

機関番号：63801

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21770172

研究課題名(和文)姉妹染色分体連結に関する出芽酵母コヒーシン複合体の構造機能解析

研究課題名(英文)Structure-function analysis of budding yeast cohesin complex involved in sister chromatid cohesion

研究代表者

西野 達哉 (NISHINO TATSUYA)

国立遺伝学研究所、分子遺伝研究部門、助教

研究者番号：50533155

研究成果の概要 (和文)：

遺伝子複製によって生じる姉妹染色分体はコヒーシン複合体により連結されている。この連結機構は真核生物において保存され、これにより姉妹染色分体は正確に娘細胞へと分配される。コヒーシン複合体は Smc 蛋白質とそれに結合する非 Smc 蛋白質より構成されるが、その構造や機能は不明な部分が多い。我々はこの複合体の構造と機能を解析する目的で高速原子間力顕微鏡を用いた。その結果、ATP 加水分解ドメイン、コイルドコイル領域、二量体形成ドメインそれぞれの構造を可視化する事が出来た。また、他の Smc 蛋白質との比較により類似のドメイン構造とが観察できるとともに、コイルドコイルの安定性の違いなど溶液中のダイナミクスを観察する事が出来た。

研究成果の概要 (英文)：

Cohesin complex is involved in holding replicated sister chromatids. Sister chromatid cohesion is conserved among eukaryotes and is required for faithful segregation of chromosomes. Cohesin complex is comprised of Smc proteins and non-Smc proteins. However, the structure-function relationship of this complex remains elusive. We have used high speed atomic force microscopy to visualize the cohesin complex. We could clearly see ATPase domain, coiled coil region and dimerization domain. We found that this domain organization is conserved among other Smc complexes and the stability of coiled coil region was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理

キーワード：構造生物学・X線構造解析・高速 AFM 姉妹染色体連結

1. 研究開始当初の背景

遺伝子複製によって生じる姉妹染色分体はコヒーシン複合体により連結されている。

この連結機構は真核生物において保存され、これにより姉妹染色分体は正確に娘細胞へと分配される。染色体連結以外にも、コヒーシ

ン複合体が転写、遺伝子修復、細胞発生や分化等にも関与することが近年明らかになってきた。特にヒトにおける遺伝病が報告され、神経細胞分化過程に重要な役割を果たしていることが示唆される。コヒーシン複合体は、Smc1、Smc3、Scc1、Scc3より構成される。これらのサブユニットはリング状の複合体を形成し、姉妹染色分体をそのリングの内側に内包すると考えられている。細胞分裂期では両極の中心体より伸長する動原微小管が染色体動原部に接着し、それぞれ自極に牽引する。姉妹染色分体連結はこの張力に拮抗して働く。両極の動原微小管がすべての染色体を捕捉し、張力バランスがとれた後、細胞は連結解除シグナルを発する。それはすなわち部位特異的蛋白質切断酵素によるScc1の切断である。Scc1の切断に伴い連結が解除され、各染色分体は娘細胞に分配される。主として酵母による遺伝学的解析により姉妹染色体連結機構に関わる因子は同定されている。またその機構についても、特に分裂期の働きについては人工的なScc1切断により連結が解除されるということ、コヒーシン複合体を人工的に環化することで2本の染色体がその内側に捉えられていることなどからコヒーシン複合体は姉妹染色分体を内包しているというコヒーシンリング仮説が最も有力となっている。一方、染色体連結確立機構であるが、Scc2-Scc4の関与、およびSmc1、Smc3のATP加水分解活性が染色体結合に必要なものであるがそれがどのように機能しているのか、また、遺伝子複製により生ずる姉妹染色分体をコヒーシンがどうやって内包し、Eco1依存的に連結確立に至るのか未だ解明されていない。

2. 研究の目的

コヒーシン複合体はSmc1、Smc3、Scc1、Scc3の4つのサブユニットより構成され、これまでにいくつかのドメインの立体構造が明らかになっている。しかし、全長複合体の原子レベルの立体構造、その機能制御および活性化機構は未だ不明である。申請者は出芽酵母コヒーシン複合体を大量調製することに成功した(Arumugam et al., Current Biology, 2006)。本申請はこれまで精製困難であったコヒーシン複合体の高速AFMを使った溶液動態解析やX線結晶構造解析を行う。

3. 研究の方法

本研究は申請者がこれまでに開発したコヒーシン複合体の発現系を利用し、高速AFMを使って溶液中の動態を解析する。コヒーシン

の機能解析は染色体やDNA結合に必要な領域を決定し、その相互作用を解明する。

4. 研究成果

コヒーシン複合体の溶液動態を調べる目的で生体分子を非染色条件下溶液中で観察できる高速AFMを使用し、解析を行った。その結果、Smc1-Smc3二量体は三つの球状ドメインが二つの紐状コイルドコイルで連結されており、激しく揺動していた(図1)。Smc蛋白質のコイルドコイル長は約50nmであったが非常に柔軟で、両端にある球状ドメインは揺れ動いていた。一方、古細菌Smcや古細菌Rad50は比較的固く、コイルドコイルはそれほど曲がらなかった(図4)。Smc1-Smc3-Scc1三量体は溶液中でリング構造をとっており(図2)、プロテアーゼによりScc1を切断した三量体はリングが開環し(図3)、Smc1-Smc3二量体と同様な形態であった。

図1 出芽酵母 Smc1-Smc3 複合体高速 AFM 像

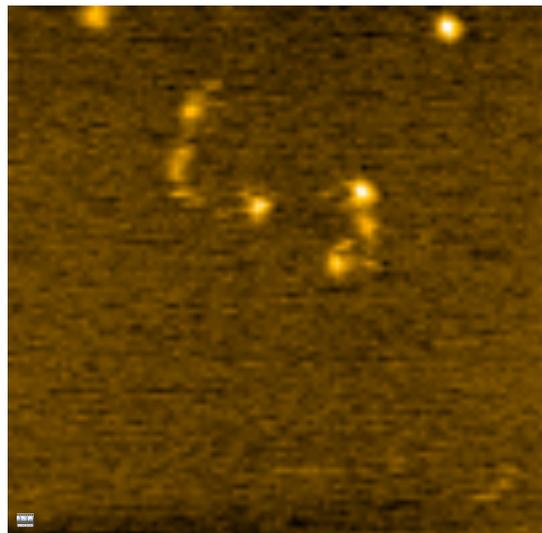


図2 出芽酵母コヒーシン複合体高速 AFM 像

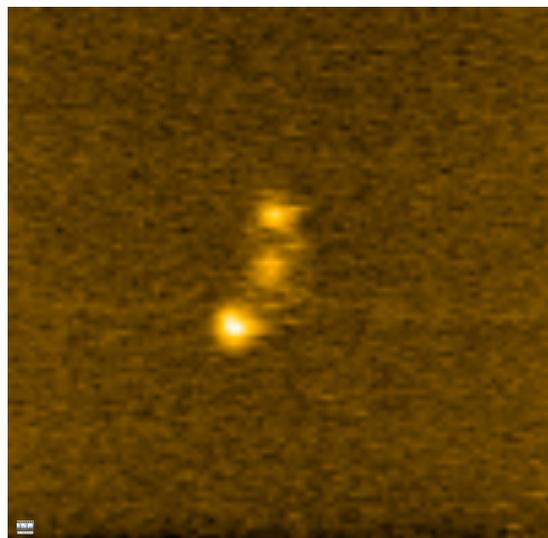
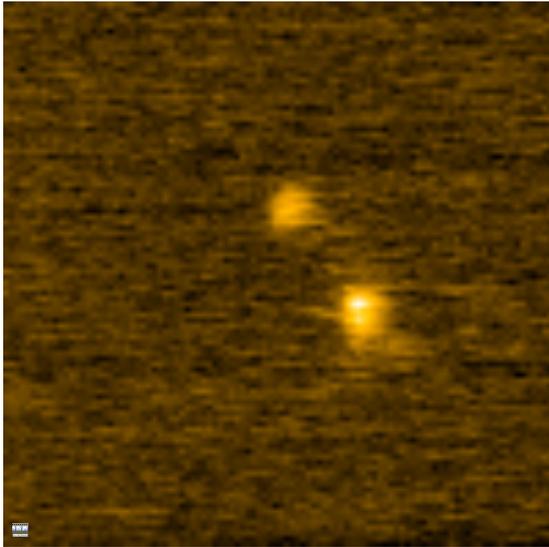
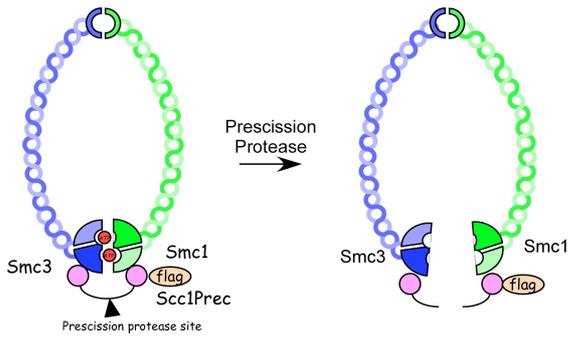


図3 出芽酵母切断コヒーシン複合体高速AFM像



また、Smc 蛋白質一群の溶液動態を比較する目的で Smc1-Smc3, Smc2-Smc4, Smc5-Smc6, 古細菌 Smc, 古細菌 Rad50 の溶液中構造を高速 AFM を使用し、解析を行った。その結果、いずれも長いコイルドコイルに球状ドメインが末端に存在するという形態は似ていた。Smc 蛋白質は全て二量体であったが、古細菌 Rad50 は溶液中で単量体であった(図4、図5)。

図4 古細菌由来 Pfu 蛋白質の高速 AFM 像

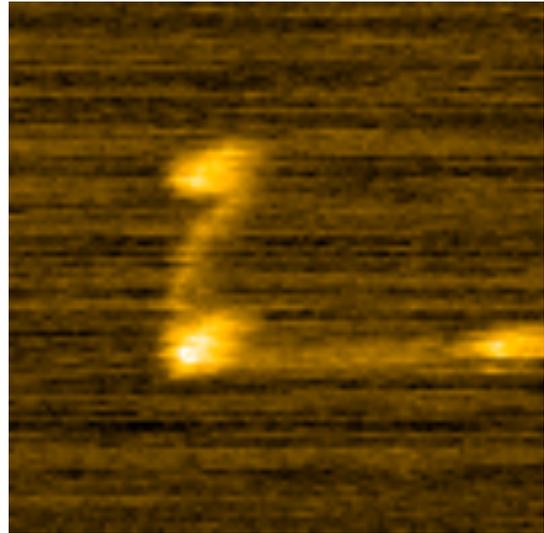
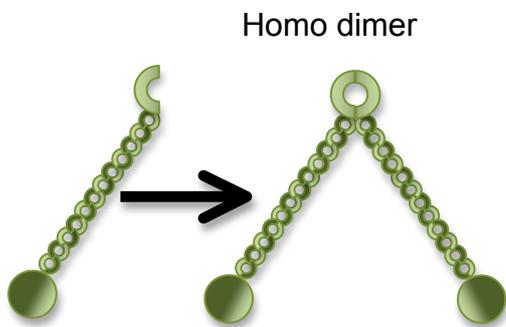
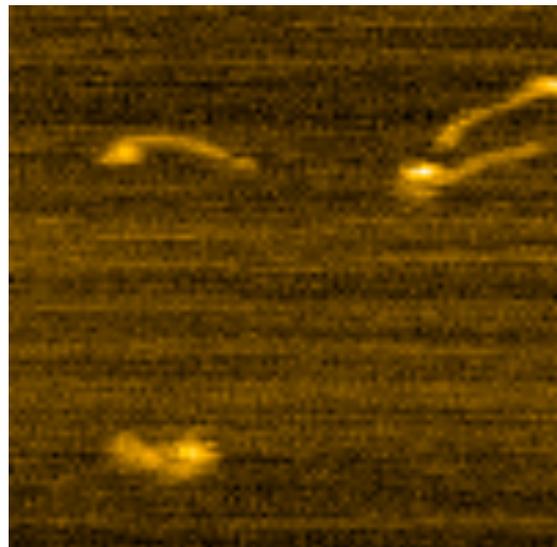
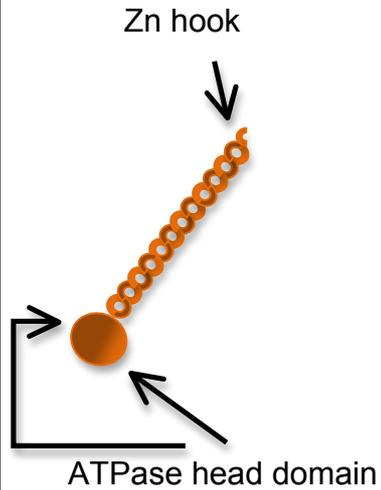


図5 古細菌由来 Rad50 蛋白質の高速 AFM 像



また Smc 蛋白質同士を比べてみると、Smc1-Smc3, Smc2-Smc4, Smc5-Smc6 二量体はいずれも似たような柔軟なコイルドコイル領域を示していたが、特に Smc1-Smc3 二量体のコイルドコイル領域は末端の ATP 加水分解ドメインのない状態ではコイルドコイルがばらけるようなものも観察できた。一方、古細菌 Smc は比較的固く、コイルドコイルはそれほど曲がらなかった。さらには ATP 加水分解ドメインを欠失したコンストラクトでもコイルドコイルを形成していた。このことから Smc 蛋白質間におけるコイルドコイルの安定性は異なっていることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Suzuki A, Hori T, Nishino T, Usukura J, Miyagi A, Morikawa K, Fukagawa T
Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins
Journal of Cell Biology, 査読有 vol.193 pp125-140, 2011

[学会発表] (計 7 件)

① B. Rowland, M. Roig, 西野達哉, K. Mechtler, K. Nasmyth
姉妹染色分体接着確立: Eco1 による Smc3 アセチル化は Pds5-Rad61-Scc3 複合体による抗確立活性に拮抗する
第 9 回日本蛋白質科学会年会、熊本、平成 21 年 5 月 20-22 日

② 西野達哉, 宮城篤, 安藤敏夫, 森川耿右, K. Nasmyth
高速 AFM による出芽酵母コヒーシン複合体の溶液動態解析
第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 21 年 12 月 9-12 日

③ T. Nishino, A. Miyagi, T. Ando, K. Morikawa, K. Nasmyth
Solution dynamics analysis of budding yeast cohesin complex by fast scanning AFM
International Symposium 'Watching Biomolecules in Action' Single Molecule Biology Symposium、大阪、平成 21 年 12 月 15-17 日

④ 西野達哉, 宮城篤, 安藤敏夫, 森川耿右, K. Nasmyth
高速 AFM による出芽酵母コヒーシン複合体の溶液動態解析
第 27 回染色体ワークショップ、御殿場、平成 22 年 1 月 20-22 日

⑤ 西野達哉, 宮城篤, 安藤敏夫, 森川耿右, K. Nasmyth
高速 AFM による Smc 蛋白質複合体の溶液中動態解析
第 10 回日本蛋白質科学会年会、札幌、平成 22 年 6 月 16-18 日

⑥ Tatsuya Nishino, Aussie Suzuki, Tetsuya Hori, Atsushi Miyagi, Kosuke Morikawa, and Tatsuo Fukagawa
Solution dynamics and Structural biochemistry of the vertebrate kinetochore complex:
High-speed AFM imaging and in vivo behavior of CENP-T/CENP-W complex
HFSP annual meeting
平成 22 年 10 月 30 日-11 月 5 日

⑦ 竹内康造, 堀哲也, 西野達哉, 立和名博昭, 越阪部晃永, 胡桃坂仁志, 深川竜郎
DNA 結合活性を有する CCAN 蛋白質群の機能解析
第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、平成 22 年 12 月 7-10 日

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/MolGene/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 達哉 (NISHINO TATSUYA)

国立遺伝学研究所、分子遺伝研究部門、助教

研究者番号: 50533155