

# 染色体構築を担うタンパク質複合体の X 線結晶構造解析 Structural analysis of various protein complexes in chromosome formation

原幸大\*, 橋本博

静岡県立大学薬学部

〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1

Kodai Hara\* and Hiroshi Hashimoto

School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8526, Japan

## 1 はじめに

染色体構築は DNA 複製後、姉妹染色分体の接着、染色体凝縮という 2 つのステップを経て行われ、娘細胞に等価な遺伝情報を持つ姉妹染色分体を分配するために重要である。これらの機構の崩壊は、細胞のがん化や小頭症、ダウン症などの遺伝性疾患発症との関連性が示唆される。従って、染色体構築に関与するタンパク質群の立体構造解析は、染色体の接着や凝縮、分配過程を標的とした新規抗がん剤などの創出が期待できる。

本年度は、染色体分配を担う **chromosome alignment-maintaining phosphoprotein (CAMP)** と **Mitotic arrest deficient 2-like protein 2 (MAD2L2)** の複合体に着目し、その複合体の立体構造と相互作用を X 線結晶構造解析により明らかにした [1]。

## 2 実験

ヒト由来 MAD2L2 を N 末端 His タグ融合タンパク質として CAMP と大腸菌 BL21 (DE3) で共発現させ、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製した。その後、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムグラフィーを用いて高純度に精製した。精製した MAD2L2-CAMP 複合体を用いて結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶を用いて、PF BL-17A で回折強度データを収集した。その後、MAD2L2 をサーチモデルとした分子置換法 (プログラム PHASER) により位相決定、モデル構築 (プログラム Coot) と構造精密化 (プログラム PHENIX) を行い、最終構造を得た。

## 3 結果および考察

MAD2L2-CAMP 複合体の結晶化スクリーニングを行った結果、ギ酸ナトリウムを沈殿剤として含む結晶化条件 (Form-I) と PEG3350 を沈殿剤として含む結晶化条件 (Form-II) で共結晶が得られ、それぞれ 2.1 Å、2.3 Å 分解能の回折強度データを収集した。Form-I の空間群は *I*422、格子定数は  $a = b = 106.5$  Å、 $c = 127.4$  Å、非対称単位中に 1 つの MAD2L2-CAMP 複合体が含まれていることが溶媒含量から推測された。Form-II の空間群は *C*2、格子定数は  $a = 71.03$  Å、

$b = 70.56$  Å、 $c = 45.13$  Å、 $\beta = 90.29^\circ$ 、非対称単位中に 1 つの MAD2L2-CAMP 複合体が含まれていることが溶媒含量から推測された。その後、MAD2L2 をサーチモデルとした分子置換法により位相決定を行い、CAMP の明瞭な電子密度を確認した。モデル構築と精密化を行い、最終構造を得た (Form-I: *R*-work = 19.7%、*R*-free = 22.6%; Form-II: *R*-work = 21.9%、*R*-free = 22.7%)。

Form-I の複合体構造では、MAD2L2 のシートベルトと呼ばれる領域を介した CAMP との相互作用がみられた。MAD2L2 と CAMP の相互作用を詳しくみたところ、CAMP のアミノ酸配列中に含まれる WK モチーフ (W: トリプトファン、K: リジン) が MAD2L2 と疎水性相互作用、及び水素結合を形成していた。これまで MAD2L2 のシートベルトは PXXXPP モチーフ (P: プロリン、X: 全アミノ酸) を疎水性相互作用により認識することが知られていたが、MAD2L2 のシートベルトを介した多様なアミノ酸配列認識機構が新たに明らかとなった。また、Form-II では MAD2L2 の C 末端領域が対称分子の C 末端領域とスワップして相互作用し、MAD2L2-CAMP ヘテロ四量体を形成していた。この構造は MAD2L2 が CAMP と複合体を形成する際の間媒体構造であると考えられ、本研究により MAD2L2 の中間体構造がはじめて明らかとなった。

## 参考文献

[1] K. Hara *et al.*, *J. Biol. Chem.* **292**, 17658-17667 (2017)

## 謝辞

PF のビームラインスタッフの方々には回折データ収集を行うにあたり、大変お世話になりました。心より感謝致します。また、MAD2L2-CAMP 複合体の調製と結晶化を中心となり行った田原迫奨大さん (静岡県立大学薬学部)、CAMP の細胞生物学的解析を行って頂いた田中耕三教授 (東北大学加齢医学研究所) と研究室の方々にお礼を申し上げます。

\* khara@u-shizuoka-ken.ac.jp