

3R&3C を担うタンパク質の X 線結晶構造解析 Structural analysis of various proteins in 3R&3C

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

DNA 修復, 複製, 組換え (3R) や染色体, クロマチン, 細胞周期 (3C) に関わるタンパク質は細胞が等価な遺伝情報を保ちながら増殖していく上で重要な役割を持つ。これらの機構の崩壊は、がんや遺伝病などの発症につながるため、3R や 3C に関わるタンパク質の構造情報はこれらのタンパク質を標的とした新規抗がん剤などの創出に役立つ。

我々はこれまでに染色体接着に関わるコヒーシンの non-SMC サブユニット (SA2-RAD21 複合体) や染色体整列に関わる REV7-CAMP, DNA 修復に関わる DNA ポリメラーゼ ζ (REV7-REV3 複合体) と REV1 の複合体の立体構造とタンパク質間相互作用を明らかにしてきた。

本年度は、染色体凝縮を担うコンデンシン I の non-SMC サブユニット (CAP-G-H 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 CAP-G を N 末端 His タグ融合タンパク質として CAP-H と大腸菌 BL21 (DE3) で共発現させ、ヘパリンカラムを用いて精製した。その後、イオン交換カラム, ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて高純度に精製した。精製した CAP-G-H 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、金化合物を浸漬した重原子同型置換体結晶を調製し、単波長異常散乱法 (プログラム *Phenix AutoSol wizard*) 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.refine*) を行い、最終構造を得た。

3 結果および考察

CAP-G-H 複合体の結晶化スクリーニングを行った結果、PEG3350 を沈殿剤として含む結晶化条件で共結晶が得られ、3 Å 分解能の回折共同データを収集した。空間群は $P2_1$, 格子定数は $a = 122.4$ Å, $b = 61.9$ Å, $c = 130.9$ Å, $\beta = 93.4^\circ$, 非対称単位中に 2 つの CAP-G-H 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、単波長異常散乱法により位相決定を行い、CAP-G-H 複合体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 ($R_{\text{work}} = 21.2\%$, $R_{\text{free}} = 27.1\%$)。

CAP-G-H 複合体の全体構造は弦鳴楽器のハープのようなかたちを形成していた。CAP-G は 19 個の HEAT リピートを含んでおり、N 末端から C 末端にかけて CAP-H と幅広い疎水性相互作用を形成していた。CAP-H の 3 つの芳香族アミノ酸 (F463, F469, F473) が CAP-G の疎水性ポケットに結合しており、これらの残基をアラニンに置換した変異体では結合能が著しく低下した。次に、以前報告された酵母ホモログと DNA の複合体構造と比較したところ、コンフォメーションに違いがみられた。ヒトホモログでは連なった HEAT リピートが「開いた構造」を形成するのに対して、DNA に結合した酵母ホモログでは CAP-H の F502, F504 (ヒトホモログの F501, Y503 に相当) が CAP-G と疎水性相互作用を形成することで DNA 結合に適した「閉じた構造」を形成していた。また、これらの 5 つのアミノ酸残基を介した相互作用を欠損させた変異体では、異常に伸長した染色体を形成した。コンデンシン I の non-SMC サブユニットが染色体凝縮に必須であることを明らかにした。

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、CAP-G-H 複合体の調製と結晶化, 変異体作製, 相互作用解析を中心となり行った右田智子さん (静岡県立大学薬食生命科学総合学府), 村上慧さん (同大学薬学部), 清水研一郎さん (同大学薬学部), コンデンシン I の細胞生物学的解析を行って頂いた平野達也主任研究員 (理化学研究所) と研究室の方々にお礼を申し上げます。

参考文献

[1] K. HARA *et al.*, *EMBO Rep.* **20**, e47183 (2019).

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