

染色体構築とゲノム維持の分子メカニズム解明に向けた構造研究 Structural study for the molecular understanding of chromosome assembly and genome maintenance

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 Science, University of Shizuoka

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

1 はじめに

染色体構築とゲノム情報の維持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であり、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。従って、染色体を形作り、DNA 損傷からゲノムを守るタンパク質の構造基盤は、生命活動の根幹をなすタンパク質間相互作用やタンパク質-核酸相互作用を原子レベルで説明できるだけでなく、それらを標的とした新規抗がん剤や腫瘍マーカーの開発につながる。

今回はゲノム維持に重要な機構の一つである、DNA 損傷チェックポイントの活性化因子 RAD9, HUS1, RAD1-interacting nuclear orphan protein 1 (RHINO) と RAD9-HUS1-RAD1 (9-1-1) の複合体の X 線結晶構造解析を報告すると共に、今後の展望について述べる [1]。

2 実験

ヒト由来 HUS1 の N 末端側に His タグを融合した組換えタンパク質と RAD1, RAD9 の組換えタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) で共発現させた。菌体を破碎し、遠心後、上清をヘパリンカラム、陰イオン交換カラム、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 9-1-1 と RHINO (45-64) の合成ペプチドをモル比 1 : 10 で混合し、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、9-1-1 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

9-1-1-RHINO (45-64) 複合体の結晶化スクリーニングを行なった結果、ポリエチレングリコール 3350 (PEG3350) を沈殿剤として含む結晶化条件で共結晶が得られ、2.4 Å 分解能の回折強度データを収集した。空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 52.9$ Å、 $b = 136.1$ Å、 $c = 154.0$ Å、非対称単位中に 1 つの 9-1-1-

RHINO (45-64) 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、9-1-1 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、RHINO 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 -work = 21.8%、 R -free = 25.8%)。

9-1-1-RHINO (45-64) 複合体の構造解析から、9-1-1 と RHINO は 1 : 1 : 1 : 1 のストイキオメトリーからなる複合体を形成することが明らかとなった。また、複合体構造から、RHINO は RAD1 サブユニットに特異的に結合しており、HUS1, RAD9 サブユニットとは立体障害を起こすため結合することができない。具体的には、RAD1 の K155, R244, Q254 を介した静電相互作用と、RAD1 の F64, M256, F266 などの疎水性アミノ酸残基を介したファンデルワールス相互作用がみられた。RAD1 サブユニットへの K155A/R244A/Q254A 変異や F64A/M256A/F266A 変異が RHINO の 9-1-1 結合能を著しく低下させており、これらの相互作用がサブユニット特異的な相互作用に重要であることを裏付けた。

一方で、RHINO は 9-1-1 の RAD9 サブユニットにも結合することが知られているが、その構造情報はまだ得られていない。今後、RAD9 との相互作用に重要な RHINO のアミノ酸配列を特定し、RHINO との相互作用の全容解明に向けて構造解析を進める。

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、9-1-1 の調製を行った櫻井ひとみさん (静岡県立大学薬学部)、内藤麻里菜さん (同)、結晶化を中心となり行った飯田奈央さん (同)、変異体の調製を行った玉舟亮太くん (静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府)、9-1-1 と RHINO の相互作用解析を行って頂いた大橋英治講師 (九州大学大学院理学研究院) にお礼を申し上げます。

参考文献

[1] K. Hara *et al.*, *J. Biol. Chem.* **295**, 899-904 (2020).

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