

チェックポイントクランプと RHINO ペプチドの複合体の構造解析 Structural analysis of the checkpoint clamp bound to a RHINO peptide

原幸大*, 橋本博

静岡県立大学薬学部, 〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 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

生物が細胞分裂する際、遺伝情報を正しく娘細胞に伝えていくために、ゲノム DNA は様々なタンパク質の力を借りて、染色体と呼ばれる高次構造体を形成する。染色体は細胞分裂の際に、紡錘糸により DNA が均等に分離するための物理的強度を与えるために形成されると考えられる。従って、染色体の形成を担うタンパク質や DNA 損傷からゲノムを守るタンパク質の構造情報は、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抗がん剤や腫瘍マーカーの開発につながる。

本稿では、多くのがん細胞で亢進がみられる DNA 損傷チェックポイント経路の損傷センサーとして働くチェックポイントクランプ (RAD9-HUS1-RAD1; 9-1-1) の新たな構造的知見を紹介する [1]。

2 実験

N 末端側に His タグを付加したヒト由来 HUS1, RAD1 変異体 (F64A/M256A/F266A), RAD9 の組換えタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) で共発現させた。菌体を超音波破碎し、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精製した。精製した 9-1-1 変異体と RHINO (88-99) 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) による位相決定とモデル構築 (プログラム Coot), 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

著者らは以前、9-1-1 とチェックポイント活性化因子 RHINO (45-64) の合成ペプチドの複合体の X 線結晶構造解析を行い、RAD1 サブユニットと RHINO (45-64) 間の相互作用を解明した (Hara *et al.* *JBC*, 2020)。一方で、RHINO は RAD1 に加え、RAD9 サブユニットとも相互作用することが報告されているが、その相互作用メカニズムは不明であった (Lindsey-Boltz *et al.* *Cell Cycle*, 2025)。大橋ら (共同研究者) により、RAD9 の C 末端に存在する疎水性アミノ酸や芳香族アミノ酸に富んだ領域が RAD9

の PCNA 様ドメインと分子内相互作用することが報告された (Takeishi *et al.*, *JBC*, 2015)。この配列は RHINO (88-99) にも保存されていることから、この領域の合成ペプチドを用いて、共結晶化スクリーニングを行ったが、結晶は得られなかった。次に、9-1-1 の RAD1 サブユニットの F64, M256, F266 をアラニンに置換した変異体を調製して、結晶化条件の再探索を行った。この変異体は、RAD1 のパートナータンパク質が結合するポケットを壊した変異体であり、野生型とは異なる晶系の結晶が得られる。その結果、PEG3350 を沈殿剤として含む条件で 9-1-1 変異体 (F64A/M256A/F266A) と RHINO (88-99) の複合体の結晶が得られ、2.81 Å 分解能の回折強度データが収集できた。空間群は $P2_1$ 、格子定数は $a = 71.1$ Å, $b = 69.9$ Å, $c = 83.9$ Å, $\beta = 97.3$ Å であり、9-1-1 をサーチモデルとした分子置換法により RHINO の明瞭な電子密度が得られた。その後、RHINO のモデル構築と精密化を行い、最終構造を得た (R -work = 21.5 %, R -free = 26.6 %)。RHINO の F91, L94, F96 が RAD9 の PCNA 様ドメインのポケットに刺さるように結合していた。これらの芳香族アミノ酸と疎水性アミノ酸残基は RAD9 の C 末端でも保存されており、RHINO (88-99) と RAD9 の C 末端は競合的に RAD9 の PCNA 様ドメインに結合すると考えられる。9-1-1 は通常は RAD9 の C 末端と分子内相互作用をしており、チェックポイント活性化の際に RHINO が結合することで分子内相互作用が遮断され、損傷部位へとリクルートされるのだろう。このようにすることで、予期しないチェックポイントの活性化を防いでいるのかもしれない。

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。また、9-1-1 の結晶化を中心となり行った永田季穂さん (静岡県立大学薬学部)、飯田奈央さん (同)、9-1-1 の相互作用解析を行った達川純介さん (九州大学システム生命科学府)、研究を進める上で多大なご助言を頂いた大橋英治准教授 (長浜バイオ大学バイオサイエンス学部) にお礼を申し上げます。

参考文献

[1] K. Hara *et al.*, *J. Biol. Chem.* **300**, 105751 (2024).

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