

コンデンシン I における HEAT-kleisin 相互作用の構造生物学的研究

原 幸大, 橋本 博

1. はじめに

DNAはヒトが生きていくために必要な遺伝情報を記憶した記録媒体である。ヒトの場合、一つの細胞の中に存在するDNAはすべてつなぎあわせると約2mの長さにまで及ぶ。このとてつもなく長いDNAは間期に直径約10 μ mほどの細胞核内に収納され、続く分裂期で1万分の1の長さまで凝縮されることで棒状の染色体構造に変換される。染色体凝縮の意義は分裂後期における染色体分配を行うための物理的強度を染色体に与えることにある。そのため、ヒトにおける染色体凝縮の機能不全は染色体の分離異常を起し、ゲノムの不安定化に起因するがんや小頭症などの遺伝性疾患の発症を招く。染色体凝縮において主要な役割を担うSMC (structural maintenance of chromosomes) タンパク質複合体として、コンデンシンが理化学研究所平野達也主任研究員らにより1997年に発見された¹⁾。コンデンシンは原核生物から真核生物まで広く存在し、真核生物型は二つのSMC, kleisin (ギリシア語で閉鎖を意味する kleisimo が由来)、二つのHEAT (Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A A subunit, target of rapamycinで見いだされた構造モチーフ) リpeatサブユニットで構成される約700kDaのリング型巨大複合体である²⁾。これまでさまざまな生物種間で保存されたSMCサブユニットに着目した細胞生物学や生化学、構造解析が行われ、ATPアーゼ活性を利用したSMC複合体のリング構造の開閉制御メカニズムへの理解が進んだ^{3,4)}。一方で、原核生物には存在せず、真核生物だけが持つHEATリpeatサブユニットによる染色体の動態制御は不明な点が多い。

本稿では、著者らによる構造解析により明らかとなった

コンデンシン I における HEAT-kleisin 相互作用と分裂期の染色体凝縮における機能を中心に⁵⁾、最近の知見を交えて紹介する。

2. コンデンシン I のサブユニット構成

コンデンシンは染色体凝縮を担うSMC複合体であり、真核生物ではコンデンシン I とコンデンシン II が存在する。他のSMC複合体として染色体接着を担うコヒーシン、DNA複製や修復、染色体分配に関わるSMC5/6などが知られる⁶⁾。

コンデンシン I はSMC2/4をコアサブユニットとして持ち、ヒンジドメインを介してヘテロ二量体を形成し、kleisinサブユニットの両末端とSMC2/4が相互作用することでDNAを内包できる環状構造を形成する(図1A)。またATP結合とADPへの加水分解により生じるコンホメーション変化を通じて、DNA結合と解離を行う点が他のSMC複合体との共通の特徴としてあげられる。一方で、SMC複合体はそれぞれ固有のnon-SMCサブユニットを持ち、これらのnon-SMCサブユニットはkleisinにぶら下がるように結合する。すなわち、コンデンシン I・IIは二つのHEATリpeatサブユニットを持つが(図1A)、コヒーシンはHEATリpeatサブユニットを一つだけ持つ。SMC5/6や真正細菌や古細菌などの原核生物のコンデンシンはHEATリpeatに代わりKITE (kleisin interacting winged-helix tandem elements) サブユニットを持つ。これらのnon-SMCサブユニットの違いにより、SMC複合体の生化学的特性が特徴づけられ、SMC複合体間での機能的な違いを生じさせる。近年、コンデンシンやコヒーシンのHEATリpeatサブユニットが染色体凝縮や転写などの機能制御を行う上で欠くことのできないクロマチンループの形成に重要な役割を果たすことが報告された^{7,8)}。

3. コンデンシン I の CAP-G-H サブコンプレックスの全体構造と相互作用

コンデンシンの構造解析はこれまで大腸菌や枯草菌などの原核生物型のATPアーゼドメインを中心とした構造解析が行われており^{3,4)}、真核生物型の構造解析は組換えタンパク質の調製や結晶化の困難さからほとんど進んで

静岡県立大学薬学部 (〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1)

Structural study of the interaction between HEAT repeats and kleisin subunit of human condensin I

Kodai Hara and Hiroshi Hashimoto (Department of Physical Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920801

© 2020 公益社団法人日本生化学会

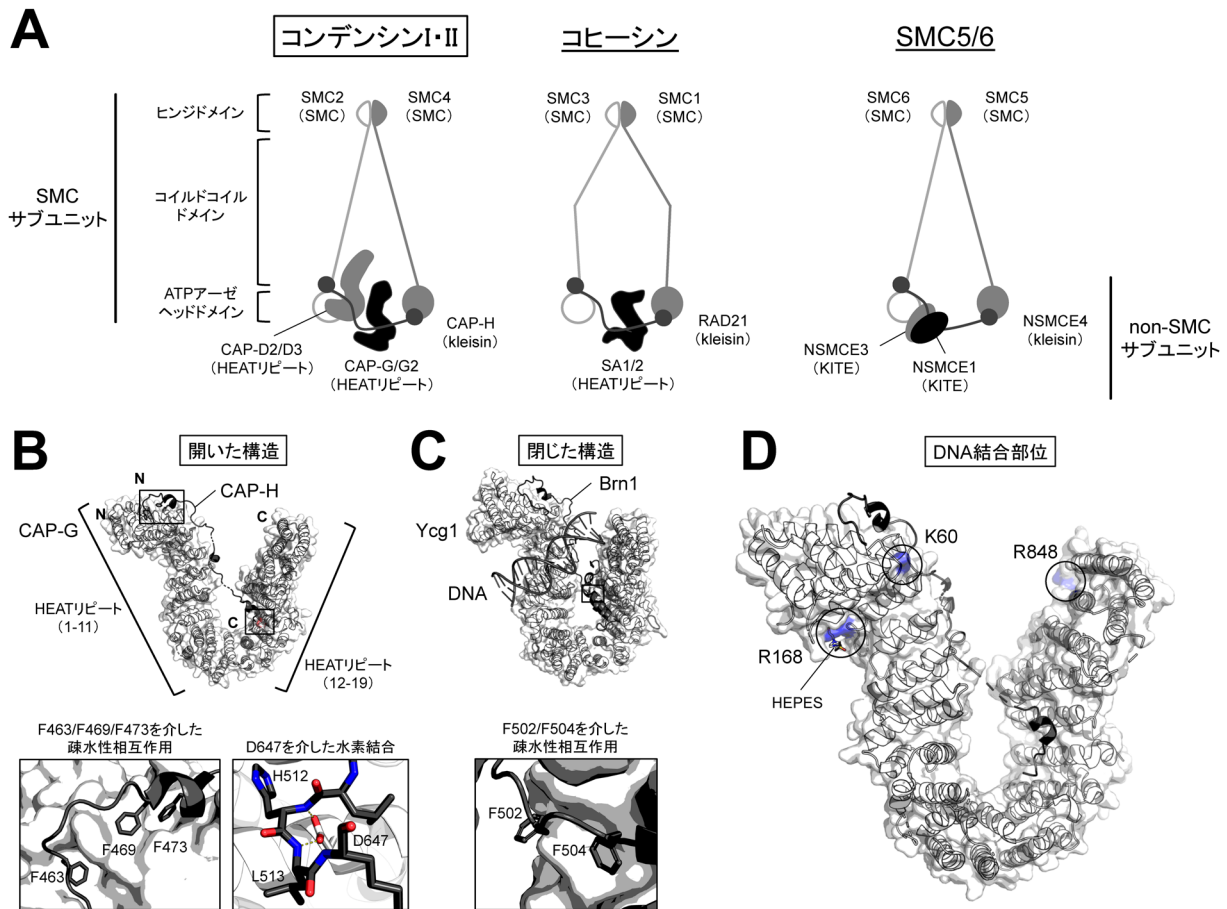


図1 コンデンシンIのサブユニット構成とCAP-G-Hサブコンプレックスの構造

(A) SMC複合体のサブユニット構成. 左から順に, コンデンシンI・II, コヒーシン, SMC5/6を示す. それぞれのSMCサブユニットはヒンジ, コイルドコイル, ATPアーゼヘッドドメインからなる. non-SMCサブユニットはSMC複合体特異的であり, HEAT-kleisin, もしくはKITE-kleisinからなる. (B) CAP-G-Hサブコンプレックスの結晶構造 (PDB 6IGX). CAP-G, CAP-Hをそれぞれリボン-サーフィス図(白), リボン図(黒)で作成した (PyMOL). CAP-G-HはN末端とC末端のHEATリピートドメインが離れた「開いた構造」を形成していた. 下の差し込み図はCAP-GとCAP-Hの疎水性相互作用, および水素結合を示す. (C) Ycg1-Brm1サブコンプレックス (出芽酵母ホモログ)の結晶構造 (PDB 5OQP). Ycg1, Brm1, DNAをそれぞれリボン-サーフィス図(白), リボン図(黒), リボン図(灰)で示す. Ycg1-Brm1はN末端とC末端のHEATリピートドメインが近づき, 「閉じた構造」を形成していた. 下の差し込み図はYcg1とBrm1の疎水性相互作用を示す. (D) CAP-G-HサブコンプレックスのDNA結合部位. CAP-G-HのDNA結合部位を黒い線の丸, HEPESをスティックモデルで示す.

いない. そこで, 著者らはコンデンシンIの真核生物型特有のHEATリピートサブユニットに着目し, CAP-G-H (chromosome-associated protein G-H) サブコンプレックスの構造解析に着手した. まず, CAP-H内のCAP-G相互作用領域をマッピングし, 大腸菌を用いた共発現系によりCAP-G-Hサブコンプレックスの組換えタンパク質を調製したが, 結晶は得られなかった. 次に, 二次構造予測サーバー PrDOSにより, CAP-Gの二次構造予測を行ったところ, N, C末端のHEATリピートドメインをつなぐ中央のリンカー領域, およびC末端領域に100アミノ酸程度のディスオーダー領域が予測された. そこでこれらの領域を欠損させた変異体を調製したところ, X線回折実験に適した

良好な結晶が得られた. その後, 重原子を結合させたデリバティブ結晶を調製し, 単波長異常分散法を用いることで, CAP-G-Hサブコンプレックスの構造解析に成功した (PDB 6IGX)⁵⁾. CAP-G-Hサブコンプレックス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 (図1B). CAP-Gの構造は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とCAP-Gの複数の相互作用の中で特に重要なアミノ酸残基を特定するためにアミノ酸配列アライメントを行ったところ, 生物種間で保存されたCAP-Hの五つの芳香族アミノ酸残基 (F463, F469, F473, F501, Y503) を同

定した。これらのうち三つのアミノ酸残基 (F463, F469, F473) はCAP-Gの疎水性ポケットに結合していた (図1B)。これら三つのフェニルアラニンをグルタミンやアラニンに置換した変異体を作製し、Niビーズを用いたプルダウンアッセイによりCAP-Gとの相互作用を調べたところ、結合が著しく低下した。一方で、残りの二つのアミノ酸残基 (F501, Y503) は明瞭な電子密度を確認できず、グルタミン置換やアラニン置換による結合の低下はみられなかった。以前報告された酵母ホモログのDNA複合体構造 (PDB 5OQP)⁹⁾ と比較したところ、コンホメーションに違いがみられた。すなわち、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HEATリピートが「閉じた」構造を形成していた (図1C)。酵母ホモログでは、ヒトホモログのF501, Y503に相当するF502, F504がCAP-Gと疎水性相互作用を形成することでコンホメーションを閉じさせていた (図1C)。F501, Y503はCAP-Gとの相互作用に必須ではないが、DNAと結合したのち、コンホメーション変化を起こしたCAP-Gにホックをかける機能を持ち、DNA結合を維持する上で役立つと考えられる。

CAP-G-Hサブコンプレックスのもう一つの興味深い相互作用として、CAP-Gの酸性アミノ酸残基 (D647) とCAP-Hの主鎖 (H512とL513) との間に形成された水素結合がある (図1B)。この酸性アミノ酸残基を介した水素結合はCAP-Gのオルソログ間だけでなく、コヒーシンのHEATリピートサブユニットでも保存されており、染色体接着における必須の相互作用として知られる¹⁰⁾。実際に、D647をリシンに置換するとCAP-Hとの相互作用が有意に低下した。CAP-HのH512, L513を含む領域を欠損させても同様の結果が得られたことから、D647を介した水素結合は染色体凝縮における重要な相互作用である可能性が示唆される。

4. CAP-G-HサブコンプレックスのDNA結合部位の同定

CAP-G-HサブコンプレックスのDNA結合部位を同定するために、DNAとの相互作用をゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、CAP-G単独ではDNA結合能を持たないが、CAP-Hと複合体を形成することでDNAとの相互作用が可能になることが明らかとなった。CAP-G-H相互作用によりDNA結合に重要なインターフェースが形成されることは明瞭である。次に、CAP-G-HとDNAとの相互作用が生物種間で保存されているか検証するために、CAP-G酵母ホモログでDNA結合に重要なアミノ酸残基⁹⁾に相当する二つの塩基性アミノ酸残基 (K60, R848) を酸性アミノ酸残基 (それぞれアスパラギン酸、およびグル

タミン酸) に置換した変異体を調製し、DNAとの相互作用を調べた。その結果、この変異体はDNAとの相互作用を顕著に減少させたことからDNA結合部位は生物種間で保存されていると考えられる (図1D)。一方で、結晶構造中でHEPESが結合していたCAP-GのR168をグルタミン酸に置換した変異体でもDNA結合能が減少した (図1D)。R168はDNAが結合するための十分な空間を持たず、保存されたDNA結合部位からも離れたところに位置する。このことから、CAP-GがR168を介してDNAに結合する際、コンホメーション変化を起こすことが示唆される。

5. CAP-G-H相互作用は適切な染色体凝縮に必須である

CAP-G-Hサブコンプレックスの形成とそれに伴い生じるDNAとの相互作用が染色体凝縮に重要であるか調べるために、アフリカツメガエルの卵抽出液を用いた染色体再構成アッセイを用いた¹¹⁾。このアッセイではアフリカツメガエル卵抽出液に、組換えタンパク質で再構成したコンデンシンIを添加し、精子核のクロマチンが分裂期染色体を形成できるか調べることができる。内在性のコンデンシンIを除去し、再構成したコンデンシンI (野生型) を添加すると適切な分裂期染色体が形成されるが、CAP-Gを欠損した再構成コンデンシンI (CAP-G欠損型) では異常に伸長した染色体を形成する (図2)。これはCAP-Gの欠損により、コンデンシンIによるクロマチンループの形成不全

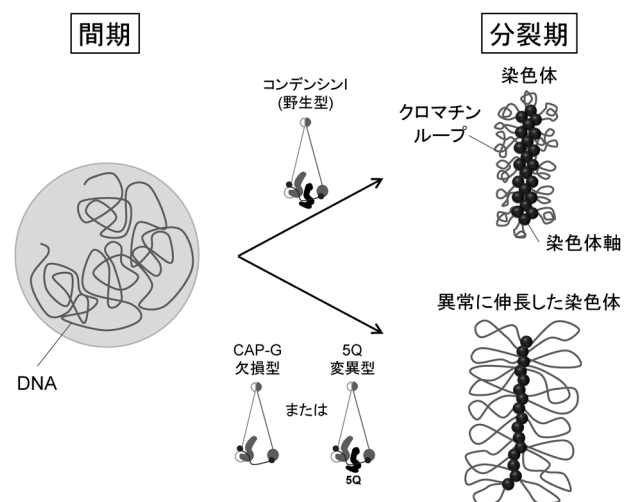


図2 コンデンシンIのCAP-G-Hサブコンプレックスの染色体凝縮における役割

間期に核内に収納されたDNAは、コンデンシンI (野生型) の働きによりクロマチンループを形成し、分裂期に凝縮された染色体を構築する。CAP-Gサブユニットを欠損させたコンデンシンI (CAP-G欠損型) や、CAP-GがCAP-Hと相互作用できないコンデンシンI (5Q変異型) ではクロマチンループの形成不全が生じ、染色体軸が異常に伸長した染色体を構築する。

が生じるためである。次に、CAP-G-Hサブコンプレックス形成とDNAとの相互作用の安定化に重要な五つの芳香族アミノ酸残基 (F463, F469, F473, F501, Y503) をグルタミン置換した再構成コンデンシンI (5Q変異型) を用いたところ、CAP-G欠損型と同様の表現型がみられた (図2)。これらの結果は、コンデンシンIにおけるHEAT-kleisin相互作用が適切な染色体凝縮に必須であることを示している。

6. おわりに

本研究では、CAP-G-Hサブコンプレックスの構造を決定し、染色体凝縮におけるクロマチンループの形成にCAP-G-H相互作用が必須であることを示した⁵⁾。また、生理機能は不明だが、CAP-G-Hサブコンプレックスは二本鎖DNAだけでなく、一本鎖DNAに対しても結合親和性を持つことをあわせて示した。コンデンシンIは転写の際に生じる一本鎖DNAを二本鎖DNAに巻き戻し、染色体凝縮を誘導することから¹²⁾、HEATリピートサブユニットはこの活性にも関与しているのかもしれない。

アフリカツメガエル卵抽出液を用いたアッセイではもう一つのHEATリピートサブユニットであるCAP-D2を欠損させると、染色体軸へのコンデンシンIの局在が阻害され、染色体上にランダムに点在するように局在するが、その作用機序は明らかとなっていない¹¹⁾。CAP-D2の酵母ホモログの構造が報告され、CAP-D2がSMC4のATP結合を競合阻害することが明らかとなったが¹³⁾、上述の問いへの十分な答えは得られていない。最近、コヒーシン/ローダー/DNA複合体のクライオ電子顕微鏡 (EM) 構造解析により、HEATリピートサブユニットとSMCサブユニットのヒンジドメインが相互作用することで、コヒーシンが環状から折りたたまれたコンホメーションへ構造変換される構造基盤が明らかとなった¹⁴⁾。この驚くべきクライオ電顕像はコヒーシンがDNAローディングされる際に起こすコンホメーション変化を見事に捉えていた。コンデンシンIの二つのHEATリピートサブユニットの染色体凝縮における役割と、他のSMC複合体との機能的な区別をはっきりさせる上で、コンデンシンI/DNA複合体のクライオEM構造解析に期待したい。

また、コヒーシンがATP非依存的にDNAをクラスター化し、このコヒーシンとDNAからなるクラスターは液-液相分離特有の可逆性を持つことが示された¹⁵⁾。SMC複合体によるATP依存的なクロマチンループの形成と、ATP非依存的なDNAのクラスター化がどのように絡み合いながら染色体高次構造を構築していくのか、今後の研究の動向に目が離せない。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、理化学研究所平野達也主任研究員、木下和久専任研究員らとの共同研究成果となります。多大なご指導、ご助言を賜り、感謝申し上げます。また、一緒に研究を進めてくれた研究室の学部生、および大学院生達に深く感謝いたします。

文 献

- Hirano, T., Kobayashi, R., & Hirano, M. (1997) Condensins, chromosome condensation complex containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein. *Cell*, **89**, 511–521.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., & Hirano, T. (2003) Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*, **115**, 109–121.
- Woo, J.S., Lim, J.H., Shin, H.C., Suh, M.K., Ku, B., Lee, K.H., Joo, K., Robinson, H., Lee, J., Park, S.Y., et al. (2009) Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions. *Cell*, **136**, 85–96.
- Bürmann, F., Shin, H.C., Basquin, J., Soh, Y.M., Giménez-Oya, V., Kim, Y.G., Oh, B.H., & Gruber, S. (2013) An asymmetric SMC-kleisin bridge in prokaryotic condensin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 371–379.
- Hara, K., Kinoshita, K., Migita, T., Murakami, K., Shimizu, K., Takeuchi, K., Hirano, T., & Hashimoto, H. (2019) Structural basis of HEAT-kleisin interactions in the human condensin I subcomplex. *EMBO Rep.*, **20**, e47183.
- Wells, J.N., Gligoris, T.G., Nasmyth, K.A., & Marsh, J.A. (2017) Evolution of condensin and cohesin complexes driven by replacement of Kite by Hawk proteins. *Curr. Biol.*, **27**, R17–R18.
- Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., & Dekker, C. (2018) Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science*, **360**, 102–105.
- Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I.J., & Yu, H. (2019) Human cohesin compacts DNA by loop extrusion. *Science*, **366**, 1345–1349.
- Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., & Haering, C.H. (2017) Structural basis for a safety-belt mechanism that anchors condensin to chromosomes. *Cell*, **171**, 588–600.e24.
- Hara, K., Zheng, G., Qu, Q., Liu, H., Ouyang, Z., Chen, Z., Tomchick, D.R., & Yu, H. (2014) Structure of cohesin subcomplex pinpoints direct shugoshin-Wapl antagonism in centromeric cohesion. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 864–870.
- Kinoshita, K., Kobayashi, T.J., & Hirano, T. (2015) Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. *Dev. Cell*, **33**, 94–106.
- Sutani, T., Sakata, T., Nakato, R., Masuda, K., Ishibashi, M., Yamashita, D., Suzuki, Y., Hirano, T., Bando, M., & Shirahige, K. (2015) Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. *Nat. Commun.*, **6**, 7815.
- Hassler, M., Shaltiel, I.A., Kschonsak, M., Simon, B., Merkel, F., Thärigen, L., Bailey, H.J., Macošek, J., Bravo, S., Metz, J., et al. (2019) Structural basis of an asymmetric condensin ATPase

cycle. *Mol. Cell*, **74**, 1175–1188.e9.

- 14) Shi, Z., Gao, H., Bai, X.C., & Yu, H. (2020) Cryo-EM Structure of the human cohesin-NIPBL-DNA complex. *Science*, **368**, 1454–1459.

- 15) Ryu, J.K., Bouchoux, C., Liu, H.W., Kim, E., Minamino, M., Groot, R.D., Katan, A.J., Bonato, A., Marenduzzo, D., Michieletto, D., et al. (2020) Phase separation induced by cohesin SMC protein complexes. *bioRxiv*.

著者寸描

●原 幸大 (はら こうだい)



静岡県立大学薬学部講師。博士（理学）。

■略歴 2005年3月東京農業大学応用生物科学部卒業。10年3月横浜市立大学大学院国際総合科学研究科修了。同年4月米国ミネソタ大学ポスドク。11年7月テキサス大学ポスドク。14年1月静岡県立大学助教。18年10月より現職。

■研究テーマと抱負 クロマチン構造形成や機能制御を担うタンパク質の構造生

物学。タンパク質間相互作用やタンパク質-核酸相互作用の破綻が引き起こすがんや遺伝性疾患の発症メカニズムの解明を目指す。

■ウェブサイト <https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bukka/>

■趣味 水泳、スキー、キャンプ、ドライブ、ウイスキー。

●橋本 博 (はしもと ひろし)



静岡県立大学薬学部教授。博士（工学）。

■略歴 1995年3月大阪大学工学部卒業。2000年3月大阪大学大学院工学研究科修了。同年4月日本学術振興会特別研究員。01年4月横浜市立大学大学院助手。07年4月同助教。12年4月同准教授を経て13年4月より現職。

■研究テーマと抱負 タンパク質は特定の機能を発現するために驚くほど巧く作

られているとつくづく思う。タンパク質が担う生命機能のメカニズムを結晶構造から明らかにしていきたい。その先に普遍的な原理を垣間見られたら僥倖である。

■ウェブサイト <https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bukka/>