

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	脊椎動物由来コンデンシン I の機能未知ドメインの構造と機能の解明				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大
	研究分担者	所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大

講演題目

脊椎動物だけが持つコンデンシン I の機能未知ドメインの調製と結晶化

研究の目的、成果及び今後の展望

本研究の目的は、脊椎動物由来コンデンシン I の機能未知ドメインの結晶構造を決定し、染色体の再構成系を用いた構造機能相関解析を通して、菌類のモデルでは説明できない脊椎動物特有の染色体凝縮の作用機序を原子レベルで明らかにすることにある。コンデンシン I はヒトをはじめとする脊椎動物の分裂期染色体を構成する主要なタンパク質複合体であり、リング状構造を呈するコアサブユニット (SMC2、SMC4、CAP-H) と制御サブユニット (CAP-G、CAP-D2) で構成される巨大タンパク質複合体である。これまでにコンデンシンは全ての生物種で保存されたコアサブユニットの生化学や細胞生物学、構造解析が中心に行われ、染色体凝縮における共通原理の理解が進んだ。一方で、制御サブユニットは生物進化の過程で生じたゲノムサイズの長大化や胚発生に適應するために、そのトポロジーを多種多様に変化させてきた。近年、菌類ホモログの構造解析が行われ、コンデンシン I の制御サブユニットの機能が徐々に明らかになってきたが、脊椎動物ホモログの構造的知見はほとんど得られていない。申請書はヒトをはじめとする脊椎動物ホモログの制御サブユニットのアミノ酸配列中に“菌類には保存されていない”機能未知ドメインを見出した。このドメインの結晶構造を明らかにし、染色体凝縮を理解する新規プローブとすることで、染色体凝縮が生物進化をどのように支えてきたのか、生命起源の理解に迫る。

今年度はヒト由来 CAP-G の機能未知ドメイン、及び CAP-D2 の機能未知ドメインの調製と結晶化に重点を置いた。具体的には、アミノ酸配列アライメントの結果から脊椎動物で高度に保存され、菌類には保存されていない CAP-G と CAP-D2 の機能未知ドメインの調製と結晶化条件を探索した。これらの機能未知ドメインは、AlphaFold3 (DeepMind 社) によりそれぞれコイルドコイル様ドメインとヘリックスバンドルからなる球状ドメインとして構造予測されており、菌類には存在せず、脊椎動物だけが持つことが示唆される。目的タンパク質を 6×His タグを融合した組換えタンパク質として、大腸菌発現系で過剰発現させた。その後、種々のカラムクロマトグラフィーを用いて高純度に精製した。タンパク質結晶化用自動分注装置 Gryphon を用いて結晶化スクリーニングを実施し、現在、結晶化プレートを観察中である。今後、得られた結晶を用いてつくばの放射光実験施設 Photon Factory にて X 線回折実験とデータ収集を行い、予測構造をサーチモデルとした分子置換法により構造解析を行う。結晶が得られない場合は、タンパク質を脱塩して調製、あるいは低温で結晶化することでタンパク質の溶解度を変化させて結晶化条件を再探索する。