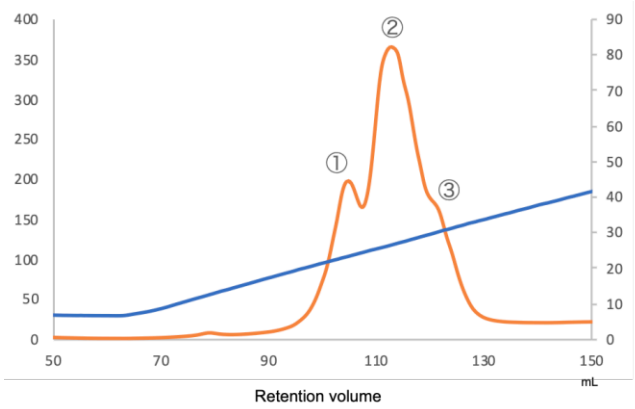
138　減数分裂に関わるHORMAD1の構造生物学的研究	菊池　壮太郎

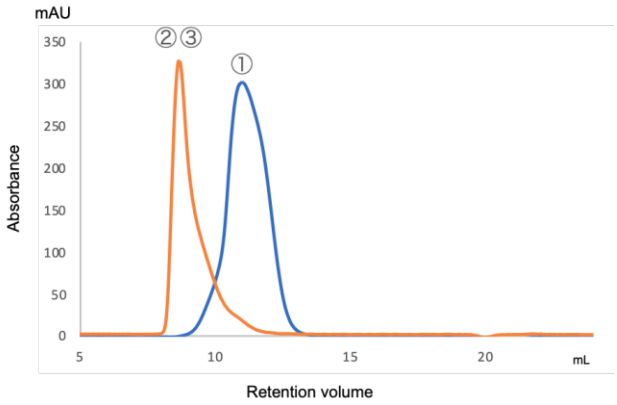
【目的】減数分裂はヒトを含む有性生殖を行う高等真核生物にみられる特殊な細胞分裂の様式であり、ゲノム多様性を生じさせつつ次代へとゲノム情報を継承していくために重要な機構である。遺伝的な多様性は、相同染色体同士の組換えと、組換えられた配偶子が娘細胞へと分配されることで紡がれていくが、染色体分配に異常が起きると、Down 症候群やKlinefelter症候群などの染色体異常疾患、また不妊症や早期の流産をひき起こすことが知られている。HORMAD1は減数分裂において、染色体の軸構造の形成に関わるタンパク質であり、DNA の二重鎖切断を引き起こす Spo11 を染色体にリクルートすることで組換えを制御している。HORMAD1 を欠損したマウスは多くの染色体不対合が観察され、また、トリプルネガティブ乳がん（TNBCs）においては HORMAD1 の発現量の増加が報告されている。染色体にどのようなメカニズムで HORMAD1 が局在・機能するかは不明な点が多く、姉妹染色分体の接着を担うコヒーシン複合体との相互作用も示唆されている。HORMAD1 は HORMA ファミリーに属しているが HORMAD1 の構造は未だ報告されていない。本研究ではヒト HORMAD1 の分子構造を X 線結晶構造解析によって明らかにし、減数分裂における HORMAD1 の構造基盤を得ることを目的とする。

【方法】大腸菌発現システムを用いてヒト HORMAD1 を発現誘導し、クロマトグラフィーシステムを用いて高純度な HORMAD1 を精製した。精製した HORMAD1 を用いて結晶化スクリーニングを行った。また、コヒーシンサブユニットである Smc3-Scc1 を調製し、HORMAD1 との相互作用を *in vitro* プルダウンアッセイにより確認した。

【結果】様々な条件で結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることができなかった。イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによって HORMAD1 が溶液中で単量体と多量体の状態で存在していることを明らかにした。またコヒーシンサブユニット Smc3 との相互作用を確認したところ、結合は見られなかった。HORMAD1 の構造解析に向けて、単量体として安定する変異やコンストラクトのさらなる探索や昆虫細胞発現系を用いた発現システムの構築を検討している。

溶液中において多量体を形成する HORMAD1





138. 減数分裂に関わる HORMAD1 の構造生物学的研究

菊池　壮太郎

奈良県立医科大学 医学部 未来基礎医学

Key words：HORMAD1，減数分裂，シナプトネマ複合体，コヒーシン

緒　言

減数分裂はヒトを含む有性生殖を行う高等真核生物にみられる特殊な細胞分裂の様式であり、ゲノム多様性を生じさせつつ次代へとゲノム情報を継承していくために重要な機構である（図 1A）。遺伝的な多様性は、相同染色体同士の組換えと、組換えられた配偶子が娘細胞へと分配されることで紡がれていく。この染色体分配に異常が起きると、Down 症候群や Klinefelter 症候群などの染色体異常疾患、また不妊症や早期の流産をひき起こすことが知られている。この減数分裂における相同染色体の組換えには、DNA の二重鎖切断と DNA 修復が重要な役割を果たしている。HORMAD1 は減数分裂において、染色体の軸構造の形成に関わるタンパク質であり、DNA の二重鎖切断を引き起こす Spo11 を染色体にリクルートすることで組換えを制御している。染色体の対合が正常に完了すると、HORMAD1 は染色体から遊離され、これにより DNA の二重鎖切断が停止される。HORMAD1 を欠損したマウスは多くの染色体不対合が観察され［1］、また、トリプルネガティブ乳がん（TNBCs）においては HORMAD1 の発現量の増加が報告されている［2］。しかしながら染色体にどのようなメカニズムで HORMAD1 が局在・機能するかは不明な点が多く、姉妹染色分体の接着を担うコヒーシン複合体との相互作用も示唆されている。この HORMAD1 は、HORMA ドメインという構造的に特徴のあるドメインを持つ。HORMA ドメインはタンパク質間相互作用のモジュールとして働くことが明らかにされて来ており、シートベルト構造とよばれる特徴的な構造を有しており、リガンドとでシートベルト部分を介して複合体を形成する（図 1B）［3］。HORMA ファミリータンパク質は減数分裂、体細胞分裂におけるスピンドルチェックポイント、DNA 組換え修復、オートファジーなど、その機能は多岐に渡る［4〜6］。本研究対象である HORMAD1 は Hop1 のホモログにあたるが、その構造は報告されていない。本研究ではヒト HORMAD1 の分子構造を X 線結晶構造解析によって明らかにし、減数分裂における HORMAD1 の構造基盤を得ることを目的とする。

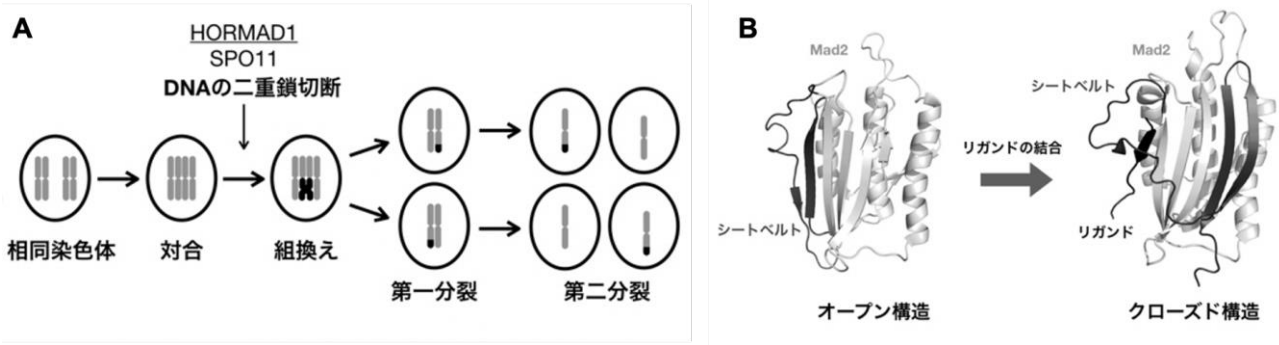


図 1. 減数分裂における染色体の分配と、HORMA ドメインのシートベルト構造

A) HORMAD1 は減数分裂の際に Spo11 をリクルートし、組換え時の DNA 二重鎖切断を制御する。

B) HORMA ファミリータンパク質 Mad2 のシートベルト構造。Mad2 をはじめとし、HORMA ファミリーはシートベルト構造と呼ばれる構造を持ち、リガンドと結合することでシートベルトの構造変化を起こす。

方　法

1. ヒトHORMAD1発現コンストラクトの作製と精製条件の検討

結晶構造解析に用いるため、HORMAD1の試料調製を行った。まずヒト由来HORMAD1のN末端にヒスチジンタグまたはGSTを付加したコンストラクトを作製し、大腸菌BL21（DE3）にタンパク質を発現させた。その後、TEVプロテアーゼまたはPreScissionプロテアーゼによりタグを切断し、その後、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを用いて高純度のHORMAD1の精製を行った。

2. HORMAD1の結晶化スクリーニング

精製した高純度のHORMAD1溶液を用いて、X線実験のための結晶化スクリーニングを行った。用いたスクリーニングキットはCrystal Screen、PEGRx、PEG/Ion（Hampton Research社）で、計288条件で結晶化を検討した。結晶化に用いたHORMAD1は5 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mLの濃度条件でスクリーニングを行った。

3. ヒトコヒーシンサブユニットとの相互作用解析

大腸菌発現系にコドンを最適させたSmc3ヘッドドメイン（HD）とRec8の遺伝子を合成し（IDT社）、共発現用のベクターpETDuet-1のマルチクローニングサイト1と2それぞれにSmc3HDとRec8（1〜200）を組み込んだ。Smc3HDのN末端側にヒスチジンタグが付加されており、大腸菌BL21（DE3）をホストとしてタンパク質を共発現させ、Niアフィニティ精製を行った。精製したSmc3HDとGST-HORMAD1を混合し、GSTビーズに供して洗浄を行い、ビーズに結合したタンパク質をSDS−PAGEで分離しCBB染色により確認した。

結果および考察

1. ヒトHORMAD1は溶液中で多量体を形成する

ヒトHORMAD1の全長について、ヒスチジンタグを付加することで高純度に精製することに成功した。しかしながら、結晶化スクリーニングでは結晶を得ることができなかった。HORMAD1は自身のC末端領域にHORMAドメインの結合モチーフを有していることから、溶液中でHORMAD同士が多量体を形成し、さまざまな会合状態を取り、不均一な状態を取っていることが結晶化に影響を与えているのではないかと考えられた。タンパク質の結晶化には、均一な状態であることが望ましい。陰イオン交換カラムに供した際の溶出プロファイルを見ると、3種類のピークの混在が観察された（図2）。

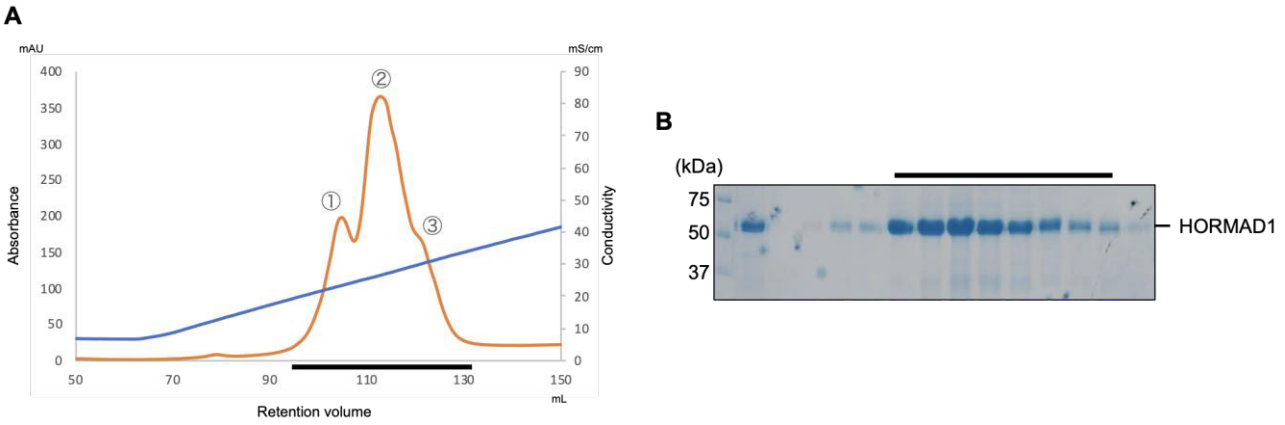


図2. イオン交換クロマトグラフィーにおけるHORMAD1の溶出プロファイル

A) Niアフィニティ精製後の陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出プロファイル。3つのピーク①〜③が確認できた。

B) 溶出プロファイルの黒線部を回収し、SDS-PAGEゲル。すべてのピークがHORMAD1由来であることが確認できた。

このピークをそれぞれ分離し、ゲル濾過カラム（Superdex75 10/300GL）に供することでそれぞれのピークの HORMAD1 がどのような会合状態で存在しているかを調べた（図 3）。その結果、イオン交換カラムで見られた 1 番目のピーク①は単量体と推定される溶出位置に溶出された。対して、他の二つのピーク②、③は単量体とみられる溶出位置には溶出せず、多量体とみられる位置に溶出が見られ、少なくとも三量体以上であることが推定された。これらをそれぞれ分離精製し、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。発現誘導した段階で HORMAD1 は単量体の状態と多量体の状態が混在していることから、単量体で精製してきたとしても時間経過で多量体と単量体の平衡状態に遷移することが考えられる。したがって構造解析に向けた HORMAD1 の結晶を得るには、今後単量体として安定するような変異やコンストラクトを探索していく必要がある。

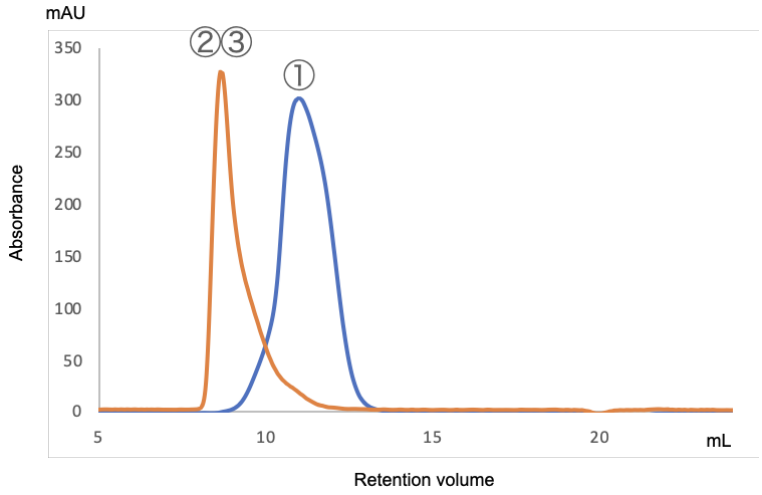


図 3. ゲル濾過クロマトグラフィーにおける HORMAD1 の溶出プロファイル
イオン交換カラムで分離したピークをそれぞれ別々に回収しゲル濾過クロマトグラフィーに供した。青のピークが①由来のもの、オレンジのピークが②③由来のピーク。

2. コヒーシンと HORMAD1 の相互作用

次に、HORMAD1 とコヒーシンが相互作用するかどうかを *in vitro* プルダウンアッセイによって確認した。まず体細胞分裂型コヒーシン Smc3-Scc1 複合体との相互作用を GST プルダウンによって確認したが結合は見られなかった。次に、減数分裂型 Rec8 の調製を検討したが、大腸菌発現系での発現系を構築することができなかった。Rec8 の N 末端領域は二次構造予測では構造を取っておらず、非常に不安定であると考えられる。体細胞分裂型コヒーシンと同様に、減数分裂型コヒーシンも昆虫細胞発現系のようなより高等な発現システムを用いる必要があると考えられる。近年、体細胞型コヒーシンの巨大分子複合体の構造が報告されており［7，8］、その構造基盤が得られてきたが、減数分裂型コヒーシンの構造はいまだに明らかになっていない。今後減数分裂におけるコヒーシンをはじめ、HORMAD1 がどのようにその染色体分配を制御しているかを構造学的に明らかにすることは、減数分裂というメカニズムを理解するためにも非常に重要な課題であると考える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、静岡県立大学生命物理化学教室の橋本博教授と原幸大講師との共同研究として進めて参りました。深く御礼申し上げます。そして、本研究を遂行するにあたり、助成賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

文 献

1) Kogo H., Tsutsumi M., Ohye T., Inagaki H., Abe T., Kurahashi H. HORMAD1-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. Genes Cells. Jun;17(6):439-54. 2012 Epub 2012 Apr 25. PMID: 22530760 DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01600.x

2) Watkins J., Weekes D., Shah V., Gazinska P., Joshi S., Sidhu B., Gillett C., Pinder S., Vanoli F., Jasin M., Mayrhofer M., Isaksson A., Cheang C. U. M., Mirza H., Frankum J., Lord J. C., Ashworth A., Vinayak S., Ford M. J., Telli L. M., Grigoriadis A., Tutt N.J. A. Genomic Complexity Profiling Reveals That HORMAD1 Overexpression Contributes to Homologous Recombination Deficiency in Triple-Negative Breast Cancers. Cancer Discov. 2015 May;5(5):488-505. Epub 2015 Mar 13.doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1092. Epub 2015 Mar 13. PMID: 25770156 PMCID: PMC4490184 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-1092

3) Luo X., Tang Z., Xia G., Wassmann, Matsumoto T., Rizo J., Yu H. The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states.Nat Struct Mol Biol. 2004 Apr;11(4):338-45. Epub 2004 Mar 14 PMID: 15024386 DOI: 10.1038/nsmb748

4) Kim Y., Rosenberg C. S., Kugel L. C., Kostow N., Rog O., Davydov V., Su Y. T., Dernburg F. A., Corbett D. K. The chromosome axis controls meiotic events through a hierarchical assembly of HORMA domain proteins. Dev. Cell. 2014 Nov 24;31(4):487-502. Epub 2014 Nov 6. PMID: 25446517 PMCID: PMC4254552 DOI: 10.1016/j.devcel.2014.09.013

5) Jao C. C., Ragusa J. M., Stanley E. R., Hurley H. J. A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013 Apr 2;110(14):5486-91. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23509291 PMCID: PMC3619307 DOI: 10.1073/pnas.1220306110

6) Hara K., Hashimoto H., Murakumo Y., Kobayashi S., Kogame T., Unzai S., Akashi S., Takeda S., Shimizu T., Sato M. Crystal structure of human REV7 in complex with a human REV3 fragment and structural implication of the interaction between DNA polymerase zeta and REV1. J. Biol. Chem. 2010 Apr 16;285(16):12299-307. Epub 2010 Feb 17. PMID: 20164194 PMCID: PMC2852969 DOI: 10.1074/jbc.M109.092403

7) Higashi L. T., Eickhoff P., Sousa S. J., Locke J., Nans A., Flynn R. H., Snijders P. A., Papageorgiou G., O'Reilly N., Chen A. Z., O'Reilly J. F., Rappsilber J., Costa A. and Uhlmann F.: A Structure-Based Mechanism for DNA Entry into the Cohesin Ring. Mol. Cell. 2020 Sep 17;79(6):917-933.e9. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32755595 PMCID: PMC7507959 DOI: 10.1016/j.molcel.2020.07.013

8) Shi Z., Gao H., Bai XC., Yu H.: Cryo-EM structure of the human cohesin-NIPBL-DNA complex. Science.2020 Jun 26;368(6498):1454-1459. Epub 2020 May 14. PMID: 32409525 DOI: 10.1126/science.abb0981