113 SMC複合体のDNAループ押し出しを停止させる機構の解明

京都大学 大学院工学研究科 合成・生物化学専攻 生物化学講座 生物化学工学分野　　竹俣　直道

【目的】Structural Maintenance of Chromosomes（SMC）複合体は広く保存されたゲノム構造化因子であり、ATPase活性をもつ巨大なリング状の構造をとる。SMC複合体は、ATPのエネルギーを用いて自身のリング構造中にDNAループを押し出していく（ループ押し出し）ことでゲノムを折り畳む。真核生物では、このループ押し出しが特定のDNA結合タンパク質（以下ロードブロック因子と呼ぶ）によって止められることでゲノムの構造と機能が制御されることが判明しつつある。例えば、真核生物のロードブロック因子はコヒーシンというSMC複合体のループ押し出しを停止させることで、停止領域を境界とするTopologically Associating Domain（TAD）という染色体ドメイン構造を形成する。また、このドメイン構造は遺伝子発現の制御などに関わることが示唆されている。このような知見が得られつつあるものの、ロードブロック因子がSMC複合体のループ押し出しを停止させる機構については未だ不明な点が多い。我々は、真核生物の起源になった原核生物「アーキア」のモデル生物である超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* を研究する過程で、このアーキアのゲノムがTADに似たドメイン構造を形成することを明らかにした。また、TAD様ドメインの形成に必要な因子として、原核型SMC複合体の一種であるSmc-ScpABと、DNAの剛性を上げる働きをもつDNA結合タンパク質であるTrmBL2を同定した。本研究では、「TrmBL2がSmc-ScpABを停止させるロードブロック因子として働くことでTAD様ドメインを形成する」という仮説のもと、その検証を目指した。

【方法】TrmBL2がSmc-ScpABをTAD様ドメインの境界領域で停止させているかを検証するため、Smc-ScpABのサブユニットの1つであるSmcと、TrmBL2に対してポリクローナル抗体を作製し、これらを用いてゲノムワイドクロマチン免疫沈降（ChIP-seq）を実施した。また、TrmBL2によるDNA剛直化がSmc-ScpABの停止と関連するかを検証するため、組換えTrmBL2を用いた生化学実験ならびに、TrmBL2-DNA複合体の原子間力顕微鏡（AFM）解析を行った。

【結果】ChIP-seqを行った結果、TAD様ドメインの境界領域の一部においてSmcとTrmBL2が共局在していることが確かめられた。また、*trmBL2*破壊株ではこの領域へのSmcの蓄積がみられなくなったことから、TrmBL2が予想通りドメイン境界でSmc-ScpABを停止させていることが示唆された。興味深いことに、TrmBL2はドメイン境界以外の約90ヶ所のゲノム領域でもSmc-ScpABの停止を引き起こしていた。その一方で、これらの非境界領域ではSmc-ScpABが弱くしか蓄積していなかったことから、TrmBL2によるSmc-ScpABの停止が特に効率よく起こる場合にのみ境界構造が形成されることが示唆された。ChIP-seqデータをもとに停止効率と相関する因子を探索したところ、停止領域に存在するAトラクト配列の頻度が停止効率と正の相関を示すことがわかった。Aトラクトは曲がりにくいDNA構造を形成する配列として知られていることから、このようなDNA物性とTrmBL2によるDNAの剛直化が協調的に働くことでSmc-ScpABを停止させることが示唆された。続いて、TrmBL2がSmc-ScpABの停止領域でDNAの剛直化を引き起こすかを検証するため、組換えTrmBL2タンパク質と、相補的な一本鎖オーバーハングを末端にもつ停止領域DNA配列を混合し、停止領域DNA配列が末端での相補鎖形成によってループ構造を形成するかを検証した。その結果、組換えTrmBL2の添加によってループの形成が阻害される、つまりDNAが曲がりにくくなることがわかった。このことから、TrmBL2が特定領域でDNAの剛性を上げることでSmc-ScpABを停止する可能性が裏付けられた。現在はTrmBL2によるDNAの剛直化を直接可視化するため、TrmBL2と停止領域DNA配列の複合体構造をAFMで解析している（遺伝研・村山准教授との共同研究）。

【考察】本研究により、アーキアが真核生物と同様SMC複合体とロードブロック因子に依拠したドメイン構造を形成すること、またこの機構にDNAの物性が関わるという意外な可能性が明らかとなった。この成果は、未だ謎の多いSMC複合体の停止機構とその意義についてユニークかつ重要な洞察をもたらすと期待される。

【発表】

1）Yamaura, K., Takemata, N., Kariya, M. *et al.* Chromosomal domain formation by archaeal SMC, a roadblock protein, and DNA structure. *Nat Commun* 2025 Feb 19;16(1):1312. PMID: 39971902 DOI: 10.1038/s41467-025-56197-y