

# ゲノムの安定維持にはたらく 染色体構築タンパク質の生化学的解析

17D2-002 讓原 秀隆

## 1. セレン単波長異常分散法を用いたヌクレオソームの構造決定

**【研究目的】** 真核生物のゲノム DNA はクロマチンと呼ばれる高次構造体を形成した状態で、細胞核の中に存在する。クロマチンの基本単位はヌクレオソームであり、ヌクレオソームは4種類のヒストン (H2A, H2B, H3, H4) を2分子ずつ含むヒストン8量体に約150 bpのゲノムDNAが巻きついたタンパク質-DNA複合体である。ヌクレオソームはゲノムDNAの核内での凝縮と収納に重要である一方で、クロマチンの構造変化を引き起こす因子を呼び込むためのプラットフォームとして機能している。ヌクレオソームは多彩な翻訳後修飾を受けることがわかっており、それによって様々な因子がヌクレオソームと結合し、ヌクレオソームの構造を変化させることが考えられている。しかし、ヌクレオソームの構造多様性については、原子レベルではほとんど解明されていない。本研究では、多様なヌクレオソーム構造を明らかにするために必要と考えられる技術の開発を行った。

**【実験方法】** 多様なヌクレオソーム構造を明らかにする方法を確立するために、セレン原子で標識したヒストンを含むヌクレオソームのX線結晶構造解析を行った。ヒストンの標識には大腸菌のメチオニン要求株を用いた。この株にヒトヒストンの発現ベクターを導入し、セレンメチオニンを含む培地で培養することにより、セレン原子で標識されたヒストンをリコンビナントタンパク質として得ることに成功した。ヌクレオソームの再構成には塩透析法を用い、結晶化にはハンギングドロップ法を用いた。ヌクレオソームの結晶はPhoton Factory放射光施設(高エネルギー・つくば市)にて測定した。得られたX線回折データは、*XDS*、*Phenix*及び*Coot*プログラムを用いて解析し、単波長異常分散法(SAD法)により構造を決定した。

**【結果および考察】** 多様なヌクレオソーム構造を明らかにするためには、既知のヌクレオソーム構造の情報を用いずに構造解析する必要性が考えられる。本研究では、ヒストンH3, H2A, 及びH2Bにセレン原子を導入し、セレン原子から得られる異常分散の情報をもとに通常型のヌクレオソーム構造を決定した。最終的に、H2AとH2Bそれぞれに1ヶ所ずつメチオニン点変異を導入した点変異体(H2A L65M, H2B L106M)を用い、合計12個のセレン原子の異常分散の情報をもとに2.5 Å分解能のヌクレオソーム構造を決定した。また、H2AとH2Bそれぞれに2ヶ所ずつメチオニン点変異を導入した点変異体(H2A L65M/L85M, H2B L101M/L106M)を用い、合計16個のセレン原子の異常分散の情報をもとに2.4 Å分解能のヌクレオソーム構造を決定す

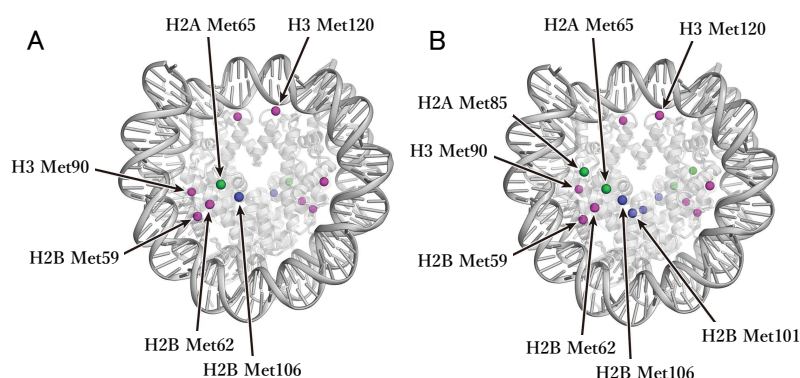


図1 セレン原子で標識した  
ヌクレオソームの立体構造

A) 12個のセレン原子で構造決定したヌクレオソーム。

B) 16個のセレン原子で構造決定したヌクレオソーム。

ることにも成功した (図 1)。決定した構造を既知のヌクレオソーム構造と比較したところ、構造が高度に類似していたことから導入されたセレン原子はヌクレオソームの構造に大きな影響を及ぼさないことが考えられた。

【まとめ】 本研究では、多様なヌクレオソーム構造を明らかにするための技術の開発を行った。セレン原子を導入したヒストンを含むヌクレオソームの構造決定に成功し、セレン原子から得られる情報のみからヌクレオソームの X 線結晶構造解析を行うことができることを立証した。本研究で確立した技術は多様なヌクレオソームを構造解析する上で、重要になることが考えられる。

## 2. 分裂酵母 Bqt1-Bqt2 複合体の X 線結晶構造解析のための異種タンパク質融合の検討

【研究目的】 減数分裂は、真核生物を特徴づける重要な生命現象の一つである。減数分裂の過程で、相同染色体は一本ずつ別々の娘細胞に分配される。これまでの研究により、減数分裂初期に、染色体の末端 (テロメア) が核膜上の一カ所に集合したテロメアクラスターと呼ばれる集合体が形成されることが分かっている (図 2)。テロメアクラスターは、出芽酵母やヒトなど多くの真核生物で見られ、相同染色体の正確な対合と分配に重要であるが、テロメアクラスターの詳細な立体構造や形成メカニズムは未だ明らかにされていない。これらを明らかにするために、本研究では分裂酵母でテロメアの核膜への固定化において中心的に働く Bqt1-Bqt2 複合体に着目した。先行研究で、Bqt1-Bqt2 複合体は可溶性が低く、大量調製が困難であることが明らかにされているため、そのままの状態では大量の試料を必要とする構造解析に適さないことが予想される。そこで、Bqt1-Bqt2 複合体の詳細な立体構造を解析するために、Bqt1 と Bqt2 を安定な複合体として大量調製する方法を検討した。

【実験方法】 構造解析に適した Bqt1-Bqt2 複合体を調製するために、分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* Bqt1-Bqt2 複合体に異種タンパク質を融合することを検討した。異種タンパク質として、マルトース結合タンパク質の構造ホモログ Athe\_0614 及び Athe\_0579 を用い、それぞれを Bqt1 の N 末端に融合した。さらに、それらのタンパク質と Bqt1 をつなぐポリペプチドリンカーの検討も行った。ポリペプチドリンカーとして、Gly-Ser, Ala-Ala, 及び 56 アミノ酸残基からなる 3-helix bundle を用いた。異種タンパク質が融合された複合体を大腸菌内で大量発現させた後、Ni アフィニティークロマトグラフィー、His<sub>6</sub>-tag の切除、陽イオン交換クロマトグラフィーの三段階で精製した (図 3)。精製した複合体の立体構造の均一性は、超遠心分析およびゲルろ過解析により調べた。

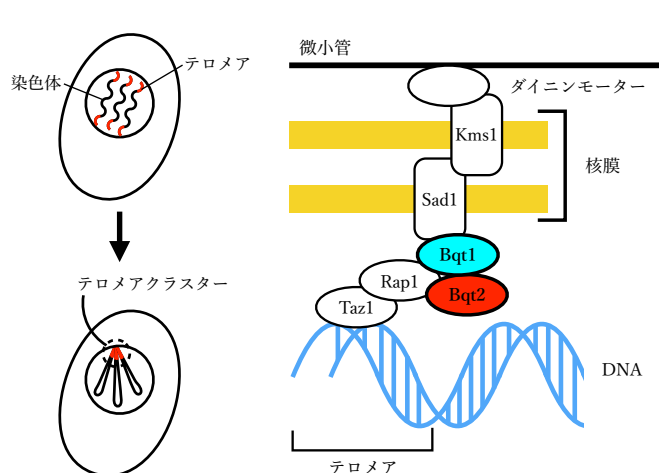


図 2 テロメアを核膜に固定化するタンパク質複合体のモデル図

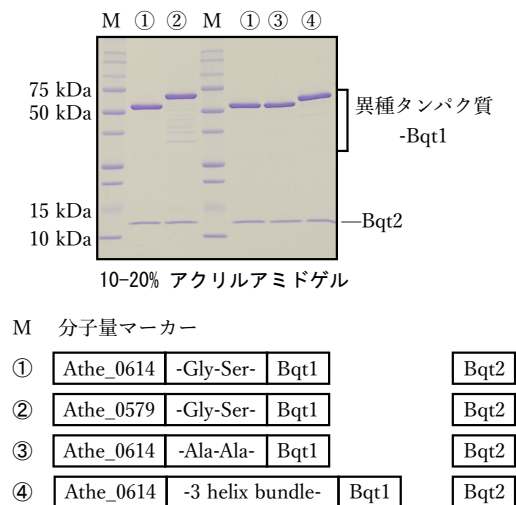


図 3 異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体の最終精製物

## [結果および考察]

### 1. 融合する異種タンパク質の検討

過去の研究で、可溶性が低く X 線結晶構造解析が困難なタンパク質に、可溶性が高く安定な立体構造を有する異種タンパク質を融合することにより、構造解析に成功した例がある。Bqt1-Bqt2 複合体の可溶性を向上させるために、異種タンパク質をそれぞれ Bqt1 の N 末端に融合し、Bqt2 と大腸菌内で共発現させた。その後、種々のクロマトグラフィーにより可溶性画分から複合体の大量精製を行った結果、いずれの異種タンパク質を融合した場合でも、Bqt1-Bqt2 複合体の可溶性が向上することがわかった。また高濃度 (~70 mg/mL) に濃縮することができた。

先行研究で、Bqt1 と Bqt2 はヘテロ二量体を形成することが明らかにされている。次に、融合した異種タンパク質がヘテロ二量体形成に影響するかを調べた。そのために、異種タンパク質が融合された Bqt1-Bqt2 複合体の正確な分子量を超遠心分析の沈降平衡法を用いて解析した。その結果、分子量は理論値とほぼ一致しており、このことから Athe\_0614 および Athe\_0597 の融合は Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体形成に影響を及ぼさないことが考えられた。

### 2. 異種タンパク質と Bqt1 をつなぐポリペプチドリンカーの検討

Athe\_0614 と Athe\_0597 の融合は Bqt1-Bqt2 複合体の可溶性を向上させ、不規則な凝集やヘテロ二量体形成の阻害を引き起こさないことがわかった。しかし Athe\_0614 と Athe\_0597 は Bqt1-Bqt2 複合体と特異的に相互作用しないため、配向が定まっていないことが考えられる。配向が定まらず、立体構造が不均一だと、結晶構造解析が困難になることが予想される。そこで Athe\_0614 と Bqt1 をつなぐポリペプチドリンカーの種類を検討した。ポリペプチドリンカーとして Gly-Ser 及び Ala-Ala の 2 アミノ酸リンカーと、3 本の  $\alpha$ ヘリックスからなる 3-helix bundle を用い、複合体構造の均一性をゲルろ過クロマトグラフィーにより評価した。2 アミノ酸リンカーを用いた Athe\_0614-Bqt1-Bqt2 複合体はいずれも左右非対称な溶出ピークが観察され、立体構造が不均一であることが考えられた。興味深いことに、両者の分子量はほぼ同じであるにも関わらず、Ala-Ala リンカーを用いた複合体の方が明らかに低分子量側に溶出されていたことから、リンカーの種類によって複合体の形状が異なることが考えられた (図 4)。

[まとめ] 本研究では、Bqt1-Bqt2 複合体の X 線結晶構造解析を行うために異種タンパク質の融合、およびそれをつなぐポリペプチドリンカーの検討を行った。その結果、Athe\_0614 と Athe\_0597 は Bqt1-Bqt2 複合体の結晶化シャペロンとして有望な候補因子であることがわかった。その一方で、ポリペプチドリンカーの種類によって複合体の立体構造の均一性が変化することから (図 5)、X 線結晶構造解析を成功させる上でリンカーの選定が重要であることが考えられた。既に Athe\_0614 を融合した Bqt1-Bqt2 複合体で微結晶が得られていることから、ポリペプチドリンカーの選定が今後の課題と言える。

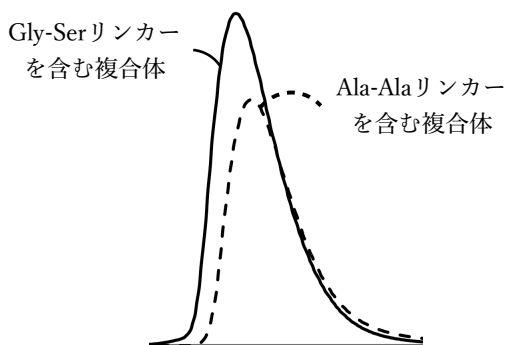


図 4 Gly-Ser リンカーを含む複合体と Ala-Ala リンカーを含む複合体のゲルろ過解析

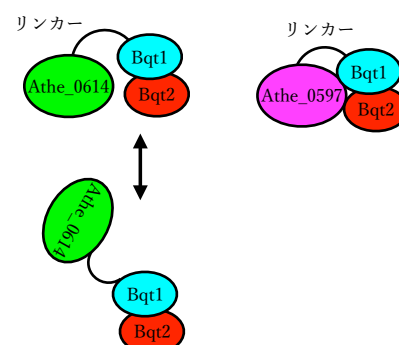


図 5 リンカーの違いが構造に与える影響