

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

Biochemical analysis of chromosomal structural proteins  
that function in genomic stability

博士（理学）学位申請論文

A dissertation submitted for Ph. D. degree

2020年3月

明星大学 大学院 理工学研究科 化学専攻 博士後期課程

Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering,  
Meisei University

讓原 秀隆

Hidetaka Yuzurihara

第1章	染色体の機能	
1-1	序論	
1-1-1	真核生物のゲノム DNA	1
1-1-2	ヌクレオソームの構造	3
1-1-3	クロマチンの構造変化	3
1-1-4	テロメアについて	6
1-1-5	テロメアクラスターについて	6
1-1-6	Bqt1 および Bqt2	8
1-1-7	ゲノムの安定維持	9
第2章	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	
2-1	序論	
2-1-1	X線結晶構造解析法	10
2-1-2	重原子の導入法	11
2-1-3	本研究の目的	11
2-2	材料および実験手法	
2-2-1	発現ベクターの構築	13
2-2-2	メチオニン置換体ヒストンおよび H3 の調製	13
2-2-3	ヒストン H4 の調製	15
2-2-4	H2A/H2B 二量体および H3/H4 四量体の再構成	15
2-2-5	ヌクレオソームの再構成	15
2-2-6	結晶化および回析データの収集	16
2-2-7	構造決定	17
2-3	結果	
2-3-1	ヒストン変異体のデザイン	18
2-3-2	セレンメチオニンを導入したヒストンの精製	20
2-3-3	セレン原子で標識されたヌクレオソームの再構成および 結晶化	20
2-3-4	セレン原子で標識されたヌクレオソームの構造	21
2-4	考察	24

第 3 章	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	
3-1	序論	
3-1-1	生体高分子複合体の X 線結晶構造解析について	26
3-1-2	結晶化が困難なタンパク質複合体の X 線結晶構造解析	27
3-1-3	異種タンパク質の融合	28
3-1-4	本研究の目的	28
3-2	材料および実験手法	
3-2-1	発現ベクターの構築	31
3-2-2	異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体の大量精製	33
3-2-3	超遠心分析（沈降平衡法）	34
3-2-4	ゲルろ過解析	35
3-3	結果	
3-3-1	Athe_0614-Gly-Ser-Bqt1-Bqt2 複合体の解析	36
3-3-2	Athe_0614-Ala-Ala-Bqt1-Bqt2 複合体の解析	36
3-3-3	Athe_0614-3 helix bundle-Bqt1-Bqt2 複合体の解析	37
3-3-4	Athe_0597-Gly-Ser-Bqt1-Bqt2 複合体の解析	38
3-4	考察	44
第 4 章	総合討論	
4-1	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	46
4-2	異種タンパク質融合を利用した分裂酵母 Bqt1-Bqt2 複合体の 大量調製	47
	引用文献	48
	謝辞	55
	研究業績	56

# 第 1 章 染色体の機能

## 1-1 序論

### 1-1-1 真核生物のゲノム DNA

ゲノム DNA は生物の遺伝情報を担う重要な物質である。真核生物では、ゲノム DNA は染色体として収納されている。例えばヒトのゲノム DNA は、約  $3.2 \times 10^9$  ヌクレオチドからなっており、23 組 46 本の染色体として細胞核内に収納されている。細胞分裂間期で染色体は、1 本の非常に長い線状の DNA と多種のタンパク質の複合体からなり、これらのタンパク質が DNA を折り畳むことで、圧縮された構造を作る。染色体を形成するタンパク質は、ヒストンと非ヒストンタンパク質の 2 つに大きく分けられる。染色体の最小基本単位はヌクレオソームである (Finch *et al.*, 1976; Kornberg *et al.*, 1999)。ヌクレオソームは H2A, H2B, H3, および H4 がそれぞれ各 2 分子ずつの、ヒストン八量体に DNA が約 1.46 巻き巻きついて形成された構造体であり、ゲノム DNA 上に数珠状の構造を形成する。このヌクレオソームが規則的に折り畳まれることで幅 30 nm の繊維状の構造体(30-nm ファイバー)を形成することが過去の研究で明らかにされている (Finch *et al.*, 1976; Horowitz *et al.*, 1994)。細胞分裂期には、クロマチンはさらに凝縮され染色体を形成する。これまで考えられている階層構造のモデルでは、30-nm ファイバーが折り畳まれて、凝集された高次構造を形成する (図 1)。その一方で近年、細胞核内における 30-nm ファイバーの存在を否定する報告があり (Eltsou *et al.*, 2008)、クロマチンの階層構造の概念を揺るがす可能性がある (Eltsou *et al.*, 2008; Maeshima *et al.* 2010; Bian *et al.*, 2012)。このことから、クロマチンの構造は未だ不明な点が多く、解決すべき課題が多く残されている。

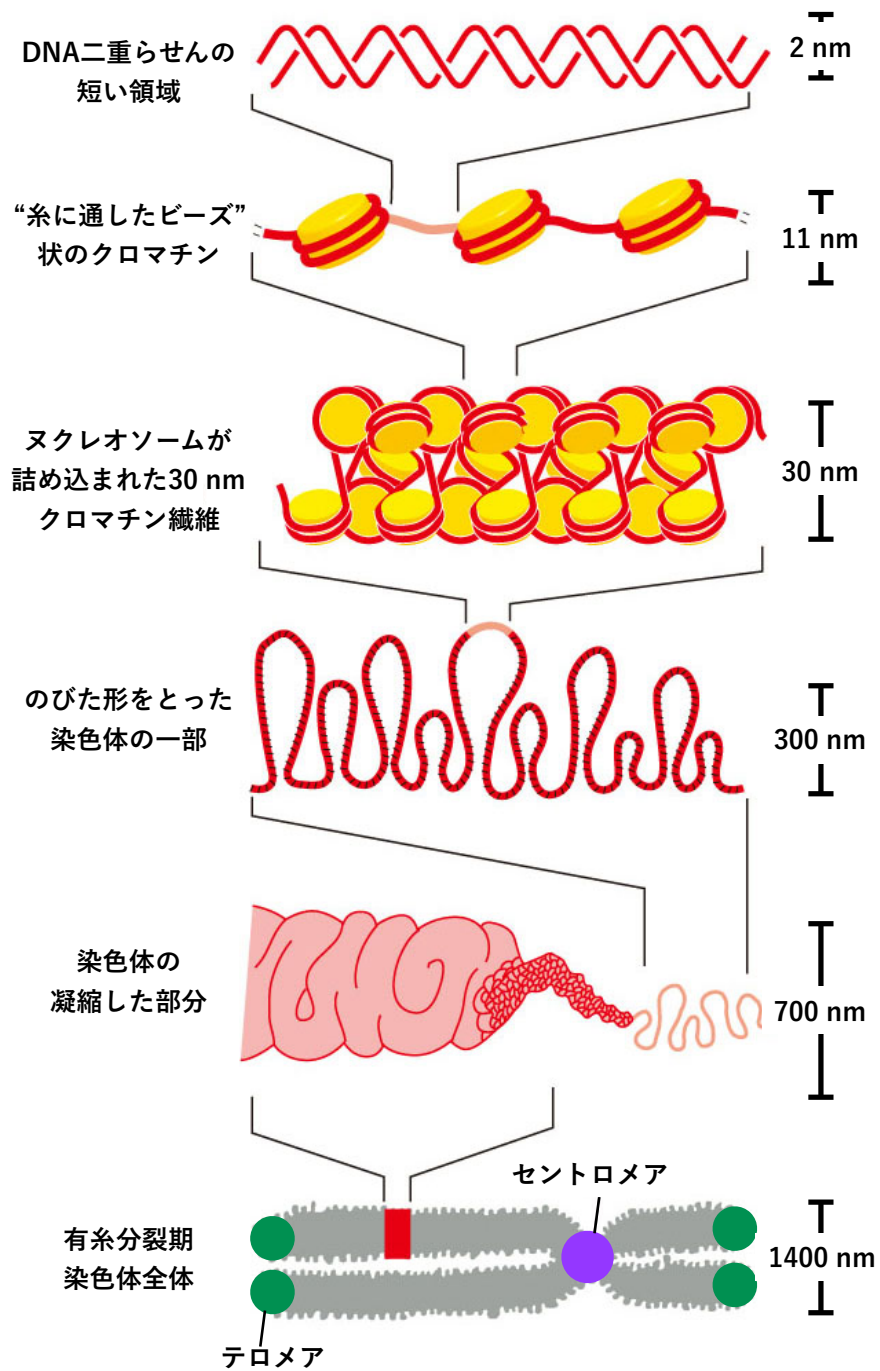


図1 ゲノムの階層構造

真核生物ゲノム DNA の階層構造 (Molecular Biology of THE CELL より引用)。緑色の丸は染色体末端であるテロメアを、紫色の丸は染色体のセントロメアを示している。

### 1-1-2 スクレオソーム構造

ヌクレオソームは、ゲノム DNA がヒストンに巻き付いて形成される構造体である。ヒストンには、コアヒストン (H2A, H2B, H3, および H4) とリンカーヒストン (H1) が存在する。コアヒストンは、塩基性タンパク質であり、分子量が 11-16 kDa である。コアヒストンに共通する構造として、1本の長い $\alpha$ -ヘリックスと2本の短い $\alpha$ -ヘリックスを含むヒストンフォールドドメインがある (図 2-A)。このヒストンフォールドドメインを介して、H2A と H2B、H3 と H4 はそれぞれ二量体を形成する。H3/H4 二量体は、二量体間で相互作用し H3/H4 四量体を形成する。H3/H4 四量体に H2A/H2B 二量体が二つ結合し、ヒストン八量体が形成される。ヒストン八量体の周りには 146 bp のゲノム DNA が約 1.75 回巻きつき、ヌクレオソームが形成される (図 2-B) (Richmond *et al.*, 1984; Luger *et al.*, 1997)。また、コアヒストンの N 末端側および C 末端側には、ヒストンテールと呼ばれる領域がある。ヒストンテールはヌクレオソームの外側に露出しており、細胞内においてヒストンテールは様々な種類の翻訳後修飾を受けている。ヒストンテールの翻訳後修飾はクロマチンの構造変化を引き起こす要因の 1 つであると考えられている。

### 1-1-3 クロマチンの構造変化

光学顕微鏡を用いた観察により、古くからクロマチンはヘテロクロマチンとユークロマチンと呼ばれる2つの状態があることが明らかにされている。ヘテロクロマチンは、ゲノム DNA が密に凝縮した状態であり、これまでの研究からその領域における転写が抑制されていることがわかっている。一方、ユークロマチンはヘテロクロマチンと比べて緩んだ状態であり、転写が活性化されていることがわかっている。ユークロマチンにおいて転写が行われている遺伝子を、実験的にヘテロクロマチンに挿入すると、その遺伝子の転写活性が低下することが知られている。これは、遺伝子の塩基配列に関係なく、

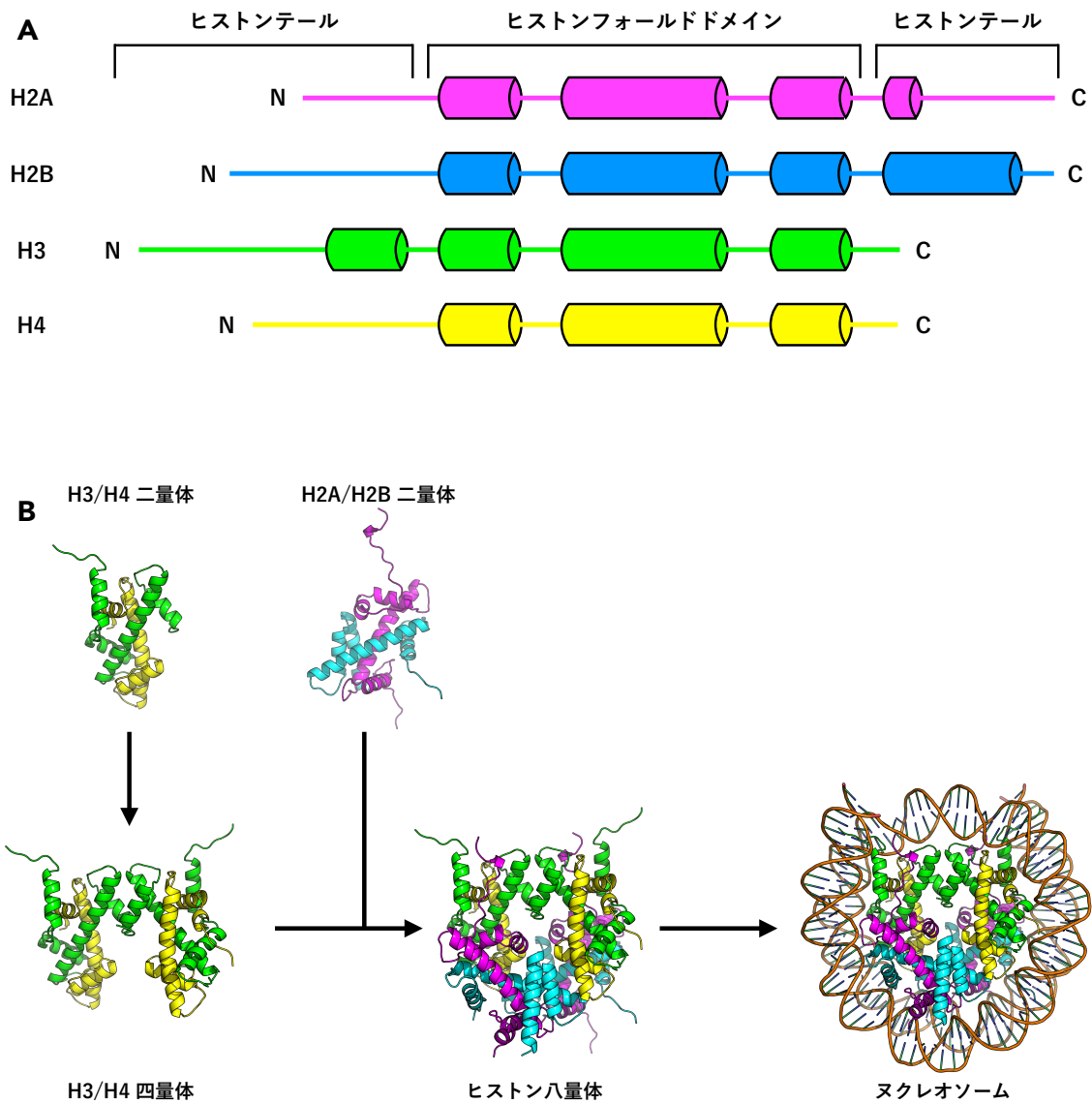


図2 4種のヒストンとヌクレオソームの構造

A) ヒストンの二次構造。α-helixは円柱で示されている。

B) ヌクレオソームを構成するH2A/H2B二量体, H3/H4二量体および四量体, ヒストン八量体の立体構造。H2A:マゼンタ色, H2B:シアン色, H3:黄緑色, H4:黄色。

クロマチンの状態によって遺伝子の発現が制御されていることを意味する。ヘテロクロマチンは、遺伝子発現を行う上で阻害的に働くため、構造が緩む。このようなクロマチンの構造変化は、ヒストンタンパク質の修飾やヒストンバリエーションの取り込みなど、エピジェネティックな変化によってもたらされる。

例えばヘテロクロマチンでは、ヒストン H3 の 9 番目のリジンがメチル化されている。メチル化されたヒストン H3 の 9 番目のリジンに HP1 と呼ばれるタンパク質が結合し、HP1 同士が相互作用することで、ヘテロクロマチンが形成される。また、ユークロマチンでは、ヒストン H3 の 4 番目のリジンがメチル化されている。メチル化されたヒストン H3 の周りにリモデリング因子の CHD1 や転写因子の TAF3 が集まることで遺伝子が転写される。しかし、ヌクレオソームが形成されている DNA 領域でどのように転写が行われているのかは不明である。近年、RNA Polymerase II(RNAPII)とヌクレオソームとの複合体のクライオ電子顕微鏡解析により、RNAPII がヌクレオソームの DNA を転写している反応中間体の構造が明らかにされた(Kujirai *et al.*, 2018)。この構造では、ヒストン八量体の構造が維持された状態で DNA が RNAPII によりヒストン八量体から外されており、転写の調節メカニズムの新しい機構を示唆している。

また、セントロメア DNA 周辺のヌクレオソームのヒストン H3 は CENP-A と呼ばれる染色体のセントロメアのマーカーとして働くヒストンバリエーションに交換される。染色体分配時に、CENP-A を含むヌクレオソームに内側動原体である CCAN(constitutive centromere associated network)複合体が結合し、外側動原体および微小管が染色体を引っ張ることで染色体を分配することが可能になる(Kaige *et al.*, 2019)。CCAN 複合体が CENP-A ヌクレオソームと結合する際、CENP-A ヌクレオソームの両端の DNA がヒストン八量体から解離して開いた構造をとることが示唆されている。これらのことから、クロマチンの構造変化はヌクレオソームレベルでも起こっている可能性が考えられる。

#### 1-1-4 テロメアについて



真核生物のゲノム DNA は線状であるため、末端が存在している。DNA の二重鎖切断損傷によって生じた末端は速やかに修復されるのに対し、染色体末端は損傷部位とは区別されることが、1940 年代に明らかにされた(McClintock *et al.*, 1941)。このことから、染色体末端は染色体同士の結合を防ぐための特殊な構造をとることが示唆され、テロメアと名付けられた。1950 年代に DNA の構造が明らかになり(Watson *et al.*, 1953)、通常の複製機構ではテロメアを完全に複製できないという問題が指摘された(Watson *et al.*, 1972; Olovnikov *et al.*, 1973)。1970 年代には、繊毛虫類テトラヒメナの染色体末端に TTG GGG の繰り返し配列が存在することが報告された(Blackburn *et al.*, 1978)。また、出芽酵母細胞に導入された線状人工染色体は、不安定ですぐに分解してしまうこと、さらに末端にテトラヒメナのテロメア配列を付加した線状人工染色体は、出芽酵母細胞内で安定に保持されることが明らかになった(Szostak *et al.*, 1982)。このことから、染色体末端は単純な繰り返し配列によって保護されること、そしてその機構は種を超えて保存されていることが考えられる。テロメアはゲノムの安定維持だけではなく、遺伝情報の継承においても重要な役割を果たしている。減数分裂期前期に見られるテロメアの集合(テロメアクラスター形成)は、相同染色体の対合・組換えの初期に起こり、酵母からヒトにいたるまで多くの真核生物で保存された現象である(Chikashige *et al.*, 1994; Scherthan *et al.*, 2001)。染色体同士の対合・組換えは、種の多様性を生み出すだけでなく染色体の均等分配にも重要であり不妊、流産や染色体異常などの疾患と深く関わっている。

#### 1-1-5 テロメアクラスターについて

細胞核内におけるテロメアの配置は、細胞周期の進行に伴い変化することがわかっている。染色体末端であるテロメアは核膜に固定されており、細胞分裂期間期では、それらの核膜上での位置は染色体によって異なる。このような染色体の核内配向はラブル配向

と呼ばれている。一方、減数分裂期に入った細胞では、前期にテロメアがスピンドル極体（中心体に相当する部位）近傍に集合し、テロメアクラスターを形成することが明らかにされている（Chikashige *et al.*, 1994）。このような染色体の核内配向はブーケ配向と呼ばれ、酵母からヒトにいたるまで広く保存された現象である（Scherthan *et al.*, 2001）（図 3）。テロメアクラスターの形成によって、減数分裂時に相同染色体の対合や組換えが促進されると考えられている。ブーケ配向に異常をきたした分裂酵母細胞では、正常な配偶子形成が起こらないことから（Chikashige *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Tomita *et al.*, 2007）、テロメアクラスターの形成は減数分裂の正常な進行に必須であると考えられている。

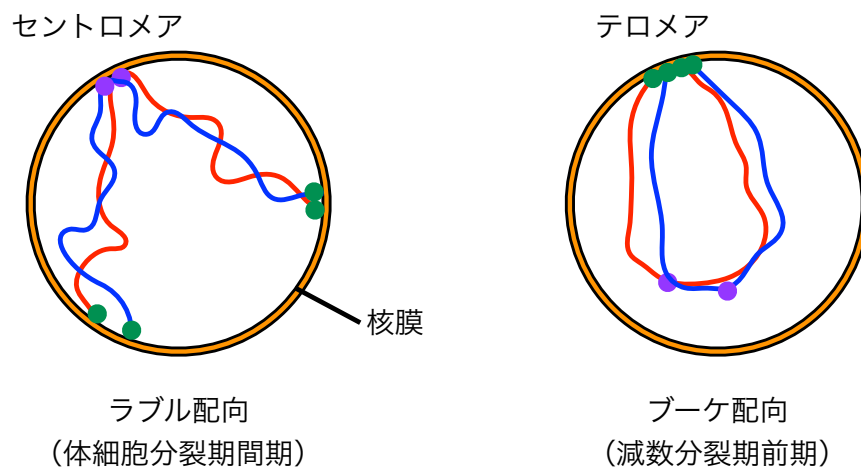


図 3 ラブル配向とブーケ配向

体細胞分裂期間期と減数分裂期前期の核内での染色体の配置。

赤色と青色の線は相同染色体を示している。体細胞分裂期間期の核内では、染色体のセントロメア領域が核膜上の一ヶ所に集合し、ラブル配向を形成する。一方、減数分裂期前期の核内では、染色体のテロメアが核膜上の一ヶ所に集合し、ブーケ配向を形成する。

### 1-1-6 Bqt1 および Bqt2

Bqt1 および Bqt2 は減数分裂期前期に特異的に発現するタンパク質であり、分裂酵母においてブーケ配向を誘導するテロメアクラスター形成の必須因子として同定された (Chikashige *et al.*, 2006)。Bqt1 と Bqt2 はヘテロ二量体を形成し、テロメア結合タンパク質である Taz1 および Rap1 と、膜タンパク質である Sad1 および Kms1 との間を連結させることがわかっている (図 4)。テロメアが核膜と物理的につながることで、核膜を介して微小管上のダイニンモーターの動きが核内に伝わり、核内の DNA を核の外から物理的に動かすことができる。Bqt1-Bqt2 複合体は大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として過去に調製されている (Ichikawa *et al.*, 2013)。

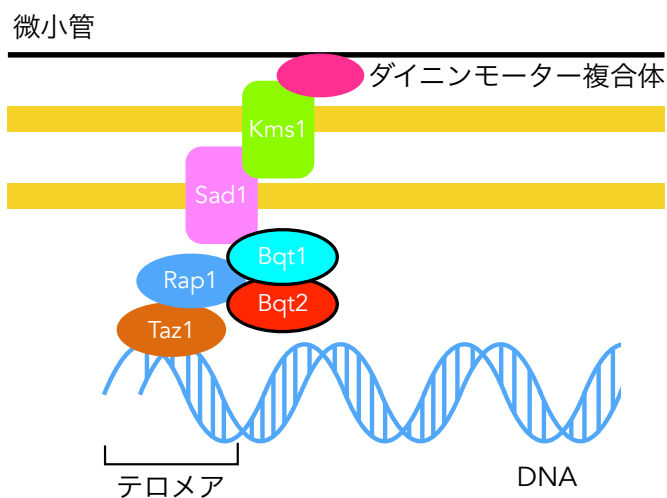


図 4 核膜へのテロメアの固定化のモデル図

Bqt1 と Bqt2 は複合体を形成し、Rap1 と Sad1 の間を連結する。Bqt1-Bqt2 複合体によって、テロメアと核膜外のダイニンモーター複合体が物理的に連結すると、ダイニンモーター複合体が微小管に沿ってスピンドル極体 (SPB) へ移動し、テロメアが集合する。Sad1 との相互作用には、Bqt1 のみが関与する一方で、Rap1 との相互作用には Bqt1 と Bqt2 が必要であることが報告されている。Bqt1 または Bqt2 が欠損した細胞では、テロメアクラスターは形成されない。

### 1-1-7 ゲノムの安定維持

ゲノム情報を安定に維持しながら増殖していくことは生物にとって必須である。DNA は日々、様々な要因によって数多くの損傷を受けている。その DNA 損傷が修復されなかったり、テロメア末端を損傷と認識してしまったりすると遺伝子の発現や、子孫への遺伝情報の伝達の異常につながるということがわかっている。DNA はヌクレオソームとして核内に収納されているため、ゲノムの安定維持のために必要に応じてヌクレオソームが凝集したり、緩んだりしてクロマチンの構造が変化することが知られている。しかし、ヌクレオソームのダイナミックな構造変化やテロメアを安定に維持するための分子機構に関しては未だに不明な点が多い。そこで、本研究では、ゲノムの安定維持機構の理解に欠かせないと考えられる通常型とは異なるヌクレオソームの構造と、テロメアを核膜に固定化するタンパク質複合体の構造に着目し、それらを明らかにするための解析手法の構築を試みた。以下、第 2 章では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について、第 3 章では分裂酵母 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について述べる。

## 第 2 章 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

### 2-1 序論

#### 2-1-1 X 線結晶構造解析法

X 線結晶構造解析法を用いて、タンパク質の立体構造を明らかにするためには、目的タンパク質を大量調製し、結晶を作製する必要がある。作製した結晶を用いて X 線回折実験を行い、構造決定に必要な X 線回折データを収集する。しかし、native 結晶から得られる X 線回折データですぐに構造決定ができるわけではない。構造決定には、X 線回折データに加え、位相の情報が必要になるからである。位相とは、X 線の波の位置のことであり、この波の位置がわからないと 3 次元空間におけるタンパク質を構成する原子の座標を求めることができない。タンパク質の X 線結晶構造解析において位相を求める方法として、分子置換法、重原子同型置換法、および多波長／単波長異常分散法といった方法がよく用いられてきた。これまでに解かれているヌクレオソーム構造は、Richmond らによって初めて解かれた構造以外はすべて分子置換法によって位相が求められている。分子置換法では、解析対象の構造と類似した既知の構造をサーチモデルとして用いることで位相の計算を行う。この方法は一般的に、サーチモデルとなる既知の構造との類似性が高くなければ位相の計算は困難である。そのため、既知の構造と大きく異なる構造の場合は、より手間のかかる重原子を導入した結晶を用いた重原子同型置換法や多波長／単波長異常分散法による解析が必要となる。

### 2-1-2 重原子の導入法

位相問題を解決するための方法として重原子同型置換法がある。重原子同型置換法は、重原子を含まないタンパク質の結晶（native 結晶）と重原子を含む結晶、つまりタンパク質分子に重原子を結合させた結晶（重原子同型置換体結晶）の回折強度の差から位相角を決定する方法である。重原子を含む結晶を調製する際、結晶内のタンパク質の分子構造と結晶系が変化を起こさないようにすることが重要で、これらが native 結晶内のそれと異なると、native 結晶と重原子同型置換体結晶の回折強度差から正確な位相の情報は何も得られない。

重原子同型置換体結晶の調製方法には、セレノメチオニンを利用する方法がある。セレノメチオニンの利用は、タンパク質工学的手法でセレンをタンパク質に導入する方法で、目的タンパク質の遺伝子を、メチオニンを外部から要求する菌株にクローニングし、その菌株を各種アミノ酸を含んだ培地（メチオニンの代わりにセレノメチオニンを含む）で培養する。そうすることで、メチオニンがセレノメチオニンに置換されたタンパク質を得ることができる。このセレノメチオニンを利用した方法は、多波長／単波長異常分散法による位相の決定の際に非常に有効であり、重原子同型置換体結晶の簡便な調製法として用いられている。

### 2-1-3 本研究の目的

動的なクロマチン構造変化の分子メカニズムを解明するためには、ヌクレオソーム単位で起こる構造変化を明らかにする必要があるがヌクレオソーム構造のダイナミクスを議論するための構造基盤は未だに確立されていない。そこで、既知のヌクレオソーム構造と異なるヌクレオソーム構造を明らかにするために必要な解析技術に着目した。多様なヌクレオソーム構造を明らかにする方法として、既知のヌクレオソームの構造情報に依存しない重原子を利用した方法が考えられる。そこで本研究では、ヌクレオソームに

簡便に重原子を導入する技術の確立を行った。

## 2-2 材料および実験手法

### 2-2-1 発現ベクターの構築

ヒストン H2A および H2B 遺伝子へのメチオニン点変異の導入は H2A 遺伝子を含む pET15b ベクターと H2B 遺伝子を含む pHCE ベクターを鋳型として, KOD mutagenesis kit (TOYOBO) を用い, inverse PCR 法により行った。Inverse PCR の反応液に *Dpn* I を加え, 37°C で一晩インキュベートした。生成物をセルフライゲーションした。その後, コンピテントセル (DH5 $\alpha$ ) を加えて混合し, 氷上で 30 分間氷冷した。42°C で 40 秒間ヒートショックした後, 氷上で 2 分間氷冷した。形質転換された大腸菌に SOC 培地を 800  $\mu$ L 加え, 37°C で 60 分間回復培養を行った。培養液を 1,740 $\times g$  で 10 分間遠心し, 沈殿した菌体を少量の SOC 培地で懸濁し, その懸濁液を終濃度 100  $\mu$ g/mL のアンプシリンを含む LB 寒天培地にまき, 一晩培養した。シングルコロニーを拾って試験管培養を行い, ミニプレップにより H2A および H2B 点変異体発現ベクターを精製し, DNA シークエンシングにより塩基配列の確認を行った。

### 2-2-2 メチオニン置換体ヒストンおよび H3 の調製

メチオニン置換体ヒストンおよび H3 は Ni-NTA Agarose (Qiagen) アフィニティークロマトグラフィー, His<sub>6</sub>-tag の切除, および SP Sepharose (GE Healthcare) 陽イオン交換クロマトグラフィーの 3 段階で精製した。大量発現にはメチオニン栄養要求性大腸菌株 B834 (DE3) を用いた。H2A-L65M, H2A-L65M/L85M または H3.1 が挿入された pET15b, H2B-L106M または H2B-L101M/L106M が挿入された pHCE をそれぞれ上記の大腸菌株に導入し, 5 L のセレノメチオニンを含む M9 培地で 37°C で培養した。菌体濁度(OD<sub>600</sub>)が 0.4 付近になったところで, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を終濃度 0.4 mM になるように加えて発現誘導し, 一晩培養を行った。H2B-



L106M と H2B-L101M/L106M の場合は IPTG を添加せず、37°Cで一晩培養した。翌日、大腸菌を溶解 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5% glycerol) で懸濁し、超音波破碎機を用いて細胞破碎液を調製した。これを 35,200×g で 30 分間遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分離した。次に、不溶性画分に TW buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100) を加え、超音波破碎機を用いて懸濁した。これを 35,200×g で 15 分間遠心して、不溶性画分を回収した。不溶性画分に DMSO を 1 mL 加え、30 分間室温で攪拌した。その後 40 mL の unfolding buffer A (7 M guanidinium HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM 2-mercaptoethanol) を加え、変性状態でヒストンタンパク質を可溶化した。これを、35,200×g で 10 分間遠心し、不溶性画分を取り除き、以降の操作を 4°Cで行った。可溶化したヒストンタンパク質を Ni-NTA Agarose ビーズ 3 mL と 1 時間混和した。ヒストンタンパク質が結合した Ni-NTA Agarose ビーズをエコノカラムに充填し、60 mL の unfolding buffer A で洗浄した。結合したヒストンタンパク質は 0 mM から 200 mM の imidazole 直線濃度勾配で溶出し、溶出液をおよそ 45 本に分画した。溶出フラクションを SDS-PAGE で確認した後ピークフラクションを回収し、透析 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行った。透析チューブからサンプルを回収し、TEV protease を加え His<sub>6</sub>-tag の切除を行った。His<sub>6</sub>-tag の切除を SDS-PAGE で確認した後、サンプルを SP Sepharose ビーズ 5 mL が充填されたエコノカラムへ添加し、SAU-200 buffer (7 M Urea(deionized), 20 mM sodium acetate, pH 5.2, 0.2 M NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した。結合したヒストンタンパク質は 0.2 M から 0.6 M の NaCl 直線濃度勾配で溶出し、溶出液をおよそ 50 本に分画した。溶出フラクションを SDS-PAGE で確認した後にピークフラクションを回収し、超純水に対して透析した。透析後、サンプルを回収し液体窒素で凍結した後、凍結乾燥して-30°Cに保存した。

### 2-2-3 ヒストン H4 の調製

ヒストン H4 の大量発現には大腸菌株 JM109(DE3)を用いた。H4 が挿入された pET15b が形質転換された大腸菌は、5 L の LB 培地で IPTG を添加せずに 37°Cで一晩培養した。菌体破碎から精製までの工程は 2-2-2 で記した方法と同様の方法で行った。

### 2-2-4 H2A/H2B 二量体および H3/H4 四量体の再構成

凍結乾燥したセレノメチオニン置換体ヒストン H2A (H2A-L65M および H2A-L65M/M85C) および H2B (H2B-L106M および H2B-L101M/L106M) を用いて、H2A/H2B 二量体の再構成を行った。H2A と H2B を 1:1 のモル比で混合し、最終濃度が 1.5 mg/mL になるように unfolding buffer (7 M guanidinium HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM 2-mercaptoethanol) を加え、4°Cで 90 分間穏やかに混ぜることでヒストンを変性させた。その後、混合物を 500 mL の 2 M NaCl を含む buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM 2-mercaptoethanol) に対して 4 時間 4 回透析し、ヒストンの巻き戻しおよび H2A/H2B 二量体を再構成した。透析チューブからサンプルを回収した後、HiLoad Superdex 200 10/30 Increase (GE Healthcare) ゲルろ過クロマトグラフィーにより H2A/H2B 二量体を分離した。

H3/H4 四量体の再構成は、セレノメチオニン置換体 H3 および野生型 H4 を用いて、H2A/H2B 二量体と同様の方法により行った。

### 2-2-5 ナクレオソームの再構成

精製した H2A/H2B 二量体、H3/H4 四量体、および 146 bp の  $\alpha$ -サテライト DNA を 3:1.5:1 のモル比で混合した。混合したサンプルを、2 M KCl を含む 400 mL の buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) に対して透析した。その後、0.25 M KCl を含む buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.25 M KCl, 1 mM EDTA,

1 mM DTT) を透析外液に 0.8 mL/min の流速で添加し、透析外液中の KCl 濃度を 2 M から 0.25 M に徐々に下げた。その後、サンプルを 0.25 M KCl を含む buffer に対して 4 時間透析した。透析サンプルを回収し、不安定に巻きついた DNA を安定に巻き付かせるために、55°C で 2 時間熱した (ヒートシフト)。再構成したヌクレオソームは氷上 4°C で保存した。

#### 2-2-6 結晶化および回折データの収集

再構成したヌクレオソームは、ハンギングドロップ蒸気拡散法を使用して 20°C で結晶化を行った。セレノメチオニン置換体 H2A-L65M/L85M, H2B-L101M/L106M, および H3 を含むヌクレオソームを結晶化するために、1  $\mu$ L のヌクレオソーム溶液と 1  $\mu$ L の結晶化溶液 (20 mM potassium cacodylate, pH 6.0, 60 mM KCl, 70 mM manganese chloride) とを混合した。混合した後、500  $\mu$ L の結晶化溶液 (20 mM potassium cacodylate, pH 6.0, 40 mM KCl, 45 mM manganese chloride) に対して平衡化させ、結晶を作製した。セレノメチオニン置換体 H2A-L65M, H2B-L106M, および H3 を含むヌクレオソームを結晶化するために、1  $\mu$ L のヌクレオソーム溶液と 1  $\mu$ L の結晶化溶液 (20 mM potassium cacodylate, pH 6.0, 50 mM KCl, 90 mM manganese chloride) とを混合した。混合した後、500  $\mu$ L の結晶化溶液 (20 mM potassium cacodylate, pH 6.0, 35 mM KCl, 55 mM manganese chloride) に対して平衡化させ、結晶を作製した。

作製した 2 種類の結晶は、28% PEG400 および 2%(w/v) trehalose を含むリザーバー溶液でハーベストし、液体窒素中で急速凍結させた。凍結した結晶は Photon Factory (つくば市) へ運び、BL-1A にてセレン原子の吸収極大 (ピーク) の波長の X 線を用い、回折データセットを収集した。セレノメチオニン置換体 H2A-L65M/L85M, H2B-L101M/L106M, および H3 を含むヌクレオソームの結晶に照射した X 線の波長は 0.9793 Å であり、セレノメチオニン置換体 H2A-L65M, H2B-L106M, および H3 を含

むヌクレオソームの結晶に照射した X 線の波長は 0.9792 Å であった。それぞれのピーク波長は、XAFS 測定により決定した。回折データの指数付け、積分、およびスケールリングは、*XDS* プログラム (Kabsch *et al.*, 2010) および *AIMLESS* プログラム (Winn *et al.*, 2011) を用いて行った。

#### 2-2-7 構造決定

セレン原子で標識されたヌクレオソームの構造は、*PHENIX* プログラムの *AutoSol* を用いた単波長異常分散法によって決定した (Adams *et al.*, 2010)。 *AutoSol* で N 末端を除くすべてのセレン原子を同定することに成功した。ヌクレオソーム内のヒストンの初期モデルは、ヒストンのアミノ酸配列を使用して *PHENIX* の自動構築プログラムで構築した。 *AutoSol* により得られた初期電子密度マップをもとに、 *Coot* プログラム (Emsley *et al.*, 2010) でヌクレオソームモデルの修正を行った。修正したモデル構造は、さらに *PHENIX* プログラムと *Coot* プログラムを用いて精密化を行った。最終モデルの妥当性は *MolProbity* を用いて検証した。構造の図は *CueMo* (<http://www.cuemol.org/ja/>) および *PyMOL* (<http://pymol.org/2/>) を使用して作成した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 ヒストン変異体のデザイン

従来、タンパク質に重原子を導入する方法としてソーキング法が用いられている。ソーキング法は作製したタンパク質の結晶を、重原子を含む溶媒に漬け込むことで、重原子をタンパク質の表面に存在するシステイン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、リジン残基、アルギニン残基などの側鎖に結合させる方法である。初めて解かれたヌクレオソーム構造はソーキング法を用いて構造解析が行われている。ソーキング法を用いることで、通常型とは異なるヌクレオソームの構造を明らかにすることは可能だが問題点もある。ソーキング法は、重原子の種類、結晶を漬ける時間、および重原子溶液の組成などの条件検討に時間が掛かる点が挙げられる。

1990年にソーキング法に変わる重原子の導入方法として、セレノメチオニンを利用した方法が報告されている (Hendrickson *et al.*, 1990)。セレノメチオニンはメチオニンの硫黄原子がセレン原子に置換されたアミノ酸である。セレノメチオニンを用いた方法の利点は、タンパク質の合成段階で重原子を導入することができる点にある。ソーキング法のように、重原子を導入するための条件検討を行う必要がない。そこで我々は、セレン原子を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析法の確立を試みた。

セレン原子を用いてタンパク質の結晶構造を明らかにするためには、目安として 100 アミノ酸につき 1 個のセレン原子が必要であると考えられている (Hendrickson and Ogata *et al.*, 1997; Hendrickson *et al.*, 1999)。ヌクレオソームは、8 分子のヒストンタンパク質 (合計 982 アミノ酸) と 145~147 bp の DNA で構成され、およそ 200 kDa の分子量を持つ。アミノ酸の平均分子量が約 110 Da であることから、ヌクレオソームの構造を明らかにするためには、理論的に 18 個のセレノメチオニンが必要である。しかし、ヒストンオクタマーの中には、構造解析に用いることができると予想されるメチオ

ニンが合計で5ヶ所しかなく(図5), そのうちの1つは発現量が他のヒストンに比べて著しく低いH4に存在する。従って, 通常型のヌクレオソーム内に構造解析に利用するセレン原子を8個しか導入できず, 構造決定が困難になることが予想される。そこで, ロイシン残基をメチオニン残基に置換し, 導入するセレン原子の数を増やす方法に着目した。ロイシンをメチオニンに置換してもタンパク質の構造と安定性に大きな影響がないことが過去に報告されている(Finney *et al.*, 1980; Guy *et al.*, 1985; Bordo and Argos *et al.*, 1991; Gassner *et al.*, 1996)。メチオニンに置換するロイシンを選定するために, 通常型のヌクレオソームの立体構造を参照し, ヒストン-ヒストン間の相互作用面に存在せず, 側鎖の周辺に空間があるロイシン残基を探索した。その結果, H2A-L65, H2A-L85, H2B-L101, および H2B-L106 が上述の条件を満たすことがわかった。そこで, H2A-L65M, H2B-L106M, H2A-L65M/L85M, および H2B-L101M/L106M の4種類のヒストン点変異体発現ベクターを構築した。

<b>H2A</b>	1	MSGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVY	50
	51	LAAVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLKLV	100
	101	TIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESHHKAKGK	129
<b>H2B</b>	1	MPEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKGDKKRKRSRKESYSIYVYKVLKQVHP	50
	51	DTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRL	100
	101	LLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSK	125
<b>H3</b>	1	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALRE	50
	51	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACEAYL	100
	101	VGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA	135
<b>H4</b>	1	MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLI	50
	51	YEETRGVLKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRPLYGF	100
	101	GG	102

図5 4種類のヒストンのアミノ酸配列

構造解析に用いることができると予想されるメチオニン残基をシアン色で示す。マゼンタ色で示すN末端のメチオニン残基の位置にも, セレノメチオニンは導入されるが構造がゆらぐため, 構造解析に用いることはできないことが予測される。

### 2-3-2 セレノメチオニンを導入したヒストンの精製

セレノメチオニン置換体ヒストンの調製は Ni-NTA Agarose (Qiagen) アフィニティークロマトグラフィー, His<sub>6</sub>-tag の切除, および SP Sepharose (GE Healthcare) 陽イオン交換クロマトグラフィーの 3 段階で精製した (Tanaka *et al.*, 2004)。ヒストンへのセレン原子の導入にはメチオニン要求株 B834 (DE3) を用いた。メチオニン要求株はメチオニン合成経路に変異が入っている。メチオニン要求株が生存するためには, メチオニンを外部から取り込む必要がある。このメチオニン要求株にヒストンの発現ベクターを挿入し, セレノメチオニンを含む M9 最小培地で振とう培養を行った。すると, メチオニン要求株は培地中のセレノメチオニンを取り込み, 細胞内で合成されるヒストンのアミノ酸配列上のメチオニンの位置にセレノメチオニンが導入される。今回, セレノメチオニン置換体ヒストンをリコンビナントタンパク質として大量精製することに成功した。精製したヒストンを, アクリルアミドゲル電気泳動で分離し, CBB 染色で検出した結果, 高純度にセレノメチオニン置換体ヒストンを精製できることがわかった。セレノメチオニン置換体ヒストンの精製収率は, 野生型のヒストンのそれと同程度であった。

### 2-3-3 セレン原子で標識されたヌクレオソームの再構成および結晶化

精製したセレン原子を含む H2A/H2B 二量体, H3/H4 四量体, および 146 bp の  $\alpha$ -サテライト DNA を用いて, 塩透析法によりヌクレオソームの再構成を行った。ヌクレオソームの位相決定に必要なセレン原子の個数がわからないので, 2 種類のヌクレオソームを再構成した。1 つはセレノメチオニン置換体 (H2A-L65M, H2B-L106M, および H3) と野生型の H4 の組み合わせで再構成し, 12 個のセレン原子を用いて位相の計算を試みた。もう 1 つは, セレノメチオニン置換体 (H2A-L65M/L85M, H2B-L101M/L106M, および H3) と野生型の H4 の組み合わせで再構成し, 16 個のセレン

原子を用いて位相の計算を試みた。再構成したヌクレオソームは、熱処理によって DNA のヒストンオクタマーへの巻きつきを均一にして、その後アクリルアミドゲルを用いた分取用電気泳動によりヌクレオソームを精製した。精製したヌクレオソームをアクリルアミドゲル電気泳動にて確認した結果、セレン原子で標識されたヒストンを用いたヌクレオソームの再構成ができることがわかった (図 6)。精製したヌクレオソームを用いて、ハンギングドロップ法により結晶化を行った。その結果、セレン原子で標識されたヌクレオソームの結晶が得られた。

#### 2-3-4 セレン原子で標識されたヌクレオソームの構造

得られた結晶の回折データは、Photon Factory 放射光施設の BL-1A にて EIGER X 4M 検出器を使用して収集した。X 線による結晶へのダメージを軽減し、水分子が氷の結晶になることを防ぐために、抗凍結剤 (28% PEG 400 および 2%(w/v) trehalose を含む結晶化溶液) を加え、結晶をクライオループですくい出し、窒素ガスにより急速冷却を行った。結晶を常に窒素ガスで冷却した状態で 12 個のセレン原子で解析するヌクレオソームは 0.9792 Å, 16 個のセレン原子で解析するヌクレオソームは 0.9793 Å の波長の X 線を用いて回折データを収集した。

得られた X 線回折データは、*PHENIX* および *Coot* プログラムを用いて解析した (Otwinoski *et al.*, 1997; McCoy *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2010)。その結果、単波長異常分散法により 12 個または 16 個のセレン原子の座標をすべて求めることに成功した。通常型のヌクレオソーム構造を 2.5 Å 分解能で決定することに成功した (図 7-A, B)。セレンメチオニン置換体ヌクレオソームの全体構造は、分子置換法を用いて過去に解かれた通常型のヌクレオソーム構造 (Tsunaka *et al.*, 2005) と非常に類似していた (図 7-C)。このことは、本研究でロイシンをメチオニンに置換したことによる影響はないことを示唆している。



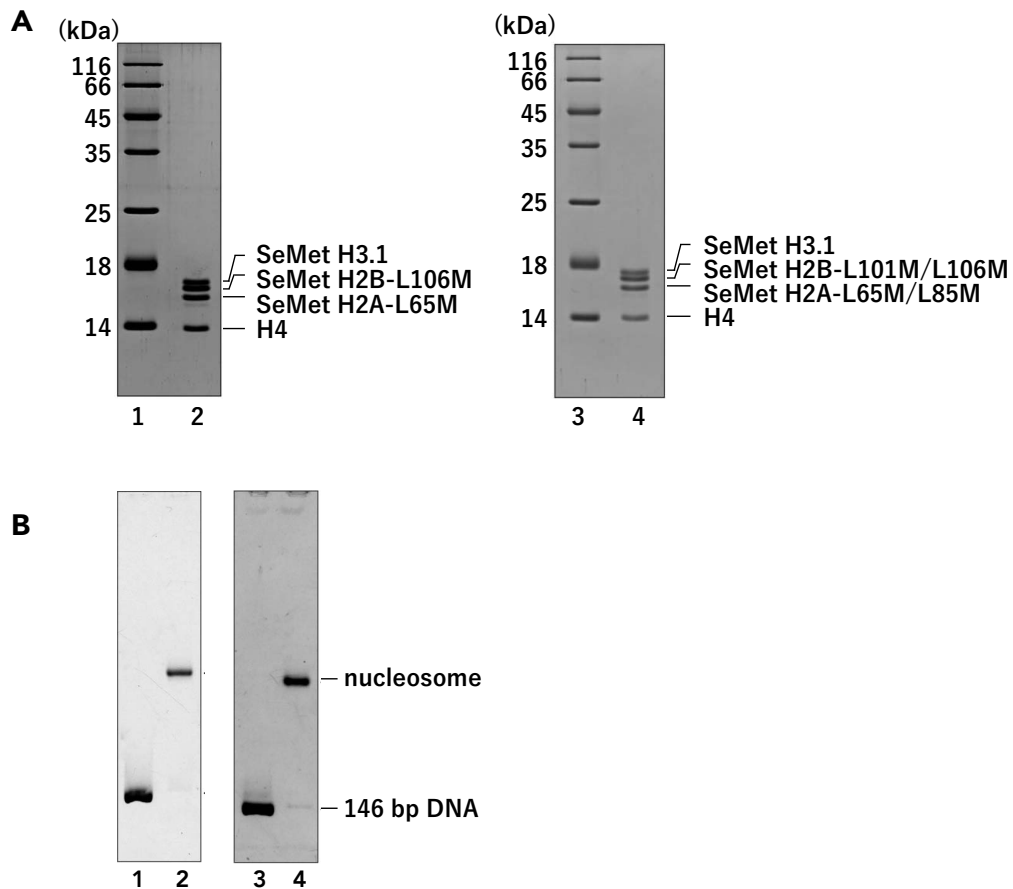
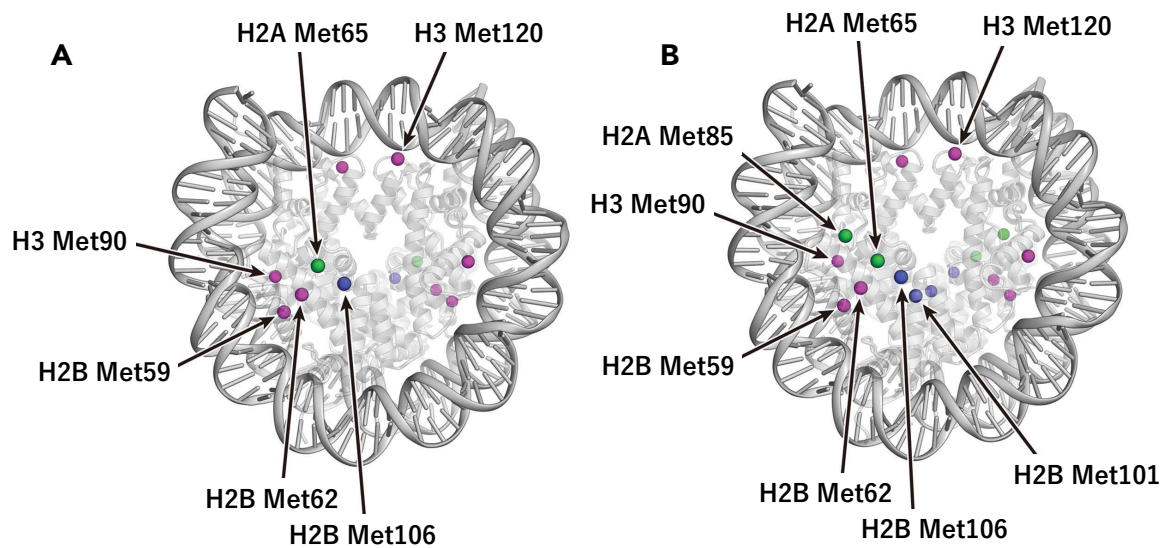


図6 セレン原子で標識されたヌクレオソームの再構成

- A) 精製したセレン原子で標識されたヌクレオソームを 16% SDS-PAGE により分離し、CBB 染色によりヒストンを検出した。レーン 1, 3: 分子量マーカー, レーン 2, 4: 再構成したヌクレオソームに含まれるヒストン。
- B) 精製したセレン原子で標識されたヌクレオソームを 0.2×TBE 中で 6% native PAGE により分離し、エチジウムブロマイド染色により DNA を検出した。レーン 1, 3: 再構成に用いた 146 bp の  $\alpha$ -サテライト DNA, レーン 2: セレノメチオニン置換体 H2A-L65M, H2B-L106M, および H3 を含むヌクレオソーム, レーン 4: セレノメチオニン置換体 H2A-L65M/L85M, H2B-L101M/L106M, および H3 を含むヌクレオソーム。



**C**

	RMSD値(Å)	
含まれるセレンの数	12個	16個
H2A first molecule	0.226	0.261
H2A second molecule	0.226	0.26
H2B first molecule	0.211	0.238
H2B second molecule	0.226	0.215
H3 first molecule	0.221	0.18
H3 second molecule	0.199	0.188
H4 first molecule	0.204	0.192
H4 second molecule	0.217	0.146

図7 セレン原子で標識され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。

C) セレン原子で標識されたヌクレオソーム中の各ヒストンと DNA を既知のヌクレオソーム(Tachiwana *et al.*, 2010, PDB ID : 3AFA)の構造と比較し、算出した RMSD 値を示す。

## 2-4 考察

本研究では、セレン原子を用いたヌクレオソームの X 線結晶構造解析法を確立することを目的とし、セレン原子で標識された通常型のヌクレオソームの構造解析を行った。構造解析を行った結果、12 個または 16 個のセレン原子を用いて、通常型のヌクレオソームの構造を明らかにすることに成功した。また、結晶構造の精密化に用いた *PHENIX* ソフトウェアにバンドルされた *phenix.plan\_sad\_experiment* プログラムを使用し、セレン単波長異常分散法に用いるのに必要なセレン原子の数を推定したところ、8 個のセレン原子で位相決定に十分なデータが得られることが予測された (表 1)。今回セレン原子を導入したメチオニンの位置が様々なヒストンバリエントにおいても保存されていることがわかった (図 8)。従って、この手法はヒストンバリエントを含む多種多様なヌクレオソームの構造解析にも適用できることが考えられる。

表 1 異常散乱データ精度の推定

anomalously scattering atoms	Accuracy of data ( $I/\sigma I$ )	Accuracy of anomalous data	Target anomalous signal	Probability of obtaining the anomalous substructure	Figure of merit
8	11	0.17	15	83	0.2
12	11	0.2	15	83	0.21
16	11	0.22	15	83	0.23
40	13	0.37	15	84	0.3

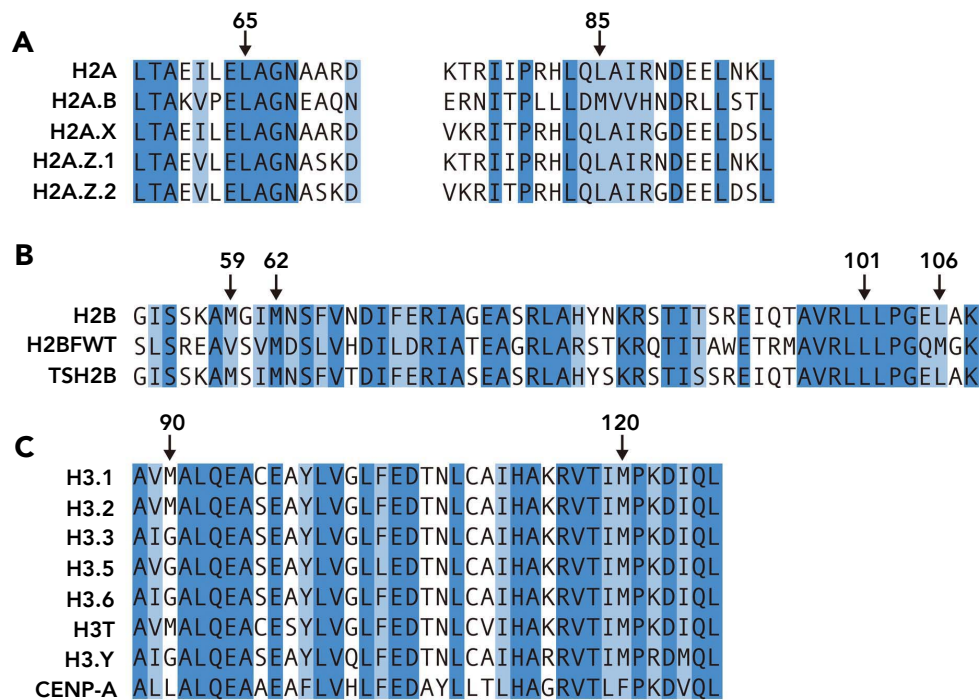


図8 メチオニンおよびロイシンのヒトヒストンバリエント間の保存性  
ヒストン H2A, H2B, および H3 のバリエントのアミノ酸配列のアライメント。セ  
レノメチオニンを導入した部位が高度に保存されている。

- A) ヒストン H2A バリエントのアミノ酸配列。  
B) ヒストン H2B バリエントのアミノ酸配列。  
C) ヒストン H3 バリエントのアミノ酸配列。

## 第 3 章 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

### 3-1 序論

#### 3-1-1 生体高分子複合体の X 線結晶構造解析について

X 線結晶構造解析は生命現象の分子メカニズムを解明するのに非常に有用な手段である。X 線結晶構造解析によって生命現象を担う重要なタンパク質複合体の立体構造が明らかになると、その構造から機能に重要なアミノ酸残基を予測することが可能となる。この情報を用いることで、点変異体を用いた *in vivo* における複合体の機能解析を効率的に行うことができる。さらに、新薬の開発などの応用研究にもつながる。本研究で標的タンパク質とした Bqt1-Bqt2 複合体は第 1 章でも述べた通り、減数分裂期前期に特異的に発現し、テロメアの核膜への固定化において重要な役割を果たすことが知られているが、詳細なメカニズムについては依然として明らかにされていない。これまで、重要な生命現象を担うタンパク質複合体の立体構造が X 線結晶構造解析により明らかにされており、その一例として、タンパク質と RNA により構成されているリボソームは、2000 年に X 線結晶構造解析により完全な立体構造が決定された (Ban *et al.*, 2000)。その構造からタンパク質ではなく、リボソーム RNA がリボソームの全体構造を構築し、メッセンジャーRNA の上にトランスファーRNA を配置する働きや、ペプチド結合形成の触媒を中心的に担っているという見解が強く裏付けられた。生体高分子複合体の立体構造を明らかにする手法として、NMR、X 線結晶構造解析、および電子顕微鏡解析がある。これらの手法の中で、最も高解像度の立体構造を明らかにできるのが X 線結晶構造解析である。今後も、生命現象を解明していくには、原子分解能レベルでの構造決

定ができる X 線結晶構造解析が重要であることが考えられる。

### 3-1-2 結晶化が困難なタンパク質複合体の X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析で解析できるタンパク質の分子量にはほぼ制約がなく、大きいものから小さいものまで構造解析が可能である。しかし、X 線結晶構造解析を行うためにはタンパク質の良質な結晶を作製する必要があり、これが X 線結晶構造解析の工程の中で最も困難なステップである。Bqt1-Bqt2 複合体は疎水性アミノ酸を多く含んでおり、結晶化が困難であることが予想される。

タンパク質は結晶の中で規則正しく整列している。しかし、タンパク質の表面に電荷を持つアミノ酸残基や疎水性アミノ酸残基が局所的に集中していると、結晶化の際に分子同士が反発したり、不規則に凝集したりしてタンパク質の規則正しい整列が困難になる可能性がある。また、タンパク質の中に存在する特定の形を取らないランダムコイル領域が、タンパク質の規則正しい整列を妨げることも知られている。このようなタンパク質を結晶化するための有効な手法がこれまでにいくつか確立されている。1つ目は、結晶化に適さない領域を、プロテアーゼを用いた限定分解や遺伝子の欠失により取り除くことで、結晶化に適した領域のみを結晶化する方法である。2つ目は、構造上独立したドメインを複数個有するタンパク質に適用される方法であり、ドメインに分けて結晶化する方法である。これらの方法を用いた研究例は多く、これまでにタンパク質の基本構造の理解や、ドメインの機能の理解に大きく貢献している。しかし、これらの方法は全長のタンパク質の構造を明らかにできないという欠点がある。

タンパク質を断片化せずに全長の状態で結晶化する方法として、他のタンパク質と複合体にする手法が考えられる。この方法は、目的タンパク質が複合体を形成することにより、安定になる場合に有効であると考えられる。しかし一般的に、相互作用するタンパク質同士が高い親和性を示さないと、複合体を形成したものとしていないものが混在

した試料になってしまい、均一な結晶を得ることができない可能性がある。従って、結晶化が困難である全長タンパク質を複合体にして結晶化する方法は、高い親和性を示す相互作用タンパク質が明らかになっているごく一部のタンパク質にしか有効ではないことが予想される。その例として、抗体を用いた膜タンパク質の構造解析などがあげられる (Hino *et al.*, 2012)。しかし、結晶化を促進する抗体の作製は容易ではなく、また他のターゲットタンパク質に応用することができないことから、汎用性がないことが問題点としてあげられる。

### 3-1-3 異種タンパク質の融合

結晶化が困難である Bqt1-Bqt2 複合体を断片化せずに結晶化する方法として、近年注目されている安定な立体構造を有する異種タンパク質を融合させる方法に着目した (Kobe *et al.*, 2015)。これまで、異種タンパク質はターゲットタンパク質の合成の段階で N 末端または C 末端側にポリペプチドリンカーを挟む形で融合されている。先行研究で、融合した異種タンパク質同士が結晶中で主に相互作用する形で、ターゲットタンパク質の立体構造の決定に成功した例が報告されている (図 9)。これまで構造解析に異種タンパク質が使用された例がいくつか報告されている。その中には、T4 Lysozyme やマルトース結合タンパク質などが用いられている (Kobe *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 2012)。

### 3-1-4 本研究の目的

本研究では、テロメアクラスター形成の詳細なメカニズムを明らかにするために、その必須因子である Bqt1-Bqt2 複合体に着目し、構造解析に適した Bqt1-Bqt2 複合体の調製を目的とした。構造解析に適した Bqt1-Bqt2 複合体を調製する方法として、複合体に異種タンパク質を融合することを検討した。

Bqt1-Bqt2 複合体の結晶化を目的とした異種タンパク質の融合を行う際に考慮した

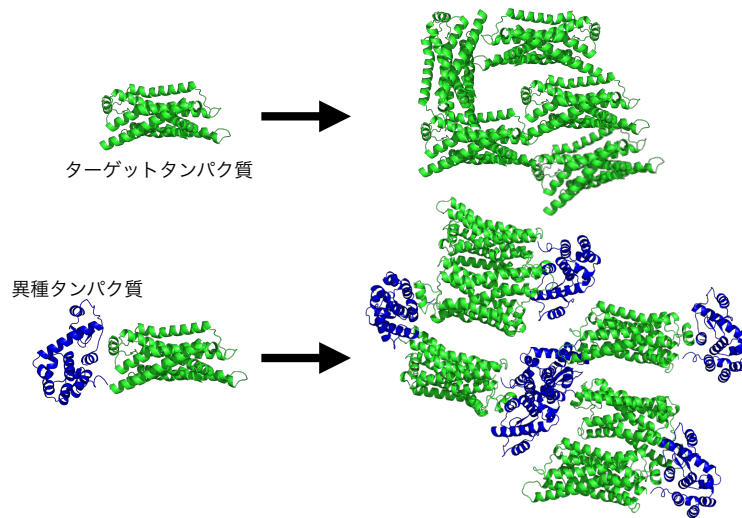


図9 結晶化における融合した異種タンパク質の役割

異種タンパク質として T4 Lysozyme を用いて解かれたヒト GPCR の構造 (Zou *et al.*, 2012. PDB ID : 4GBR)。

青色：異種タンパク質，黄緑色：ターゲットタンパク質

点がいくつかある。1つ目は、異種タンパク質の分子量である。異種タンパク質が Bqt1-Bqt2 複合体よりも大きいと結晶化の際に、主に異種タンパク質同士が接触することで、Bqt1-Bqt2 複合体同士の接触が起こりにくくなることが考えられる。Bqt1-Bqt2 複合体は凝集しやすいことから、良質な結晶を作製するためには、Bqt1-Bqt2 複合体同士が接触しないことが好ましい。逆に異種タンパク質が小さいと、Bqt1-Bqt2 複合体同士の接触が起こりやすくなり、良質な結晶の作製が困難になることが考えられる。

2つ目に考慮した点として、立体構造が安定で結晶になりやすい異種タンパク質を選定することである。例えば、マルトース結合タンパク質とそのホモログの立体構造は、これまでに数多く明らかにされている。マルトース結合タンパク質は、安定で可溶性が非常に高く、精製タグとして用いられており、結晶になりやすい構造であることが考えられる。

3つ目に考慮した点として、結晶化ターゲットタンパク質において異種タンパク質を



融合する部位である。Bqt1-Bqt2 複合体では、異種タンパク質は Bqt1 と Bqt2 のそれぞれの N 末端と C 末端の合計 4 箇所融合することが可能である。先行研究では、Bqt1-Bqt2 複合体の可溶性を上昇させるために SUMO 分子を Bqt1 の N 末端に融合している。SUMO 分子については、4 つの融合箇所を検討しており、Bqt1 の N 末端に融合した時に最も可溶性が上昇することが明らかにされている (Ichikawa *et al.*, 2013)。

4 つ目に考慮した点として、結晶化ターゲットタンパク質と異種タンパク質をつなぐポリペプチドリンカーの長さや配列である。異種タンパク質と結晶化ターゲットタンパク質が直接つながった形で融合タンパク質を発現させると、異種タンパク質と結晶化ターゲットタンパク質が物理的に近いため、折りたたみなどに問題が生じる可能性がある。このような異種タンパク質と結晶化ターゲットタンパク質との間の不要な相互作用を避けるために、両者の間にポリペプチドリンカーを挿入することが望ましい。ポリペプチドリンカーを構成するアミノ酸残基の種類によって、リンカーの性質は大きく異なる。例えば、親水性アミノ酸に富んだリンカーは、柔軟な構造をとることがわかっている。一方で、疎水性アミノ酸に富んだリンカーは、水分子を排除する形で側鎖同士が相互作用するため、硬い構造をとることが考えられる。また、ポリペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基の数も大量調製や結晶化に影響することが考えられる。

本研究では、Bqt1-Bqt2 複合体の結晶化を促進する異種タンパク質として、Athe\_0614, Athe\_0597 の 2 種類のタンパク質を試した。Athe\_0614 と Athe\_0597 は好熱性細菌 (*Caldicellulosiruptor bescii*) 由来のマルトース結合タンパク質の構造ホモログである。Athe\_0614 については高濃度 (80-100 mg/mL) に濃縮することが可能であり、結晶化と X 線回折実験が行われている (Yokoyama *et al.*, 2013)。

## 3-2 材料および実験手法

### 3-2-1 発現ベクターの構築

先行研究で用いられた, pET21a ベクターに SUMO-Bqt1 および Bqt2 の遺伝子が挿入されている発現ベクターを鋳型として, 異種タンパク質-Bqt1 および Bqt2 の共発現ベクターの構築を行った。KOD mutagenesis kit (TOYOBO) を用いて, inverse PCR 法により SUMO 分子の遺伝子を除いた領域を増幅させた。プライマーは Vector\_forward\_1 (GGT TCT ATG CAT TTT CTG GCG AGC CAT CTG C) と Vector\_reverse\_1 (CCC GGG CCC CTG GAA CAG AAC TTC C) の 2 つを用いた。インサートの異種タンパク質は GoTaq (Promega) を用い, PCR 法により増幅させた。使用したプライマーは, Athe\_0614 については SBP49\_forward\_1 (TTC CAG GGG CCC GGG AGC TCA GCT GGT GGA ACA AAG AAG ATT G) と SBP49\_reverse\_1 (AAA ATG CAT AGA ACC CTT CTT GAA ATA TTC CTT AGC AGC TTT CTC) を, Athe\_0597 については SBP57\_forward\_1 (TTC CAG GGG CCC GGG TCT TCT TCA AAA CTT CCT TAT GTT AAG CTT ACA TGG) と SBP57\_reverse\_1 (AAA ATG CAT AGA ACC TTT CTT TCT TCC TGT CTT CTT CAG AAA TTC ATC) を使用した。アガロースゲル電気泳動でインサートおよびベクターの増幅を確認し, ゲルを切り出し精製した。精製したベクターにインサートを In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa) を用いて導入し, 異種タンパク質と Bqt1 を Gly-Ser リンカーで繋いだ異種タンパク質融合ベクターを構築した。また, Athe\_0614-Gly-Ser-Bqt1 および Bqt2 の共発現ベクターを鋳型として, Ala-Ala リンカーもしくは 3 helix bundle 構造を持つブドウ球菌タンパク質(SpA) (Deis *et al.*, 2015) のどちらかを含む共発現ベクターを構築した。Ala-Ala リンカーを含むベクターは, KOD mutagenesis kit (TOYOBO) を用い, inverse PCR 法により Gly-Ser リンカーを Ala-Ala リンカーに置換した。プライマーは SBP49-AA-Bqt\_fwd(ATG CAT TTT

CTG GCG AGC CAT CTG C)と SBP49-AA-Bqt\_rev(CGC CGC CTT CTT GAA ATA TTC CTT AGC AGC)を用いた。Inverse PCR の反応液に *Dpn*I を加え、37°Cで一晩インキュベートした。生成物をセルフライゲーションした。3 helix bundle リンカーを含むベクターは、KOD mutagenesis kit (TOYOBO) を用い、inverse PCR 法により Gly-Ser リンカーを除いた領域を増幅させた。プライマーは SBP49-SpA-Vector\_fwd\_2(ATG CAT TTT CTG GCG AGC CAT CTG CTG ACC)と SBP49-SpA-Vector\_rev\_2(CTT CTT GAA ATA TTC CTT AGC AGC TTT CTC)を使用した。3 helix bundle リンカーは GoTaq (Promega) を用い、PCR 法により調製した。プライマーは 4ZMD linker\_SBP49\_2(TTC ATA AAA CGC ATT CTG CCA TTC TTT ATT GAA CTT ATT GTC CGC TTT CTT AAA GTA CTC), 4ZMD linker\_SBP49\_3(TGG CAG AAT GCG TTT TAT GAA ATT CTG CAT CTG CCG AAT CTG ACC GAA GAA CAG CGT AAT), 4ZMD linker\_SBP49\_4(GCT CAC GCT CGG ATC ATC TTT CAG GCT CTG AAT AAA GCC ATT ACG CTG TTC TTC GGT CAG), 4ZMD linker\_SBP49\_5(GAT GAT CCG AGC GTG AGC AAA GAA ATT TTG GCG GAA GCG AAA AAA CTG AAT GAT GCG CAG), 4ZMD linker\_SBP49\_7(GAA TAT TTC AAG AAG GCG GAC AAT AAG TTC AAT AAA GAA T), 4ZMD linker\_SBP49\_8(CGC CAG AAA ATG CAT TTT CGG CGC CTG CGC ATC ATT CAG T)を使用した。アガロースゲル電気泳動でインサートおよびベクターの増幅を確認し、ゲルを切り出し精製した。精製したベクターにインサートを In-fusion HD Cloning Kit (TaKaRa) を用いて導入し、3 helix bundle リンカーを含むベクターを構築した。その後、コンピテントセル(DH5  $\alpha$ )を加えて混合し、氷上で 30 分間氷冷した。42°Cで 40 秒間ヒートショックした後、氷上で 2 分間氷冷した。形質転換された大腸菌に SOC 培地を 800  $\mu$ L 加え、37°Cで 60 分間回復培養を行った。培養液を 1,740  $\times$  *g*で 10 分間遠心し、沈殿した菌体を少量の SOC 培地で懸濁し、その懸濁液を終濃度 100  $\mu$ g/mL のアンピシリンを含む LB 寒天培地にまき、一晩

培養した。シングルコロニーを拾って試験管培養を行い、ミニプレップにより発現ベクターを精製し、DNA シークエンシングにより塩基配列の確認を行った。

### 3-2-2 異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体の大量精製

異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体は Ni-NTA Agarose (Qiagen) アフィニティークロマトグラフィー, His<sub>6</sub>-tag の切除および SP Sepharose (GE Healthcare) 陽イオン交換クロマトグラフィーの3段階で精製した。異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体の大量発現には大腸菌株 BL21(DE3)を用いた。異種タンパク質-Bqt1 および Bqt2 の遺伝子が挿入された pET21a で形質転換された大腸菌は 800 mL の LB 培地で 30°C で培養した。菌体濁度(OD<sub>600</sub>)が 0.4 付近になったところで培養器の温度を 18°C に下げて 60 分間培養したのちに、IPTG を終濃度 0.2 mM になるように加えて発現を誘導し、一晩 18°C で培養を行った。翌日、大腸菌を溶解 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 1 mM imidazole, 2 mM 2-mercaptoethanol) で懸濁し、以降の操作を 4°C で行った。まず、超音波破碎機を用いて細胞破碎液を調製した。これを 35,200×g で 30 分間遠心し、可溶性画分と不溶性画分を分離した。次に、可溶性画分を Ni-NTA Agarose ビーズ 2 mL と 1 時間混和した。異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体が結合した Ni-NTA Agarose ビーズをエコノカラム (Bio-Rad) に充填し、40 mL の洗浄 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 30 mM imidazole, 2 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した。結合した異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体は 30 mM から 400 mM の imidazole 直線濃度勾配で溶出し、溶出液をおよそ 47 本に分画した。溶出フラクションを SDS-PAGE で確認した後にピークフラクションを回収し、PreScission protease (タンパク質 1 mg に対して PreScission protease を 4 units) を加え、透析 buffer A (10 mM Bis-Tris-HCl, pH 6.5, 0.5 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% CHAPS, 2 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析し、His<sub>6</sub>-tag の切除を行った。透析チューブからサンプル

ルを回収し、His<sub>6</sub>-tag の切除を SDS-PAGE で確認した後、塩濃度を下げるためにサンプルを超純水で 2.5 倍希釈した。希釈したサンプルを SP Sepharose ビーズ 2.1 mL が充填されたエコノカラムへ添加し、40 mL の透析 buffer B (His<sub>6</sub>-tag の切除で使用した透析 buffer A を超純水で 2.5 倍希釈したもの) で洗浄した。結合した異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体は 200 mM から 800 mM の NaCl 直線濃度勾配で溶出し、溶出液をおよそ 47 本に分画した。溶出フラクションを SDS-PAGE で確認した後にピークフラクションを回収し、透析 buffer C (10 mM Bis-Tris-HCl, pH 6.5, 0.5 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析し、glycerol および CHAPS の除去を行った。回収したサンプルは、VIVASPIN TURBO 15 (30 K MWCO) 濃縮カートリッジを用いて、濃度が約 10 mg/mL 付近になるまで濃縮を行った。全てのサンプルは-80°C に保存した。精製した異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体の濃度は紫外吸収法により定量し、モル吸光係数は ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) を用いて算出した。モル吸光係数は、Athe\_0614-GS リンカーは 141,180 L $\cdot$ mol<sup>-1</sup> $\cdot$ cm<sup>-1</sup>, Athe\_0614-AA リンカーは、141,180 L $\cdot$ mol<sup>-1</sup> $\cdot$ cm<sup>-1</sup>, Athe\_0614-3 helix bundle は 148,170 L $\cdot$ mol<sup>-1</sup> $\cdot$ cm<sup>-1</sup>, Athe\_0597 は 151,610 L $\cdot$ mol<sup>-1</sup> $\cdot$ cm<sup>-1</sup>であった。

### 3-2-3 超遠心分析 (沈降平衡法)

超遠心分析には、Beckman Optima XL-A/I 装置を用いた。ローターは 8 セクターに分かれた Beckman An-50Ti rotor を用いた。測定に用いた異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体は、終濃度が 0.3 mg/mL と 0.5 mg/mL となるように調製した。遠心は 20°C で行い、7,000 rpm で 16 時間、10,000 rpm で 16 時間、18,000 rpm で 16 時間、22,000 rpm で 16 時間、連続で遠心し、4 時間おきに 280 nm の波長でサンプルの分布を測定した。得られた分布を、Origin ソフトウェアを用いて解析した。SEDNTERP プログラム (Laue *et al.*, 1992) を用いてアミノ酸配列から求めた偏比容 (0.743 cm<sup>3</sup>/g) と溶媒密度 (1.16

g/cm<sup>3</sup>)を用いて分子量を計算した。

#### 3-2-4 ゲルろ過解析

精製した異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体を透析 buffer C で平衡化した Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)で分離した。分子量マーカーとして, conalbumin (75 kDa), ovalbumin (43 kDa)を用いた。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 Athe\_0614-Gly-Ser-Bqt1-Bqt2 複合体の解析

Athe\_0614 はマルトース結合タンパク質 (図 10-A) の構造ホモログであり, 分子量が 45,762 Da である。Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体の分子量 (29,101 Da) と比較すると約 1.5 倍である。Bqt1 の N 末端に Athe\_0614 を融合し, Athe\_0614-GS-Bqt1-Bqt2 複合体を大腸菌内で大量発現させたところ, 溶解度が大幅に向上することがわかった。Athe\_0614-GS-Bqt1-Bqt2 複合体を高純度に精製することに成功した (図 14, レーン 2, 5)。また, 複合体を高濃度 (~70 mg/mL) に濃縮することができ, 界面活性剤を用いなくても精製することができるようになった。Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体形成に Athe\_0614 が影響を与えているかを調べるために, 超遠心分析を用いて, 沈降平衡法により Athe\_0614-GS-Bqt1-Bqt2 複合体の正確な分子量を算出した。Athe\_0614, Bqt1, および Bqt2 のアミノ酸配列から求めた理論上の分子量が 75,009 Da であり, 沈降平衡法により算出された分子量が 75,000 Da であった (図 10-B)。このことから, Athe\_0614 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わかった。

#### 3-3-2 Athe\_0614-Ala-Ala-Bqt1-Bqt2 複合体の解析

Athe\_0614 と Bqt1 をつなぐポリペプチドリンカーを短く硬い Ala-Ala リンカーにして, 複合体の大量調製を試みたところ, この複合体は Gly-Ser リンカーを含む複合体と同様の方法で, 高純度に精製することができた (図 14, レーン 6)。また, 界面活性剤を用いなくても精製することができた。次に, Ala-Ala リンカーの Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体形成への影響を調べるために, 超遠心分析を用いて, 沈降平衡法により Athe\_0614-AA-Bqt1-Bqt2 複合体の正確な分子量を算出した。Athe\_0614, Bqt1, および Bqt2 のアミノ酸配列から求めた分子量が 75,007 Da であり, 沈降平衡法により算出

された分子量が 74,900 Da であった (図 11-B)。このことから、Ala-Ala リンカーは Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体形成に影響を及ぼさないことがわかった。

### 3-3-3 Athe\_0614-3 helix bundle-Bqt1-Bqt2 複合体の解析

Gly-Ser リンカーは柔軟な構造を有するのに対し、Ala-Ala リンカーは硬い構造を有することが考えられる。そこで、これらのリンカーより長く硬い構造を有すると考えられるリンカーの複合体構造への影響を調べた。このリンカーとして、56 アミノ酸残基からなる 3 helix bundle を用いた。3 helix bundle はブドウ球菌由来のタンパク質であり、立体構造が既に明らかにされている (PDB ID: 4ZMD) (図 12-A)。

Athe\_0614 と Bqt1 を 3 helix bundle でつないだ融合タンパク質を Bqt2 と大腸菌内で共発現させたところ、他のリンカーを含む複合体と同様に可溶性が高いことがわかった。そして、Athe\_0614-3 helix bundle-Bqt1-Bqt2 複合体も高純度に精製することに成功した (図 14, レーン 7)。3 helix bundle リンカーの Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体形成への影響を調べるために、超遠心分析を用いて、沈降平衡法により Athe\_0614-3helix bundle-Bqt1-Bqt2 複合体の正確な分子量を算出した。Athe\_0614, 3 helix bundle, Bqt1, および Bqt2 のアミノ酸配列から求めた分子量が 81,533 Da であり、沈降平衡法により算出された分子量が 81,500 Da であった (図 12-B)。このことから、3 helix bundle リンカーを用いても、Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体形成には影響がないことが考えられた。

3 種類のリンカーを用いた Bqt1-Bqt2 複合体の大量調製の結果を統合して考えると、様々な種類のポリペプチドリンカーにおいて複合体の大量調製が可能であることが推察できる。



#### 3-3-4 Athe\_0597-Gly-Ser-Bqt1-Bqt2 複合体の解析

Athe\_0597 はマルトース結合タンパク質の構造ホモログであり、分子量が 54,704 Da である。Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体の分子量 (29,101 Da) と比較すると約 2 倍であり、Athe\_0597 を融合すると Athe\_0597-Bqt1-Bqt2 複合体の大部分は Athe\_0597 によって占められることになる。Athe\_0597 の立体構造は明らかになっていないが、マルトース結合タンパク質とアミノ酸配列の相同性が高い領域が N 末端側にある。Bqt1 の N 末端に Athe\_0597 を融合し、複合体を大腸菌内で大量発現させたところ、Athe\_0614 を用いた時と同様に溶解度が高いことがわかった。Athe\_0597-Bqt1-Bqt2 複合体についても高純度に精製することに成功した (図 14, レーン 3)。界面活性剤も不要であった。Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体形成に Athe\_0597 が影響を与えているかを調べるために、超遠心分析を用いて、沈降平衡法により Athe\_0597-Bqt1-Bqt2 複合体の正確な分子量を算出した。Athe\_0597, Bqt1, および Bqt2 のアミノ酸配列から求めた理論上の分子量が 83,486 Da であり、沈降平衡法により算出された分子量が 83,500 Da であった (図 13-B)。このことから、Athe\_0597 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わかった。その一方で、Athe\_0597-Bqt1-Bqt2 複合体の最終精製物の SDS-PAGE ゲル写真にわずかではあるが、Athe\_0597 と考えられる分解産物が見られた。そのことから、Bqt1 に融合するタンパク質としては Athe\_0614 の方が Athe\_0597 より安定であることが考えられた。

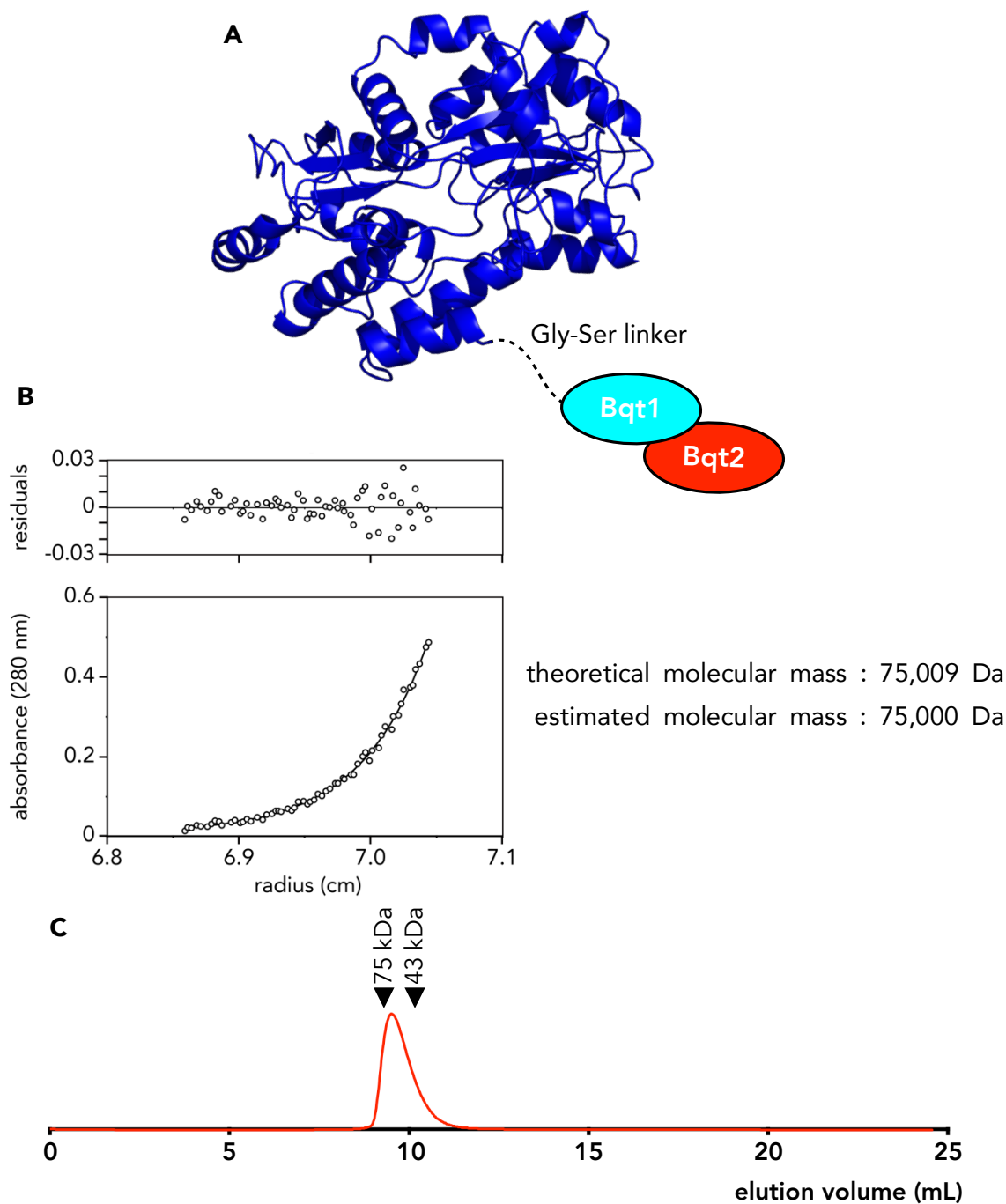


図10 Athe\_0614-Gly-Ser-Bqt1-Bqt2 複合体の解析

A) マルトース結合タンパク質の構造を用いた複合体の模式図。

B) 沈降平衡法解析により得られた, Athe\_0614-GS-Bqt1-Bqt2 複合体のプロット。理論値は Athe\_0614-Gly-Ser-Bqt1 と Bqt2 がヘテロ二量体を形成した場合の分子量。

C) ゲルろ過解析の溶出ピーク。黒い三角は分子量マーカーとして流した球状タンパク質(conalbumin:75 kDa, ovalbumin:43 kDa) の溶出ピークの位置を示している。

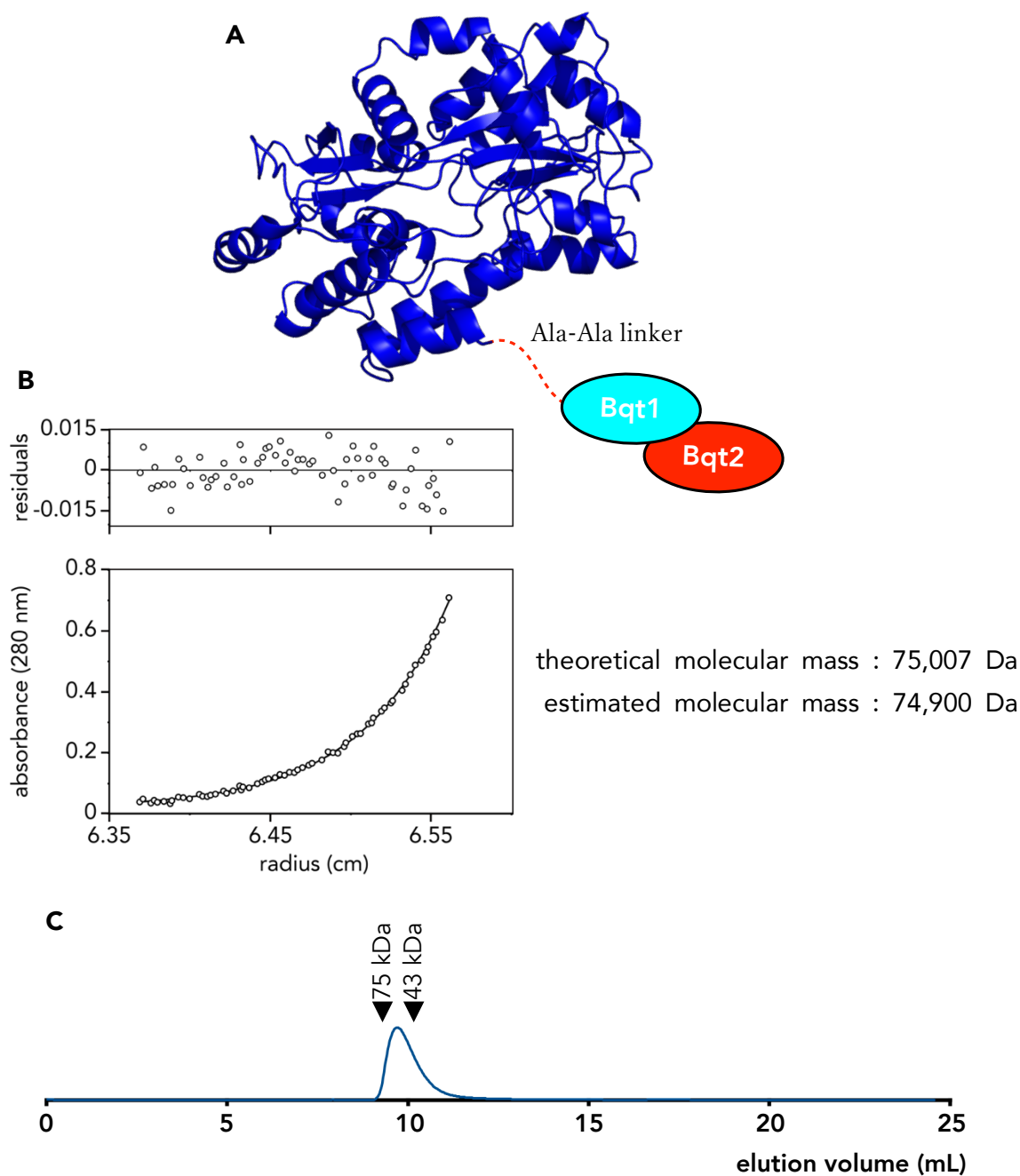


図 11 Athe\_0614-Ala-Ala-Bqt1-Bqt2 複合体の解析

A) マルトース結合タンパク質の構造を用いた複合体の模式図。

B) 沈降平衡法解析により得られた, Athe\_0614-Ala-Ala-Bqt1-Bqt2 複合体のプロット。理論値は Athe\_0614-Ala-Ala-Bqt1 と Bqt2 がヘテロ二量体を形成した場合の分子量。

C) ゲルろ過解析の溶出ピーク。黒い三角は分子量マーカーとして流した球状タンパク質(conalbumin:75 kDa, ovalbumin:43 kDa) の溶出ピークの位置を示している。

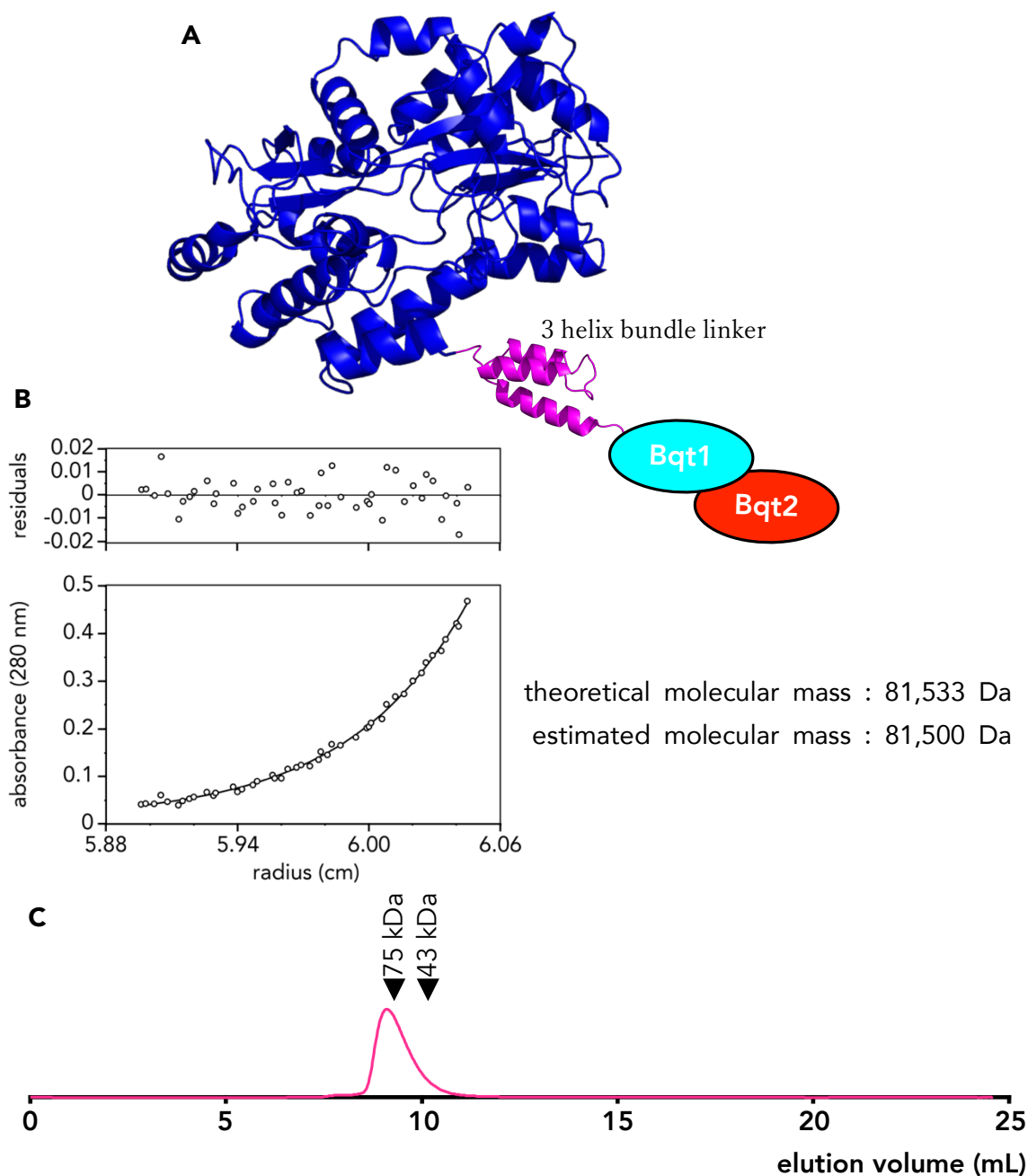


図12 Athe\_0614-3 helix bundle-Bqt1-Bqt2 複合体の解析

- A) マルトース結合タンパク質および 3 helix bundle の構造を用いた複合体の模式図。
- B) 沈降平衡法解析により得られた, Athe\_0614-3 helix bundle-Bqt1-Bqt2 複合体のプロット。理論値は Athe\_0614-3 helix bundle-Bqt1 と Bqt2 がヘテロ二量体を形成した場合の分子量。
- C) ゲルろ過解析の溶出ピーク。黒い三角は分子量マーカーとして流した球状タンパク質(conalbumin:75 kDa, ovalbumin:43 kDa) の溶出ピークの位置を示している。

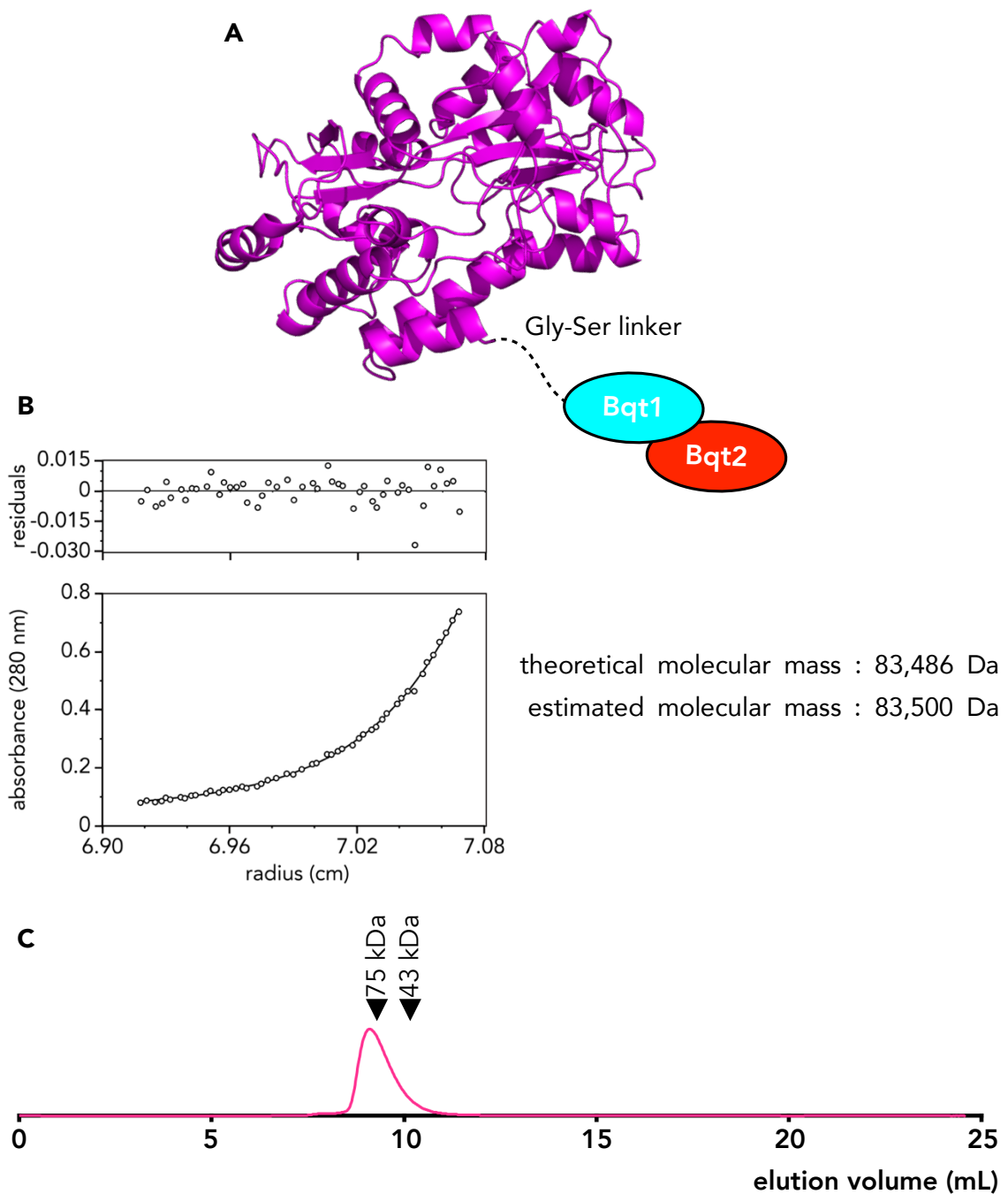


図 13 Athe\_0597-Gly-Ser-Bqt1-Bqt2 融合体の解析

A) マルトース結合タンパク質の構造を用いた複合体の模式図。

B) 沈降平衡法解析により得られた, Athe\_0597-Gly-Ser-Bqt1-Bqt2 複合体のプロット。理論値は Athe\_0597-Gly-Ser-Bqt1 と Bqt2 がヘテロ二量体を形成した場合の分子量。

C) ゲルろ過解析の溶出ピーク。黒い三角は分子量マーカーとして流した球状タンパク質(conalbumin:75 kDa, ovalbumin:43 kDa) の溶出ピークの位置を示している。

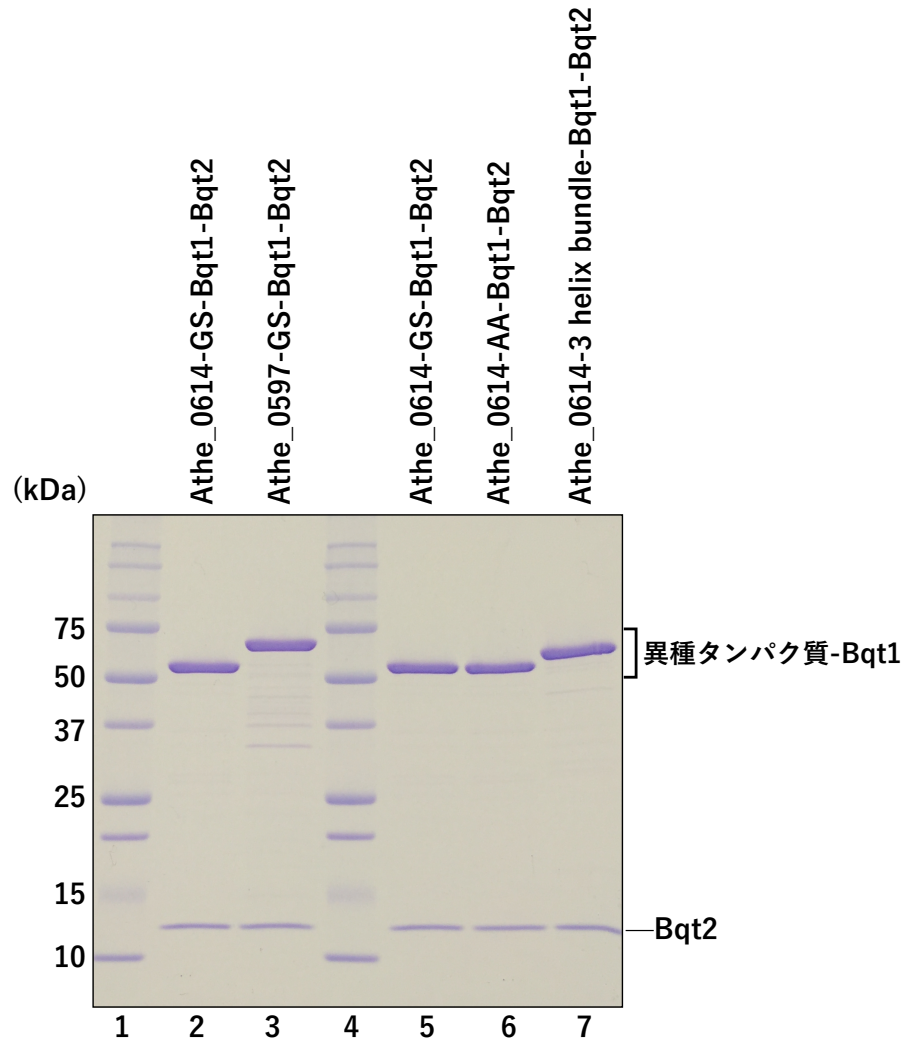


図 14 大量精製した異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体  
 異種タンパク質-Bqt1-Bqt2 複合体精製物の 10-20% SDS-PAGE の結果。  
 レーン 1, 4 : 分子量マーカー  
 レーン 2, 5 : Athe\_0614-GS-Bqt1-Bqt2 複合体  
 レーン 3 : Athe\_0597-GS-Bqt1-Bqt2 複合体  
 レーン 6 : Athe\_0614-AA-Bqt1-Bqt2 複合体  
 レーン 7 : Athe\_0614-3 helix bundle-Bqt1-Bqt2 複合体

### 3-4 考察

本研究では、マルトース結合タンパク質の構造ホモログである Athe\_0614 および Athe\_0597 を Bqt1 の N 末端に融合させると、Bqt1-Bqt2 複合体の溶解度が大幅に向上することがわかった。精製した複合体は、高濃度に濃縮でき、界面活性剤を用いなくても精製することができるようになった。先行研究で Bqt1 の N 末端に SUMO タグを融合した際は界面活性剤 (CHAPS) が必要不可欠であった。融合した Athe\_0614 および Athe\_0597 タンパク質は、それぞれ 45 kDa および 54 kDa の分子量であり、SUMO タンパク質 (12 kDa) および Bqt1-Bqt2 複合体 (29 kDa) より大きなタンパク質である。さらに、Athe\_0614 タンパク質は非常に可溶性が高く結晶化に成功している (Yokoyama *et al.*, 2013)。Athe\_0614 および Athe\_0597 タンパク質の分子量と溶解度は、Bqt1-Bqt2 複合体の凝集および沈殿を防ぐのに重要な要因である可能性が考えられる。

超遠心分析を用いた沈降平衡法の解析より、Athe\_0614 および Athe\_0597 タンパク質を Bqt1 の N 末端に融合しても、Bqt1 と Bqt2 のヘテロ二量体の形成に影響を及ぼさないことが考えられる。今回融合した 2 種類のタンパク質は、Bqt1-Bqt2 複合体の結晶化を促進する異種タンパク質として、有望であると結論づけた。

以前の研究で、異種タンパク質との間のポリペプチドリンカーの配列と長さが立体構造の不均一性の程度に影響することが示されており (Moon *et al.*, 2010)、最適なリンカーは標的タンパク質ごとに異なることが考えられる。Athe\_0614-Bqt1-Bqt2 複合体は、様々なポリペプチドリンカーでも安定して精製することができた。Gly-Ser リンカーの代わりに Ala-Ala リンカーや 3helix bundle リンカーを用いても、Bqt1 と Bqt2 とのヘテロ二量体形成への影響はないことが超遠心分析の解析より明らかになった。一方で、2 アミノ酸リンカーを用いた、Athe\_0614-Gly-Ser-Bqt1-Bqt2 複合体と Athe\_0614-Ala-Ala-Bqt1-Bqt2 複合体のゲルろ過解析の結果を比較すると、興味深いことに、溶出ピー

ク的位置にはっきりした違いが見られた (図 15)。両者の分子量の差は、2 Da とほとんど分子量に差が無いにもかかわらず、Athe\_0614-Ala-Ala-Bqt1-Bqt2 複合体の方が明らかに低分子量側に溶出されていた。この結果から、リンカーの種類によって異種タンパク質と Bqt1 とのコンフォメーションが異なっていたことが考えられる。X 線結晶構造解析により、Bqt1-Bqt2 複合体の構造を明らかにするためには、ポリペプチドリンカーの選択が重要になることが考えられる。

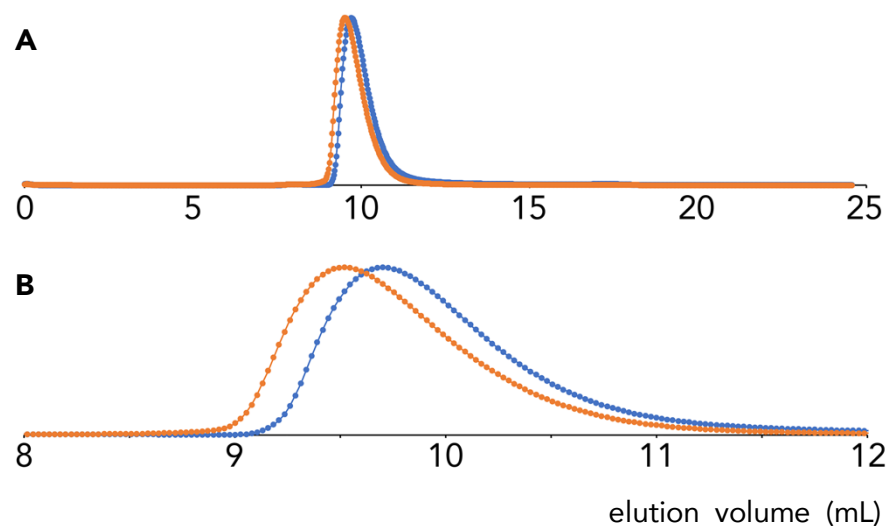


図 15 Athe\_0614-GS-Bqt1-Bqt2 複合体と Athe\_0614-AA-Bqt1-Bqt2 複合体のゲルろ過ピークの重ね合わせ

橙色：Gly-Ser リンカーを含む Athe\_0614 融合体のピーク

青色：Ala-Ala リンカーを含む Athe\_0614 融合体のピーク

A) GS リンカーと AA リンカーのゲルろ過ピークの重ね合わせ。

B) 溶出体積 8-12 mL の間にあるピークの拡大図。



## 第4章 総合討論

### 4-1 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

クロマチンの研究に関しては、多様なヌクレオソーム構造を解析する際に問題となる位相計算のステップを解決するために、セレノメチオニンを導入したヌクレオソームのX線結晶構造解析法の確立を試みた。その結果、セレノメチオニン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位相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。これまでにセレン原子の異常分散の情報をもとにヌクレオソームの構造を明らかにした報告はされておらず、本研究が初めてである。今回、12個および16個のセレン原子で通常型のヌクレオソームの構造決定に成功した。構造解析に必要なセレン原子の数は解析対象となるタンパク質の形（対称性）、分解能およびセレン原子のB-factorなどに影響されると言われている。今回構造解析したヌクレオソームに導入したセレン原子の位相データをもとに構造解析に必要なセレン原子の数を予測した結果、8個のセレン原子で構造解析が可能であることが示唆された。このことから多様なヌクレオソーム構造を解く際には、H4をのぞく他の3種類のヒストンタンパク質にもともと存在するメチオニンをセレノメチオニンに置換することにより、構造解析を行うことが可能だと考えられる。

今回確立した方法を用いることで、理論上は多様なヌクレオソームの位相を決定することができると考えられる。しかし、セレノメチオニンを導入したヒストンバリエーションの調製、ヌクレオソームの再構成、および結晶化ができるのかという問題点がある。最近明らかにされたタンパク質の構造の多くは、クライオ電子顕微鏡を用いて構造決定がなされている。その理由として、クライオ電子顕微鏡解析ではタンパク質の結晶を作製する必要がなく、溶液の状態で構造解析できるという点が挙げられる。しかし、X線結晶構造解析に比べると高分解能で解けるケースはまだ少ない。このことから、より高分解能での構

造解析が可能なX線結晶構造解析の有用性は依然として高いと言える。

#### 4-2 異種タンパク質融合を利用した分裂酵母Bqt1-Bqt2複合体の大量調製

テロメアに着目した研究では、Bqt1-Bqt2複合体のX線結晶構造解析を試みた。Bqt1-Bqt2複合体は可溶性が低く、構造解析に適さない問題を解決するべく、Bqt1-Bqt2複合体に融合する異種タンパク質の種類と、そのタンパク質とBqt1-Bqt2複合体をつなぐポリペプチドリンカーの種類を検討した。

Athe\_0614およびAthe\_0597タンパク質をBqt1のN末端に融合し、複合体を大腸菌内で大量発現させたところ、溶解度が大幅に向上した。また高純度に精製することが可能になり、界面活性剤を用いなくても精製することができるようになった。過去の研究から、ポリペプチドリンカーの配列と長さが立体構造の分解能に影響を及ぼすことが示されているため、Athe\_0614-Bqt1-Bqt2複合体についてはAthe\_0614とBqt1をつなぐポリペプチドリンカーをGly-Serリンカー、Ala-Alaリンカーおよび3 helix bundleリンカーの3種類について検討を行った。3種類のどのリンカーについても可溶性が高い状態で複合体を調製することができた。また高純度に精製することができたことから、リンカーによる複合体の安定性への影響は小さいことがわかった。Athe\_0614を融合することで複合体を安定に精製することが可能となったが、依然として結晶化には至っていない。その理由として、Athe\_0614とBqt1の間のコンフォメーションまたはBqt1とBqt2の間のコンフォメーションが不均一である可能性が考えられる。今後、Athe\_0614-Bqt1-Bqt2複合体がテロメアクラスター形成因子であり、Bqt1とBqt2の両者と相互作用するRap1と複合体を形成するのかを検証し、Athe\_0614を融合したBqt1-Bqt2複合体が機能的であるかを調べると同時に、Athe\_0614とBqt1を融合するポリペプチドリンカーの種類を検討し、結晶構造解析に適した複合体を探索する必要がある。

## 引用文献

Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst.* **D66**, 213-221.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science* **289**, 905-920.

Blackburn, E. H. and Gall, J. G. (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* **25**, 33-35.

Bian, Q. and Belmont, A. S. (2012) Revisiting higher-order and large-scale chromatin organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 359-66.

Chikashige, Y., Ding, D. Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S., Yanagida, M., and Hiraoka, Y. (1994) Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* **264**, 270-273.

Chikashige, Y., Tsutsumi, C., Yamane, M., Okamasa, K., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006) Meiotic proteins bqt1 and bqt2 tether telomere to form the bouquet arrangement of chromosomes. *Cell* **125**, 59-69.

Couture, J. F., Collazo, E., and Trievel, R. C. (2006) Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 698-703.

Deis, L. N., Wu, Q., Wang, Y., Qi, Y., Daniels, K. G., Zhou, P., and Oas, T. G. (2015) Suppression of conformational heterogeneity at a protein-protein interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 9028-9033.

Diamond, R. (1974) Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *J. Mol. Biol.* **25**, 371-391.

Eltsov, M., Maclellan, K. M., Maeshima, K., Frangakis, A. S., and Dubochet, J. (2008) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19732–19737.

Finch, J. T. and Klug, A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1897-901.

Hendrickson, W. A., Horton, J. R., and LeMaster, D. M. (1990) Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for

direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J.* **9**, 1665-1672.

Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., Cameron, A. D., Kobayashi, T., Hamakubo, T., Iwata, S., and Murata, T. (2012) G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* **482**, 237-240.

Horowitz, R. A., Agard, D. A., Sedat, J. W., and Woodcock, C. L. (1994) The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J. Cell Biol.* **125**, 1-10.

Ichikawa, Y., Kagawa, W., Saito, K., Chikashige, Y., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Kurumizaka, H. (2013) Purification and characterization of the fission yeast telomere clustering factors, Bqt1 and Bqt2. *Protein Expr. Purif.* **88**, 207-213.

Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Cryst.* **D66**, 125-132.

Kobe, B., Center, R. J., Kemp, B. E., and Poulos, P. (1999) Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4319-4324.

Kobe, B., Ve, T., and Williams, S. J. (2015) Fusion-Protein-assisted crystallization. *Acta Cryst.* **F71**, 861-869.

Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of eukaryote chromosome. *Cell***98**, 285-294.

Kujirai, T., Ehara, H., Fujino, Y., Shirouzu, M., Sekine, S. I., and Kurumizaka, H. (2018) Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage. *Science* **362**, 595-598.

Laue, T. M., Shah, B., and Ridgeway, T. M. (1992) In: Harding, S. E., Rowe, A. J., Horton, L. C. (eds), *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.

Maeshima, K., Hihara, S., and Eltsov, M. (2010) Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 291-297.

McClintock, B. (1941) The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**, 234-282.

Moon, A. F., Mueller, G. A., Zhong, X., and Pedersen, L. C. (2010) A synergistic approach to protein crystallization: Combination of a fixed-arm carrier with surface entropy reduction. *Protein Sci.* **19**, 901-913.

Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **41**, 181-190.

Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* **311**, 532-537.

Scherthan, H. (2001) A bouquet makes ends meet. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 621-627.

Szostak, J. W. and Blackburn, E. H. (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**, 245-255.

Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010) Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant H3T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 10454-10459.

Tanaka, Y., Tawaramoto-Sasanuma, M., Kawaguchi, S., Ohta, T., Yoda, K., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2004) Expression and purification of recombinant human histones. *Methods* **30**, 3-11.

Tang, X., Jin, Y., and Cande, W. Z. (2006) Bqt2p is essential for initiating telomere clustering upon pheromone sensing in fission yeast. *J. Cell Biol.* **173**, 845-851.

Tomita, K. and Cooper, J. P. (2007) The telomere bouquet controls the meiotic spindle. *Cell* **130**, 113-126.

Watson, J. D. and Crick, F. D. (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737-738.

Watson, J. D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* **239**, 197-201.

Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Cryst.* **D67**, 235-242.

Yan, K., Yang, J., Zhang, Z., McLaughlin, S. H., Chang, L., Fasci, D., Ehrenhofer-Murray, A. E., Heck, A. J. R., and Barford, D. (2019) Structure of inner kinetochore CCAN complex assembled onto a centromeric nucleosome. *Nature* **574**, 278-282.



Yokoyama, H., Yamashita, T., Horikoshi, N., Kurumizaka, H., and Kagawa, W. (2013) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the secreted protein Athe\_0614 from *Caldicellulosiruptor bescii*. *Acta Cryst.* **F69**, 438-440.

Zou, Y., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2012) N-terminal T4 lysozyme fusion facilitates crystallization of a G protein coupled receptor. *PLoS One* **7**, e46039.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜り、また本論文を作成するにあたり、貴重な御助言を賜りました明星大学大学院理工学研究科化学専攻教授 香川 亘先生に心より御礼申し上げます。

ヒストンの調製、ヌクレオソームの再構成および構造解析を行うにあたり、ご指導いただきました明星大学大学院理工学研究科化学専攻 浦野一輝修士、ノースダコタ大学 五月女美香博士に心より感謝いたします。

また、Bqt1-Bqt2 複合体の調製を行うにあたり、貴重なご支援を賜りました理化学研究所テクニカルスタッフ 相澤由有希修士に心より感謝いたします。

Athe\_0614 および Athe\_0597 遺伝子を提供していただきました畜産草地研究所主任研究員横山浩博士に心より感謝いたします。

投稿論文の作成にあたり、貴重なご助言を頂きました東京大学定量生命科学研究所 教授 胡桃坂仁志先生、大阪大学大学院教授 平岡泰先生、情報通信研究機構 原口徳子先生並びに近重裕次先生に心より感謝いたします。

最後に、研究室での研究活動において、支援していただきました香川研究室および清水研究室の皆様へ感謝いたします。

研究業績

種類別	題名、発表・発行掲載雑誌名、発表発行年月、連名者
論文	<p><u>Yuzurihara, H.</u>, Aizawa, Y., Saotome, M., Ichikawa, Y., Yokoyama, H., Chikashige, Y., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Kurumizak, H., and Kagawa, W. Improved methods for preparing the telomere tethering complex Bqt1-Bqt2 for structural studies. <i>Protein J.</i> (In press)</p> <p>Saotome, M., Horikoshi, N., Urano, K., Kujirai, T., <u>Yuzurihara, H.</u>, Kurumizaka, H., Kagawa, W. Structure determination of the nucleosome core particle by selenium SAD phasing. <i>Acta Cryst. D75</i>, 930-936(2019).</p>
講演	<p>国内学会（口頭発表） <u>讓原 秀隆</u>、今井 洸志、布施 智博、香川 亘、柳田 顕郎、胡桃坂 仁志、清水 光弘 出芽酵母ゲノムにおけるヒストンバリエント H2A.Z を含むヌクレオソームの動態：部位特異的的化学切断法による解析 『第 92 回日本生化学会大会』 2019 年 9 月</p> <p><u>讓原 秀隆</u>、横山 浩、近重 裕次、原口 徳子、平岡 泰、胡桃坂 仁志、香川 亘 結晶化シャペロンを用いた Bqt1-Bqt2 複合体の X 線結晶構造解析 『第 89 回日本生化学会大会』 2016 年 9 月</p>

	<p>国内学会（ポスター発表）</p> <p><u>譲原 秀隆</u>、今井 洸志、布施 智博、香川 亘、柳田 顕郎、胡桃坂 仁志、清水 光弘</p> <p>出芽酵母ゲノムにおけるヒストンバリエント H2A.Z を含むヌクレオソームの動態：部位特異的化学切断法による解析</p> <p>『第 92 回日本生化学会大会』</p> <p>2019 年 9 月</p> <p><u>譲原 秀隆</u>、横山 浩、近重 裕次、原口 徳子、平岡 泰、胡桃坂 仁志、香川 亘</p> <p>ブーケ配向形成に関与する Bqt1-Bqt2-Rap1 複合体の生化学的解析</p> <p>『第 41 回日本分子生物学会年会』</p> <p>2018 年 12 月</p> <p><u>譲原 秀隆</u>、横山 浩、近重 裕次、原口 徳子、平岡 泰、胡桃坂 仁志、香川 亘</p> <p>ブーケ配向形成に関与する因子群の生化学的解析</p> <p>『第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会』</p> <p>2017 年 12 月</p> <p><u>譲原 秀隆</u>、横山 浩、近重 裕次、原口 徳子、平岡 泰、胡桃坂 仁志、香川 亘</p> <p>分裂酵母 Bqt1-Bqt2 複合体の大量調製と結晶化</p> <p>『第 17 回日本蛋白質科学会』</p> <p>2017 年 6 月</p> <p><u>譲原 秀隆</u>、横山 浩、近重 裕次、原口 徳子、平岡 泰、胡桃坂 仁志 香川 亘</p> <p>X-ray crystallographic studies of the Bqt1-Bqt2 complex using crystallization chaperones</p> <p>『第 39 回日本分子生物学会年会』</p> <p>2016 年 12 月</p>
--	--

讓原 秀隆、横山 浩、近重 裕次、原口 徳子、平岡 泰、胡桃坂 仁志、香川 亘

結晶化シャペロンを用いた Bqt1-Bqt2 複合体の X 線結晶構造解析  
『第 89 回日本生化学会大会』

2016 年 9 月

讓原 秀隆、横山 浩、近重 裕次、原口 徳子、平岡 泰、胡桃坂 仁志、香川 亘

結晶化シャペロンを用いた Bqt1-Bqt2 複合体の X 線結晶構造解析  
『第 38 回日本分子生物学会年会』

2015 年 12 月