

博士論文

Aryl hydrocarbon receptorの構造生物学的研究

櫻井 駿也

## 目次

図表目次 .....	5
略語.....	9
1. 序.....	11
1-1. ダイオキシン類.....	11
1-2. Aryl hydrocarbon receptor.....	12
1-3. AhR のシグナル経路 .....	14
1-4. bHLH-PAS ファミリー .....	15
1-5. AhR, ARNT, AhRR .....	18
1-6. 本研究の目的と概要 .....	25
2. 材料と方法.....	26
2-1. 2本鎖 DNA, リガンドの調製 .....	26
2-1-1. 2本鎖 DNA の調製 .....	26
2-1-2. リガンドの調製.....	29
2-2. 野生型 human AhR/ARNT.....	30
2-2-1. 発現ベクターの構築 .....	30
2-2-2. タンパク質の発現と精製.....	31
2-2-3. DNA との結合確認と DNA 複合体の調製.....	32
2-2-4. 安定性の評価 .....	33
2-3. ループ欠損変異体.....	34
2-3-1. 発現ベクターの構築 .....	34
2-3-2. タンパク質の発現と精製.....	35
2-3-3. DNA との結合確認と DNA 複合体の調製.....	35
2-3-4. 安定性の評価 .....	35
2-4. Human 以外の種由来の AhR/ARNT .....	36
2-4-1. 発現ベクターの構築 .....	36
2-4-2. タンパク質の発現と精製.....	39
2-5. 熱安定化変異体.....	41
2-5-1. HEK293 細胞を用いた発現系, 熱安定性評価系の構築 .....	41
2-5-1-1. 発現ベクターの構築 .....	41
2-5-1-2. タンパク質の発現.....	43
2-5-1-3. 熱安定性の評価 .....	44
2-5-2. 1 残基変異によるスクリーニング .....	45
2-5-2-1. 導入する変異の選定 .....	45
2-5-2-2. 発現ベクターの構築 .....	46
2-5-2-3. タンパク質の発現と熱安定性の評価.....	50

2-5-3. 2 残基変異によるスクリーニング .....	50
2-5-3-1. 発現ベクターの構築 .....	50
2-5-3-2. タンパク質の発現と熱安定性の評価 .....	52
2-5-4. 昆虫細胞 Sf9 を用いた熱安定化変異体 AhR/ARNT の調製 .....	53
2-5-4-1. 発現ベクターの構築 .....	53
2-5-4-2. タンパク質の発現と精製 .....	54
2-5-4-3. 熱安定性の評価 .....	55
2-6. 結晶化シャペロン NZ-1 との複合体 .....	56
2-6-1. NZ-1 Fv-clasp の調製 .....	57
2-6-1-1. 既存の方法による NZ-1 Fv-clasp の調製 .....	57
2-6-1-2. リフォールディング条件の検討 .....	59
2-6-1-3. 発現コンストラクトの検討 .....	61
2-6-1-4. NZ-1 Fv-clasp の新規調製方法の確立 .....	61
2-6-2. HKE293 細胞を用いた PA ペプチド挿入位置のスクリーニング .....	63
2-6-2-1. 発現ベクターの構築 .....	63
2-6-2-2. タンパク質の発現と NZ-1 結合能の評価 .....	65
2-6-3. 昆虫細胞 Sf9 を用いた PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の調製 .....	66
2-6-3-1. 発現ベクターの構築 .....	66
2-6-3-2. タンパク質の発現と精製 .....	69
2-6-3-3. 精製試料を用いた NZ-1 結合能の評価 .....	70
2-6-3-4. スモールスケールでの発現と NZ-1 Fv-clasp 結合能の評価 .....	70
2-6-4. NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製 .....	71
2-7. 結晶化に向けたその他の検討 .....	73
2-7-1. 変異を組み合わせた AhR/ARNT .....	73
2-7-1-1. 発現ベクターの構築 .....	73
2-7-1-2. タンパク質の発現と精製 .....	74
2-7-2. AhR と HIF-2 $\alpha$ のキメラコンストラクト .....	76
2-7-2-1. 発現ベクターの構築 .....	76
2-7-2-2. タンパク質の発現と精製 .....	77
2-7-3. リジン残基のアルキル化 .....	78
2-7-4. 添加剤の検討 .....	79
2-8. AhR/ARNT の結晶化スクリーニング .....	82
2-9. AhR/ARNT のホモロジーモデル .....	83
2-10. クライオ電子顕微鏡による単粒子解析 .....	84
2-10-1. AhR/ARNT/DNA の電子顕微鏡解析 .....	84
2-10-2. AhR/ARNT/NZ-1 Fv-clasp の電子顕微鏡解析 .....	84

2-11. AhRR/ARNT の X 線結晶構造解析.....	86
2-11-1. 発現ベクターの構築.....	86
2-11-2. タンパク質の発現, 精製と結晶化用試料の調製.....	86
2-11-3. 結晶化スクリーニング.....	87
2-11-4. X 線回折実験.....	87
2-11-5. AhRR/ARNT の構造決定.....	88
2-12. X 線小角散乱.....	89
3. 結果.....	90
3-1. 野生型 human AhR/ARNT.....	90
3-1-1. 野生型 human AhR/ARNT の精製.....	90
3-1-2. DNA との結合確認と DNA 複合体の調製.....	91
3-1-3. 安定性の評価.....	93
3-2. ループ欠損変異体.....	94
3-2-1. ループ欠損変異体の精製.....	94
3-2-2. DNA との結合確認と DNA 複合体の調製.....	95
3-2-3. 安定性の評価.....	97
3-3. Human 以外の種由来の AhR/ARNT.....	98
3-3-1. Mouse 由来の AhR/ARNT.....	98
3-3-2. Mouse 以外の種由来の AhR/ARNT.....	99
3-4. 熱安定化変異体.....	101
3-4-1. 野生型 AhR/ARNT の HEK293 細胞による発現.....	101
3-4-2. 野生型 AhR/ARNT の熱安定性の評価.....	103
3-4-3. 1 残基変異体の熱安定性の評価.....	104
3-4-4. 2 残基変異体の熱安定性の評価.....	108
3-4-5. 熱安定化変異体の精製.....	110
3-4-6. 熱安定化変異体の熱安定性の評価.....	112
3-5. 結晶化シャペロン NZ-1 との複合体.....	113
3-5-1. 既存の方法による NZ-1 Fv-clasp の調製.....	113
3-5-2. リフォールディング条件の検討.....	114
3-5-3. 発現コンストラクトの検討.....	117
3-5-4. 新規方法による NZ-1 Fv-clasp の調製.....	118
3-5-5. HEK293 細胞を用いた PA ペプチド挿入位置のスクリーニング.....	119
3-5-6. PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の精製.....	121
3-5-7. 精製試料を用いた NZ-1 結合能の評価.....	122
3-5-8. スモールスケールでの発現と NZ-1 Fv-clasp 結合能の評価.....	126
3-5-9. NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製.....	129

3-6. 結晶化に向けたその他の検討.....	134
3-6-1. 変異を組み合わせた AhR/ARNT .....	134
3-6-2. AhR と HIF-2 $\alpha$ のキメラコンストラクト.....	136
3-6-3. リジン残基のアルキル化.....	137
3-6-4. 添加剤の検討 .....	138
3-7. AhR/ARNT の結晶化スクリーニング .....	141
3-8. AhR/ARNT のホモロジーモデル.....	141
3-9. クライオ電子顕微鏡による単粒子解析 .....	142
3-9-1. AhR/ARNT/DNA .....	142
3-9-2. AhR/ARNT/6 $\times$ NZ-1 Fv-clasp .....	144
3-10. AhRR/ARNT の X 線結晶構造解析.....	145
3-10-1. 結晶化用試料の調製 .....	145
3-10-2. 結晶化と X 線回折実験.....	146
3-10-3. AhRR/ARNT の結晶構造.....	150
3-10-4. 他の bHLH-PAS ファミリーとの比較.....	155
3-11. X 線小角散乱 .....	160
4. 考察.....	163
4-1. AhR/ARNT の構造解析に向けた検討 .....	163
4-2. AhRR/ARNT の結晶構造解析.....	164
5. 総括.....	166
6. 参考文献.....	168
7. 謝辞.....	175

## 図表目次

図 1	ダイオキシン類の一般構造式 .....	11
図 2	AhR のアゴニストの例 .....	13
図 3	AhR のアンタゴニストの例 .....	13
図 4	AhR の一般的なシグナル経路 .....	14
図 5	AhR, ARNT, AhRR のドメイン構成 .....	16
図 6	これまでに報告されている bHLH-PAS ファミリーの結晶構造 .....	17
図 7	AhR のアミノ酸配列のアラインメント .....	20
図 8	ARNT のアミノ酸配列のアラインメント .....	22
図 9	AhRR のアミノ酸配列のアラインメント .....	24
図 10	本研究で使用した 2 本鎖 DNA .....	28
図 11	pFastBac Dual 改変ベクターのタグ配列 .....	30
図 12	ループ欠損変異体から野生型の遺伝子の作製 .....	38
図 13	pEF-BOS 改変ベクターのタグ配列 .....	42
図 14	リフォールディング条件の検討に用いたバッファー .....	60
図 15	野生型 human AhR/ARNT 精製試料の純度の確認 .....	90
図 16	ゲル濾過クロマトグラフィーによる野生型 human AhR/ARNT の DNA との結合確認 .....	92
図 17	野生型 human AhR/ARNT/DNA 精製試料の純度の確認 .....	92
図 18	野生型 human AhR/ARNT 精製試料の安定性の評価 .....	93
図 19	ループ欠損変異体 AhR/ARNT 精製試料の純度の確認 .....	94
図 20	ゲル濾過クロマトグラフィーによるループ欠損変異体 AhR/ARNT の DNA との結合確認 .....	96
図 21	ループ欠損変異体 AhR/ARNT/DNA 精製試料の純度の確認 .....	96
図 22	ループ欠損変異体 AhR/ARNT 精製試料の安定性の評価 .....	97
図 23	野生型 mouse AhR/ARNT のゲル濾過クロマトグラフィーによる精製 .....	98
図 24	様々な種由来の AhR/ARNT 精製試料の SDS-PAGE .....	99
図 25	HEK293 細胞による野生型 AhR/ARNT の発現確認 .....	102
図 26	L-kynurenine 濃度による発現量の比較 .....	102
図 27	野生型 AhR/ARNT の熱安定性 .....	103
図 28	野生型 AhR/ARNT の熱安定性の評価 .....	104
図 29	AhR に 1 残基変異を導入した AhR/ARNT の熱安定性の評価 .....	106
図 30	ARNT に 1 残基変異を導入した AhR/ARNT の熱安定性の評価 .....	107
図 31	野生型 AhR/ARNT の熱安定性の評価 .....	108
図 32	AhR に 2 残基変異を導入した AhR/ARNT の熱安定性の評価 .....	110
図 33	ARNT に 2 残基変異を導入した AhR/ARNT の熱安定性の評価 .....	110

図 34	AhR に 4 残基, ARNT に 4 残基熱安定化変異を導入した AhR/ARNT 精製試料の純度の確認.....	111
図 35	AhR に 12 残基, ARNT に 4 残基熱安定化変異を導入した AhR/ARNT 精製試料の純度の確認.....	111
図 36	精製試料の熱安定性の評価.....	112
図 37	既存の方法で調製した NZ-1 Fv-clasp の精製試料の SDS-PAGE.....	113
図 38	15 種類のバッファーによるリフォールディング条件の検討 .....	115
図 39	バッファーによるリフォールディング効率の比較 .....	116
図 40	タグ配列を除いた NZ-1 Fv-clasp の発現確認の SDS-PAGE.....	117
図 41	新規方法で調製した NZ-1 Fv-clasp の精製試料の SDS-PAGE .....	118
図 42	1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT の発現量及び NZ-1 結合能の評価 .....	119
図 43	PA ペプチド挿入 AhR/ARNT 精製試料の SDS-PAGE .....	121
図 44	PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の NZ-1 Fab との結合能の評価 .....	123
図 45	PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の NZ-1 Fv-clasp との結合能の評価① .....	124
図 46	PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の NZ-1 Fv-clasp との結合能の評価② .....	125
図 47	ループを長くした PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の発現確認.....	126
図 48	スモールスケールでの PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の NZ-1 Fv-clasp との結合能の評価 .....	127
図 49	ゲル濾過クロマトグラフィーによる NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製 .....	129
図 50	陰イオン交換クロマトグラフィーによる NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製 .....	131
図 51	陰イオン交換クロマトグラフィーによって調製した NZ-1 Fv-clasp 複合体の SDS-PAGE.....	132
図 52	AhR/ARNT/NZ-1 Fv-clasp のゲル濾過プロファイル .....	133
図 53	変異を組み合わせた AhR/ARNT 精製試料の SDS-PAGE .....	134
図 54	キメラコンストラクト/ARNT 精製試料の SDS-PAGE.....	136
図 55	アルキル化した試料の SDS-PAGE .....	137
図 56	Solubility & Stability Screen による添加剤の検討 .....	140
図 57	AhR/ARNT/DNA (左)と AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp (右)の構造モデル	141
図 58	AhR/ARNT/DNA のクライオ電子顕微鏡画像(川本晃大博士による) .....	142
図 59	AhR/ARNT/DNA の二次元平均化像(川本晃大博士による).....	143
図 60	AhR/ARNT/DNA の三次元密度マップ(川本晃大博士による) (左)と構造モデルとの重ね合わせ(右) .....	143
図 61	AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp のネガティブ染色電子顕微鏡画像 .....	144
図 62	AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp の二次元平均化像.....	144
図 63	AhRR/ARNT の結晶化用試料の SDS-PAGE.....	145

図 64	初期のスクリーニングで得られた AhRR/ARNT の結晶 .....	148
図 65	結晶化条件最適化後の AhRR/ARNT の結晶(上)と回折点(下) .....	149
図 66	AhRR/ARNT の全体構造 .....	152
図 67	AhRR/ARNT の電子密度 .....	152
図 68	AhRR, ARNT の各ドメインの構造 .....	153
図 69	Human 由来の AhRR と AhR のアミノ酸配列のアラインメント .....	153
図 70	Bovine, human, mouse 由来の ARNT のアミノ酸配列のアラインメント .....	154
図 71	AhRR/ARNT のドメイン界面 .....	154
図 72	bHLH ドメイン同士(上)及び PAS-A ドメイン同士(下)の相互作用 .....	155
図 73	AhRR/ARNT, AhR/ARNT, HIF-2 $\alpha$ /ARNT の構造比較 .....	157
図 74	ARNT の PAS-B ドメインのパートナー分子との相互作用界面 .....	157
図 75	ARNT の PAS-B ドメインとの相互作用界面の比較 .....	158
図 76	AhRR の PAS-A と ARNT の PAS-B の相互作用界面の拡大図 .....	158
図 77	AhRR と AhR の PAS-A ドメインの比較 .....	159
図 78	AhR/ARNT の L-kynurenine の有無による散乱曲線の比較 .....	162
図 79	AhRR/ARNT の溶液構造と結晶構造の比較 .....	162

表 1	本研究で用いたリガンド .....	29
表 2	野生型 hAhR, hARNT の発現ベクター .....	31
表 3	ループ欠損変異体の発現ベクター .....	34
表 4	Human 以外の種由来の AhR, ARNT の発現ベクター .....	38
表 5	大量培養, 精製を行った AhR, ARNT の組み合わせ .....	40
表 6	HEK293 細胞発現用の野生型 hAhR, hARNT の発現ベクター .....	42
表 7	hAhR_142, hARNT_114 の発現ベクター作製に用いたプライマー .....	42
表 8	熱安定化変異を 1 残基導入した AhR の発現ベクター .....	46
表 9	熱安定化変異を 1 残基導入した ARNT の発現ベクター .....	48
表 10	熱安定化変異を 2 残基導入した AhR の発現ベクター .....	51
表 11	熱安定化変異を 2 残基導入した ARNT の発現ベクター .....	52
表 12	熱安定化変異を 4 残基導入した AhR, ARNT の発現ベクター .....	54
表 13	昆虫細胞 Sf9 発現用の熱安定化変異体 hAhR, hARNT の発現ベクター .....	54
表 14	NZ-1 Fv-clasp の発現ベクター .....	58
表 15	リフォールディングバッファー2 のさらなる検討 .....	60
表 16	タグ配列を除いた NZ-1 Fv-clasp の発現ベクター .....	61
表 17	HEK293 細胞発現用の PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の発現ベクター .....	64
表 18	hAhR_331 の発現ベクター作製に用いたプライマー .....	65
表 19	昆虫細胞 Sf9 発現用の PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の発現ベクター .....	67



表 20	hAhR_375, hARNT_302, hARNT_303, hARNT_304_2 の発現ベクター作製に用いたプラスミドとプライマー .....	68
表 21	大量培養, 精製を行った PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の組み合わせ .....	69
表 22	スモールスケールで発現させた PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の組み合わせ .....	71
表 23	変異を組み合わせた AhR, ARNT の発現ベクター .....	74
表 24	大量培養, 精製を行った, 変異を組み合わせた AhR, ARNT の組み合わせ ..	75
表 25	HIF-2 $\alpha$ の遺伝子中の EcoRI 認識部位を変異させるために用いたプライマー	76
表 26	AhR と HIF-2 $\alpha$ のキメラコンストラクトの発現ベクター .....	77
表 27	Solubility & Stability Screen に含まれる試薬(濃度は最終濃度) .....	79
表 28	AhR/ARNT/DNA の電子顕微鏡による測定と解析(川本晃大博士による) .....	84
表 29	AhR/ARNT/6 $\times$ NZ-1 Fv-clasp の電子顕微鏡による測定と解析 .....	85
表 30	hAhRR の発現ベクター .....	86
表 31	Human 以外の種由来の AhR/ARNT の培地 1 L あたりの収量 .....	100
表 32	野生型 AhR/ARNT の熱安定性 .....	103
表 33	熱安定化変異体 AhR/ARNT の培地 1 L あたりの収量 .....	111
表 34	リフォールディングバッファー2 を用いた詳細な検討 .....	117
表 35	1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT の発現量及び NZ-1 結合能 ...	120
表 36	PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の培地 1 L あたりの収量 .....	122
表 37	1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR, ARNT と NZ-1 の結合能のまとめ .	128
表 38	変異を組み合わせた AhR/ARNT の培地 1 L あたりの収量 .....	135
表 39	キメラコンストラクト/ARNT の培地 1 L あたりの収量 .....	136
表 40	AhRR/ARNT の培地 1 L あたりの収量 .....	145
表 41	AhRR/ARNT の回折強度データセット収集と構造精密化の統計値 .....	151
表 42	X 線小角散乱のパラメーター .....	161

略語

A <sub>260</sub>	absorbance at 260 nm
A <sub>280</sub>	absorbance at 280 nm
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AhRR	AhR repressor
ARNT	AhR nuclear translocator
BMAL1	brain and muscle ARNT like 1
bHLH	basic-helix loop helix
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CBB	coomassie brilliant blue
CBP	CREB-binding protein
CH223191	1-methyl-N-[2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl) diazenyl]phenyl]-1H-pyrazole-5- carboxamide
CIP	Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
CREB	cAMP response element binding protein
CYP	cytochrome P450
DL-PCB	dioxin like-polychlorinated biphenyl
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FICZ	6-formylindolo(3,2b)carbazole
GST	glutathione S-transferase
HDAC	histone deacetylase
HIF	hypoxia-inducible factor

Hsp90	heat shock protein 90
IC3	indol-3-carbinol
ICZ	indolo-(3,2,-b)-carbazole
$K_d$	dissociation constant
MES	2-( <i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
NLS	nuclear localization signal
NPAS	neuronal pas domain protein
p23	23-kDa co-chaperone protein
p300	histone acetyltransferase p300
PAGE	polyacylamide gel electrophoresis
PAS	PER ARNT SIM
PCDD	polychlorinated dibenzo-p-dioxin
PCDF	polychlorinated dibenzofuran
pCIP	CBP interacting protein
PCR	polymerase chain reaction
RMSD	root-mean-square deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIM	single minded protein
SRC1	steroid receptor coactivator-1
SUMO	small ubiquitin-related modifier
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
XAP2	X-associated protein 2
XRE	xenobiotic-responsive element

## 1. 序

### 1-1. ダイオキシン類

ダイオキシン類は、 polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD) , polychlorinated dibenzofuran (PCDF), dioxin like-polychlorinated biphenyl (DL-PCB)の総称で、公害物質、環境汚染物質、環境ホルモンとして広く認知されている(図 1)。ダイオキシン類が公害物質として問題視される大きな理由は、非常に分解されにくく、体内に蓄積することで微量でも強い毒性を発揮するという特徴からである。ダイオキシン類の毒性に関しては、催奇形性、発癌作用、神経毒性、免疫機能の低下など様々な報告がある[1-4]。

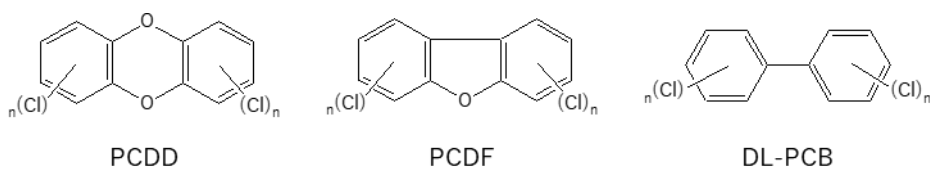


図1 ダイオキシン類の一般構造式

## 1-2. Aryl hydrocarbon receptor

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)はダイオキシン類を認識する受容体として同定された[5]。AhRはダイオキシン類などの生体異物に応答し、cytochrome P450 (CYP)や glutathione S-transferase (GST)などの異物代謝酵素の発現を制御するリガンド依存的な転写因子である[6-10]。ダイオキシン類による毒性のほとんどは AhR の持続的な活性化を介して発現するとされている[11-13]。AhRは生体異物を代謝する機能だけでなく、多様なリガンドに応答して様々な生理的機能を持つことが明らかになっている[14-16]。AhRのリガンドはアゴニスト、アンタゴニストそれぞれ、現在までに多数報告されており、その化学構造は多岐に渡る[9,17] (図2, 図3)。AhRのアゴニストとして最も一般的に知られている外因性リガンドは1-1節で示したようなダイオキシン類である。その他にも外因性のリガンドとして野菜や果物に含まれる indol-3-carbinol (I3C)や indolo-(3,2,-b)-carbazole (ICZ)などのインドール化合物が食事を通して摂取される[18]。AhRの内因性リガンドとしてはトリプトファンの代謝中間体である kynurenine や[19-21], トリプトファンに可視光または紫外線が照射されることによって生じる 6-formylindolo(3,2b)carbazole (FICZ)などが報告されている[22-24]。AhRのアンタゴニストとしては resveratrol [25]や kaempferol [26,27]などのフラボノイド類や、合成化合物である 1-methyl-N-[2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazenyl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide (CH223191) [28]などが報告されている。

AhRの異物代謝以外の生理的機能としては免疫系において AhR がリガンド特異的に T細胞の分化を調節することが報告されており、ダイオキシン類である 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)や kynurenine によって制御性 T細胞への分化を、FICZ によって interleukin-17 産生ヘルパーT細胞への分化を誘導する[19,29]。さらに、kynurenine によって活性化することで癌の亢進に寄与していることや[20,21], 大気汚染物質によって活性化することで神経伸長因子である artemin の転写を活性化し、アトピー性

皮膚炎を引き起こすことなどが報告されている[30]。このようなことから AhR は創薬ターゲットとして注目されており，AhR の活性制御機構を理解することは種々の疾患の治療薬開発につながる可能性がある。

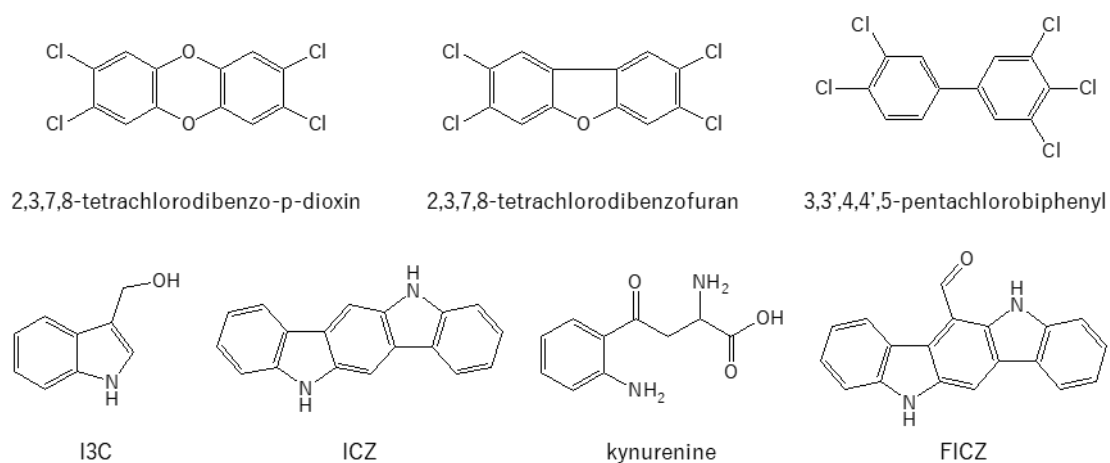


図2 AhR のアゴニストの例

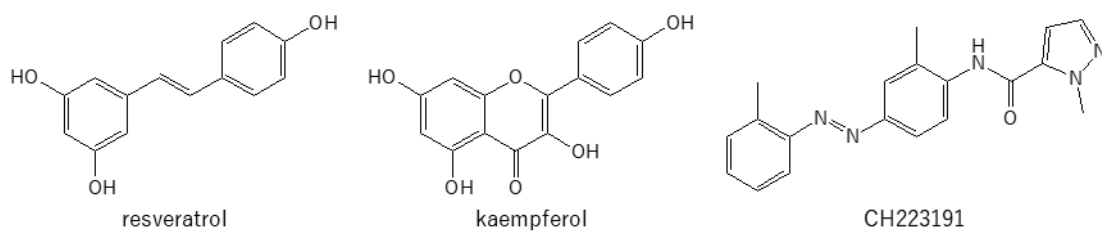


図3 AhR のアンタゴニストの例

### 1-3. AhR のシグナル経路

AhR は通常は細胞質に存在し、heat shock protein 90 (Hsp90), X-associated protein 2 (XAP2), 23-kDa co-chaperone protein (p23)と複合体を形成している[31-36] (図4)。リガンド結合に伴い AhR は核に移行し、パートナー分子である AhR nuclear translocator (ARNT)とヘテロダイマーを形成する。AhR/ARNTヘテロダイマーは xenobiotic-responsive element (XRE)と呼ばれる異物応答 DNA 配列に結合し、CREB-binding protein (CBP)や histone acetyltransferase p300 (p300), steroid receptor coactivator-1 (SRC1), CBP interacting protein (pCIP)などのコアクチベータをリクルートすることでターゲット遺伝子の転写を活性化する[4,6-8,10,14]。AhR が誘導するタンパク質の 1 つに AhR repressor (AhRR)がある。AhRR は ARNT とのヘテロダイマー形成とそれに続く XRE への結合によって AhR の転写活性を競合的に抑制する[37]。それに加えて AhRR は histone deacetylase (HDAC)などのコリプレッサーをリクルートすることで転写を抑制する[38,39]。

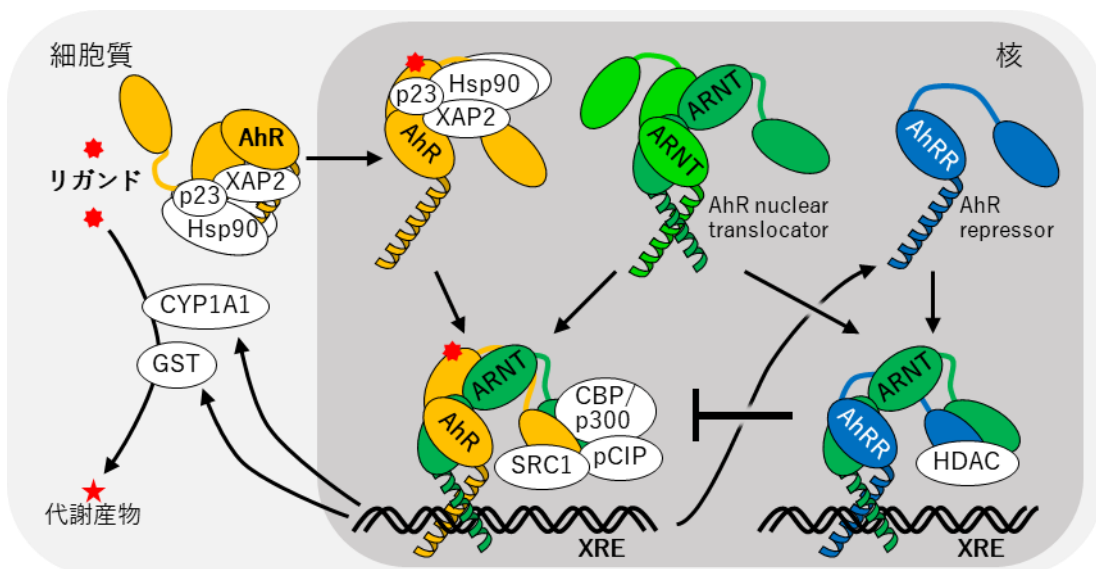


図4 AhRの一般的なシグナル経路

#### 1-4. bHLH-PAS ファミリー

AhR, ARNT, AhRR はいずれもそのドメイン構成から basic-helix loop helix (bHLH)-PER ARNT SIM (PAS)ファミリーに属している[40-42] (図 5)。bHLH-PAS ファミリーは転写因子からなるファミリーで, AhR, ARNT, AhRR の他に, 低酸素ストレスに対する細胞応答を調節する hypoxia-inducible factors (HIFs)や神経系において重要な役割を果たす neuronal pas domain proteins (NPASs), 神経発生や胚発生に関わる single minded proteins (SIMs), 概日リズムの調節に関係する circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK)や brain and muscle ARNT like 1 (BMAL1)など生理学的に重要な機能を持つタンパク質が多く属している。bHLH-PAS ファミリーは Class I または Class II に分類される[41]。Class I には AhR, AhRR, HIFs, NPASs, SIMs, CLOCK などが分類され, ホモダイマーや Class I 同士でのヘテロダイマーは形成せず, 機能を発揮するためには Class II に分類されるタンパク質とヘテロダイマーを形成する必要がある。Class II には ARNT, BMAL1 などが分類され, Class II のタンパク質同士でホモダイマーを形成するとともに, Class I のタンパク質とヘテロダイマーを形成する。ARNT は AhR, AhRR, HIFs, NPAS1, NPAS3, NPAS4, SIMs と, BMAL1 は NPAS2, CLOCK とそれぞれヘテロダイマーを形成する。

bHLH-PAS ファミリーは N 末端側に DNA 結合部位である bHLH ドメイン, タンパク質間の相互作用やリガンド結合に関わる PAS ドメインを 2 つ(PAS-A, PAS-B)持つ[40-42]。また, C 末端側に転写を制御する領域を持つ。N 末端側の bHLH-PAS 領域はファミリーメンバーの中でよく保存されている一方で, C 末端側の転写制御領域は保存度が低い[40,42]。AhR の場合, リガンドは PAS-B ドメインに結合する[43]。また, AhRR は bHLH-PAS ファミリーの中で唯一 PAS ドメインを 1 つしか持たないという点で特徴的である[37,41,42]。bHLH-PAS ファミリーについてはこれまでに HIF-1 $\alpha$ /ARNT/DNA, HIF-2 $\alpha$ /ARNT, HIF-2 $\alpha$ /ARNT/DNA, NPAS1/ARNT, NPAS3/ARNT/DNA, CLOCK/BMAL1 など複数のタンパク質で bHLH ドメインから PAS-B ドメインまでの領域の結晶構造が報告されて



いる[44-46] (図6)。一方で, AhR/ARNT については bHLH ドメインから PAS-A ドメインまでの領域で DNA 複合体の結晶構造が報告されているが, PAS-B ドメインの構造は明らかになっておらず, AhR による詳細なリガンド認識機構や PAS-B ドメインを含む四次構造は不明である[47,48]。

これまでに報告されている結晶構造を比較すると, ARNT をパートナー分子とするヘテロダイマーの構造は全て同様のドメイン配置をしている。しかし, それらを CLOCK/BMAL1 の構造と比較すると, bHLH 同士, PAS-A 同士, PAS-B 同士の相互作用はよく一致していたが, ドメイン間の配向は両者で大きく異なっており, 全く異なる全体構造を形成していた(図6)。

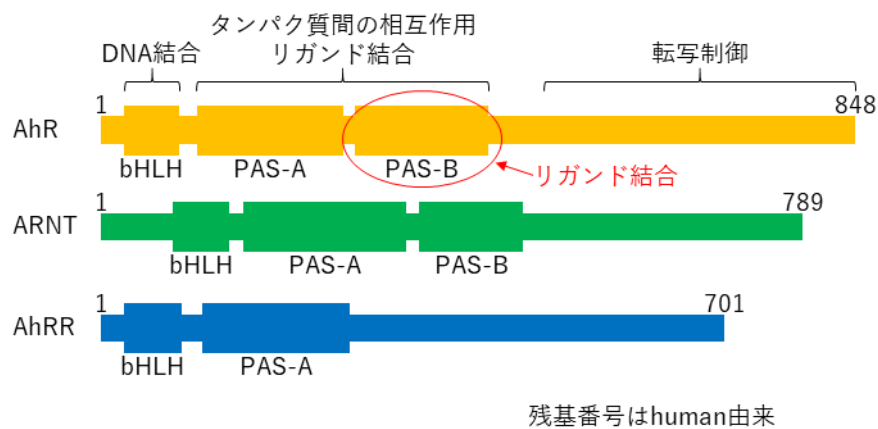


図5 AhR, ARNT, AhRR のドメイン構成

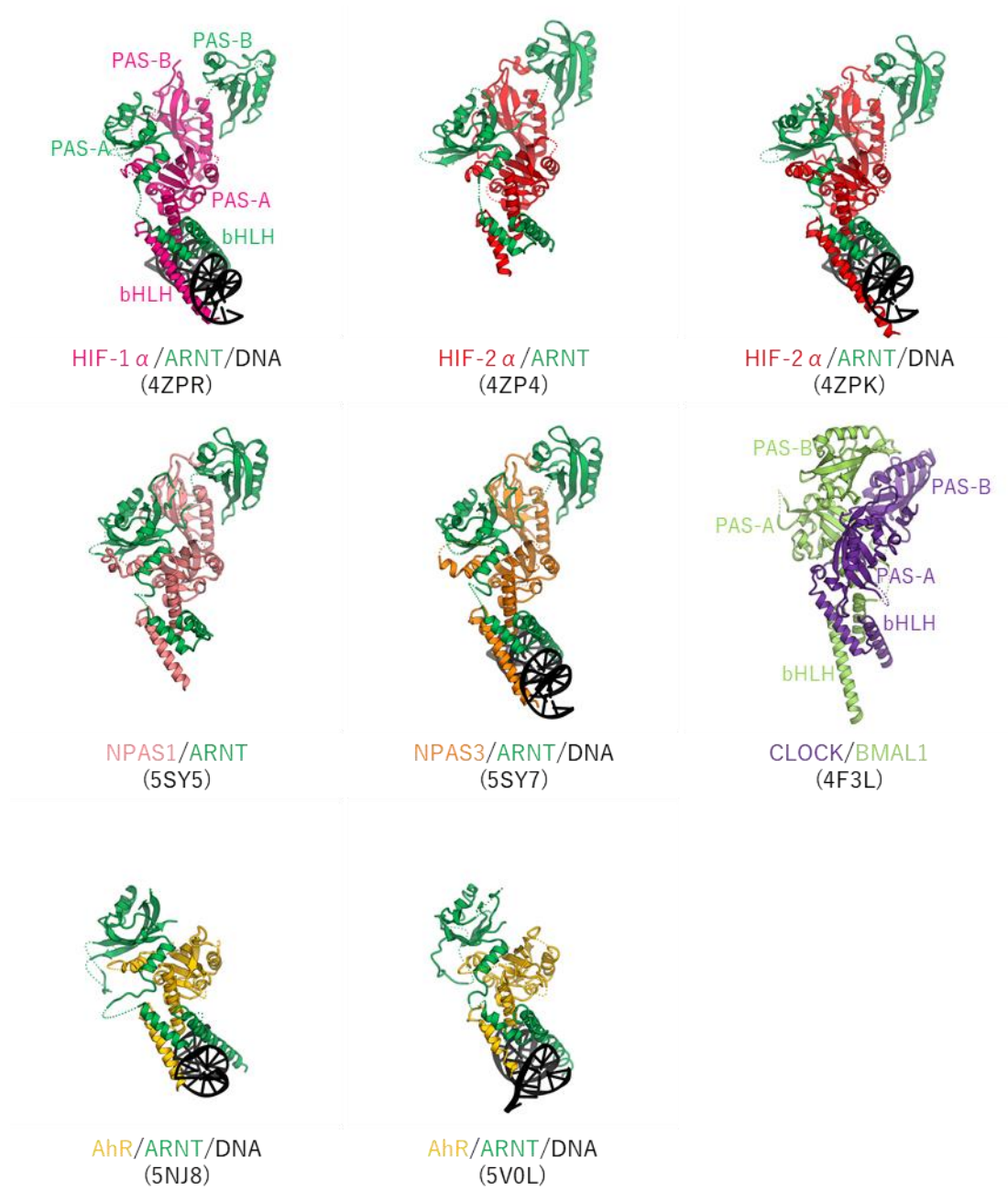


図6 これまでに報告されている bHLH-PAS ファミリーの結晶構造  
括弧内は PDB ID を示す。

#### 1-5. AhR, ARNT, AhRR

本研究では AhR の転写制御機構解明に向けて主に AhR, ARNT, AhRR について実験を行った。AhR, ARNT, AhRR は脊椎動物に広く保存されており, AhR, ARNT は無脊椎動物にも見つかっている [49] (図 7, 図 8, 図 9)。AhR, ARNT, AhRR はいずれも nuclear localization signal (NLS) を持ち, 核内に移行して機能する [50-52]。ただし, AhR はリガンド非存在下では Hsp90, XAP2, p23 と複合体を形成している (1-3 節参照)。この複合体中では AhR の NLS は露出しておらず細胞質に留まっており, リガンド結合によって複合体の構造が変化し, NLS が露出することで核内に移行するとされている [53]。

AhR, ARNT が恒常的に発現しているのに対して, AhRR は AhR の活性化によって発現が誘導される。その後 AhR の転写活性を抑制するため, AhRR は AhR のシグナル経路においてネガティブフィードバック因子として働いている [37]。AhRR による AhR の転写抑制機構については複数の機構が提唱されている [37-39,54]。AhR と AhRR は配列一致度が高く, AhR 同様 ARNT や XRE と高い親和性で結合する。そのため AhRR は ARNT や XRE との結合において AhR と競合することで AhR の転写活性を抑制する [37]。また, AhRR の C 末端領域の SUMO 化は ankyrin-repeat protein 2 や HDAC4, HDAC5 などのコリプレッサーをリクルートするのに重要だと報告されている [38,39]。しかし, これらの競合モデルやコリプレッサーのリクルートだけでは AhRR による転写抑制機構を完全には説明できないとする実験結果も報告されており, これらの機構に加えてトランスリプレッションと呼ばれる機構が提唱されている [54]。この機構では AhRR は未知のコレギュレーターとの結合において AhR と競合すると考えられている。しかし, AhRR に関する構造情報はこれまでに全く報告されておらず, 詳細な分子メカニズムは不明だった。

human 1 MNSSSANITYASRKRRKPVQKTVKPIPAEGI KSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI NKLDKLSVL 70  
monkey 1 MNSSSANITYASRKRRKPVQKTVKPIPAEGI KSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI NKLDKLSVL 70  
bovine 1 MNSSSANITYASRKRRKPVQKTVKPIPAEGI KSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI NKLDKLSVL 70  
pig 1 MNSSSANITYASRKRRKPVQKTVKPIPAEGI KSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI NKLDKLSVL 70  
rabbit 1 MNGGGANITYASRKRRKPVQKTVKPIPAEGI KSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI NKLDKLSVL 70  
rat 1 -MSSGANITYASRKRRKPVQKTVKPIPAEGI KSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI NKLDKLSVL 69  
chicken 1 -W-MNPVITYASRKRRKPVQKTVKPIPAEIVKPSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI AKL DKLSVL 67  
xenopus 1 ---MNTNIYAGRRKRKPVQKTVKPIPAEIVKPSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI SKL DKLSVL 67  
zebrafish 1 - - - - -MYAGRKRKPVQKTVKPIPAEIVKPSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI SSKL DKLSVL 62  
mouse 1 -MSSGANITYASRKRRKPVQKTVKPIPAEGI KSNPSKRHRDR LNTELDRLASLLPFPPQDVI NKLDKLSVL 69

**bHLH**

human 71 RLSVSYLRAKSFDFVALKSSSP--- TERNNGODNCRAANFREGLNLQEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 136  
monkey 71 RLSVSYLRAKSFDFVALKSSSP--- AERNNGOENCRANFRREGLNLOEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 136  
bovine 71 RLSVSYLRAKSFDFVALKSSSP--- ADNRNGVDNCRRTK-FREGLNLQEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 135  
pig 71 RLSVSYLRAKSFDFVALKSSSP--- ADNRNGVDNCRRTK-FREGLNLQEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 135  
rabbit 71 RLSVSYLRAKSFDFVALKSSSP--- ADNRNGVDNCRRTK-FREGLNLQEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 135  
rat 70 RLSVSYLRAKSFDFVALKSSSP--- ADNRNGVDNCRRTK-FREGLNLQEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 134  
chicken 68 RLSVSYLRAKSFDFVALKSSNST-RLERNGIQESRTAK-LGEGMQLLEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 135  
xenopus 68 RLSVSYLRAKSGFDFVALKSSNST-DLERNITOKOAEAL-RSILLEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 127  
zebrafish 63 RLSVSYLRAKSNFDFVTLKHNHCNGLSNNNSNQDNTSKATGLVDGCLREGELLOALNGFVLVVTADGILVF 131  
mouse 70 RLSVSYLRAKSFDFVALKSTP--- ADNRNGVDNCRRTK-FREGLNLQEGEFLLOALNGFVLVVTDDALVF 134

**PAS-A**

human 137 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEATGLPOTV--VCYN 204  
monkey 137 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 204  
bovine 136 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 203  
pig 136 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 203  
rabbit 136 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 203  
rat 135 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 202  
chicken 136 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 203  
xenopus 128 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 193  
zebrafish 132 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 191  
mouse 135 YASSTIQDYLGFFQSSDVIHQSVYELHTEDRAEFORQLHVALNPSOCTESGOGITEEAPGLPOPV--VCYN 198

human 205 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 274  
monkey 205 AFDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 274  
bovine 204 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 273  
pig 204 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 272  
rabbit 203 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 272  
rat 203 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 272  
chicken 204 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 273  
xenopus 202 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 263  
zebrafish 202 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 271  
mouse 199 PDDIIPDENSSPFIEMERCFICRLRCLLDNSSGFLAMNFGQGLKYLHGOAKKKGKDGSLPPALALFAIATPLOP 268

human 275 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGRIVLYGTEAEELCTRGSGYOFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 344  
monkey 275 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGRIVLYGTEAEELCTRGSGYOFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 344  
bovine 274 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGKLVLYGTEAEELSMRGSVGFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 343  
pig 273 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGKLVLYGTEAEELCMRGTGYOFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 342  
rabbit 273 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGKLVLYGTEAEELCMRGTGYOFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 342  
rat 273 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGKLVLYGTEAEELCMRGTGYOFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 342  
chicken 274 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGKLVLYGTEAEELCMRGTGYOFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 343  
xenopus 274 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGKLVLYGTEAEELCMRGTGYOFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 343  
zebrafish 262 PSILEIRTKNMIFRTKHKLDFTPIGCDAKGKLVLYGTEAEELRVRGSVGFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 341  
mouse 269 PSILEIRTKNFIFRTKHKLDFTPIGCDAKGKLVLYGTEAEELCTRGSGYOFVHAADMLYCAESHIRMIKTG 338

**PAS-B**

human 345 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 414  
monkey 345 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 414  
bovine 344 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 413  
pig 343 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 412  
rabbit 343 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 412  
rat 343 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 412  
chicken 344 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 413  
xenopus 334 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 403  
zebrafish 342 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 411  
mouse 339 ESGMIVFRLLTKNRWTWVSNARLLYKNGRPDYIIVTORP LTDEEGTEHLRKNRTKLPPMFMTTGEAVLY 408

human 415 EATNPFPAIMDPLLRKNTSFKSADATSTLSKDSLNPSSLLAAMMQUDES IYLYPASSTSSSTAPFENN 484  
monkey 415 EATNPFPAIMDPLLRKNTSFKSADATSTLSKDSLNPSSLLAAMMQUDES IYLYPASSTSSSTAPFENN 484  
bovine 414 EISNPFPSVMDPLPIKTKNGAGKSETITSALS KDSSLNPSSLLAAMMQUDES IYLYPASSTSSSTAPFENN 480  
pig 413 EITSPFPPTVDPLPVRTKSGAGKSDATKSSLSKDSLNPSSLLAAMMQUDES IYLYPASSTSSSTAPFENN 479  
rabbit 413 EMTSPFPPI MDPLPIRKSGTCGKSDATKTPSKDSLNPSSLLSALMOQDES IYLYPPS-SN-APFERN 479  
rat 413 EISSPFSPI MDPLPIRTKSNTSRKDWAPQSTPSKDSFHPNLSM SALIQDES IYLYCPPS--SP-APLDSH 478  
chicken 414 ELTFPMSLSDTSOPRSKTTGK--GGKTTLHGSDVDPNLSLGAMLRDSESVYLCPPA--SHKLSFERN 479  
xenopus 404 EISFPLOTIMEVAPTAKATSAK--GSSSKNEPVPKSSLLGAMMRQDES SVYSCPPA--SKIFSFDN- 466  
zebrafish 412 QINY PMLGF PDTLDKQKNNKTKK--SKVKNSS KDLDPSLLGAMMRQDES SVYSCPPA--SKIFSFDN- 478  
mouse 409 EISSPFSPI MDPLPIRTKSNTSRKDWAPQSTPSKDSFHPNLSM SALIQDES IYLYCPPS--SP-APLDSH 475

human 485 FFNE SMNECR----NWQDNTAPMGNDTILKHEQIDQPODVN----SFAGGHPGLFQDSK----NSDLYS 541  
monkey 485 FLNESMSECR----NWEDNTAPMGNDTILKHEQIDQPODVN----SFAGGHLGLFQDSK----NSDLYS 541  
bovine 481 FFSDSLNECS----NWONNVPMGSSDILKHEQISQSODMNP--TLSGDHTGLFADNR----NSDLYS 538  
pig 480 FLSESLNECS----SWONSVPMPGSDNVLKHEQIGSQOEMNL--TSPGDHAGLFPDSR----NSDLYS 537  
rabbit 480 FFTESLNECS----NWPE NVASVAGGSLVKHEQIGSQOEVSP--AFSGDQTVLFPDNK----NCDLYS 537  
rat 480 FLFMSMSIECG----SWQGSFASVNEALLKHEQIRHTQDVNL--TLSGGPSELFQDNK----NNDLYS 537  
chicken 479 FFADSRDELSGVVS DWTDSL L P A G S H N I L K Q L M E C S Q D S V -- P L P E D S A A L F O D N K -- T N D L Y S 541  
xenopus 467 YFQDLRSEL S ----NNFTSOPENLWPIVNNLKLK EGAAACSLGNLAHTSDCSEVFPESK----NNDLYS 527  
zebrafish 479 LFGEQGETST----FSSSAENESVNPVQNGVLTASKOETSS-FDPLLATLDSLSELENECSNSELFS 541  
mouse 476 FLMGVSKCG----SWQDSFAAAGSEAALKHEQIGHAQDVNL--ALSGGPSELFPDNK----NNDLYS 533

human 542 IMKNLGI DFEDIRHMQ-NEKFFRNDFS--GEVDFRDI DLTDLE I LTYVQDLSK-SPFIPSDYQOQOOSLAL 607  
monkey 542 IMKNLGI DFEDIKHMQ-NEKFFRNDFS--SEVDFRDI DLTDLE I LTYIQDLSK-SPFIPSDYQOQOOSLAL 607  
bovine 539 IMKHLG DFEDIHMQONEEFFRTDFFS--GEDDFRDIDLTDLE I LTYVEDLSKNK-PAFCSGSYQOQOOSLAL 605  
pig 538 IMKHLG DFEDIKHMQONEEFFRTDFFS--GEDDFRDIDLTDLE I LTYVEDLSKNK-STFGSGSY--QOOSLAL 602  
rabbit 538 IMKNLGI DFEDIKMQ-NEEFFGADFS--GEVDFRDI DLTDLE I LTYVQDLSKNK-SFPGSGYQOQOOSLAL 603  
rat 538 IMRNLGI DFEDIRSMQ-NEEFFRTDTS--SGEVDFKDI DLTDLE I LTYVQDLSKNK-STL LNSACQ--QOQPVSO 602  
chicken 542 IMKNLGI DFEDLKC I QDEEFFKTLS--GMDDIGDIDLTDLE I LTYVQDLSKNK-SDFL YSGCNQOQOOSLAL 608  
xenopus 528 IMNSLGI DVDDL EMI QQDEAFFRNEFD--YSELSDIDVADE I LTYVGETLNKKTDCMFMNNAQOQOOSLAL 594  
zebrafish 542 ALENLGI N A D E L L L L D E R M I Q V E V F D F I P S L N D L T N N E I L S Y V H D S L E N K - Q T E D P A E S Q K P S T P C V D 610  
mouse 534 IMRNLGI DFEDIRSMQ-NEEFFRTDTS AAGEVDFKDI DLTDLE I LTYVQDLSKNK-STL MNSACQ--QOQPVSO 600

```

human 608 NSSCMVQEFHLHLEQ0000---HHOKOVVVEPQOQLCOKMKHMOVNGMFEWNWNSN-----657
monkey 608 NSSCMVQEFHLQLEQ0000--O-----HHOKOAVVEPQOQLCOKMKHMOVNGMFAWNSN-----659
bovine 606 NPSCMVQEFQLOLDQ000--LQ-----PHORHTTVEQOQQLCOKMKHMOVNSMFAWNNAN-----656
pig 603 NSSCMVQEFQLOLEQ0000QQLQ-----HHOKHIAVEQOQQLCOKMKHMOVNGMFAWNSN-----656
rabbit 604 NSSCMVQERLQLEQPPQOP--P-----CRSEQATVEPQOQLCOKMEHMOVNSMFAWNSAN-----655
rat 603 HLSMCLQERLQLEQ000LQOQHPTQTLEPORQLCOVEVPOHELQOKTKHMOVNGMFAWNSNPA-----664
chicken 609 NAGCLVQOELDQHOIHQH--Q-----KQLMEQOQOQOQLCOKMKHMOVNGMFTWNSSG-----660
xenopus 595 EPSSITPNPMNPPQIQHP-----SKMM--PQOLSQMKHMOVNGMLTWNWNSV-----639
zebrafish 611 SVENSKPESDSPPQVTSVVPAP---FWPQKOIPIILHLSORMQOHLNGOSVCHKTEHWIHTPLSQVPTT-----676
mouse 601 HLSMCLQERLQLEQ00QLQOP-PPQALEPQOQLCQMVCPQOQLG--PKHTQINGTFASWNP-----659

human 658 -----QFVPFNCPQO---DPOQYN---VFTDLHGISOFFP--YKSEMDSMPTT-----697
monkey 660 -----QFVPFSCPRO---DPOQYN---VFSDLHGINOFFP--YKSEMDPVPTT-----699
bovine 657 -----QSVPLNCPQO---DLQOY---VFADLPGTSONOFFP--YKPELDPMPYPT-----695
pig 657 -----QPVPFGCPQOQDLQOQLOOYN---IFPDLPGTNOFFS--YKSEIDTLPYPT-----700
rabbit 656 -----QPVPFSEPPQO---DLQOY---VFTDFHTADQAFP--YTAAMNTPYPT-----695
rat 665 -----PPVFSFCPOO---ERKHY---LFSGLQGTAEFFP--YKSEVDSMPTT-----704
chicken 661 -----TSMPLGCSQO---QPOOY---TSPGMOATAEFF--YKSEVNASPYACR-----700
xenopus 640 -----NNVPTTFEQO---QCEY---NVSSINDMTHL---YKSLSSAPYACK-----679
zebrafish 677 ESETANFNQHDITLVNSVPPVHNGHWVPEHTOVNLSQLSDKITGTSKAQPQWOQNLQVFPQCKPKTI-----746
mouse 660 -----PPVFNCPQO---ELKHYQ---LFSGLQGTAEFFP--YKPEVDSVPTT-----699

human 698 -----QNFISCNOP--VLP-----QHSKCTELDYPMGS---FEPSPYPTTSS-L-----735
monkey 700 -----QNFISCNOP--VLP-----QHSKCTELDYPMGS---YEPSPYPTTSS-L-----737
bovine 696 -----QNLIPYSOP--GLP-----PQPQGAQLDFPMGD---FEPAPYPTTASNL-----734
pig 701 -----QNFIPCSQS--VLP-----QHPKGPQLDFSIGN---FEPALYPTTSSNL-----739
rabbit 696 -----QNFPCNOT--VAP-----QHSRCTLDFAMGN---FDSSPYPTSN-L-----733
rat 705 -----QNFAPCNSO--LLP-----EHSKGTQLDFPGRD---FERSLHPNASN-L-----742
chicken 701 -----QEFVPYKOPTAMMP-----QLSTFAQMDFPVAG---LDRSAYSASSN-L-----740
xenopus 680 -----QEYMPYQEP-----SNLTQMDFLDGN---VERSVYTNPTN-L-----712
zebrafish 747 EGGDTLANGIYSNPOWHGYNFAEQLVINGPCFPNGQMAHTQTMGTHIIDYNMNTDMSGVEFTMNSSSSGNL-----816
mouse 700 -----QNFAPCNSO--LLP-----EHSKSVQLDFPGRD---FEPSPYPTTSS-L-----737

human 736 EDFVFTCLQLP--ENQKHGLNPOSATITP--QTCYAGAVSMYQCQPEPQ-HTHVGMQOYNPVLPGQQAFLN-----800
monkey 738 EDFVFTCLQVP--ENQKHGLNPOSATITP--QTCYAGAVSMYQCQPEPQ-HTHVGMQOYNPVLPGQQAFLN-----802
bovine 735 EDFVFTCLQVP--ENQKHGLNPOSAMVAP--QTCYAGAVSMYQCQPDPO-HSOLAQOYNPVLTPGSOAVN-----799
pig 740 EDFVFTCLQGA--ENQKPLNPOSAMVTP--QTCYAGAVSMYQCQPDPO-HSHVAQOYNPVLTPGSOAVN-----804
rabbit 734 EDFVFTCLQVP--DROTHGGNPOSAMVAP--QTCYAGAVSMYQCQPGPA-HLTMGQOCEPPVPGPEAFN-----798
rat 743 EDFVFTCLQVP--ENQRHGINPOSAMVSP--QAYYAGAVSMYQCQAGPO-HTPVDQOYSPEIPGSOAVN-----807
chicken 741 EDFLGLCLQVQ--ENLDCGINSESVMLTP--QTCYAGAVSMYQCTQEAQ--PNCMDQOYDPMMAQOPLLN-----806
xenopus 713 EGFLLECLPONS--GIQECGLDSQTLMTVP--QSCYSGAVSMYQCLPESSPATCLNQMNYNAVMAAQOPLLN-----779
zebrafish 817 GQFQGAMASSSSSYQOYQKQOQPKVTPTYYASVTKQNSLEHILGLAPP--SNLPSLTDYQSELTHDMTHS-----886
mouse 738 D-FVVSCLQVP--ENQSHGINQSSTMVSP--QAYYAGAVSMYQCQPGPQ-RTPVDQTYQYSSEIPGSOAVN-----801

human 801 KFGNG---VLNETYPAELNNI NN-TQTTTHLOPL---HHPSEARPPF-DLTSSGFL-----848
monkey 803 KFGNG---VLNETYPAELNNI NN-TQATTHLOPL---HHPSEARPPF-DLTSSGFL-----850
bovine 800 KFGNGA---ILNETYPAELNSMRN-TEPATRL-----HHPSEARPPF-DLTSSGFL-----844
pig 805 KFGSGG---VLNETYPNELNSI NN-TQTTTHL-----HHPSEARPPF-DLTSSGFL-----849
rabbit 799 KFPNGG---MLNETYPADLHDI NN-TVASTHLPL---HHPSEARPPF-DLASGRLL-----847
rat 808 KFGSPS---ILNETYSAADLSSI GH-LQATAHL-----RLAEAQPL-DITPSGFL-----853
chicken 807 KFGNGFNGGNVNEAYPSQLDVISN-SQATHLOPV---HHPTEPRSP-DLASSGFM-----858
xenopus 780 KFGTGFNGGTVNETYAAPVDIVNS-SPAGNHLPHHLHHPADSKHFP-DLQPSGFM-----834
zebrafish 887 KMETGFLNSTSVTYNGSCLVPNGNTVAAPVNSP-----HPLPEPHPHPP-DPOTTGFYL-----940
mouse 802 KVQSRG---IFNETYSSDLSSI GHAAQTTHLH-----HLAEARPLP-DITPGGFL-----848

```

図7 AhRのアミノ酸配列のアラインメント

脊椎動物の AhR のアミノ酸配列を CLUSTALW ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_clustalw.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html))によってアラインメントした。アラインメントした種の全てにおいて保存されている残基に薄橙色を付した。ループ欠損変異体(2-3節, 2-4節, 2-7-1項参照)において欠損させた領域を青枠で囲み, 切断を抑制する目的で導入した変異を緑色で示した。また, 熱安定化変異体(2-5節, 2-7-1項参照)において変異を導入した残基を赤色で示した。

```

human 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNSGPGIQGGGAIVQRAIKRRPGLDFDDDGEGNS--KFLRCDDDQMS 68
bovine 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNDGPGIQGGGAIVQRAIKRRPGLDFDDDGEGNS--KFLRCDDDQMS 68
monkey 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNDGPGIQGGGAIVQRAIKRRPGLDFDDDGEGNS--KFLRCDDDQMS 68
pig 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNDGPGIQGGGAIVQRAIKRRPGLDFDDDGEGNS--KFLRCDDDQMS 68
rabbit 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNDGPGIQGGGAIVQRAIKRRPGLDFDDDGEGNS--KFLRCDDDQMS 68
rat 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNDGPGIQGGGAIVQRAIKRRPGLDFDDDGEGNS--KFLRCDDEQMC 68
mouse 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNDGPGIQGGGAVVQRAIKRRSGLDFDDEVEVNT--KFLRCDDDQMC 68
chicken 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNDGPGIQGGGAVVQRAIKRRSGLDFDDEVEVNT--KFLRCDDDQMC 68
xenopus 1 MAATTANPEMTSDVPSLGPALIASGNDGPGIQGGGAVVQRAIKRRSGLDFDDEVEVNT--KFLRCDDDQMC 68
zebrafish 1 ---MA---MA---DVPALGAVSTGNPSSGAGOTGGGIVQRAIKRRPGLDFDDDGEGNS--KFLRCDDDQLP 61
1 ---MTSANPDMS--EVPSLAMTSSNGSHSG--AG--GSMVQRITNKRSGLDDEDDDDSSNKF--FRCDDD-- 61
1 ---MTSANPDMS--EVPSLAMTSSNGSHSG--AG--GSMVQRITNKRSGLDDEDDDDSSNKF--FRCDDD-- 53

```

bHLH

```

human 69 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 138
bovine 69 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 138
monkey 69 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 138
pig 69 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 138
rabbit 69 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 138
rat 69 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 138
mouse 69 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 138
chicken 69 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 138
xenopus 62 NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 131
zebrafish 54 -----GGG-----S--NDKE RFA RSDDEFEESADKFR LARENHSGIEERRRRNKMTAYITELSDMVPTCSALARKPKLTLIRMAVSH 112

```

```

human 139 MKSLRGTGNTSDGSYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 208
bovine 139 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 208
monkey 139 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 208
pig 139 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 208
rabbit 139 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 208
rat 139 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 208
mouse 139 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 208
chicken 139 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 208
xenopus 132 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQPSEWFGST 201
zebrafish 113 MKSLRGTGNTSDGTYKPSFLTDOELKHLILEAADGFLFIVS CETGRVYVYSDSVPVNLNQAQSDWLGS 182

```

PAS-A

```

human 209 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-ALTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 277
bovine 209 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-ALTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 277
monkey 209 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-ALTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 277
pig 209 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-ALTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 277
rabbit 209 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-ALTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 277
rat 209 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-ALTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 277
mouse 209 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-ALTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 277
chicken 209 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-ALTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 277
xenopus 202 LYDQVHPDDVDKLREQLSTSEN-AMTRGLDLKTGTVKKEGQOOSMRMCMGSRRSFI CRMRGSSSVDVPV 270
zebrafish 183 LYDQLHPDDVEKLRQLSTTENNNSGRMLDMKTGTVKKEGQATVRMSMGARRSFI CRMRGVCVPEPV 252

```

```

human 278 SVNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 347
bovine 278 SMNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 347
monkey 278 SVNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 347
pig 278 SMNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 347
rabbit 278 SMNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 347
rat 278 SMNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 347
mouse 278 SMNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 347
chicken 277 SMNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 346
xenopus 271 SVNRLSFVRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 340
zebrafish 253 SLNRLNFRNRNRCRNLGSGVDGEPHFVVVHCTGYIKAWPPAGVSLPDDDPDPEAGQSGKFCFLVAIGRLQVTS 322

```

```

human 348 SPNCTDMSNVCOPTTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 417
bovine 348 SPNCTDMSNVCOPTTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 417
monkey 348 SPNCTDMSNVCOPTTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 417
pig 348 SPNCTDMSNVCOPTTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 417
rabbit 348 SPNCTDMSNVCOPTTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 417
rat 348 SPNCTDMSNVCOPTTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 417
mouse 348 SPNCTDMSNVCOPTTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 417
chicken 347 SPNCTDMSNVCOPTTEFISRHNIEGIFTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 416
xenopus 341 SPTCTDINTVCOPIEFISRHGVDFLTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI VEFCHPEEQQLLRDSFQOVVK 410
zebrafish 323 CPSDTSINNSVPEFISRHNSQGVYTFVDHRCVATVGYOPELLGKNI LDFAHPEEQQLLRDSLQOVVK 392

```

PAS-B

```

human 418 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 487
bovine 418 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 487
monkey 418 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 487
pig 418 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 487
rabbit 418 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 487
rat 418 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 487
mouse 418 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 487
chicken 417 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 486
xenopus 411 LKGQVLSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVKNSSQEPRLT|SNT|QRPQLGPT 480
zebrafish 393 LRQVMSVMFRFRSKNQEWLWMRTSSFTFQNPYSDEIEYI|CTNTNVNRGSSSEGS--VSPLSSPSLGQS 459

```

```

human 488 ANLPLEMGSGOLAPR-----QQQOQTELDMPVGRDGLASYNHSQV-VOPVTTTGPESHKPLEKS 545
bovine 488 ANLPLEMGSGOLAPR-----QQQOQTELDVVPGRDGLTSCNHSQVSVOPVTTTGPESHKPLEKS 546
monkey 488 ANLPLEMGSGOLAPR-----QQQOQTELDMPVGRDGLASYNHSQV-VOPVTTTGPESHKPLEKS 545
pig 488 ANLPLEMGSGOLAPR-----QQQOQTELDVVPGRDGLASYNHSQVSVOPVTTTGPESHKPLEKS 546
rabbit 488 ANLPLEVGSOLAPR-----QQQOQTELDMPVGRDGLTNYNHSQVSVOPVATAGSEHKGPLEKS 546
rat 488 ANLPLEMGTGVLASRQQQQQQQQQQOQOQTELDMPVGRDGLASYNHSQVSVOPVATAGSEHKGPLEKS 557
mouse 488 ANLPLEMGTGOLPSR-----QQQOQTELDMPVGRDGLASYNHSQVSVOPVATAGSEHKGPLEKS 547
chicken 487 VSLPLEMGTGOLPSRQ-----QQQOQTELEVVPGRESLGYDHAQVVPVOPVSAAGSEHKGPLEKA 547
xenopus 481 INHPMDMGOTLPGRI RQ-----QQQOQTELDVVPGRDGLASYNHSQVSVOPVSAAGSEHKGPLEKT 544
zebrafish 460 PNCPTSPSPGCVTR-----QLQQQVELDGG-GMSQETPYENSQVALPQVNTPDI TH----- 511

```

```

human 546 DGLFAQDRDRPFSEIEYHNI NADOSKGISSSTVPAATQOLFSGNTPFPPTPRPAENFRNSGLAPPVTI VOP- 614
bovine 547 ESLFAQDRDRPFSEIEYNSI NSTDOSKGISSSTVPAATQOLFSGNTPFPPTPRPAENFRNSGLAPPVTI VOP- 615
monkey 546 DGLFAQDRDRPFSEIEYHNI NADOSKGISSSTVPAATQOLFSGNTPFPPTPRPAENFRNSGLAPPVTI VOP- 614
pig 547 ESLFAQDRDRPFSEIEYNSI NSTDOSKGISSSTVPAATQOLFSGNTPFPPTPRPAENFRNSGLAPPVTI VOP- 615
rabbit 547 DGLFAQDRDRPFSEIEYHNI NADOSKGISSSTVPAATQOLFSGNTPFPPTPRPAENFRNSGLAPPVTI VOA- 615
rat 558 EGLFVQDRDRPFSEIEYHNI NADOSKGISSSTVPAATQOLFSGNTPFPPTPRPAENFRNSGLAPPVTI VOP- 626
mouse 548 EGLFAQDRDRPFSEIEYPSI TADOSKGISSSTVPAATQOLFSGSSFPPTPRPAENFRNSGLAPPVTI VOP- 616
chicken 548 ESLFVQDRDRPFSEIEYHNI NADONKAI PAVSVPANPTL FPOGNAFTPS-RPAENFRNSGSMVPPVNI IOOQ 613
xenopus 545 EGMVQDRDRPFSEIEYNSI NADOSKGISSSTVPAATQOLFSGSSFPPTPRPAENFRNSGSMVPPVNI IOOQ 616
zebrafish 512 -----AE-----AHCSKAVSS--VSSGQVYPPAAAAPSAPRPTETFRSPVL PQQMVPVAH- 559

```

```

human 615 SASAGOMLAQISRHSNPTQGATPTWT-----PSTRSGFSAQQVATQATAKTRTSQFVGVS 669
bovine 616 STSAGOMLAQISRHSNPTQGAAPAWT-----PSTRPGFSAQQVVTQATAKTRTSQFVGVS 670
monkey 615 SASAGOILAQISRHSNPTQGATPTWT-----PSTRSGFSAQQVVTQATAKTRTSQFVGVS 669
pig 616 SASAGOMLAQISRHSNPTQGAAPAWT-----PSTRPGFSAQQVATQATAKTRTSQFVGVS 670
rabbit 616 SASAGOMLAQISRHSNPTQGAAPAWT-----PSTRPGFSAQQVATQATAKTRTSQFVGVS 670
rat 627 SSSAGOILAQISRHSNPTQGAAPAWT-----PSTRPGFSAQQVATQATAKTRTSQFVGVS 670
mouse 617 SSSAGOILAQISRHSNPTQGAAPAWT-----PSTRPGFSAQQVATQATAKTRTSQFVGVS 670
chicken 617 PAAAGRIILAQISRHSNPTQGAAPAWT-----PSTRPGFSAQQVATQATAKTRTSQFVGVS 670
xenopus 614 PVSAGOILAQISRHSNPTQGAAPAWT-----PSTRPGFSAQQVATQATAKTRTSQFVGVS 667
zebrafish 560 -SAG-QMLAQMSRQSTPSGVSGSNNSPIQAPSGPTAPPGLWNTTRQPFSTQQVAGPIGKN-QSAPFNMGG 626

human 670 FQ-----TPSSSFSMSLPGAPTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 731
bovine 671 FQ-----TPSSSFSMSLPGASTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 732
monkey 670 FQ-----TPSSSFSMSLPGAPTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 731
pig 671 FQ-----TPSSSFSMSLPGASTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 732
rabbit 671 FQ-----TPSSSFSMSLPGAPTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 732
rat 681 FQ-----TPSSSFSMSLPGAPTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 742
mouse 672 FQ-----TPSSSFSMSLPGAPTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 733
chicken 671 FQ-----TPSSSFSMSLPGAPTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 733
xenopus 668 FQA-----TPSSSFSMSLPGAPTASPGAAAYP-SLTNRGNSNFAPETGOTAGQFOTR-TAEGVGVWPOWOG 729
zebrafish 627 FSSASAPSTSSSFGQMGASASMASTSSYQQINSHSNPSNNGYGDVGQIAAAGTR-PAEAGVTGWQWPS 695

human 732 QQPHHRSSSSEQHVQOPPAQOPGOPEVFOEMLSMGLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 789
bovine 733 QQSHHRSSSSEQHVQOPSAQOPGOPEVFOEMLSMGLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 790
monkey 732 QQPHHRSSSSEQHVQOPSAQOPGOPEVFOEMLSMGLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 789
pig 733 QQPHHRSSSSEQHVQOPSAQOPGOPEVFOEMLSMGLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 790
rabbit 733 QQPHHRSSTSEQHVQOPSTQOPNOPEVFOEMLSMGLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 790
rat 743 QQPHHRSSSSEQHVQOPTSAQOPSOPEVFOEMLSMGLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 800
mouse 734 QQPHHRSSSSEQHVQOTQAQAPSOPEVFOEMLSMGLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 791
chicken 730 Q--HHSQSTAESHVQO-----PSOPEAFPDMLTMLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 784
xenopus 730 Q--HHSQSTAESHVQO-----PSOPEAFPDMLTMLGDQSNYNNEEFPDLTMFPFSE 781
zebrafish 696 Q--HTQASADTQVQN-----NQTDMPVSGAIVKVKLSWVRV----- 731

```

図8 ARNTのアミノ酸配列のアラインメント

脊椎動物のARNTのアミノ酸配列を CLUSTALW ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_clustalw.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html))によってアラインメントした。アラインメントした種の全てにおいて保存されている残基に薄橙色を付した。ループ欠損変異体(2-3節, 2-4節参照)において欠損させた領域を青枠で囲み, 熱安定化変異体(2-5節参照)において変異を導入した残基を赤色で示した。

bHLH

human 1 MPRTMI PPGECTYAGRKRRLPLQOKORPAVGA-EKSNPSKRHRDRNLNAELDLHLASLLPFPPDIISKLDKLS 69  
monkey 1 RPRTMI PPGECTYAGRKRRLPLQOKORPAVGA-EKSNPSKRHRDRNLNAELDLHLASLLPFPPDIISKLDKLS 69  
pig 1 ---MIPPGDCMYAGRKRRLPLQOKORPAVGA-EKSNPSKRHRDRNLNAELDLHLASLLPFPPDIISKLDKLS 65  
rat 1 ---MMIPSGECTYAGRKRRLPLQKRRLTMTG-EKSNPSKRHRDRNLNTLDELHLASLLPFSPDIISKLDKLS 66  
mouse 1 ---MMIPSGECTYAGRKRRLPIQKRRLTMTG-EKSNPSKRHRDRNLNTLDELHLASLLPFSPDIISKLDKLS 66  
chicken 1 ---MIPPGECLYAGRKRRLPIQOKORPAAGN-EKSNPSKRHRDRNLNAELDLHLASLLPFPPDIISKLDKLS 65  
xenopus 1 ---MIPPGECMYAGRKRRLPIQOKORPSAGS-EKSNPSKRHRDRNLNAELDLHLASLLPFPPDIISKLDKLS 65  
zebrafish 1 ---MIPPGDCLYAGRKRRLPIQOKORPAALMS-EKSNPSKRHRERLNAELERLAEELPFPGPDTVCKLDKLS 66

---

human 70 VLRLSVSYLRVKSFFQVQVEQSSROP--AAGAPSPGDS CPLAGSAVL EGRLLLES LNGFALVVS AEGTIF 137  
monkey 70 VLRLSVSYLRVKSFFQVQVEQSSROP--AAGAPSPRDSRPLAGSAVL EGRLLLES LNGFALVVS AEGTIF 137  
pig 66 VLRLSVSYLRVKSFFQALQERKCPROP--AAGAPSAAGDRGPHRGS AVL EGRLLLES LHGFALVVS AEGTIF 133  
rat 67 VLRLSVSYLRVKSFFQALQETCVWSA--PALSP--EDHSSRGFPVQ EGRLLLES LNGFALVVS AEGTIF 131  
mouse 67 VLRLSVSYLRVKSFFQALQETCVWSA--PALSP--EHSYRGFVQ EGRLLLES LNGFALVVS AEGTIF 131  
chicken 66 VLRLSVSYLRVKSFFQALQETCVWSA--PALSP--EHSYRGFVQ EGRLLLES LNGFALVVS AEGTIF 131  
xenopus 66 ILRLSVSYLRVKSFFQALQETCVWSA--PALSP--EHSYRGFVQ EGRLLLES LNGFALVVS AEGTIF 131  
zebrafish 67 VLRLSVSYLRVKSFFQALQETCVWSA--PALSP--EHSYRGFVQ EGRLLLES LNGFALVVS AEGTIF 131

---

PAS-A

human 138 YASATI VDYLGFHQT DVMHONI YDY IHVDDRQDF CRQLHWAMDPPOVVFQOPPP-LETGDDA I LGRLLRA 206  
monkey 138 YASATI VDYLGFHQT DVMHONI YDY IHVDDRQDF CRQLHWAMDPPOVVFQOPPP-LETGDDA I LGRLLRA 206  
pig 134 YASATI VDYLGFHQT DVMHONI YDY IHVDDRQDF CRQLHWAMDPPOALCGOPLLSGSAGEDAVLGRLLQA 203  
rat 132 YASATI VDYLGFHQT DVMHONI YDY IHVDDRQDF CRQLHWAMDPPOVVFQOSPH-ADTDNTVLGKLLRA 199  
mouse 132 YASATI VDYLGFHQT DVMHONI YDY IHVDDRQDF CRQLHWAMDPPOVVFQOSPH-ADTDNTVLGKLLRA 199  
chicken 132 YASATI VDYLGFHQT DVMHONI YDY IHVDDRQDF CRQLHWAMNPPOMS-GOQLQ-TETGEEYILSKLFA 199  
xenopus 136 YASATI LDYLGHFHQT DVMHONVYDY IHVDDRQDF CRQLHWAMNPQOMEIAEQSQ-TDTGADVFLNKLFEA 204  
zebrafish 131 YASSTI ADYLGHFHQT DVMHONVYDY IHVDDRQDF FRRQLHWAMNPPNPE-AQSSG--TAEFFAVS-SLFAQS 196

---

human 207 QEWTGTPT EYS AFLTRCFICRVRCLLDSTSGFLTMQFQGLKFLFGQKKKAPSGAMLPRLSLFCIAAP 276  
monkey 207 QEWTGTPT EYS AFLTRCFICRVRCLLDSTSGFLTMQFQGLKFLFGQKKKAPSGAMLPRLSLFCIAAP 276  
pig 204 QEGAAGLPPEYS AFLTRCFICRVRCLLDSTSGFLTMQFQGLKFLFGQKKKAPSGAALPRLSLFCIAAP 273  
rat 200 QEGGKGLPSEYS AFLTRCFICRVRCLLDSTSGFLTMQFQGLKFLFGQKKKAPSGAALPRLSLFCIAAP 269  
mouse 200 QEGGKGLPSEYS AFLTRCFICRVRCLLDSTSGFLTMQFQGLKFLFGQKKKAPSGAALPRLSLFCIAAP 269  
chicken 200 QE-NDSTTTDYSAFLTRCFICRVRCLLDSTSGFLTMQFQGLKFLFGQKKKAPSGAALPRLSLFCIAAP 268  
xenopus 205 EE-SDS SPSAYS SFLNRCFICRVRCLLDSTSGFLTMQFQGLKFLFGQKKKAPSGTIHPPQMSLFCIAAP 273  
zebrafish 197 DQ-PAGVPELSCFLSRCFILRVRCLLDSTSGFLTMQFQGLKFLHGRRAVSGAALPPALALFCIAAP 265

---

human 277 VLLPSAAEMKMRSALLRAKPRAD-TAATAKVKATTS LCESELH-----GKPNYSAG 328  
monkey 277 VLLPSAAEMKMRSALLRAKPRAD-TAATAKVKATTS LCESELH-----GKPNYSAG 328  
pig 274 VLLPPVAEVS GKSA LRAKHRVD-I SATPDAGAKATPSLCSGDLH-----GKPSYVAG 325  
rat 270 -VLP SVTEMKMS AFLKAKHRAD-I VVTMDSRAKAVTSLCESELH-----PKLNYLAG 320  
mouse 270 -VLP SVTEMKMS AFLKAKHRAD-I VVTMDSRAKAVTSLCESELH-----PKLNYLAG 320  
chicken 269 LLLP SVTEMKMS LLVKAHKADDAATNNTSNTKSN SGLCEAAELYGRNCHHEGAAFNVLQITENQFA 338  
xenopus 274 LLLP VTEI KTKSVL MKTKPKG-ATSNNTTKPF PGAYEVEHA-GRNS-HQGTCFPI LHDPDNOIKL 340  
zebrafish 266 -LLP SGPD LKMS--RQRGPGALPVQHTDRE DPLRRAGHTL F-----SRDAVKR 313

---

human 329 RSSRESGVLVLEQT DAGRWAQV PARAPCLCLRG GPDVLVDPKGGSG--DREEEQHRMLS RASG----- 390  
monkey 329 RSSRESGVLVLEQT DAGRWAQVPT RAPCLCLRG GPDVLVDPKGGSG--DREEEQHRMLS RASG----- 390  
pig 326 SRNENGLSVF RAP T DACRWGRV PARAPCLCLRG GDS DLVDP EGATG--DGGEEPRGVRRDVP----- 388  
rat 321 RSNGENV I SLFRGOTDRSHWARALARSSCLCLRG GPD-LLDPKGTS G--DREEDDQKHILRRSPGARGQR 387  
mouse 321 KSNGENV I SLFRGOTDRSHWARALARSSCLCLRG GPD-LLDPKGTS G--DREEDDQKHILRRSPGARGQR 387  
chicken 339 KNNGENV I SLFRGOTNE DQWVWVQAN TOLLRYRSGCEYVVAQQMLKEE DEQLKIPNSFAL LKGNLEG-- 406  
xenopus 341 MNSGDNGI SFFKVRTNE DQWVWVQAN TOLLRYRSGSDYI VVPQQ-----SEEMKQDGVSLGKGNRE-- 403  
zebrafish 314 RTEG-----LYAADQPQSVWPRTAPAVDMTARRHTHY-----GKP-----SR SAGYSRAEC----- 359

---

human 391 ----VTGRRETGP T KPLPWTAGKHS EDG-ARPRLOPSKNDPPSLRPMRPGSCLP CPCVQGT----- 447  
monkey 391 ----VTGRRETGP VPMKPLPWTAGRHVE DG-ARPRLOPSKNDPPCLRP TPRGSCLP YSCVGT----- 447  
pig 389 ----HSCRL ETPGSTKHL S WTPGKHGDG STKLLDPSNSDLF SVLALPRGACLPCPGLOGDTHAGGVA 454  
rat 388 EMHKYSYGLETPVHLRHL DWSTEQRSGE STTKL TROPSKNEP-STCL VPHGSCVYPYPSOGMFS-----A 451  
mouse 388 EMHKYSYGLETPVHLRHL DWSTEQRSGE STTKL TROPSKNEP-STCL VPHGSCVYPYPSOGMFS-----A 451  
chicken 407 --LSYNGAIETLGLQKHLNWAVKNEQDN-VKVKFEPHTNGECFVQEE SLTNTPTVLGIQNCTTNNSWT 473  
xenopus 404 --ASLG--INDMPAL LKHLLPWGKQEKED-MKVKFEPHTNGECFVQEE SLTNTPTVLGIQNCTTNNSWT 466  
zebrafish 360 ----VEFS FQPHGDY NTHTHLLEP--QVKLEPDS DCE--NGS GACG--RYNTHGGACER----- 409

---

human 448 FRNSPI SHPPSPSPSAYS SRTSRPMDVGE DQVHPP-LCHF PQRSLOHQLPQPGAQR FATRGYPMEDMKL 516  
monkey 448 FRNSPI SHPPSPSPSAYS SRTSRPMDVGE DQVHPP-LCHF PQRSLOHQLPQPGAQR FATRGYPMEDVKL 516  
pig 455 SRNPASGHLPRHPPCACAGRTSRAVRGGHGOVHPPSPCFPQGG LGGGLP----QRLPAGGYPAQD-KF 519  
rat 452 SNMA SFRESLDHPTG YCSQMNRP L PDI HOGOV DPS-TCHI PQSSLGSR I PLSGMOCFTARGFSTEDA KL 520  
mouse 452 SNMA SF RDSLDHPTGAYCSQMNRP L SDI HOGOV DPS-TCHI PQSSLGSR I PLSGMORF TARGFSTEDA KL 520  
chicken 474 FRNS SCS I NRQMN-ACSNRRAGSFYNR DQSFLNLA STCP SHWGSANCOQS YSGLQORAVENY TADHLKL 542  
xenopus 467 GKTSSSR I NHQL I GSFSDR I NRPF Y SMDQNT P GVHMLGRHHHGNT EHFQSYSGF QHALDSYVPEHKL 536  
zebrafish 410 YNTHGAA CERYNTHGAA CERYNSAG-----GHTHMG-----AQVKLEDGF G--QFSCQRMKPPY-- 462

---

human 517 QGVMPMPGDLCGPTLLLDVSIKMEKDSGCEGAA DG--CVPSQVWL G ASD--RSHPATFPTRMHLKTEPDS 582  
monkey 517 QGVLMPMPGDLYGPTLLLDVPIKMEKDSGCEGAA DG--CVPSQVWL G ASD--RSHPATFPTRMHLKTEPDS 582  
pig 520 HGLPMLPGALRN PVS LLDVPIKMERDSGAE DTA DGYSVSPSQVWV G ASDVAKS QLVTFPTRMHLKTEPDA 589  
rat 521 PSLP VNI GTPCNPVLSLEVP I KME N E S G SODI VEA--STTS CVWLGT GDMTRRHLVGF PARMHLKTEPDY 588  
mouse 521 PSLPVT I GTPCNPVLSLEVP I KME N E S G SODI VEA--STTS CVWLGT GDMTRRHLVGF PARMHLKTEPDY 588  
chicken 543 QRSL I SSES L Y DAAFLDMP I KTEYSDS ESNLA DNYMPPQNR AWLDE NGTMRKQLFSYPNRHLKAE PDL 612  
xenopus 537 ESPFVNPEVLYDSGLPLTMP I KTEYSDS ESNLA DNYMPPQNR AWLDE NGTMRKQLFSYPNRHLKAE PDL 605  
zebrafish 463 --AGHY----YTPPRPLKCVLNREASGTLNTHCT-----NGLKQLD-FSEGLHLMESDL 506

---

human 583 ROQVY-----ISHLGHG-VRGAOPHGRATAG-----RSRELPFHPAHCACLEPTDGLPOSEPPH 636  
monkey 583 ROQVH-----ILHLGHG-VRGTQPHGRATVGV-----RSRELPFHPAHCACLEPMHGLAOPPEPH 636  
pig 590 RHPLVY-----SPLRHGGLLGAHPR-----GREPAPFPQAPACACLEPPRRLARGHOP 637  
rat 589 ROQVC-----TPHRGHG-ILGTNPHSRDITVG-----SREHAPLYSAHCTCLSP-----EPH 635  
mouse 589 ROQAC-----TPLGHG-MLGTNPHSRDITVG-----SREHAPLYSAHCTCLSP-----EPH 635  
chicken 613 COQASPCQKPRHCLYTPHNWQCI V AN-HPSNLNLNRSCGLRNREAVDFCPQNS SACL E L P D Q P H T E G Y 674  
xenopus 606 SEQTS--CLKPKHYMHSSHRSHCYASGTHMNFNSGRPFKGIY NKDVGQFCPPKCAYLESVLQ GADVSN 674  
zebrafish 507 KAG-----



```

human 637 -QLCARGRGE-----QSCTCRAAEAAPVVKREPLDSPQWATHSQGMVPGMLPKSALAT----LVP 691
monkey 637 -QLCARGRGE-----QSCTCRAAEAAPVVKREPLDSPPWATHSQGAVPGMFPKSALAT----LVP 691
pig 638 ---PTG-----DCDCRAPGSAPVVKLEPLDLPWAAHSQGGAPGMFPKSALAT----RMP 685
rat 636 -HLFMCSHSE-----SQHPSLDQDCRAPIVKREPLDSPSWAAPGHVTVPRMFPKNSIT----VIP 691
mouse 636 -HLFMCSHSE-----SQHPSLDQDCRAPIVKREPLDSPSWAAPGQVTVPRMFPKNSKT----VIP 691
chicken 682 GQFYSLAPGE-KEQSNVFKMPCEFKNPCLVQAIKREPLDSPPLSNSGQNRAHMSFPENTIAG----PVP 746
xenopus 675 NQFYSVATVDDKSTGNHPYKLCQEFKTHSLVQNIKREPLDSPPWVESQGEAVQAIYQKNTLMGFLPSQMP 744
zebrafish 510 -----YEFKGHGLVHSIKQEPLDPQHWDTLMMSCGSGRADTHTCTH----- 550

human 692 PQASGCTFLP 701
monkey 692 PQASECTFLP 701
pig 686 ARDPECVFLP 695
rat 692 SKGSDGIFLP 701
mouse 692 SKGSDGIFLP 701
chicken 747 HKATECTFLQ 756
xenopus 745 RNAAEFYIQ 754
zebrafish 550 ----- 550

```

図9 AhRRのアミノ酸配列のアラインメント

脊椎動物のAhRRのアミノ酸配列をCLUSTALW ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_clustalw.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html))によってアラインメントした。アラインメントした種の全てにおいて保存されている残基に薄橙色を付した。

## 1-6. 本研究の目的と概要

本研究では AhR の転写制御機構を構造生物学的に解明することを目的とし、転写活性化複合体である AhR/ARNT について X 線結晶構造解析またはクライオ電子顕微鏡による単粒子解析に向けた検討を行った。また、転写抑制複合体である AhRR/ARNT について X 線結晶構造解析を行った。具体的には、まず AhR/ARNT について human 由来の AhR (残基番号 27-436)/ARNT (残基番号 82-474) (野生型と呼ぶ) の高純度精製方法を確立し、DNA 結合能を確認した。得られた試料を用いて結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはできなかった。そこで結晶化に向けてフレキシブルなループを欠損させた変異体や複数の種由来の AhR, ARNT, 熱安定性を向上させた変異体などを検討した。さらに、PA ペプチド配列を挿入した AhR/ARNT を作製し、PA ペプチドの抗体 NZ-1 との複合体を調製した。これらの試料を用いて結晶化スクリーニングを行ったが、結晶は得られていない。また、得られた試料を用いてネガティブ染色またはクライオ条件下での電子顕微鏡観察を行った。野生型 AhR/ARNT/DNA についてクライオ条件下で測定を行った結果、12 Å の分解能で三次元密度マップを得た。AhRR/ARNT については human 由来の AhRR と bovine 由来の ARNT のループ欠損変異体の複合体試料を調製した。得られた試料を用いてリジン残基のアルキル化などを行い、結晶化スクリーニングを行った。その結果、リジン残基をエチル化した試料を用いて結晶を得ることに成功した。X 線回折実験を行い、2.4 Å の分解能で AhRR/ARNT の結晶構造を明らかにした。AhRR/ARNT と AhR/ARNT (bHLH-PAS-A 領域) の結晶構造を比較すると、bHLH-PAS-A 領域の構造はよく似ていた。さらに、ARNT や DNA との相互作用に関わる残基は AhRR と AhR で高度に保存されており、AhRR が AhR を競合的に抑制する構造基盤が明らかになった。一方、他の bHLH-PAS ファミリーの構造と比較すると、AhRR は PAS-B ドメインを持たないため、ドメイン配置が異なっており、AhRR と ARNT に特異的な相互作用界面が観察された。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 2本鎖 DNA, リガンドの調製

#### 2-1-1. 2本鎖 DNA の調製

AhR/ARNT ヘテロダイマーは XRE と呼ばれる DNA 配列(CACGCAA)に結合する[55] (1-3 節参照)。XRE 配列を含む 1 本鎖 DNA とその相補鎖をユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼して合成した(OPC 精製)。それぞれの 1 本鎖 DNA を濃度 2 mM となるように純水に溶解し, 等量ずつ混合した。98°Cで 5 分間インキュベートし, 室温で冷却することで 1 mM の 2 本鎖 DNA とした(図 10)。

XRE_0	5'- GATCCCTCCAGGCTTCTCACGCAACTCC	-3'	XRE_53	5'- GTCTCAGC AAC	-3'
XRE_1	3'- CTAGGAGGTCGAGAAGAGT GCGTTGAGG	-5'	XRE_54	GGAGT GCGTTG	-5'
XRE_2	CTCCAGGCTCTTCTCACGCAACTCC		XRE_55	TCCTTCTCAGC CAACGCCTGG	
XRE_3	GAGTCCGAGAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_56	CAGGAAGAGT GCGTTGCGGAC	
XRE_4	GGCTCTTCTCACGCAACTCC		XRE_57	TCCTTCTCAGC CAACGCCTGTA	
XRE_5	CCGAGAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_58	ATAGGAAGAGT GCGTTGCGGAC	
XRE_6	TTCTCACGCAACTCC		XRE_59	GTCTCCTTCTCAGC CAACGCCTG	
XRE_7	AAGA GTGCGTTGAGG		XRE_60	AGGAAGAGT GCGTTGCGGACCAG	
XRE_8	ATCCCTCCAGGCTCTTCTCACGCAA		XRE_61	TCCTTCTCAGC CAACGCCTG	
XRE_9	TAGGGAGGTCGAGAAGAGT GCGTT		XRE_62	GGAAAGAGT GCGTTGCGGACA	
XRE_10	A TTCTCACGCAACTCC		XRE_63	CACCTTCTCAGC CAACGCCTG	
XRE_11	AAGA GTGCGTTGAGGT		XRE_64	GGAAAGAGT GCGTTGCGGACGT	
XRE_12	TTTCTCACGCAACTCC		XRE_65	CCTTCTCAGC CAACGCCTGCGA	
XRE_13	AAGA GTGCGTTGAGGA		XRE_66	GCTGGAAGAGT GCGTTGCGGAC	
XRE_14	CTTCTCACGCAACTCC		XRE_67	CCTTCTCAGC CAACGCCTT	
XRE_15	AAGA GTGCGTTGAGGG		XRE_68	AGGAAGAGT GCGTTGCGGAC	
XRE_16	GTTCTCACGCAACTCC		XRE_69	CCTTCTCAGC CAACGCCTCA	
XRE_17	AAGA GTGCGTTGAGGC		XRE_70	GTGGAAGAGT GCGTTGCGGA	
XRE_18	TTCTCACGCAACTCCA		XRE_71	CTGCC TCTCAGC CAACGCCT	
XRE_19	TAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_72	GGAAAGAGT GCGTTGCGGAGAC	
XRE_20	TTCTCACGCAACTCCT		XRE_73	CCTTCTCAGC CAACGCCT	
XRE_21	AAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_74	GAAGAGT GCGTTGCGGAG	
XRE_22	TTCTCACGCAACTCCC		XRE_75	AGCTTCTCAGC CAACGCCT	
XRE_23	GAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_76	GAAGAGT GCGTTGCGGATC	
XRE_24	TTCTCACGCAACTCCG		XRE_77	CCTTCTCAGC CAACGCCTTGG	
XRE_25	CAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_78	ACCGAAGAGT GCGTTGCGGA	
XRE_26	AA TTCTCACGCAACTCC		XRE_79	CTTCTCACGCAACTCC	
XRE_27	AAGA GTGCGTTGAGGT		XRE_80	AGAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_28	TTTCTCACGCAACTCC		XRE_81	CTTCTCACGCAACTCCAG	
XRE_29	AAGA GTGCGTTGAGGA		XRE_82	TCGAAAGAGT GCGTTGCGGAC	
XRE_30	CTTCTCACGCAACTCC		XRE_83	AGCTTCTCAGC CAACGCCT	
XRE_31	AAGA GTGCGTTGAGGG		XRE_84	GAAGAGT GCGTTGCGGCT	
XRE_32	GTTCTCACGCAACTCC		XRE_85	TCTCAGC CAACGCCTT	
XRE_33	AAGA GTGCGTTGAGGC		XRE_86	GAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_34	TTCTCACGCAACTCCA		XRE_87	TTCTCACGCAACTCC	
XRE_35	TAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_88	AGAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_36	TTCTCACGCAACTCCT		XRE_89	CTTCTCACGCAACTCC	
XRE_37	AAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_90	GAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_38	TTCTCACGCAACTCCC		XRE_91	TTCTCACGCAACTCCG	
XRE_39	GAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_92	TTCTCACGCAACTCCG	
XRE_40	TTCTCACGCAACTCCG		XRE_93	CAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_41	CAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_94	TTCTCACGCAACTCCG	
XRE_42	AA TTCTCACGCAACTCC		XRE_95	GAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_43	AAGA GTGCGTTGAGGT		XRE_96	TTCTCACGCAACTCCG	
XRE_44	TTTCTCACGCAACTCC		XRE_97	GAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_45	AAGA GTGCGTTGAGGA		XRE_98	TTCTCACGCAACTCCG	
XRE_46	CTTCTCACGCAACTCC		XRE_99	GAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_47	AAGA GTGCGTTGAGGG		XRE_100	TTCTCACGCAACTCCG	
XRE_48	GTTCTCACGCAACTCC		XRE_101	GAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_49	AAGA GTGCGTTGAGGC		XRE_102	TTCTCACGCAACTCCG	
XRE_50	TTCTCACGCAACTCCA		XRE_103	GAAGAGT GCGTTGCGG	
XRE_51	TAAGAGT GCGTTGAGG		XRE_104	TTCTCACGCAACTCCG	
XRE_52	TTCTCACGCAACTCCT		XRE_105	GAAGAGT GCGTTGCGG	

```

XRE_106 5'- CCTTCT CACGCAA CGCCTGG -3'
3'- AAGA GTGCGTT GCGGACCGG -5'
XRE_107 CCTTCT CACGCAA CGCCTG
AGA GTGCGTT GCGGACGGA
XRE_108 CCTTCT CACGCAA CGCCTGGGC
GAAGA GTGCGTT GCGGACCCGG
XRE_109 CCTTCT CACGCAA CGCCTGGG
AAGA GTGCGTT GCGGACCCGG
XRE_110 CCTTCT CACGCAA CGCCTGG
AGA GTGCGTT GCGGACCCGA
XRE_111 CCTTCT CACGCAA CGCCTGGGCA
GAAGA GTGCGTT GCGGACCCGTG
XRE_112 CCTTCT CACGCAA CGCCTGGGC
AAGA GTGCGTT GCGGACCCGGG
XRE_113 CCTTCT CACGCAA CGCCTGGG
AGA GTGCGTT GCGGACCCGGA
XRE_114 GGTCCCTTCT CACGCAA CGCCT
CAGGAAGA GTGCGTT GCGGAC
XRE_115 GGTCCCTTCT CACGCAA CGCCTGGTCCTTCT CACGCAA CGCCT
CAGGAAGA GTGCGTT GCGGAC CAGGAAGA GTGCGTT GCGGAC
XRE_116 GGTCCCTTCT CACGCAA CGCCGGTCTTCT CACGCAA CGCC
CAGGAAGA GTGCGTT GCGGCCAGGAAGAGT GCGTT GCGGA
XRE_117 GGTCCCTTCT CACGCAA CGCCGTCTTCT CACGCAA CGCC
CAGGAAGA GTGCGTT GCGCCAGGAAGAGT GCGTT GCGGA
XRE_118 GGTCCCTTCT CACGCAA CGGGTCCTTCT CACGCAA CGCC
CAGGAAGA GTGCGTT GCCAGGAAGAGT GCGTT GCGGA
XRE_119 GGTCCCTTCT CACGCAA CGGTCTTCT CACGCAA CGCC
CAGGAAGA GTGCGTT GCCAGGAAGAGT GCGTT GCGGA
XRE_120 GGTCCCTTCT CACGCAA CGTCTTCT CACGCAA CGCC
CAGGAAGA GTGCGTT GCAGGAAGA GTGCGTT GCGGA
XRE_121 CCTTCT CACGCAA CTCTCT CACGCAA CG
GAAGA GTGCGTT GAGGAAGAGT GCGTT GCG
XRE_122 CCTTCT CACGCAA CCTTCT CACGCAA CG
GAAGA GTGCGTT GGAAGAGT GCGTT GCG
XRE_123 CCTTCT CACGCAA CTCT CACGCAA CG
GAAGA GTGCGTT GGAAGAGT GCGTT GCG
XRE_124 CCTTCT CACGCAA CTCT CACGCAA CG
GAAGA GTGCGTT GAGAGT GCGTT GCG
XRE_125 CCTTCT CACGCAA CTCT CACGCAA CG
GAAGA GTGCGTT GAGA GTGCGTT GCG
XRE_126 TCT CACGCAA CCT CACGCAA
GA GTGCGTT GGA GTGCGTTG
XRE_127 GTCCTTCT CACGCAA CGCCT
AGGAAGA GTGCGTT GCGGAC
XRE_128 GTCCTTCT CACGCAA CGCC
GGAAGA GTGCGTT GCGGCA
XRE_129 GTCCTTCT CACGCAA CGC
GAAGA GTGCGTT GCGCAG
XRE_130 GGTCCCTTCT CACGCAA CGCCT
CAGGAAGA GTGCGTT GCGGAC
XRE_131 GGTCCCTTCT CACGCAA CGCC
AGGAAGA GTGCGTT GCGGCC
XRE_132 GGTCCCTTCT CACGCAA CGC
GGAAGA GTGCGTT GCGCCA
XRE_133 CTCT CACGCAA CGC
AAGA GTGCGTT GCGG
XRE_134 CTCT CACGCAA CG
AGA GTGCGTT GCGA
XRE_135 CTCT CACGCAA C
GA GTGCGTT GGA
XRE_136 CTCT CACGCAA CGCC
AAGA GTGCGTT GCGGG
XRE_137 CTCT CACGCAA CGC
AGA GTGCGTT GCGGA
XRE_138 CTCT CACGCAA CG
GA GTGCGTT GCGAA
XRE_139 TGGCTGCGCGGCCCTCCGGTCTTCT CACGCAA CGCCTGGGC TCCGCGCTCCGGGCCAG
ACCGAGCCGCCCGGAGGCCAGGAAGA GTGCGTT GCGGACCCGAGGCCGGAGGCCCGTCC
TGGGCTCCGCGCCCTCCGGCCAGTGGCTGCGCGGGCC TCCGGTCTTCT CACGCAA CGCC
XRE_140 ACCCGAGGCCCGGAGGCCCGT CACCGAGCCCGGAGGCCAGGAAGA GTGCGTT GCGG
GCGGCGCTCCGGTCTTCT CACGCAA CGCCTGGGCTCCGCGCTC
XRE_141 CGCCCGGAGGCCAGGAAGA GTGCGTT GCGGACCCGAGGCCGGAG

```

図 10 本研究で使用した 2 本鎖 DNA

赤字は XRE 配列を示す。

## 2-1-2. リガンドの調製

AhR のリガンドはアゴニスト，アンタゴニストそれぞれ様々なものが知られている(1-2 節参照)。本研究では以下のリガンドを DMSO (ナカライテスク)に溶解させたものを調製した(表 1)。また，修士課程における研究で L-kynurenine を室温または 37°C でインキュベートしたものを培地に添加して培養することで AhR/ARNT の収量が増加することを見出した。そこで，本研究では L-kynurenine を溶解した後，37°C で数か月間インキュベートしたものをリガンドとして培地に添加した。インキュベート後のリガンドは溶解直後と比較して溶液の色が濃くなっていた。

表 1 本研究で用いたリガンド

リガンド	濃度
L-kynurenine (SIGMA)	50 mM
FICZ (Tocris Bioscience)	25 mM
kaempferol (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	100 mM
CH223191 (Cayman Chemical)	75 mM

## 2-2. 野生型 human AhR/ARNT

### 2-2-1. 発現ベクターの構築

当研究室の先行研究によって昆虫細胞発現ベクター pFastBac Dual (Invitrogen) の PH プロモーター下流中の制限酵素サイト BamHI から EcoRI または SpeI から NotI までの配列を置換した改変ベクターが作製されている(図 11)。修士課程における研究でこれらの改変ベクターの EcoRI と SpeI の間に human (h)由来の AhR (残基番号 27-436)または ARNT (残基番号 82-474)の遺伝子を組み込み、発現ベクターを作製した(野生型と呼ぶ)(表 2)。その際、タグを切断せずに精製、結晶化を行うことを目的として改変ベクター#6 のプレシジョン認識配列, Flag 配列を欠損させた pFastBac Dual 改変ベクター(#10)も作製した(図 11, 表 2)。



図 11 pFastBac Dual 改変ベクターのタグ配列

表 2 野生型 hAhR, hARNT の発現ベクター

名前	残基番号	改変ベクター/タグ配列
hAhR_3	27-436	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
hAhR_5	27-436	#6/C 末 プレジジョン認識配列-Flag-His
hAhR_59	27-436	#10/C 末 His
hARNT_9	82-474	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
hARNT_11	82-474	#6/C 末 プレジジョン認識配列-Flag-His
hARNT_37	82-474	#10/C 末 His

### 2-2-2. タンパク質の発現と精製

前項で作製した発現ベクターを大腸菌 DH10Bac 株にトランスフォーメーションした。Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen)に記載されている方法に従って Bacmid の調製, 昆虫細胞 Sf9 へのトランスフェクション, P1, P2, P3 ウイルス液の作製を行った。Sf9 の細胞濃度が  $2\sim 3 \times 10^6$  個/mL となるように, 5 L フラスコに 2.5 L の培地を加えた。発現用の培地には最終濃度 1%ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液(ナカライテスク)を添加した Sf-900™ II SFM (Gibco)を用い, 37°Cでインキュベートした L-kynurenine を最終濃度 10  $\mu$ M になるように添加した。そこに hAhR と hARNT の P3 ウイルス液を 3:1 の混合比で 10 mL (ウイルス液)/1 L (培養液)の割合で添加した。25°Cで 60 時間, 回転させながらインキュベートし, 目的タンパク質を発現させた。培養液を 3,000 rpm で 8 分遠心することで細胞を回収し, 培養液 1 L 分の細胞あたり 24~30 mL の破碎バッファー(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 25 mM Imidazole-HCl pH 8.0)に懸濁し超音波破碎した。続いて, 細胞破碎液を 20,000 rpm で 20 分遠心し, 上清と Ni-NTA Agarose (培養液 1 L あたり 2 mL)を混合して攪拌しながら 4°Cで 1~1.5 時間インキュベートし, 目的タンパク質をバッチ法で吸着させた。インキュベート後, エコノカラムに Ni-NTA Agarose を充填した。300~400 mL の破碎バッファーで洗浄した後, (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 250 mM Imidazole-HCl pH 8.0)のバッファー15 mL でタンパク質を溶出させた。溶出液を(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol)のバッファーで



37.5 mL に希釈し、HisTrap HP (5 mL) (GE Healthcare) にタンパク質を吸着させた。(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 100 mM Imidazole-HCl pH 8.0) のバッファー約 50 mL で洗浄し、(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 300 mM Imidazole-HCl pH 8.0) のバッファー約 14 mL でタンパク質を溶出させた。続いて、プレシジョンプロテアーゼを 1/100 (w/w) 量添加して 4°C で緩やかに振とうさせながら 3 時間インキュベートしタグを切断した。タグを切断後、HiLoad 26/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol) を用いた。Amicon Ultra - 15 (Ultracel - 50K) (Merck) を用いた限外濾過により濃縮して高純度試料を得た。精製試料の純度を SDS-PAGE と Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで確認した(結果は 3-1-1 項)。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) を用いた。

### 2-2-3. DNA との結合確認と DNA 複合体の調製

前項で得られた精製試料に対して 2-1-1 項で調製した XRE<sub>0</sub> を 1.2 倍モル量混合し、Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% Glycerol) を用いた。フリーの AhR/ARNT では  $A_{260}/A_{280}$  の比が 0.7 程度であるのに対して、XRE と混合して行ったゲル濾過クロマトグラフィーにおいて AhR/ARNT ヘテロダイマーに対応するピークの  $A_{260}/A_{280}$  の比が 1.5 程度まで上昇したことから DNA 複合体を形成していると判断し、DNA 複合体画分を分取した(結果は 3-1-2 項)。Amicon Ultra - 4 (Ultracel - 50K) (Merck) を用いた限外濾過により濃縮して DNA 複合体試料を調製した。精製試料の純度を SDS-PAGE と Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで確

認した(結果は 3-1-2 項)。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl)を用いた。

#### 2-2-4. 安定性の評価

野生型 AhR/ARNT の安定性を評価するため、2-2-2 項で得られた試料を(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol)のバッファーにタンパク質濃度が 2 mg/mL となるように調製し、20°Cで 1 週間インキュベートした後 SDS-PAGE を行った(結果は 3-1-3 項)。

### 2-3. ループ欠損変異体

野生型 AhR/ARNT の試料を用いて結晶を得ることはできなかった。野生型 AhR/ARNT が切断されやすいという実験結果(3-1-3 項参照)や AhR/ARNT の PAS-A ドメインまでの結晶構造においてディスオーダーしている領域が複数見られることから[47,48], AhR, ARNT はフレキシブルなループ領域が多数存在することが考えられた。それらのループ領域が結晶化を妨げている可能性が考えられたため、ループ領域を欠損させた変異体を作製した。修士課程における研究で欠損領域を検討し、複数のコンストラクトで高純度試料を得ることに成功した。ここではその一例として hAhR (残基番号 27-417, Δ101-110, Δ182-207, Δ249-259, R281N), hARNT (残基番号 82-474, Δ148-154, Δ231-256, Δ272-300, Δ318-331)について記す。

#### 2-3-1. 発現ベクターの構築

修士課程における研究でループ欠損変異体の発現ベクターを構築した(表3)。2-2-1 項と同様に pFastBac Dual 改変ベクター#6 の EcoRI と SpeI の間に、ループ領域であると予測される領域を欠損させた AhR, ARNT の遺伝子を組み込んだ。AhR については PAS-A ドメインと PAS-B ドメイン間の切断を抑制するため、R281N の変異を導入した。

表3 ループ欠損変異体の発現ベクター

名前	残基番号	改変ベクター/タグ配列
hAhR_124	27-417, Δ101-110, Δ182-207, Δ249-259, R281N	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
hARNT_107	82-474, Δ148-154, Δ231-256, Δ272-300, Δ318-331	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His

#### 2-3-2. タンパク質の発現と精製

前項で作製した hAhR\_124/hARNT\_107 のコンストラクトについて大量培養，精製を行った(方法は 2-2-2 項と同様の手順で行った)。このコンストラクトの精製においてはゲル濾過クロマトグラフィーによる精製に Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いた。精製試料の純度を 2-2-2 項と同様に SDS-PAGE とゲル濾過クロマトグラフィーで確認した(結果は 3-2-1 項)。

#### 2-3-3. DNA との結合確認と DNA 複合体の調製

前項で得られた精製試料に対して 2-1-1 項で調製した XRE\_0 を 1.1 倍モル量混合し，2-2-3 項と同様の方法で DNA との結合を確認し，DNA 複合体試料を調製した(結果は 3-2-2 項)。この際ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 prep grade (24 mL)カラム(GE Healthcare)を用いた。精製試料の純度を 2-2-3 項と同様に SDS-PAGE とゲル濾過クロマトグラフィーで確認した(結果は 3-2-2 項)。

#### 2-3-4. 安定性の評価

ループ欠損変異体 AhR/ARNT についても 2-2-4 項と同じ方法で安定性を評価した(結果は 3-2-3 項)。

## 2-4. Human 以外の種由来の AhR/ARNT

AhR, ARNT は脊椎動物に広く保存されている(1-5 節参照)。Bovine, mouse, monkey, rabbit, pig, rat, chicken, xenopus, zebrafish 由来の AhR, ARNT についても検討を行った。

### 2-4-1. 発現ベクターの構築

Bovine (b)及び mouse (m)由来の AhR, ARNT については修士課程における研究で野生型またはループ欠損変異体(bovine のみ)の発現ベクターを構築していた(表 4)。Bovine, mouse に加えて monkey (Mo), rabbit (Oc), pig (p), rat (r), chicken (c), xenopus (x), zebrafish (z)由来の AhR についてループ欠損変異体の遺伝子を合成した。遺伝子合成は GenScript 社に依頼し, 昆虫細胞 Sf9 用にコドン最適化した目的遺伝子の 5'末端側に EcoRI 認識配列-kozak 配列-開始コドン, 3'末端側に SpeI 認識配列を付加した。これらの合成遺伝子を含むプラスミドについて, EcoRI (TaKaRa)と SpeI (TaKaRa)によって制限酵素処理を行い, アガロースゲル電気泳動を行った後, Wizard® SV Minicolumns (Promega)を用いて精製することで目的遺伝子断片を得た。pFastBac Dual 改変ベクターは#10 を用いた(2-2-1 項参照)。EcoRI と SpeI によって制限酵素処理を行い, Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) (BioLabs)によって脱リン酸化を行った。アガロースゲル電気泳動を行った後, Wizard® SV Minicolumns を用いて精製することで線状化ベクターとした。これらの目的遺伝子断片と線状化ベクターを Ligation high Ver.2 (Toyobo)によって連結することで発現ベクターを構築した(表 4)。

また, タグ切断可能な発現ベクターを構築するため, 合成遺伝子を含むプラスミドを鋳型として, KOD FX Neo (Toyobo)によって PCR で増幅し, アガロースゲル電気泳動を行った後, Wizard® SV Minicolumns を用いて精製した。EcoRI と SpeI によって制限酵素処理を行い, 再度 Wizard® SV Minicolumns を用いて精製することで目的遺伝子断片を得た。pFastBac

Dual 改変ベクター#3 について、上記と同じ方法で線状化ベクターを作製し、目的遺伝子断片と線状化ベクターを Ligation high Ver.2 によって連結することで発現ベクターを作製した(表 4)。

さらに、野生型の AhR の発現ベクターを構築した(図 12)。ループ欠損変異体の遺伝子を含むプラスミドを鋳型とし、欠損させたループ領域に相当する遺伝子を付加したプライマーを用いて、KOD FX Neo によって PCR で増幅することで欠損させたループ領域を補った 4 つの遺伝子断片(①~④)を得た。アガロースゲル電気泳動を行った後、Wizard® SV Minicolumns を用いて精製し、遺伝子断片①と②, ③と④をそれぞれ In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara)を用いて連結した。それらを鋳型として PCR で増幅することで 2 つの遺伝子断片(⑤, ⑥)を得た。アガロースゲル電気泳動を行った後、Wizard® SV Minicolumns を用いて精製し、遺伝子断片⑤と⑥を In-Fusion® HD Cloning Kit を用いて連結した。それを鋳型として PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動を行った後、Wizard® SV Minicolumns を用いて精製した。EcoRI と SpeI によって制限酵素処理を行い、再度 Wizard® SV Minicolumns を用いて精製することで野生型 AhR の遺伝子断片を得た。上記と同じ方法で作製した pFastBac Dual 改変ベクター#3 の線状化ベクターと目的遺伝子断片を Ligation high Ver.2 によって連結することで発現ベクターを作製した(表 4)。

表4 Human以外の種由来のAhR, ARNTの発現ベクター

名前	残基番号	改変ベクター/タグ配列
bAhR_1	27-435	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
bAhR_23	27-416, Δ101-109, Δ182-214, Δ248-258, R280N	#6/C末 プレジジョン認識配列-Flag-His
bARNT_1	82-474	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
bARNT_21	82-474, Δ148-154, Δ231-256, Δ272-300, Δ318-331	#6/C末 プレジジョン認識配列-Flag-His
bARNT_22	82-464, Δ148-154, Δ231-256, Δ272-300, Δ318-331	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
mAhR_1	26-430	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
mAhR_2	26-430	#6/C末 プレジジョン認識配列-Flag-His
mARNT_3	82-474	#6/C末 プレジジョン認識配列-Flag-His
MoAhR_1	27-436, Δ101-110, Δ182-207, Δ249-259	#10/C末 His
MoAhR_2	27-436, Δ101-110, Δ182-207, Δ249-259	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
MoAhR_5	27-436	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
OcAhR_1	27-434, Δ101-109, Δ181-205, Δ247-257	#10/C末 His
OcAhR_2	27-434, Δ101-109, Δ181-205, Δ247-257	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
OcAhR_5	27-434	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
pAhR_1	27-434, Δ101-109, Δ181-206, Δ247-257	#10/C末 His
pAhR_2	27-434, Δ101-109, Δ181-206, Δ247-257	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
pAhR_5	27-434	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
rAhR_1	26-434, Δ100-108, Δ180-205, Δ247-257	#10/C末 His
rAhR_2	26-434, Δ100-108, Δ180-205, Δ247-257	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
rAhR_5	26-434	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
cAhR_1	24-435, Δ101-109, Δ181-206, Δ248-258	#10/C末 His
cAhR_2	24-435, Δ101-109, Δ181-206, Δ248-258	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
cAhR_5	24-435	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
xAhR_1	24-424, Δ96-103, Δ173-196, Δ238-248	#10/C末 His
xAhR_2	24-424, Δ96-103, Δ173-196, Δ238-248	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
xAhR_5	24-424	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
zAhR_1	19-433, Δ97-106, Δ179-204, Δ246-256	#10/C末 His
zAhR_2	19-433, Δ97-106, Δ179-204, Δ246-256	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列
zAhR_5	19-433	#3/N末 His-Flag-プレジジョン認識配列

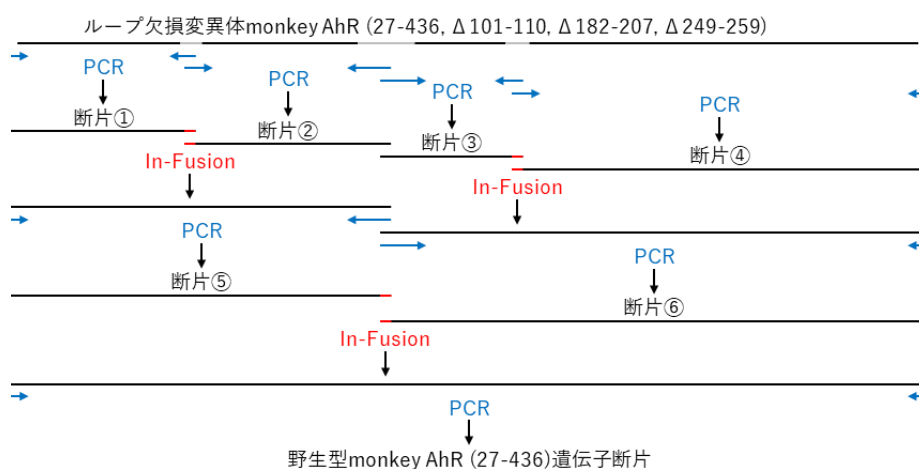


図12 ループ欠損変異体から野生型の遺伝子の作製

#### 2-4-2. タンパク質の発現と精製

2-2-1 項, 2-3-1 項及び前項で作製したコンストラクトについて以下の組み合わせで大量培養, 精製を行った(表 5) (方法は 2-2-2 項と同様の手順で行った)。mAhR\_2/mARNT\_3, bAhR\_23/bARNT\_21 の精製においてはゲル濾過クロマトグラフィーによる精製に Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いた。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol)または(10 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% Glycerol)を用いた。また, MoAhR\_1/hARNT\_107, cAhR\_1/hARNT\_107 の精製においてはゲル濾過クロマトグラフィーによる精製の後に HiTrap SP HP (5 mL) (GE Healthcare) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出液を(45 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 0.125 M NaCl, 10% Glycerol)のバッファーで 3 倍希釈し, HiTrap SP HP (5 mL)に吸着させた。(10 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 250 mM NaCl, 10% Glycerol)及び(10 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 1 M NaCl, 10% Glycerol)のバッファーを用いて NaCl の濃度勾配によってタンパク質を溶出させた。精製試料の純度を SDS-PAGE で確認した(結果は 3-3 節)。



表 5 大量培養，精製を行った AhR, ARNT の組み合わせ

AhR	/	ARNT
mAhR_2	/	mARNT_3
bAhR_1	/	bARNT_22
bAhR_23	/	bARNT_21
bAhR_23	/	bARNT_22
MoAhR_1	/	hARNT_107
OcAhR_1	/	hARNT_107
pAhR_1	/	hARNT_107
rAhR_1	/	hARNT_107
cAhR_1	/	hARNT_107
xAhR_1	/	hARNT_107
zAhR_1	/	hARNT_107
MoAhR_2	/	bARNT_22
OcAhR_2	/	bARNT_22
pAhR_2	/	bARNT_22
rAhR_2	/	bARNT_22
cAhR_2	/	bARNT_22
xAhR_2	/	bARNT_22
zAhR_2	/	bARNT_22
hAhR_3	/	bARNT_21
MoAhR_5	/	bARNT_21
OcAhR_5	/	bARNT_21
pAhR_5	/	bARNT_21
rAhR_5	/	bARNT_21
cAhR_5	/	bARNT_21
xAhR_5	/	bARNT_21

## 2-5. 熱安定化変異体

### 2-5-1. HEK293 細胞を用いた発現系，熱安定性評価系の構築

AhR/ARNT の熱安定性を向上させることを目的として，変異の導入を検討した。変異体のスクリーニングに要する時間を短縮するために Sf9 ではなく HEK293 細胞を用いた。そこで，まず HEK293 細胞を用いた AhR/ARNT の発現系を構築した。

#### 2-5-1-1. 発現ベクターの構築

発現ベクターには動物細胞用発現ベクター pEF-BOS を用いた[56]。当研究室の先行研究によって pEF-BOS の 3766 bp から 4183 bp を置換した改変ベクターが作製されている(図 13)。この改変ベクターを鋳型として，PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara) によって PCR で増幅し，アガロースゲル電気泳動を行った後，Wizard® SV Minicolumns を用いて精製することで線状化ベクターとした。目的遺伝子は野生型 hAhR，hARNT の遺伝子を含むプラスミド(hAhR\_59，hARNT\_9) (2-2-1 項参照)を鋳型として，KOD FX Neo によって PCR で増幅し，アガロースゲル電気泳動を行った後，Wizard® SV Minicolumns を用いて精製することで目的遺伝子断片を得た。これらの線状化ベクターと目的遺伝子断片を In-Fusion® HD Cloning Kit によって連結することで発現ベクターを作製した(表 6)。これらの発現ベクターにおいて，AhR には C 末端にリンカー配列(GGGGSGGGGS)-enhanced green fluorescent protein (EGFP)-Flag-His，ARNT には N 末端に His-Flag-プレシジョン認識配列がそれぞれ付加されるようにプライマーを設計した(表 7)。

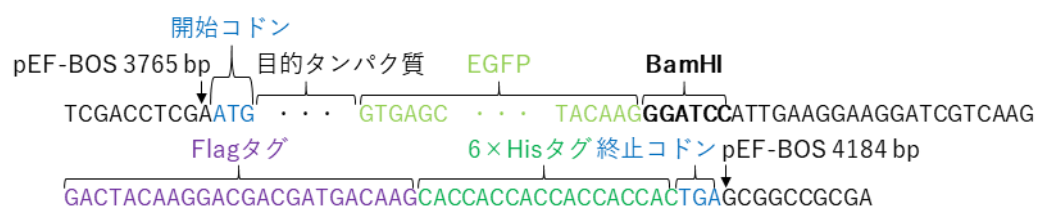


図 13 pEF-BOS 改変ベクターのタグ配列

表 6 HEK293 細胞発現用の野生型 hAhR, hARNT の発現ベクター

名前	残基番号	ベクター/タグ配列
hAhR_142	27-436	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His
hARNT_114	82-474	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列

表 7 hAhR\_142, hARNT\_114 の発現ベクター作製に用いたプライマー

線状化ベクター	forward	5'- GTGAGCAAGGGCGAG -3'
	reverse	5'- TCGAGGTCGAGGGAT -3'
AhR	forward	5'- ATCCCTCGACCTCGAGAAACCATGCCAGCC -3'
	reverse	5'- CTCGCCCTTGCTCACGGAACCGCCGCCACC AGAGCCGCCGCCACCAGATGTGCCGTTCTT -3'
ARNT	forward	5'- ATCCCTCGACCTCGAGAAACCATGTCGTAC -3'
	reverse	5'- CTCGCCCTTGCTCACCTAGGTCGGACGTGGTTC -3'

#### 2-5-1-2. タンパク質の発現

前号で作製した発現ベクターを大腸菌 DH5  $\alpha$  株にトランスフォーメーションし、PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)によってトランスフェクション用のプラスミドを精製した。6 ウェルプレートに HEK293 細胞(CH3 BioSystems)を播種した。培地には最終濃度 1%ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液, 10%非働化 FBS (Gibco)を添加した DMEM (ナカライテスク)を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 2 日程度培養し, 60~80%コンフルエントになったところで培地を新しいものに交換した。さらに数時間培養した後, トランスフェクションを行った。トランスフェクションには精製したトランスフェクション用のプラスミド, OPTI-MEM (Gibco), Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いた。AhR, ARNT のプラスミドをそれぞれ 1.8  $\mu$ g, 0.6  $\mu$ g と OPTI-MEM 150  $\mu$ L を混合した。また, Lipofectamine 2000 10  $\mu$ L と OPTI-MEM 150  $\mu$ L を混合した。これらの溶液を混合して室温で 10 分間静置した後, 全量を添加した。トランスフェクション後 2 日間培養することで目的タンパク質を発現させた。1,000 rpm で 1 分遠心することで細胞を回収し, 1 mL の破碎バッファー(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 25 mM Imidazole-HCl pH 8.0)で懸濁し超音波破碎した。続いて, 細胞破碎液を 15,000 rpm で 10 分遠心し, 上清を回収した。このうち 45  $\mu$ L を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし, ゲル濾過クロマトグラフィーで分析した(結果は 3-4-1 項)。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。タンパク質の検出には LaChrom Elite L-2485 Fluorescence Detector (Hitachi)を用い, 励起波長: 489 nm, 蛍光波長: 508 nm で EGFP の蛍光を検出した。さらに, 残りの破碎上清と Ni-NTA Agarose 20  $\mu$ L を混合して振とうしながら 4°C で 1 時間インキュベートし, 目的タンパク質をバッチ法で吸着させた。インキュベート後, 破碎バッファーで洗浄した後, 20  $\mu$ L の溶出バッファー(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 400 mM Imidazole-HCl pH 8.0)でタンパク質を溶出させた。SDS-PAGE を行い, 泳動後のゲルを用いてウェスタンブロッティングを行った。SDS-PAGE

のゲルを Nitrocellulose Membranes, 0.2  $\mu\text{m}$  (BIO-RAD)に転写し, Blocking One (ナカライテスク)を最終濃度 5%になるように添加した TBS-T バッファー(50 mM Tris-HCl pH 7.4, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween 20)中でブロッキングを行った。染色には Anti-DDDDK-tag mAb (MBL)を一次抗体, ECL Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody (GE Healthcare)を二次抗体としてそれぞれ TBS-T バッファーで 1,000 倍希釈したものをを用いた。Chemi-Lumi One (ナカライテスク)を用いて暗室中で発光を測定することでバンドを検出した(結果は 3-4-1 項)。

また, 発現量の増加を目的として, トランスフェクション時にリガンドを添加することを検討した。37°Cで数か月間インキュベートした L-kynurenine を最終濃度 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  で添加し, 上記と同様に破碎上清を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行うことで発現量を比較した(結果は 3-4-1 項)。

### 2-5-1-3. 熱安定性の評価

熱安定性の評価は加熱前後におけるゲル濾過クロマトグラフィーのピークの蛍光強度を比較することで行った。前号で調製した破碎上清(L-kynurenine を 10  $\mu\text{M}$  添加して培養したもの)について加熱なし, または 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°Cで 10 分間加熱したものを調製し, 50  $\mu\text{L}$  を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライしてゲル濾過クロマトグラフィーで分析した。AhR の C 末端側に付加された EGFP の蛍光によって AhR/ARNT のピークを検出した。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。加熱前後でピークの蛍光強度を比較し, 熱安定性の評価に適した加熱温度を検討した(結果は 3-4-2 項)。

## 2-5-2.1 残基変異によるスクリーニング

### 2-5-2-1. 導入する変異の選定

変異の導入か所, また変異後のアミノ酸残基の選定には, まず PROSS (Protein Repair One Stop Shop) ウェブサーバー (<http://pross.weizmann.ac.il>) を利用した [57]。PROSS では既知の結晶構造をインプットとして, 相同タンパク質との配列アラインメントを行い, 配列の一致度に基づいて変異の候補を選択する。結晶構造モデルに候補となった変異を導入し, 野生型とのエネルギーの差を計算する。エネルギーが減少し, 安定になっている変異をアウトプットする。

本研究ではインプットの結晶構造として human (h) AhRR/bovine (b) ARNT (3-10-3 項参照) (PDB ID : 5Y7Y) と mouse (m) HIF-2 $\alpha$ /mouse (m) ARNT [45] (PDB ID : 4ZP4) を用いた。それぞれの単体構造 (hAhRR, bARNT, mHIF-2 $\alpha$ , mARNT) 及びヘテロダイマー構造 (hAhRR/bARNT, mHIF-2 $\alpha$ /mARNT) をインプットとして, PROSS サーバーで計算した。hAhRR, mHIF-2 $\alpha$  についてそれぞれ hAhR と配列アラインメントを行い, PROSS サーバーのアウトプットとして候補に挙げられた変異か所のうち, hAhR で保存されている残基を抽出し, その中から導入する変異を複数個選択した。ARNT についても同様に bARNT, mARNT についてそれぞれ hARNT と配列アラインメントを行い, 導入する変異を選択した (2-5-2-2 号, 表 8, 表 9 参照)。

さらに, hAhRR/bARNT の結晶構造中でドメイン界面に存在するアミノ酸残基について, ①hAhR と hAhRR で異なる残基は hAhRR のアミノ酸に変異させる, ②hAhRR と hAhR で保存されている残基のうち PROSS サーバーで候補に挙げられた変異を導入する, ③それ以外の残基は適当に (hAhRR/bARNT の結晶構造を観察して塩橋を形成できそう, 疎水性相互作用を形成できそうなど独自に判断) 変異を導入する, のように AhR について 95 個, ARNT について 85 個, 導入する変異を選択した (2-5-2-2 号, 表 8, 表 9 参照)。

## 2-5-2-2. 発現ベクターの構築

2-5-1-1 号で作製した野生型の発現ベクターを鋳型として, PrimeSTAR® Max DNA Polymerase を用いた PCR 反応を行うことで, 前号で選定した変異を導入した発現ベクターを作製した。

表 8 熱安定化変異を 1 残基導入した AhR の発現ベクター

名前	残基番号	ベクター/タグ配列	作製
hAhR_144	27-436, N44G	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_145	27-436, S68C	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_146	27-436, S73A	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_147	27-436, S75A	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_148	27-436, Q173R	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_149	27-436, I221T	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_150	27-436, Q240E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_151	27-436, Q273P	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_152	27-436, Y310W	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_153	27-436, S336C	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_155	27-436, R40K	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_156	27-436, R42E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_157	27-436, L43V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_158	27-436, E46A	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_159	27-436, L48V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_160	27-436, R49E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_161	27-436, L50V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_162	27-436, L53V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_163	27-436, L54V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_164	27-436, P55A	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_165	27-436, F56Y	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_166	27-436, Q58P	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_167	27-436, V60I	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_168	27-436, L64V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_169	27-436, D65E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_170	27-436, K66E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_171	27-436, L67V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_172	27-436, L70V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_173	27-436, R71L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_174	27-436, L72V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_175	27-436, V74A	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_176	27-436, Y76F	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_177	27-436, L77V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_178	27-436, R78L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_179	27-436, A79V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_180	27-436, K80R	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_181	27-436, S81A	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_182	27-436, F82L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×

hAhR_183	27-436, F83L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_184	27-436, D84Q	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_185	27-436, V85A	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_186	27-436, A86V	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_187	27-436, S89Q	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_188	27-436, E114Q	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_189	27-436, G115A	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_190	27-436, E116R	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_191	27-436, F117L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_192	27-436, L118V	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_193	27-436, L119V	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_194	27-436, Q120E	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_195	27-436, A121T	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_196	27-436, L122V	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_197	27-436, N123L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_198	27-436, V126A	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_199	27-436, L127V	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_200	27-436, V128A	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_201	27-436, F136L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_202	27-436, Y137L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_203	27-436, Q149H	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_204	27-436, Q150L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_205	27-436, S151V	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_206	27-436, D152L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_207	27-436, I154M	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_208	27-436, H155L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_209	27-436, Q156E	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_210	27-436, R172L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_211	27-436, H175L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_212	27-436, W176F	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_213	27-436, A177V	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_214	27-436, L178M	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_215	27-436, N179D	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_216	27-436, E211Q	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_217	27-436, N212Y	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_218	27-436, P214A	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_219	27-436, L215F	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_220	27-436, E217T	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_221	27-436, R218L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_222	27-436, C219S	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_223	27-436, N238Q	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_224	27-436, G241A	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_225	27-436, K242R	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_226	27-436, K244R	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_227	27-436, Y245F	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_228	27-436, L246V	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_229	27-436, H247F	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_230	27-436, G248A	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_231	27-436, Q249D	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_232	27-436, K250N	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_233	27-436, K251R	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_234	27-436, K252R	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_235	27-436, G253A	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_236	27-436, F266L	pEF-BOS/C 未 リンカー-EGFP-Flag-His	○



hAhR_237	27-436, A267C	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_238	27-436, I268V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○

×印は PCR 反応で目的の DNA が増幅されなかった, 大腸菌 DH5  $\alpha$  株へのトランスフォーメーションでコロニーが得られなかった, などの理由により発現ベクターを作製できなかったものを示す。

表 9 熱安定化変異を 1 残基導入した ARNT の発現ベクター

名前	残基番号	ベクター/タグ配列	作製
hARNT_115	82-474, A123G	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_116	82-474, I264V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_117	82-474, E370D	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_118	82-474, I372K	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_119	82-474, H378Q	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_120	82-474, L407H	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_121	82-474, Q413K	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_122	82-474, F427Y	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_123	82-474, L437V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_124	82-474, S443A	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_126	82-474, R101K	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_127	82-474, K104L	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_128	82-474, M105L	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_129	82-474, Y108F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_130	82-474, I109L	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_131	82-474, T110S	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_132	82-474, E111D	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_133	82-474, L112V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_134	82-474, D114L	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_135	82-474, M115L	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_136	82-474, V116T	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_137	82-474, P117D	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_138	82-474, S120E	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_139	82-474, D127L	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_140	82-474, K128E	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_141	82-474, L129V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_142	82-474, L132V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_143	82-474, R133A	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_144	82-474, A135V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_145	82-474, V136A	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_146	82-474, H138F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_147	82-474, M139L	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_148	82-474, K140A	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_149	82-474, L142V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_150	82-474, R143A	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_151	82-474, F158V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_152	82-474, L159V	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_153	82-474, T160S	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_154	82-474, D161N	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_155	82-474, E163F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○

hARNT_156	82-474, L164V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_157	82-474, K165L	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_158	82-474, H166F	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_159	82-474, L167V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_160	82-474, I168V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_161	82-474, L169V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_162	82-474, E170K	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_163	82-474, A171G	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_164	82-474, A172V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_165	82-474, D173E	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_166	82-474, L176V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_167	82-474, I178V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_168	82-474, Y188R	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_169	82-474, S192A	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_170	82-474, R260A	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_171	82-474, T309S	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_172	82-474, G310A	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_173	82-474, Y311H	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_174	82-474, K313N	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_175	82-474, V338A	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_176	82-474, A339G	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_177	82-474, I340V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_178	82-474, R342F	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_179	82-474, Q344S	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_180	82-474, V345L	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_181	82-474, T346S	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_182	82-474, P360V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_183	82-474, E362L	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_184	82-474, I364L	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_185	82-474, R366L	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_186	82-474, F375Y	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_187	82-474, D377A	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_188	82-474, R379L	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_189	82-474, G420A	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_190	82-474, Q421N	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_191	82-474, V422I	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_192	82-474, S442A	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	×
hARNT_193	82-474, F444L	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_194	82-474, F446L	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_195	82-474, E455R	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_196	82-474, Y456I	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_197	82-474, I458V	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_198	82-474, T460A	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_199	82-474, T462S	pEF-BOS/N 未 His-Flag-プレジジョン認識配列	○

×印は PCR 反応で目的の DNA が増幅されなかった, 大腸菌 DH5  $\alpha$  株へのトランスフォーメーションでコロニーが得られなかった, などの理由により発現ベクターを作製できなかったものを示す。

### 2-5-2-3. タンパク質の発現と熱安定性の評価

前号で作製した変異体について 2-5-1-2 号と同様の方法で目的タンパク質を発現させ、2-5-1-3 号と同様の方法で熱安定性を評価した(結果は 3-4-3 項)。発現においては、変異体 AhR のプラスミド 1.8 µg と野生型 ARNT (hARNT\_114)のプラスミド 0.6 µg, または野生型 AhR (hAhR\_142)のプラスミド 1.8 µg と変異体 ARNT のプラスミド 0.6 µg を組み合わせてトランスフェクションすることで 1 残基変異が導入された AhR/ARNT を発現させた。また、3-4-1 項の結果からトランスフェクション時に 37°C で数か月間インキュベートした L-kynurenine を最終濃度 10 µM で培地に添加した。また、3-4-2 項の結果から加熱は 50°C で 10 分間行った。

### 2-5-3. 2 残基変異によるスクリーニング

#### 2-5-3-1. 発現ベクターの構築

3-4-3 項で見つかった熱安定化変異について、複数の変異を組み合わせることでさらに安定化されるかどうか、また悪影響を及ぼさないかどうかを検討するため、2 残基変異を組み合わせ導入した変異体を作製した(表 10, 表 11)。ただし、AhR に E217T の変異(69%)を導入すべきところを誤って N238Q の変異(64%)を導入してしまった。2-5-2-2 号で作製した 1 残基変異体の発現ベクターを鋳型として、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase を用いた PCR 反応を行うことで 2 残基変異体の発現ベクターを作製した。

表 10 熱安定化変異を 2 残基導入した AhR の発現ベクター

名前	残基番号	ベクター/タグ配列	作製
hAhR_239	27-436, R42E, S75A	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_240	27-436, R42E, A79V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_241	27-436, R42E, D84Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_242	27-436, R42E, A86V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_243	27-436, R42E, E116R	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_244	27-436, R42E, F117L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_245	27-436, R42E, Y137L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_246	27-436, R42E, Q149H	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_247	27-436, R42E, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_248	27-436, R42E, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_249	27-436, R42E, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_250	27-436, S75A, A79V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_251	27-436, S75A, D84Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_252	27-436, S75A, A86V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_253	27-436, S75A, E116R	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_254	27-436, S75A, F117L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_255	27-436, S75A, Y137L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_256	27-436, S75A, Q149H	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_257	27-436, S75A, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_258	27-436, S75A, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_259	27-436, S75A, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_260	27-436, A79V, D84Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_261	27-436, A79V, A86V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_262	27-436, A79V, E116R	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_263	27-436, A79V, F117L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_264	27-436, A79V, Y137L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_265	27-436, A79V, Q149H	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_266	27-436, A79V, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_267	27-436, A79V, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_268	27-436, A79V, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_269	27-436, D84Q, A86V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_270	27-436, D84Q, E116R	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_271	27-436, D84Q, F117L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_272	27-436, D84Q, Y137L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_273	27-436, D84Q, Q149H	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_274	27-436, D84Q, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_275	27-436, D84Q, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_276	27-436, D84Q, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_277	27-436, A86V, E116R	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_278	27-436, A86V, F117L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_279	27-436, A86V, Y137L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_280	27-436, A86V, Q149H	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_281	27-436, A86V, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_282	27-436, A86V, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_283	27-436, A86V, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_284	27-436, E116R, F117L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_285	27-436, E116R, Y137L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_286	27-436, E116R, Q149H	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_287	27-436, E116R, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_288	27-436, E116R, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_289	27-436, E116R, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○

hAhR_290	27-436, F117L, Y137L	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_291	27-436, F117L, Q149H	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_292	27-436, F117L, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_293	27-436, F117L, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_294	27-436, F117L, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_295	27-436, Y137L, Q149H	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_296	27-436, Y137L, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_297	27-436, Y137L, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_298	27-436, Y137L, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_299	27-436, Q149H, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_300	27-436, Q149H, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_301	27-436, Q149H, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_302	27-436, S151V, Q156E	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	×
hAhR_303	27-436, S151V, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○
hAhR_304	27-436, Q156E, N238Q	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His	○

×印は PCR 反応で目的の DNA が増幅されなかった, 大腸菌 DH5  $\alpha$  株へのトランスフォーメーションでコロニーが得られなかった, などの理由により発現ベクターを作製できなかったものを示す。

表 11 熱安定化変異を 2 残基導入した ARNT の発現ベクター

名前	残基番号	ベクター/タグ配列	作製
hARNT_200	82-474, M115L, K128E	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_201	82-474, M115L, H166F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_202	82-474, M115L, R342F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_203	82-474, K128E, H166F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_204	82-474, K128E, R342F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○
hARNT_205	82-474, H166F, R342F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列	○

### 2-5-3-2. タンパク質の発現と熱安定性の評価

前号で作製した変異体について 2-5-2-3 号と同様の方法で発現, 熱安定性の評価を行った (結果は 3-4-4 項)。発現においては, 2 残基変異体 AhR と野生型 ARNT, または野生型 AhR と 2 残基変異体 ARNT を組み合わせてトランスフェクションすることで 2 残基変異が導入された AhR/ARNT を発現させた。

#### 2-5-4. 昆虫細胞 Sf9 を用いた熱安定化変異体 AhR/ARNT の調製

3-4-4 項の結果から変異の組み合わせによる悪影響はなく、さらなる安定化が見られたと判断し、熱安定化変異を複数導入した AhR/ARNT を、昆虫細胞 Sf9 を用いて調製した。AhR については見つかった 12 の熱安定化変異を全て導入したものと、その中で特に熱安定性を向上させた 4 つの変異を導入したものを作製し、ARNT については見つかった 4 つの熱安定化変異を全て導入したものを作製した。

##### 2-5-4-1. 発現ベクターの構築

まず、2-5-3-1 号で作製した 2 残基変異体を鋳型として、PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase を用いた PCR 反応を繰り返し行うことで 4 残基変異体の発現ベクター(pEF-BOS)を作製した(表 12)。また、12 残基変異を導入した AhR については GENEWIZ 社に依頼し、昆虫細胞 Sf9 用にコドン最適化した遺伝子を合成した。これらの 4 残基変異体または 12 残基変異体の遺伝子を含むプラスミドを鋳型として、KOD FX Neo によって PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動を行った後、Wizard<sup>®</sup> SV Minicolumns を用いて精製することで目的遺伝子断片を得た。pFastBac Dual 変異ベクター#3 について、2-4-1 項と同じ方法で線状化ベクターを得た。これらの目的遺伝子断片と線状化ベクターを用いて、4 残基変異体については Ligation high Ver.2 によって、12 残基変異体については T5 Exonuclease (New England Biolabs)、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)によって連結することで Sf9 発現用ベクターを作製した(表 13)。

表 12 熱安定化変異を 4 残基導入した AhR, ARNT の発現ベクター

名前	残基番号	ベクター/タグ配列
hAhR_306	27-436, S75A, A79V, F117L, S151V	pEF-BOS/C 末 リンカー-EGFP-Flag-His
hARNT_207	82-474, M115L, K128E, H166F, R342F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列

表 13 昆虫細胞 Sf9 発現用の熱安定化変異体 hAhR, hARNT の発現ベクター

名前	残基番号	改変ベクター/タグ配列
hAhR_314	27-436, S75A, A79V, F117L, S151V	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
hAhR_315	27-436, R42E, S75A, A79V, D84Q, A86V, E116R, F117L, Y137L, Q149H, S151V, Q156E, N238Q	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
hARNT_212	82-474, M115L, K128E, H166F, R342F	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列

#### 2-5-4-2. タンパク質の発現と精製

前号で作製したコンストラクトについて hAhR\_314/hARNT\_212, hAhR\_315/hARNT\_212 の組み合わせで大量培養, 精製を行った(方法は 2-2-2 項と同様の手順で行った)。hAhR\_315/hARNT\_212 の精製においてはゲル濾過クロマトグラフィーによる精製に Superdex 200 prep grade (24 mL)カラムを用いた。また, 最終精製試料のバッファー組成は (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 10 mM L-Histidine, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA))とした(3-6-4 項参照)。精製試料の純度を 2-2-2 項と同様に SDS-PAGE とゲル濾過クロマトグラフィーで確認した(結果は 3-4-5 項)。

#### 2-5-4-3. 熱安定性の評価

2-2-2 項で得られた野生型 AhR/ARNT と前号で得られた熱安定化変異体 AhR/ARNT の精製試料を用いて熱安定性を評価した。精製試料を(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 2 mM L-Histidine, 2 mM EDTA)のバッファーにタンパク質濃度が 1 mg/mL となるように調製した。加熱なし, または 55°Cで 10 分間加熱したものを Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライしてゲル濾過クロマトグラフィーで分析した。加熱前後でピークの強度を比較し, 熱安定性を評価した(結果は 3-4-6 項)。



## 2-6. 結晶化シャペロン NZ-1 との複合体

モノクローナル抗体は結晶化を促進する結晶化シャペロンとして頻繁に用いられている。本研究では AhR/ARNT に特異的な抗体ではなく、PA タグシステムを利用した。PA タグシステムは human podoplanin 中に存在する 12 残基のペプチド(GVAMPGAEDDVV)と rat 由来のモノクローナル抗体 NZ-1 の抗原抗体反応を利用しており、高い特異性と親和性を持つ[58,59]。さらに PA ペプチド自身が  $\beta$  ターン構造を形成するという特徴から任意のタンパク質の  $\beta$  ターンまたはループ領域に挿入可能であるという利点がある[60]。さらに、結晶化には Fab または Fv-clasp と呼ばれるフラグメント抗体を利用した。これまで、結晶化には全長の抗体ではなく Fc 領域を除いた Fab フラグメントや、重鎖と軽鎖の可変領域(fragment variable; Fv)をリンカー配列でつないだ single chain Fv (scFv)が用いられてきた。しかし、これらのフラグメント抗体はそれ自身が構造の柔軟性を持っており、理想的な結晶化シャペロンではなかった。本研究では Fab に加えて、Fv-clasp を結晶化に用いた。Fv-clasp は抗体の可変領域と human Mst1 kinase 由来二量体化モチーフ(SARAH ドメイン)の融合タンパク質である[61]。従来のフラグメント抗体に比べて構造の柔軟性が少なく、結晶性がよいという特徴がある。これらの特徴を利用し、AhR, ARNT の  $\beta$  ターンまたはループ領域に PA ペプチドを挿入し、NZ-1 Fab または Fv-clasp との複合体での結晶化を目指した。これらの実験を行うにあたって、大阪大学蛋白質研究所の高木淳一教授から NZ-1 固定化セファロースレジン、NZ-1 Fab、NZ-1 Fv-clasp、NZ-1 Fv-clasp の発現ベクター(#4999; NZ-1 の重鎖の可変領域  $V_H$  と SARAH の融合タンパク質、#5001; NZ-1 の軽鎖の可変領域  $V_L$  と SARAH の融合タンパク質) (2-6-1-1 号参照)、Fv-clasp のリフォールディング時に用いる PA ペプチドを供与していただいた。

## 2-6-1. NZ-1 Fv-clasp の調製

### 2-6-1-1. 既存の方法による NZ-1 Fv-clasp の調製

複合体での結晶化に向けて、NZ-1 Fv-clasp を調製した。NZ-1 Fv-clasp の発現ベクターは大腸菌発現ベクター-pET-11c の T7 タグが His タグ-TEV 認識配列-NZ-1 可変領域-SARAH に置換されている(表 14)。また、#4999 の NZ-1 には S112C, #5001 の SARAH には S37C の変異が導入されている[61]。高木教授の研究室で確立された以下の方法に従って NZ-1 Fv-clasp を調製した。

発現ベクター#4999 と#5001 をそれぞれ大腸菌 BL21(DE3)にトランスフォーメーションした。アンピシリンナトリウム(ナカライテスク)を最終濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した LB 培地, Miller (ナカライテスク)を用いて、37°Cで#4999 は 2 L, #5001 は 1 L 培養した。OD<sub>600</sub> = 0.6~1.1 となった時点で最終濃度 0.4 mM となるように isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (ナカライテスク)を添加した。37°Cで 4 時間培養し、目的タンパク質を発現させた。培養液を 8,500 rpm で 4 分遠心することで菌体を回収し、(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, Protease Inhibitor Cocktail (EDTA free) (ナカライテスク))のバッファーを用いて#4999, #5001 それぞれ 30 mL, 20 mL で懸濁し超音波破碎した。続いて、菌体破碎液を 20,000 rpm で 20 分遠心した。沈殿画分に(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 6 M Guanidine hydrochloride, 375  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol)のバッファーを#4999, #5001 それぞれ 8 mL, 4 mL 加えて 37°Cで 3 時間インキュベートすることで封入体に発現したタンパク質を可溶化した。続いて、可溶化液を 20,000 rpm で 20 分遠心し、#4999, #5001 それぞれの上清を混合した。(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 4 M Urea, 400 mM L-Arginine Hydrochloride, 375  $\mu\text{M}$  Oxidized glutathione (GSSG))のバッファー288 mL に 80 mg の PA ペプチドを溶解し、上記の混合溶液を攪拌しながら加えた。4°Cで 4 時間インキュベートした後、さらに(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 400 mM L-Arginine Hydrochloride, 375  $\mu\text{M}$  GSSG)のバッファー300 mL を攪拌しながら添加した。

4°Cで13時間インキュベートした後、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を80%飽和になるように加え(336.6 g)、攪拌しながら4°Cで3時間インキュベートすることでタンパク質を沈殿させた。12,000×gで1時間遠心することで沈殿を回収し、(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 M Urea, 400 mM L-Arginine Hydrochloride)のバッファー20 mLで懸濁した後、分画分子量14,000の透析膜(三光純薬)を用いて、(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl)のバッファーで透析した。透析後の溶液を25,000×gで20分遠心し、上清を回収した。Amicon Ultra - 15 (Ultracel - 30K) (Merck)を用いた限外濾過により濃縮した後、HiLoad 26/600 Superdex 200 pgを用いてゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。ゲル濾過バッファーには(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl)を用いた。リフォールディングの際に結合させたPAペプチドを除去するため、Amicon Ultra - 15 (Ultracel - 30K)による濃縮と(20 mM MES-NaOH pH 6.0, 3 M MgCl<sub>2</sub>)のバッファーによる希釈を繰り返した。さらに、濃縮と(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)のバッファーによる希釈を繰り返すことでバッファー置換を行った。続いて、TEVプロテアーゼを1/50 (w/w)量添加して20°Cで12時間インキュベートしタグを切断した。タグを切断後、HiTrap Q HP (1 mL) (GE Healthcare)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。タグ切断後の溶液を(20 mM Tris-HCl pH 7.5)のバッファーで3倍希釈し、HiTrap Q HP (1 mL)に吸着させた。(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl)及び(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl)のバッファーを用いてNaClの濃度勾配によってタンパク質を溶出させた。Amicon Ultra - 4 (Ultracel - 30K) (Merck)を用いた限外濾過により濃縮してNZ-1 Fv-claspを調製した。精製試料の純度をSDS-PAGEで確認した(結果は3-5-1項)。

表 14 NZ-1 Fv-clasp の発現ベクター

名前	タンパク質	ベクター/タグ配列
#4999	rat NZ-1 V <sub>H</sub> (S112C)-human Mst1 kinase SARAH	pET-11c/N 末 His-TEV 認識配列
#5001	rat NZ-1 V <sub>L</sub> -human Mst1 kinase SARAH (S37C)	pET-11c/N 末 His-TEV 認識配列

#### 2-6-1-2. リフォールディング条件の検討

既存の NZ-1 Fv-clasp 調製方法では収量が少ない(3-5-1 項参照), リフォールディングに大量の PA ペプチドを必要とする(前号参照)などの問題があったため, 調製方法を検討した。まず, リフォールディングの条件を検討した。前号と同様に#4999 及び#5001 を発現させ, 可溶化後の上清を混合した。混合溶液 5  $\mu$ L を以下の 15 種類のバッファー(図 14)または既存のリフォールディングバッファーと同様のバッファー(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 M Urea, 400 mM L-Arginine Hydrochloride, 375  $\mu$ M GSSG, 0.13 mg PA ペプチド) 95  $\mu$ L に添加し, 20°C で 1 日間, 4°C で 2 日間インキュベートした。12,000 rpm で 5 分遠心し, 上清を Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで分析した。バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。タンパク質の検出には LaChrom Elite L-2485 Fluorescence Detector (Hitachi)を用い, 励起波長: 280 nm, 蛍光波長: 335 nm でトリプトファンの蛍光を検出した。同様に前号で得られた NZ-1 Fv-clasp を 5  $\mu$ g アプライし, ゲル濾過プロファイルを比較した(結果は 3-5-2 項)。

15 種類のバッファーのうち, NZ-1 Fv-clasp に相当する明瞭なピークが観測された 3 種類のバッファー(2, 9, 10)についてスケールアップしてさらに検討した。可溶化後の混合溶液 1 mL をリフォールディングバッファー19 mL に添加し, 20°C で 17 時間インキュベートした。また, 比較対照として可溶化後の混合溶液 1 mL を用いて既存の方法に従ってリフォールディングを行った。前号と同様に(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> によってタンパク質を沈殿させ, (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)のバッファーで懸濁した。この際, バッファー10 を用いた試料は遠心によって沈殿を回収できなかった。懸濁液を 15,000 rpm で 5 分遠心し, 上清を濃縮後, Superdex 200 prep grade (24 mL)カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行った。溶出した試料を SDS-PAGE で確認した。既存のリフォールディングバッファーとバッファー2 を用いた試料について, NZ-1 Fv-clasp のフラクションを回収し, 濃縮後, 収量を比較した(結果は 3-5-2 項)。

バッファー2 において既存のリフォールディングバッファーと同等の収量が得られたことから、バッファー2 について、ペプチドの有無やリフォールディング時の温度、希釈の倍率によって収量が変わるかどうかをさらに検討した(表 15)。可溶化後の混合溶液 800  $\mu$ L を用いて、上記と同様の方法で得られた NZ-1 Fv-clasp の収量を比較した(結果は 3-5-2 項)。

バッ ファー	MES- NaOH pH 6.0 (mM)	Tris-HCl pH 8.0 (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	EDTA (mM)	Guanidine Hydrochloride (M)	Triton X-100 (%)	Sucrose (M)	L- Arginine (M)	PAペプ チド (mg/mL)	GSH (mM)	GSSG (mM)
1	50	-	9.6	0.4	2	2	-	0.75	0.5	-	-	-	-	-
2	50	-	9.6	0.4	2	2	-	-	-	-	0.5	0.13	1	0.1
3	50	-	9.6	0.4	-	-	1	0.75	0.5	0.4	-	0.13	-	-
4	50	-	240	10	2	2	-	-	0.5	-	0.5	-	1	0.1
5	50	-	240	10	-	-	1	0.75	-	0.4	-	-	-	-
6	50	-	240	10	-	-	1	-	0.5	0.4	0.5	0.13	1	0.1
7	50	-	240	10	2	2	-	0.75	-	-	-	0.13	-	-
8	-	50	9.6	0.4	2	2	-	-	0.5	0.4	-	0.13	1	0.1
9	-	50	9.6	0.4	-	-	1	0.75	-	-	0.5	0.13	-	-
10	-	50	9.6	0.4	2	2	-	0.75	-	0.4	0.5	-	1	0.1
11	-	50	9.6	0.4	-	-	1	-	0.5	-	-	-	-	-
12	-	50	240	10	-	-	1	-	-	-	-	0.13	1	0.1
13	-	50	240	10	-	-	1	0.75	0.5	-	0.5	-	-	-
14	-	50	240	10	2	2	-	0.75	0.5	0.4	0.5	0.13	1	0.1
15	-	50	240	10	2	2	-	-	-	0.4	-	-	-	-

図 14 リフォールディング条件の検討に用いたバッファー

表 15 リフォールディングバッファー2 のさらなる検討

条件	PA ペプチド	温度	希釈の倍率
1	0.131 mg/mL	20°C	20 倍
2	0.013 mg/mL	20°C	20 倍
3	-	20°C	20 倍
4	0.013 mg/mL	4°C	20 倍
5	-	4°C	20 倍
6	0.013 mg/mL	20°C	100 倍
7	-	20°C	100 倍
8	-	4°C	100 倍

### 2-6-1-3. 発現コンストラクトの検討

リフォールディング効率の上昇を目的として、NZ-1 Fv-clasp 発現ベクター#4999, #5001 の His タグ-TEV 認識配列を除いた発現ベクターを作製した(表 16)。それらの発現ベクターを用いて、2-6-1-1 号と同様の方法でタンパク質を発現させ、菌体を SDS-PAGE することでタグの有無で発現量を比較した(結果は 3-5-3 項)。

表 16 タグ配列を除いた NZ-1 Fv-clasp の発現ベクター

名前	タンパク質	ベクター/タグ配列
Fv_3	rat NZ-1 V <sub>H</sub> (S112C)-human Mst1 kinase SARAH	pET-11c/なし
Fv_4	rat NZ-1 V <sub>L</sub> -human Mst1 kinase SARAH (S37C)	pET-11c/なし

### 2-6-1-4. NZ-1 Fv-clasp の新規調製方法の確立

2-6-1-2 号及び前号の検討を踏まえて、PA ペプチドを使用せずに、高い収量で NZ-1 Fv-clasp を調製する方法を確立した。以下にその方法を示す。

発現ベクター Fv\_3 と #5001 をそれぞれ大腸菌 BL21(DE3) にトランスフォーメーションした。アンピシリンナトリウムを最終濃度 100 µg/mL となるように添加した TB 培地を用いて 37°C で培養した。OD<sub>600</sub> = 0.6~0.9 となった時点で最終濃度 0.4 mM となるように IPTG を添加した。37°C で 6 時間培養し、目的タンパク質を発現させた。培養液を 8,500 rpm で 4 分遠心することで菌体を回収し、(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) のバッファーで懸濁し超音波破碎した。続いて、菌体破碎液を 20,000 rpm で 20 分遠心した。沈殿画分に (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 6 M Guanidine hydrochloride, 375 µM 2-mercaptoethanol) のバッファーを加えて 37°C で 1 時間インキュベートすることでタンパク質を可溶化した。続いて、可溶化液を 20,000 rpm で 20 分遠心し、上清を回収した。得られた上清を SDS-PAGE することでそれぞれのタンパク質量を比較し、量比がおよそ 1 : 1

となるように混合した。混合溶液を(50 mM MES, 9.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 500 mM L-Arginine, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSG, pH 10.3)のバッファーに攪拌しながら添加し, 20 倍希釈した。4°Cで 20 時間インキュベートした後, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を 52% 飽和になるように加え, 攪拌しながら室温で 45 分インキュベートすることでタンパク質を沈殿させた。9,000 rpm で 30 分遠心することで沈殿を回収し, (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)のバッファーで懸濁した後, 分画分子量 14,000 の透析膜を用いて, (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)のバッファーで透析した。透析後の溶液を 12,000 rpm で 5 分遠心し, 上清を回収した。Amicon Ultra - 15 (Ultracel - 30K)を用いた限外濾過により濃縮した後, HiLoad 26/600 Superdex 200 pg を用いてゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)を用いた。NZ-1 Fv-clasp のフラクションを回収し, 濃縮後, TEV プロテアーゼを 1/100 (w/w)量添加して 20°Cで 20 時間インキュベートしタグを切断した。タグを切断後, HiTrap Q HP (1 mL)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。タグ切断後の溶液を(10 mM Tris-HCl pH 7.5)のバッファーで 3 倍希釈し, HiTrap Q HP (1 mL)に吸着させた。(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl)及び(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl)のバッファーを用いて NaCl の濃度勾配によってタンパク質を溶出させた。Amicon Ultra - 4 (Ultracel - 30K)を用いた限外濾過により濃縮して NZ-1 Fv-clasp を調製した。精製試料の純度を SDS-PAGE で確認した(結果は 3-5-4 項)。

## 2-6-2. HEK293 細胞を用いた PA ペプチド挿入位置のスクリーニング

PA ペプチドが $\beta$ ターン構造を形成するという特徴から AhR, ARNT の $\beta$ ターンまたはループ領域に PA ペプチドを挿入した[60]。ペプチドを挿入する位置は AhR/ARNT/DNA (bHLH-PAS-A 領域) [48] (PDB ID : 5NJ8)や HIF-2 $\alpha$ /ARNT (bHLH-PAS-A-PAS-B 領域) [45] (PDB ID : 4ZP4)の結晶構造を参考に決定した。ペプチドを挿入する際、ループの先端にそのまま挿入、ループを欠損させて挿入、ループを伸ばして挿入など、1つの挿入位置について2または3種類コンストラクトを作製して発現量, NZ-1 との結合能が良好なものをスクリーニングした。この際、スクリーニングに要する時間を短縮するために Sf9 ではなく HEK293 細胞を用いた。

### 2-6-2-1. 発現ベクターの構築

発現ベクターには動物細胞用発現ベクター pEF-BOS を用いた。また, hAhR 全長(残基番号 1-848), hARNT 全長(残基番号 1-789)のコドン最適化していない遺伝子を含むプラスミドを, 理化学研究所 BRC 遺伝子材料開発室から購入し, 今回の実験に用いた[62-65]。まず, hAhR, hARNT の全長の遺伝子を 2-5-1-1 号と同様の方法で pEF-BOS に組み込んだ(hAhR\_324, hARNT\_228) (表 17)。これらの発現ベクターにおいて, C 末端に Flag-His タグが付加されるようにした。さらに, hAhR\_324 を鋳型とし, KOD Plus Neo (Toyobo)によって表 18 のプライマーを用いて PCR で増幅することで, 5', 3'両末端に PA ペプチド配列を半分ずつ付加した線状化ベクターを得た。DpnI (TaKaRa)によって大腸菌由来の鋳型プラスミドを除去した後, Ligation high Ver.2 と T4 Polynucleotide Kinase (TaKaRa)によって両末端を連結することで N 末端に PA ペプチドを付加した発現ベクター(hAhR\_331)を作製した。次に, hAhR\_331, hARNT\_228 を鋳型として AhR, ARNT それぞれ野生型の遺伝子を 2-5-1-1 号と同様の方法で C 末端に Flag-His タグが付加されるように pEF-BOS に組み込んだ(hAhR\_332, hARNT\_236)。AhR については N 末端に PA ペプチド, C 末端に



Flag-His タグが付加されるように pEF-BOS に組み込んだものも作製した(hAhR\_333)。さらに, hARNT\_236 を鋳型として, hAhR\_331 と同様に PCR を行い, ARNT の N 末端に PA ペプチドを付加した発現ベクターを作製した(hARNT\_237)。

PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の発現ベクターは hAhR\_332 及び hARNT\_236 を鋳型として, hAhR\_331 と同様に PCR を行い, PA ペプチド配列を付加した両末端を連結することで作製した(表 17)。

表 17 HEK293 細胞発現用の PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の発現ベクター

名前	残基番号	ベクター/タグ配列	作製	挿入位置
hAhR_324	1-848	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	
hAhR_331	1-848	pEF-BOS/N 末 PA, C 末 Flag-His	○	
hAhR_332	27-436	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	
hAhR_333	27-436	pEF-BOS/N 末 PA, C 末 Flag-His	○	
hAhR_341	27-436, 98-PA-99	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	①_1
hAhR_342	27-436, 93-PA-104	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	①_2
hAhR_343	27-436, 88-PA-109	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	①_3
hAhR_344	27-436, 131-5aa-PA-5aa-132	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	②_1
hAhR_345	27-436, 131-PA-132	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	②_2
hAhR_346	27-436, 185-PA-207	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	③_1
hAhR_347	27-436, 180-PA-212	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	③_2
hAhR_348	27-436, 175-PA-217	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	③_3
hAhR_349	27-436, 229-5aa-PA-5aa-230	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	④_1
hAhR_350	27-436, 229-PA-230	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	④_2
hAhR_351	27-436, 225-PA-235	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	④_3
hAhR_352	27-436, 255-PA-256	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑤_1
hAhR_353	27-436, 251-PA-259	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑤_2
hAhR_354	27-436, 247-PA-262	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑤_3
hARNT_228	1-789	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	
hARNT_236	82-474	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	
hARNT_237	82-474	pEF-BOS/N 末 PA, C 末 Flag-His	○	
hARNT_238	82-474, 151-PA-152	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	①_1
hARNT_239	82-474, 143-PA-157	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	①_2
hARNT_240	82-474, 183-5aa-PA-5aa-184	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	②_1
hARNT_241	82-474, 183-PA-184	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	②_2
hARNT_242	82-474, 180-PA-186	pEF-BOS/C 末 Flag-His	×	②_3
hARNT_243	82-474, 243-PA-244	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	③_1
hARNT_244	82-474, 232-PA-255	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	③_2
hARNT_245	82-474, 227-PA-260	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	③_3
hARNT_246	82-474, 277-PA-294	pEF-BOS/C 末 Flag-His	×	④_1
hARNT_247	82-474, 272-PA-299	pEF-BOS/C 末 Flag-His	×	④_2
hARNT_248	82-474, 267-PA-304	pEF-BOS/C 末 Flag-His	×	④_3
hARNT_249	82-474, 324-PA-325	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑤_1

hARNT_250	82-474, 319-PA-330	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑤_2
hARNT_251	82-474, 314-PA-335	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑤_3
hARNT_252	82-474, 369-5aa-PA-5aa-370	pEF-BOS/C 末 Flag-His	×	⑥_1
hARNT_253	82-474, 369-PA-370	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑥_2
hARNT_254	82-474, 402-5aa-PA-5aa-403	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑦_1
hARNT_255	82-474, 400-PA-404	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑦_2
hARNT_256	82-474, 420-3aa-PA-4aa-421	pEF-BOS/C 末 Flag-His	×	⑧_1
hARNT_257	82-474, 418-PA-422	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑧_2
hARNT_258	82-474, 433-5aa-PA-5aa-434	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑨_1
hARNT_259	82-474, 430-PA-436	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑨_2
hARNT_260	82-474, 450-5aa-PA-5aa-451	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑩_1
hARNT_261	82-474, 450-PA-451	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑩_2
hARNT_262	82-474, 447-PA-454	pEF-BOS/C 末 Flag-His	○	⑩_3

×印は PCR 反応で目的の DNA が増幅されなかった, 大腸菌 DH5  $\alpha$  株へのトランスフォーメーションでコロニーが得られなかった, などの理由により発現ベクターを作製できなかったものを示す。

表 18 hAhR\_331 の発現ベクター作製に用いたプライマー

forward	5'- <b>CGAAGATGATGTGGTGGGATCCATGAACAGCAGCAGC</b> -3'
reverse	5'- <b>GCACCTGGCATGGCAACGCCATTTCGAGGTTCGAGGGAT</b> -3'

PA ペプチド配列をコードする遺伝子を赤字で示した。

#### 2-6-2-2. タンパク質の発現と NZ-1 結合能の評価

前号で作製したコンストラクトについて PA ペプチド挿入 AhR と野生型 ARNT または野生型 AhR と PA ペプチド挿入 ARNT を組み合わせて, 2-5-1-2 号と同様の方法で HEK293 細胞によって発現させた。これらを Ni-NTA Agarose, または NZ-1 固定化セファロースレジンによって精製することで, それぞれ発現量, NZ-1 結合能を評価した。1,000 rpm で 1 分遠心することで細胞を回収し, 1 mL の破碎バッファー(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 25 mM Imidazole-HCl pH 8.0)で懸濁し超音波破碎した。続いて, 細胞破碎液を 15,000 rpm で 10 分遠心し, 上清を回収した。破碎上清を 500  $\mu$ L ずつ 2 つに分け, 片方に Ni-NTA Agarose, もう片方に NZ-1 固定化セファロースレジンをそれぞれ 20  $\mu$ L 添加して振とうしながら 4°C で 2 時間インキュベートし, 目的タンパク質をバッチ法で

吸着させた。インキュベート後、破碎バッファーで洗浄した後、Ni-NTA Agarose については(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 400 mM Imidazole-HCl pH 8.0), NZ-1 固定化セファロースレジンについては(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 25 mM Imidazole-HCl pH 8.0, 0.5 mg/mL PA ペプチド)のバッファー20  $\mu$ L でタンパク質を溶出させた。SDS-PAGE を行い、泳動後のゲルを用いて 2-5-1-2 号と同様の方法で Flag タグによるウェスタンブロッティングを行った(結果は 3-5-5 項)。ただし、TBS-T バッファーの代わりに PBS バッファー(8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)を用い、二次抗体には Rabbit Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (abcam)を PBS バッファーで 1,000 倍希釈したものをを用いた。

### 2-6-3. 昆虫細胞 Sf9 を用いた PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の調製

#### 2-6-3-1. 発現ベクターの構築

3-5-5 項で見出した、良好な発現量と NZ-1 結合能を与える PA ペプチド挿入位置について、まず 1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR, ARNT の昆虫細胞 Sf9 用の発現ベクターを構築した(表 19)。昆虫細胞用にコドンを最適化した野生型 AhR, ARNT の遺伝子を pFastBac Dual 改変ベクター#6 に組み込んだプラスミド(hAhR\_5, hARNT\_11 (2-2-1 項参照))を鋳型として、hAhR\_331 と同様の方法で発現ベクターを作製した(2-6-2-1 号参照)。または、2-6-2-1 号で作製したコドンを最適化していない PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の遺伝子を含むプラスミドを鋳型として、2-5-4-1 号と同様の方法で発現ベクターを作製した。

さらに、3-5-5 項の結果見出した NZ-1 Fv-clasp と結合能を持つ PA ペプチド挿入位置について、複数か所に PA ペプチドを挿入した AhR, ARNT のコンストラクトを作製した(表 19)。hARNT\_287~301 については hAhR\_331 と同様の方法で発現ベクターを作製した(2-6-2-1 号参照)。hAhR\_375, hARNT\_302, 303, 304\_2 については表 20 に示した鋳型プラス

ミドとプライマーを用いて、KOD One (Toyobo)または KOD Plus Neo によって PCR で増幅することでそれぞれに PA ペプチドが挿入された 2 つの遺伝子断片を得た。アガロースゲル電気泳動を行った後、Wizard® SV Minicolumns を用いて精製し、2 つの遺伝子断片を In-Fusion® HD Cloning Kit を用いて連結した。それを鋳型として PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動を行った後、Wizard® SV Minicolumns を用いて精製することで目的遺伝子断片を得た。pFastBac Dual 改変ベクター#6 について、2-4-1 項と同じ方法で線状化ベクターを得た。これらの目的遺伝子断片と線状化ベクターを用いて、T5 Exonuclease 及び Phusion High-Fidelity DNA Polymerase によって連結することで発現用ベクターを作製した。これらの発現ベクターにはすべて pFastBac Dual 改変ベクター#6 を用い、目的タンパク質の C 末端にプレシジョン認識配列-Flag-His タグが付加されている。

表 19 昆虫細胞 Sf9 発現用の PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の発現ベクター

名前	残基番号	コドン	挿入位置
hAhR_366	27-436, 98-PA-99	最適化なし	①_1
hAhR_367	27-436, 93-PA-104	最適化なし	①_2
hAhR_362	27-436, 88-PA-109	Sf9 最適化	①_3
hAhR_368	27-436, 185-PA-207	最適化なし	③_1
hAhR_369	27-436, 180-PA-212	最適化なし	③_2
hAhR_363	27-436, 175-PA-217	Sf9 最適化	③_3
hAhR_370	27-436, 229-5aa-PA-5aa-230	最適化なし	④_1
hAhR_364	27-436, 229-PA-230	Sf9 最適化	④_2
hAhR_371	27-436, 255-PA-256	最適化なし	⑤_1
hAhR_365	27-436, 251-PA-259	Sf9 最適化	⑤_2
hAhR_375	27-436, 93-PA-104, 185-PA-207	最適化なし	①_2, ③_1
hARNT_274	82-474, 151-PA-152	最適化なし	①_1
hARNT_263	82-474, 143-PA-157	Sf9 最適化	①_2
hARNT_275	82-474, 183-5aa-PA-5aa-184	最適化なし	②_1
hARNT_271	82-474, 183-PA-184	最適化なし	②_2
hARNT_276	82-474, 243-PA-244	最適化なし	③_1
hARNT_277	82-474, 232-PA-255	最適化なし	③_2
hARNT_265	82-474, 227-PA-260	Sf9 最適化	③_3
hARNT_281	82-474, 324-PA-325	最適化なし	⑤_1
hARNT_266	82-474, 319-PA-330	Sf9 最適化	⑤_2
hARNT_267	82-474, 369-PA-370	Sf9 最適化	⑥_2
hARNT_272	82-474, 402-5aa-PA-5aa-403	最適化なし	⑦_1
hARNT_269	82-474, 418-PA-422	Sf9 最適化	⑧_2
hARNT_273	82-474, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	⑨_1

hARNT_287	82-474, 151-PA-152, 232-PA-255	最適化なし	①_1, ③_2
hARNT_288	82-474, 151-PA-152, 418-PA-422	最適化なし	①_1, ⑧_2
hARNT_289	82-474, 151-PA-152, 438-PA-429	最適化なし	①_1, ⑨_1
hARNT_290	82-474, 232-PA-255, 324-PA-325	最適化なし	③_2, ⑤_1
hARNT_291	82-474, 232-PA-255, 418-PA-422	最適化なし	③_2, ⑧_2
hARNT_292	82-474, 232-PA-255, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	③_2, ⑨_1
hARNT_293	82-474, 324-PA-325, 418-PA-422	最適化なし	⑤_1, ⑧_2
hARNT_294	82-474, 324-PA-325, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	⑤_1, ⑨_1
hARNT_295	82-474, 418-PA-422, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	⑧_2, ⑨_1
hARNT_296	82-474, 151-PA-152, 232-PA-255, 418-PA-422	最適化なし	①_1, ③_2, ⑧_2
hARNT_297	82-474, 151-PA-152, 232-PA-255, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	①_1, ③_2, ⑨_1
hARNT_298	82-474, 151-PA-152, 418-PA-422, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	①_1, ⑧_2, ⑨_1
hARNT_299	82-474, 232-PA-255, 324-PA-325, 418-PA-422	最適化なし	③_2, ⑤_1, ⑧_2
hARNT_300	82-474, 232-PA-255, 324-PA-325, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	③_2, ⑤_1, ⑨_1
hARNT_301	82-474, 232-PA-255, 418-PA-422, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	③_2, ⑧_2, ⑨_1
hARNT_302	82-474, 324-PA-325, 418-PA-422, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	⑤_1, ⑧_2, ⑨_1
hARNT_303	82-474, 151-PA-152, 232-PA-255, 418-PA-422, 433-5aa-PA-5aa-434	最適化なし	①_1, ③_2, ⑧_2, ⑨_1
hARNT_304_2	82-474, 232-PA-255, 324-PA-325, 418-PA-422, 433-5aa-PA-5aa-434, P195T	最適化なし	③_2, ⑤_1, ⑧_2, ⑨_1

表 20 hAhR\_375, hARNT\_302, hARNT\_303, hARNT\_304\_2 の発現ベクター作製に用いたプラスミドとプライマー

hAhR_375	hAhR_367	forward	5'- AAGCGCGCGGAATTCGAAACCATGCCAGCTGAAGGAATC -3'
		reverse	5'- TAGATAATCCTGTAT -3'
	hAhR_368	forward	5'- ATACAAGATTATCTA -3'
		reverse	5'- CACCTCCAGACTAGTACTAGTGCCATTTTT -3'
hARNT_302	hARNT_281	forward	5'- AAGCGCGCGGAATTCGAAACCATGAGCTCTGCGGATAAA -3'
		reverse	5'- AGTGAAGATACCCTC -3'
	hARNT_295	forward	5'- GAGGGTATCTTCACT -3'
		reverse	5'- CACCTCCAGACTAGTTGTAGGCCGTGGTTC -3'
hARNT_303	hARNT_287	forward	5'- AAGCGCGCGGAATTCGAAACCATGAGCTCTGCGGATAAA -3'
		reverse	5'- AGTGAAGATACCCTC -3'
	hARNT_295	forward	5'- GAGGGTATCTTCACT -3'
		reverse	5'- CACCTCCAGACTAGTTGTAGGCCGTGGTTC -3'
hARNT_304_2	hARNT_290	forward	5'- AAGCGCGCGGAATTCGAAACCATGAGCTCTGCGGATAAA -3'
		reverse	5'- AGTGAAGATACCCTC -3'
	hARNT_295	forward	5'- GAGGGTATCTTCACT -3'
		reverse	5'- CACCTCCAGACTAGTTGTAGGCCGTGGTTC -3'

### 2-6-3-2. タンパク質の発現と精製

前号で作製した PA ペプチド挿入 AhR, ARNT または 2-2-1 項で作製した野生型 AhR, ARNT のコンストラクトについて以下の組み合わせで大量培養, 精製を行った(表 21) (方法は 2-2-2 項と同様の手順で行った)。ただし, 培養には 250 mL の培地を加えた 1 L フラスコを用いた。また, ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製には HiLoad 26/600 Superdex 200 pg または Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いた。精製試料の純度を SDS-PAGE で確認した(結果は 3-5-6 項)。

表 21 大量培養, 精製を行った PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の組み合わせ

AhR (挿入位置)	/	ARNT (挿入位置)	挿入か所合計
hAhR_367 (①_2)	/	hARNT_11 (-)	1
hAhR_362 (①_3)	/	hARNT_11 (-)	1
hAhR_368 (③_1)	/	hARNT_11 (-)	1
hAhR_363 (③_3)	/	hARNT_11 (-)	1
hAhR_364 (④_2)	/	hARNT_11 (-)	1
hAhR_365 (⑤_2)	/	hARNT_11 (-)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_274 (①_1)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_263 (①_2)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_271 (②_2)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_277 (③_2)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_265 (③_3)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_281 (⑤_1)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_266 (⑤_2)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_267 (⑥_2)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_269 (⑧_2)	1
hAhR_5 (-)	/	hARNT_273 (⑨_1)	1
hAhR_367 (①_2)	/	hARNT_269 (⑧_2)	2
hAhR_5 (-)	/	hARNT_293 (⑤_1, ⑧_2)	2
hAhR_367 (①_2)	/	hARNT_291 (③_2, ⑧_2)	3
hAhR_368 (③_1)	/	hARNT_287 (①_1, ③_2)	3
hAhR_367 (①_2)	/	hARNT_299 (③_2, ⑤_1, ⑧_2)	4
hAhR_367 (①_2)	/	hARNT_300 (③_2, ⑤_1, ⑨_1)	4
hAhR_367 (①_2)	/	hARNT_303 (①_1, ③_2, ⑧_2, ⑨_1)	5
hAhR_367 (①_2)	/	hARNT_304_2 (③_2, ⑤_1, ⑧_2, ⑨_1)	5
hAhR_368 (③_1)	/	hARNT_303 (①_1, ③_2, ⑧_2, ⑨_1)	5
hAhR_375 (①_2, ③_1)	/	hARNT_300 (③_2, ⑤_1, ⑨_1)	5
hAhR_375 (①_2, ③_1)	/	hARNT_303 (①_1, ③_2, ⑧_2, ⑨_1)	6
hAhR_375 (①_2, ③_1)	/	hARNT_304_2 (③_2, ⑤_1, ⑧_2, ⑨_1)	6

#### 2-6-3-3. 精製試料を用いた NZ-1 結合能の評価

前号で精製した PA ペプチド挿入 AhR/ARNT について、NZ-1 Fab または NZ-1 Fv-clasp との結合試験を行った。NZ-1 Fab との結合試験では PA ペプチドを 1 か所挿入した AhR/ARNT を Ni-NTA Agarose によって精製した後の試料に対して NZ-1 Fab を等モル量混合し、Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。NZ-1 Fv-clasp との結合試験では最終精製標品に対して NZ-1 Fv-clasp を PA ペプチドの挿入か所の数に応じて過剰量混合し、Superdex 200 Increase 5/150 GL または Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った(結果は 3-5-7 項)。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。

#### 2-6-3-4. スモールスケールでの発現と NZ-1 Fv-clasp 結合能の評価

3-5-7 項の結果から、1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT で NZ-1 Fv-clasp との結合が確認できなかったものが複数存在したため、それらのペプチド挿入位置について挿入位置のループを長くすることで NZ-1 Fv-clasp との結合が改善しないかどうか検討した。以下に示したコンストラクトについて、2-2-1 項または 2-6-3-1 号で作製した発現ベクターを用いて、2-2-2 項と同様の方法で P1 または P2 ウイルス液の作製を行った(表 22)。細胞濃度が  $1 \times 10^6$  個/mL の Sf9 を 10 cm ディッシュに 10 mL 加えた。発現用の培地には最終濃度 1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液、5% FBS を添加した Sf-900™ II SFM を用い、37°C でインキュベートした L-kynurenine を最終濃度 10  $\mu$ M になるように添加した。そこに AhR と ARNT のウイルス液を 3 : 1 の混合比で 800  $\mu$ L (ウイルス液)/10 mL (培養液)の割合で添加した。27°C で 60 時間インキュベートし、目的タンパク質を発現させた。3,000 rpm で 3 分遠心することで細胞を回収し、2-5-1-2 号と同様の方法でタンパク質を精製した。ただし、吸着には Ni-NTA Agarose を 100  $\mu$ L 用い、溶出バッファー 100  $\mu$ L で溶出

させた。SDS-PAGE で目的タンパク質のバンドを確認し、得られた試料に対して NZ-1 Fv-clasp を概ね等モル量混合し、Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った(結果は 3-5-8 項)。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。

表 22 スモールスケールで発現させた PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の組み合わせ

AhR (挿入位置)	/	ARNT (挿入位置)
hAhR_5 (-)	/	hARNT_11 (-)
hAhR_366 (①_1)	/	hARNT_11 (-)
hAhR_367 (①_2)	/	hARNT_11 (-)
hAhR_368 (③_1)	/	hARNT_11 (-)
hAhR_369 (③_2)	/	hARNT_11 (-)
hAhR_370 (④_1)	/	hARNT_11 (-)
hAhR_371 (⑤_1)	/	hARNT_11 (-)
hAhR_5 (-)	/	hARNT_274 (①_1)
hAhR_5 (-)	/	hARNT_275 (②_1)
hAhR_5 (-)	/	hARNT_276 (③_1)
hAhR_5 (-)	/	hARNT_277 (③_2)
hAhR_5 (-)	/	hARNT_281 (⑤_1)

#### 2-6-4. NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製

2-6-3-2 号で調製した PA ペプチド挿入 AhR/ARNT について、ゲル濾過クロマトグラフィーまたは陰イオン交換クロマトグラフィーによって NZ-1 Fv-clasp との複合体を調製した。ゲル濾過クロマトグラフィーによる調製では、それぞれ PA ペプチドの挿入か所の数に応じて過剰量の NZ-1 Fv-clasp と混合し、Superdex 200 Increase 10/300 GL にアプライした。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。

陰イオン交換クロマトグラフィーによる調製では、PA ペプチド挿入 AhR/ARNT と過剰量の NZ-1 Fv-clasp を混合した後、NaCl 濃度が 50 mM となるように(10 mM Tris-HCl pH 8.5)のバッファーで希釈し、HiTrap Q HP (1 mL)に吸着させた。(10 mM Tris-HCl pH



8.5, 50 mM NaCl)及び(10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 M NaCl)のバッファーを用いて NaCl の濃度勾配によってタンパク質を溶出させた。精製試料の純度を SDS-PAGE で確認した(結果は 3-5-9 項)。いくつかの試料については Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで溶出体積を確認した(結果は 3-5-9 項)。ゲル濾過バッファーには (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。

## 2-7. 結晶化に向けたその他の検討

### 2-7-1. 変異を組み合わせた AhR/ARNT

#### 2-7-1-1. 発現ベクターの構築

Human, bovine, monkey, rabbit, pig, rat, chicken, xenopus 由来の AhR 及び, human 由来の ARNT にループ欠損変異, 熱安定化変異を組み合わせて導入したコンストラクトを作製した(2-3 節, 2-4 節, 2-5 節参照)。また, これらのコンストラクトにおいては DNA 非結合状態でディスオーダーしていると考えられる bHLH ドメインの N 末端領域(basic region)も欠損させた。

まず, hARNT の熱安定化変異体の遺伝子を含むプラスミド(hARNT\_207/pEF-BOS) (2-5-4-1 号参照)を鋳型として PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase を用いた PCR 反応を繰り返すことによりループ欠損変異と熱安定化変異を組み合わせた発現ベクター(hARNT\_211/pEF-BOS)を作製した(表 23)。また, human 以外の種由来の AhR について basic region 及びループを欠損させ, 熱安定化変異を導入し, 昆虫細胞 Sf9 用にコドン最適化した遺伝子を, GENEWIZ 社に依頼して合成した。これらのループ欠損変異と熱安定化変異を導入した遺伝子を含むプラスミド及び hAhR の熱安定化変異を含むプラスミド(hAhR\_314, hAhR\_315)を鋳型として PCR を行い, hAhR\_315 と同様の方法で発現ベクターを作製した(表 23) (2-5-4-1 号参照)。

表 23 変異を組み合わせた AhR, ARNT の発現ベクター

名前	残基番号	改変ベクター/タグ配列
hAhR_322	39-436, S75A, A79V, F117L, S151V	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
hAhR_323	39-436, R42E, S75A, A79V, D84Q, A86V, E116R, F117L, Y137L, Q149H, S151V, Q156E, N238Q	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
bAhR_27	39-416, Δ 101-109, Δ 181-206, Δ 248-258, R42E, S75A, A79V, D84Q, A86V, E115R, F116L, Y136L, Q148H, S150V, Q155E, E216T, N237Q, R280N	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
MoAhR_7	39-417, Δ 101-110, Δ 182-207, Δ 249-259, R42E, S75A, A79V, D84Q, A86V, E116R, F117L, Y137L, Q149H, S151V, Q156E, E217T, N238Q, R281N	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
OcAhR_7	39-415, Δ 101-109, Δ 181-205, Δ 247-257, R42E, S75A, A79V, D84Q, A86V, E115R, F116L, Y136L, Q148H, S150V, Q155E, E215T, N236Q, R279N	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
pAhR_7	39-415, Δ 101-109, Δ 181-206, Δ 247-257, R42E, S75A, A79V, D84Q, S86V, E115R, F116L, Y136L, Q148H, S150V, Q155E, E215T, N236Q, R279N	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
rAhR_7	38-415, Δ 100-108, Δ 180-205, Δ 247-257, R41E, S74A, A78V, D83Q, A85V, E114R, F115L, Y135L, Q147H, S149V, Q154E, E215T, N236Q, R279N	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
cAhR_7	36-416, Δ 101-109, Δ 181-206, Δ 248-258, R39E, S72A, A76V, D81Q, A83V, E115R, Y136L, Q148H, S150V, Q154E, E216T, N237Q, R280N	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
xAhR_7	36-406, Δ 96-103, Δ 173-196, Δ 238-248, R39E, S72A, A76V, E81Q, A83V, E107R, F128L, Q140H, S142V, Q147E, E206T, N227Q, R270N	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His
hARNT_211	82-474, Δ 148-154, Δ 231-256, Δ 272-300, Δ 318-331, M115L, K128E, H166F, R342F	pEF-BOS/N 末 His-Flag-プレシジョン認識配列
hARNT_213	82-474, Δ 148-154, Δ 231-256, Δ 272-300, Δ 318-331, M115L, K128E, H166F, R342F	#3/N 末 His-Flag-プレシジョン認識配列
hARNT_217	98-464, Δ 148-154, Δ 231-256, Δ 272-300, Δ 318-331, M115L, K128E, H166F, R342F	#6/C 末 プレシジョン認識配列-Flag-His

#### 2-7-1-2. タンパク質の発現と精製

2-5-4-1 号及び前号で作製したコンストラクトについて以下の組み合わせで大量培養、精製を行った(表 24) (方法は 2-2-2 項と同様の手順で行った)。ただし、hARNT\_212 との組み合わせにおいては AhR と ARNT のウイルス液の混合比を 4 : 1 にした。また、hAhR\_322/hARNT\_217, hAhR\_323/hARNT\_217 の精製においてはゲル濾過クロマトグラフィーによる精製に Superdex 200 Increase 10/300 GL を用い、それ以外の組み合わせには Superdex 200 prep grade (24 mL)カラムを用いた。精製試料の純度を SDS-PAGE で確認し

た(結果は 3-6-1 項)。

表 24 大量培養, 精製を行った, 変異を組み合わせた AhR, ARNT の組み合わせ

AhR	/	ARNT
hAhR_322	/	hARNT_217
hAhR_323	/	hARNT_217
bAhR_27	/	hARNT_212
bAhR_27	/	hARNT_213
MoAhR_7	/	hARNT_212
MoAhR_7	/	hARNT_213
OcAhR_7	/	hARNT_212
OcAhR_7	/	hARNT_213
pAhR_7	/	hARNT_212
pAhR_7	/	hARNT_213
rAhR_7	/	hARNT_212
rAhR_7	/	hARNT_213
cAhR_7	/	hARNT_212
cAhR_7	/	hARNT_213
xAhR_7	/	hARNT_212
xAhR_7	/	hARNT_213

## 2-7-2. AhR と HIF-2 $\alpha$ のキメラコンストラクト

### 2-7-2-1. 発現ベクターの構築

AhR と既に構造解析されている HIF-2 $\alpha$  のキメラコンストラクトを用いて結晶化を試みた。具体的には human 由来の HIF-2 $\alpha$  の bHLH-PAS-A と bovine または rabbit 由来の AhR の PAS-B のキメラまたは, human, bovine, xenopus または mouse 由来の AhR の bHLH-PAS-A と human 由来の HIF-2 $\alpha$  の PAS-B のキメラを作製した。HIF-2 $\alpha$  の遺伝子は理化学研究所 BRC 遺伝子材料開発室から購入し[62-65], bHLH ドメインから PAS-B ドメインまでの領域(残基番号 3-361)を pFastBac Dual 改変ベクター#3 に組み込んだ後, 表 25 のプライマーを用いて遺伝子中に存在する EcoRI 認識部位を変異させたものを用いた。HIF-2 $\alpha$  及び各種由来の野生型 AhR の遺伝子を含むプラスミド(bAhR\_1, OcAhR\_5, hAhR\_3, xAhR\_5, mAhR\_1) (2-2-1 項, 2-4-1 項参照)を鋳型として KOD FX Neo によって PCR で増幅することで bHLH-PAS-A と PAS-B の 2 つの遺伝子断片を得た。アガロースゲル電気泳動を行った後, Wizard® SV Minicolumns を用いて精製し, 2 つの遺伝子断片を T5 Exonuclease 及び Phusion High-Fidelity DNA Polymerase を用いて連結した。それを鋳型として PCR で増幅し, アガロースゲル電気泳動を行った後, Wizard® SV Minicolumns を用いて精製した。EcoRI と SpeI によって制限酵素処理を行い, 再度 Wizard® SV Minicolumns を用いて精製することで目的遺伝子断片を得た。pFastBac Dual 改変ベクター#3 について, 2-4-1 項と同様の方法で線状化ベクターを作製し, 目的遺伝子断片と線状化ベクターを Ligation high Ver.2 によって連結することで発現ベクターを作製した(表 26)。

表 25 HIF-2 $\alpha$  の遺伝子中の EcoRI 認識部位を変異させるために用いたプライマー

forward	5'- CCTATGAGTTCTACCATGCGCTAGACT -3'
reverse	5'- GGTAGAACTCATAGGCTGAGCGGCCAA -3'

表 26 AhR と HIF-2 $\alpha$  のキメラコンストラクトの発現ベクター

名前	bHLH-PAS-A		PAS-B		改変ベクター/タグ配列
	タンパク質	残基番号	タンパク質	残基番号	
キメラ_2	hHIF-2 $\alpha$	3-233	bAhR	276-435	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
キメラ_4	hHIF-2 $\alpha$	3-233	OcAhR	275-434	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
キメラ_11	hAhR_	27-276	hHIF-2 $\alpha$	234-361	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
キメラ_12	bAhR	27-275	hHIF-2 $\alpha$	234-361	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
キメラ_18	xAhR	24-265	hHIF-2 $\alpha$	234-361	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
キメラ_20	mAhR	26-270, F123L	hHIF-2 $\alpha$	234-361	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列

#### 2-7-2-2. タンパク質の発現と精製

前号で作製したキメラコンストラクトと 2-2-1 項で作製した野生型 ARNT (hARNT\_9) を組み合わせて大量培養, 精製を行った(方法は 2-2-2 項と同様の手順で行った)。精製試料の純度を SDS-PAGE で確認した(結果は 3-6-2 項)。

### 2-7-3. リジン残基のアルキル化

タンパク質表面の性質を変化させることで結晶性に影響を与えるため、リジン残基のアルキル化を行った。2-4-2 項で調製した bAhR\_1/bARNT\_22 についてメチル化、エチル化、イソプロピル化を行い、MoAhR\_2/bARNT\_22, OcAhR\_2/bARNT\_22, pAhR\_2/bARNT\_22, rAhR\_2/bARNT\_22, cAhR\_2/bARNT\_22, xAhR\_2/bARNT\_22, zAhR\_2/bARNT\_22, についてイソプロピル化を行った。さらに、pAhR\_2/bARNT\_22, cAhR\_2/bARNT\_22 について 2-4-2 項と同じ方法で高純度試料を調製し、メチル化、エチル化、イソプロピル化を行った。方法は Reductive Alkylation Kit (HAMPTON)の方法に従った。アルキル化を行った後、Superdex 200 prep grade (24 mL)カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% Glycerol)を用いた。精製試料の純度を SDS-PAGE で確認した(結果は 3-6-3 項)。

#### 2-7-4. 添加剤の検討

タンパク質を安定化することを目的として、添加剤の検討を行った。まず、2-4-2項と同じ方法で bAhR\_1 (残基番号 27-435)/bARNT\_22 (残基番号 82-464, Δ148-154, Δ231-256, Δ272-300, Δ318-331)の高純度試料を精製し、(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol)のバッファーにタンパク質濃度が 5.6 mg/mL となるように調製した。その溶液を 9 μL ずつ分注し、Solubility & Stability Screen (HAMPTON)に含まれる 96 種類の試薬(表 27)を 1 μL ずつ添加することでタンパク質濃度を 5 mg/mL とした。4°Cで 1 週間インキュベートした後、(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol)のバッファーを 40 μL 加え、Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで安定性を評価した(結果は 3-6-4 項)。ゲル濾過バッファーには(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。

表 27 Solubility & Stability Screen に含まれる試薬(濃度は最終濃度)

No.	試薬 1	試薬 2
01	10% (v/v)	Water
02	7.5% (w/v)	Trichloroacetic acid
03	25 mM	L-Arginine
04	25 mM	L-Arginine
05	50 mM	Glycine
06	50 mM	L-Proline
07	12 mM	L-Histidine
08	50 mM	β-Alanine
09	50 mM	L-Serine
10	50 mM	L-Arginine ethyl ester dihydrochloride
11	50 mM	L-Argininamide dihydrochloride
12	50 mM	6-Aminohexanoic acid
13	50 mM	Gly-gly
14	20 mM	Gly-gly-gly
15	0.5% (w/v)	Tryptone
16	250 mM	Betaine monohydrate
17	75 mM	D-(+)-Trehalose dihydrate
18	200 mM	Xylitol
19	200 mM	D-Sorbitol
20	200 mM	Sucrose
21	50 mM	Hydroxyectoine
22	250 mM	Trimethylamine N-oxide dihydrate



---

23	200 mM	Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside		
24	1% (v/v)	Triethylene glycol		
25	50 mM	Spermine tetrahydrochloride		
26	50 mM	Spermidine		
27	50 mM	5-Aminovaleric acid		
28	50 mM	Glutaric acid		
29	8 mM	Adipic acid		
30	50 mM	Ethylenediamine dihydrochloride		
31	50 mM	Guanidine hydrochloride		
32	50 mM	Urea		
33	50 mM	N-Methylurea		
34	20 mM	N-Ethylurea		
35	3% (w/v)	N-Methylformamide		
36	0.3% (w/v)	Hypotaurine		
37	15 mM	TCEP hydrochloride		
38	2 mM	GSH (L-Glutathione reduced)	2 mM	GSSG (L-Glutathione oxidized)
39	0.5% (w/v)	Benzamidine hydrochloride		
40	5 mM	EDTA		
41	10 mM	Magnesium chloride hexahydrate	10 mM	Calcium chloride dihydrate
42	10 mM	Cadmium chloride hydrate	10 mM	Cobalt(II) chloride hexahydrate
43	100 mM	Non Detergent Sulfo betaine 195 (NDSB-195)		
44	100 mM	Non Detergent Sulfo betaine 201 (NDSB-201)		
45	100 mM	Non Detergent Sulfo betaine 211 (NDSB-211)		
46	100 mM	Non Detergent Sulfo betaine 221 (NDSB-221)		
47	80 mM	Non Detergent Sulfo betaine 256 (NDSB-256)		
48	50 mM	Taurine		
49	50 mM	Acetamide		
50	50 mM	Oxalic acid dihydrate		
51	50 mM	Sodium malonate pH 7.0		
52	50 mM	Succinic acid pH 7.0		
53	0.5% (v/v)	Tacsimate pH 7.0		
54	2.5% (w/v)	Tetraethylammonium bromide		
55	2.5% (w/v)	Cholin acetate		
56	2.5% (w/v)	1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate		
57	2.5% (w/v)	1-Butyl-3-methylimidazolium chloride		
58	2.5% (w/v)	Ethylammonium nitrate		
59	50 mM	Ammonium sulfate		
60	50 mM	Ammonium chloride		
61	50 mM	Magnesium sulfate hydrate		
62	50 mM	Potassium thiocyanate		
63	25 mM	Gadolinium(III) chloride hexahydrate		
64	25 mM	Cesium chloride		
65	25 mM	4-Aminobutyric acid (GABA)		
66	50 mM	Lithium nitrate		
67	50 mM	DL-Malic acid pH 7.0		
68	50 mM	Lithium citrate tribasic tetrahydrate		
69	25 mM	Ammonium acetate		
70	25 mM	Sodium benzenesulfonate		
71	25 mM	Sodium p-toluenesulfonate		
72	100 mM	Sodium chloride		
73	140 mM	Potassium chloride		
74	70 mM	Sodium phosphate monobasic monohydrate	130 mM	Potassium phosphate dibasic
75	100 mM	Sodium sulfate decahydrate		
76	140 mM	Lithium chloride		

---

---

77	100 mM	Sodium bromide	
78	4% (v/v)	Glycerol	40 mM Lithium chloride
79	5% (v/v)	Glycerol	
80	1% (v/v)	Ethylene glycol	
81	1% (v/v)	Polyethylene glycol 200	
82	0.5% (v/v)	Polyethylene glycol monomethyl ether 550	
83	0.5% (w/v)	Polyethylene glycol monomethyl ether 750	
84	5% (v/v)	Formamide	
85	1% (v/v)	Polyethylene glycol 400	
86	2.5% (v/v)	Pentaerythritol ethoxylate (15/4 EO/OH)	
87	1% (w/v)	1,2-Propanediol	
88	0.3% (w/v)	Polyethylene glycol monomethyl ether 1,900	
89	0.3% (w/v)	Polyethylene glycol 3,350	
90	0.3% (w/v)	Polyethylene glycol 8,000	
91	0.2% (w/v)	Polyvinylpyrrolidone K15	
92	0.2% (w/v)	Polyethylene glycol 20,000	
93	1 mM	(2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin	
94	8 mM	$\alpha$ -Cyclodextrin	
95	1 mM	$\beta$ -Cyclodextrin	
96	5 mM	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	

---

## 2-8. AhR/ARNT の結晶化スクリーニング

様々な種由来の野生型やループ欠損変異体、熱安定化変異体の AhR/ARNT や PA ペプチド挿入 AhR/ARNT と NZ-1 複合体、HIF-2 $\alpha$  とのキメラコンストラクトなど上記で調製した試料を用いて結晶化スクリーニングを行った。温度(4°C, 15°C, 20°C), タンパク質濃度(1.5~20 mg/mL), タンパク質溶液のバッファー組成(pH (7.0~8.5), NaCl 濃度(150~500 mM), Glycerol 濃度(0~10%), DTT (0 mM または 1 mM)), 添加物(2 本鎖 DNA やリガンド(2-1 節参照), L-Histidine や EDTA (3-6-4 項参照), Tacsimate)の種類, スクリーニングキット(The JCSG+ Suite, The PACT Suite, The PEGs Suite, The PEGs II Suite, The Protein Complex Suite (QIAGEN), Crystal Screen, Crystal Screen 2, Index, MembFac, PEG/Ion 2 (HAMPTON), Morpheus (Molecular Dimensions), Wizard I, Wizard II (Emerald Biosystems), また The JCSG+ Suite, The PEGs Suite, The Protein Complex Suite を純水で2倍希釈したもの)などの条件を組み合わせ約5万条件で結晶化スクリーニングを行った。結晶化は自動結晶化ロボット CRYSTAL GRYPHON (ARI), mosquito Crystal (ttplabtech)を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法で行った。修士課程における研究と合わせて AhR/ARNT に関して 10 万以上の条件で結晶化スクリーニングを行った。

## 2-9. AhR/ARNT のホモロジーモデル

AhR/ARNT/DNA の bHLH-PAS-A [48] (PDB ID : 5NJ8)及び HIF-2 $\alpha$ /ARNT の bHLH-PAS-A-PAS-B [45] (PDB ID : 4ZP4)の結晶構造から AhR/ARNT の bHLH-PAS-A-PAS-B のホモロジーモデルを構築した。テンプレートとして 5NJ8 の chain A の residue 34-272 (AhR の bHLH-PAS-A), 5NJ8 の chain B の residue 85-345 (ARNT の bHLH-PAS-A), 4ZP4 の chain D の residue 230-360 (HIF-2 $\alpha$  の PAS-B), 4ZP4 の chain C の residue 161-464 (ARNT の PAS-A-PAS-B)を用い, MODELLER [66]によってホモロジーモデルを構築した。さらに TLR3/RNA の結晶構造[67] (PDB ID : 3CIY)から 30-mer DNA の構造モデルを作製した。これらのモデルをそれぞれ AhR/ARNT/DNA の bHLH-PAS-A の結晶構造 (PDB ID : 5NJ8)に重ね合わせることで AhR/ARNT/DNA の構造モデルを作製した(結果は 3-8 項)。

また, AhR/ARNT のホモロジーモデルと NZ-1 Fv-clasp の結晶構造[61] (PDB ID : 5XCV)から AhR/ARNT の 6 か所に NZ-1 Fv-clasp が結合した構造モデル (hAhR\_375/hARNT\_304\_2/6 $\times$ NZ-1 Fv-clasp)を作製した(結果は 3-8 項)。

## 2-10. クライオ電子顕微鏡による単粒子解析

### 2-10-1. AhR/ARNT/DNA の電子顕微鏡解析

2-2-2 項で精製した野生型 AhR/ARNT (hAhR\_3/hARNT\_9)及び 2-1-1 項で調製した 2 本鎖 DNA (XRE\_0)を用いて、2-2-3 項と同様の方法で調製した AhR/ARNT/DNA 複合体について、大阪大学蛋白質研究所の川本晃大博士にクライオ条件下での電子顕微鏡画像の取得、及び Relion 3.0 [68]による解析をしていただいた(表 28) (結果は 3-9-1 項)。

表 28 AhR/ARNT/DNA の電子顕微鏡による測定と解析(川本晃大博士による)

AhR/ARNT/DNA	
<b>Data Collection</b>	
Microscope	Titan Krios (using volta phase plate)
Magnification (×)	96,000
Voltage (kV)	300
Electron exposure (e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> )	30
Detector	Falcon 3EC
Defocus range (µm)	-0.4 to -0.7
Pixel size (Å)	0.69
Number of images	1908
<b>Data Processing</b>	
Initial number of particles	838,609
Final number of particles	8,244
Symmetry imposed	C1
Map resolution (Å)	12

### 2-10-2. AhR/ARNT/NZ-1 Fv-clasp の電子顕微鏡解析

2-6-3-2 号で精製した 6 か所に PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT (hAhR\_375/hARNT\_304\_2)及び 2-6-1-4 号と同様の方法で調製した NZ-1 Fv-clasp を用いて、2-6-4 項と同様の方法で AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp 複合体を調製した。Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、ピークトップを分取し 2~4 倍希釈することでタンパク質濃度を 10~40 nM とした。バッファーには(10 mM Tris-

HCl pH 8.0, 500 mM NaCl)を用いた。3  $\mu$ L の試料をカーボン支持膜(イーエムジャパン, Cat No. U1013)に添加し, 30 秒インキュベートした後, 濾紙で試料を吸い取った。続いて 3  $\mu$ L の 2% Uranyl acetate を添加し, 30 秒インキュベートした後, 濾紙で吸い取り電子顕微鏡観察用のグリッドを作製した。東京大学微細構造解析プラットフォームの電子顕微鏡を用いてネガティブ染色電子顕微鏡画像を取得し, cisTEM [69]によって解析した(表 29)(結果は 3-9-2 項)。

表 29 AhR/ARNT/6 $\times$ NZ-1 Fv-clasp の電子顕微鏡による測定と解析

AhR/ARNT/6 $\times$ NZ-1 Fv-clasp	
<b>Data Collection</b>	
Microscope	JEM-1400
Magnification ( $\times$ )	50,000
Voltage (kV)	120
Pixel size ( $\text{\AA}$ )	5
Number of images	82
<b>Data Processing</b>	
Number of particles	4,033

## 2-11. AhRR/ARNT の X 線結晶構造解析

転写抑制複合体である AhRR/ARNT についても X 線結晶構造解析を目指して実験を行った。AhRR は PAS-B ドメインを持たないため(1-4 節参照), bHLH-PAS-A を含む領域を AhR/ARNT と同様に昆虫細胞 Sf9 を用いた共発現によって AhRR/ARNT を発現させ, 構造解析を目指した。

### 2-11-1. 発現ベクターの構築

Human 由来の AhRR について GenScript 社に依頼し, 昆虫細胞用にコドン最適化した遺伝子を合成した。この合成遺伝子を含むプラスミドを鋳型として, KOD FX Neo によって PCR で増幅し, MoAhR\_2 と同じ方法で発現ベクターを作製した(表 30) (2-4-1 項参照)。

表 30 hAhRR の発現ベクター

名前	残基番号	改変ベクター/タグ配列
hAhRR_4	27-280	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
hAhRR_5	27-390	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列
hAhRR_6	27-420	#3/N 末 His-Flag-プレジジョン認識配列

### 2-11-2. タンパク質の発現, 精製と結晶化用試料の調製

前項で作製した AhRR のコンストラクトと 2-4-1 項で作製した bovine 由来の ARNT のループ欠損変異体 bARNT\_22 (残基番号 82-464,  $\Delta$ 148-154,  $\Delta$ 231-256,  $\Delta$ 272-300,  $\Delta$ 318-331)を組み合わせて大量培養, 精製を行った(方法は 2-2-2 項と同様の手順で行った)。ただし, hAhRR\_5/bARNT\_22 の精製にはゲル濾過バッファーに(10 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% Glycerol)を用いた。さらに, 得られた試料について, リジン残基のアルキル化を行った(方法は 2-7-3 項と同様の手順で行った)。精製試料の純度を SDS-PAGE

で確認した(結果は 3-10-1 項)。

### 2-11-3. 結晶化スクリーニング

前項で得られた AhRR/ARNT のアルキル化前, またはアルキル化後の試料を用いて結晶化スクリーニングを行った。温度(4°C, 20°C), タンパク質濃度(3.5~12.4 mg/mL), タンパク質溶液のバッファー組成(pH (7.5~8.0), NaCl 濃度(60~500 mM), Glycerol 濃度(0~10%)), 添加物(2 本鎖 DNA)の種類, スクリーニングキット(The JCSG+ Suite, The PACT Suite, The PEGs Suite, The Protein Complex Suite (QIAGEN))などの条件を組み合わせて約9,000 条件で初期スクリーニングを行った。結晶化は自動結晶化ロボット mosquito Crystal (ttplabtech)を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法で行った(結果は 3-10-2 項)。

初期のスクリーニングで結晶が得られた条件を基に, 温度, タンパク質濃度, リザーバー溶液の組成(PEG の種類や濃度, pH, 塩の濃度), ドロップサイズ, 2 本鎖 DNA の種類, 添加剤(Additive Screen, Detergent Screen, Silver Bullets (HAMPTON))などの条件を検討し, 結晶化条件の最適化を行った(結果は 3-10-2 項)。

### 2-11-4. X 線回折実験

前項で得られた結晶を用いて X 線回折実験を行った。DNA フリーの結晶については PF-AR NE3A (茨城)において回折実験を行った。クライオプロテクタントとして, 12.5% PEG20000, 100 mM HEPES pH 7.3, 350 mM NaCl, 25% Glycerol を用いた。測定波長は 1.0000 Å, 振動角 0.5° /image で全振動角 180° , 露光時間 0.5 sec/image で計 360 枚の image を取得した。測定温度は 100 K で行った。検出器にはシングルフォトンカウンティング型 2 次元 X 線検出器 PILATUS2M-F (DECTRIS)を使用した(結果は 3-10-2 項)。



DNA を添加した結晶については SPring-8 BL41XU (兵庫)において回折実験を行った。クライオプロテクタントとして、12% PEG3350, 100 mM MES pH 6.0, 350 mM NaCl, 25% Ethylene glycol を用いた。測定波長は 1.0000 Å, 振動角 0.5°, 露光時間 0.5 sec で回折実験を行い、回折点を確認した。測定温度は 100 K で行った。検出器にはシングルフォトンカウンティング型 2 次元 X 線検出器 PILATUS3 6M (DECTRIS)を使用した(結果は 3-10-2 項)。

#### 2-11-5. AhRR/ARNT の構造決定

前項で得られた DNA フリーの結晶を用いて測定したデータについて、HKL2000 [70]を用いて積分強度の算出とスケーリングを行った。HIF-2 $\alpha$ /ARNT の結晶構造[45] (PDB ID : 4ZP4)をサーチモデルとして、Phaser [71]を用いた分子置換法によって位相を決定し、AhRR/ARNT の初期モデルを構築した。その後、Coot [72]を使用してモデルを修正し、Refmac5 [73]によって構造精密化を行った。Coot と Refmac5 のサイクルを繰り返し、最終モデル構造を得た。精密化した構造の評価を MolProbity [74]で行った(結果は 3-10-3 項)。

## 2-12. X線小角散乱

AhR/ARNT, AhRR/ARNT の溶液中での構造情報を取得するため, PF BL10C (茨城)において X 線小角散乱を行った。2-2-2 項で得られた野生型 AhR/ARNT (L-kynurenine (+)) (hAhR\_3/hARNT\_9), 2-2-2 項と同様の方法でリガンドを添加せずに培養, 精製を行った野生型 AhR/ARNT (L-kynurenine (-)) (hAhR\_59/hARNT\_37), 及び 2-11-2 項と同様の方法で調製した AhRR/ARNT (hAhRR\_4/hARNT\_22) の 3 種類の試料を用いて測定を行った。今回の実験では size exclusion chromatography-small angle X-ray scattering (SEC-SAXS) と呼ばれるゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせることでより単分散性の高い試料を散乱実験に用いることができる手法を実施した。試料を Superdex 200 Increase 10/300 GL にアプライし, 溶出液に連続的に X 線を照射して散乱実験を行った。ゲル濾過バッファーには (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) を用いた。波長 1.0000 Å, 溶出ピーク時の流速 0.035 mL/min, 露光時間 20 sec/image, 温度 293 K で測定を行い, 約 370 枚の image を取得した。検出器にはシングルフォトンカウンティング型 2 次元 X 線検出器 PILATUS3 2M (DECTRIS) を使用した。

測定したそれぞれの image について, SAngher [75] を用いて円周平均, Guinier 解析を行い, 散乱角  $0^\circ$  における散乱強度 ( $I(0)$ ) 及び慣性半径 (Radius of gyration;  $R_g$ ) を計算した。 $I(0)$  の値が最大値の  $2/3$  以上である image (40~50 枚) を平均したものを散乱データとして用い, 再び  $I(0)$  及び  $R_g$  を計算した。また, PRIMUSqt [76] を用いて  $P(r)$  関数を求めた (結果は 3-11 節)。AhRR/ARNT については DAMMIN [77] 及び DAMAVER [78] を用いてダミーアトムモデルを構築し, 2-11-5 項で得られた AhRR/ARNT の結晶構造と比較した。さらに, AhRR/ARNT の結晶構造から CRY SOL [79] を用いて散乱曲線を計算し, 実験値と比較した (結果は 3-11 節)。

### 3. 結果

#### 3-1. 野生型 human AhR/ARNT

##### 3-1-1. 野生型 human AhR/ARNT の精製

野生型 human AhR/ARNT の高純度試料を得ることに成功した(図 15) (方法は 2-2-2 項)。

培地 1 L あたりの収量は約 4 mg だった。ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出体積から

AhR/ARNT はヘテロダイマーを形成していると判断した。

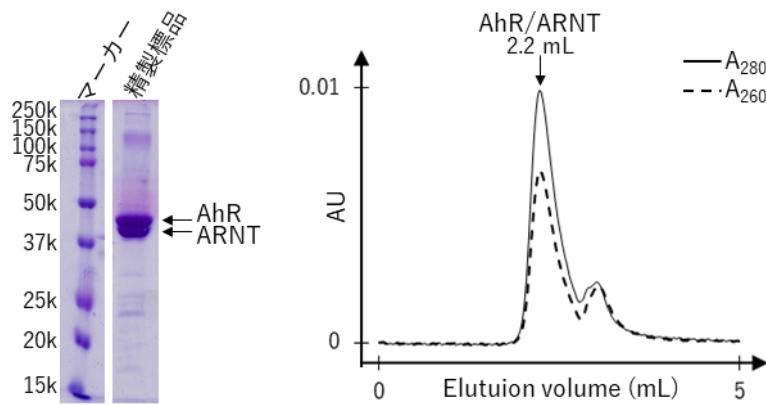


図 15 野生型 human AhR/ARNT 精製試料の純度の確認

野生型 human AhR/ARNT の精製標品の SDS-PAGE (左)とゲル濾過プロファイル(右)を示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。

### 3-1-2. DNA との結合確認と DNA 複合体の調製

野生型 human AhR/ARNT と XRE\_0 を混合し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った(図 16) (方法は 2-2-3 項)。フリーの AhR/ARNT では  $A_{260}/A_{280}$  の比が 0.7 程度であるのに対して、XRE と混合して行ったゲル濾過クロマトグラフィーにおいて AhR/ARNT ヘテロダイマーに対応するピークの  $A_{260}/A_{280}$  の比が 1.5 程度まで上昇したことから DNA と複合体を形成していると判断した。調製した複合体試料について SDS-PAGE とゲル濾過クロマトグラフィーを行った(図 17) (方法は 2-2-3 項)。その結果、調製試料はゲル濾過クロマトグラフィーにおいて単分散に溶出し、SDS-PAGE において AhR, ARNT のバンドが確認できた。これらの結果から調製した AhR/ARNT/DNA 複合体は強固に結合していると考えられる。このことは以前報告された AhR/ARNT ヘテロダイマーと XRE 配列を含む DNA の  $K_d$  値が数 nM であったことと対応している [55]。

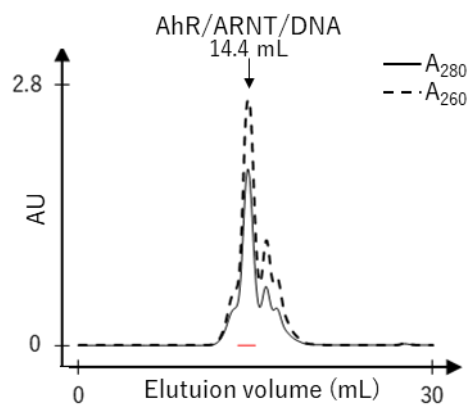


図 16 ゲル濾過クロマトグラフィーによる野生型 human AhR/ARNT の DNA との結合確認

野生型 human AhR/ARNT と XRE\_0 を混合し Superdex 200 Increase 10/300 GL にアプライした際のゲル濾過プロファイルを示す。赤線のフラクションを分取することで AhR/ARNT/DNA 複合体試料とした。

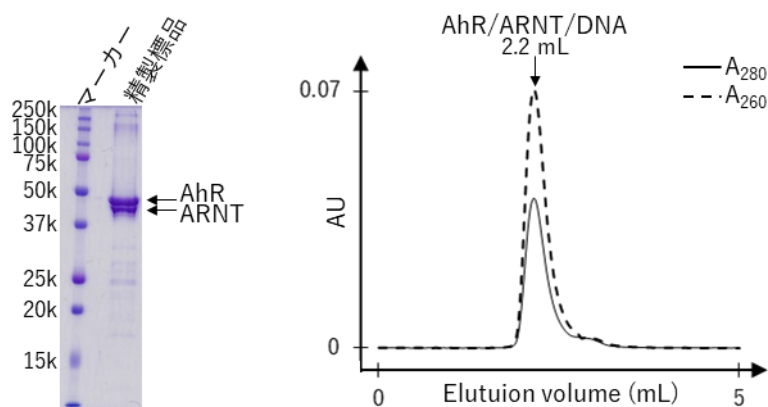


図 17 野生型 human AhR/ARNT/DNA 精製試料の純度の確認

野生型 human AhR/ARNT/DNA の精製標品の SDS-PAGE (左)とゲル濾過プロファイル (右)を示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。

### 3-1-3. 安定性の評価

野生型 human AhR/ARNT の安定性を評価するため、精製試料を 20°C で 1 週間インキュベートした後、SDS-PAGE を行った(図 18) (方法は 2-2-4 項)。SDS-PAGE の結果、20°C でインキュベートした試料では切断が起こっていた。この結果から AhR, ARNT にはフレキシブルなループ領域が存在することが示唆された。このことは AhR/ARNT の PAS-A ドメインまでの結晶構造中で複数か所がディスオーダーしていることに対応しており、フレキシブルなループ領域が結晶化を妨げている可能性が考えられる。

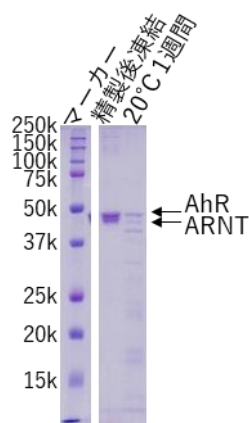


図 18 野生型 human AhR/ARNT 精製試料の安定性の評価

精製後凍結または 20°C でインキュベートした野生型 human AhR/ARNT 精製試料の SDS-PAGE を示す。

### 3-2. ループ欠損変異体

#### 3-2-1. ループ欠損変異体の精製

ループ欠損変異体についても野生型と同様に高純度試料を得ることに成功した(図 19) (方法は 2-3-2 項)。培地 1 L あたりの収量は約 0.4 mg だった。

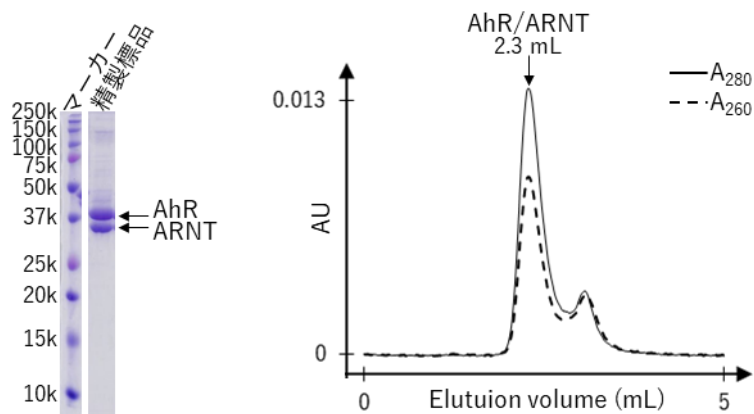


図 19 ループ欠損変異体 AhR/ARNT 精製試料の純度の確認

hAhR\_124/hARNT\_107 の精製標品の SDS-PAGE (左)とゲル濾過プロファイル(右)を示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。

### 3-2-2. DNA との結合確認と DNA 複合体の調製

ループ欠損変異体 AhR/ARNT と XRE\_0 を混合し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った (図 20) (方法は 2-3-3 項)。ループ欠損変異体についても野生型と同様に AhR/ARNT ヘテロダイマーに対応するピークの  $A_{260}/A_{280}$  の比が 1.5 程度まで上昇したことから DNA と複合体を形成していると判断した。調製した複合体試料について SDS-PAGE とゲル濾過クロマトグラフィーを行った (図 21) (方法は 2-3-3 項)。その結果、調製試料はゲル濾過クロマトグラフィーにおいて単分散に溶出し、SDS-PAGE において AhR, ARNT のバンドが確認できた。



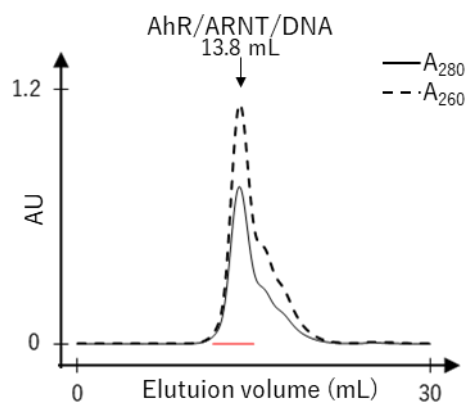


図 20 ゲル濾過クロマトグラフィーによるループ欠損変異体 AhR/ARNT の DNA との結合確認

hAhR\_124/hARNT\_107 と XRE\_0 を混合し Superdex 200 prep grade (24 mL) カラムにアプライした際のゲル濾過プロファイルを示す。赤線のフラクションを分取することで AhR/ARNT/DNA 複合体試料とした。

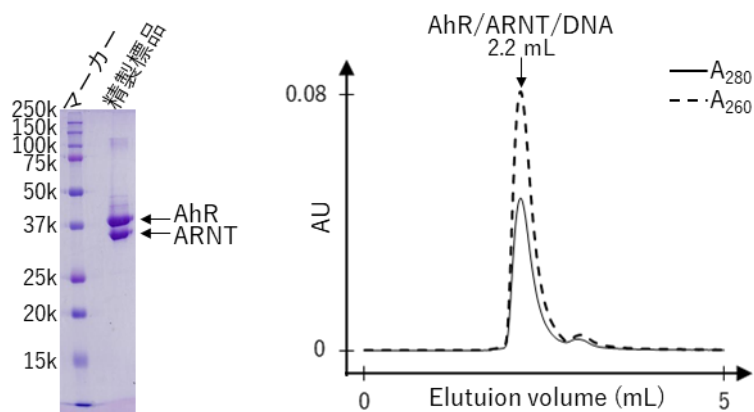


図 21 ループ欠損変異体 AhR/ARNT/DNA 精製試料の純度の確認

hAhR\_124/hARNT\_104/XRE\_0 の精製標品の SDS-PAGE (左) とゲル濾過プロファイル (右) を示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。

### 3-2-3. 安定性の評価

ループ欠損変異体 AhR/ARNT の安定性を評価するため、精製試料を 20°C で 1 週間インキュベートした後、SDS-PAGE を行った(図 22) (方法は 2-3-4 項)。SDS-PAGE の結果、野生型 AhR/ARNT と比較してループ欠損変異体ではほとんど切断が起こっておらず、安定性が向上したと考えられる(3-1-3 項参照)。

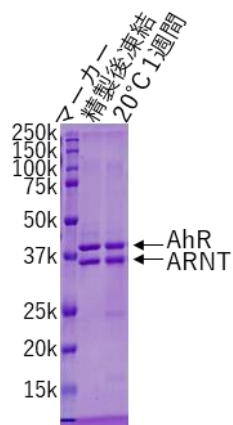


図 22 ループ欠損変異体 AhR/ARNT 精製試料の安定性の評価

精製後凍結または 20°C でインキュベートした hAhR\_124/hARNT\_104 精製試料の SDS-PAGE を示す。

### 3-3. Human 以外の種由来の AhR/ARNT

#### 3-3-1. Mouse 由来の AhR/ARNT

野生型 mouse AhR/ARNT (mAhR\_2/mARNT\_3)について大量培養，精製を行った(図 23)  
(方法は 2-4-2 項)。しかし，ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロファイルから，mouse  
由来の AhR/ARNT は凝集体を形成しており，試料を調製することはできなかった。

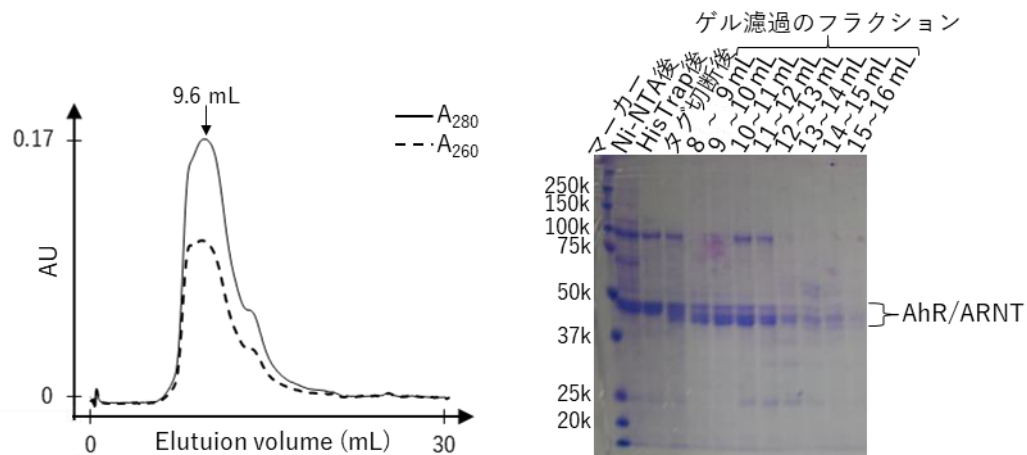


図 23 野生型 mouse AhR/ARNT のゲル濾過クロマトグラフィーによる精製

mAhR\_2/mARNT\_3 精製時のゲル濾過プロファイル(左)と精製過程の SDS-PAGE (右)を  
示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いた。

### 3-3-2. Mouse 以外の種由来の AhR/ARNT

Human, bovine, monkey, rabbit, pig, rat, chicken, xenopus, zebrafish 由来の AhR と human, bovine 由来の ARNT を組み合わせて大量培養，精製を行い，高純度試料を得ることに成功した(図 24，表 31) (方法は 2-4-2 項)。

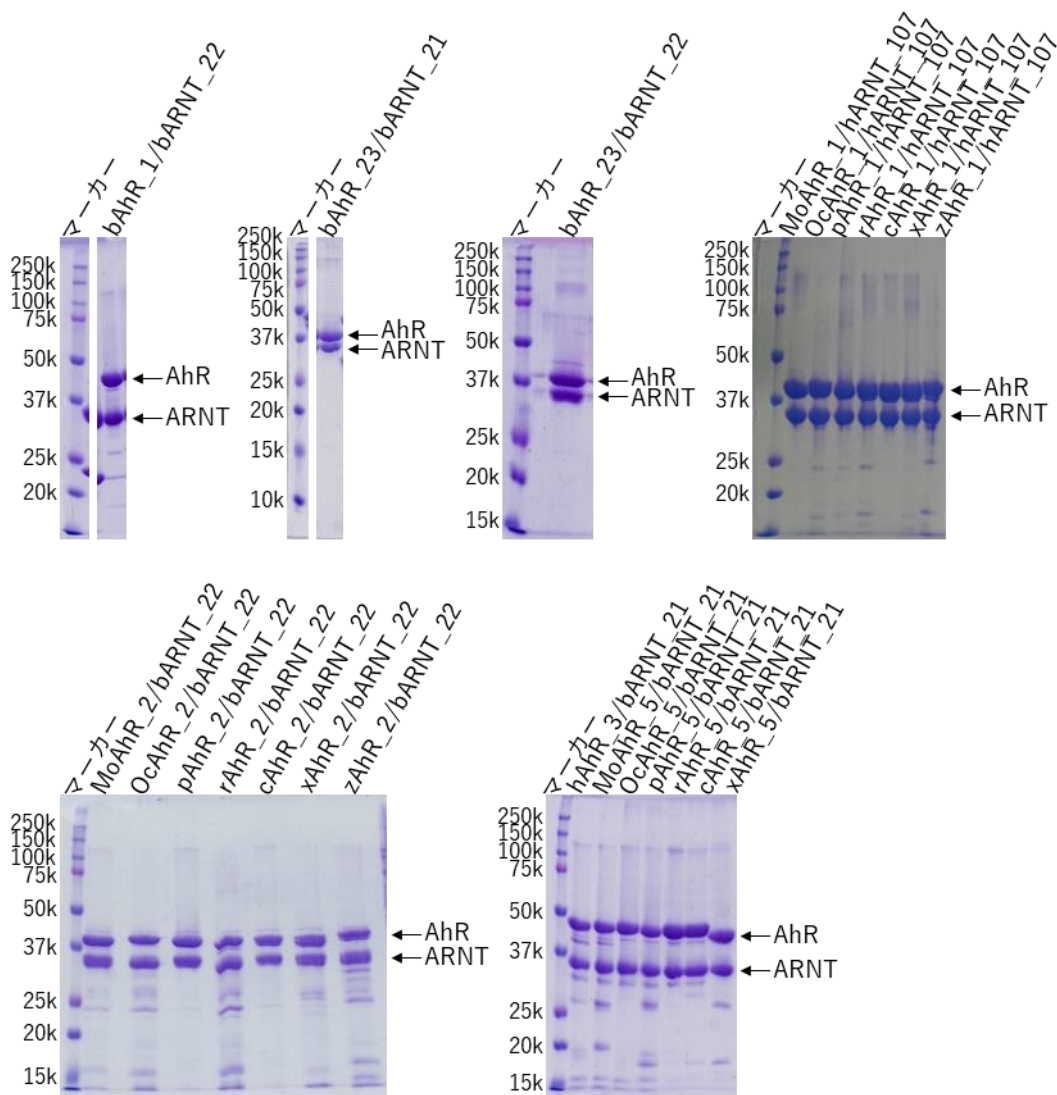


図 24 様々な種由来の AhR/ARNT 精製試料の SDS-PAGE

表 31 Human 以外の種由来の AhR/ARNT の培地 1 L あたりの収量

AhR/ARNT	培地 1 L あたりの収量
bAhR_1/bARNT_22	3.1 mg
bAhR_23/bARNT_21	1.3 mg
bAhR_23/bARNT_22	0.8 mg
MoAhR_1/hARNT_107	4.8 mg
OcAhR_1/hARNT_107	1.4 mg
pAhR_1/hARNT_107	4.2 mg
rAhR_1/hARNT_107	3.8 mg
cAhR_1/hARNT_107	3.1 mg
xAhR_1/hARNT_107	4.3 mg
zAhR_1/hARNT_107	0.9 mg
MoAhR_2/bARNT_22	1.8 mg
OcAhR_2/bARNT_22	2.0 mg
pAhR_2/bARNT_22	2.5 mg
rAhR_2/bARNT_22	1.7 mg
cAhR_2/bARNT_22	3.5 mg
xAhR_2/bARNT_22	1.4 mg
zAhR_2/bARNT_22	1.1 mg
hAhR_3/bARNT_21	3.4 mg
MoAhR_5/bARNT_21	2.7 mg
OcAhR_5/bARNT_21	2.1 mg
pAhR_5/bARNT_21	3.0 mg
rAhR_5/bARNT_21	1.8 mg
cAhR_5/bARNT_21	3.2 mg
xAhR_5/bARNT_21	1.8 mg

### 3-4. 熱安定化変異体

#### 3-4-1. 野生型 AhR/ARNT の HEK293 細胞による発現

HEK293 細胞によって野生型 AhR/ARNT の発現を確認した(図 25) (方法は 2-5-1-2 号)。  
EGFP の蛍光を検出したゲル濾過クロマトグラフィーの溶出体積から AhR-EGFP/ARNT はヘテロダイマー形成していると判断した。また, Flag タグを用いたウェスタンブロッティングによって AhR-EGFP, ARNT のバンドをそれぞれ確認した。また, トランスフェクション時に添加するリガンドの濃度による発現量の違いをゲル濾過クロマトグラフィーで評価した(図 26) (方法は 2-5-1-2 号)。最終濃度 10  $\mu$ M で添加した時に最も発現量が多く, リガンドを添加しなかった時と比べてゲル濾過クロマトグラフィーのピークの蛍光強度は約 4 倍になっていた。この結果からトランスフェクション時に 37°C で数か月間インキュベートした L-kynurenine を最終濃度 10  $\mu$ M で添加することとした。

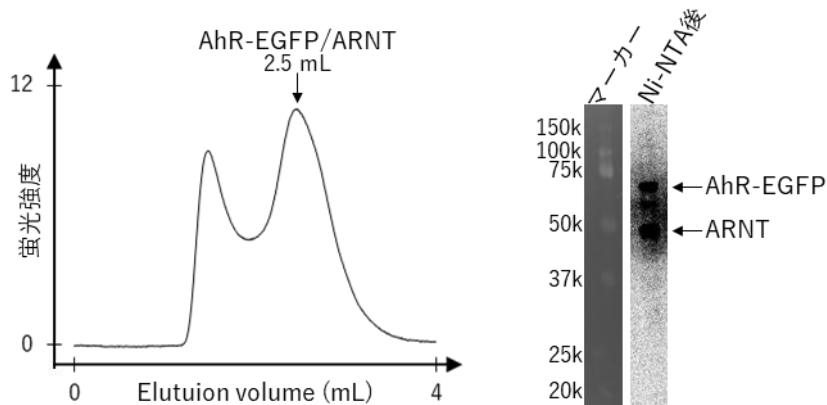


図 25 HEK293 細胞による野生型 AhR/ARNT の発現確認

hAhR\_142/hARNT\_114 を HEK293 細胞で発現させた際の破碎上清のゲル濾過プロファイル(左)と Ni-NTA Agarose による精製後のウェスタンブロッティング(右)を示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用い、EGFP の蛍光を検出した。ウェスタンブロッティングは Flag タグを用いて行った。

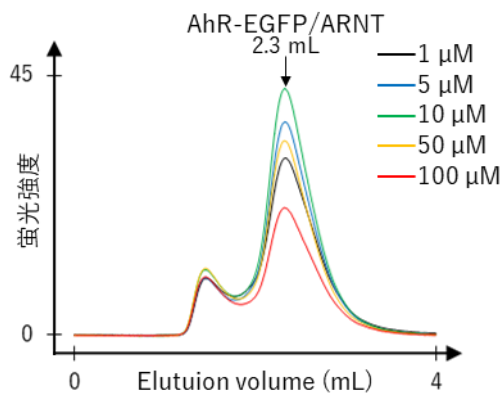


図 26 L-kynurenine 濃度による発現量の比較

1~100  $\mu\text{M}$  の L-kynurenine を培地に添加し、AhR/ARNT の発現量をゲル濾過クロマトグラフィーで比較した。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用い、EGFP の蛍光を検出した。

### 3-4-2. 野生型 AhR/ARNT の熱安定性の評価

野生型 AhR/ARNT について異なる温度で加熱した後ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、EGFP の蛍光を検出し、AhR-EGFP/ARNT のピークの蛍光強度を比較した(図 27, 表 32) (方法は 2-5-1-3 号)。その結果, 加熱しなかった試料と比較して, 40°C または 45°C で 10 分間加熱した試料はピークの蛍光強度が 90% 以上残存していたのに対して, 50°C で 10 分間加熱した試料では約 60% になっており, 55°C または 60°C で 10 分間加熱した試料ではピークが消失した。この結果から, スクリーニングを行う際は 50°C で 10 分間加熱することで熱安定性が向上したかどうかを評価できると判断した。

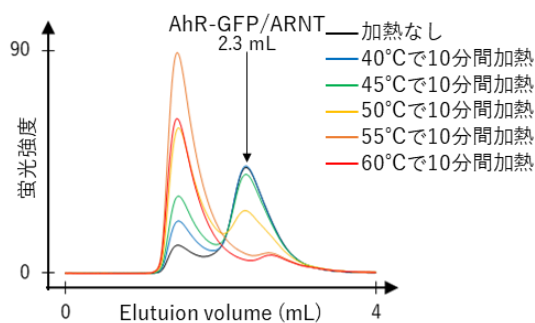


図 27 野生型 AhR/ARNT の熱安定性

異なる温度で加熱した hAhR\_142/hARNT\_114 の破碎上清を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし, ピークの蛍光強度を比較した。タンパク質の検出には EGFP の蛍光を用いた。

表 32 野生型 AhR/ARNT の熱安定性

加熱条件	ピークの蛍光強度	加熱なし/加熱あり (%)
加熱なし	42.8	-
40°Cで10分間	43.3	101
45°Cで10分間	40.0	93
50°Cで10分間	25.4	59
55°Cで10分間	-	-
60°Cで10分間	-	-



### 3-4-3. 1 残基変異体の熱安定性の評価

2-5-2-1 号で選定した変異を 1 残基導入した発現ベクターの構築を試みた結果、表 8、表 9 の作製欄に○印を付したコンストラクトについて発現ベクターの作製に成功した(2-5-2-2 号参照)。作製できたコンストラクトの熱安定性を加熱前後におけるゲル濾過クロマトグラフィーのピークの蛍光強度の比で評価した(図 28, 図 29, 図 30) (方法は 2-5-2-3 号)。野生型 AhR/ARNT については複数回実験を行い、加熱後のピークの蛍光強度が加熱前の 50~60%であった。変異体のゲル濾過クロマトグラフィーの結果から、加熱後のピークの蛍光強度が加熱前の 65%以上である変異について熱安定性が向上したと判断した。次にこれらの熱安定化変異を組み合わせて導入することとした。ただし、以降の実験で AhR に E217T の変異(69%)を導入するべきところを誤って N238Q の変異(64%)を導入してしまった。

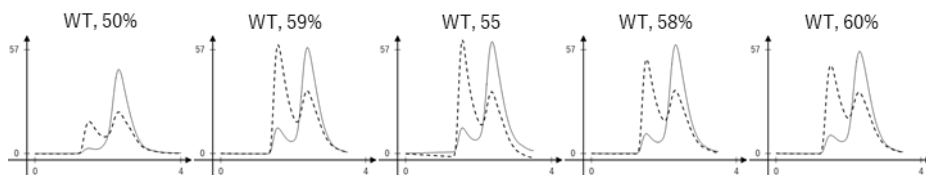
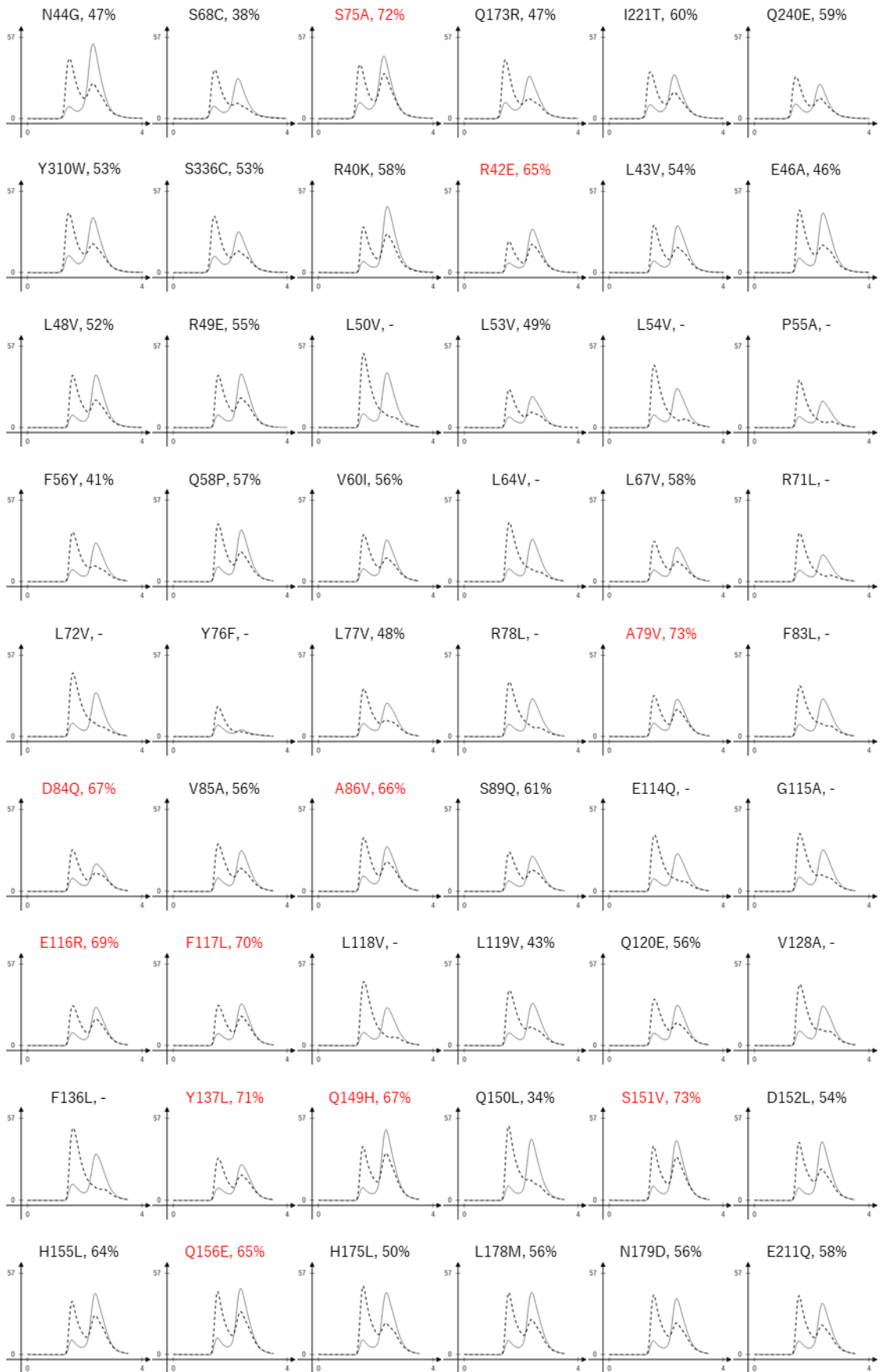


図 28 野生型 AhR/ARNT の熱安定性の評価

hAhR\_142/hARNT\_114 の破碎上清を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし、加熱前後のピークの蛍光強度を比較した。タンパク質の検出には EGFP の蛍光を用いた。横軸は Elution volume (mL)、縦軸は蛍光強度、実線及び破線はそれぞれ加熱前後のゲル濾過プロファイルを示す。グラフ上部の数値は加熱前に対する加熱後のピークの蛍光強度の比を示す。



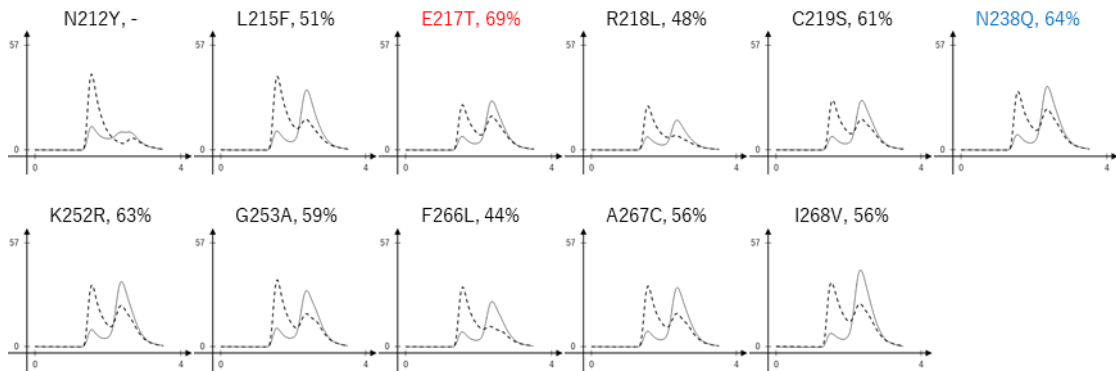
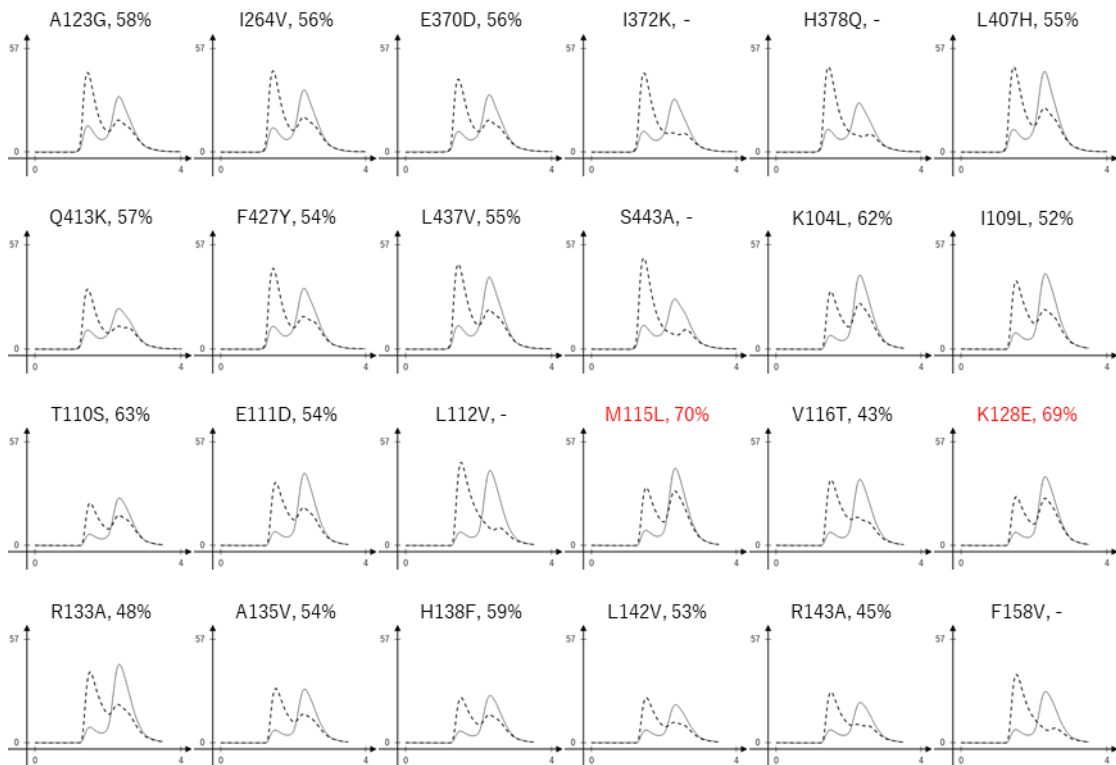


図 29 AhR に 1 残基変異を導入した AhR/ARNT の熱安定性の評価

AhR に 1 残基変異を導入した AhR/ARNT の破碎上清を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし、加熱前後のピークの蛍光強度を比較した。タンパク質の検出には EGFP の蛍光を用いた。横軸は Elution volume (mL)、縦軸は蛍光強度、実線及び破線はそれぞれ加熱前後のゲル濾過プロファイルを示す。グラフ上部の数値は加熱前に対する加熱後のピークの蛍光強度の比を示し、- は加熱後にピークが消失したものを示す。また、ピークの蛍光強度の比が 65% 以上だったものを赤字で、2-5-3-1 号において誤って導入した N238Q 変異を青字で示した。



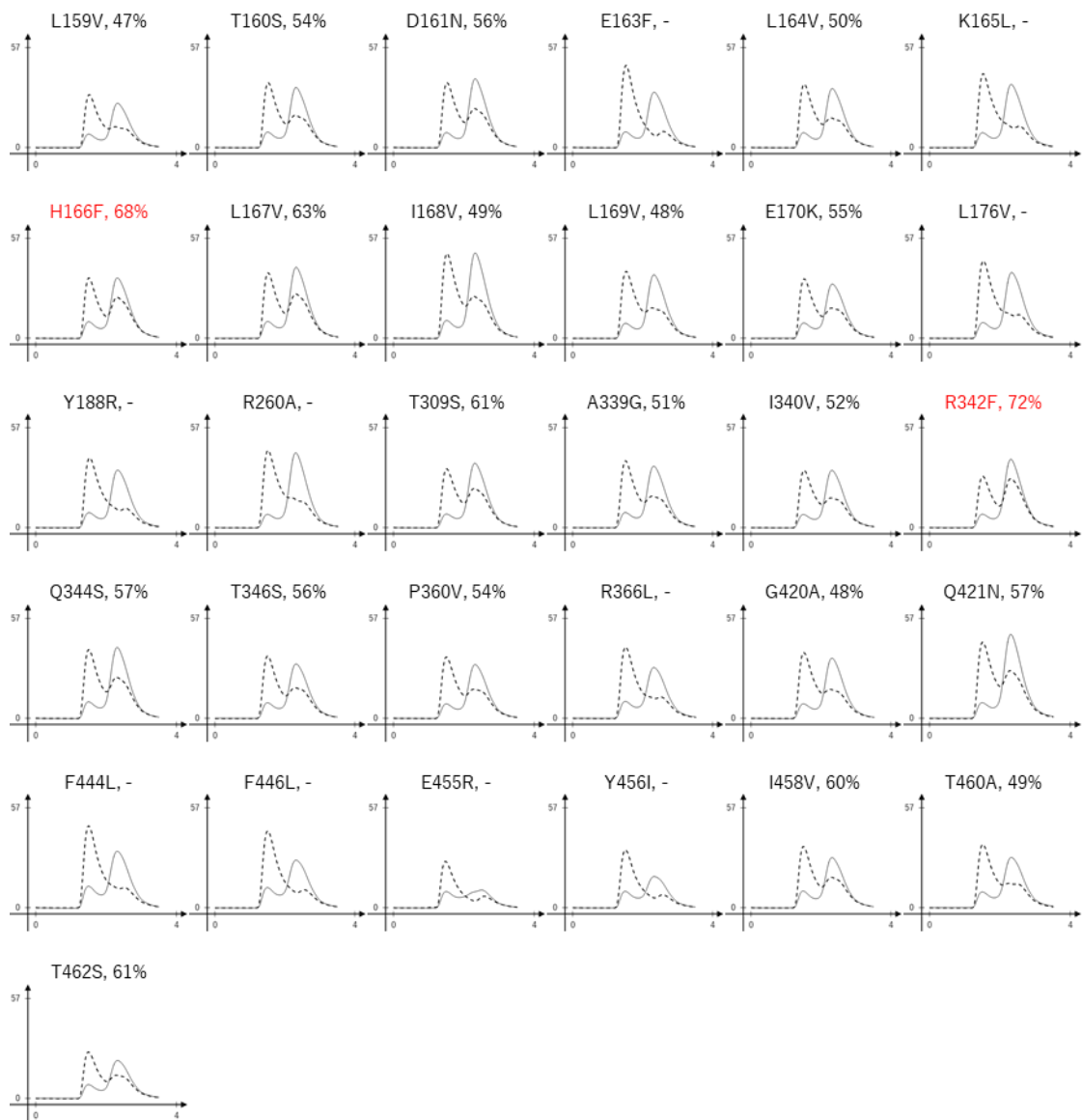


図 30 ARNT に 1 残基変異を導入した AhR/ARNT の熱安定性の評価

ARNT に 1 残基変異を導入した AhR/ARNT の破碎上清を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし、加熱前後のピークの蛍光強度を比較した。タンパク質の検出には EGFP の蛍光を用いた。横軸は Elution volume (mL)、縦軸は蛍光強度、実線及び破線はそれぞれ加熱前後のゲル濾過プロファイルを示す。グラフ上部の数値は加熱前に対する加熱後のピークの蛍光強度の比を示し、-は加熱後にピークが消失したものを示す。また、ピークの蛍光強度の比が 65%以上だったものを赤字で示した。

#### 3-4-4. 2 残基変異体の熱安定性の評価

前項で見出した熱安定化変異を 2 残基組み合わせで導入した発現ベクターの構築を試みた結果、表 10、表 11 の作製欄に○印を付したコンストラクトについて発現ベクターの作製に成功した(2-5-3-1 号参照)。作製できたコンストラクトの熱安定性を加熱前後におけるゲル濾過クロマトグラフィーのピークの蛍光強度の比で評価した(図 31、図 32、図 33) (方法は 2-5-3-2 号)。その結果、発現を確認できた変異体については全て加熱後のピークの蛍光強度が加熱前の 65%以上だったことから変異の組み合わせによる悪影響はないと判断した。また、ある変異について、さらに 1 残基変異を追加したコンストラクト(11 種類)の加熱前後におけるピークの蛍光強度の比を平均すると、1 残基変異の場合の蛍光強度比よりも高かったことから、2 残基変異を組み合わせることでさらに安定化されたと判断した。ただし、AhR の(E116R, Q149H)、(Q149H, Q156E)、(Q149H, N238Q)、(S151V, N238Q)、(Q156E, N238Q)、ARNT の(M115L, K128E)、(M115L, H166F)の変異体については細胞のコンタミネーションにより AhR/ARNT の発現を確認できなかった。また、AhR の(E116R, Q149H)の変異体についても十分な発現を確認できなかった。

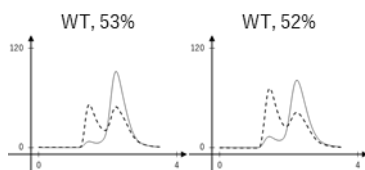
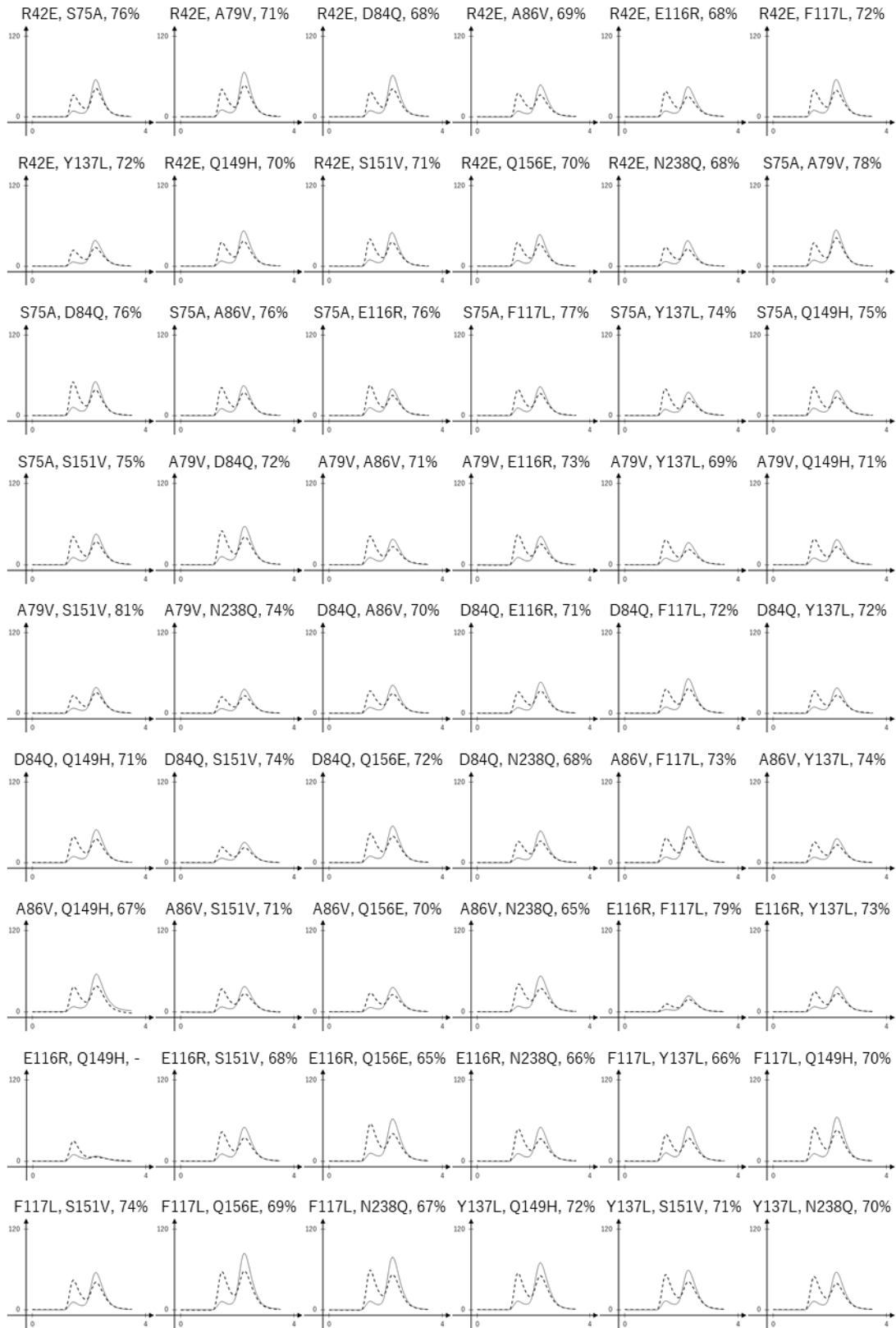


図 31 野生型 AhR/ARNT の熱安定性の評価

hAhR\_142/hARNT\_114 の破碎上清を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし、加熱前後のピークの蛍光強度を比較した。タンパク質の検出には EGFP の蛍光を用いた。横軸は Elution volume (mL)、縦軸は蛍光強度、実線及び破線はそれぞれ加熱前後のゲル濾過プロファイルを示す。グラフ上部の数値は加熱前に対する加熱後のピークの蛍光強度の比を示す。



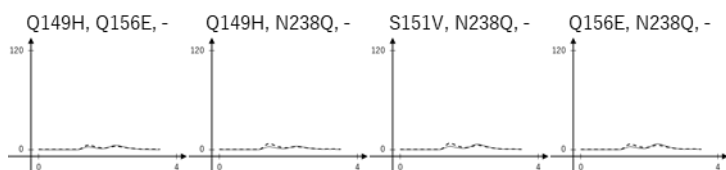


図 32 AhR に 2 残基変異を導入した AhR/ARNT の熱安定性の評価

AhR に 2 残基変異を導入した AhR/ARNT の破碎上清を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし、加熱前後のピークの蛍光強度を比較した。タンパク質の検出には EGFP の蛍光を用いた。横軸は Elution volume (mL)、縦軸は蛍光強度、実線及び破線はそれぞれ加熱前後のゲル濾過プロファイルを示す。グラフ上部の数値は加熱前に対する加熱後のピークの蛍光強度の比を示し、- は細胞のコンタミネーションによって AhR/ARNT の発現を確認できなかったものを示す。

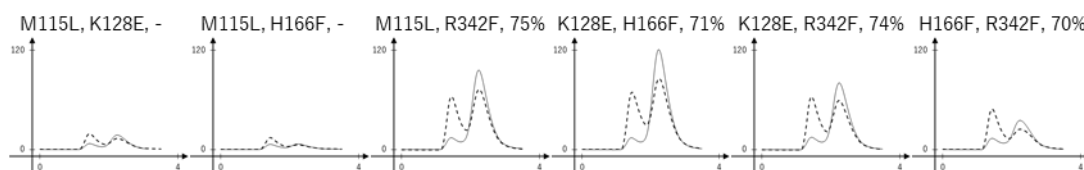


図 33 ARNT に 2 残基変異を導入した AhR/ARNT の熱安定性の評価

ARNT に 2 残基変異を導入した AhR/ARNT の破碎上清を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし、加熱前後のピークの蛍光強度を比較した。タンパク質の検出には EGFP の蛍光を用いた。横軸は Elution volume (mL)、縦軸は蛍光強度、実線及び破線はそれぞれ加熱前後のゲル濾過プロファイルを示す。グラフ上部の数値は加熱前に対する加熱後のピークの蛍光強度の比を示し、- は細胞のコンタミネーションによって AhR/ARNT の発現を確認できなかったものを示す。

#### 3-4-5. 熱安定化変異体の精製

3-4-3 項で見出した熱安定化変異を組み合わせ導入した変異体を作製し、昆虫細胞 Sf9 を用いて大量培養、精製を行い、高純度試料を得ることに成功した(図 34, 図 35, 表 33) (方法は 2-5-4-2 号)。

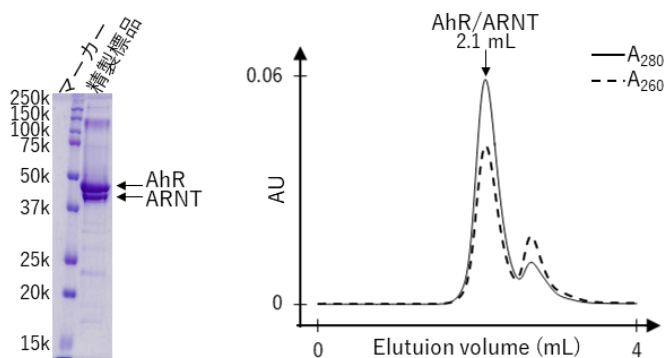


図 34 AhR に 4 残基, ARNT に 4 残基熱安定化変異を導入した AhR/ARNT 精製試料の純度の確認

hAhR\_314/hARNT\_212 の精製標品の SDS-PAGE (左)とゲル濾過プロファイル(右)を示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。

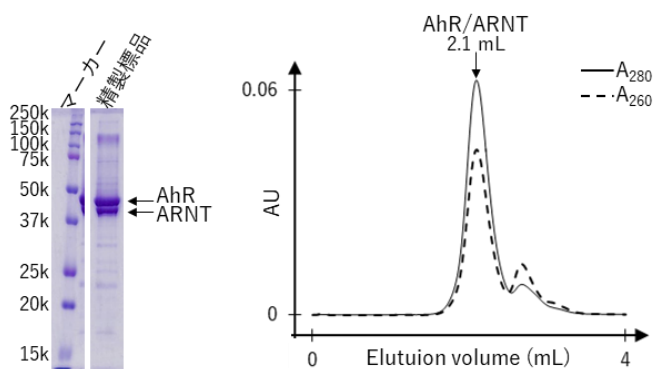


図 35 AhR に 12 残基, ARNT に 4 残基熱安定化変異を導入した AhR/ARNT 精製試料の純度の確認

hAhR\_315/hARNT\_212 の精製標品の SDS-PAGE (左)とゲル濾過プロファイル(右)を示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。

表 33 熱安定化変異体 AhR/ARNT の培地 1 L あたりの収量

AhR/ARNT	培地 1 L あたりの収量
hAhR_314/hARNT_212	3.8 mg
hAhR_315/hARNT_212	0.7 mg



### 3-4-6. 熱安定化変異体の熱安定性の評価

前項で得られた熱安定化変異体の精製試料を用いて熱安定性を評価した(図 36) (方法は 2-5-4-3号)。その結果, 野生型(hAhR\_3/hARNT\_9)では 55°Cで10分間加熱すると AhR/ARNT 由来のピークが消失したのに対して, 熱安定化変異体(hAhR\_314/hARNT\_212, hAhR\_315/hARNT\_212)では加熱後のピークの強度が加熱前の 60%以上残存しており, 熱安定性が向上していることが確認できた。

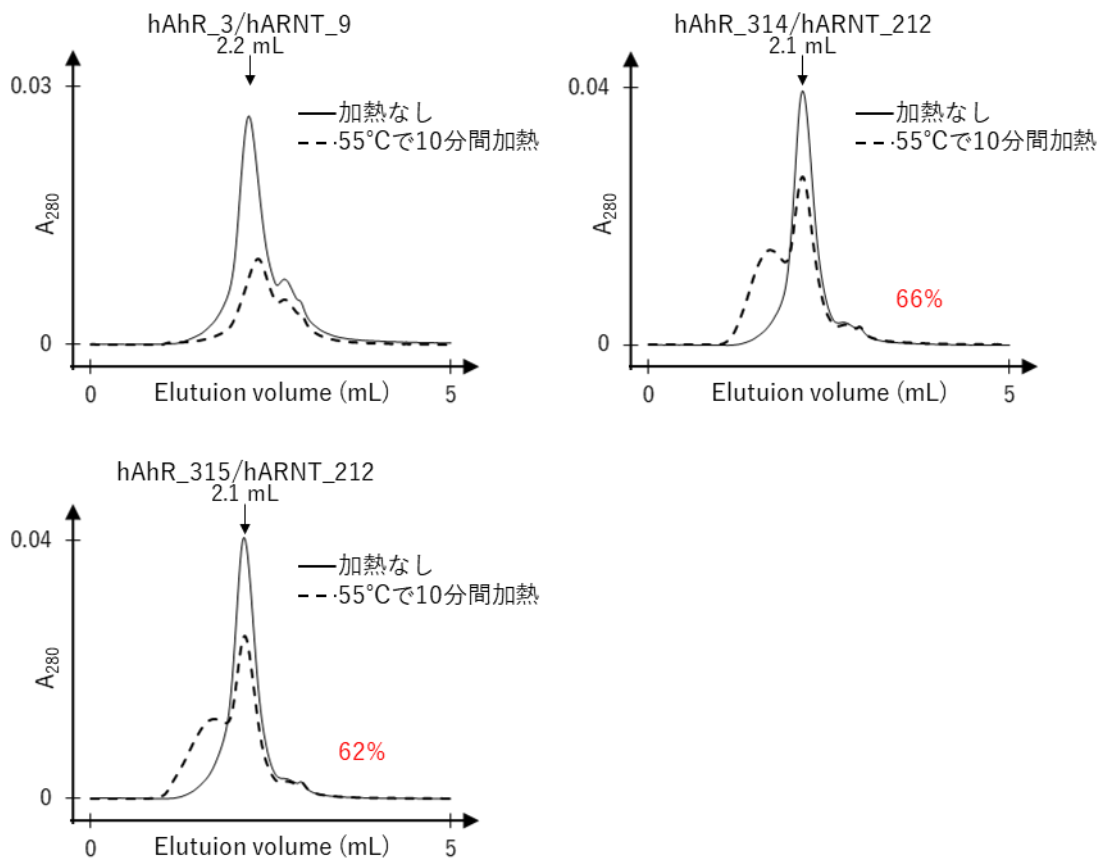


図 36 精製試料の熱安定性の評価

hAhR\_3/hARNT\_9, hAhR\_314/hARNT\_212, hAhR\_315/hARNT\_212 の精製試料を Superdex 200 Increase 5/150 GL にアプライし, 加熱前後のピークの強度を比較した。グラフ右部に加熱前に対する加熱後のピークの強度の比を示す。

### 3-5. 結晶化シャペロン NZ-1 との複合体

#### 3-5-1. 既存の方法による NZ-1 Fv-clasp の調製

大阪大学タンパク質研究所, 高木教授の研究室で確立された方法に従って NZ-1 Fv-clasp を調製した(図 37) (方法は 2-6-1-1 号)。SDS-PAGE の結果から, 精製試料には NZ-1 の V<sub>H</sub> と Mst1 kinase の SARAH 間のジスルフィド結合が形成されていないものが含まれていた。この方法で培地 1 L あたりの収量は約 0.4 mg だった。

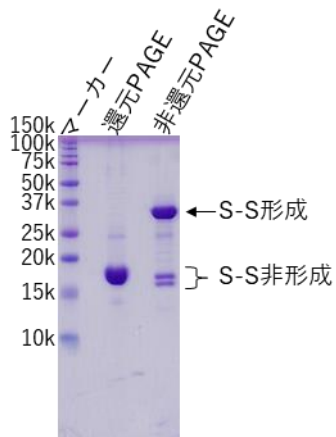


図 37 既存の方法で調製した NZ-1 Fv-clasp の精製試料の SDS-PAGE

### 3-5-2. リフォールディング条件の検討

前項の結果から既存の方法では収量が少ない、またリフォールディング時に大量の PA ペプチドが必要である(2-6-1-1 号参照)などの問題からリフォールディングの条件を検討した。まず、15 種類のバッファーを用いてリフォールディングし、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分析を行った(図 38) (方法は 2-6-1-2 号)。その結果、3 種類のバッファー(2, 9, 10)において Elution volume = 2.5~3.0 mL に NZ-1 Fv-clasp に相当する明瞭なピークが観察された。これら 3 種類のバッファーについて、スケールアップしてさらなる検討を行った(図 39) (方法は 2-6-1-2 号)。リフォールディング後、硫酸沈殿によってタンパク質を回収したが、バッファー10 を用いた試料は遠心によって沈殿を回収できなかった。これはバッファー10 の比重がタンパク質の比重を上回ったためであると考えられる。バッファー2, バッファー9 を用いた試料及び既存の方法でリフォールディングした試料を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。溶出フラクションの SDS-PAGE の結果、バッファー2 を用いた試料で既存の方法と同等のバンドが観察された。NZ-1 Fv-clasp のフラクションを回収したところ、既存の方法とバッファー2 で同等の収量(約 260  $\mu$ g)の NZ-1 Fv-clasp が得られた。次にバッファー2 について PA ペプチドの有無、リフォールディング時の温度、希釈の倍率を検討した(表 34) (方法は 2-6-1-2 号)。その結果、全ての条件で概ね収量に差がなかったため、条件 5 (PA ペプチドなし, 4°C, 20 倍希釈)でリフォールディングを行うこととした。

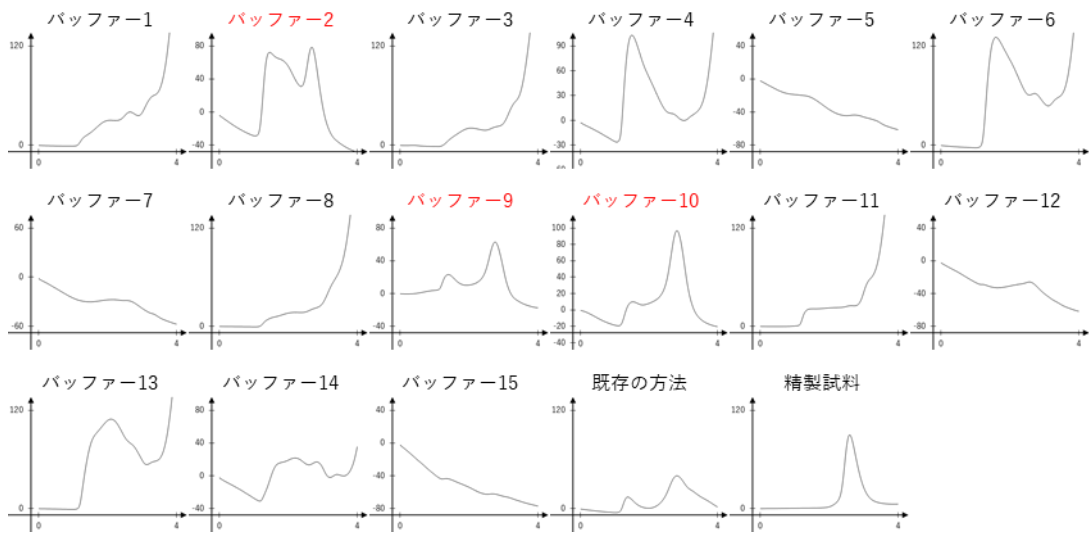


図 38 15 種類のバッファーによるリフォールディング条件の検討

可溶化後の試料をそれぞれのバッファーでリフォールディングした後のゲル濾過プロファイルを示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用い、トリプトファンの蛍光を検出した。横軸は Elution volume (mL), 縦軸は蛍光強度を示す。Elution volume = 2.5~3.0 mL に NZ-1 Fv-clasp に相当する明瞭なピークが観察されたバッファーを赤字で示した。

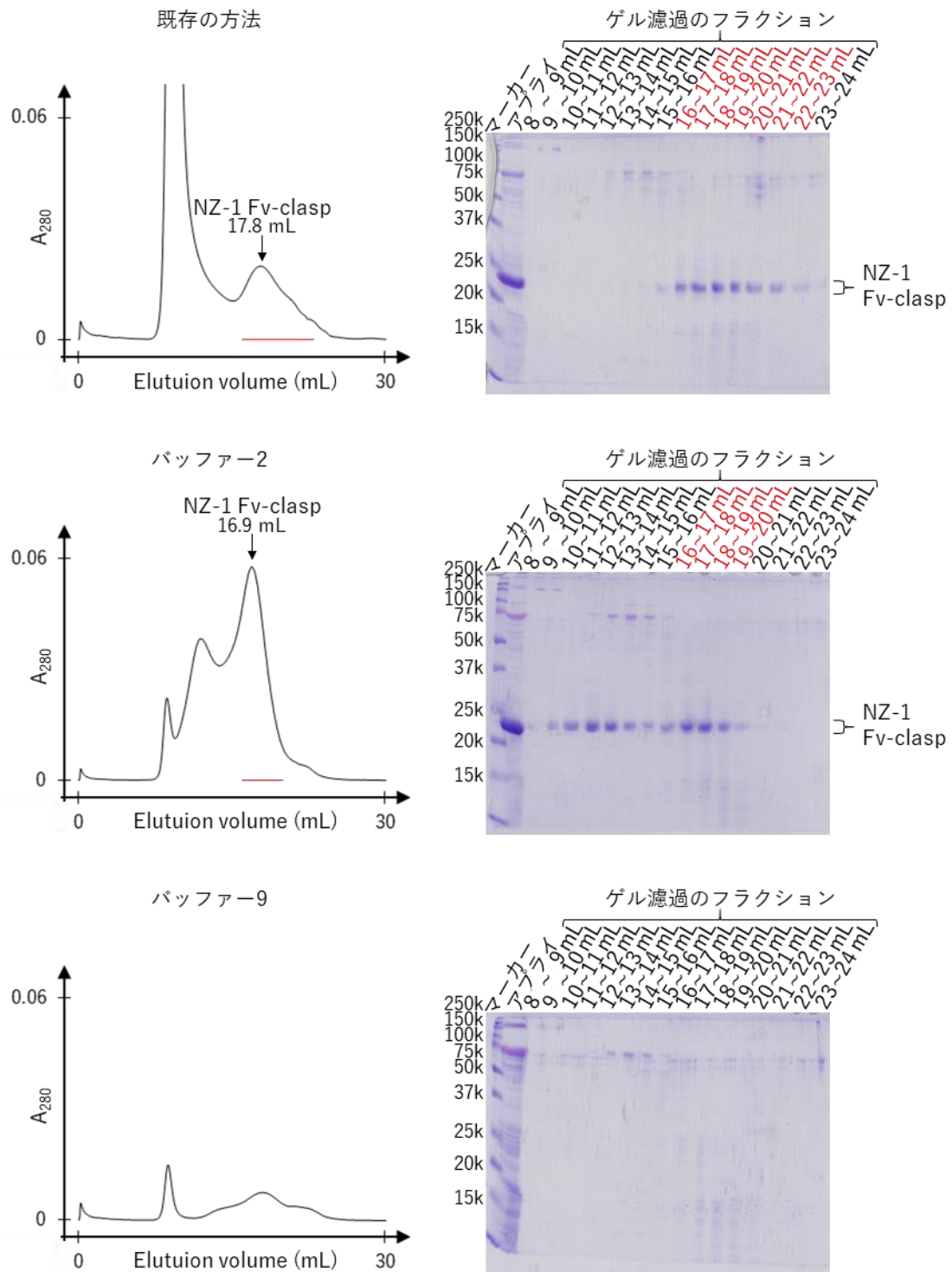


図 39 バッファーによるリフォールディング効率の比較

それぞれのバッファーによるリフォールディング後の試料のゲル濾過プロファイル(左)とそのフラクションの SDS-PAGE (右)を示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 prep grade (24 mL)カラムを用いた。赤線及び赤字のフラクションを分取し収量を比較した。

表 34 リフォールディングバッファー2 を用いた詳細な検討

条件	PA ペプチド	温度	希釈の倍率	収量
1	0.131 mg/mL	20°C	20 倍	250 µg
2	0.013 mg/mL	20°C	20 倍	240 µg
3	-	20°C	20 倍	250 µg
4	0.013 mg/mL	4°C	20 倍	270 µg
5	-	4°C	20 倍	260 µg
6	0.013 mg/mL	20°C	100 倍	340 µg
7	-	20°C	100 倍	320 µg
8	-	4°C	100 倍	270 µg

その後のリフォールディング方法に採用した条件を赤字で示した。

### 3-5-3. 発現コンストラクトの検討

リフォールディング効率の上昇を目的として、タグをなくしたコンストラクトを作製し、タグを有するコンストラクトと発現量を比較した(図 40) (方法は 2-6-1-3 号)。その結果, Fv\_3 (V<sub>H</sub>, タグ無し)は#4999 (V<sub>H</sub>, タグ有り)と同等の発現量だったが, Fv\_4 (V<sub>L</sub>, タグ無し)は#5001 (V<sub>L</sub>, タグ有り)と比較して著しく発現量が低下した。この結果から, 以降の実験では Fv\_3 と#5001 を発現ベクターとして用いた。

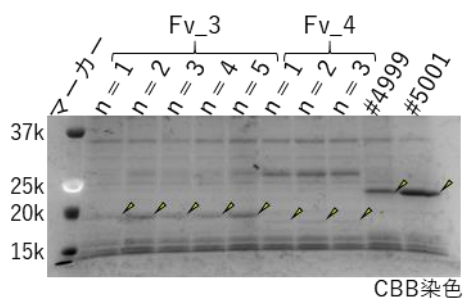


図 40 タグ配列を除いた NZ-1 Fv-clasp の発現確認の SDS-PAGE

菌体の SDS-PAGE を示す。目的タンパク質のバンドを黄色い矢印で示した。

#### 3-5-4. 新規方法による NZ-1 Fv-clasp の調製

3-5-2 項及び前項の結果を踏まえて、新しく確立した調製方法によって NZ-1 Fv-clasp を調製した(図 41) (方法は 2-6-1-4 号)。この方法では培地 1 L あたりの収量は約 4 mg であり、既存の方法と比較して約 10 倍収量が増加した。また、既存の方法ではリフォールディングの際に大量の PA ペプチドを必要としたが(2-6-1-1 号参照)、新しく確立した調製方法では PA ペプチドなしでリフォールディングできるようになった。

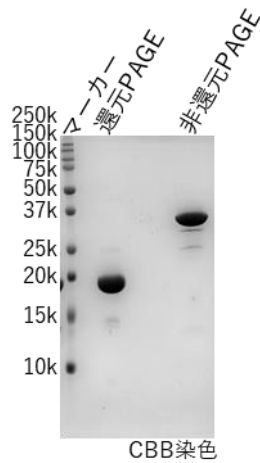


図 41 新規方法で調製した NZ-1 Fv-clasp の精製試料の SDS-PAGE

### 3-5-5. HEK293 細胞を用いた PA ペプチド挿入位置のスクリーニング

1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR, ARNT の HEK293 細胞発現用ベクターの構築を試みた結果, 表 17 の作製欄に○印を付したコンストラクトについて発現ベクターの作製に成功した(2-6-2-1 号参照)。作製したコンストラクトの発現量及び NZ-1 結合能をウェスタンブロッティングのバンドの濃さで評価した(図 42, 表 35) (方法は 2-6-2-2 号)。その結果, 図 42 及び表 35 の赤字で示したコンストラクトについて良好な発現と NZ-1 結合能が確認できた。

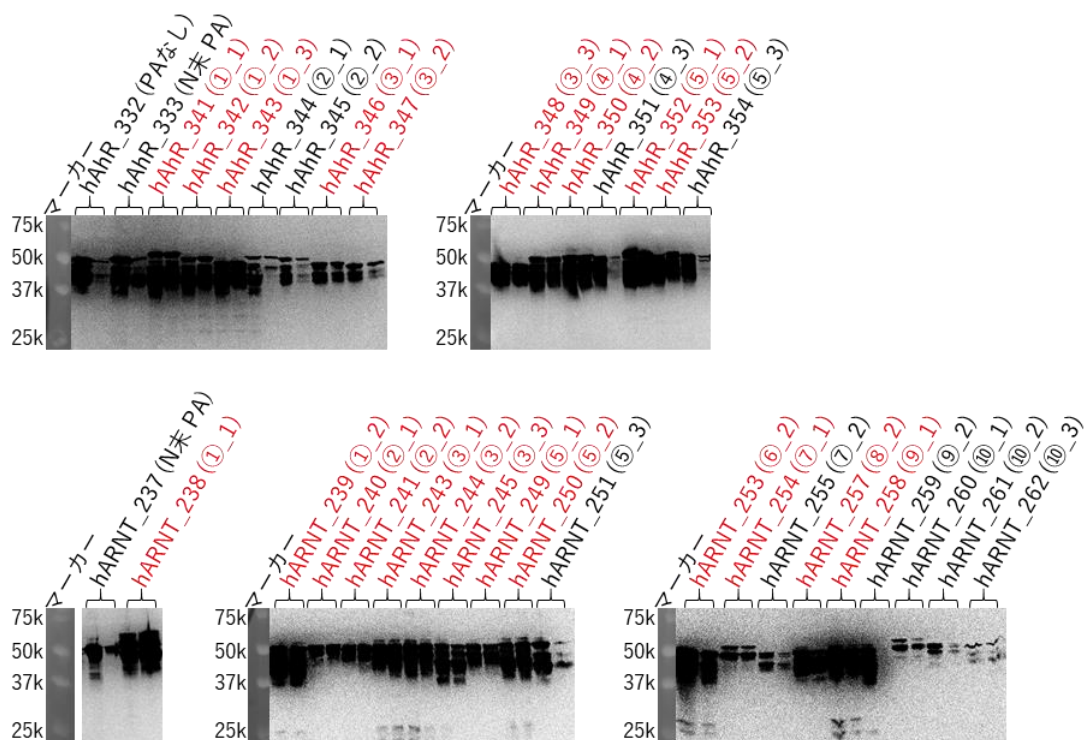


図 42 1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT の発現量及び NZ-1 結合能の評価

1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT について, Ni-NTA Agarose (それぞれのコンストラクトの左側のレーン)及び NZ-1 固定化セファロースレジン(それぞれのコンストラクトの右側のレーン)で精製後のウェスタンブロッティングを示す。ウェスタンブロッティングは Flag タグを用いて行った。括弧内は PA ペプチド挿入位置を示す。また, 良好な発現と NZ-1 結合能が確認できたコンストラクトを赤字で示した。



表 35 1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT の発現量及び NZ-1 結合能

名前	挿入位置	作製	発現	NZ-1 結合
hAhR_341	①_1	○	○	○
hAhR_342	①_2	○	○	○
hAhR_343	①_3	○	○	○
hAhR_344	②_1	○	△	○
hAhR_345	②_2	○	△	△
hAhR_346	③_1	○	○	○
hAhR_347	③_2	○	○	○
hAhR_348	③_3	○	○	○
hAhR_349	④_1	○	○	○
hAhR_350	④_2	○	○	○
hAhR_351	④_3	○	○	×
hAhR_352	⑤_1	○	○	○
hAhR_353	⑤_2	○	○	○
hAhR_354	⑤_3	○	○	×
hARNT_238	①_1	○	○	○
hARNT_239	①_2	○	○	○
hARNT_240	②_1	○	○	○
hARNT_241	②_2	○	○	○
hARNT_242	②_3	×	-	-
hARNT_243	③_1	○	○	○
hARNT_244	③_2	○	○	○
hARNT_245	③_3	○	○	○
hARNT_246	④_1	×	-	-
hARNT_247	④_2	×	-	-
hARNT_248	④_3	×	-	-
hARNT_249	⑤_1	○	○	○
hARNT_250	⑤_2	○	○	○
hARNT_251	⑤_3	○	○	×
hARNT_252	⑥_1	×	-	-
hARNT_253	⑥_2	○	○	○
hARNT_254	⑦_1	○	○	○
hARNT_255	⑦_2	○	○	△
hARNT_256	⑧_1	×	-	-
hARNT_257	⑧_2	○	○	○
hARNT_258	⑨_1	○	○	○
hARNT_259	⑨_2	○	○	×
hARNT_260	⑩_1	○	△	△
hARNT_261	⑩_2	○	△	△
hARNT_262	⑩_3	○	△	△

良好な発現と NZ-1 結合能が確認できたコンストラクトを赤字で示した。

### 3-5-6. PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の精製

PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT の高純度試料を得ることに成功した(図 43, 表 36) (方法は 2-6-3-2 号)。ただし, hAhR\_364/hARNT\_11, hAhR\_365/hARNT\_11 の組み合わせについては十分な発現が確認できず, 高純度試料を得ることができなかった。スモールスケールでの予備実験では他のコンストラクトと同等の発現が確認できていたため, ウイルス液の不調によるものだと考えられる。

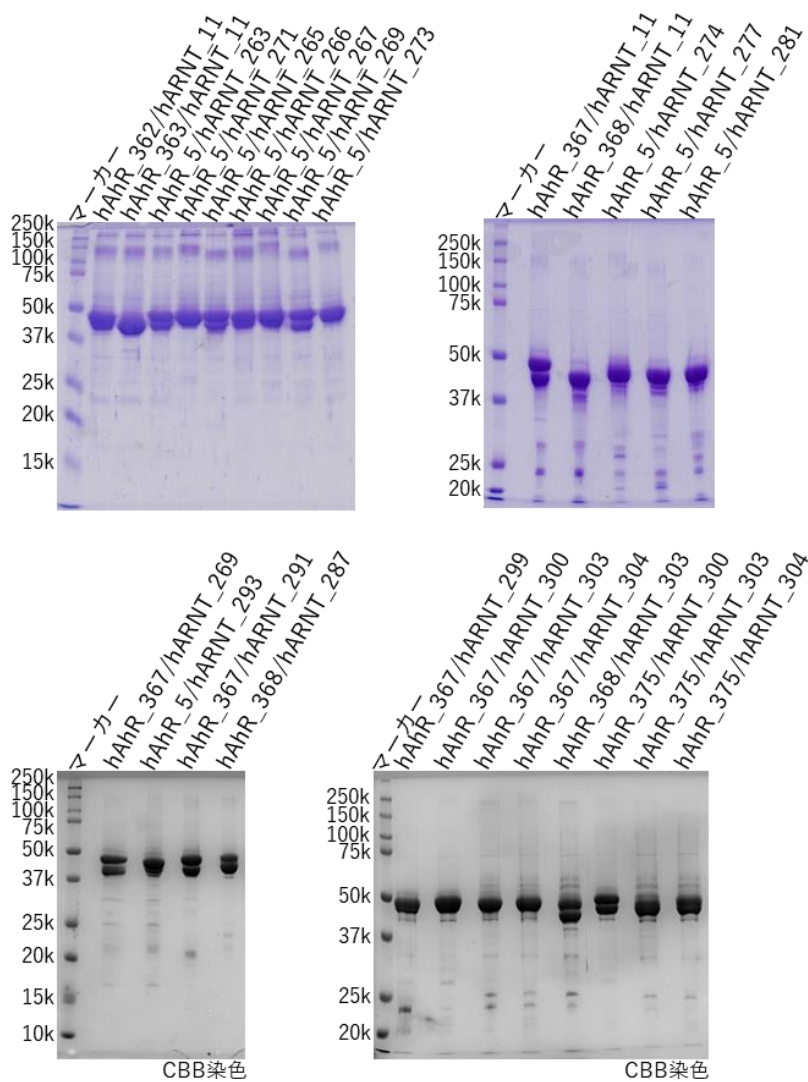


図 43 PA ペプチド挿入 AhR/ARNT 精製試料の SDS-PAGE

表 36 PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の培地 1 L あたりの収量

AhR/ARNT	挿入か所合計	培地 1 L あたりの収量
hAhR_367/hARNT_11	1	4.2 mg
hAhR_362/hARNT_11	1	2.2 mg
hAhR_368/hARNT_11	1	3.8 mg
hAhR_363/hARNT_11	1	2.2 mg
hAhR_5/hARNT_274	1	2.1 mg
hAhR_5/hARNT_263	1	2.3 mg
hAhR_5/hARNT_271	1	1.3 mg
hAhR_5/hARNT_277	1	2.5 mg
hAhR_5/hARNT_265	1	2.1 mg
hAhR_5/hARNT_281	1	2.0 mg
hAhR_5/hARNT_266	1	1.3 mg
hAhR_5/hARNT_267	1	0.7 mg
hAhR_5/hARNT_269	1	0.8 mg
hAhR_5/hARNT_273	1	0.8 mg
hAhR_367/hARNT_269	2	0.8 mg
hAhR_5/hARNT_293	2	1.2 mg
hAhR_367/hARNT_291	3	1.8 mg
hAhR_368/hARNT_287	3	2.8 mg
hAhR_367/hARNT_299	4	2.6 mg
hAhR_367/hARNT_300	4	2.8 mg
hAhR_367/hARNT_303	5	0.8 mg
hAhR_367/hARNT_304_2	5	0.8 mg
hAhR_368/hARNT_303	5	1.0 mg
hAhR_375/hARNT_300	5	2.9 mg
hAhR_375/hARNT_303	6	1.1 mg
hAhR_375/hARNT_304_2	6	1.3 mg

### 3-5-7. 精製試料を用いた NZ-1 結合能の評価

前項で得られた PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の精製試料を用いて NZ-1 との結合試験を行った(図 44, 図 45, 図 46) (方法は 2-6-3-3 号)。1 か所に PA ペプチドを挿入したコンストラクトと NZ-1 との結合実験の結果, NZ-1 Fab との結合試験では実験した全てのコンストラクトにおいて, AhR/ARNT と NZ-1 Fab を混合した試料で NZ-1 Fab 由来のピークが減少し, AhR/ARNT に比べて溶出体積が小さくなったことから, AhR/ARNT は NZ-1 Fab と結合したと判断した(図 44)。一方で, NZ-1 Fv-clasp との結合試験では NZ-1 Fv-clasp 由来のピークの減少や溶出体積の減少が明瞭に観察できず, 結合が確認できないコンストラクトが複数存在した(図 45)。それらのペプチド挿入位置については挿入位置のループを長く

することで NZ-1 Fv-clasp との結合能が確認できたものもあった(3-5-8 項参照)。

複数か所に PA ペプチドを挿入したコンストラクトについては, 挿入か所を増やすにつれて 溶出体積が小さくなったことから挿入か所数に対応した NZ-1 Fv-clasp が結合したと考えられる(図 46)。

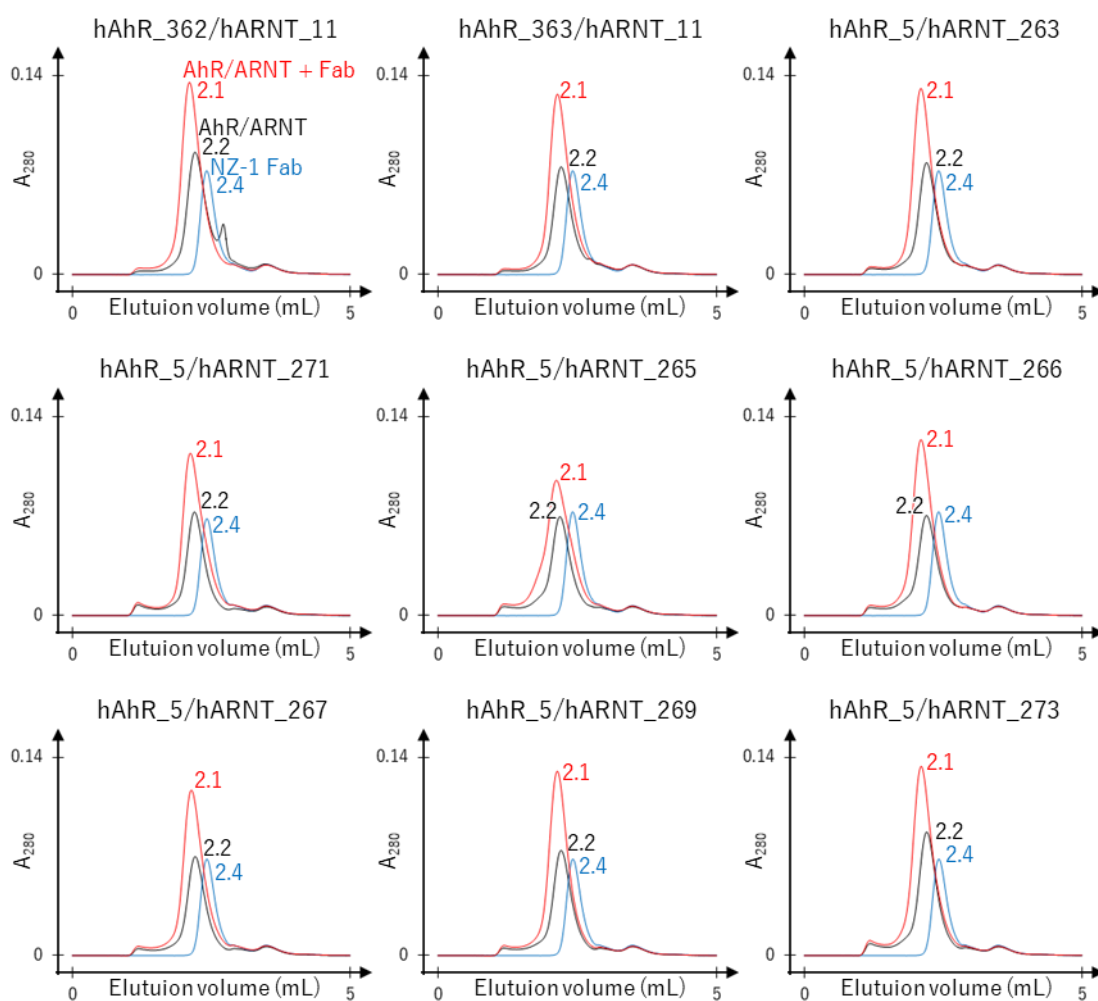


図 44 PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の NZ-1 Fab との結合能の評価

PA ペプチド挿入 AhR/ARNT (黒線), NZ-1 Fab (青線), それらを混合した試料(赤線)のゲル濾過プロファイルを示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。グラフ中の数値はピークトップの Elution volume を示す。

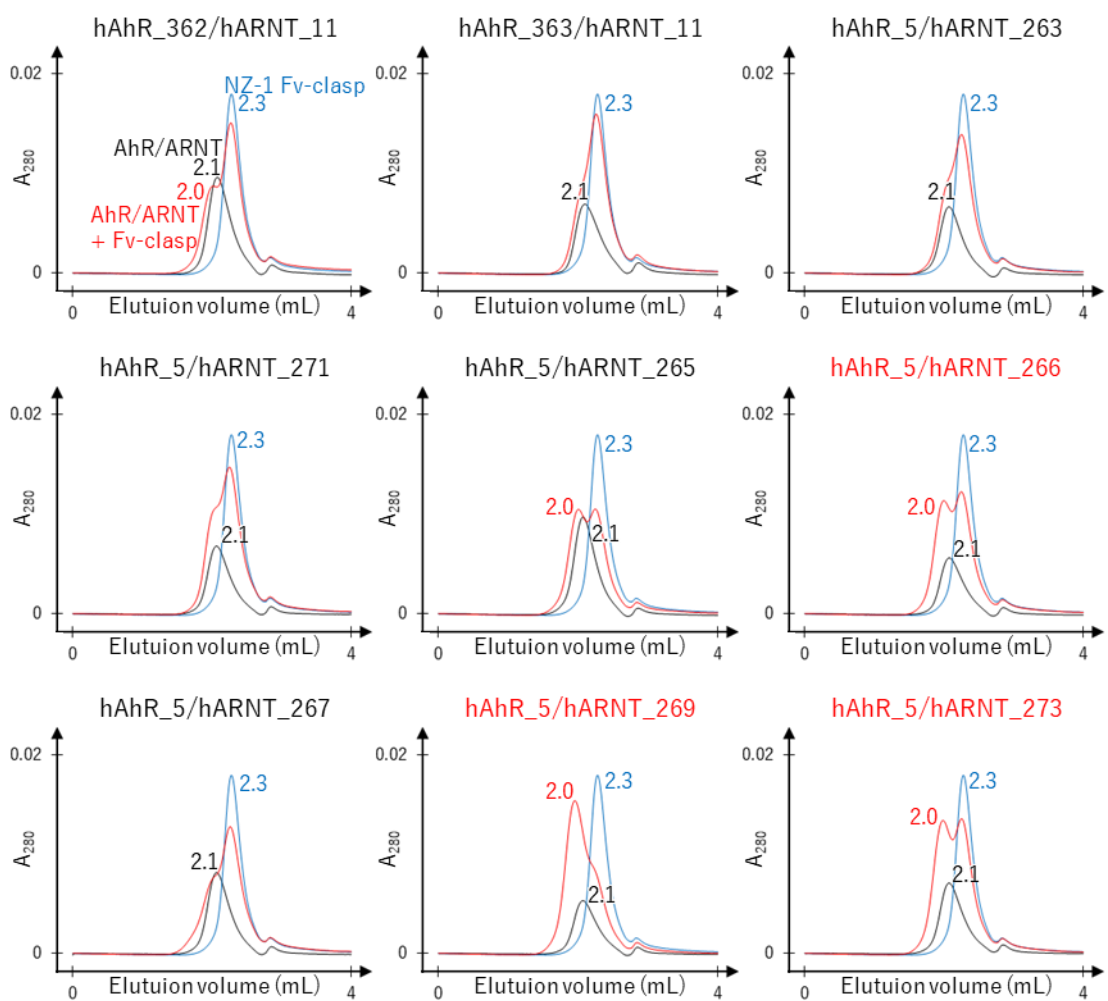


図 45 PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の NZ-1 Fv-clasp との結合能の評価①

PA ペプチド挿入 AhR/ARNT (黒線), NZ-1 Fv-clasp (青線), それらを混合した試料(赤線)のゲル濾過プロファイルを示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。グラフ中の数値はピークトップの Elution volume を示す。また、結合が確認できたコンストラクトを赤字で示した。

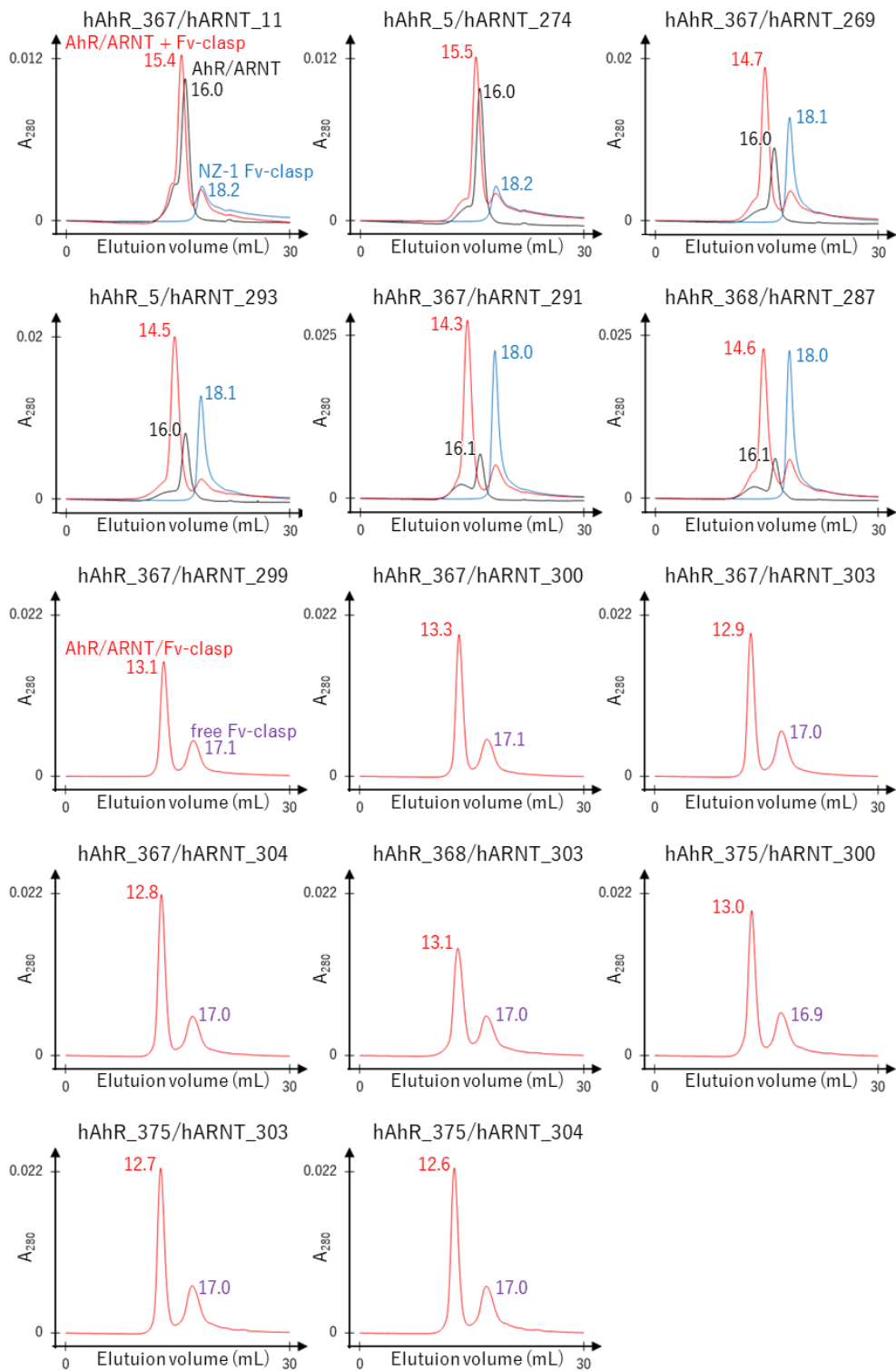


図 46 PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の NZ-1 Fv-clasp との結合能の評価②

PA ペプチド挿入 AhR/ARNT (黒線), NZ-1 Fv-clasp (青線), それらを混合した試料(赤線)のゲル濾過プロファイルを示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いた。グラフ中の数値はピークの Elution volume を示す。

### 3-5-8. スモールスケールでの発現と NZ-1 Fv-clasp 結合能の評価

前項の結果から、1か所に PA ペプチドを挿入した AhR/ARNT で NZ-1 Fv-clasp との結合が確認できなかったものが複数存在した。そこで挿入位置のループを長くした AhR/ARNT についてスモールスケールで発現させ、NZ-1 Fv-clasp との結合試験を行った(図 47, 図 48, 表 37) (方法は 2-6-3-4 号)。なお、hAhR\_371/hARNT\_11 は Ni-NTA による精製後の収量が少なく、ゲル濾過クロマトグラフィーで明瞭なピークが観測されなかったため、それ以外のコンストラクトについて NZ-1 Fv-clasp との結合能を評価した。その結果、前項において NZ-1 Fv-clasp との結合が確認できなかった PA ペプチド挿入位置の中で、挿入位置のループを長くすることで NZ-1 Fv-clasp との結合が確認できたものが複数あった。前項の結果と合わせて、それぞれの PA ペプチド挿入位置について、NZ-1 Fab または NZ-1 Fv-clasp との結合能を表 37 にまとめた。NZ-1 Fv-clasp との結合を確認できたペプチド挿入位置の中で、赤字で示した挿入位置を組み合わせたコンストラクトを作製した(2-6-3-1 号参照)。

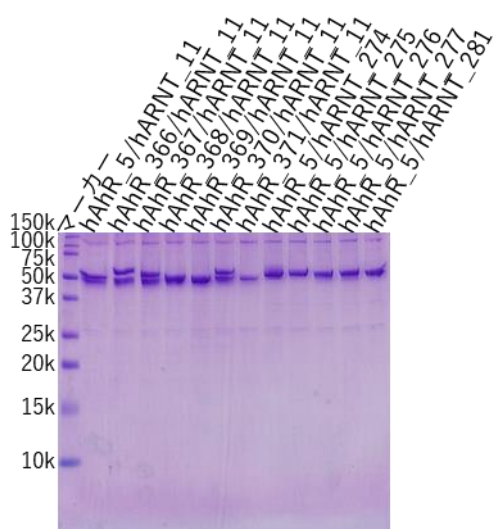


図 47 ループを長くした PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の発現確認

ループを長くした PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の Ni-NTA Agarose による精製後の SDS-PAGE を示す。

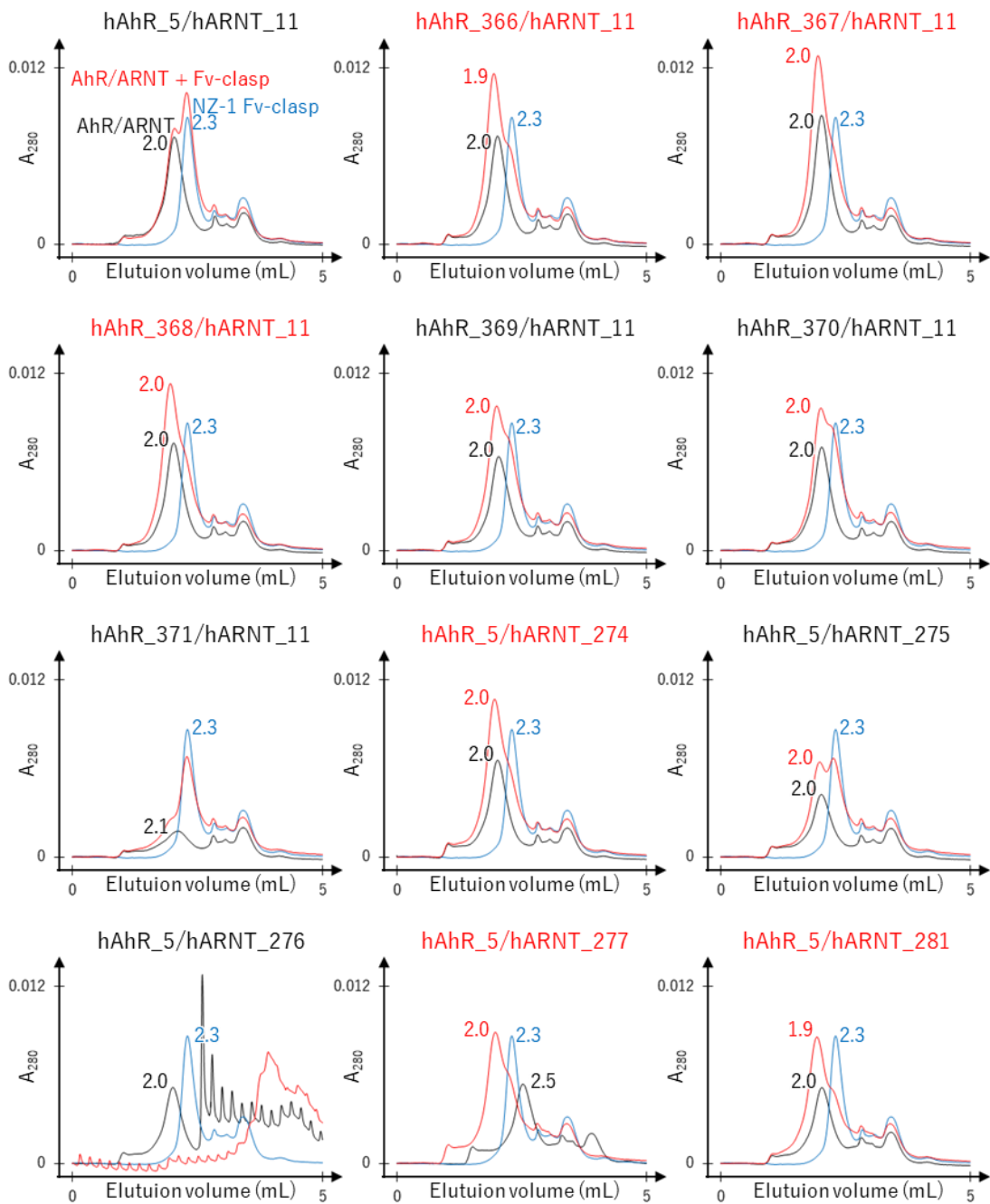


図 48 スモールスケールでの PA ペプチド挿入 AhR/ARNT の NZ-1 Fv-clasp との結合能の評価

PA ペプチド挿入 AhR/ARNT (黒線), NZ-1 Fv-clasp (青線), それらを混合した試料(赤線)のゲル濾過プロファイルを示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。グラフ中の数値はピークトップの Elution volume を示す。結合が確認できたコンストラクトを赤字で示した。hAhR\_5/hARNT\_276, hAhR\_5/hARNT\_277 についてはカラムにエアーが入りプロファイルが乱れた。



表 37 1 か所に PA ペプチドを挿入した AhR, ARNT と NZ-1 の結合能のまとめ

名前	挿入位置	発現	Fab 結合	Fv-clasp 結合	大量培養	スモールスケール
hAhR_366	①_1	○	-	○		✓
<b>hAhR_367</b>	<b>①_2</b>	○	-	○	✓	✓
hAhR_362	①_3	○	○	×	✓	
<b>hAhR_368</b>	<b>③_1</b>	○	-	○	✓	✓
hAhR_369	③_2	○	-	△		✓
hAhR_363	③_3	○	○	×	✓	
hAhR_370	④_1	○	-	△		✓
hAhR_364	④_2	?	-	-	✓	
hAhR_371	⑤_1	×	-	-		✓
hAhR_365	⑤_2	?	-	-	✓	
<b>hARNT_274</b>	<b>①_1</b>	○	-	○	✓	✓
hARNT_263	①_2	○	○	×	✓	
hARNT_275	②_1	○	-	△		✓
hARNT_271	②_2	○	○	×	✓	
hARNT_276	③_1	○	-	?		✓
<b>hARNT_277</b>	<b>③_2</b>	○	-	○	✓	✓
hARNT_265	③_3	○	○	△	✓	
<b>hARNT_281</b>	<b>⑤_1</b>	○	-	○	✓	✓
hARNT_266	⑤_2	○	○	○	✓	
hARNT_267	⑥_2	○	○	×	✓	
hARNT_272	⑦_1	×	-	-		
<b>hARNT_269</b>	<b>⑧_2</b>	○	○	○	✓	
<b>hARNT_273</b>	<b>⑨_1</b>	○	○	○	✓	

それぞれの PA ペプチド挿入位置について発現及び NZ-1 結合能をまとめた。正確に評価できなかったものについては?印で示し、大量培養またはスモールスケールでの実験を行ったコンストラクトについては✓印で示した。また、複数か所を組み合わせで挿入したペプチド挿入位置を赤字で示した。

### 3-5-9. NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製

3-5-6 項で得られた PA ペプチド挿入 AhR/ARNT と NZ-1 Fv-clasp の複合体をゲル濾過クロマトグラフィーまたは陰イオン交換クロマトグラフィーで調製した(図 49, 図 50, 図 51) (方法は 2-6-4 項)。ペプチド挿入か所の数異なる複合体試料についてゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果, 挿入か所が増えるにつれて溶出体積が小さくなっており, 挿入か所数に対応した NZ-1 Fv-clasp が結合したと考えられる(図 52)。

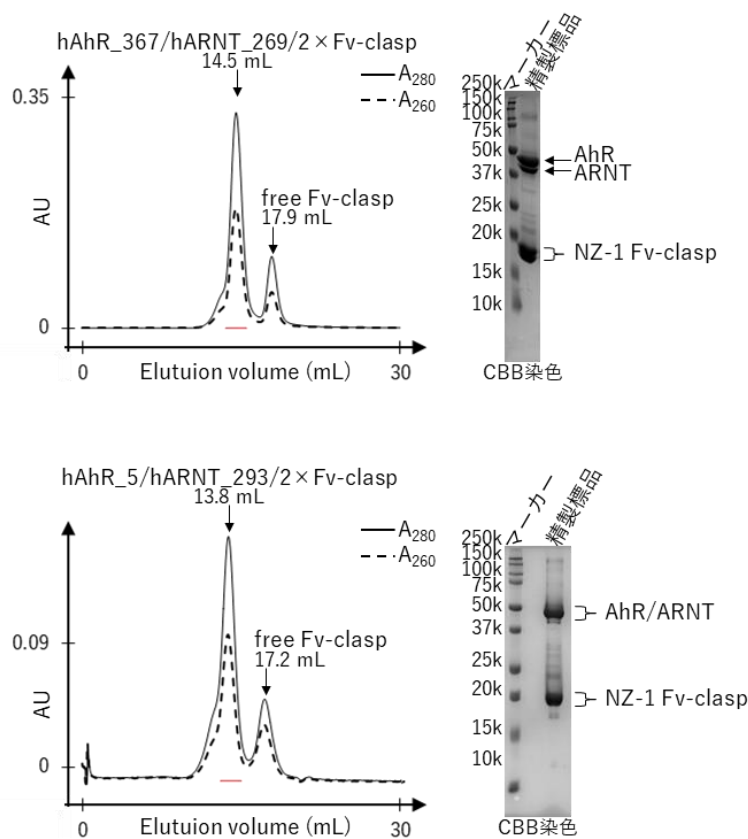
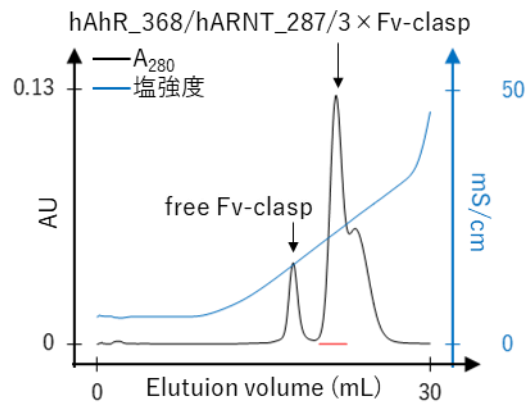
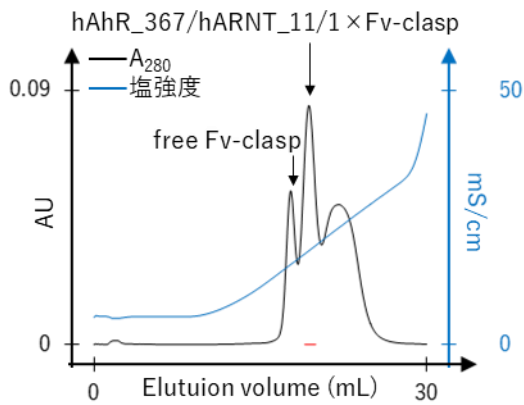
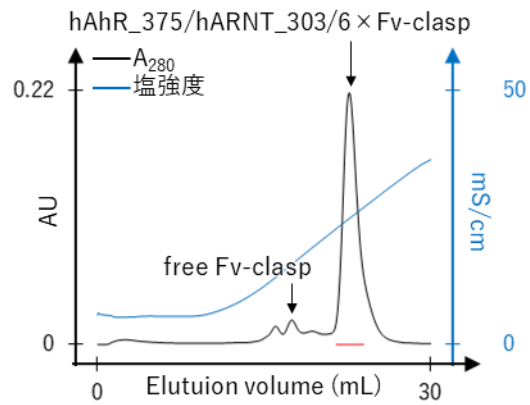
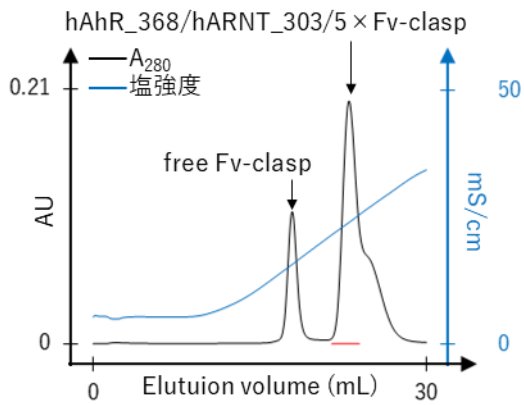
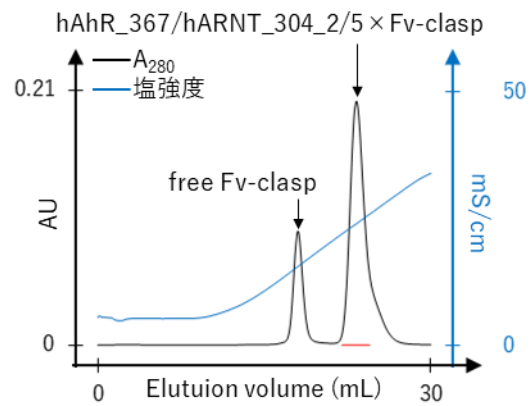
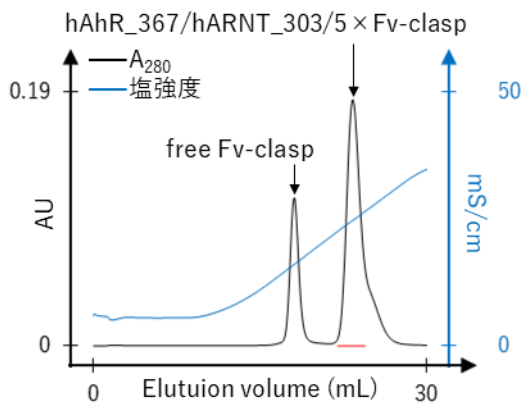
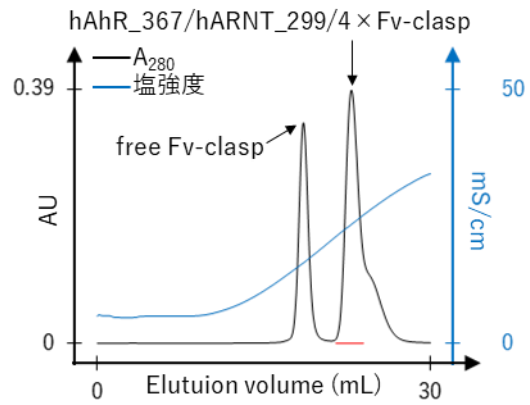
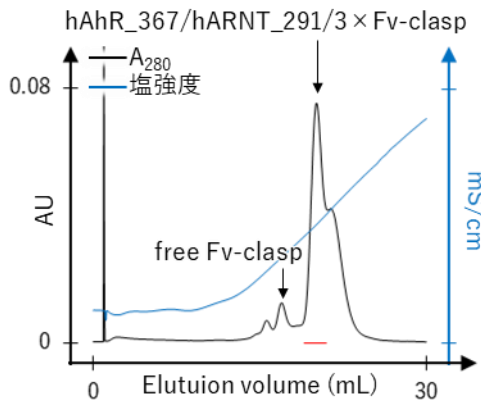


図 49 ゲル濾過クロマトグラフィーによる NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製

PA ペプチド挿入 AhR/ARNT と NZ-1 Fv-clasp を混合し Superdex 200 Increase 10/300 GL にアプライした際のゲル濾過プロファイル(左)と精製標品の SDS-PAGE (右)を示す。赤線のフラクションを分取することで AhR/ARNT/NZ-1 Fv-clasp 複合体試料とした。



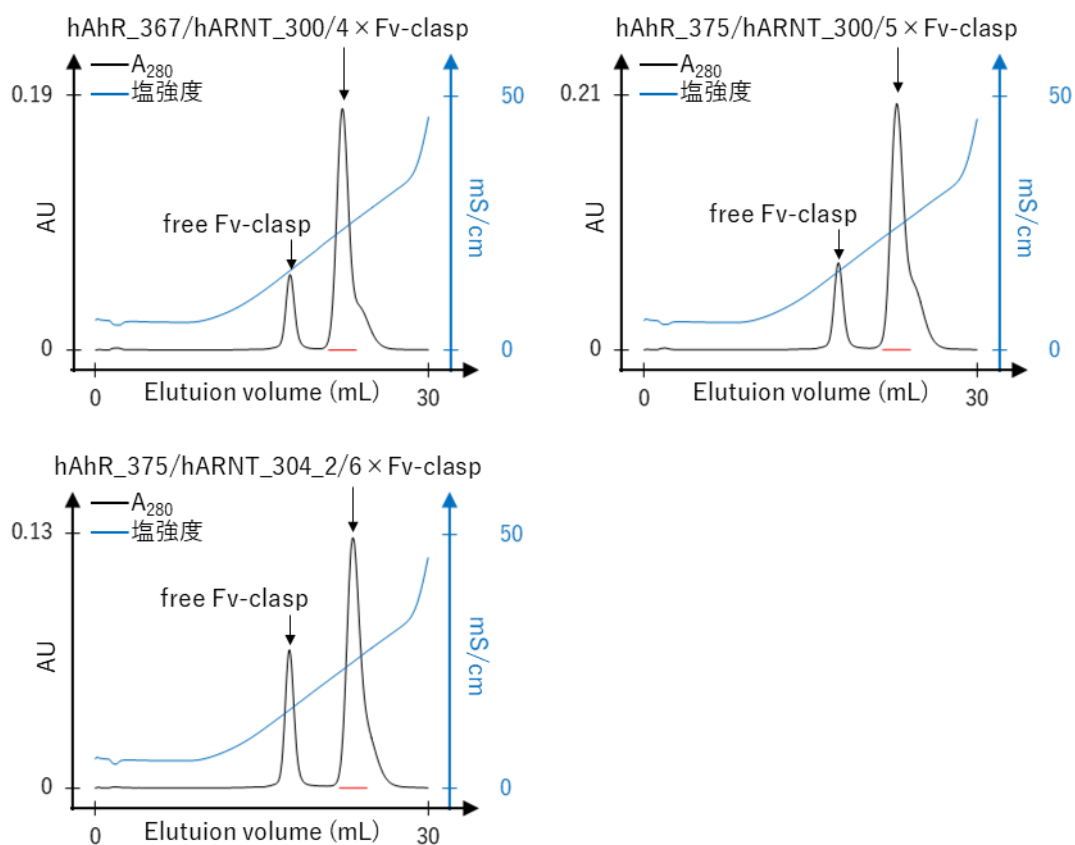


図 50 陰イオン交換クロマトグラフィーによる NZ-1 Fv-clasp 複合体の調製

PA ペプチド挿入 AhR/ARNT と NZ-1 Fv-clasp を混合し HiTrap Q HP (1 mL) にアプライした際の溶出プロファイルを示す。赤線のフラクションを分取することで AhR/ARNT/NZ-1 Fv-clasp 複合体試料とした。

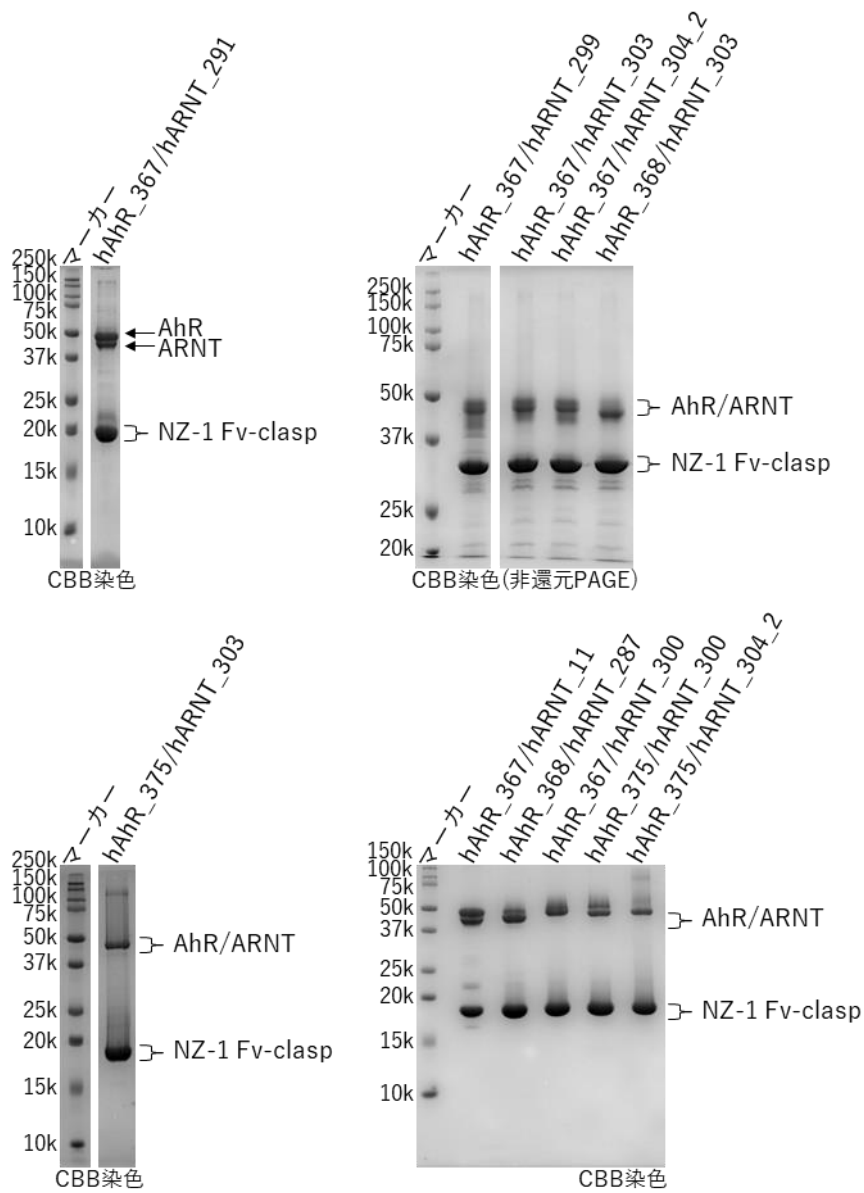


図 51 陰イオン交換クロマトグラフィーによって調製した NZ-1 Fv-clasp 複合体の SDS-PAGE

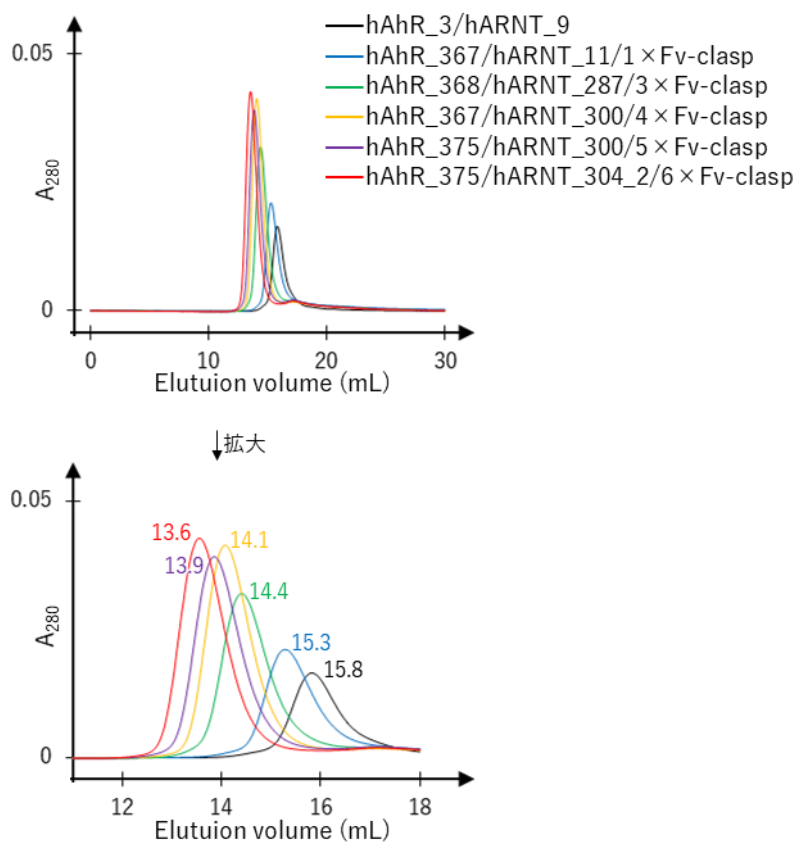


図 52 AhR/ARNT/NZ-1 Fv-clasp のゲル濾過プロファイル

ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 10/300 GL を用いた。グラフ中の数値はピークトップの Elution volume を示す。

### 3-6. 結晶化に向けたその他の検討

#### 3-6-1. 変異を組み合わせた AhR/ARNT

ループ欠損変異及び熱安定化変異を組み合わせて導入し、N 末端の basic region を欠損させたコンストラクトについて大量培養，精製を行った(図 53, 表 38) (方法は 2-7-1-2 号)。

SDS-PAGE の結果，いくつかの精製試料では ARNT に比べて AhR のバンドが薄く，1 : 1 の複合体になっていないことが示唆された。

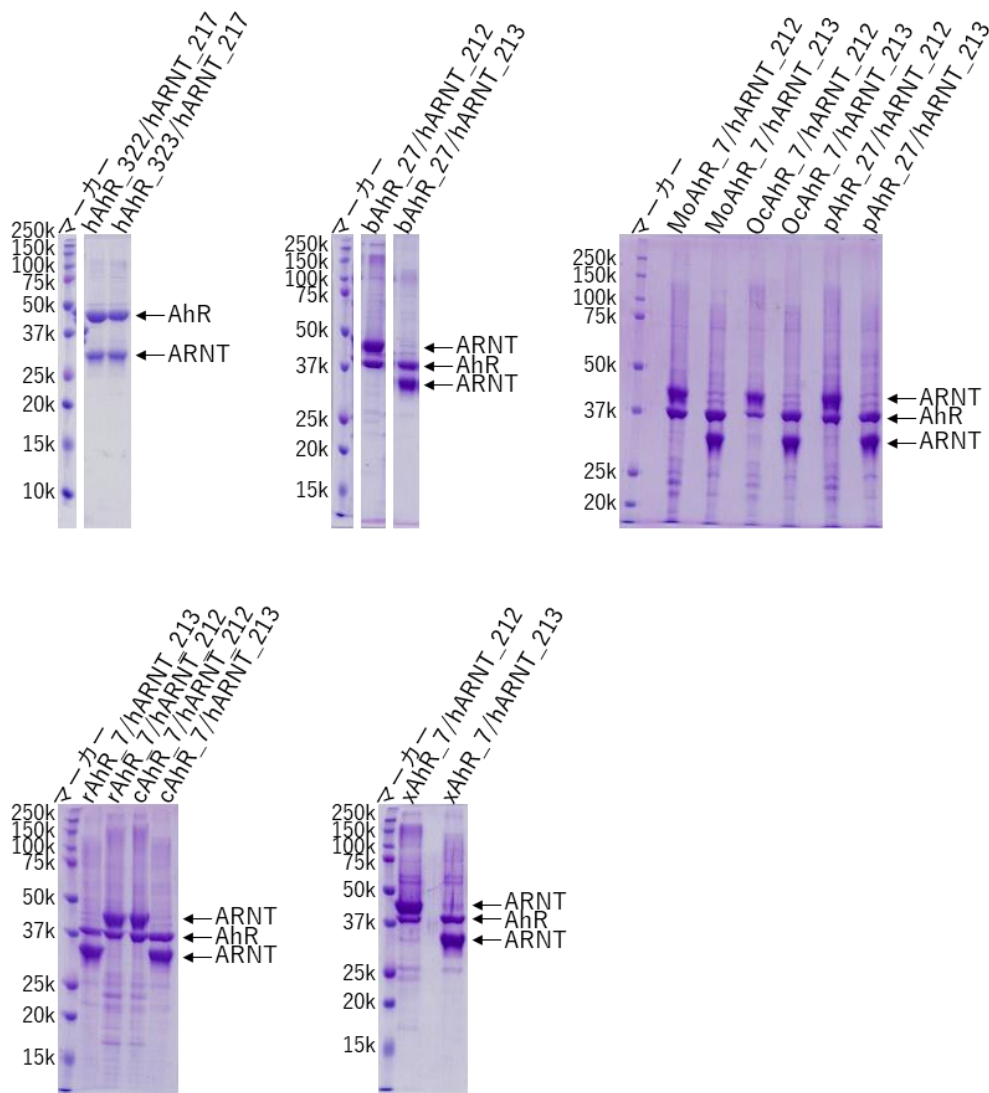


図 53 変異を組み合わせた AhR/ARNT 精製試料の SDS-PAGE

表 38 変異を組み合わせた AhR/ARNT の培地 1 L あたりの収量

AhR/ARNT	培地 1 L あたりの収量
hAhR_322/hhRNT_217	0.7 mg
hAhR_323/hhRNT_217	0.2 mg
bAhR_27/hhRNT_212	0.5 mg
bAhR_27/hhRNT_213	0.6 mg
MoAhR_7/hhRNT_212	0.2 mg
MoAhR_7/hhRNT_213	0.2 mg
OcAhR_7/hhRNT_212	0.3 mg
OcAhR_7/hhRNT_213	0.2 mg
pAhR_7/hhRNT_212	0.3 mg
pAhR_7/hhRNT_213	0.5 mg
rAhR_7/hhRNT_212	0.2 mg
rAhR_7/hhRNT_213	0.3 mg
cAhR_7/hhRNT_212	0.4 mg
cAhR_7/hhRNT_213	0.5 mg
xAhR_7/hhRNT_212	0.6 mg
xAhR_7/hhRNT_213	0.3 mg



### 3-6-2. AhR と HIF-2 $\alpha$ のキメラコンストラクト

AhR と HIF-2 $\alpha$  のキメラと野生型 ARNT を組み合わせて大量培養，精製を行い，高純度試料を得ることに成功した(図 54，表 39) (方法は 2-7-2-2 号)。

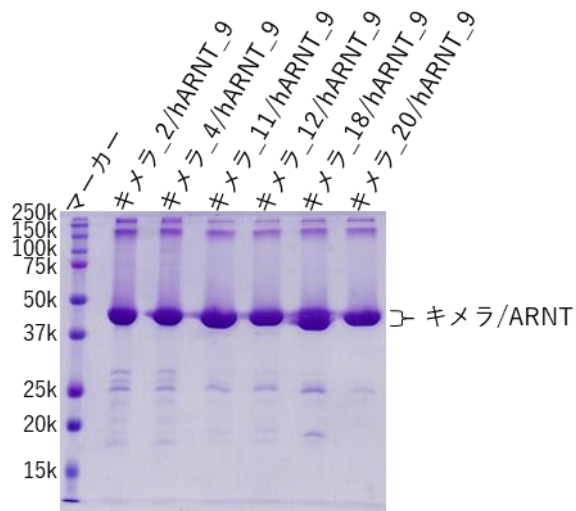


図 54 キメラコンストラクト/ARNT 精製試料の SDS-PAGE

表 39 キメラコンストラクト/ARNT の培地 1 L あたりの収量

AhR/ARNT	培地 1 L あたりの収量
キメラ_2/hARNT_9	2.0 mg
キメラ_4/hARNT_9	1.9 mg
キメラ_11/hARNT_9	9.9 mg
キメラ_12/hARNT_9	9.6 mg
キメラ_18/hARNT_9	8.5 mg
キメラ_20/hARNT_9	11.4 mg

### 3-6-3. リジン残基のアルキル化

AhR/ARNT のリジン残基をアルキル化した試料を調製した。反応中に切断が進行している試料もあったが、概ね高純度な試料を得ることができた(図 55) (方法は 2-7-3 項)。

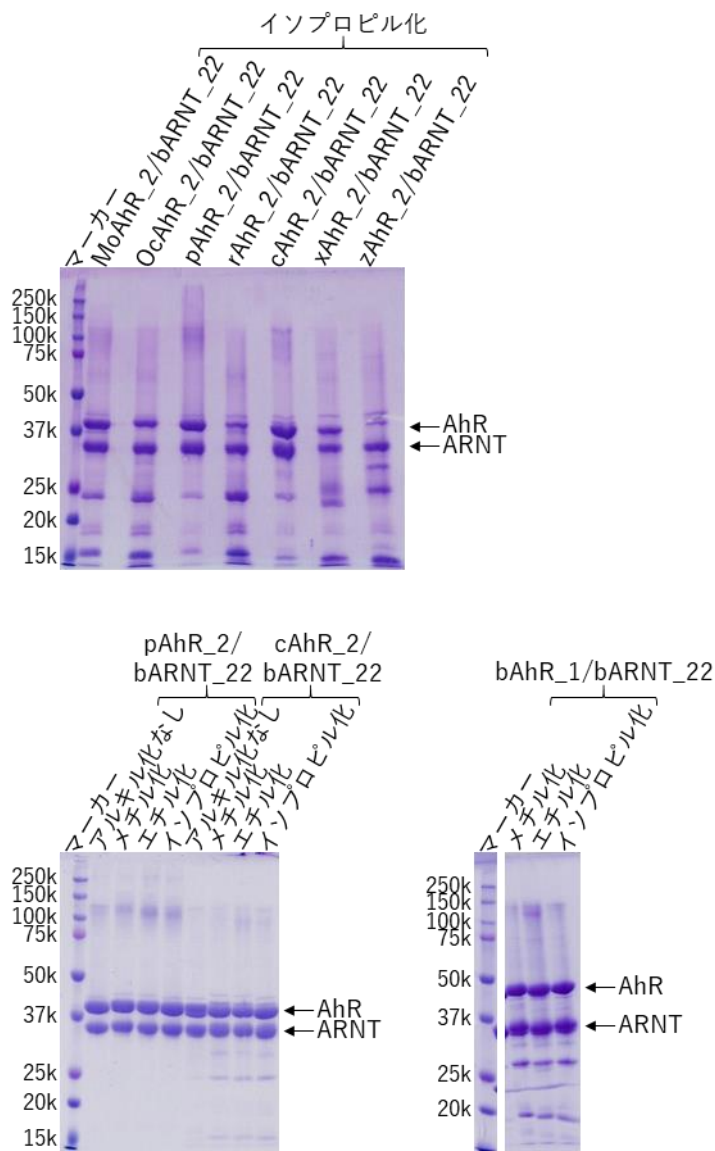
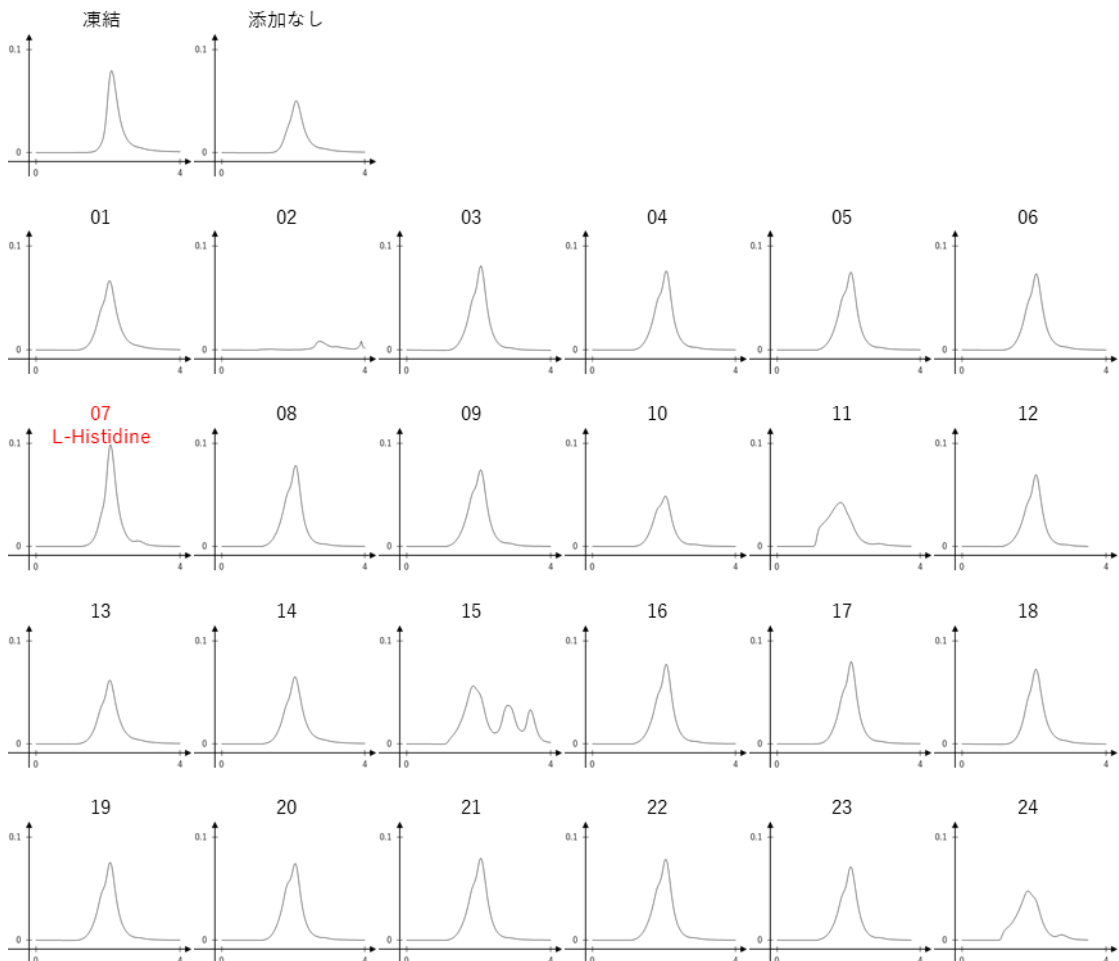
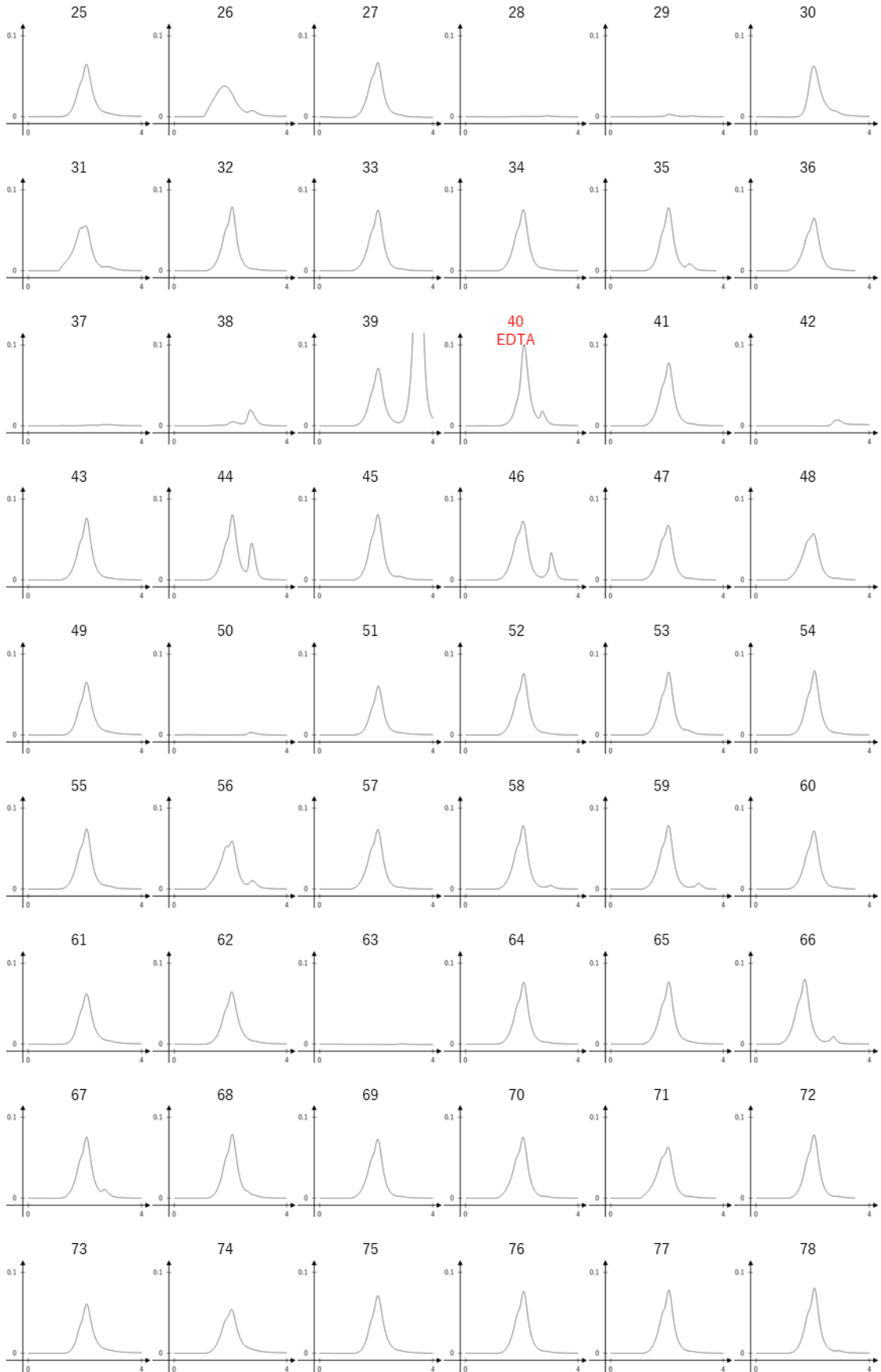


図 55 アルキル化した試料の SDS-PAGE

### 3-6-4. 添加剤の検討

Solubility & Stability Screen に含まれる試薬を用いて、タンパク質を安定化する添加剤を検討した(図 56) (方法は 2-7-4 項)。試薬を添加して 4°C で 1 週間インキュベートした後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果、12 mM L-Histidine (No. 07) と 5 mM EDTA (No. 40) を添加した試料において添加なしの試料よりも高く鋭いピークが観察された。このことから L-Histidine と EDTA に AhR/ARNT を安定化する効果があると判断した。





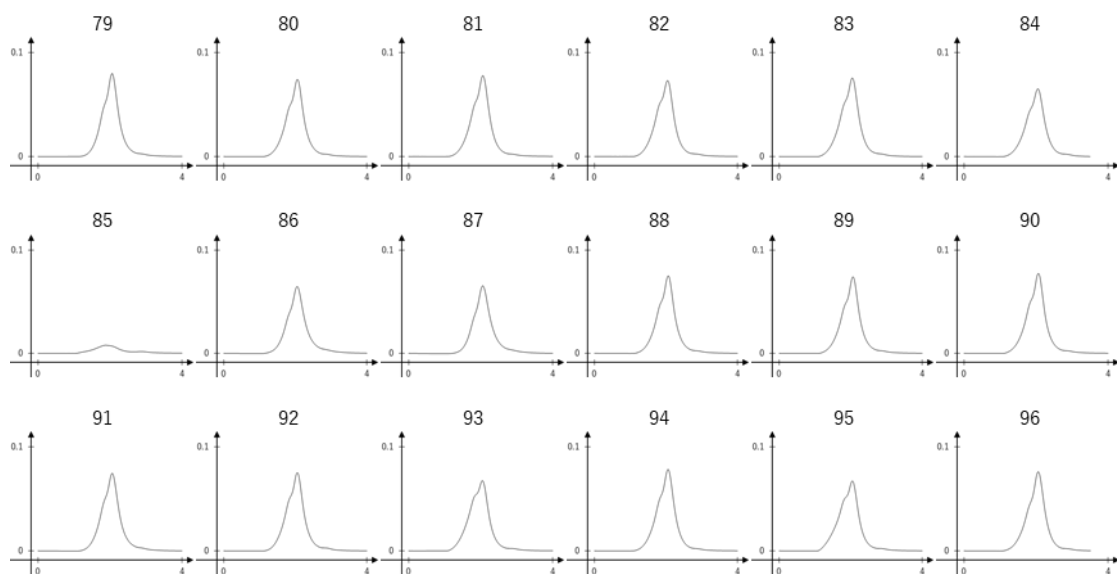


図 56 Solubility & Stability Screen による添加剤の検討

精製後凍結または 4°C でインキュベートした試料のゲル濾過クロマトグラフィーを示す。ゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 Increase 5/150 GL を用いた。横軸は Elution volume (mL)，縦軸は  $A_{280}$  を示し，グラフ上部の番号は 2-7-4 項の表 27 に対応する。安定化効果があった試薬を試薬名と共に赤字で示した。

### 3-7. AhR/ARNT の結晶化スクリーニング

様々な種由来の野生型やループ欠損変異体、熱安定化変異体の AhR/ARNT や PA ペプチド挿入 AhR/ARNT と NZ-1 複合体、HIF-2 $\alpha$  とのキメラコンストラクトなどの試料を用いて温度、タンパク質濃度、タンパク質溶液のバッファー組成、添加物の種類、スクリーニングキットなどの条件を組み合わせて、修士課程における研究と合わせて 10 万以上の条件で結晶化スクリーニングを行った(2-8 節参照)。しかし、現在までのところ結晶を得ることはできていない。

### 3-8. AhR/ARNT のホモロジーモデル

MODELLER [66] によって AhR/ARNT のホモロジーモデルを構築し、それを基に AhR/ARNT/DNA、AhR/ARNT/6 $\times$ NZ-1 Fv-clasp の構造モデルを作製した(図 57) (方法は 2-9 節)。

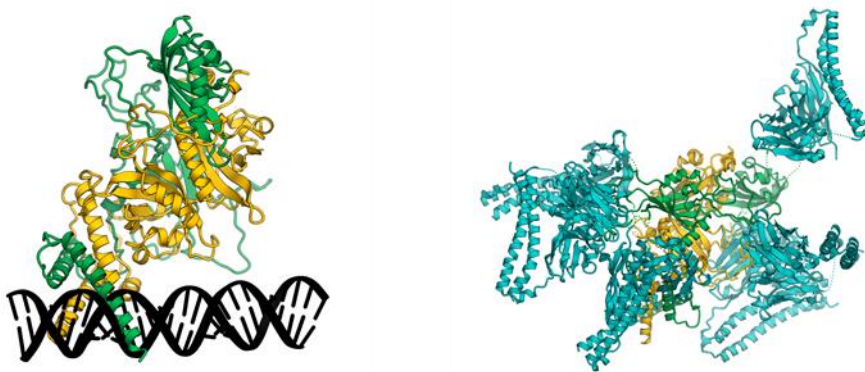


図 57 AhR/ARNT/DNA (左)と AhR/ARNT/6 $\times$ NZ-1 Fv-clasp (右)の構造モデル

### 3-9. クライオ電子顕微鏡による単粒子解析

#### 3-9-1. AhR/ARNT/DNA

大阪大学蛋白質研究所の川本晃大博士に AhR/ARNT/DNA についてクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行っていただいた(図 58, 図 59, 図 60) (方法は 2-10-1 項)。電子顕微鏡画像において小さな黒い粒のように見えている粒子が AhR/ARNT/DNA だと考えられる(図 58)。それらの粒子をピックアップし、二次元平均化を行った(図 59)。その結果、前節で作製した AhR/ARNT/DNA の構造モデルとよく一致した平均化像が得られた。DNA は棒状に明瞭に見えているが、AhR/ARNT は不明瞭であり、フレキシビリティが高いことが示唆される。さらに、12 Å の分解能で三次元密度マップを構築した(図 60)。構造モデルと比較すると概ね一致していたが、この密度マップから詳細な構造情報やドメイン配置を解明するには至らなかった。

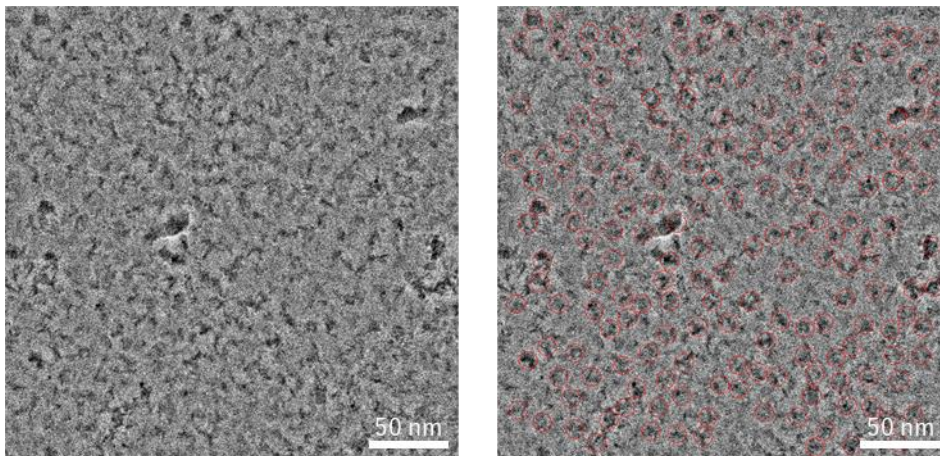


図 58 AhR/ARNT/DNA のクライオ電子顕微鏡画像(川本晃大博士による)  
右の画像では AhR/ARNT/DNA だと考えられる粒子を赤丸で示した。

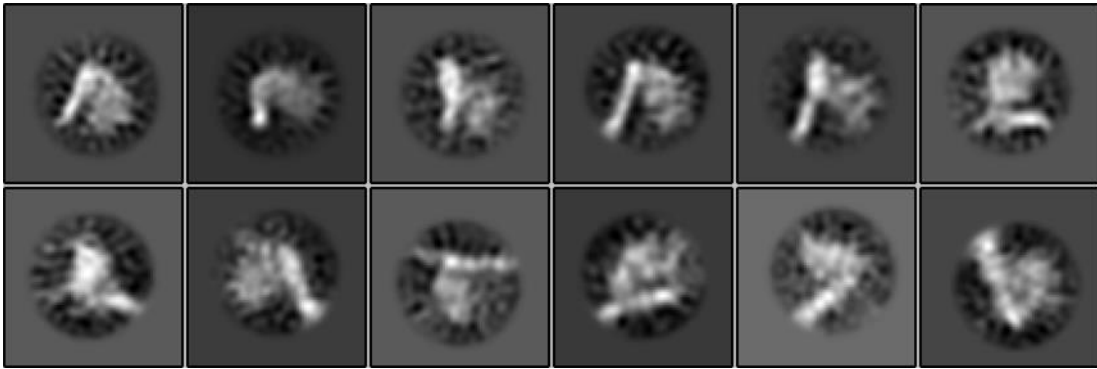


図 59 AhR/ARNT/DNA の二次元平均化像(川本晃大博士による)

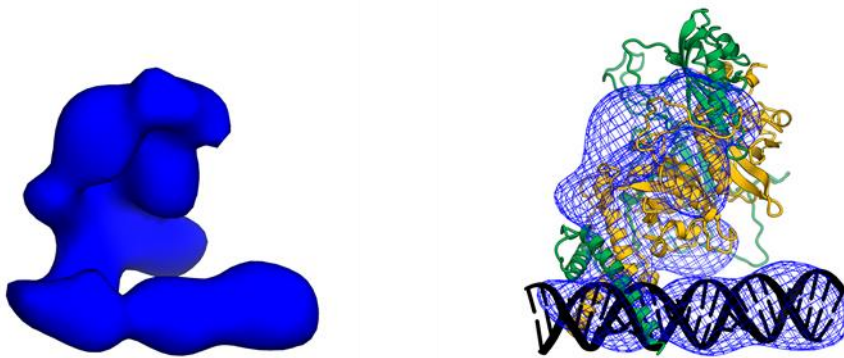


図 60 AhR/ARNT/DNA の三次元密度マップ(川本晃大博士による) (左)と構造モデルとの重ね合わせ(右)



### 3-9-2. AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp

AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp についてネガティブ染色電子顕微鏡画像を取得し、単粒子解析を行った(図 61, 図 62) (方法は 2-10-2 項)。電子顕微鏡画像において白く見えている粒子が AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp だと考えられる。それらの粒子をピックアップし、二次元平均化を行った。その結果、3-8 節で作製した AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp の構造モデルとよく一致した平均化像が得られた。

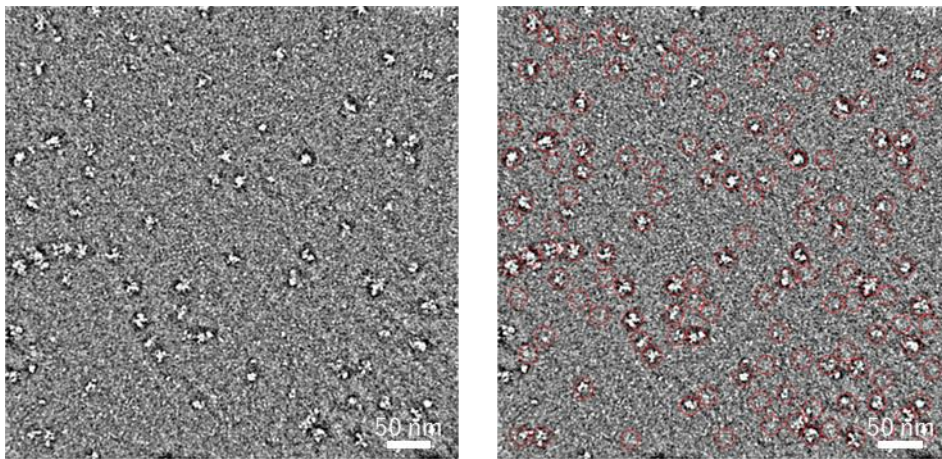


図 61 AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp のネガティブ染色電子顕微鏡画像  
右の画像では AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp だと考えられる粒子を赤丸で示した。

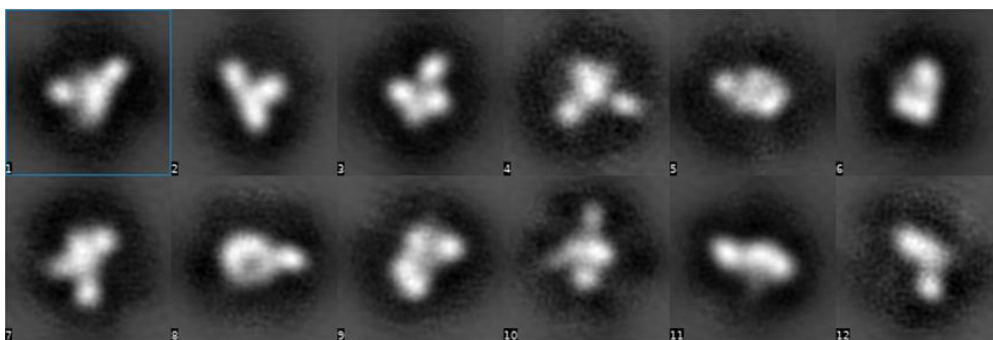


図 62 AhR/ARNT/6×NZ-1 Fv-clasp の二次元平均化像

### 3-10. AhRR/ARNT の X 線結晶構造解析

#### 3-10-1. 結晶化用試料の調製

bHLH-PAS-A の領域を含む human 由来の AhRR (hAhRR\_4~6) と bHLH-PAS-A-PAS-B 領域を含む bovine 由来の ARNT のループ欠損変異体(bARNT\_22)を組み合わせて大量培養, 精製を行い, 高純度試料を得ることに成功した(図 63, 表 40) (方法は 2-11-2 項)。さらに, リジン残基をアルキル化した試料を調製し, これらも結晶化用試料とした(図 63) (方法は 2-11-2 項)。調製した試料の SDS-PAGE の結果, hAhRR\_5/bARNT\_22 の試料ではアルキル化の反応中に AhRR の切断が進行していた。

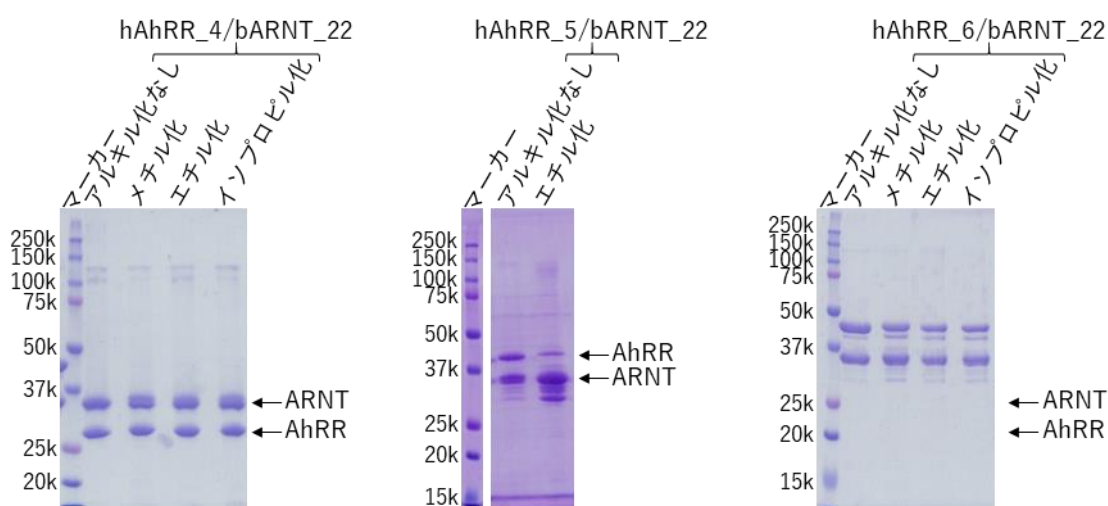


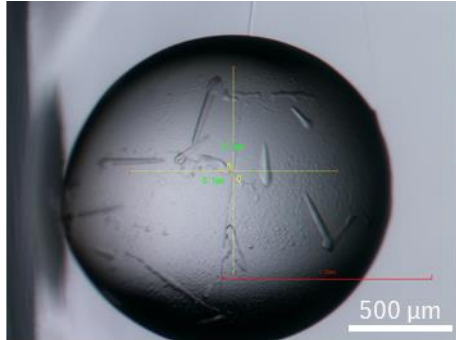
図 63 AhRR/ARNT の結晶化用試料の SDS-PAGE

表 40 AhRR/ARNT の培地 1 L あたりの収量

AhRR/ARNT	培地 1 L あたりの収量
hAhRR_4/bARNT_22	5.7 mg
hAhRR_5/bARNT_22	5.3 mg
hAhRR_6/bARNT_22	3.2 mg

### 3-10-2. 結晶化と X 線回折実験

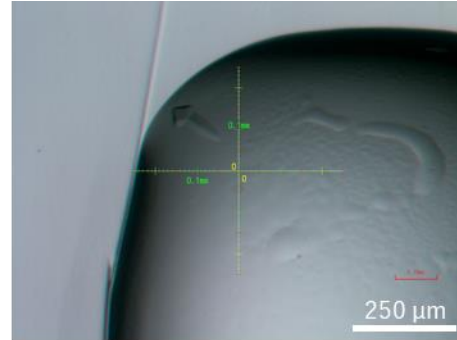
初期の結晶化スクリーニングにおいて、複数の条件で結晶が得られた(図 64) (方法は 2-11-3 項)。DNA フリーの条件ではエチル化した試料のみ結晶が析出した。DNA と共結晶化した条件ではアルキル化なし及びエチル化した試料で結晶が析出した。また、3 種類の AhRR のコンストラクト (hAhRR\_4~6) 全てにおいて結晶が析出した。初期のスクリーニングで結晶が得られた条件を基に条件を最適化した結果、初期のスクリーニングよりも大きな結晶が得られた(図 65) (方法は 2-11-3 項)。これらの結晶を用いて X 線回折実験を行った(図 65) (方法は 2-11-4 項)。その結果、DNA フリーの結晶では構造解析に十分な分解能の回折点が得られ、データセットを取得することができた。一方で DNA を添加した結晶では 10 Å 程度の分解能の回折点しか得られず、データセットの取得には至らなかった。



タンパク質溶液 0.2  $\mu$ L  
 10 mg/mL エチル化hAhRR\_4/bARNT\_22  
 10 mM Tris-HCl pH 8.0  
 350 mM NaCl  
 7% Glycerol

リザーバー溶液 0.2  $\mu$ L  
 15% PEG20000  
 100 mM HEPES-NaOH pH 7.0

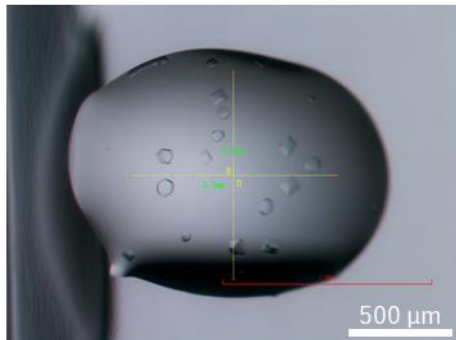
温度 20°C



タンパク質溶液 0.2  $\mu$ L  
 10 mg/mL エチル化hAhRR\_5/bARNT\_22  
 10 mM Tris-HCl pH 8.0  
 350 mM NaCl  
 7% Glycerol

リザーバー溶液 0.2  $\mu$ L  
 15% PEG20000  
 100 mM HEPES-NaOH pH 7.0

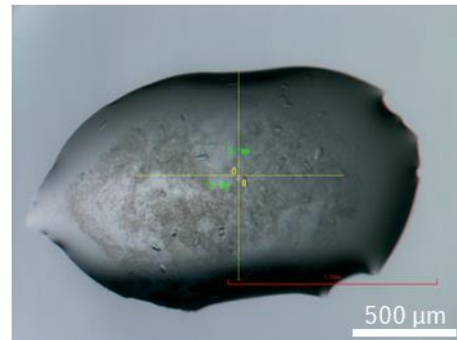
温度 20°C



タンパク質溶液 0.2  $\mu$ L  
 4.8 mg/mL アルキル化なしhAhRR\_4/bARNT\_22  
 9 mM Tris-HCl pH 8.0  
 190 mM NaCl  
 4% Glycerol  
 110  $\mu$ M XRE\_73

リザーバー溶液 0.2  $\mu$ L  
 14% PEG3350  
 100 mM MES-NaOH pH 6.5  
 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

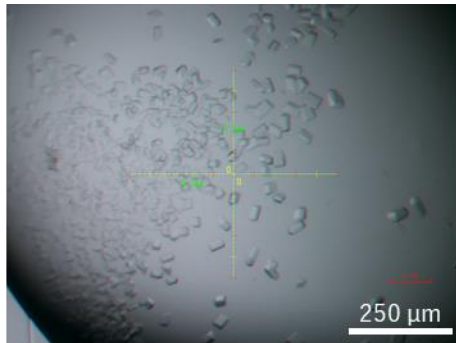
温度 20°C



タンパク質溶液 0.2  $\mu$ L  
 5.0 mg/mL エチル化hAhRR\_4/bARNT\_22  
 9 mM Tris-HCl pH 8.0  
 170 mM NaCl  
 3% Glycerol  
 120  $\mu$ M XRE\_86

リザーバー溶液 0.2  $\mu$ L  
 10% PEG10000  
 100 mM MES-NaOH pH 6.5  
 100 mM MgAcetate

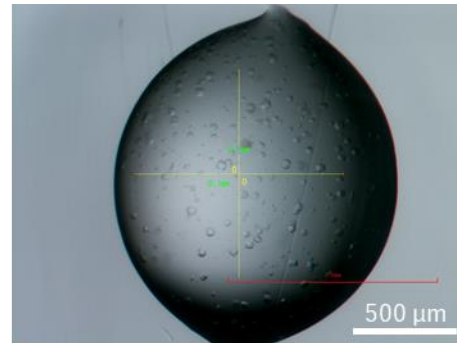
温度 20°C



タンパク質溶液 0.2 μL  
 10 mg/mL エチル化hAhRR\_5/bARNT\_22  
 8 mM Tris-HCl pH 8.0  
 350 mM NaCl  
 7% Glycerol  
 200 μM XRE\_73

リザーバー溶液 0.2 μL  
 10% PEG4000  
 100 mM MES-NaOH pH 6.5  
 200 mM NaCl

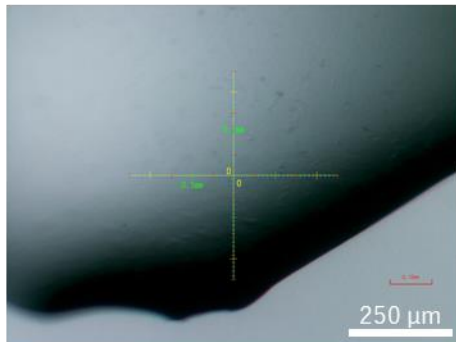
温度 20°C



タンパク質溶液 0.2 μL  
 10 mg/mL エチル化hAhRR\_6/bARNT\_22  
 8 mM Tris-HCl pH 8.0  
 270 mM NaCl  
 5% Glycerol  
 190 μM XRE\_73

リザーバー溶液 0.2 μL  
 15% PEG5000MME  
 100 mM HEPES-NaOH pH 7.0  
 100 mM KCl

温度 20°C

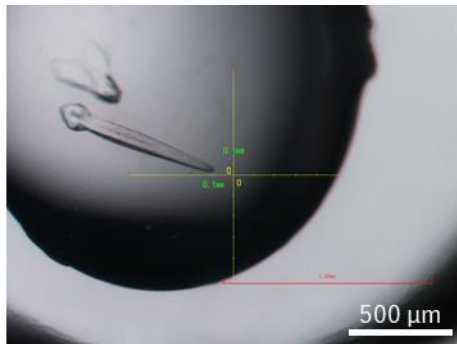


タンパク質溶液 0.2 μL  
 3.2 mg/mL エチル化hAhRR\_6/bARNT\_22  
 9 mM Tris-HCl pH 8.0  
 220 mM NaCl  
 4% Glycerol  
 60 μM XRE\_77

リザーバー溶液 0.2 μL  
 10% PEG10000  
 100 mM MES-NaOH pH 6.5  
 100 mM MgAcetate

温度 20°C

図 64 初期のスクリーニングで得られた AhRR/ARNT の結晶

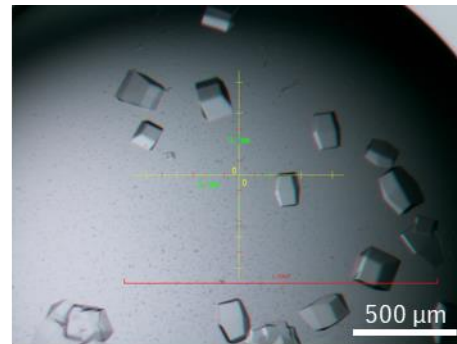


タンパク質溶液 0.4 μL  
 10 mg/mL エチル化hAhRR\_4/bARNT\_22  
 10 mM Tris-HCl pH 8.0  
 350 mM NaCl  
 7% Glycerol

リザーバー溶液 0.4 μL  
 12.3% PEG20000  
 100 mM HEPES-NaOH pH 7.3

添加剤 0.1 μL  
 500 mM Dimethylethylammonium  
 500 mM propane sulfonate

温度 20°C



タンパク質溶液 0.5 μL  
 10 mg/mL エチル化hAhRR\_5/bARNT\_22  
 8 mM Tris-HCl pH 8.0  
 350 mM NaCl  
 7% Glycerol  
 200 μM XRE\_73

リザーバー溶液 0.5 μL  
 11% PEG3350  
 100 mM MES-NaOH pH 6.0  
 200 mM NaCl

温度 20°C

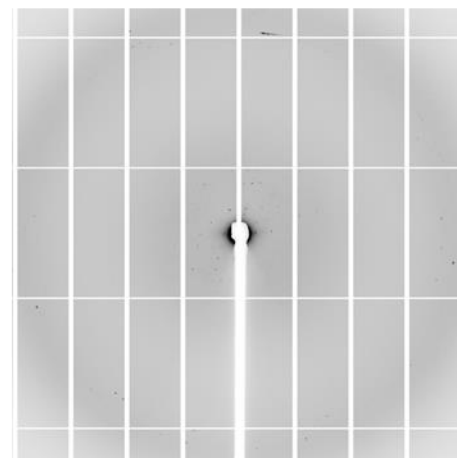
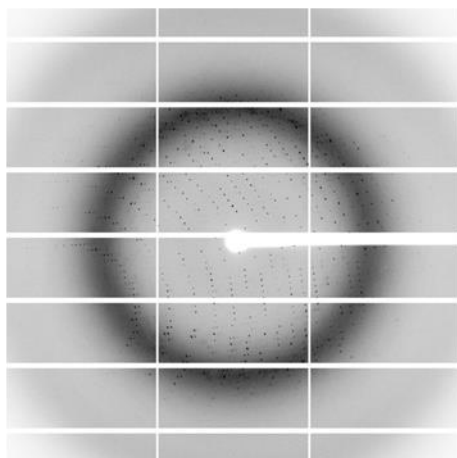


図 65 結晶化条件最適化後の AhRR/ARNT の結晶(上)と回折点(下)

### 3-10-3. AhRR/ARNT の結晶構造

DNA フリーの結晶の X 線回折実験から AhRR/ARNT の結晶構造を 2.4 Å の分解能で明らかにした[80] (表 41, 図 66) (方法は 2-11-5 項)。非対称単位中には 1 つの AhRR/ARNT 複合体が存在した。複合体中の電子密度は概ね明瞭に観測されたが, ARNT の PAS-A ドメインの電子密度は比較的貧弱であった(図 67)。全体の構造として, AhRR/ARNT は AhRR の PAS-A ドメインを中心に, bHLH ドメイン及び ARNT の 2 つの PAS ドメインを頂点とした三角形をしていた。N 末端領域といくつかのフレキシブルなループ領域はディスオーダーしていた。それぞれのドメインはこれまでに報告されている bHLH-PAS ファミリーに典型的な構造で, bHLH ドメインは 2 本の  $\alpha$  ヘリックス( $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ )と, それらをつなぐ短い  $\alpha$  ヘリックス( $\alpha 2$ )を含むリンカーで構成されており, PAS ドメインは 5 本の  $\beta$  ストランドから成る中央の  $\beta$  シートとそれを囲む  $\alpha$  ヘリックスで構成されていた(図 68, 図 69, 図 70)。AhRR, ARNT それぞれの対応するドメイン同士はよく似ており, root-mean-square deviation (RMSD) は bHLH 同士が 0.8 Å, PAS-A 同士が 2.0 Å だった。また, ARNT の PAS-B ドメインと AhRR, ARNT の PAS-A ドメインもよく似ており, それぞれ RMSD は 1.0 Å, 2.8 Å だった。

AhRR/ARNT の四次構造は AhRR と ARNT 間の分子間相互作用, 及び AhRR の分子内相互作用によって形成されていた(図 71)。分子間相互作用は bHLH (AhRR)-bHLH (ARNT), bHLH (AhRR)-PAS-A (ARNT), PAS-A (AhRR)-bHLH (ARNT), PAS-A (AhRR)-PAS-A (ARNT), PAS-A (AhRR)-PAS-B (ARNT) の 5 つの領域に分けられ, それぞれ相互作用面積は 1,118 Å<sup>2</sup>, 389 Å<sup>2</sup>, 230 Å<sup>2</sup>, 1,016 Å<sup>2</sup>, 768 Å<sup>2</sup> であり, 合計で 3,522 Å<sup>2</sup> で相互作用していた。これらの中でそれぞれの対応するドメイン同士(bHLH-bHLH 及び PAS-A-PAS-A) の相互作用は擬二回対称で関係づけられ, 四次構造形成に大きく寄与していた(図 72)。さらに AhRR の分子内のドメイン間相互作用面積(bHLH (AhRR)-PAS-A (AhRR))は 716 Å<sup>2</sup> であり, AhRR のフォールディングに寄与していた(図 71)。一方で ARNT の各ドメインは

AhRR に巻き付くように配置しており、ARNT 分子内のドメイン間相互作用は観察されなかった。

表 41 AhRR/ARNT の回折強度データセット収集と構造精密化の統計値

AhRR/ARNT	
<b>Data collection</b>	
X-ray source	PF-AR NE3A
Space group	$P4_1$
Cell dimensions	
$a, b, c$ (Å)	78.4, 78.4, 129.8
Resolution (Å)	50.0-2.4 (2.44-2.40)*
$R_{\text{merge}}$	0.057(0.599)
$I/\sigma I$	28.3 (2.0)
Completeness (%)	100.0 (99.9)
Redundancy	6.8 (6.1)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	50.0-2.4
No. reflections	29,016
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.234/0.269
No. atoms	
AhRR	1,615
ARNT	2,127
Other	40
$B$ -factors	
AhRR	58.8
ARNT	96.3
Other	57.6
R.m.s deviations	
Bond length (Å)	0.005
Bond angles (°)	0.97

\*括弧の中は最外殻における値を示す。

1 つの結晶からデータセットを取得した。



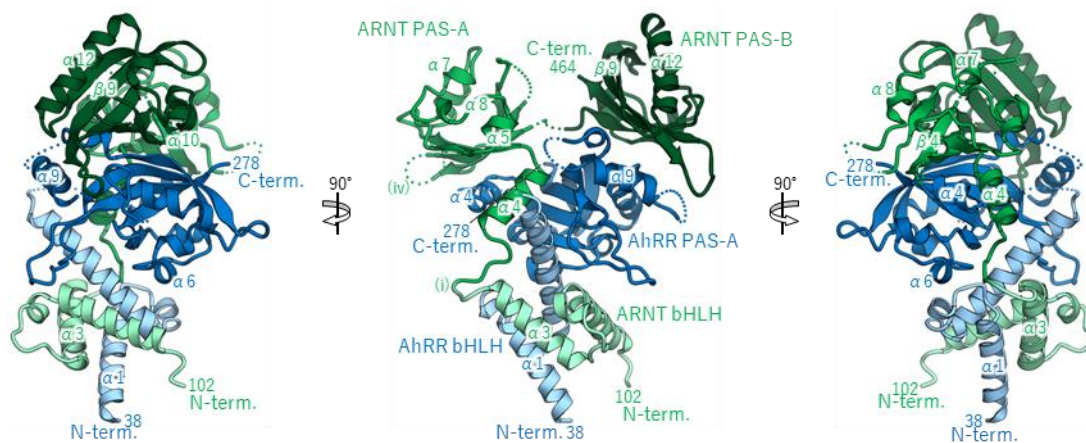


図 66 AhRR/ARNT の全体構造

AhRRを青色，ARNTを緑色で示し，それぞれのドメインを若干異なる色で示した。また，ARNTのコンストラクトにおいて欠損させたループ領域を(i)~(iv)で示した。

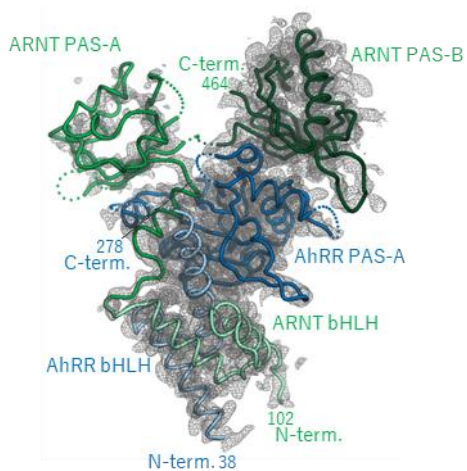


図 67 AhRR/ARNT の電子密度

AhRR/ARNTの結晶構造に電子密度マップを灰色で重ねて示した。電子密度マップは $2F_o - F_c$ マップで， $1.0\sigma$ で表示している。

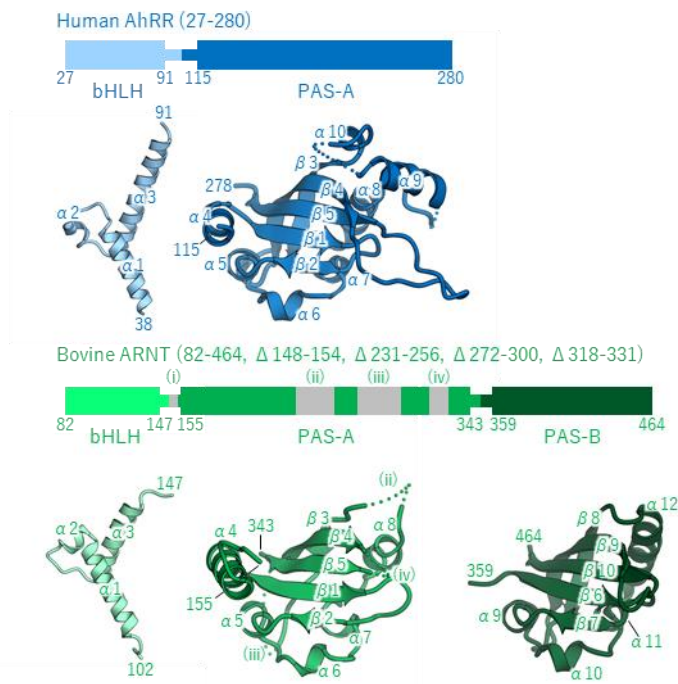


図 68 AhRR, ARNT の各ドメインの構造

それぞれのドメインをドメイン図と共に向きを揃えて示す。ドメイン図中の灰色の部分は欠損させたループ領域を示す。

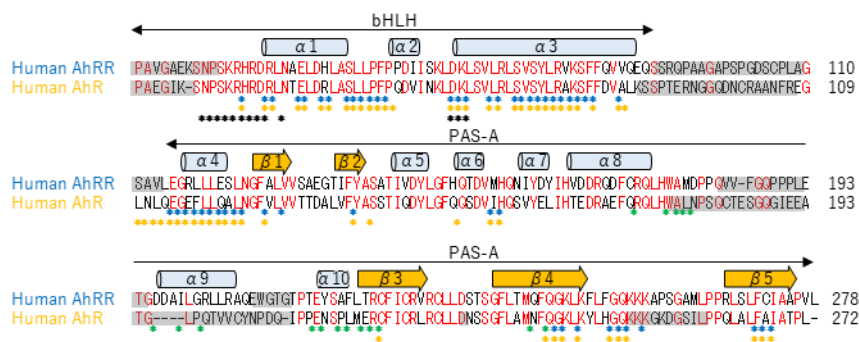


図 69 Human 由来の AhRR と AhR のアミノ酸配列のアラインメント

AhRR の二次構造をアミノ酸配列の上に示し、AhRR と AhR で保存されている残基を赤字で示した。ARNT の bHLH-PAS-A, PAS-B と相互作用する AhRR の残基をそれぞれ青色、緑色の\*で示し、AhR/ARNT/DNA の結晶構造[48] (PDB ID:5NJ8)において ARNT, DNA と相互作用する AhR の残基をそれぞれ黄色、黒色の\*で示した。結晶構造中でディスオーダーしている残基に灰色を付した。

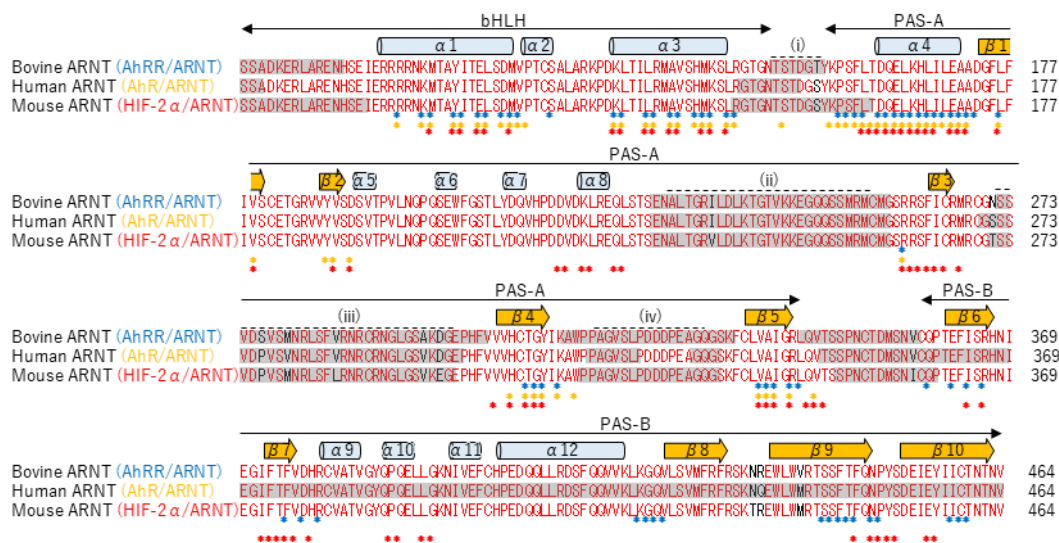


図 70 Bovine, human, mouse 由来の ARNT のアミノ酸配列のアラインメント

二次構造をアミノ酸配列の上に示し、保存されている残基を赤字で示した。AhRR/ARNT, AhR/ARNT/DNA [48] (PDB ID : 5NJ8), HIF-2 $\alpha$ /ARNT [45] (PDB ID : 4ZP4)において AhRR, AhR, HIF-2 $\alpha$ と相互作用する ARNT の残基をそれぞれ青色, 黄色, 赤色の\*で示した。結晶構造中でディスオーダーしている残基に灰色を付した。

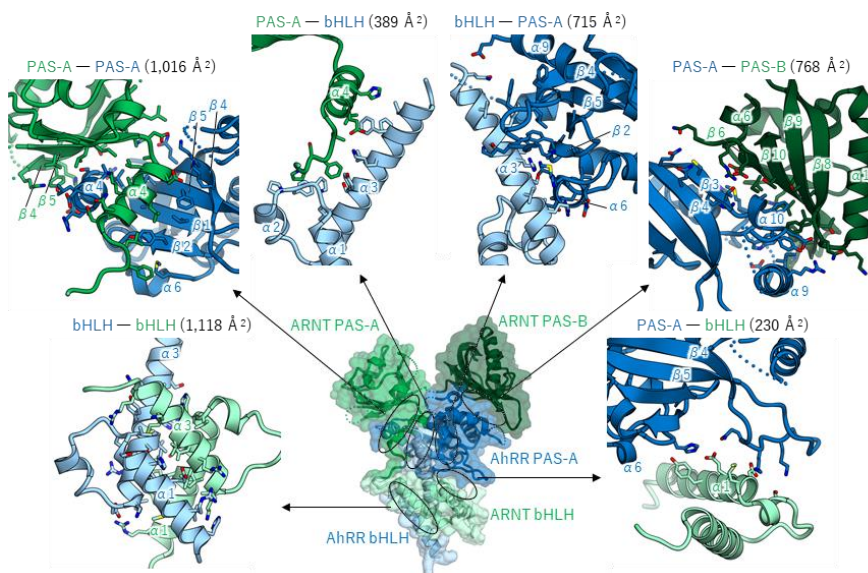


図 71 AhRR/ARNT のドメイン界面

AhRR/ARNT のドメイン界面をそれぞれ拡大して示す。結合に関与しているアミノ酸残基をスティック表示した。括弧内は相互作用面積を示す。

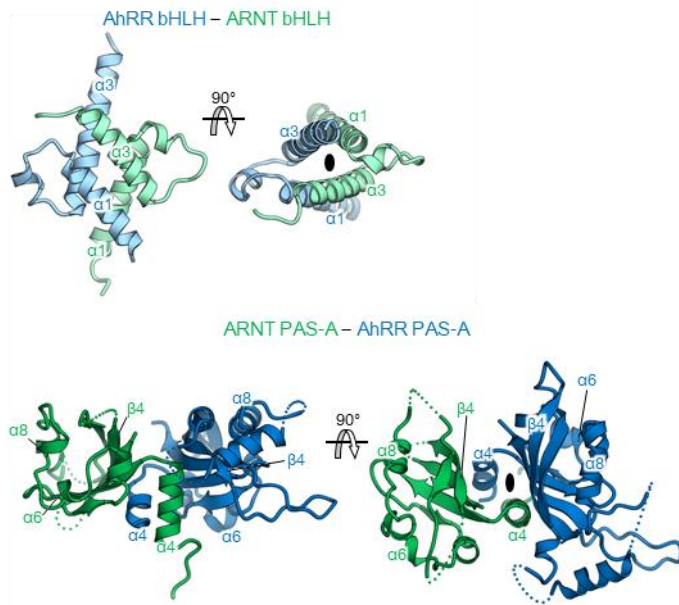


図 72 bHLH ドメイン同士(上)及び PAS-A ドメイン同士(下)の相互作用  
それぞれのドメインが関係づけられる擬似二回回転軸を黒色で示した。

#### 3-10-4. 他の bHLH-PAS ファミリーとの比較

AhRR/ARNT の結晶構造と既に報告されている他の bHLH-PAS ファミリーの結晶構造を比較した(図 73)。まず, AhR/ARNT/DNA の bHLH-PSA-A の構造と比較した。bHLH-PSA-A の領域において, ARNT との相互作用に関わる AhRR の残基は AhR において 76% と高度に一致しているため, AhRR/ARNT と AhR/ARNT は同様のドメイン界面を持ち, よく似たドメイン配置をしていた(RMSD = 1.6 Å) (前項, 図 69 参照)。bHLH-PSA-A 領域における AhRR と ARNT の相互作用面積は 2,753 Å<sup>2</sup> であり AhR/ARNT の 2,562 Å<sup>2</sup> に匹敵する。さらに, DNA との結合に関与する AhR の残基は AhRR で完璧に保存されていた(前項, 図 69 参照)。したがって, AhRR/ARNT は AhR/ARNT と同様に DNA に結合することが予想される。以上のことから, ARNT や DNA との結合機構は AhRR と AhR で高度に保存されており, AhRR の転写抑制機構の 1 つである AhR との競合モデルが構造生物学的に示された。

次に、これまでに報告されている、ARNT をパートナー分子とし、bHLH-PSA-A-PSA-B の領域を含む bHLH-PAS ファミリーの結晶構造と比較した(1-4 節参照)。AhR/ARNT 同様、bHLH-PSA-A 領域のドメイン配置は保存されており、この領域の AhRR/ARNT と HIF-2  $\alpha$ /ARNT の RMSD は 2.1 Å だった。一方で、AhRR が PAS-B ドメインを持たないという特徴から、ARNT の PAS-B ドメインの配置は明確に異なっていた(図 73)。AhRR/ARNT において ARNT の PAS-B ドメインは AhRR の PAS-A ドメインと相互作用しているのに対して、他の bHLH-PAS ファミリーでは ARNT の PAS-B ドメインはパートナー分子の PAS-B ドメインとのみ相互作用しており、PAS-A ドメインとの相互作用はなかった。また、ARNT の PAS-B ドメインにおける AhRR の PAS-A ドメインとの相互作用界面と、他のパートナー分子の PAS-B ドメインとの相互作用界面は近接していたが同一ではなかった(図 74)。さらに、AhRR の PAS-A ドメインと他のパートナー分子の PAS-B ドメインでは ARNT の PAS-B ドメインとの相互作用界面が全く異なっていた(図 75)。この AhRR/ARNT に特徴的な相互作用界面は AhRR/ARNT の特徴的な四次構造の形成に寄与している。この特徴的な相互作用界面は主に AhRR の W177, A178, M179, I199, Y217, F220 及び ARNT の I364, F375, V422, F444, F446, I458 の側鎖が形成する疎水性相互作用から成っている(図 76)。さらに、A178 (AhRR)と R366 (ARNT), R202 (AhRR)と K419 (ARNT), Y217 (AhRR)と G420 (ARNT)の水素結合もこの界面の相互作用に寄与していた(図 76)。AhRR と AhR の PAS-A ドメインは RMSD が 0.6 Å とよく似ているが、この界面に存在する残基の保存度は低かった(図 77)。さらに、AhRR の PAS-A ドメインの  $\alpha$ 9 ヘリックスは ARNT の PAS-B ドメインとの結合に大きく寄与しているが、AhR においてこの領域はディスオーダーしている(図 77)。アミノ酸配列においても AhR はこの領域を欠損しており、ARNT の PAS-B ドメインとの相互作用界面を形成しない可能性が考えられる(前項, 図 69 参照)。

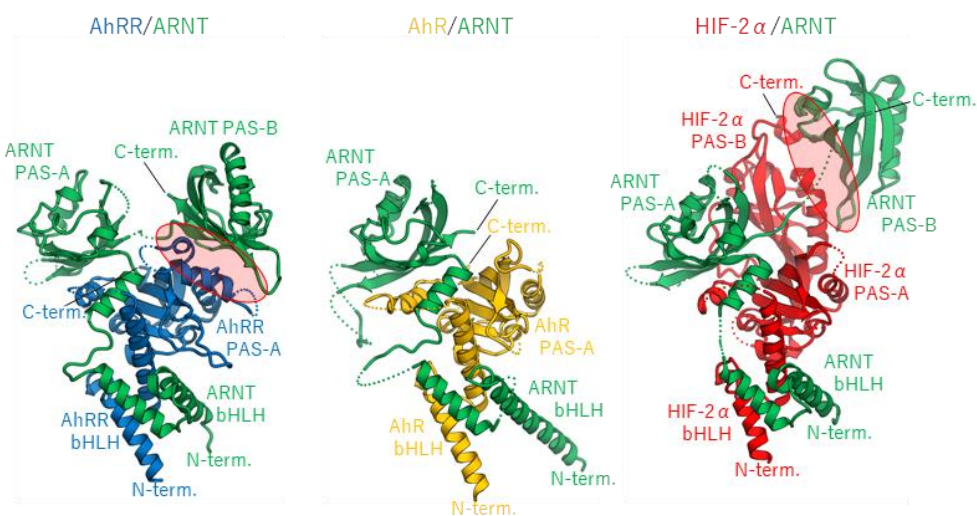


図 73 AhRR/ARNT, AhR/ARNT, HIF-2 $\alpha$ /ARNT の構造比較

AhRR/ARNT, AhR/ARNT/DNA [48] (PDB ID : 5NJ8)の AhR/ARNT, HIF-2 $\alpha$ /ARNT [45] (PDB ID : 4ZP4)の結晶構造を、向きを揃えて示す。AhRR, AhR, HIF-2 $\alpha$ , ARNT をそれぞれ青色, 黄色, 赤色, 緑色で示した。ARNT の PAS-B ドメインとパートナー分子のドメイン界面を赤丸で囲んだ。

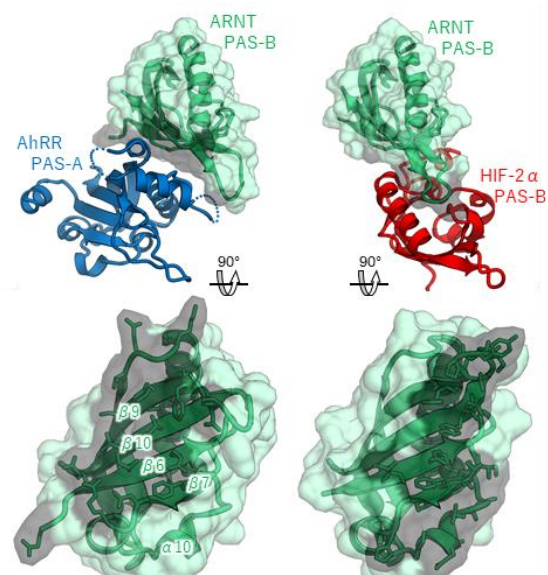


図 74 ARNT の PAS-B ドメインのパートナー分子との相互作用界面

AhRR の PAS-A と ARNT の PAS-B (左)及び HIF-2 $\alpha$  の PAS-B と ARNT の PAS-B (右)の構造を ARNT の PAS-B の向きを揃えて示す。相互作用に関与する ARNT の表面を灰色で示した。

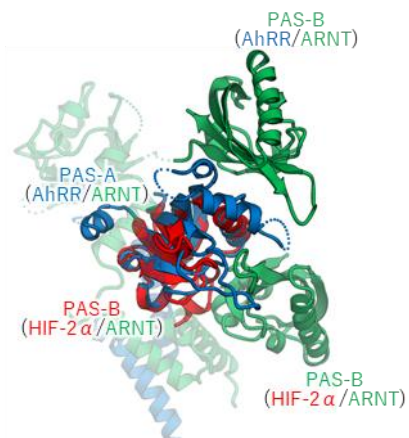


図 75 ARNT の PAS-B ドメインとの相互作用界面の比較

AhRR の PAS-A ドメインに HIF-2 $\alpha$  の PAS-B ドメインを重ね合わせて示した。

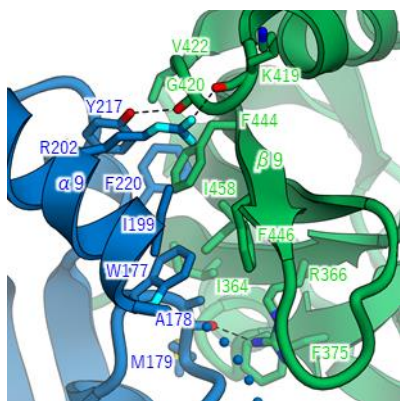


図 76 AhRR の PAS-A と ARNT の PAS-B の相互作用界面の拡大図

相互作用に関与するアミノ酸残基をスティック表示し、水素結合を点線で示した。

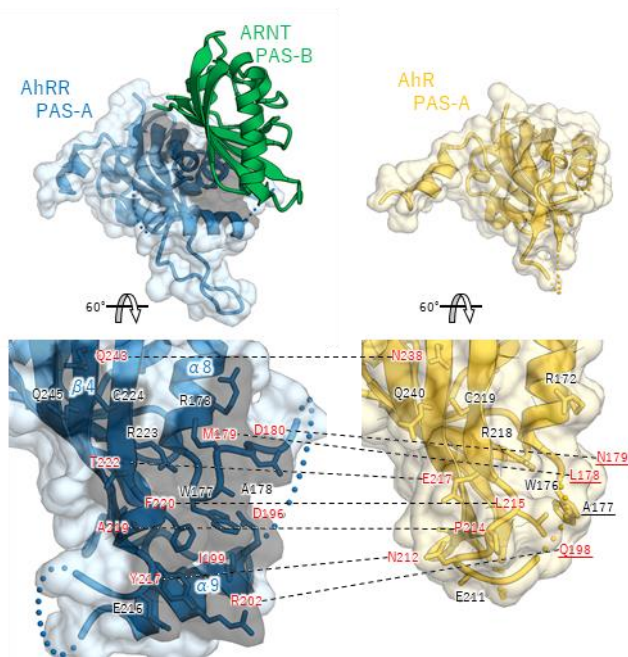


図 77 AhRR と AhR の PAS-A ドメインの比較

AhRR と AhR の PAS-A ドメインを、向きを揃えて示す。ARNT との相互作用に参与するアミノ酸残基とそれらに対応する AhR のアミノ酸残基をスティック表示した。AhRR と AhR で保存されていないアミノ酸残基を赤字で示し、AhR の結晶構造中でディスオーダーしているアミノ酸残基に下線を引いた。



### 3-11. X線小角散乱

AhR/ARNT 及び AhRR/ARNT について X線小角散乱を行った(表 42) (方法は 2-12 節)。その結果, L-kynurenine の有無によって AhR/ARNT の散乱曲線が異なっていた(図 78)。また, L-kynurenine (-)の試料に比べて L-kynurenine (+)の試料では慣性半径( $R_g$ )が 5 Å 程度小さくなっていた。これらのことから AhR/ARNT はリガンド結合によってよりコンパクトな構造を形成することが示唆された。AhRR/ARNT の実験から得られた散乱曲線と結晶構造から計算した理論曲線はよく一致しており, 結晶構造が溶液構造を反映していると考えられる(図 79)。さらに, 得られたデータを基にダミーアトムモデルを構築した(図 79)。こちらも結晶構造と概ね一致していた。

表 42 X線小角散乱のパラメーター

	AhR/ARNT (L-kynurenine (+))	AhR/ARNT (L-kynurenine (-))	AhRR/ARNT
<b>Sample preparation</b>			
Construct	hAhR_3/hARNT_9	hAhR_59/hARNT_37	hAhRR_4/bARNT_22
M.W. calculated from sequence	91,462	92,886	64,001
Loading concentration (mg/mL)	10	8	10
Injection volume ( $\mu$ L)	200	250	200
<b>Data collection parameters</b>			
X-ray source	PF BL10C	PF BL10C	PF BL10C
Wavelength ( $\text{\AA}$ )	1.0000	1.0000	1.0000
Beam size ( $\mu$ m)	$270 \times 560$	$270 \times 560$	$270 \times 560$
Camera length (m)	2.030	2.030	2.030
$q$ range ( $\text{\AA}^{-1}$ )	0.0091-0.2187	0.0160-0.1964	0.0096-0.2714
Exposure time (sec)	$20 \times 43$ images	$20 \times 49$ images	$20 \times 46$ images
Temperature (K)	293	293	293
<b>Structural parameters</b>			
$I(0)$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) [from $P(r)$ ]	$0.05 \pm 0.00$	$0.05 \pm 0.00$	$0.05 \pm 0.00$
$R_g$ ( $\text{\AA}$ ) [from $P(r)$ ]	$37.0 \pm 0.20$	$41.9 \pm 0.46$	$30.0 \pm 0.14$
$I(0)$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) [from Guinier]	$0.05 \pm 0.00$	$0.05 \pm 0.00$	$0.05 \pm 0.00$
$R_g$ ( $\text{\AA}$ ) [from Guinier]	$36.5 \pm 1.79$	$40.7 \pm 2.22$	$29.5 \pm 0.54$
$D_{\text{max}}$ ( $\text{\AA}$ )	136	158	115
Porod volume ( $\text{\AA}^3$ )	171,049	206,111	110,289
M.W. calculated with porod volume	106,906	128,819	68,931
Dry volume calculated from sequence ( $\text{\AA}^3$ )*	110,663	112,385	77,436
Mean value of NSD (exclude model/total models)			$0.525 \pm 0.011$ (1/15)
<b>Software employed</b>			
Data reduction	SAngher	SAngher	SAngher
Basic analyses: Guinier	SAngher	SAngher	SAngher
Basic analyses: $P(r)$ , porod volume	PRIMUSqt	PRIMUSqt	PRIMUSqt
Ab initio analysis			DAMMIN
Validation and averaging			DAMAVER
Computation of model intensities			CRY SOL

\* Dry volume calculated from sequence は Peptide Property Calculator

(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/proteincalc.html>)によって計算した。

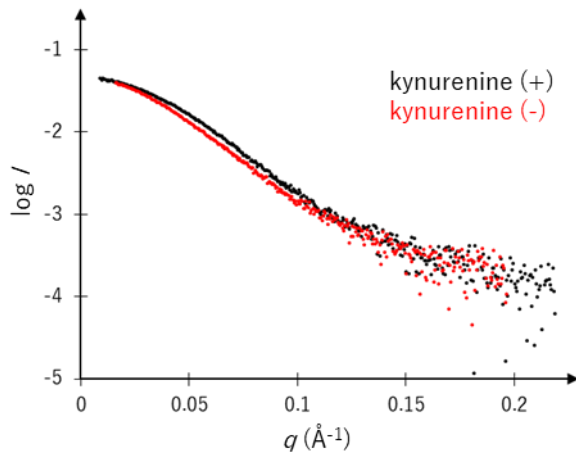


図 78 AhR/ARNT の L-kynurenine の有無による散乱曲線の比較

hAhR\_3/hARNT\_9 (L-kynurenine (+)), hAhR\_59/hARNT\_37 (L-kynurenine (-))の散乱曲線をそれぞれ黒色, 赤色で示す。

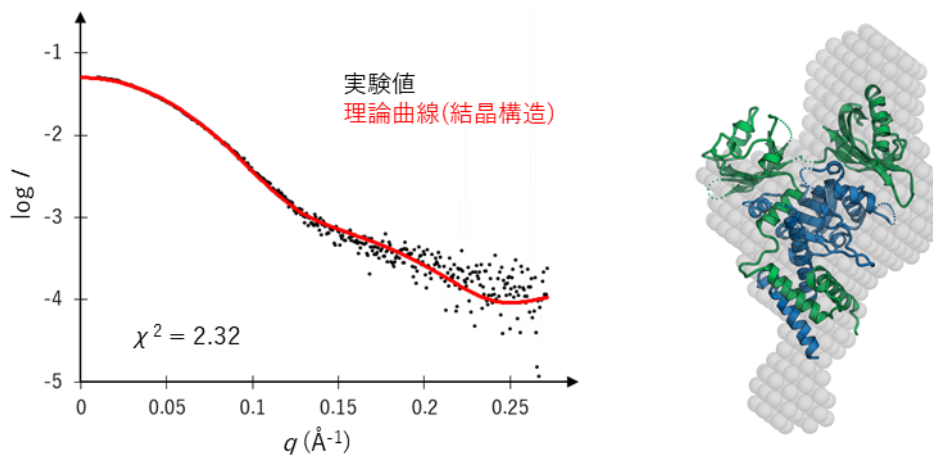


図 79 AhRR/ARNT の溶液構造と結晶構造の比較

AhRR/ARNT の散乱曲線, 結晶構造から計算した理論曲線をそれぞれ黒色, 赤色で示す(左)。また, 散乱曲線から構築したダミーアトムモデル(灰色)を結晶構造(3-10-3 項参照)に重ね合わせて示す(右)。

## 4. 考察

### 4-1. AhR/ARNT の構造解析に向けた検討

AhR/ARNT の X 線結晶構造解析に向けて、野生型及び複数の変異体の AhR/ARNT の高純度試料を調製することに成功した(3-1~3-6 節参照)。また、得られた試料を用いて DNA との結合を確認し、DNA 複合体を調製することに成功した(3-1-2 項, 3-2-2 項参照)。野生型の試料と変異体試料を比較すると、ループ欠損変異体では切断が抑制されていたことや熱安定化変異体で熱安定性が向上していたことから、野生型に比べて結晶化に有利な試料を調製することができたと考えられる(3-1-3 項, 3-2-3 項, 3-4-6 項参照)。PA ペプチド挿入 AhR/ARNT については 1~6 か所 PA ペプチドを挿入した試料を調製し、NZ-1 Fv-clasp との複合体を調製した。ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて挿入か所を増やすにつれて AhR/ARNT/NZ-1 Fv-clasp の溶出体積が小さくなっており、想定した数の NZ-1 Fv-clasp が結合していると考えられる(3-5-9 項参照)。変異を組み合わせた AhR/ARNT については複数の試料で AhR に対して ARNT が過剰になっていた(3-6-1 項参照)。それまでの実験では発現させる際に AhR と ARNT のウイルスの量比を 3 : 1 にすることで概ね 1 : 1 の複合体を得られていた。これは AhR 単独では試料調製ができないことから AhR を過剰に発現させることで単独の ARNT は存在せず、AhR/ARNT ヘテロダイマーのみが精製されていたと考えられる。変異を組み合わせた AhR/ARNT においては ARNT の発現量が AhR よりも非常に高かった、または AhR のウイルスのタイターが低かったことが考えられるため、ウイルスのタイターまたは量比を検討することで AhR と ARNT の量比を改善できる可能性がある。AhR と HIF-2 $\alpha$  のキメラコンストラクトについて、PAS-B ドメインを AhR にしたコンストラクトは PAS-B ドメインを HIF-2 $\alpha$  にしたコンストラクトに比べて収量が 1/5 程度であった(3-6-2 項参照)。このことから AhR の PAS-B ドメインが非常に不安定であり、このことが結晶化を妨げている可能性がある。Solubility & Stability Screen による添加剤の検討の結果、L-Histidine と EDTA が AhR/ARNT を安定化することを見出した(3-6-4 項参

照)。上記のように様々な検討を行い、AhR/ARNT について 10 万以上の条件で結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはできていない(2-8 節, 3-7 節参照)。今後、結晶化スクリーニングを行っていない PA ペプチド挿入 AhR, ARNT の組み合わせなど、さらに結晶化スクリーニングを行うことで結晶が得られる可能性がある。

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行った結果、AhR/ARNT/DNA について 12 Å と低分解能ではあるが、三次元密度マップを構築することに成功した(3-9-1 項参照)。これまでの bHLH-PAS ファミリーの構造から予想される構造モデルと概ね一致した密度マップが得られたが、詳細な構造情報やドメイン配置を解明するには至らなかった。原因として AhR/ARNT のフレキシビリティが高いことが考えられた。このフレキシビリティの高さは結晶化を困難にしている大きな原因だと考えられる。また、AhR/ARNT/DNA は分子量が約 10 万であり、電子顕微鏡で解析を行うには分子量が小さいことが考えられる。NZ-1 Fv-clasp を 6 か所に結合させた複合体では分子量が約 30 万になっており、電子顕微鏡での解析に有利になっていると考えられる(3-9-2 項参照)。今後、この複合体についてクライオ条件下での電子顕微鏡画像の取得、及び解析を行う。

#### 4-2. AhRR/ARNT の結晶構造解析

AhRR/ARNT の結晶構造を 2.4 Å の分解能で決定した(3-10-3 項参照)。AhRR による AhR の転写抑制機構は複数提唱されているが、その中で最も広く受け入れられているのは AhRR と AhR の競合モデルである[37]。このモデルでは AhRR と AhR は ARNT とのヘテロダイマー形成とそれに続く DNA との結合において競合する。このモデルを強く支持するように、AhRR/ARNT と AhR/ARNT の bHLH-PAS-A 領域の構造はよく似ており、ARNT や DNA との結合に関与するアミノ酸残基は AhRR と AhR で高度に保存されていた(3-10-3 項, 3-10-4 項参照)。bHLH-PAS-A 領域が高度に保存されていた一方で、AhRR/ARNT に

において ARNT の PAS-B ドメインの配置は他の bHLH-PAS ファミリーとは明確に異なっていた(3-10-4 項参照)。AhR/ARNT の PAS-B ドメインを含む構造は明らかになっていないが、他のファミリー同様 AhR/ARNT も AhRR/ARNT とは異なるドメイン配置をとることが予想される。このような AhRR/ARNT に特徴的なドメイン配置は AhR との競合モデル以外の転写抑制機構に関与する可能性がある。AhRR (転写制御領域の K542, K583, K660) と ARNT (PAS-A ドメインの K245)が SUMO 化されることはコリプレッサーをリクルートし、転写を抑制することに重要だということや[38,39,81], AhRR と ARNT はヘテロダイマーを形成することでお互いの SUMO 化を促進する一方で、AhR は ARNT の SUMO 化を促進しないことが報告されている[39]。また、トランスクリプション仮説においては、AhRR は ARNT や DNA との結合における AhR との競合や、C 末端領域によるコリプレッサーのリクルートに関係なく、未知の分子との結合において AhR と競合すると考えられている[54]。これらの知見と構造解析の結果から、今回明らかになった AhRR/ARNT の特徴的な四次構造が SUMO E3 リガーゼのリクルートやトランスクリプション仮説における未知分子との相互作用に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。以上の結果は AhRR による AhR の転写抑制機構の構造基盤となるものだと考えられる。

## 5. 総括

本研究では、多様なリガンドに応答し異物代謝や T 細胞の分化など様々な生理応答を制御する転写因子である AhR について、転写制御機構を構造生物学的に解明することを目的とし、転写活性化複合体である AhR/ARNT と転写抑制複合体である AhRR/ARNT の構造解析に向けた実験を行った。

AhR/ARNT の X 線結晶構造解析に向けて、bHLH ドメインから PAS-B ドメインまでの領域を対象とし、複数の種由来の AhR/ARNT について昆虫細胞 Sf9 を用いた発現系及び高純度精製方法を確立した。さらに、結晶化に向けて変異導入や結晶化シャペロン NZ-1 との複合体調製など、様々な条件を検討した。これまで 700 種類以上のコンストラクトを作製し、100 種類以上の結晶化試料を調製した。DNA の長さや配列、リガンドの種類などの条件を変更して 10 万以上の条件で結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはできていない。

AhR/ARNT/DNA 複合体についてクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行った結果、12 Å の分解能で三次元密度マップを得た。これまでの bHLH-PAS ファミリーの構造から予想される構造モデルと概ね一致した密度マップが得られたが、詳細な構造情報やドメイン配置を解明するには至らなかった。

転写活性化複合体である AhRR/ARNT については human 由来の AhRR と bovine 由来の ARNT を用いて 2.4 Å の分解能で結晶構造を決定した。AhR/ARNT (bHLH-PAS-A 領域) の結晶構造との比較から AhR と AhRR の構造的類似性が明らかとなり、AhRR による AhR の転写抑制機構の 1 つである競合モデルを構造生物学的に示すことができた。一方、AhRR は PAS-B ドメインを持たないという特徴から AhRR/ARNT のドメイン配置は他の bHLH-PAS ファミリーとは異なっていた。この AhRR/ARNT に特徴的な四次構造が競合モデル以外の抑制機構に関与している可能性が考えられる。これらの結果は AhRR による AhR の転写抑制機構の構造基盤となるものだと考えられる。

今後、AhR/ARNT の構造解析に向けてさらなる結晶化条件の検討や NZ-1 との複合体などクライオ電子顕微鏡解析に適した分子量(15 万以上)の試料を用いた電子顕微鏡測定を行う必要がある。さらに、AhR の一連の転写制御機構を構造生物学的に解明するためには、本研究では着手しなかった AhR の細胞質での複合体(AhR/Hsp90/XAP2/p23)についても構造解析を行い、AhR のリガンド結合に伴う核移行機構を解明する必要がある。



## 6. 参考文献

1. Poland A, Knutson JC: **2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982, **22**:517-554.
2. Whitlock JP, Jr.: **Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990, **30**:251-277.
3. Pohjanvirta R, Tuomisto J: **Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models.** *Pharmacol Rev* 1994, **46**:483-549.
4. Mandal PK: **Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology.** *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systems and Environmental Physiology* 2005, **175**:221-230.
5. Poland A, Glover E, Kende AS: **STEREOSPECIFIC, HIGH AFFINITY BINDING OF 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-PARA-DIOXIN BY HEPATIC CYTOSOL - EVIDENCE THAT BINDING SPECIES IS RECEPTOR FOR INDUCTION OF ARYL-HYDROCARBON HYDROXYLASE.** *Journal of Biological Chemistry* 1976, **251**:4936-4946.
6. Schmidt JV, Bradfield CA: **Ah receptor signaling pathways.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1996, **12**:55-89.
7. Hahn ME: **The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective.** *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 1998, **121**:23-53.
8. Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L: **Ligand binding and activation of the Ah receptor.** *Chem Biol Interact* 2002, **141**:3-24.
9. Denison MS, Nagy SR: **Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003, **43**:309-334.
10. Abel J, Haarmann-Stemann T: **An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology.** *Biol Chem* 2010, **391**:1235-1248.
11. FernandezSalguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ: **Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 1996, **140**:173-179.
12. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, et al.: **Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor.** *Genes to Cells* 1997, **2**:645-654.
13. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T: **Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:779-782.

14. Mulero-Navarro S, Fernandez-Salguero PM: **New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology.** *Front Cell Dev Biol* 2016, **4**:45.
15. Wright EJ, De Castro KP, Joshi AD, Elferink CJ: **Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways.** *Current Opinion in Toxicology* 2017, **2**:87-92.
16. Gutierrez-Vazquez C, Quintana FJ: **Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor.** *Immunity* 2018, **48**:19-33.
17. Pernomian L, da Silva CH: **Current basis for discovery and development of aryl hydrocarbon receptor antagonists for experimental and therapeutic use in atherosclerosis.** *Eur J Pharmacol* 2015, **764**:118-123.
18. Bjeldanes LF, Kim JY, Grose KR, Bartholomew JC, Bradfield CA: **Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:9543-9547.
19. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA: **An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells.** *J Immunol* 2010, **185**:3190-3198.
20. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahn F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, et al.: **An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor.** *Nature* 2011, **478**:197-203.
21. Liu Y, Liang X, Yin X, Lv J, Tang K, Ma J, Ji T, Zhang H, Dong W, Jin X, et al.: **Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN-gamma-induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells.** *Nat Commun* 2017, **8**:15207.
22. Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafstrom AK: **Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances.** *J Biol Chem* 1987, **262**:15422-15427.
23. Wincent E, Amini N, Luecke S, Glatt H, Bergman J, Crescenzi C, Rannug A, Rannug U: **The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans.** *J Biol Chem* 2009, **284**:2690-2696.
24. Wincent E, Bengtsson J, Mohammadi Bardbori A, Alsberg T, Luecke S, Rannug U, Rannug A: **Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:4479-4484.
25. Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E, Savouret JF: **Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity.** *Mol Pharmacol* 1999, **56**:784-790.

26. Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC: **Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially.** *Biochem J* 1999, **340 ( Pt 3)**:715-722.
27. Puppala D, Gairola CG, Swanson HI: **Identification of kaempferol as an inhibitor of cigarette smoke-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor and cell transformation.** *Carcinogenesis* 2007, **28**:639-647.
28. Kim SH, Henry EC, Kim DK, Kim YH, Shin KJ, Han MS, Lee TG, Kang JK, Gasiewicz TA, Ryu SH, et al.: **Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-*o*-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor.** *Mol Pharmacol* 2006, **69**:1871-1878.
29. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL: **Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor.** *Nature* 2008, **453**:65-71.
30. Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Fujimura T, Aiba S, Nakayama K, Okuyama R, et al.: **The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin.** *Nat Immunol* 2017, **18**:64-73.
31. Perdew GH: **Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein.** *J Biol Chem* 1988, **263**:13802-13805.
32. Carver LA, LaPres JJ, Jain S, Dunham EE, Bradfield CA: **Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**:33580-33587.
33. Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH: **Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:978-988.
34. Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I: **Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor.** *J Biol Chem* 1999, **274**:13519-13524.
35. Bell DR, Poland A: **Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90.** *J Biol Chem* 2000, **275**:36407-36414.
36. Petrusis JR, Hord NG, Perdew GH: **Subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor is modulated by the immunophilin homolog hepatitis B virus X-associated protein 2.** *J Biol Chem* 2000, **275**:37448-37453.
37. Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: **Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function.** *Genes Dev* 1999, **13**:20-25.
38. Oshima M, Mimura J, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y: **Molecular mechanism of transcriptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4, and HDAC5.** *Biochem Biophys*

- Res Commun* 2007, **364**:276-282.
39. Oshima M, Mimura J, Sekine H, Okawa H, Fujii-Kuriyama Y: **SUMO modification regulates the transcriptional repressor function of aryl hydrocarbon receptor repressor.** *J Biol Chem* 2009, **284**:11017-11026.
  40. Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA: **The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000, **40**:519-561.
  41. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A: **The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**:189-204.
  42. Wu D, Rastinejad F: **Structural characterization of mammalian bHLH-PAS transcription factors.** *Curr Opin Struct Biol* 2017, **43**:1-9.
  43. Fukunaga BN, Probst MR, Reiszporszasz S, Hankinson O: **IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL DOMAINS OF THE ARYL-HYDROCARBON RECEPTOR.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**:29270-29278.
  44. Huang N, Chelliah Y, Shan Y, Taylor CA, Yoo SH, Partch C, Green CB, Zhang H, Takahashi JS: **Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex.** *Science* 2012, **337**:189-194.
  45. Wu D, Potluri N, Lu J, Kim Y, Rastinejad F: **Structural integration in hypoxia-inducible factors.** *Nature* 2015, **524**:303-308.
  46. Wu D, Su X, Potluri N, Kim Y, Rastinejad F: **NPAS1-ARNT and NPAS3-ARNT crystal structures implicate the bHLH-PAS family as multi-ligand binding transcription factors.** *Elife* 2016, **5**.
  47. Seok SH, Lee W, Jiang L, Molugu K, Zheng A, Li Y, Park S, Bradfield CA, Xing Y: **Structural hierarchy controlling dimerization and target DNA recognition in the AHR transcriptional complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, **114**:5431-5436.
  48. Schulte KW, Green E, Wilz A, Platten M, Daumke O: **Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Activation.** *Structure* 2017, **25**:1025-1033.e1023.
  49. Walker MK, Heid SE, Smith SM, Swanson HI: **Molecular characterization and developmental expression of the aryl hydrocarbon receptor from the chick embryo.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000, **126**:305-319.
  50. Eguchi H, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K: **A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex.** *J Biol Chem* 1997, **272**:17640-17647.
  51. Ikuta T, Eguchi H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K: **Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor.** *J Biol Chem* 1998, **273**:2895-2904.
  52. Kanno Y, Miyama Y, Takane Y, Nakahama T, Inouye Y: **Identification of intracellular**

- localization signals and of mechanisms underlining the nucleocytoplasmic shuttling of human aryl hydrocarbon receptor repressor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **364**:1026-1031.
53. Petrusis JR, Kusnadi A, Ramadoss P, Hollingshead B, Perdew GH: **The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity.** *J Biol Chem* 2003, **278**:2677-2685.
  54. Evans BR, Karchner SI, Allan LL, Pollenz RS, Tanguay RL, Jenny MJ, Sherr DH, Hahn ME: **Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator.** *Mol Pharmacol* 2008, **73**:387-398.
  55. Kikuchi Y, Ohsawa S, Mimura J, Ema M, Takasaki C, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: **Heterodimers of bHLH-PAS protein fragments derived from AhR, AhRR, and Arnt prepared by co-expression in Escherichia coli: characterization of their DNA binding activity and preparation of a DNA complex.** *J Biochem* 2003, **134**:83-90.
  56. Mizushima S, Nagata S: **pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector.** *Nucleic Acids Res* 1990, **18**:5322.
  57. Goldenzweig A, Goldsmith M, Hill SE, Gertman O, Laurino P, Ashani Y, Dym O, Unger T, Albeck S, Prilusky J, et al.: **Automated Structure- and Sequence-Based Design of Proteins for High Bacterial Expression and Stability.** *Mol Cell* 2016, **63**:337-346.
  58. Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Uchiyama N, Amano K, Chiba Y, Hasegawa Y, Hirabayashi J, Narimatsu H, Mishima K, et al.: **Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **349**:1301-1307.
  59. Fujii Y, Kaneko M, Neyazaki M, Nogi T, Kato Y, Takagi J: **PA tag: a versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin.** *Protein Expr Purif* 2014, **95**:240-247.
  60. Fujii Y, Matsunaga Y, Arimori T, Kitago Y, Ogasawara S, Kaneko MK, Kato Y, Takagi J: **Tailored placement of a turn-forming PA tag into the structured domain of a protein to probe its conformational state.** *J Cell Sci* 2016, **129**:1512-1522.
  61. Arimori T, Kitago Y, Umitsu M, Fujii Y, Asaki R, Tamura-Kawakami K, Takagi J: **Fv-clasp: An Artificially Designed Small Antibody Fragment with Improved Production Compatibility, Stability, and Crystallizability.** *Structure* 2017, **25**:1611-1622.e1614.
  62. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, et al.: **Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs.** *Nat Genet* 2004, **36**:40-45.
  63. Otsuki T, Ota T, Nishikawa T, Hayashi K, Suzuki Y, Yamamoto J, Wakamatsu A, Kimura K, Sakamoto K, Hatano N, et al.: **Signal sequence and keyword trap in silico for selection of**

- full-length human cDNAs encoding secretion or membrane proteins from oligo-capped cDNA libraries.** *DNA Res* 2005, **12**:117-126.
64. Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H, et al.: **Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes.** *Genome Res* 2006, **16**:55-65.
65. Itoh M, Yasunishi A, Imamura K, Kanamori-Katayama M, Suzuki H, Suzuki M, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y: **Constructing ORFeome resources with removable termination codons.** *Biotechniques* 2006, **41**:44, 46, 48 passim.
66. Fiser A, Sali A: **Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models.** *Methods Enzymol* 2003, **374**:461-491.
67. Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, Davies DR: **Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA.** *Science* 2008, **320**:379-381.
68. Zivanov J, Nakane T, Forsberg BO, Kimanius D, Hagen WJ, Lindahl E, Scheres SH: **New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3.** *Elife* 2018, **7**.
69. Grant T, Rohou A, Grigorieff N: **cisTEM, user-friendly software for single-particle image processing.** *Elife* 2018, **7**.
70. Otwinowski Z, Minor W: **[20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode.** *Methods Enzymol* 1997, **276**:307-326.
71. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ: **Phaser crystallographic software.** *J Appl Crystallogr* 2007, **40**:658-674.
72. Emsley P, Cowtan K: **Coot: model-building tools for molecular graphics.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004, **60**:2126-2132.
73. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ: **Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997, **53**:240-255.
74. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC: **MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, **66**:12-21.
75. Shimizu N, Yatabe K, Nagatani Y, Saijyo S, Kosuge T, Igarashi N: **Software development for analysis of small-angle x-ray scattering data.** *2016*: AIP Publishing: 2016:050017.
76. Petoukhov MV, Franke D, Shkumatov AV, Tria G, Kikhney AG, Gajda M, Gorba C, Mertens HD, Konarev PV, Svergun DI: **New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis.** *J Appl Crystallogr* 2012, **45**:342-350.
77. Svergun DI: **Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing.** *Biophysical journal* 1999, **76**:2879-2886.

78. Volkov VV, Svergun DI: **Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering.** *Journal of applied crystallography* 2003, **36**:860-864.
79. Svergun D, Barberato C, Koch MHJ: **CRY SOL—a program to evaluate X - ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates.** *Journal of applied crystallography* 1995, **28**:768-773.
80. Sakurai S, Shimizu T, Ohto U: **The crystal structure of the AhRR-ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription.** *Journal of Biological Chemistry* 2017, **292**:17609-17616.
81. Tojo M, Matsuzaki K, Minami T, Honda Y, Yasuda H, Chiba T, Saya H, Fujii-Kuriyama Y, Nakao M: **The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system.** *J Biol Chem* 2002, **277**:46576-46585.

## 7. 謝辞

本研究を行う上で有益な御指導, 御討論, 御助力を賜りました東京大学大学院薬学系研究科  
蛋白構造生物学教室 清水 敏之 教授に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり, 一から実験の御指導, 御助言を賜りました東京大学大学院薬学系  
研究科蛋白構造生物学教室 大戸 梅治 博士に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として, NZ-1 固定化セファロースレジンは, NZ-1 Fab, NZ-1 Fv-clasp,  
NZ-1 Fv-clasp の発現ベクター, PA ペプチドを供与していただいた大阪大学蛋白質研究所  
分子創製学研究室 高木 淳一 教授に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として, クライオ電子顕微鏡解析を行ってくださった筑波大学生存ダ  
イナミクス研究センター 岩崎 憲治 教授, 大阪大学蛋白質研究所分子創製学研究室 川本  
晃大 博士, 廣瀬 未果 氏に心から御礼申し上げます。

X 線回折実験及び X 線小角散乱において大変なご助力を賜りました高エネルギー加速器研  
究機構, SPring-8 ビームラインスタッフの皆様にご心から御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり, 多くの御助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学物質創  
成科学研究科分子複合系科学研究室 藤間 祥子 博士に心から御礼申し上げます。

東京大学大学院薬学系研究科蛋白構造生物学教室の皆様には日頃から大変御世話になりま  
した。厚く御礼申し上げます。