

博士 論文

ヒストンシャペロン CIA/ASF1-CCG1 プロモドメイン
複合体の構造と機能

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 食品工学研究室

2009年1月

赤井 祐介

目次

第 1 章 序論	1
1.1 はじめに	2
1.2 ヌクレオソーム構造変換	4
1.3 プロモドメインを介したヒストンシャペロン CIA/ASF1 のリクルートモデル	6
1.4 研究目的	11
第 2 章 精製	12
2.1 CIA/ASF1 の精製	13
2.2 セレノメチオニン置換体 CIA/ASF1(172)の精製	15
2.3 GST-hCIA/ASF1(155)の精製	17
2.4 DBD(CCG1)の精製	19
2.5 セレノメチオニン置換体 DBD(CCG1)の精製	21
2.6 His-DBD(CCG1)の精製	23
2.7 GST-yCia1p/Asf1p(155)の精製	25
2.8 His-yBdf1p の精製	27
第 3 章 結晶化	31
3.1 CIA1/ASF1-DBD(CCG1)複合体溶液の調製	32
3.2 CIA/ASF1(172)-DBD(CCG1)複合体の結晶化	34
3.3 セレノメチオニン置換体 CIA/ASF(172)-DBD(CCG1)複合体の結晶化および最適化	36
3.4 CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1) の回折強度データ収集条件の検討	39
3.5 CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1) の回折強度データ収集	41
3.6 CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶化条件および最適化	45
3.7 多波長異常分散法(MAD)データの測定	47
3.8 CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)の回折強度データ収集	48
第 4 章 構造計算	53
4.1 SHELXD によるセレン位置の決定	54
4.2 autoSHARP を用いた構造解析計算	58
第 5 章 CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の構造解析	61
5.1 分子置換法を用いたモデルの構築	62

5.2 構造精密化	63
5.3 全体構造	66
5.4 構造の重ね合わせ	69
5.5 相互作用に関わるアミノ酸残基の特定	74
5.6 接触面積	76
第 6 章 相互作用解析	79
6.1 GST-CIA/ASF1 (204, 155)を用いた GST プルダウンアッセイ	80
6.2 結合飽和実験	81
6.3 DBD(CCG1)の点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ	83
6.4 GST-hCIA/ASF1(155)の点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ	87
6.5.1 沈降速度法による沈降係数および分子量の決定	91
6.5.2 CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体形成における濃度依存性	94
6.5.3 HYDROPRO を用いた沈降係数の算出	97
6.5.4 DBD(CCG1)点変異体を用いた分析超遠心	99
6.5.5 SEDPHAT によるモデルフィッティング	101
6.6 等温滴定カロリメトリー (ITC)	107
第 7 章 ヌクレオソーム構造変換の分子機構の解明に向けた研究	112
7.1 アセチル化ヒストン H4 ペプチドを用いた競合実験	113
7.2 CIA/ASF(155)-DBD(CCG1)-アセチル化ヒストン H4 ペプチド複合体の形成	115
7.3 アセチル化ヒストン H4 ペプチド結合部位の特定	118
7.4 アセチル化ヒストン H4 ペプチドを介した DBD(CCG1)の自己会合	123
7.4 ヒストン (H3-H4) ₂ を用いた競合実験	128
7.5 DBD(CCG1)を用いた競合実験	133
第 8 章細胞内における Cia1p/Asf1p と Bdf1p の関連性	137
8.1 酵母株を用いた Spt(-) 表現型解析 (共同研究)	138
8.2 酵母株を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) (共同研究)	142
8.3 Bdf1p の点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ	144
参考文献	148
謝辞	152

第 1 章

序論

1.1 はじめに

真核生物における特異的な遺伝子の発現は、発生から分化の過程において精密に制御される必要がある。必要な時期に、必要な場所で、必要な量だけ、必要な遺伝子が発現されることによって、生体内で細胞が機能し、組織や器官が形成され、生命が統合的に維持されている。遺伝子発現制御には、転写レベルおよび翻訳レベルでの制御が考えられるが、その大部分および主たる制御が転写レベルで行われている。

真核生物のゲノム DNA は全長約 2 メートルにも及び、そのすべてが細胞核内にクロマチン構造として折り畳まれている。クロマチン構造は、4 種類のヒストン (H2A, H2B, H3, H4) がそれぞれ 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体に約 146 bp 塩基対の DNA が巻き付いたヌクレオソームコアを基本単位として構成されている⁽³⁴⁾ (図 1)。DNA はヒストン 8 量体の周囲を 1.75 回左巻きに巻き付いている。さらに、ヌクレオソームコアはヒストン H1 が結合することにより超高次構造を形成している。このようにコンパクトに折り畳まれた DNA は遺伝子が抑制された状態であり、mRNA を合成するためには DNA が裸になる必要がある。しかしながら、必要な時期に、必要な場所のヌクレオソーム構造がどのように破壊されるのか、その反応素過程について未だに全く解明されていない。

1964 年、Allfrey らはヒストンの翻訳後修飾が転写をはじめとする核内の機能に影響を与えることを明らかにした⁽³⁾。Allfrey らは、まず分離したウシ胸腺の核において *in vitro* でヒストンにアセチル基やメチル基が取り込まれることを証明した。さらに、ウシ胸腺や大腸菌の RNA polymerase による RNA 合成の実験において、ヒストンを添加することにより阻害がかかる一方、ヒストンがアセチル化されることによりこの阻害活性が低下することを明らかにした。このことから、ヒストンが RNA の代謝に常に阻害的に働いているのではなく、修飾を受けることで染色体上の異なる領域で RNA 合成の調節を行っているとするヒストンの化学修飾と転写活性化の概念を提唱した。このように 1960 年代にすでに、ヒストンのアセチル化修飾が遺伝子発現の活性を制御していることが示されていたが、ヒストンの化学修飾の実体を担う酵素群が不明であったため、実際にヒストンのどのアミノ酸残基にアセチル化修飾が施されるのか明らかにされることはなかった。1990 年代に入ると、Gcn5, p300, PCAF といったヒストンアセチル化化学修飾酵素群が単離されたことにより、細胞内で特定のヒストンテイル領域のリジン残基のみがアセチル化されていることが明らかになった^(5, 44)。どのヒストンのどのアミノ酸残基がどのような化学修飾を受けるのか、その組み合わせを含めた修飾パターンが一種の暗号として働き、それを様々なヌクレオソーム構造変換に関わる因子が解読して

ヌクレオソーム構造を変化させると考えられるようになった。さらに、細胞外からの刺激に応答してヒストン H3 のリン酸化と遺伝子発現の活性化が起こることが明らかになると、ヒストン化学修飾の種類と遺伝子発現との関係を単純に説明することが難しくなってきた⁽⁸⁾。そこで、エピジェネティックなクロマチン状態を規定するには、ヒストンの化学修飾よりも、その化学修飾に結合するタンパク質との組み合わせが重要であるとのモデルが提唱された⁽⁵⁶⁾。そして実際、アセチル化を特異的に認識するプロモドメインを含むタンパク質が多く発見されたことで、転写の活性化や抑制がヒストン化学修飾を介した分子間相互作用のレベルで説明されるようになってきた⁽²⁷⁾。



図 1.2.8 分解能で決定されたヌクレオソームコアの立体構造

ヒストン H2A (黄色)、H2B (赤)、H3 (青)、H4 (緑) をリボン図で示す。ヒストン 8 量体の周囲に二本鎖 DNA が巻き付いている。DNA の内側でヒストン同士の結合に寄与するヒストンコア領域と、DNA の外側に露出しているヒストンの部分をヒストンテイル領域と呼ばれている⁽³⁴⁾。

1.2 ヌクレオソーム構造変換

これまでの知見から、真核生物における転写制御は、「ヒストン化学修飾酵素がヒストンテイル領域に化学修飾を施し、それを目印としてヒストンテイル領域に相互作用した化学修飾認識ドメインを含むタンパク質がヌクレオソーム構造変換因子を特定領域のヌクレオソーム上にリクルートして、ヌクレオソーム構造を破壊することで遺伝子発現を制御する」という分子機構モデルが考えられるようになってきた。それでは、化学修飾を受けた特定領域のヌクレオソーム構造がどのようなタンパク質によって、どのように構造変換されるのだろうか。

転写制御におけるヌクレオソーム構造変換は、ATP 依存的クロマチンリモデリング因子複合体やヒストンシャペロンと呼ばれるタンパク質群が関与することが近年明らかになってきた^(6, 28, 29, 55, 63)。ATP 依存的クロマチンリモデリング因子複合体は、共通して ATPase サブユニットやヒストン化学修飾認識サブユニットを含む複合体で、SWI/SNF、RSC、ISWI などの複合体が知られている。クロマチンリモデリング因子複合体は、ATP のエネルギーを使用してモノヌクレオソームを別の DNA 上に移すことによりプロモーター周辺の DNA 配列を露出させ、基本転写因子や RNA polymerase のプロモーター上への分子集合を可能にさせている^(11, 28, 48, 64)。また、クロマチンリモデリング因子複合体は、化学修飾認識ドメインをもつことから、この化学修飾認識ドメインを介して化学修飾を受けた特定領域のヌクレオソーム上へリクルートされていることが報告されている^(21, 22)。そこで、ATP 依存的クロマチンリモデリング因子複合体では、ヒストン化学修飾認識ドメインを介して化学修飾を受けた特定領域のヌクレオソーム上にリクルートされ、ヌクレオソーム構造変換するというモデルが考えられている。これらの結果から類推すると、ヒストンシャペロンも化学修飾認識ドメインによって、ヌクレオソーム構造変換が必要な染色体領域へリクルートされる可能性が高いことが予想される。

ヒストンシャペロンは、ヒストンと直接結合してヒストン分子の凝集を阻害するだけでなく、ヒストン分子を DNA 上に集合させたり逆にヌクレオソームからヒストンを取り除いたりすることで、ヌクレオソームの形成・破壊に寄与している⁽²⁹⁾。図 1 のヌクレオソームの結晶構造から、ヒストン H3-H4 はヌクレオソームのより内部に、ヒストン H2A-H2B はより外部にあることがわかるが、*in vivo* の観察からもヒストン H3、H4 がまず DNA に取り込まれ、ついでヒストン H2A、H2B が挿入されていることが示されている。これらの知見から、ヒストン H3-H4 四量体としてまず DNA に取り込まれ、ヌクレオソームの前駆体（テトラソーム）を形成し、これに 2 分子のヒストン H2A-H2B 二量体を取り込まれることでヌクレオソーム構造が形成すると推測されている。その一方

で、ヌクレオソーム構造の破壊過程では、ヌクレオソーム形成とは逆にヒストン H2A-H2B がまず DNA から取り除かれ、ついでヒストン H3-H4 が取り除かれることが生化学的解析により証明されている⁽⁷⁾。これまでに約 10 種類のヒストンシャペロンが同定・単離され、ヒストンシャペロンにはヒストン分子に対する指向性の違いがあることがわかってきた。例えば、CIA/ASF1、TAF-1 β 、CAF-1、HIRA などのヒストンシャペロンはヒストン H3-H4 に優先的に相互作用し、ヌクレオプラスミン、Nap-1、FACT などのヒストンシャペロンはヒストン H2A-H2B に優先的に相互作用することが報告されている^(14, 17)。従って、ヌクレオソーム構造の形成・破壊は、複数のヒストンシャペロンが協調的に作用することによって、多段階的に制御していると考えられている。しかしながら、これらのヒストンシャペロンが化学修飾を受けた特定領域のヌクレオソーム上にどのようにリクルートされるのか、その詳細な分子機構は未だ明らかにされていない。

1.3 プロモドメインを介したヒストンシャペロン CIA/ASF1 のリクルートモデル

このような状況下において、我々は、アセチル化ヒストンを認識するヒト転写基本因子 TFIID の最大サブユニット CCG1 の高保存領域であるプロモドメイン（以下、DBD(CCG1)と略す）と、ヒストンシャペロン CIA/ASF1 との機能的相互作用に着目した。ヒト CIA/ASF1 は DBD(CCG1)の相互作用因子として単離された経緯から、CIA/ASF1 と DBD(CCG1)の相互作用は転写反応を制御していると考えられた。そこで、この相互作用の転写制御反応における重要性を明らかにするため、出芽酵母細胞を用いて Spt(-) 表現型解析*が行われた（図 2A）。Spt(-) 表現型解析には、ヒト DBD(CCG1) の出芽酵母の対応因子である Bdf1p および Bdf2p が用いられた。Spt(-) 表現型解析の結果、CIA/ASF1 遺伝子破壊株と BDF1 遺伝子破壊株がともに Spt(-) 表現型を示し、両遺伝子の 2 重変異が合成致死となったことから、CIA/ASF1 と BDF1 との転写制御反応における協調的作用が示唆された（図 2C）。さらに、CIA/ASF1 遺伝子破壊による Spt(-) 表現型が TFIID のサブユニットの過剰発現によって抑圧されるということから、Cia1p/Asf1p と TFIID が遺伝学的に相互作用することが明らかにされた（図 2D）。また、出芽酵母細胞抽出液を用いて免疫沈降を行った結果、CIA/ASF1 と Bdf1p および Bdf2p が共沈することから、Cia1p/Asf1p と Bdf1p および Bdf2p が相互作用することが示唆された。その後、*in vitro* による相互作用解析を行った結果、Cia1p/Asf1p は、Bdf1p および Bdf2p のプロモドメイン領域と直接相互作用することが明らかにされた。これにより、CIA/ASF1 と DBD(CCG1)の相互作用は出芽酵母からヒトまで生物種を超えて保存されていることが示された⁽⁹⁾。

以上の結果から、CIA/ASF1 と DBD(CCG1)が *in vitro* で直接相互作用し、細胞内において遺伝学的にも両者が相互作用することが示され、さらに、転写反応における CIA/ASF1 と DBD(CCG1)との協調的作用が示唆された。そこで我々は、ヒストンシャペロン CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の立体構造を明らかにすることで、ヒストンシャペロンを特定領域のヌクレオソーム上にリクルートする分子機構の詳細を解明できると考えた。

*Spt(-) 表現型：栄養要求性を示すレポーター遺伝子である *HIS4* 遺伝子のプロモーターに Ty トランスポゾンが挿入されると *HIS4* 遺伝子の転写が起こらなくなり、ヒスチジン要求性の表現型を示す（図 2A 上段）。この状態でクロマチン構造変換に関与する因子を欠損させた酵母株では、*HIS4* 遺伝子の発現が回復し、-His プレートでも生育できるようになる。これを Spt(-) 表現型を示すという（図 2A 下段）。

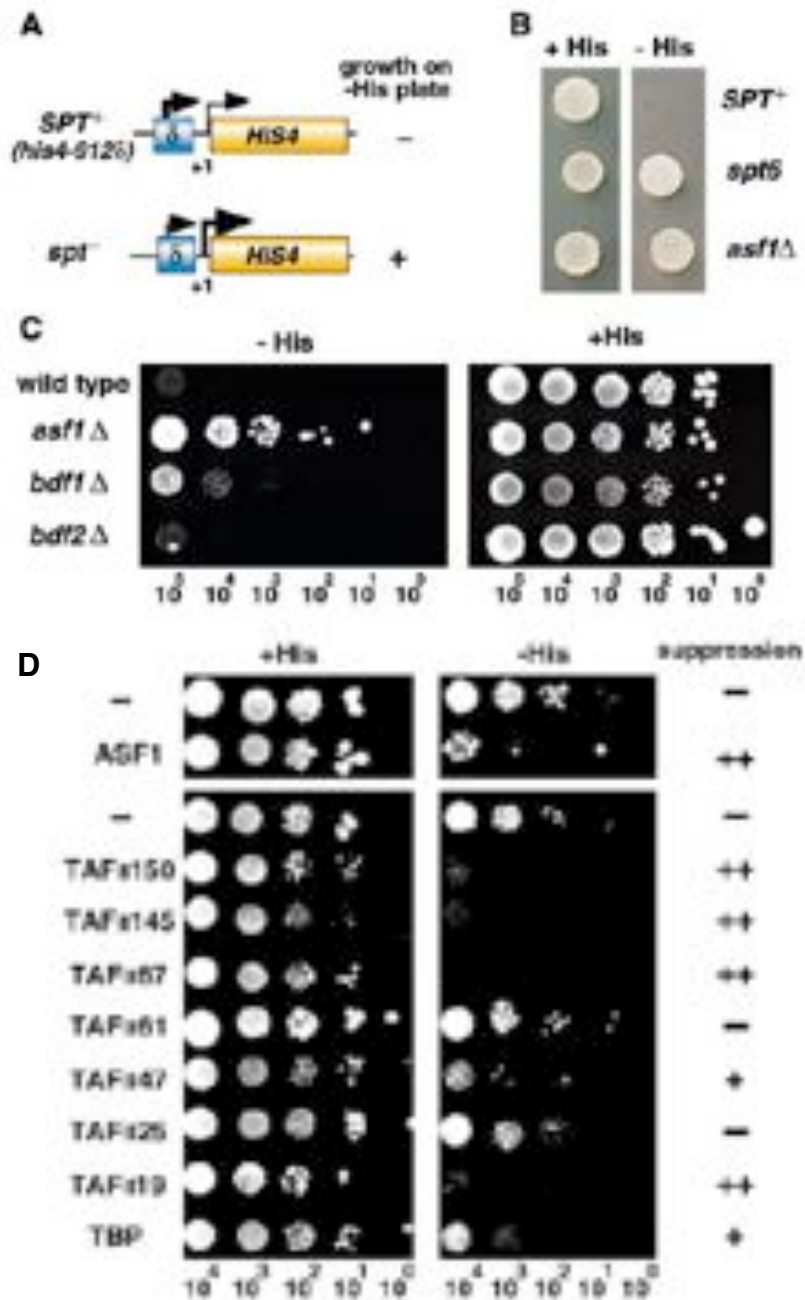


図 2. 出芽酵母株を用いた *Spt(-)* 表現型解析の結果

A) *Spt(-)* 表現型の概要図。B) *ASF1* 遺伝子破壊株では、-His プレートで生育できることから *Spt(-)* 表現型を示している。C) *ASF1*, *BDF1*, *BDF2* 遺伝子破壊株では、-His プレートで生育できることから *Spt(-)* 表現型を示している。D) *ASF1* 遺伝子破壊により生じた *Spt(-)* 表現型 (-His プレートで生育している状態) に TFIID のサブユニット(*TAF_{II}150*, *TAF_{II}145*, *TAF_{II}67*, *TAF_{II}47*, *TAF_{II}19*)を過剰発現させることによって、-His プレートで生育できなくなり、*Spt(-)* 表現型が示さなくなる。これは、*ASF1* と TFIID のサブユニットとの間に機能的な相互作用があることを示している⁽⁹⁾。

CCG1ブロモドメイン

基本転写因子 TFIID は TBP (TATA-box binding protein) および 13 種類の TAF (TBP-associated factor) サブユニットから構成される巨大複合体である。TFIID の最大のサブユニットである TAF_{II}250/TAF1/CCG1 は 1872 アミノ酸からなるタンパク質で、ヒストンアセチル化酵素活性、リン酸化酵素活性、アセチル化ヒストンを認識するブロモドメインなど様々な機能ドメインを有している^(16, 36, 49)。これまでに、TFIID の最大サブユニットである CCG1 の高保存領域であるダブルブロモドメイン (DBD(CCG1)) の結晶構造が 2.1 Å 分解能で決定され、N 末端から Z, A, B, C と称される 4 つの α ヘリックスをもち、左巻きのヘリックス・バンドルという構造を形成していることが明らかになった⁽²³⁾ (図 3)。各ブロモドメインには、アセチル化リジンが結合する疎水性ポケットを持っていることが判明した。さらに、DBD(CCG1)とアセチル化ヒストン H4 ペプチドを用いた相互作用解析の結果、DBD(CCG1)は 7 つのアミノ酸 残基分離したジ (Ac-Lys5/12)-アセチル化ヒストン H4 ペプチドと最も結合親和性が高いことが明らかにされた。この 2 つのアセチル化リジン間の距離は、2 つの結合ポケット間の距離である 25 Å によく一致している。これらの結果から、ダブルブロモドメインがジアセチル化したヒストン H4 のテイル領域を認識して、特異的なプロモーター上に TFIID をリクルートさせるのではないかと考えられている。

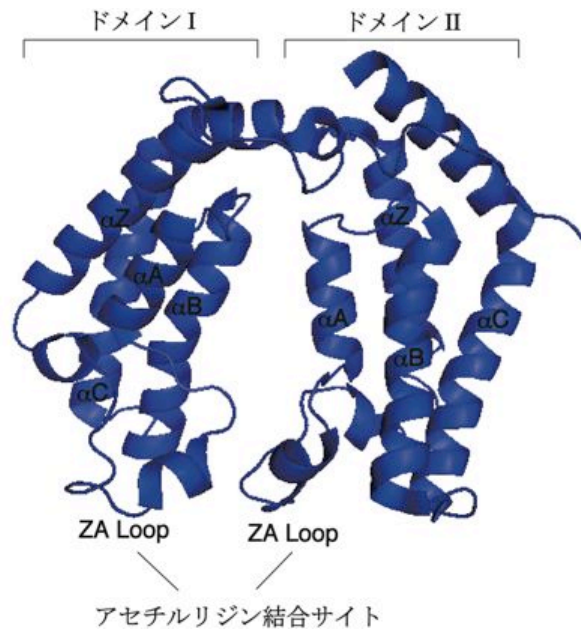


図 3. ヒト DBD(CCG1)の結晶構造⁽²³⁾
各ドメインにアセチル化リジン結合サイトが存在する。

ヒストンシャペロン CIA/ASF1

ヒストンシャペロンCIAはDBD(CCG1)の相互作用因子として単離され、その後、ヌクレオソーム構造の形成・破壊を促進するヒストンシャペロン活性を有することが明らかにされた^(40,61)。また、CIAは出芽酵母細胞におけるテロメア領域のサイレンシングを解除するAsf1 (anti-silencing function 1)としても同定されていた⁽³⁰⁾。CIA/ASF1は出芽酵母からヒトまでN末端領域が高度に保存され、その結晶構造からN末端の高保存領域は免疫グロブリン様フォールドを形成していることが明らかとなった⁽¹²⁾ (図4A, B)。このCIA/ASF1の保存性の高いN末端領域がヒストンとの相互作用、ヒストンシャペロン活性に重要であると考えられてきた。近年、我々は産総研の千田研究室との共同研究でCIA/ASF1-ヒストンH3-H4複合体の結晶構造を明らかにすることに成功した⁽⁴³⁾ (図5)。CIA/ASF1にはヒストン(H3-H4)₂ 四量体をヒストンH3-H4 二量体に分割する働きがあり、ヒストンH3-H4 二量体とヘテロに三量体化した複合体構造をとることが明らかになった。加えてCIA/ASF1の分割活性は*in vitro*での機能解析によっても示された。従って、CIA/ASF1は転写反応におけるヌクレオソーム構造変換においてプロモーター上からヒストンH3-H4を除去する働きを持っているのではないかと予想された。

実際、出芽酵母細胞内において、1) CIA/ASF1の局在依存的にPHO5, 8プロモーターのヒストンが除去されること⁽²⁶⁾、2) CIA/ASF1の局在依存的に配列特異的DNA結合タンパク質であるTBP (TATA-box binding protein) やRNA polymerase IIがPHO5プロモーター上にエンタリーすること⁽²⁾、3) DNA結合タンパク質であるHairless依存的にCIA/ASF1が*E(spl)*遺伝子座に局在すること⁽²⁰⁾、4) CIA/ASF1が複数の活性型遺伝子のプロモーターやORFに局在すること⁽⁵³⁾、などの知見が得られており、CIA/ASF1の局在と転写活性化に必要なプロモーター周辺の構造変換の相関性が示されている。しかしながら、CIA/ASF1との直接相互作用を介したプロモーター周辺へのリクルートモデル機構の詳細を明らかにした例はこれまでにない。

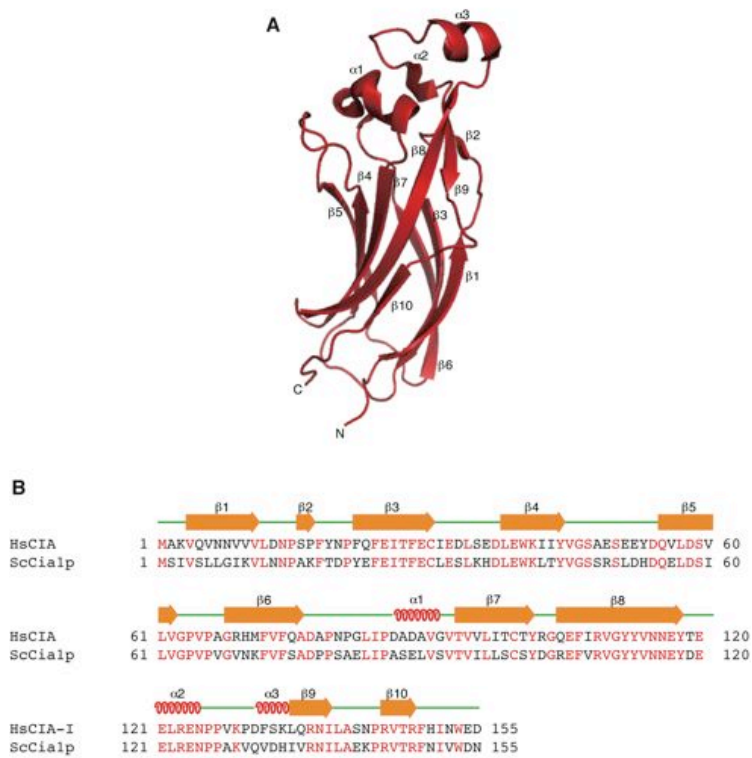


図 4. A) 出芽酵母由来 Cia1p/Asf1p の N 末 155 アミノ酸領域の結晶構造⁽¹²⁾ B) ヒトと出芽酵母由来の Cia1p/Asf1p のアミノ酸シーケンスアライメント
保存されているアミノ酸残基を赤色で示す。アミノ酸の相同性は 58%である。

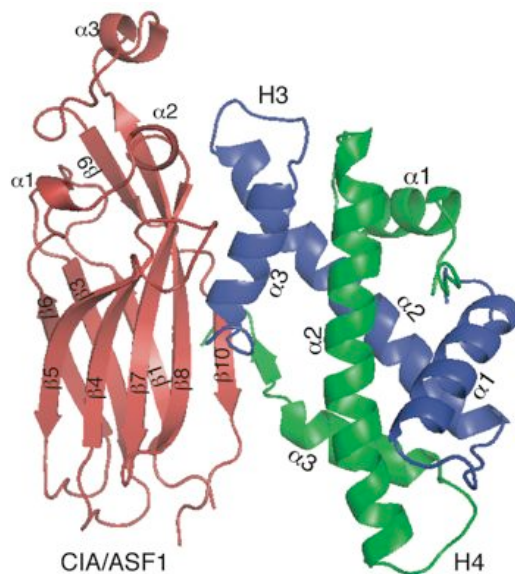


図 5. CIA/ASF1-ヒストン H3-H4 複合体の結晶構造⁽⁴³⁾
CIA/ASF1、ヒストン H3、ヒストン H4 をそれぞれ赤色、青色、緑色で示す。CIA/ASF1 はヒストン H3-H4 二量体同士が相互作用する分子表面でヒストン H3-H4 と相互作用している。

1.4 研究目的

堀越研の千村博士らの解析の結果、*in vitro*でCIA/ASF1とDBD(CCG1)が直接相互作用すること、また、細胞内においても遺伝学的にも両者が相互作用することが明らかとなり、転写反応におけるCIA/ASF1とDBD(CCG1)との協調的作用が示唆された⁽⁹⁾。機能的な解析とは独立に、プロモドメインの結晶構造が決定されると、プロモドメインがヒストンH4のアセチル化リジンを認識することが示されたことから⁽²³⁾、我々は、「ヒストンアセチル化酵素などのクロマチン因子がヒストンテイル領域に化学修飾を施し、それを目印としてヒストンテイル領域に相互作用したDBD(CCG1)がヒストンコアに作用するCIA/ASF1を特定のヌクレオソーム上にリクルートしてヌクレオソーム構造を変換することで遺伝子発現を制御する」という分子機構モデルを想定した(図6)。本研究では、ヌクレオソーム構造変換因子とアセチル化ヒストン認識ドメインとの複合体(CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体)を決定することで、DBD(CCG1)との相互作用を介したヒストンシャペロンCIA/ASF1のプロモーター周辺へのリクルートモデルの分子機構の解明することを目的とした。

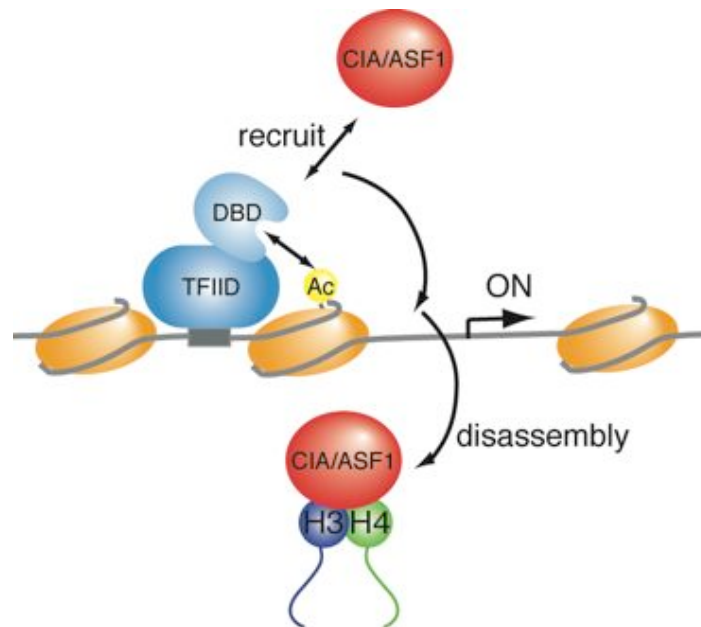


図 6. DBD(CCG1)との相互作用を介した CIA/ASF1 のプロモーター上へのリクルートモデル

第 2 章

精製

2.1 CIA/ASF1 の精製

<目的>

結晶化、相互作用解析に使用するヒト由来の CIA/ASF1 を精製する。

<実験方法>

CIA/ASF1 の N 末端 172 アミノ酸の領域をクローニングした高発現ベクター (pET15b hCIA/ASF1(172))は、堀越研より分与されたものを使用した。CIA/ASF1 の N 末端 155 アミノ酸の領域をクローニングした高発現ベクター (pET15b hCIA/ASF1(155))は pET15b hCIA/ASF1(172)を鋳型として PCR を用いて作成した。培養、精製に使用したバッファの組成や培地の組成等については章末を参照されたい。ヒト CIA/ASF1 の培養、精製方法を以下に示す。

ヒト由来 CIA/ASF1 の発現プラスミドを用いて、大腸菌 BL21(DE3) Codon plus-RIL (Stratagene)を形質転換し、TBG-M9 培地、37°C 培養により培養菌体を取得した。培養菌体は 1 mM PMSF と 0.1% NP-40 を含む buffer A を用いてけん濁し、超音波破碎を行った。全細胞抽出液を 20,000 x g, 4°C の条件で 1 時間遠心し、不溶性画分を取り除いた後、破碎上清を buffer A で平衡化した HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)に添加した。Buffer A を用いて HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V. (column volume)で洗浄した後、buffer B を用いて 40-250 mM imidazole、8 mL/fraction、溶出容量 80 mL の溶出条件で His-CIA/ASF1 を溶出した。His-CIA/ASF1 を含むフラクションを回収し、ヒスタグを切断するためにトロンビンプロテアーゼ (GE Healthcare)を 10 mg に対して 1 unit の割合で添加した。トロンビンプロテアーゼ (GE Healthcare)と His-CIA/ASF を含むタンパク質を buffer C に対して室温で透析し、His-CIA/ASF1 からヒスタグを切断した。HisTrap (GE Healthcare, 1 mL)と DEAE toyopearl 650M (TOSOH, 80mL)カラムをタンデムに接続した後、buffer C を用いて平衡化し、透析した CIA/ASF1 を添加した。CIA/ASF1 を添加した後、HisTrap カラム (GE Healthcare, 1 mL)は取り外す。Buffer C を用いて DEAE toyopearl (TOSOH, 80 mL)カラムを 5 C.V.で洗浄した後、buffer D を用いて 250 mM NaCl, 5 mL/fraction, 溶出容量 100 mL の溶出条件で CIA/ASF1 を溶出した。精製した CIA/ASF1 を buffer J に対して 4°C で透析を行い、バッファ交換を行った。精製タンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

<実験結果および考察>

精製した CIA/ASF1 の純度を SDS-PAGE で検定した結果、17 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (図 7)。ExPASy の ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) を用いてアミノ酸配列から見積った CIA/ASF1(155), CIA/ASF1(172)の分子量は約 18, 19 kDa であり、精製タンパク質の分子量とよく一致することがわかる。さらに、精製した CIA/ASF1 の 280 nm, 260 nm における吸光度を測定したところ、 A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以上の値を示すことから、核酸の混入は少なく高純度の CIA/ASF1 が得られたと考えられる。上記の精製方法により、1 L の培養菌体当たり 15 mg 程度の精製標品が得られた。

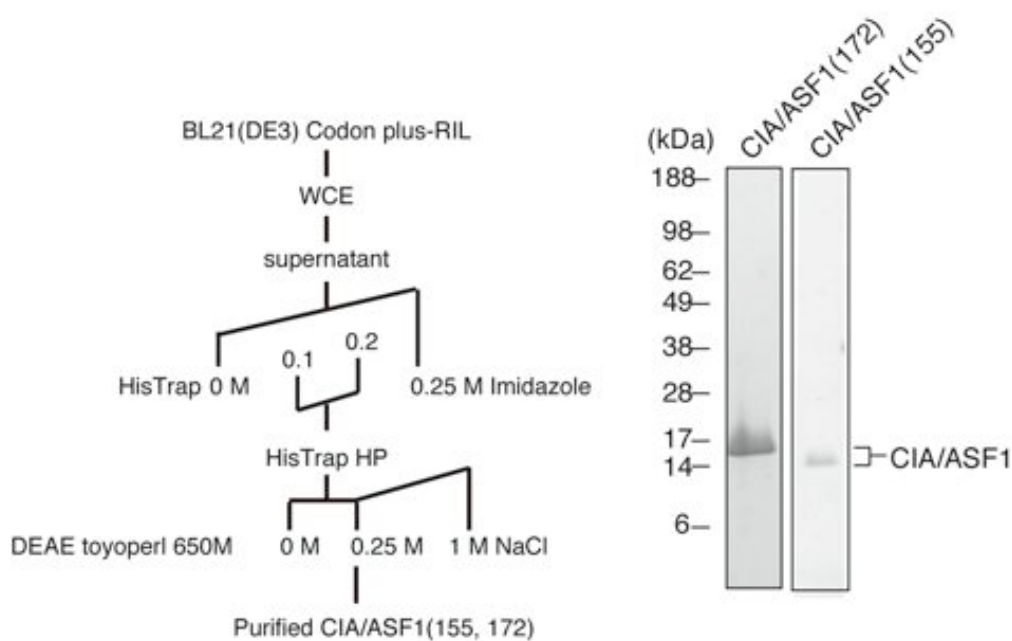


図 7. CIA/ASF1(155, 172)の精製フローおよび SDS-PAGE

2.2 セレノメチオニン置換体 CIA/ASF1(172)の精製

<目的>

結晶化に使用するヒト由来のセレノメチオニンを導入した CIA/ASF1(以下、Se CIA/ASF1(172)と略す)を精製する。

<実験方法>

培養、精製に使用したバッファの組成や培地の組成等については章末を参照されたい。ヒト由来のセレノメチオニン置換体 CIA/ASF1 の培養、精製方法を以下に示す。

ヒト由来 CIA/ASF1 の発現プラスミド (pET15b hCIA/ASF1(172))を用いて、大腸菌 B834(DE3) pLysS (Novagen)を形質転換し、LeMaster 培地、37°C 培養により培養菌体を取得した。培養菌体は 1 mM PMSF と 0.1% NP-40 を含む buffer A を用いてけん濁し、超音波破碎を行った。全細胞抽出液を 20,000 x g, 4°C の条件で 1 時間遠心し、不溶性画分を取り除いた後、破碎上清を buffer A で平衡化した HisTrap カラム (GE Healthcare, 5mL)に添加した。Buffer A を用いて HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V. (column volume)で洗浄した後、buffer B を用いて 40-250 mM imidazole、8 mL/fraction、溶出容量 80 mL の溶出条件で His-Se CIA/ASF1(172) を溶出した。His-Se CIA/ASF1 を含むフラクションを回収し、ヒスタグを切断するためにトロンビンプロテアーゼ (GE Healthcare)を 10 mg に対して 1 unit の割合で添加した。トロンビンプロテアーゼ (GE Healthcare)と His-Se CIA/ASF を含むタンパク質を buffer C に対して室温で透析し、His-Se CIA/ASF1(172)からヒスタグを切断した。HisTrap (GE Healthcare, 1 mL)と DEAE toyopearl 650M (TOSOH, 80 mL)カラムをタンデムに接続した後、buffer C を用いて平衡化し、透析した Se CIA/ASF1(172)を添加した。Se CIA/ASF1(172)を添加した後、HisTrap カラム (GE Healthcare, 1 mL)は取り外す。Buffer C を用いて DEAE toyopearl (TOSOH, 80 mL)カラムを 5 C.V.で洗浄した後、buffer D を用いて 250 mM NaCl, 5 mL/fraction, 溶出容量 100 mL の溶出条件で Se CIA/ASF1 を溶出した。精製した Se CIA/ASF1 を buffer J に対して 4°C で透析を行い、バッファ交換を行った。精製タンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

<実験結果および考察>

精製した Se CIA/ASF1(172)の純度を SDS-PAGE で検定した結果、17 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (図 8)。ExPASy の ProtPrm を用いてアミノ酸配列から見積った Se CIA/ASF1(172)の分子量は約 18kDa であり、精製タンパク質の分子量とよく一致することがわかる。さらに、精製した Se CIA/ASF1 の 280 nm, 260 nm における吸光度を測定したところ、 A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以上の値を示すことから、核酸の混入は少なく純度の高い Se CIA/ASF1(172)が得られたと考えられる。CIA/ASF1(172)野生型と比較して、得られるタンパク質量は少ないが、結晶化には十分な量の Se CIA/ASF1(172)が精製できていると考えられる。純度については、CIA/ASF1 野生型と同程度の純度の Se CIA/ASF1(172)が精製することができている。上記の精製方法により、1 L の培養菌体当たり、10 mg 程度の精製標品が得られた。

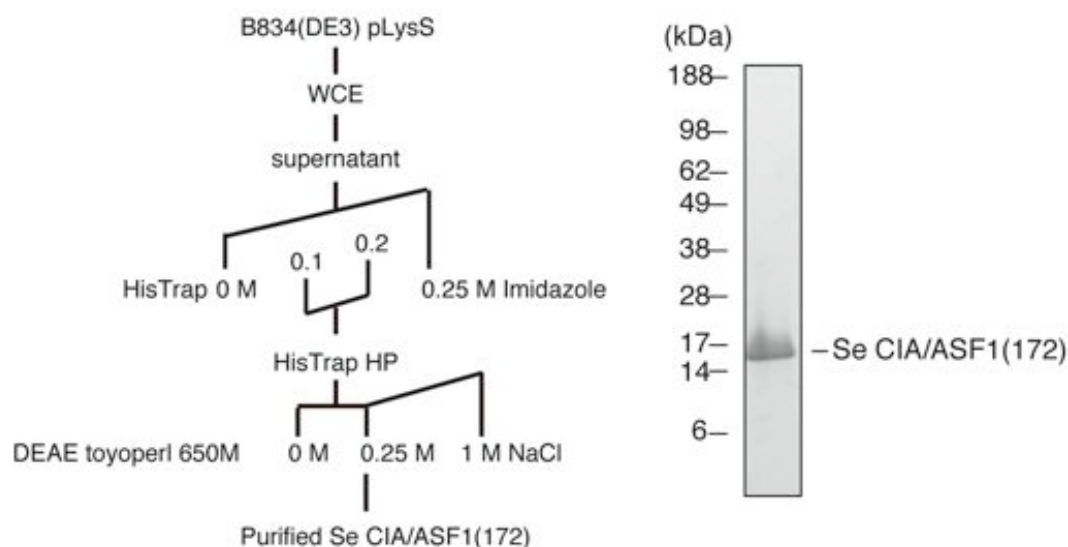


図 8. Se CIA/ASF1 の精製フローおよび SDS-PAGE(172)

2.3 GST-hCIA/ASF1(155)の精製

<目的>

相互作用解析に使用するヒト由来の GST-hCIA/ASF1(155)を精製する。

<実験方法>

CIA/ASF1 の高度に保存された N 末端 155 アミノ酸の領域を高発現ベクター pGEX4T-1 (pGEX4T-1 hCIA/ASF1(155))にクローニングを行った⁽⁴³⁾。培養、精製に使用したバッファや培地の組成等については章末を参照されたい。ヒト由来 GST-hCIA/ASF1(155)の培養、精製方法を以下に示す。

ヒト由来 CIA/ASF1 の発現プラスミド (pGEX4T-1 hCIA/ASF1(155))を用いて、大腸菌 BL21(DE3) Codon plus-RIL (Stratagene)を形質転換し、TBG-M9 培地、37°C 培養により培養菌体を取得した。培養菌体は 1 mM PMSF と 0.1% NP-40 を含む buffer E を用いてけん濁し、超音波破碎を行った。全細胞抽出液を 20,000 x g, 4°C の条件で 1 時間遠心し、不溶性画分を取り除いた後、破碎上清を buffer E で平衡化した GSTrap HP カラム (GE Healthcare, 5 mL)に添加した。Buffer E を用いて GSTrap HP カラム (GE Healthcare, 5 mL) を 5 C.V. (column volume)で洗浄した後、Buffer F を用いて 20mM 還元型-グルタチオン, 2 mL/fraction, 溶出容量 20 mL の溶出条件で GST-hCIA/ASF1(155)を溶出した。GST-hCIA/ASF1(155)を含むフラクションを回収し、buffer C で 2 倍に希釈した。希釈した GST-hCIA/ASF1(155)を buffer C で平衡化した HiTrap Q HP (GE Healthcare, 5 mL)に添加した。Buffer C を用いて HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V.で洗浄した後、Buffer D を用いて 0-1 M NaCl, 1 mL/fraction, 溶出容量 120 mL の溶出条件で、GST-hCIA/ASF1(155)を溶出した。精製した GST-hCIA/ASF1(155)を buffer J に対して 4°C で透析を行い、バッファ交換を行った。精製タンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

<実験結果および考察>

精製した GST-hCIA/ASF1(155)の純度を SDS-PAGE で検定した結果、38 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (図 9)。ExPASy の ProtPrm を用いてアミノ酸配列から見積った GST-hCIA/ASF1(155)の分子量は約 36 kDa であり、精製タンパク質の分子量とよく一致することがわかる。さらに、精製した GST-hCIA/ASF1(155)の 280 nm, 260 nm における吸光度を測定したところ、 A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以上の値を示すことから、核酸の混入は少なく高純度 GST-hCIA/ASF1(155)が得られたと考えられる。以上の精製方法により、1 L の培養菌体当たり 10 mg 程度の精製標品が得られた。

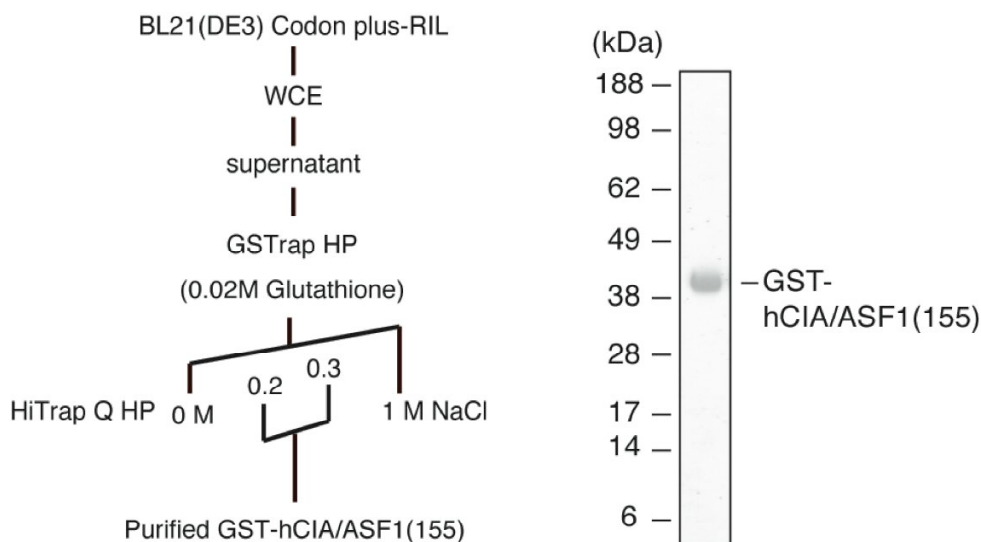


図 9. GST-hCIA/ASF1(155)の精製フローおよび SDS-PAGE

2.4 DBD(CCG1)の精製

<目的>

結晶化、相互作用解析に使用するヒト由来の DBD(CCG1)を精製する。

<実験方法>

基本転写因子 TFIID の最大サブユニット CCG1 の高保存領域であるプロモドメインの 1342~1629 アミノ酸の領域をクローニングした高発現ベクターは、堀越研より分与されたものを使用した。培養、精製に使用したバッファーや培地の組成等については章末を参照されたい。ヒト由来 DBD(CCG1)の培養、精製方法を以下に示す。

ヒト由来 DBD(CCG1)の発現プラスミド (pET15b DBD(CCG1))を用いて、大腸菌 BL21(DE3) Codon plus-RIL (Stratagene)を形質転換し、TBG-M9 培地、26.5°C 培養により培養菌体を取得した。培養菌体は 1 mM PMSF と 0.1% NP-40 を含む buffer A を用いてけん濁し、超音波破碎を行った。全細胞抽出液を 20,000 x g, 4°C の条件で1時間遠心し、不溶性画分を取り除いた後、破碎上清を buffer A で平衡化した HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)に添加した。Buffer A を用いて HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V. (column volume)で洗浄した後、buffer B を用いて 40-250 mM imidazole, 8 mL/fraction, 溶出容量 80 mL の溶出条件で His-DBD(CCG1)を溶出した。His-DBD(CCG1)を含むフラクションを回収し、ヒスタグを切断するためにトロンビンプロテアーゼ (GE Healthcare)を 10 mg に対して 1 unit の割合で添加した。トロンビンプロテアーゼ (GE Healthcare)と His-DBD(CCG1)を含むタンパク質溶液を buffer G に対して室温で透析し、His-DBD(CCG1)からヒスタグを切断した。HisTrap (GE Healthcare, 1 mL)と HiTrap Q HP (GE Healthcare, 5 mL)カラムをタンデムに接続した後、buffer H を用いて平衡化し、透析した DBD(CCG1)を添加した。DBD(CCG1)を添加した後、HisTrap カラム (GE, 1mL)は取り外す。Buffer H を用いて HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V.で洗浄した後、Buffer I を用いて 0-1 M NaCl, 1 mL/fraction, 溶出容量 100 mL の溶出条件で、DBD(CCG1)を溶出した。精製した DBD(CCG1)を buffer J に対して 4°C で透析を行い、バッファー交換を行った。精製タンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

<実験結果および考察>

精製した DBD(CCG1)の純度を SDS-PAGE で検定した結果、38 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (図 10)。ExPASy の ProtParam を用いてアミノ酸配列から見積った DBD(CCG1)の分子量は約 34 kDa であり、精製タンパク質の分子量とよく一致することがわかる。さらに、精製した DBD(CCG1)の 280 nm, 260 nm における吸光度を測定したところ、 A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以上の値を示すことから、核酸の混入は少なく高純度の DBD(CCG1)が得られたと考えられる。以上の精製方法により、1 L の培養菌体当たり、5 mg 程度の精製標品が得られた。

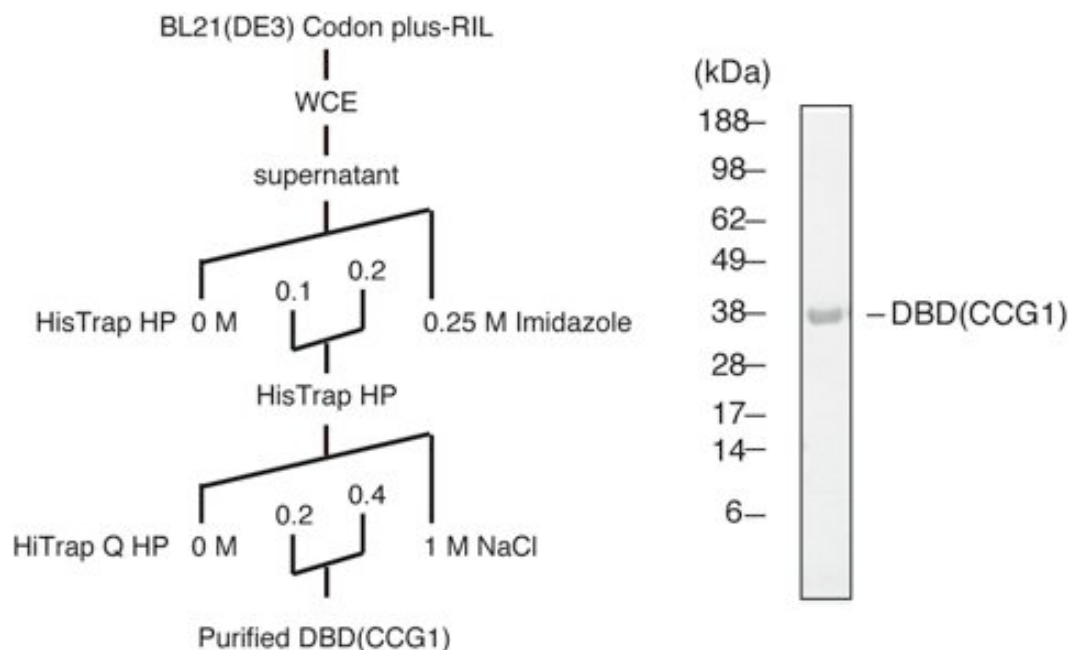


図 10. DBD(CCG1)の精製フローおよび SDS-PAGE

2.5 セレノメチオニン置換体 DBD(CCG1)の精製

<目的>

結晶化に使用するヒト由来のセレノメチオニンを導入した DBD(CCG1) (以下、Se DBD(CCG1)と略す)を精製する。

<実験方法>

培養、精製に使用したバッファーや培地の組成等については章末を参照されたい。ヒト由来セレノメチオニン置換体 DBD(CCG1)の培養、精製方法を以下に示す。

ヒト由来 DBD(CCG1)の発現プラスミド (pET15b DBD(CCG1))を用いて、大腸菌 B834(DE3) pLysS (Novagen)を形質転換し、LeMaster 培地、26.5°C 培養により培養菌体を取得した。培養菌体は 1 mM PMSF と 0.1% NP-40 を含む buffer A を用いてけん濁し、超音波破碎を行った。全細胞抽出液を 20,000 x g, 4°C の条件で 1 時間遠心し、不溶性画分を取り除いた後、破碎上清を buffer A で平衡化した HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)に添加した。Buffer A を用いて HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V. (column volume)で洗浄した後、buffer B を用いて 40-250 mM imidazole, 8 mL/fraction, 溶出容量 80 mL の溶出条件で His-Se DBD(CCG1)を溶出した。His-Se DBD(CCG1)を含むフラクションを回収し、ヒスタグを切断するためにトロンビンプロテアーゼ (GE Healthcare)を 10 mg に対して 1 unit の割合で添加した。トロンビンプロテアーゼ (GE Healthcare)と His-Se DBD(CCG1)を含むタンパク質溶液を buffer G に対して室温で透析し、His-Se DBD(CCG1)からヒスタグを切断した。HisTrap (GE Healthcare, 1 mL)と Resource Q (GE Healthcare, 6 mL)カラムをタンデムに接続した後、buffer H を用いて平衡化し、透析した DBD(CCG1)を添加した。Se DBD(CCG1)を添加した後、HisTrap カラム (GE Healthcare, 1 mL)は取り外す。Buffer H を用いて Resource Q カラム (GE Healthcare, 6 mL)を 5C.V.で洗浄した後、Buffer I を用いて 0-1 M NaCl, 1 mL/fraction, 溶出容量 100 mL の溶出条件で、Se DBD(CCG1)を溶出した。精製した Se DBD(CCG1)を buffer J に対して 4°C で透析を行い、バッファー交換を行った。精製タンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

<実験結果および考察>

精製した Se DBD(CCG1)の純度を SDS-PAGE で検定した結果、38 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (図 11)。ExPASy の ProtPrm を用いてアミノ酸配列から見積った Se DBD(CCG1)の分子量は約 34 kDa であり、精製タンパク質の分子量とよく一致することがわかる。さらに、精製した Se DBD(CCG1)の 280 nm, 260 nm における吸光度を測定したところ、 A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以上の値を示すことから、核酸の混入は少なく高純度の Se DBD(CCG1)が得られたと考えられる。DBD(CCG1)野生型と比較して、得られるタンパク質量や純度の低下はみられず、DBD(CCG1)野生型と同程度の純度の Se DBD(CCG1)が精製することができている。以上の精製方法により、1 L の培養菌体当たり、5 mg 程度の精製標品が得られた。

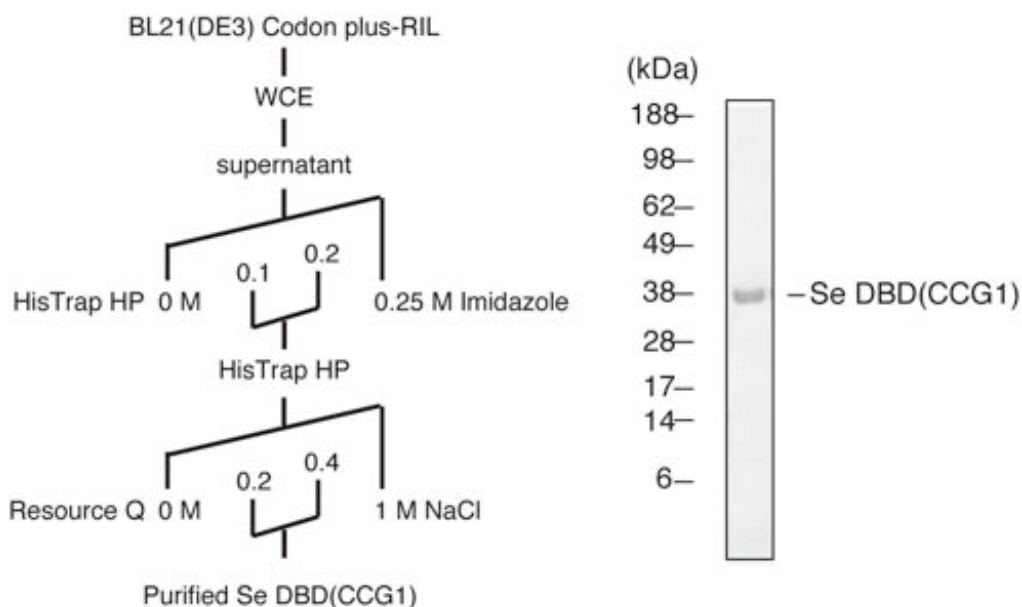


図 11. Se DBD(CCG1)の精製フローおよび SDS-PAGE

2.6 His-DBD(CCG1)の精製

<目的>

相互作用解析に使用するヒト由来の His-DBD(CCG1)を精製する。

<実験方法>

培養、精製に使用したバッファーや培地の組成等については章末を参照されたい。ヒト由来 His-DBD(CCG1)の培養、精製方法は以下に示す。

ヒト由来 DBD(CCG1)の発現プラスミド (pET15b DBD(CCG1)) を用いて、大腸菌 BL21(DE3) Codon plus-RIL (Stratagene)を形質転換し、TBG-M9 培地、26.5°C 培養により培養菌体を取得した。培養菌体は 1 mM PMSF と 0.1% NP-40 を含む buffer A を用いてけん濁し、超音波破碎を行った。全細胞抽出液を 20,000 x g, 4°C の条件で1時間遠心し、不溶性画分を取り除いた後、破碎上清を buffer A で平衡化した HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL) に添加した。Buffer A を用いて HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL) を 5 C.V. (column volume)で洗浄した後、Buffer B を用いて 40-250 mM imidazole, 8 mL/fraction, 溶出容量 80 mL の溶出条件で His-DBD(CCG1)を溶出した。His-DBD(CCG1)を含むフラクションを回収し、buffer G に対して 4 °C で透析した。Buffer H を用いて HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V.で洗浄した後、buffer I を用いて 0-1 M NaCl, 1 mL/fraction, 溶出容量 100 mL の溶出条件で、His-DBD(CCG1)を溶出した。精製した His-DBD(CCG1)を buffer J に対して 4°C で透析を行い、バッファー交換を行った。精製タンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

<実験結果および考察>

精製した His-DBD(CCG1)の純度を SDS-PAGE で検定した結果、38 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (図 12)。ExPASy の ProtPrm を用いてアミノ酸配列から見積った His-DBD(CCG1)の分子量は約 36 kDa であり、精製タンパク質の分子量とよく一致することがわかる。さらに、精製した His-DBD(CCG1)の 280 nm, 260 nm における吸光度を測定したところ、 A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以上の値を示すことから、核酸の混入は少なく高純度の DBD(CCG1)が得られたと考えられる。しかしながら、精製バッチにより A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以下の値を示すことが稀にみられることから、核酸の混入には注意する必要がある。おそらく大腸菌由来の核酸が混入していると考えられるが、その混入した経緯については不明である。以上の精製方法により、1 L の培養菌体当たり 8 mg 程度の精製標品が得られた。

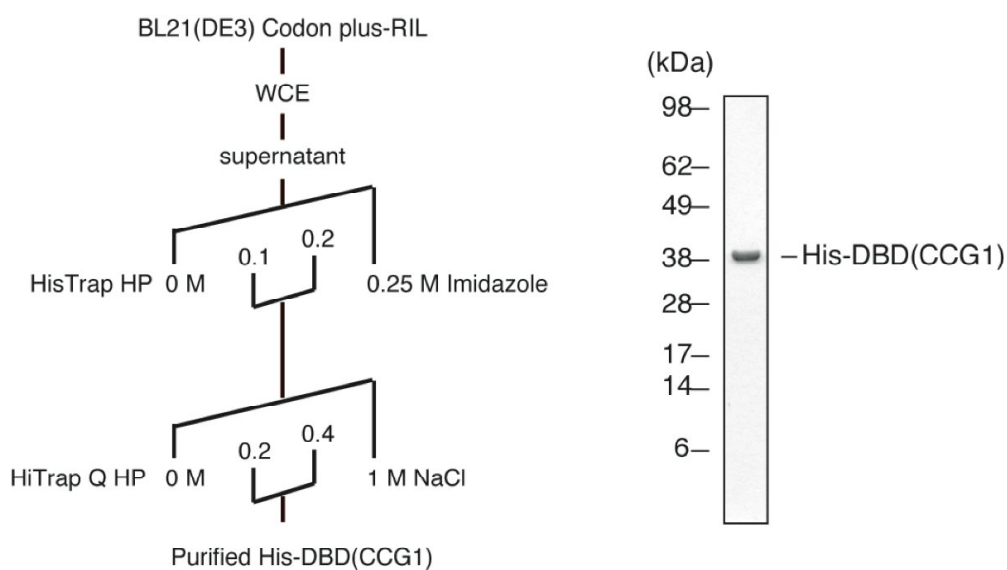


図 12. His-DBD(CCG1)の精製フローおよび SDS-PAGE

2.7 GST-yCia1p/Asf1p(155)の精製

<目的>

相互作用解析に使用する酵母由来の GST-yCia1p/Asf1p(155)を精製する。

<実験方法>

Cia1/Asf1 の高度に保存された N 末端 155 アミノ酸の領域を高発現ベクター pGEX4T-1 (pGEX4T-1 yCia1p/Asf1p(155))にクローニングを行った。培養、精製に使用したバッファーや培地の組成等については章末を参照されたい。酵母由来 GST-yCia1p/Asf1p(155)の培養、精製方法を以下に示す。

酵母由来 GST-yCia1p/Asf1p(155)の発現プラスミド (pGEX4T-1 yCia1p/Asf1p(155))を用いて、大腸菌 BL21(DE3) Codon plus-RIL (Stratagene)を形質転換し、TBG-M9 培地、37°C 培養により培養菌体を取得した。培養菌体は 1 mM PMSF と 0.1% NP-40 を含む buffer E を用いてけん濁し、超音波破碎を行った。全細胞抽出液を 20,000 x g, 4°C の条件で 1 時間遠心し、不溶性画分を取り除いた後、破碎上清を buffer E で平衡化した GSTrap HP カラム (GE Healthcare, 5 mL) に添加した。Buffer E を用いて GSTrap HP カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V. (column volume)で洗浄した後、Buffer F を用いて 20 mM 還元型-グルタチオン, 2 mL/fraction, 溶出容量 20 mL の溶出条件で GST-yCia1p/Asf1p(155)を溶出した。GST-yCia1p/Asf1p(155)を含むフラクションを回収し、buffer C で 2 倍に希釈した。希釈した GST-yCia1p/Asf1p(155)を buffer C で平衡化した HisTrap Q HP カラム (GE Healthcare, 5 mL)に添加した。Buffer C を用いて HisTrap Q HP カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5C.V.で洗浄した後、Buffer D を用いて 0-1 M NaCl, 1 mL/fraction、溶出容量 120 mL の溶出条件で、GST-yCia1p/Asf1p(155)を溶出した。精製した GST-yCia1p/Asf1p(155)を buffer J に対して 4°C で透析を行い、バッファー交換を行った。精製タンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

<実験結果および目的>

精製した GST-yCia1p/Asf1p(155)の純度を SDS-PAGE で検定した結果、40 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (図 13)。ExPASy の ProtPrm を用いてアミノ酸配列から見積った GST-yCia1p/Asf1p(155)の分子量は約 36 kDa であり、精製タンパク質の分子量とよく一致することがわかる。さらに、精製した GST-yCia1p/Asf1p(155)の 280 nm, 260 nm における吸光度を測定したところ、 A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以上の値を示すことから、核酸の混入は少なく純度の高い GST-yCia1p/Asf1p(155)が得られたと考えられる。以上の精製方法により、1 L の培養菌体当たり 1 mg 程度の精製標品が得られた。

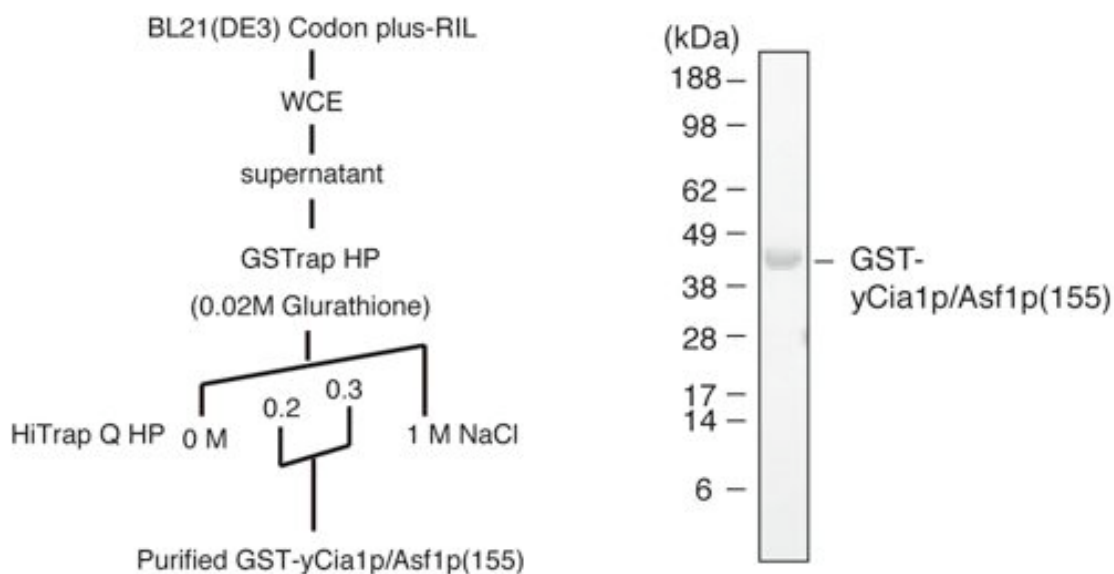


図 13. GST-yCia1p/Asf1p(155)の精製フローおよび SDS-PAGE

2.8 His-yBdf1p の精製

<目的>

相互作用解析に使用する酵母由来の His-yBdf1p を精製する。

<実験方法>

ヒト DBD(CCG1)の酵母ホモログである Bdf1p の 147-422 アミノ酸の領域をクローニングした高発現ベクターは、東大・分生研の千村博士らの論文を参考にしてクローニングを行った⁽⁹⁾。培養、精製に使用したバッファーや培地の組成等については章末を参照されたい。酵母由来の His-Bdf1p の培養、精製方法を以下に示す。

酵母由来 His-yBdf1p の発現プラスミド (pET28b yBdf1p) を用いて、大腸菌 BL21(DE3) Codon plus-RIL (Stratagene)を形質転換し、LB 培地、37°C 培養により培養菌体を取得した。培養菌体は 1 mM PMSF と 0.1% NP-40 を含む buffer A を用いてけん濁し、超音波破碎を行った。全細胞抽出液を 20,000 x g, 4°C の条件で 1 時間遠心し、不溶性画分を取り除いた後、破碎上清を buffer A で平衡化した HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)に添加した。Buffer A を用いて HisTrap カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V. (column volume)で洗浄した後、Buffer B を用いて 40-250 mM imidazole、8 mL/fraction、溶出容量 80 mL の溶出条件で His-Bdf1p を溶出した。His-Bdf1p を含むフラクションを回収し、buffer C で 2 倍希釈した。buffer C を用いて平衡化し、透析した His-yBdf1p を添加した。Buffer D を用いて HisTrap SP HP カラム (GE Healthcare, 5 mL)を 5 C.V.で洗浄した後、0-1 M NaCl、1 mL/fraction、溶出容量 100 mL の溶出条件で、His-yBdf1p を溶出した。HiTrap SP HP カラムから溶出する際には 2 つのピークが表れるが、後半のピークの His-yBdf1p のフラクションを回収する。精製した His-yBdf1p を buffer J に対して 4°C で透析を行い、バッファー交換を行った。精製タンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

<実験結果および考察>

精製した His-yBdf1p の純度を SDS-PAGE で検定した結果、38 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (図 14)。ExPASy の ProtParam を用いてアミノ酸配列から見積った His-yBdf1p の分子量は約 36 kDa であり、精製タンパク質とよく一致することがわかる。さらに、精製した His-yBdf1p の 280 nm, 260 nm における吸光度を測定したところ、 A_{280} に対する A_{260} の吸光度の比が 1.5 以上の値を示すことから、核酸の混入は少なく純度の高い His-yBdf1p が得られたと考えられる。以上の精製方法により、1 L の培養菌体当たり、5 mg 程度の精製標品が得られた。

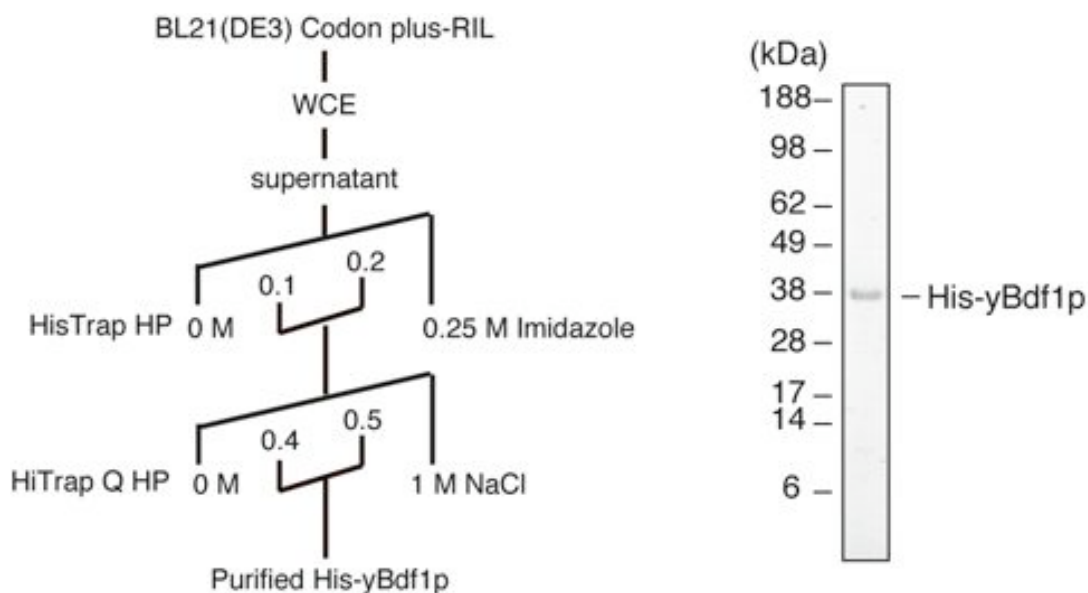


図 14. His-yBdf1p の精製フローおよび SDS-PAGE

<使用機器>

- 小型遠心機: MX-300 (TOMY)
- ローター: AR500-04 (TOMY), AR015-24 (TOMY)
- 限外ろ過フィルター: Amicon Ultra 15 (Millipore)
- AKTA prime (GE Healthcare)
- 分光光度計: DU 640 SPECTROPHOTOMETER (Beckman Coulter)
- 大型遠心機: Avanti HP-20 XP-1 (Beckman Coulter)
- ローター: JLA 8.1000 8000rpm (Beckman Coulter)
- 振とう培養器: Bioshaker BR-180LF (TAITEC)
- オートクレーブ: SX-700 (TOMY)
- 超音波式ホモジナイザー (TAITEC)

<培地>

TBG-M9 培地 (f. 2L)

- | | |
|------------------------|----------------------|
| - Bacto tryptone | 20 g (final 1%) |
| - NaCl | 10 g (final 0.5%) |
| - 20 x M9 | 100 mL |
| - 1M MgSO ₄ | 2 mL (final 1 mM) |
| - 40 % Glucose | 20 mL (final 0.4%) |

↓ autoclave 120 °C, 20min

↓ OK

20 x M9

- | | |
|------------------------------------|------|
| - NH ₄ Cl | 16 g |
| - KH ₂ PO ₄ | 48 g |
| - Na ₂ HPO ₄ | 96 g |

↓ autoclave 120 °C, 20min

↓ OK

LeMaster 培地 (f. 2L)

- | | |
|----------------------------|-------------------------------|
| - Auto-clavable portion | 1.8 L (WAKO: 特注品 SeMet 用培地) |
| - Non-autoclavable portion | 200 ml |
| - VITAMIN (x100) | 10 ml (SIGMA, K3129) |

↓ autoclave 120 °C, 20min

↓ OK

Non-autoclavable portion

- | | |
|---|---------|
| - D(+)-glucose | 20 g |
| - MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.5 g |
| - FeSO ₄ · 7H ₂ O | 8.35 mg |
| - H ₂ SO ₄ | 16.6 µl |

↓ autoclave 120 °C, 20min

Autoclavable portion の組成

L-alanine , L(+)-arginine • HCl, L-asparatic acid , L-cystine, L-glutamic acid, L(+)-glutamine, glycine, L-histidine, L(+)-isoleucine, L-leucine, L-lycine • HCl, L(-)-phenylalanine, L(-)-proline, L-serine, L(-)-threonine, L(-)-tyrosine, L(-)-valine, adenine, guanosine, thymine, uracil, sodium acetate, succinic acid, ammonium , sodium hydroxide, K₂HPO₄

<精製>

精製に使用したレジン

- HisTrap HP (GE Healthcare, 1 mL, 5 mL)
- HiTrap Q HP (GE Healthcare, 5 mL)
- Resource Q HP (GE Healthcare, 6 mL)
- Benzamidine FF (GE Healthcare, 1 mL)
- DEAE toyopearl 650M (TOSOH, 75 mL)

精製に使用したバッファー

- Buffer A: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 40 mM imidazole, 10 mM mercaptoetanol
- Buffer B: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 250 mM imidazole, 10 mM mercaptoetanol
- Buffer C: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5% glycerol, 5 mM mercaptoetanol
- Buffer D: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 5% glycerol, 5 mM mercaptoetanol
- Buffer E: 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM mercaptoetanol
- Buffer F: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM mercaptoetanol, 20 mM reduced glutathione
- Buffer G: 20 mM Tris-HCl pH 8.9, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 100 mM imidazole, 5 mM mercaptoetanol
- Buffer H: 20 mM Tris-HCl pH 8.9, 10% glycerol, 5 mM mercaptoetanol
- Buffer I: 20 mM Tris-HCl pH 8.9, 1 M NaCl, 10 % glycerol, 5 mM mercaptoetanol
- Buffer J: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM mercaptoetanol

<電気泳動>

- NuPAGE Bis-Tris 4-12% Gel (Invitrogen)
- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)

第 3 章

結晶化

3.1 CIA1/ASF1-DBD(CCG1)複合体溶液の調製

<目的>

結晶化に使用する CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の溶液を調製する。

<実験方法>

2.1 および 2.4 の方法で精製した CIA/ASF1 (モル吸光係数 $\epsilon=21430 \text{ M cm}^{-1}$) と DBD(CCG1) (モル吸光係数 $\epsilon=24870 \text{ M cm}^{-1}$) を 280 nm の波長を使って定量した後、モル比 1:1 となるように混合した。CIA/ASF1-DBD(CCG1)の混合液を Amicon Ultra-15 (Molecular Weight Cut Off (MWCO) = 10 K)に添加し、濃度の密度勾配ができるように遠心スピードを 1500 rpm \rightarrow 3000 rpm \rightarrow 5000 rpm へと段階的に上げながら 1 mL になるまで濃縮を行った。タンパク質溶液が 1 mL に濃縮されたところで buffer J を 10 mL 添加し、5000 rpm, 4°C の遠心条件で濃縮を進めた。この操作を 3 回繰り返すことでバッファ交換を行い、終濃度 15-20 mg ml⁻¹ になるまで濃縮した。その後、20 mM Tris-HCl pH7.5, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 5mM 2-mercaptoethanol のバッファ条件でゲル濾過カラム HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare)を用いて CIA/ASF-DBD(CCG1) 複合体の精製を試みた。

<実験結果および考察>

濃縮の際、膜への吸着は少なく、回収率については毎回 90% 以上であった。また、ゲル濾過カラム を用いて CIA/ASF-DBD(CCG1) 複合体の精製を試みたが、CIA/ASF1-DBD(CCG1) 複合体を単離することはできなかった。ゲルろ過の溶出ピークは、シングルピークとして得られたことから複合体を形成しているように思えた。しかし、SDS-PAGE で各フラクションを分析すると、個々のタンパク質が別々に溶出していることがわかった。ゲル濾過精製により複合体の単離できない理由は、CIA/ASF1 と DBD(CCG1)の間の解離会合が非常に早く、ゲルろ過カラム内で希釈されてしまうことだと考えられる。

以上の結果から、CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の結晶化には、濃縮したタンパク質溶液を直接使用することにした (図 15)。

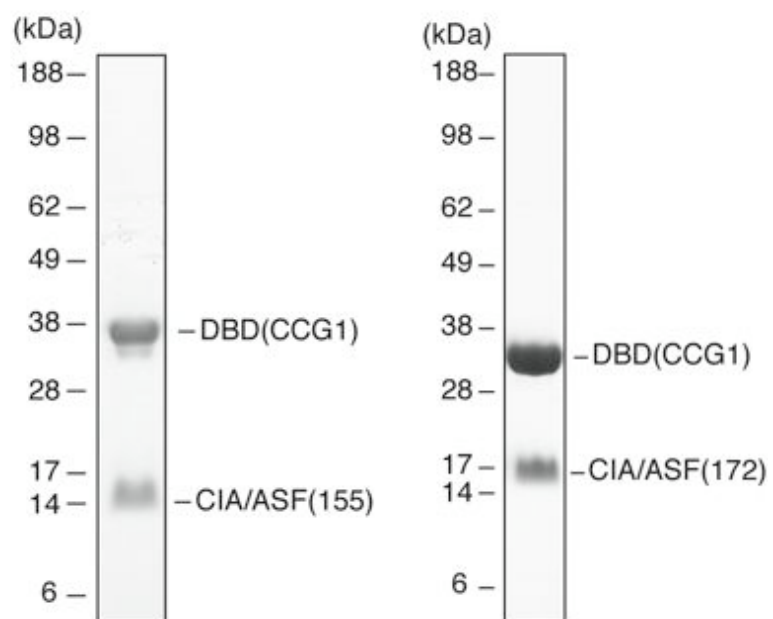


図 15. 結晶化に用いた CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の SDS-PAGE

3.2 CIA/ASF1(172)-DBD(CCG1)複合体の結晶化

<目的>

回折データを収集するため CIA/ASF1(172)-DBD(CCG1)複合体の結晶化を行う。

<実験方法>

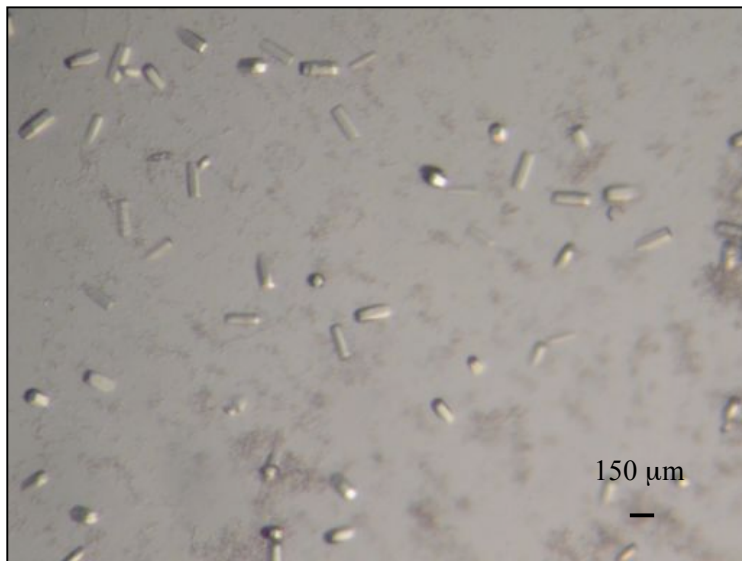
3.1 の方法でタンパク質複合体溶液を調製する。試料を調製した後、Hampton 社製の Crystal Screen 1 & 2 (196 条件)、Emerald Bio Structures 社製の Wizard 1 & 2 (100 条件) の結晶化条件で初期スクリーニングを行った。結晶化の方法は、リザーバー容量を 500 μl 、1 μl のタンパク質溶液と 1 μl のリザーバー溶液を混合してドロップレットの容量を 2 μl にして、20°C でハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。

<実験結果および考察>

初期スクリーニングの結果、1 週間が経過した時点で、以下の 10 種類の結晶化条件で 50 μm 程度の小さな結晶の成長がみられた。10 種類の結晶化条件の中で、1.26 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 M MES pH 6.0 の結晶化条件においてのみ 0.15 x 0.05 x 0.05 mm^3 程度の結晶を得られることがわかった (図 16)。

結晶成長がみられた結晶化条件

- (1) 1.26 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 M MES pH 6.0
- (2) 1.0 M K/Na tartrate, 0.1 M MES pH 6.0
- (3) 1.5 M Li_2SO_4 , 0.1 M HEPES pH 7.5
- (4) 1.26 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 M Cacodylate pH 6.5
- (5) 1.0 M K/Na tartrate, 0.2 M NaCl, 0.1 M Imidazole pH 8.0
- (6) 1.26 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 M Li_2SO_4 , 0.1 M Tris pH 8.5
- (7) 1.0 M CH_3COONa , 0.1 M Imidazole pH 6.5
- (8) 10% 1,4-Dioxane, 1.6 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 0.1 M MES pH 6.5
- (9) 1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 M NaCl, 0.1 M HEPES pH 7.5
- (10) 50% MPD, 0.2 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.1 M Tris pH 8.5



Method	Hanging drop vapour diffusion
Reservoir	1.26 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M MES pH 6.0
Size	0.15 x 0.05 x 0.05 mm ³
Period	1 week
Temperature	20 °C

図 16. CIA/ASF1(172)-DBD(CCG1)複合体の結晶

3.3 セレノメチオニン置換体 CIA/ASF(172)-DBD(CCG1)複合体の結晶化および最適化

<目的>

多波長異常分散法 (MAD 法) は、一つの結晶からセレン原子の吸収端近傍での異なる波長 (通常 3 波長) でデータ収集を行い、それらデータセット間の異常分散差を利用して位相決定する方法である。この MAD 法による構造解析を行うために、セレノメチオニン置換体タンパク質を含む Se CIA/ASF(172)-DBD(CCG1) 複合体、CIA/ASF(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶化を行う。

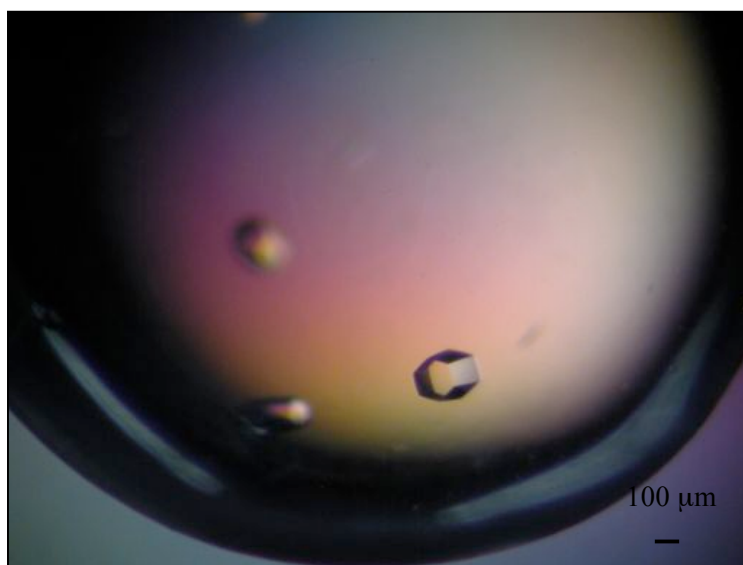
<実験方法>

2.1, 2.2, 2.4, 2.5 の方法で各タンパク質を精製した。3.1 の方法で Se CIA/ASF-DBD(CCG1)複合体、CIA/ASF1-Se DBD(CCG1)複合体溶液を調製した。3.2 の結晶化条件のスクリーニングで得られた 1.26 M (NH₄)₂ SO₄, 0.1 M MES pH 6.0 の結晶化条件で Se CIA/ASF-DBD(CCG1)複合体、CIA/ASF1-Se DBD(CCG1)複合体の結晶化を行った。結晶成長が認められた場合には、結晶化条件の最適化を行った。

<実験結果および考察>

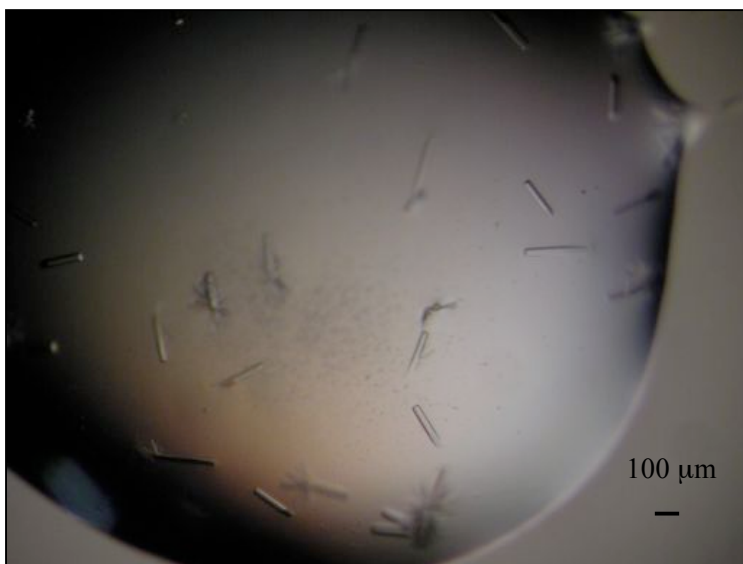
1.26 M NH₄ (SO₄)₂, 0.1 M MES pH 6.0 の条件で結晶化を行った結果、Se CIA/ASF(172)-DBD(CCG1)複合体、CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体ともに 0.05 x 0.01 x 0.01 mm³ 程度の小さな結晶を得ることに成功した。次に、1.26 M (NH₄)₂ SO₄, 0.1 M MES pH 6.0 の結晶化条件をもとに、Hampton 社製の detergent screen を用いて CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶化を行ったが、100 μm の大きさを超える結晶の成長はみられなかった。そこで、1.2~0.9 M までの 0.1 M 間隔で NH₄(SO₄)₂ の濃度を変化させ、バッファの pH を 5.6~6.0 の 0.1 間隔で変化させて結晶化条件のスクリーニングを行った。0.9~1.1 M (NH₄)₂ SO₄, 0.1M MES pH 5.6~5.7 の結晶化条件で、100 μm 程度の大きさ CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶を得ることができた。さらに、0.9~1.1 M までの 0.05 M 間隔で (NH₄)₂ SO₄ の濃度を変化させ、バッファの pH を 5.6~5.7 の 0.05 間隔で結晶化条件のスクリーニングを行った結果、0.95~1.1 M (NH₄)₂ SO₄, 0.1 M MES pH 5.65~5.7 の結晶化条件で、150~200 μm 程度の大きさ CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶を得ることに成功した (図 17)。しかしながら、安定的に 0.2 mm³ の結晶を得ることができず、安定した結晶化条件を確立するまでには至らなかった。また、Se CIA/ASF1(172)-DBD(CCG1)複合体の結晶については、最適化した 0.95~1.1 M

(NH₄)₂SO₄, 0.1 M MES pH 5.65~5.7 の結晶化条件においても 0.1 mm³程度の大きさの結晶しか得られなかった (図 18)。



Method	Hanging drop vapour diffusion
Reservoir	1.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M MES pH 5.65
Size	0.15 x 0.1 x 0.1 mm ³
Period	1 week
Temperature	20 °C

図 17. CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶



Method	Hanging drop vapour diffusion
Reservoir	1.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M MES pH 5.65
Size	0.1 x 0.05 x 0.05 mm ³
Period	1 week
Temperature	20 °C

図 18. Se CIA/ASF1(172)-DBD(CCG1)複合体の結晶

3.4 CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1) の回折強度データ収集条件の検討

<目的>

3.3 の方法で得られた CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の 200 μm 程度の結晶を使って、回折強度データの測定を行った。実験室系の X 線回折装置 FR-D を使ったデータ測定は、得られている CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶の数が少ないことから断念し、高エネルギー加速器研究機構のシンクロトロン放射光施設 PF (NW12, BL5, 6)での測定に専念した。回折データ収集するにあたり、まず、クライオプロテクタントの種類、浸す時間、放射線の照射時間の検討を行った。

<実験方法>

CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体のスタンダードバッファーは、結晶が解けてしまうことのない 1.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 M MES pH 5.6 に決定した。スタンダードバッファーには、放射線による結晶損傷を防ぐためのクライオプロテクタントとして 25, 30% グリセロール、25, 30% エチレングリコール、25, 30% トレハロースを添加する。結晶試料を結晶化プレートからクライオプロテクタント含有のスタンダードバッファーにクライオループを使って移す。クライオプロテクタント含有のスタンダードバッファーに数秒から数分浸した後、クライオループを回折計にマウントする。マウントした結晶に放射線を照射し、測定した回折像の分解能、回折点の分離、モザイク性などの評価を行い、クライオプロテクタントの良否を判断した。クライオプロテクタントの種類を決定した後、クライオプロテクタント含有のスタンダードバッファーに浸す時間の検討を行った。さらに、測定した回折像の強度を確認することで露光時間の設定を行った。

＜実験結果および考察＞

クライオプロテクタントの種類を検討の結果、25, 30%グリセロール含有スタンダードバッファーをクライオプロテクタントとして用いることにより、最も鋭い回折点を得られた。凍結させた結晶をスタンダードバッファーに1~2分間戻した後再度凍結させるアニーリングも行ったが、アニーリングの効果はほとんどなかった。次に、クライオプロテクタントに浸す時間の検討を行った。浸す時間は、30秒、1~2分、10分の3種類を検討した。1~2分浸したときに最も鋭い回折点を得ることができ、分解能も5 Å から3.5 Å 程度まで向上した。クライオ条件検討の結果から、CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶は、25もしくは30%グリセロールに1~2分浸し、クライオノズルで結晶を凍らせることで高分解能の回折が得られ、質のよいデータが得られる可能性が高いことがわかった。

さらに、CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶に放射線を照射する時間を増加させると回折点が増加することから、放射線損傷を受けることがわかった。そこで、放射線損傷を最小限に抑え、より分解能の高い回折データを収集するため、露光時間は60秒程度にすることに決定した。

3.5 CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1) の回折強度データ収集

<目的>

MAD 法による構造解析を行うために、シンクロトロン放射光施設にてセレノメチオニン置換体タンパク質を含む CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の回折データを収集する。

<実験方法>

1. 回折データの収集

3.4 の方法で結晶試料を回折計にマウントして、 ϕ 軸を 1° ずつ回転させながら、露光時間 60 秒で、120 枚の反射データを収集した。検出器は、CCD Quantum 210 (ADSC) を用いた。測定データは、*HKL2000* や *XDS* を用いて処理した^(25, 45)。

2. Merohedral Twin 結晶の判定

CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶は、 a 軸と b 軸が等しい結晶であることから、結晶中のある部分が上下に反対になってしまうことがある。Merohedral twin 結晶は、上向きと下向きに配置した単位格子をもつ結晶であるため、測定により得られた回折点も上向き (h,k,l) と下向き $(h,k,-l)$ の回折点が存在することになる。実際に構造解析を行う際には、この上向きと下向きの反射点を分離して解析を行う必要がある。この上向きと下向きの割合を示す値を twin fraction と呼び、通常 α ($0 < \alpha < 0.5$) で示す。 $\alpha = 0.5$ の場合、完全な merohedral twin 結晶であるという。結晶が単結晶であるか merohedral twin 結晶であるかは、結晶の観察や回折像からでは判断できないことが多く、得られた反射強度分布を調べる必要がある。そこで、CCP4⁽¹⁰⁾ の Detwin、Britton plot、Yeast (H)、Uppsala Software factory の Dataman package 中の Local intensity を用いて、CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶が merohedral twin 結晶であるかどうか判定した。

<実験結果および考察>

1. 回折データの収集

放射光施設にて CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体結晶の回折実験を行い、これまでに 59 セットのデータセットを収集した。59 データセットの中で、最も分解能の高いデータは、cia1sebrm027 のデータセットであった。結晶の晶系は、hexagonal に属し、空間群 $P6_122$ 、格子定数 $a = b = 101.8 \text{ \AA}$ 、 $c = 272.2 \text{ \AA}$ であった。回折データ収集の結果、分解能は 3.2 \AA で、completeness = 99.3% (100.0%)、 $R_{\text{merge}} = 8.4$ (77.2)であった。

CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶は、 c 軸方向に長い辺をもつ形状をしている。 a および b 軸方向の結晶成長が c 軸方向に比べて低く、その回折像に異方性が生じていることから、 3.2 \AA を超える高分解能のデータを得ることができなかった。これまでに CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体結晶から得られた回折データは、 R_{merge} の値が非常に高く、completeness の値も低いことなども問題となっていた。これらの問題は、CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶が merohedral twin 結晶の兆候を示していると考えられる。

2. Merohedral Twin 結晶の判定結果

CCP4 の Detwin、Britton plot、Yeast (H)を用いてデータ解析を行った結果⁽¹⁰⁾、twin fraction は一貫して 0.25 程度の値を示していたことから、Merohedral Twin 結晶の兆候がはっきりとみられた (図 19, 20)。さらに、Merohedral Twin 結晶の判定で最も信頼性の高い方法として知られる Upssala Software factory の Dataman package の Local intensity を行った結果 [Upssala Software factory, Sweden]、CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶は $P6_1$ の merohedral twin 結晶であることがわかった (図 21)。

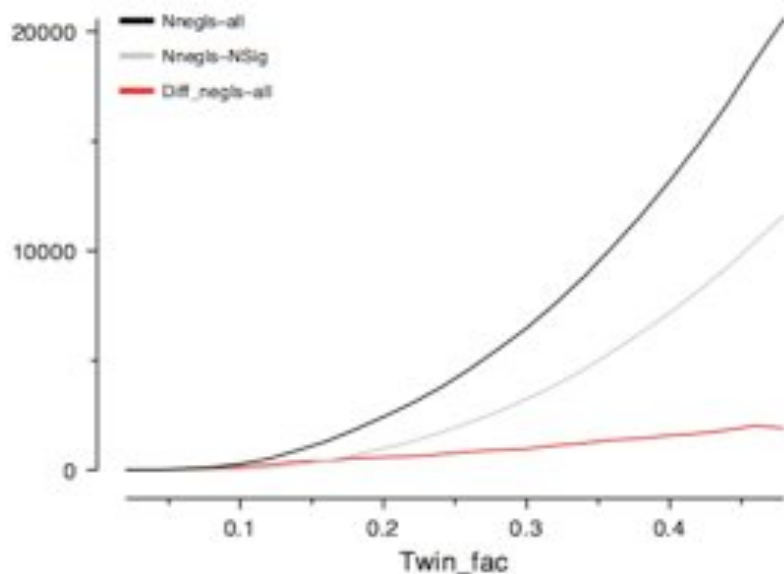


図 19. Britton plot による merohedral twin 結晶の判定結果

赤色の直線が完全な単結晶であることを示し、赤色の直線から離れるほど merohedral twin 結晶の可能性が高いことを示す。CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)結晶 (黒) の twin fraction は約 0.25 の値を示していることがわかる。

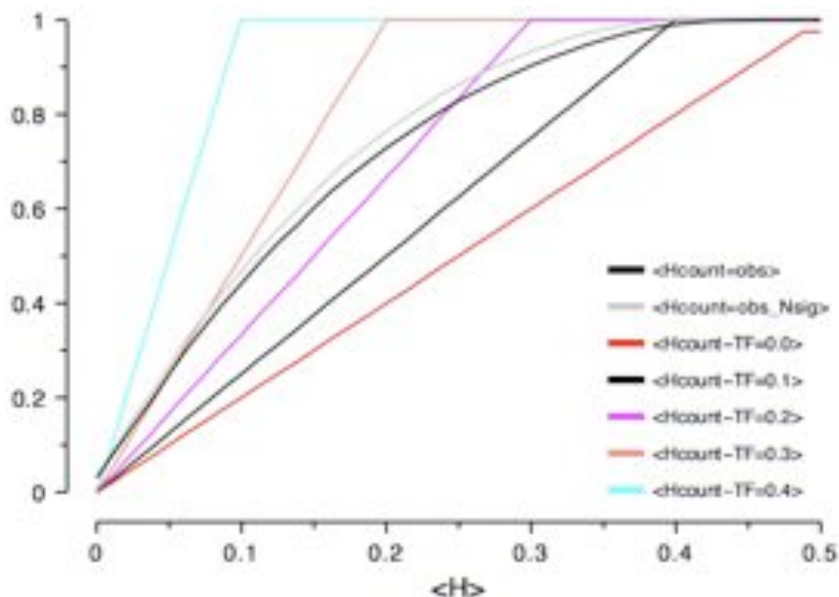


図 20. Yeates S(H) plot による merohedral twin 結晶の判定結果

赤色の直線が完全な単結晶であることを示し、赤色の直線から離れるほど merohedral twin 結晶の可能性が高いことを示す。CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)結晶 (黒) の twin fraction は約 0.25 の値を示していることがわかる。

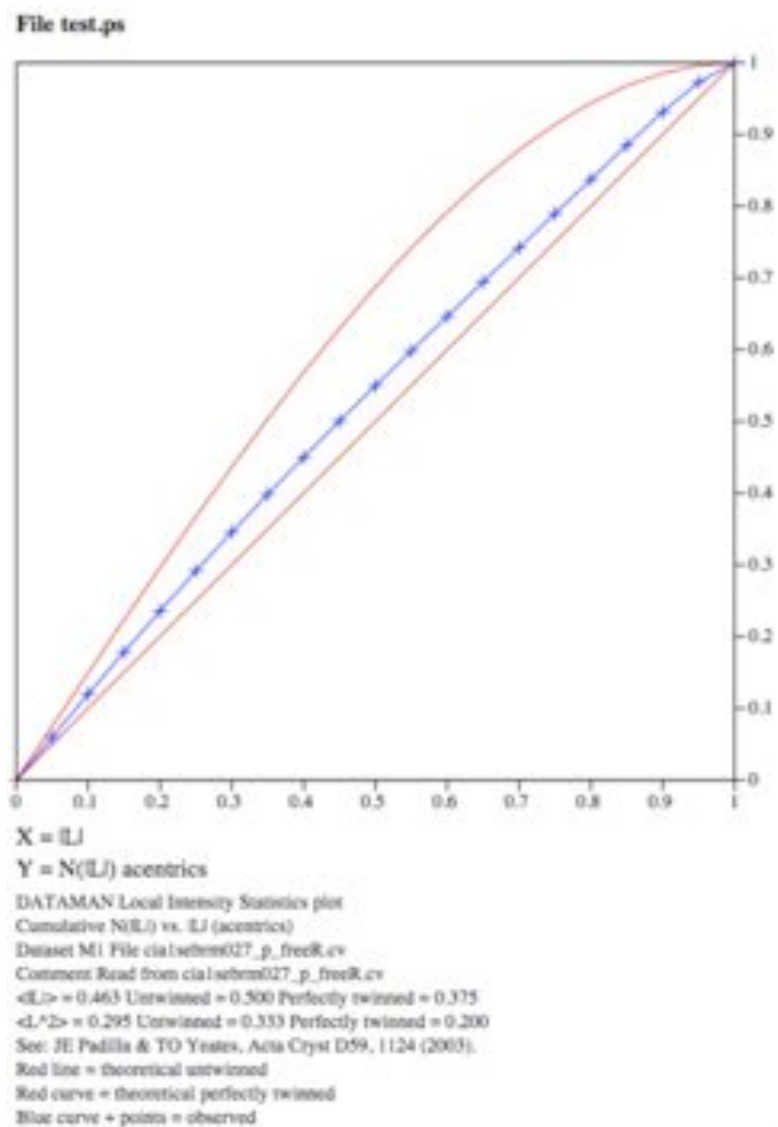


図 21. Local intensity による merohedral twin 結晶の判定結果

赤色の直線が完全な単結晶であることを示し、赤色の直線から離れるほど merohedral twin 結晶の可能性が高いことを示す。CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)結晶 (青) は merohedral twin 結晶であることを示している。

3.6 CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶化条件および最適化

<目的>

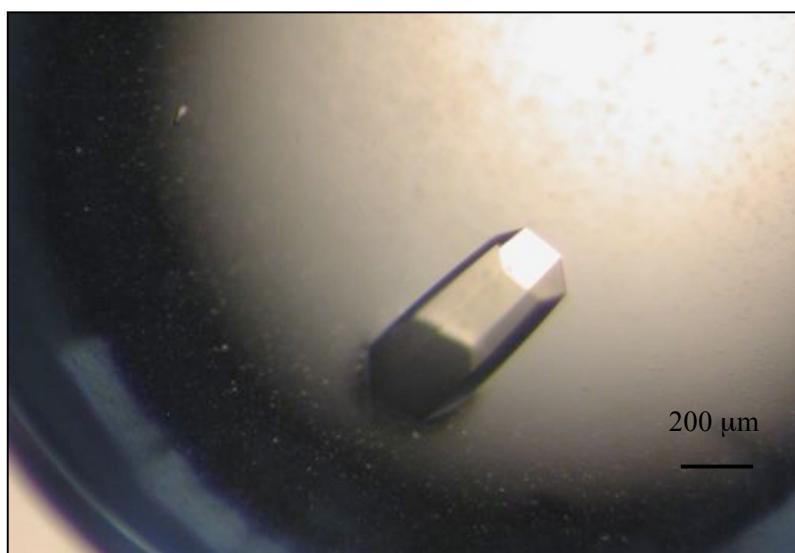
3.5の結果から、CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体結晶が merohedral twin 結晶であることが明らかになった。3.2 Å 分解能の merohedral twin 結晶では、構造解析は困難である。CIA/ASF1 は全長 204 アミノ酸のタンパク質で、N 末端 155 アミノ酸残基の領域が酵母からヒトまで高度に保存されている一方、それ以降の C 末端の領域の保存性は低い。そのため、結晶中で、CIA/ASF1 の C 末端が安定した構造をとらず、結晶のパッキングに悪影響を与えているのではないかと考えられる。そこで、CIA/ASF1(172)の C 末端領域を除いた CIA/ASF1(155)を使って結晶化することで、merohedral twin 結晶が解消されて構造決定可能な高分解能のデータを得られるのではないかと考え、CIA/ASF1(172)の C 末端領域を除いた CIA/ASF1(155)を使って結晶化を試みることにした。

<実験方法>

CIA/ASF1(155)は 2.1 の方法で精製を行った。その後、3.1~3.4 の方法で結晶化まで行った。

<実験結果および考察>

結晶化の結果、最大 $0.2 \times 0.2 \times 0.2 \text{ mm}^3$ の CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶を得ることができた。CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体結晶と比較して、結晶成長の再現性もよいことがわかった。さらに、結晶化条件の最適化を進めた結果、0.95~1.1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1M MES pH 5.65~5.7 の結晶化条件に 0.2~0.25 M Li_2SO_4 を添加することで、最大 $0.4 \times 0.25 \times 0.2 \text{ mm}^3$ の結晶を得ることに成功した (図 22)。以上のようにして、CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)の結晶複合体を安定に結晶化させる条件は確立することができた。



Method	Hanging drop vapour diffusion
Reservoir	0.95 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1M MES pH 5.65 0.25 M Li_2SO_4
Size	$0.4 \times 0.25 \times 0.05 \text{ mm}^3$
Period	1 week

図 22. CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶

3.7 多波長異常分散法(MAD)データの測定

<目的>

MADデータ測定を行うにあたり、結晶中にセレノメチオニンが導入されているかどうかを確認するため、CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶を用いてXAFS (X-ray Absorption Fine Structure) 測定を行った。

<実験方法>

吸収端はXAFS実験を行うことにより決定する。セレン原子からの異常分散をMCA (Multi channel analyzer) を用いて分析した所、散乱X線、セレン原子からの蛍光X線の2つのピークが得られた。そこで、X線の波長を変化させながら再度測定を行うと、蛍光X線が消失することから、セレノメチオニンが結晶中に導入されていることを確認した。その後、セレン原子の吸収端付近でX線の吸収スペクトルを測定し、Peak, edge, high remoteの波長、 f' および f'' を決定した。

<実験結果および考察>

XAFS測定を行った結果、セレン原子による蛍光 X線を検出したことから、CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体にセレノメチオニンが導入されていることがわかった(図23)。その後、セレン原子の吸収端付近でX線の吸収スペクトルを測定し、Peak (0.97918 Å)、Edge (0.97943 Å)、High remote (0.96420 Å)の波長と各波長での f' 、 f'' を決定した。

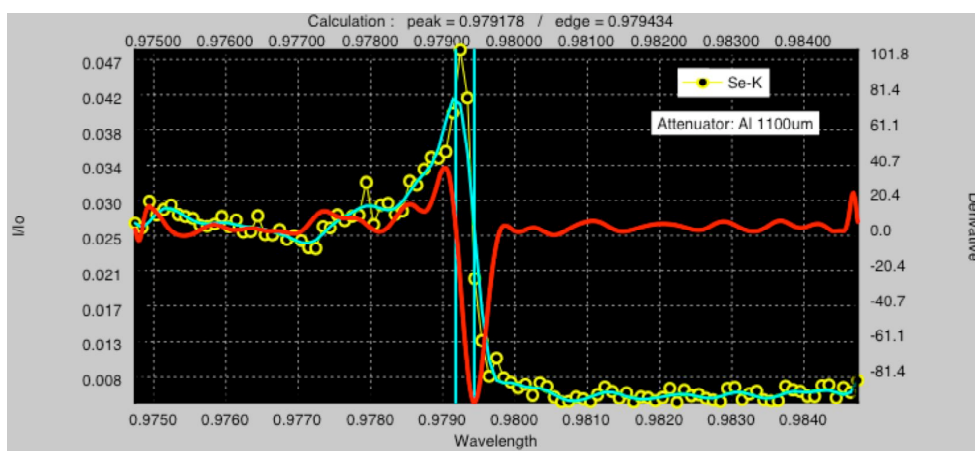


図 23. CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶の XAFS 測定

3.8 CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)の回折強度データ収集

<目的>

CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の回折データを収集する。

<実験方法>

1. 回折データの収集

結晶試料は、10%、20%、30% グリセロールの順に濃度を上げながらに1分間ずつ浸してクライオランプを利用して回折計にマウントした。peak, edge, high remote の各波長で、 ϕ 軸を 1° ずつ回転させながら、露光時間60秒で、それぞれ120枚の反射データを収集した。検出器は、CCD Quantum 315 (ADSC)を用いた。測定データは、*HKL2000* および *XDS* を用いて処理した^(25, 45)。

2. Merohedral Twin 結晶の判定

Uppsala Software factory の Dataman package 中の Local intensity を用いて、CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶が merohedral twin 結晶であるかどうか判定した。

<実験結果および考察>

1. 回折データの収集

シンクロトロン放射光施設にて X 線回折データ収集を行った結果、これまでに16個のデータセットを収集することができた。これらの全データセットの R_{merge} や I/σ の分解能に対してプロットすると、cia1sebrm072 のデータセットで最大分解能の回折データを収集できていることがわかる (図 24, 25)。Cia1sebrm072 データセットの分解能は 3.0 \AA で、completeness = 97.9% (90.7%)、 $R_{\text{merge}} = 7.4$ (20.8)であった (表 1)。CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶は、hexagonal に属し、空間群 $P6_122$ 、格子定数 $a = b = 102.2 \text{ \AA}$ 、 $c = 272.9 \text{ \AA}$ であることがわかった。CIA/ASF1(172)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶のデータセット (45 頁参照) と比較して、最外殻の R_{merge} の値が改善されていることがわかる。Cia1sebrm072 のデータセットの X 線回折像は図 26 に示す。その他に3波長の MAD データとして7個のデータセット (cia1sebrm060-066)を収集することに成功した。

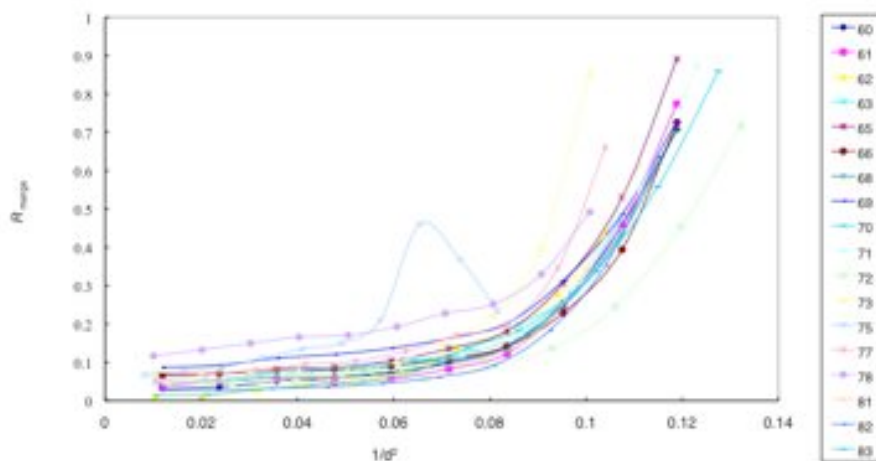


図 24. CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体結晶の各データセットにおける R_{merge} の分解能に対するプロット

横軸に示す $1/d^2$ は分解能(d)の 2 乗の逆数をあらわしている。全データセットを XDS でデータ処理し、 I/σ が 3.5 になる分解能でカットして、分解能に対する R_{merge} を比較した。

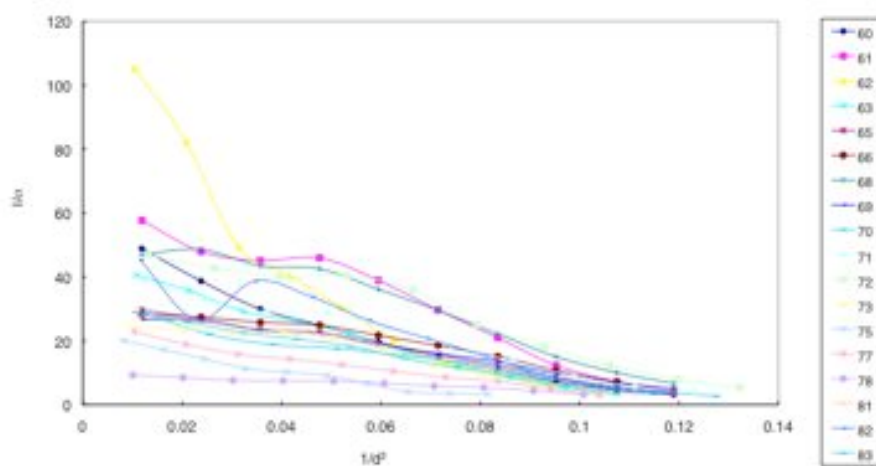


図 25. CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体結晶の各データセットにおける I/σ の分解能に対するプロット

横軸に示す $1/d^2$ は分解能(d)の 2 乗の逆数をあらわしている。全データセットを XDS でデータ処理し、 I/σ が 3.5 程度になる分解能でカットして、各分解能に対する I/σ を比較した。

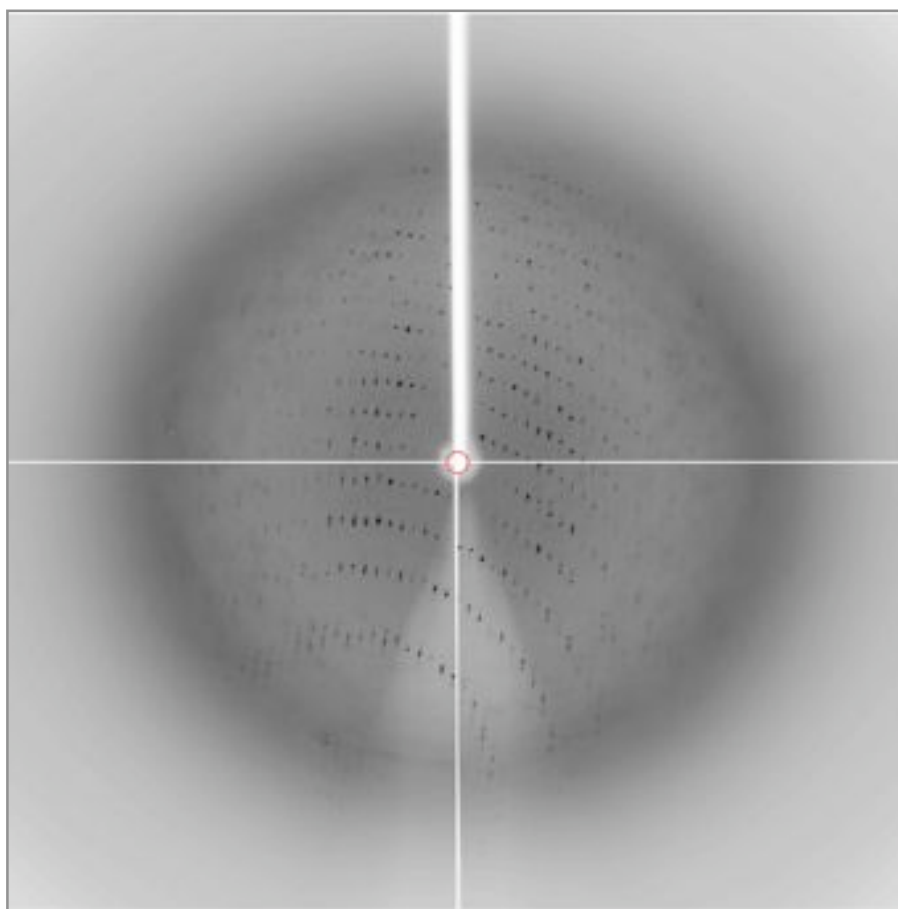


図 26. CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の回折像

表 1. CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の回折データ

Crystal	CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)
Beamline	PF BL5A
Wavelength (Å)	0.9792
Program	<i>HKL2000</i>
Space group	<i>P6₁22</i>
Cell parameters	$a = b = 102.2 \text{ \AA}, c = 272.9 \text{ \AA}$
Resolution (Å)	50.00 - 3.00 (3.11-3.00)
R_{merge}	97.9 (90.7)
$I/\sigma(I)$	13.0 (10.9)
Completeness(%)	0.074 (0.208)

2. Merohedral Twin 結晶の判定結果

Cia1sebrm072 の X 線回折データを用いて Upsala Software factory の Dataman package の Local intensity を行った結果、CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶は $P6_1$ の merohedral twin 結晶ではなく、 $P6_122$ の単結晶であることがわかった (図 27)。この結果を受けて、構造解析計算には merohedral twin 結晶ではない CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の結晶の回折データを使用することにした。また、merohedral twin 結晶は、おそらく 2 回軸対称に位置する CIA 分子の一方の分子が結晶中からはがれ落ちることによって生成されたのではないかと推測される。以上の点から推察すると、CIA/ASF1(155)の不安定な C 末端領域を除くことで両者の相互作用が安定的に形成され、DBD から CIA/ASF1(155)の解離が抑えられることによって、CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体の単結晶が形成されたのではないかと考えられる。

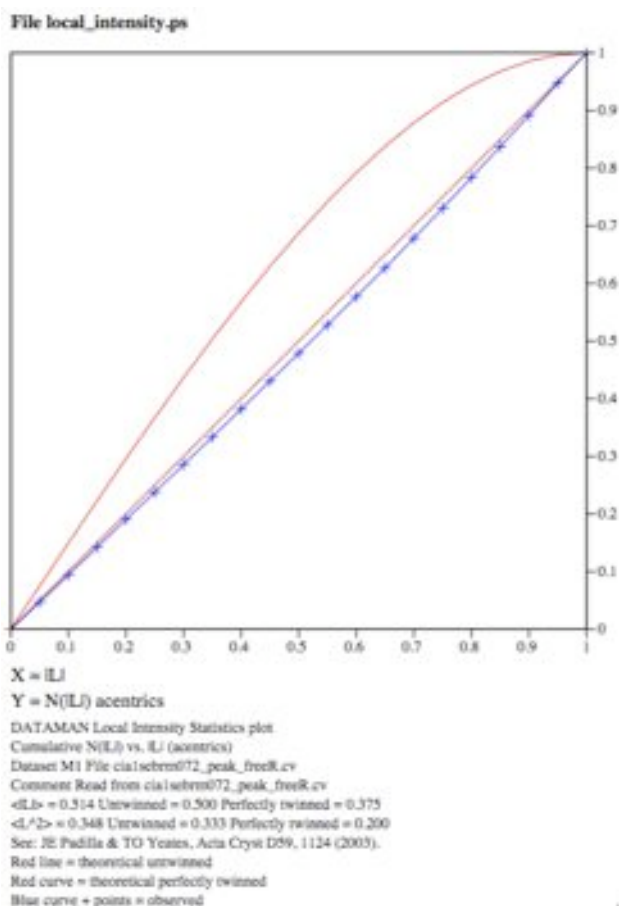


図 27. Local intensity による merohedral twin 結晶の判定結果

赤色の直線が完全な単結晶であることを示し、赤色の直線から離れるほど merohedral twin 結晶の可能性が高いことを示す。CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)結晶 (青) は merohedral twin 結晶ではないことを示している。

<使用機器>

- 小型遠心機: MX-300 (TOMY)
- ローター: AR500-04 (TOMY), AR015-24 (TOMY)
- 限外ろ過フィルター: Amicon Ultra 15 (Millipore)
- AKTA prime (Amersham Bioscience)
- 分光光度計: DU 640 SPECTROPHOTOMETER (Beckman Coulter)
- 結晶化プレート: Linbro プレート (24 穴, Hampton Research)
- クライオループ (Hampton Research)

<結晶化条件スクリーニングキット>

- Crystal Screen1 & 2 (196 条件, Hampton Research)
- Wizard 1 & 2 (100 条件, Emerald Bio Structures)
- Detergent Screen 1 (Hampton Research)

<複合体精製に使用したゲル濾過カラム>

- Hiload 16/60 Superdex 200pg (GE Healthcare, mL)

<データ解析に使用したプログラム>

- CCP4 (<http://www.dl.ac.uk/CCP/CCP4/>)
- HKL2000 (<http://www.hkl-xray.com/>)
- XDS (<http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/~kabsch/xds/>)
- Dataman (Upssala Software factory)

<電気泳動>

- NuPAGE Bis-Tris 4-12% Gel (Invitrogen)
- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)

第 4 章

構造計算

4.1 SHELXD によるセレン位置の決定

<目的>

SHELXD を用いて DBD(CCG1)タンパク質中に存在するセレン原子座標を決定し、求めたセレン原子座標から CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の初期位相が得られるかどうか検討した。

<実験方法>

SHELXC を用いて任意に分割したサブセット間の異常散乱差の相関値 $CC(\text{anom})$ と異常散乱シグナルの大きさ $\langle \Delta F/\sigma(F) \rangle$ の統計値を計算した。計算には、cia1sebrm060, 061, 063, 064, 065, 066 の 6 つの MAD データセットを使用した。 $CC(\text{anom}) = 50\%$, $\langle \Delta F/\sigma(F) \rangle = 1.2$ 程度までの分解能を SHELXD の計算に使用することにした⁽⁵⁰⁾。その後、SHELXD を用いて、SHELXC での統計値から判断した分解能の範囲で 100 回の試行を行い、DBD(CCG1)のセレン原子の座標を求めた。SHELXD の結果、規格化構造因子の計算値と実測値の相関係数である $CC(\text{all})$ の値が 30 を超えるものを正解と判断した。セレン原子座標の確からしさは SOLVE 等のプログラムを使って位相改良を進め、確かな電子密度を与えられるかどうかで判断した。

<実験結果および考察>

SHELXC の結果、 $CC(\text{anom}) = 50\%$, $\langle \Delta F/\sigma(F) \rangle = 1.2$ 程度の条件を満たす分解能は、20~4.0 Å の範囲であることがわかった (図 28)。 $CC(\text{anom})$ と $\langle \Delta F/\sigma(F) \rangle$ を分解能に対してプロットしたものを図 29 に示す。SHELXD を用いて 20~4.0 Å 分解能で 100 回の試行を行った結果、cia1sebrm063 のデータセットのみ解が得られた (図 29)。SHELXD で決定したセレン原子座標を SOLVE で精密化し初期位相を計算した電子密度分布図を図 30 に示す⁽⁵⁹⁾。SOLVE の結果は、分解能が 4 Å、 $FOM = 0.53$ であったが、得られた電子密度に α ヘリックスや β シートなどの 2 次構造を見つけることができなかった (図 30)。そこで、RESOLVE を用いて電子密度の改良を行った⁽⁶⁰⁾。しかしながら、得られた電子密度は、解釈可能なものではなかった (図 31)。解釈可能な電子密度が得られなかった原因は、正確なセレン原子の位置を決定することができず正確な位相角が求まらなかったこと、分解能が低いこと、異方性のある回折データを使用していることなどが挙げられる。実際、SHELXD を用いて求めたセレンの位置は、分子置換法により決定した DBD(CCG1)のメチオニンの硫黄原子の位置とは一致しなかった。また、FOM は 0.53 と

高い値を与えるにも関わらず解釈可能な電子密度が得られなかったことは、初期位相の正確さということの他に、FOMの適切な見積もりが行われていなかったのではないかと考えられる。今回の初期位相から得られた電子密度は信頼のあるものとは言えず、解釈可能な程度までの電子密度の改善は難しいと予想される。以上の結果から、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体結晶のMADデータを用いて、複合体の構造を決定することは困難であると考えられる。

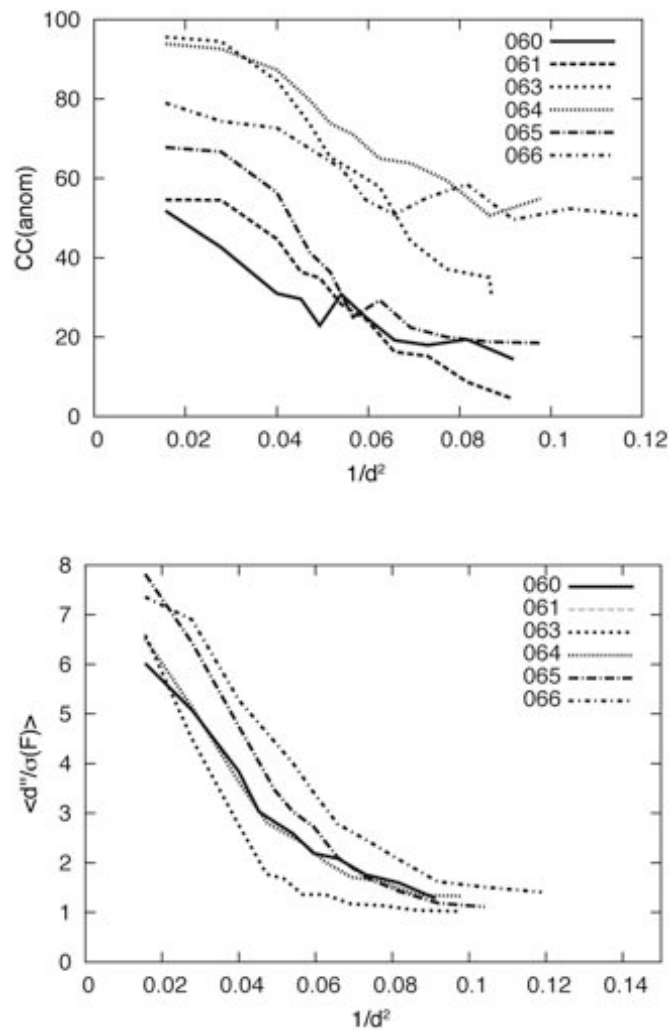


図 28. CIA/ASF1(155)-Se DBD(CCG1)複合体結晶の異常散乱差の相関値 $CC(\text{anom})$ と異常散乱シグナルの大きさ $\langle \Delta F / \sigma(F) \rangle$ の分解能に対するプロット
横軸に示す $1/d^2$ は分解能(d)の2乗の逆数をあらわしている。

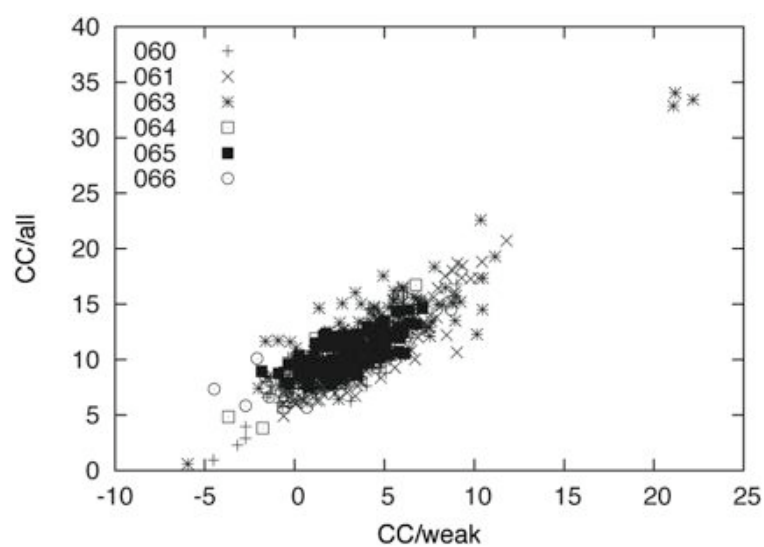


図 29. SHELXD の解の CC all/weak プロット
 cia1sebrm063 のデータセットのみ CC (all)の値が 30 を超える値が得られた。

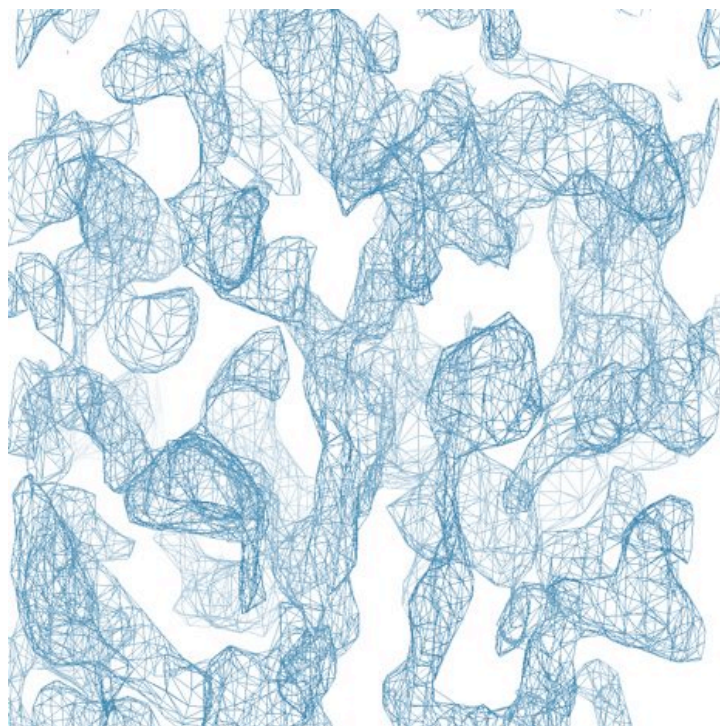


図 30. SHELXD により決定したセレン原子座標を SOLVE で精密化して初期位相を計算した電子密度分布 (1 σ レベル)

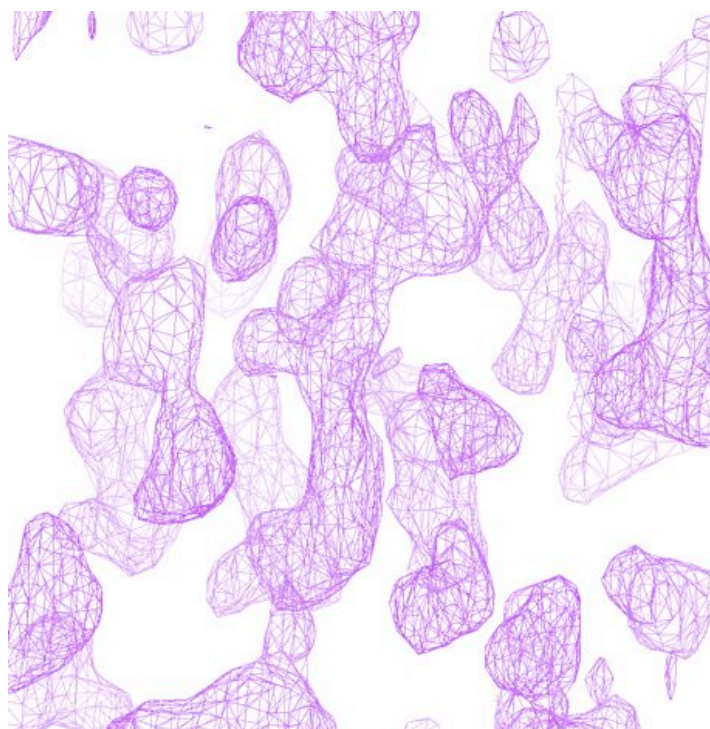


図 31. RESOLVE により位相改良を行った電子密度分布 (1 σ レベル)

4.2 autoSHARP を用いた構造解析計算

<目的>

4.1 の結果、SHELXD, SOLVE 用いた構造計算では初期位相を得ることはできなかった。次に、autoSHARP を用いて DBD(CCG1)中に存在するセレン原子座標を決定し、初期位相が得られるかどうか検討した。

<実験方法>

4.1 の結果、cia1sebrm063 のデータセットが最も良好な結果を与えたことから、autoSHARP による MAD 計算には、cia1sebrm063 のデータセットを使用した。構造計算に用いた回折データは、*HKL2000* で処理をし、3 波長のデータをマージしてスケーリングを行ったものである^(10,45)。構造計算に使用した分解能の範囲は、20~4.0 Å である。

<実験結果および考察>

autoSHARP の結果、RANTAN で決定したセレン原子位置座標を SOLOMON で精密化し初期位相を計算した電子密度分布図は図 32 に示すようなものだった⁽¹³⁾。得られた電子密度分布は、解釈可能なものではなかった。解釈可能な電子密度が得られなかった原因は、正確なセレン原子の位置を決定することができず位相角が求まらなかったこと、分解能が低いこと、異方性のある回折データを使用していることなどが上げられる。以上の結果から、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体結晶の MAD データを用いて、複合体の構造を決定することは非常に困難であると考えられる。

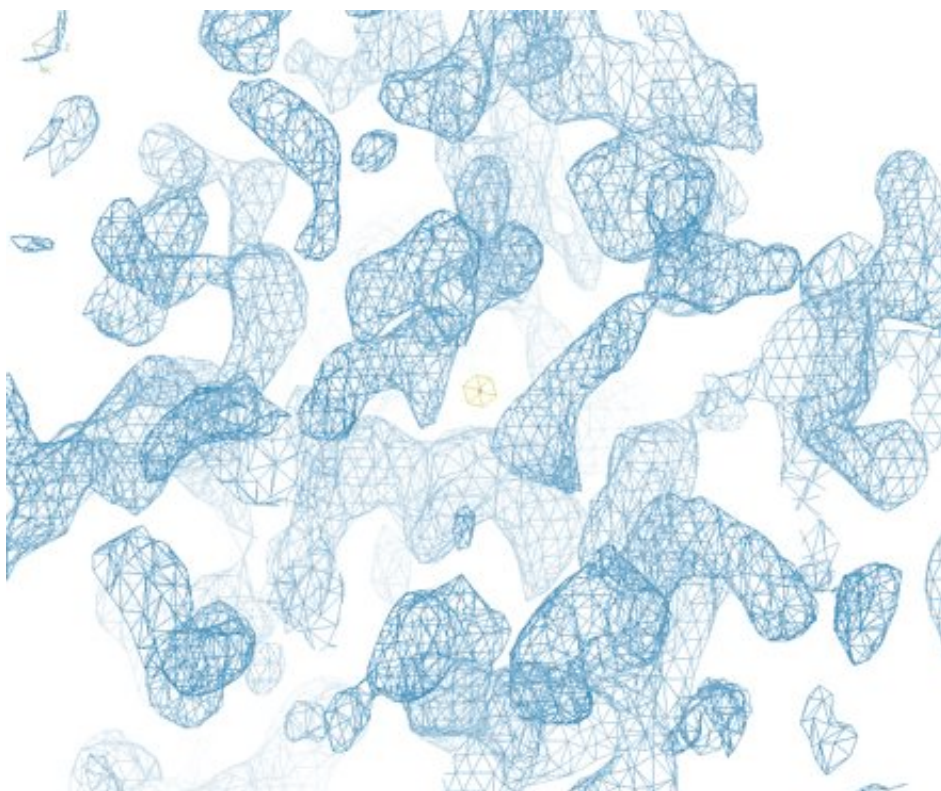


図 32. autoSHARP 計算により得られた電子密度分布 (1 σ レベル)

<データ解析に使用したプログラム>

- CCP4 (<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>)
- HKL2000 (<http://www.hkl-xray.com/>)
- XDS (<http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/~kabsch/xds/>)
- SHELX (<http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/>)
- SOLVE/RESOLVE (<http://solve.lanl.gov/index.html>)
- autoSHARP (<http://www.globalphasing.com/sharp/>)

<電子密度表示に使用したプログラム>

- XtalView (<http://www.scripps.edu/pub/dem-web/>)

第 5 章

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の構造解析

5.1 分子置換法を用いたモデルの構築

<目的>

4.1~4.2 の MAD 法により初期位相が得られなかったことから、分子置換法による位相決定を試みた。

<実験方法>

これまでに構造決定されている酵母由来の Cia1p/Asf1p (PDB ID: 1ROC)とヒト由来の DBD(CCG1) (PDB ID: 1EQF)をモデルとして、cia1sebrm072 の回折データを用いて、分子置換法による位相の決定を試みた。分子置換法のプログラムは、CCP4 の molrep, PHASER を使用した^(10,47)。

<実験結果および考察>

DBD(CCG1) (PDB ID: 1EQF)を用いて molrep による分子置換を行ったが、解を得ることはできなかった。そこで、ダブルプロモドメインとして登録されている DBD(CCG1)の構造をシングルプロモドメインに切り離し、N, C 末端のシングルプロモドメインをモデルとして molrep による分子置換を行った。しかしながら、解を得ることはできなかった。解が得られなかった理由は、プロモドメインが動きやすいドメインで温度因子が高いことだと考えられる。そこで、Cia1p/Asf1p と C 末端のシングルプロモドメイン (図 33 ドメイン II) の 2 つを組み合わせたモデルとして PHASER による分子置換を行った結果、解を得ることができた。一方、Cia1p/Asf1p と N 末端のシングルプロモドメイン (図 33 ドメイン I) の 2 つを組み合わせたモデルとして PHASER による分子置換では、解を得ることができなかった。この結果からも、N 末端のシングルプロモドメイン (図 33 ドメイン I) が動きやすいドメインであることが伺える。次に、PHASER を用いて分子置換法により得られた原子座標と N 末端のシングルプロモドメインをモデルとして、molrep による分子置換を行った結果、DBD(CCG1)と CIA/ASF1 複合体の初期モデルを得ることに成功した。

5.2 構造精密化

分子置換法で得られた座標を用いて、3.3 Å 分解能で REFMAC5、CNS による精密化を行った^(4, 41)。回折データ 3.3~3.0 Å の高分解能の領域は R_{merge} が大きいことから、精密化には用いなかった。また、CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の回折データは強い異方性を示していたことから、UCLA の diffraction anisotropy server (<http://www.doe-mbi.ucla.edu/~sawaya/anisoscale/>) を用いて anisotropy scaling した回折データを使用した⁽⁵⁷⁾。まず、Refmac5 による Rigid body refinement および restrained refinement を行った。次に、モデルバイアスを減少させるため、初期モデルを CNS の simulated annealing などの精密化を行った。これらの精密化の過程で、2 つ目の CIA/ASF1 分子の電子密度分布 (2Fo-Fc, 1 σ) が見つかったため、さらに CIA/ASF1 モデルを追加した。その後、モデルの末端から順次 composite omit map を作成し、初期モデルの修正を行った。モデルの修正は XtalView を用いて行った⁽³⁵⁾。特に N 末端のプロモドメインの個々の温度因子が大きい傾向がみられ、N 末端プロモドメインは動きやすいドメインであることがわかった (図 33)。また、精密化に用いた分解能が 3.0 Å より低いことから個々の温度因子は精密化を行わず、個々の原子の温度因子を 40.0 Å に固定して精密化を行った。 $R_{\text{work}}=0.237$, $R_{\text{free}}=0.293$ となったところで精密化を終了した。結晶学的精密化のまとめを表 2 に示す。また、立体構造の信頼性を評価するため、CCP4 の PROCHECK を用いてラマチャンドラプロットを作成した⁽¹⁰⁾ (図 34)。主鎖の結合距離および結合角が典型的な値から大きく外れていないことを確認した。

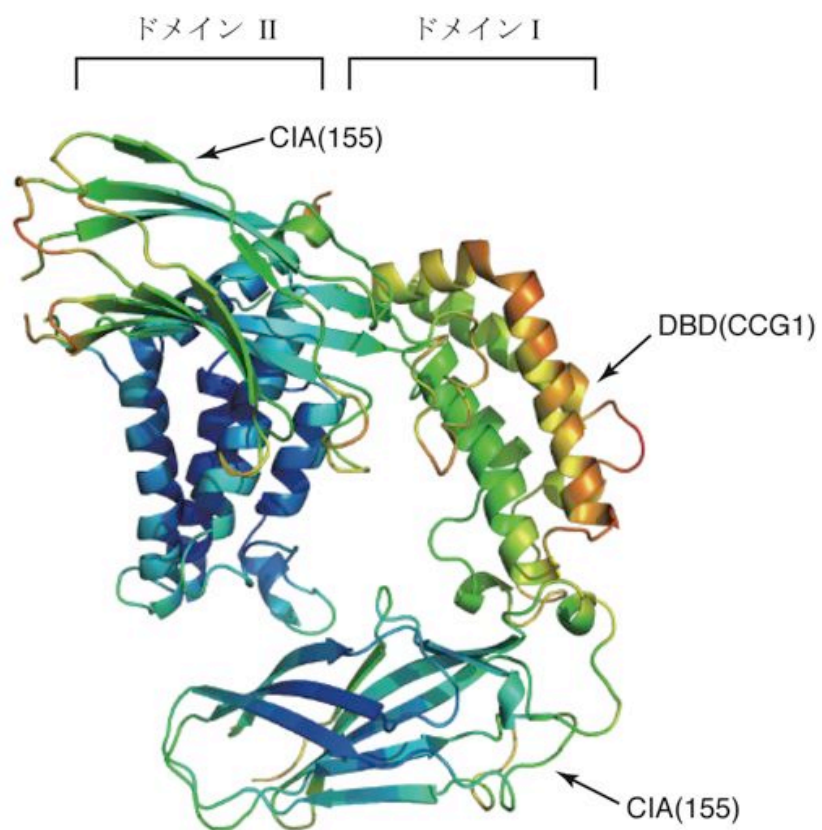


図 33. CIA/ASF(155)-DBD(CCG1)複合体の温度因子の分布
 温度因子が高い領域を赤色で、温度因子の低い領域を青で示す。DBD(CCG1)のドメイン I では温度因子が高いことがわかる。

表 2. 結晶学的精密化のまとめ

Resolution (Å)	31.65 – 3.30
Completeness (%)	99.2 (99.8)
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.237/0.293
Number of protein atoms	4,613
Number of ligands/ions	5
<i>rms deviation from idealities</i>	
Bond length (Å)	0.015
Bond angle (°)	1.524

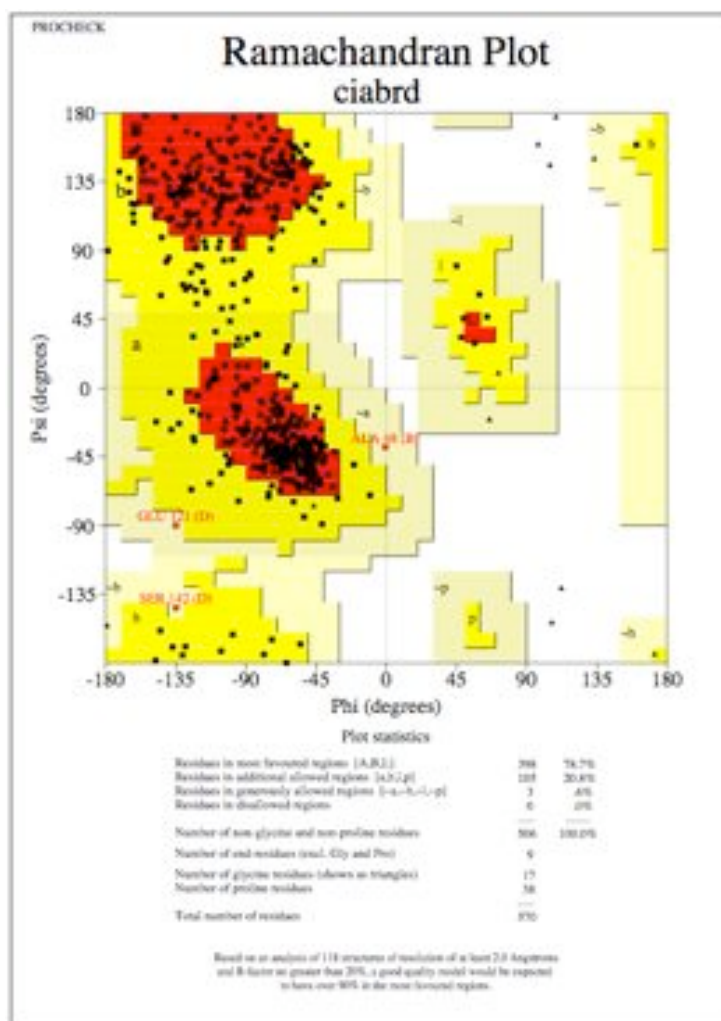


図 34.3.3 Å 分解能で解析した CIA/ASF(155)-DBD(CCG1)複合体のラマチャンドロランプロットの結果

5.3 全体構造

<結果および考察>

結晶構造では、DBD(CCG1)に対して異なる分子表面で 2 分子の CIA/ASF1 が結合していることがわかった (図 35)。図 35 に示すように、2 つの結合サイトには、結合サイト 1 および結合サイト 2 と名称をつけた。結合サイト 1 は結合サイト 1a と結合サイト 1b から構成される。CIA/ASF1 は、DBD(CCG1)のドメイン I と II の領域で相互作用している。結合サイト 1b では、DBD(CCG1)の Trp1526、Phe1536、Tyr1589 が CIA/ASF1(155)との相互作用に関与し、疎水的相互作用を形成している。結合サイト 1b の Trp1526、Phe1536 は DBD(CCG1)のアセチル化ヒストン H4 との結合に重要な ZA ループに位置する (図 36A)。結合サイト 1 の特徴的な点は、Phe1536 が CIA/ASF1(155)の $\beta 1$ ストランドと $\beta 10$ ストランドに挟まれる疎水ポケットを塞ぐ形で相互作用していることである (図 36A)。この疎水ポケットは CIA/ASF1 とヒストン H4 Phe100 との相互作用に利用される領域でもある (図 66A, B)。また、DBD(CCG1)の結合サイト 1 はアセチル化ヒストン H4 との結合にも利用される領域でもある。結合サイト 2 では、DBD(CCG1)のドメイン II に位置する Ala1506、Phe1509、Ile1510、His1610 が主に CIA/ASF1(155)との相互作用に関与している (図 36B)。

CIA/ASF1 はヒストン H3-H4 と DBD(CCG1)の結合に関与する分子表面が重複しているおり、CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の形成に大きな影響を与えることが示唆される。ヒストン H3-H4 とアセチル化ヒストン H4 の影響は、第 7 章で詳しく述べる。CIA/ASF1 は進化上高度に保存されたタンパク質でその相互作用因子も多いことから、共通表面を多数の相互作用に利用されていることが示唆される。

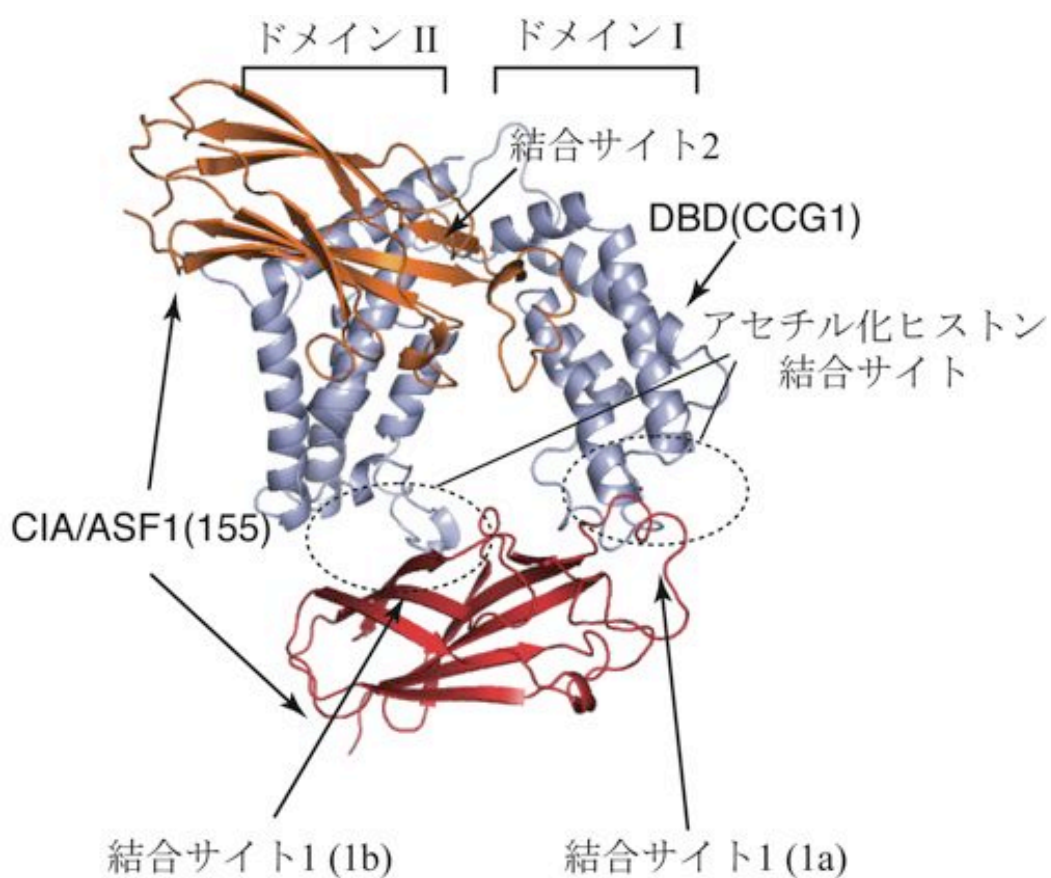


図 35. CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の全体構造

DBD(CCG1) (薄い青)、結合サイト 1 の CIA/ASF1(155) (赤)、結合サイト 2 の CIA/ASF1(155) (オレンジ) を cartoon で示す。結晶中では、1 分子の DBD(CCG1) に 2 分子の CIA/ASF1(155) が異なる表面で相互作用している。DBD(CCG1) のアセチル化リジン結合サイトは点線で示した。結合サイト 1 の CIA/ASF1(155) とアセチル化リジンは DBD(CCG1) に対して近接した領域で相互作用している。

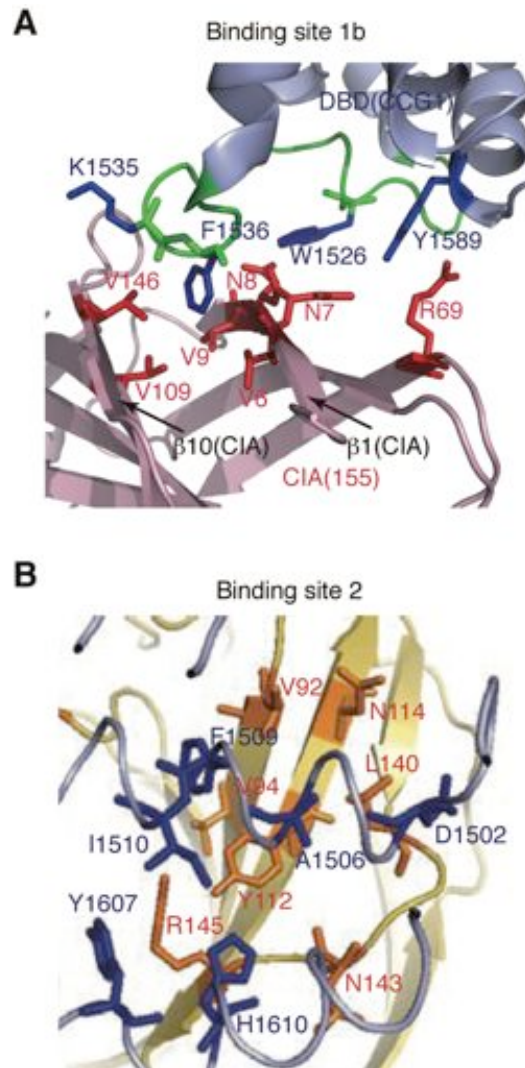


図 36. CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用に関わるアミノ酸

A) 結合サイト 1b の相互作用表面。DBD(CCG1)を薄い青で、結合に関わるアミノ酸残基を青のスティックモデルで示す。アセチル化リジン結合サイト近傍に位置する ZA ループは緑色で示す。CIA/ASF1(155)をピンク色で、結合に関わるアミノ酸残基を赤のスティックモデルで示す。B) 結合サイト 2 の相互作用表面。DBD(CCG1)を薄い青で、結合に関わるアミノ酸残基を青のスティックモデルで示す。CIA/ASF1(155)を黄色で、結合に関わるアミノ酸残基をオレンジ色のスティックモデルで示す。

5.4 構造の重ね合わせ

<目的>

CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)と複合体を形成することで、構造変化がみられるのかどうか明らかにするために、これまでに構造決定されているヒト CIA/ASF1 (PDB ID: 1TEY)⁽³⁷⁾と CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体中の CIA/ASF1 の立体構造の重ね合わせを行った。

<実験方法>

Uppsala software factory の Dejavu package 中の LSQMAN を用いて、CIA/ASF1 分子の C α での構造重ね合わせを行った。

<結果および考察>

重ね合わせた CIA/ASF1 の立体構造を図 37 に示す。重ね合わせの結果、rmsd はそれぞれ 1.174 Å (結合サイト 1; 152 C α atoms)、1.144 Å (結合サイト 2; 101 C α atoms) であった。CIA/ASF1 は DBD(CCG1)との複合体形成に依存して顕著なコンフォメーション変化は見られなかった。



図 37. ヒト CIA/ASF1 の構造重ね合わせ

単体 CIA/ASF1 (赤、PDB: 1TEY)、CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体中の CIA/ASF1 (緑、結合サイト 1)、CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体中の CIA/ASF1 (青、結合サイト 2) を示す。

<目的>

CIA/ASF1 は DBD(CCG1)との複合体形成に依存した構造変化はみられなかった。次に、DBD(CCG1)が CIA/ASF1(155)と複合体を形成することで、構造変化がみられるのかどうか明らかにするために、これまでに構造決定されているヒト DBD(CCG1) (PDB ID: 1EQF)⁽²³⁾と CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体中の DBD(CCG1)の立体構造の重ね合わせを行った。

<実験方法>

Uppsala software factory の Dejavu package 中の LSQMAN を用いて、DBD(CCG1)分子の C α での構造重ね合わせを行った。

<結果および考察>

重ね合わせた DBD(CCG1)の立体構造を図 38 に示す。重ね合わせの結果、DBD(CCG1)は CIA/ASF1(155)との複合体形成に依存したコンフォメーション変化がみられた。DBD(CCG1)単体の立体構造と比較して 10°近く開いていた構造を形成することがわかった。

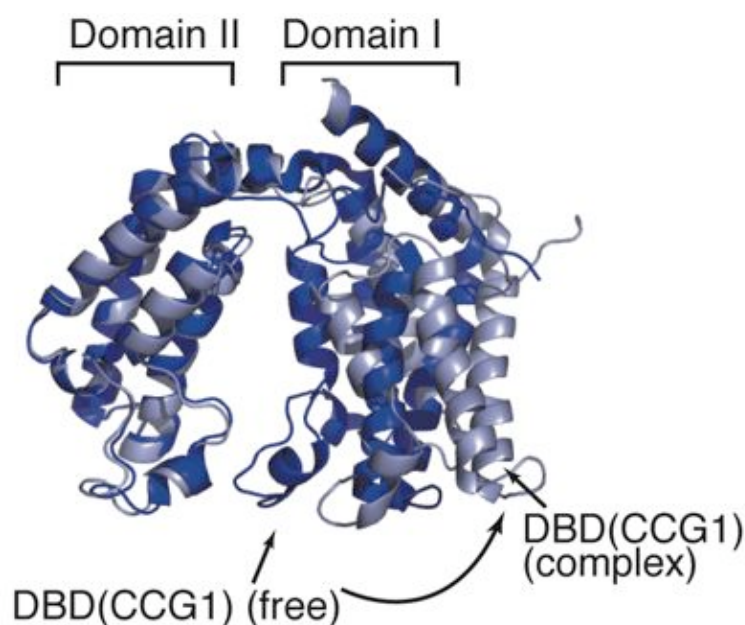


図 38. 単量体と複合体の DBD(CCG1)の構造重ね合わせ
ヒト DBD(CCG1) (青, PDB ID: 1EQF)、CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体中の DBD(CCG1) (薄い青) を cartoon で示す。

<目的>

DBD(CCG1)は CIA/ASF1(155)との複合体形成に依存した構造変化がみられた。次に、シングルプロモドメイン自体の構造変化があるのかどうか明らかにするため、ヒト DBD(CCG1)の単体構造と CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体中の DBD(CCG1)の各ドメインの重ね合わせを行った。

<実験方法>

DBD(CCG1)のドメイン I を 1360-1500 アミノ酸残基の領域、ドメイン II を 1501~1625 アミノ酸残基の領域として PDB ファイルを作成し、Uppsala software factory の Dejavu package 中の LSQMAN を用いて、DBD(CCG1)の各ドメインの C α で構造重ね合わせを行った。

<結果および考察>

重ね合わせた DBD(CCG1)の各ドメインの立体構造を図 39 に示す。重ね合わせの結果、rmsd はそれぞれ 0.63 Å (ドメイン II, 101 C α atoms)、0.63 Å (ドメイン I, 101 C α atoms) であり、ドメイン内部には顕著なコンフォメーション変化はみられなかった。

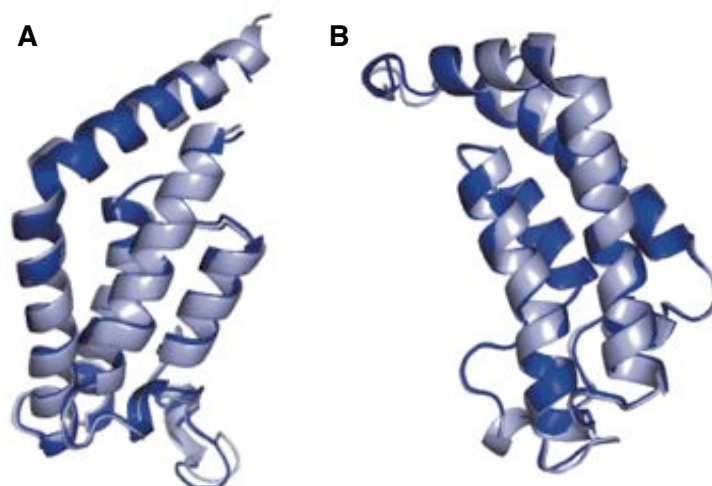


図 39. ヒト DBD(CCG1)の各ドメインの構造重ね合わせ

A) DBD(CCG1)単量体 (青) と CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体 (薄い青) のドメイン II のプロモドメインの重ね合わせ。 B) DBD(CCG1)単量体 (青) と CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体 (薄い青) のドメイン I のプロモドメインの重ね合わせ。

<目的>

プロモドメインタンパク質は、これまでに 40 種類近くの立体構造が X 線結晶構造解析や NMR により決定されている^(15, 23, 33, 38, 39, 42, 46, 54, 58, 62, 65)。そこで、これまでに構造決定されているその他のプロモドメインと CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体中の DBD(CCG1)の各ドメインの立体構造の重ね合わせを行うことで、構造変化がみられるかどうか検討した。

<実験方法>

DBD(CCG1)のドメイン I を 1360~1500 アミノ酸残基の領域、ドメイン II を 1501~1625 アミノ酸残基の領域として PDB ファイルを作成した。その後、Uppsala software factory の Dejavu package 中の LSQMAN を用いて、DBD(CCG1)の各ドメインとその他のプロモドメインの C α での構造重ね合わせを行った。

<実験結果および考察>

重ね合わせた DBD(CCG1)の各ドメインの立体構造、rmsd を図 40A, B に示す。構造重ね合わせの結果、DBD(CCG1)の各ドメインとその他のプロモドメインとの rmsd は、1.4~2.0 の値を示すことがわかった。図 40A の立体構造に示されるように、プロモドメインの 3 次構造は大きく変化していないことがわかる。rmsd の値が大きな値を示す理由は、個々のプロモドメインによって α ヘリックス間をつなぐループが大きく構造が異なっていることである。このループ領域は個々のプロモドメインによって長さが区々であり、このループの違いによりアセチル化ヒストンへの特異性の決定などに関与しているものと考えられる。

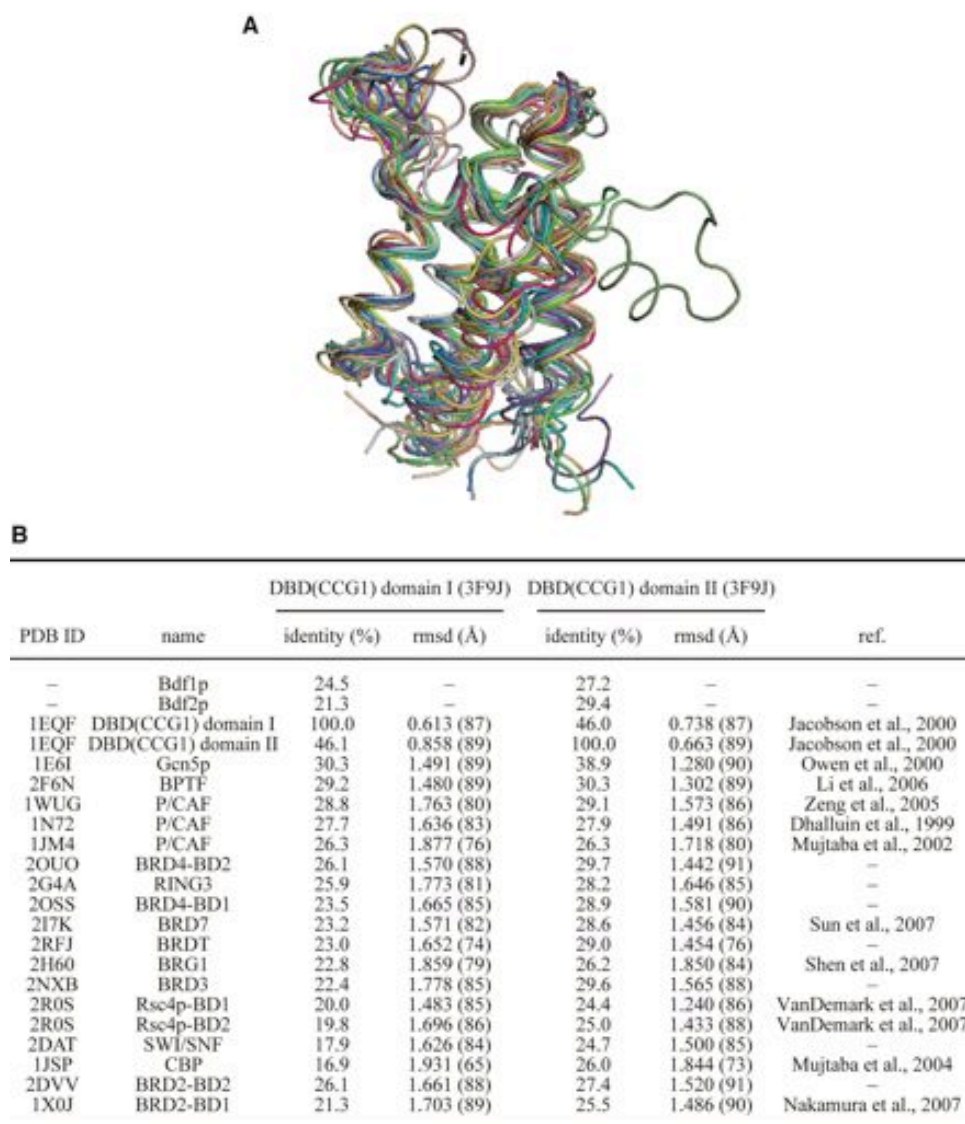


図 40. CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体中の DBD(CCG1)の各ドメインとその他のプロモドメインの構造重ね合わせ
CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の PDB ID は 3F9J。A)重ね合わせた立体構造。B) DBD(CCG1)の各ドメインとその他のプロモドメインの重ね合わせた結果得られた rmsd の値。構造に基づいてアミノ酸配列のアライメントを行い、算出されたアミノ酸相同性。

5.5 相互作用に関わるアミノ酸残基の特定

<目的>

CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用に関わるアミノ酸残基を特定する。

<実験方法>

相互作用するアミノ酸残基の結合距離は、CCP4 の Contact を用いて計算を行った⁽¹⁰⁾。両者の相互作用に側鎖が関与し、その結合距離が 4 Å 以内のアミノ酸残基を表 3 に示した。

<結果および考察>

結合サイト 1a では、DBD(CCG1)の Lys1419、Ile1420、Thr1422、Asn1460 が CIA/ASF1(155)との結合に関与している。結合サイト 1b では、DBD(CCG1)の Trp1526、Phe1536、Tyr1589 が CIA/ASF1(155)との結合に関与し、疎水的な相互作用を形成している。結合サイト 2 では、DBD(CCG1)のドメイン II に位置する Ala1506、Phe1509、Ile1510、His1610 が CIA/ASF1(155)との結合に関与しており、疎水的な相互作用をしていると考えられる。CIA/ASF1(155) Tyr112, V92 は DBD(CCG1)との相互作用に特に重要で、結合サイト 1 および 2 利用されている (表 3A, B)。第 6 章で述べる相互作用解析に使用した点変異体タンパク質は表 3 から選択し作成した。

A) 結合サイト 1 (818 Å²)

DBD(CCG1)		CIA/ASF1(155)
Residue	Domain	
Lys1419	I	Tyr112, Leu140
Ile1420	I	Val92, Asn114
Thr1422	I	Ser142
Thr1458	I	Arg123
Tyr1459	I	Arg123
Asn1460	I	Arg123
Gly1461	I	Arg123
Lys1463	I	Thr120, Glu121, Glu124
Trp1526	II	Asn8, Val10, Gly110
Asn1533	II	Pro144
Lys1535	II	Val146, Arg148
Phe1536	II	Asn7, Asn8, Val9, Pro144, Arg148
Pro1538	II	Arg148
Gln1588	II	Arg69
Tyr1589	II	Arg69

B) 結合サイト 2 (719 Å²)

DBD(CCG1)		CIA/ASF1(155)
Residue	Domain	
Glu1443	I	Glu124
Arg1446	I	Glu124, Asn125
Glu1450	I	Asn125
Asp1502	II	Leu140, Ala141
Asp1503	II	Ala141, Ser142
Ala1506	II	Tyr112, Leu140, Ser142
Phe1509	II	Val92, Val94, Tyr112
Ile1510	II	Tyr112
Asn1513	II	Ala48
Gln1517	II	Ala48, Glu49
Tyr1607	II	Arg145
His1610	II	Tyr112, Pro144, Arg145
Gln1613	II	Asn143
Leu1614	II	Ser142

表 3. CIA/ASF1 と DBD(CCG1)の相互作用に関わるアミノ酸残基

A) 結合サイト 1 で CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用に関わり、その結合距離が 4 Å 以内のアミノ酸残基。 B) 結合サイト 2 で CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用に関わり、その結合距離が 4 Å 以内のアミノ酸残基。

5.6 接触面積

<目的>

CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の接触面積を求める。

<実験方法>

サブユニット間の接触面積は、CCP4 の Surface を用いて計算した⁽¹⁰⁾。サブユニット単独の Solvent Accessible Surface Area と多量体中での Solvent Accessible Surface Area を計算した後、この単独の値の和と多量体の値の差をとり 2 で割ったものをサブユニット間の接触面積とした。

<結果および考察>

DBD(CCG1)と CIA/ASF1(155)の接触面積は、818 Å² (結合サイト 1)、719 Å² (結合サイト 2) であり、両者の相互作用は非常に弱いことが示唆される (図 41)。結合サイト 1a の接触面積は、381.7 Å² で全体の 47 % を占め、結合サイト 1b の接触面積は 436.1 Å² で全体の 53 % を占めている。つまり、結合サイト 1 では、結合サイト 1b の相互作用表面が主に CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用に関わっていることがわかる。一方、結合サイト 2 では、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)のドメイン II の接触面積が 561.5 Å² で全体の 78 % を占めており、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)のドメイン II の相互作用表面の主に関わっていることがわかる。

結晶中でのサブユニットの接触面積が 600 Å² 以上であれば、その相互作用が偶然である確率は 5%以下であるという報告がされている⁽²⁴⁾。接触面積が小さい場合でも、別の結晶系や相同タンパク質で同じ様式の接触面をもつ結晶構造がみられることや、溶液中で相互作用することが明らかにされていれば、その相互作用は結晶の artifact ではなく、生物学的意義のある相互作用と判断することができる。CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の接触面積は 600 Å² 以上であり、溶液中で特異的に相互作用することから、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の結晶は偶然に成長した可能性は低いと考えられる。CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)と相互作用する分子表面は、1) ヒストン H3-H4 複合体との結合にも利用されていること、2) 結合サイト 1 の DBD(CCG1)の分子表面はアセチル化ヒストンとの相互作用に利用されることが明らかにされており、結合サイト 1 における CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用は生物学的意義があると判断できる。しかしながら、結合サイト 2 における DBD(CCG1)の分子表面は、1) 他の因子との相互作用

に利用される報告例がないこと、2) TFIID の複合体中では他のサブユニットにより分子表面が覆われている可能性があること、3) CCG1 のダブルプロモドメインを切り出して DBD(CCG1)を調製していることなどから考えても、結合サイト 2 での CIA/ASF1(155) と DBD(CCG1)の相互作用は、結晶成長による artifact である可能性が残っている。そこで、GST プルダウンアッセイ、ITC、分析超遠心などの様々な手法を用いて CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用を行った結果、溶液中において結合サイト 1 および 2 を用いて CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)が相互作用していることが確認された。このことから、細胞内においても CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)は異なる 2 つの分子表面を用いて機能的な相互作用をしているのではないかと考えられる。CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用解析の詳細については第 6 章で述べる。

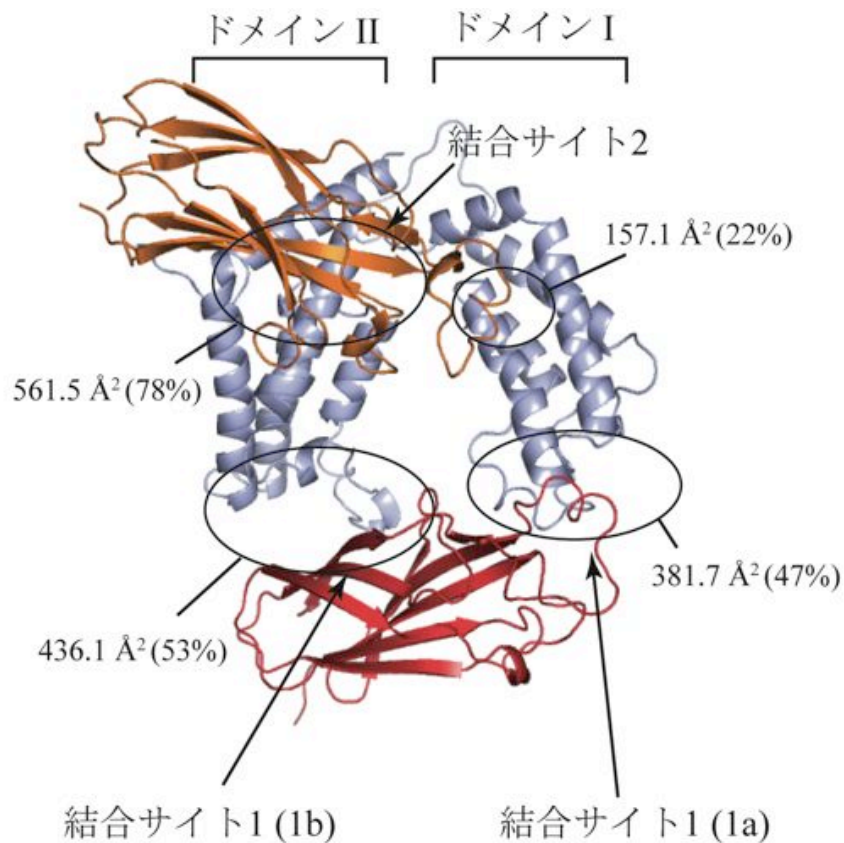


図 41. CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)間の接触面積

括弧内の数値は各結合サイト全体の接触面積のうち各サブサイトが占める割合を示している。

<モデル構築に使用したプログラム>

- Molrep (<http://www.ytbl.york.ac.uk/~alexei/molrep.html>)
- PHASER (<http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/phaser/>)

<構造精密化に使用したプログラム>

- REFMAC (http://www.ytbl.york.ac.uk/~garib/refmac/latest_refmac.html)
- CNS (<http://cns-online.org/v1.21/>)
- Anitropic scaling (<http://www.doe-mpi.ucla.edu/~sawaya/anisotscale/>)

<データ解析に使用したプログラム>

- LSQMAN (http://xray.bmc.uu.se/usf/lqman_man.html)
- Surface (CCP4)
- Contact (CCP4)
- Procheck (CCP4)

<立体構造表示に使用したプログラム>

- Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>)

第 6 章

相互作用解析

6.1 GST-CIA/ASF1 (204, 155)を用いた GST プルダウンアッセイ

結晶構造解析に用いた CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)に対して CIA/ASF1(204)と同等の結合活性が得られるかどうか明らかにするため、CIA/ASF1 の全長と C 末端欠損体を用いて GST プルダウンアッセイを行う。

<実験方法>

50% スラリー glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l に対して 100 pmol GST-hCIA/ASF1(204, 155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol)内で 500 pmol の His-DBD(CCG1) (20 μ l)を 4°C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l) で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行い、GST-CIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)を抗 His タグ抗体で検出する。一次抗体には、抗ヒスタグ抗体として anti-His antibody (GE: 27-4710-01)、二次抗体には、anti-mouse IgG (GE: NA9310)、検出には ECL western blotting Detection Reagents (GE Healthcare: RPN2106)を用いた。ネガティブコントロールとして GST を用いる。

<結果と考察>

GST-hCIA/ASF1 全長、C 末端欠損体ともに DBD(CCG1)との特異的な結合が検出され、その結合量に大きな変化は見られなかった (図 42 レーン 1-3)。

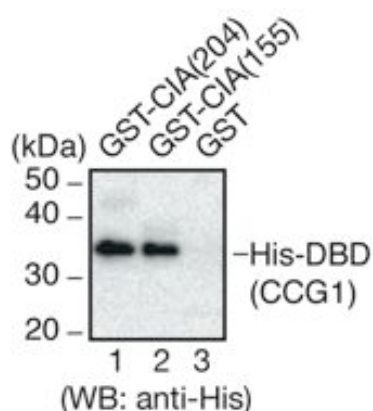


図 42. CIA/ASF1 全長と C 末端欠損体の DBD(CCG1)への結合活性の比較

6.2 結合飽和実験

<目的>

点変異体を用いた相互作用解析を行うためには、野生型と点変異体との間で結合の差がはっきりと現れるような結合条件を設定する必要がある。そのためには、レジン上に固定した CIA/ASF1(155)に対して添加する DBD(CCG1)の最適な量を決める必要がある。そこで、CIA/ASF1(155)に結合する DBD(CCG1)の飽和レベルを明らかにするため、レジン上に固定した CIA/ASF1(155)に DBD(CCG1)の添加量を段階的に増加させる結合飽和実験を行う。

<実験方法>

50% スラリー glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l に対して 100 pmol GST-CIA/ASF1(155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol)内で 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000 pmol の His-DBD(CCG1) (20 μ l)を 4°C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l)で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行い、GST-CIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)を抗 His タグ抗体で検出する。ネガティブコントロールとして GST を用いる。一次抗体には、抗 His タグ抗体として anti-His antibody (GE: 27-4710-01)、二次抗体には、anti-mouse IgG (GE: NA9310)、検出には ECL western blotting Detection Reagents (GE: RPN2106)を用いた。図 43A の結果から His-DBD(CCG1)の検出シグナルを ImageJ⁽¹⁾で計測し、His-DBD(CCG1)の添加量に対するシグナル強度をプロットした。

<結果と考察>

DBD(CCG1)はレジンに吸着することなく、CIA/ASF1(155)に特異的に結合している(図 43A)。100 pmol CIA/ASF1(155) に結合する DBD(CCG1)の量は、input (1.5 pmol) とほぼ同じシグナル強度を示していることから、1.5 pmol 程度であると推測される。CIA/ASF1(155)の DBD(CCG1)に対する結合は非常に弱いことがわかる。また、点変異体を用いた相互作用解析を行うための His-DBD(CCG1)の最適な添加量は、100 pmol CIA/ASF1(155)に対して 500 pmol 程度であると考えられる(図 43A)。

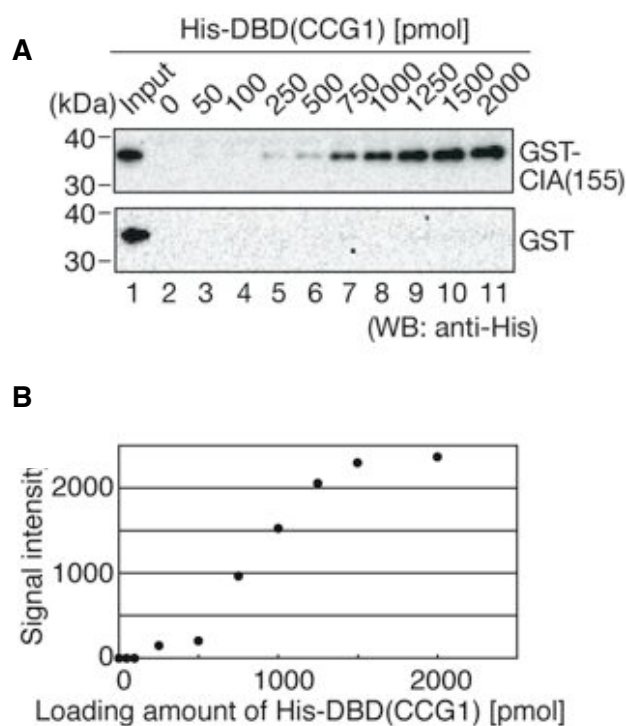


図 43. A) 結合飽和実験の結果 B) His-DBD(CCG1)の添加量に対するシグナル強度をプロット His-DBD(CCG1)のシグナルを ImageJ⁽¹⁾を用いて数値化したグラフ。

6.3 DBD(CCG1)の点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ

<目的>

結晶構造中では CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)に対して相互作用する分子表面が 2 通り考えられる。そこで、溶液中ではどちらの分子表面を用いて複合体を形成しているか明らかにするため、DBD(CCG1)の点変異体を用いた GST プルダウンアッセイを行う。

<実験方法>

1. His-DBD(CCG1)点変異体の精製

表 3 に示したアミノ酸残基の中から、CIA/ASF1 との相互作用に側鎖が使われているアミノ酸残基を選択し、アラニン残基に置換した DBD(CCG1)点変異体を 9 種類作成した。PCR 変異導入法により DBD(CCG1)発現プラスミド (6HisT-pET11d DBD(CCG1): 1342-1629)に変異を導入した。変異導入に使用したプライマーは表 4 に示す。培養から精製までは、2.6 の方法で行った。精製した後、DBD(CCG1)野生型と変異体の CD スペクトルを測定し、構造が壊れていないことを確認した。

2. DBD(CCG1)点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ

50% スラリー glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l に対して 100 pmol GST-hCIA/ASF1(155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1 % NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol)内で 500 pmol の His-DBD(CCG1) 野生型/点変異体 (20 μ l)を 4 $^{\circ}$ C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l)で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行い、GST-hCIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)を抗 His タグ抗体で検出する。ネガティブコントロールとして GST を用いる。

表 4. DBD(CCG1)変異体作成に使用したプライマー

DBD(CCG1)変異体		プライマー配列
Lys1419Ala	Forward	GCAATCATCACTCGGCCAATGG
	Reverse	GTAGTAGTCCTTTACAACCTTTGC
Ile1420Ala	Forward	AAAGCCATCACTCGGCCAATGG
	Reverse	GTAGTAGTCCTTTACAACCTTTGC
Phe1509Ala	Forward	GCCATTCTGGACAACATTGTCACC
	Reverse	AGAAAACGCCACTTGGTCATC
Trp1526Ala	Forward	GCGCCATTTTCATCACCCAG
	Reverse	AGAATCTGGAAGTCCATCATTTTC
Lys1535Ala	Forward	GCATTTGTTCCAGATTATTACAAAGTGATT
	Reverse	AAAGCTGTTCCAGATTATTACAAAGTGATT
Phe1536Ala	Forward	CTTATTAAGTGGGTGATGAAATG
	Reverse	CTTATTAAGTGGGTGATGAAATG
Tyr1589Ala	Forward	GCTACTAAGACTGCCCAGGAG
	Reverse	CTGACTCTCAGGTCCATTATAC
Tyr1607Ala	Forward	GCTGATGAACATTTGACTCAACTTGAG
	Reverse	CTCAGTCAATGTCTGGTAACAG
His1610Ala	Forward	TATGATGAAGCTTTGACTCAACTTGAG
	Reverse	CTCAGTCAATGTCTGGTAACAG

<結果と考察>

1. His-DBD(CCG1)点変異体の精製

精製した His-DBD(CCG1) 野生型と変異体の SDS-PAGE を図 44A に示した。高純度で十分なタンパク質量が回収できた。His-DBD(CCG1) 野生型と変異体の CD スペクトル測定を行った結果、220 nm 付近にスペクトルが観測されたことから、一定の二次構造を形成していると推定される。His-DBD(CCG1) 点変異体は野生型と比較して、CD スペクトルの変化はなく変異導入による構造変化は生じていないと考えられる (図 44B)。

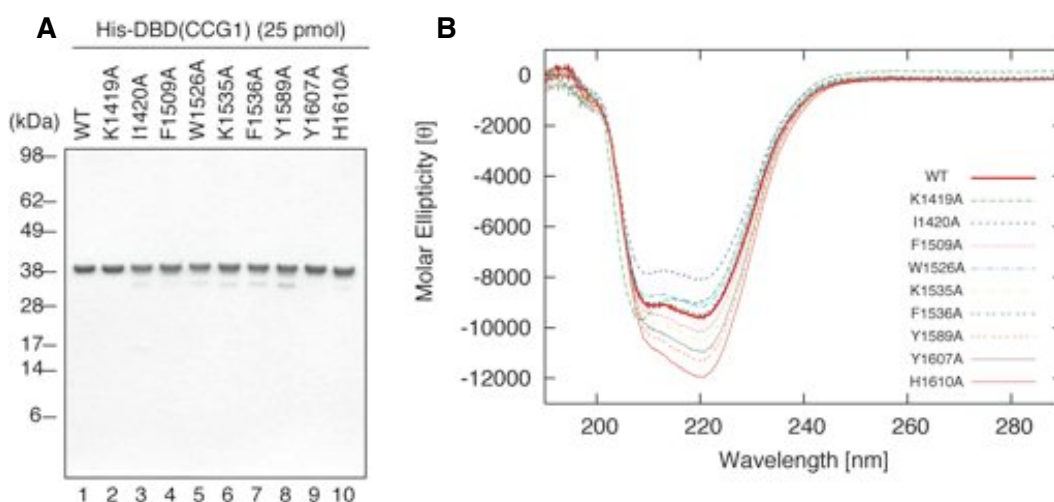


図 44. A) His-DBD(CCG1) 野生型/変異体の SDS-PAGE B) His-DBD(CCG1) 野生型/変異体の CD スペクトル測定の結果

2. DBD(CCG1)点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ

GST プルダウンアッセイの結果、結合サイト 1 (Trp1526Ala, Phe1536Ala, Tyr1589Ala) と結合サイト 2 (Phe1509Ala, Tyr1607Ala, His1610Ala) の点変異体 DBD(CCG1) と CIA/ASF1(155)との相互作用が減少した (図 45A, B)。DBD(CCG1)変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果、いずれの分子と相互作用する表面の変異においても相互作用が減少したことから、2つの異なる分子表面を用いて複合体を形成していると考えられる (図 45B レーン 9-11, 13-16)。DBD(CCG1)点変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果は、結晶構造とよく一致することがわかった。

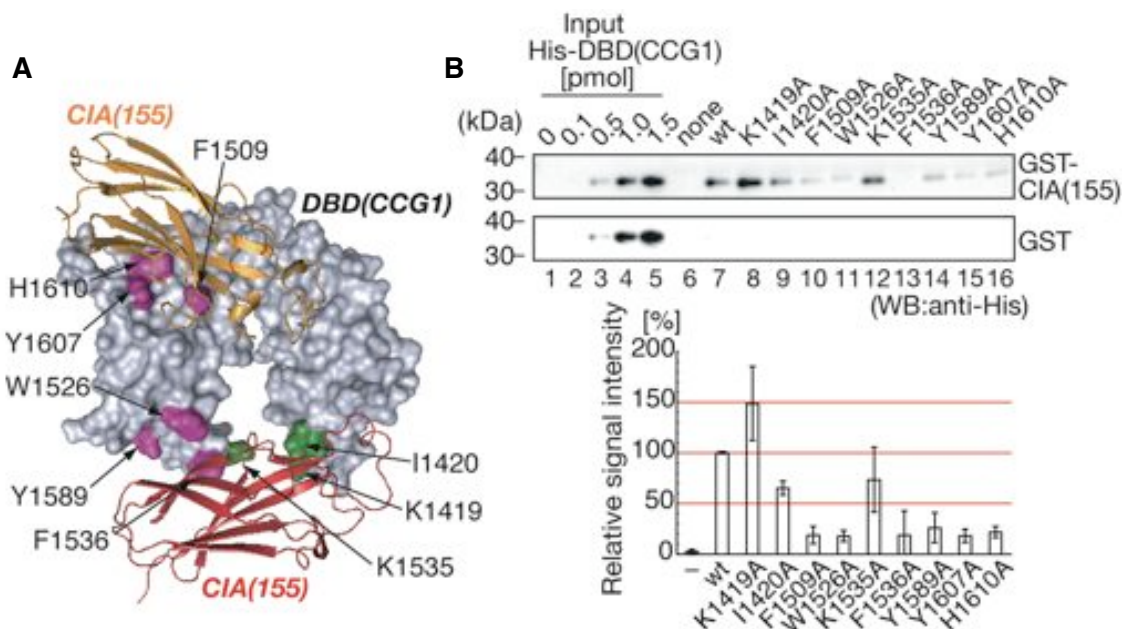


図 45. DBD(CCG1)点変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果

A) 変異を導入した部位。CIA/ASF1 との相互作用に関与するアミノ酸残基を紫色、関与しないアミノ酸残基を緑色で示す。B) 各点変異体のシグナル強度を ImageJ⁽¹⁾を用いて数値化したグラフ。WT を 100 として定義した。3 回の実験結果を使って標準偏差を計算した。

6.4 GST-hCIA/ASF1(155)の点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ

<目的>

結晶構造中では CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)に対して相互作用する分子表面が 2 通り考えられる。そこで、溶液中でどちらの分子表面を用いて複合体を形成しているか明らかにするため、CIA/ASF1(155)の点変異体を用いた GST プルダウンアッセイを行う。

<実験方法>

1. GST-hCIA/ASF1(155)点変異体の精製

表 3 に示したアミノ酸残基の中から、DBD(CCG1)との相互作用に側鎖が使われているアミノ酸残基を選択し、アラニン残基に置換した CIA/ASF1(155)点変異体を 19 種類作成した。PCR 変異導入法により GST-hCIA/ASF1(155)の発現プラスミド (pGEX4T-1 GST-hCIA/ASF1(155)) に変異を導入した。変異導入に使用したプライマーは表 5 に示す。培養から精製までは、2.3 の方法で行った。

表 5. CIA/ASF1(155)変異体作成に使用したプライマー

CIA/ASF1 変異体		プライマー配列
Val9Ala	Forward	GTGAACAATGCAGTGGTGCTGGATAACCC
	Reverse	CTGAACCTTTGCCATATGGAATTCCGGGG
Val10Ala	Forward	GCGGTGCTGGATAACCCTTC
	Reverse	TACATTGTTACCTGAACCTTTGC
Glu49Ala	Forward	GCAAGTGAAGAATACGATCAAGTTTTAG
	Reverse	TGCAGAGCCCACATAGATAATTTTC
Arg69Ala	Forward	GCGCACATGTTTGTATTTTCAGGC
	Reverse	TCCTGCGGGAACAGGAC
Val92Ala	Forward	GCAACTGTTGTGCTAATTACTTG
	Reverse	GCCTACTGCATCTGCATC
Val94Ala	Forward	GCGTAACTGCGGTGCTAATTACTTGTAC
	Reverse	TACTGCATCTGCATCTGGAATGAGTCCTG

Tyr112Ala	Forward	GTTGGCTATGCTGTAAATAATGAATATACTGAG
	Reverse	TCTAATAAATTCTTGTCTCGATAGGTACAAG
Asn114Ala	Forward	CTATTATGTAAATGCTGAATATACTGAGACAG
	Reverse	CCAACTCTAATAAATTCTTGTCTCGATAG
Thr120Ala	Forward	GCAGAATTAAGGGAAAATCCACC
	Reverse	CTCAGTATATTCATTATTTACATAATAGCCAAC
Arg123Ala	Forward	GCGGAAAATCCACCAGTAAAAC
	Reverse	TAATTCTGTCTCAGTATATTCATTATTTAC
Glu124Ala	Forward	AGGGCAAATCCACCAGTAAAAC
	Reverse	TAATTCTGTCTCAGTATATTCATTATTTAC
Asn125Ala	Forward	ACAGAATTAAGGGAAGCTCCACC
	Reverse	CTCAGTATATTCATTATTTACATAATAGCCAAC
Leu140Ala	Forward	GCGGCATCTAATCCCAGGGTC
	Reverse	AATATTCCTTTGAAGCTTAGAAAAGTCTG
Ser142Ala	Forward	TTGGCAGCTAATCCCAGGGTC
	Reverse	AATATTCCTTTGAAGCTTAGAAAAGTCTG
Asn143Ala	Forward	GCTCCCAGGGTCACAAGATTC
	Reverse	AGATGCCAAAATATTCCTTTGAAGC
Pro144Ala	Forward	GAATATTTTGGCATCTAATGCCAGGGTCAC
	Reverse	CTTTGAAGCTTAGAAAAGTCTGGTTTTACTG
Arg145Ala	Forward	GCATCTAATCCCGCGGTCACAAGATTC
	Reverse	CAAATATTCCTTTGAAGCTTAGAAAAGTCTG
Val146Ala	Forward	GCATCTAATCCCAGGGCCACAAGATTC
	Reverse	CAAATATTCCTTTGAAGCTTAGAAAAGTCTG
Val148Ala	Forward	CAGGGTCACAGCATTCACATTAATTG
	Reverse	GGATTAGATGCCAAAATATTCCTTTGAAG

2. GST-hCIA/ASF1(155) 点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ

50% スラリー glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l に対して 100 pmol GST-hCIA/ASF1(155) 野生型/点変異体を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol)内で 500 pmol の His-DBD(CCG1) (20 μ l)を 4 $^{\circ}$ C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l)で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行い、GST-hCIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)を抗 His タグ抗体で検出する。ネガティブコントロールとして GST を用いる。

<結果および考察>

1. GST-hCIA/ASF1(155) 野生型と点変異体の精製

精製した GST-hCIA/ASF1(155) 野生型と点変異体の SDS-PAGE を図 46 に示す。高純度で十分なタンパク質量が回収できた。

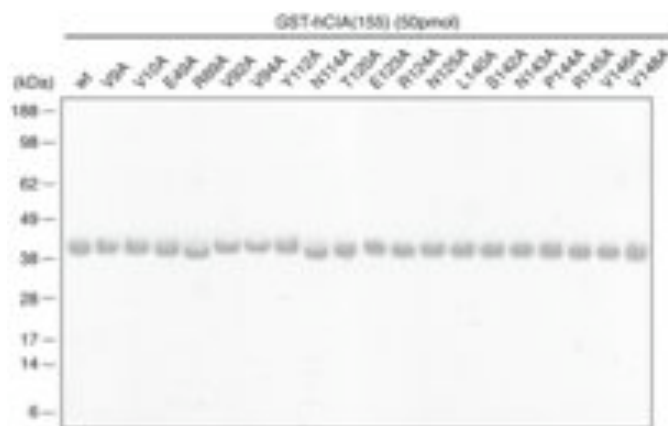


図 46. GST-hCIA/ASF1(155) 野生型/点変異体の SDS-PAGE

2. GST プルダウンアッセイ

GST プルダウンアッセイの結果、結合サイト 1 (Val10Ala, Val92Ala, Tyr112Ala)と結合サイト 2 (Val92Ala, Val94Ala, Tyr112Ala)の点変異体 GST-CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用が減少した。CIA/ASF1(155)変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果、いずれの分子と相互作用する表面の変異においても相互作用が減少したことから、2つの異なる分子表面を用いて複合体を形成していると考えられる (図 47A, B レーン 9-11, 13-16)。

変異体を用いた GST プルダウンアッセイの実験結果、CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)に対して2つの相互作用する表面を持っていることが示唆される。この結果は、結晶構造とよく一致する結果である。しかしながら、サイト 1 で結合する CIA/ASF1(155)によって、サイト 2 に結合する CIA/ASF1(155)の結合が強まる (あるいは弱まる) かどうか、といった疑問をこの GST プルダウンアッセイで明らかにすることはできない。CIA/ASF1(155)同士の協調性を明らかにするためには、その他の定量的な相互作用解析が必要となるだろう。

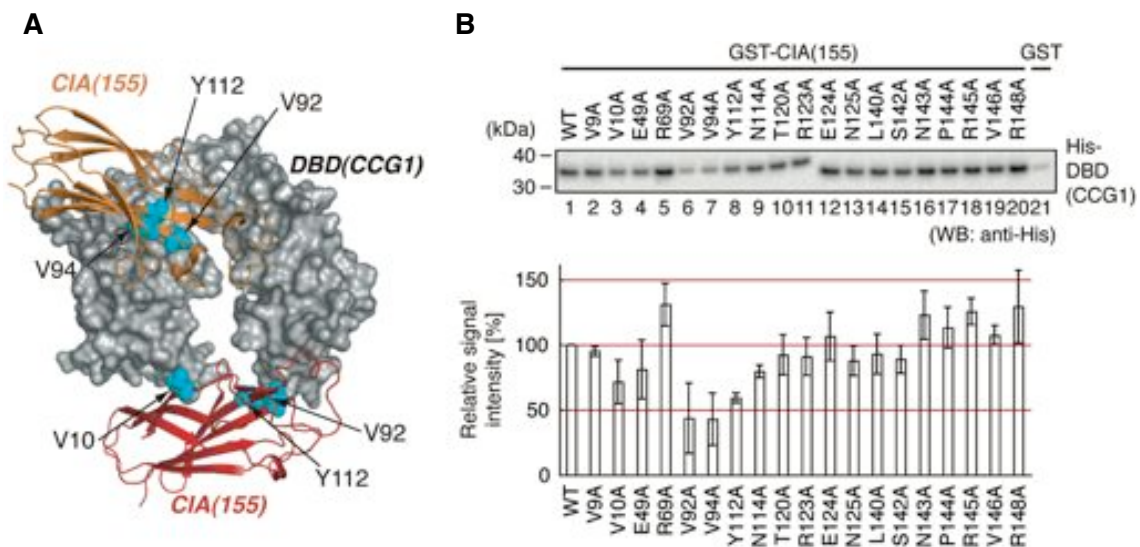


図 47. GST-CIA/ASF1(155)点変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果
A) 変異を導入した部位。DBD(CCG1)との相互作用に関与したアミノ酸残基をシアン色で示す。B) 各点変異体のシグナル強度を ImageJ⁽¹⁾を用いて数値化したグラフ。WTを100として定義した。3回の実験結果を使って標準偏差を計算した。

6.5.1 沈降速度法による沈降係数および分子量の決定

<目的>

6.3 および 6.4 の結果から、溶液中で CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)に対して 2 つの結合表面を持つことを明らかになった。次に、溶液中における正確な分子量、化学量論比を明らかにするために、沈降速度法を用いた分析超遠心を行う。分析超遠心には、ベックマンコールター社製の XL-A を用いて測定を行った。測定に使用するセルやローター等についてもすべてベックマンコールター社製の製品を使用した。

<実験方法>

1. セルの組み立て

沈降速度法では、2 つの穴を持つダブルセクターセンターピースと呼ばれる部品と、ウィンドウアセンブリ、専用のセルハウジング などを使用した。装置マニュアル (<http://www.beckmancoulter.co.jp/product/product01/centerpiece.html>) に従って正確に組み立てる。センターピースとウィンドウアセンブリはぴったりとつかなければならない。間にホコリがはさまると、遠心の際中にサンプルが漏れてしまい、サンプル回収もできなくなる。エアダスターなどを用いてホコリを吹き飛ばしつつ、サンプルセルを組み立てる。

2. サンプルの調整

2.1, 2.4 の方法で CIA/ASF1(155) と DBD(CCG1) を精製した。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体溶液はモル比 1:1 となるように調製し、直接測定に使用した。CIA/ASF1(155), DBD(CCG1), CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体をバッファー (20 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM KCl, 5 % glycerol, 1 mM DTT) に対して 4°C で透析を行った。透析後、255 nm の波長を用いて各サンプルの濃度を調製した。CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)のタンパク質濃度が約 140 μM ($A_{255} = 1.0$) なるように調製した。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1) 複合体のタンパク質濃度が、約 20, 130 μM ($A_{255} = 0.5, 3.0$) なるように調製した。

3. サンプルセル、ローター、光学系の設置

CIA/ASF1(155), DBD(CCG1), CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1) (20 μM)複合体溶液は、12 mm ダブルセクターセルを、CIA/ASF1–DBD(CCG1)複合体(130 μM)は 3 mm ダブルセクターセルを使用した。セルに注入するタンパク質溶液はそれぞれ 400 μl (12 mm セル)、100 μl (3 mm セル) である。その後、サンプルセルの重さを測定し、カウンターバランスの重さを合わせてローターに入れる。サンプルセルを入れたローターと光学系を装置チャンバー内に設置する。フタを閉じて測定温度を 7 $^{\circ}\text{C}$ に設定した後、チャンバー内を真空ポンプ装置で減圧する。

4. テストデータの収集

パラメーターは、ローターのタイプ (8 hole) 、回転数 (3000 rpm) 、温度 (7 $^{\circ}\text{C}$) 、実験方法 (absorbance, velocity) 、測定範囲 (6.0~7.3 cm) 、測定波長 (255 nm) と設定した。上記の設定条件で、シングルスキャンを行う。サンプルの漏れがないか、ベースライン、移動境界面、メニスカス、プラトー領域が観測されていることを確認する。一旦ローターの回転を止め、真空ポンプ装置によるチャンバー内減圧は維持する。チャンバー、ローター内の温度が完全に平衡に達するように、チャンバー内温度が設定温度に達してからさらに 1 時間ほど待った後に本番のデータ測定を開始する。温度が平衡に達するまでに 3 時間程度は必要である。

5. 本測定

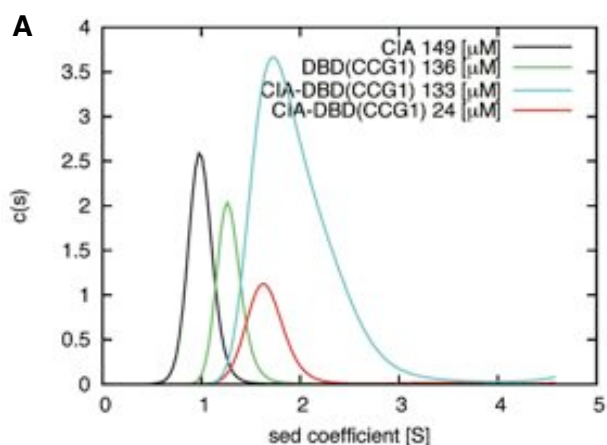
回転数 (42000 rpm) 、ローターのタイプ (8 hole) 、回転数 (3000 rpm) 、温度 (7 $^{\circ}\text{C}$) 、実験方法 (absorbance, velocity) 、測定範囲 (6.0~7.3 cm) 、測定波長 (255 nm) 、スキャン間隔 (10 分) 、測定枚数 (99 枚) と設定し、測定を開始した。測定開始から 17 時間後、測定データを回収し、SEDFIT を用いてデータ解析を行った⁽⁵¹⁾。

6. データ解析

データ解析に必要なパラメーターである、タンパク質の偏比容、緩衝液の密度・粘度の数値はソフトウェア SEDNTERP を用いて計算した⁽³²⁾。CIA/ASF1(155), DBD(CCG1), CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1) 複合体 (1:1 と仮定して算出) の 7 $^{\circ}\text{C}$ における偏比容は、それぞれ 0.7260, 0.7316, 0.7297 であった。緩衝液の 7 $^{\circ}\text{C}$ における密度・粘度の値は、それぞれ 1.02987, 0.016756 であった。これらのパラメーターを用いて、SEDFIT により沈降係数の $c(s)$ 分布を求めた⁽⁵¹⁾。CIA/ASF1(155), DBD(CCG1), CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1) 複合体の $c(s)$ 分布をまとめたものを図 48 に示す。

<結果と考察>

沈降速度法の結果、CIA/ASF1(155), DBD(CCG1), CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の重量平均の沈降係数を決定した (図 48A, B)。CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体溶液は、CIA/ASF1(155)および DBD(CCG1)の $c(s)$ 分布と比較して、 $c(s)$ 分布が高い沈降係数側に移行していることから、溶液中で CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)複合体が形成されていると考えられる (図 48A, B)。しかしながら、CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の $c(s)$ 分布は幅広いピークを示していることから、複数の分子種が混在した reaction boundary を形成している可能性がある。そのため、分析超遠心を用いた解析では、正確な分子量を求めることができないと考えられる。



B

Protein name	Conc. [μ M]	s	
		s	$s_{20,w}$
(Experimental)			
CIA	149	0.995	1.816
DBD(CCG1)	136	1.292	2.362
CIA-DBD(CCG1)	133	1.956	3.575
	24	1.659	3.032

図 48. 沈降速度法の測定結果

A) CIA/ASF1(155), DBD(CCG1), CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の $c(s)$ 分布。

B) CIA/ASF1(155), DBD(CCG1), CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の各濃度における沈降係数。

6.5.2 CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体形成における濃度依存性

<目的>

6.5.1 の実験結果から、CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の $c(s)$ 分布は、CIA/ASF1(155), DBD(CCG1), CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の3者が解離会合を繰り返しながら沈降している **reaction boundary** をあらわしていると考えられる。分子同士の解離会合が速い平衡にある系 ($k_{off} > 0.01/\text{sec}$ 程度) では、 $c(s)$ 分布にあらわれるピークは重量平均化されてしまい、実在する分子種のピークをあらわすとは限らない。この場合、複数の異なるタンパク質濃度条件で沈降速度法を行い、濃度依存的に沈降係数の値を持つ成分が増えれば、特徴的な **fast reaction boundary** を形成していることが考えられる⁽¹⁹⁾。SEDFIT を用いた解析では、 $c(s)$ から $c(M)$ への変換において「すべての分子種の摩擦比*が共通である」という仮定をおいているため、**reaction boundary** から正確な分子量を求めることが難しい⁽⁵¹⁾。そこで、濃度依存的に CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の沈降係数の値が増加する傾向があるか、**reaction boundary** の $c(s)$ 分布かどうか確認するために、複数の異なる濃度で沈降速度法を行う。

*タンパク質の形状が真球に比べてどのくらい偏っているかどうかを示す。通常の球状タンパク質であれば、1.05～1.3 程度の値を示すことが多い。

<実験方法>

CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体溶液の 255 nm の吸光度が約 0.2, 0.4, 0.8, 1.4, 2.5 となるように調整する (6.5.1 参照)。吸光度が約 0.2, 0.4, 0.8 のタンパク質溶液は、12 mm ダブルセクターセルを使用し、吸光度が約 1.4, 2.5 のタンパク質溶液は 3 mm ダブルセクターセルを使用する。セルに注入するサンプルはそれぞれ 400 μl , 100 μl である。測定からデータ解析は、6.5.1 の方法で行った。

<結果と考察>

複数の異なる濃度で沈降速度法を行った結果、濃度依存的に沈降係数の値を持つ成分が増えたことから、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の $c(s)$ 分布は、fast reaction boundary であることが示された (図 49A, B)。タンパク質濃度の増加に伴って $c(s)$ 分布のピーク位置が高沈降係数側に移行する場合、複数の分子が解離会合を繰り返しながら沈降している fast reaction boundary であると言える。一方、タンパク質濃度の増加に伴って $c(s)$ 分布のピーク位置 (もしくは沈降係数) が変わらずに鋭いピークを示す場合には、分子間の結合が遅く非常に安定した複合体を形成していると言える。CIA/ASF1(155) と DBD(CCG1) の相互作用は前者の条件によく当てはまり、CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1) 複合体の 3 者が解離会合を繰り返しながら沈降している reaction boundary であることがわかる。以上の結果から、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1) 複合体の $c(s)$ 分布は fast reaction boundary を形成しており、複合体の正確な分子量を求められないことがわかった。また、SEDFIT による解析方法では、 5 mg ml^{-1} 以上の高濃度のタンパク質試料の解析を行うことができないこと知られている。高濃度では理想溶液からずれが生じるため、理想性からのずれを考慮する必要がある。しかしながら、沈降係数を算出する Lamm の方程式は、溶液の非理想性を考慮していないため、SEDFIT による解析ができない。図 49 の $133 \mu\text{M}$ (7 mg ml^{-1}) の $c(s)$ 分布は、 5 mg ml^{-1} より高濃度の試料を非理想性も考慮せずに SEDFIT 解析を行っているため、ピーク幅の広い非対称な $c(s)$ 分布を示しているものと考えられる。そのため、正しい沈降係数を求められていない可能性があり、 5 mg ml^{-1} より高濃度条件では沈降平衡法などを用いて詳細な解析を行う必要があると考えられる。

図 49A の $133 \mu\text{M}$ を除く CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1) 複合体の $c(s)$ 分布は、濃度の増加に伴って対称的な分布を示していることから、高濃度にすることで CIA/ASF1(155) と DBD(CCG1) との複合体が安定的に形成していると考えられる。図 49A の対称的な $c(s)$ 分布の形にも表れているように、 $43\sim 74 \mu\text{M}$ 程度の濃度条件で CIA/ASF1(155) と DBD(CCG1) は安定して複合体を形成していると考えられる。

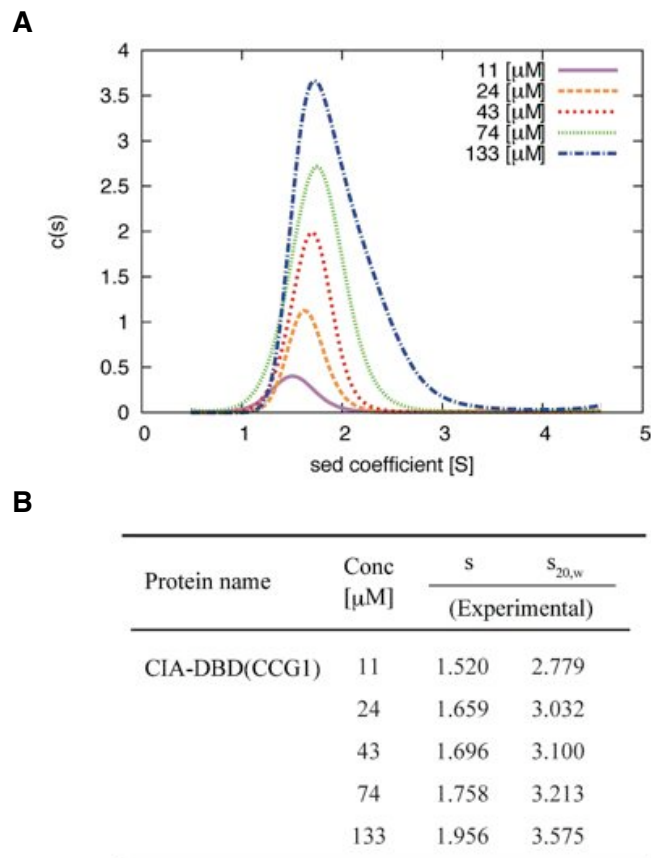


図 49. 沈降速度法の測定結果

A) CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の各濃度における $c(s)$ 分布。
 B) CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の各濃度における沈降係数。

6.5.3 HYDROPRO を用いた沈降係数の算出

<目的>

CIA/ASF1(155)–DBD(CGG1)複合体のc(s)分布は fast reaction boundary を形成していることから、直接、CIA/ASF1(155)–DBD(CGG1)複合体の正確な分子量を求めることはできない。それでは、「分子量ではなく実験的に得られた沈降係数の値から CIA/ASF1(155)–DBD(CGG1)複合体の化学量論比を推測することができないか？」と考えた。球状ビーズを組み合わせたモデルについて 結晶構造の座標から沈降係数を計算できるHYDROPROというプログラムがすでにあることが報告されている⁽¹⁸⁾。そこで、HYDROPROを用いて結晶構造の座標から複合体の沈降係数を予測し、計算で得られた理想的な沈降係数と reaction boundary から得られた沈降係数を比較することで、溶液中でのCIA/ASF1(155)とDBD(CGG1)の化学量論比を決めることができるかどうか検討した。

<実験方法>

PDB 座標から沈降係数の計算は、HYDROPRO を使用した。HYDROPRO に使用するパラメーターは、AER (3.1 Å)、Beads radius (2-30 Å)、buffer density (1.02987 ml g⁻¹)、buffer viscosity (0.01676 g cm⁻¹ s⁻¹)、sigma factor (6)、temperature (273 K) である。パラメーターの設定値が適切であるかどうか調べるため、結晶構造の座標から CIA/ASF1(155)と DBD(CGG1)の理想的な沈降係数を計算した。パラメーターの設定値が適正かどうか評価した後、CIA/ASF1(155)–DBD(CGG1)複合体の理想的な沈降係数を計算した。

<結果と考察>

上記の設定条件で、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の沈降係数を計算した結果、実験的に得られた沈降係数（1.816 S, 2.362 S）と結晶構造の原子座標をもとに得られた沈降係数の値（1.928 S, 2.517 S）はよく一致することが示された（表 6）。沈降係数だけではなく、拡散係数、ストークス半径も実験値とよく一致することも同時に示された（表 6）。以上の結果から、結晶構造の原子座標から計算した沈降係数を用いて、reaction boundary の c(s)分布に存在する分子種を推測することが可能であると考えられる。

次いで CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の沈降係数を計算すると、24 μM と 133 μM の複合体溶液から得られた沈降係数（3.032S, 3.575S）は、HYDROPRO により算出した 1:1 複合体の沈降係数（2.900 S, 2.965 S）と 2:1 複合体（3.479 S）とそれぞれよく一致することが示された（表 6）。CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)複合体は濃度増加に伴って沈降係数が増加する傾向にあること、結晶構造の原子座標より算出した沈降係数と実験で得られた沈降係数が非常によく一致することから、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)は、溶液中において濃度依存的に 1:1, 2:1 の複合体を形成することが示唆される（図 48, 49, 表 6）。

表 6. HYDROPRO により算出した値と実験値との比較

Protein name	Conc. [μM]	s ($\times 10^{-13}$ s)	$s_{20,w}^a$ ($\times 10^{-13}$ s)	$D_{20,w}^b$ ($\times 10^{-7}$ cm ² /s)	R_s^c (nm)	MW ^d (Da)	Stoichiometry of the complex ^e	
							CIA	DBD(CCG1)
CIA	149	0.995	1.816 (1.928)	9.663 (10.49)	2.610 (1.742)	19616 (17954)	1	-
DBD(CCG1)	136	1.292	2.362 (2.517)	6.999 (7.444)	3.690 (2.456)	36707 (33997)	-	1
CIA-DBD(CCG1)	24	1.659	3.032 (2.900)*	5.964 (5.565)	2.900 (3.285)	- (51951)	1	1
	24	1.659	3.032 (2.965)*	- (5.690)	1.960 (3.213)	- (51951)	1	1
	133	1.956	3.575 (3.479)	- (4.940)	2.580 (3.701)	- (69905)	2	1

Value in parenthesis were estimated from HYDROPRO software.

a Experimental $S_{20,w}$ value from SEDFIT c(S) distribution

b $D_{20,w}$ from $s_{20,w}$ and experimental Mr using the Svedberg equation $D = SRT/M(1 - \nu\rho)$

c Effective Stokes radius

d Molecular weight from the SEDFIT c(M) distribution. Molecular weights in parenthesis refer to theoretical values.

* 2.900 and 2.965 corresponds 1:1 complexes in which CIA/ASF1 binds to binding sites 1 and 2, respectively.

6.5.4 DBD(CCG1)点変異体を用いた分析超遠心

<目的>

DBD(CCG1)点変異体である Phe1536Ala (結合サイト 1)、Phe1509Ala (結合サイト 2) を用いて沈降速度法を行い、c(s)分布や沈降係数の変化を DBD(CCG1) 野生型と比較することで、CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)のどちらの分子表面に対して親和性が高いのかどうか検討する。

<実験方法>

1. 分析超遠心に使用したタンパク質の精製

2.4 の方法で DBD(CCG1) Phe1536Ala, Phe1509Ala を精製した。

2. 沈降速度法

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体溶液の濃度が約 20 μM ($A_{255} = 0.5$)となるように調製する。測定には 12 mm ダブルセクターセルを使用する。セルに注入するタンパク質溶液はそれぞれ 400 μl である。測定からデータ解析は、6.5.1 の方法で行った。

<結果と考察>

1. 分析超遠心に使用したタンパク質の精製

精製した各タンパク質の SDS-PAGE を図 50 に示す。高純度で十分なタンパク質量が回収できた。

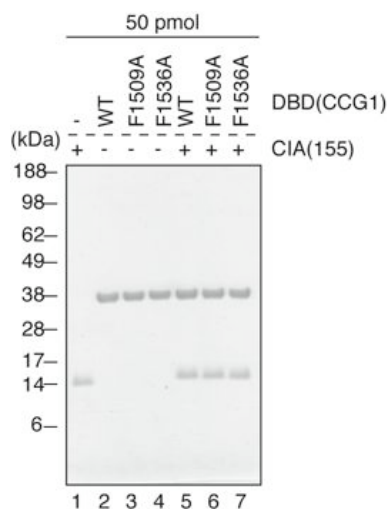


図 50. 分析超遠心に使用したタンパク質の SDS-PAGE

2. 沈降速度法

DBD(CCG1) Phe1536Ala 点変異体を用いた結果、CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の $c(s)$ 分布は低沈降係数側にシフトし、沈降係数は顕著に減少することがわかった (図 51A, B)。得られた沈降係数 (2.591 S) は DBD(CCG1)単体の沈降係数 (2.362 S) にほぼ等しく、Phe1536 の変異を導入することで、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の複合体形成が阻害されたと考えられる。DBD(CCG1) Phe1509Ala 点変異体では沈降係数に変化は全くみられなかった (図 51A, B)。以上の結果から、CIA/ASF1(155)は溶液中で DBD(CCG1)の結合サイト 1 に対して高い親和性を持っていることが明らかになった。また、結合サイト 1 の点変異体のみで変異の影響がみられたことから、CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体の濃度が 21-24 μM 程度の条件下では、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)は 1:1 の複合体を形成していることを支持する結果にもなった。

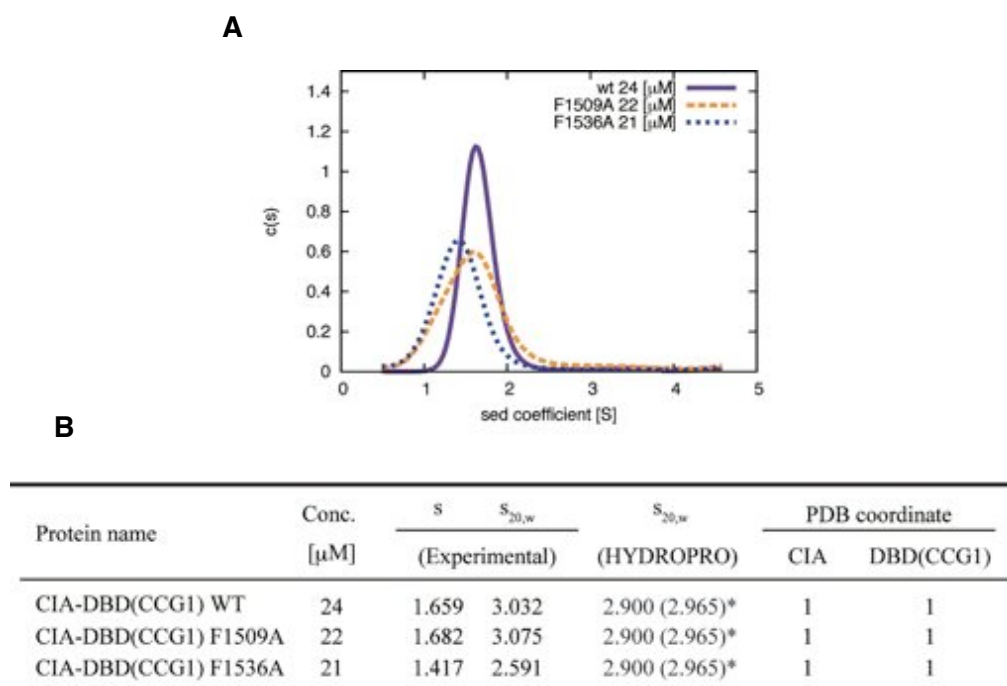


図 51. DBD(CCG1)点変異体を用いた沈降速度法の測定結果

A) CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1) 野生型/Phe1509Ala/Phe1536Ala 複合体の $c(s)$ 分布。

B) 実験的に得られた沈降係数と HYDRPRO により算出した沈降係数の比較。

6.5.5 SEDPHAT によるモデルフィッティング

<目的>

6.5.1~6.5.4 の実験結果から、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)が濃度依存的に 1:1, 2:1 の複合体を形成すること、CIA/ASF1 が DBD(CCG1)の結合サイト 1 に高い親和性を持つことが強く示唆された。次に、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)がどの程度の解離定数をもつ複合体なのか現段階では全くわからない。分析超遠心を用いた解析では、SEDFIT を拡張してモデルフィッティングを可能にしたプログラム SEDPHAT がある⁽⁵²⁾。SEDPHAT では、測定データにモデルを当てはめて解離会合モデルの妥当性を評価することや解離定数を求めることができる。そこで、SEDPHAT を利用してこれまでに沈降速度法で得られた複数の実験曲線をまとめてモデルフィッティングすることで、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の解離定数を求めることができるかどうか検討する。

<実験方法>

1. 沈降速度法を用いた分析超遠心

モデルフィッティングするデータは、異なる混合比の測定データ、混合比一定で異なるタンパク質濃度の測定データを使用する。CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)をモル比が 1:1, 2:1, 3:1 となるように混合し、 $A_{255} = 1.0$ (17.9, 12.2, 9.22 μM)に調製したタンパク質溶液を用意する。また、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)をモル比が 3:1 となるように混合し、 $A_{255} = 0.2, 0.5, 1.0$ (1.87, 4.67, 9.34 μM) に調製したタンパク質溶液を用意する。合計 6 種類の異なるタンパク質溶液を用いて、20°C で沈降速度法を行った。測定には 12 mm ダブルセクターセルを使用した。セルに注入するタンパク質溶液はそれぞれ 400 μl である。測定からデータ解析は、6.5.1 の方法で行った。

2. SEDPHAT を用いたデータ解析

図 52 の 5 つの $c(s)$ 分布をまとめて SEDPHAT を用いてモデルフィッティングを行った。まず、SEDFIT で解析した各測定データを SEDPHAT 用の .xp ファイルとして保存し、初期パラメーターを設定する。設定すべき初期パラメーターは、各タンパク質の初濃度、沈降係数、モル吸光係数、分子量、理論モデル、おおよその結合定数、測定条件である。測定条件については、.xp ファイルに変換に伴って自動的に保存される。CIA/ASF1 と DBD(CCG1)との解離定数は、6.2 の GST プルダウンアッセイで 100 pmol の

CIA/ASF1(155)に対して 1.5 pmol の DBD(CCG1)が結合していることから考えると数百 μM 程度と推測されるため、 $\log(K_a) = 5$ (10 μM)もしくは 4 (100 μM)と設定する。フィッティングには、single-site association ($A + B \rightarrow AB$)と second-site association ($A + B \rightarrow AB + B \rightarrow ABB$)の 2 つの理論モデルを使用する。図 52 の 5 つの実験データをまとめて最適化し、Marquardt-Levenbert 法によるフィッティングを行う。フィッティングの良否は、chisq (1.0 であれば perfect fit)、locrmsd (0.01 以下であれば信頼性のあるデータ)、最適化された沈降係数の値から評価する。

<結果と考察>

1. 沈降速度法を用いた分析超遠心

混合比一定で異なるタンパク質濃度の測定データは、6.5.2 の結果と同様、CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体形成の濃度依存性が示された (図 52A, B)。異なる混合比の測定データでは、DBD(CCG1)に対して CIA/ASF1(155)を過剰な状態にすることで、複合体形成を促進する結果が得られた (図 52A, B)。低濃度条件で分析超遠心を行うことで、複合体形成前、複合体形成過程、複合体形成後の 3 段階の $c(s)$ を得ることができた (図 52A-D)。

ここで、図 49A の 11 μM (紫色の曲線, 7°C で測定) と図 52C の 9 μM (青色の曲線, 20°C で測定) の $c(s)$ 分布を比較すると、図 49 の 11 μM (紫色の曲線, 7°C で測定) の $c(s)$ 分布のピークが鋭いことがわかる。 $c(s)$ 分布のピーク形状は、安定に複合体が形成されているかどうか判断する指標でもあることから、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)は低温で安定に複合体を形成することを示唆している。

熱力学によると、ギブズエネルギー G が小さいほど安定に反応 (正反応) が進行し、 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ という関係式 (以後、熱力学方程式を呼ぶ) で表される。低温条件で安定的に CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体を形成する理由は、熱力学方程式から推察することができる。熱力学方程式によれば、 ΔH および ΔS がともに負の場合、低温において ΔG は負 ($|\Delta H| > |\Delta S|$)、高温において ΔG は正 ($|\Delta H| < |\Delta S|$) となり、低温では反応は自発的に進行し、高温では逆方向に進行する傾向になる。また、 ΔH が負、 ΔS が正である場合、 ΔG は温度によらず負となることから、反応は温度によらず正方向に自発的に進行する⁽⁶⁶⁾。CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の場合、6.6 に示す ITC 実験の結果から、結合サイト 1 の ΔH および ΔS は共に負、結合サイト 2 の ΔH は負、 ΔS は正であることが示されている。熱力学方程式と ITC 実験の結果から解釈すると、結合サイト 1 および 2 において、低温条件で反応は正方向に傾くこととなり、CIA/ASF1(155)–DBD(CCG1)複合体が安定して形成されることが考えられる。

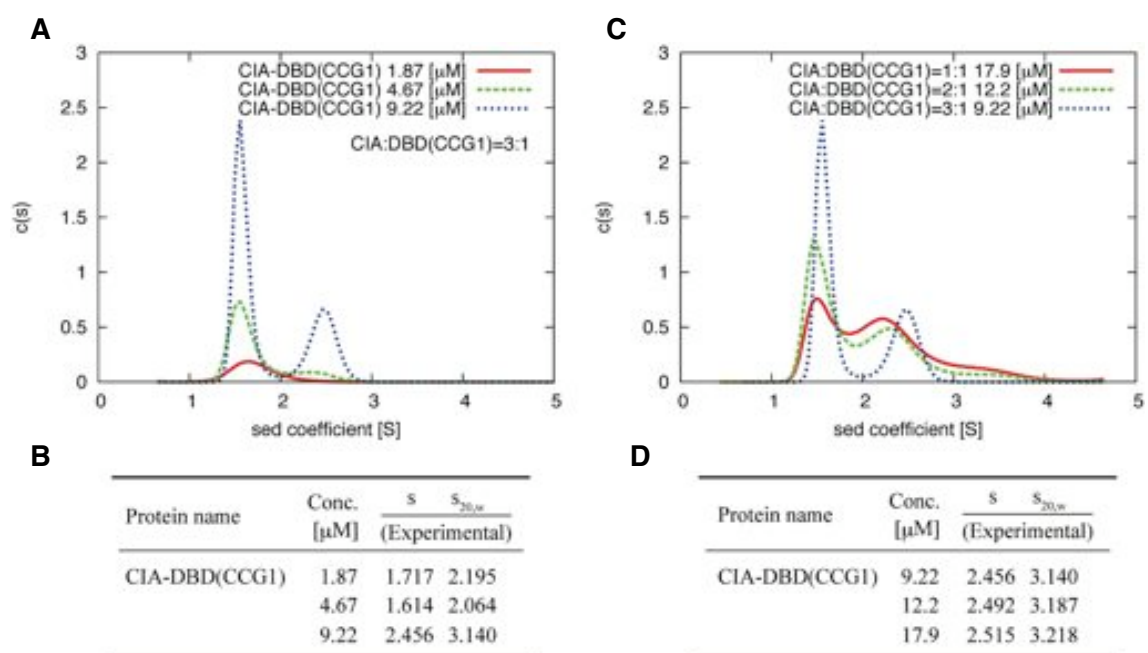


図 52. 異なる測定条件での分析超遠心の結果

A, B) 混合比一定で異なるタンパク質濃度の測定データから得られた $c(s)$ 分布と沈降係数。
 C, D) 異なる混合比の測定データから得られた $c(s)$ 分布と沈降係数。

得られた複数の実験曲線をまとめて SEDPHAT を用いてモデルフィッティングすることで解離定数を求めることが可能かどうか検討する。

2. SEDPHAT を用いたモデルフィッティング

モデルフィッティングの結果を表 7 に示す。single-site association ($A + B \rightleftharpoons AB$) を用いたモデルフィッティングの結果、仮定した結合定数に関係なく、chisq の値は大きく、沈降係数が初期値から大きくずれていることから、うまくフィッティングされていないことがわかる。これは、計算に使用した理論モデルとは矛盾していることを示していると考えられる (表 7) 。second-site association ($A + B \rightleftharpoons AB + B \rightleftharpoons ABB$) を用いたモデルフィッティングでは、locrmsd の値は 0.01 に近く、chisq の値は 1.000 に近いことから比較的良いフィッティングを示していると考えられる (表 7) 。その中でも、結合定数を $\log(Ka) = 5$ ($10 \mu\text{M}$) と仮定したモデルフィッティングで最良のフィッティングデータが得られている (表 7) 。最良のフィッティングが得られた SEDPHAT の結果を図 53 に示す。比較的良いフィッティング結果が得られているものの、5 つの実験データともに残差が大きい (移動境界面を示すグラフの下段のグラフ) 。今後、この測定残差が低くなるようにパラメーターを最適化した上でモデルフィッティングすることで、より正確な解離定数を求めることが可能であると考えられる。SEDPHAT 解析の結果、 $12.763 \mu\text{M}$ と $51.0052 \mu\text{M}$ の 2 つの解離定数が求められた。さらに、SEDPHAT より求めた解離定数は、6.6 項で述べる等温滴定カロリメトリーの実験から求めた解離定数と近い値を示すことがわかった。以上の結果から、沈降速度法により得られた異なる濃度の測定データを用いて、ヘテロ解離会合系の解離定数を求めることが可能であることが示唆された。

表 7. SEDPHAT を用いたフィッティング結果のまとめ

Model	log(Ka)	Kd	chisq	locrmsd	sAB	
					initial	after
single-site association	5	9.618	4.238059	0.010306	2.88	3.398
(A + B → AB)	4	38.258	4.382898	0.010282	2.88	3.817

Model	log(Ka)	Kd	Kd1	Kd2	chisq	locrmsd	sAB		sABB	
							initial	after	initial	after
second-site association	5	25.51429	12.763	51.0052	1.527326	0.015474	2.88	2.937	3.4	3.42181
(A + B → AB + B → ABB)	4	200.0214	100.002	400.006	1.880476	0.018746	2.88	3.400	3.4	3.40000

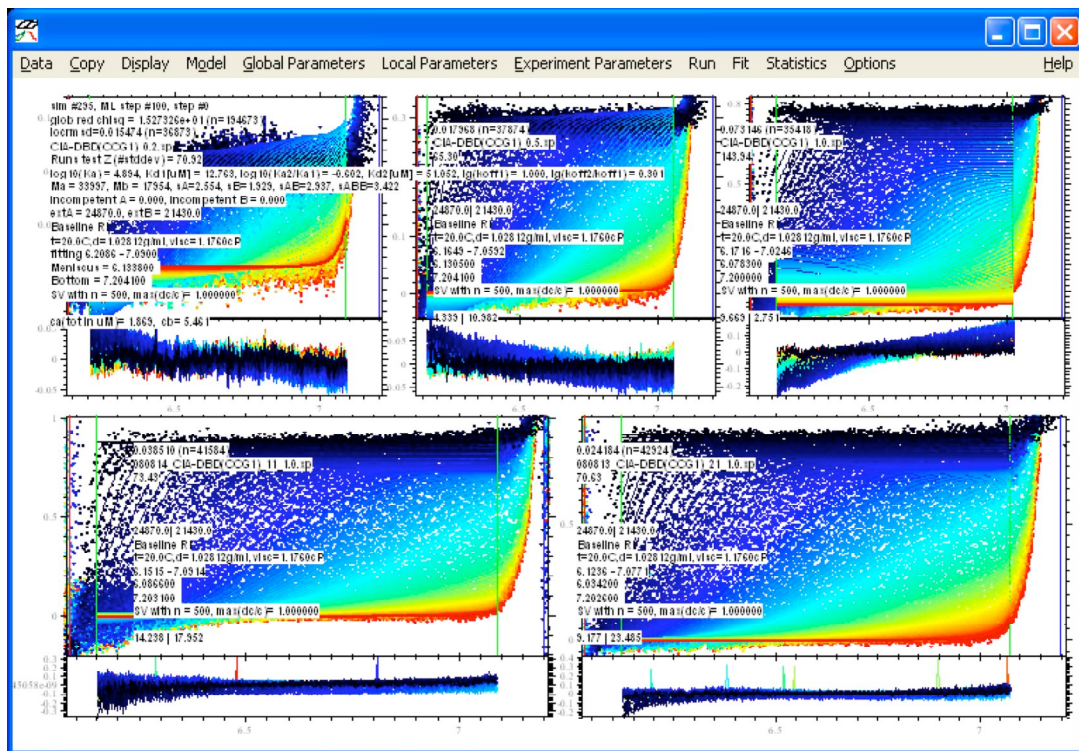


図 53. second-site association モデルを用いたフィッティング結果

6.6 等温滴定カロリメトリー (ITC)

<目的>

6.5.5 の実験結果から、CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用モデルは、「second-site association (A + B \rightleftharpoons AB + B \rightleftharpoons ABB)」であることが示唆され、その解離定数が 12.763 μ M、51.005 μ M であることが示された。この解離会合モデルや解離定数の妥当性を判断するためには、SEDPHAT 以外の手法を用いて解離定数を求める必要がある。そこで、溶液中での CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の解離会合モデル、解離定数を明らかにするため、等温滴定カロリメトリーを行う。

<実験方法>

1. 試料溶液の濃度の見積もり

セル側に充填するサンプル濃度は、 $c = K_b \times M_{tot} \times n$ で表される c パラメーターより決定される (図 54)。今回、 $c = 10$, $K_d = 50 \mu$ M と仮定すると、セル側に充填する DBD(CCG1)の濃度を 273 μ M とする。一方、滴定シリンジに充填するリガンドの濃度は、 $X_{tot} \times \Delta v / V = M_{tot} \times n \times 1.5$ を満たすように設定する。ここで、 X_{tot} (初期リガンド濃度) = 1.4 mL、 Δv (トータル滴定量) = 240 μ l、 n (結合サイト数) = 2、 $M_{tot} = 273 \mu$ M とすると、セルに滴定する CIA/ASF1(155)の濃度は 5 mM と見積もられた。

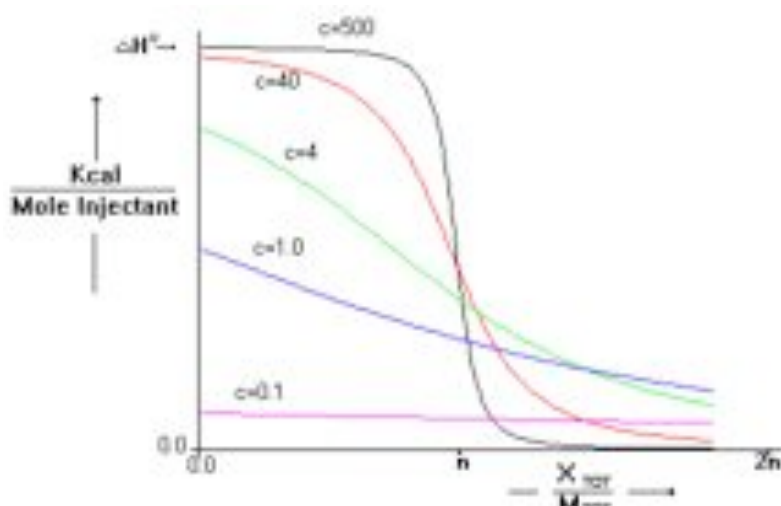


図 54. 各 c 値で予想される滴定曲線

X_{tot}/M_{tot} : サンプルセル中に滴下された滴定シリンジからの試料濃度 / 滴定前のサンプルセルの中の試料濃度、Kcal/mole: 測定によって発生する熱量。少なくとも C 値が 10 程度でなければ、シグモイドな曲線が得られないことがわかる (Microcal ITC ユーザーマニュアルより転載)。

2. ITC の測定

2.1, 2.4 の方法で CIA/ASF1(155) と DBD(CCG1) を精製した。CIA/ASF1(155), DBD(CCG1) を 20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 300 mM KCl, 5% glycerol の緩衝液に一晩透析し、 90 mg ml^{-1} (5.032 mM) CIA/ASF1(155) を 1.5 mL, 8.5 mg ml^{-1} (247 μM) DBD(CCG1) を 2 mL 調製した。試料溶液を脱気した後、DBD(CCG1) を測定セル、CIA/ASF1(155) を滴定シリンジに充填した。リガンドの滴定量 = 6 μl 、リガンドの滴定回数 = 40 回、温度 = 4 °C、溶媒 : 20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 300 mM KCl, 5% glycerol の条件で、滴定終了後のセル中のリガンド濃度がサンプルの結合サイトの濃度の 3 倍となるように測定を行った。同様の操作を溶媒に試料を滴下した実験データに関しても行い、これをリファレンスデータとして、試料同士の滴定データから差し引いた。このように得られた測定データを用いて、one set of sites、two set of sites モデルによるフィッティングを行った。これらのデータの解析には、Origin V. 5.0 [Microcal Ins.] を用いた。

<結果と考察>

Two set of sites モデルによるフィッティングの結果、CIA/ASF1(155) は DBD(CCG1) に対して 8.6 μM と 173 μM の 2 つの解離定数を持つことが示された (図 55A, B)。6.5.4 と ITC の結果を合わせて解釈すると、結合サイト 1 の解離定数が 8.6 μM 、結合サイト 2 の解離定数が 173 μM であると考えられる。

One set of sites モデルによるフィッティングでは結果が収束しなかった。N の値を固定した One set of sites および two set of sites モデルでフィッティングは、いずれも良いフィッティング結果が得られなかった (図 56)。以上の結果から、結晶構造解析で得られた DBD(CCG1) に 2 分子の CIA/ASF1(155) が相互作用しているモデルに対応する結果が得られたと示唆される。しかしながら、結合比 $N = 0.2$ という結果は、使用したモデルが two set of sites モデルとは矛盾していることを示しているように思われる。もし $N = 0.2$ が正しいとすれば、「高親和性サイトには溶液中の 20% のタンパク質しか結合しない」と解釈するべきかもしれない。Two set of sites モデルは、2 つの結合サイトに独立にリガンドが結合するモデルであるため、2 つの結合に正あるいは負の共同性がある場合には正しい結果を与えない可能性があり、このようなモデルを検証するためには、異なる温度で相互作用を測定し、使用したモデルから決めた ΔG と ΔH の値が矛盾しないということを確認する必要があるだろう。異なる温度で求めた ΔG と ΔH が、 $\partial(\Delta G/T)/\partial T = -\Delta H/T^2$ ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ の両辺を T^2 で割り偏微分した式) の関係式に当てはまるようであれば、使用したモデルが正しいと判断することができる。

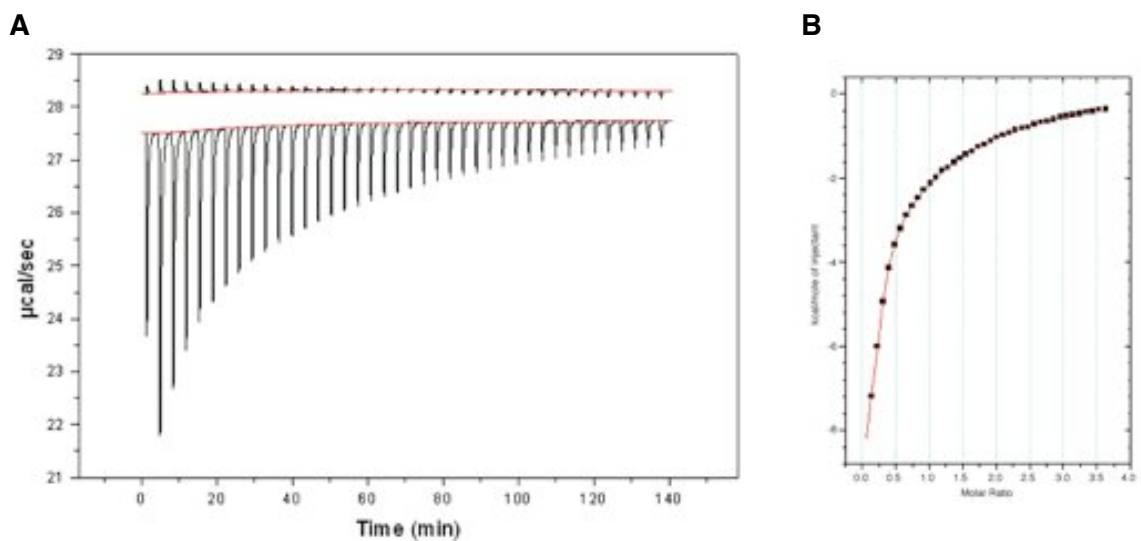
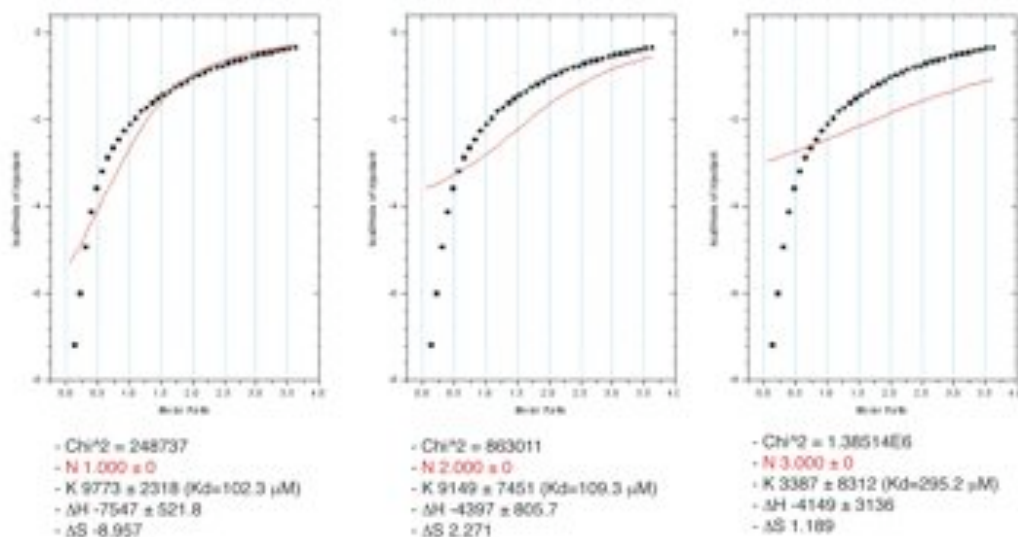


図 55. ITC の解析結果

A) DBD(CCG1)に CIA/ASF1(155)を滴定することで得られた滴定曲線。発熱反応($\Delta H < 0$)が起こっている。B) Two set of sites モデルによるフィッティング解析の結果: $N_1 = 0.214 \pm 0.004$, $K_{a1} = 1.16 \times 10^5 \pm 0.06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($K_{d1} = 8.6 \mu\text{M}$), $\Delta H_1 = -1.13 \times 10^4 \pm 0.04 \times 10^4 \text{ cal mol}^{-1}$, $\Delta S_1 = -17.7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $N_2 = 1.37 \pm 0.06$, $K_{a2} = 5.77 \times 10^3 \pm 0.28 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ($K_{d2} = 173 \mu\text{M}$), $\Delta H_2 = -4.08 \times 10^3 \pm 0.23 \times 10^3 \text{ cal mol}^{-1}$, $\Delta S_2 = 2.52 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

One set of sites



Two set of sites

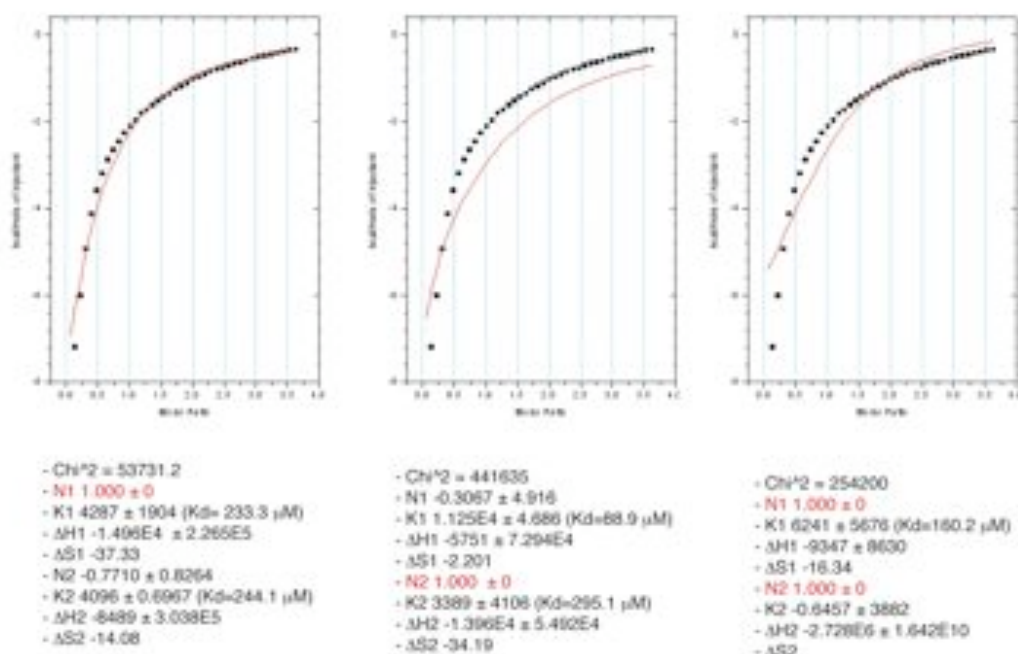


図 56. 複数のモデルでのフィッティングの結果

N 値を一定にすることで、フィッティングは悪くなり、条件によっては解離定数が負の値を示す場合もある。N 値を一定にしてフィッティングすることはそれぞれのモデルと矛盾していることを示している。

<使用機器>

- 小型遠心機: MX-300 (TOMY)
- ローター: AR500-04 (TOMY), AR015-24 (TOMY)
- 限外ろ過フィルター: Amicon Ultra 15 (Millipore)
- 分光光度計: DU 640 SPECTROPHOTOMETER (Beckman Coulter)
- 分析超遠心機 (Beckman Coulter, XL-A)
- 等温滴定カロリメトリー (Microcal)
- PCR (Applied Biosystem, GeneAmp 9700)
- 円二色性分散計 (島津製作所, Model 202)

<分析超遠心で使したセルの組み立て方法>

- セルの部品 (<http://www.beckmancoulter.co.jp/product/product01/centerpiece.html>)

<分析超遠心のデータ解析に使したプログラム>

- SEDFIT (<http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>)
- SEDPHAT (<http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/sedphat.htm>)
- SEDNTERP (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>)
- HYDROPRO (<http://leonardo.fcu.um.es/macromol/programs/hydropro/hydropro.htm>)

<GST プルダウンアッセイに使したレジソ>

- Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare, 1mL)

<GST プルダウンアッセイのデータの数值化に使したプログラム>

- ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

<立体構造表示に使したプログラム>

- Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>)

<電気泳動>

- NuPAGE Bis-Tris 4-12% Gel (Invitrogen)
- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)

<ウェスタンブロッティング>

- MagicMarker Western Protein Standards (Invitrogen, LC5602)
- anti-His antibody (GE Healthcare, 27-4710-01)
- ECL goat anti-mouse IgG (GE Healthcare, NA931V)
- ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, RPN2106)
- 3MM the nitrocellulose membrane (Whatman)

第7章

ヌクレオソーム構造変換の分子機構の解明に向けた研究

7.1 アセチル化ヒストン H4 ペプチドを用いた競合実験

<目的>

DBD(CCG1)はアセチル化ヒストン H4 認識ドメインとして知られ、その結晶構造からアセチル化リジン結合部位およびその結合様式の詳細が明らかにされている⁽²³⁾。DBD(CCG1)の結合サイト 1 は CIA/ASF1(155)との結合表面だけでなく、アセチル化リジン結合部位としても利用されている (図 35)。アセチル化ヒストン H4 は CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体形成を阻害するのか、もしくは、安定化させるのか、その詳細は明らかにされていない。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体形成に与えるアセチル化ヒストン H4 の影響は、ヌクレオソーム構造変換の分子機構の解明の手がかりとなるはずである。そこで、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体に与えるアセチル化ヒストン H4 の影響について明らかにするために、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にアセチル化ヒストン H4 ペプチドを添加する競合実験を行う。

<実験方法>

50% スラリー glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l に対して 100 pmol GST-hCIA/ASF1(155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol) 内で 500 pmol の His-DBD(CCG1) (20 μ l)を 4°C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l) で 3 回洗浄した後、1000 pmol のモノ (Ac-Lys5, Lys8, Lys12, Lys16)-, ジ (Ac-Lys5/Lys12, Lys8/Lys16)-, テトラ (Ac-Lys5/Lys8/Lys12/Lys16)-アセチル化ヒストン H4 ペプチド (ペプチド研究所により合成) (10 μ l)を添加し、10 分間インキュベートする。上清を回収した後、GST レジンを GST pull-down assay buffer (250 μ l)で 3 回洗浄する。上清と沈殿に分けて SDS-PAGE を行い、GST-hCIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)、アセチル化ヒストン H4 ペプチド添加により遊離した His-DBD(CCG1)を抗 His タグ抗体で検出する。

<結果と考察>

アセチル化ヒストン H4 ペプチドを用いた競合実験の結果、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にアセチル化ヒストン H4 ペプチド添加することで DBD(CCG1)が CIA/ASF1(155)から解離せず、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体を保持していることが示された (図 57B レーン 3-9, 13-19)。この結果は、細胞内でヒストンの化学修飾がタンパク質間の相互作用を阻害するまでの影響を与えず、ヌクレオソーム上の単なる目印として機能していることを示唆している。

アセチル化ヒストン H4 ペプチドと CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)に対して競合的に相互作用していないことから、次に、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-アセチル化ヒストン H4 ペプチドによる 3 者複合体が形成されると予想される。

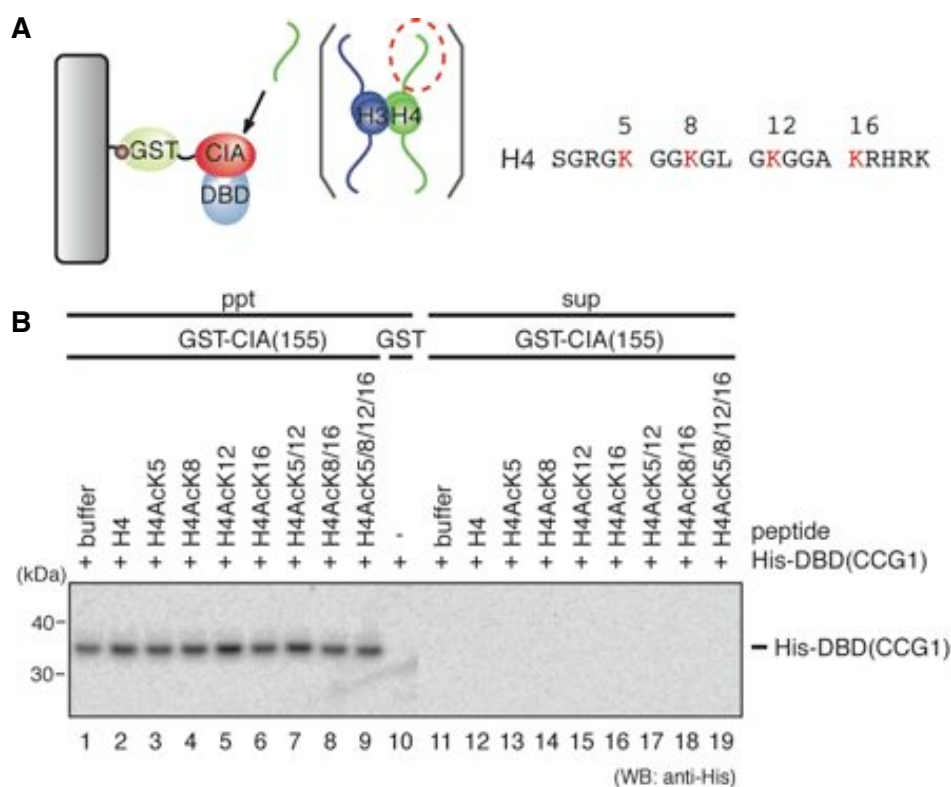


図 57. アセチル化ヒストン H4 ペプチドを用いた競合実験の結果

A) 競合実験の概要図と実験に使用したアセチル化ヒストン H4 ペプチドの配列。アセチル化サイトを赤色で示す。B) CIA/ASF1(155)に結合した His-DBD(CCG1) (ppt)とアセチル化ペプチド添加により遊離した His-DBD(CCG1) (sup) を抗 His タグ抗体で検出。

7.2 CIA/ASF(155)-DBD(CCG1)-アセチル化ヒストン H4 ペプチド複合体の形成

<目的>

7.1 の実験の結果、アセチル化ヒストン H4 ペプチドと CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1) に対して競合的に相互作用していないことから、次に、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-アセチル化ヒストン H4 ペプチドによる 3 者複合体が形成されると予想される。図 58 のように、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にはアセチル化リジンが結合可能な領域が存在している。CIA/ASF1、DBD(CCG1)、アセチル化ヒストン H4 ペプチド 3 者複合体を形成が示されれば、「DBD(CCG1)がアセチル化ヒストン H4 テイルに結合→DBD(CCG1)との相互作用により CIA/ASF1 が特定のプロモーター上にリクルートされる」という分子機構モデルを支持する結果となるだろうと考えられる。そこで、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-アセチル化ヒストン H4 ペプチドの 3 者複合体は形成されるかどうか明らかにするため、アセチル化ヒストン H4 ペプチド存在下で GST プルダウンアッセイを行う。

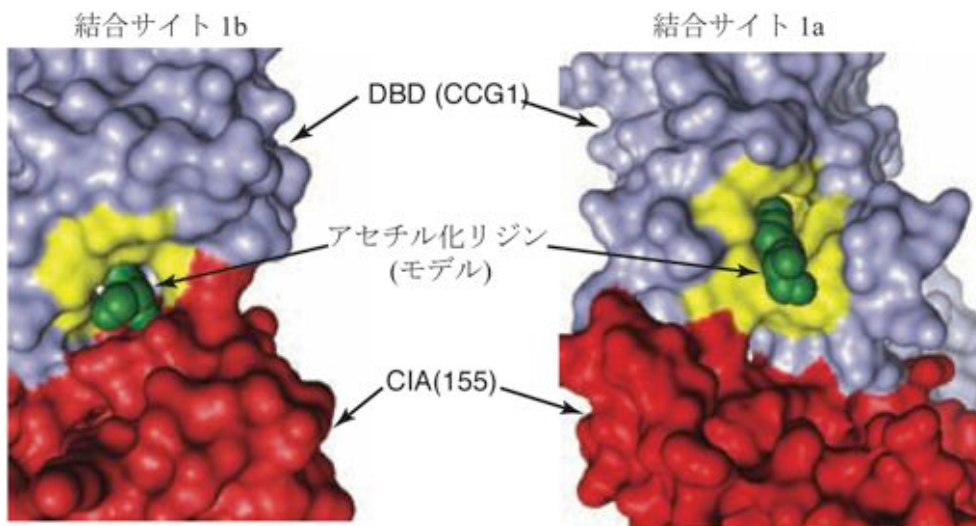


図 58. CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体へのアセチル化リジン結合モデル
DBD(CCG1) (青) の結合サイト 1a (右) と 1b (左)、CIA/ASF1(155) (赤色) を surface
で表示した。緑色のスティックモデルで表したアセチル化リジンは、 Gcn5-アセチ
ル化ヒストン H4 ペプチド複合体⁽⁴⁶⁾と DBD(CCG1)に重ね合わせることで表示した。

<実験方法>

500 pmol His-DBD(CCG1)と 500 pmol モノ-, ジ-, テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドを混合し、4°C で 20 分間インキュベートする。50% スラリー-glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 µl に対して 100 pmol GST-hCIA/ASF1(155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol)内で His-DBD(CCG1) (20 µl)とアセチル化ヒストン H4 ペプチド (5 µl)を 4°C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 µl)で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行う。その後、GST-CIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)を抗 His タグ抗体で検出し、His-DBD(CCG1)に特異的に結合したモノ-, テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドを抗アセチル化ヒストン H4 抗体で検出する。ジ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドに対する抗アセチル化ヒストン抗体は入手することができなかつたため、ジ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドを抗体で検出することができなかった。同時性を示す為に、実験は duplicate で行う。抗 His タグ抗体および抗アセチル化ヒストン H4 抗体を使ってタンパク質およびペプチドの局在を確認する。ネガティブコントロールとして GST を用いる。

<結果と考察>

GST プルダウンアッセイの結果、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドの 3 者複合体が形成されることが示された (図 59B, C)。一方、モノ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドは CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の DBD(CCG1)に結合することができなかつた (図 59C レーン 2-5)。さらに、テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチド添加依存的に、CIA/ASF1(155)に対する DBD(CCG1)の結合量が 2 倍近く増加していることも明らかになった。これは、テトラアセチル化ヒストンペプチド結合型の DBD(CCG1)が、テトラアセチル化ヒストンペプチド非結合型の DBD(CCG1)と比較して CIA/ASF1(155)と安定的に結合できることを示唆している。また、テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドによる CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の結合量の増加は、図 63C に示すようなテトラアセチル化ペプチドを介して 2 つの DBD(CCG1)が相互作用していると考えられることもできる。この詳細については、7.4 項で詳しく述べる。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチド複合体の形成は、我々の想定する「DBD(CCG1)がアセチル化ヒストン H4 テイルに結合→アセチル化ヒストン H4 に結合した DBD(CCG1)との相互作用を介して CIA/ASF1 が特定のプロモーター上にリクルートされる」という分子機構モデルを支持する結果であると考えられる。

ジ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドについては、ジ-アセチル化ペプチドに対する抗体を入手することができなかつたため、DBD(CCG1)との結合を確認することができなかつた。ジ-アセチル化ヒストン H4 ペプチド添加により CIA/ASF1(155)に対するDBD(CCG1)の結合量が変化していないことから、おそらくジ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドとDBD(CCG1)は結合していないと推察される(図 59C レーン 2-5)。以上の結果から、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドの3者複合体が形成され、その3者複合体形成には少なくとも4つリジン残基がアセチル化されたヒストン H4 が必要であることが示唆される(図 59A-C)。

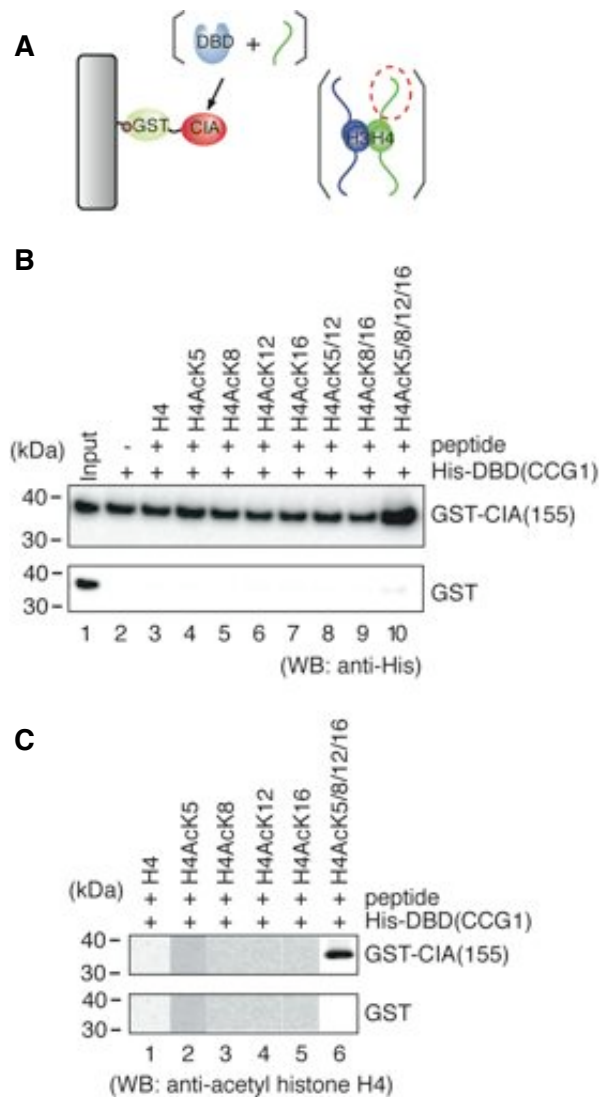


図 59. アセチル化ヒストン H4 ペプチド存在下での GST プルダウンアッセイの結果
A) 実験の概要図。B) GST-CIA/ASF(155)と His-DBD(CCG1)の結合を anti-His 抗体で検出した。C) His-DBD(CCG1)とペプチドの結合を anti-acetyl histone 抗体で検出した。

7.3 アセチル化ヒストン H4 ペプチド結合部位の特定

<目的>

7.2 の実験結果から、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドの 3 者複合体が形成されることが明らかになった。DBD(CCG1)にはアセチル化リジンが結合する分子表面はサイト 1a とサイト 1b の 2 通り考えられるが、7.2 の実験結果から、テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドと DBD(CCG1)の結合部位を特定できていない。これまでに Gcn5 のプロモドメインとアセチル化ヒストン H4 ペプチド複合体の結晶構造が決定され、その結合様式が明らかにされている⁽⁴⁶⁾ (図 60)。Ladurner らの解析では、Gcn5 Tyr364 に対応する Tyr を Phe に置換した点変異体を用いて相互作用解析を行い、プロモドメインとアセチル化ヒストン H4 との結合に Tyr が必須であることが示している⁽³¹⁾。DBD(CCG1)で Gcn5 Tyr364 に対応するアミノ酸残基は、Tyr1417 (サイト 1a)、Y1540 (サイト 1b) である。そこで、サイト 1a とサイト 1b のどちらの疎水ポケットを利用してテトラアセチル化ヒストン H4 ペプチドに結合しているかを明らかにするために、DBD(CCG1)の Tyr1417Phe (サイト 1a) と Tyr1540Phe (サイト 1b) 変異体を用いてアセチル化ヒストン H4 ペプチド存在下で GST プルダウンアッセイを行う。

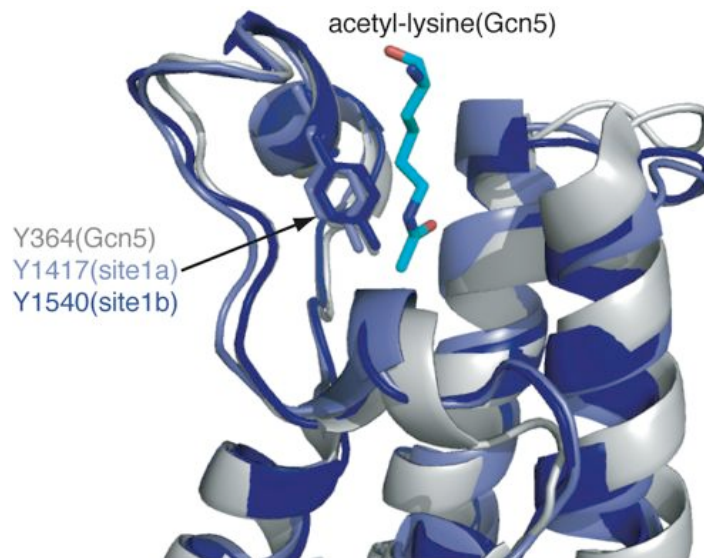


図 60. Gcn5 のプロモドメイン (シルバー) と DBD(CCG1)の各ドメイン (ドメイン I (薄い青)、ドメイン II (青)) の構造重ね合わせ
アセチル化ヒストン H4 ペプチドとの結合に必須な Tyr 残基をスティックモデルで示す。Gcn5 に結合したアセチル化リジン残基をシアン色のスティックモデルで示す。

<実験方法>

1. His-DBD(CCG1) Tyr1417Phe/Y1540Phe の精製

PCR 変異導入法により DBD(CCG1)発現プラスミド (6HisT-pET11d DBD(CCG1): 1342-1629)に変異を導入した。変異導入に使用したプライマーは表 8 に示す。培養から精製までは、2.6 の方法で行った。

表 8. DBD(CCG1)に変異を導入する際に使用したプライマー

DBD(CCG1)変異体		プライマー配列
Tyr1417Phe	Forward	TTCTACAAAATCATCACTCGGCC
	Reverse	GTCCTTTACAACCTTTGCATTGAC
Tyr1540Phe	Forward	TTTTACAAAGTGATTGTCAATCCAATGG
	Reverse	ATCTGGAACAAATTTCTTATTAAGTGGG

2. GST プルダウンアッセイ

500 pmol His-DBD(CCG1) WT/Tyr1417Phe/Tyr1540Phe と 500 pmol テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチドを混合し、20 分間インキュベートする。50%スラリー-glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l 対して 100 pmol GST-hCIA/ASF1(155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol) 内で 500 pmol の His-DBD(CCG1) (20 μ l)と 500 pmol テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチド (5 μ l)を 4 °C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l)で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行う。その後、GST-hCIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)を抗 His タグ抗体で検出し、His-DBD(CCG1)に特異的に結合したテトラアセチル化ヒストン H4 ペプチドを抗アセチル化ヒストン抗体で検出する。同時性を示す為に、実験は duplicate で行う。抗 His タグ抗体および抗アセチル化ヒストン抗体を使ってタンパク質およびペプチドの局在を確認する。ネガティブコントロールとして GST を用いる。

<実験結果および考察>

1. His-DBD(CCG1) Tyr1417Phe/Y1540Phe の精製

精製した His-DBD(CCG1) WT/Tyr1417Phe/Y1540Phe の SDS-PAGE を図 61 に示す。高純度で十分なタンパク質量が回収できた。

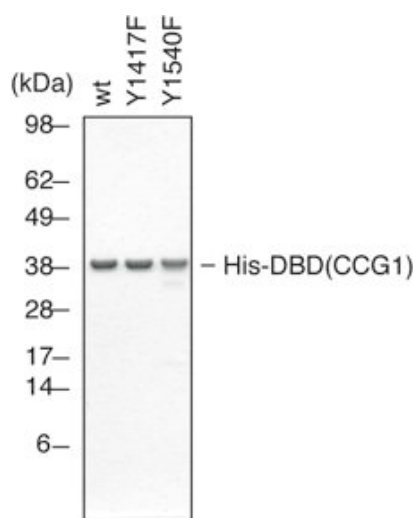


図 61. His-DBD(CCG1) WT/Tyr1417Phe/Y1540Phe の SDS-PAGE

2. GST プルダウンアッセイ

GST プルダウンアッセイの結果、DBD(CCG1) Tyr1417Phe (サイト 1a) と Tyr1540Phe (サイト 1b) 変異体では、テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチドとの結合量には顕著な差がみられた。DBD(CCG1) Tyr1417Phe (サイト 1a) 変異体では、テトラアセチル化ペプチドとの相互作用がわずかに減少している (図 62 下段 レーン 3)。その一方で、DBD(CCG1) Tyr1540Phe (サイト 1b) 変異体では、テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチドとの相互作用が完全に消滅することが明らかになった (図 62 下段 レーン 4)。以上の結果から、DBD(CCG1)の各ドメインにテトラ-アセチル化リジンペプチドが結合していると考えられる。また、DBD(CCG1)の各ドメインにおけるテトラ-アセチル化ペプチドの結合様式は大きく異なっていることが示唆される。 Jacobson らの解析では、DBD(CCG1)とアセチル化ヒストン H4 ペプチドは、7つのアミノ酸残基分離したジアセチル化ヒストン H4 ペプチド (Ac-Lys5/Lys12)との結合親和性が最も強いことが明らかになっており、この2つのアセチル化されたリジン残基の距離は、DBD(CCG1)の2つ

の疎水ポケット間の距離である 25 Å に一致している。このことから、DBD(CCG1)単量体はジ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドと 1 つの疎水ポケットにつき 1 つのアセチル化リジンと相互作用していると考えられる (図 63A)。しかしながら、CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)の結合サイト 1 で複合体を形成することで、DBD(CCG1)単量体とは同じように結合できなくなり、DBD(CCG1)の各疎水ポケットに 1 つのテトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドが結合するのではないかと考えられる (図 63B)。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体における DBD(CCG1)のアセチル化ヒストン H4 ペプチドがどのように結合しているのかを明らかにするには、今後、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-アセチル化ヒストン H4 複合体の立体構造を決定する必要があると考えられる。

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にアセチル化リジンを重ね合わせたモデルでは、サイト 1b にアセチル化リジンが結合する十分な領域が存在しないため、サイト 1b でアセチル化リジンが結合するには DBD(CCG1)の構造変換が必要になるかもしれない (図 58)。また、テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチド依存的に CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の結合量が増加すること、両者の結合には少なくとも 4 つのリジン残基がアセチル化されたヒストン H4 が必要であること、DBD(CCG1)の各ドメインにアセチル化ヒストン H4 ペプチドが結合していることを考え合わせると、DBD(CCG1)とアセチル化ヒストン H4 ペプチドの結合は、図 63C に示すような結合様式を持っていることが示唆される。

今回の実験条件では、DBD(CCG1)が非特異的にレジンを吸着するため、ネガティブコントロールをとることができなかった (図 62 下段 レーン 5)。詳細な解析を進めるためには、GST プルダウンアッセイ以外の実験手法で行う必要がある。

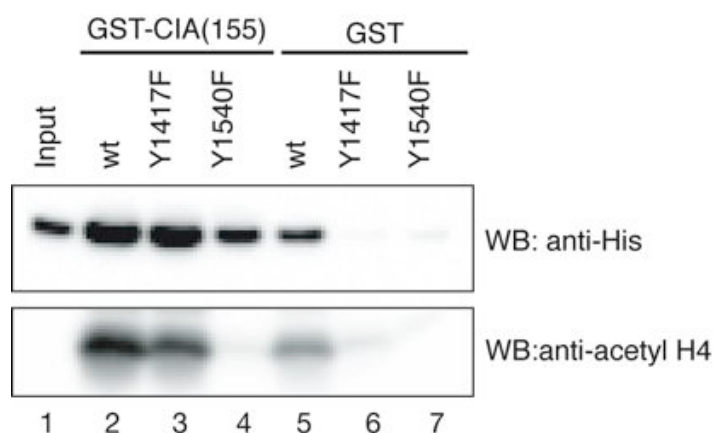


図 62. DBD(CCG1) Tyr1417Phe, Tyr1540Phe 変異体を用いたアセチル化ヒストン H4 ペプチド存在下での GST プルダウンアッセイの結果

各ドメインに変異を導入することで、DBD(CCG1)とテトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドとの結合量が減少していることから、各ドメインにテトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドが結合していることが示唆される。各ドメインにおけるテトラ-アセチル化ペプチド H4 の結合量に違いが見られることから、各ドメインにおける両者の結合様式が異なっていることが示唆される。

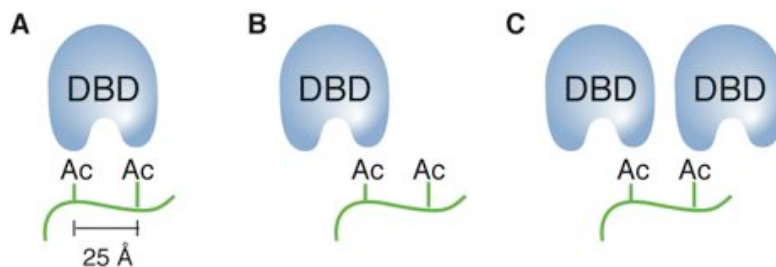


図 63. DBD(CCG1)とアセチル化ペプチドの予想される結合様式

A) DBD(CCG1)の結晶構造と DBD(CCG1)とアセチル化ヒストン H4 ペプチドを用いた ITC による相互作用解析の結果から推測される DBD(CCG1)とアセチル化ヒストン H4 ペプチドとの結合様式。 B, C) 上記の実験結果から推測される CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体における DBD(CCG1)のアセチル化ヒストン H4 ペプチドの結合様式。 CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体におけるテトラアセチル化ヒストン H4 の結合状態を明らかにするためには、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチド複合体の立体構造を決定する必要があると考えられる。

7.4 アセチル化ヒストン H4 ペプチドを介した DBD(CCG1)の自己会合

<目的>

7.2, 7.3 の実験の結果、図 63C のようにテトラ-アセチル化ペプチドを介して 2 つの DBD(CCG1)が相互作用している可能性が示された。そこで、まず DBD(CCG1)が自己会合するのか明らかにするため、Blue Native-PAGE を行う。その後、テトラ-アセチル化ペプチドを介して DBD(CCG1)同士が結合するかどうか明らかにするために、GST プルダウンアッセイを行う。

<実験方法>

1. Blue Native-PAGE

通常のDavis系によるNative-PAGEでは、塩基性タンパク質である DBD(CCG1)は泳動されないため、Blue Native-PAGE (Invitrogen)を行った。2.3の方法でDBD(CCG1)を精製した。精製したDBD(CCG1)をNative-PAGEサンプルバッファーで溶解する。塩濃度は50 mM以下に抑え、溶解性を上げるためにDMMを添加した。調製したサンプルにCoomassie G-250を添加し、NativePAGE 4~12% ビストリスゲルに添加する。150 V 定電圧条件下で1次元電気泳動を行う。1次元電気泳動が終了した後、1次元泳動後のゲルの8番目のレーンを切り出し、2次元電気泳動を行った。

2. GST プルダウンアッセイ

500 pmol His-DBD(CCG1)と 100, 250, 500, 1000 pmol テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチドを混合し、20 分間インキュベートする。50%スラリー-glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l 対して 100 pmol GST-DBD(CCG1)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1 % NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol)内で 500 pmol の His-DBD(CCG1)と 500 pmol テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチド (10 μ l)を 4 °C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l)で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行う。その後、GST-DBD(CCG1)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)を抗 His タグ抗体で検出する。ネガティブコントロールとして GST を用いる。

1. Blue Native-PAGE の結果および考察

1次元電気泳動の結果、DBD(CCG1)の濃度の増加に伴ってラダー状の泳動像が検出された(図 64A レーン 2-9)。図 64A レーン 8 のゲル(赤枠)を切り出し、2次元電気泳動を行った結果、ラダー状のバンドは、DBD(CCG1)で構成されていることがわかった。これらの結果は、DBD(CCG1)同士が自己会合していることを強く示唆している。Blue Native-PAGE の条件下では、DBD(CCG1)が 12.5 μ M (0.5 mg/ml)より高い濃度でDBD(CCG1)が自己会合することがわかった(図 64A, B)。このようなDBD(CCG1)の自己会合は、これまでGSTプルダウンアッセイの実験でGSTレジンへの非特異的な吸着が多くみられた要因の一つではないかと考えられる。これは、微量でもDBD(CCG1)がGSTレジンに吸着してしまうと、そのDBD(CCG1)に新たなDBD(CCG1)が結合することで多くのDBD(CCG1)がGSTレジン上に集合してしまうと考えられる。

また、DBD(CCG1)の自己会合を好意的に解釈すると、アセチル化ヒストンの領域にDBD(CCG1)が一度結合すると、DBD(CCG1)同士の相互作用によりアセチル化ヌクレオソーム上に多くのDBD(CCG1)が集合することでヌクレオソームの構造変化を促し、ヌクレオソーム鋳型からの転写反応を活性化するのではないかと考えることができる。

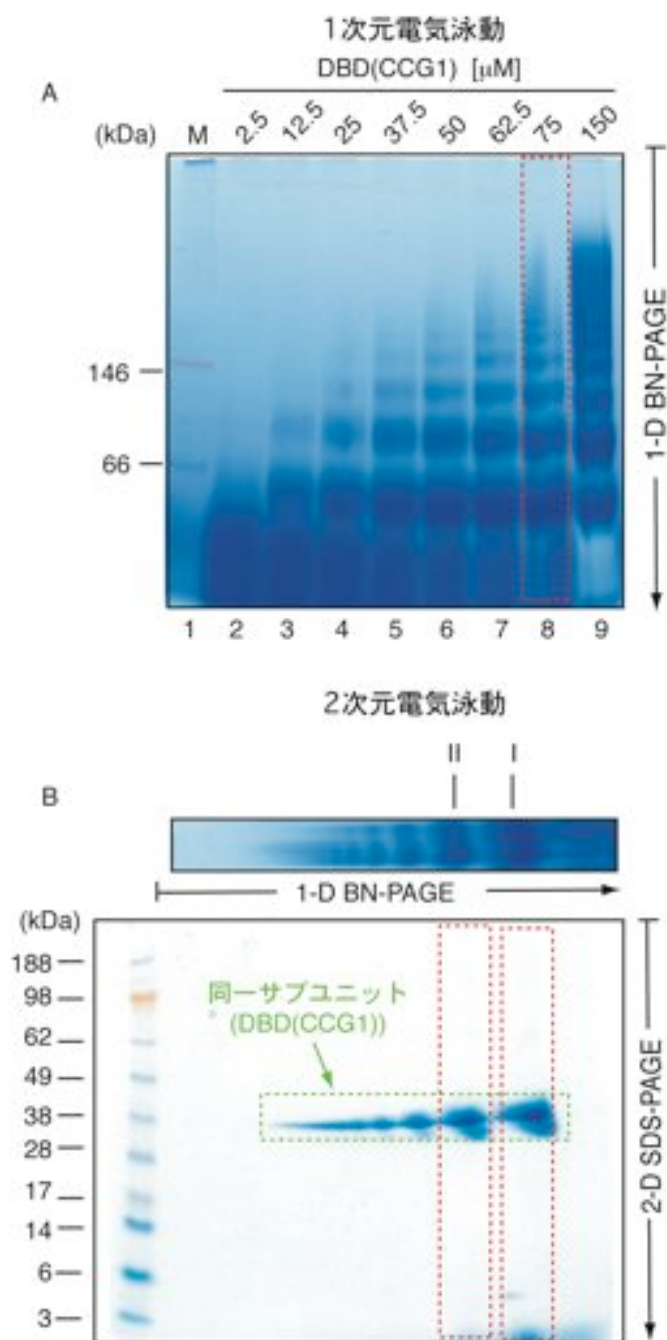


図 64. Blue Native-PAGE を用いた DBD(CCG1)の分子量分析

A) 1次元電気泳動 DBD(CCG1)が 12.5 μM (0.5 mg/ml)より高い濃度でラダー上のバンドが観測された。B) 2次元電気泳動 ラダーバンドを DBD(CCG1)のみで構成されることから、DBD(CCG1)が自己会合していることが示唆される。

前述のように、ヌクレオソーム上での DBD(CCG1)の自己会合を考える上では、アセチル化ヒストンを介して DBD(CCG1)が結合する必要があると思われる。また、アセチル化ヒストンを介して DBD(CCG1)が結合することが示されれば、DBD(CCG1)とアセチル化ヒストン H4 との結合様式を考える上で有用な知見を与えてくれると考えられる。そこで、テトラ-アセチル化ヒストンペプチドを介して DBD(CCG1)同士が相互作用するかどうか明らかにするために、GST プルダウンアッセイを行う。

2. GST プルダウンアッセイの結果および考察

GST プルダウンアッセイの結果、GST-DBD(CCG1)と His-DBD(CCG1)が特異的に結合することが示された (図 65B 上段 レーン 2)。これは、Blue Native-PAGE の結果を強く示唆する結果であるが、その相互作用は非常に弱いと示唆される。さらに、テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチド添加依存的に GST-DBD(CCG1)に対する His-DBD(CCG1)の結合量が増加することが示された (図 65B 上段 レーン 8-11)。この結果は、アセチル化ヒストン H4 ペプチドを介して 2 つの His-DBD(CCG1)が結合し、図 63C のような結合様式をもつことが示唆される。テトラアセチル化ヒストン H4 ペプチドを介して DBD(CCG1)同士が相互作用することから、細胞内でアセチル化されたヌクレオソーム領域での DBD(CCG1)の効率的な集合が転写反応を活性化させる上で重要な役割を担っているのではないかと推測される。しかしながら、DBD(CCG1)とテトラアセチル化ヒストン H4 ペプチドとの結合様式については不明な点が多く、現段階では解釈が非常に難しい。今後、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)-テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチド複合体の結晶構造を決定することでその結合様式は明らかになると考えられる。今回の実験条件では、His-DBD(CCG1)が非特異的に GST レジンに吸着してしまい、ネガティブコントロールをとることができなかつ (図 65B 下段 レーン 8-11)。詳細な解析を進めるためには、GST プルダウンアッセイ以外の実験手法で行う必要があると考えられる。

Blue Native-PAGE と GST プルダウンアッセイの結果から DBD(CCG1)が自己会合することが明らかになったが、タグなどを付加していない天然状態の DBD(CCG1)は、DBD(CCG1)単量体として溶液中で存在していると考えられる。これは、6.5.1 の分析超遠心 136 μ M の濃度で DBD(CCG1)の単量体として存在していることがわかっている。溶液中では DBD(CCG1)の単量体として存在しているが、Blue Native-PAGE や GST プルダウンアッセイなどの特殊な条件下では、DBD(CCG1)の自己会合が起りやすくなると考えられる。

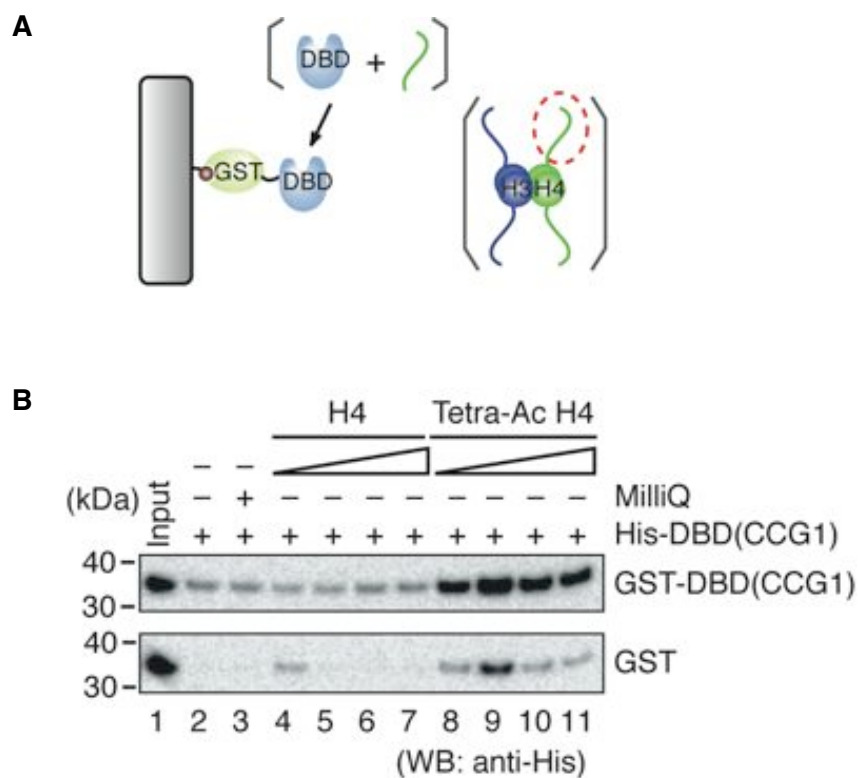


図 65. アセチル化ヒストン H4 ペプチド存在下での GST プルダウンアッセイの結果
 A) 実験の概要図。B) GST プルダウンアッセイの結果。Blue Native-PAGE の結果と同様、DBD(CCG1)同士が結合している。また、テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドの添加量依存的に DBD(CCG1)同士の結合量が増加することから、テトラ-アセチル化ヒストン H4 ペプチドを介して、DBD(CCG1)同士が結合していると考えられる。しかしながら、今回の実験条件では、His-DBD(CCG1)の GST レジンへの非特異的に吸着することから、ネガティブコントロールをとることができなかった。

7.4 ヒストン (H3-H4)₂ を用いた競合実験

<目的>

DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた CIA/ASF1 は次にヒストン H3-H4 を標的とし、ヌクレオソーム構造を破壊することが考えられる。我々が決定した CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体と CIA/ASF1-ヒストン H3-H4 複合体の CIA/ASF1 分子で構造重ね合わせを行うと、立体障害のため DBD(CCG1)とヒストン H3-H4 が CIA/ASF1 に対して競合的に相互作用することが予想される (図 66)。そこで、3 者の相互作用の関連性を明らかにするため、CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン (H3-H4)₂ を用いた競合的相互作用実験を行う必要がある。まず、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にヒストン(H3-H4)₂を添加する競合実験を行う。

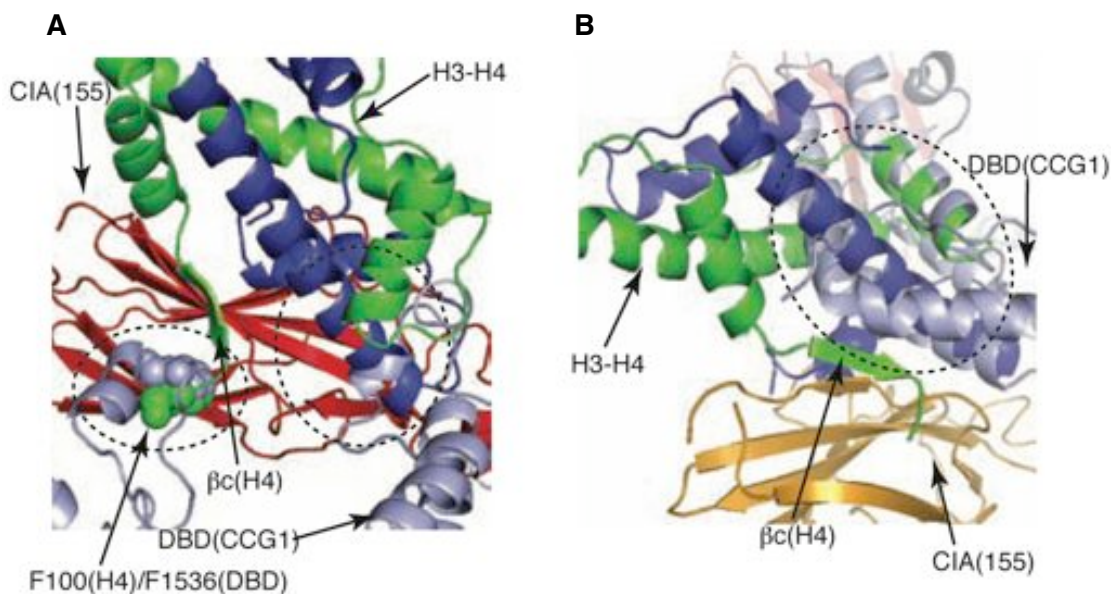


図 66. CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体に与えるヒストン H3-H4 の影響

点線で示した領域が立体障害を起こしていると考えられる。

A) 結合サイト1のCIA/ASF1とCIA/ASF1-H3-H4複合体のCIA/ASF1を重ね合わせ。

B) 結合サイト2のCIA/ASF1とCIA/ASF1-H3-H4複合体のCIA/ASF1を重ね合わせ。

<実験方法>

50% スラリー glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l に対して 100 pmol GST-hCIA/ASF1(155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol) 内で 500 pmol の His-DBD(CCG1) (20 μ l)を 4 °C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l) で 3 回洗浄した後、0, 100, 250, 500 pmol のヒストン(H3-H4)₂ 野生型もしくは (H3_{L126A/I130A}-H4_{F100A}) 変異体 (10 μ l)を添加し、10 分間インキュベートする。上清を回収した後、GST レジンを GST pull-down assay buffer (250 μ l)で 3 回洗浄する。上清と沈殿に分けて SDS-PAGE を行い、GST-hCIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1)、ヒストン H3-H4 野生型/変異体 添加依存的に遊離した DBD(CCG1)を抗ヒスタグ抗体で検出する。

<結果と考察>

競合実験の結果、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にヒストン(H3-H4)₂ 添加することで DBD(CCG1)が CIA/ASF1(155)から解離し、CIA/ASF1(155)はヒストン H3-H4 と複合体を形成することが示された (図 67B 上段 レーン 8-11)。しかしその一方で、ヒストン H3-H4 の 3 重変異体を用いて競合実験では、ヒストン H3-H4 の 3 重変異体の添加することで DBD(CCG1)が CIA/ASF1(155)から解離せず、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の多くが保持されていることが示された (図 67B 下段 レーン 8-11)。この結果から、ヒストン H3 の $\alpha 2$ および $\alpha 3$ のヘリックスとヒストン H4 の C 末端領域が、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体との競合的相互作用に重要であることが明らかになった。これらの結果は、図 66 の CIA/ASF1(155)の重ね合わせから予測された立体障害となる領域と非常によく一致している。また、結合サイト 1 における CIA/ASF1(155)は、ヒストン H3-H4 との相互作用に関わるアミノ酸残基が DBD(CCG1)との相互作用に関与しておらず、それらのアミノ酸残基は 90%近く溶媒中に露出していることから、CIA/ASF1(155)は大きな構造変化を伴うことなく容易にヒストン H3-H4 と複合体を形成できると考えられる (図 68A, 表 9)。しかしながら、結合サイト 2 の CIA/ASF1(155)は、ヒストン H3-H4 との結合に関わるアミノ酸残基が DBD(CCG1)との結合に関与しており、ヒストン H3-H4 と複合体を形成することが困難であることが予想される (図 68B, 表 9)。つまり、図 68 の実験で観測された CIA/ASF1(155)の DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 への転移は、主に結合サイト 1 の CIA/ASF1(155)が関与しているものと考えられる。

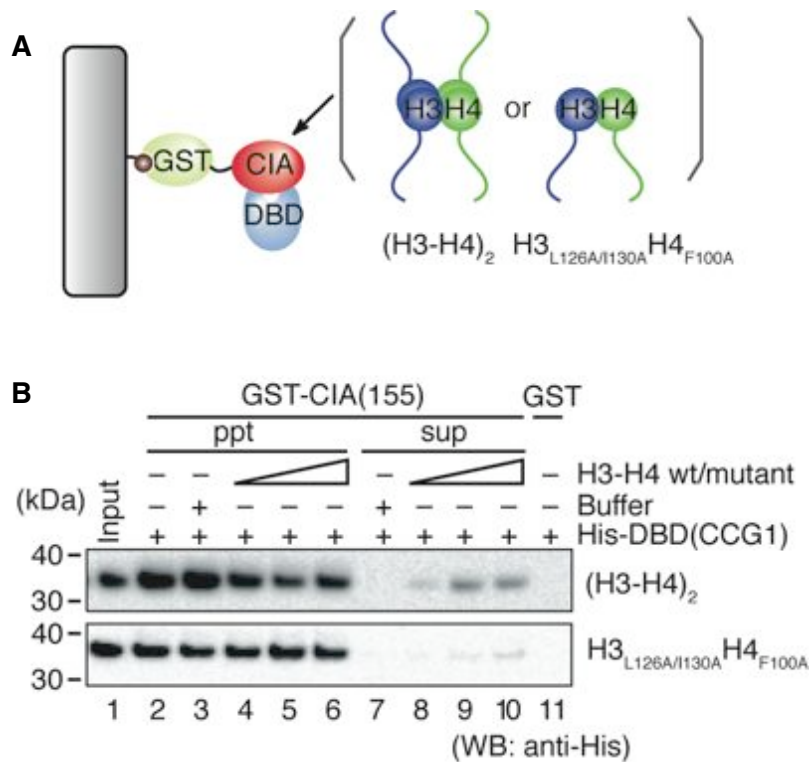


図 67. ヒストン(H3-H4)₂ 野生型/変異体を用いた競合的相互作用解析の結果
 A) 実験の概要図 B) 競合実験の結果。ヒストンH3-H4の3重変異体は、ヒストン(H3-H4)₂ 四量体形成を阻害するとともに、CIA/ASF1(155)と相互作用できない変異体である。ヒストン(H3-H4) 野生型では、レーン2に示すDBD(CCG1)の量を100%と定義した場合、レーン10では約20%のDBD(CCG1)が上清に遊離している。一方、ヒストンH3-H4の3重変異体ではCIA/ASF1(155)から解離するDBD(CCG1)の量は劇的に減少している。

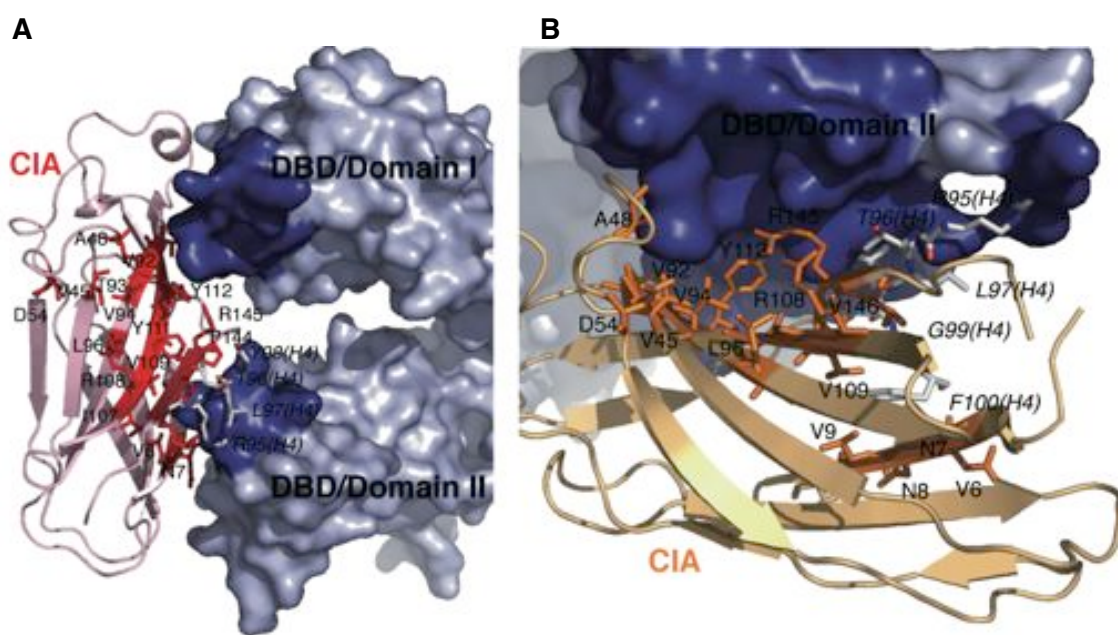


図 68. ヒストン H3-H4 との相互作用に関わる CIA/ASF1 のアミノ酸残基
 ヒストン H3-H4 との相互作用に関わる CIA/ASF1 のアミノ酸残基を赤色 (サイト 1) とオレンジ色 (サイト 2) のスティックモデルで示す。結合サイト 1 では、CIA/ASF1(155)のヒストン H3-H4 との結合表面が露出されている。しかしながら、結合サイト 2 では、CIA/ASF1(155)のヒストン H3-H4 との相互作用表面が DBD(CCG1)と CIA/ASF1(155)の相互作用表面で埋没している。

1) ヒストン H3 との結合に関与するアミノ酸残基の溶媒露出面積

Residue	CIA (free) [†] (Å ²)		CIA-H3-H4 (Å ²)		CIA-DBD site 1 (Å ²)		CIA-DBD site 2 (Å ²)	
Val45	28.33	(1.00) [§]	0.00	(0.00)	35.50	(1.25)	19.10	(0.67)
Ala48	85.80	(1.00)	0.60	(0.01)	94.40	(1.10)	28.70	(0.33)
Asp54	43.47	(1.00)	33.70	(0.78)	45.20	(1.04)	40.40	(0.93)
Val92	89.27	(1.00)	15.20	(0.17)	21.80	(0.24)	40.30	(0.45)
Val94	27.20	(1.00)	0.00	(0.00)	31.10	(1.14)	10.20	(0.38)
Leu96	16.33	(1.00)	0.00	(0.00)	15.50	(0.95)	16.40	(1.00)
Arg108	80.90	(1.00)	1.70	(0.02)	99.10	(1.22)	60.70	(0.75)
Tyr112	80.13	(1.00)	1.70	(0.02)	47.80	(0.60)	1.50	(0.02)
Asn114	35.13	(1.00)	1.20	(0.03)	8.60	(0.24)	27.10	(0.77)
Asn138	48.33	(1.00)	28.50	(0.59)	59.70	(1.24)	36.90	(0.76)
Arg145	128.73	(1.00)	10.90	(0.08)	128.80	(1.00)	26.00	(0.20)
Thr147	59.80	(1.00)	2.50	(0.04)	70.50	(1.18)	43.40	(0.73)
Sum (Average)	723.43	(1.00)	96.00	(0.13)	658.00	(0.91)	350.70	(0.49)

2) ヒストン H4 との結合に関与するアミノ酸残基の溶媒露出面積

Residue	CIA (free) [†] (Å ²)		CIA-H3-H4 (Å ²)		CIA-DBD site 1 (Å ²)		CIA-DBD site 2 (Å ²)	
Val45	6.57	(1.00) [§]	0.00	(0.00)	4.50	(0.69)	0.80	(0.12)
Ala48	27.87	(1.00)	0.00	(0.00)	30.60	(1.10)	18.70	(0.67)
Asp54	3.03	(1.00)	0.00	(0.00)	3.30	(1.09)	2.10	(0.69)
Val92	20.97	(1.00)	2.60	(0.12)	20.10	(0.96)	17.60	(0.84)
Sum (Average)	58.43	(1.00)	2.60	(0.03)	58.50	(0.96)	39.20	(0.58)

表 9. CIA/ASF1 のヒストン H3-H4 結合残基の溶媒露出面積の比較

† CIA/ASF1 の溶媒露出面積は、CIA/ASF-histone-H3-H4 複合体と CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の3つの CIA/ASF1 の平均値である。

7.5 DBD(CCG1)を用いた競合実験

7.4 の結果から、ヒストン H3-H4 と DBD(CCG1)が CIA/ASF1(155)に対して競合的に相互作用し、CIA/ASF1(155)が DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 へ受け渡されることから、7.4 の結果は我々のモデルを強く支持していると考えられる。さらにこのモデルを裏付けるためには、CIA/ASF1(155)の DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 への転移が不可逆的に進行することを証明する必要がある。そこで、次に7.4の逆過程が起こるのかどうか明らかにするため、CIA/ASF1-ヒストン (H3-H4)₂複合体にDBD(CCG1)を添加する競合実験を行う。

<実験方法>

50% スラリー glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l に対して 100 pmol GST-hCIA/ASF1(155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM MES pH 5.6, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 50 mM 2-mercaptoethanol)内で 100 pmol のヒストン H3-H4 (20 μ l)を結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l)で3回洗浄した後、0, 100, 250, 500 pmol DBD(CCG1) (10 μ l)を添加し、10 分間インキュベートする。GST pull-down assay buffer (250 μ l)で3回洗浄した後、上清と沈殿に分けて SDS-PAGE を行い、GST-hCIA/ASF1(155)に特異的に結合した His-DBD(CCG1) およびヒストン H3-H4、DBD(CCG1)添加により遊離したヒストン H3-H4 を CBB で検出する。

<結果と考察>

競合実験の結果、CIA/ASF1(155)-ヒストン H3-H4 複合体に DBD(CCG1)を添加することでヒストン H3-H4 が CIA/ASF1(155)から解離せず、CIA/ASF1(155)-ヒストン H3-H4 複合体が保持されていることが示された (図 69B レーン 7-9)。従って、DBD(CCG1) とヒストン H3-H4 は CIA/ASF1(155)に対して競合的に相互作用し、CIA/ASF1(155)の DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 への変化は不可逆的に進行することが明らかになった (図 69B レーン 3-9)。これらの結果は、DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた CIA/ASF1 が DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 へと受け渡され、ヌクレオソームを破壊するという分子機構モデルを強く支持していると考えられる。

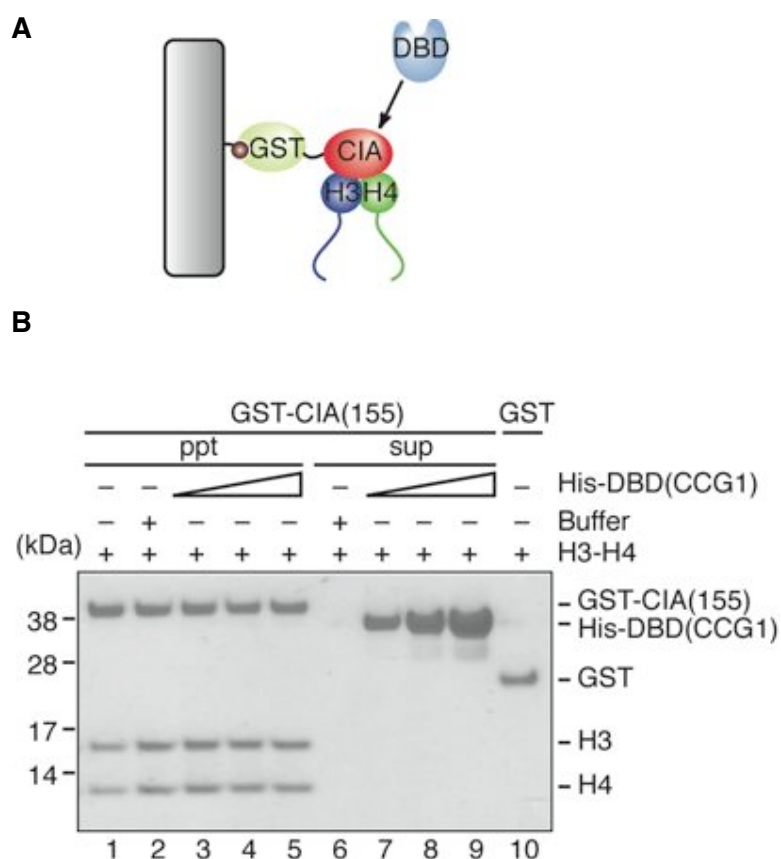


図 69. CIA/ASF1-ヒストン H3-H4 複合体に与える DBD(CCG1)の影響
A) 実験の概要図 B) DBD(CCG1)を用いた競合的相互作用解析の結果

<使用機器>

- 小型遠心機: MX-300 (TOMY)
- ローター: AR500-04 (TOMY), AR015-24 (TOMY)
- 限外ろ過フィルター: Amicon Ultra 15 (Millipore)
- 分光光度計: DU 640 SPECTROPHOTOMETER (Beckman Coulter)
- PCR (Applied Biosystem, GeneAmp 9700)

<GST プルダウンアッセイに使用したレジン>

- Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare)

<立体構造 表示に使用したプログラム>

- Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>)

<電気泳動>

- NuPAGE Bis-Tris 4-12% Gel (Invitrogen)
- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)

<ウェスタンブロッティング>

- MagicMarker Western Protein Standards (Invitrogen, LC5602)
- anti-His antibody (GE Healthcare, 27-4710-01)
- ECL goat anti-mouse IgG (GE Healthcare, NA931V)
- ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, RPN2106)
- 3MM the nitrocellulose membrane (Whatman)
- anti-histone H4 antibody (Upstate Cat: 07-108)
- anti-acetyl-histone H4 antibody (Lys5; Upstate Cat: 06-759)
- anti-acetyl-histone H4 antibody (Lys8; Upstate Cat: 06-760)
- anti-acetyl-histone H4 antibody (Lys12; Upstate Cat: 06-761)
- anti-acetyl-histone H4 antibody (Lys16; Upstate Cat: 06-762)
- anti-acetyl-histone H4 antibody (Lys5/8/12/16; Upstate Cat: 06-866)
- HRP goat anti-rabbit IgG (H+L) DS grade (Zymed, Cat: 65-6120)

<ペプチド>

ヒストン H4 N 末の 20 アミノ酸残基の領域を合成し、各リジン残基にアセチル化修飾させた。

- histone H4 peptide (ペプチド研究所受託合成; AE-593, Lot 910-708271)
- acetyl-histone H4 peptide (ペプチド研究所受託合成; Lys5, AE-603, Lot 220-709121)
- acetyl-histone H4 peptide (ペプチド研究所受託合成; Lys8, AE-604, Lot 750-709111)
- acetyl-histone H4 peptide (ペプチド研究所受託合成; Lys12, AE-605, Lot 750-709101)
- acetyl-histone H4 peptide (ペプチド研究所受託合成; Lys16, AE-606, Lot 750-709061)
- acetyl-histone H4 peptide (ペプチド研究所受託合成; Lys5/12, AE-594, Lot 910-708272)
- acetyl-histone H4 peptide (ペプチド研究所受託合成; Lys8/16, AE-595, Lot 750-708282)
- acetyl-histone H4 peptide (ペプチド研究所受託合成; Lys5/8/12/16, AE-596, Lot 750-708281)
- acetyl-histone H4 peptide (Upstate; Lys5/Lys 8/Lys 12/Lys 16, Cat: 12-353)

< Blue Native-PAGE 電気泳動 >

1 次元電気泳動

- NativeMark Unstained Protein Standard (Invitrogen)
- NativePAGE Sample Buffer (4X) (Invitrogen)
- 10% DDM (n-dodecyl- β -D-maltoside) (Invitrogen)
- NativePAGE 5% G-250 Sample Additive (Invitrogen)
- Native PAGE 4-12% Bis-Tris Gel 10well (Invitrogen)

2 次元電気泳動

- NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen)
- NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)
- NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel with IPG-well (Invitrogen)
- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- Ethanol

< 溶媒露出面積の計算に使用したプログラム >

- Surface (CCP4)

第 8 章

細胞内における **Cia1p/Asf1p** と **Bdf1p** の関連性

8.1 酵母株を用いた Spt(-) 表現型解析 (共同研究)

共同研究を進めている堀越研では、これまでに Spt(-) 表現型解析を用いて酵母 Cia1p/Asf1p と Bdf1p, Bdf2p が遺伝学的に相互作用することを明らかにしている⁽⁹⁾。そこで、Cia1p/Asf1p と Bdf1p/Bdf2p が結合サイト 1 と 2 の分子表面を利用して細胞内で機能的な相互作用をしているかどうか明らかにするため、変異体を用いた Spt(-) 表現型解析が行われた。Bdf1p, Bdf2p の変異導入部位は、図 70 および表 10 をもとに決定した。

<結果および考察>

Bdf1p 点変異体を用いた Spt 表現型解析の結果、結合サイト 1 (Tyr338Ala, Val347Ala, Asn350Ala, Val403Ala) と結合サイト 2 (Thr216Ala, Asn423Ala) の点変異体が Spt(-) 表現型を示した。結合サイト 1 と結合サイト 2 が細胞内で機能的な分子表面であることが示された(図 71F-H)。しかしながら、Spt(-) 表現型を示したアミノ酸残基が Cia1p/Asf1p との相互作用に重要であるかどうか現段階ではわからない。

次に、Spt(-) 表現型を強く示す Cia1p/Asf1p Y112A 変異株に Bdf2 の点変異体を過剰発現させる抑圧実験が行われた。抑圧実験の結果、Bdf2 の野生株では Cia1p/Asf1p による Spt(-) 表現型が抑圧されるが、Bdf2 の Leu354Ala (結合サイト 1)、Val408Ala (結合サイト 1) 点変異株では Spt(-) 表現型が抑圧されないことから、結合サイト 1 が Cia1p/Asf1p と Bdf2 との相互作用に利用されていると考えられる (図 71C-E)。

以上の結果から、Bdf1p/Bdf2p と Cia1p/Asf1p は、結合サイト 1 で機能的な相互作用していることが示唆される。

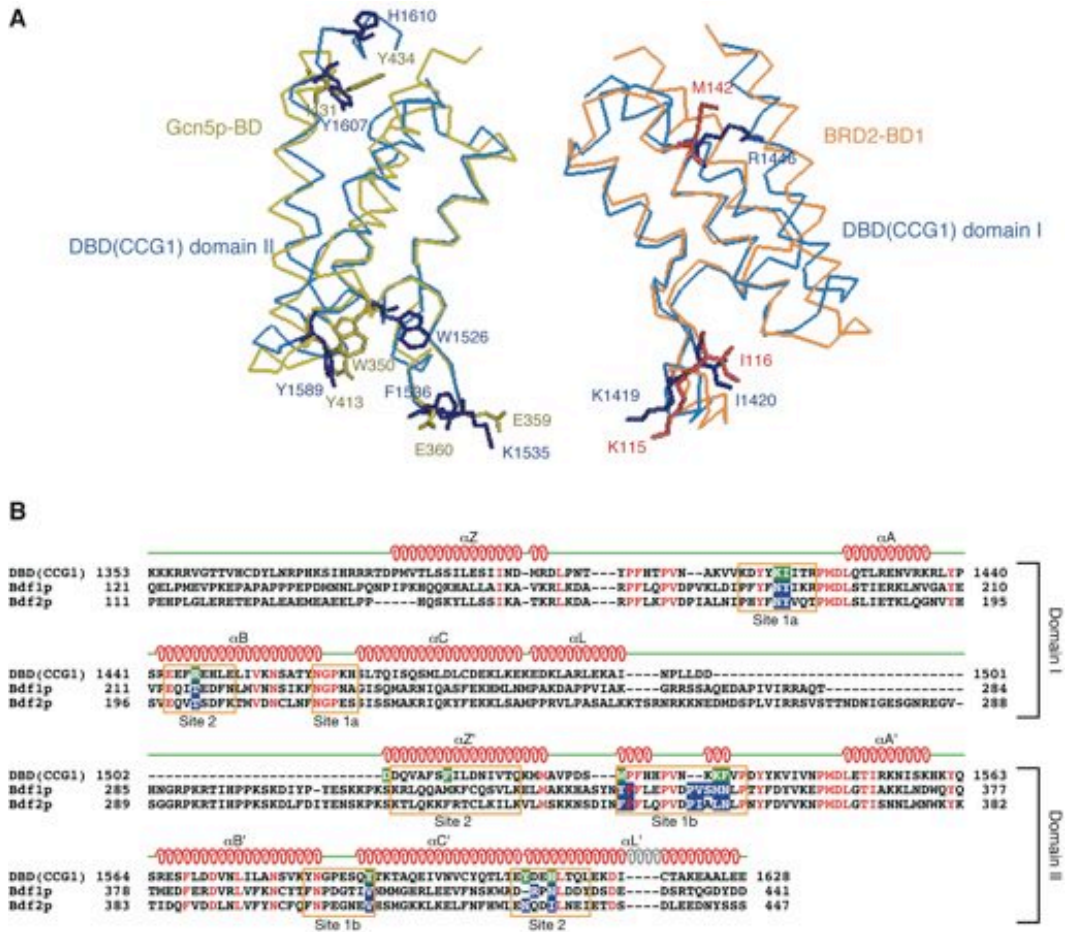


図 70. DBD(CCG1), Bdf1p, Bdf2p のアミノ酸シーケンスアライメント

A) Gcn5 (黄色)⁽⁴⁶⁾と DBD(CCG1)のドメイン2 (青)の構造重ね合わせ (左パネル)。BRD2 (オレンジ)⁽⁴²⁾と DBD(CCG1)のドメイン1の構造重ね合わせ (右パネル)。B) 立体構造に基づいたアミノ酸シーケンスアライメントの結果。完全に保存されたアミノ酸残基を赤色で示す。相互作用解析 (図 74) や遺伝学的解析 (図 71) で変異を導入したアミノ酸残基は、緑、青で示す。CIA/ASF1 に結合するサイトをオレンジ色の枠で囲む。DBD(CCG1)の2次構造やヘリックスの名称はアミノ酸配列の上部に示す。

GST プルダウンアッセイや Spt 表現型解析で変異を導入したアミノ酸残基の対応表

DBD(CCG1)	Bdf1p	Bdf2p
K1419	N189	N174
I1420	Y190	Y175
	N189/Y190	N174/Y175
R1446 [†]	T216	T201
D1502 [†]	?	?
F1509	?	?
W1526	Y338	F343
	P339	P344
	Y338/P339	F343/P344
K1535	P346	P351
F1536	V347	I352
	S348	(A353)
	M349	L354
	N350	N355
	M349/N350	L354/N355
Y1589	V403	V408
Y1607	R421	N426
H1610	N423	I429
	R421/N423	N426/I429

表 10. DBD(CCG1), Bdf1p, Bdf2p のアミノ酸残基の対応表

立体構造に基づいたアミノ酸残基のシーケンスアライメントの結果、DBD(CCG1)のアミノ酸残基に対応する Bdf1p/Bdf2p のアミノ酸残基を表示した。

* 相互作用解析 (図 74) と遺伝学的解析 (図 71) の結果、CIA/ASF1(155) (Cia1p/Asf1p) と DBD(CCG1) (Bdf1p/Bdf2p) との相互作用に重要だと考えられるアミノ酸残基を赤色で示す。

† DBD(CCG1)の Arg1446Ala, Asp1502Ala 変異体は、GST レジンに非特異的に吸着することから、GST プルダウンには使用しなかった。

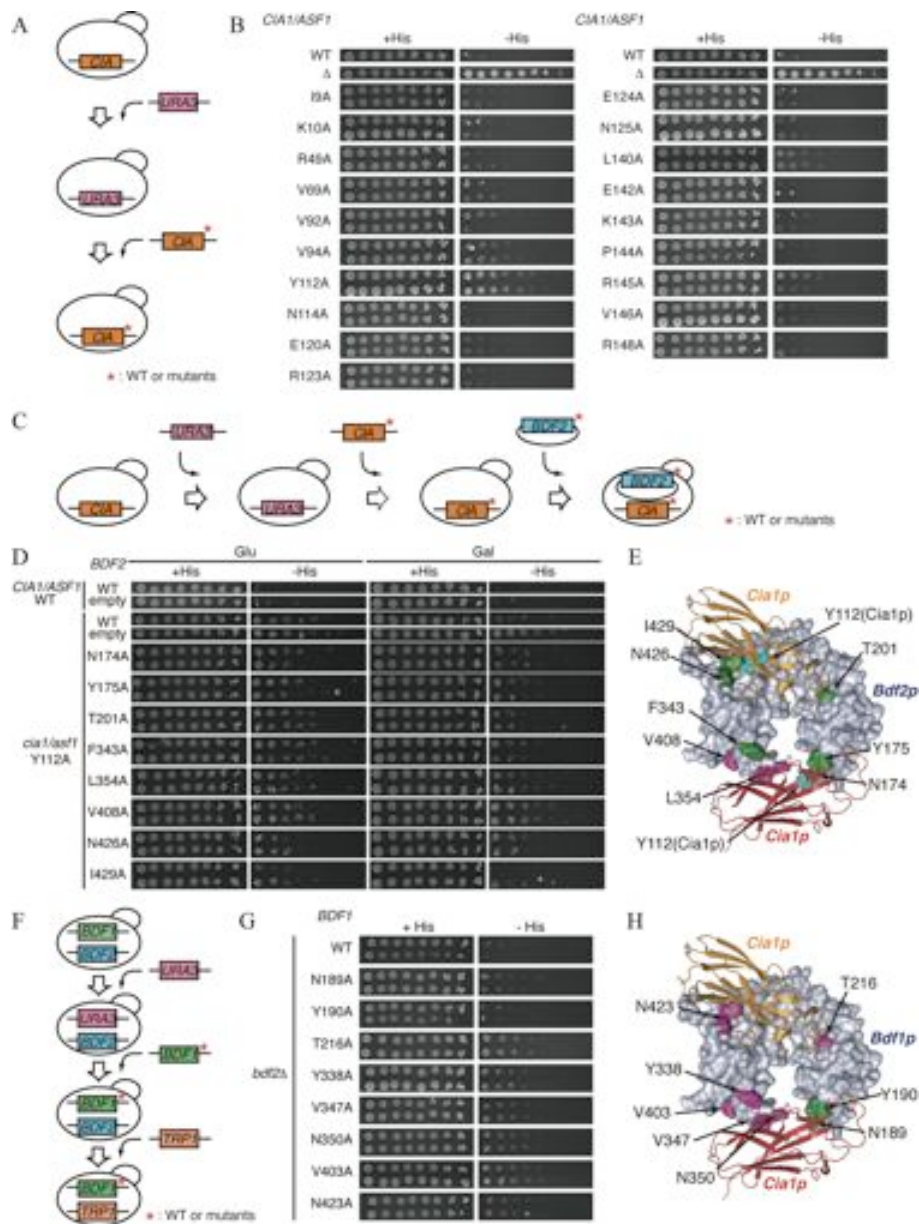


図 71. Bdf1/Bdf2 を用いた Spt 表現型解析の結果

A) Cia1p/Asf1p 点変異体株の作成方法。B) Cia1p/Asf1p 点変異体を用いた Spt 表現型解析の結果。C) Bdf2p 野生型/変異体を用いた抑圧実験株の作成方法。D) Bdf2p による抑圧実験の結果。E) D の結果を立体構造上にマップしたもの。Cia1p/Asf1p との結合に関与するアミノ酸残基を紫色。関与しないアミノ酸残基を緑色で示す。F) Bdf1 点変異体株の作成方法。G) Bdf1 点変異体を用いた Spt 表現型解析の結果。H) F の結果を立体構造上にマップしたもの。生物学的重要性の高いアミノ酸残基を紫色、低いアミノ酸残基を緑色で示す。

8.2 酵母株を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) (共同研究)

<目的>

共同研究を進めている堀越研では、Cia1/Asf1p と Bdf1/Bdf2p が *in vitro* で直接相互作用するだけでなく、細胞内でも相互作用することを免疫沈降によって明らかにしている。しかしながら、Bdf1p と Cia1p/Asf1p がいつどのプロモーター上で複合体を形成しているかどうかについては未だ詳細なデータは得られていなかった。そこで、Bdf1p と Cia1p/Asf1p がどの遺伝子領域に共局在し、機能的な相互作用をしているかを明らかにするため、千田研究室の安達博士によって ChIP 解析が行われた。

<結果および考察>

ChIP 解析では、*PMAI*、*ACT1*、*PHO11*、*GAL10*、*GAL1*、*HO* 遺伝子プロモーター上での Bdf1p、Cia1p/Asf1p、pol II、histone H3 の局在が調べられた。ChIP 解析の結果、Cia1p/Asf1p と Bdf1p は *PMAI*、*ACT1* 遺伝子の活性型のプロモーター領域に局在することが示され (図 72 A-D)。次に、Bdf1p Val403Ala (サイト 1) 変異株を用いて *ACT1* プロモーター上の Bdf1、Cia1p/Asf1p、pol II、histone H3 の局在を調べた結果、Cia1p/Asf1p と Rpb1p の局在が有意に減少し、histone H3 の局在が増加した (図 72 E, F, H)。このとき、Bdf1 の局在に変化はみられなかった (図 72 G)。Bdf1p 点変異体を用いた ChIP 解析は、「Bdf1p を介して Cia1p/Asf1p がプロモーター上にリクルートされる→Cia1p/Asf1p がプロモーター上のヒストンを除去する→RNA pol II がプロモーターにエンタリーされる」という分子機構モデルを示唆する結果であるといえる。

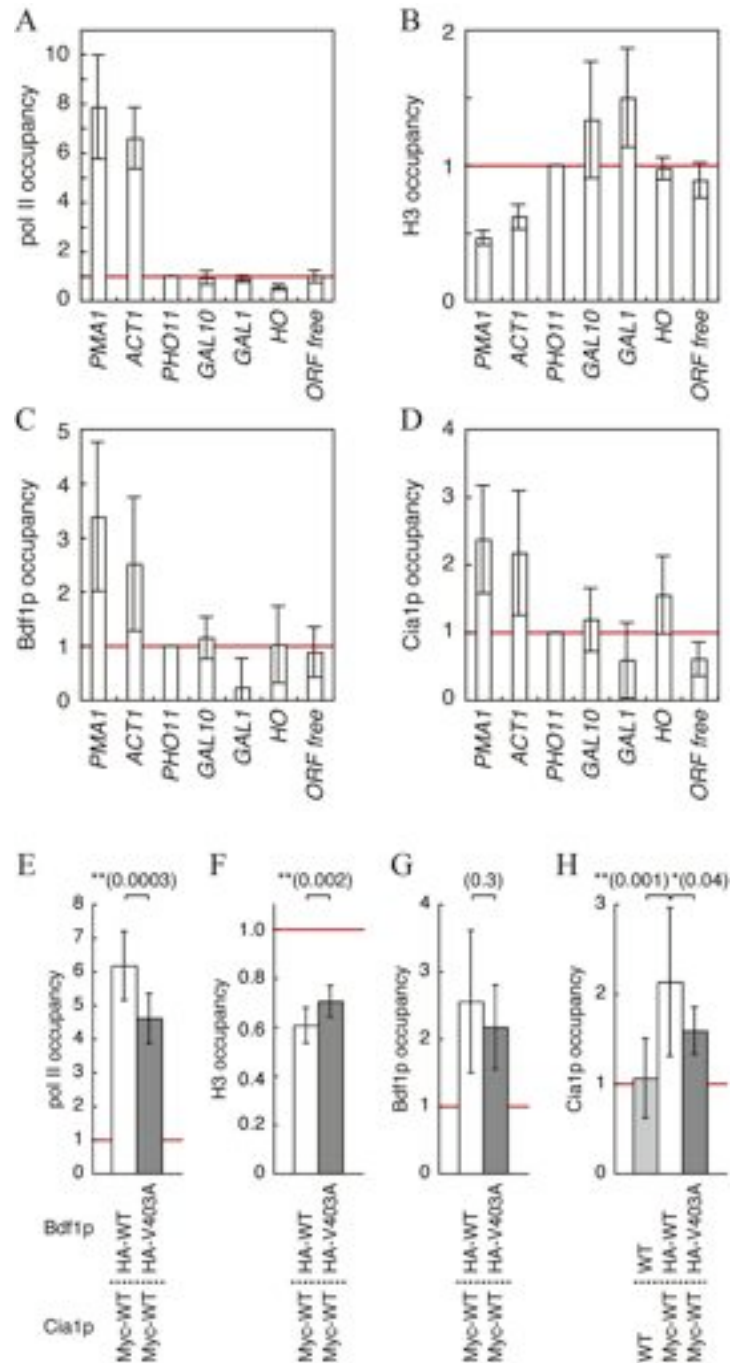


図 72. プロモーター上での *Cia1p/Asf1p*, *Bdf1p*, histone H3, *pol II* の局在解析
 A-D) 各遺伝子プロモーター上での *pol II* (A), histone H3 (B), *Bdf1p* (C), *Cia1p* (D)の相対的な局在。E-H) *Bdf1p* WT/Val403Ala 株の *ACT1* プロモーター上での *pol II* (E), histone H3 (F), *Bdf1p* (G), *Cia1p* (H)の局在。

8.3 Bdf1p の点変異体を用いた GST プルダウンアッセイ

<目的>

共同研究を進めている東大の堀越研により酵母由来の Cia1p/Asf1p と Bdf1 が *in vitro* で特異的に結合することが示されている。しかしながら、ヒト CIA/ASF1 と DBD(CCG1) の相互作用と同様、Cia1p/Asf1p が Bdf1p のサイト 1 とサイト 2 を利用して結合しているのかわからない。そこで、どちらの分子表面を用いて複合体を形成しているか明らかにするため、Bdf1p 点変異を用いた GST プルダウンアッセイを行う。

<実験方法>

1. His-Bdf1p 野生型/変異体の精製

表 10 に示したアミノ酸残基の中から、Cia1p/Asf1p との相互作用に重要なアミノ酸残基を選択し、アラニン残基に置換した His-Bdf1p 点変異体を 5 種類作成した。変異の導入はすでに Spt(-) 表現型解析で使用したプラスミドから大腸菌用の発現ベクターにのせかえることで、His-Bdf1p 野生型/変異体の発現プラスミド (pET28b Bdf1p: 147-422) を作成した。サブクローニングに使用したプライマーは、5'-ATAAGAATGCTAGCAATCCAATACCAAAGCACCAGC-3' (Forward) と 5'-ATAAGAATGCGGCCGC AGGCCTATCCGCCCCATTTG-3' (Reverse) である。培養から精製までは、2.8 の方法で行った。

2. GST プルダウンアッセイ

50 % スラリー glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) 40 μ l に対して 100 pmol GST-yCia1p/As1p(155)を固定し、GST pull-down assay buffer (25 mM HEPES-KOH, 200 mM KCl, 20 % glycerol, 12.5 mM MgCl₂, 0.1 % NP-40, 50 mM 2-mercaptoethanol)内で 500 pmol の His-Bdf1 野生型/変異体 (20 μ l)を 4°C で 1.5 時間結合させる。GST pull-down assay buffer (250 μ l)で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE を行い、GST-yCia1p(155)に特異的に結合した His-Bdf1p を抗ヒスタグ抗体で検出する。ネガティブコントロールとして GST を用いる。

<結果と考察>

1. His-Bdf1p 野生型/変異体の精製

精製した His-Bdf1p 野生型と変異体の SDS-PAGE を図 73 に示した。高純度で十分なタンパク質量が回収できた。

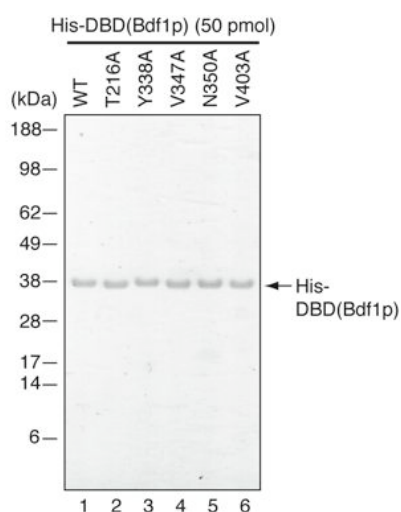


図 73. His-Bdf1p の野生型/変異体の SDS-PAGE

2. GST プルダウンアッセイ

GST プルダウンアッセイの結果、サイト 1 (Val403Ala) とサイト 2 (Thr216Ala) の点変異体 Bdf1p と GST-yCia1p/Asf1p(155)の結合量が減少した (図 74)。GST プルダウンの結果、Bdf1p に対して Cia1p/Asf1p(155)が結合する分子表面が 2 通りあることが示された。これらの結果は、ヒト由来のタンパク質を用いた GST プルダウンアッセイの結果とよく一致することがわかった。出芽酵母 Bdf1p と GST-yCia1p/Asf1p(155)の相互作用は、結合サイト 1 での変異導入による影響が大きいことから、主に結合サイト 1 が関与していることが示唆される。

DBD(Bdf1p)の Val347Ala 変異体は、GST レジンに非特異的に吸着することから、GST プルダウンには使用しなかった。

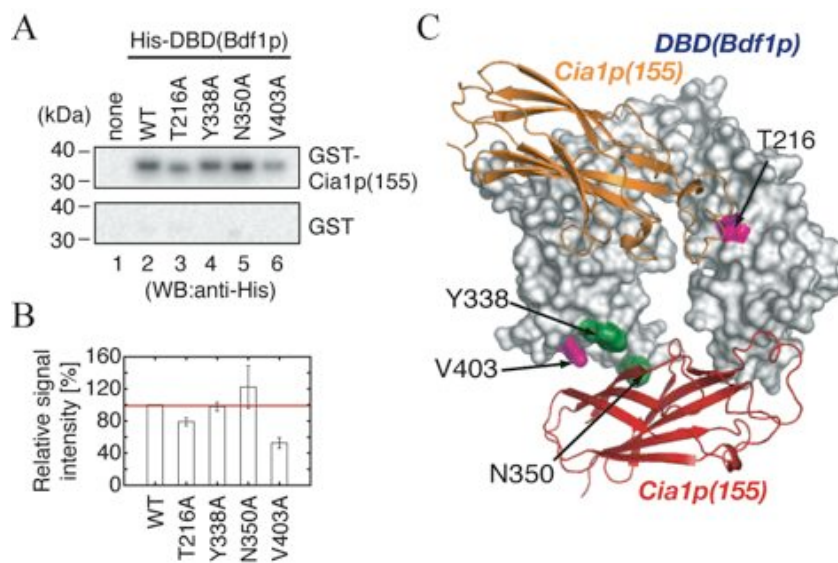


図 74. Bdf1p 点変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果

A) GST プルダウンアッセイの結果 B) 各点変異体のシグナル強度を ImageJ⁽¹⁾を用いて数値化したグラフ。WT を 100 として定義した。3 回の実験結果を使って標準偏差を計算した。C) Cia1p/Asf1p との結合に関与するアミノ酸残基を紫色、関与しないアミノ酸残基を緑色で示す。

実験材料

<使用機器>

- 小型遠心機: MX-300 (TOMY)
- ローター: AR500-04 (TOMY), AR015-24 (TOMY)
- 分光光度計: DU 640 SPECTROPHOTOMETER (Beckman Coulter)
- PCR (Applied Biosystem, GeneAmp 9700)

<GST プルダウンアッセイに使用したレジソ>

- Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare)

<立体構造 表示に使用したプログラム>

- Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>)

<電気泳動>

- NuPAGE Bis-Tris 4-12% Gel (Invitrogen)
- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)

<ウェスタンブロッティング>

- MagicMarker Western Protein Standards (Invitrogen, LC5602)
- anti-His antibody (GE Healthcare, 27-4710-01)
- ECL goat anti-mouse IgG (GE Healthcare, NA931V)
- ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, RPN2106)
- 3MM the nitrocellulose membrane (Whatman)

参考文献

- (1) Abramoff, M.D., Magelhães, P.J., and Ram, S.J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36–42.
- (2) Adkins, M.W., Howar, S.R., and Tyler, J.K. (2004). Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast *PHO5* and *PHO8* genes. *Mol. Cell* **14**, 657–666.
- (3) Allfrey, V., Faulkner, R.M. and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**, 786–794.
- (4) Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921.
- (5) Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843–51.
- (6) Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B. and Kornberg, R.D. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **87**, 1249–1260.
- (7) Chen, H., Li, B., and Workman, J.L. (1994). A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosomes and factor-induced nucleosome disassembly. *EMBO J.* **13**, 380–390.
- (8) Cheung, P., Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**, 263–271.
- (9) Chimura, T., Kuzuhara, T., and Horikoshi, M. (2002). Identification and characterization of CIA/ASF1 as an interactor of bromodomains associated with TFIID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9334–9339.
- (10) Cote, J., Quinn, J., Workman, J.L. and Peterson, C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**, 53–60.
- (11) Collaborative computational project number 4. (1994). CCP4 suite: Programs for protein crystallography by collaborative computational project number 4. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763.
- (12) Cote, J., Quinn, J., Workman, J.L. and Peterson, C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**, 53–60.
- (13) Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Lam, W.M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A.A., Brill, S.J., Adams, P.D., Berger, J.M., and Kaufman, P.D. (2003). Structure and function of the conserved core of histone deposition protein Asf1. *Curr. Biol.* **13**, 2148–2158.
- (14) delafortelle, E and Bricogne, G. (1997). *Macromol. Crystallogr. A* **276**, 472–494.
- (15) De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E. and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol.* **14**, 997–1007.
- (16) Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999).

- Structure and Ligand of a Histone Acetyltransferase Bromodomain. *Nature* **399**, 491–496.
- (16) Dikstein, R., Ruppert, S. and Tjian R. (1996) TAF_{II}250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell* **84**, 781-790.
- (17) Eitoku, M., Sato, L., Senda, T., and Horikoshi, M. (2007). Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 414–444.
- (18) Garcia, De. La. Torre. J., Huertas, M. L., and Carrasco, B. (2000). Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* **78**, 719–730.
- (19) Gilbert, G.A., and Jenkins, R.C. (1956). Boundary problems in the sedimentation and electrophoresis of complex systems in rapid reversible equilibrium. *Nature* **177**, 853–854.
- (20) Goodfellow, H., Krejci, A., Moshkin, Y., Verrijzer, C.P., Karch, F., and Bray, S.J. (2007). Gene-specific targeting of the histone chaperone asf1 to mediate silencing. *Dev. Cell* **13**, 593–600.
- (21) Hassan, A.H., Neely, K.E. and Workman, J.L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* **104**, 817-27.
- (22) Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* **111**, 369–379.
- (23) Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAF_{II}250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422-1425.
- (24) Janin, J. (1997). Specific *versus* non-specific contacts in protein crystals. *Nat Struct Biol.* **4**, 973-974.
- (25) Kabsch, W. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800.
- (26) Korber, P., Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Schermer, U.J., Blaschke, D. and Hörz W. (2006). The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast PHO5 and PHO8 promoters. *J Biol Chem.* **281**, 5539-5545.
- (27) Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705.
- (28) Kwon, H., Imbalzano, A.N., Khavari, P.A., Kingston, R.E. and Green MR. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* **370**, 477-481.
- (29) Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**, 416-420.
- (30) Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., and Sternglanz, R. (1997). Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1029–1042.
- (31) Ladurner, A.G., Inouye, C., Jain, R., and Tjian, R. (2003). Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol. Cell* **11**, 365–376.
- (32) Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., and Pelletier, S.L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, S. Harding and A. Rowe, ed. (Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry), 359–393.
- (33) Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of

- NURF. *Nature* **442**, 91–95.
- (34) Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- (35) McRee, D.E. (1993). *Practical Protein Crystallography*, Academic Press.
- (36) Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y. and Allis, C.D. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**, 1261-1270.
- (37) Mousson, F., Lautrette, A., Thuret, J.Y., Agez, M., Courbeyrette, R., Amigues, B., Becker, E., Neumann, J.M., Guerois, R., Mann, C., Ochsenbein, F. (2005). Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3 and its functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5975–5980.
- (38) Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J.E., Ott, M., Verdin, E., and Zhou, M.M. (2002). Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol. Cell* **9**, 575–586.
- (39) Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Yan, S., Plotnikova, O., Sachchidanand, Sanchez, R., Zeleznik-Le, N.J., Ronai, Z., and Zhou, M.M. (2004). Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation. *Mol. Cell* **13**, 251–263.
- (40) Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T. and Horikoshi M. (2000). A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity. *Genes Cells* **5**, 221-233.
- (41) Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255.
- (42) Nakamura, Y., Umehara, T., Nakano, K., Jang, M.K., Shirouzu, M., Morita, S., Uda-Tochio, H., Hamana, H., Terada, T., Adachi, N., et al. (2007). Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4. *J. Biol. Chem.* **282**, 4193–4201.
- (43) Natsume, R., Eitoku, M., Akai, Y., Sano, N., Horikoshi, M., and Senda, T. (2007). Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature* **446**, 338–341.
- (44) Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959.
- (45) Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- (46) Owen, D.J., Ornaghi, P., Yang, J.C., Lowe, N., Evans, P.R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A.A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.* **19**, 6141–6149.
- (47) Read, R.J. (2001). Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 1373–1382.
- (48) Roeder RG. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci.* **21**, 327-335.
- (49) Rossignol, M., Keriell, A., Staub, A. and Egly, J.M. (1999). Kinase activity and phosphorylation of the largest subunit of TFIIF transcription factor. *J Biol Chem.* **274**,

22387-22392.

- (50) Schneider, T.R. and Sheldrick, G.M. (2002). Substructure Solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. D* **58**, 1772-1779.
- (51) Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606–1669.
- (52) Schuck, P. (2003). On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal Biochem.* **320**, 104-24.
- (53) Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2006). Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **22**, 415–422.
- (54) Shen, W., Xu, C., Huang, W., Zhang, J., Carlson, J.E., Tu, X., Wu, J., and Shi, Y. (2007). Solution structure of human Brg1 bromodomain and its specific binding to acetylated histone tails. *Biochemistry* **46**, 2100–2110.
- (55) Steger, D.J. and Workman, J.L. (1996). Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones? *Bioessay* **18**, 875-84.
- (56) Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45.
- (57) Strong, M., Sawaya, M.R., Wang, S., Phillips, M., Cascio, D., and Eisenberg, D. (2006). Toward the structural genomics of complexes: Crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8060–8065.
- (58) Sun, H., Liu, J., Zhang, J., Shen, W., Huang, H., Xu, C., Dai, H., Wu, J., and Shi, Y. (2007). Solution structure of BRD7 bromodomain and its interaction with acetylated peptides from histone H3 and H4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 435–441.
- (59) Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Cryst. D* **55**, 849-861.
- (60) Terwilliger, T. C. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Cryst. D* **56**, 965-972.
- (61) Umehara, T., Chimura, T., Ichikawa, N. and Horikoshi M. (2002). Polyanionic stretch-deleted histone chaperone cial/Asf1p is functional both *in vivo* and *in vitro*. *Genes Cells* **7**, 59-73.
- (62) VanDemark, A.P., Kasten, M.M., Ferris, E., Heroux, A., Hill, C.P., and Cairns, B.R. (2007). Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gen5 acetylation. *Mol. Cell* **27**, 817–828.
- (63) Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E. and Young, R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* **84**, 235-244.
- (64) Workman, J.L., and Roeder, R.G. (1987). Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during *in vitro* nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. *Cell* **51**, 613-622.
- (65) Zeng, L., Li, J., Muller, M., Yan, S., Mujtaba, S., Pan, C., Wang, Z., and Zhou, M.M. (2005). Selective small molecules blocking HIV-1 Tat and coactivator PCAF association. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2376–2377.
- (66) 化学・生命科学系のための物理化学, Raymond Chang 著 北澤康裕・北川貞三・濱口宏夫 訳

謝辞

本論文を完成するにあたり、多くの人々にご協力をいただきました。東京大学の田之倉優教授には、懇切なるご指導及びご鞭撻を賜りました。心よりお礼を申し上げます。産業技術総合研究所バイオメディシナル 情報研究センターで学ぶ機会を与えていただき、終始有意なご指導を賜りました千田俊哉博士に深く感謝いたします。本研究を遂行するあたり、研究内容の情報を快く提供していただいた田之倉研究室の工藤紀雄博士には深く感謝いたします。また、田之倉研究室の先輩方や院生の暖かいご協力に感謝の意を表したいと思います。

東京大学分子細胞生物学研究所の堀越正美准教授には、論文の内容に関して有益なご助言をいただいたこと、快く研究試料を提供していただいたことに深く感謝いたします。東京工業大学の有坂文雄准教授には、分析超遠心に関して有益な助言をいただいたことに深く感謝いたします。長岡科学技術大学の城所俊一准教授には、等温滴定カロリメトリーの実験に際して有益な助言をいただいたことに深く感謝いたします。タンパク質の精製条件の検討を行うにあたり、的確な助言をいただいた千田研究室の夏目亮博士、生化学的解析や ChIP 解析などを行っていただいた千田研究室の安達成彦博士に深く感謝いたします。そして、本研究を行うにあたり、様々な面でお世話になった千田研究室、堀越研究室の皆様に深く感謝します。

また、日本学術振興会による特別研究員DC2への採用は筆者の博士課程での研究継続のための精神的な支えとなりました。ここに感謝の意を表します。

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 食品工学研究室

赤井祐介