



東洋大学生命科学部
生命科学科・准教授
博士（工学）
東端啓貴

平成 12 年 大阪大学大学院工学研究科
博士後期課程修了
平成 12 年 産業技術総合研究所（旧通産省
工業技術院生命工学工業技術研究所）ポスドク
平成 14 年 筑波大学生命環境科学研究科
（応用生物化学系） 助手
平成 17 年 関西学院大学理工学部 博士研究員
平成 18 年 東洋大学生命科学部 講師
平成 19 年 現職

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来 ヒストンによる DNA 凝集特性

はじめに

現在、生物界は真核生物、細菌、始原菌（アーキア）の 3 つのドメインに分類される。始原菌は形態的には細菌と同様な特徴を有しているが、セントラルドグマに関係するタンパク質や遺伝子は真核生物のものと類似した特徴を示す興味深い生物である。真核生物のヒストンは、塩基性 DNA 結合タンパク質として細胞内に豊富に存在し、DNA と結合してヌクレオソームを形成する。近年、ヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化などの修飾による転写の制御機構が明らかにされつつある。一方、始原菌にもヒストンを細胞内に保持しているものが存在し、それらのヒストンは、真核生物のヒストンとアミノ酸配列上の保存性は低いが、真核生物のヒストンコア四量体に類似した DNA 結合様式でヌクレオソーム様構造を形成する。

超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* には相同性の極めて高い 2 種類のヒストン HpkA と HpkB が存在する（同一性、83.6 %）。これらの遺伝子は 67 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、そのアミノ酸の一次配列から推定される分子量は、HpkA が 7378、HpkB が 7167 である。両ヒストンは共に他の始原菌由来ヒストンと極めて相同性が高く、真核細胞のヒストンとも低いながらも相同性を示している。始原菌のヒストンは二量体として DNA に結合し、DNA に結合した二量体ヒストンがさらに四量体となることで、DNA をコンパクト化（凝集）させると考えられており、ヒストンの四量体化が高温環境下における DNA の安定化と構造維持に重要である。*T. kodakaraensis* 細胞内の両タンパク質の発現量は HpkA よりも HpkB の方が高いことが明らかになっている。*In vitro* の実験では、HpkB の方が HpkA よりも高い DNA 結合能・DNA コンパクト化能を有し、熱に対する DNA 安定化効果も HpkB の方が HpkA よりも高い。これらの結果から、*T. kodakaraensis* 細胞内の染色体 DNA の高温環境下での構造維

持には、HpkB が重要な役割を担っていることが考えられる。HpkA と HpkB 間のアミノ酸配列上の相異はわずか 11 箇所であり、特定の部位での違いが HpkA と HpkB の性質を特徴づけていると考えられる（図 1）。そこで、本研究では HpkA の（HpkB との）相異箇所（11 箇所）のアミノ酸残基を一つずつ HpkB のアミノ酸残基に置換していき、HpkA と HpkB の違いを特徴づけているアミノ酸残基を特定することにより、始原菌ヒストンの構造と機能（DNA コンパクト化能、DNA 結合能、熱に対する DNA 安定化能）の相関を明らかにすることを目指した。

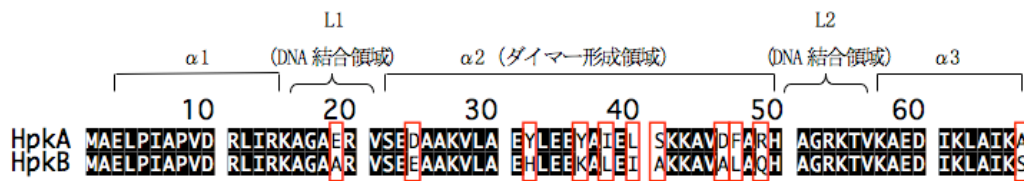


図 1 HpkA と HpkB のアミノ酸配列比較

変異ヒストンの精製

始原菌のヒストンは、3つの α ヘリックス（ $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ）と2つのループ（L1、L2）で構成されており、 $\alpha 2$ 領域はダイマー形成、L1、L2はDNA結合に関与している（図1）。HpkAの11個の相異アミノ酸のうち9個が $\alpha 2$ 領域にあり、1個がL1に、1個が $\alpha 3$ に存在する。DNA結合領域L1にある19番目のグルタミン酸、ダイマー形成に直接関与すると考えられる32番目と36番目のチロシン、また、変異を入れることでpIが大きく減少する49番目のアルギニン、そしてヌクレオソームの安定性に関与するC末端配列（ $\alpha 3$ ）に存在する67番目のアラニンに注目し、合計12種類のHpkA変異体（E19A、D24E、Y32H、Y36K、I38L、L40I、S41A、D46A、F47L、R49Q、A67S、Y32H・Y36K）を構築した。いずれの変異体も大腸菌内で可溶性タンパク質として発現することを確認し、さらに、すべての変異体の精製条件を既に決定している。まず、ダイマー形成に関与する（J. Mol. Biol. 325, 1031-1037 (2003)）32番目と36番目のチロシン残基を、HpkBの対応するアミノ酸残基へと置換した変異体（Y32H、Y36K、Y32H・Y36K）の大量取得を目指した。変異体ヒストン発現プラスミド（pUC-hpkA-Y32H、pUC-hpkA-Y36K、pUC-hpkA-Y32HY36K）をそれぞれ保持する大腸菌BL21を2YT培地（3リットル）に植菌（1%）し、 $OD_{660} = 0.4$ 時に誘導剤としてイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド（終濃度 0.1 mM）を加えた。さらに4時間培養（37℃）した後、集菌した。菌体を20 mM Tris-HCl (pH 7.2)に懸濁し、超音波破碎後、上澄み液を75℃で15分間熱処理しその後、陰イオン（Q Sepharose）及び陽イオン交換カラム（HiTrap SP FF、RESOURCE S）を用いて変異ヒストンを精製した（図2）。これらヒストンは分子量が小さいため、一般的に用いられるブラッドフォード法によるタンパク質の定量を行えない。そこで、アミノ酸組成分析を行うことにより、タンパク質濃度を決定した。コントロールとして野生型HpkA、HpkBも調製した。

変異ヒストンの機能解析

精製したタンパク質を用いてコンパクションアッセイを行った。線状化したプラスミド pACT2 (8.1 kbp) (50 ng) にタンパク質を質量比で 0、0.5、1.0、3.0、3.5 となるように加え (HpkB の場合は、0、0.25、0.5、1.0、1.5)、室温で 20 分間放置した後、0.7 % アガロースゲルに供し、泳動した (1V/cm、18 時間)。DNA-ヒストン複合体は、DNA のみの場合と比べて、より凝集しているためアガロースゲル内を速く移動する。コンパクションアッセイの結果を図 3 に示す。線状化 DNA (pACT2) への変異ヒストンの添加量が増加

すると DNA の移動度が増加したことから、すべての変異体 (Y32H、Y36K、Y32H・Y36K) は、DNA コンパクト化能を保持していることが解った。また、Y32H は HpkA とほぼ同等のコンパクト化能を示し、Y36K、Y32H・Y36K は HpkA よりもコンパクト化能が向上していたが、HpkB に比べて劣っていた。さらに、Y32H・Y36K は、Y36K とほぼ同等のコンパクト化能を持つことが解った。

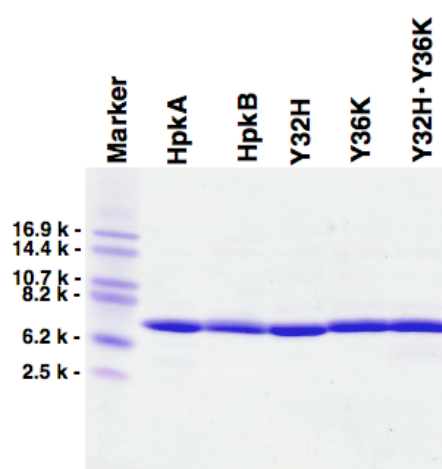


図2 SDS-PAGE解析

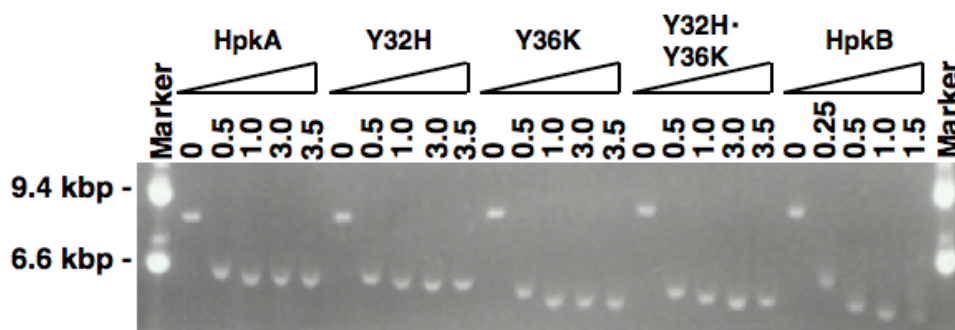
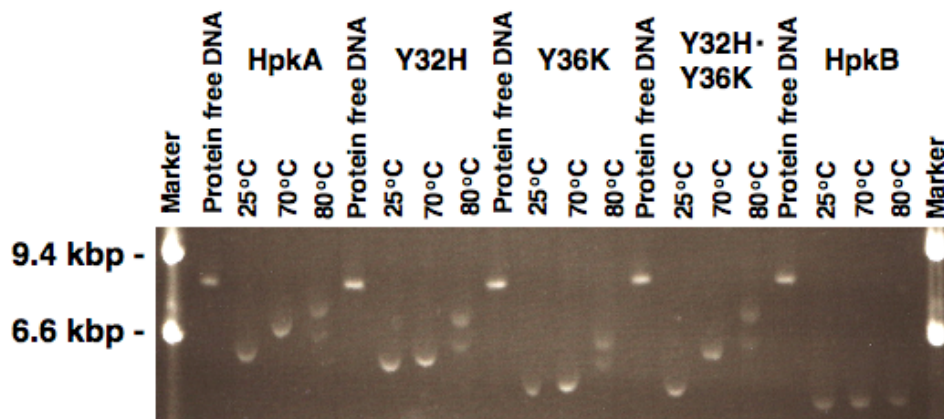


図3 HpkA、HpkB、HpkA変異体のDNAコンパクト化能

次に、反応温度を 25°C、70°C、80°C に設定して、コンパクションアッセイを行った (図 4)。反応温度 70°C では、HpkA-DNA 複合体の構造が 25°C のそれよりも脱凝集している (移動度が小さい) が、Y32H と Y36K は、DNA との複合体構造を 25°C の場合と同程度に維持していた。このことから、Y32H と Y36K は、HpkB 型の特徴を保持していると考えられる。しかし、80°C の反応温度において、HpkB と同程度にまで DNA との複合体を維持できないことが解った。Y32H・Y36K ダブルミュータントは、高温下では、単独の変異体 (Y32H と Y36K) に比べて DNA との複合体を維持できないことが明らかとなった。



**図4 HpkA、HpkB、HpkA変異体の
各反応温度でのDNAコンパクト化能**

考察と今後の方針

各変異体の理論上の等電点（pI）は、Y32H が 9.24、Y36K が 9.63、Y32H・Y36K が 9.72 を示し、野生型 HpkA（9.17）に比べて pI 値が著しく上昇している変異体（Y36K、Y32H・Y36K）がコンパクト化能を向上させていると推測された。（予備的実験では、残り 9 種類の変異体のうち、pI（理論上）が増加する E19A と D46A はコンパクト化能が向上し、pI（理論上）が減少する R49Q のコンパクト化能は低下することが解っている。その他の変異体（D24E、I38L、L40I、S41A、F47L、A67S）は HpkA と同程度のコンパクト化能を示した。）今後、等電点電気泳動に供し実測値を求める予定である。各反応温度（25、70、80℃）での DNA コンパクト化能を調べた結果、Y32H と Y36K は、高温でも（HpkB には及ばないが）DNA との複合体を維持できることが解った。そこで、円二色性分散計を用いて変異体の熱に対する安定性を測定し、 T_m （℃）を算出したところ、Y32H は 88.2℃、Y36K は 88.9℃、Y32H・Y36K は 78.8℃（HpkA は 90.0℃、HpkB は 88.5℃）を示した。高温下において他の変異体（Y32H と Y36K）に比べて DNA との複合体を維持できない Y32H・Y36K の T_m 値は、他の変異体や HpkA、HpkB よりも低い値を示し、熱安定性が低下していることが解った。しかし、熱安定性の高い HpkA（HpkB よりも熱安定性が高い）が、高温で DNA 高次構造を維持できないことから、タンパク質の安定性以外の要因が考えられる。今後は、ダイマー形成に関わるモノマー間の相互作用について調べていく予定である。残り 9 種類の変異体についても詳細に解析していく。

謝辞

この研究を遂行するにあたり、ご指導頂きました京都大学大学院 今中忠行教授、関西学院大学 藤原伸介教授に深謝致します。実験上のサポートをして頂きました筑波大学 白木賢太郎准教授に御礼申し上げます。