

## RNA/蛋白質複合体の単結晶が得られるまで ～Exportin-5/RanGTP/pre-microRNA 複合体を例として～

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット

慈幸 千真理

(投稿日 2011/3/23、再投稿日 2011/4/25、受理日 2011/4/25)

キーワード：発現、蛋白質/RNA 複合体、多結晶、単結晶

### 概要

高等生物の核内には無数に RNA が存在し、その中から特定の RNA のみを選択し、核から細胞質に輸送する蛋白質 Exportin-5 の働きを構造学的に明らかにするために、Exportin-5/RanGTP/pre-microRNA 複合体の結晶化を行った。Exportin-5 を例に分子量 100K を超える蛋白質の大腸菌による大量発現系の構築と、蛋白質/RNA 複合体の構造解析可能な結晶を得ることができた方法について紹介する。

### 装置、器具、試薬

ジャーファメンター (いわしや)、遠心機、ソニケーター、Ni-NTA agarose (Qiagen)、Glutathione Sepharose (GE Healthcare)、Superdex200 (GE Healthcare)、BioLogic (BioRad)、Amicon Ultra 10K (Millipore)、NanoDrop (Thermo)

pre-microRNA ((株) ジーンデザイン) (pre-microRNA は、二本鎖のステムとループ領域をもつ RNA である。本研究で用いた RNA はヒト pre-microRNA30 の二本鎖ステム部分のみである)。

### 実験手順

- 1) 蛋白質の発現 Exportin-5、RanGTP
- 2) Exportin-5、RanGTP の粗精製
- 3) 複合体形成と精製
- 4) 結晶化
- 5) X 線回折実験

## 詳細 1 分子量 100k 以上の蛋白質の大腸菌システムを用いた大量発現方法

ヒト由来 Exportin-5 (136kDa) の大量発現系の構築

pQE60 ベクター (C 末端 6xHis、アンピシリン耐性) (Qiagen) に Exportin-5 遺伝子を挿入し、大腸菌 M15 株 (カナマイシン耐性) (Qiagen) に形質転換した。

当初、大腸菌の増殖が途中で止まったり、発現量が微量 (0.2mg/10L 培養) だったりした。大腸菌で発現させるには分子量が大きすぎるからかもしれない。形質転換した同じ LB プレートのコロニーでも発現量に差がみられた。そこでコロニーを一つずつ 2mL 培養し、 $OD_{600}$ =約 0.7 になった時に 100  $\mu$ L を採取し -80°C で 15%グリセロールストックした。残りの培養液は、 $OD_{600}$ =1.0 の時に 0.1mMIPTG を加え 20°C で 12 時間誘導処理し、2mL のサンプリングチューブで集菌した。ペレットを可溶化バッファ (50mM TrisHCl (pH7.4)、7mM  $\beta$ -mercaptoethanol、10mM imidazole、5% Glycerol、5mM  $MgCl_2$ 、500mM NaCl、0.1% Tween20) 1mL で懸濁し、氷上で超音波処理後遠心分離した。1.5mL サンプリングチューブに Ni-NTA agarose (40  $\mu$ L) をとり可溶化バッファで洗っておいた。可溶化した上清を Ni レジンと 30 分間混合し遠心分離後、上澄み液を捨て可溶化バッファで Ni レジンをよく洗った。遠心分離後、Ni レジンを吸わないように注意しながら可溶化バッファはできるかぎり捨てた。Ni レジンに電気泳動用の 2 $\times$ SDS サンプルバッファを添加し、電気泳動を行った。(図 1) 電気泳動の結果から大量発現するコロニーを選択しそのグリセロールストックから大量培養を行った。2mL の LB 培地にグリセロールストック全量を加え 37°C、2 時間培養した。次にその培養液を 200mL の LB 培地に移し 37°C 4 時間培養した。前培養液はすべて 10L ジャーファメンターに移し 37°C で培養した。(培地組成は下記の通り) 大量培養中に  $OD_{600}$  が 0.6-0.7 になったときに培養液を約 5mL 採取し 700  $\mu$ L ずつ分注し 50%グリセロールを 300  $\mu$ L 加え 15%グリセロールストックとした。 $OD_{600}$  が 0.95-1.0 (ジャーファメンターでの培養をはじめてから 5 時間後くらいが目安。これ以上長く培養時間のかかるものは、発現量が低かった。) になると培地温度を 20°C まで急激に下げ、誘導処理剤 IPTG を 0.1mM 添加し 12 時間後に集菌した。

培地組成は、1% Polypepton、0.5% Bacto Yeast Extract、0.5% NaCl で前培養を行う。本培養は、10L ジャーファメンターを用い、前培養用の培地組成に 10% Glycerol を添加する (培地は、10% Glycerol も一緒にオートクレーブ滅菌する。15min、121°C)。オートクレーブ滅菌後、温度が十分下がってからアンピシリンを終濃度が 100  $\mu$ g/mL、カナマイシンを終濃度が、50  $\mu$ g/mL で加えた。

## 詳細 2 蛋白質/RNA 複合体形成と精製

Exportin-5、RanGTP は大腸菌でそれぞれを発現させ、粗精製を行っておく。粗精製を行う目的は、大腸菌由来の tRNA の除去である。なぜなら、Exportin-5 は tRNA と結合可能で、Exportin-5/RanGTP/tRNA が一旦三者複合体を形成してしまうと、目的の複合体である Exportin-5/RanGTP/pre-microRNA 複合体との分離が困難であるからである。

### ①Exportin-5 の粗精製

Exportin-5 を発現させた大腸菌 wet 重量 30g (5L 培養分) に可溶化バッファと 0.1mM Pefabloc RC (Sigma Aldrich)、0.1% Tween20 を加え全量で 80mL にし、

氷冷しながら超音波破碎後遠心分離し、上清に Ni-NTA agarose (Qiagen) を加え 1 時間 4°C で攪拌した。可溶化バッファでオープンカラム (BioRad) に入れた Ni レジンをよく洗い、可溶化バッファに 80mM imidazole を加え Exportin-5 を溶出する。溶出液 (約 35mL) を 500mM NaCl 含むバッファで平衡化した Phenyl Sepharose とオープンカラムで混合し室温で 30 分置いた。100mM NaCl 含むバッファ (pH7.4) で担体をよく洗い MilliQ で溶出した。溶出容器に最終溶出液が 50mM TrisHCl (pH7.4)、2mM MgCl<sub>2</sub>、2mM DTT になるようにあらかじめ添加しておいた (最終溶出量は、約 30mL) (図 2 レーン a)。

蛋白質をカラムから溶出して回収するタイミングは、Bradford 試薬の色の变化で判断した (500 μL Bradford 試薬に対して、10 μL の蛋白溶液を加える)。

#### 可溶化バッファ組成

50mM TrisHCl (pH7.4)  
7mM β-mercaptoethanol  
10mM imidazole  
5% Glycerol  
5mM MgCl<sub>2</sub>  
500mM NaCl

#### Phenyl Sepharose カラム用バッファ組成

50mM TrisHCl (pH7.4)  
2mM DTT  
5% Glycerol  
2mM MgCl<sub>2</sub>

#### ②RanGTP の粗精製

Ran (1-176) 遺伝子 (C 末 40 アミノ酸欠損型) は GST 切断サイト (TEV) を入れた pGEX6p ベクターに入れた。宿主大腸菌は、BL21 (DE3) pLysS (STRATEGENE) を用いた。

Ran (1-176) は、Ran 遺伝子の C 末を除去することによって GTP 型になるという文献を参考にした (Exportin-5 は、RanGTP 結合下において基質と複合体を形成する)。

10L 培養した Ran (菌体 wet 重量 60g) を可溶化バッファと 0.1mM Pefabloc SC (Sigma Aldrich) で 150mL 以下に懸濁した。氷冷しながら超音波破碎後遠心処理し、上清と可溶化バッファで平衡化した Glutathione Sepharose (GE Healthcare) (ゲル 5mL) を 50mL コニカルチューブ 2 本に分けて入れ 1 時間 4°C で攪拌した後にオープンカラムに移した後に、可溶化バッファで担体をよく洗浄した (NaCl を含まないことがこの後行う複合体形成のためには重要である) (図 2 レーン b (注))。

(注) 純度はよくないが、GST-RanGTP の粗精製の目的は、大腸菌由来 tRNA の除去であり、複合体形成後の精製で純度はあがるためこのときの純度は気にしなかった。

#### 可溶化バッファ

50mM TrisHCl (pH7.4)  
2mM DTT  
2mM MgCl<sub>2</sub>  
5% Glycerol

#### ③複合体形成

Exportin-5、RanGTP は、特に RanGTP は単体で可溶化すると不安定なために粗精製が終わったらすぐに複合体を形成させ安定化しなければならなかった。そこで各蛋白質の粗精製から複合体の形成までは、数時間以内に行った。

RanGTP (②) を吸着させた Glutathione Sepharose のオープンカラムに粗精製の終わった Exportin-5 (①) と pre-microRNA (ジーンデザイン合成 RNA) 1mM GTP、Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega) 800unit (20  $\mu$ L) を素早く混ぜ、2 時間半、4°C でおだやかに攪拌した。

2 時間半後、カラムの中で、白い粘性のある糸くずのような凝集物が浮いているが、これは変性した Exportin-5 が主成分で、きれいなピペットの先でとり除いた。大腸菌で発現させたリコンビナント Exportin-5 は、約 30% しか複合体活性をもたないことがわかった。

カラムをよく洗浄し、10mM 還元型グルタチオン (pH7.4) を含むバッファで溶出した。(図 2 レーン d) カラムを洗浄するバッファに還元型グルタチオンを 10mM になるようにはかりとり、1M TrisHCl (pH8.8) で pH7.4 になるように調整した。

溶出液 (約 50mL) は、Ni アフィニティオープンカラムに添加し、1 時間 4°C で穏やかに攪拌した。カラムをよく洗浄した後は 80mMimidazole を含むバッファで溶出した。(図 2 レーン f) この溶出液 (約 20mL) を、濃縮膜 (Amicon Ultra10K (Millipore)) を用いて 5mL まで濃縮した。濃縮したサンプルに TEV プロテアーゼ (Invitrogen) を 20  $\mu$ L 加え、4°C に一晩置いた (図 2 レーン g)。

次に、切断された GST および、凝集したものを Exportin-5/RanGTP/pre-microRNA 複合体から分離するために Superdex カラムを用いてゲル濾過 HPLC (BioRad) を行った。HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) カラムを、ゲル濾過用バッファ (20mM TrisHCl (pH7.4)、2mM MgCl<sub>2</sub>、2mMDTT) で平衡化し、5mL の蛋白溶液を注入し、流速 1mL/min でゲル濾過用バッファを流した。

280nm の吸光度 ( $A_{280}$ ) と純度検定 (SDS-PAGE) で Exportin-5/RanGTP/pre-microRNA 複合体のピークフラクションを回収し、濃縮膜 Amicon Ultra 10k (Millipore) を用いて 5-10mg/mL まで濃縮した (図 2 レーン h)。

### 詳細 3 結晶化

高純度に精製された Exportin-5/RanGTP/pre-microRNA 複合体溶液を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。複合体の結晶化を行う場合、結晶中でも複合体を形成していること、できた結晶が構造解析可能な単結晶でなければならない。我々が初めて得た結晶は、pre-microRNA のみが解離した Exportin-5/RanGTP 二者複合体結晶で、構造解析不可能な多結晶であった（結晶の写真と回折実験の結果図 3）。以下に pre-microRNA を含み、単結晶を得た方法について記す。

#### ①Exportin-5/RanGTP 結晶から Exportin-5/RanGTP/pre-miRNA 結晶へ

二者複合体の結晶が得られたリザーバー溶液の条件は、8-10% PEG3350、100mM MgCl<sub>2</sub>、100mM DTT、5mM spermine 4HCl、100mM MES (pH6.5) だった。ドロップは、蛋白質溶液とリザーバー溶液を1:1で混合した。MgCl<sub>2</sub>の効果によってRNAが蛋白質から解離される。50mM MgCl<sub>2</sub>条件下でゲル濾過を行った結果、三者は解離することが明らかになった。

Mg濃度を2mMまで下げ、解離しやすいpre-microRNAを結晶化サンプル溶液に、サンプル溶液中に含まれているpre-microRNAの1.2倍量になるようにpre-microRNAを加えた。Exportin-5/RanGTP/pre-microRNA三者複合体の結晶は得られたが、多結晶のため構造解析不可能であった。

#### 三者複合体が得られたリザーバー溶液条件

7-8% PEG3350  
2mM MgCl<sub>2</sub>  
100mM DTT  
2mM spermine 4HCl  
100mM MES (pH6.5)

#### 三者複合体が得られた蛋白質溶液条件

2mM MgCl<sub>2</sub>  
2mM DTT  
20mM TrisHCl (pH7.4)  
0.01mM pre-microRNA (ジーンデザイン)

#### ②多結晶から単結晶へ

##### (1)ストリークシーディング

得られた結晶を2~3個、結晶が溶けない溶液50μLに移しseedbeads (Hampton Research) にいれ、ボルテックスミキサーにかけ結晶を細かく砕いた。ストリークシーディングするためにタングステンのような細い針を、seedbeadsの溶液にいれ種結晶を付着させ、針先でドロップに一筋の線を書いた。シーディングを行うときのリザーバー溶液に含まれる沈殿剤 (PEG3350) の濃度は、約1%下げた。

ストリークシーディングにより結晶のできる空間的な間隔は広くなった。しかし、多結晶であった。

(2)ハンギングドロップ蒸気拡散法の条件の最適化

ハンギングドロップ蒸気拡散法では、ドロップ（液相）、気相、リザーバー溶液（液相）の間で、各成分の濃度変化がおり平衡状態になる。

平衡状態になるまで各成分の濃度変化により、各成分の化学ポテンシャルの変化がおり、結晶核ができ結晶成長を促す。結晶成長中に様々な成分の化学ポテンシャルが変化するために、成長中の結晶に新しい別の結晶核ができ多結晶になっているのではないかと考えた。そこで、ドロップ、リザーバー溶液の沈殿剤を除く各成分の濃度を一定に保ち、沈殿剤の化学ポテンシャル変化によってのみ結晶化を行った。体積が一定でないため、濃度一定にすることは厳密には不可能である。しかし体積変化は微量なので、体積変化は無視することができる。各成分のどの濃度で結晶ができるのか、条件を最適化した（図4）。

蛋白質溶液

2mM MgCl<sub>2</sub>  
2mM DTT  
20mM Tris HCl pH7.4

リザーバー溶液

2mM MgCl<sub>2</sub>  
100mM DTT  
5mM spermine.4HCl  
6-7% PEG3350  
100mM MES-NaOH (pH6.5)

蛋白質溶液（最適化後）

2mM MgCl<sub>2</sub>  
50mM DTT  
2mM spermine.4HCl  
20mM Tris HCl pH7.4

リザーバー溶液（最適化後）

2mM MgCl<sub>2</sub>  
50mM DTT  
2mM spermine.4HCl  
3-5% PEG3350  
100mM MES-NaOH (pH6.5)

ドロップは、蛋白質溶液 1 $\mu$ L、リザーバー溶液 1 $\mu$ L を混合した。  
この溶液条件の最適化により、単結晶を得ることのできる確率が、約 1%に向上した。

文献

1) Okada, C. et al., *Science*, **326**, 1275-8 (2009)

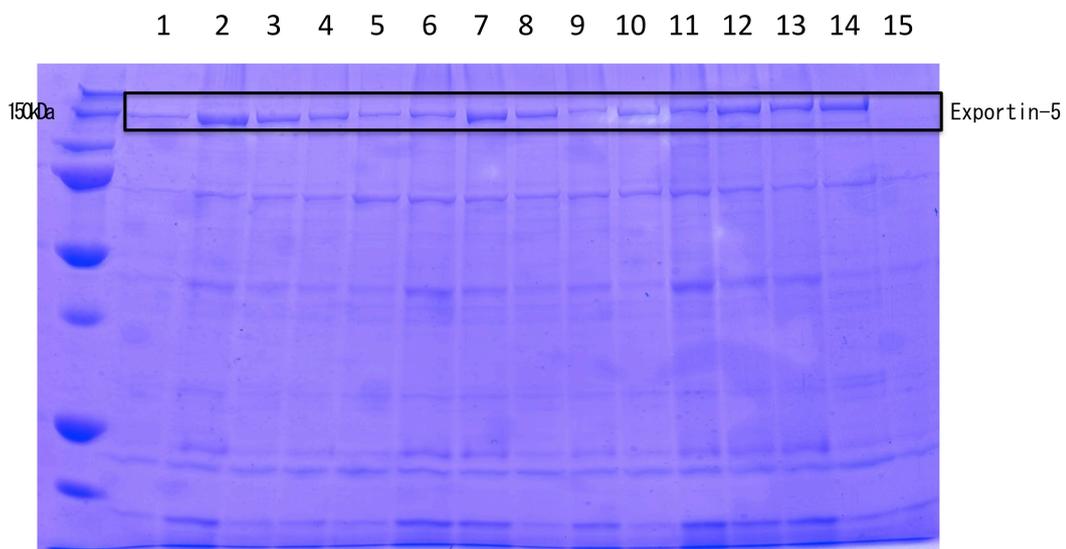


図1. Exportin-5各コロニーの発現量確認SDS-PAGE Niアフィニティカラム精製後

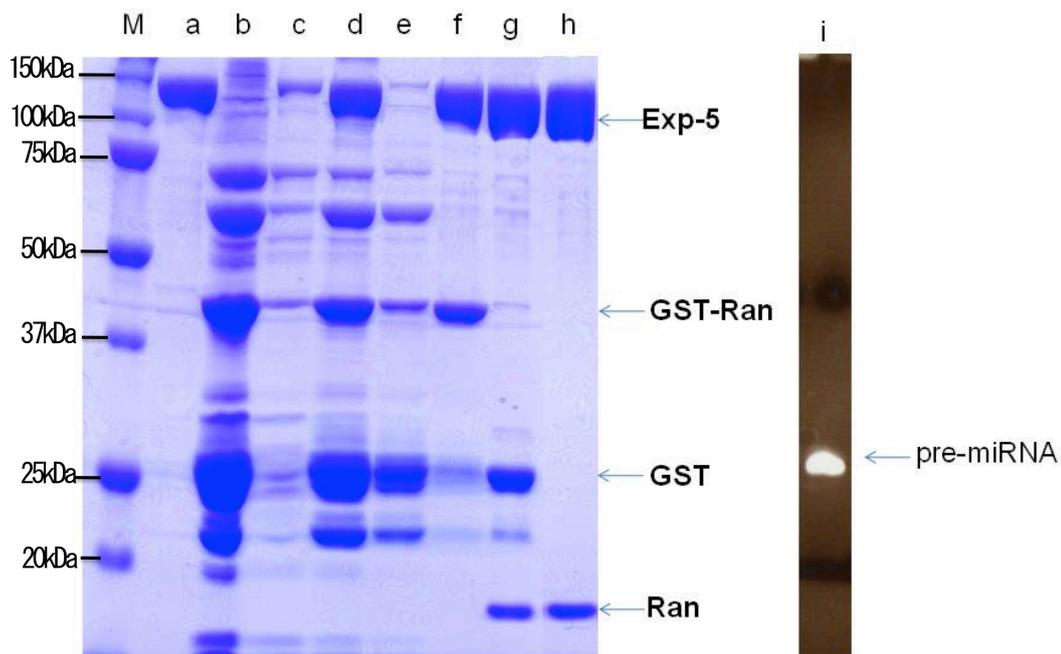


図2. Exportin-5/RanGTP/pre-miRNA複合体精製のSDS-PAGEとRNA電気泳動  
a 粗精製後のExportin-5, b 粗精製後のGST-RanGTP, c 複合体形成後のGSTカラムフロースルー  
d. GSTカラム溶出液 e Niアフィニティカラムフロースルー, f. Niアフィニティカラム溶出液  
g TEVプロテアーゼ処理後 h ゲル濾過後ピーク濃縮液 i. ゲル濾過後濃縮液に含まれるpre-miRNA

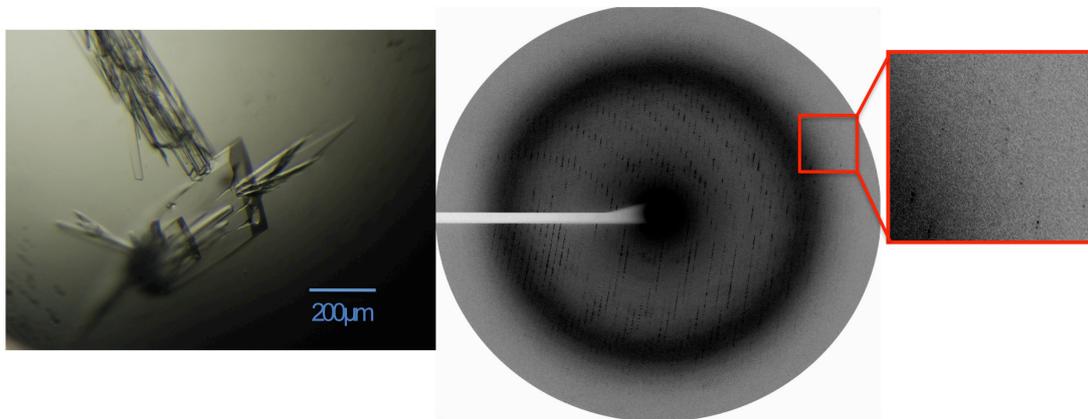


図3. Exportin-5/RanGTP二者複合体多結晶とX線回折イメージ

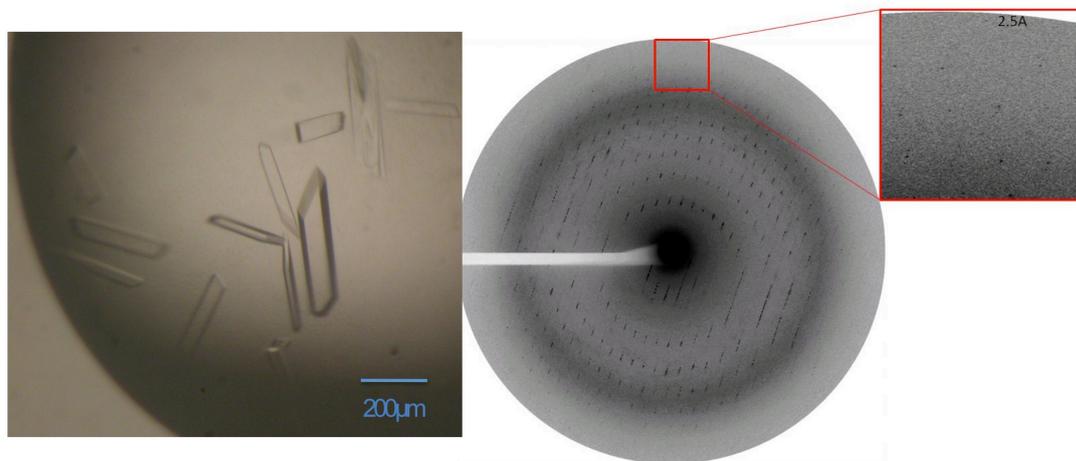


図4. Exportin-5/RanGTP/pre-microRNA複合体単結晶とX線回折イメージ  
図の結晶の1%が単結晶であった。回折イメージから単結晶を判断した。