

真核生物キネトコア複合体 CENP-TWSX の調製、結晶化と立体構造解析

国立遺伝学研究所

西野 達哉

Preparation, crystallization and structural analysis of
eukaryotic kinetochore complex CENP-TWSX

National Institute of Genetics

Tatsuya Nishino

キーワード: 蛋白質複合体、蛋白質発現、精製、結晶化、X線結晶構造解析

(投稿日 2013/2/22、再投稿日 2013/3/13、受理日 2013/3/15)

概要

真核生物キネトコア複合体は染色体を娘細胞に分配するために必須の超分子複合体で、100 を超える因子より構成される。今回筆者は染色体結合に関与するヒストン様複合体 CENP-TWSX の立体構造解析を行った(1)。本プロトコールは染色体分配複合体の構造解析過程において利用した各種方法(遺伝子クローニング、蛋白質発現、精製、結晶化、立体構造解析)及びそのコツについて紹介する

イントロダクション

キネトコアは細胞分裂時の染色体分配に必須の超分子複合体で染色体セントロメア領域に構築される。構成因子は出芽酵母で約 80、高等真核生物では約 100 を超え、様々なネットワークを形成して染色体と微小管を連結する。これら因子のなかには染色体と結合するもの、蛋白質-蛋白質同士を結びつけるもの、微小管と結合するもの等、様々なものがあり、それらにより段階的にキネトコアが構築される。

キネトコア構造構築に重要となるのが染色体セントロメア部位における足場形成である。これまでの解析より CENP-A ヌクレオソームが、世代を超えて引き継がれるセントロメアマーカースとして機能する事が知られている。しかし他の因子がどのように DNA に結合し微小管に連結するのか不明であった。我々はこの謎に迫るため、キネトコアの安定サブ複合体の構造機能解析を行った。

本稿ではヒストンフォールドを有し DNA および染色体結合に関与するキネトコア構成因子 CENP-T、CENP-W、CENP-S、CENP-X の調製、結晶化、構造解析について紹介する。

装置、器具、試薬

サーマルサイクラー (TaKaRa)

インキュベータ

2L フラスコ

遠心機(Beckman)

ソニケーター(Branson)

ペリスタポンプ(GE Healthcare)

AKTA purifier(GE Healthcare)、

HisTrap Sepharose column(GE Healthcare)、

StrepTactin Sepharose column(GE Healthcare)、

Superdex 200 column(GE Healthcare)、

TEV protease(自作)、

Amicon Ultra 限外濾過チューブ(Millipore)、

結晶化ロボット Mosquito(TTP Labtech)

実験手順

- 1) 遺伝子クローニング
- 2) 蛋白質発現
- 3) 蛋白質精製
- 4) 結晶化
- 5) 位相決定

実験の詳細

(1) キネトコア複合体遺伝子のクローニング

キネトコア複合体に限らず複合体の構造解析ではどの部分をどのように発現精製するかという事はいつも頭を悩ませる問題である。また、生体内で複合体形成が確認されているものであっても組換え蛋白質により、生体内の複合体を再構成する事が困難であることも多く、通常は試行錯誤の末、コンストラクト構築に至る。

複合体再構成に関してはいくつか方法があるが大まかには二つに分ける事が出来る。

すなわち

1: 個別に発現精製、後に再構成

本方法は各因子を大腸菌において大量に発現し（多くの場合、インクルージョンボディ）、尿素や塩酸グアニジン等の変性剤を用いて可溶化しアフィニティーカラムやイオン交換カラムを通して精製する。精製した画分を各構成因子のモル比に併せて混合し、透析法や希釈法により変性剤除去と蛋白質の巻き戻しを行う。この方法は、ヒストン8量体を含む多数の蛋白質で報告されている(2)。著者の経験ではインクルージョンボディは分解が起こりにくいので不安定な蛋白質の発現精製に向いている。しかし巻き戻しの過程はそれぞれの蛋白質複合体で異なるため条件検討が必要である。また、再構成複合体が完全に巻き戻っているかどうかをチェックできるようなアッセイ系があるとなお良い。

2: 共発現の後、複合体を精製

大腸菌等において複合体の各構成因子を共発現し、複合体を精製する。可溶性画分で精製できる場合は変性や巻き戻しを経る事なく調製でき、ヒストンにおいても実施例が報告されている(3)。しかし、正しい複合体が形成できない場合や蛋白質分解が見られる場合もあり、不溶性画分になる事も多い。またヒートショック蛋白質等が共雑蛋白質として結合する事も多い(4)。著者の経験上、個々の蛋白質の適切な発現領域の選定と発現量調節が重要と考える。これらは相互に依存しており、結晶化が可能な性質の良い複合体は（おそらく）どちらも満たしていると思われる。

CENP-TW 複合体および CENP-SX 複合体の調製においていずれの方法も試みた。

当初はヒストン等と同様に個別発現による複合体の再構成を行った。しかし、取扱いの容易な共発現法を後に採用し複合体を調製した。

CENP-T や CENP-S はコーディング領域中に長い天然変性領域を有している。CENP-S は 40 アミノ酸程であるが、CENP-T は 500 アミノ酸程の領域が天然変性領域となっており、高速原子間力顕微鏡による解析からもこの領域は溶液中で揺動している様子が観察されている(5)。

X 線結晶構造解析においてこのような天然変性領域は結晶化の妨げになる事から天然変性領域を避けて、球状ドメインより構成されるコンストラクトを作製する事が重要となる。著者は天然変性領域予測のために

Disopred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred/>)

を利用し、蛋白質の二次構造予測には

Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)

Coils (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)

を利用した。

真核生物キネトコア複合体遺伝子の共発現には Novagen 社の pRSFduet シリーズをベースに使用した。ニワトリ由来の N 末端を 530 残基欠失した CENP-T ヒストンフォールド、全長 CENP-W および C 末端を 34 残基欠失した CENP-S、全長 CENP-X 遺伝子コーディング領域を PCR にて増幅し、T7 プロモーター下流に挿入した。精製、構造解析のためにそれぞれの遺伝子がコードする蛋白質の N 末端側にヒスタグ及び StreptII タグを挿入し、構造解析のためにそのすぐ直下に TEV プロテアーゼ切断認識部位を導入した。

(2) 蛋白質発現

共発現プラスミドにより大量発現用大腸菌 BL21Star (DE3) pRARE2LysS を形質転換し、導入した。CENP-TW 複合体及び CENP-SX 複合体の蛋白質発現は初期培養を 37°C にて行い、前培養は 250mL の LB 培地、本培養は 1 L の Terrific Broth を使用した。37°C 振とう培養で OD_{600nm} の濁度を 0.5 まで上昇させた後、IPTG を終濃度 0.5 mM にて添加し、培養温度を 16°C まで下げて一夜培養(16 時間)した。

(3) 蛋白質精製

培養した大腸菌を遠心機にて集菌後一度凍結保存した。大腸菌ペレットを緩衝液にて再懸濁した後、超音波処理により細胞を破碎した。DNA 除去のため polyminA を終濃度 0.1% で添加し、高速遠心機にて残さを除去し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液はペリスタポンプにて HisTrap Sepharose カラムにアプライし、20mM imidazole 入りの緩衝液にて非特異的な吸着物を除去した。AKTA purifier にて 500mM imidazole 入りの緩衝液にて溶出した。もしこの段階で精製度が低い場合は Streptactin カラムにてさらに精製を行った。両アフィニティーカラムにて精製後、ピーク画分を Superdex200 カラムにてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。ゲル濾過のピーク画分を TEV プロテアーゼにて精製タグを切断し、再度 Superdex200 カラムにて精製を行った。ゲル濾過のピーク画分を Amicon Ultra 限外濾過チューブにて濃縮し、-80°C に分注保存した。

CENP-TWSX 複合体は CENP-TW 及び CENP-SX を等モル比で混合した後、Superdex200 ゲル濾過カラムにて複合体を分離精製した。ピークフラクションを Amicon Ultra 限外濾過チューブにて濃縮し、-80°C に分注保存した。

(4) 蛋白質結晶化

蛋白質は緩衝液にて蛋白質濃度 10 mg/ml に調製し、各種結晶化スクリーニングキット試薬 (ハンプトン、キアゲン、モレキュラーダイナミクス社製) を結晶化ロボット mosquito にて 100nL:100nL もしくは 100nL:200nL の比率で混合し、20°C のインキュベータにてプレートを保存した。CENP-TW はハンプトンリサーチ社やキアゲン社、モレキュラーディメンション社製の既成スクリーニングキットを約 1000 条件程スクリーニングした。CENP-TW の場合はこのうち一つの条件にて微小結晶が得られた。一方、CENP-SX は多数の結晶が得られた。結晶条件精密化はモスキートを使って PEG 濃度を細かく検討し X 線解析用の結晶を得た (図 1)。放射光施設においてこれらの X 線回折データを取得した (図 2)。CENP-TWSX 複合体の結晶は CENP-TW 複合体と CENP-SX 複合体を等量混合したもの及び CENP-TWSX 複合体をゲル濾過によりさらに精製した。

(5) 位相決定

CENP-TW および CENP-SX 複合体ともにヒストンフォールドを有しているが、構造既知のヒストン蛋白質をテンプレートとした分子置換法では位相決定に至らなかった。そこでまずは重原子による同型置換及びセレノメチオニン置換体を使った多波長異常分散法を試した。重金属は水銀、白金等をソーキングにより置換した。またセレノメチオニン置換体は蛋白質科学会アーカイブ『メチオニン要求株を使わないセレノメチオニン標識蛋白質の作り方』に従って調製した (6)。

http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Expression/SeMet_02/SeMet_02_01.html

最終的にはセレンの単波長異常分散法により位相を決定した (図 3)。得られた初期位相よりモデリング及び構造の精密化を行い、最終的に構造解析まで至った (図 4)。

工夫とコツ

クローニングのコツ

共発現系ではベクターの種類や各遺伝子の順番、組み合わせ等色々考えられる。これに関して著者はノバジェン社の pETduet や pColaduet, pRSFduet 等を使用している。ベクターの種類や遺伝子の配置によって発現量が変わるのでこの辺りは試行錯誤する。なお同様な共発現による方法は構造ゲノムプロジェクト等でも紹介されているのでそちらを参照の事(7)。

蛋白精製のコツ

多数のサンプルを作製した際、時間的な制約から一気に最終精製段階まで持って行く事が困難な場合がある。安定な蛋白質であれば 4°Cにおいて保存する事が望ましいがそうでないケースも多々ある。著者はそのような場合、大腸菌ペレットもしくは細胞抽出液を 60%硫酸(g/mL)にて沈殿したペレットとして-20°C保存する。pRARE2LysS を導入した大腸菌は稀少コドンの供給や誘導前の発現抑制だけでなく凍結融解により容易に大腸菌を溶解する事が出来、超音波処理を最小限に押さえられる。一方、硫酸沈殿ペレットは容量も少なく、融解後は緩衝液にも容易に溶解する事から、著者はいずれの保存状態も好んで利用している。精製再開は緩衝液に溶解後、アフィニティー精製、ゲル濾過精製を続けて行う。なお以前ニッケルカラム溶出画分を-20°C保存した事が何度かあるが蛋白質が凝集してしまいさらに精製する事が出来なかった。そのためニッケル溶出画分の凍結はお勧めしない。

結晶化のコツ

CENP-TWは約 1000 種の結晶化条件中でうまく結晶化したものがよほど特殊な条件で結晶化したのではないかと思われるかもしれないが、実際には適切な pH と PEG の分子量であれば容易に結晶化した。難しかったのは CENP-TW では結晶が二系存在し、それらは同じ空間群で一軸のみ格子の長さが倍になっていた。結晶の見た目では区別がつかず、X 線回折により判別した。

構造解析のコツ

筆者は 5 年ぶりに蛋白質の構造解析を行ったが、以前はワークステーションで行っていた作業が全てラップトップで出来るようになった事に驚いている。今回の構造解析はすべて MacBookPro にインストールした HKL2000 にて指数付けを行い、Phenix+Coot にて位相決定、モデル構築、最終的な精密化まで至った。

位相決定のコツ

もしセレノメチオニン置換体の結晶がうまくとれるのであればこちらを使う事をお勧めする。プロトコルは

http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Expression/SeMet_02/SeMet_02_01.html

に記載の通り(6)。

文献

- 1) Nishino, T., et al., *Cell*, **148**, 487-501 (2012)
- 2) Luger, K., et al., *Methods Mol Biol.*, **119**, 1-16 (1999)
- 3) Anderson, M., et al., *Protein Expr. Purif.*, **72**, 194-204 (2010)
- 4) Rial, D. V. & Ceccarelli, E. A., *Protein Expr. Purif.*, **25**, 503-7 (2002)
- 5) Suzuki, A., et al., *J. Cell Biol.*, **193**, 125-40 (2011)
- 6) 中村努 & 石川一彦, 蛋白質科学会アーカイブ, **1**, e045 (2008)
- 7) Busso, D., et al., *J. Struct. Biol.*, **75**, 159-70 (2011)

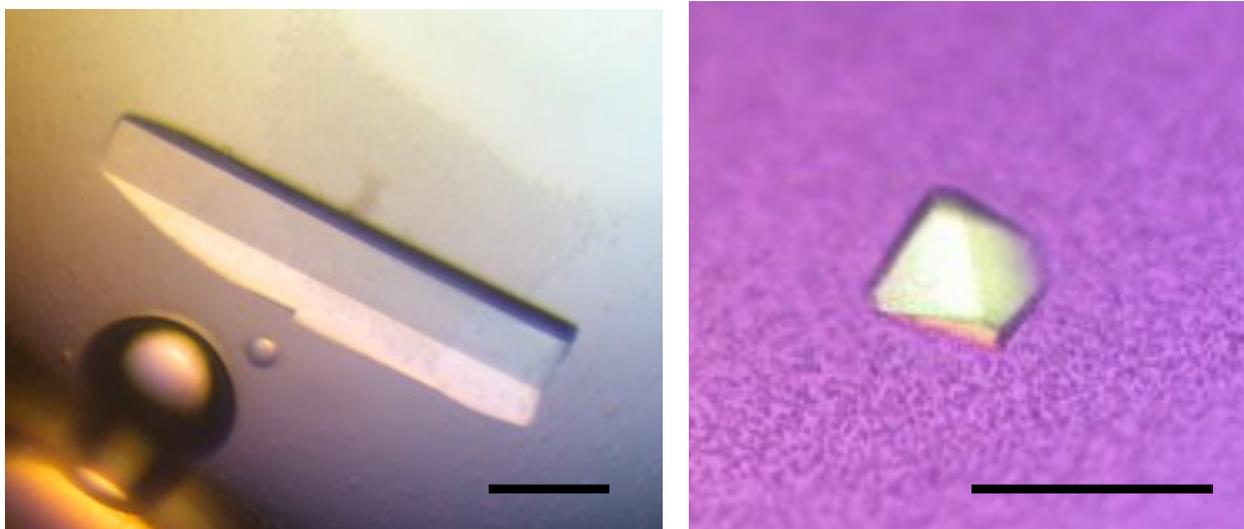


図 1 : CENP-SX 複合体および CENP-TW 複体の結晶。左 : CENP-SX 複体の結晶写真、
右 : CENP-TW 複体の結晶写真。スケールは $100 \mu\text{m}$ 。

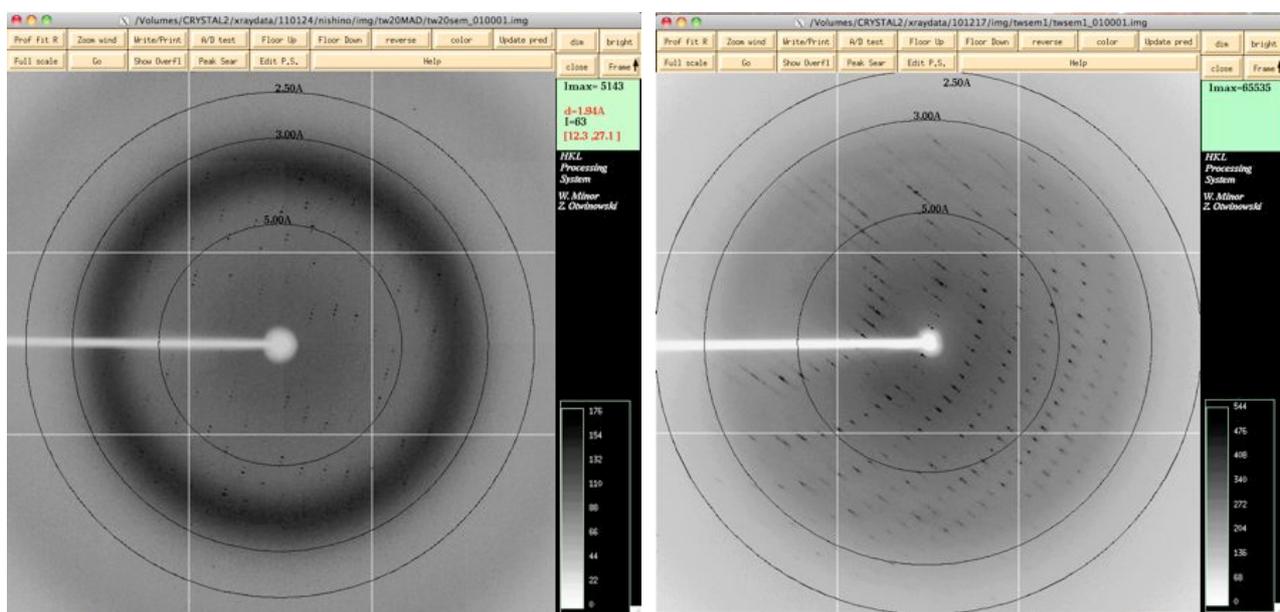


図 2 : CENP-TW 複合体の回折像。左 : 野生型 CENP-TW 複合体、右 : CENP-TW シス테인変異体。左右で逆格子の間隔が異なる。

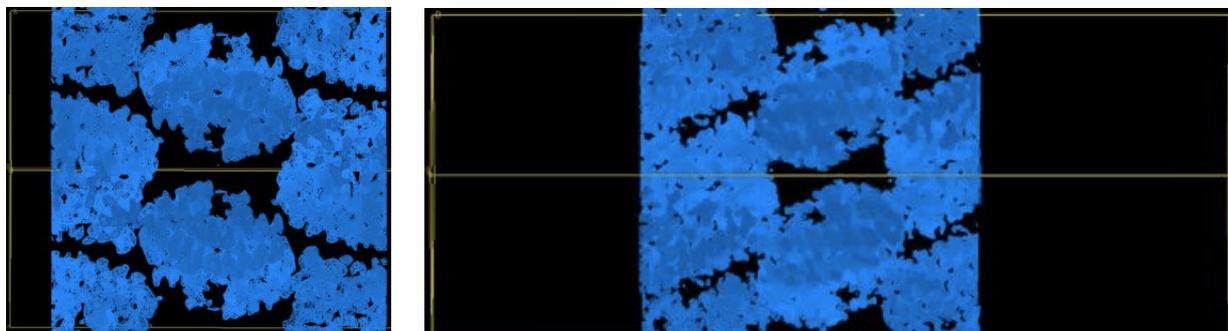


図 3 : GENP-TW 複合体の初期電子密度。左 : 野生型 GENP-TW、右 : GENP-TW システイン変異体外枠は単位格子を表す。



図 4: CENP-TW 複合体(左)、CENP-SX 複合体(中)、CENP-TWSX 複合体(右)結晶構造。CENP-T(緑)、CENP-W(黄)、CENP-S(シアン)、CENP-X(マゼンタ)をそれぞれリボン図で示す。