

タイトル	ヒストン様タンパク質によるDNA高次構造体構築の試行
著者	友池，史明；Tomoike, Fumiaki
引用	工学研究：北海学園大学大学院工学研究科紀要：47-52
発行日	2025-09-30

ヒストン様タンパク質による DNA 高次構造体構築の試行

友 池 史 明*

Construction of an artificial DNA complex incorporating
a chemically modified histone-like protein

Fumiaki Tomoike*

要 旨

近年、細胞内で生体分子は部分的に集まることで機能を調節することが報告されている。しかし、この部分的な濃淡を再現する手法はまだ十分に確立されていない。そこで DNA に結合するタンパク質 HU の任意の場所を化学修飾し、ビオチンを提示させた。これにより、ストレプトアビジンを加えて DNA 上の HU を多量体化することで、DNA の高次構造を変化させ、部分的に凝集した状態をつくることを試みた。DNA、ビオチン提示 HU、ストレプトアビジンを混合したところ、DNA が凝集した高次構造体を形成していることを示唆する結果が得られた。本手法を発展させることで、生体分子の凝集による機能調節の理解や人工的な凝集による生体分子の利用が期待される。

1. ま え が き

DNA は生命の設計図であり、そこに保持された情報に基づいてタンパク質が作られることにより、細胞は形作り、様々な機能をもつようになる。そのため、DNA の情報がどのように読みだされるか、に注目した研究が広く進められてきた。その中で近年、DNA からの情報の読み出し、すなわち遺伝子発現は単純な DNA とタンパク質の相互作用だけでなく、DNA がとる高次構造が重要な役割を果たすことが示唆されている。細胞内の DNA は複数のタンパク質と結合することで複雑な高次構造が形成されている。これにより、部分的にタンパク質の濃淡が生じ、それが生体内の反応に重要な役割を果たしていることが知られている。たとえば真核生物の DNA では、部分的に凝集したヘテロクロマチンという高次構造体を形成することで、特定の領域の遺伝子発現を抑制していることが知られている。また、近年の研究により、従来のようなヘテロクロマチン構造だけでなく、non-coding RNA を介して DNA が部分的に

凝集した高次構造をとることで遺伝子発現が抑制される系や¹、核内の液液相分離によって遺伝子発現が促進されている系がみられている²。これら先行研究で示されているように、生体内では核酸は高次構造の形成によって部分的な密度が変化し、核酸上での反応が調節されている。また、生体内では DNA 以外にも酵素などの生体分子が集まり、液液相分離状態になることで、代謝経路の制御³や反応性の促進⁴をおこなっていることが近年報告されている。しかし、どの程度の凝集密度を持つ高次構造で生体分子が持つ機能が活性化するか、または抑制されるかという凝集密度と機能相関という物性は未だわかっていない。よって、生体分子の密度が制御できる人工的な高次構造体を設計し、液液相分離を再現することができれば、生体内の生化学反応の理解促進と応用が期待される。

そこで、本研究では DNA に結合し、かつ扱いやすいタンパク質によって凝集密度が制御された DNA の高次構造体を形成することを目指す (図 1)。また、構築した DNA の高次構造を足場と

* 北海学園大学大学院工学研究科電子情報生命工学専攻

Graduate School of Engineering (Electronics, Information, and Life Science Eng.), Hokkai-Gakuen University

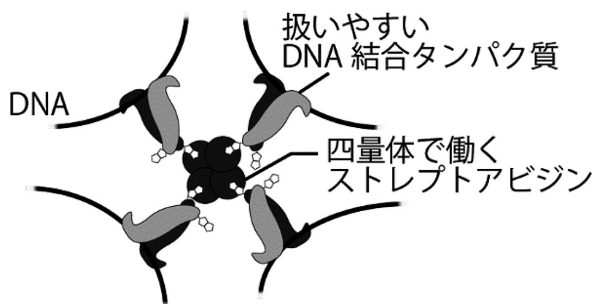


図 1 DNA 高次構造体設計戦略

して利用することで，生体分子の凝集密度が制御された液液相分離系を構築する．これにより，DNA に限らず，生体分子の凝集密度と機能発現の相関関係を解析する系を構築する．今回，扱いやすい DNA 結合タンパク質として，ネンジュモ由来のヒストン様タンパク質 HU を用いた．このタンパク質は容易に精製することができ，また，DNA と混合するのみで結合するという特徴がある．DNA と結合した状態の立体構造も明らかになっており（図 2）⁵，構造情報に基づいた改変の設計も可能である．また，システイン残基をもたないため，任意の位置に点変異導入によってシステイン残基を導入することで，任意の位置に化学修飾を導入することが可能である．今回は点変異で導入したシステイン残基とマレイミドを反応させることで，HU の DNA 結合部位から遠い位置にビオチンを提示させ（図 3）⁵，四量体で働くストレプトアビジンを加えることで，複数の HU を固定化した．

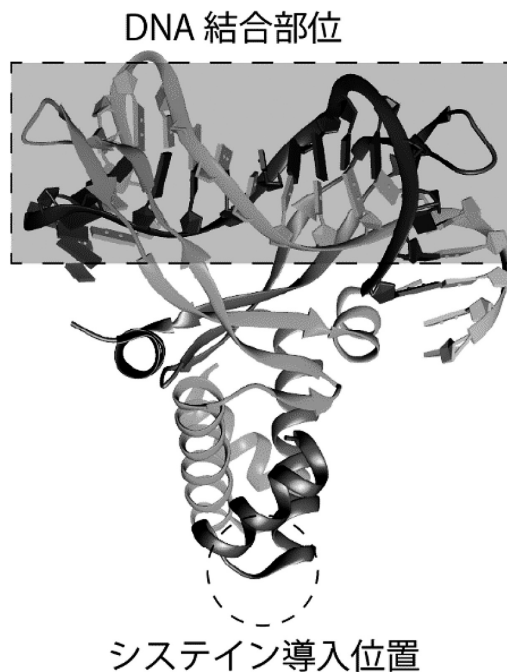


図 2 HU の構造とシステイン導入位置

2. 実験手法

2.1. 点変異導入

Protein Data Bank に登録されている HU の構造に基づいて，DNA 結合部位から遠い位置にあり，かつ，他の部分と相互作用がないアミノ酸残基を特定した．このアミノ酸残基をシステイン残基に置換するためのプライマーを用いて，HU の発現プラスミドを鋳型とした PCR 反応をおこなうことでシステイン導入型 HU の発現プラスミドを調製した．

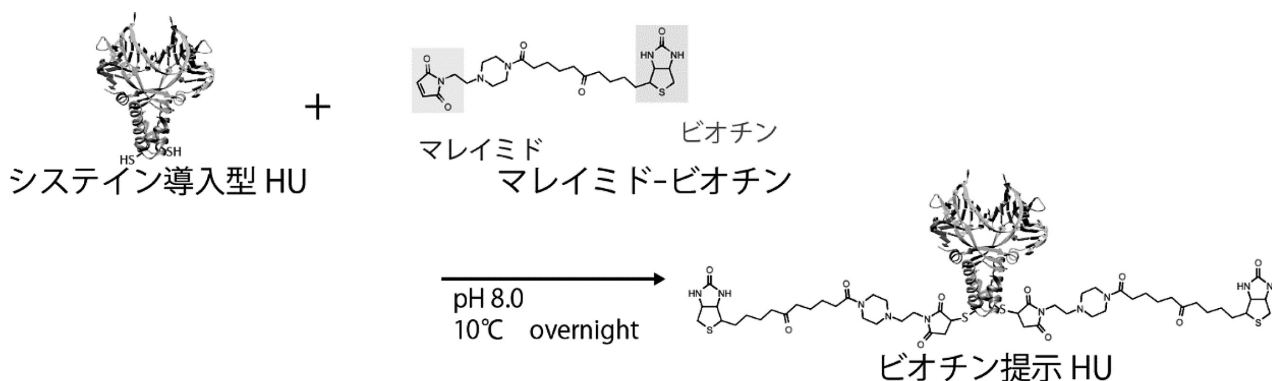


図 3 HU のビオチン提示方法

2.2. タンパク質調製

システイン導入型 HU の発現プラスミドを大腸菌 Rosetta (DE3) 株に形質転換した。この大腸菌を 37℃で一晩培養し、培養したものを集菌後、50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0 に懸濁し、超音波破碎をおこなった。超音波破碎したものを 70℃においた後、15,000 *g* で 10 分間遠心した。上清に硫酸アンモニウムを加えて沈殿させた後、50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0 に溶かした。このタンパク質溶液を透析膜に封入し、50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0 の溶液を用いて透析した。透析した溶液を回収し、遠心した後、0.22 μ m のフィルターに通した。その後、Heparin 樹脂 (HiTrap™ Heparin HP affinity column, cytiva) に吸着させ、50 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, pH 8.0 で溶出した。塩濃度を下げるため、タンパク質溶液を再度透析した後、Ni 樹脂 (cOmplete™ His-Tag Purification Resin, Roche) に吸着させた。その後、50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM イミダゾール, pH 8.0 を用いて溶出した。溶出した HU の純度は 15% のアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で確認した。また、濃度についてはウシ血清アルブミンを基準とした BCA Assay (Pierce BCA Protein Assay, ThermoFisher Scientific) による呈色反応を行い、微量分光光度計で 562 nm の光の吸光度を測定することで定量した。

2.3. ビオチン提示

生成したシステイン導入型 HU にトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) (図 4) を加えることで還元した後、マレイミド-PEAC5-ビオチン (同仁化学研究所) (図 5) を加えて、4℃で一晩反応させることでビオチン提示 HU を調製した。その後、限外ろ過膜 (Amicon Ultra

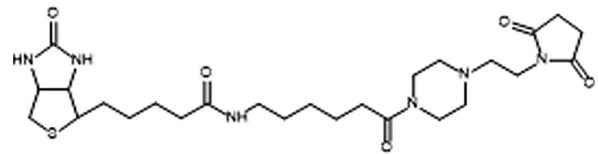


図 5 マレイミド-PEAC5-ビオチン

Centrifugal Filter, 10 kDa MWCO, Merck) を用いて、未反応のマレイミド-PEAC5-Biotin を除いた。

2.4. ビオチン提示の反応効率の定量

マレイミド-PEAC5-ビオチンとシステイン導入 HU の反応収率は、エルマン法を利用して定量した (図 6)。具体的には、未反応のシステイン導入型 HU のシステイン残基と 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を反応させて、37℃一時間おいた後、微量分光光度計 (NanoDrop, ThermoFisher Science) で 412 nm における吸光度を測定した。この吸光度値から、DTNB が分解されて生じた 5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid (TNB) の濃度、すなわち、未反応の HU の濃度を計算する。この結果からビオチン提示 HU の濃度を求めることで反応収率を求める。

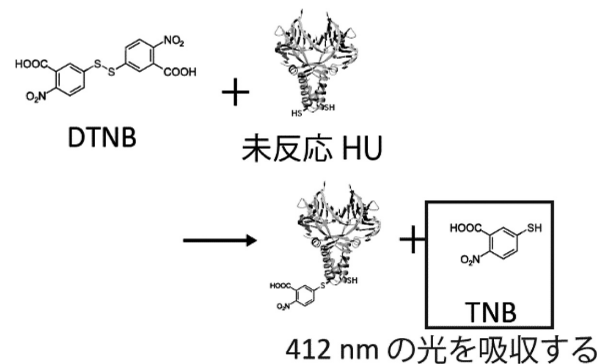


図 6 エルマン法

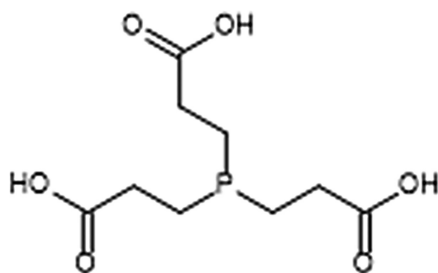


図 4 TCEP

2.5. DNA との結合実験

ビオチン提示型 HU と DNA との相互作用はアガロースゲル電気泳動で評価した。ビオチン提示型 HU またはシステイン導入型 HU と環状 DNA を混合し、0.8% アガロースゲルを用いた電気泳動を行うことで、ビオチン提示により DNA への親和性が損なわれないことを確認した。また、ストレプトアビジンを添加することによるビオチン提示型 HU を多量体化の影響についても同様の

方法で検証した。

2.6. ビオチン提示 HU とストレプトアビジンによる DNA 保護

DNA, ビオチン提示 HU, ストレプトアビジンの複合体が DNA を他の酵素から保護するかを検証するため, 制限酵素の活性を調べた。まず, DNA とビオチン提示 HU, ストレプトアビジンを混合した後, 制限酵素 *EcoRI* を添付の H Buffer の条件で 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl の条件下で 30 分, 37℃ で反応させた後, 終濃度 0.09% になるよう SDS を添加し, 90℃ で 10 分熱処理した後, 0.7% アガロースゲルを用いた電気泳動によって解析した。

3. 実験結果

3.1. HU の発現

大腸菌 Rosetta (DE3) 株を用いて HU を発現させたところ, 興味深いことに寒天培地上のプレートから一度試験管で培養した後, 三角フラスコにスケールアップした場合は発現が見られず, 寒天培地から直接三角フラスコで培養した場合は発現が確認できた。このことから, 一度大腸菌が定常状態になると HU の発現が抑制されることが示唆された。

3.2. HU の精製

HU は熱に耐性をもつタンパク質であるため, HU を大量発現させた大腸菌を超音波で破碎した後, 70℃ に 10 分間おいた後も, 凝集・沈殿がおこらなかった。一方で大腸菌がもつタンパク質は熱に対して不安定であるため, この熱処理条件では凝集沈殿を起こす。よって, 70℃, 10 分間の処理により, HU を高い純度でえることができた。

次に, 大腸菌由来の低分子を取り除くため, 硫安沈殿をおこなった。硫安沈殿後のタンパク質溶液を透析にかけたところ, 再度透明の溶液になったため, HU が硫安沈殿後, 可溶化できるタンパク質であることが確認された。

しかし, この状態のタンパク質溶液の吸光スペクトルを測定したところ, 260 nm に吸収がみら

れた。このことから核酸が硫安沈殿では取り除けないことがわかった。

そこで DNA に似た構造を担体を持つ Heparin 樹脂に吸着させ, 塩化ナトリウムによって溶出させた。溶出したタンパク質溶液の吸光度を調べると 260 nm における吸収がなくなった。このことから, 核酸が除かれたことが確認された。

Heparin 樹脂を用いた精製後も夾雑タンパク質がみられたため, HU の C 末端につけたヒスチジンタグを利用したアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行った。溶出後に得られたタンパク質溶液に, 夾雑タンパク質がほとんどないことを確認した。

精製した HU にはトリプトファンとチロシンが含まれないため, 他のタンパク質と異なり, 280 nm の光を吸収しない。そのため, ウシ血清アルブミンを標準とした BCA Assay を行い, 濃度を決定した。

3.3. ビオチン提示 HU の調製

次に十分なビオチン提示 HU を得る条件を調べた。精製したシステイン導入型 HU を様々な濃度のマレイミド-PEAC5-ビオチン (図 5) と一晩反応させた後, エルマン反応によってマレイミド-PEAC5-ビオチンと反応しなかったシステイン導入型 HU を定量した。その結果, システイン導入型 HU とマレイミド-PEAC5-ビオチンの物質比が 1 : 40 以上の時, 9 割以上のシステイン導入型 HU にビオチンを提示させられることがわかった (図 7)。

この条件に従い, システイン導入型 HU とマレ

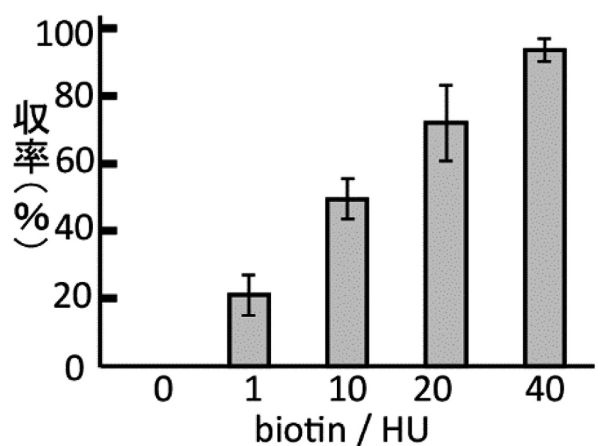


図 7 ビオチン提示の収率

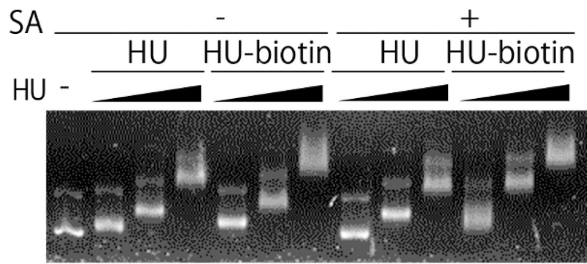


図8 ビオチン提示 HU の DNA 結合能

図中の SA はストレプトアビジンを，HU-biotin はビオチン提示 HU を示す。

イミド-PEAC5-ビオチンを 1 : 40 の比率で混合した後，限外ろ過で未反応のマレイミド-PEAC5-ビオチンを取り除き，ビオチン提示 HU を調製した。

3.4. ビオチン提示による DNA 結合能の変化

ビオチンを提示させる反応およびビオチンの提示によって HU の DNA 結合能が損なわれる可能性が考えられた。そこで，ビオチン提示 HU およびビオチンを提示させる前のシステイン導入型 HU を環状 DNA と混合し，電気泳動によって結合能を比較した（図8）。その結果，同程度の親和性が確認された。この結果から，ビオチン提示において DNA 結合能が変化しないことが確認できた。

3.5. ストレプトアビジンによる多量体化による DNA 高次構造体構築の検討

環状 DNA にシステイン導入型 HU またはビオチン提示型 HU を加えた後，ストレプトアビジンを加えた。これをアガロースゲルで電気泳動にかけることで，高次構造体の構築を検証した（図9）。システイン導入型 HU と DNA の複合体については，ストレプトアビジンを添加しても電気泳動における DNA の位置に変化はみられなかった。一方，ビオチン提示型 HU についてはストレプトアビジンを加えることで泳動位置の変化が見られた。また，条件によっては，DNA の形状が環状と直鎖状でストレプトアビジンによる泳動距離の変化が異なる結果も得られた（図9）。

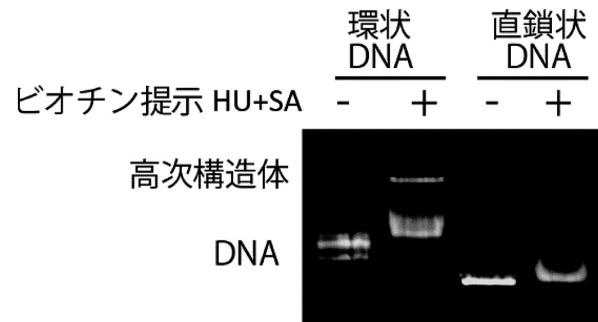


図9 DNA の構造の違いによる複合体の泳動位置の変化

図中の SA はストレプトアビジンを示す。

EcoRI	-	+	+	+	+
Biotin-HU	-	-	+	-	+
SA	-	-	-	+	+

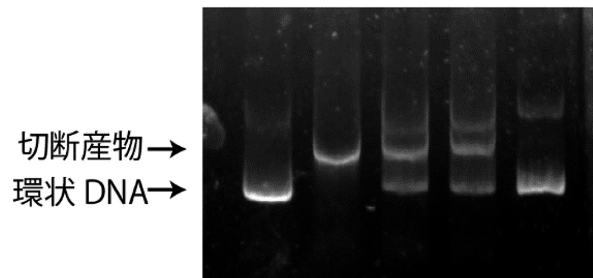


図10 DNA 高次構造体による DNA の保護

図中の Biotin-HU はビオチン提示 HU を，SA はストレプトアビジンを示す。

3.6. DNA 高次構造体による DNA の保護

ストレプトアビジンにより，DNA 上のビオチン提示 HU が多量体化し，DNA・タンパク質複合体が凝集した構造をとっていた場合，真核生物におけるヘテロクロマチンのように，他のタンパク質との相互作用を阻害すると考えられる。

そこで DNA，ビオチン提示 HU，ストレプトアビジンの三者複合体に制限酵素 *EcoRI* を反応させた後，SDS 存在下で熱処理をほどこすことで，タンパク質を変性・失活させた。これを電気泳動で分離したところ，ビオチン提示 HU と結合した DNA はほとんどに *EcoRI* によって切断された一方で，ビオチン提示 HU に加えてストレプトアビジンを加えた条件下では，DNA はほとんど切断されていなかった（図10）。この結果から，ストレプトアビジンによりビオチン提示 HU を多量体化することで，DNA 高次構造体が構築できることが示唆された。

4. 考察

報告されている立体構造情報に基づいて、HU の機能を損なうことなく、ビオチンを提示させることに成功した。また、四量体で働くストレプトアビジンを加えることで、DNA と HU の複合体の電気泳動における挙動が変わったこと、また制限酵素による切断が阻害されたことから、複雑な高次構造を形成することが示唆された。しかし、電気泳動の変化がストレプトアビジンによって分子量が大きくなった可能性もあり、また、制限酵素を用いた検証においてもストレプトアビジンによる制限酵素の阻害もみられているため、DNA、ビオチン提示 HU、ストレプトアビジンの三者によって高次構造が形成されていると断定するには不十分である。そのため、今後、単粒子解析等を用いて、複合体の大きさを定量化する必要がある。

本研究で構築している DNA と HU の高次構造体は、単純に密に DNA が折りたたまったものにすぎない。しかし、HU と別の酵素を融合させることにより、この高次構造体に酵素を容易に導入させることができ、任意の酵素が密集した液液相分離様の構造を設計できることが示唆される。また、液液相分離状態が酵素活性を向上させることも報告されているため、酵素と融合した HU を

DNA とストレプトアビジンによって凝集させることで、酵素による物質生産をより効率化することが期待される。

5. 謝辞

本研究は北海学園学術研究助成金を受けて実施された。

6. 参考文献

- 1) Guo, Q., Shi, X. & Wang, X.: RNA and liquid-liquid phase separation. *Noncoding RNA Res* **6**, 92-99 (2021).
- 2) Luo, J. *et al.*: LncRNAs: Architectural Scaffolds or More Potential Roles in Phase Separation. *Front Genet* **12**, 626234 (2021).
- 3) Fuller, G. G. *et al.*: RNA promotes phase separation of glycolysis enzymes into yeast G bodies in hypoxia. *Elife* **9** (2020).
- 4) Ura, T., Yoshida, T., Mikawa, T. & Shiraki, K.: Polymer-engineered condensates for enzyme activation. *Polymer Journal* (2025).
- 5) White, S. W., Appelt, K., Wilson, K. S. & Tanaka, I.: A protein structural motif that bends DNA. *Proteins* **5**, 281-288 (1989).