

カイコのヒストンメチル化酵素 Su(var)3-9 の精製

竹野奈津美¹⁾・光延仁志^{1), 3)}・門 宏明²⁾・李 在萬²⁾・
河口 豊²⁾・日下部宜宏²⁾

¹⁾九州大学大学院生物資源環境科学府, ²⁾九州大学大学院農学研究院, ³⁾日本学術振興会

(2008年12月8日受付; 2009年12月18日受理)

Purification of histone methyltransferase Su(var)3-9 in *Bombyx mori*

NATSUMI TAKENO, HIROAKI MON, HITOSHI MITSUNOBU, JAE-MAN LEE, YUTAKA KAWAGUCHI and TAKAHIRO KUSAKABE

Modulation of chromatin structure regulates many DNA metabolic events, such as transcription, genome integrity and recombination. Chromatin structure can be affected by histone modification. One of the best studied modifications is methylation by Su(var)3-9, which is a histone methyltransferase, at lysine 9 of histone H3 (H3K9) during heterochromatin formation. The silkworm, *Bombyx mori*, is known to have a unique holocentric centromere system, here, we isolated and characterized histone methyltransferase Su(var)3-9 from *B. mori*. Recombinant BmSu(var)3-9 protein from *Escherichia coli* formed inclusion body. Therefore, after the denaturation of BmSu(var)3-9 protein using urea, the denatured protein was purified through affinity chromatography and renatured by dialysis in the presence of L-arginine. Using renatured protein, we characterized the biochemical properties of BmSu(var)3-9.

Key words : Su(var)3-9, Histone methyltransferase, H3, Methylation, Inclusion body

緒 言

クロマチンの構造は、ゲノムの安定性や転写、組換えの制御において重要な役割を担っており、ヒストンの修飾状態に影響を受けている。特に注目されている修飾の1つがヒストンリジン残基のメチル化である (LACHNER et al., 2001)。Su(var)3-9 はヒストン H3K9 へ特異的にメチル基を付加する HMTase であり (REA et al., 2000), Su(var)3-9 によって K9 がメチル化されると、それをターゲットとしてヘテロクロマチンタンパク質 HP1 がリクルートされ、ヘテロクロマチンが形成される (EBERT et al., 2004; MAISON et al., 2004)。哺乳類のセントロメアは、ヘテロクロマチンを形成しているが、分散型動原体を有するカイコで、セントロメアがどのような DNA 配列を有し、また、どのようなタンパク質群がキネトコアを形成しているかは分かっていない。これまでにカイコ Su(var)3-9 を単離し、そのアミノ酸配列が活性ドメインにおいて生物間で高い相同性があることが確認されている (TAKENO et al., 2006)。そこで本研究では、カイコでのヘテロクロマチン形成の解析を行うため、カイコ Su(var)3-9 を精製し、機能解析を行った。

材料と方法

供試蚕：実験には九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター保存の w051 系統を用いた。

大腸菌発現用ベクター pET-Su(var)3-9 の作製：pET ベクターを gateway (Invitrogen) 対応ベクターに改変し、LR 反応を用いて Su(var)3-9 を組み込ん

だ。

大腸菌内における Su(var)3-9 タンパク質の発現：pET-Su(var)3-9 をエレクトロポレーション法によって大腸菌 rosetta 株に形質転換した。プレートに散布し、一晚培養した後に出てきたコロニーを 20 ml の LB 培地にて 37 °C で一晚培養した。そのうち 1 ml を 50 mg/ml のアンピシリンを含む 1 L の LB 培地に加え、37 °C でさらに 6 時間培養し、大腸菌が十分に増えたところで 1 mM IPTG を添加し、37 °C、3 時間タンパク質の発現誘導を行った。その後、大腸菌を回収した。

Su(var)3-9 タンパク質の変性：回収した大腸菌を 20 ml の 20 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl, コンブリート (Roche) に溶菌し、少量のリゾチム、PMSF を加えて液体窒素中で凍結させた。氷上で徐々に融解し、4 °C、8,000 rpm、20 分間遠心分離を行った。上清を取り除き、沈殿画分を 1 M Sucrose 溶液 20 ml に懸濁し、8,000 rpm で 20 分間遠心分離した後、沈殿画分を回収した。これに 2% Triton X-100, 10 mM EDTA 溶液 20 ml を加え懸濁し、8,000 rpm で 20 分間遠心した。再び 2% Triton X-100 溶液 20 ml により同様の操作を繰り返すことにより封入体を得た。そして、ペースト状の封入体を 8 M Urea を含む 50 mM Tris-HCl pH7.9, 500 mM NaCl 溶液 20 ml に溶解させ、8,000 rpm で 30 分間遠心した後、その上清画分を回収することにより封入体の変性を行った。

アフィニティークロマトグラフィーによる精製：平衡化バッファー (8 M Urea, 50 mM Tris-HCl pH7.9, 500 mM NaCl) により平衡化されたカラムにタンパク質溶液を供与し 10 ml の平衡化バッ

^{1), 2)} 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
Tel, Fax: 092-642-2842
連絡先: kusakabe@agr.kyushu-u.ac.jp

ファーでカラムを洗浄後、溶出バッファー（50 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl, 8 M Urea を含む溶液に 5 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM の imidazole をそれぞれ加えたもの）によって変性させた His タグ付きの組み換えタンパク質の溶出を試みた。精製したタンパク質は SDS-PAGE により確認した。

Slow dialysis 法による巻き戻し：タンパク質溶液と同様の尿素を含んだ組成の Buffer（Denaturing solution：8 M Urea 50 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DDT）と尿素を含まない Buffer（Renaturing solution：50 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl, 400 mM L-Arg-HCl）を準備した。Renaturing solution には凝集抑制剤として 400 mM L-Arg-HCl を加えた。蛋白質溶液を Denaturing solution に透析し、ポンプを用いて徐々に Denaturing solution と Renaturing solution を交換することで、蛋白質溶液中の尿素濃度を徐々に減少させ、最終的に 36 時間かけて尿素を除去し巻き戻しを行った（Fig. 1）。

HMTase 活性測定：Su(var)3-9 のヒストンメルトランスフェラーゼ活性を測るために Epigentek 社の EpiQuik™ Histone Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit (H3-K9) を用い、ELISA 法で確認した。

結 果

カイコ Su(var)3-9 を大腸菌内で発現させたところ、組換えタンパク質は封入体を形成し、不溶化した。そこで、尿素を用いてタンパク質を変性させ、Su(var)3-9 タンパク質を可溶化した。可溶化タンパク質を Ni カラムで精製し、Slow dialysis 法を利用してタンパク質の構造を巻き戻した（Fig. 1-A）。ELISA 法を用い、巻き戻された Su(var)3-9 タンパク質の HMTase 活性を測定したところ、H3K9 に対するメチル化活性を検出した（Fig. 2）。

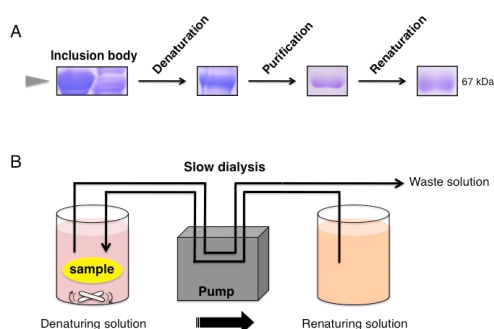


Fig. 1. A: Renaturation process of recombinant Su(var)3-9. B: The diagram of the slow dialysis method.

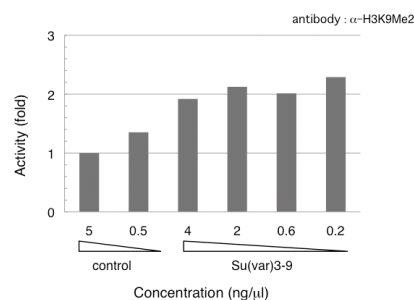


Fig. 2. The H3K9 methylation activity of renatured Su(var)3-9.

考 察

封入体に含まれている組換えタンパク質は本来の生理活性を有していないため、封入体を尿素で可溶化し巻き戻し操作によって活性型の組換えタンパク質を得た。ELISA 法を用いた解析により、巻き戻したカイコ Su(var)3-9 タンパク質は JENUWEIN, et al. (2000) の報告と同様に H3K9 メチル化活性を有していることが示唆された。しかしながら、可溶化した Su(var)3-9 タンパク質は非常に不安定であり、HMTase 活性が減少しやすく保存が困難であった。これは、不溶化タンパク質を強制的に可溶化させたために活性が持続しなかったためと考えられる。

摘 要

カイコの組換え Su(var)3-9 タンパク質は、大腸菌内で発現させると不溶化する。そこで尿素を用いて変性させ、slow dialysis 法で巻き戻し操作を行うことで、活性型の Su(var)3-9 タンパク質を得ることに成功した。しかし、その活性は持続的な活性ではなかった。

文 献

- EBERT, A., SCHOTTA, G., LEIN, S., KUBICEK, S., KRAUSS, V., JENUWEIN, T. and REUTER, G. (2004) Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes. Dev.*, **18**, 2973-2983.
- GREINER, D., BONALDI, T., ESKELAND, R., ROEMER, E. and IMHOF A. (2005) Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 143-145.
- KRAUSS, V., FASSL, A., FIEBIG, P., PATTIES, I. and SASS, H. (2006) The evolution of the histone methyltransferase gene Su(var)3-9 in metazoans includes a fusion with and a re-fission from a functionally unrelated gene. *BMC Evol. Biol.*, **2**, 6-18.
- LACHNER, M., O'CARROLL, D., REA, S., MECHTLER, K. and

- JENUWEIN, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- MAISON, C. and ALMOUZZI, G. (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, **5**, 296-304.
- REA, S., EISENHABEN, F., O'CARROLL, D., STRAHL, B. D., SUN, Z., SCHMID, M., OPRAVIL, S., MECHTLER, K., PONTING, C. P., ALLIS, C. D. and JENUWEIN, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- SCHOTTA, G., EBERT, A., KRAUSS, V., FISCHER, A., HOFFMANN, J., REA, S., JENUWEIN, T., DORN, R. and REUTER, G. (2002) Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO J.*, **5**, 1121-1131.
- WESTPHAL, T. and REUTER, G. (2002) Recombinogenic effects of suppressors of position-effect variegation in *Drosophila*. *Genetics*, **160**, 609-621.
- THORSTENSEN, T., FISCHER, A., SANDVIK, S. V., JOHNSEN, S. S., GRINI, P. E., REUTER, G. and AALEN, R. B. (2006) The Arabidopsis SUV4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9. *Nucl. Acids Res.*, **34**, 5461-5470.
- TAKENO, N., MITSUNOBU, H., YOSHIDA, H., MON, H., LEE, J.-M., KUSAKABE, T. and KAWAGUCHI, Y. (2007) Molecular cloning and characterization of histone methyltransferase Su(var)3-9 in *Bombyx mori*. *Entomotech*, **31**, 33-34.