

(研究題目) 一本鎖DNA結合蛋白質 (SSB) 及び基質複合体の高分解能X線解析
High Resolution X-ray Structures of Single Strand DNA Binding Protein (SSB)
and SSB- DNA complex.

(研究者) 研究代表者

佐藤孝雄 (Takao Sato) (University of Tokushima 徳島大学工学部助手)
協同研究者

森本幸生 (Yukio Morimoto) (University of Tokushima 徳島大学助教授)、

月原富武 (Tomitake Tsukihara) (University of Tokushima 徳島大学教授)、

永井宏樹 (Hiroki Nagai) (National Institute of Genetics 国立遺伝学研究所助手)、

嶋本伸雄 (Nobuo Shimamoto) (National Institute of Genetics 国立遺伝学研究所助教授)
abstract

The single strand binding protein in *E. coli* (SSB) is a tetrameric protein with 18,845Da subunits each consisting of 177 amino acids. SSB is essential for a number of fundamentally important processes such as replication, repair and recombination and so if we are to understand these processes in the atomic detail it will be essential that we determine the structure of SSB and how it interacts with DNA.

SSB Protein was purified by FPLC using a Mono Q column (Pharmacia), to greater homogeneity. The protein was crystallized by a modification of the small scale batch crystallization technique to exploit the temperature gradient of solubility. Needle-like crystals were dissolved by warming it to 37°C. For several weeks larger crystals of SSB can be grown at 15°C where the supersaturation is higher. The crystal form that diffract to high resolution (>2.8 Å) has been obtained. It is possible to trace the path of the main chain. Only the large amino acid side chains show up as discrete density peaks. We observed one native tetramer per crystallographic asymmetric unit, which is similar to a liquid state. A search for suitable heavy-atom derivatives is in progress on the native crystal of SSB. The qualities of the soaking crystals were checked by comparison of their diffraction patterns along the [100], [010], [001], and [110] directions with those of the native crystals. If any change of the diffraction patterns was observed (and cell dimension changes are not larger than 0.5%), the intensity data were collected beyond 6 Å resolution on a four-circle diffractometer and a difference Patterson map were calculated.

生理的条件下ではDNAは、複製、修復、転写、組換えといった過程で、不安定な一本鎖構造をとる。そこでこの一本鎖DNAに結合して安定化を行っているのが、一

本鎖DNA結合タンパク質（以下SSBと略す）である。大腸菌のSSBは117個のアミノ酸からなる18,845Daサブユニットをもつ4量体タンパク質である。この、複製、修復組換え、転写といった蛋白質合成過程に必須であるSSBのDNA認識機構を、分子レベルで解明するために重原子同型置換法を用いたX線結晶構造解析に着手した。ここで重原子同型置換法を用いるにあたって数多くの結晶を必要とするために、精製法の確立及び再現性のよい結晶化が重要となった。

〈大量精製系の確立〉

本研究では大腸菌（BL21(DE3)pLysS）から、SSBを抽出精製し、結晶化を行っている。まず、大腸菌を破碎した後に、数回の硫酸分画、アフィニティークロマトグラフィーカラム（フォスフォセルロース）で精製されたSSB標品をタンパク質濃度1%まで濃縮すると沈殿を生じた。この状態のサンプルはSDS-PAGEにおいて複数のバンドが確認された。更にSephacryl S-200を用いたゲルろ過を行った後に、強陰イオン交換体カラムであるMono Qを用いてクロマトを行ったところ、この標品は4つの分画に分れることができた。これらのSSB由来の分画は1:4:16:32の割合で存在し、お互いに経時的な平衡状態にあり、それぞれ溶解度が異なっていた（その差異は、分子の会合様式の違いによるものであることを突き止めた）。そのうちの電気泳動的に単一バンドを示す分画だけを結晶化に用いた。つまり均一性の高い結晶化標品を得ることができた

〈結晶化機構の解明と結晶化制御〉

再現性の高い結晶化条件を確定するためにその結晶化メカニズムを解明することは不可避である。そこで温度、イオン強度、タンパク質濃度の3成分と日数、イオン強度、タンパク質濃度の3成分における結晶化に及ぼす影響を調べるために相図を作成し条件の最適化を検討した。その結果、前者において、急激に溶解度の低下する近傍にテラスが突き出たように溶解度がほとんど変化しない領域の存在を見出した。次に後者において温度変化に対応し溶解度が緩やかに変化させるには300mMのNaCl添加が必須であることを見出した。こうして結晶化のメカニズム解明により結晶成長を制御することが可能になった。その結果、決定された最適条件は、タンパク質濃度7mg/ml、50mM Tris-HCl緩衝液pH9.0、沈殿剤として300mM NaClと300mM 硫酸アンモニウムを添加し、4℃で放置し微結晶を析出させてから、37℃に一気に昇温させて溶解度を上げてから15℃で2カ月静置することである。これは2.8Åという高分解能に回折する単結晶を再現性よく得る析出させることに成功した。この結晶なら、SSBの構造モチーフのみならず、嵩高い側鎖までなら認識できるはずである。結晶中でも溶

液状態と同じ4個のサブユニット、つまり1分子からなりパッキングしていた。この条件検索法は、統計的に広範な条件範囲の検討が可能であり、結晶化点を見出すと言うよりは、むしろそれを線又は面と言った多次元に拡張し、迅速にかつ的確に結晶化条件の最適化に有効であることを示したといえる。

《SSB-DNA複合体結晶の調製》

DNA複合体結晶を調製するのに好都合な液性を保持した結晶化条件を見出したことになる。上記の条件で析出させた結晶に対し、1～3時間でストック溶液中で脱塩後、短い8merの合成DNA (5'-GGCATCTC-3')を浸漬してSSB-DNA複合体結晶を得ることができ、回折パターンに有意な強度変化が見い出されたのでSSB自体の構造決定ができれば、一度にDNAとの分子認識機構を決定することが可能性が高くなった。

《多型結晶化の挑戦》

また、重原子同型置換法を適用するには酸性側で結晶化した方が有利である。なぜなら重原子の導入を行いタンパク質分子にマークを付けることが必要になる。従って酸性側の緩衝液なら数多くの重原子試薬が溶解しより良い条件を見だしやすいためである。そこで酸性側で結晶化条件の検索を行ってみたところ、緩衝液に酢酸ナトリウムpH3.4を用い、硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール(PEG)等を用いた結果、数種類の沈澱剤で針状結晶を、ギ酸ナトリウム、タートレイトカリウムナトリウムによってひし形の結晶を得ることができた。

《重原子同型置換法の適用》

現在、これらの結晶を用いて、構造解析が進行中である。すなわち重原子同型置換法によって位相を決定するために重原子誘導体の検索を行っている。目下、5種類の重原子試薬を浸漬し (SmCl₃, HgAc₂, PbI₂, Pt(NH₂)₂(NO₃)₂, PtNH₂(CH₂)₂CL₂等) 得られたそれらの誘導体結晶はネイティブ結晶と比較し、有意な回折強度変化を示したが、格子定数はネイティブのそれと大きく変わらなかった。結晶の同型性は保持されており、目下これらの回折強度データを用いて構造解析が進行中である。

- ①平成5年 3月31日～4月1日 徳島大学薬学部、中四国支部生化学会 口頭発表
- ②平成5年10月12日～14日 名大情報文化学部、日本生物物理学会年会 口頭発表。
- ③平成5年12月16日～19日 幕張メッセ、日本分子生物学会 ポスター発表。