

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 9日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22370036

研究課題名（和文）

II型制限酵素HindIIIの時分割結晶構造解析

研究課題名（英文）

Time-resolved structure analysis of type-II restriction endonuclease HindIII

研究代表者

渡邊 信久 (WATANABE NOBUHISA)

名古屋大学・シンクロトン光研究センター・教授

研究者番号：70212321

研究成果の概要（和文）：

遺伝子実験に広く使用されているII型制限酵素 *HindIII* の基質 DNA の切断反応のメカニズムを解明するため、*HindIII* の基質 DNA 複合体の結晶を作成し、金属イオンをソーキングして一定時間後に急速凍結するフリーズトラップ法による時間分割結晶構造解析を行った。*HindIII* の切断反応には2つの金属イオンが必須であり、2つめの金属イオンが結合して始めて切断反応が起こることが解明された。

研究成果の概要（英文）：

We have performed the time-resolved X-ray crystal structure analysis of a type-II restriction endonuclease *HindIII* using the freeze trap method. Crystals of *HindIII* and its cognate DNA complex were soaked in a solution containing metal ion, and flash-frozen to stop its reaction after the elapse of a certain period of time. In the reaction, two metal ions are necessary, and the scission reaction takes place after binding of the second metal ion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：蛋白質結晶学

科研費の分科・細目：生物科学，構造生物化学

キーワード：X線，結晶構造解析，制限酵素，反応機構，時間分割，フリーズトラップ

1. 研究開始当初の背景

II型制限酵素は、それぞれに特異的なパリンδροームを認識して特定の位置で切断するため、遺伝子工学の実験にツールとして広く利用されている。核酸の切断・修復を行う酵素では「2金属イオンメカニズム」が提唱されており、代表者らによって解析された

HindIII の構造でも、切断後の DNA との複合体の活性中心に2個のイオンが結合している状態で解析されていた。

一般に求核攻撃をする水分子を活性化する金属を A サイト、3' 脱離リン酸に配位している金属を B サイトと呼ぶ。それらの役割に関しては、これまでに10年以上の研究が蓄積されており、通常の「2金属イオンメカ

ニズム」では、Bサイトの金属イオンは遷移状態の安定化に関与しているとされているが、*HindIII*の場合もBサイトの金属は、切断反応が完了した後に結合したものではないか、X線結晶構造解析実験のアーチファクトであろうと指摘される等、反応に必要な金属イオンの数および役割についてはいまだに混乱があった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らがDNA切断前後の状態を構造解析していた*HindIII*をモデル酵素とし、フリーズトラップ法を用いて実際のDNA切断反応過程の時分割結晶構造解析を行い、核酸切断の「2金属イオンメカニズム」の2つの金属イオンの真の役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では*HindIII*と基質DNAとの複合体結晶を作成し、それに金属イオンを結晶ソーキングによって導入してDNA切断反応を起す。その反応過程を時分割で結晶構造解析するため、瞬時にタンパク質結晶周辺の溶液を交換し、秒オーダーの時間経過後にそのままフリーズトラップすることが可能な装置を開発した。

一方、単純な結晶構造解析と異なり、時間分割実験には*HindIII*と基質DNAの良質な複合体結晶が大量に必要である。さらに結晶性を低下させることなく金属イオンを導入することが出来る溶液条件および結晶化条件を検討する必要がある。本課題の当初の2年間は反応機構の研究に十分な分解能の結晶を再現性良く得ることが出来ず、既知の条件の改良と平行してスクリーニングによる結晶化条件の再検討を行った。初期結晶が生成した条件については、さらに沈殿剤濃度、pH、塩強度のほか複合体形成のための*HindIII*とDNAの混合比を検討した。

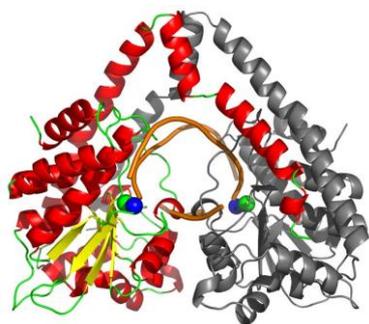


図1. *HindIII* 二量体と切断後の基質DNA複合体の構造. 青: Mg^{2+} , 緑: Mn^{2+} .

本研究では、得られた結晶を金属イオンを含む抗凍結剤に短時間ソーキングしたのち、100Kの低温窒素気流により急速冷却することで反応を停止し、時分割の測定を試みる。これまでに解析されていたDNA切断後の構造では、Aサイトにマンガンイオン、Bサイトにマグネシウムイオンが結合した状態で構造解析されていた(図1)。そのため、本研究ではマンガンイオンの濃度とソーキング時間を変化させて、反応の進行を捉えることが出来る条件を模索した。*HindIII*のDNA切断反応の場合、反応の進行を分光法等の物理計測でモニターする手段が無いので、構造解析してみるまで反応進行状況が不明であり、完全に試行錯誤によった。急速凍結した結晶のX線回折データ測定は高エネルギー加速器研究機構のPF-BL-5AおよびPF-AR-NE-3Aで行った。構造解析は*HindIII*-DNA複合体結晶の構造による分子置換法を用いた。

4. 研究成果

(1) フリーズトラップ法用短時間溶液交換装置の開発

従来研究代表者が、蛋白質中に含まれるイオン原子の異常散乱を利用して位相決定する構造解析法であるS-SAD法用に開発していたWestBond社製3軸マイクロマニピュレーター結晶マウントツール(7100C)を改造し、結晶化ドロップから結晶を拾い出して保持し、ピエゾポンプで金属イオンを含む微量溶液を添加し、それから一定時間経過後に100Kの冷却窒素ガスで急速凍結して反応を停止する装置を製作した(図2)。

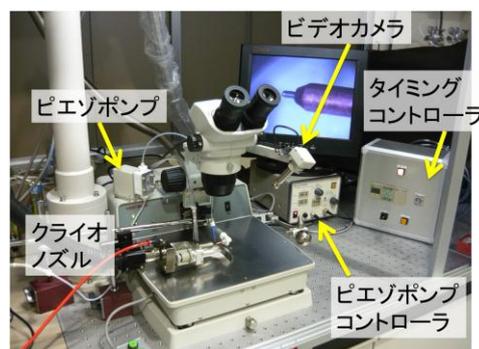


図2. フリーズトラップ用時分割フラッシュクーリング結晶マウント装置

(2) *HindIII*の時間分割結晶構造解析 *HindIII*-DNA複合体の結晶化

本研究での結晶化条件の再検討により、以前と異なるパッキングの *Hind*III-DNA 複合体結晶構造が得られた (図 3). *Hind*III は二量体を形成し、一本の 2 本鎖 DNA と結合していた. 非対称単位中にはこの二量体が 2 つ存在し、四量体を形成していた. さらに非対称単位中には、*Hind*III と結合していないフリーの DNA 二本鎖が二つあり、それぞれが *Hind*III と結合した DNA に継ぎ足される形で存在していた. この非結合 DNA の配置は、我々が以前に報告した *Hind*III-DNA 結晶構造における非結合 DNA の配置とは異なっていた. 今回得られた結晶構造では *Hind*III に結合した DNA と非結合 DNA が直線状に繋がることにより、結晶中を縦貫する構造になっており、これが骨格となることで結晶析出の再現性を高めたと考えられる. ただし、このため結晶のパッキングがゆるく、分解能は 2.2 Å 程度が限界であった.

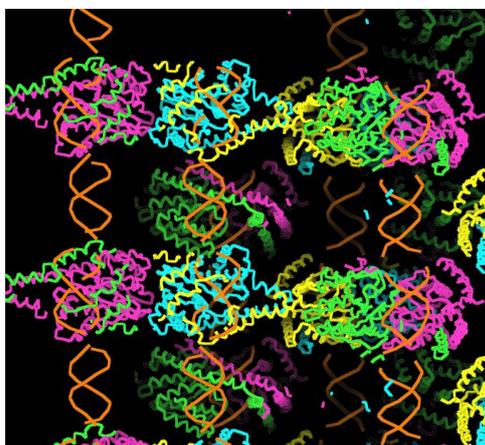


図 3. *Hind*III-DNA 複合体の結晶構造

マンガンイオンの導入

より低濃度で実験が行えるため、金属イオンとしてはマグネシウムではなくマンガンイオンを用いた. そのソーキング時間を 0 秒, 25 秒, 40 秒, 60 秒, 230 秒と変えて結晶構造解析することで、*Hind*III の DNA 切断反応を時分割で追跡することに成功した. 図 4

表 1. 金属イオンのピーク高さ
単位は差電子密度マップの σ 値

		0秒	25秒	40秒	60秒	230秒
分子A	Aサイト	11.6	22.8	24.0	31.8	31.0
	Bサイト	11.2	10.2	14.7	19.2	29.8
分子B	Aサイト	9.8	20.0	22.0	31.8	33.3
	Bサイト	13.1	8.1	8.1	22.7	33.1
分子C	Aサイト	11.1	20.2	20.2	29.3	32.1
	Bサイト	11.4	6.8	6.8	19.3	28.3
分子D	Aサイト	11.7	20.2	20.2	28.8	31.4
	Bサイト	12.1	8.6	8.6	16.8	31.2

に金属イオン付近の差電子密度マップを示す. ソーキング時間が長くなるとともに、活

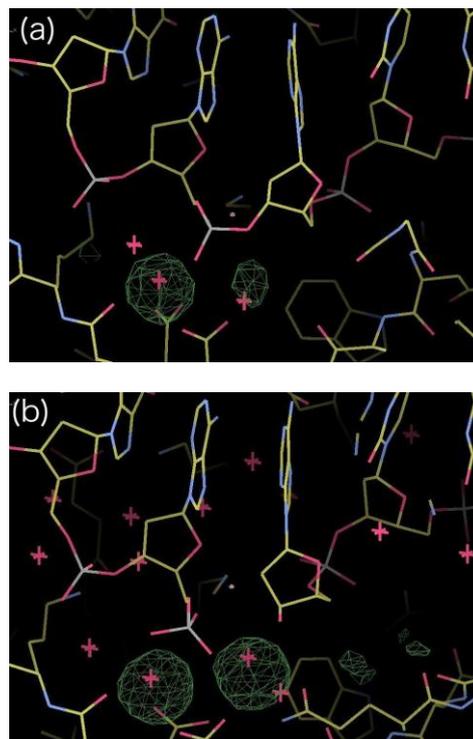


図 4. 活性部位の金属イオンの差電子密度マップ. (a) 25 秒後, (b) 230 秒後. 電子密度表示の閾値は 6σ .

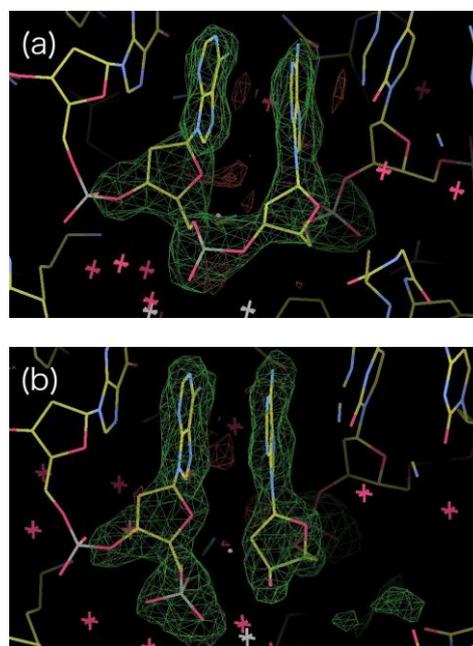


図 5. 切断されるホスホジエステル結合をはさむ 2 塩基部分の差電子密度マップ. (a) 25 秒後, (b) 230 秒後. 電子密度表示の閾値は 5σ .

性部位の金属イオンのピークが増大することが観察された。しかもその増大はAサイトがBサイトに先行していた。

各ソーキング時間における活性部位の金属イオンピークの高さを、非対称単位中の4分子それぞれについてまとめたものを表1に示す。Aサイトのピークは25秒後から、Bサイトのピークは40秒後に増加を開始しており、230秒後には二つのサイトのピーク高さはほぼ等しくなった。マンガンイオンをソーキングしなかった0秒後に見られるナトリウムイオン由来と思われるピーク高さを差し引くと、25秒後の時点ではBサイトにはマンガンイオンはまだ導入されていないものと考えられる。

触媒反応の進行の直接観察

上記の時間間隔で実施したフリーズトラップ法による時分割構造解析により、DNA切断反応の進行を直接その場観察することに成功した。図5に切断されるホスホジエステル結合をはさむ二つの塩基の差電子密度マップの時間変化を示す。

図4および表1に示すように金属イオンのピークが成長してくるのと同様に、切断さ

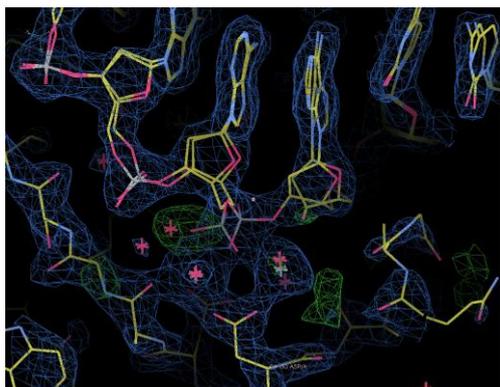


図6. 60秒後の2Fo-Fcマップ(青)とFo-Fcマップ(緑). 位相計算のためのモデルには切断されていないDNAを用い、切断されたDNAモデルも重ねて表示している。

れるホスホジエステル結合をはさむ二つの塩基の差電子密度マップには、40秒後までは変化が見られないが、60秒後のマップでは結合の部分の電子密度が低くなっていることが観察された。さらに230秒後においては、この結合はほぼ失われていた。

60秒後の結晶構造では、DNAが切断されていない構造と、切断された構造がいくらかの割合で混ざっていると考えられる。実際、切断されていないDNAモデルを構築して差マップを作成すると、リボースからの水酸基がDNAの切断によって自由になり、配位位置を変えていると思われる電子密度を検出できた(図6)。このような電子密度は40秒後には現れないため、ソーキング開始40秒後か

ら60秒後の間に切断反応は始まると考えられる。そのタイミングは、Bサイトにマンガンイオンが導入され始めるタイミングに近い。

以上のように、本研究でフリーズトラップ法による時間分割構造解析を実現した結果、従来HindIIIのDNA切断後の結晶構造に観られていたBサイトの金属イオンは構造解析のアーチファクトではなく、DNA切断反応に必須であることが解明された。Aサイトの金属イオンが求核攻撃する水分子を活性化し、Bサイトの金属イオンは遷移状態の安定化と、切断後のDNAのリリースにも関与していることが示唆される。

現在論文を準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

現在投稿論文準備中

[学会発表] (計4件)

- ① Kawamura, T., Kobayashi, T. and Watanabe, N.: Time-resolved structure analysis of restriction endonuclease Hind III, International Conference on Structural Genomics 2013 - Structural Life Science (2013. 7. 29-8. 1) Keio Plaza Hotel Sapporo.
- ② 小林朋希, 河村高志, 渡邊信久: II型制限酵素Hind IIIの反応メカニズムと2価金属イオン, 日本結晶学会年会(2012. 10. 25) 東北大学片平キャンパス
- ③ 小林朋希, 河村高志, 渡邊信久: Hind III-cognate DNA複合体の新規結晶化条件とフリーズトラップ法のための装置開発, 日本蛋白質科学会年会(2011. 6. 7-9) ホテル阪急エキスポパーク
- ④ 渡邊信久, 小林朋希, 河村高志: フリーズトラップ用時分割フラッシュクーリング結晶マウント装置の開発, 日本結晶学会年会(2010. 12. 5) 大阪大学コンベンションセンター

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 信久 (WATANABE NOBUHISA)

名古屋大学・シンクロトン光研究センター・教授

研究者番号：70212321

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし