

# ヒト p53 蛋白質 DNA 結合ドメインの結晶性評価 Evaluation of crystal quality of human p53 protein DNA binding domain

山田太郎

茨城大学 iFRC, 〒319-1106 那珂郡東海村白方 162-1

Taro Yamada

iFRC Ibaraki University, 162-1 Sirakata, Tokai, 319-1106, Japan

## 1 はじめに

p53 蛋白質は DNA 修復、細胞増殖、アポトーシスの制御に関係するがん抑制蛋白質である。この中性子回折実験の可能性を探るために p53 蛋白質の DNA 結合ドメイン p53DBD(94-293)結晶の評価を X 線結晶構造解析により行った。

## 2 実験

Kitayner らの報告に従い結晶化を行った[1]。大腸菌発現系から得られた p53DBD と回文構造をもつ DNA 2 重鎖 CGG GCA TGC CCG を 1:1.2 で混合した。結晶化はハンギングドロップ法により 20 °C で行った。20% PEG4,000、100 mM NaCl、100 mM MES pH 6.0 の結晶化条件で空間群 P1 の板状結晶が得られた。空間群 C2 の棒状結晶は PEG 3,350、300 mM NH<sub>4</sub>F、10% Ethylene Glycol、100 mM HEPES pH7.5 溶液より得られた。X 線回折実験は PF BL-5A にて 100K で行った。構造精密化はプログラム PHENIX ver. 1.8 と COOT ver. 0.7 を用いて行った。

## 3 結果および考察

表 1 に 2 つの多形の結晶学的データの一部を示す。

P1 型結晶の非対称単位には独立な分子が 4 つ存在する。一方 C2 型結晶では 1 分子が独立である。分解能で見ると、P1 結晶よりも C2 結晶のほうが結晶性がよい。実際に P1 結晶は薄い板状結晶であり、中性子回折実験用の大きな結晶を育成することは困難であった。

表 1: p53DBD DNA 複合体結晶多形

空間群	P1	C2
Z	4	4
分解能 Å	1.6	1.1
R <sub>merge</sub>	0.054	0.064
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0.21/0.23	0.18/0.19

P1 型および C2 型結晶中で p53DBD は 4 量体を形成して 2 本の DNA 2 重鎖と結合している。2 つの結晶中では DNA の構造が異なっている[1]。P1 型結晶中の DNA 2 重鎖では、一方のポリヌクレオチド鎖の 1-12 番目の塩基が別の鎖の 12-1 番目の塩基と対を作っている。それが上下に積み重なって 1 本の DNA 2 重鎖を模した構造を取っている。ただし

p53DBD 4 量体の外側にあるポリヌクレオチド部分は乱れていて結晶全体にわたる DNA 2 重鎖は観測されなかった。一方 C2 型結晶では両方のポリヌクレオチド鎖の 11 番目と 12 番目の CG 塩基は塩基対を形成せずに乱れている。その代わりに結晶の対称性で関係づけられる別のポリヌクレオチド鎖の 1 番目と 2 番目の CG 塩基が塩基対を形成してつながり、結晶全体にわたる DNA 2 重鎖を形成している(図 1)。この DNA の構造の違いが 2 つの結晶性に影響していると考えられる。C2 型結晶の結晶化には NH<sub>4</sub>F の添加が必要であるが、これは DNA 2 重鎖の末端の塩基対の形成を阻害するためと予想される。このことから 11 番目と 12 番目のヌクレオチドを除いてあらかじめ DNA 2 重鎖に突出末端を持たせるなどの変更を加えることにより、効率よく C2 型結晶を形成させることができるのではないかと考えている。

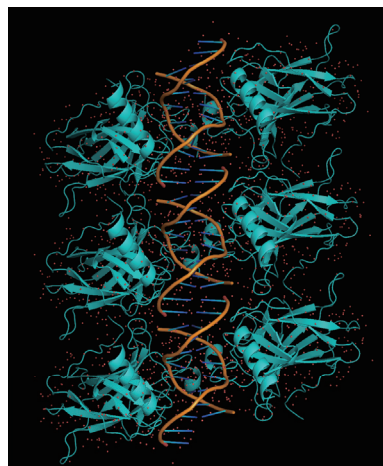


図 1 : p53DBD と 12bp dsDNA の C2 型結晶構造。

## 4 まとめ

現段階では結晶サイズの問題で p53 蛋白質の中性子回折実験を行うことは現実的ではないが、DNA 2 重鎖の設計により結晶性を変化させるという方針が得られた。

## 参考文献

[1] M. Kitayner *et al.*, *Nat Struct Mol Biol* **17**, 423 (2010).

\* taro@mx.ibaraki.ac.jp