

制限酵素 *Hind*III の時分割結晶構造解析Time-resolved crystal structure analysis of restriction endonuclease *Hind*III河村高志<sup>2</sup>, 小林朋希<sup>1</sup>, 渡邊信久<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>名古屋大学工学研究科, 〒464-8603 名古屋市千種区不老町<sup>2</sup>名古屋大学シンクロトロン光研究センター, 〒464-8603 名古屋市千種区不老町Takashi Kawamura<sup>2</sup> and Tomoki Kobayashi<sup>1</sup> Nobuhisa Watanabe<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603, Japan<sup>2</sup>Synchrotron Radiation Research Center, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603, Japan

## 1 はじめに

制限酵素は原核生物のもつ防御因子であり、現在遺伝子工学に欠かせないツールでもある。その DNA 切断反応は、加水分解によるリン酸エステル切断反応である。これを触媒する制限酵素のメカニズムは、結晶構造解析の結果からいくつか提案されている。特に、結晶構造中に金属イオンが見出されることの多い二つのサイト (A サイト, B サイト) があり、二つのサイトが切断反応に必要なのか、制御に必要なのか不明であった。

われわれは、*Hind*III・DNA 複合体の結晶を用いて、制限酵素の反応メカニズムの解明を試みた。具体的には、金属イオンを含んだ抗凍結剤に *Hind*III 結晶を浸すことにより、結晶内で反応を進行させる系を作成し、浸してから凍結までの時間を制御することで、反応の進行を時分割した構造解析を行った。

## 2 実験

*Hind*III の時分割測定のためには、複数個の結晶が、活性部位の構造を検討できる程度の質で得られることが必要であった。このため、*Hind*III の結晶化条件の再検討を行った。得られた結晶を、いくつかの濃度の  $MnCl_2$  を含んだ抗凍結溶液に対し、ソーキング時間をさまざまに変えて、凍結して X 線回折測定を行った。位相決定は、*Hind*III の構造をモデルにした分子置換法を用い、2.0~2.5 Å 程度の分解能で構造を決定した。

## 3 結果および考察

結晶の質の再検討の結果、以前のパッキングの結晶は再現性が得られず、新しいパッキングの結晶を用いた。非対称単位中には *Hind*III・DNA 複合体の 2 量体が更なる 2 量体を形成し、さらに *Hind*III と結合していない DNA が、結合している DNA に連なって結晶中を貫く形となっていた。抗凍結剤に含まれる  $MnCl_2$  濃度は 1mM 程度が反応制御に容易であった。この濃度で、ソーキング時間 25 秒, 40 秒, 60 秒, 230 秒後および  $MnCl_2$  を含まない条件 (0 秒後) での構造を決定した。

活性部位には、 $Mn^{2+}$  イオンと思われるピークがあり、ソーキング時間が長いほどピークは大きくなった。ピークは A サイトで 25 秒後から増大し、B サイトで 40 秒後から増大した。230 秒後には両サイトのピーク高さは同程度であった。また DNA が切断されたことを示す電子密度が、60 秒後には観測され始め、230 秒後には完全に切断されていた。この切断反応に使われた水分子は、40 秒後の結晶構造中では  $Mn^{2+}$  イオンに配位して、 $S_N2$  反応の立体配置に観測されていた。

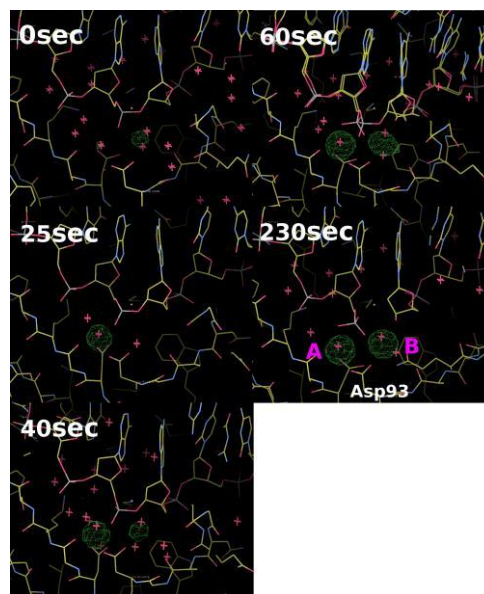


図1：活性部位における金属イオンの電子密度差マップの時間変化

## 4 まとめ

*Hind*III の DNA 切断反応が、 $Mn^{2+}$  イオンが B サイトに検出されてから開始されたことから、この実験結果は金属イオンが二つ必要である 2 金属反応モデルを支持している。詳細な解析は進行中である。

\* nobuhisa@nagoya-u.jp