

## 制限修飾系メチル化酵素 *M.HindIII* の構造解析 Structural analysis of restriction-modification system methyltransferase *M. HindIII*

河村高志<sup>1,\*</sup>, 渡邊信久<sup>1,2</sup>

<sup>1</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

<sup>2</sup>名古屋大学工学研究科, 〒464-8603 名古屋市千種区不老町

Takashi Kawamura<sup>1,\*</sup> and Nobuhisa Watanabe<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Synchrotron Radiation Research Center, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603, Japan

### 1 はじめに

制限修飾系は制限酵素と修飾酵素で構成され、原核生物の防御因子として知られている。制限酵素は、外来 DNA を切断することにより進入を防ぐとされ、その配列認識特異性から、遺伝子工学実験のツールとして利用されてきた。他方修飾酵素は、制限酵素が働く前に自らのゲノム DNA にメチル化修飾を施し、保護する役割を担うとされている。二つの酵素はセットで働く必要があり、とくに修飾酵素の働きが失われるとその生物は死んでしまう。じっさい、制限酵素を遺伝子組換えにより大量発現する際には、修飾酵素の共発現が必要である。

修飾酵素は、制限酵素と同様、DNA 配列を認識する分子であるが、いままでに制限酵素との配列認識を比較された例はなかった。本研究では、制限酵素 *HindIII* に対応する修飾酵素 *M. HindIII* の構造解析を行い、制限酵素との配列認識の種類や、特異性について構造から検討することを目的とした。

### 2 実験

修飾酵素 *M. HindIII* は、*HindIII* 発現用プラスミドに組み込まれていた遺伝子を、新たなプラスミドに組み込んで大量発現させた。C-末端 His-tag 融合型たんぱく質として精製し、結晶化条件のスクリーニングを行った。得られた結晶を回折測定に用いた。位相決定には *M. RsrI* の立体構造をモデルにした分子置換法を用いた。

### 3 結果および考察

*M. HindIII* は低塩濃度条件化では不安定であり、大量発現後の大腸菌からの抽出には500 mM の NaCl を含む溶液として扱い、陽イオン交換の際には150 mM まで NaCl 濃度を低下させる代わりに、10% v/v glycerol を添加した。PEG を沈殿剤とした結晶化条件で *M. HindIII* 結晶は油滴生成のち結晶化した。X 線回折測定の結果、2.4 Å の回折データを得た。分

子置換のモデル構造は、配列相同性が21%と低かったものの、モデル構築と精密化と位相改良を繰り返して、50残基程度のディスオーダー領域を除いて構造決定した。

*M. HindIII* は結晶の非対称単位中に、2分子存在し、2量体を形成していた(図1)。この折りたたみは、制限修飾系の修飾酵素の中ではβ型に属し、この酵素群に特徴的である TRD ドメインが保存されており、DPPY モチーフ、FxGxG モチーフが近接して活性部位を形成していると予想された。類似構造はモデルとして用いた *M. RsrI* のほか、*M. MboIIA*、*M. PvuII* などのβ型の修飾酵素があった。

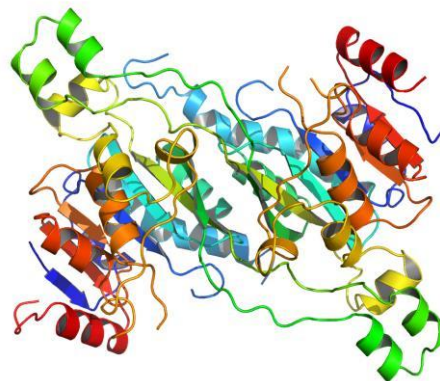


図1：非対称単位中の *M. HindIII* 2量体

### 4 まとめ

β型の修飾酵素は未だに DNA 結合型の結晶構造は決定されておらず、*M. HindIII* の DNA 複合体構造の決定を今後も目指す。また、既知の構造との比較から DNA 認識について考察するためには、他のαおよびγ型の修飾酵素との比較が必要である。

\*t.kawamura@nusr.nagoya-u.ac.jp