

制限酵素を「創る」ことは可能か？

鳥取大学工学部生物応用工学科 喜多恵子

現在までに、約10,000種もの細菌について制限酵素活性がスクリーニングされているが、まだ認識する酵素が報告されていない配列が数多く存在している。たとえば、AATTを認識する酵素は発見されていない上に、この配列を認識する酵素を選択的にスクリーニングする方法も今のところない。それでは、既存の制限酵素のアミノ酸を修飾あるいは置換することで、新たな特異性をもつ酵素を「創る」ことはできないだろうか？ そのためには、制限酵素の塩基配列認識機構を理解しておく必要があるが、DNA結合タンパク質として興味深い対象であるにもかかわらず、その作用機構はほとんど知られていない。しかし、約60種の制限酵素遺伝子がすでにクローニングされ、いくつかの酵素については結晶構造解析も進んでおり、認識および切断に関するアミノ酸残基が徐々に解明されつつある。ここではもっとも詳細に研究されているEcoRIについて、DNAとの相互作用がどの程度解明されているかについて紹介し、あわせて制限酵素の特異性の改変は可能かどうかについて述べてみたい。

EcoRIは、DNA上のGAATTC配列を認識し、 Mg^{2+} 存在下でGとAの間を切断する酵素で、277個のアミノ酸残基から成る分子量約31 kDaのサブユニットから構成される二量体として作用する。その遺伝子構造はごく早い時期に明らかにされており、基質DNA・酵素複合体のX線結晶構造解析の結果、 α -ヘリックスのN末端側に位置するArg200が認識配列中のGと、これとは別の α -ヘリックスのN末端側に位置するGlu144とArg145がおのおのAと水素結合を形成していることが明らかになった。¹⁾ Glu144とArg145は塩基の認識だけではなくサブユニット間の相互作用にも関与している。これらの α -ヘリックスは、多くのリプレッサータンパク質で報告されているようなヘリックス・ターン・ヘリックス構造はとっていない。最近、EcoRIのDNA結合ドメインと、c-mycタンパク質のDNA結合ドメインのアミノ酸配列の間に相同性が存在することが報告された。²⁾ Arg200を19種すべてのアミノ酸に置換した変異酵素のうち、Lys置換体は親株と同等の活性を、Cys, Val, Ser置換体はGと水素結合を形成できないにもかかわらず親株と同一の配列を認識した。Pro, Trp置換体を保持する大腸菌はEcoRIメチラーゼの有無に関わらず生育阻害を示したことから、これら変異酵素が親株とは異なる配列を認識することが期待されたが、残念ながら*in vitro*での活性は検出されず、生育阻害は別の理由によると考えられている。³⁾

制限酵素による反応は、①塩基配列の認識と結合、それに伴う構造変化、② Mg^{2+} の結合による構造変化、③切断、の順に起こるとされている。ランダム変異の結果、Gly93, Glu96が Mg^{2+} との結合に、Glu111が切断活性に関与していることが示唆された。ウン臓由来のDNaseIでは、Glu-His- H_2O のプロトンリレーで生じたOH⁻がPを求核攻撃し、P-O-3'結合が切断されるモデルが提唱されている。⁴⁾ しかし、EcoRIではHisの変異株は得られておらず、切断機構の詳細は不明である。EcoRIと同一配列を認識して切断する制限酵素RsrIでも、以上述べたような活性に関与するアミノ酸残基は非常によく保存されているが、⁵⁾ 切断機構には差があることが報告されている。⁶⁾

これらの結果は、制限酵素が塩基配列を認識する際、アミノ酸側鎖と塩基間の水素結合の形成だけではなく、塩基配列に依存するDNAの立体構造の認識も必要であることを示しており、リプレッサータンパク質で報告されているような、1個のアミノ酸置換で認識特異性を改変することは困難であることを示唆している。さらに、認識特異性が変化した制限酵素が変異の結果生じたとしても、その制限酵素による切断から保護するメチラーゼが共存していない場合、宿主の染色体DNAは新たな特異性を持つ制限酵素で切断されるため、細菌は死滅してしまう。したがって、特異性が変化した制限酵素が*in vivo*で触媒活性を示すためには、メチラーゼも変異しなければならない。新たな特異性を持つ制限酵素が偶然に出現する確率は非常に低いだろう。しかし、メチル化の制約のもとで新たな特異性を付加することは、必ずしも不可能ではなく、今後さらに多くの制限修飾酵素遺伝子がクローニングされ、結晶構造に関するデータが蓄積されれば、系統的に特異性を改変したり、任意の配列を認識する酵素を「創り出す」ことも可能になると予想している。

- 1) McClarin, J. A. *et al.*: *Science*, **234**, 1526 (1986).
- 2) Halazonetis, T. D. *et al.*: *Science*, **255**, 464 (1992).
- 3) Needels, M. C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3579 (1989).
- 4) Suck, D. *et al.*: *Nature*, **321**, 620 (1986).
- 5) Stephenson, F. H. *et al.*: *Gene*, **85**, 1 (1989).
- 6) Aiken, C. R. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **266**, 19070 (1991).