

**枯草菌制限修飾系遺伝子 *BsuM* の分子遺伝学的解析**

Molecular genetical analysis of the intrinsic restriction-modification  
system genes, *BsuM*, of *Bacillus subtilis*.

**総合研究大学院大学 生命科学研究科 遺伝学専攻**

**大島英之**

**2001 年**

## Abstract

Many microorganisms prevent phage or plasmid infection by digesting its unmethylated DNA with restriction endonuclease, which recognizes specific target sequence on incoming DNA. In order to maintain the integrity of the chromosome, they also possess modification methylase that recognizes and methylates chromosomal DNA at the same target sequence as restriction endonuclease recognizes. Methylated chromosomal DNA is no more susceptible to restriction endonuclease. A set of genes of restriction endonuclease and modification methylase is called restriction modification (RM) system genes.

Since the early investigation of the RM system by Luria, Arber, Messelson et al, lots of restriction modification systems have been found in various kinds of microorganisms and they were studied mainly on their enzymatic mechanisms.

The research on RM system in *Bacillus subtilis* was started by Shibata and Ando in 1970's. They revealed that *B. subtilis* Marburg strain 168 has only one RM system genes, named *BsuM*. The chromosomal location of the *BsuM* was determined by Saito et al, and mutant strain RM125 was isolated by Uozumi et al, which lacks both restriction and modification activities. Further, The recognition sequence of *BsuM* was determined by Bron et al, as CTCGAG. This sequence is the same as the recognition sequence of *XhoI* restriction enzyme. However, the sequence and components of *BsuM* genes and their products were remained unknown.

In the genome sequencing project, Kasahara et al, revealed that *B. subtilis* Marburg 168 has only one orf, *YdiS*, the predicted product of which is homologous to restriction enzyme, and two orfs, *ydiO* and *ydiP* whose presumed products are homologous to the cytosine-specific DNA methyltransferases. They were found in the prophage 3 region between *groESL* operon and *gut* operon, where classical *BsuM* mutations were located.

PCR analysis revealed that the classical RM mutant strain RM125 is lacking the prophage 3 region (13kbp) containing five genes, *ydiO*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS* and *ydjA*.

Disruption of *ydiO* or *ydiP* genes required disrupted *ydiR*, *ydiS* or *ydjA*. Interestingly, two novel genes, *ydiR* and *ydjA*, that locate upstream and downstream of the *ydiS* gene had to be disrupted to disrupt *ydiO* or *ydiP*.

Northern analysis showed that the *ydiO*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS* and *ydjA* genes constitute two operons, the *ydiO-ydiP* operon and the *ydiR-ydiS-ydjA* operon, expressing during logarithmic phase of growth. The *ydiO-ydiP* operon was also transcribed by a read through mechanism from the *groESL* operon, which is the upstream operon of the *ydiO-ydiP* operon.

The ratio of the transformation frequency of pHV1401 with 3 *XhoI* sites to that of pHV33 without *XhoI* site was several ten hold higher in the *ydiR*, *ydiS* or *ydjA* disruptants.

The degree of methylation of the *BsuM* target sequence (CTCGAG) on the chromosomal DNA was estimated indirectly by susceptibility to *XhoI* (an isoschizomer to *BsuM*) digestion of DNA extracted from these disruptant strains. Six *XhoI* sites on the chromosome were examined. Each *XhoI* site was susceptible to *XhoI* digestion when DNA was extracted from the strain disrupted for both operons, while it was not susceptible when extracted from the wild type strain or the strain disrupted for the *ydiR*,

*ydiS* or *ydjA* gene only.

Only His-tagged YdiO was purified in a denatured form in *E. coli* but its renatured form did not show methyltransferase activity. His-tagged YdiR protein could be produced in *B. subtilis* cell, and Ni column purified YdiR showed a weak endonuclease activity. This activity may be due to the presumed YdiR/YdiS/YdjA protein complex.

Although biochemical evidences are not enough, these results show that *ydiO* and *ydiP* make an operon for DNA methylation, and *ydiR*, *ydiS* and *ydjA* make the other operon for DNA restriction, and these genes are component genes of restriction - modification system *BsuM* in *B. subtilis* Marburg. YdiR, YdiS and YdjA may make a protein complex, where only YdiS has a similarity to endonuclease. YdiO and YdiP methylate *BsuM* target sequence and YdiR/YdiS/YdjA digests unmethylated DNA at *BsuM* site. Smaller orfs in the prophage 3 region seemed not to be involved restriction and modification of *B. subtilis*.

Prophage 3 region contains pseudogenes of integrase and terminase of bacteriophage and phosphomannomutase. These suggest that the RM system in *B. subtilis* Marburg originated from integration of a bacteriophage in a relatively recent period during evolution, and many genes, except RM system genes, may have been lost by accumulation of mutations.

## 目次

### 1. 序論

1-1. 制限修飾	3
1-2. 枯草菌 Marburg168 株の制限修飾研究	8
1-3. 本研究の目的	12

### 2. 材料・方法

2-1. 本研究で用いられた菌株、DNA および培地	14
2-2. PCR および Long PCR を用いた染色体制限修飾領域解析	24
2-3. 遺伝子破壊株の作成	25
2-4. 枯草菌の形質転換	26
2-5. ノーザンハイブリダイゼーション	27
2-6. サザンハイブリダイゼーション	29
2-7. 大腸菌内 6×His タグ融合蛋白質発現系の構築	30
2-8. 枯草菌内 6×His タグ融合蛋白質発現系の構築	30
2-9. ウェスタンブロッティング	31
2-10. 6×His タグ融合蛋白質の精製	32
2-11. 塩基配列情報解析	33

<b>3. 結果・考察</b>	
3-1. <i>ydiO-ydjA</i> の相同性検索	34
3-2. RM125 株における制限修飾領域の欠損の確認	44
3-3. 転写産物解析による <i>ydiO-ydjA</i> のオペロン構造解析	46
3-4. 遺伝子破壊株作成	51
3-5. 形質転換による外来プラスミドの導入に対する <i>ydiO-ydjA</i> のふるまい	55
3-6. サザンハイブリダイゼーション法をもちいたゲノム修飾解析	61
3-7. <i>ydiR-ydiS-ydjA</i> オペロン発現誘導株を用いた解析	68
3-8. <i>ydiO-ydiP</i> オペロンが受けているリードスルー転写	72
3-9. YdiO, YdiR 蛋白の精製と機能解析	
I. YdiO- 6×His 融合蛋白の精製	75
II. YdiR- 6×His 融合蛋白の精製	81
<b>4. 総括</b>	89
<b>5. 結論</b>	107
<b>6. 謝辞</b>	109
<b>7. 参考文献</b>	110

## 1. 序論

### 1-1. 制限修飾の発見と遺伝子研究への応用

制限修飾系 (restriction and modification system, RM) とは、特異的な DNA 塩基配列を認識し、その DNA 鎖を切断する配列特異的エンドヌクレアーゼ、制限酵素と、そのヌクレアーゼの認識塩基配列中の塩基にメチル基を付加することで、ヌクレアーゼの活性を阻害するメチルトランスフェラーゼ、修飾酵素の対から成る遺伝子系である。この制限修飾は、外来のプラスミドやファージ DNA から自己を守るための細菌の持つ防御機構のひとつであると考えられてきた。すなわち、制限酵素が細胞内に進入した外来 DNA を切断消化し、一方自身の染色体は修飾酵素によるメチル化修飾によって制限酵素切断から保護するといった 2 つの機構により、自身の DNA と他の DNA を区別、排除するものである。

この制限修飾の発見は、1940 年代にファージの宿主域特異性の変化という形で Luria が見出しており、その後 Bertani、Weigle らが、大腸菌 *Escherichia coli* K12 株と C 株を用いた実験において、C 株を宿主としたファージを、K12 株 (別の宿主) に感染させた場合、ファージが  $10^{-4}$  の割合でしか増殖しないことを発見したことに始まった (Luria and Human, 1952, Bertani and Weigle, 1953, Reviewed by Arber, 1965)。制限 (restriction) という名称は、この宿主域特異性の変化する現象が、ファージの最終宿主によって次の宿主への感染が制限される現象という意味で「制限現象」と呼ばれていたことに由来する。この現象に対して定量的実験を行ったのが Arber と Dussoix である。彼らは入ファージと、P1 プロファージを持つ大腸菌 K12 株、B 株および C 株を用いたファージ感染実験によって、(1) 宿主株は感染したファージ DNA を敵として認識し、分解するかあるいは受容 (感染が成立) すること、(2) ファージは完全に宿主に受容されると、その増殖の過程で宿主

特異性を得ることで（つまりファージが宿主内で修飾（modification）を受けると）、次の宿主が同じ株なら宿主に攻撃されずに増殖できるようになることを結論づけた（Arber and Dussoix, 1962）。Arber は、この制限現象は宿主内に存在するファージ DNA を分解する核酸分解酵素によって引き起こされることを予想したが、実際にこの制限現象を引き起こす酵素、制限酵素の解析は、Meselson と Yuan の実験によって行われた（Meselson and Yuan, 1968）。彼らは K 株の細胞破砕液から粗精製した酵素で、K 株由来の  $\lambda$  ファージの DNA は切断されないが、C 株由来の  $\lambda$  ファージ DNA は切断される事を明らかにした。またこの酵素活性には S-アデノシルメチオニン（SAM）および ATP の反応液への添加が必要であることも明らかにした。この大腸菌 K 株における制限酵素が *EcoK* である。

同時期に、Smith、Wilcox らによる、サルモネラファージ P22DNA、および大腸菌 T7 ファージ DNA を用いたインフルエンザ菌 *Hemophilus influenzae* Rd 株の制限修飾の研究から、インフルエンザ菌の制限現象を起こす酵素の性質は、大腸菌の酵素（*EcoK*）と異なり、ATP や S-アデノシルメチオニンを要求せず  $Mg^{2+}$  のみを要求することを発見し、さらにこの酵素がファージ DNA の二本鎖を特異的に切断し、一本鎖 DNA は切断しないこと、切断の結果 P22 DNA は約 1300 塩基対、T7 DNA は約 1000 塩基対の断片になることや、この酵素のインフルエンザ菌 DNA に対しての切断活性は認められないことを示した（Smith and Wilcox, 1970）。したがってこの酵素は、異種 DNA に特異的な二本鎖を切断する DNA 分解酵素と考えられ、分解によりある程度大きい DNA 断片を生成することから、その酵素は DNA 鎖を端から順次切っていくエキソ型ではなく塩基配列に特異的なエンド型の酵素であると考えられた（Smith and Wilcox, 1970）。また Smith, Kelly らは、この制限酵素によって切断された T7 DNA の切断末端を Alkaline phosphatase 処理し、さらに  $[^{32}P]$ ATP と polynucleotide kinase によって  $[^{32}P]$  でラベルする実験を行い、最終的にこの酵素が

GTPyPuAC(Py=C or T、Pu=A or G)配列を持つ2本鎖のPy-Pu間を特異的に切断することを突き止め、この酵素がDNA2本鎖に対し、その認識配列に対称的に結合することを予想した(Kelly and Smith, 1970)。このSmithらが解析した酵素がHindIIである。

制限修飾系は、現在知られている限りでも200を超える多くの種、属のバクテリア、古細菌に保持されており、その種類は3000種を超える。また、その認識配列や活性の特徴などの研究は現在も続いており、多くのアイソシゾマー(isochizomer, 同配列認識酵素)も発見されている。これら制限修飾酵素群は、その認識配列や切断箇所、補因子等からいくつかの型に分類されている。以下にその分類と主だった特徴を記載した(以下、Wilson, 1991、New England Biolabs, 1999 および Official REBASE Database <http://rebase.neb.com/>)。

I型： 同定された制限修飾の1%程度がこの型に属する。特定の塩基配列(対称的な塩基配列ではない)を認識するが、その切断箇所に特異性がなく、認識配列から離れた位置を切断する。その活性には $Mg^{2+}$ 、S-アデノシルメチオニンおよびATPを必要とする。現在知られている制限酵素では、ArberやMeselsonの研究によって解明された、EcoK制限酵素などがこのクラスに属する。

II型： 同定された制限修飾の93%を占める、一般的な制限修飾の型である。II型制限酵素は対称的なDNA塩基配列(4-8塩基長)を認識し、その認識配列の内部でDNA鎖を切断する。この活性には $Mg^{2+}$ のみを必要とする。この対称的な配列認識は、2つの同一サブユニットがDNAを両側から対称的に挟みこむように(ホモダイマーとして)作用するためである。また、II型修飾酵素(メチルトランスフェラーゼ)はS-アデノシルメチオニンのみを活性に要求し、モノマーで作用することが知られている。また、II型制限酵素は認識配



列および切断箇所のどちらにも正確な配列特異性があるため、遺伝子解析の道具として使用されている。Smithらが解析した *Hind*II 酵素はこの型である。

**IIS 型：** II 型制限酵素には、その認識配列が非対称な 4～7 塩基を認識する IIS 型が存在する。同定された制限修飾の 5% が IIS 型であり、その切断箇所は認識配列の外側に存在する。IIS 型修飾のほとんどは、2 本鎖のおのおのを認識する別々の酵素によって行われることが知られている。

**III 型：**  $Mg^{2+}$  および ATP を必要とし、認識配列から 2-5 塩基対程度下流の位置で DNA を切断するもので、その認識配列は IIS 型に似ている。同定された制限修飾の 1% に満たない数がこの型である。*E. coli* の P1 ファージが持つ *Eco*P1 制限酵素などがこのクラスに属する。

**Methyl-directed 型：** IV 型とも分類される。2 本鎖 DNA の片方または両方の鎖がメチル化された（メチルシトシン、 $^{14}C$  が配列内にある）DNA 鎖を特異的に切断する。その切断活性には GTP を必要とする。代表的なものに *Mcr*B および *Mcr*C 酵素からなる *Mcr*BC があるが、その認識配列は  $Pu^{14}C(N_{40-1000})Pu^{14}C$  であり、離れた距離にある 2 つの  $Pu^{14}C$  を認識していることが知られている。その他、*Dpn*I 等がこれに分類される。

**Nicking 酵素：** 配列特異的エンドヌクレアーゼであるが、2 本鎖 DNA の片方にのみニックを入れる活性を持つ。たとえば *N.Bst*NI 酵素（Nicking 酵素は名称の前に N.をつける）は GAGTC 配列を認識するが、ニックは認識配列から 3' 方向に 4 塩基離れた箇所である。

**Homing 制限酵素：** 2 本鎖 DNA を切断する酵素だが、その認識配列は 12-40 塩基と大きく、対称的な配列ではない。このような大きな配列特異性が厳密なものであると、たとえば 18 残基認識の場合でも、理論的には  $10^{10}$  塩基に一箇所しか切断できなくなり、生物ゲノム

上に認識配列が殆ど存在しないことになる。よって、厳密な配列認識は 10-12 塩基程度と考えられている。

近年の細菌のゲノムシーケンシングプロジェクトにより、全塩基配列の解明された細菌の内、80%の細菌が制限修飾遺伝子（同定されていないホモログを含む）をそのゲノムに保持しており、さらに 75%の細菌は複数の制限修飾を保持していることが判明した（Kong, 2000）。特に *Helicobacter pylori* においては 52(26695 株)~53 (J99 株) の制限修飾遺伝子ホモログの存在が示されている（Nobusato et al., 2000）。

自己を守るための細菌の持つ防御機構として存在する制限修飾系であるが、感染した DNA がすでに制限活性を阻害するようなメチル化修飾を受けていた場合や、細胞に感染した後、切断される前にメチル化修飾を受けてしまった DNA には、この細胞の持つ防御効果は期待できないことになる。感染防御という観点から考えれば、高等生物の液性免疫などと比較しても原始的なシステムであると考えられるが、細胞単位の生物である細菌などに対しては、感染とは DNA の直接的な侵入であり、その防御手段としては非常に直接的かつ効果的なシステムであるともいえる。

## 1-2. 枯草菌 Marburg168 株の制限修飾研究

Arber や Meselson、Yuan らによって、制限現象がヌクレアーゼによるものであることが明らかにされたのと同時期の 1968 年に、Gwinn、Lawton らが *Bacillus subtilis* Marburg 株由来の SP10、SP20 ファージを用いた実験により、ヒートショックをかけた宿主で感染効率が大幅に上昇するという制限様機構 (Restrictive mechanism) の存在を示したが (Gwinn and Lawton, 1968)、*Bacillus subtilis* Marburg の制限修飾を明らかにしたのは、*Bacillus subtilis* Marburg168 株および N 株、H 株 (現在では *B. amyloliquefaciens* と分類されている) を宿主とした、ファージ  $\Phi$ 105 を用いた Shibata、Ando の実験からである (Shibata and Ando, 1974)。彼らはテンプレートファージ (Templated phage) である  $\Phi$ 105 に対し、感染したファージが溶源化せず、ファージの感染がプラーク形成単位 (Plaque Forming Unit, PFU) によって明瞭に測定できる  $\Phi$ 105C (Clear plaque mutant) を作成し、Marburg168 株および N 株、H 株にそれぞれ感染させる実験を行った。これにより、(1) 168 株のプラークから調整したファージ  $\Phi$ 105C を、N 株および H 株に感染させた場合、その PFU は、元の宿主の 168 株に再度感染させた場合よりも  $10^{-2}$  から  $10^{-5}$  倍低くなること、(2) N 株および H 株のプラークから調整したファージ  $\Phi$ 105C の場合、168 株に感染させるとその PFU は、元の宿主株に再度感染させた場合よりも  $10^{-1}$  から  $10^{-2}$  倍低くなること、を発見した。この現象は Arber や Meselson、Yuan らの示した制限効果と同じものであり、このことから枯草菌 Marburg168 株には N 株、H 株 (*B. amyloliquefaciens*) にはない固有の制限修飾が少なくとも 1 つは存在することが示された。この N 株、H 株については、それぞれ固有の制限修飾を持つと考えられ、それぞれ *Bam*NI (Shibata and Ando, 1976)、*Bam*HI (Wilson and Young, 1975、ここでは *B. amyloliquefaciens* H 株の *Bam*I と示されている) としてその解析が行われていた。またこのころ、枯草菌 *B. subtilis* の R 株に確認された *Bsu*R 制限修飾

に関して、同様にファージ SPP1、Φ105、SPO2 等の感染効率を見る実験が Bron, Trautner らによって行われていた (Trautner et al., 1974)。

Shibata らは Marburg168 株をふくむ 34 の *B. subtilis* 株について、おのおのの細胞破碎液にて入ファージ DNA、および 168 株と N 株由来の Φ105C ファージ DNA を切断消化する実験を行った。そしてその DNA の電気泳動パターンから 168 株には *Bam*NI、*Bam*HI および *Bsu*R 等とは異なる、Marburg 株特異的制限修飾が存在することを示し、これを *Bsu*M と記した (Shibata et al., 1976)。その後、Uozumi らによって、Marburg 株と他の *Bacillus* 株とのファージ Φ105C に対する制限活性を比較する実験が行われた (Uozumi et al., 1977)。これにより、*Bsu*M は他の *Bacillus* 株が持つ制限修飾に比べ、 $10^{-1} \sim 10^{-3}$  弱い活性であることが明らかになった。また、紫外線を照射した 168 株 (168-YS11 株) を *B. subtilis* 202-5 (*B. amyloliquefaciens*) DNA にて形質転換し、Φ105C の感染率が親株の 20-200 倍上昇した株、RM125 株が取得された。この RM125 株は制限活性の欠損した株と考えられたが、RM125 株由来の Φ105C を親株 (168 株) に感染させても、168 株以外の株由来の Φ105C と同様の制限を受けたことから、この RM125 株は制限効果の欠損と共に、修飾効果も欠損した株 ( $r_{M-}$   $m_{M-}$ ) であることが判明した (Uozumi et al., 1977)。

この *Bsu*M の遺伝子マッピングは、Saito らによって行われた (Saito et al., 1979)。Saito らは、PBS1 ファージを用いた形質導入によって、Marburg 株の制限遺伝子の突然変異 *non*B1 (SP10 ファージに対する制限欠損) と *hsr*M1 (ΦNR2 ファージに対する制限欠損) が強く連鎖し、しかもこの 2 つが *pur*B と連鎖を示すことを明らかにした。またこのことから、*Bsu*M 遺伝子は Bron や Trautner らが解析を行っていた *B. subtilis* R 株の制限修飾、*Bsu*R の染色体位置とは異なる位置に存在することが示された。その後に行われた、*Bsu*M と *Bsu*R を用いた (*B. subtilis* Marburg 株および R 株を用いた) PBS1 ファージによる形質導入実験

(Ikawa et al., 1979) および形質転換実験(Ikawa et al., 1980)により、この *BsuM* と *BsuR* は遺伝学的にも独立した制限修飾であり、*B. subtilis* Marburg 株では *BsuM* が唯一の制限修飾であることが示された。また、Uozumi らの作成した RM125 株は、この *BsuM* 制限修飾が欠損した株であることが明らかになった。

一方、Marburg168 株の染色体 DNA は、*XhoI* 制限酵素（認識配列 CTCGAG）による切断を受けないが、RM125 株の染色体は切断を受けること、168 株に感染させた  $\Phi$ 105C がその他の制限酵素で切断を受けるのにもかかわらず、*XhoI* 制限酵素では切断を受けないことを示した実験により、*BsuM* 制限酵素は CTCGAG 配列を認識する *XhoI* のアイソシゾマーであると考えられた(Jentsch et al., 1983)。

枯草菌がシトシンメチラーゼを持つことを最初に示したのは、Oda、Marmur であったが (Oda and Marmur, 1966)、その後の Guha らにより、*in vivo* および *in vitro* における *M. BsuM* (*BsuM* メチラーゼ) のメチル化活性の測定が、 $^{32}\text{P}$  で 5'末端をラベルした pGsOB2、およびそれ由来の DNA フラグメントをもちいた実験により行われた (Guha et al., 1985)。その結果、*M. BsuM* は TCGA 配列のシトシンをメチル化していること、およびその認識配列は PyTCGAPu (Py=C or T, Pu=A or G)であることが示された。その後 *BsuM* 制限活性が、ファージや染色体 DNA 以外のプラスミドによる形質転換の際にも働くことを、pLS プラスミドを用いた実験により Tanaka が示したが (Tanaka 1979)、Bron らの行った、*XhoI* 認識配列 CTCGAG をその配列内に複数個持つプラスミドシリーズ、pHV33 および pHV1401~7 を Marburg 由来の HVS49 株 (*BsuM* 株) と 1012 株 (*BsuM* 欠損株) に用いた実験では、*XhoI* 配列を 3 箇所を持つ pHV1401 プラスミドは、*XhoI* 配列をまったく持たない pHV33 プラスミドに比べその形質転換効率が約 20 倍低いこと、および *BsuM* 欠損株ではその差がなくなることが示された (Bron et al., 1988)。これと同時期に Guha は(Guha 1988)、Marburg168

株の細胞破碎液から粗精製した *M.BsuM* によって、*XhoI* 配列をもつ pBM3 プラスミドがメチル化を受けることを示し、*M.BsuM* の認識配列が *XhoI* 認識配列と同様であると考えた。また彼らは *M.BsuM* のクローニングを行い、3kbp のインサートを持つクローンを取得した (Guha, 1988)。しかしながらその後、*BsuM* 制限修飾の研究、特にその遺伝子構成などに関する研究は行われず、*BsuM* 遺伝子自体は現在まで同定されていない。

1989 年より、枯草菌を対象としたゲノムシーケンスプロジェクトの体制がヨーロッパで作られ始め、1991 年には日本の研究グループの参入によって日本-ヨーロッパ共同のプロジェクトが発足した。このプロジェクトでは、基準株として *B.subtilis* Marburg168 株が解析対象となり、1997 年に *B.subtilis* Marburg168 株の全塩基配列が決定された。この過程で、染色体 56 度の領域の塩基配列の決定が私達の研究室が中心となって行われ、それに伴う各 ORF の機能予想から (Kasahara et al., 1997)、*BsuM* を想起させる ORF 群が見出された。つまり、この領域の *ydiS* が制限遺伝子と、その近傍にある ORF、*ydiO* および *ydiP* が修飾遺伝子と相同性があることがわかった (Kasahara et al., 1997、および図 1-1 参照)。また全ゲノムシーケンスと全 ORF の機能予測からは、枯草菌 Marburg168 株染色体上にはこれ以外に制限修飾遺伝子に相同性のある ORF は見つからず、例外はプロファージ SP  $\beta$  上のメチラーゼ遺伝子と相同性をもつ ORF、*mtbP* のみであった (Kunst et al., 1997)。また、このゲノムシーケンスにより、A+T 含有率が高く、ファージ由来である可能性が高い遺伝子 (制限修飾遺伝子もその一つである) を含む領域がいくつか見出され、枯草菌 Marburg168 株には既知のプロファージ、SP  $\beta$ 、PBSX および skin element 以外にもプロファージ様の領域が存在することが判明した。これらはプロファージ 1~7 と名づけられた (Kunst et al., 1997)。*ydiO*、*ydiP* および *ydiS* は全て、プロファージ 3 と名づけられた領域に存在していた (図 1-1 参照)。

### 1-3. 本研究の目的

私達の研究室が中心となって行った染色体領域のシーケンス (Kasahara et al., 1997)、および完了した全シーケンス (Kunst et al., 1997) によって同定された枯草菌 Marburg168 株の ORF とその機能推測をみると、序論 1-2 で述べたように、制限酵素に相同性のある ORF は全塩基配列中で *ydiS* のみである (Kasahara et al., 1997, Kunst et al., 1997)。また、この *ydiS* の遺伝子位置は、旧来より Marburg 株に存在する *BsuM* 遺伝子位置 (Saito et al., 1979) と一致する。この *ydiS* は、その近傍にあるメチル化酵素遺伝子ホモログ *ydiO*, *ydiP* と共に、プロファージ 3 と定義された領域に存在していることから、*ydiO*, *ydiP* および *ydiS* はファージによって枯草菌 Marburg 株にもたらされた制限修飾遺伝子の一群であり、Marburg168 株に唯一の制限修飾である *BsuM* 制限修飾の本体をなす遺伝子群であると予想される。

本研究は、枯草菌 Marburg168 株内で *BsuM* 制限修飾系を構成している遺伝子群と予想される *ydiO*, *ydiP* および *ydiS* について、実際に細胞内にて制限効果、および修飾効果を担っている遺伝子であることを証明するための分子遺伝学的解析を行うものである。

このため、(1) これら遺伝子群の相同性検索の再確認、(2) 従来から知られている *BsuM* 制限修飾欠損株 RM125 におけるこれら遺伝子群の検索、(3) これら遺伝子群のオペロン構造と発現時期の同定、(4) 遺伝子破壊によるこれら遺伝子群の制限修飾に関する機能の推定、(5) これら遺伝子群の産物の生化学的な解析、を行った。

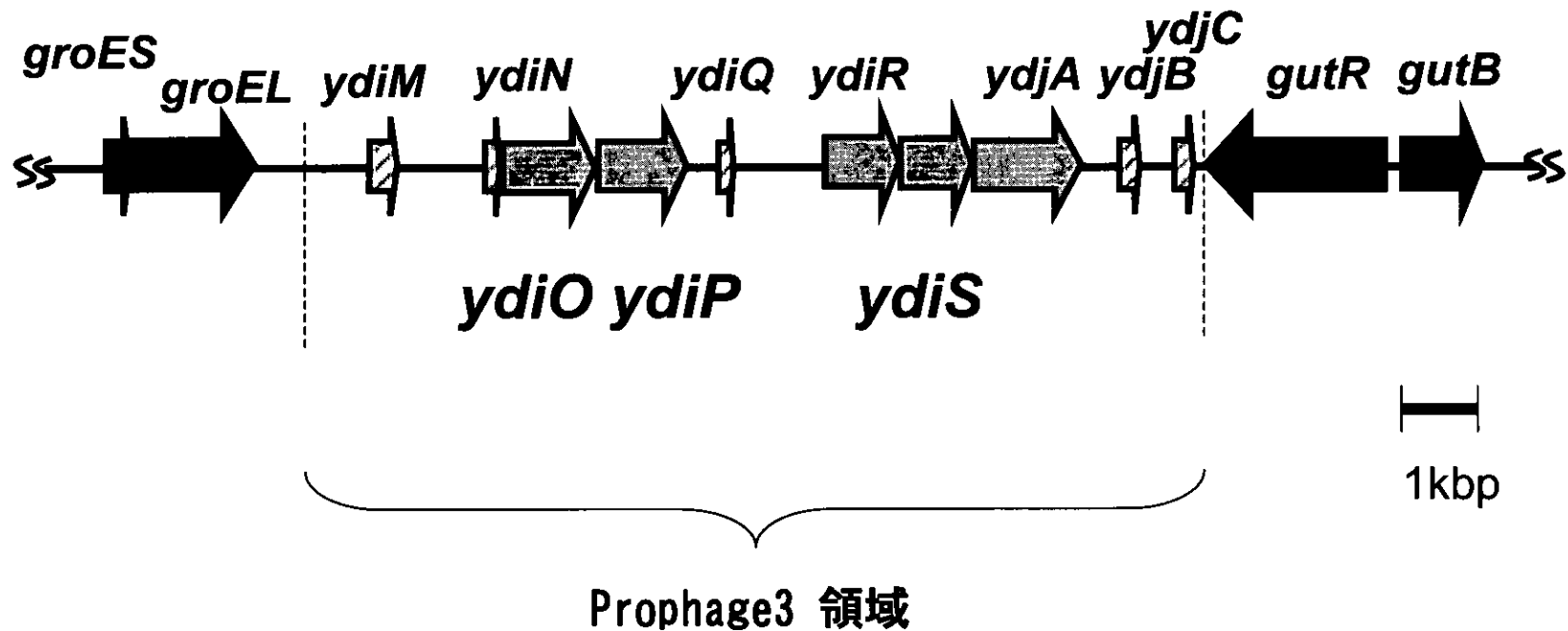


図1-1 枯草菌56度 (*groES-gutB*) 領域のORF地図

枯草菌Marburg168株の染色体56度の領域(染色体位置649500-668300)に存在するORFの位置関係、および *prophage3*領域を模式図で表した。図左側が核酸鎖の5'方向。矢印の向きと長さは各ORFの方向と塩基数に対応している (Kunst et al 1997., Kasahara et al., 1997)。矢印の色は、黒：既知遺伝子、斜線：機能未知遺伝子、灰：本研究にて解析する遺伝子。



## 2. 材料・方法

### 2-1. 本研究で用いられた菌株、DNA および培地

本研究で用いられた菌株を表 2-1-1 に示した。本研究にて作成された枯草菌遺伝子破壊株（プラスミド挿入破壊）については、Laboratory stock である *Bacillus subtilis* Marburg 168 株をすべての株の野生株（親株）とした。枯草菌形質転換用プラスミドのクローニングには大腸菌 *Escherichia coli* C600 株(Laboratory stock)を、大腸菌内 6×His タグ融合蛋白質発現系構築用プラスミドのクローニングには大腸菌 *E.coli* HB101 株(Laboratory stock)および大腸菌内 6×His タグ融合蛋白質発現系宿主株には大腸菌 *E.coli* BL21(DE3)pLysS 株 (Novagen 社)を用いた。また、本研究におけるクローニング、枯草菌形質転換に用いられたプラスミドベクターを図 2-1-1~4 および図 2-2 に示した。PCR 増幅実験、および各遺伝子のクローニングの際のオリゴヌクレオチドプライマーを表 2-1-2~4 に示した。これらは全て、エスベックオリゴサービス社に合成を委託した。また本研究で使用した全ての試薬は断りのない限り和光純薬社製特級試薬を用いた。また使用した培地組成を表 2-2-5 に記した。

表 2-1-1 本研究で使用された菌株

株	制限修飾	その他の遺伝型	Reference
<b>枯草菌 <i>B.subtilis</i> Marburg</b>			
168	m+r+	<i>trpC2</i>	Laboratory stock
RM125	m-r-	<i>leuA8, argA15</i>	Uozumi et al., 1977
YDIO01	m-r-	<i>ydiO::pET24b neo (Km)</i> <i>ydiS::pMUTIN2 (Em)</i>	This study
YDIP01	m-r-	<i>ydiP::pET24b neo (Km)</i> <i>ydiS::pMUTIN2 (Em)</i>	This study
YDIR23	m+r-	<i>ydiR::pMUTIN2 (Em)</i>	This study
YDIS101	m+r-	<i>ydiS::pMUTIN2 (Em)</i>	This study
YDJA34	m+r-	<i>ydjA::pMUTIN2 (Em)</i>	This study
RSA01	m+r±	<i>ydiR::pMUTIN2(P<sub>spac</sub>±ydiR, Em)</i>	This study
RSAO105	m-r±	<i>ydiO::pET24b neo (Km)</i> <i>ydiR::pMUTIN2 (P<sub>spac</sub>±ydiR, Em)</i>	This study
RSAP155	m-r±	<i>ydiP::pET24b neo (Km)</i> <i>ydiR::pMUTIN2 (P<sub>spac</sub>±ydiR, Em)</i>	This study
SHRC801	m+r±	<i>ydiR::pMHISC (ydiR-His×6,</i> <i>P<sub>spac</sub>±ydiS, Em)</i>	This study
<b>大腸菌 <i>E.coli</i></b>			
CHOC133		<i>pET21b(ydiO):: BL21(DE3)pLysS</i>	This study
C600			Laboratory stock
HB101			Laboratory stock
BL21(DE3)pLysS		<i>pLysS (Cm)</i>	Novagen 社

図 2-1 本研究にて使用したプラスミドベクター

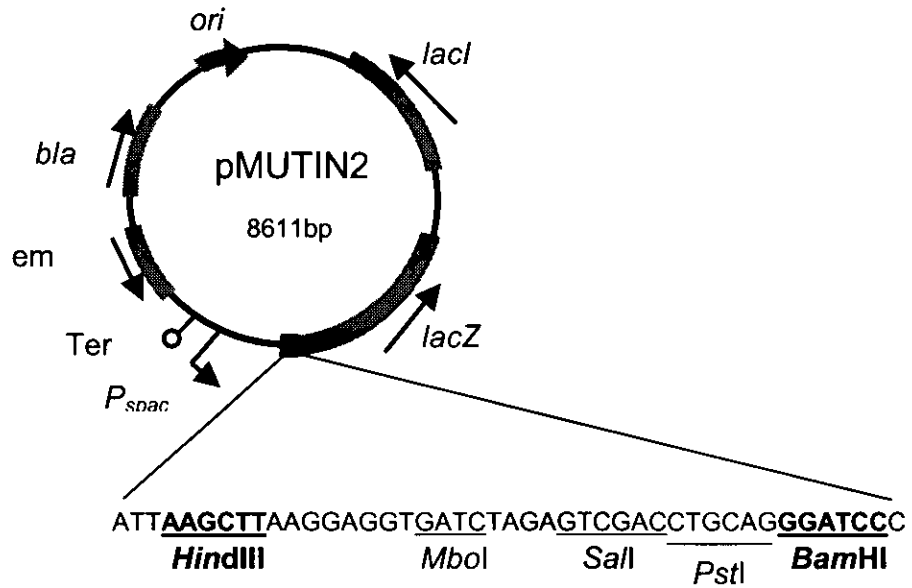


図.2-1-1 pMUTIN2 ベクター (Vagner et al., 1998)

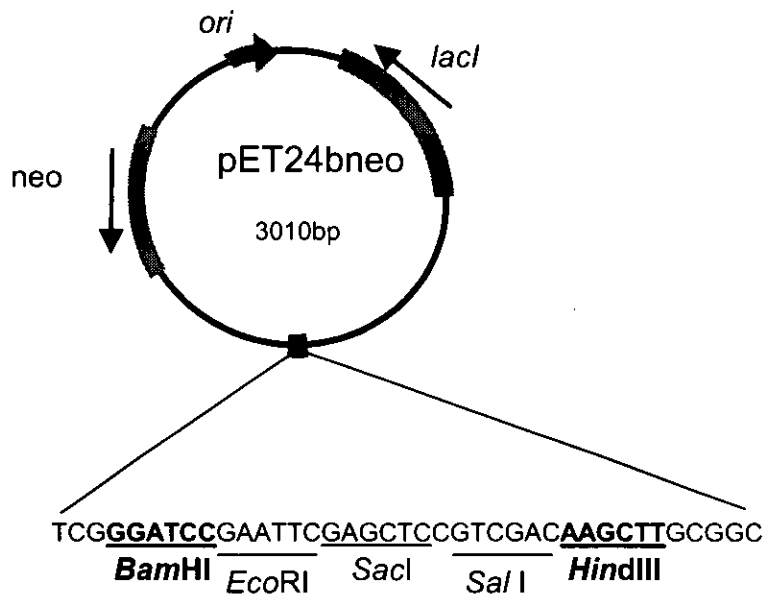


図 2-1-2 pET24b neo ベクター (Fujita and Sadaie 1998)

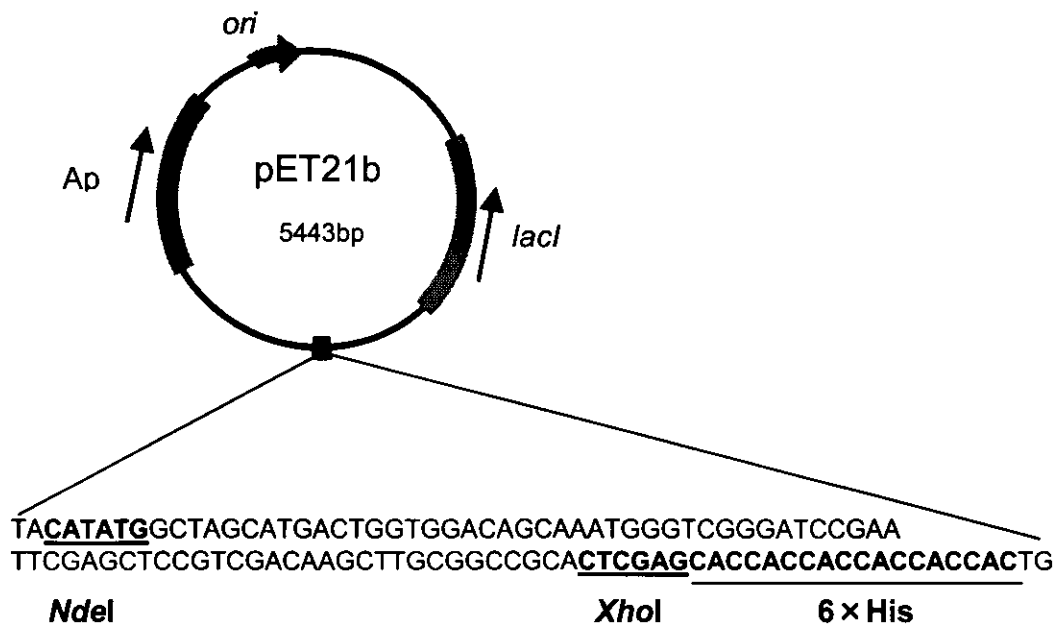


図 2-1-3 pET21b ベクター (Novagen 社)

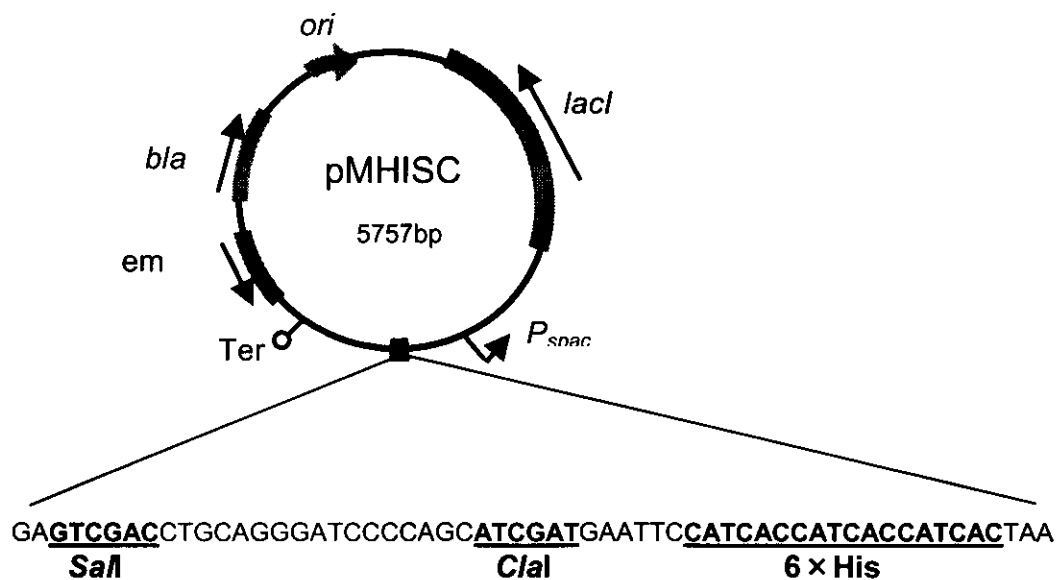


図 2-1-4 pMHISC ベクター (Laboratory stock)

本研究に用いたプラスミドベクターを図 2-1-1~4 に示した。各クローニングサイト（黒四角）を拡大した。Ori:複製起点、bla:β-ラクタマーゼ遺伝子、em:エリスロマイシン耐性遺伝子、neo:ネオマイシン耐性遺伝子、Ap:アンピシリン耐性遺伝子、lacI:lacI 遺伝子、lacZ: lacZ 遺伝子、Ter:転写終結点、P<sub>spac</sub>:スパックプロモータ。各遺伝子の機能説明は本文参照。

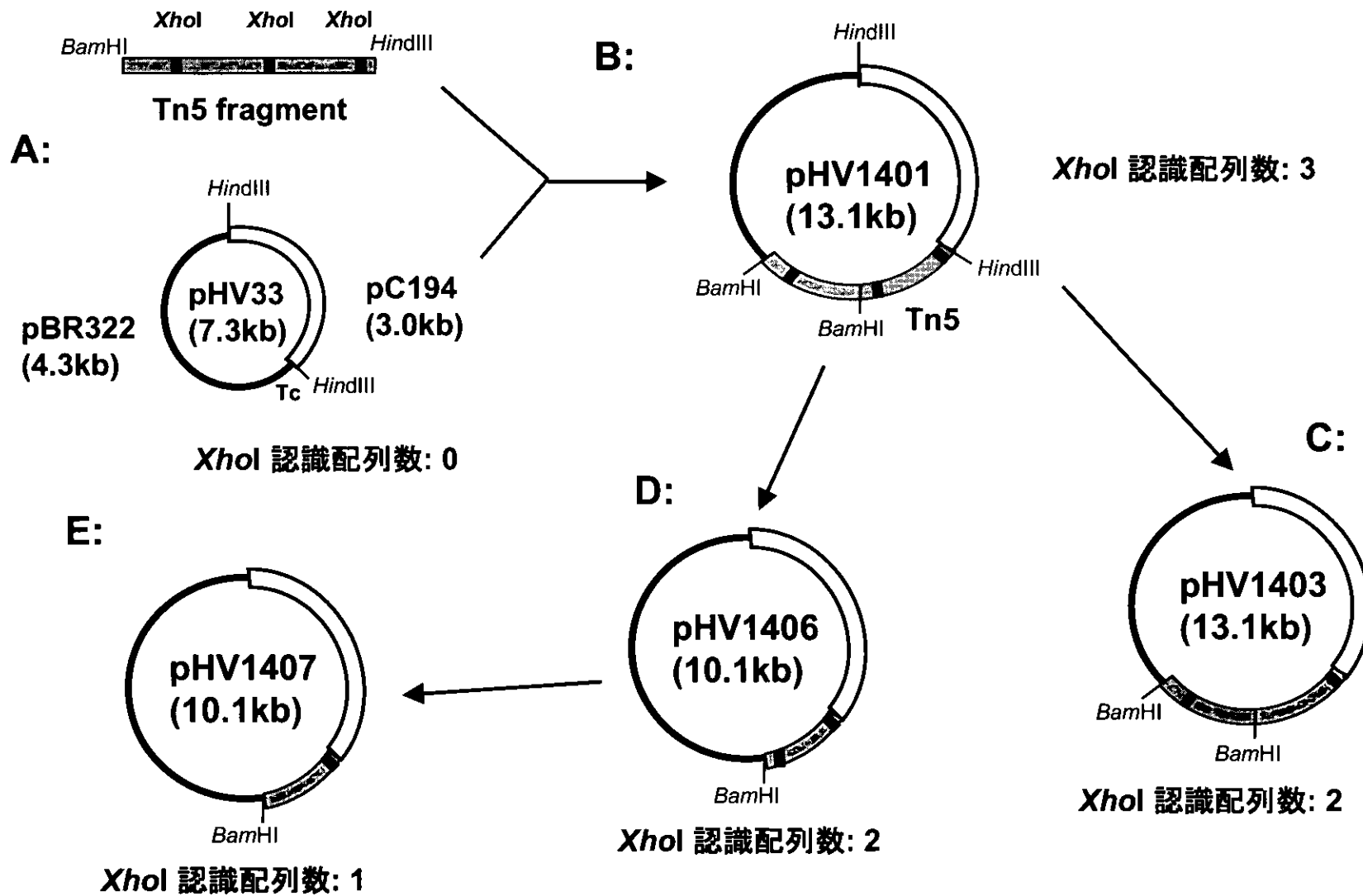


図2-2 本研究にて使用したプラスミド(pHVシリーズ)

## 図 2-2 注釈

本研究において枯草菌形質転換率測定実験に用いたプラスミドシリーズの模式図を示した。プラスミド長および *Xho*I 認識配列数は図中に示した。各プラスミドの作成および出典は Bron et al., 1988 および Primrose and Ehrlich, 1981 による。A: pBR322 プラスミド (黒色) と pUC194 プラスミド (白色) を結合し、pHV33 プラスミドが作成された。*Xho*I 認識配列は存在しない。B: pHV33 にトランスポゾン Tn5(*Xho*I 認識配列を 3 箇所保持) (灰色) を挿入し、pHV1401 プラスミドが作成された。*Xho*I 認識配列を 3 つ保持する。C: pHV1401 プラスミドの *Xho*I 認識配列 1 箇所を破壊し、pHV1403 プラスミドが作成された。*Xho*I 認識配列を 2 つ保持する。D: pHV1401 プラスミドを *Bam*HI によって切断し、セルフライゲーションさせて *Xho*I 認識配列 1 箇所を含む領域を削除し、pHV1406 プラスミドが作成された。*Xho*I 認識配列を 2 つ保持する。E: pHV1406 プラスミドの *Xho*I 認識配列 1 箇所を破壊し、pHV1407 プラスミドが作成された。*Xho*I 認識配列を 1 つ保持する。これら全てのプラスミドはアンピシリンおよびクロラムフェニコール耐性遺伝子を保持している。大腸菌内での選択は 50  $\mu$ g/ml アンピシリンにて、枯草菌内での選択は 5  $\mu$ g/ml クロラムフェニコールにて行った。

表 2-1-2 遺伝子破壊用オリゴヌクレオチドプライマー

名称*1	配列	塩基数	付加塩基*2	染色体位置*3
groESF	5'-GCC <u>GAA GCT TCT</u> AAA ATT ACA TAT TCA	27	<i>Hind</i> III	649580
groESR	5'-CGC <u>GGA TCC</u> GTA TTT TGA GAA GAT AA	26	<i>Bam</i> HI	649814
groELF	5'-GCC <u>GAA GCT TAA</u> GAA ATT AAG TTT AGT	27	<i>Hind</i> III	649956
groELR	5'-CGC <u>GGA TCC</u> GAT TGT GAT AAC GCC GT	26	<i>Bam</i> HI	650470
ydiOF	5'-GCC <u>GAA GCT TAA</u> CAT AGA AAA TTT TTA	27	<i>Hind</i> III	654996
ydiOR	5'-CGC <u>GGA TCC</u> CAC CTA GTT TTT CAG CA	26	<i>Bam</i> HI	655679
ydiPF	5'-GCC <u>GAA GCT TAT</u> CAG TCA GGA CAT ACA	27	<i>Hind</i> III	656296
ydiPR	5'-CGC <u>GGA TCC</u> CCT TGT AGG CGC TCA GC	26	<i>Bam</i> HI	656979
ydiRF	5'-GCC <u>GAA GCT TGC</u> CGG AGT ATC TAG TAC	27	<i>Hind</i> III	659396
ydiRR	5'-CGC <u>GGA TCC</u> ATT TAT GTT TTA TCT TA	26	<i>Bam</i> HI	660079
ydiSF	5'-GCC <u>GAA GCT TAG</u> TAT TCC TAG GAA TAG	27	<i>Hind</i> III	660396
ydiSR	5'-CGC <u>GGA TCC</u> AAA GCG GTA TCG AGC GG	26	<i>Bam</i> HI	660946
ydiJAF	5'-GCC <u>GAA GCT TAA</u> AGG ATT GTA CGT GTA	27	<i>Hind</i> III	661396
ydiJAR	5'-CGC <u>GGA TCC</u> TAA TAT CGG GTT CTA GT	26	<i>Bam</i> HI	662278
gutRF	5'-CGC <u>GGA TCC</u> ATG CTG GCA CCT GGC GT	26	<i>Bam</i> HI	666928
gutRR	5'-GCC <u>GAA GCT TCC</u> GTA TCG CTT CCA TAT	27	<i>Hind</i> III	666423
gutBF	5'-GCC <u>GAA GCT TAA</u> ATT GCC GCT GTC GGA	27	<i>Hind</i> III	667406
gutBR	5'-CGC <u>GGA TCC</u> TTT TCC GCC CCG GCG CA	26	<i>Bam</i> HI	667964
RprmF	5'-AAG <u>AAG CTT</u> GCT TGT GTG ATT TTA TGG GG 30		<i>Hind</i> III	659310
groELF30	5'-ATA TGG GCG GCA TGG GCG GTA TGG GTG GAA	30	なし	651546
gutRR30	5'-GCA TAA CAG CCG CTT TCA TGT TTT GAG GTA	30	なし	667195

表 2-1-3 ノーザン/サザンハイブリダイゼーション用  
オリゴヌクレオチドプライマー

名称*1	配列	塩基数	付加塩基*2	染色体位置*3
xfrg9F	5'-CGG ATC TAC AAA CGA AAT GG	20	なし	106875
xfrg9R	5'-CCC TGT TAT GGT CTA TTC CC	20	なし	107076
xfrg54F	5'-GGT AGC CTA ATT CGA CAT AC	20	なし	633821
xfrg54R	5'-GGG AAT AGA CCA TAA CAG GG	20	なし	634051
xfrg172F	5'-GCA TCA ATC AAT CCT GCG AC	20	なし	2015610
xfrg172R	5'-AGC TGT TTT TGG CAC ACG GC	20	なし	2015810
xfrg239F	5'-GTG ATT AAC TGC ACT CAG GA	20	なし	2800250
xfrg239R	5'-GGC TGT TCC TGC GAC GGC TG	20	なし	2800460
xfrg265F	5'-ATG TTC TGG AAT GAA TTA AA	20	なし	3105600
xfrg265R	5'-ATT CGT CAA TGT GCA AAC GA	20	なし	3105810
xfrg303F	5'-GCT GGA TCA TAG AAA CCA CC	20	なし	3550830
xfrg303R	5'-GGG CGA TTG AAA GTA ACT GG	20	なし	3551040
T7rev	5'- <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC</u> GAA GTG TAT CAA CAA GCT GG	40		



表 2-1-4 6×His タグ融合蛋白質用オリゴヌクレオチドプライマー

名称*1	配列	塩基数	付加塩基*2	染色体位置*3
YdiOHF	5'-CGT <u>ACA TAT GAC</u> AAA TTT TAT TTT AAA T	28	<i>Nde</i> I	654940
ydiOHR	5'-CGT <u>ACT CGA GTC</u> TTA ATT GAT GTA ATG CTA A	31	<i>Xho</i> I	656223
ydiPHF	5'-CGT <u>ACA TAT GTT</u> GAA AGT TGT TAG TTT ATT C	31	<i>Nde</i> I	656245
ydiPHR	5'-CGT <u>ACT CGA GAA</u> CCT TTT GAA GTT GCC TAT C	31	<i>Xho</i> I	657414
ydiR(Sal)F	5'-GTC <u>GTC GAC</u> TGA AGA TGA GGA AAG TGC	27	<i>Sal</i> I	659882
ydiR(Cla)R	5'-ATC <u>ATC GAT</u> GTT ATT TTC AAA GTC TTC CGG	30	<i>Cla</i> I	660257
ydiS(Sal)F	5'-GTC <u>GTC GAC</u> TTT ACC GCT CGA TAC CGC	27	<i>Sal</i> I	660942
ydiS(Cla)R	5'-ATC <u>ATC GAT</u> ATC ACT CAC AAA AGA CGA ATC	30	<i>Cla</i> I	661320
ydjA(Sal)F	5'-GTC <u>GTC GAC</u> GGC TTT CGA ATA CCG TTC	27	<i>Sal</i> I	662309
ydjA(Cla)R	5'-ATC <u>ATC GAT</u> ATT TTT ATC ACT TAA TCT TTT TG	32	<i>Cla</i> I	662718

\*1 フォワードプライマー（5'末端からの塩基配列に対して同一の配列を持つプライマー）には名称の最後に F を、リバースプライマー（5'末端からの塩基配列に対して相補鎖と同一の配列を持つプライマー）には名称の最後に R を付した。

\*2 各プライマーに制限酵素認識部位を接続することで、これらプライマーを用いた PCR 反応産物であるオリゴヌクレオチドの末端に制限酵素認識（切断）部位ができるようにし、これらオリゴヌクレオチドを制限酵素処理するだけでクローニングに使用できるようにした。プライマー配列上下線を付した配列が付加した制限酵素認識部位であり、その制限酵素名を\*2 に示した。

\*3BSORF 上にある *B. subtilis* Marburg 168 株全塩基配列（Kunst et al., 1997）に対する各プライマーの結合位置（塩基数）を示した。

表 2-1-5 本実験で使用した培地組成

改変 Lennox 培地

10g/l (w/v) Bacto Tryptone(Difco 社製)

5g/l (w/v) Bacto Yeast Extract(Difco 社製)

10g/l (w/v) NaCl

必要に応じて 1mM IPTG または各種抗生物質を添加

枯草菌形質転換用 C I 培地

0.6%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.4%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% クエン酸ナトリウム,

0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5% グルコース

0.02% カサミノ酸 各要求アミノ酸 50  $\mu\text{g/ml}$  を添加 (w/v)

枯草菌形質転換用 C II 培地

0.6%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.4%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% クエン酸ナトリウム,

0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5% グルコース

0.01% カサミノ酸 各要求アミノ酸 5  $\mu\text{g/ml}$  を添加 (w/v)

DSM 培地 (枯草菌孢子形成培地)

8g/l (w/v) Bacto Nutrient broth

1mM  $\text{MgSO}_4$ , 13.4mM KCl, 0.01mM  $\text{MnCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , 1mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

必要に応じて 1mM IPTG または各種抗生物質を添加

## 2-2. PCR および LongPCR を用いた染色体制限修飾領域解析

枯草菌 ORF である *ydiO*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* とその近傍の遺伝子、*groEL*, *gutR* の内部領域の DNA を増幅するためのプライマー（オリゴエスベック社委託）ペアを設計し（表 2-1-2）、*B.subtilis*168 株、および RM125 株の染色体をテンプレートに、AmpliTaq（PerkinElmer 社）およびサーマルサイクラー（Takara 社 PCR thermal cyclar MP）を用いて、各 ORF 断片を PCR 増幅し、アガロースゲル電気泳動によって増幅の有無を確認した。PCR 反応溶液の組成および反応条件は PerkinElmer 社プロトコルにしたがった。また、*groEL-gutR* 間の領域を LAPCR（Takara 社製）により増幅確認した。増幅するためのプライマーペア(*groELF30* および *gutRR30*)を表 2-1-2 に示した。また、LAPCR 反応溶液の組成および反応条件は Takara 社プロトコルにしたがった。またテンプレートとした枯草菌染色体の調製法はサザンハイブリダイゼーションの項に示した。

### 2-3. 遺伝子破壊株の作成

表 2-1-2 に示す遺伝子破壊用プライマーペアを用い、枯草菌 *B.subtilis* Marburg 168 株の染色体をテンプレートに AmpliTaq およびサーマルサイクラーを用いて目的 ORF の内部領域を PCR 増幅した。増幅遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動し、増幅の確認とおおよその増幅産物の量を決定した。フェノール処理、エタノール沈殿にて濃縮精製した増幅産物を *Bam*HI、*Hind*III 制限酵素 (K バッファー使用) によって短時間処理した。ベクターとして pMUTIN(Vagner et al., 1998)、および pET24b neo(Fujita and Sadaie, 1998) を同様に処理し、精製した増幅断片とベクターをライゲーションシ(Takara 社製 DNA ライゲーションキット ver.2 使用)、遺伝子破壊用プラスミドを得た。制限酵素およびライゲーション反応溶液の組成および反応条件は Takara 社プロトコルにしたがった。また、各制限酵素は以後の実験においても全て Takara 社製であり、反応バッファー組成は、L: 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol、M : 10m MTris-HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 50mM NaCl、H : 50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl、K : 20mM Tris-HCl pH8.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM KCl、T+BSA : 33mM Tris-acetate pH7.9, 10mM Mg- acetate, 0.5mM Dithiothreitol, 66mM K-acetate, 0.01% BSA である。プラスミドは NTS 法(Groth et al., 1996)により大腸菌にクローニングした。培養した大腸菌 *E.coli* C 600 株を遠心集菌し、NTS 溶液(10%(W/V)PEG1500, 30mM MgCl<sub>2</sub> を含む改変 Lennox 培地)に懸濁後氷上で 10 分間静置した後、クローニングするプラスミドを加え、さらに氷上で 10 分間静置し、その後室温で 10 分間保温し温度ショックをかけた。その後再度氷上で 10 分間静置し、DNA の取り込みを完了させた後、改変 Lennox 培地を加えて 37 度にて 60 分間振とう培養し、形質転換されたマーカー遺伝子の発現を完了させ、改変 Lennox 培地に 1.5%寒天 (第一製薬社製) と選択マーカー (pMUTIN2, pET21b, pMHISC: 50 μg/ml アンピシリン、pET24b neo: 25 μg/ml カナマイシン) に対応する抗生物質等を加えた寒天培地上で形質転換体を選択した。各形質転換体からのプラスミド抽出にはアルカリ-SDS 法を用いた (Sambrook et al., 1989)。

#### 2-4. 枯草菌の形質転換

改変 Lennox 培地で前培養された枯草菌（受容菌）を、枯草菌形質転換用 C I 培地に要求する栄養素（50  $\mu$ g/ml トリプトファン）を加えた液体培地に植えつぎ、37 度にて振とう培養した。生育を培養液の O.D.<sub>600</sub> を随時測定することによってモニターし、定常期に達した（O.D.<sub>600</sub>=1.2-1.5）菌の培養液を採取し、17,000 $\times$  g にて 2 分間遠心し、菌体を分離して上澄みを除いた後、採取した培養液の 2 倍量の枯草菌形質転換用 C II 培地に要求する栄養素（5  $\mu$ g/ml トリプトファン）を加えた液体培地に再懸濁し、37 度にて 1 時間、振とう培養した。その後培養液に形質転換用プラスミドを終濃度約 250-500ng/ml となるように加え、さらに 37 度にて 90 分間振とう培養し、DNA の取り込みおよび組換え、および形質転換されたマーカー遺伝子の発現を完了させた後、改変 Lennox 培地に 1.5% 寒天（第一製薬社製）と選択マーカーに対応する抗生物質（pMUTIN2, pMHISC: 0.3  $\mu$ g/ml エリスロマイシン、pET24b neo: 5  $\mu$ g/ml カナマイシン）を加えた寒天培地上で形質転換体を選択した。

## 2-5. ノーザンハイブリダイゼーション

前項と同様に、前培養した枯草菌野生株および各破壊株を DSM 培地に植えつぎ、37 度にて振とう培養した。生育を培養液の O.D.<sub>600</sub> を随時測定することによってモニターし、対数増殖中期 (O.D.<sub>600</sub>=0.7) (L)、対数増殖期一定常期移行期 (孢子形成開始期) (T0)、孢子形成開始期後 1 時間 (T1)、2 時間 (T2)、3 時間 (T3)、4 時間 (T4) および 5 時間後 (T5) に培養菌体を遠心処理によって集菌し、菌体サンプルとした。各サンプルより、フェノール-ガラスビーズ混合溶液による細胞破壊法にて全 RNA を回収した。集菌した細胞塊を LETS バッファー (0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.4)、1% SDS)、ガラスビーズ (直径 0.4mm)、水飽和フェノールの等量混合溶液に懸濁後、Vortex mixer で激しく攪はんし、細胞を破碎すると同時に蛋白を変性させた。破碎液を遠心し、上清を回収した。DNase 処理後、LiCl 沈殿によって、上清から全 RNA を回収した。電気泳動像、および吸光度測定より核酸濃度を測定後、各サンプル 10 μg の RNA を熱変性させ、ホルムアミドを 2% 含む変性アガロースゲル (1% アガロースを含む) で電気泳動し、変性状態のままニトロセルロースメンブラン (Amersham 社製 Hybond N+) にプロットした。0.8J/cm<sup>2</sup> 強度の UV 照射により核酸をメンブランにクロスリンクさせ固定した後、68 度にて、ハイブリダイゼーションバッファー (50mM リン酸ナトリウム (pH7.0)、50%ホルムアミド、7% SDS を含む) 中でプローブとハイブリダイゼーションさせた。プローブは発現解析対象とする各遺伝子の遺伝子破壊株作成時に用いた PCR プライマーのフォワードプライマー (表 2-1-2) と、遺伝子破壊用プラスミド内に対応するリバースプライマー T7rev (表 2-1-3) による各破壊株染色体をテンプレートとした PCR によって、T7 プロモータ配列を持つ遺伝子断片を作成し (図 3-3 参照。T7rev プライマーは T7 promoter 配列と、*lacZ* 遺伝子配列をもつ。このプライマーを用いた PCR にて T7 promoter の付加されたオリゴヌ

クレオチドが作成される)、これを鋳型として DIG labeling kit (Roche 社製) を用いた T 7 RNA polymerase による試験管内転写により、DIG-UTP を取り込んだ RNA 鎖プローブを作成した。ハイブリダイゼーション後のメンブランは SDS を含むクエン酸-NaCl バッファーで短時間洗浄後、DIG detection kit (Roche 社製) 試薬を用いて、抗 DIG 抗体で処理し、CSPD®(Roche 社)による化学発光を X 線フィルム (Amersham 社製、Hyperfilm ECL) に感光させることでプローブの検出を行った。プローブの作成、ハイブリダイゼーションおよびプローブ検出は Roche 社プロトコルにしたがった。

## 2-6. サザンハイブリダイゼーション

前項と同様に、前培養した枯草菌野生株および各破壊株を改変 Lennox 培地に植えつぎ、37 度にて振とう培養した。生育を培養液の O.D.<sub>600</sub> を随時測定することによってモニターし、対数増殖期 (O.D.<sub>600</sub>=0.7) に培養菌体を遠心処理によって集菌し、菌体サンプルとした。サンプルを 10 mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) を含むバッファーに懸濁後、0.2mg/ml Lysozyme、20 μg/ml RNaseI を加え、37 度にて 20 分保温後、0.2% SDS を添加し混合した。等量のフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール(25:24:1)混合液を加えて攪拌、遠心し、染色体 DNA を含む上清を回収した。これをエタノール沈殿にて濃縮精製し、染色体サンプルとした。電気泳動像、および吸光度測定より核酸濃度を測定後、10 μg の各染色体サンプルに 50U の染色体切断のための制限酵素 (種類、反応条件は結果・考察 3-6 および図 3-6 参照) を加え 37 度、16 時間保温した後、メチル化修飾確認のための制限酵素 (XhoI) にて同様の処理を行った。このサンプルを 1% アガロースゲルにて電気泳動した。泳動後のゲルを 0.25M - HCl に 5 分間浸した後、0.4N - NaOH で 30 分間ゲルを洗い、1mM Tris、1.5mM NaCl バッファーにてゲルを中和させた後、ニトロセルロースメンブレン (Amersham 社製 Hybond N+) にゲル中の核酸を転写した。メンブレンに転写された核酸は、UV にてメンブレンに固定した。プローブとなるオリゴ DNA は、枯草菌染色体 DNA を鋳型として、別記プライマーペア (表 2-1-3) を用いた PCR によって増幅・作成した。プローブのラベル、ハイブリダイゼーションおよび検出には Alk-phos direct with CDP-star® labeling and detection kit (Amersham 社製) を用い、プローブの化学蛍光発光を X 線フィルム (Hyperfilm ECL, Amersham 社製) に感光させることによって検出した。サンプルの電気泳動後のプロットティング、ハイブリダイゼーション、化学発光検出の方法は全て Amersham 社プロトコルに従った。



## 2-7. 大腸菌内 6×His タグ融合蛋白質発現系の構築

表 2-1-4 に示す、6×His タグ融合蛋白質用プライマーペアを用い、枯草菌 *B.subtilis* Marburg 168 株の染色体をテンプレートに ExTaq (Takara 社製) およびサーマルサイクラーを用いて、目的 ORF の全領域を PCR 増幅した。濃縮精製した増幅産物を各プライマーに適合した制限酵素 (Takara 社製) によって短時間処理した。ベクターとして pET21b(+) (Novagen 社) を同じ制限酵素にて処理し、精製した増幅断片とベクターをライゲーションして融合蛋白質発現プラスミドを得た。プラスミドは NTS 法によりまず大腸菌 HB101 株にクローニングされた。アルカリ-SDS 法を用い形質転換体から抽出したプラスミドをシーケンスして、ORF の全領域およびライゲーション部位の配列を確認した。この確認されたプラスミドにて大腸菌 *E.coli* BL21(DE3)pLysS 株を形質転換し、得られた形質転換体を以下の実験に用いた。

## 2-8. 枯草菌内 6×His タグ融合蛋白質発現系の構築

表 2-1-4 に示す枯草菌内 6×His タグ融合蛋白質用プライマーと表 2-1-2 に示す遺伝子破壊用プライマーを組み合わせ用い、枯草菌 *B.subtilis* Marburg 168 株の染色体をテンプレートに ExTaq (Takara 社製) およびサーマルサイクラーを用いて、目的 ORF の内部から C 末端領域までを PCR 増幅した。濃縮精製した増幅産物を各制限酵素によって短時間処理した。ベクターとして pMHISC (Laboratory stock) を同様に処理し、精製した増幅断片とベクターをライゲーションすることで、目的遺伝子に His タグがコードされた融合蛋白質発現プラスミドを得た。プラスミドは NTS 法により大腸菌 C600 株にクローニングし、アルカリ-SDS 法を用い形質転換体から抽出したプラスミドをシーケンスして塩基配列を確認した。この確認されたプラスミドにて枯草菌 168 株を形質転換し、得られた形質転換体を以下の実験に用いた。

## 2-9. ウェスタンブロッティング

前項と同様に、前培養した枯草菌野生株および各変異株を×2 SG 培地に植えつぎ、37度にて振とう培養した。対数増殖中期 (O.D.<sub>600</sub>= 0.7) まで生育した培養菌体を集菌後、Lysis バッファー(20mM Tris-HCl, 1M NaCl, 1mM imidazole, 20%(v/v)glycerol, pH7.9)に懸濁し、1mg/ml濃度で Lysozyme を加え、氷上で 15分静置した後、ソニケータ(Taitech 社製 VP30S ホモジナイザ)にて細胞を冷却しながら超音波破壊した。破碎後のサンプルを 17,000×g, 4度で冷却遠心し、上清を回収した。サンプルを熱変性し、12.5%アクリルアミドを含むゲルにて SDS-PAGE 電気泳動を行った。泳動後のポリペプチドは PVDF メンブレン(Amersham 社製 Hybond P)にウェットブロッタ (Atto 社製 AE3280 トランスウエスタン転写装置) によって転写、固定した。このメンブレンを PBS+スキムミルクバッファー(28mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5M NaCl, 5%(w/v)スキムミルク, pH7.2)に浸してブロッキングした後、Anti-His6-peroxydase(Roche 社製マウスモノクローナル抗体)を 0.1U/ml 濃度で 90分反応させた。メンブレンを Tween-PBS バッファー(28mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5MNaCl, 0.1%(v/v)ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート, pH7.2)にて洗浄し、ECL+ Western blotting detection kit (Amersham 社製) を用い、抗体の化学蛍光発光を X線フィルム (Hyperfilm ECL, Amersham 社製) の感光によって検出した。

## 2-10. 6×His タグ融合蛋白質の精製

サンプルが枯草菌の場合、前培養した枯草菌野生株および各変異株を×2 SG 培地に植えつぎ、37度にて振とう培養し、対数増殖中期(O.D.<sub>600</sub>=0.7)まで生育した培養菌体を集菌し、培養液の1/10体積のLysisバッファー(20mM Tris-HCl, 1M NaCl, 1mM imidazole, 20%(v/v)glycerol, pH7.9)に懸濁し、1mg/ml濃度でLysozymeを加え、氷上で15分静置した後、ソニケータにて細胞を冷却しながら超音波破壊した。サンプルが大腸菌の場合、前培養した大腸菌変異株を改変Lennox培地に植えつぎ、37度にて振とう培養し、対数増殖初期(O.D.<sub>600</sub>=0.2-0.4)に終濃度1mMのIPTGを培地中に添加し、対数増殖中期-後期(O.D.<sub>600</sub>=1.0-1.3)まで生育した培養菌体を集菌し、培養液の1/10体積のLysisバッファーに懸濁した後、ソニケータにて細胞を冷却しながら超音波破壊した。以後の操作は菌種にかかわらず同様である。破碎後のサンプルを17,000×g、4度で冷却遠心し、回収した上清を平衡化したNi-NTAアガロース(Novagen社His Bind Resin 50% slurry)充填カラムに充填し、自然落下によりNi-NTAアガロースにHisタグ融合目的蛋白質を吸着させた。Ni-NTAアガロースの体積(カラムボリューム、以下vol.)を1とした場合、装填した上清は2.5vol.とした。目的蛋白質を吸着させたカラムは25vol.のWashバッファー(20mM Tris-HCl, 1M NaCl, 50mM imidazole, 20%(v/v)glycerol, pH7.9)にて洗浄後、2.5vol.のElutionバッファー(20mM Tris-HCl, 1M NaCl, 200mM imidazole, 20%(v/v)glycerol, pH7.9)にて目的蛋白質をカラムから溶出した。尿素による変性状態での精製には、Lysis, Wash, Elutionの各バッファーに終濃度6Mの尿素を添加したバッファーを用い、上記操作を行った。変性状態で精製したサンプルは透析バッファー(20mM Tris-HCl, 1M NaCl, 20%(v/v)glycerol, pH7.9)にて段階的に尿素を希釈透析し、再構成させた。精製後のサンプルは遠心式限外ろ過フィルタ(centricon YM30, ミリポア社製)によって脱塩・濃縮し、各反応に用いた。

## 2-11. 塩基配列情報解析

枯草菌 ORF である *ydiO*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報 (Kunst et al., 1997) は、インターネット上にて公開されている BSORFDB : *Bacillus subtilis* ORF Data Base (JAFAN: Japan Functional Analysis Network for *Bacillus subtilis* HomePage: <http://bacillus.genome.ad.jp>) より入手した。この塩基配列情報、アミノ酸配列情報を基に、目的の ORF に対して相同性検索を行った。プログラムは PSI-BLASTP プログラム (Altschul et al., 1997) を用い、複数の Database を対象に検索を行った (SWISS-PROT Database の定期リリースデータ+新着データ、PIR Database のアミノ酸配列+定期リリースデータ、DAD Database のアミノ酸配列、DDBJ Database のリリース+新着データからアミノ酸翻訳配列を取り出したデータおよび PDB Database のアミノ酸配列+定期リリースからアミノ酸配列を取り出したデータ)。モチーフ検索は MOTIF (Searching Protein and Nucleic Acid Sequence Motifs) プログラムを用いて、Blocks Database (Henikoff et al., 1999) および PROSITE Database (Hofmann et al., 1999) を対象に検索を行った (Genome Net WWW server : <http://www.genome.ad.jp>)。その他の配列解析および制限酵素部位検出には、塩基配列解析ソフトウェア Genetyx (ソフトウェア開発社製) を使用した。

### 3. 結果・考察

#### 3-1. *ydiO-ydjA* の相同性検索

枯草菌 Marburg 168 株は、ゲノムシーケンスプロジェクトによってその全塩基配列が決定され、ORF の推定と機能予測が行われた (Kunst et al., 1997)。しかし、その後解析された遺伝子や、他のバクテリアのゲノムシーケンスの結果を推定された ORF の機能予測に反映させるため、本研究の解析対象とした *ydiO*, *ydiP* および *ydiS* を含むプロファージ 3 領域 (*groESL-cotA* 領域) の推定 ORF (Kasahara et al., 1997) に対して、新たに PSI-BLAST による相同性検索を行った (材料・方法参照)。

この結果を図3-1-1~5に示した。*ydiO* (枯草菌染色体位置654940-656223(Originからの塩基数))は、*E.coli*のC5-メチルトランスフェラーゼであるM.Eco47II (II型メチラーゼ、認識配列GGNCC) (図3-1-1B)や、*Psychrobacter* のII型 m5C-methyltransferase (機能未知) (図3-1-1C)、*Lactococcus lactis*の亜種である*cremoris* F株のM.ScrFIA (II型メチラーゼ、認識配列CCNGG) (図3-1-1D)を初めとしてM.NgoVII(型、認識配列未決定)やM.Sau96I (C5-メチルトランスフェラーゼ (II型)、認識配列GGNCC) 等、多くのC5-メチルトランスフェラーゼと高い相同性を示した。BLASTPプログラムから、一般的に類似性(Positives)が30%前後またはそれ以上、かつe-value(期待値)が有意に低い ( $e^{-3}$ 以下) 場合、その2つの配列の相同性は有意であると考えられる (Altschul et al., 1997)。よって、*ydiO*はシトシンメチルトランスフェラーゼと高い相同性を持つと考えることができる。

*ydiP* (枯草菌染色体位置 656245-657414)も M.ScrFIA (図 3-1-2B)を初めとして *Neisseria lactamica* の M.NlaX (II 型メチラーゼ、認識配列 CCNGG) (図 3-1-2C)や *Enterobacter cloacae* 18k 株の M. Ecl18kl (II 型メチラーゼ、認識配列 CCNGG) (図 3-1-2D)等、多く

の C5-メチルトランスフェラーゼと高い相同性を示した。よって、*ydiP* もまたシトシンメチルトランスフェラーゼと高い相同性を持つと考えることができる。また、これらの結果を比較すると、*ydiO,ydiP* ともに *M.ScrFIA* との相同性が非常に高い事がわかった。加えてこれら *ydiO,ydiP* と相同性の高い既知遺伝子に共通する特徴として、CCNGG または GGNCC を認識する II 型の C5-メチルトランスフェラーゼであることが挙げられる。

一方、*ydiS* (枯草菌染色体位置 660313-661344、343 アミノ酸残基)は、*Helicobacter pylori* J99 株の制限酵素遺伝子と予想されている ORF、JHP0164(図 3-1-4B)や、*E. coli* の *McrB* 制限酵素 (Methyl-direct 型、序論参照) (図 3-1-4C)、*Lactococcus lactis* のプラスミド、pTR2030 に存在する *Llal-2* (IIS 型と予測されている、O'Sullivan et al., 1995) (図 3-1-4D)等、いくつかの制限酵素遺伝子 (と推測される ORF を含む) と高い相同性が確認された。加えて *ydiS* に隣接する ORF、*ydjA* (枯草菌染色体位置 661347-662744、465 アミノ酸残基)は相同性が有意に高いものが少なく、*Helicobacter pylori* J99 株の機能未知 ORF、JHP0165(図 3-1-5B) や、*L. lactis* のプラスミド、pTR2030 に存在する *Llal-3* (機能未知、O'Sullivan et al., 1995) (図 3-1-5C)との相同性が示されたのみであった (ただしどちらの ORF も制限修飾遺伝子と予想される ORF に連続した ORF である。ことに *Llal-3* は破壊によってその制限活性が部分的に低下することが分かっている)。つまり、枯草菌で連続した ORF である *ydiS* と *ydjA* には、*Helicobacter pylori* J99 株の制限酵素遺伝子と予想される ORF とその連続した ORF である JHP1064-JHP1065、および *L. lactis* のプラスミド、pTR2030 に存在する制限酵素遺伝子とそれに連続した ORF、*Llal-2- Llal-3* との相同性が確認された。

さらに、その機能的な類似性を見るために、各 ORF のアミノ酸配列データに対して機能モチーフの検索を行った。検索プログラムは MOTIF プログラム (材料・方法参照) を用いた。その結果、相同性検索において C5-メチルトランスフェラーゼと高い相同性を示した

*ydiO* および *ydiP* には C5-メチルトランスフェラーゼが保持する共通ブロック配列、および機能モチーフ配列が保存されていた。C5-メチルトランスフェラーゼはその機能モチーフ的特徴として、6 の保存された配列、共通ブロックを保持しており、Blocks Database に IPB001525A~F という名称で登録されている(Henikoff et al., 1999)。またこれら保存された共通ブロックとオーバーラップする形で2つの機能モチーフ、active site と C-terminal signature が保存されていることが知られている。active site はこの酵素の活性であるシトシンにメチル基を結合させる際の活性中心に保存されている Pro-Cys ペプチドとその周辺の配列であり、

[DENKS]-x-[FLIV]-x-x-[GSTC]-x-P-C-x-x-[FYWLIM]-S (X:任意)

モチーフである(Chen et al., 1991)。既知の C5-メチルトランスフェラーゼでは、*M.MthI* 以外はすべてこの active site を保持している。また、C5-メチルトランスフェラーゼはそのペプチド鎖の C 末端領域に保存された配列がある。これが C-terminal signature

[RKQGTf]-x-x-G-N-[STAG]-[LIVMF]-x-x-x-[LIVMT]-x-x-x-[LIVM]-x-x-x-[LIVM]

というモチーフであり(Chen et al., 1991)、*M.AluI*, *M.HgaI1*, *M.HgaI2*, *M.HpaII* を除く C5-メチルトランスフェラーゼが保持している。これらは PROSITE Database に PS0094(active site)および PS0095(C-terminal signature)として登録されている(Hofmann et al., 1999)。

図 3-1-6 に、これら共通ブロック、および機能モチーフの配列と *YdiO* および *YdiP* の配列を比較した結果を示した。IPB001525A~F の6のブロックについて、*YdiO* および *YdiP* の配列にはその全てのブロックの保存があることが分かった(図 3-1-6 細線部 A~F)。IPB001525A~F の各ブロック間での置換や反転も見られなかった。また、これらブロックは、各ポリペプチド鎖内に分散して存在しているのではなく、*YdiO* では C 末方向に、*YdiP* では N 末方向に集中していた。2つの機能モチーフ、active site (図 3-1-6 太線部) と

C-terminal signature (図 3-1-6 破線部) の保存については、YdiP は Chen らの定義どおりの配列が(Chen et al., 1991) active site と C-terminal signature どちらにも見られた。YdiO には、この定義の配列に照らし合わせると、 active site の保存配列 [DENKS]-x-[FLIV]-x-x-[GSTC]-x-P-C-x-x-[FYWLIM]-S の内、12 番目にあたる[FYWLIM]が H、ヒスチジンになっていた。このドメインは、メチル化の活性中心ドメインであるので厳密なモチーフの保存が要求されると予想されるが、本来の活性中心である Pro-Cys ジペプチド構造は保存されている事や、この部位には芳香族、複素環式のアミノ酸のいずれかが入る厳密性の低い位置であるので、同じ複素環式アミノ酸であるヒスチジンが代わりに入ってもその酵素活性がなくなるようなことはないと考えられる。同様に C-terminal signature の[RKQGTG]-x-x-G-N-[STAG]-[LIVMF]-x-x-x-[LIVMT]-x-x-x-[LIVM]-x-x-x-[LIVM]というモチーフと比較すると、1 番目に当たる[RKQGTG]がアスパラギン酸になっていた。しかしながら、この部位に関してもモチーフの保存性は厳密ではない部位であり、このような厳密性の低いモチーフ部位がないメチルトランスフェラーゼ *M.AluI*, *M.HgaI1*, *M.HgaI2*, *M.HpaII* においても、メチル化活性は保持している(Chen et al., 1991)ことから、このモチーフにおいても 1 番目に当たるアミノ酸残基一つとその酵素活性が密接に関係しているようなことはないと考えられる。よって YdiO においても 2 つの機能モチーフは (ほぼ) 保存されていると考えることができる。

また制限酵素遺伝子と相同性の高い YdiS、および連続した YdjA には、その活性に関与するようなモチーフは唯一 YdiS が保持する ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)

( [AG]-x(4)-G-K-[ST] ) のみであった。このモチーフは核酸の磷酸基に接触する部位で、DNA に作用する酵素、バクテリアでは DnaA、RecA、RecF や、DNA ミスマッチ修復酵素 *mutS* ファミリー等に広く保持されている (Saraste et al., 1990) モチーフである。YdiS



が制限酵素と相同性が高いことと、このモチーフを保持していることとは相関があるとも考えられる。YdjA にはこのモチーフの保持も、その機能を思わせるモチーフの保持も確認されなかった。

この検索を行った ORF の中で、有意な相同性や機能モチーフを検出できたのは、*ydiO*, *ydiP*, *ydiS* のみであり、*ydjA* には制限酵素遺伝子に連続した ORF に相同性があったが、その他の ORF、*ydiM*, *ydiN*, *ydiQ*, *ydiR*, *ydjB* および *ydjC* には有意な相同性や機能モチーフは検出されなかった。特に *ydiS* の上流部に隣接する ORF である *ydiR* (枯草菌染色体位置 659340-660281、313 アミノ酸残基) は、その大きさや遺伝子位置からも制限酵素に関連した何らかの機能を保持する ORF であることを予想させるが、PSI-BLAST の結果(図 3-1-3) は Database 上に自分自身の配列以外、相同性があるものがないことを示しており、また共通ブロックや機能モチーフの保持も確認されなかった。

よって、検索結果をまとめると、(1) YdiO、YdiP は C5-メチルトランスフェラーゼとの相同性が高く、機能モチーフ、共通ブロックの保持も見られた。(2) YdiS と YdjA は制限酵素 Llal-2 とそれに連続する Llal-3 および、制限酵素と予想される JHP0164 とそれに連続する JHP0165 に高い相同性が見られた。YdiS のみが ATP/GTP-binding site motif を保持していた、ということが示された。

Query= YdiO (427 letters)

	Score (bits)	E Value	
dad Z99107-53 CAB12425.1  427 Bacillus subtilis ydiO protein.	511	e-144	A
dad AB007637-5 BAA22750.1  427 Bacillus subtilis ydiO protein.	511	e-144	
pir H69787 H69787 DNA-methyltransferase (cytosine-specific) hom...	511	e-144	
dad X82105-2 CAA57629.1  417 Escherichia coli site-specific DN...	428	e-118	B
sp P50196 MTE8_ECOLI MODIFICATION METHYLASE EC047II (EC 2.1.1.7...	428	e-118	
dad Y07554-1 CAA68841.1  416 Psychrobacter sp. type II DNA m5C...	418	e-116	C
dad U89998-6 AAB66696.1  389 Lactococcus lactis subsp. cremori...	413	e-114	D
dad M87289-1 AAA25220.1  389 Lactococcus lactis SCRFI methylas...	413	e-114	
sp P34877 MTSA_LACLC MODIFICATION METHYLASE SCRFIA (EC 2.1.1.73...	413	e-114	
pir A48966 A48966 methylase - Lactococcus lactis	413	e-114	
dad U43736-1 AAA86270.1  374 Neisseria gonorrhoeae M. NgoVII pr...	408	e-112	
sp Q59606 MTF7_NEIGO MODIFICATION METHYLASE NGOFVII (EC 2.1.1.7...	408	e-112	
pir T10165 T10165 site-specific DNA-methyltransferase (cytosine...	408	e-112	
dad X53096-1 CAA37260.1  430 Staphylococcus aureus Sau96I DNA ...	406	e-112	
sp P23737 MTS9_STAAU MODIFICATION METHYLASE SAU96I (EC 2.1.1.73...	406	e-112	
pir S12705 S12705 site-specific DNA-methyltransferase (cytosine...	406	e-112	
dad U42460-2 AAB03209.1  341 Neisseria gonorrhoeae NgolI cytos...	396	e-109	
dad X52661-2 CAA36888.1  341 Neisseria gonorrhoeae NgoPII rest...	395	e-109	

B) >sp|P50196|MTE8\_ECOLI MODIFICATION METHYLASE EC047II (EC 2.1.1.73)  
 (CYTOSINE-SPECIFIC METHYLTRANSFERASE EC047II)  
 (M. EC047II).  
 Length = 417

Score = 428 bits (1089), Expect = e-118  
 Identities = 82/422 (19%), Positives = 154/422 (36%), Gaps = 33/422 (7%)

C) >dad|Y07554-1|CAA68841.1| 416|Psychrobacter sp. type II DNA  
 m5C-methyltransferase protein.  
 Length = 416

Score = 418 bits (1064), Expect = e-116  
 Identities = 83/415 (20%), Positives = 148/415 (35%), Gaps = 34/415 (8%)

D) >sp|P34877|MTSA\_LACLC MODIFICATION METHYLASE SCRFIA (EC 2.1.1.73)  
 (CYTOSINE-SPECIFIC METHYLTRANSFERASE SCRFIA) (M. SCRFIA)  
 (M. SCRFI-A). Lactococcus lactis  
 Length = 389

Score = 413 bits (1051), Expect = e-114  
 Identities = 91/438 (20%), Positives = 159/438 (35%), Gaps = 69/438 (15%)

図 3-1-1 YdiO-DATABASE 登録遺伝子 (アミノ酸配列) 間の相同性検索結果

Query= YdiP (389 letters)

	Score (bits)	E Value	
dad Z99107-54 CAB12426.1  389 Bacillus subtilis ydiP protein.	532	e-150	A
dad AB007637-6 BAA22751.1  389 Bacillus subtilis ydiP protein.	532	e-150	
pir A69788 A69788 DNA-methyltransferase (cytosine-specific) hom...	532	e-150	
dad U89998-6 AAB66696.1  389 Lactococcus lactis subsp. cremori...	399	e-110	B
dad M87289-1 AAA25220.1  389 Lactococcus lactis SCRFI methylas...	399	e-110	
sp P34877 MTSA_LACLC MODIFICATION METHYLASE SCRFA (EC 2.1.1.73)...	399	e-110	
pir A48966 A48966 methylase - Lactococcus lactis	399	e-110	C
dad X54485-2 CAA38357.1  313 Neisseria lactamica cytosine-spec...	398	e-109	
sp P24581 MTNX_NEILA CYTOSINE-SPECIFIC METHYLTRANSFERASE NLAX (...)	398	e-109	
pir S12037 XYNHCL site-specific DNA-methyltransferase (cytosine...	398	e-109	D
dad Y16897-6 CAA76526.1  379 Enterobacter cloacae M. Ecl18kl (D...	395	e-109	
dad U65460-2 AAC45971.1  379 Salmonella enteritidis DNA cytosi...	395	e-109	
dad M86545-1 AAA98279.1  379 Plasmid P4 C5-cytosine methylase ...	395	e-109	
dad D73442-1 BAA11167.1  379 Salmonella typhi C5-cytosine meth...	395	e-109	
sp P34879 MTS2_SHISO MODIFICATION METHYLASE SS011 (EC 2.1.1.73)...	395	e-109	
pir JC5542 JC5542 DNA (cytosine-5-)-methyltransferase (EC 2.1.1...	395	e-109	
pir JT0744 JT0744 site-specific DNA-methyltransferase (EC 2.1.1...	395	e-109	
dad U10528-2 AAA86046.1  351 Dactylococcopsis salina DsaV meth...	387	e-106	
sp P50185 MTD5_DACSA MODIFICATION METHYLASE DSAV (EC 2.1.1.73) ...	387	e-106	
pir S50098 S50098 site-specific DNA-methyltransferase (cytosine...	387	e-106	

B) >sp|P34877|MTSA\_LACLC MODIFICATION METHYLASE SCRFA (EC 2.1.1.73)  
 (CYTOSINE-SPECIFIC METHYLTRANSFERASE SCRFA) (M. SCRFA)  
 (M. SCRFI-A).  
 Length = 389

Score = 399 bits (1015), Expect = e-110  
 Identities = 82/323 (25%), Positives = 127/323 (38%), Gaps = 36/323 (11%)

C) >sp|P24581|MTNX\_NEILA CYTOSINE-SPECIFIC METHYLTRANSFERASE NLAX (EC  
 2.1.1.73) (M. NLAX).  
 Length = 313

D) >dad|Y16897-6|CAA76526.1| 379|Enterobacter cloacae M. Ecl18kl  
 (DNA-methyltransferase) protein.  
 Length = 379

Score = 395 bits (1004), Expect = e-109  
 Identities = 80/320 (25%), Positives = 132/320 (41%), Gaps = 36/320 (11%)

図 3-1-2 YdiP-DATABASE 登録遺伝子 (アミノ酸配列) 間の相同性検索結果

Query= YdiR (313 letters)

	Score (bits)	E Value
dad Z99107-56 CAB12428.1  313 Bacillus subtilis ydiR protein.	499	e-140
dad AB007637-8 BAA22753.1  313 Bacillus subtilis ydiR protein.	499	e-140
pir C69788 C69788 hypothetical protein ydiR - Bacillus subtilis	499	e-140

} A

図 3-1-3 YdiR-DATABASE 登録遺伝子 (アミノ酸配列) 間の相同性検索結果

Query= YdiS (343 letters)

	Score (bits)	E Value
dad Z99107-57 CAB12429.1  343 Bacillus subtilis ydiS protein.	409	e-113
dad AB007637-9 BAA22754.1  343 Bacillus subtilis ydiS protein.	409	e-113
pir D69788 D69788 DNA restriction homolog ydiS - Bacillus subtilis	409	e-113
dad AE001455-1 AAD05745.1  448 Helicobacter pylori J99 putativ...	269	5e-71
pir H71964 H71964 probable restriction enzyme - Helicobacter py...	269	5e-71
dad U14003-259 AAA97243.1  465 Escherichia coli mcrB protein.	252	1e-65
dad M58752-1 AAA24145.1  465 Escherichia coli mcrB protein.	252	1e-65
dad AE000505-4 AAC77302.1  465 Escherichia coli component of M...	252	1e-65
dad U14003-259 AAA97243.1  465 Escherichia coli mcrB protein.	252	1e-65
sp P15005 MCRB_ECOLI_5-METHYLCYTOSINE-SPECIFIC RESTRICTION ENZY...	252	1e-65
pir A36708 XYECMB 5-methylcytosine-specific restriction enzyme ...	252	1e-65
dad AB001341-1 BAA19243.1  465 Escherichia coli McrB protein.	251	1e-65
dad U17233-3 AAA65069.1  337 Lactococcus lactis Llal.2 protein.	236	4e-61
dad AE000700-5 AAC06851.1  469 Aquifex aeolicus putative prote...	222	1e-56
pir C70357 C70357 hypothetical protein aq_647 - Aquifex aeolicus	222	1e-56
dad M24927-2 AAA24143.1  294 Escherichia coli mcrB protein.	216	4e-55
dad M24927-1 AAA24142.1  455 Escherichia coli mcrB protein.	216	4e-55
dad U67557-14 AAB99153.1  903 Methanococcus jannaschii cell di...	215	1e-54
sp Q58556 YB56_METJA CELL DIVISION CYCLE PROTEIN 48 HOMOLOG MJ1...	215	1e-54
pir C64444 C64444 cell division control protein CDC48 homolog -...	215	1e-54

} A  
} B  
} C  
} D

B) >pir|H71964|H71964 probable restriction enzyme - Helicobacter pylori  
(strain J99) JHP0164  
Length = 448  
Score = 269 bits (681), Expect = 5e-71  
Identities = 114/355 (32%), Positives = 176/355 (49%), Gaps = 58/355 (16%)

C) >dad|U14003-259|AAA97243.1| 465|Escherichia coli mcrB protein.  
Length = 465  
Score = 252 bits (636), Expect = 1e-65  
Identities = 72/315 (22%), Positives = 119/315 (36%), Gaps = 56/315 (17%)

D) >dad|U17233-3|AAA65069.1| 337|Lactococcus lactis Llal.2 protein.  
Length = 337  
Score = 236 bits (597), Expect = 4e-61  
Identities = 105/348 (30%), Positives = 155/348 (44%), Gaps = 74/348 (21%)

図 3-1-4 YdiS-DATABASE 登録遺伝子 (アミノ酸配列) 間の相同性検索結果

Query= YdjA (465 letters)

	Score (bits)	E Value	
dad  <u>Z99107-58</u>  CAB12430.1  465 Bacillus subtilis ydjA protein.	821	0.0	A
dad  <u>AB007637-10</u>  BAA22755.1  465 Bacillus subtilis ydjA protein.	821	0.0	
pir  <u>E69788</u>  E69788 hypothetical protein ydjA - Bacillus subtilis	821	0.0	
dad  <u>AE001455-2</u>  AAD05746.1  406 Helicobacter pylori J99 putativ...	491	e-137	B
pir  <u>A71965</u>  A71965 hypothetical protein jhp0165 - Helicobacter p...	491	e-137	
dad  <u>U17233-4</u>  AAA65070.1  464 Lactococcus lactis Llal.3 protein.	58	4e-07	C
dad  <u>X87974-1</u>  CAA61233.1  1159 Clostridium botulinum nontoxic-no...	45	0.002	
dad  <u>AE002136-6</u>  AAF30799.1  1284 Ureaplasma urealyticum conserve...	45	0.004	
pir  <u>G82897</u>  G82897 conserved hypothetical ATP/GTP-binding protei...	45	0.004	

B) >pir|A71965|A71965 hypothetical protein jhp0165 - Helicobacter pylori (strain J99)  
Length = 406

Score = 491 bits (1250), Expect = e-137  
Identities = 95/370 (25%), Positives = 172/370 (45%), Gaps = 37/370 (10%)

C) >dad|U17233-4|AAA65070.1| 464|Lactococcus lactis Llal.3 protein.  
Length = 464

Score = 57.9 bits (137), Expect = 4e-07  
Identities = 59/307 (19%), Positives = 106/307 (34%), Gaps = 30/307 (9%)

図 3-1-5 YdjA-DATABASE 登録遺伝子 (アミノ酸配列) 間の相同性検索結果

図 3-1-1~5 の注釈 :

PSI-BLAST プログラム (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いて YdiO, YdiP, YdiR, YdiS および YdjA アミノ酸配列を検索し、スコアの順に配列した。検索対象とした Database は検索漏れのないように複数指定した (SWISS-PROT Database の定期リリースデータ+新着データ、PIR Database のアミノ酸配列+定期リリースデータ、DAD Database のアミノ酸配列、DDBJ Database のリリース+新着データからアミノ酸翻訳配列を取り出したデータおよび PDB Database のアミノ酸配列+定期リリースからアミノ酸配列を取り出したデータ)。このため、同一アミノ酸配列が複数の Database に登録されている場合、複数の検索結果が出力される。各図において、A: Database 上の検索対象アミノ酸配列。B~D: 検索対象と相同性の高いアミノ酸配列の名称、スコア、期待値を記した。

## YdiO:

MTNFILNENKQLSLAIEDENIENFYIDGTDLVRKIIRRS<sup>A</sup>SGSGVTSRVPVLSTQDLEN  
KNLHEL<sup>B</sup>YDESWLRMKNRPNTELT<sup>A</sup>TESINIADLFSGCGGLSLGVWEACRALGINPR  
FSFACDLNEAALSVYEKNFSPDFSLNESIEKHINGELGAPLTV<sup>A</sup>EEQRIKDKVKKIDFI<sup>B</sup>  
LAGPPCQGHSDLNNHTRRKDPRNALLMRVSRVIELFQPSSVLVENVPGIIHDKSG  
SFKEFKNHLKTQGY<sup>C</sup>YFDEIVLNAEKLGVSQARRRYFIFASKTPVSSLNQINEFYST  
NSRPISWAISDLVENVGDDIFNTASEHSLENKRRIEYLFENNLFELPNSERPDCHR  
LKPHSYKSVYGRMYWDRPAPTITR<sup>D</sup>GFGSTGQGRFVHSLKRTITPHEAARIQF  
FPDFNF<sup>E</sup>GD<sup>E</sup>LRRRQYQDVIGNAVPSKLSYLLALHQLR  
F - - - - -

## YdiP:

MKVVS<sup>A</sup>LFSGIGGIELGLHQSGHTTEIFCEVDPLAKAVLSKNFPGVKIEDDINEIREL  
PSCDLVAAG<sup>B</sup>FPCQDLSQAGGKEGIDGSRSGLVK<sup>C</sup>KLFELIEKKEHANRPPWILIENV  
PYMLRLNRGKAMS<sup>D</sup>YLT<sup>D</sup>SVLSELGYTWAYRTVDARCFGLPQRRHRVILLASLFEDP  
KDVIFSQDHSEPDLDGKPSVVDHSNYYGFYWTEGLRGV<sup>D</sup>GWAREAVPPIKCGSSV  
GIASPPAVWSPYEDIVGTINIRDAERLQGFPE<sup>E</sup>DWTNITTETGKDIKEGARWRLVGN  
AVSVRVSKWIGENLSQP<sup>E</sup>KGSISDFEGELVTKTWPSAAWGYGDKKYKVPVSKWV  
-----  
ANTEQIAISEFLNHPLKPLSARALNGFLGRAARCTNVNYSDEFINSLERCKDR  
QLQKV

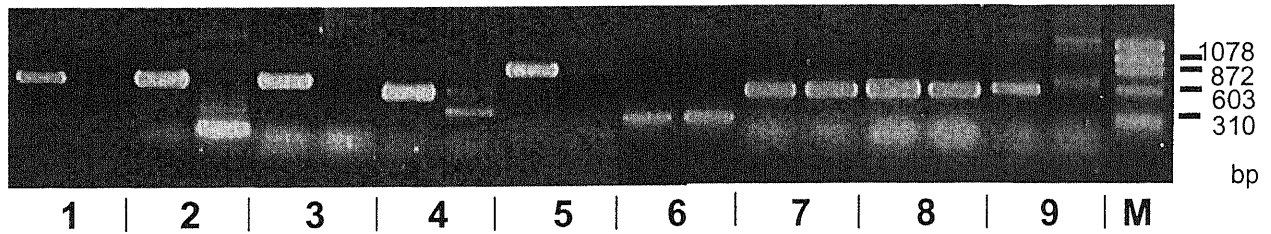
図3-1-6 YdiOおよびYdiPアミノ酸配列のブロック・機能モチーフ検索結果

YdiOおよびYdiPアミノ酸配列に保存されているブロックと機能モチーフを、モチーフ検索プログラム MOTIF (Searching Protein and Nucleic Acid Sequence Motifs: <http://motif.genome.ad.jp/>)を用いて、PROSITE database (Hofmann et al., 1999) およびBlocks Database (Henikoff et al., 1999) を対象に検索を行った。下線(細線) A~F: ブロック検索の結果、C5-メチルトランスフェラーゼブロック(Blocks No. IPB001525A~F)の位置を示した。A~FはIPB001525A~Fを示す。下線(太線): 機能モチーフ検索の結果、active site(Prosites No. PS00094): [DENKS]-x-[FLIV]-x-x-[GSTC]-x-P-C-x-x-[FYWLIM]-S (実線部)、およびC-terminal signature (Prosites No. PS00095): [RKQGTG]-x-x-G-N-[STAG]-[LIVMF]-x-x-x-[LIVMT]-x-x-x-[LIVM]-x-x-x-[LIVM] (破線) (Xは任意のアミノ酸)の位置を表した。機能モチーフはChenらの示した共通配列(Chen et al., 1991)が使用されている。

### 3-2. RM125 株における制限修飾領域の欠損の確認

Uozumi らが分離した RM125 株 (Uozumi et al., 1977) は、*BsuM* 制限活性を持つ Marburg168 株を、*BsuM* 制限活性を持たない *B.amyloliquefaciens* の染色体 DNA にて形質転換させた制限欠損変異株であるが、同時に *BsuM* 修飾活性も欠損した株であることが明らかになった (Uozumi et al., 1977)。また、RM125 株の変異は、その染色体の一部が相同組みかえにて *B.amyloliquefaciens* 染色体の一部と置き換わった結果であると考えられるので、RM125 株では *BsuM* 遺伝子自体が存在していない事が考えられる。よってその欠損した ORF を調べることで *BsuM* の活性を担う遺伝子が予想できるかもしれないと考え、Marburg 168 株の遺伝子破壊用の ORF 内部領域を増幅できるプライマーペアを用い (材料・方法参照)、Marburg 168 株と RM125 株の染色体 DNA をテンプレートとし、染色体 56 度に存在する ORF、つまり *ydiO* ~ *ydjA* を含む *groESL-gutB* 間の ORF の有無を 2 つの株について比較することで、RM125 株の欠損している ORF を検出した。また、この領域 (*groES-gutB* 間) の Long PCR 増幅を行い、RM125 株におけるこの領域の塩基長を検出した。図 3-2 に、PCR 増幅の結果および LongPCR 増幅の結果を示した。その結果、*groES, groEL* および *gutR, gutB* は 168 株、RM125 株共に保持されているが (図 3-2A レーン 6-9)、*ydiO, ydiP* および *ydiR, ydiS, ydjA* は RM125 株染色体上に保持されていない事がわかった (図 3-2A レーン 1-5)。さらに、これら ORF を全て含む、*groEL* より下流領域から *gutB* より上流領域までの約 15.7kbp の領域の LongPCR 増幅が見られず、代わりに 5kbp の増幅が確認された。この結果より、RM125 株は少なくとも *ydiO* ~ *ydjA* を含む遺伝子領域が *B.amyloliquefaciens* の染色体 DNA と置換されていると考えられる。また、LongPCR のプライマー結合部位と、プロフェージ部位との関係から、この株においては 13kbp のプロフェージ 3 領域が、1.9kbp の DNA で置き換わっているものと考えられる。

A:



B:

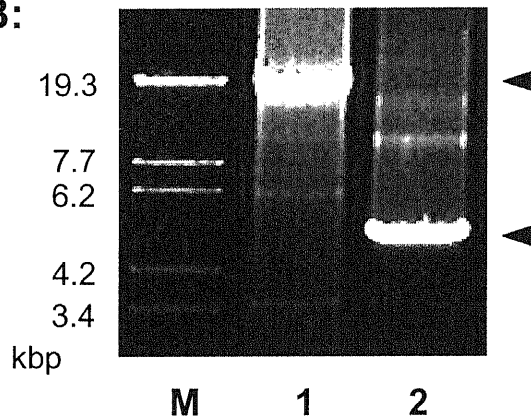


図3-2 PCRおよびLong PCRを用いたRM125株における制限修飾領域の欠損の確認

実験方法、条件等は材料・方法参照。A: 各遺伝子の内部領域プライマーペアを用いた遺伝子増幅。2組のレーン中右はPCRテンプレートに168株染色体DNAを使用したもの、左はPCRテンプレートにRM125株染色体DNAを使用したもの。M: 分子量マーカー、増幅した遺伝子は、1:*ydiO*、2:*ydiP*、3:*ydiR*、4:*ydiS*、5:*ydjA*、6:*groES*、7:*groEL*、8:*gutR*および9:*gutB*。B: *groEL* - *gutR*領域のlongPCR増幅。M: 分子量マーカー、1: テンプレートに168株染色体DNAを使用したもの、2: テンプレートにRM125株染色体DNAを使用したもの。



### 3-3. 転写産物解析による *ydiO-ydjA* のオペロン構造解析

解析対象とした*ydiO*~*ydjA*は、ファージによってもたらされた外来性のDNAであると推測されているが（序論参照）、これらORFを解析する前に、このような外来性の遺伝子が実際に枯草菌内で転写、発現しているのかを確認する必要があると思われる。また、シーケンスによってこれらORFの位置が同定されているが（図1-1）、その遺伝子配列の並びから、*ydiO*と*ydiP*、*ydiR*と*ydiS*および*ydjA*がおのおの一つの転写単位を構成していることが予想される。これを確認し、その転写単位や発現時期から各ORF間の関係を明らかにするためにも、各ORFの転写をノーザンハイブリダイゼーションによって検出する実験を行った（材料・方法参照）。

大腸菌や他のバクテリアと同じく、枯草菌においても、その発現変化にはRNAポリメラーゼの $\sigma$ 因子の変化が関与しているが、特に孢子形成過程においては、 $\sigma$ 因子が次々と変わり、それに伴って孢子形成が進行していく、いわゆる $\sigma$ カスケードによる転写の変化が起こることが知られている（Haldenwang, 1995）。本実験では目的のORFがどの $\sigma$ 因子によって転写されているのか、つまり生育のどの時期に発現しているのかが不明であったため、この実験においては細胞の培養は孢子形成培地（DSM培地）にて行い、生育の各時期における発現を観察できるようにした（材料・方法参照）。この実験による転写の検出結果を図3-4に示した。結果として、*ydiO*および*ydiP*の転写は、生育の対数増殖期から定常期初期（Log-T1期）に起こっており、その転写産物は共に約3.0kbp（3.0-3.5kbp）のmRNA長を持っていることがわかった（図3-3b,cバンドC）。この2つのORFの長さは、1283bpおよび1169bpであるが、同一のmRNA上に収まる長さであることや、*ydiO*のORFの3'末端から*ydiP*のORFの5'末端までは21bpと、この2つのORFが連続していること（図1-1）、加えて発現時期の同一性から考え、これら2つのORFは1つの転写ユニット（オペロン）を構成していると考えられ

る。

また、これら2つのORFに共通に見られる9.0kbp超の転写（図3-3b,cバンドA）は、前述した*ydiO,ydiP*が受けている短い距離の転写以外に、その上流または下流からの比較的長い距離の転写も同時に受けていることを示している。そこでこれら*ydiO,ydiP*の上流に位置する*groEL*遺伝子の転写を確認すると、*groESL*共の長さ(2004bp)に相当する約2.5kbpの転写と（図3-3aバンドB）、*ydiO,ydiP*に共通に見られた9.0kbp超の転写が見られた（図3-3aバンドA）。よって、*ydiO*および*ydiP*は*groESL*上流からの転写も受けていることが考えられる。この上流からの転写については本論文の後半にて検証する。

また、*ydiS*の転写は、生育の対数増殖期から定常期初期（Log-T1期）に起こり、その転写産物は約4.0kbpのmRNA長を持っていることがわかった(図3-3eバンドD)。*ydiS*は1031bpであるが、ORFの連続性や（*ydiR*の3'末端から*ydiS*の5'末端までは30bp、*ydiS*の3'末端から*ydjA*の5'末端までは3bp）、*ydiR,ydjA*をプローブとした場合にも同一バンドが検出され、その発現時期も同一であったこと(図3-4dおよびfバンドD)から、その上流および下流の*ydiR*(941bp)および*ydjA* (1397bp)とオペロンを構成していると考えられる。

また、図3-4において各レーンにはバンドが数本確認できるように見えているが、このバンドの境目（白く抜けている部分）は16Sおよび23SリボソームRNAと同じ位置にある。全mRNAの90%以上はこの16Sおよび23SリボソームRNAで占められていることから、これら数本に見えるバンドは元のRNAのスミアーになったバンドがリボソームRNAでマスクされ、バンドが数本あるように見えているものと考えられる。

これら実験結果は、ファージ由来と考えられる*ydiO*~*ydjA*が枯草菌内で確かに転写を受けていること、これら5つのORFは上流の*ydiO-ydiP*の2つが、下流の*ydiR-ydiS-ydjA*の3つがおのおの同一の転写単位（オペロン）を構成していること、およびその発現時期はどちら

のオペロンとも対数増殖期から定常期初期にかけて起こっていることを示している。YdiOとydiPが、およびydiR、ydiS、yjdAがおのおのオペロンを構成している事は、これら2つのORF群がおのおの一つの機能単位を構成している可能性を示唆している。また、発現時期が対数増殖期から定常期初期にかけてであることから、これらオペロンは、ハウスキーピング遺伝子の $\sigma$ である $\sigma^A$ によって転写されていると予測される。つまりこれらオペロンを構成しているORFは、通常の生育をしている間は転写されている事がわかる。

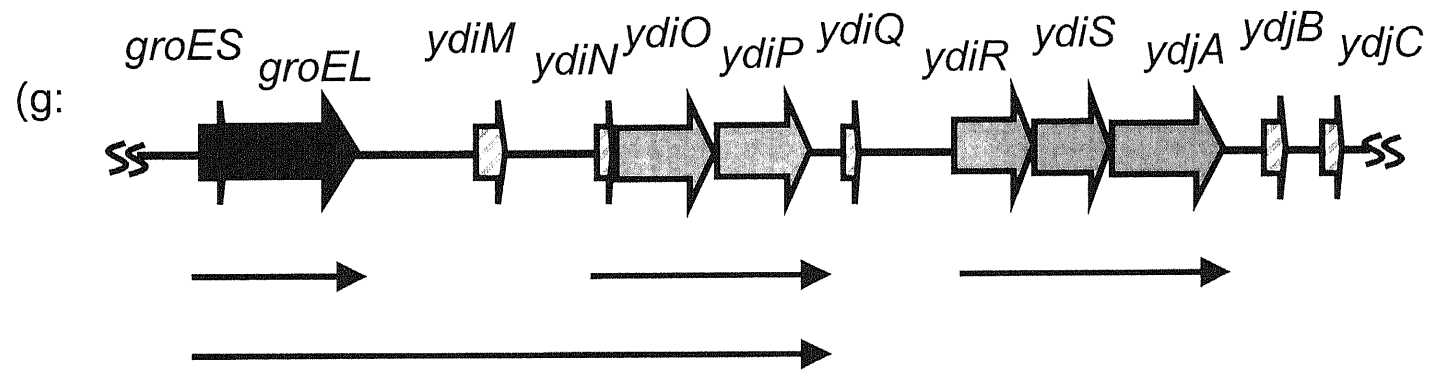
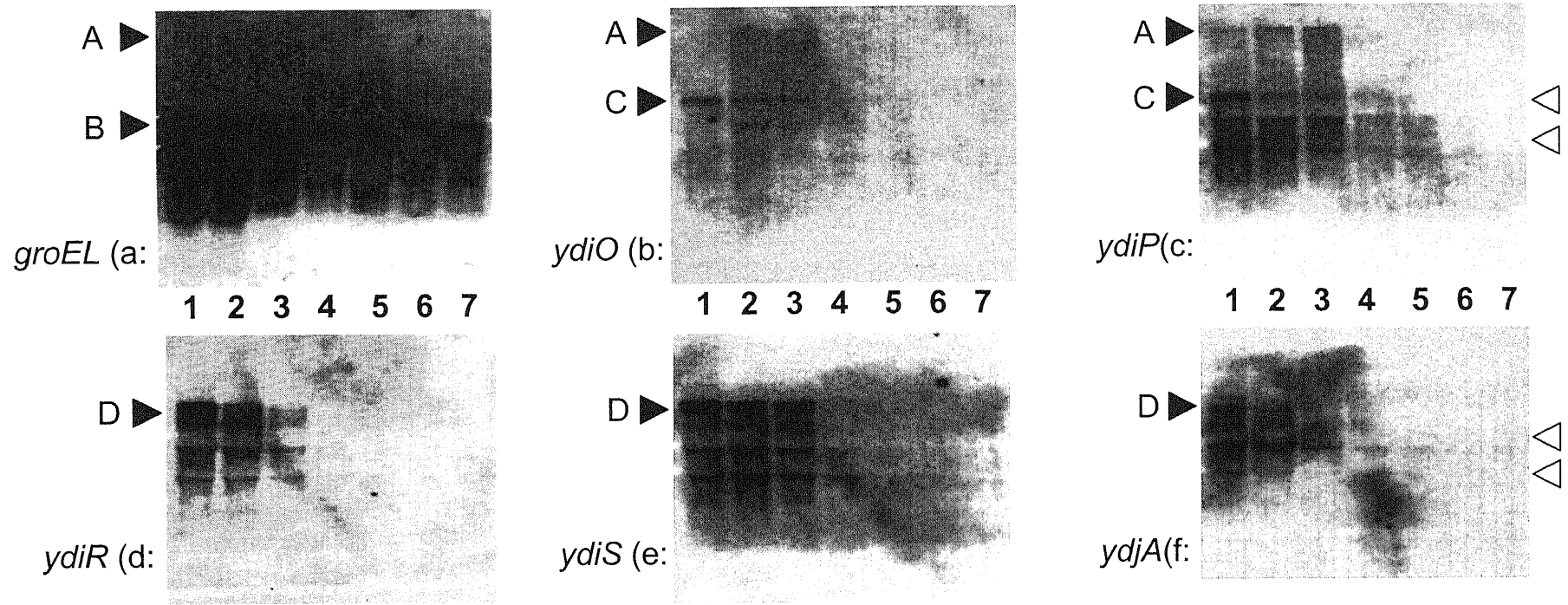


図3-3 ノーザンハイブリダイゼーションを用いた発現解析

### 図3-3 注釈

実験方法、条件等は材料・方法参照。各レーンは 1 : (L) 対数増殖中期 (O.D.<sub>600</sub>=0.7)、  
2 : (T0) 対数増殖期一定常期移行期 (孢子形成開始期)、3 : (T1) 孢子形成開始期後  
1 時間、4 : (T2) 孢子形成開始期後 2 時間、5 : (T3) 孢子形成開始期後 3 時間、6 :  
(T4) 孢子形成開始期後 4 時間および 7 : (T5) 孢子形成開始期後 5 時間後の菌体サンプ  
ルから調整した全 RNA を使用した。各メンブランに使用した RNA プローブに対応する遺  
伝子は、a:*groEL*、b:*ydiO*、c:*ydiP*、d:*ydiR*、e:*ydiS* および f:*ydjA*。白三角：16s (1.5kbp)  
および 23s (2.9kbp) リボゾーム RNA の位置。検出されるバンドは全 RNA の 90%を占め  
るリボゾーム RNA によって分断されているように見える。黒三角：検出されたバンドの位  
置。リボゾーム RNA の位置から、A:9.0kbp 超、B:約 2.5kbp、C: 約 3.0kbp、D:約 4.0kbp  
と考えられる。g : a-f の結果から予想される転写地図。→ : 転写産物の長さとして予想される  
転写位置を示している。

### 3-4. 遺伝子破壊株作成

本研究の目的は、*ydiO*, *ydiP*, *ydiS*, *ydiR* および *ydjA* の分子遺伝学的解析を行うことであり、その始めのステップは、各遺伝子の破壊株からその表現型を見ることであると思われる。RM125株に代表される制限修飾の表現型を失った変異株は今までに数多く獲得されてきたが、各 ORF のシーケンスはすでに明らかであるので (Kasahara et al., 1997, Kunst et al., 1997)、おのこの ORF にプラスミドを挿入することにより一遺伝子を破壊した株を作成することができる。そこで、まずは各 ORF の挿入破壊株をそれぞれ構築する実験を行った。まず ORF の内部領域 (600 から 800bp) を増幅できるプライマーペアを設計し (表 2-1-2)、枯草菌 Marburg 168 株染色体をテンプレートとして各遺伝子内部領域を PCR 増幅し、この断片をベクターにクローニングした。実験 3-3 の結果は、*ydiO-ydiP*、および *ydiR-ydiS-ydjA* が同一の転写単位、オペロンを構成していることを示している。そのためオペロン上流の遺伝子に対する挿入破壊が、そのオペロン下流遺伝子の転写に影響を与える極性効果 (polar effect) を考え、ベクターはスパックプロモータ (*Pspac*) とターミネータ (Ter) を持つ pMUTIN ベクター (pMUTIN2, Vagner et al., 1998, 図 2-1-1) を使用した。このクローニングサイトに遺伝子断片を挿入し、これによって枯草菌を形質転換すると、枯草菌染色体上の標的遺伝子配列とクローニングベクター上の標的遺伝子配列との間でキャンベルタイプの相同組換えがおこり、ベクターが標的遺伝子内に挿入される (Niaudet et al., 1982, 図 3-4(a))。これによって、標的遺伝子が挿入破壊される。標的遺伝子のオペロン下流の遺伝子は、ベクターが挿入されることでベクター内の転写終結によって転写を受けなくなり、そのすぐ下流のスパックプロモータ制御下におかれるようになる (図 3-4(b))。IPTG を培地中に添加することで、スパックプロモータによって破壊遺伝子下流の転写が起こるようになり、極性効果が回避できる (図 3-4(c))。

この方法で、*ydiO*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* の挿入破壊を試みた。その結果、*ydiR*, *ydiS*, *ydjA* の形質転換体に関しては  $10^4$  形質転換体 /  $\mu\text{g}$  DNA の頻度で遺伝子破壊株を得た。しかし、*ydiO*, *ydiP* の形質転換体は得られなかった ( $2 \times 10^7$  の菌体をプレートに接種しても、菌のコロニー (形質転換体) が得られなかった) (表 3-4(a))。この結果より、*ydiO* および *ydiP* は破壊不能な必須遺伝子であると考えられる。しかしながら、*ydiO*~*ydjA* 遺伝子はプロファージとして細胞外から進入してきた遺伝子領域にあると考えられていることから (Kunst et al., 1997)、その様な遺伝子が細胞にとって単純に必須遺伝子であるとは考えにくい。また、この領域を欠損した RM125 株は生存していることも、*ydiO* および *ydiP* が単なる必須遺伝子ではないことを示している。そこで、薬剤耐性マーカーを換えるために pET24b neo ベクター (Fujita and Sadaie, 1998) に *ydiO*, *ydiP* 内部領域断片をクローニングし、これを用いて同じプロファージ上の破壊可能であった *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* の破壊株を受容菌として形質転換を試みたところ、何れの破壊株においても *ydiO*, *ydiP* とともに形質転換体を得た (表 3-4(b-d))。この形質転換体は薬剤耐性マーカー、および挿入プラスミド配列に特異的なプライマーによる PCR にて、pMUTIN と pET ベクターによる挿入破壊が 2 遺伝子に対して独立に行われていることを確認した。また各破壊株の培養等は IPTG 存在下で行っており、*ydiR*, *ydiS* および *ydjA* おのおのの破壊の影響を見ていると考えることができる。

結果として、*ydiR*, *ydiS* および *ydjA* から構成されるオペロンの各 ORF を破壊することで、*ydiO* および *ydiP* の破壊が可能になった。このことから、このオペロンの (またはオペロンを構成する ORF の) 働きは、*ydiO* および *ydiP* の破壊に致死性をもたらすものであると考えることができる。

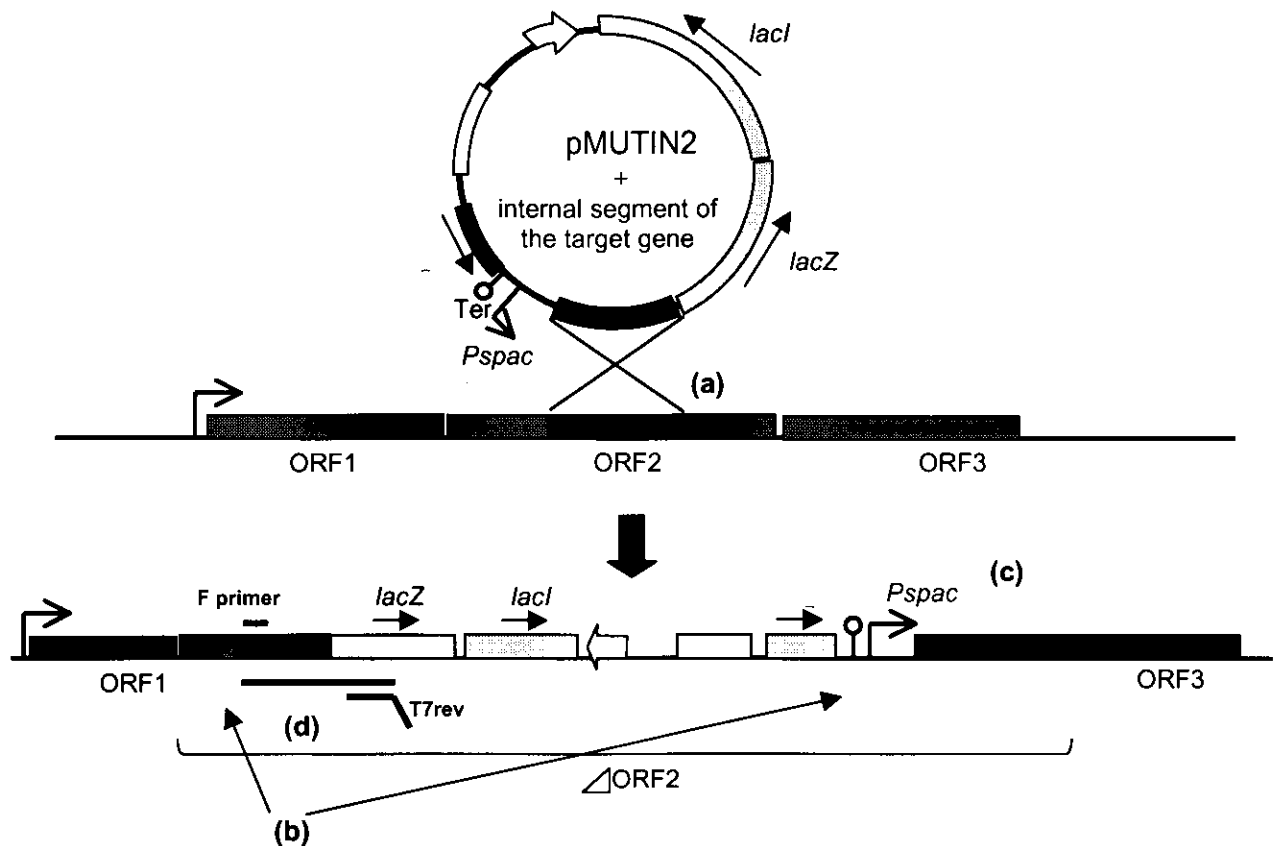


図 3-4 枯草菌形質転換による遺伝子挿入破壊図

枯草菌内に取り込まれたプラスミドが相同組換えによって枯草菌の染色体に組み込まれる過程を模式図化した。図では例としてオペロンを構成する ORF1~3 の 3 遺伝子について、ORF2 を挿入破壊する場合である。(a) : ORF2 の遺伝子断片を持つベクターは、枯草菌内で相同な目的遺伝子(ORF2)とキャンベル型の相同組換えを起こし、枯草菌染色体内に挿入される (Niaudet et al., 1982)。(b) : ORF2 内部にプラスミドが挿入されるため、ORF2 は破壊される。上流からの転写もベクター内のターミネータによって終結する。(c) : 破壊された遺伝子の下流にある ORF3 は、ベクターの *Pspac* 制御下におかれる。これは枯草菌ファージ SPO-1 のプロモータと大腸菌 *lac* オペレータを組み合わせたプロモータで (Yansura and Henner., 1984)、ベクターの持つ *lacI* によって抑制されている。IPTG を培地中に添加することでこの抑制がはずれ、下流にある ORF3 の転写が起こるようになる。(d) 結果・考察 3-4 におけるノーザン解析用 RNA プロープのテンプレートとなる PCR のプライマー結合部位および増幅部位を示した。



Target genes:	168 <sup>(a)</sup>	Recipient (genotype)		
		YDIR23 <sup>(b)</sup> <i>ydiR</i> ::pMUTIN2	YDIS101 <sup>(c)</sup> <i>ydiS</i> ::pMUTIN2	YDJA34 <sup>(d)</sup> <i>ydjA</i> ::pMUTIN2
<i>ydiO</i>	* < 0.03	5.8	5.7	6.7
<i>ydiP</i>	* < 0.06	7.1	6.4	5.8

(Km<sup>r</sup> Transformants /  $\mu$ g DNA  $\times 10^4$ )

表 3-4 枯草菌形質転換による修飾遺伝子破壊実験

実験方法、条件等は材料・方法参照。数値は Km 耐性形質転換細胞  $\times 10^4 / \mu$ gDNA を表している。Em は  $0.3 \mu$ g/ml を、Km は  $5 \mu$ g/ml を LB 寒天培地中に添加した。また 1 遺伝子の破壊による形質転換への影響を見るために、選択培地中には全て 1mM の IPTG を添加し、オペロン下流遺伝子の発現を誘導した（結果・考察 3-3 参照）。(a)：遺伝子破壊用プラスミド受容菌を野生株（168 株）にした場合の形質転換効率。横軸は破壊する標的遺伝子を示した。以下、(b)：*ydiR* 挿入破壊株（YDIR23）を受容菌とした場合、(c)：*ydiS* 挿入破壊株（YDIS101）受容菌とした場合、(d) *ydjA* 挿入破壊株（YDJA34）受容菌とした場合。\* この時形質転換体（コロニー）が得られなかった(本文参照)。

### 3-5. 形質転換による外来プラスミドの導入に対する *ydiO-ydjA* のふるまい

制限修飾系の表現型をみる方法として、その当初から行われてきたのがファージ感染効率を見る方法である。枯草菌制限修飾系に関しても、Shibata, Ando らのファージ  $\Phi 105C$  を用いた感染率測定に代表される多くの実験が行われてきた（序論参照）。そこで、結果・考察 3-4 で作成された *ydiO~ydjA* 各破壊株の表現型を見るための最初の試みとして、ファージ  $\Phi 105$  を 168 株および各破壊株に感染させ、PFU を測定することでその表現型を確認する実験を行った。Shibata、Ando らの用いた  $\Phi 105C$  そのものは入手できず、Laboratory Stock も絶えていたため、Laboratory Stock の  $\Phi 105$  溶源菌から新たに  $\Phi 105$  を誘発増殖させ、この  $\Phi 105$  に紫外線を照射することで変異を誘発し、クリアプラークを作る変異ファージ  $\Phi 105C$  を新たに獲得した。この  $\Phi 105C$  を 168 株および各破壊株に感染させ、その感染効率を測定する実験を行ったが、その宿主を変化させても宿主に依存した感染効率の有意な変化を確認することができなかった。つまり、*ydiO~ydjA* 各破壊株（ただし *ydiO* と *ydiP* の破壊株では *ydiS* も破壊されている）は  $\Phi 105C$  ファージに対する制限効果の欠損が見られなかったことになる。この結果のみから考えれば、*ydiO~ydjA* によって構成される遺伝子群が、制限修飾の役割を担う遺伝子ではないということがまず第一に考えられるが、序論で述べたように、*BsuM* の制限修飾活性は配列特異的であると考えられることから、Shibata らの用いた  $\Phi 105C$  は野生型  $\Phi 105$  とは異なり、クリアプラーク等の変異によって *BsuM* 認識配列が増加していたため、彼らの行った実験においては特に制限効果が強く現れたとも考えることができる。その根拠として、(1) 1988 年の Bron らの実験では、この *BsuM* の制限効果は *XhoI* 認識配列を多く持つプラスミドに対してはより強く作用することが示されている。この実験では、*XhoI* 認識配列を 3 個持つプラスミドに対する制限効果は、配列を 1~2 個持つプラスミドに対しての効果よりも強いことが示されている (Bron et al.,

1988)。 (2)  $\Phi$ 105 の全塩基配列 (DDBJ データベース登録より、Kobayashi et al., 1998, Unpublished) を解析すると、*Xho*I 認識配列は 2 個のみであったが、それに似た配列は多く存在していた (たとえば *Taq*I 制限酵素認識配列 (TCGA) は 76 個)。これらのことより、Shibata らの用いた  $\Phi$ 105C はクリアプラーク等の変異で *Xho*I 認識配列の数が多くなっていたため、その制限効果が明瞭に現れたとも考えられる。

そこで、ファージを用いた実験よりも新しい、実際にその制限活性を観察することに成功した Bron らの実験 (Bron et al., 1988) にて用いられた *Xho*I 配列を持たないプラスミドである pHV33 プラスミドと、3 つの *Xho*I 配列をもつ pHV1401 プラスミド (図 2-2 参照) によって 168 株および各破壊株を形質転換し、その形質転換効率を見る実験を行った。pHV33 プラスミドと pHV1401 プラスミドの *Xho*I 配列の有無を確認するために、これらプラスミドを *Xho*I 制限酵素にて切断した結果を図 3-5 に示した。この結果から、実験に使用した、大腸菌から調整した pHV1401 プラスミドは *Xho*I 制限酵素で容易に切断できることを確認した。これらプラスミドを使用した感染効率測定の結果を表 3-5-1 および表 3-5-2 に示した。各形質転換効率は、クロラムフェニコール耐性形質転換菌のコロニー形成数を形質転換プラスミド量にて補正する形で表示した (表 3-5-1 および表 3-5-2 における(a)および(b))。しかしながら、この実験に用いた形質転換法 (材料・方法参照) では、枯草菌の持つ形質転換能を使用しているため、プラスミドの細胞への取り込みは野生株と破壊株の形質転換能の差やプラスミド長に依存してしまうことになるので、真に感染効率のみを見るためには制限修飾の影響を受けるプラスミドと受けないプラスミドとの形質転換効率の比を取り (表 3-5-1 および表 3-5-2 (c))、さらに 168 株 (親株) との比を取る (表 3-5-1 および表 3-5-2 (d)) ことで、その効率が明らかになると考えられる。その結果、*ydiO*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* 各破壊株 (YDIO01, YDIP01, YDIR23, YDIS101 および YDJA34 株) の形

質転換効率は、168 株に比べ数十倍の上昇が見られた（表 3-5-1 (d)）。ただし、この実験に用いた破壊株においては、その挿入破壊に使用した pMUTIN プラスミド、および形質転換に用いた pHV プラスミドシリーズは、どちらも pBR322 プラスミド由来（Vanger et al., 1998, Bron et al., 1988）であり、これら破壊株に形質転換を行った場合、染色体上の pMUTIN プラスミドと pHV プラスミド間で相同組替えが起ってしまう可能性が考えられる。よって、この実験における厳密な対照は、解析対象とした *ydiO*~*ydjA* 以外の ORF を同様に破壊した株でとる必要があるとも考えられる。そこで、本研究にて解析対象とした *ydiO*~*ydjA* 以外の ORF で、*ydiO*~*ydjA* に染色体位置に近い *ydiM*,*ydiN*,*ydjB* および *ydjC* を同様に破壊した株に対するプラスミド形質転換実験を行った。この結果を表 3-5-2 に示したが、何れの ORF 破壊も、形質転換効率の上昇を引き起こさなかった。なお、全ての実験においては各破壊株の一遺伝子破壊の影響を見るため、終濃度 1mM の IPTG を改変 Lennox 寒天培地中に添加して行われた（結果・考察 3-4 参照）。これらの結果は IPTG を改変 Lennox 寒天培地中に添加しなかった場合においても同様であった（数値等は示していない）。

これらの実験により、(1)野生株および *ydiM*,*ydiN*,*ydjB* および *ydjC* 破壊株においては、*XhoI* 認識配列を 3 つ持つプラスミドは、持たないプラスミドに比べてその形質転換効率が低下し(表 3-5(c))、(2)*ydiR*, *ydiS* または *ydjA* おのこの破壊によってのみ、形質転換効率の上昇を引き起こす (表 3-5(d)) ことが示された。なお、*ydiO*、*ydiP* 破壊株は *ydiS* の破壊も同時に行われているため、この実験においては *ydiO*、*ydiP* のみの破壊に対する影響を見ることは困難である。

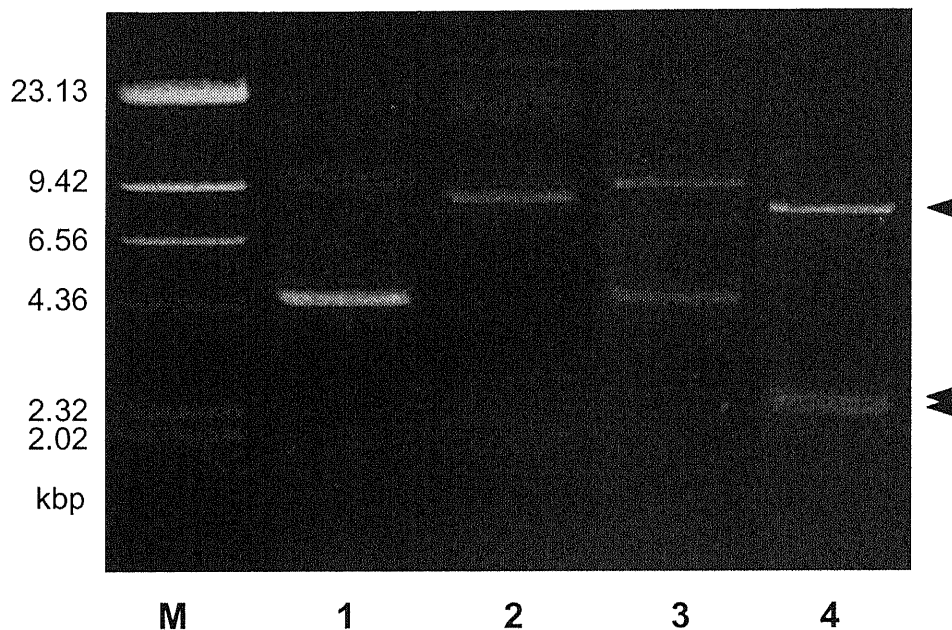


図 3-5 *Xho*I 制限酵素によるプラスミド切断

実験には *E. coli* C600 株から調製した pHV33 および pHV1401 プラスミドを使用した（材料・方法項目参照）。図に酵素処理後の DNA の電気泳動像を示した。1%アガロースゲルにて電気泳動を行ったのち、EtBr 染色にて DNA を検出した。M：分子量マーカー、1：pHV33DNA－制限酵素処理なし、2：pHV1401DNA－制限酵素処理なし、3：pHV33DNA－*Xho*I 制限酵素処理、4：pHV1401DNA－*Xho*I 制限酵素処理。黒色三角：pHV1401/*Xho*I 処理にて出現するバンド位置。pHV1401 は *Xho*I 制限酵素処理で約 2kbp-2kbp-7kbp の断片となる。各レーンの反応において、DNA は 0.5  $\mu$ g を処理に用いた。制限酵素処理は 10U *Xho*I(Takara 社製)と H バッファーを用い、37 度にて 1 時間反応させた。

Recipient strain	Disrupted ORF	pHV33 (a) (no <i>Xho</i> I site)	pHV1401 (b) (3 <i>Xho</i> I sites)	b/a (c)	Ratio (d)
168	WT	2.26	0.24	0.11	1
YDIO01	<i>ydiO</i> , <i>ydiS</i>	0.75	3.24	4.32	40.7
YDIP01	<i>ydiP</i> , <i>ydiS</i>	0.12	1.10	9.17	86.3
YDIR23	<i>ydiR</i>	0.38	1.28	3.37	31.7
YDIS101	<i>ydiS</i>	0.20	0.46	2.30	21.7
YDJA34	<i>ydjA</i>	0.13	0.54	4.15	39.1

表 3-5-1 外来プラスミドに対する *ydiO*~*ydjA* 破壊株の形質転換効率測定

実験方法、条件等は材料・方法参照。(a) : pHV33 プラスミドを使用した枯草菌形質転換効率。(b) : pHV1401 プラスミドを使用した枯草菌形質転換効率。(a)、(b)共に数値はクロラムフェニコール (Cm) 耐性形質転換細胞  $\times 10^4 / \mu\text{gDNA}$  を表している。Cm は終濃度  $5 \mu\text{g/ml}$  を改変 Lennox 寒天培地中に添加した。各破壊株の一遺伝子破壊の影響を見るため、終濃度  $1\text{mM}$  の IPTG を改変 Lennox 寒天培地中に添加した。(c) : pHV1401 (b)形質転換数 / pHV33 (a) 形質転換数。(d)168 株の形質転換数(c)を 1 とした時の割合。詳細は本文参照。

Disrupted ORF	pHV33 (a) (no <i>Xho</i> I site)	pHV1401 (b) (3 <i>Xho</i> I sites)	b/a (c)	Ratio (d)
WT	0.99	0.26	0.26	1
<i>ydiM</i>	0.45	0.09	0.20	0.8
<i>ydiN</i>	0.42	0.28	0.67	2.6
<i>ydiS</i>	0.32	1.77	5.53	21.3
<i>ydjB</i>	0.05	0.05	1.0	3.8
<i>ydjC</i>	0.18	0.11	0.61	2.3

表 3-5-2 外来プラスミドに対する各 ORF 破壊株の形質転換効率測定

実験方法、条件等は材料・方法参照。(a) : pHV33 プラスミドを使用した枯草菌形質転換効率。(b) : pHV1401 プラスミドを使用した枯草菌形質転換効率。(a)、(b)共に数値は表 3-5-1 と単位を合わせ、クロラムフェニコール (Cm) 耐性形質転換細胞  $\times 10^4 / \mu\text{gDNA}$  にて表している。Cm は  $5 \mu\text{g/ml}$  を LB 寒天培地中に添加した。(c) : pHV1401 (b)形質転換数 / pHV33 (a) 形質転換数。(d)168 株の形質転換数(c)を 1 とした時の割合。詳細は本文参照。

### 3-6. サザンハイブリダイゼーション法をもちいたゲノム修飾解析

Shibata, Ando らによって行われてきたファージ感染効率を見る実験や、本研究で行ったプラスミド形質転換効率を測定する実験（結果・考察 3-5）は、外来性の DNA が制限効果を受けるか否かを見たものである。制限修飾の働きのもうひとつは、自身の染色体 DNA を制限酵素の攻撃から守ること、つまり修飾活性であると考えられている。この働きを確認するには、染色体 DNA が制限活性によって切断を受けないことを観察することが挙げられる。染色体が切断を受けるか否か自体は、実際に染色体を制限酵素分解することで判断できるが、染色体を制限酵素で完全切断しても、その染色体の長さや認識部位の多さから、電気泳動像は正確なものでなく、その修飾が本当に認識配列に行われているかを知るのは難しいと思われる。そこで、サザンハイブリダイゼーション法を用いて枯草菌染色体上の修飾を部位特異的に確認する実験を行った。この実験は、修飾酵素による染色体特定部位の修飾の有無を検出するものであるが、その修飾がアイソシゾマーによる切断の阻害で検出できる等の仮定しなければならない。本実験では、*BsuM* による修飾を見ることを目的とするため、最初の試みとして、Guha や Jentsch らによって示された（Guha et al., 1985, Jentsch et al., 1983）*XhoI* 制限酵素をそのアイソシゾマーとして用いることにした。方法としては、枯草菌 168 株の全塩基配列中から *XhoI* 認識配列(CTCGAG)を検索し（枯草菌染色体には総計 192 箇所）の *XhoI* 認識配列が確認できた(図 3-6A))、その *XhoI* 配列上にかぶさるように設計されたプローブ（枯草菌染色体をテンプレートにした PCR にて増幅・作成したもの）を 168 株、RM125 株および各破壊株の染色体を *XhoI* 制限酵素で処理した DNA サンプルに対してハイブリダイズさせた（材料・方法および図 3-6B 参照）。これにより、染色体の *XhoI* 配列の切断の有無によって異なるバンドが検出される系ができる。染色体 54 度の *XhoI* 認識配列について実験を行った結果を図 3-6C に示した。この結果、プロファ-



ジ3領域完全欠損の RM125 株、および破壊株 YDIO01(*ydiO* および *ydiS* 挿入破壊株)の染色体は *XhoI* にて切断されたとと思われる短い2本のバンドのみが検出された(図3-6C、レーン2,3)。YDIP01(*ydiP* および *ydiS* 挿入破壊株)に関しても、切断によるものと思われる短い2本のバンドが検出されたが、切断を受けなかったと思われる長い1本のバンドも検出された(図3-6C、レーン4)。この YDIO01 および YDIP01 においての *ydiO* および *ydiP* の破壊では、そのプラスミド構築の都合上(結果・考察3-3参照)極性効果を回避できていないので、この場合 *ydiO* の破壊は *ydiP* の発現に影響を与え、*ydiP* は発現されていないか、極端に発現量が抑えられていると思われる。つまり YDIO01 株は *ydiO*, *ydiP* および *ydiS* 破壊株であり、YDIP01 株は *ydiP* および *ydiS* 破壊株であると考えられる。また、染色体を細胞外に取り出して制限酵素反応を行っていることから、この実験において DNA が切断されないのは、各遺伝子の活性を抑制するなどの、*in vivo* のみで観察されるような現象が原因ではなく、DNA 自体が *XhoI* 制限酵素活性に対して保護されるような修飾を受けていることが原因であると考えられる。よってこの実験結果は、(1) *ydiO* および *ydiP* は、染色体の *XhoI* 制限酵素による切断を妨げる修飾を染色体 DNA に対して行っていること、(2) *ydiO* のみでも、*ydiO*, *ydiP* 両方が存在する場合に比べて弱い修飾(*XhoI* 制限酵素による切断の阻害)活性をもつ、ということを示していると考えられる。野生株 DNA(図3-6C、レーン1)に見られる *XhoI* の切断によって生じたと思われる短い断片は、*ydiO*, *ydiP* が揃っていても、検定に用いた *XhoI* に対しては十分な修飾を示さないということを考えさせる。また *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* のいずれかが欠損していると(破壊されていると)、野生株の場合のようなバンドが検出されないことから、*ydiR*, *ydiS* および *ydjA* の欠損がこの阻害(修飾)活性を高めていると思われる。

またこの実験は、枯草菌染色体位置 54 度の *XhoI* 認識配列以外に、9 度 (図 3-6D)、172 度 (図 3-6E)、239 度 (図 3-6F)、265 度 (図 3-6G)、303 度 (図 3-6H) の合計 6 箇所の *XhoI* 認識配列に対しても行った。いずれの場合においても、染色体位置 54 度の *XhoI* 認識配列と同様に、RM125 株、および *ydiO* 破壊株の染色体は *XhoI* にて切断されたと思われる短い 2 本のバンドのみが検出された (図 3-6D-H、レーン 2,3)。ただし、野生株および *ydiP* 破壊株のバンドは各染色体位置によって少し異なっている (図 3-6D-H、レーン 1,4) これらを各染色体位置についてまとめることで、*ydiO*、*ydiP* の活性について、以下のような説明が考えられる。

D および G (9 度、265 度) : *XhoI* 配列が *ydiO*、*ydiP* 両方の破壊では修飾保護されない (切断を受ける) こと、および *ydiP* 破壊のみでは完全に修飾保護される (切断を受けない) ことから、*ydiO* は *XhoI* による切断を妨げる修飾を染色体 DNA に対して行っていることが考えられる。

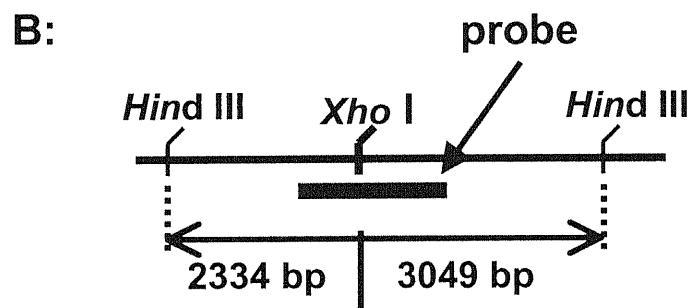
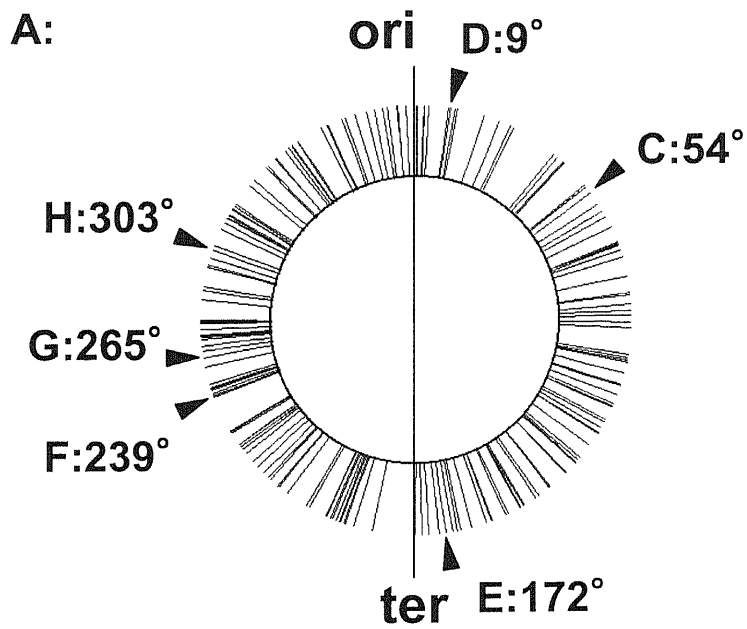
E (172 度) : *XhoI* による切断が十分ではないが、そのバンドパターンは D および G と同様であると考えられる。同様の反応にてこの部位が切断されにくいのは、*XhoI* 配列の場所や周囲の配列による違いなのかもしれない。

F および H (239 度、303 度) : 本質的には D、G における結論と同じ結論を支持する結果を示すと考えられる。ただし、(1) F においては登録シーケンスデータ (BSORF Database) から予想される *XhoI* 配列以外に *YdiO*、*YdiP* の修飾保護を受けにくい *XhoI* 配列があり、この配列のために RM125 株、*ydiO* 破壊株以外では *XhoI* 制限酵素による切断を部分的に受けられると思われる。(2) RM125 株や *ydiO* 破壊株では、*YdiO*、*YdiP* による修飾保護を失った *XhoI* 配列が優先的に切断され、予想しなかった *XhoI* 配列は切断されなくなったと思われる。

また H では、XhoI 配列の修飾保護が十分でないと考えられる。全体を通して、XhoI 配列の周囲の配列や染色体上の位置の違いにより *ydiO*, *ydiP* による保護の違いがあるのかもしれない。ただし、C, F, H の XhoI 配列の周囲および D, E, G の XhoI 配列の周囲の塩基配列中には、おのおの共通するような配列的特徴は見出せなかった。対象とする染色体上の XhoI 配列を増やせば、このことは明確になる可能性がある。

いずれにせよ、この結果は *ydiO* が XhoI による切断を妨げる修飾を染色体 DNA に対して行っているということは明らかである。

以上のことより、*ydiO* は XhoI 制限酵素による制限活性に対して十分な保護効果（修飾）をあたえ、*ydiP* も図 3-6C の例から、保護効果（修飾）を持つものと考えられる。また *ydiP* が単独で破壊できなかったこと（結果・考察 3-4）は、この *ydiP* が活性を持つものであることを示しており、*ydiO*, *ydiP* 共に XhoI 制限酵素活性に対する保護効果（修飾）をあたえていると考えられる。



C:

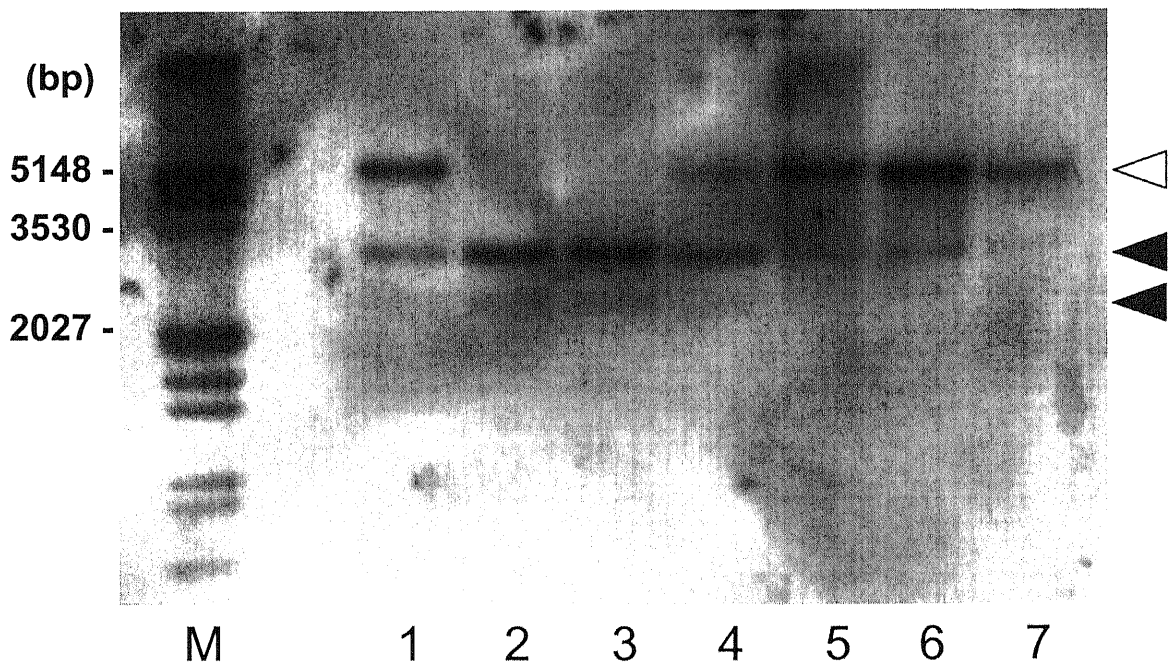


図3-6 サザンハイブリダイゼーション法をもちいたゲノムメチル化確認実験 (その1)

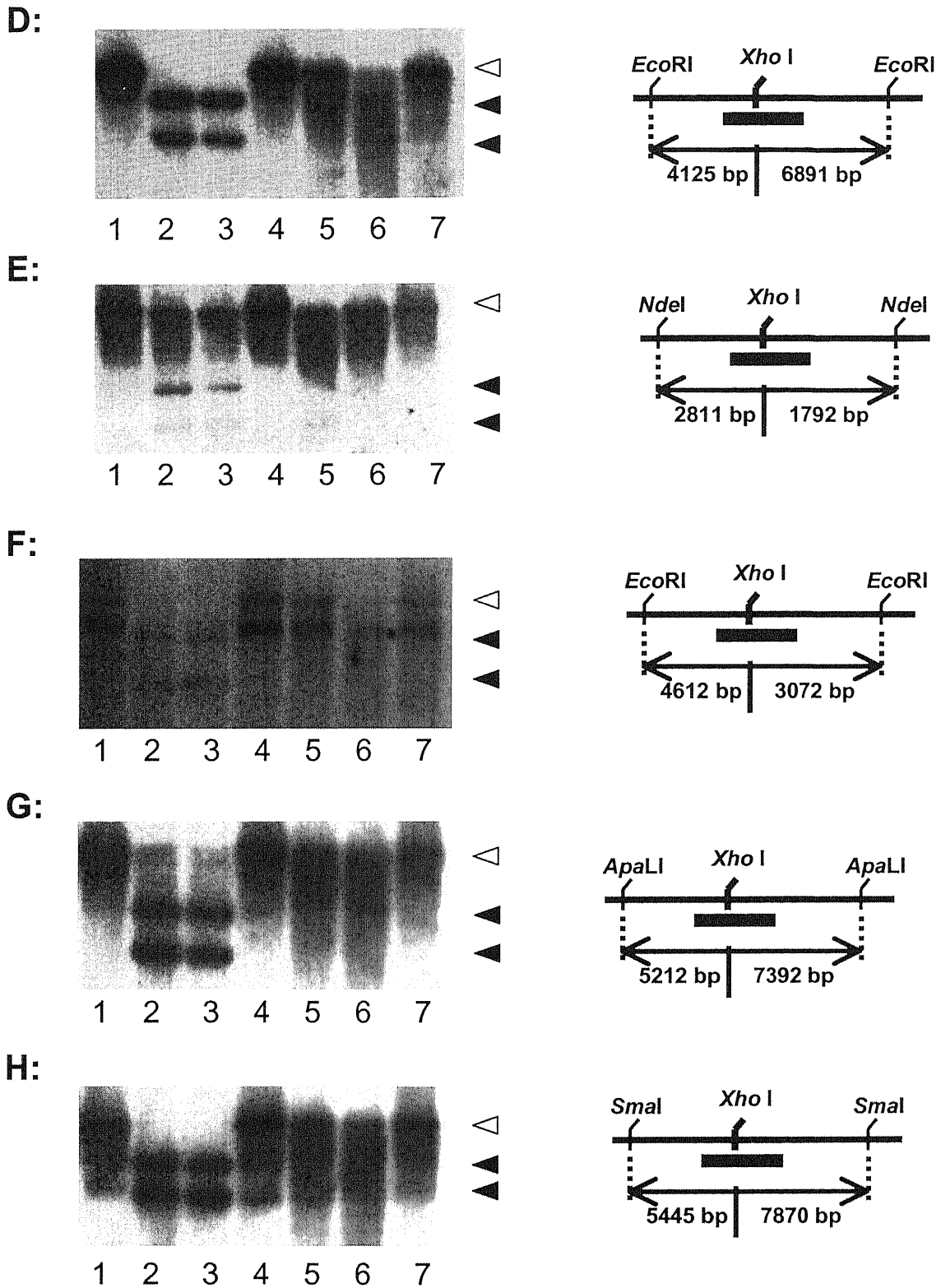


図3-6 サザンハイブリダイゼーション法をもちいたゲノムメチル化確認実験 (その2)

### 図 3-6 注釈

A : 枯草菌 Marburg168 株染色体中の *XhoI* 認識配列(CTCGAG)。枯草菌染色体を円で、*XhoI* 認識配列を線で示した。黒色三角：実験の標的配列の場所を示した。

B : 染色体地図とサザンハイブリダイゼーションにおけるプローブの結合部位模式図。

C : の検出に対して、染色体切断酵素 (*HindIII*) とメチル化修飾確認のための制限酵素 (*XhoI*) の位置、プローブの結合を示した。*HindIII* 制限酵素処理は M バッファーを使用した。*XhoI* 制限酵素処理は H バッファーを使用した。バッファーや実験条件の詳細は材料・方法項目参照。C : サザンハイブリダイゼーションの結果。染色体 54 度 (染色体位置 633916) の *XhoI* 認識配列について検出を行った。M : 分子量マーカー、1 : 168 株染色体、2 : RM125 株染色体、3 : YDIO01 破壊株染色体(*ydiO-* *ydiP-* *ydiS-*)、4 : YDIP01 破壊株染色体(*ydiP-* *ydiS-*)、5 : YDIR23 破壊株染色体(*ydiR-*)、6 : YDIS101 破壊株染色体(*ydiS-*)、7 : YDJA34 破壊株染色体(*ydiA-*)。白色三角：*XhoI* 制限酵素処理により染色体が切断を受けない場合に検出されるバンドの位置 (1 本)。黒色三角：*XhoI* 制限酵素処理により染色体が切断を受けた場合に検出されるバンドの位置 (2 本)。

D : 染色体 9 度 (染色体位置 106975) の *XhoI* 認識配列の検出結果および染色体地図とプローブ結合部位模式図。詳細は B : および C : と同様。染色体切断酵素は *EcoRI* を使用。酵素処理は H バッファーを使用した。同様に、E : 染色体 172 度 (染色体位置 2015718) 染色体切断酵素 *NdeI* (H バッファー)、F : 染色体 239 度 (染色体位置 2800360) 染色体切断酵素 *EcoRI* (H バッファー)、G : 染色体 265 度 (染色体位置 3105700) 、染色体切断酵素 *ApaI* (L バッファー)および H : 染色体 265 度 (染色体位置 3550939) 、染色体切断酵素 *SmaI* (T+BSA バッファー)。

### 3-7. *ydiR-ydiS-ydjA* オペロン発現誘導株を用いた解析

本研究における実験によって、*ydiR,ydiS* および *ydjA* 破壊株は、*XhoI* 認識配列を持つプラスミドに対しての形質転換効率が野生株等に比べて上昇することが示された（結果・考察 3-5）。また *ydiO* および *ydiP* の破壊により染色体が *XhoI* 制限酵素で切断を受けるようになること（結果・考察 3-6）が明らかになった。この 2 つの実験結果は、それぞれ *ydiR-ydiS-ydjA*、および *ydiO-ydiP* の 2 つの系についての解析を表すものであるが、破壊株作成実験（結果・考察 3-4）より、この 2 つの系に相関関係があると考えられる。この 2 つの実験（系）の関連をより明確にするためには、この *ydiR-ydiS-ydjA* の活性を *ydiO, ydiP* 破壊株で見る必要がある。しかし結果・考察 3-3 が示すように、*ydiR,ydiS* および *ydjA* が正常な状態で、*ydiO* または *ydiP* を破壊することは不可能である。そこで、*ydiR,ydiS* および *ydjA* がオペロンを構成していること（結果・考察 3-3）を踏まえ、この *ydiR-ydiS-ydjA* オペロン上流、つまり *ydiR* の上流部に、遺伝子挿入破壊に用いた pMUTIN 2 プラスミドベクターを挿入し、*ydiR-ydiS-ydjA* オペロンを *spac* プロモータ制御下におき、このオペロンの発現を IPTG 添加の有無で制御する系を作成した（原理、方法等は材料・方法および結果・考察 3-4 参照）。ベクターにクローニングする際使用した PCR 増幅断片のためのプライマーペアは RprmF および YdiRR を用いた（表 2-1-2 参照）。枯草菌の形質転換は前述の方法によって行い、（材料・方法 2-4 参照）これにより RSA01 株を獲得した。この株は培地中に IPTG を添加しなければ *ydiR-ydiS-ydjA* オペロン破壊株として扱うことができる。RSA01 株において、*ydiR-ydiS-ydjA* オペロンが発現されていないことは、結果・考察 3-3 の挿入破壊株作成の際に使用した *ydiO* および *ydiP* の配列をもつ pET24b neo ベクターによって RSA01 株を形質転換し、*ydiR-ydiS-ydjA* オペロン誘導かつ *ydiO* 又は *ydiP* 破壊株が取得できたことでも証明された。なお、この確認実験において、IPTG を添加した選択培地を用い

た場合には形質転換株のコロニー形成はなかった。この獲得した RSA01 株の *ydiO* および *ydiP* 破壊株から、RSAO105 株および RSAP115 株を選択し、RSA01 株と合わせて培養実験に使用した。

これらの株の生育を、培養液吸光度と生菌数によって観察した結果を実験条件等と共に、図 3-7 に示した。この実験においては対数増殖初期-中期 (O.D.<sub>600</sub>=約 0.3) の培養液中に終濃度 1mM の IPTG を添加し *ydiR-ydiS-ydjA* オペロンを発現させて、その後の生育を観察した。その結果、(1) IPTG を培地中に添加していない時の RSAO105 株および RSAP155 株の生育は、*ydiO,ydiP* が破壊されていない 168 株および RSA01 株と比較して変化がなかった(図 3-7 黒マーカー)。(2) IPTG を培養途中に培地中に添加した場合、168 株および RSA01 株の生育は IPTG を培地中に添加していない場合と同じだが、RSAO105 株および RSAP155 株の生育は IPTG 添加 30 分後には殆ど停止し、その後培養液吸光度は変化しなかった(図 3-7 灰マーカー)。(3)RSAO105 株および RSAP155 株の生菌数は、IPTG を添加すると急激に低下した。これはコロニー数を計測する IPTG 無添加の改変 Lennox 寒天培地上にコロニーが生成しなかったことを示している。*ydiR-ydiS-ydjA* オペロン発現誘導後の RSAO105 株および RSAP155 株においては、どの時間のサンプルにおいても、コロニーの生成は見られなかった(図 3-7 白抜マーカー)。

生育の停止した細胞が IPTG 無添加の培地上で生育を回復できないことは、この生育の停止した原因、つまり *ydiR-ydiS-ydjA* オペロンの発現が細胞の不可逆的な生育停止、つまり細胞の死滅を誘発したものと考えられる。また、細胞の死滅後も培地吸光度が停止しないことは、この死滅によって細胞自体は溶菌せずに残っていることを示している。

しかしながら、*ydiO* および *ydiP* が破壊されていなければ、*ydiR-ydiS-ydjA* オペロンを誘導しても生育には変化が見られないことから、*ydiR-ydiS-ydjA* オペロンのもつ細胞を死滅さ



せる作用を、*ydiO* および *ydiP* が抑制していると考えられる。この結果は、結果・考察 3-4 と合致するものである。

i

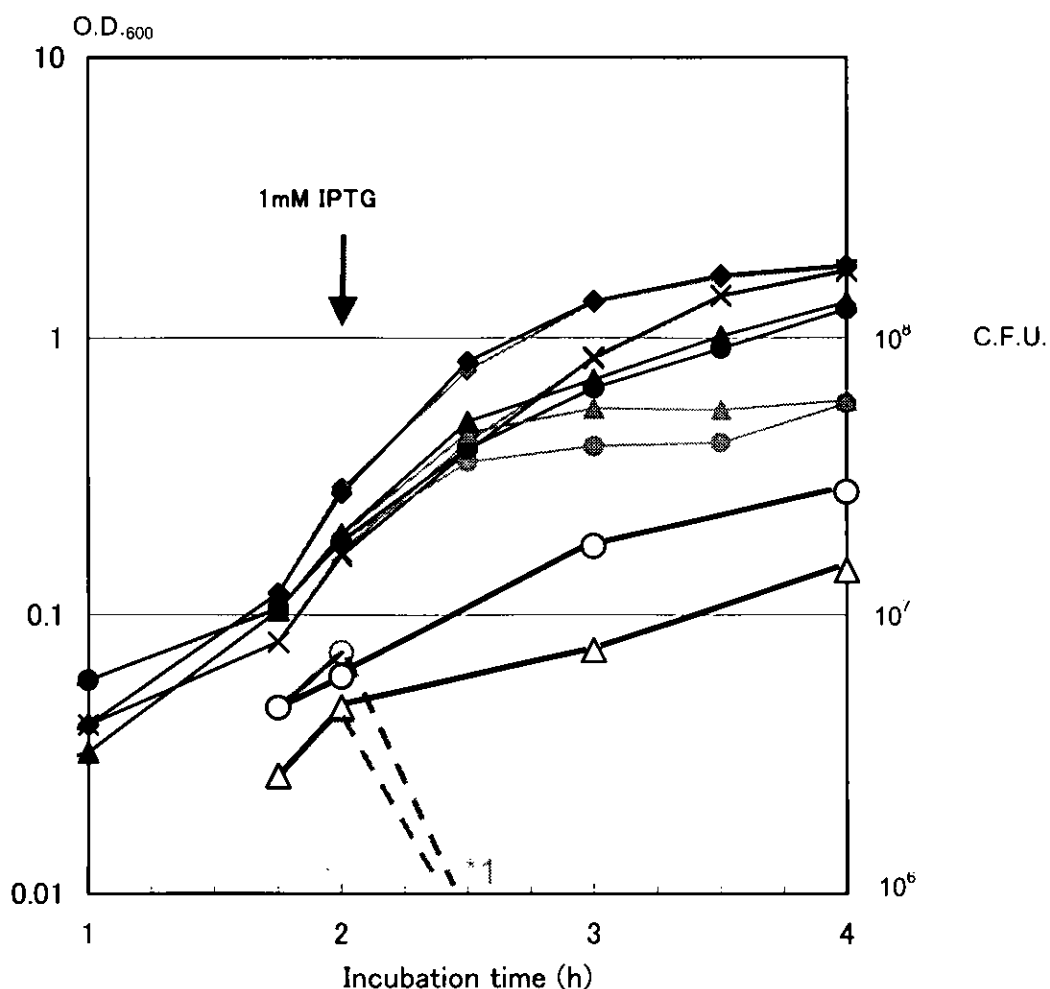


図 3-7 制限酵素オペロン発現誘導株の生育曲線

他の実験と同様に、前培養した 168 株、RSA01 株、RSAO105 株および RSAP155 株(材料・方法参照)を改変 Lennox 培地に  $O.D._{600}=0.05$  程度になるよう植え接ぎ、37 度にて振とう培養した。任意の時間で培地の  $O.D._{600}$  を測定することで、菌の成育を観察した。また培養液の一部を希釈したものを改変 Lennox 寒天培地に播種して 37 度にて培養し、コロニー数を測定することで生菌数を測定 (CFU=Colony Forming Unit) した。IPTG は  $O.D._{600}$  = 約 0.3 の時に培養液中に終濃度 1mM になるように添加した (↓個所)。横軸：培養時間、縦軸：培地吸光度および CFU (cells/ml culture) を示す。各マーカーは、菱形：168 株、X 型：RSA01 株、丸型：RSAO105 株および三角型：RSAP155 株。マーカーの白抜きは、CFU を示す。灰マーカー・ラインは発現誘導を行ったもの、黒マーカーは発現誘導を行っていないもの。株欄外の黒三角は  $O.D._{600}=1.5$ 、灰三角は  $O.D._{600}=0.6$  の位置を示す。\*1：プレートにコロニーが生成しなかったことを示す。本文参照。

### 3-8. *YdiO-ydiP* オペロンが受けているリードスルー転写

前述した転写解析の結果（結果・考察 3-3）において、*ydiO,ydiP* とその上流の *groEL* 遺伝子に検出された 9.0kbp のバンド(図 3-3 バンド A) より、*ydiO,ydiP* の転写は対数増殖期から定常期初期にかけて起こるのみでなく、分子シャペロンである *groESL* (Schmidt et al., 1992) と *ydiO, ydiP* の転写が同一ユニットとして  $T_0$ - $T_1$ 、つまり対数増殖末期に行われていると考えられる。

この転写の開始点と考えられる *groES* 遺伝子上流領域は、Li および Wong らによって解析されているが、この領域には対数増殖期およびハウスキーピング遺伝子の転写因子である  $\sigma^A$  の認識配列が存在するとともに、 $\sigma^H$  の認識配列があることが予想されている(Li And Wong, 1992、図 3-8A)。この  $\sigma^H$  は対数増殖末期（孢子形成開始期）に発現する、形質転換能関連遺伝子および孢子形成初期の遺伝子の転写に関与する転写因子である (Haldenwang, 1995)。また、*Dnak* や *Lon*, *GroEL* 遺伝子は大腸菌のみならず枯草菌においてもヒートショック蛋白として存在していることが知られている (Arnosti et al., 1986)。そこで  $\sigma^H$  の発現する孢子形成開始期、または *groESL* の転写が上昇するヒートショック時に、*groESL* 上流から始まった転写がリードスルーし、下流の *ydiO*、*ydiP* まで転写されるのではないかと考えた。そこで、 $\sigma^H$  欠損株および枯草菌野生株（168 株）にヒートショックを与えた場合の *ydiO*、*ydiP* の転写をノーザンハイブリダイゼーションにて検出する実験を行った。もしこのリードスルーによる転写が  $\sigma^H$  によって転写されるものであれば、 $\sigma^H$  欠損株においては転写が起こらないはずであるが、実験の結果、 $\sigma^H$  欠損株においてもこの転写によるバンドが検出された(データは表していない)。しかしヒートショックを与える実験（熱処理条件等は図 3-9 参照）においては、ヒートショックをかけてから 10 分後に、急激に *groEL* (*groESL*) の転写が高まり(図 3-8B バンド b)、それと同時に図 3-4 の結果と同様

のバンドが強く検出された(図 3-8B バンド a)。このことから、枯草菌 (Marburg 株) では *groESL* の転写がヒートショック等によって急激に高まると、*ydiO* および *ydiP* も *groESL* からのリードスルーによる転写を受けると考えられる。

実際、*groESL* 遺伝子の下流領域の転写終結シグナル配列 (と思われる配列) を破壊した株からも、これと同様の 9.0kbp の mRNA が検出されたと共に、この破壊株では pHV1401(*XhoI* 認識配列を 3 つ持つ)の形質転換効率が野生株 (168 株) に比べて数十倍復活することが、私達の研究室にて行われた実験によって確認されている(データは表していない)。これは、この株においては野生株と比べて *ydiO,ydiP* の発現が高まっており、*ydiO,ydiP* の持つ、制限活性を抑制する作用が強くなった結果であると考えられる。

A:

...CGAAAA GA ATGATGTAAG CGTGAAAAAT TTTTATCTT ATCACTTGAA ATTGGAAGGG 649532  
← *ydiL* -35  $\sigma^A$  -35  $\sigma^H$

AGATTCTTTATTATAAGAAT TGTGTTAGCA CTCTTTA GTG CTGAGTGCTA AAATTACA... 649592  
-10  $\sigma^A$  -10  $\sigma^H$  *groES* →

B:

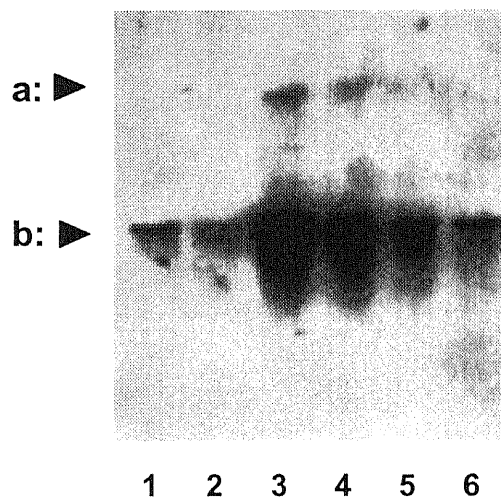


図 3-8 修飾酵素が受けているリードスルー転写の解析

A: 枯草菌染色体 *groES* 上流のプロモータ配列 (染色体位置 649475-649590)。 *groES* およびその上流にある *ydiL* 間の領域、 $\sigma^A$  プロモータ配列および推定  $\sigma^H$  プロモータ配列 (Li and Wong, 1992) を示した。 B: 枯草菌 168 株を改変 Lennox 培地にて 37 度で培養し、O.D.<sub>600</sub>=0.2 の時点で 42 度に温度を変更して培養を続け、時間ごとのサンプルから全 RNA を調整した。この RNA サンプルに対し、*groEL*-RNA プローブを用いてノーザン解析を行った。ノーザンハイブリダイゼーションの方法は材料・方法参照。レーン 1: 培養温度変更後 0 分後のサンプル。以下レーン 2: 5 分後、レーン 3: 10 分後、レーン 4: 15 分後、レーン 5: 20 分後、レーン 6: 30 分後。また、a: 9.0kbp 超の mRNA バンドの位置。 b: 2.5kbp (*groES*+*groEL* の遺伝子長に対応している) の mRNA バンドの位置。

### 3-9. YdiO, YdiR 蛋白の精製と機能解析

#### I. YdiO- 6×His 融合蛋白の精製

*ydiO-ydjA* がもつ機能を解析するにあたり、本研究では結果・考察 3-2 から 3-8 に示す遺伝学的解析を行った。これらの結果は *ydiO-ydjA* 遺伝子の機能を明らかにするための多くのデータを与えてくれているが、その遺伝子産物である蛋白を分離精製し活性を調べるといった生化学的手法によって、そのデータをより確固としたものにできる可能性がある。そこで、これら YdiO-YdjA 蛋白の精製と活性測定を試みた。枯草菌 Marburg 株の持つ制限修飾蛋白の精製においては、Shibata らや (Shibata et al., 1976) Guha (Guha, 1985) によって細胞破碎液や粗精製蛋白を用いた解析が行われてきたが、その塩基配列や目的 ORF が明確になっている本研究においては、方法を選択することでより精製度の高い蛋白が得られる可能性がある。そこで、最初のアプローチとして His タグ融合蛋白質の大腸菌内過剰生産系を用いることにした。結果・考察 3-8 の実験に代表されるように、*ydiR*, *ydiS* および *ydjA* の発現は、大腸菌内といえども有毒に働く可能性があるので、たとえばクローニングに関しても、活性を持つように ORF 全てをクローニングすることは非常に困難であり、遺伝子が発現しないような方法で行う必要がある。これを考慮し、Novagen 社の pET システムによる大腸菌内 6×His 融合蛋白の過剰生産系を試した。方法としては (1) 各遺伝子の開始コドンから終止コドン直前までを 6×His タグ付加用クローニングベクター pET21b+(Novagen 社)を用いて大腸菌 HB101 にクローニングする。これによって、T7 プロモータに制御された目的蛋白の C 末端に 6 ペプチドのヒスチジン (6×His) タグが結合されたベクターができる。(2) このベクターを大腸菌過剰発現宿主である BL21(DE3)pLysS 株(Novagen 社)にクローニングする。この宿主は溶源化された λ (DE3) にコードされている T7RNA ポリメラーゼをもつが、通常は *lacI* によってその発現が制御さ

れている(Rosenberg et al., 1987)。(3) さらにプラスミド pLysS がもつ T7 Lysozyme が、*lacI* 制御からもれ出た T7RNA ポリメラーゼに結合して不活性化することで、宿主にとって有害な蛋白であっても、誘導をかけるまではその発現を強力に抑制する(Studier, 1991)。

(4) よって、目的蛋白遺伝子のクローンを一定の蛋白収量が期待できる細胞数まで培養し、IPTG 添加によって誘導をかけることで、T7RNA ポリメラーゼが発現し、それによって T7 プロモータ下にクローニングされた目的蛋白-6×His 融合蛋白を過剰発現—蛋白生産する、という機構である。

しかしながら、致死性を有すると考えられる *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* の ORF 全体のクローニングは困難であり、ORF 全体を PCR 増幅した断片とベクターをライゲーションし、大腸菌形質転換に持ち込む最初のクローニングの段階で、形質転換体が取得できなかった。宿主の大腸菌株をさまざまに換えて行ってみたところ、HB101 株 (Laboratory stock) を使用することで形質転換体をとることが可能となった。しかしながらその形質転換体から抽出したプラスミドは塩基置換や欠損があるものが多く、大量発現宿主 (BL21(DE3)pLysS 株) に形質転換するに至らなかった。

一方、*ydiO* および *ydiP* はその致死性を抑制する活性を持つと考えられるので、これらの過剰生産は宿主菌に有毒に働かないと考えられる。実際に *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* と同様に、HB101 株を用いて *ydiO* および *ydiP* のクローニングを試み、完全な YdiO と His タグが融合した遺伝子をクローニングされた BL21 株を得た。この株から 6×His タグ蛋白質の精製を試みた (材料・方法参照)。その結果、YdiO 蛋白質の過剰発現が確認されたが、その殆どの目的蛋白が不溶性の封入体内に凝集していた。そこで、封入体を 6M の尿素を含むバッファーで変性、可溶化させてから、Ni カラムにて精製を行い、酵素溶液を得た (図 3-9A)。この変性状態で精製された蛋白溶液から透析にて尿素を徐々に除いたサンプルを用いて、

その活性の検定を行った。結果・考察 3-6 の実験にて、*ydiO* または *ydiP* 非破壊下では、*XhoI* 制限酵素が染色体 DNA の認識配列部位を切断できなくなるということから、これらが修飾活性を持つと考えられる為、結果・考察 3-5 で使用した pHV1401 プラスミドをテンプレート DNA として、この酵素を反応させた DNA が *XhoI* 制限酵素で切断できなくなるかを見た。この反応の対照としては、DNA 切断を阻害する（DNA を修飾する）*M.BamHI* 修飾酵素（Takara 社製）および *BamHI* 制限酵素（Takara 社製）を用いた。その結果を図 3-9B に示した。結果として、*M.BamHI* 修飾酵素が DNA に働く（図 3-9B レーン C1,C2）条件下において、*YdiO* からは図 3-6 に見られるような修飾活性（*XhoI* 制限酵素による DNA 切断活性の阻害）を検出することはできなかった（図 3-9B レーン 2-4）。

この実験においては、酵素反応時の条件の検討を十分に重ねる必要があることは言うにおよばない。更に、変性状態で精製した蛋白の再構成は、実際に *in vivo* で行われている蛋白高次構造が構築できない場合が多い。よってその蛋白が不完全な高次構造のために活性を持たなくなっていることも考えられる。

一般的に、大腸菌由来ではない目的蛋白を大腸菌内で発現させた時に、菌体内で不溶性の封入体として回収される場合が多いが、その発現誘導、または培養をマイルドに行うことで可溶性分画に回収できる場合がある。このクローンについても、誘導剤である IPTG の濃度を下げる（1mM~0.005mM）、培養温度を常温まで下げる（37 度~20 度）、低温で誘導を一切かけずに培養する（20 度終夜培養）等を試したが、いずれも目的蛋白を可溶性分画に回収することはできなかった。

また、これら遺伝子のクローニングの困難や、発現された蛋白が封入体に回収されてしまうといった問題を回避する手段の一つとして、細胞を使わず、*in vitro* において転写および翻訳を行う系にてこれら酵素の試験管内合成を試みた。このアプローチには Promega 社



の *E.coli* S30 Extract System for Linear Template を用いた。これは、目的の蛋白質をコードする塩基配列に T7 プロモータ配列と SD 配列を付加したテンプレート DNA をプロテアーゼやヌクレアーゼを除いた *E.coli* 抽出液 (S30 リボソームを含む) と基質アミノ酸混合溶液に入れることで、テンプレート DNA にコードされたアミノ酸配列を持つポリペプチド鎖を試験管内合成する系である。テンプレートはプラスミドにクローニングされている DNA 以外にも、PCR によって作成したオリゴヌクレオチドも使用できるので、クローニングや菌内発現の際の問題を回避できる (Promega 社プロトコルによる)。YdiR, YdiS および YdjA のコード領域を PCR で増幅精製したテンプレート DNA を用いて、各蛋白の試験管内合成を試みた。合成された蛋白の活性測定を、各反応溶液を混合して用いたサンプルと、YdiR, YdiS および YdjA のテンプレート DNA を 1 つの反応系に入れたサンプルに対し、*XhoI* 配列を持つ DNA 断片の切断の可否により測定したが、活性を認めることができなかった。

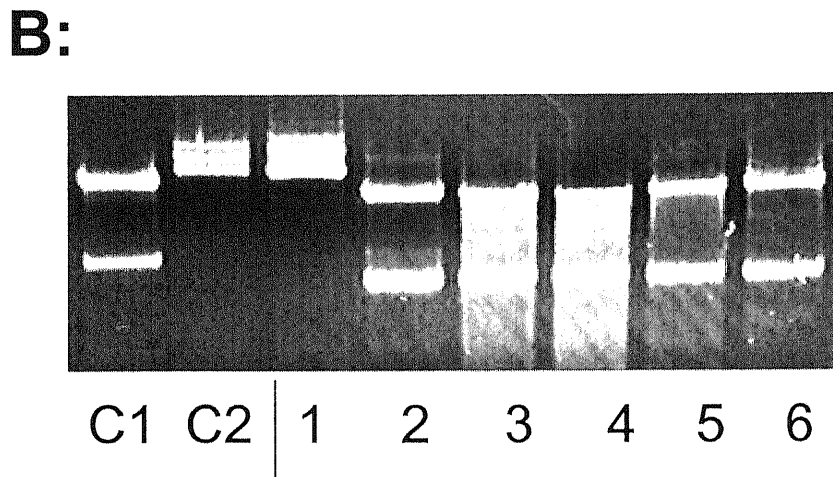
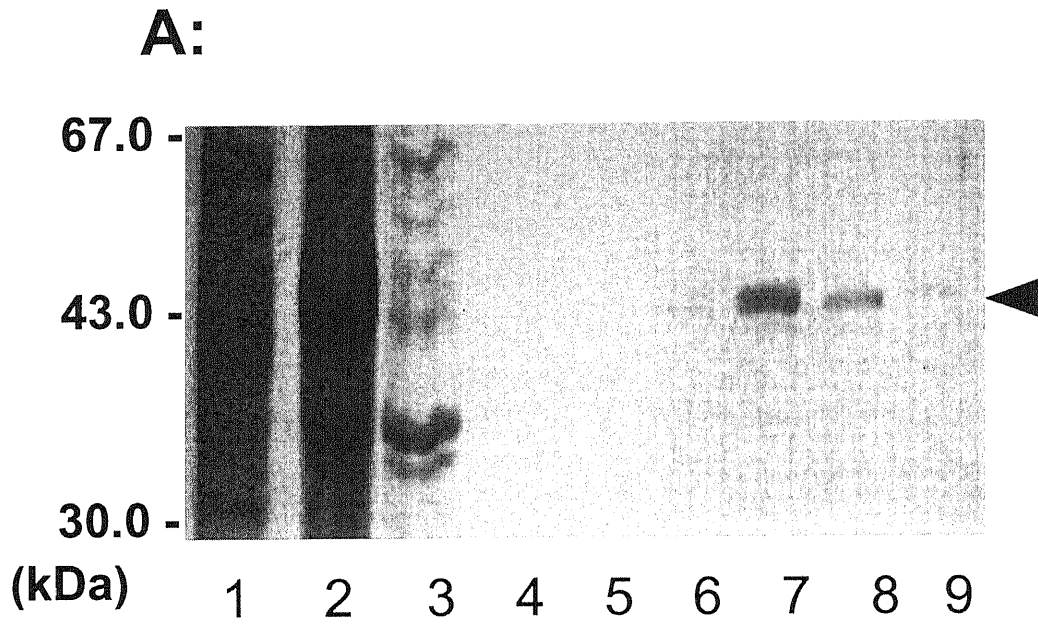


図3-9 YdiO-6×Hisタグ融合蛋白質の発現確認と酵素活性測定

### 図3-9 注釈

A: YdiO-6×Hisタグ融合蛋白質の発現確認。実験方法の詳細は材料・方法参照。終濃度1mMのIPTGにて発現誘導した大腸菌CHOC133株の培養液100mlをサンプルとして変性状態で精製を行った。各段階のサンプルを12.5%アクリルアミドを含むSDS-PAGEにて電気泳動し、Coomassie Brilliant Blueにて蛋白を染色した。各サンプルは、レーン1：細胞破碎液（封入体除く）、レーン2：6Mの尿素で変性させた封入体、レーン3：カラム通過後のサンプル、レーン4-6：カラム通過後の尿素入りWashバッファー、総量25vol.のうち、流出した順に10-10-5vol.ずつ回収、サンプルとした。レーン7-9：カラム通過後の尿素入りElutionバッファー（ただしこの泳動したサンプルにおけるimidazole濃度は250mMである）。総量2.5vol.のうち、流出した順に1-1-0.5vol.ずつ回収、サンプルとした。YdiOに相当する分子量位置に黒色三角を置いた。

B: YdiO-6×Hisタグ融合蛋白質の酵素活性測定。精製したサンプルを透析し、段階的に尿素を除いたバッファーに置換した。酵素溶液10 $\mu$ g中に80 $\mu$ M（終濃度）のS-アデノシルメチオニン(SAM)を添加し、1 $\mu$ gのpHV1401を基質として加え、37度にて16時間保温した。反応溶液からエタノール沈殿によって核酸を取り出し、10U/ $\mu$ gDNAのXhoI制限酵素で2時間処理した。サンプルは1%アガロースゲル電気泳動後、EtBr染色にて検出した。レーン1：未酵素処理、レーン2：YdiOサンプル未添加（XhoI処理有）、レーン3：発現誘導を行っていないサンプルの細胞破碎液（封入体除く）を精製したもの、レーン4：発現誘導を行ったサンプルの細胞破碎液（図3-10Aレーン1のサンプル）を精製したもの、レーン5：発現誘導を行っていないサンプルの封入体（尿素変性・可溶化した後透析を行った）を精製したもの、レーン6：発現誘導を行ったサンプルの封入体（尿素変性・可溶化した後透析を行った）を精製したもの（図3-10Aレーン7のサンプルに相当）。対照実験として、10UのM.BamHI修飾酵素(Takara社製)とBamHI制限酵素(Takara社製)を用いた。レーンC1：M.BamHI未添加（BamHI処理有）、レーンC2：M.BamHI添加（BamHI処理有）。

## II. YdiR- 6×His 融合蛋白の精製

YdiO - 6×His 融合蛋白の大腸菌内過剰生産における封入体形成は、大腸菌内で大腸菌由来ではない目的蛋白を発現させているためであると考えられる。よって、目的の His タグ融合蛋白を枯草菌内で生産させることで封入体形成等の問題は防げるはずである。枯草菌は菌体外にさまざまな酵素を多く産生しており、プロテアーゼも多いといった問題があるので使用を避けていたが、この封入体形成の問題を解決するためにも、枯草菌内の目的遺伝子に His タグが付加するようにプラスミドを挿入することで枯草菌染色体内で His タグ融合蛋白を生産させる方法を試した。最初は前述の ORF 全体を PCR 増幅した断片を、クローニングサイト上流に His タグおよび *spac* プロモータをもつ pMHISN プラスミドにクローニングし、これを用いて枯草菌を形質転換することで枯草菌染色体の目的遺伝子の上流部位にプラスミドが挿入された株を構築し、この枯草菌株が生産する目的蛋白の N 末に His タグが付加された融合蛋白を精製する系を試した。枯草菌内であれば、その宿主に及ぼす活性を考えなくてもよいはずであるので、まずは致死性のある *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* を目的遺伝子として枯草菌の形質転換を行った。その結果、*ydiR*, *ydiS* および *ydjA* の全てにおいて、His タグ (N 末) 融合蛋白遺伝子を持つ変異株を取得した。

これらの株の融合蛋白の発現を見るために、His タグ抗体 (Roche 社製、材料・方法参照) を用いたウエスタンブロットによって His タグ融合蛋白の発現を見たが、*ydiR*, *ydiS* および *ydjA* の何れの場合も、細胞抽出液中に His タグ融合蛋白の発現は検出されなかった。これは、これら蛋白の N 末端がプロセッシング等を受けて切断消化されていることが原因であると考えられた。そこで、ORF 全体を PCR 増幅した断片を、クローニングサイト下流に 6×His タグ配列をもつ pMHISC プラスミド(材料・方法参照)にクローニングし、枯草菌染色体の目的遺伝子の下流部位にプラスミドが挿入されることで、目的蛋白の C 末に His タグが付

加された融合蛋白を枯草菌内で生産させる系を試した。その結果、His タグ抗体を用いたウエスタンブロットにて YdiR-6×His タグ融合蛋白質の検出に成功した（図 3-10A）。さらにこれを用いて Ni-NTA カラムによる 6×His タグ融合蛋白質を精製したところ、精製できたことを示す結果を得た（図 3-10A, レーン 3-6、方法は材料・方法参照）。

YdiS-6×His タグ融合蛋白質および YdjA-6×His タグ融合蛋白質に関しては、His タグ抗体でも検出できなかった。また、8 アミノ酸残基から構成される FLAG タグ（Amino terminal FLAG Expression Kit, Sigma 社）を付加した YdiS および YdjA 融合蛋白質を枯草菌内で生産させてみたが、いずれもタグの検出はできなかった。このことから、YdiS、YdjA 蛋白は N 末端および C 末端がプロセッシングまたは修飾等を受けていると考えられ、タグ融合蛋白としての精製は難しいと思われる。

今までの解析結果（結果・考察 3-5）より、*ydiR*、*ydiS* および *ydjA* のいずれかが破壊されても、その活性が失われることから、おのこの蛋白がこの活性（致死性）に対して何らかの役割を担っている可能性も考えられる。そこで、まずはこの精製された YdiR-6×His タグ融合蛋白質を対象に解析を進めた。最初に、結果・考察 3-5 などで使用した pHV1401 プラスミドを切断できるかを試した。その結果を図 3-10C に表した。脱塩・濃縮した YdiR 蛋白（このサンプルを銀染色にて確認し（図 3-10B）、目的のバンドと分子量マーカーから、このサンプルの目的蛋白の濃度は約 100ng/μl 程度と推測できる）を使用した場合、制限酵素バッファー(塩)を入れないと切断は起こらない（レーン 2）が、10mM MgCl<sub>2</sub> および 50mM NaCl 存在下では新しいバンドが確認できた（レーン 4、b バンド）。非切断のプラスミドの泳動結果において、この b バンドの上部および下部に見える DNA バンド（レーン 4）は、開環構造の pHV1401（Open Circular, OC, a バンド）と閉環構造の pHV1401（Closed Circular, CC, c バンド）と考えられる。よって、この b バンドは pHV1401 に 1 箇所切断

のいった直鎖状 DNA と考えられ、この YdiR サンプルには pHV1401 プラスミドを一箇所切断し直鎖状 DNA にする活性があると考えられる。

次に、*Xho*I 制限酵素認識部位を 0 から 3 箇所持つ pHV プラスミドシリーズ (Bron et al., 1988, 図 2-2 参照) を基質として用いた場合の結果を図 3-10D に示した (反応条件等は前述および図注釈を参照)。コントロールとして *Xho*I 制限酵素 (Takara 社製) を用いて同反応条件にて各プラスミドを切断することで *Xho*I 制限酵素認識配列の存在確認を同時に行った (図 3-10D、レーン 3、レーン 6、レーン 9、レーン 12)。これらプラスミドは *Xho*I 制限酵素による切断を受け、各プラスミドが持つ *Xho*I 制限酵素認識配列の個数に応じた切断断片を生じている。しかし、YdiR を反応させたサンプルは、酵素を入れないサンプル (図 3-10D、レーン 1、レーン 4、レーン 7、レーン 10) と比較しても、CC と OC のバンドの中間に一つのバンドを生成するのみであった。つまりこの YdiR によって切断を受けたプラスミドは、その *Xho*I 認識配列数とは無関係にすべて直鎖状になっていると考えられる。プラスミドが 1 箇所切断を受けていることは、pHV1407 を基質に用いた実験によって明らかである。pHV1407 は *Xho*I 認識配列を 1 箇所しか持たないので、切断前の CC と OC の 2 本のバンドが (図 3-10D、レーン 10)、*Xho*I で切断すると全て直鎖状になるため、CC と OC の 2 本のバンドの中間位置に 1 本のバンドを生成する (図 3-10D、レーン 12)。YdiR での切断では、直鎖状 DNA のバンドを生成するが、CC と OC の 2 本のバンドも残っていることが分かる (図 3-10D、レーン 11)。これは、基質 DNA が切断を受けて CC から OC を経て直鎖状 DNA になる中間過程のものであると考えられる。これらの結果は、この YdiR サンプルが (1) プラスミド上に複数個ある *Xho*I 配列の内、いずれか 1 箇所を特異的に認識切断しているか、(2) *Xho*I 認識配列に関係なく、環状 DNA を直鎖状 DNA に切断する活性を持っていることを示唆している。(1) の場合は、*Xho*I 配列を持たない pHV33 プラ

スミドにも直鎖状 DNA の生成を示すバンドが確認できたため、厳密に *XhoI* 配列を認識できずにそれと似た配列を認識・切断している可能性がある。(2) の場合は、YdiR がプラスミドを CC から OC へ変換する活性(直鎖状にニックを入れる活性)を持つと考えられる。この活性反応において直鎖状 DNA のバンドを生成するのは、第一のニックの近くの相補鎖部分にニックが入った DNA が直鎖状になるためと考えられるが、塩基配列特異性が低いため、反対の鎖の最初のニック部位に近い箇所を特異的には切断しないので、直鎖状の生成率は低いものと考えられる。これらの結果から、この YdiR サンプルは DNA 鎖を切断する能力を有しているが、実験を行った反応条件では厳密に *XhoI* 配列を認識しないとも考えられる。

なお、精製した YdiR サンプルは YdiS, YdjA を発現誘導 (IPTG を細胞培養液中に添加) した細胞から調整したが、誘導をかけなかった細胞からも同様の活性を得た。このことも、この活性に関しては YdiR のみで行われていることを示唆している(ただしこの発現誘導はリプレッサー (LacI) による抑制を解除しただけであるので、誘導といっても YdiS, YdjA 蛋白の過剰生産を意味しているわけではない)。

また、*XhoI* 認識配列が 1 箇所の pHV1407 プラスミドを用いて、YdiR の塩濃度を変化させて反応の最適化を試みた結果を図 3-10E に示した。これは図 3-10D レーン 11 の反応系に、BSA を 0.01% 添加し、塩濃度を変化させたものである。比較すると、BSA を添加することによって、CC のバンドが殆どなくなった。これより、この YdiR サンプルは BSA 添加によってその活性が安定化することが分かった。また NaCl 濃度を変化させたレーン 2 から 4、および K イオンを使用したレーン 5、および酢酸カリウムバッファのレーン 6 において差があまり見られないことから、この活性にはナトリウムイオンやカリウムイオン濃度に依存することはないものと考えられる。

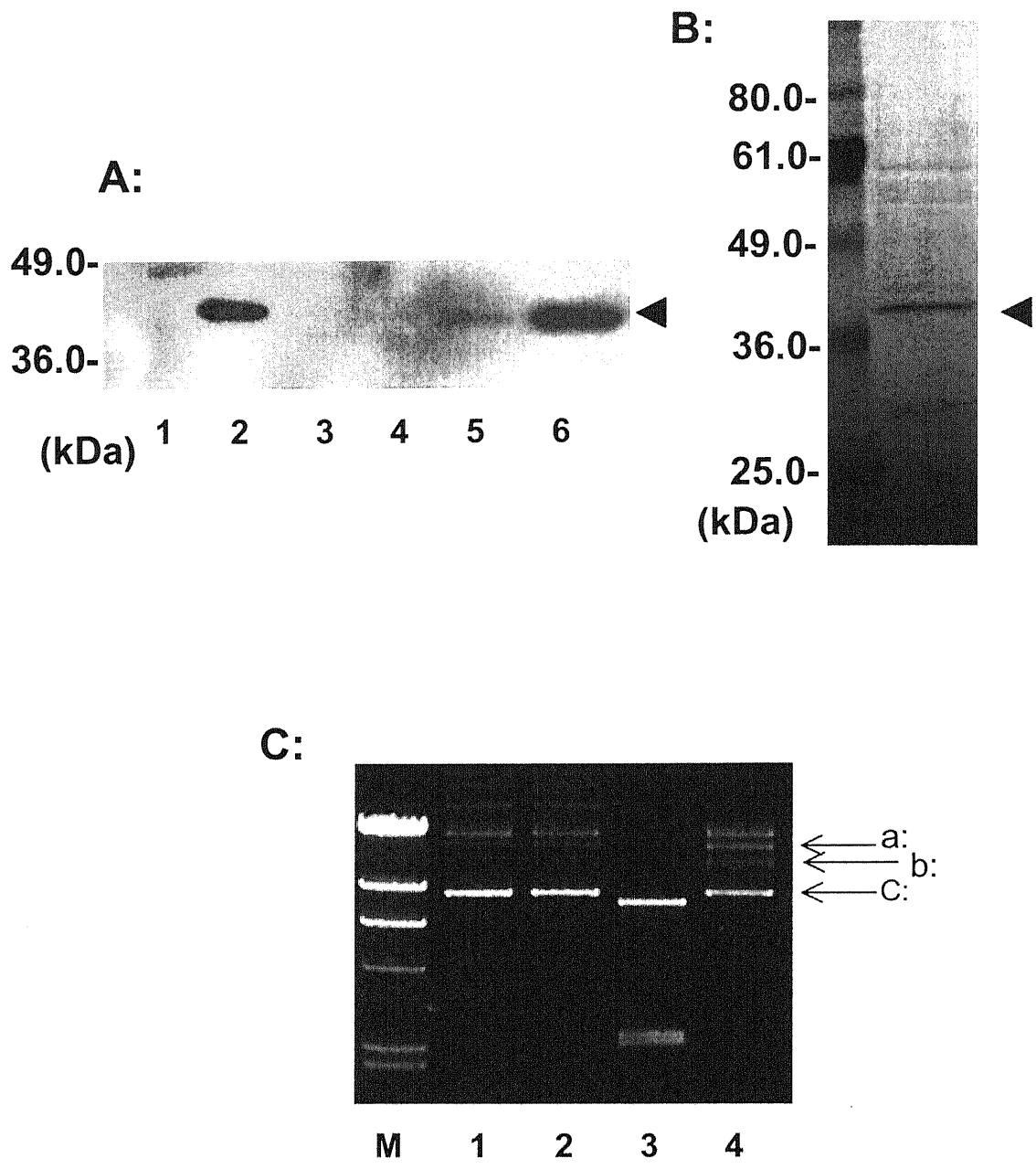
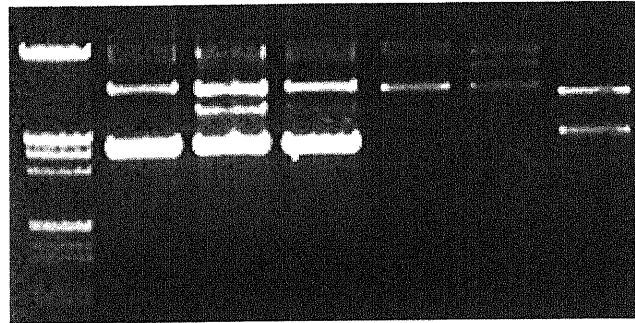


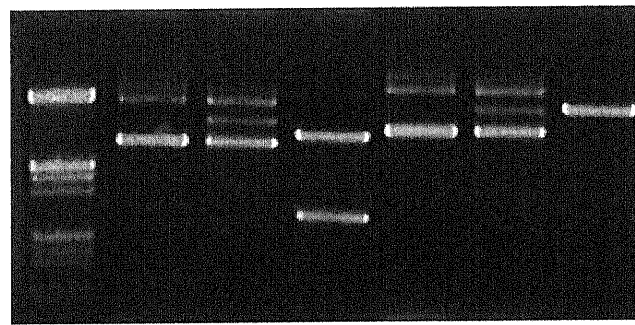
図3-10 YdiR-6×Hisタグ融合蛋白質の発現確認と酵素活性測定(1)



D:

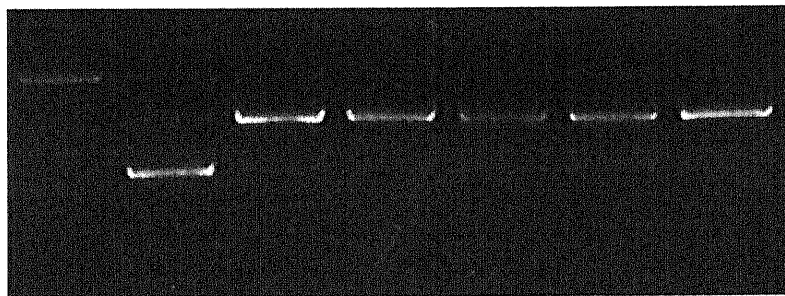


M 1 2 3 4 5 6



M 7 8 9 10 11 12

E:



M 1 2 3 4 5 6

図3-10 YdiR-6×Hisタグ融合蛋白質の発現確認と酵素活性測定(2)

### 図 3-10 注釈

A:ウエスタンブロットによる YdiR-6×His タグ融合蛋白質の発現確認。蛋白精製、実験方法等は材料・方法および本文参照。終濃度 1mM の IPTG にて発現誘導した枯草菌 SHRC801 株の培養液 100ml をサンプルとして非変性状態で精製を行った。各段階のサンプルを 12.5%アクリルアミドを含む SDS-PAGE にて電気泳動し、抗 His タグ抗体によるウエスタンブロットによって蛋白を検出した。この精製においては図 3-9 の精製方法と異なり、His タグ蛋白をカラムに結合させた後、Wash バッファーを通す前に総量 25vol. の Lysis バッファーを通してある。各サンプルは、レーン 1 : 枯草菌 168 株の細胞破碎液、レーン 2 : 枯草菌 SHRC801 株の細胞破碎液、レーン 3 : カラム通過後のサンプル、レーン 4 : カラム通過後の Lysis バッファー、総量 25vol. のうち、流出した順に 10-10-5vol. ずつ回収、最初の 10vol. をサンプルとした。レーン 5 : カラム通過後の Wash バッファー、総量 25vol. のうち、流出した順に 10-10-5vol. ずつ回収、最初の 10vol. をサンプルとした。レーン 6 : カラム通過後の Elution バッファー(ただしこの泳動したサンプルにおける imidazole 濃度は 200mM である)。総量 2vol. を回収、サンプルとした。YdiR に相当する分子量位置に黒色三角を置いた。

B: 銀染色による YdiR-6×His タグ融合蛋白質の発現確認。図 3-10A、レーン 6 のサンプル 10 $\mu$ l を 12.5%アクリルアミドを含む SDS-PAGE にて電気泳動し、泳動後のゲルを銀染色試薬「第一」(第一化学薬品社製)を用いて銀染色した。方法は試薬のマニュアルに従った。YdiR に相当する分子量位置に黒色三角を置いた。

C:pHV1401 プラスミドを用いた DNA 切断能試験。1 $\mu$ g の pHV1401 を基質として、脱塩後の YdiR サンプル 10 $\mu$ l に加えた。反応溶液は H バッファーである。各レーンは M:分子量マーカー、1: YdiR サンプルの代わりに XhoI 制限酵素 5U を使用した(バッファーなし)、

2 : YdiR サンプル (バッファーなし) 、 3 : レーン 1 のサンプルに H バッファーを添加したもの、 4 : レーン 2 のサンプルに H バッファーを添加したもの。反応は 37 度、 2 時間にて行った。

D: pHV33、 pHV1403、 pHV1406、 pHV1407 プラスミドを用いた DNA 切断能試験。C: と同様の処理を各プラスミドを基質として行った。各レーンは M: 分子量マーカー、 レーン 1、 4、 7、 10 : 酵素を添加していないサンプル、 レーン 2、 5、 8、 11 : YdiR サンプル (H バッファーを添加) 、 レーン 3、 6、 9、 12 : YdiR サンプルの代わりに *Xho*I 制限酵素 5U を使用した (H バッファーを添加) 。基質 DNA はレーン 1-3 : pHV33、 レーン 4-6 : pHV1403、 レーン 7-9 : pHV1406、 レーン 10-12 : pHV1407。反応は 37 度、 2 時間にて行った。

E: pHV1407 プラスミドを用いた DNA 切断能の反応溶液組成による変化。1  $\mu$ g の pHV1407 を基質として、脱塩後の YdiR サンプル 10  $\mu$ l に加えた。反応溶液中の塩等の組成を変化させた。Takara 社製各種バッファーと同じ組成を用いた。各種バッファーの組成は材料・方法参照。各レーンは M: 分子量マーカー、 1: バッファー不添加、 2: L バッファー、 3: M バッファー、 4: H バッファー、 5: K バッファー、 6: T+BSA バッファー。反応は 37 度、 2 時間にて行った。

#### 4. 総括

***ydiO-ydjA* は枯草菌制限修飾系 *BsuM* を構成する遺伝子群である**

本研究の対象である枯草菌制限修飾遺伝子 *BsuM* は、枯草菌 Marburg 168 株に唯一存在する制限修飾遺伝子であり、そのファージ感染に対する防御能や作用機構が解析されてきたが、その根本である遺伝子構成の解析は殆ど行われていなかった（序論参照）。本研究の実験結果から、プロファージ 3 と呼ばれる領域に見出された *ydiO-ydjA* に対して以下のような分子遺伝学的性質が明らかになった。

1) 枯草菌全 ORF の中で、制限酵素に相同性を示す ORF は唯一、この領域内にある *ydiS* のみであることが示されていたが(Kunst et al., 1997)、PSI-BLAST プログラムを用い、複数の Database を検索した結果（結果・考察 3-1）、*ydiS-ydjA* の連続した ORF が *Lactococcus lactis* のプラスミドや *Helicobacter pylori* で同定されている（又は予想されている）制限酵素遺伝子とそれに連続した遺伝子、*Llal-2*, *Llal-3* および JHP0164, JHP0165 と非常に高い相同性を示した。また同領域の隣接した ORF である *ydiO* および *ydiP* は、C5-メチルトランスフェラーゼと非常に高い相同性を持ち、C5-メチルトランスフェラーゼが保持する機能モチーフの保存も認められた。制限修飾の関係にある制限遺伝子（群）および修飾遺伝子（群）は機能上からもその関係が密であり、外来から同時に導入されたものが多いため、この2つは一般的に近傍に位置する事が多いと考えられる（Kong, 2000）。これらのことを総合し、同じプロファージ 3 上に存在する *ydiO-ydiP* と *ydiS-ydjA* が制限修飾を構成していると予想した。

2) 枯草菌の *BsuM* 欠損株として長年利用されてきた RM125 株は、そのプロファージ 3 領域の約 13kbp が欠損していることが判明した（結果・考察 3-2）。RM125 を作成した Uozumi らの論文によると(Uozumi et al., 1977)、2重形質転換法によって RM125 は得られ

ている。このような条件下における形質転換では、相同組替えによって導入された DNA が複数ある場合があり、*ydiO-ydjA* 以外の部位に *BsuM* が存在している可能性もあるが、*BsuM* 遺伝子のマッピング (Saito et al., 1979) の結果は、*ydiO-ydjA* の存在する位置と *BsuM* 遺伝子が存在する位置はほぼ同一であることを示している。

1) および 2) より、*BsuM* の本体が *ydiO-ydiP* および *ydiS-ydjA* から構成される制限修飾であるということが予想されるが、以下に示す実験結果はこれを証明するものと考えられる。

3) *ydiO-ydjA* の各 ORF をプラスミド挿入によって破壊する実験において(結果・考察 3-4)、*ydiO,ydiP* の破壊は *ydiR,ydiS,ydjA* いずれかの ORF の破壊の下に成立した。つまり、*ydiO,ydiP* 破壊による致死性を *ydiR,ydiS,ydjA* 破壊が抑制していると考えられることができるが、*ydiO,ydiP* によって修飾活性、*ydiR,ydiS,ydjA* によって制限活性がもたらされると考えれば、この現象は序論で述べた制限修飾の役割に従い、*ydiO,ydiP* のみ破壊した株は、制限遺伝子存在下で修飾遺伝子のみ破壊した為、自身の DNA をメチル化修飾によって保護することができなくなり、その制限遺伝子による染色体 DNA への制限活性によって生存できなくなってしまうが、制限遺伝子破壊下では修飾遺伝子は破壊可能であるといった理論によって説明できる。また、*ydiR,ydiS,ydjA* 破壊株は 1 遺伝子破壊が成立していると考えられるので(結果・考察 3-4)、この制限活性には *ydiR,ydiS,ydjA* の 3 つの ORF が必須であることも示される。

4) *ydiR,ydiS,ydjA* の破壊株は、野生型および他の ORF 破壊株に比べ、予想される認識配列を持つプラスミドの形質転換効率が数十倍に上昇していた(結果・考察 3-5)。これは Arber や多くの研究者が見出してきた制限現象で説明できるものである。

5) *ydiO,ydiP* 破壊株の染色体 DNA を *XhoI* 制限酵素で処理すると、その *XhoI* 制限酵素認識配列部位が野生株と比較し切断されるようになった(結果・考察 3-6) (正確にはこれら破壊株は *ydiO-ydiS* および *ydiP-ydiS* 破壊株であるが、*ydiS* のみを破壊した株においては、この結果は確認されなかった)。これは、*ydiO,ydiP* が *XhoI* 配列を認識し、メチル化修飾を行う酵素であることで説明できる。*ydiO,ydiP* 遺伝子産物(蛋白質)が存在しない *in vitro* においても、その活性(DNA が切断されなくなる)があることから、*XhoI* 制限酵素の活性を *ydiO,ydiP* 蛋白自身が阻害しているのではなく、直接その基質である DNA を修飾していることがその原因と考えられる。

6) *ydiO-ydjA* の存在するプロファージ 3 領域においては、修飾活性をもつ *ydiO* と *ydiP* が、制限活性に関与する *ydiR*、*ydiS*、*ydjA* がおのおの同一転写単位、オペロンとして転写をうけていた(結果・考察 3-4)。蛋白複合体を形成している遺伝子群や代謝活性を持つ遺伝子群はオペロンを形成し、同時に転写されることで一連の反応が制御されていることが多いが、このオペロン構造は、*ydiO-ydiP* が修飾活性の複合体を、*ydiR*、*ydiS*、*ydjA* が制限活性を持つ複合体を形成していることを示唆している。

7) *ydiR,ydiS,ydjA* によって構成されるオペロンの発現誘導によって、*ydiO,ydiP* 破壊株が死滅すること(結果・考察 3-8)も、*ydiR,ydiS,ydjA* が制限酵素オペロンであり、修飾酵素非存在下(*ydiO,ydiP* 破壊株)での制限酵素活性は、その細胞を死滅させてしまうといった理論である。つまりこの生育停止は、制限酵素による染色体の損傷、破壊の結果であるとも考えられる。

これらのことは、*ydiO*、*ydiP*、*ydiR*、*ydiS*、*ydjA* が枯草菌 Marburg168 株内にて制限修飾遺伝子として機能しており、*ydiO*、*ydiP* が修飾活性を、*ydiR*、*ydiS*、*ydjA* が制限活性を

担う遺伝子であること、この制限修飾が *XhoI* 認識配列を持つ DNA に対して働くこと、およびこれが枯草菌 *BsuM* の本体を成していることを結論付けるものである。

なお、枯草菌染色体上のプロファージ SP $\beta$  上にある ORF、*mtbP* は、*ydiP* や *Neisseria gonorrhoeae* がもつ II 型 C5-メチルトランスフェラーゼの *M.NgoV* 等と高い相同性を示し、修飾酵素であると思われるが、*ydiO* および *ydiP* を破壊することによって生じる致死性を *mtbP* が抑制するわけではないので（結果・考察 3-4）、*ydiR-ydiS-ydjA* がもつ制限活性に対する修飾を行っているわけではないと考えられる。

### **groESL-ydiOP 転写系の誘導は外来遺伝子の進入を許諾する**

結果・考察 3-8 における実験により、枯草菌 (Marburg 168 株) では *groESL* の転写がヒートショックによって急激に高まると、*ydiO* および *ydiP* もリードスルーによる転写を受けられるようになると考えられる。これは、ヒートショック等といったストレス条件により *groESL* の発現が一時的に高まると、細胞のメチル化修飾能も同時に高まることを示唆している。細胞が制限修飾を持っているにもかかわらず外来性のファージやプラスミドといった DNA が感染するのは、これら外来性の DNA が細胞内の制限修飾に対応するメチル化修飾をすでに受けていることが要因の一つであるが、メチル化されていない外来 DNA が制限修飾を持つ細胞に制限効果を受けながらも感染することができるのは (これは今まで行われてきた多くの研究によっても、また本研究においても確認される)、細胞内で制限酵素による切断の前に修飾酵素によるメチル化修飾を受けるためであると考えられる。細胞への感染防御という機能を考えれば制限活性は強く働くほうが都合がいいが、自身の染色体に対しては、制限活性はその数多く存在する認識配列をどこか一箇所を切断すれば役目は完了するが、修飾による防御は染色体全体の認識配列に対して修飾を行う必要がある (染色体に及ぶ制限活性に対して、修飾酵素と DNA 修復酵素が共同して作用していれば別であるが、それは不明である)、細胞内では制限酵素以上に強い活性を持つ必要があると考えられる。

また、私達の研究室にて行われた実験により、*groESL-ydiM(groEL* 下流)にある転写終結を破壊した株を作成した。この株の *groEL* の転写は *ydiO,ydiP* までリードスルーすることになる。この株に対して転写を見てみると、9kbp の mRNA が非常に強く検出された。また、この破壊株では *XhoI* 認識配列を 3 つ持つ pHV1401 プラスミドの形質転換効率 (結果・考察 3-5 と同様の実験系) が 168 株と比較して数十倍復活した (データは示していない)。



つまり、*groESL* の転写によって、*ydiO,ydiP* の転写が高まり、プラスミドの形質転換効率が増加するということになる。このことは、ヒートショック時には修飾遺伝子の発現が増加することで、進入してきた外来 DNA に対するメチル化修飾が、制限酵素による消化を受ける前に速やかに行われ、感染（進入）効率が上がるといった機構を思わせる。細胞からすれば、感染を許諾するような機構はむしろ排除されるべきなのかもしれないが、枯草菌はその生存環境の変化、特に炭素源の枯渇等といった悪化に応じて孢子形成により休眠したり、コンピテント能（自然形質転換能）により外来 DNA を取り込んで新しい形質を獲得したりすることで適応し生き延びようとする。おそらく最初は偶然に *groESL* 下流に修飾遺伝子が組み込まれただけなのであろうが、このヒートショック時の外来 DNA 感染効率の上昇を招くような遺伝子構成は、枯草菌の生存に少なからずも貢献してきたのではないだろうか。*groESL* の発現が、コンピテント能の高まる T0 付近で増大するという（結果・考察 3-8）も、この新形質の獲得を支持しているのかもしれない。

枯草菌 168 株にヒートショックを与えると、ファージ SP10 および SP20 の感染率が（この実験では最大  $10^5$  程度）上昇することを示した Gwinn や Lowton らはその論文の中で (Gwinn and Lowton, 1968)、この現象は、通常細胞内でのファージ蛋白の発現はリプレッサーによって抑制されているが、ヒートショックによって、リプレッサーが不活性化するためにファージが（溶源化せずに）感染後すぐに溶菌化してしまうため、結果的に PFU の上昇を招くからであると考えた。彼らは制限修飾のこの現象への関与については不明としているが、枯草菌 Marburg168 株に対しては、本研究で明らかになったような、ヒートショックに伴う修飾遺伝子の転写活性の上昇が、この感染率上昇の大きな要因となっている可能性も考えられる。

## 制限修飾蛋白の解析

結果・考察 3-9 における制限修飾蛋白の精製と活性測定において、活性の検出された YdiR 蛋白精製サンプルの酵素的性質は (1) DNA 切断能を有している。(2) DNA にニックを入れる活性を見せる。(3) 実験した限りの条件では XhoI 認識配列特異性を確認できなかった。ということであった。本研究で行ってきた多くの実験結果は、*In vivo* における枯草菌の制限活性は、*ydiR*、*ydiS* および *ydjA* の 3 つの内どれが欠けても失われてしまうということを示唆していた。つまりこの制限修飾の本来の制限活性を再現するには、少なくとも活性をもったこれら 3 遺伝子産物が必要であるということを予想させるものであり、それゆえにこの精製した YdiR 蛋白単独では本来の活性に満たない不完全な活性しか持たないのではないかと考えられる。たとえば YdiR、YdiS および YdjA が複合体を作って DNA に作用しており、YdiR (サブユニット) は DNA にニックを入れる働きがあるが、本来の制限酵素のような配列特異性、DNA の塩基の認識は YdiS および YdjA (サブユニット) が行っているのかもしれない。YdiR、YdiS、YdjA の内、YdiS のみが DNA に作用する酵素に多く見られる ATP/GTP-binding site motif A を保持していた (結果・考察 3-1 参照) 事も、この酵素複合体を考えた時、YdiS サブユニットが DNA に結合、認識する役割を担っているのではないかとすることを予感させる。

また YdiR 蛋白精製サンプルの銀染色の結果 (図 3-11B) は、この精製サンプルは YdiR が大部分であるが、YdiR と分子量の異なる他の蛋白が少量ながら存在していることを示している。よって、この実験にて示された活性は、YdiR とこれら他の蛋白との相互作用による活性であるといった可能性は、低いが否定できないものである。しかしながら、もし仮に YdiR、YdiS、YdjA が複合体を構成しているのであれば、この YdiR 精製蛋白を非変性状態で Ni-NTA カラムにて精製する際に、カラムに YdiR-6His-YdiS-YdjA 複合体として吸着して

いる可能性が考えられる。たとえば枯草菌の RNA ポリメラーゼコア酵素を精製する際に、その $\beta$ 'サブユニットに 6×His タグを融合させた蛋白を作成しておくことで、Ni-NTA カラムに吸着させた時にコア酵素複合体として吸着し、複合体のまま精製ができる (Fujita and Sadaie, 1998)。この YdiR に関しても、大部分は YdiR のみであるが、YdiR-YdiS-YdjA 複合体として得られた少量の YdiS、YdjA がその活性に関与しているかもしれない。無論、このような複合体形成は仮定の話であり、本来はそのような複合体を作らずに、おのおのが単独で活性を担い、その結果枯草菌内に見られた制限効果の完全な活性を生んでいる可能性もある。そうだとすれば、本研究で検出された DNA にニックをいれて環状 DNA 鎖を弛緩する働きは、その後続くおそらく YdiS と YdjA が単独、または協調して行うであろう DNA 配列の特異的認識、および切断のために DNA 鎖を弛緩 (直鎖状に切断) させ、酵素 (複合体) が DNA 鎖の認識配列部に接触することを容易にするのに必要な活性ではないかということ想起させるものである。

## **BsuM 制限修飾系は II 型もしくは IIS 型を由来としている**

*ydiO* および *ydiP* の相同性検索の結果（結果・考察 3-1）は、このどちらも II 型の C5 メチラーゼ、特に CCNGG または GGNCC の配列を認識するものとの相同性が高かった。この *ydiO* および *ydiP* と相同性を持つメチルトランスフェラーゼは、結果・考察 3-1 に示す以外にも非常に多く（数十種の）が検索された。C5-シトシンメチルトランスフェラーゼはまた、*ydiO*、*ydiP* に示されるように、ブロックやモチーフの保存率も高いことから、その作用機構も類似していると考えられる。このことから、*ydiO* および *ydiP* の DNA 認識も II 型であると予想される。これは、*ydiO* および *ydiP* によって認識される配列が *XhoI* 認識配列（II 型、CTCGAG）であることに合致する。ただし、CCNGG または GGNCC の配列を認識するものとの相同性が高かったことは、*ydiO* および *ydiP* も CCNGG または GGNCC の配列を認識するものである可能性はあるが、これら配列を認識する II 型修飾酵素は数十種類が知られており（Rebase Database）、その全てが *ydiO*、*ydiP* と高い相同性を示すわけではないことや、この認識配列以外のメチラーゼにも、同様に高い相同性を示すものがあることから（たとえば *M.NspHI* メチラーゼは RCATGY 認識である）、*ydiO* および *ydiP* が必ずしも CCNGG または GGNCC 配列を特異的に認識しているとは考えられない。しかしながら II 型修飾酵素はモノマーで DNA 鎖に作用すると考えられている。これは、細胞分裂が終了すると、複製された 2 本の DNA 鎖は、新しく合成された片方の鎖がメチル化されていないヘミメチル化された DNA 鎖となっている為、この片方の鎖をメチル化し保護するためにモノマーで活性を持つと考えられている。*ydiO* および *ydiP* が II 型修飾酵素であるのなら、おのおの単体で活性を持つ修飾酵素が連続していることは不自然であるとも考えられるが、*ydiO*、*ydiP* のどちらにも相同性の高かった（結果・考察 3-1）*M.ScrFIA* は II 型修飾酵素であり、同じく II 型修飾酵素であり、同じ配列を認識する *M.ScrFIB* と、対応する制

限酵素である ScrFI が染色体上に M.ScrFIB-ScrFI-M.ScrFIA の順で連続して存在している (Official Rebase Datadbase) また、*B. subtilis* のファージΦ3T には、GGCC 塩基配列を認識する M.Φ3TI と、TCGA 塩基配列を認識する M.Φ3TII の独立した 2 つの C5-メチルトランスフェラーゼがファージ DNA 上に連続した (2 遺伝子間の距離は 84bp) ORF として存在している (Trautner and Weidner, 1993)。これらの例からも、*ydiO*、*ydiP* が 2 つの独立した II 型修飾酵素と考えること自体は不自然ではない。

相同性では *ydiO*、*ydiP* は II 型制限酵素と予想されるが、II 型の亜種である IIS 型の修飾酵素の多くは 2 つの酵素 (遺伝子) から構成され、一方の酵素が DNA の一方の鎖を認識するものであるが、いくつかの IIS 型システムでは、それぞれの認識配列が異なるものがある (New England Biolabs, 1999)。その遺伝子構成から考えると、*ydiO*、*ydiP* は II 型というよりもむしろ IIS 型に近い型なのかもしれない。

*ydiO*、*ydiP* が IIS 型である可能性を強くしているのが *ydiR*、*ydiS*、*ydjA* の遺伝子構成である。結果・考察 3-1 において、*ydiS* と *ydjA* はそれぞれ *Lactococcus* プラスミド pTR2030 の *Llal-2,3* と高い相同性を示した (結果・考察 3-1)。この *Llal-2,3* を含む *Llal* 制限修飾はオペロンを構成しており、*llalM*、*llalC*、*llal-1*、*llal-2*、*llal-3*、および *llal-4* から構成されているが、この 4 つの ORF、*llal-1*、*llal-2*、*llal-3*、および *llal-4* の解析により、(1) *Llal-1,2,3* (4 つの ORF の先頭から 3 つ) の遺伝子をフレームシフト変異や欠損変異させると Φ31 ファージに対する制限活性が失われる、(2) 2 番目の ORF である *Llal-2* は GTP Binding Motif をもつ、(3) *Llal-2* は *McrB* と相同性を持つが、*Llal-1* および *Llal-3* は他に相同性のない遺伝子である、ということから、*Llal* 制限酵素は *Llal-1,2,3* の 3 つの ORF で構成されていることが明らかとなった (O'Sullivan et al., 1995)。また、O'Sullivan らはこの論文の中で、上記の結果および、*LlalM* と既知の IIS 型修飾を行う *FokI* および *StsI* 制限修飾との相同性から、*Llal* 制

限修飾系を IIS 型と考えたが、*LlaI*-1,2,3 が I 型の遺伝子構造を持つことや、機能未知遺伝子の存在などから、*LlaI* 制限修飾系が I 型および IIS 型を由来とした他のどの型にも属さない型であることを予想した。これと比較しても、*ydiR-ydiS-ydjA* オペロンは、(1) 3 遺伝子がオペロンを構成している、(2) 2 番目の ORF、*ydiS* が ATP/GTP Binding motif を持つ、(3) *ydiS* のみが他の制限酵素、特に *LlaI*-2 と同源性を持つ、(4) 3 番目の ORF、*ydjA* が *LlaI*-3 と同源性を持つ、(5) 3 つの ORF のどれを破壊してもその制限活性を失う、といった多くの点で *LlaI* 制限遺伝子群と酷似しており、この 2 つのオペロンは同一の由来であるかまたは、その一方がオリジナルで、水平伝達によって他方に定着したものであると考えられる。なお、*LlaI*-2 および *ydiS* に共通に同源性のある *mcrB* は (結果・考察 3-1) Methyl-direct 型の制限酵素 McrBC を構成する遺伝子であり (序論参照)、その同源性から制限修飾型を推測すれば、*ydiS* が Methyl-direct 型の制限遺伝子である可能性も考えられるが、*ydiS* 破壊株に対するプラスミド形質転換実験 (結果・考察 3-5) において使用された pHV プラスミドは *XhoI* 制限酵素で切断が可能であったことから (図 3-5) メチル化修飾されていないことが明らかである。よって *ydiS* がメチル化された DNA 鎖のみを特異的に認識する Methyl-direct 型の制限酵素ではないと考えられる。

また *ydiR-ydiS-ydjA* オペロンの 1 番目である *ydiR* に関しては、*ydiS-ydjA* と *llaI*-2,3 の関係に見られるような *ydiR*、*llaI*-1 同士の同源性が認められなかったが、本研究および O'Sullivan らの研究 (O'Sullivan et al., 1995) から、*ydiR*、*llaI*-1 がそれぞれのオペロンの中で制限活性に関与している遺伝子であると考えられる。この同源性の不一致の原因に明確な答えを出すのは難しいが、元々同一の遺伝子であったものが、進化の過程で変異したために同源性が (ほぼ完全に) 失われるとは、*ydiS-ydjA* と *llaI*-2,3 の同源性が残っていることから考えにくく、遺伝子が水平伝達される際不完全に伝達されたことが原因 (*llaI*-2,3

のみが切り取られて伝達された) であるか、外来から伝達された制限遺伝子群の一部が組換えによって元々あった制限遺伝子の一部と入れ替ったこと等が考えられる。

これらを総合すると、*ydiO-ydiP* 修飾系は旧来の解析結果および相同性からは II 型、遺伝子構成からは IIS 型であることが予想される。*ydiR-ydiS-ydjA* 制限系は *ydiS-ydjA* の相同性から *Llal* 制限系と同一の由来であることが予想され、この場合、*ydiR-ydiS-ydjA* 制限系は I 型または IIS 型を由来とする未知の型である可能性がある。

### **BsuM 制限修飾は prophage3 上にあり、外来遺伝子であると予想される**

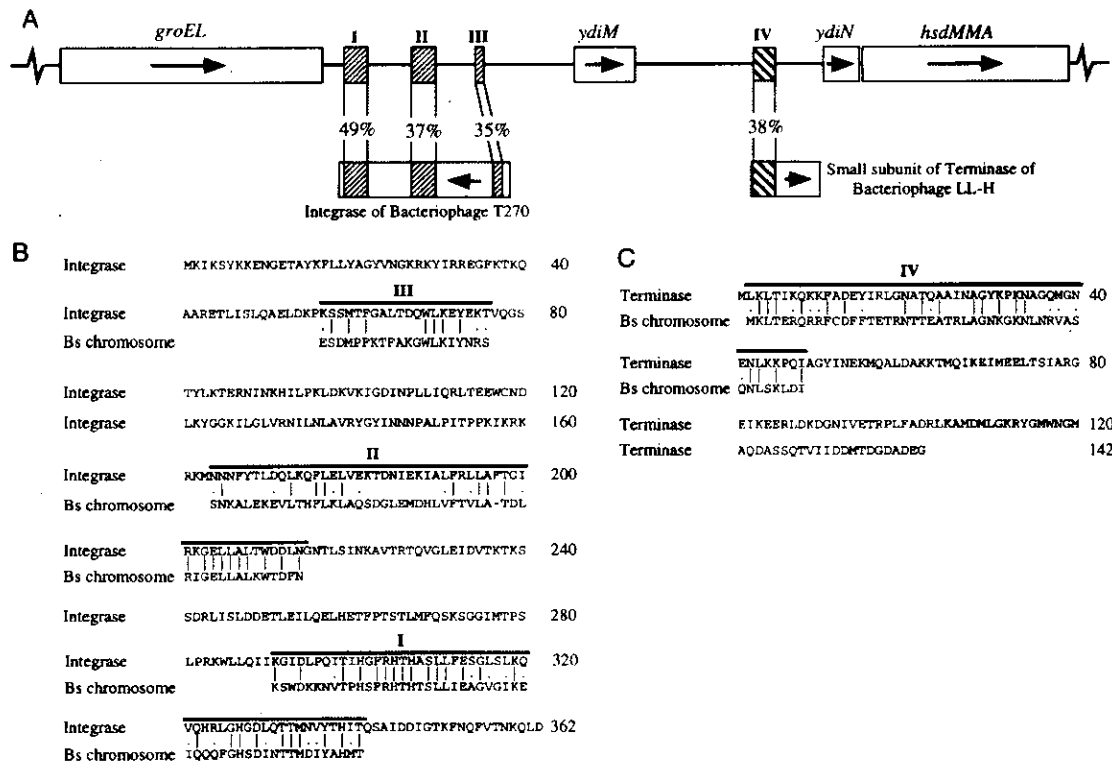
枯草菌 Marburg168 株にはプロファージとして、SP $\beta$ 、PBSX および skin の他に、7 つの領域が推定されており (Kunst et al., 1997)、BsuM を構成していると考えられる *ydiO-ydjA* は枯草菌染色体上のプロファージ 3 遺伝子領域 (*ydiM* 上流から *ydjC* まで。図 1-1 参照) に存在している (Kasahara et al., 1997, Kunst et al., 1997)。このプロファージ 3 領域は他のプロファージ領域と比べると、*ydiO-ydiP* オペロンおよび *ydiR-ydiS-ydjA* オペロンの間隙が他の領域と比べても比較的大きく、2つのオペロンの間に小さな ORF、*ydiN*, *ydiM*, *ydiQ*, *ydjB* および *ydjC* が散在している形が見られる。制限修飾遺伝子群には、その発現を制御する遺伝子 (C 遺伝子) の存在するものが知られている (Tao et al., 1991)。LlaI 制限修飾にも C.LlaI と呼ばれる制御遺伝子が存在している (O'Sullivan et al., 1998)。これら比較的短い ORF にもこのような活性が予想されたが、*ydiN*, *ydiM*, *ydiQ*, *ydjB* および *ydjC* は他の遺伝子にホモロジーがなく、モチーフも *ydiN* がトランスメンブランセグメントを持つのみであった(結果・考察 3-1 および BSORF Database より)。

さらに Kasahara らの論文 (Kasahara et al., 1997) によると、*ydiO-ydiP* オペロン上流部に当たる領域については、*groEL-ydiM* の間隙に、*Streptococcus pyogenes* のファージ T270 がもつ Integrase と相同性の高い個所が存在し、また *ydiM-ydiN* の間隙にも、*Lactobacillus delbruekii* のファージ LL-H がもつ Terminase と相同性の高い個所が存在することが示されている (図 4-1 参照)。しかしこれらファージ遺伝子は、あたかも遺伝子が切断、置換や欠損を受けたり、変異によって終止コドンが配列内に入り、断片化していることを思わせる構造をしている(図 4-1 参照)。また、*ydiO-ydiP* オペロンと *ydiR-ydiS-ydjA* オペロンの間にある小さな ORF、*ydiQ* の相補鎖配列上に、枯草菌 YhxB (Phosphomannomutase) に相同な配列が断片化して存在していることが確認できる (図



4-2,4-3 参照)。なぜ、このプロファージ 3 領域にこのような断片が蓄積しているのであろうか。制限修飾遺伝子、特に修飾遺伝子が細胞内で変異や欠損によって機能がなくなると、その制限活性に対抗することができなくなり細胞が生存できなくなることから、結果的に制限修飾系は進化の過程で他の遺伝子より高い保存率を示すと考えられているが (Naito et al., 1995, Nakayama and Kobayashi, 1998)、このプロファージ 3 領域内の突然変異の蓄積により ORF が断片化された結果、*ydiN*, *ydiM*, *ydiQ*, *ydjB* および *ydjC* のような小さい機能未知 ORF や断片化された Integrase、Terminase が生じたのであれば、その断片化を受けずに存在している *ydiO*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS*, *ydjA* は、これらが制限修飾活性をもつ遺伝子であり、そのため周囲の ORF に比べて断片化されずに細胞内に保存されているという理論を示唆するものである。

また、*ydiS*-*ydjA* が *l1a1*-2,3 と相同性を示すことを述べたが、この他にも近年ゲノム塩基配列が明らかになった (Alm et al., 1999) *Helicobacter pylori* J99 株の JHP0164 (制限エンドヌクレアーゼと推定されている) が *ydiS* と、そして JHP0164 に隣接する機能未知の JHP0165 が *ydjA* と非常に高い相同性を示した。これに注目すると、同じ *Helicobacter pylori* J99 株の JHP0435 (シトシン特異性メチルトランスフェラーゼと推定) が *ydiO* と、JHP1050 (シトシン特異性メチルトランスフェラーゼと推定) が *ydiP* と相同性が検出された。これを図 4-3 に示したが、特に *ydiS*, *ydjA* に対応する JHP0164 と JHP0165 は、その並びこそ違おうが、双方が隣接していることは先に述べた *L1a1*-2,3 の関係と同様であり、その機能に重要な関係を持つ遺伝子同士であることを予期させるものである。実際の証明になるわけではないが、このことも、枯草菌の制限修飾系遺伝子群が枯草菌の進化の過程で他種細菌間より水平伝達して染色体上に定着したものであることを示唆していると考えられる。



**Figure 3.** (A) Location of DNA sequences having similarities to parts of the integrase of the bacteriophage T270 of *S. pyogenes* and the small subunit of the terminase of the bacteriophage LL-H of *L. delbrueckii*. The percentages of identical amino acids between the translated sequences of the *groEL-hsdMMA* region and the phage genes are indicated. The arrows indicate the direction of translation of the ORFs. (B) Alignment of translated sequences in regions I-III and the integrase of bacteriophage T270. (C) Alignment of translated sequences in region IV and terminase protein of bacteriophage LL-H.

#### 図 4-1 *groEL-ydiO* 領域の遺伝子断片

枯草菌 Marburg168 株染色体上の *groEL-ydiO* (図中では *hsdMMA* となっている) 遺伝子間の領域に存在する Integrase および Terminase 断片と相同性の高い領域を示している。図は Kasahara et al., 1997 より抜粋した。

**A:**

KSH\*FYPHKI TQANMYVFSN \*YNCIIINKE DGIV\*ETNSN IELVLIGAVE KEIPRHDLI KFRDKIKKTN YN\*T\*SDKST  
 RFMSESRRSK TSRLYNEQ\* CYFIVGQS\*A GKTKQKNGYS LVNLHRAKIG VG\*IRKE\*ER PGR CFL\*GIW DMEQEACAGK  
 LELEQTG\*HL YVKESFCWVG GFYNGSRQDT GIQRIRFRVI KAYNRVKFAV RHLHGFAGIV VTASHNPPEY NGYKVVYVGDG  
GQLPPSKGPD QNIAQRWTRH TLNYFRKLY LR\*NRHQGC I YAASWYSKST AMALAAMNYK HVAVGKEQEQ PALCFPLSPV  
QMLKNMPRLS WPSGKAAN\*R RYLIATDPDA DRLGIAVKNE NGEYTVLTGN QTEPLLLHYI LTQIKKKGTL PSNGIVLKI  
VTSELGREVA TSFRVETIGV LTGFKFIARK INGYKTGEH NFLFGYEESY GYLIGDFVRD KDAVQTDVLA VEVCAYYKKK  
GFHYTKLSLV LKNMATFRKA CAH\*H\*REKK QGN\*FSRPSL PSVLNLASFG SVKVTTVEDY LTGIERLWKA LRNSWAFHSQ  
MFLNVFLKSD PWMCLRLSGT EPKIKFYFRV DESLAETRNP QRIEKEFMEL VE\*KME\*CKK N\*R\*KTELV L SSSDTF\*YAL  
 FNVK

**B:**

MTWRKSYERW KQTEHLDLEL KERLIELEGD EQALEDCFYK DLEFGTGGM R GEIGAGTNR M NIYTVRKASA GFAAYISKQG  
 EEAKKRGVVI AYDSRHKSPE FAMEAAKTLA TQGIQTYVFD ELRPTPELSE AVRQLNAYGG VVVTASHNPP EYNGYKVVYGD  
DGGQLPPKEA DIVIEQVNAI ENELTITVVR YDKVYTEKLT SISVHPELSE EVDVKVFTPLHGTANKPVR RGLALGYKN  
VTVVKEQELP DSNFSTVTSP NPEEHAFFEY AIKLGEQNA DIL IATDPDA DRLGIAVKND QKQYTVLTGN QTGALLLHYL  
LSEKKKQIL PDNGVVLKTI VTSEIGRAVA SSFGLDTIDT LTGFKFIGEK IKEYEASGQY TFQFGYEESY GYLIGDFARD  
KDAIQALLA VEVCAFYKQ GMSLYEALIN LFNEYGFYRE GLKSLTLK GK QGAEQIEAIL ASFRQNPQK MAGKQVVTAE  
DYAVSKRLL TESKEEAIDL PKS NVLKYFL EDGSWFCLRP SGTEPKVKFY FAVKGSLED SEKRLAVLSE DVMKTVD EIV  
 ESTAK

**C:**

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
sp:YHXB_BACSU PROBABLE PHOSPHOMANNOMUTASE (EC 5.4.2.8) (PMM).>p...	303	4e-81
gp:AP001510_281 phosphomannomutase [Bacillus halodurans]	264	2e-69
gp:STH243290_1 phosphoglucomutase [Streptococcus thermophilus]	203	6e-51
prf:2608228B phosphoglucomutase - Streptococcus pneumoniae...	150	5e-35

**D:**

(PMM).>pir:C69835 phosphomannomutase homolog yhxB -  
 [Bacillus subtilis]>gp:BSUB0006\_6 yhxB gene product  
 [Bacillus subtilis]>gp:BSY14079\_6 hypothetical protein  
 Length = 565  
 Score = 303 bits (768), Expect = 4e-81  
 Identities = 191/435 (43%), Positives = 242/435 (54%), Gaps = 37/435 (8%)

Query: 191 GIQRIRFRVIKAYNRVKFAVRHLHGFAGIVVTASHNPPEYNGYKVVYVGDGGQLPPSKGP- 249  
 GIQ F ++ + FAVR L+ + G+VVTASHNPPEYNGYKVVY G DGGQLPP +  
 Sbjct: 113 GIQTYVFDL RPTPELSFAVRQLNAYGGVVVTASHNPPEYNGYKVVYGDGGQLPPKEAD I 172

Query: 250 -----DQNIQRWTRHTLNYFRKLYLR\*NRHQG-----CIYAA--SWYSKSTAMA 293  
 + + R+ Y KL + + ++ +K  
 Sbjct: 173 VIEQVNAIENELTITVVR YDKVYTEKLT S I SVHPELSEEVDVKVFTPLHGTANKPVRRG 232

Query: 294 LAAMNYKHVAVGKEQEQPALCFPL--SPVQMLKNMPRLSWPSGKAAN\*RRYLIATDPDAD 351  
 L A+ YK+V V KEQE P F SP + G+ N LIATDPDAD  
 Sbjct: 233 LEALGYKNVTVVKEQELPDSNFSTVTSPNPEEHAFFEYAIKLGEQNA-ADIL IATDPDAD 291

図 4-2 ydiP-ydiR 遺伝子間の領域と枯草菌 YhxB 配列の相同性検索結果

```

Query: 352 RLGIAVKNENGEYTVLTGNQTEPLLLHYILTQIKKKGTLPNSGIVLKTIVTSELGREVAT 411
          RLGIAVKN+ G+YTVLTGNQT LLLHY+L++ KK+G LP NG+VLKTIVTSE+GR VA+
Sbjct: 292 RLGIAVKNQGGKYTVLTGNQGTGALLLHYLLSEKKKGILPDNGVVLKTIVTSEIGRAVAS 351

Query: 412 SFRVETIGVLTGFKFIARKINGYYKTGEHNFLFGYEESYGYLIGDFVRDKDAVQTDVLAV 471
          SF ++TI LTGFKFI KI Y +G++ F FGYEESYGYLIGDF RDKDA+Q +LAV
Sbjct: 352 SFGLDTIDTLTGFKFIGEKIKEYEASGQYTFQFGYEESYGYLIGDFARDKDAIQALLAV 411

Query: 472 EVCAYYKKKGFH-YTKLSLVLKNMATFRKACAH*H*REKKGQN*FSRPSLPSVLNLASF- 529
          EVCA+YKK+G Y L + +R+ + K+G + ++ LASF
Sbjct: 412 EVCAFYKKQMSLYEALINLFNEYGFYREGLKSLTLKGKQGAE-----QIEAI--LASFR 464

Query: 530 -----GSVKVTTVEDYLTGIER-LWKALRNSWAFHSQMFLNVFLKSDPMMCLRLSGTE 581
          +V T EDY L ++ + L FL+ W CLR SGTE
Sbjct: 465 QNPPQKMAGKQVVTAEDYAVSKRLLTESKEEAIDLPSNVLYFLEDGGSWFCLRPSGTE 524

Query: 582 PKIKFYFRVDESLAE 596
          PK+KFYF V S E
Sbjct: 525 PKVKFYFAVKGSSLE 539

```

図 4-2 *ydiP-ydiR* 遺伝子間の領域と枯草菌 YhxB 配列の相同性検索 (続き)

BLASTP を用いた相同性検索結果。

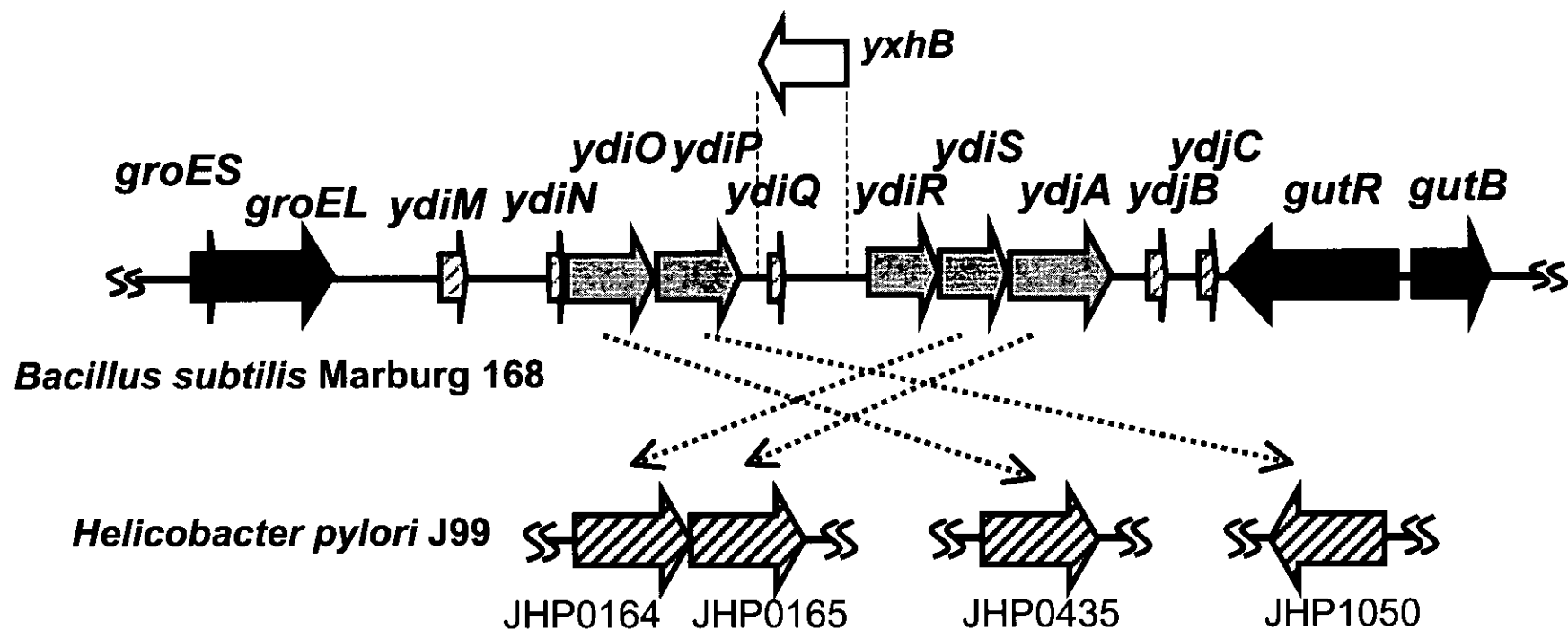
A: *ydiP-ydiR* 遺伝子間の領域 (*ydiQ* 含む) の相補鎖 (複製と逆方向) から変換したアミノ酸配列。3つのフレーム中、有意であったフレームの配列を示した。\*: 終止コドン。

B: 枯草菌 YhxB 配列。A:B: 共に、比較した配列部分に下線、および

Phosphoglucomutase and phosphomannomutase phosphoserine signature

( [GSA] - [LIVM] -x- [LIVM] - [ST] - [PGA] -S-H-x-P-x (4) - [GNHE] ) モチーフを網掛けで示した。

C: BLASTP 検索のトップスコア。Phosphoglucomutase および phosphomannomutase との相同性が非常に高いことが分かる。D: *ydiP-ydiR* 遺伝子間の領域と枯草菌 YhxB 配列の相同性検索結果。比較は終止コドンを見逃して行った。機能モチーフに網掛けをいれた。モチーフの保存が分かる。



JHP0435= type II DNA modification enzyme (methyltransferase) - *Helicobacter pylori* (strain J99)  
 Length = 351aa, vs.YdiO Identities = 96/369 (26%), Expect = 7e-97

JHP1050= type II DNA modification enzyme (methyltransferase) - *Helicobacter pylori* (strain J99)  
 Length = 321aa, vs.YdiP Identities = 123/322(38%), Expect = 5e-94

JHP0164=probable restriction enzyme - *Helicobacter pylori* (strain J99)  
 Length = 448aa, vs.YdiS Identities = 176/355 (49%), Expect = 5e-71

JHP0165=hypothetical protein - *Helicobacter pylori* (strain J99)  
 Length = 406aa, vs.YdjA Identities = 172/370 (45%), Expect = e-137

図4-3 枯草菌制限修飾遺伝子と *Helicobacter pylori* 制限修飾遺伝子との比較

図1-1の枯草菌染色体地図と *Helicobacter pylori* 制限修飾遺伝子のORFを示した。上段：枯草菌染色体、中段、下段：  
*Helicobacter pylori* 染色体。上下段とも図左側が核酸鎖の5'方向。矢印の向きと長さは各ORFの方向と塩基数に対応している。点  
 線：相同性のあるORF同士を示す。点線で結ばれたORF同士の相同性検索結果の一部を黒枠内に示した。また印の色は、黒：既  
 知遺伝子、斜線：機能未知遺伝子、灰：本研究にて解析する遺伝子。白矢印：*ydiP-ydiR*間にある *yxhB* 様遺伝子の位置を示した。

## 5. 結論

- 1) 旧来から研究材料とされてきた、枯草菌 *B. subtilis* Marburg 168 株の染色体の一部を他のバチルス属細菌の染色体で置換された RM125 株 (m-r) において、その置換された染色体領域がプロファージ 3 領域であること、13kbp のプロファージ 3 領域が、2.5kbp の DNA で置き換わっていた事を明らかにした。この領域は *ydiO*, *ydiP* および *ydiS* を含む領域であり、*ydiO*, *ydiP* および *ydiS* が *BsuM* 制限修飾の機能を担う遺伝子であることを強く示唆するものである。
- 2) *ydiO*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS* および *ydjA* 各遺伝子の破壊株構築と、プラスミドを用いた形質転換実験による表現系の解析、サザンハイブリダイゼーションによるゲノムのメチル化の検出、および *ydiR*, *ydiS*, *ydjA* 遺伝子発現誘導株の解析を行った。この結果、枯草菌 *B. subtilis* Marburg 168 株に唯一存在する制限修飾遺伝子 *BsuM* は、修飾遺伝子 *ydiO*, *ydiP* と制限遺伝子 *ydiS* から構成されるシステムであり、さらに機能未知遺伝子である *ydiR* および *ydjA* もその制限活性に必須であることが結論された。つまりこの制限修飾系は、制限活性に必要な 3 遺伝子と、修飾活性に必要な 2 遺伝子から構成されていることになる。特にその制限活性に必要な 2 つの未知遺伝子の役割は興味深い。
- 3) 各制限修飾遺伝子の転写ユニットを明らかにした。修飾 2 遺伝子および、制限活性に必要な 3 遺伝子は各々オペロンを形成していた。また 2 つの修飾遺伝子はその上

流の *groESL* とともに転写を受けており、ヒートショックによってもその発現が高まる事が分かった。これは、枯草菌においてはヒートショックがかかり、*groESL* の発現が高まると同時に細胞内での修飾活性が上がり、外来性 DNA に対するメチル化修飾能も同時に高まることで、外来性 DNA の感染を許諾する機構を想起させるものである。

- 4) これら制限修飾蛋白のうち YdiO と YdiR 蛋白の精製サンプルを得た。精製度の高い YdiO には DNA メチル化修飾活性が認められなかった。精製度の低い YdiR には環状 DNA にニックを入れる活性を確認したが、実験した限りの条件では認識配列特異性を確認できなかった。*In vivo* における実験結果を踏まえ、この制限修飾の本来の活性を再現するには、本研究の対象となった 5 遺伝子の産物の生化学的解析が必要である。

## 6. 謝辞

本論文は総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻において、1998年より2001年にかけて行った研究をまとめたものです。元国立遺伝学研究所RIセンター長、現埼玉大学理学部分子生物学科の定家義人教授には、遺伝学の基礎から本研究における研究手法の全般に渡って御指導御教授いただきました。また、論文作成法や表現方法まで指導いただきました。ここに心から御礼申し上げます。また、同学科の朝井計助手にはその実験方法や具体的な研究の思考法を御指導いただきました。国立遺伝学研究所分子遺伝研究部門の石浜明教授には、本研究後半の指導教官として携わっていただき、多大な御指導をいただきました。また、pHVプラスミドを譲渡していただき、また制限修飾の研究に御意見をいただきました三菱化学生命研究所の板谷光泰教授、本研究、および本論文作成に当たり、有益な御指導御助言をいただきました、国立遺伝学研究所、桂勲教授、小原雄治教授、安田成一助教授、藤田信之助手、および東京大学医科学研究所小林一三助教授、東海大学海洋学部海洋科学科田中暉夫教授に感謝いたします。また、私の研究活動の場であった国立遺伝学研究所RIセンターの方々、埼玉大学理学部分子生物学科の方々には、さまざまな形の御支持をいただき、感謝しております。そして、これまでの私の人生を支えてくれた家族の理解と協力は、私にとって大きな励みとなりました。心より感謝いたします。

本研究は、以上の多くの方々、さらにここに挙げきれないほどの、私と縁を持った方々の御指導、御協力の下に行ったものです。これらの方々の多大なる御尽力のどれ一つ欠けても、本研究は完成できなかつたと確信しております。



## 7. 参考文献

- Alm, R.A., Ling, L.S.L., et al. (1999). Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397:176-180.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Arber, W. and D. Dussoix. (1962). Host Specificity of DNA Produced by *Escherichia coli*. I. Host Controlled Modification of Bacteriophage  $\lambda$ . *J. Mol. Biol.* 5:18.
- Arber, W. (1965). Host-controlled Modification of Bacteriophage. *Annu. Rev. Microbiol.* 19:365-378.
- Arnosti, D.N., Singer, V.L., and M.J. Chamberlin. (1986). Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 168:1243-1249.
- Bertani, G. and J.J. Weigle. (1953). Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* 65:113-121.
- Bickle, T.A. and D.H. Kruger. (1993). Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* 57:434-450.
- Bron, S., Janniere, L., and S.D. Ehrlich. (1988). Restriction and modification in *Bacillus subtilis* Marburg 168: target sites and effects on plasmid transformation. *Mol. Gen. Genet.* 211:186-189.
- Bujrdcki, I.M. and M. Radlinska. (1999). Molecular evolution of DNA-(cytosine-N4) methyltransferase: evidence for their polyphyletic origin. *Nucleic Acids Res.* 27:4501-4509.
- Chen, L., McMillan, A.M., Chang, W., Ezak-Nipkay, K., Lane, W.S. and G.L. Verdine. (1991). Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5) -methyltransferase. *Biochemistry* 30:11018-11025.
- Fujita, M., and Y. Sadaie. (1998). Rapid isolation of RNA polymerase from Sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Gene.* 221: 185-90.
- Groth, D., Reszka, R., and J.A. Schenk. (1996). Polyethylene glycol-mediated transformation of *Escherichia coli* is increased by room temperature incubation. *Anal. Biochem.* 240:302-304.
- Guha, S. (1985). Determination of DNA sequences containing methylcytosine in *Bacillus subtilis* Marburg. *J. Bacteriol.* 163,573-579.
- Guha, S. (1988). DNA methyltransferase of *Bacillus subtilis* Marburg: purification properties and further evidence of specificity. *Gene* 74:77-81.
- Gwinn, D.D., and W.D. Lawton. (1968) Alteration of host specificity in *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.* 32:297-301.
- Haldenwang, W.G. (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 59:1-30.
- Henikoff, J.G., Henikoff, S., and S. Pietrokovski. (1999). New features of the Blocks Database servers. *Nucleic Acids Res.* 27:226-228.
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., and A. Bairoch. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27:215-219.
- Ikawa, S., Shibata, T., and T. Ando. (1979). Host-controlled modification and restriction in *Bacillus subtilis*. *Bsu168*-system and *BsuR*-system in *B. subtilis* 168. *Molec. Gen. Genet.* 170:123-127.

- Ikawa,S., Shibata,T., Ando,T. and H. Saito. (1980). Genetic studies on site-specific endodeoxyribonucleases in *Bacillus subtilis*: multiple modification and restriction systems in transformants of *Bacillus subtilis* 168. *Molec.Gen.Genet.* 177:359-368.
- Ikawa,S., Shibata,T., Matsumoto,K., Iijima,T. Saito,H. and T. Ando. (1981). Chromosomal loci of genes controlling site-specific restriction endonucleases of *Bacillus subtilis*. *Molec.Gen.Genet.* 183:1-6.
- Jentsch,S. (1983). Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: Sequence specificities of restriction/modification systems *BsuM*, *BsuE*, and *BsuF*. *J. Bacteriol.* 156:800-808.
- Kasahara, Y., Nakai, S., Ogasawara, N., Yata, K., and Y. Sadaie. (1997). Sequence analysis of the *groESL-cotA* region of the *Bacillus subtilis* genome, containing the restriction/ modification system genes. *DNA Res.* 4:335-339.
- Kelly Jr, T.J., and H.O. Smith. (1970). A Restriction Enzyme from *Hemophilus influenzae* II. Base Sequence of the Recognition Site. *J. Mol. Biol.* 51:393
- Kobayashi,K., Okamura,K., Inoue,T., Sato,T. and Kobayashi,Y. (1998). Complete nucleotide sequence of *Bacillus subtilis* phage phi-105. Unpublished DDBJ/EMBL/GenBank databases.
- Kong, H. (2000). Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nuc.Acid Res.* 28: 3216-3223.
- Kunst, F., N. Ogasawara, et al. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 390:249-256.
- Li, M. and Wong, S.L. (1992). Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174:3981-3992.
- Luria S.E. and M.L. Human (1952). Nonhereditary, Host-induced variation of bacterial viruses. *J. Bacteriol.* 64:557-569.
- Meselson, M. and R. Yuan. (1968). DNA Restriction Enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110-1114.
- Naito,T., Kusano,K., and I. Kobayashi. (1995). Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science.* 267:897-899.
- Nakayama, Y., and I. Kobayashi. (1998). Restriction-modification gene complexes as selfish gene entities: roles of a regulatory system in their establishment, maintenance, and apoptotic mutual exclusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95:6442-6447.
- New England Biolabs (1999). New England Biolabs catalog and Technical reference 1998-99, pp.12-65.
- Niaudet, B., and S. D. Ehrlich. (1979). *In vitro* genetic labeling of *Bacillus subtilis* cryptic plasmid pHV400. *Plasmid* 2:48-58.
- Niaudet, B., Goze, A, and S.D. Ehrlich. (1982). Insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis*: mechanism and use in gene cloning. *Gene* 19:277-84.
- Nobusato, A., I. Uchiyama, I. Kobayashi. (2000). Diversity of restriction-modification gene homologues in *Helicobacter pylori*. *Gene* 259:89-98.
- Oda,K., and I. Marmur. (1966). Purification and properties of deoxyribonucleic acid methylase from *Bacillus subtilis*. *Biochem.* 5:761-773.

- O'Sullivan, D.J., Zagula, K., and T.R. Klaenhammer. (1995). *In vivo* restriction by *LlaI* is encoded by three genes, arranged in an operon with *llaM*, on the conjugative *Lactococcus* plasmid pTR2030. *J. Bacteriol.* 177:134-143.
- O'Sullivan D.J., and T.R. Klaenhammer. (1998). Control of expression of *LlaI* restriction in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 275:1009-1020.
- Primrose, S.B. and S.D. Ehrlich. (1981). Isolation of plasmid deletion Mutants and study of their instability. *Plasmid* 6:193-201.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and F.W. Studier. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56:125-135.
- Saito, H., Shibata, T., and T. Ando. (1979). Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol.Gen.Genet.* 170:117-122.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and T.Maniatis. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and A. Wittinghofer. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15:430-434.
- Schmidt, A., Schiesswohl, M., Volker, U., Hecker, M., and W. Schumann. (1992). Cloning, sequencing, mapping and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174:3993-3999.
- Shibata, T., and T. Ando. (1974). Host controlled Modification and Restriction in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gene.Genet.* 131:275-280.
- Shibata, T., and T. Ando. (1976). The restriction endonucleases in *Bacillus amyloliquefaciens* N strain. Substrate specificities. *Biochim. Biophys. Acta* 442: 184-196.
- Shibata T, Ikawa S, Kim C, Ando T. (1976). Site-specific deoxyribonucleases in *Bacillus subtilis* and other *Bacillus* strains. *J Bacteriol.* 128:473-476.
- Smith, H.O. and K.W. Wilcox. (1970). A Restriction Enzyme from *Hemophilus influenzae* I. Purification and General Properties. *J. Mol. Biol.* 51:379
- Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219:37-44.
- Tanaka, T., (1979). Restriction of plasmid-mediated transformation in *Bacillus subtilis* 168. *Mol.Gen.Genet.* 175:235-237.
- Tao, T., Bourne, I.C., and Blumenthal, R.M. (1991). A family of regulatory genes associated with type II restriction-modification systems. *J. Bacteriol.* 173:1367-1375.
- Trautner, T.A., and M. Noyer-Weidner. (1993). Restriction/ Modification and methylation systems in *Bacillus subtilis*, related species, and their phases.
- Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and R. Losick ed. (1993) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. 530 - 650 pp American Society for microbiology.
- Trautner, T.A., Pawick, B., Bron, S., and C. Anagnostopoulos. (1974). Restriction and modification in *B.subtilis*, Biological aspects. *Mol.Gen.Genet.*131:181-191.

Uozumi, T., Hoshino, T., Miwa, K., Horinouchi, S., Beppu, T., and K. Arima. (1977). Restriction and modification in *Bacillus* species. Genetic transformation of bacteria with DNA from different species. Part I. *Mol. Gen. Genet.* 152:525-538.

Vagner, V., Dervyn, E., and S.D. Ehrlich. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 144:3097-3104.

Wilson, G.G. (1991). Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res.* 19:2539-2566.

Wilson, G.A., and F.E. Young. (1975). Isolation of a sequence-specific endonuclease (*Bam*I) from *Bacillus amyloliquefaciens* H. *J. Mol. Biol.* 97: 123-125 .

Yansura, D.G. and D.J. Henner. (1984). Use of the *Escherichia coli lac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81:439-443.