

氏 名 大 島 英 之

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第528号

学位授与の日付 平成13年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 枯草菌制限修飾系遺伝子*Bsu* Mの分子遺伝学的解析

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	桂 勲
	教授	小原 雄治
	助教授	安田 成一
	教授	田中 暉夫 (東海大学)
	助教授	小林 一三 (東京大学)

## 論文内容の要旨

Many microorganisms prevent phage or plasmid infection by digesting its unmethylated DNA with restriction endonuclease, which recognizes specific target sequence on the 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, a large number of restriction modification systems have been found in various kinds of microorganisms, but 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, named *BsuM*. The chromosomal location of *BsuM* was determined by Saito et al, and a 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 remain 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 cytosine-specific DNA methyltransferases. They were found in the prophage 3 region between *groESL* operon and *gut* operon, where classical *BsuM* mutations were located.

In this study, 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*, which are located 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, both of which are expressed during the logarithmic phase of growth. The *ydiO-ydiP* operon was also transcribed by a read-through mechanism from the upstream *groESL* operon.

The ratio of the transformation frequency of pHV1401 with 3 *XhoI* sites to

that of pHV33 without an *Xho*I site was about 40-fold higher in the *ydiR*, *ydiS* or *ydjA* disruptants.

The degree of methylation of the *Bsu*M target sequence (CTCGAG) on the chromosomal DNA was estimated indirectly by susceptibility to *Xho*I (an isoschizomer to *Bsu*M) digestion of DNA extracted from these disruptant strains. Six *Xho*I sites on the chromosome were examined. Each *Xho*I site was susceptible to *Xho*I 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.

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* cells, and Ni column-purified YdiR showed weak endonuclease activity. This activity may be due to a presumed YdiR/YdiS/YdjA protein complex.

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

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

## 論文の審査結果の要旨

大島英之君は、枯草菌168株のゲノム塩基配列で、制限修飾系と相同性のある遺伝子を含むプロファージ3領域に着目し、そこにある遺伝子群の機能と発現について研究した。

この領域は、他と比べてGC含量が低く、ファージ・インテグラーゼの断片と似た配列が散在しているため、進化の過程で挿入された外来性の配列に由来すると考えられている。予測された遺伝子は10個あるが、ORFの大きさなどから、*ydi0*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS*, *ydjA*の5つが正常な遺伝子で、他の5つは断片化した偽遺伝子の可能性がある。従来の研究から、枯草菌168株には1つの制限修飾系*BsuM*があり、その活性を失った変異のマッピングでは、この制限修飾系はプロファージ3領域付近にあることがわかっていた。また、168株から分離したゲノムDNAやプラスミドが制限酵素*XhoI*に耐性なので、*BsuM*は*XhoI*と同じI認識配列をもつことが予想され、プラスミドによる形質転換効率が*XhoI*配列の有無で変わることからも、これが支持されていた。なお、他研究室で*BsuM*メチラーゼは部分精製したという報告があるが、*BsuM*制限酵素は*in vitro*の活性測定にも不可解な点があり、精製は失敗に終わっている。

大島君は、上記の5遺伝子の内、*ydi0*と*ydiP*が種々の修飾酵素、*ydiS*が制限酵素とアミノ酸配列に相同性があることを確認した。*ydjA*は、*Helicobacter pylori*ゲノムで制限酵素遺伝子付近に存在する*jhp0165*遺伝子や、*Lactococcus lactis*で制限酵素活性に必要な第3の成分*LlaI.3*遺伝子と相同性をもつことを見つけたが、*ydiR*と相同性をもつ遺伝子はなかった。

次に、大島君は、制限修飾系のない変異体ではプロファージ3領域全体(13kbp)が別のDNA(2.5kbp)で置換されていることを見つけ、*BsuM*制限修飾系がプロファージ3領域にあることを確認した。また、プラスミドの挿入により*ydi0*, *ydiP*, *ydiR*, *ydiS*, *ydjA*の各遺伝子の破壊を試み、(1)野生型では*ydiR*, *ydiS*, *ydjA*の破壊はできるが、*ydi0*や*ydiP*の破壊ができないこと、(2) *ydiR*, *ydiS*, *ydjA*のいずれかを破壊すると*ydi0*や*ydiP*も破壊できることを見つけた。これは、*ydi0*と*ydiP*の両方が修飾酵素活性に、*ydiR*, *ydiS*, *ydjA*の全てが制限酵素活性に必要なことを示唆する。そこで、大島君は、168株のDNAから6箇所の*XhoI*認識配列について*XhoI*感受性を調べ、*ydi0*, *ydiP*破壊株のDNAはこの6箇所が*XhoI*で切断されるが、野生型のDNAでは切れにくいことを示し、*ydi0*, *ydiP*が修飾活性に必要なことを確認した。また、*XhoI*部位をもつプラスミドと持たないプラスミドで野生型および上記の破壊株の形質転換実験を行い、その効率から、古典的な意味での制限活性には、*ydiR*, *ydiS*, *ydjA*の全てが必要であることを示した。

さらに大島君は、ノーザン解析を行い、(*ydi0*, *ydiP*)と(*ydiR*, *ydiS*, *ydjA*)という同じ機能に働く2つの遺伝子群がそれぞれオペロンを構成することを示した。これらの転写は、対数増殖期と定常期初期に起り、それ以降は著しく低下する。興味深いことに、*ydi0*, *ydiP*は、上流にある*groES*, *groEL*オペロンからのreadthroughとしても転写され、この転写は熱ショックで著しく促進される。*ydiR*, *ydiS*, *ydjA*オペロンをIPTGで誘導可能なプロモーターの制御下に置き、培養中にIPTGを添加すると、*ydi0*と*ydiP*の両方が正常な場合は菌は増殖

を継続するが、一方でも破壊されている場合はただちに増殖を停止し、生菌数が激減することが示された。

このように、大島君は、*in vitro*の制限酵素活性測定が非常に困難な枯草菌168株で、主に遺伝子破壊株を用いた実験から、*ydiO*と*ydiP*が修飾酵素活性、*ydiR*, *ydiS*, *ydjA*が制限酵素活性に必須らしいことを様々な方法で示した。この結果は、従来は単純なII型の制限修飾系と考えられていたBsuMが複雑な遺伝子構成をもつ珍しい制限修飾系である可能性を示し、制限修飾系の分類や複雑な制限修飾系の作用機構などの研究に興味ある問題を提起した。またプロフェージ3領域では、制限修飾系に必須の遺伝子以外は遺伝子が断片化していることから、制限修飾系は進化で強く保存されることが示された。さらに、修飾酵素遺伝子が*groE*オペロンからのreadthroughでも転写されることから、修飾酵素遺伝子が熱ショックプロモーターの制御下に置かれた場合の進化的意味という問題も提起された。

審査委員会は、これらのことから、本研究が遺伝学専攻の博士論文に十分なものと判断した。

公開の発表会とそれに続く非公開の審査委員会で、大島君はさまざまな質問に適切に答えたので、専門および周辺分野の基礎知識や理解力については、博士号取得に十分と判断した。英語の実力は、英文要旨の他に大島君が書いた英文の投稿論文原稿を審査委員全員で見て、十分と判断した。