



Title	II型制限酵素の開発と生産菌株の育種に関する研究
Author(s)	前川, 宣彦
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2093
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

II型制限酵素の開発と生産菌株の 育種に関する研究

前川 宜彦



目次

緒論	1
第1章 II型制限酵素の検索と特異性及び酵素的性質	6
第1節 緒言	6
第2節 実験材料及び方法	7
第3節 実験結果	12
1. II型制限酵素のスクリーニング	12
2. <u>Acetobacter aceti</u> IF0 3281よりII型制限酵素の精製	12
2-1 <u>AatI</u> の精製	12
2-2 <u>AatII</u> の精製	13
3. 酵素の特異性と性質	15
3-1 <u>AatI</u> の特異性と性質	15
3-2 <u>AatII</u> の特異性と性質	20
4. <u>Bacillus aneurinolyticus</u> IAM 1077よりII型制限酵素の精製	27
4-1 <u>BanI</u> の精製	27
4-2 <u>BanII</u> の精製	28
4-3 <u>BanIII</u> の精製	29
5. 酵素の特異性と性質	31
5-1 <u>BanI</u> の特異性と性質	31
5-2 <u>BanII</u> の特異性と性質	38
5-3 <u>BanIII</u> の特異性と性質	44
6. <u>Micrococcus roseus</u> SよりII型制限酵素の精製	51
6-1 <u>MroI</u> の特異性と性質	51
7. その他の菌株からの制限酵素	56
第5節 考察	57
第6節 要約	58
第2章 <u>BanI</u> と <u>BanIII</u> 制限-修飾系の <u>E. coli</u> へのクローニングと発現	60
第1節 緒言	60

第2節	実験材料及び方法	61
第3節	実験結果	63
3-1	<u>Ban</u> Iおよび <u>Ban</u> III制限-修飾系遺伝子のクローニングと発現	63
3-2	<u>Ban</u> Iおよび <u>Ban</u> III制限-修飾系遺伝子の位置	67
3-3	バクテリアファージの制限について	67
3-4	形質転換頻度の宿主依存性について	69
第4節	考察	69
第5節	要約	72
第3章	<u>Bacillus aneurinolyticus</u> IAM 1077の制限-修飾系遺伝子の 塩基配列決定	72
第1節	緒言	72
第2節	実験材料と方法	73
第3節	実験結果	75
3-1	<u>Ban</u> I制限酵素及び <u>Ban</u> Iメチラーゼの発現	75
3-2	<u>Ban</u> I制限-修飾系酵素系の分子量	77
3-3	DNA 塩基配列	77
3-4	蛋白のアミノ酸配列の比較	80
第4節	考察	82
第5節	要約	82
	総括	84
	参考文献	87
	本論文に関係のある報告	89

著者 論論

制限酵素は、DNA上の特定の塩基配列を認識して、そのホスホジエステル結合を切断するエンド型のヌクレアーゼであり、制限エンドヌクレアーゼ (restriction endonuclease) と呼ばれる。DNAやRNAに作用する酵素は多数知られているが、そのなかで制限酵素、特にII型制限酵素がとりわけ重要であるのは、長いDNA鎖を特定の部位で切断できるきわめて特異性の高い性質をもっているからである。いわゆる遺伝子操作において、制限酵素による長いDNA分子の特定部位での切断、それによって得られるDNA断片の分離、そしてDNAの制限酵素による地図の作成は、最も基本的な実験技術の一つである。

制限酵素の酵素化学的研究は、1968年 LinnとArbort¹⁾らにより大腸菌B株 (*Escherichia coli* B) に、MeselsonとYuan²⁾ らにより、大腸菌K株 (*Escherichia coli* K) に、それぞれの菌株により修飾を受けていない外来性のDNAのみを分解する酵素活性が認められ、分離されたことから始まった。これらが今日、"I型制限酵素"と呼ばれるもので、その活性発現には、Mg²⁺、ATP、S-アデノシルメチオニン (SAM) が必要である。本酵素は認識する塩基配列と切断点とは異なり、またその切断点が一定でないので特定の長さのDNA断片の產生が認められないことから、遺伝子操作に利用されることはない。1970年、Smith^{3・4)}らは、はじめて *Haemophilus influenzae* Rd菌からDNA上の特定の塩基配列を認識して特定の位置を切断する新型のエンドヌクレアーゼの分離、精製を報告した。これが今日 "II型制限酵素"として分離された最初の制限酵素である。

制限酵素の命名法は 1973年、SmithとNathans⁵⁾らにより提唱され、現在広く用いられている。II型制限酵素は主として細菌やラン藻類などの原核性の微生物から分離され、Roberts⁶⁾の一覧表によると、現在 1500種以上に見いただされている。その特異性の異なるものは、150種類以上に及ぶ。

- II型制限酵素は次の性質を持っている。
 - 1) 活性発現には Mg²⁺ のみが必要である。
 - 2) 4-8個ヌクレオチドの特定の対称性 (Symmetry) 塩基配列を認識して切断する。
 - 3) 生成する切断末端は、5'-または3' -が突出した付着末端 (Cohesive end)、ま

たは平滑末端 (Blunt end) である。

このように II 型制限酵素は、特定の部位で DNA を切断することができることから、遺伝子の単離 (Gene isolation), 物理的 地図の作成 (Physical mapping), DNA 塩基配列決定 (DNA sequence), 遺伝子工学 (Genetic engineering) などさまざまな利用がなされている。この酵素の多くは市販されており年々その利用度は高まり、現在 100 品種以上に達している。また本酵素はその特異性が高いが故に利用されるものであり高度の精製が要求される。酵素の種類により精製の難易度に差があるが、一般に高価であり研究試薬として経済的な供給が望まれている。さらに現在分離されている酵素は 2 回回転対称性のある 4-6 塩基対を識別する酵素にかぎっても、塩基配列の全組合せを完全に埋めあわせていない。したがって、新しい塩基配列を認識する II 型制限酵素を分離することができれば、DNA 組換え実験や DNA の構造解析の研究に役立つと考えられる。また、既に分離されている II 型制限酵素と同じ特異性を持つ酵素 (isoschizomer) であつても、切断性において識別塩基のメチル化の影響が異なったり、あるいはその酵素の精製がより容易で、しかも収量が多いければ、現在酵素試薬として利用されている酵素にとって代わる可能性がある。そこで、これらの II 型制限酵素を検索と分離を試みた。

既に実用に供されている酵素のなかで生産性が低い品種があり、その生産性の向上のため必要な酵素の収量の向上のため組換え DNA 技術による菌株の育種の方法が考えられる。制限酵素発現のためには制限エンドヌクレアーゼ遺伝子のほかに、宿主の遺伝子を修飾するメチラーゼ遺伝子をクローニングすることが必要である。Walder⁷⁾ らは、Providencia stuartii 164 の PstI 制限 - 修飾系遺伝子のクローニングをおこない、大腸菌で発現させ、その生産性を約 10 倍向上させることに成功している。そのほか数種の制限 - 修飾系遺伝子がクローニングされている。^{8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16)} これらの研究は各種微生物のバクテリオファージによる感染に対する防御機構解明および制限酵素の酵素化学的研究に重要視されているが、一方、応用面では制限酵素の生産性向上に有力な手段を提供するものである。特に同一の菌株が 2 種以上の制限酵素を産生する場合に相互の酵素の分離精製が困難な時、各々の制限 - 修飾系遺伝子のクローニングして個々の細胞

で発現できるならば、非常に有効である。そこで、著者は制限酵素製造の改良を目的として、また生産菌の制限-修飾系の機構解明および酵素的性質の把握を目的として組換えDNA技術による制限酵素生産菌の育種を試みた。

本論文は新特異性制限酵素およびisoschizomerの検索と特異性決定を含む酵素的性質の検討、および組換えDNA技術による制限酵素生産菌の育種と制限-修飾系の検討に関するものである。

第1章： II型制限酵素の存在の報告のない細菌やアミノ酸、核酸を生産する細菌種について、入ファージおよびT4dCファージの2種のDNAを基質としてII型制限酵素活性のスクリーニングを行った。対数増殖期の終わり頃まで培養して得た細菌種の凍結菌体1gを超音波処理により菌体を破壊した後、超遠心分離しその上澄み画分のII型制限酵素の活性を分析した。その結果、10種の細菌種にその酵素活性を見いだすことができた。ここで得られた酵素画分を用い、各種のウイルスDNA (ϕ X174 RF-I, SV40, λ -DNA, T4dC) および、プラスミド(pBR322, pAO2, pAO43 DNA)を基質として消化し、それぞれの切断パターンを既知の酵素と比較した所、Acetobacter aceti IFO 3281, Bacillus aneurinolyticus IAM 1077 およびMicrococcus roseus Sより分離した酵素画分が新しい特異性をもつII型制限酵素である可能性が示唆された^{19, 37)}。

そこでこれらの菌体から酵素を精製分離し、各精製酵素より生成したDNA断片の5'末端部の塩基配列をMaxam-Gilbert法¹⁷⁾およびフィンガープリント法¹⁸⁾で分析することにより特異性を決定した。その結果、Acetobactor aceti IFO 3281は、StuI³²⁾のisoschizomer(AatI)と新特異性制限エンドヌクレアーゼAatIIを、Bacillus aneurinolyticus IAM 1077は、HgiCI^{43, 44)}およびClaI⁵⁴⁾のisoschizomer (BanI およびBanIII)と新特異性エンドヌクレアーゼ BanIIを生産することを認めた^{35, 36)}。そのほか、AatI, AatII, BanI, BanII, BanIIIの酵素的性質を明らかにすることを試みた。

上記以外の菌株の細菌より分離した酵素について 識別する認識配列をしらべたがすべて既知のisoschizomerであった¹⁹⁾。

更にアミノ酸、核酸生産菌からMicrococcus roseus S.よりMroIを生産することを

見いだした³⁷⁾。本酵素はAcinetobacter calcoaceticus由来のAccIII²⁵⁾, Bacillus species M.由来のBspMII^{26, 27)}と同一の塩基配列を識別するが、メチル化された塩基配列の切断性が異なる酵素であることを明らかにした。また本酵素の温度安定性、最適反応温度など酵素的性質を検討した。

第2章: Bacillus aneurinolyticus IAM 1077は、制限エンドヌクレアーゼBanI, BanII, BanIIIの3種の酵素を生産する。同一の細胞から3種の制限酵素を高純度に再現性高く精製することは、難しく製造上問題があった。そこでBanI, BanII, BanIIIの各制限-修飾系遺伝子をクローニングすることを試み、BanI, BanIII遺伝子のクローニングに成功した³⁸⁾。BanIクローニング株（pBanIRM8を保持するE. coliHB101）は元株に比べ10倍、BanIIIクローニング株（pBanIRRM12を保持するE. coliHB101）は、50倍の活性を示した。次に種々の組換えプラスミドを持つE. coliHB101で調製されたλ-vir phageに対する制限活性を調べた。E. coliHB101(pBR322/HB101)で調製されたphageはE. coliHB101(pBanIRM8)によりきわめて著しく制限された。E. coliHB101(pBanIRM8)で調製されたλ-vir phageはE. coliHB101(pBR322)に比較しE. coliHB101(pBanIRM8)は制限されない。しかるにE. coliHB101(pBanIRRM12)で調製されたλ-vir phageはE. coliHB101(pBanIRM8)により強く制限された。これはpBanIRM8が強い制限活性を保持していることを示した。また、プラスミドpBanIRM8とpBanIRRM12をそれぞれE. coliHB101に形質転換しその効率を調べるといずれのプラスミドもよく形質転換された。しかしながら、E. coliJM109に形質転換した場合、pBanIRRM12は高効率で形質転換されるに対し pBanIRM8は低い形質転換であった。

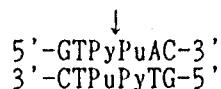
第3章: BanI制限-修飾系遺伝子の解析および酵素の発現機構の解明を目的として、BanI制限エンドヌクレアーゼ遺伝子とBanIメチラーゼ遺伝子の塩基配列を決定した⁴⁰⁾。また、E. coliHB101(pBanIRM8)菌体よりBanI 制限ヌクレアーゼを電気泳動的に单一まで精製し、分子量を決定した。他方、E. coliHB101(pBanIRM8)からサブクローニングし、BanIメチラーゼ遺伝子をコードするDNA断片を含むpBanIM4を作成した。さらにE. coliHB101(pBanIM4)菌体からBanIメチラーゼを電気泳動的に单一にまで精製し、分子量を決定した。決定した塩基配列からBanI制限エンド

ヌクレアーゼとBanI メチラーゼは、それぞれ分子量39,841および42,637の蛋白であった。また、BanIメチラーゼのアミノ酸配列から他のメチラーゼのホモロジーを調べるといくつかのアミノ酸配列と類似性が見られた。
総括では本研究で得られた結果を述べた。

第1章 II型制限酵素の検索と酵素的性質

第1節 緒言

制限エンドヌクレアーゼは、DNA上のある決まった塩基配列を認識し、特定の部位でそのホスホジエステル結合を切断するエンド型のヌクレアーゼである。その特異性の厳密性から、DNA組換え実験やDNAの塩基配列の決定に欠くことのできない重要な酵素試薬となっている。1970年にSmithら^{3,4)}がはじめて Haemophilus influenzae RdからDNA上の次に示す配列



を認識して↑に示す位置を切断する酵素 HindII の分離、精製を報告した。1971年 Yoshimori⁴⁾による EcoRI が続き、その後続々と特異性の異なる新しい酵素が発見され、Roberts⁶⁾の一覧表によると現在約1500種に及ぶ。その中で特異性の異なる酵素はおよそ150種に達している。最近でも新しい特異性をもつ制限酵素は毎年約10種が見いだされている。著者らが検索を開始した1979年当時特異性の異なる酵素は約50種程度であり、4-6ヌクレオチドの可能な対称性配列の種類の1/3であった。従って新しい塩基配列を識別できるII型制限酵素を見いだせば、遺伝子操作、DNA構造、機能解析の研究に役立つと考えられた。また、既に市販されているII型制限酵素と同じ特異性のある酵素(isoschizomer)であっても、メチル化DNAの切断性が異なったり、あるいは酵素の生産性が高く、精製がより容易であれば、高品質の酵素を安価に供給でき上記の研究に利用されるものと思われた。

そこでこれまでII型制限エンドヌクレアーゼの存在の報告のない細菌種やII型制限酵素の存在が報告^{21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28)}されているアミノ酸、核酸生産菌群のうちまだ検索されていない細菌種について制限酵素の検索と分離を試みた。

第二節 実験材料及び方法

使用菌株と培養条件

スクリーニングに使用した菌株は下記から譲渡された菌株を利用した。Acetobacter, Gluconobacterの菌株は、京都大学農学部食品工学科倉教授から譲渡された。Pseudomonas, Streptomycesは東洋紡敦賀酵素工場研究室の保存菌株である。また京都大学化学研究所左右田教授から分与された。また佐賀大学農学部応用微生物学教室保存菌株を使用した。

各々の菌株の培地組成は次の通りである。

- a) Acetobacter, Gluconobacter; 0.5% glucose, 1.0% glycerol, 0.5% yeast extract, 0.5% bacto-tryptone, 0.1% malt-extract (pH7.2)
- b) Lactobacillus, Streptococcus; 0.85% yeast extract, 1.0% glucose, 0.2% KH₂PO₄, 10% Tomato juice, 0.1% Tween 80, 2% CaCO₃ (pH7.2)
- c) Micrococcus, Mycobacterium, Pseudomonas, Serratia; 1% meat extract, 1% bacto-tryptone, 2% glucose, 5% NaCl (pH 7.0).
- d) Streptomyces; 2% nutrient broth (Difco), 0.2% yeast extract, 0.8% NaCl, 0.5% glucose (pH 7.2).
- e) 他の菌株; 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% glucose (pH 7.2).

すべての菌株は 30°C(aからe)あるいは37°C(cとe)で対数増殖期の後期までNBC-回転振湯機で培養した。菌体は遠心分離で分離し, 0.14 M NaCl-20 mM Tris-HCl(緩衝液A)で一度洗浄後-70 °Cで保存した。

Acetobacter aceti IF0 3281の培地および培養条件

A. acetiをglucose 5g, glycerol 15 ml, Yeast extract 5 g, Bacto tryptone 5g と Malt Extract 1 g を1 literの水道水(pH7.2)に含む培地で30°Cで培養した。対数増殖期後期まで培養後、遠心分離で菌体を分離し緩衝液A(0.14M NaCl-20mM Tris-HCl, pH7.5)で一度洗浄し, -70 °Cで保存した。

Bacillus aneurinolyticus IAM 1077の培地および培養条件

B. aneurinolyticusを1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.1% glucose, 0.5% NaCl, 0.02% Adecanol (pH7.2)を含む培地で、種培養として70mlの培地を含む500ml容坂口フラスコで24時間30°Cで振湯培養する。さらにこの培養液を、7L培地を含む10Lジャーフラスコに植菌し、30°Cで通気攪拌条件を1vvm, 250rpmとして培養した。培養菌体を遠心分離であつめ、-20°Cで保存した。菌体収量は1 liter当たり約12グラムであった。

Micrococcus roseus S.の培地および培養条件

M. roseus Sを1% meat extract, 1% polypeptone, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl (pH 6.8)で30°Cで好気的に対数増殖後期まで培養した後培養液を遠心分離して菌体を得た。菌体収量は培養液1 liter当たり約2gであった。

Viral DNAs, plasmid DNAs と酵素

ファージT4dC λ-DNAs, plasmids, pA02, pA043, pBR322, は報文^{28, 29)}に従つて調製した。ファージφX174 RF-I DNA, SV40 DNA, Col E1 DNA, Nonmethylated λ-DNA, Adenovirus-2 DNAは Bethesda Research Laboratories Ltd., または Takara Shuzo Co. から購入した。制限マップやシーケンスのため、他の酵素は東洋紡, New England Biolabs, Inc., Takara Shuzo Co., Ltd. から購入した。

制限酵素検索のための酵素の精製

酵素の精製は前に報告されている方法^{28, 29)}と同一である。凍結菌体1gを10mlの0.01M Tris-HCl(pH7.5)-2mM 2-mercaptoethanolに懸濁し、トミー超音波破碎機で破碎しSpinco 50Ti rotarで30,000rpm, 60min遠心分離した。上澄みに最終濃度0.1MとなるようにNaClを加えた後、中和した10%のポリエチレンイミンを、最終1%濃度になるように加えた。沈澱を遠心分離で除去し上澄みに固体の硫安を70%飽和度になるまで加えた。生成した沈澱を遠心分離で集め、0.01M磷酸カリ(pH7.5)-2mM 2-mercaptoethanol-5%glycerol(緩衝液B)に溶解し、同じ緩衝液に透析した。透析液をホスホセルロースカラム(Whatman P-11, 0.5 cm X 1 cm)に吸着させ、

5mlの緩衝液Bでカラムを洗った後、吸着したタンパク質成分は、1M KClを含む同緩衝液で溶出する。素通り画分と1M KClで溶出される画分についてⅡ型制限酵素の活性を測定した。

制限酵素検索のための酵素活性測定とスクリーニング方法

0.01 M Tris-HCl(pH 7.5)-7 mM MgCl₂と1μgの ウィルスDNA(φX174 RF-1 DNA, SV40, λ-DNA, T4dCDNA)とプラスミドDNA(pBR322, pUC18, M13mp18, pA02, pA043 DNA)を含む30μl反応液に1-5 μlの 画分を加える。30min ~2hr, 37°Cでインキュベートした後、反応は0.05 M EDTA-Ficoll-0.02% Bromophenol 5μlを加え停止させる。溶液は、90 mM Tris-borate 緩衝液(pH 8.3)-2.5 mM EDTA-0.5 μg/mlエチジウム ブロマイドで溶解した1%アガロース電気泳動で10 V/cmの速さで2-4hr泳動した。電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色されたDNA分解物をUVトランスイルミネーター(FUNA-UV-LIGHT MODEL SL-800F)で観察した。Kodak ポラロイド インスタント パック フィルム665でパターンを写真撮影した。そのパターンで酵素活性の有無を調べた。活性の認められる酵素画分は各DNAの切断パターンを既知酵素による切断パターンと比較し、新特異性をもつ酵素か、isoschizomerである可能性かを判断した。

精製のための酵素活性測定

酵素活性測定のため酵素溶液5μlを 10mM Tris-HCl(pH7.5)-7 mM MgCl₂-7 mM 2-mercaptoethanolと、BanIに対しては1 μg pBR322, AatI, AatII, BanII, BanIII 制限酵素には1μg λ-DNAを含む反応液(液量50μl)に加え反応させた。MroIに関しては10 mM Tris-HCl pH 7.5-10 mM MgCl₂-100 mM NaCl-6 mM 2-mercaptoethanolで反応させた。反応は37°C, 1時間行った。反応後、10 mM Tris-HCl(pH7.5)-0.05% Bromphenol Blue-80 mM EDTA-15% Ficoll溶液5μlを加え反応を停止する。反応分解液は1.0%アガロースゲル、あるいは5%アクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色されたDNA分解物をUVトランスイルミネーターで観察した。DNA 1μgを37°Cで60分間に完全に分解するのに必要な酵素量を1単位と定義した。

Non-specific endonucleaseの活性測定

精製の各ステップで画分を1 μg の λ -DNAと37°C, 16hrインキュベートして過剰量の酵素量で反応を行い反応物を電気泳動してnon-specific endonucleaseの夾雜をしらべた。即ち分解DNAのアガロース電気泳動パターンを観察し本来の制限酵素パターンを示す画分をあつめ、精製を更にすすめた。

5'-Exonuclease と phosphatase活性の測定

酵素標品の5'-exonuclease と phosphatase活性の測定に試料を10mM Tris-HCl (pH7.5), 7 mM MgCl₂, 7 mM 2-mercaptoethanol と λ -DNAの5'末端³²Pラベル HindIII 消化物 1 μg (100,000cpm/ μg) を含む反応混合液に 37 °Cで4hrインキュベートした。反応液に冷10%トリクロル酢酸-1%Na₂PO₇を加え沈澱させる。遠心分離(10,000 rpm, 5min)後、上澄みのラジオアクティビティをシンチレーションカウンター(Aloka LSC700)で測定する。

Non-specific Exonucleaseの測定

酵素標品中のnon-specific exonuclease活性を検出するためE. coli³H-DNAから遊離する酸可溶性のラジオアクティビティを測定した。種々の酵素量を(thymidine-methyl-³H)DNA(1 μg 10,000cpm)含む制限酵素測定緩衝液に加え、BanIには50°C、他の制限酵素には37°Cで4hrインキュベートした。前述した方法で酸可溶性のラジオアクティビティを測定した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

蛋白分析用ポリアクリルアミドゲル電気泳動はDavis⁴¹⁾の記載した方法で行った。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はWeberとOsbornの方法⁴²⁾で行った。ゲルはクマジーブリューで染色した。SDS PAGEの分子量マーカーはBDH Chemicals Ltd. から購入した。

λ -DNAのメチレーション

dcm- λ -DNA 3 μg を HapII メチラーゼ、あるいはMspI メチラーゼ1-2 単位を10 μl のメチラーゼ活性測定用緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 5

1mM 2-mercaptoethanol, $80 \mu\text{M}$ SAM)と 37°C 5-6hr反応させ, メチル化されたDNAを制限酵素2-3単位と1hrインキュベートした。生成したDNA断片をアガロース電気泳動で分析した。

塩基配列の決定

塩基配列の分析はMaxam and Gilbertの方法¹⁷⁾で行った。電気泳動とホモクロマトグラフィを使用するフィンガープリント法¹⁸⁾で制限酵素混合分解物の5'-末端配列の決定に使用した。5'-末端スクレオチドの分析は清水、高橋ら³²⁾の方法にしたがった。

第3節

実験結果

1. II型制限酵素のスクリーニング

II型制限酵素の存在の報告のない細菌種やアミノ酸、核酸生産菌について前節実験方法で述べた方法でスクリーニングを行った。λ-DNA および T4dCの2種のDNAを基質として対数増殖期の終り頃まで培養して得た凍結菌体を破碎してその抽出上澄みの制限酵素活性を分析した結果、10種の細菌にその酵素活性を見いだすことが出来た。各種のウイルスDNA(φX174 RF-1, SV40, Ad2, λ-DNAおよびT4dC)およびプラスミド(pBR322, pA02, pA043 DNA)基質として分解し切断パターンを既知酵素のそれと比較した。その結果、Acetobacter aceti IFO 3281, Bacillus aneurinolyticus IAM1077, Micrococcus roseus S, Escherichia coli 2bT ICR0020, Gluconobacter gluconicus IFO 0020, Micrococcus auranticus IFO 12422, Pseudomonas alkaligenes ATCC 12815, Pseudomonas alkanoxytica IFO 12319, Pseudomonas putida C-83, Streptomyces phaeochromogenes IFO 3108に制限酵素活性が認められ、そのうち Acetobacter aceti IFO 3281, Bacillus aneurinolyticus IAM 1077, Micrococcus roseus Sに新しい特異性をもつ制限酵素がある可能性を示唆されたので本格的に特異性、酵素的性質を検討するため精製した。

2. Acetobacter aceti IFO 3281より酵素の精製

2-1 AatIの精製

凍結菌体500グラムを10 mM Tris-HCl(pH7.5)-10 mM MgCl₂-7mM 2-mercaptoethanol 1.4 literに懸濁する。懸濁液を超音波破壊器(Sonifier M450)で破碎した後、14,000rpm、20分遠心分離する。上澄みを分離し、固体硫酸安を加え40%-50%飽和の画分を集める。沈澱を10mM リン酸カリ(pH7.5)-2mM 2-mercaptoethanol-5% glycerol溶液(緩衝液B)に溶解し、同液 5 litersで透析する。透析した画分をホスホセルロース(Whatman P11, 11.5 cm x 19.3cm)に吸着させ、4000ml の緩衝液Bで洗う。吸着したタンパク質成分は、NaClの直線濃度勾配(緩衝液B → B+0.8M NaCl, 4 litersずつ)で溶出する。20mlずつ分取し、その1μlをλ-DNA

を含む反応液に加え37°Cで15分インキュベートした後、アガロース電気泳動を行う。ホスホセルロースカラムで塩濃度0.35-0.39Mで溶出する酵素をAatI（画分Ⅰ）と、0.52-0.56Mで溶出する酵素をAatII（画分Ⅱ）と命名した。

次にAatI活性画分Ⅰ(1200ml)をあつめPEG6000で濃縮した後、10 mM Tris-HCl(pH 7.5)-2 mM 2-mercaptoethanol-5% Glycerol(緩衝液C)に透析し、予め緩衝化したDEAE-セファロースカラム(4.5 x 13 cm)吸着させた。カラムを2カラムベッド体積の緩衝液Cで洗浄後、KC1の直線濃度勾配(緩衝液C→緩衝液C+1M KC1 500mlずつ)で溶出した。AatIは0.15 M-0.22M NaClで溶出しこれをプールした(80ml)。プール液を緩衝液Cで透析した後、これをヘパリンセファロースカラム(4.5X13cm)に吸着させKC1の直線濃度勾配(緩衝液C→緩衝液C+1M KCL100mlずつ)で溶出した。AatI活性画分は0.56 M KC1-0.64 M KC1の間で溶出した。これをあつめPEG6000で濃縮後、50% glycerolを含む10mM Tris-HCl(pH7.5), 100 mM KC1, 10mM 2-mercaptoethanolで透析した。酵素溶液は-20°Cで保管した。

2-2 AatIIの精製

AatII活性画分Ⅱ(1020ml)をプールしPEG6000で濃縮した後、緩衝液Cで透析した。同緩衝液で緩衝化しておいたDEAEセファロースカラム(4.5 x 13 cm)に酵素液を吸着させ緩衝液Cで洗浄後、KC1直線濃度勾配(緩衝液C→緩衝液C+0.5 M KC1 500mlずつ)で溶出した。AatII活性画分は0.3M KC1-0.38 M KC1で溶出された(140ml)。Affigel-10にAatI抗体を結合したAatI抗体カラム(1.0 cm x 12 cm)を緩衝液Bで緩衝化後同緩衝液で透析しておいたAatII酵素液をチャージし夾雑しているAatIを抗体カラムに吸着させ通過液を集めた(液量55ml)。さらに予め10 mM リン酸カリ(pH7.5)-2mM mercaptoethanol-5% glycerol(緩衝液B)で緩衝化しておいたヒドロキシアバタイトカラム(2.7 X 6.5 cm)に吸着させリン酸カリ直線濃度勾配(緩衝液B→緩衝液B+0.3 M KPO₄)で溶出した。活性画分は0.1M-0.18M リン酸カリで溶出した。これをあつめ(50ml)50% glycerolを含む10 mM Tris-HCl(pH7.5)100 mM KC1, 10 mM mercaptoethanolで透析後、-20 °Cで保管した。

AatI, AatIIの精製の要約をTable 1, 2 に示す。

AatI, Aat II の精製の要約を Table 1, 2 に示す。

Table 1. Summary of Purification of AatI

Step	Volume (ml)	Total activity (units)	E_{280nm}	Specificity T.A/ E_{280nm}
I. Lysate	1400	—	136,780	—
II. Ammonium sulfate precipitation	520	—	62,504	—
III. Phosphocellulose column chromato.	1200	2400X10 ³	487	4,928
IV. DEAE-Sephadex column chromato.	79	237X10 ³	46	5,252
V. Heparin Sepharose column chromato.	20	40X10 ³	2	20,000

Table 2. Summary of Purification of AatII

Step	Volume (ml)	Total activity (units)	E_{280nm}	Specificity T.A/ E_{280nm}
I. Lysate	1,400	136,780		
II. Ammonium sulfate precipitation	520	62,504		
III. Phospho-cellulose column chromato.	1,020	525X10 ³	597	879
IV. DEAE-Sephadex column chromato.	140	120X10 ³	44	2,727
V. Anti-AatI Affinity column chromato.	55	110X10 ³	42	2,619
VI. Hydroxyapatite column chromato.	50	60X10 ³	8	7,500

3. 酵素の特異性と性質

3-1 AatIの特異性と性質

1). λ -DNAの分解性

精製酵素標品を 1 μ g の λ -DNAを含む反応液に種々の酵素量を加え 24hr, 37°C インキュベートした後、その分解物を 1% アガロース電気泳動を行い パターンを観察した。Fig. 1 に示すように、 λ -DNAを 37 °Cで 60min で 6箇所切断した。電気泳動パターンは一定で変化は見られず夾雜酵素は除去されていた。またラジオアイソトープラベルした基質 (5'- 32 P 標識 HindIII 消化 λ -DNA, 3 H-DNA) に本酵素を作用させても酸可溶性の放射活性は認められなかった。

2). Phage, virus, plasmid DNAに対する特異性

種々の Phage, virus, plasmid DNA (1 μ g) を精製酵素 (4単位) で 2hr, 37°C で 分解し電気泳動したパターンをしらべた (Fig. 2)。 ϕ x 174 RFI DNA は 1箇所、 また Ad2, SV 40 DNA は 2箇所以上で切断された (Table 3)。

しかし pBR322, M13mp18 RF DNA pUC19 DNA は切断されなかった。

Table 3 AatIによる各種DNAの切断断片数

DNA	pBR322	pUC19	M13mp18	ϕ x174	SV40	Ad2
切断箇所数	0	0	0	1	7	12

3). AatIの認識塩基配列

AatIの認識塩基配列をファージDNA、本酵素が 1 箇所切断する ϕ xDNA174 を用いて分析した。一本鎖にしたDNAをバクテリアアルカリフィオスファターゼで脱燐後、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用い (γ - 32 P)ATP で 5'-末端をラベルした。ラベルしたDNAを HinfI で消化した後、生じたサブフラグメントを 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。分離したフラグメントの 5'-末端の塩基配列を Maxam-Gilbert 法で決定したオートラディオグラムを Fig. 3 に示す。また、フラグメントの 5'-末端のヌクレオチドを決定したオートラディオグラムを Fig. 4 に示す。また、分離したフラグメントの 5'-末端を決定した塩基配列と ϕ x174 RFI DNA の塩基配列と



Fig. 1. Effect of AatI Concentration on λ -DNA Digestions.

One microgram of λ -DNA was incubated for 16 h at 37 °C in 10 mM Tris-HCl (pH, 7.5)-7 mM MgCl₂-50 mM NaCl-2 mM 2-mercaptoethanol in total volume of 50 μ l with AatI. (a) 6 U; (b) 12 U; (c) 18 U; (d) 24 U; (e) 30 U.

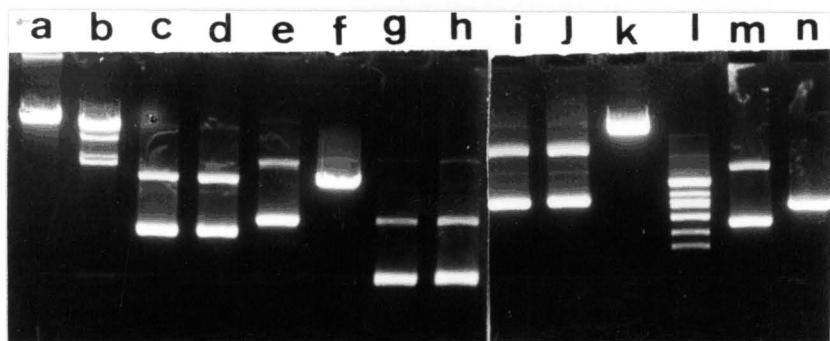


Fig. 2 Cleavage Patterns of λ , PBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2 and SV40 DNAs after Digestions with AatI.

4 units of AatI was incubated with 1 μ g each DNA in 50 μ l of reaction buffer for 2 hr at 37 °C. The digests were electrophoresed on 1% agarose gels at 150 V for 2 hr. a and b, λ -DNA; c and d; pBR322; e and f, ϕ X174; g and h, pUC18; i and j, M13mp18; k and l, Ad2; m and n, SV40. b, d, f, h, j, l and n are digested with AatI. a, c, e, g, i, k and m are undigested DNAs.

Fig. 3

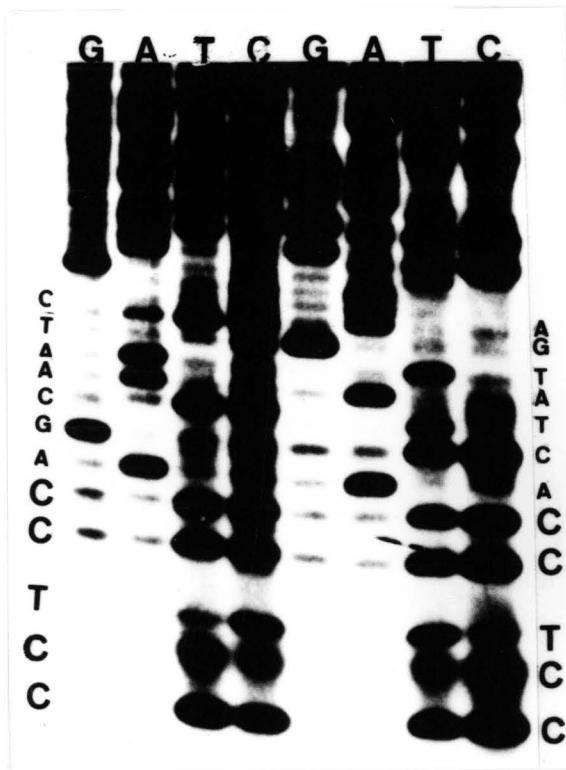


Fig. 4

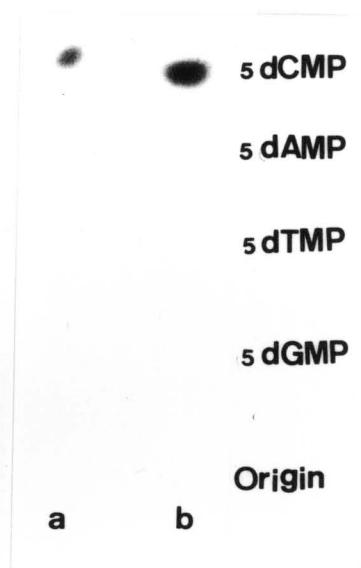


Fig. 3 Autoradiogram of $5'-^{32}P$ -labeled subfragments of ϕ x174RF1 DNA produced by double digestion with AatI and HinfI.

The fragment was sequenced on a gel from $5'$ -AatI cleavage site. When the $5'$ -end is pyrimidine(T or C), the first and second bands are reversed. In this case, the sequencing gel can be read as 5'CCTCCA....

Fig. 4 Identification of $5'$ -terminal mononucleotides obtained from the labeled smaller fragments(a) and the labeled longer fragments(b) of ϕ x174 RF1 DNA.

$5'$ -labeled AatI fragments of ϕ x174RF1 DNA were completely digested with P1 nuclease and the resulting mononucleotide $5'$ -phosphates analyzed by chromatography on a PEI-cellulose thin-layer plates with 0.5 M Li-formate(pH3.0), respectively. The $5'$ -mononucleotide was detected by autoradiography and deduced from mobility relative to authentic markers.

の照合をFig. 5 に示す.

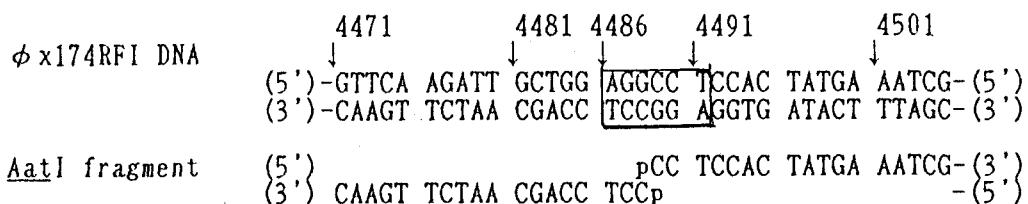
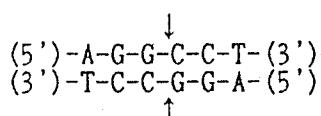


Fig. 5 Alignment of 5'-terminal sequences generated by AatI on the ϕ x174RFI DNA sequence³¹). The number above the sequences indicate the nucleotide position from the PstI site of ϕ x174RFI DNA. The possible site was boxed.

Fig. 4 に示すように、両フラグメントの泳動パターンはCCTCCAGCAAT および CCTCCACTATGを示した。得られた塩基配列を ϕ x174 RF-1と比較した(Fig. 5)。上記の 32 P-ラベル AatI-分解 ϕ xDNA 174 RF1 DNA の末端塩基分析を行い、末端モノヌクレオチドはpdCであることが分かった。切断点の塩基配列を解析した結果と pBR322, SV40らの種々 DNA の切断パターンより本酵素は Streptomyces tubercidicus より分離された Stu I 32 の isoschizomer であると判別した。AatIは下記に示す塩基配列を識別し矢印の部位で切断すると決論した。



4). 酵素活性に及ぼす温度と pH の影響

15-60 °C の温度で 1 hr 作用させ最適温度をしらべた。反応液 50 μl (10 mM Tris-HCl, pH 7.5/7 mM MgCl₂/7 mM 2-mercaptoethanol) に入-DNA 1 μg を加え、インキュベートした後、電気泳動し入-DNA の分解の程度をみた。その結果、本酵素は 35-40 °C の間でよく作用し最適温度を 37.0 °C と決定した (Fig. 6)。精製酵素を種々の pH (6.5-9.0) の反応液に入-DNA 1 μg を加え 37 °C, 1 hr インキュベートした後、電気泳動し入-DNA の分解の程度をみた。この酵素は pH 7.5-9.0 でよくはたらき、最適 pH は 7.5 であることが分かった (Fig. 7)。

Fig. 6.

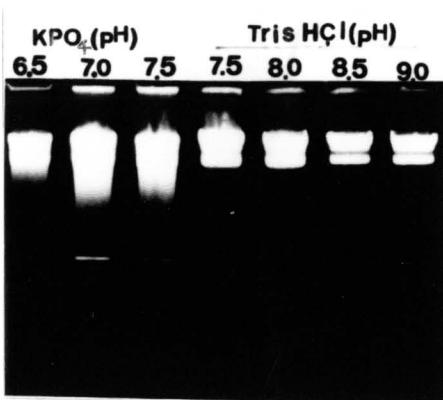


Fig. 7.

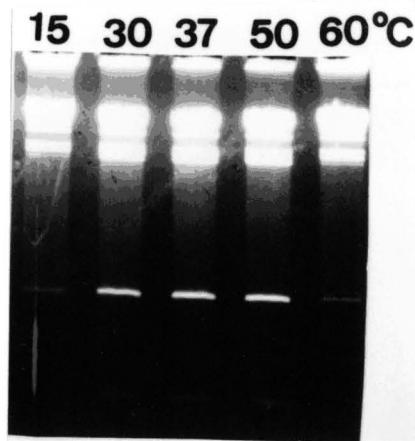


Fig. 8.

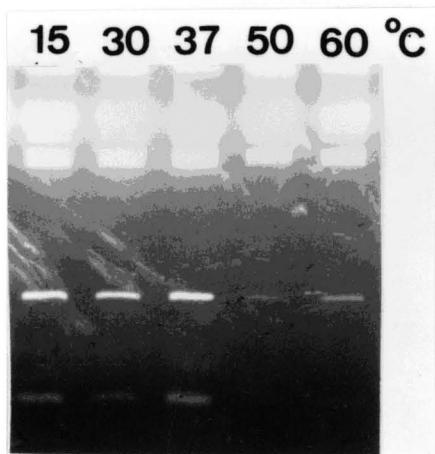


Fig. 9.

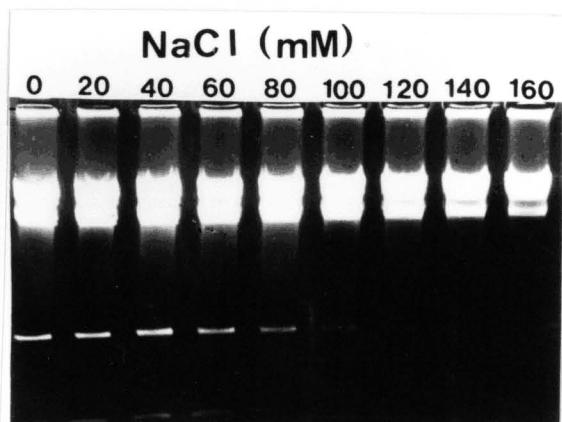


Fig. 6 and Fig. 7. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of AatI

The activity of purified AatI was measured at different pH levels ranging pH 6.5 to 9.0 (Fig. 6) and measured at different temperatures from 15 to 60 °C.

Fig. 8. Thermal Stability of AatI

The thermal stability of the purified enzyme was examined by heating 15 to 60 °C for 30 min at pH 7.5. After incubation, the residual activity was measured by adding 1 µg of λ-DNA to the reaction mixture.

Fig. 9. Effect of NaCl Concentration on Enzyme Activity of AatI.

The effect of NaCl concentration on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5-7 mM MgCl₂-2 mM mercaptoethanol. AatI activity was measured at various concentrations of NaCl ranging 0 to 160 mM for 1 h at 50 °C.

5). 酵素の温度安定性

精製酵素を pH7.5 で 15°C-60°C で、30 min インキュベートした後、残存活性を調べた。その結果活性は 40°Cまで残存していたが、50 °C以上の処理では、活性は認められなかった (Fig. 8)。

6). 酵素活性におよぼす塩濃度の影響

NaCl および KCl 濃度が活性に及ぼす影響を調べた。10 mM Tris-HCl (pH7.5)-7 mM-MgCl₂ の存在下で 0-160 mM の間で濃度をかえ入-DNA の AatI による分解性をしらべた (Fig. 9)。その結果 NaCl, KCl いずれも 0-60 mM の間でよく作用し、最適濃度を 40 mM と決定した。100 mM 濃度以上では阻害が著しい（相対活性として 20% 以下）ことが判明した。

7) 酵素活性に及ぼす2価カチオンの影響

10 mM Tris-HCl (pH7.5) の存在下で、種々の2価カチオン（濃度 7 mM）の存在下で酵素活性に及ぼす影響をしらべた。活性は MgCl₂ が存在する時もっとも強く発現し、MnCl₂ ではきわめて弱い発現がみられた。他のカチオン CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, ZnCl₂ では全く活性は見られなかった（データ略）。

8) AatI の認識配列のメチル化の AatI 活性に及ぼす影響

この酵素は 1) に記載したように、 ϕ x174 DNA RFI 1箇所のみ切断する。認識サイトのメチル化の活性に及ぼす影響をみるため、 ϕ x174 DNA の Hae III の認識部位の内側の C を Hae III メチラーゼでメチル化した。このようにメチル化した ϕ x174 DNA を AatI で処理しその分解性を検討した。その結果このようにメチル化された DNA は AatI で切断されないことが分かった。（データ略）

3-2 AatII の特異性と性質

1). 入-DNA の分解性

精製した酵素標品の種々の量を 10 mM Tris-HCl (pH7.5)-7 mM MgCl₂ 測定用緩衝液に 1 μg の入-DNA を加えた反応液 (50 μl) に 37°C で 16 hr インキュベートした後、1% アガロース電気泳動した (Fig. 10)。その結果電気泳動パターンより入-DNA を 7 節

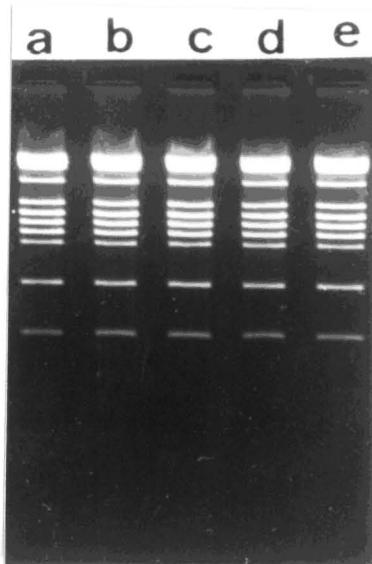


Fig. 10. Effect of AatII Concentration on λ -DNA Digestions.

One microgram of λ -DNA was incubated for 16 h at 37 °C in 10 mM Tris-HCl (pH, 7.5)-7 mM MgCl₂-50 mM NaCl-2 mM 2-mercaptoethanol in total volume of 50 μ l with AatII. (a) 6 U; (b) 12 U; (c) 18 U; (d) 24 U; (e) 30 U.

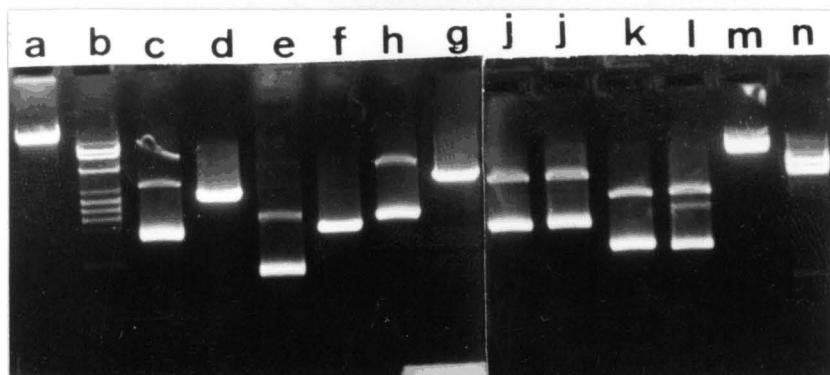


Fig. 11. Cleavage Patterns of λ , PBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2 and SV40 DNAs after Digestions with AatII.

4 units of AatII were incubated with 1 μ g each DNA in 50 μ l of the reaction buffer for 2 hr at 37 °C. The digests were electrophoresed on 1% agarose gels at 150 V for 2 hr. a and b, λ -DNA; c and d; pBR322; e and f, ϕ X174; g and h, pUC18; i and j, M13mp18; k and l, SV40; m and n, Ad2. b, d, f, h, j, l and n are digested with AatII. a, c, e, g, i, k and m are undigested DNAs.

所以上分解することが判った。また酵素量の如何にかかわらず一定の電気泳動パターンを示しAatIおよび非特異性のヌクレアーゼが除去されていることが判った

2). Phage, virus, plasmid DNAに対する特異性

種々のphage, virus, plasmids DNA(1 μ g)を精製酵素(2単位)で2hr, 37°Cで分解し電気泳動しパターンをしらべた(Fig. 10)。Ad2 DNAは2箇所以上で切断された(Table 5)。pBR322 DNA, pUC19 DNA, ϕ x174 RFI DNAは1箇所のみ切断された。しかしM13mp18, SV40 DNAは切断されなかった。

Table 4 AatIIによる各種DNAの切断断片数

DNA	pBR322	pUC19	M13mp18	ϕ x 174	SV40	Ad2
切断箇所数	1	1	0	1	0	3

3). 精製酵素の認識塩基配列

AatIIはpBR322を1箇所切断する。AatIIの認識配列を決めるためAatIIで直鎖にしたpBR322の切断点の塩基配列を分析した。直鎖にしたDNAをAatIの場合と同様にバクテリアアルカリ fosfatasで脱りん後、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用い(γ - 32 P)ATPで5'-末端をラベルした。ラベルしたDNAをHaeIIIで消化した後、生じたサブフラグメントを5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。分離したフラグメントの5'一末端の塩基配列をMaxam-Gilbert法で決定した。Fig. 12に示すように、両フラグメントはGACGTCTAAGAA., GACGTCAGGTGGCA..の塩基配列を持っていることが明かとなった。本酵素が二回回転対称性を持つ6塩基対を識別する酵素と仮定すると、その識別する塩基配列としてG-A-C-G-T-Cが推定できる。また本酵素は2)に示した様にGACGTCの塩基配列を1箇所だけをもつ ϕ x174 RF-I DNAを全長鎖をもつ直鎖DNAに分解することが判った。また他の酵素とのdouble digestionのDNAの切断パターンからAatIIはGACGTCの位置で ϕ x174 RF-I DNAを切断することが確認された。塩基配列決定に使用した 32 P-5'一末端ラベルDNAの末端モノヌクレオチドを分析した結果Fig. 13に示すようにpCであることが判った。

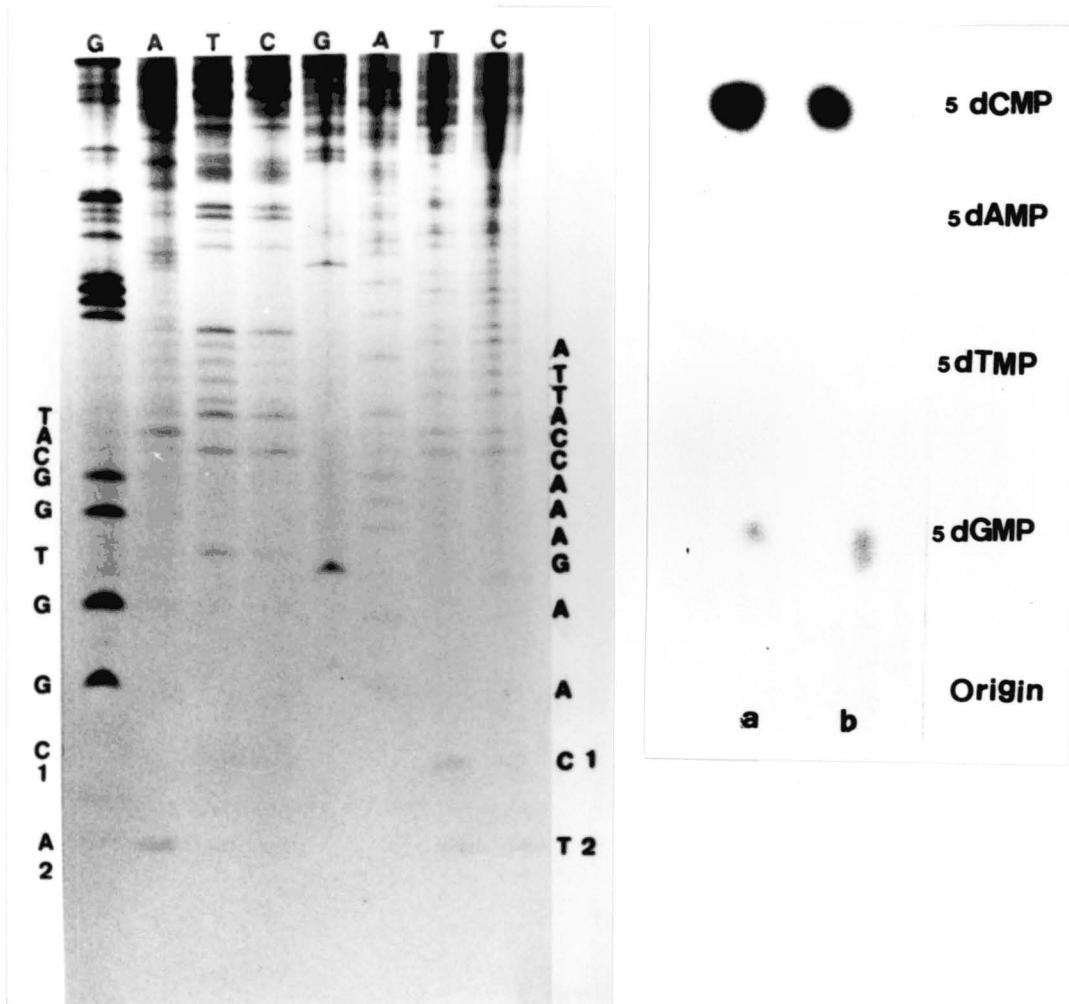


Fig. 12. Autoradiogram of $5'-^{32}\text{P}$ -labeled subfragments of pBR322 DNA produced by double digestion with AatII and HaeIII.

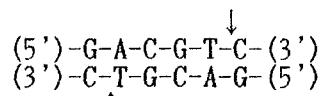
The fragment was sequenced on a gel from $5'-\text{Aat}$ II cleavage site. When the $5'$ -end is pyrimidine (T or C), the first and second bands are reversed. In this case, the sequencing gel can be read as 5'CAGGTGGCAT.. (left side) and CTAAGAACCA... (right side).

Fig. 13. Identification of $5'$ -terminal mononucleotides obtained from the labeled smaller fragments (a) and the labeled longer fragments (b) of plasmid pBR322 DNA. The method was described in Fig. 4.

pBR322 4280 4300
 ↓ ↓
 (5') TCCCCGAAAGTGC CACCTGACGTCAAGAAACC ATTATTATCA (3')
 (3') AGGGGCTTTCACG GTGGACTGCAGATTCTTGG TAATAATAGT (5')
Aat II fragment pCTAAGAAACC ATTATTATCA (3')
 (3') AGGGGCTTTCACG GTGGACp

Fig. 13 Alignment of the 5'-terminal sequence generated by Aat II on the pBR322 sequence. The number above the sequence indicates the nucleotide position from the EcoRI site of pBR322^{33, 34)}. The possible recognition sequence was boxed.

Aat IIは次の6塩基配列を認識し矢印で示した位置を切断する新しい特異性を持つ酵素であると結論した³⁵⁾.



最もよくクローニングベクターとして利用されるpBR322は、本酵素による切断部位を b1a遺伝子の上流 (pBR322のEcoRIによる切断箇所より4,285-4,290塩基対離れた位置^{33, 34)}に1箇所持っている。従って、本酵素はpBR322によるクローニングに有用である。しかも(5')-N-A-C-G-T-N-(3')を認識するII型制限酵素は少なく現在、Mae II (ACGT), Pmac I (CACGTG), SnaB I (TACGTA), Eco105 I (TACGTA)に過ぎないので貴重であると思われる。

4). 酵素活性におよぼすpHと温度の影響

精製酵素を種々のpH(6.5-9.0)の反応液に入-DNA 1μgを加え37°C, 1hrインキュベートした後電気泳動を行い入-DNAの分解の程度をみた。この酵素はpH7.5-9.0でよくはたらき、最適pHはpH7.5であることが分かった(Fig. 15)。また30-50°Cの温度で1 hr作用させ最適温度をしらべた。その結果、本酵素は35-40°Cの間でよく作用し最適温度を37°Cと決定した(Fig. 16)。

5). 酵素のpH安定性と 温度安定性

精製酵素を種々のpH(6.5-9.0)で1hr放置し残存活性を調べた結果、最高活性はpH 7.5でみられた。同様に15-60°CでpH7.5, 30 minプレインキュベートした後、残存活性を調べた。その結果活性は 40°Cまで残存していたが、50°C以上の処理では、活性は認められなかった(データ略)。

6). 酵素活性におよぼす塩濃度の影響

NaClおよびKCl濃度が活性に及ぼす影響を調べた。10mM Tris-HCl(pH7.5)-7 mM-MgCl₂の存在下で0-100mMの間で濃度をかえ入-DNAのAat IIによる分解性をしらべた。その結果NaCl, KClいずれも40-60mMの間でよく作用するがKClがNaClより、Aat IIの反応に適しており、最適KCl濃度は60mMであるとことを認めた。また100mM濃度以上では阻害が著しい(相対活性として20%以下)ことが判明した。Fig. 17はNaCl濃度に及ぼす影響の電気泳動パターンを示す。

7). 酵素活性に及ぼす2価カチオンの影響

Aat IIの酵素活性に及ぼす2価カチオンの影響を10mM Tris-HCl(pH7.5)の存在下で、種々の2価カチオン(濃度10mM)を反応液に加えてしらべた(Fig. 18)。活性はMgCl₂が存在すると活性を示すが、本酵素はMnCl₂が存在する時、きわめて強い活性(MgCl₂より約10倍)がみられ他の多くの酵素と異なる性質を持っていることが知られている。また、他のカチオンCaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, ZnCl₂では全く活性は見られなかった。

Fig. 15.

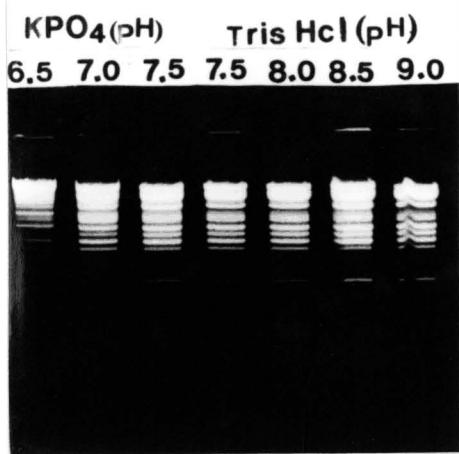


Fig. 16.

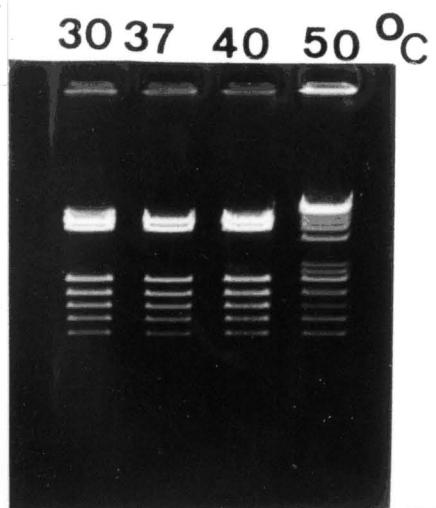


Fig. 15 and Fig. 16. Effect of pH and temperature on Aat II Activity.

The enzyme activity of Aat II was measured at different pH levels ranging pH 6.5 to 9.0 and at different temperatures from 30 to 50 °C.

Fig. 17

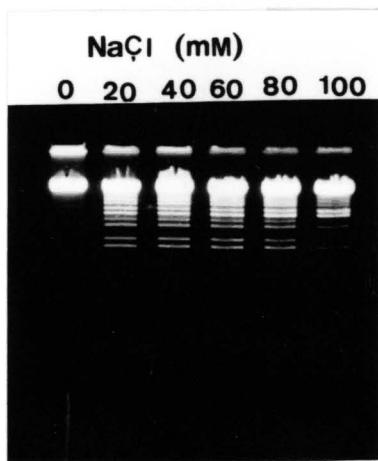


Fig. 18

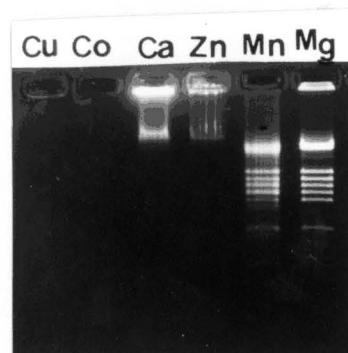


Fig. 17. Effect of NaCl Concentration on Aat II Activity.

The effect of NaCl concentration on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 2 mM mercaptoethanol.

Fig. 18. Effect of Divalent Cations on Aat II Activity

The effect of divalent cations on Aat II activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM divalent cations as indicated.

4. Bacillus aneurinolyticus IAM 1077よりⅡ型制限酵素の精製

4-1 BanIの精製

B. aneurinolyticus IAM 1077 菌体100グラムを緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH7.5, 10 mM MgCl₂, 7 mM 2-mercaptoethanol)300mlに懸濁しSonifier M450で3Wで10min超音波破碎した。破碎液を10,000rpm, 20min遠心分離し上澄みを分離した。分離した上澄みに固体食塩を攪拌しながら最終濃度0.15Mになるように加えた後、中和した10% (W/V) ポリエチレンイミン溶液を最終濃度0.2%になるように添加し30min穏やかに攪拌した。この後8,000rpmで20 min遠心した後、沈澱を捨て上澄みに固体硫酸安を攪拌しながら0.7飽和になるまで加えた。この懸濁液を20分間8,000rpmで遠心分離した後上澄みをすて、沈澱を緩衝液C(10 mM Tris-HCl, pH7.5-2 mM mercaptoethanol-5% glycerol)30mlで溶解し、同じ緩衝液で一昼夜透析した。透析した画分を予め緩衝液B (10 mM K-phosphate buffer, pH7.5-2 mM 2-mercaptoethanol-5% glycerol)で緩衝化したホスホセルロース(Whatman p-11)カラム(4 cm x 40 cm)に吸着させ、緩衝液B 1 literで洗浄した。吸着した蛋白をKC1の直線濃度勾配(緩衝液B→緩衝液B+1M KC1, 1 literずつ)で溶出し20 mlずつ集め、2μlをとり活性を測定した。λ-DNAを含む測定用反応液に加え、37°C, 15min インキュベートした後、1%ゲル電気泳動を行った。それぞれ異なったⅡ型制限酵素が 0.05-0.15M KC1濃度(画分1), 0.42-0.46M KC1, (画分2), および0.53M-0.57M KC1(画分3)で溶出された。溶出される順番から 画分1の制限酵素をBanI、画分2の制限酵素をBanII、画分3の制限酵素をBanIIIと名づけた。次に 画分1(800ml)を緩衝液B 10 litersで1昼夜透析した後DEAE-セファロースカラム(3.6 cm x 55 cm)に吸着させた。カラムを1カラムベッド体積の緩衝液Bで洗浄した後、直線濃度勾配(緩衝液C→緩衝液C+0.5 M KC1, 1 literずつ)で溶出する。BanI活性は0-0.05 M KC1で溶出された(画分4)。

次に緩衝液Bで平衡化したヒドロキシアバタイトカラム(生化学工業製、8 cm x 22 cm)に画分4(500ml)を吸着させ、1カラムベッド体積の緩衝液で洗浄後 リン酸カリ直線濃度勾配(緩衝液B→緩衝液B + 0.25Mリン酸カリ 200 mlずつ)で溶出した。BanI活性は 0.15 M- 0.2 Mで溶出した。(画分5)。

次に画分5(100ml)を 緩衝液B 1 literに一昼夜透析した後、ヘパリンセファーロースカラム (1.2 cm x 18 cm)に吸着させた。緩衝液D(10 mM リン酸カリ, pH7.5, 2 mM mercaptoethanol-5% glycerol-100 mM KC1)で1ベッドカラム体積で洗浄後、KC1直線濃度勾配で(緩衝液D→緩衝液D+0.5M KC1 40mlずつ)で溶出した。BanI活性は0.2-0.3M KC1の間で溶出した。活性画分をプールし 50% glycerol-10 mM Tris-HCl-pH7.5-10 mM 2-mercaptoproethanol-100 mM KC1)に透析して濃縮し、-20°Cで保存した。

4-2 BanIIの精製

BanI制限酵素の精製過程で得た画分2を緩衝液B(10 mM リン酸カリ, 2 mM 2-mercaptoproethanol, 5% glycerol)で一昼夜透析し予め緩衝液Bで平衡化したDEAE-セファロースカラム (4.5 cm x 16 cm)に吸着させた。吸着後緩衝液B 1 literで洗浄後、直線濃度勾配(緩衝液B→緩衝液B+0.5 M KC1, 500 mlずつ)で溶出した。BanIIは0.20-0.25 M KC1濃度で溶出した。これをプールした後、緩衝液Bで透析し再度ホスホセルロースカラム(4.5 cm x 13 cm)に吸着させた。緩衝液C 500mlでカラムを洗浄後、KC1直線濃度勾配(緩衝液B+0.20 M KC1→緩衝液B+0.8 M KC1, 500 mlずつ)で溶出した。BanII制限酵素は0.4M-0.5M KC1の間で溶出されたのでこれを集めた。次に緩衝液Dで平衡化したヒドロキシアバタイトカラム (2.7 cm X 9 cm)に吸着させ同緩衝液D 200 mlで洗浄後、直線濃度勾配(緩衝液D→緩衝液D+0.3 M リン酸カリ, 200 mlずつ)で溶出した。BanII制限酵素は 0.16 -0.22 M リン酸カリで溶出されたので、この画分をプールし10 mM Tris-HCl, pH7.5/10 mM 2-mercaptoproethanolを含む 50% glycerolで透析した。透析液を-20°Cで保存した。

4-3 BanIIIの精製

BanI制限酵素の精製過程で得た画分3をヒドロキシアバタイトカラム (2.7 cm x 9 cm)に吸着させ洗浄後、KC1直線濃度勾配 (緩衝液B→緩衝液B+0.3M リン酸カリ, 125mlずつ) の濃度勾配で溶出した。BanIII制限酵素活性は 0.1から0.15M (画分6)の間で溶出した。さらに画分(6)を 緩衝液B 500mlで 1昼夜透析した後、透析画分をDEAE-セファロース(2.2 cm x 13 cm)に吸着させた。カラムを 緩衝

液Bで2ベッドカラム体積の液量で洗浄しKC1直線濃度勾配（緩衝液B→緩衝液B+0.4 M KC1 250mlずつ）で溶出した。BanIII活性は0.1-0.13M KC1でみられた（画分7）。次にこの画分を上記と同様に透析し ヘパリンセファーロース(1.1 cm x 10 cm)に吸着させた洗浄後、KC1直線濃度勾配（緩衝液B→緩衝液B+1M KC1, 25 mlずつ）で溶出した。0.7-0.75Mの間に活性がみられる画分をあつめ50%グリセロールで透析し-20°Cで保存した。精製の要約を次のTable 5, 6, 7 に示す。

このようにして精製された酵素標品は後述するように非特異性のヌクレアーゼは酵素の特異性、性質を決めるには問題とならない程ほぼ完全に除去されていた。またこれらの結果からわかるように収量はBanIIIが最も少なく生産性はよくないことが判った。

Table 5 Summary of Purification of Ban I

Step	Total Activity (Kilo units)	O.D. at 280 nm	Specific Activity	Yield %
1. Crude extract	—	18.083	—	—
2. PEG precipitation	—	4.150	—	—
3. Ammonium sulfate precipitation	500	63	7.9	100
4. Phospho-cellulose column chromat.	424	22	19.3	84.8
5. DEAE-Sephadex column chromat.	202	9.1	22.2	40.4
6. Hydroxyapatite column chromat.	130	4.0	32.5	26.0
7. Heparin-sepharose column chromat.				
Specific Activity: (T. K.U./OD280nm)				

Table 6 Summary of Purification of Ban II

Step	Total Activity (Kilo units)	O.D. at 280 nm	Specific Activity	Yield %
1. Crude extract	—	18.083	—	—
2. PEG precipitation	—	4.150	—	—
3. Ammonium sulfate precipitation	10,000	206	49	100
4. Phospho-cellulose column chromat.	7,500	29	259	75
5. DEAE-Sephadex column chromat.	4,900	18	272	49
6. Phospho-cellulose column chromat.	3,480	10	348	35
7. Hydroxyapatite column chromat.				

Table 7 Summary of Purification of Ban III

Step	Total Activity (Kilo units)	O.D. at 280 nm	Specific Activity	Yield %
1. Crude extract	—	18.083	—	—
2. PEG precipitation	—	4.150	—	—
3. Ammonium sulfate precipitation	122	53	2.3	100
4. Phospho-cellulose column chromat.	47	3.5	7.0	38
5. Hydroxyapatite column chromat.	34	0.15	9.9	27.9
6. DEAE-Sephadex column chromat.	20	0.15	133.3	16.3
7. Heparin-sepharose column chromat. & Concentration				

5. B. aneurinolyticus IAM 4077より精製した酵素の特異性と性質

5-1. BanIの特異性と性質

1). λ -DNA の分解性

精製酵素標品を $1\mu\text{g}$ の λ -DNA を含む反応液に、酵素量を変え $24\text{hr}, 37^\circ\text{C}$ でインキュベートした後、分解物を 1% アガロース電気泳動をおこない、パターンを観察した。Fig. 19 に示すように過剰酵素量が少ない時は切断DNAパターンに変化を示さないが酵素量が多くなる (2.5 単位 $\times 16\text{ hr}$) とパターンに変化が見られた (Fig. 20)。pBR322を基質にした時も λ -DNAの場合のように顕著でないが酵素量が過剰になる (3.8 単位 $\times 16\text{hr}$) とDNA断片が増加することが観察された (Fig. 20)。しかし本酵素標品を Hind III で消化した後 ^{32}P で標識した λ -DNA 及び ^3H -DNA (E. coli) と反応させると 遊離される酸可溶性の放射活性はそれぞれ 0.05% cpm/単位. hr, 0.01% cpm /単位. hr 以下であり非特異性ヌクレアーゼは除去されていた。本酵素は特異性をリラックスしやすい性質を持っていることが予想された。この性質については 3) で論述する。

2). Phage, virus, plasmid DNA に対する特異性

下記の表に示す種々の phage, virus, plasmid DNA ($1\ \mu\text{g}$) を精製酵素 (2 単位) で $37^\circ\text{C}, 2\text{hr}$ インキュベート後、電気泳動しパターンを調べた。Ad2, $\phi \times 174$, RF1 DNA, pBR322, M13mp18, Ad2 DNA は 2 箇所以上切断され、SV40 DNA は 1 箇所切断された (Fig. 21)。

Table 8 BanIによる各種DNAの切断断片数

DNA	pBR322	pUC19	M13mp18	$\phi \times 174$	SV40	Ad2
切断箇所数	9	4	7	3	1	>10

3). BanIの認識塩基配列

精製 BanI の識別する塩基配列の解析は、T4 dC DNA および λ -DNA の本酵素による分解物の 5' 末端をポリヌクレオチドキナーゼ反応で標識し、電気泳動 - ホモクロマトグラフィーによる二次元分析法により行った。T4 dC DNA および λ -DNA の酵素分解物をバクテリアアルカリフェオヌクレアーゼで脱リンし、T4 ポリヌクレオ

Fig. 19

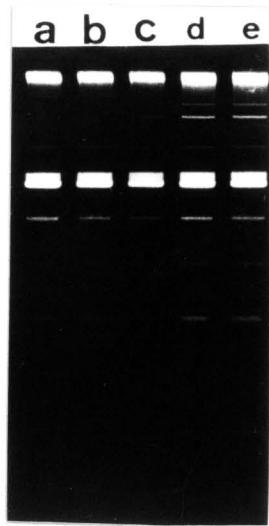


Fig. 20

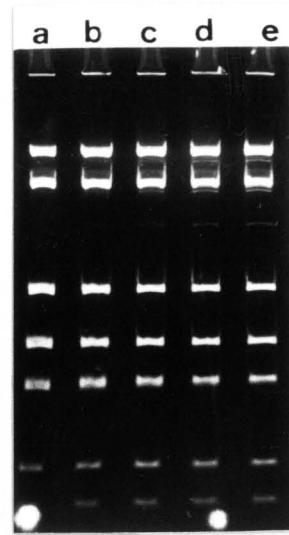


Fig. 19. Effect of BanI Concentration on λ -DNA Digestion.

One microgram of λ -DNA was incubated for 16 h at 50 °C in 10 mM Tris-HCl (pH, 8.0), 7 mM MgCl₂, 2 mM 2-mercaptoethanol in total volume of 50 μ l with BanI. (a) 1 U; (b) 2.5 U; (c) 3.1 U; (d) 3.8 U; (e) 4.4 U.

Fig. 20. Effect of BanI Concentration on pBR322 DNA Digestion.

One microgram of pBR322 DNA was incubated for 16 h at 50 °C in 10 mM Tris-HCl (pH, 8.0), 7 mM MgCl₂, 2 mM 2-mercaptoethanol in total volume of 50 μ l with BanI. (a) 1 U; (b) 2.5 U; (c) 3.1 U; (d) 3.8 U; (e) 4.4 U.

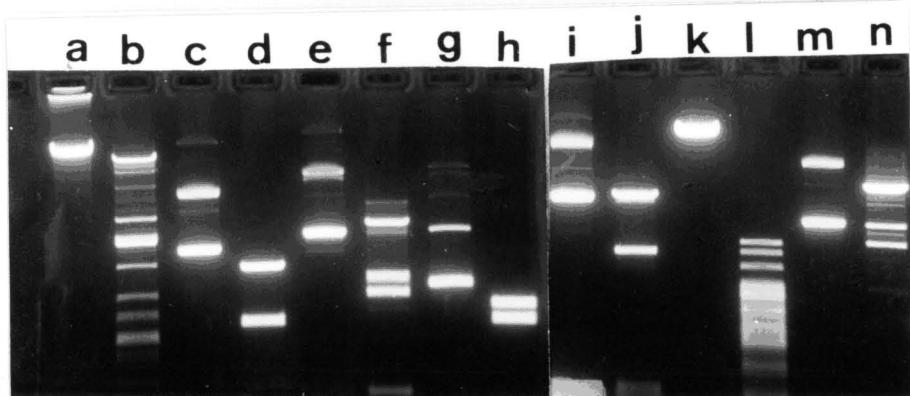
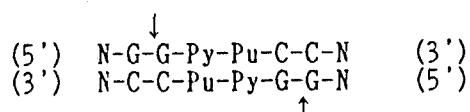


Fig. 21. Cleavage Patterns of λ , PBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2, and SV40 DNAs after Digestions with BanI.

2 units of BanI was incubated with 1 μ g each DNA in 50 μ l of the reaction buffer for 2 hr at 37 °C. The digests were electrophoresed on 1 % agarose gels at 150 V for 2 hr. a and b, λ -DNA; c and d; pBR322; e and f, ϕ X174; g and h, pUC18; i and j, M13mp18; k and l, Ad2; m and n, SV40. b, d, f, h, j, l and n were digested with BanI. a, c, e, g, i, k and m are undigested DNAs

チドキナーゼによるキナーゼ反応で5'末端に³²Pを標識した。これをpancreas DNase Iで消化する。次に7M尿素存在下、pH 3.5でセルロースアセテート高圧電気泳動（1次元）を行つた後、ホモミックス VIを使うホモクロマトグラフィ（2次元）を行う。得られたフィンガープリントのオートラジオグラムをFig. 22に示す。これよりBanIの認識する塩基配列を以下の様に決定した。また、切断フラグメントDNAの末端モノヌクレオチド分析(Fig. 23)より↓印の部位で本酵素は切断することを決定した。（↓印は切断部位、Pu:プリンヌクレオチド、Py:ピリミジンヌクレオチド）。



↑
本酵素は、Herpetosiphon giganteus Hpg9 より分離されたHgICl^{43, 44)}のiso-schizomerであることが判った。

4). BanIの特異性の弛緩

II型制限酵素のなかには標準反応条件下ではその制限酵素の本来の特異性を示すが特殊な条件では反応をリラックスする酵素が見られる。このような酵素としてEcoRI⁴⁵⁾, BamHI^{47, 48)}, BsuI⁴⁶⁾, BstI⁴⁹⁾, PvuII⁵⁰⁾等が知られている。BanIについてもFig. 24に示すように過剰量の酵素で作用させた時本来のDNA分解パターンを示さず他のDNAフラグメントが酵素量の増加と共に増える傾向がみられた。これを更に確かめた。本酵素を高濃度でλ-DNA、あるいはpBR322を分解する時、予想したように正常な分解パターンとは異なるバンドが生ずることが電気泳動でみられた。この現象は特にλ-DNAで顕著にみられ、pBR322ではそれほど強くないが反応液に最終濃度25%グリセロールあるいは、10%ジメチルスルフォキサイド(DMSO)を加えるとこの現象は増大した(Fig. 24)。この2次的切断部位はまだ決定するに至っていないが、これは異常な条件下で見られる特異性の弛緩(relaxation of specificity)と考えられる。Bacillus属の生産するBamHI^{47, 48)}, BsuI⁴⁶⁾, BstI⁴⁹⁾も特異性をリラックスすることがしられているので本属の生産する酵素はこのような性質をもっている酵素が多いのかもしれない。

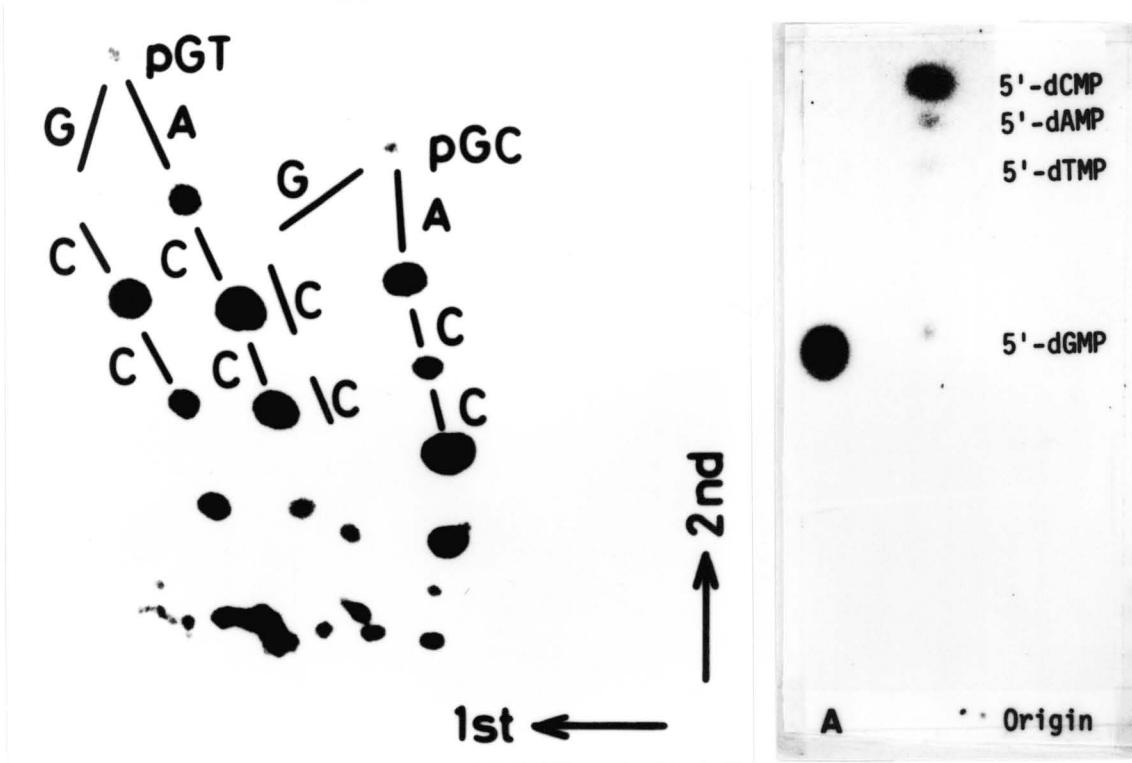


Fig. 22. Analysis of the 5'-ends sequenced generated at the λ -DNA.

$5'-^{32}P$ -labeled BanI fragments of λ -DNA were partially digested by DNaseI and venom phosphodiesterases, and fractionated by electrophoresis on cellulose-acetate film (first dimension), followed by homochromatography on a DEAE-cellulose thin-layer plate with homomix VI (second dimension). The 5'-oligonucleotides were detected by autoradiography and the sequences deduced from map position relative to authentic markers indicated in the fingerprint.

Fig. 23. Identification of the 5'-mononucleotide present after cleavage with BanI.

$5'-^{32}P$ -labeled BanI fragments of λ -DNA were completely digested with P1 nuclease, and the resulting mononucleotide 5'-phosphates analyzed by chromatography on a PEI-cellulose thin-layer plates with 0.5 M Li-formate (pH 3.0), respectively. The 5'-mononucleotide was detected by autoradiography and deduced from mobility relative to authentic markers. A; 5'-Terminal mononucleotide of BanI fragments.

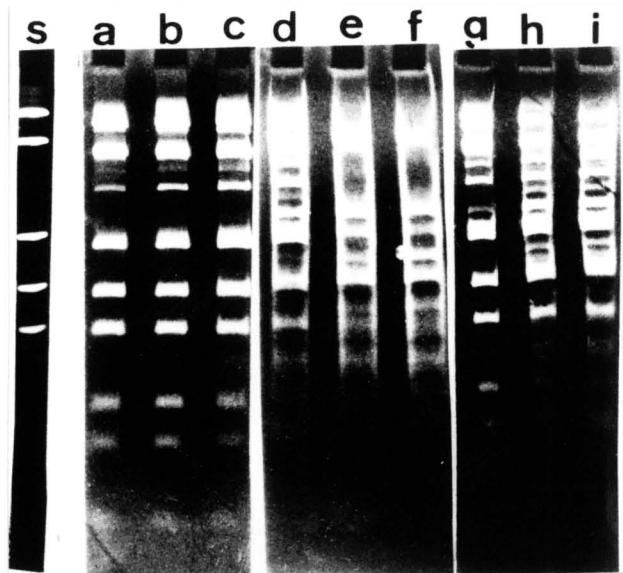


Fig. 24. Effect of Glycerol and DMSO on pBR322 Digestion with BanI.

One microgram of pBR322 DNA was incubated for 16 h at 50 °C in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 7 mM MgCl₂, 2 mM 2-mercaptoethanol in total volume of 50 µl with BanI. (a) 14 U; (b) 28 U; (c) 42 U; (d) 14 U plus 25 % glycerol; (e) 28 U plus 25 % glycerol; (f) 42 U plus 25 % glycerol; (g) 14 U plus 10 % DMSO; (h) 28 U plus 10 % DMSO; (i) 42 U plus 10 % DMSO; (s) Standard pattern of BanI-digested pBR322 DNA.

Fig. 25

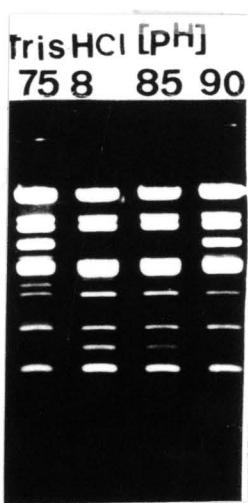


Fig. 26

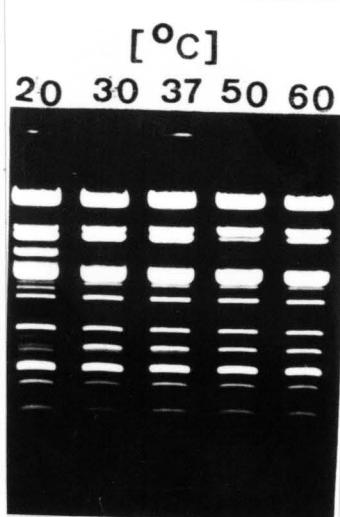


Fig. 25., Fig. 26. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of Ban I

The activity of purified Ban I was measured at different pH levels ranging pH 7.0 to 9.0 (Fig. 24) and measured at different temperatures from 15 to 60 °C (Fig. 26), pH:10 mM Tris-HCl; (1)pH 7.5; (b) pH8.0; (3) pH 9.0. Temperature; (1)20 °C; (2)30 °C; (3)37 °C; (4)50 °C; (5)60 °C.

5). 酶素活性におよぼすpHと温度の影響および熱安定

制限酵素BanIを、種々のpH(6.5-9.0)の測定反応液にλ-DNA 1 μgを加え50°C, 1 hrインキュベートした後、反応物を1%アガロース電気泳動をおこないλ-DNAの分解の程度より相対活性をしらべた。その結果、pH8.0で最も高い活性を示した(Fig. 26)。BanI制限酵素の作用温度をしらべるため、λ-DNA 1 μgを加えた反応液(pH7.5)で20°Cから60°Cまでの間で1 hr反応させ、λ-DNAの分解度をしらべた所、50°Cで最大の分解を示した(Fig. 25), (Fig. 26)。

本酵素の熱安定性をしらべた。反応液pHをpH8.0に固定し、20°C-70°C 1 hr同様にプレインキュベートし残存酵素活性を測定した結果、50°C以上の温度処理では活性は完全に失活していた(Fig. 27)。これらの結果から制限酵素BanIの至適pHと至適温度はそれぞれpH8.0と50°Cであることが判った。

6). 酶素活性におよぼす塩濃度の影響

NaCl濃度がBanI制限酵素活性に及ぼす影響を調べた。10mM Tris-HCl(pH8.0)-7-mM MgCl₂の存在下で、0-160 mMの間でNaCl濃度を変えてλ-DNAに対するBanIの相対活性を調べた。その結果最大活性は、0-30 mMの間で示し120 mM以上の塩濃度ではいずれの塩も活性に強い阻害を示すことが判った(Fig. 28)。KClも同様な結果を示し大差なかった。

7). 酶素活性におよぼす2価カチオンの影響

10mM Tris-HCl(pH8.0)存在下で、種々の2価カチオン(濃度7 mM)で酵素活性におよぼす影響をしらべた。BanI制限酵素は、反応液にMgCl₂が存在する時最も強い活性を示しMnCl₂では極くわずかの活性を示すにすぎなかった。他のカチオンCaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, ZnCl₂は全く活性は見られなかつた(Fig. 29)。反応液の1成分のMgCl₂濃度をかえ活性に及ぼす影響を調べたところ4-10 mM MgCl₂の範囲でよく作用することが判った(Fig. 30)。

Fig. 27

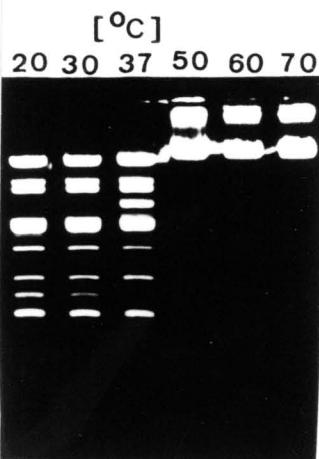
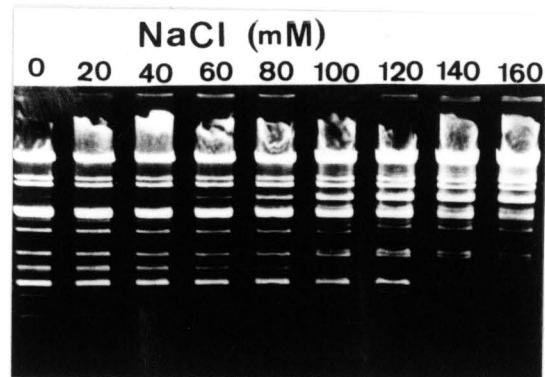


Fig. 28

Fig. 27. Thermal Stability of BanI

The thermal stability of the purified enzyme was examined by heating 15 to 60 °C for 30 min at pH 7.5. After incubation, the residual activity was measured by adding 1 μ g of λ -DNA to the reaction mixture. Temperature; (1) 20 °C; (2) 30 °C; (3) 37 °C; (4) 50 °C; (5) 60 °C; (6) 70 °C.

Fig. 28. Effect of NaCl Concentration on Enzyme Activity of BanI.

The effect of NaCl concentration on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5-7 mM MgCl₂-2 mM mercaptoethanol. BanI activity was measured at various concentrations of NaCl, ranging 0 to 160 mM for 1 h at 50 °C.

Fig. 29

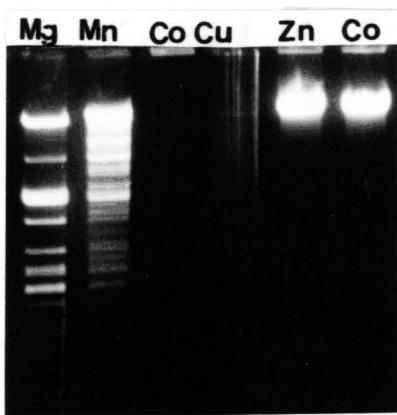
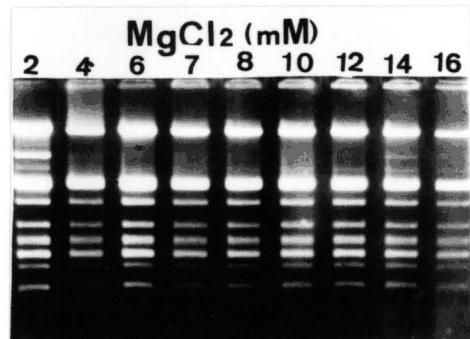


Fig. 30

Fig. 29., Fig. 30. Effect of Divalent Cations and Mg²⁺ion Concentration on Enzyme Activity of BanI.

The effect of divalent cations on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM 2-mercaptoethanol, 7 mM divalent cations as indicated (Fig. 29). The enzyme activity was measured with different concentration of MgCl₂. (1) 2 mM; (2) 4 mM; (3) 6 mM; (4) 7 mM; (5) 8 mM; (6) 10 mM; (7) 12 mM; (8) 14 mM; (9) 16 mM. (Fig. 30)

5-2. Ban II の特異性と性質

1). λ -DNAの分解性

精製酵素標品を $1\ \mu\text{g}$ の λ -DNAを含む反応液に種々の酵素量を加え 37°C で 1hr インキュベートした後、分解物を 1% アガロース電気泳動を行いパターンを観察した。Fig. 31 に示すように λ -DNAを 7箇所切断した。また酵素量を種々変えて過剰量で 24hr, 37°C でインキュベートした結果、480倍過剰 (30 単位 \times 16 hr) でもパターンに変化は見られず非特異性のヌクレアーゼは除去されていた (Fig. 32)。また Hind III で消化した後 ^{32}P でラベルした λ -DNA 及び ^{3}H -DNA (E. coli) と反応させると遊離される酸可溶性の放射活性はそれぞれ $0.03\%\text{cpm}/\text{単位} \cdot \text{hr}$ 以下であり上記の非特異性のヌクレアーゼの夾雜が無いことを確認した。

2). Phage, virus, plasmid DNAに対する特異性

下記の表に示す種々の phage, virus, plasmid DNA ($1\ \mu\text{g}$) を精製酵素 (2単位) で 37°C で 2hr インキュベート後、電気泳動しパターンを調べた (Fig. 31)。Ad2 DNA は 10箇所以上、pBR322, SV40 DNA, M13mp18 は 2箇所、pUC19 は 1箇所切断され、 $\phi \times 174$ RF1DNA は切断されなかった。

Table 9 Ban II による各種DNAの切断断片数

DNA	pBR322	pUC19	M13mp18	$\phi \times 174$ RF1	SV40	Ad2
切断箇所数	2	1	2	0	2	>10

3). Ban II の認識塩基配列

精製 Ban II は pBR322 を非常に近い位置で 2箇所、pA043 を 1箇所で切断する。生じた切断末端分子の 5' - 末端塩基配列を分析し、pBR322^{33, 34)}, pA043^{51, 52)} の塩基配列と照合した。pBR322, および pA043 を精製 Ban II で切断しバクテリアアルカリフォスファターゼで脱リン後、(γ - ^{32}P)ATP と T4 ポリヌクレオチドキナーゼによるキナーゼ反応で切断 5' 末端を ^{32}P で標識した。Ban II で処理した pBR322 の ^{32}P 標識 DNA フラグメントには Ava II で、同様に Ban II で処理した pA043 の ^{32}P 標識 DNA フラグメントには Pvu II で分解後電気泳動して分離することによりサブフラグメント化した。この分離 DNA フラグメントを Maxam-Gilbert 法で 5'-末端の塩基配列を決

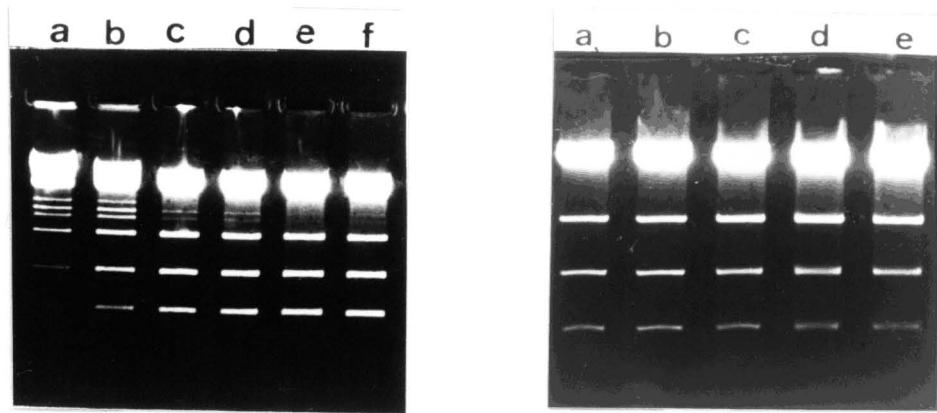


Fig. 31. Analysis of Cleavage Products of λ -DNA Incubated with Increasing Amounts of Ban II.

Different amounts of Ban II was incubated for 1 h at 37 °C in 50 μ l reaction mixtures containing 1 μ g λ -DNA, 7 mM 2-mercaptoethanol, 7 mM MgCl₂ and 10 mM Tris-HCl (pH 7.5). (1) 0.5 U; (2) 0.6 U; (3) 0.6 U; (4) 0.9 U; (5) 1.0 U.

Fig. 32. Effect of Ban II Concentration on λ -DNA Digestions.

One microgram of λ -DNA was incubated for 16 h at 37 °C in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol in total volume of 50 μ l with Ban II. (a) 6 U; (b) 12 U; (c) 18 U; (d) 24 U; (e) 30 U.

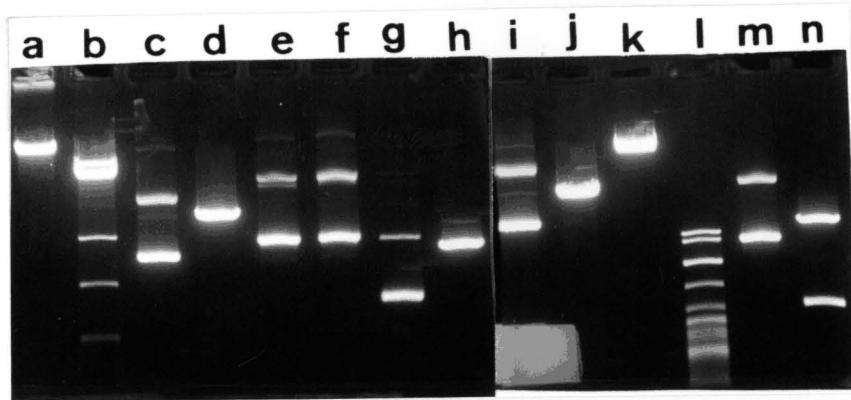


Fig. 33. Cleavage Patterns of λ , PBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2 and SV40 DNAs after Digestions with Ban II.

2 units of Ban II was incubated with 1 μ g each DNA in 50 μ l of reaction buffer for 2 hr at 37 °C. The digests were electrophoresed on 1% agarose gels at 150 V for 2 hr. a and b, λ -DNA; c and d; pBR322; e and f, ϕ X174; g and h, pUC18; i and j, M13mp18; k and l, Ad2; m and n, SV40. b, d, f, h, j, l and n are digested with Ban II. a, c, e, g, i, k and m are undigested DNAs.

定した(Fig. 34)(Fig. 35). 上記塩基配列に使用した5'-末端ラベルDNA断片の末端モノヌクレオチドを決定した(Fig. 36).

pBR322 \downarrow (5') ATCACCGAT GGGGAAGAT <u>GGGCTCGCC</u> ACTTC <u>GGGCTCATGAGCGCT</u> TGTTTCGGC \downarrow (3') TAGTGGCTA CCCCTCT <u>AGCCCCAGCGG</u> TGAAG <u>CCCCAGTACTGTCGA</u> ACAAAGCCG	\downarrow 460 480 \downarrow 300	Ban II fragment (3') TAGTGGCTA CCCCTCTAGCP \downarrow 1241 \downarrow 1261	pCATGAGCGCT TGTTTCGGC \downarrow pCGCGATAATGTC GGGCAATC
pA043 \downarrow (5') GATTATATGGGTATA AAT <u>GGGCTCGCGATAATGTC</u> GGGCAATC \downarrow (3') CTAAATATAACCCATAT TT <u>ACCCCCAGCGCTATTACAG</u> CCCGTTAG			
Ban II fragment (3') CTAAATATAACCCATATTACp			

Fig. 37. Alignment of the 5'-terminal sequences generated by Ban II on the sequences of pBR322^{33, 34)} and pA043^{51, 52)} DNAs. The number above the pBR322 sequence indicates the positions from the EcoRI site^{33, 34)}, and those above the pA043 sequence indicates the positions from the left end of Tn 903 on pA043^{51, 52)}, respectively. The possible recognition sequence was boxed.

Fig. 37 に示すように切断部位に6塩基配列GAGCCCが共通にみられた. Ban IIが部分的な二回回転対称構造を持つ6塩基配列を識別する制限酵素であると仮定すると, Ban IIの識別する塩基配列は G-Pu-G-C-Py-Cと推定される. 全塩基配列が決定されているウイルスDNAやプラスミド上の2回回転対称構造を網羅したFuchs⁵³⁾らによる表によると, この塩基配列に相当する配列はSV40DNA上には2箇所(G-A-G-C-C-C及び G-G-G-C-C-C)あり, ϕ x174 RFI DNA上にはない. 本酵素はSV40DNAを2箇所で切断し, ϕ x174 RF-I DNAは切断しなかった(Table 9). しかも, SV-40DNA上の切断箇所はG-A-G-C-C-C及び G-G-G-C-C-Cの塩基配列に相当する位置であった. 以上の結果から, Ban IIの識別する塩基配列は以下の様に決定した³⁵⁾.

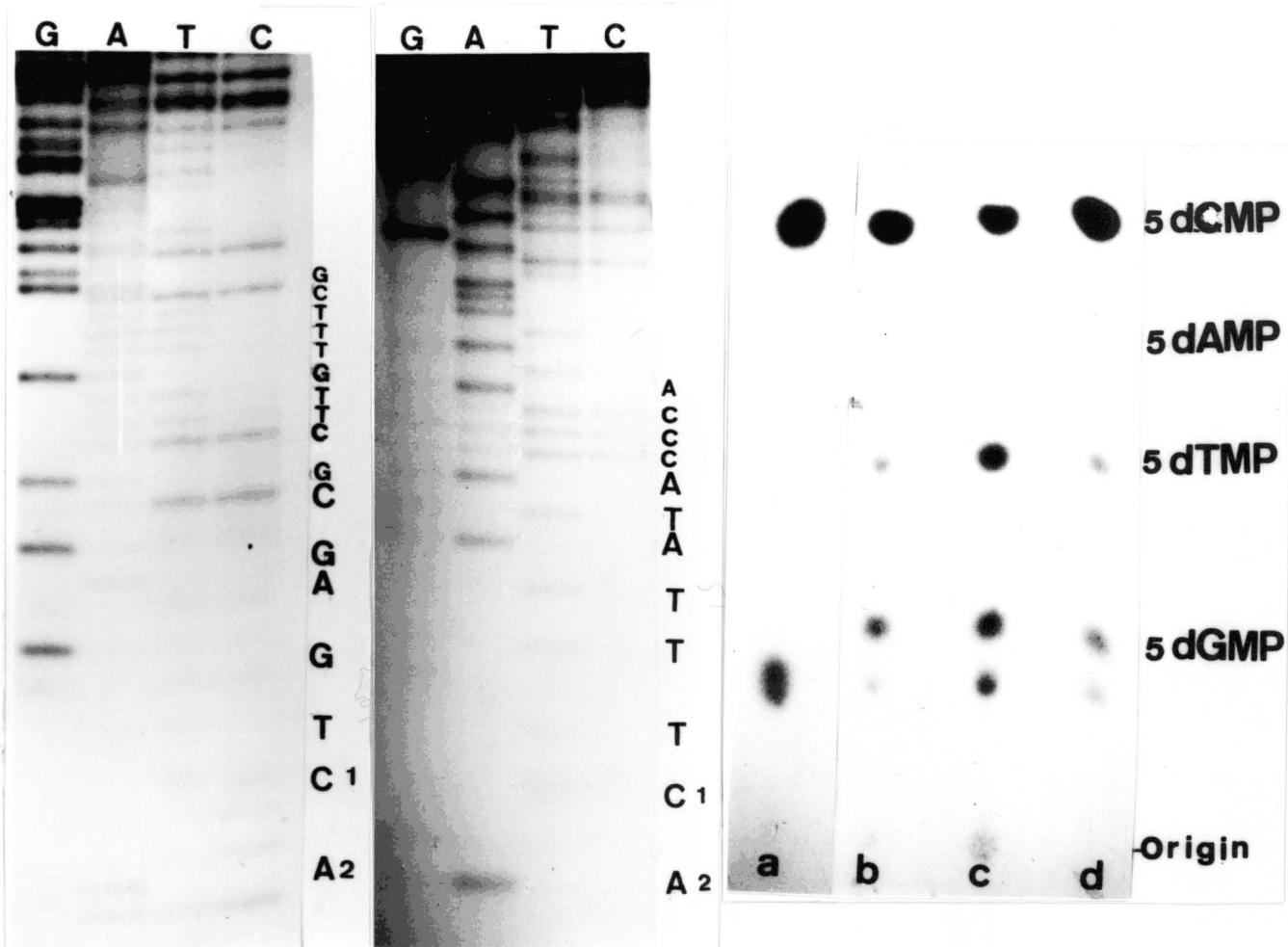


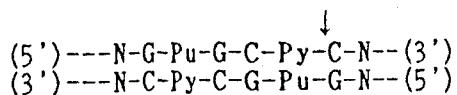
Fig. 34. Autoradiogram of $5'-^{32}\text{P}$ -labeled subfragments of pBR322 DNA produced by double digestion with Ban II and Ava II.

The fragment was sequenced on a gel from $5'$ -Ban II cleavage site. When the $5'$ -end is pyrimidine(T or C), the first and second bands are reversed. In this case, the sequencing gel can be read as 5'CATGAGCGC...

Fig. 35. Autoradiogram of $5'-^{32}\text{P}$ -labeled subfragments of pA043 DNA produced by double digestion with Ban II and Pvu II.

The fragment was sequenced on a gel from $5'$ -Ban II cleavage site. When the $5'$ -end is pyrimidine(T or C), the first and second bands are reversed. In this case, the sequencing gel can be read as 5'CATTATATCCCA...

Fig. 36. Identification of $5'$ -terminal mononucleotides obtained from the labeled smaller fragments(a) and the labeled longer fragments(b) of plasmid pA043 DNA and the labeled smaller fragments(c) and the labeled longer fragments of pBR322 DNA.



↑
本酵素は新しい特異性をもつ酵素である。

4). 酵素活性に及ぼすpHと温度の影響

Ban II 制限酵素 (0.5 単位) を種々のpHの反応液で37 °Cでインキュベートした後、反応物を1%アガロース電気泳動をおこないλ-DNAの分解の程度より相対活性をしらべた。その結果pH7.5が最適であった (Fig. 38)。次にBan II 制限酵素の作用温度をしらべるため、λ-DNA 1μgを加えた反応液 (pH7.5) で30 °Cから50 °Cまでの間1 hrは反応させλ-DNAの分解度をしらべた。反応温度は35-40°Cで最もよく分解した。最適温度を37 °Cとした (Fig. 39)。

5). 酵素活性に及ぼす塩濃度の影響

NaClおよびKCl濃度がBan II 制限酵素活性に及ぼす影響を調べた。10 mM Tris-HCl (pH7.5)-7 mM MgCl₂の存在下で、0-100 mM の間でNaCl及びKCl濃度を変えて反応させλ-DNAに対するBan II の相対活性を調べた (Fig. 40)。その結果最大活性は、NaCl, KClいずれも30-50 mM濃度であり高濃度の塩濃度では少し阻害がみられた。最適塩濃度を50 mMと決定した。

6). 二価カチオンの活性に及ぼす影響

10 mM Tris-HCl (pH8.0)-7 mM 2-mercaptoethanolを含む反応液に種々の二価カチオン (濃度7 mM) を加えBan II 制限酵素の相対活性をしらべた (Fig. 41)。Mg²⁺イオンを加えた場合に強い活性がみられた。MnCl₂ の添加ではMg²⁺イオンとほぼ同じ程度の活性が観察されBan I, Ban IIIと異なる性質を持っていることが判った。CoCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, CaCl₂ の添加では全く活性が認められなかった。

Fig. 38

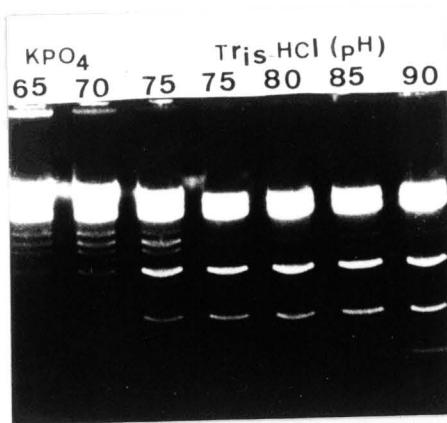
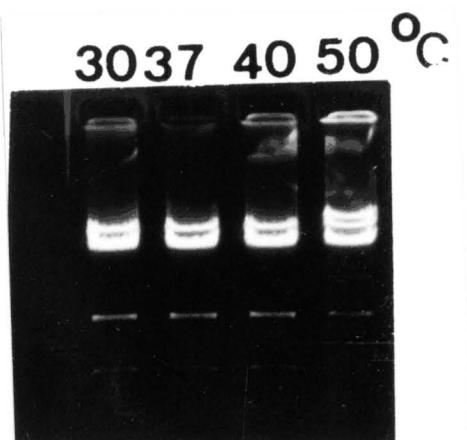


Fig. 39

Fig. 38., Fig. 39. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of Ban II

The activity of purified Ban II was measured at different pH levels ranging pH 7.0 to 9.0 (Fig. 38) and measured at different temperatures from 15 to 60 °C. (Fig. 39). pH: 10 mM KPO₄; (1) pH 6.5; (2) pH 7.0; (3) pH 7.5, 10 mM Tris-HCl; (1) pH 7.5; (2) pH 8.0; (3) pH 9.0. Temperature; (1) 30 °C; (2) 37 °C; (3) 40 °C; (4) 50 °C.

Fig. 40

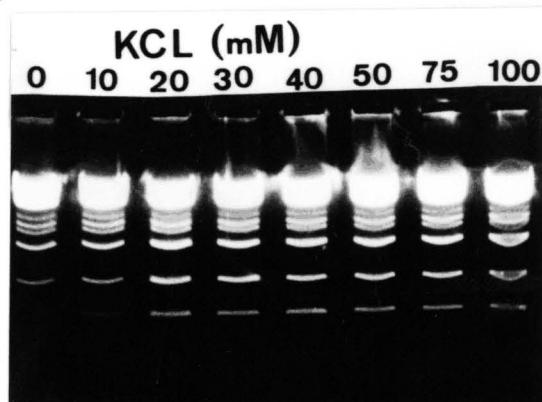
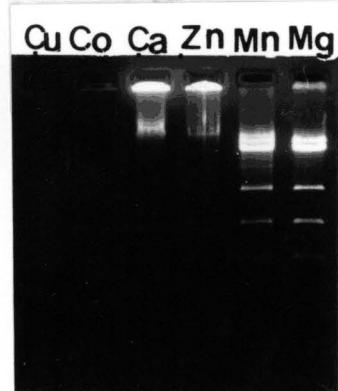


Fig. 41

Fig. 40. Effect of KCl Concentration on Enzyme Activity of Ban II.

The effect of KCl concentration on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5-7 mM MgCl₂-2 mM mercaptoethanol. Ban II activity was measured at various concentrations of NaCl ranging 0 to 100 mM for 1 h at 37 °C.

Fig. 41. Effect of Divalent Cations on Enzyme Activity of Ban II.

The effect of divalent cations on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM divalent cations as indicated.

5-3. BanIIIの特異性と性質

1). λ -DNAの分解性

精製酵素標品を $1\mu\text{g}$ の λ -DNAを含む反応液に種々の酵素量を加え 37°C で 1hr インキュベートした後、分解物を 1% アガロース電気泳動を行いパターンを観察した。Fig. 42 に示すように λ -DNAを 10箇所以上切断した。また酵素量を種々変えて 24hr 37°C でインキュベートして過剰試験を行った結果、パターンに変化は見られず非特性のヌクレアーゼは除去されていた (Fig. 43)。また ^{32}P 標識 HindIII 消化 λ -DNA及び ^3H -DNA (E. coli)と反応させると遊離される酸可溶性の放射活性はそれぞれ 0.03%cpm/単位 hr 以下で非特異性ヌクレアーゼが除去されていることを確認した。

2). Phage, virus, plasmid DNAに対する特異性

下記の表に示す種々の phage, virus, plasmid DNA ($1\mu\text{g}$)を精製酵素(2単位)で 37°C で 2hr インキュベート後電気泳動しパターンを調べた (Fig. 44)。pBR322は1箇所、M13mp18は2箇所で切断され、SV40 DNA, pUC19, ϕ x174 RF1 DNAは切断されなかった (Table 10)。

Table 10 BanIIIによる各種DNAの切断断片数

DNA	pBR322	pUC19	M13mp18	ϕ x174RF-1	SV40	Ad2	pA043
切断箇所数	1	0	2	0	0	2	0

3). BanIIIの認識塩基配列

本酵素は pBR322を 1箇所で切断する。この切断点の塩基配列を解析した。pBR322で BanIII 切断し、直鎖DNAをアルカリフォスファターゼで脱リン化した後、T4 ポリヌクレオチドキナーゼで 5'-末端を ^{32}P でラベルする。標識したDNAフラグメントを HaeIIIで切断し、生成断片をゲル電気泳動で分離した。このDNAの 5'末端を Maxam-Gilbert 法で塩基配列を決定した (Fig. 45)。今まで論述してきた制限酵素と同様に BanIII 切断部位の末端モノヌクレオチドを分析した結果 pdC であることが明らかになった (Fig. 46)。

Fig. 42

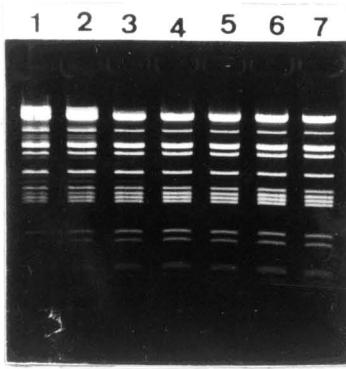


Fig. 43

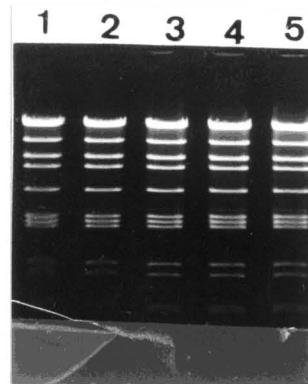


Fig. 42. Analysis of Cleavage Products of λ -DNA Incubated with Increasing Amounts of BanIII.

Different amounts of BanIII was incubated for 1 h at 37 °C in 50 μ l reaction mixtures containing 1 μ g λ -DNA, 7 mM 2-mercaptoethanol, 7 mM MgCl₂ and 10 mM Tris-HCl (pH 7.5). (1) 0.5 U; (2) 0.75 U; (3) 0.9 U; (4) 1.0 U; (5) 1.5 U; (6) 2.0 U; (7) 3.0 U.

Fig. 43. Effect of BanIII Concentration on λ -DNA Digestions.

One microgram of λ -DNA was incubated for 16 h at 37 °C in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol in total volume of 50 μ l with BanIII. (1) 6 U; (2) 12 U; (3) 18 U; (4) 24 U; (5) 30 U.

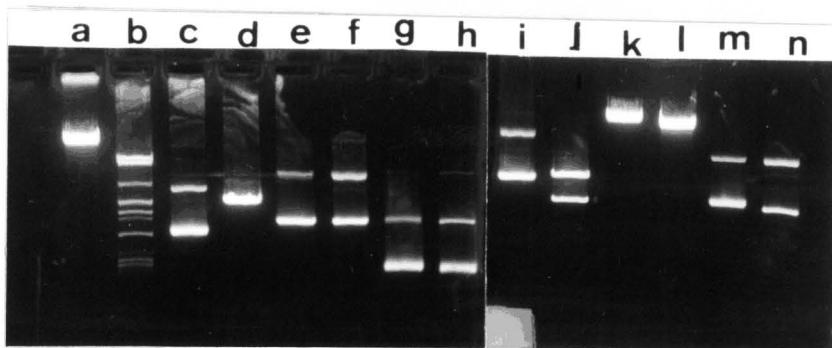


Fig. 44. Cleavage Patterns of λ , PBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2 and SV40 DNAs after Digestions with BanIII.

2 units of BanIII was incubated with 1 μ g each DNA in 50 μ l of reaction buffer for 2 hr at 37 °C. The digests were electrophoresed on 1% agarose gels at 150 V for 2 hr. a and b, λ -DNA; c and d, PBR322; e and f, ϕ X174; g and h, pUC18; i and j, M13mp18; k and l, Ad2; m and n, SV40. b, d, f, h, j, l and n are digested with BanIII. a, c, e, g, i, k and m are undigested DNAs.

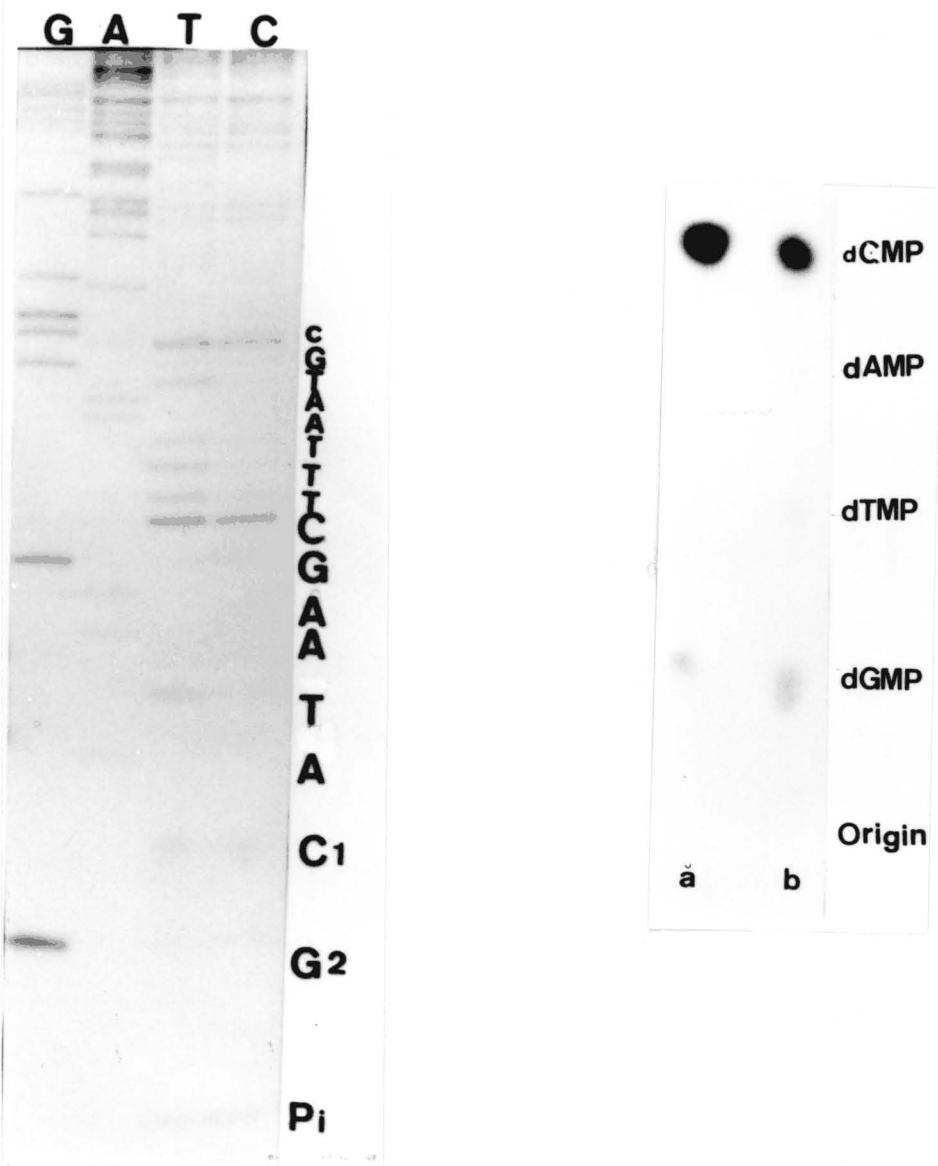


Fig. 45. Autoradiogram of $5' - ^{32}P$ -labeled subfragment of pBR322 DNA produced by double digestion with BanIII and HaeIII.

The fragment was sequenced on a gel from $5' - \underline{\text{Ban}}\text{III}$ cleavage site. When the $5'$ -end is pyrimidine (T or C), the first and second bands are reversed. In this case, the sequencing gel can be read as 5'CGATAAGCTT....

Fig. 46. Identification of $5'$ -terminal mononucleotides obtained from the labeled smaller fragments (A) of plasmid of pBR322 DNA.

pBR322 (5')-TT TGACAGCTTA TC <u>ATCGATAA</u> GCTTTAATGC GGTAGTTAT(3') (3')-AA ACTGTCGAAT AG <u>TAGCTA</u> CGAAATTACG CCATCAAATA(5')	↓ ↓ ↓ ↓ 11 21 31 41	pCGATAA GCTTTAATGC GGTAGTTAT(3') (3')-AA ACTGTCGAAT AGTAGCp
<u>BanIII</u> fragment		pCGATAA GCTTTAATGC GGTAGTTAT(3') (3')-AA ACTGTCGAAT AGTAGCp

Fig. 47. Alignment of the 5'-terminal sequences generated by BanIII on the pBR322 sequence. The number above the sequence indicates that the nucleotide position from EcoRI site of pBR322^{33, 34)}. The position recognition sequences was boxed.

塩基配列を決定した結果からFig. 47にBanIIIにより切断されたpBR322の切断部位領域を示す。これより本酵素はつぎの2回回転対称構造をとる塩基配列を認識し矢印の部位で切断することが判った。

↓
 5'-A-T-C-G-A-T-3'
 3'-T-A-G-C-T-A-5'
 ↑

この塩基配列の解析結果とλ-DNAとT4dC等の切断パターンより、本酵素はCaryophanon latum Lより分離されたClaI⁵⁴⁾のisoschizomerであることが判明した。

4). 酵素活性に及ぼすpHと温度の影響

λ-DNAを37 °Cで種々のpH (pH6.5-9.0)で分解し相対活性を調べた結果、最大活性はpH8.0-8.5であった(Fig. 48)。またpH7.5で30 °C-50 °Cで活性を調べた結果最大活性は37 -40 °Cであった(Fig. 49)。これらの結果から最適pH及び温度条件はpH8.0, 37 °Cと決定した。

5). 酵素活性におよぼす塩濃度の影響

NaClおよびKCl濃度がBanIII制限酵素活性に及ぼす影響を調べた。10 mM Tris-HCl (pH7.5)-7 mM MgCl₂の存在下で、0-110 mM の間でNaCl及びKCl濃度を変えてλ-DNAに対するBanIIIの相対活性を調べた。その結果最大活性は、NaCl, KClいずれも60-80 mM濃度であり高濃度(100 mM)の塩濃度では阻害がみられた。最適塩濃度を60 mMと決定した(Fig. 50)。

Fig. 48

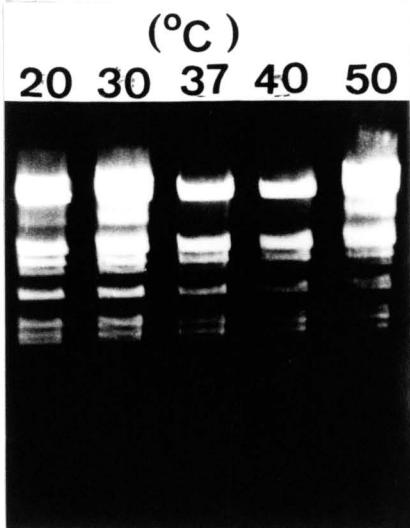


Fig. 49

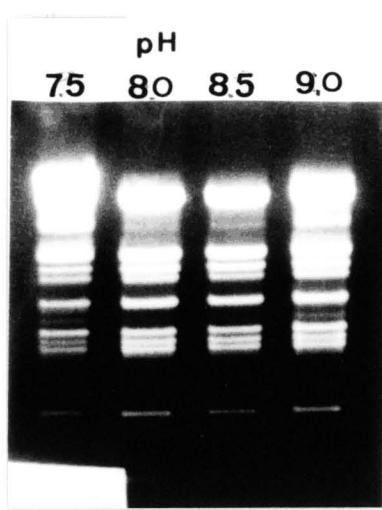


Fig. 48., Fig. 49. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of BanIII

The activity of purified BanIII was measured at different pH levels ranging pH 7.0 to 9.0 (Fig. 48) and measured at different temperatures from 20 to 60 °C. 10 mM Tris-HCl; (1) pH 7.5; (2) pH 8.0; (3) pH 9.0. (Fig. 49). Temperature; (1) 20 °C; (2) 30 °C; (3) 37 °C; (4) 40 °C; (5) 50 °C.



Fig. 50. Effect of KCl Concentration on BanIII Activity.

The effect of NaCl concentration on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 7 mM MgCl₂, 2 mM mercaptoethanol. KCl concentration: (1) 10 mM; (2) 25 mM; (3) 50 mM; (4) 70 mM; (5) 90 mM; (6) 110 mM.

Fig. 51

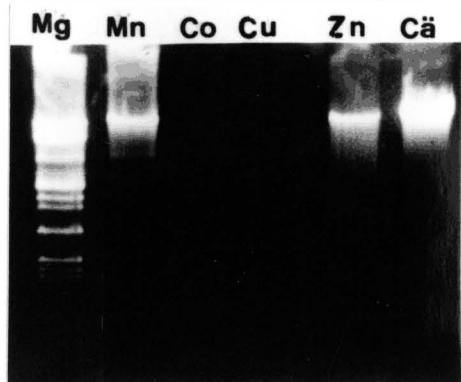


Fig. 52

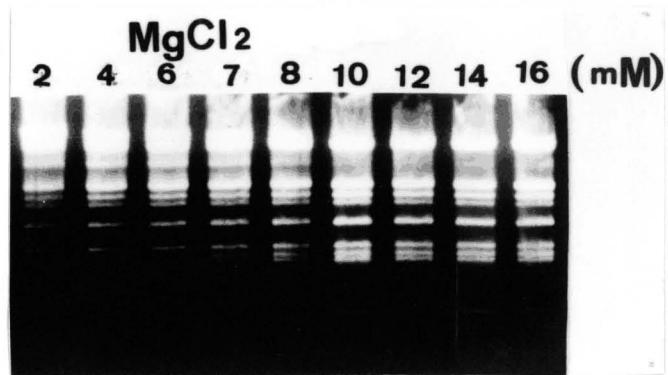


Fig. 51., Fig. 52. Effect of Divalent Cations and Mg²⁺ ion concentration on Activity of BanIII.

The effect of divalent cations on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM 2-mercaptoethanol, 7 mM divalent-cations as indicated (Fig. 51). The enzyme activity was measured with different concentration of MgCl₂. (Fig. 52), (1) 2 mM; (2) 4 mM; (3) 6 mM; (4) 7 mM; (5) 8 mM; (6) 10 mM; (7) 12 mM; (8) 14 mM; (9) 16 mM.

6). 二価カチオンの活性に及ぼす影響

10 mM Tris-HCl(pH8.0)-7 mM 2-mercaptoethanolを含む反応液に種々の二価カチオン(濃度7 mM)を加えBanIII制限酵素の相対活性をしらべた。Mg⁺²イオンを加えた場合に強い活性がみられた(Fig. 52)。MgCl₂濃度と活性の影響を調べると10-16 mM濃度で強い活性を示しBanIII制限酵素が最大の活性を示すためには他の酵素に比べ比較的高い濃度を要求することが判った(Fig. 53)。MnCl₂の添加では極くわずかな活性が観察されるだけで、MgCl₂に代替することは出来ないことが判った。CoCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, CaCl₂の添加では全く活性が認められなかった。

6. Micrococcus roseus S より酵素の精製

M. roseus S 菌体12.1gより超音波破碎により抽出液を調製し ホスホセルロース(Whatman P11)に吸着させた。溶出した活性画分をPEG6000で濃縮した後、溶液をSephadex G-100(Pharmacia Fine Chemical)カラムに吸着させ100mM NaClを含む10 mM 磷酸緩衝液で溶出した。本酵素をMroIと命名した。MroIの制限酵素は10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 6 mM 2-mercaptoethanolを含む反応液40 μl酵素溶液5-20 μl加えて37 °Cで1 hr反応させた後電気泳動させて測定した。MroI活性画分をプールしPEG6000で濃縮しλ-DNAをMroI酵素過剰量で一夜インキュベートしても分解DNA断片の電気泳動のパターンに変化が見られないことから、非特異性ヌクレアーゼで完全に除去されていた。MroIの収量は湿潤菌体1g当り200 単位であった。MroIの比活性は767単位/mgで粗抽出液のそれより14.4倍に精製された。-20°Cで少なくとも6カ月は安定である。

6-1 MroI の特異性と性質

1). Phage, virus, plasmid DNAに対する特異性

λ-DNA, Ad-2, CoIE1 DNA, pBR322 DNA, SV40 DNA, φX174 DNAを精製MroIで切断した。その結果Fig. 53 に示すようにλ-DNAを20箇以上, Ad-2 DNAを9, CoIE1 DNAを4, pBR322を1のフラグメントにそれぞれ切断し, SV40 DNA, φx174RF1 DNAを分解しなかつた。pBR322のMroIによる分解位置はPstIあるいはHindIIIでダブル分解で決定した結果、その認識部位はTCCGGAであると推定された。

2). MroI の 認識塩基配列

MroIの認識塩基配列をプラスミドpBR322 DNAを用いて分析した³⁷⁾。プラスミドpBR322 DNAをMroIとHindIIIで切断し生成したフラグメントをアガロースゲル電気泳動で分離後、ゲルより抽出しこの断片の5'末端を³²PラベルしPstIで切断した。このうち3つのDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離しMroI-HindIIIの切断断片のMroI切断部位付近の塩基配列をMaxam Gilbert法で決定した。その結果Fig. 54に示す様に標識されたDNAフラグメントは次の配列を示した。

Fig. 53

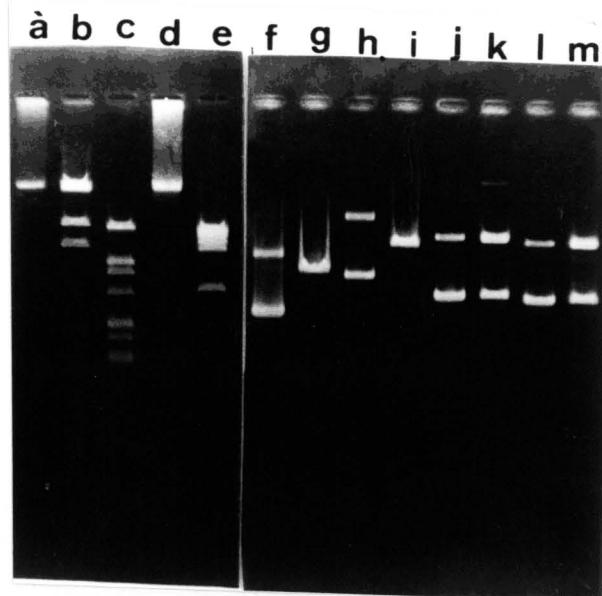


Fig. 53. Cleavage Patterns of λ , Ad-2, pBR322 and CoIE1 DNAs after Digestions with MroI

One unit of MroI was incubated with 2 μ g each DNA in 40 μ l of reaction buffer for 3 hr at 37 °C. The digests were electrophoresed on 1 % agarose gels at 100 V for 2 hr. a, b and c, λ - DNA; d and e, Ad-2 DNA; f and g, pBR 322 DNA; h and i, CoIE1 DNA; j and k, ϕ X174 DNA; l and m, SV40 DNA. b is digested by HindIII, a, d, f, h, j and l are undigested DNAs.

Fig. 54

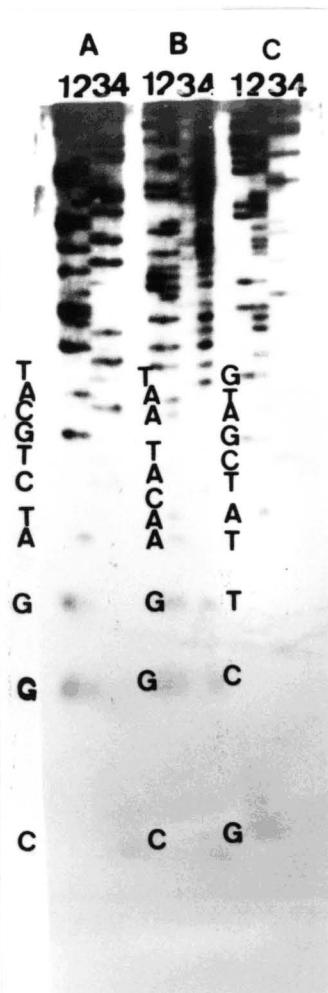


Fig. 54. Determination of MroI Cleavage

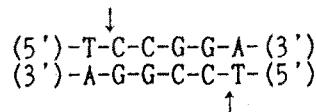
Ends.

The 5'- 32 P-labeled MroI-reaction fragments of pBR322 were sequenced by the method of Maxam and Gilbert. The fragments (a) in lanes 1, 2, 3 and 4 are cleavage products from the G, G+A, T+C, and C reactions of MroI-PstI fragment in a clockwise direction from the MroI terminal. (c), HindIII-PstI fragment in a counterclockwise direction from the HindIII terminal.

lane a) (5') CCGGATCTGCAT.....(3')
lane b) (5') CCGGAACATAAT.....(3')

従って MroII は 5'-TCCGGA-3' を認識し T と C の間を切断すると結論した。

さらに 本酵素は 3' ヒドロキシル基と 5' ホスホモノエステル基の 2 断片 DNA を生成することが判った。



本酵素は Acinetobacter calcoaceticus 由来の AccIII²⁶⁾, Bacillus species M 由来の BspMII^{26, 27)} の isoschizomer であることがわかった。

3). MroI の認識配列のメチル化の影響

この酵素は、2)に述べたように T-C-C-G-G-A を認識し T と C の間を切断するので。 AccIII, BspMII の iso-schizomer であることが判明した。しかしこれらの isoschizomer は dam メチル化塩基配列及び MspI メチラーゼでメチル化された配列を切断できない。そこで MroI がこの様なメチル化された DNA を切断するかどうかを検討した (Fig. 55)。 MroI は pBR322 DNA, dam+ λ-DNA と dam- λ-DNA を 37°C で切断する。しかし AccIII は dam- DNA のみを 60°C で分解した。HpaII メチラーゼと MspI メチラーゼで MroI 認識配列の C をメチル化した DNA を調製した。Fig. 55 に示すように MspI メチラーゼでメチル化した塩基配列を MroI は切断できるが HpaII メチラーゼでメチル化した塩基配列を切断できないことがわかった。これは塩基配列 TCCGGA 内の内側の C がメチル化されると MroI 切断がブロックされることを示している。もう一つの isoschizomer BspMII は外側、内側の両 C ともメチル化されると切断できないことを示している。他方 AccIII は pBR322 DNA を切断できない。これは認識配列の下流に T と C が続くので (TCCGGATC), dam メチラーゼが GATC を識別しこの 4 塩基配列にある A をメチル化しているため pBR322 DNA を開裂できないことを示している。これに対し MroI は pBR322 DNA を切断できることは AccIII とメチル化された DNA の切断性が異なることを示している。

4). MroI 活性に及ぼす pH, 塩濃度, 金属イオンの影響



Fig.55. Effect of Methylation of λ -DNA with M.Hap II and M.MspI on MroI Digestion.

Dcm⁻ λ -DNA was incubated with M.Hap II or M.MspI in the methylase assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol and 80 μ M SAM) at 37 °C. The methylated DNA was incubated with MroI, Hpa II and Nae I. a and i, λ -DNA; b and j, λ -DNA digested with Hind III; c, λ -DNA digested with MroI; d, dam⁻ λ -DNA digested with MroI; e and k, dcm⁻ λ -DNA digested with MroI; f, dcm⁻ λ -DNA digested with Hpa II; g, dcm⁻ λ -DNA digested with M.Hap II and treated with Hpa II; h, dcm⁻ λ -DNA digested with M.Hap II and treated with MroI; m, dcm⁻ λ -DNA digested with M.MspI and treated with Nae I; n, dcm⁻ λ -DNA digested with M.MspI and treated with MroI.

MroI活性には10 mM Mg²⁺を要求し pH 7.2-7.8で最高の活性を示した。またCo²⁺, Mn²⁺の存在下ではわずかな活性を示すがCa²⁺, Ba²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, Fe³⁺が存在する時活性は全く示さなかった。NaCl, KClは 100mMより高い濃度では活性阻害を示した。(データ省略)

5). 酵素の最適温度と熱安定性

反応温度の効果を最適反応液(10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl)中で温度を20 °Cから 65 °C変え反応させることによりしらべた。その結果、最大活性は37°Cでえられた。次にMroIの熱安定性を30 °Cから65 °Cに1 hrインキュベーションした後活性を測ることにより調べた。MroI活性は50 °Cで50%に減少し60 °Cで完全に失活した。本酵素は 50 °C, 10 minのインキュベーションで殆ど活性を失うことがわかった。(データ省略)

6). MroI活性の最適条件

MroIの最適反応条件は10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaClからなる反応組成で37°Cで作用させることであることがわかった。

7. その他の菌株からの制限酵素

Acetobacter aceti IFO 3281, Bacillus aneurinolyticus IAM 1077の他に、制限酵素を分離することができたが、それらはすべてすでに分離されている制限酵素のisoschizomerであった¹⁹⁾。そのうちで、Escherichia coli ICR0020より分離されたEcoICRI(SstIのisoschizomer), Micrococcus auranticus IFO 12422 より分離されたMauI((PstI isoschizomer), Pseudomonas putida C-83 UV mutantからPpuI, Pseudomonas alkaligenes ATCC 12815からPaiI(いずれもHaeIIIのisoschizomer), Pseudomonas alkanolytica IFO 12319より分離されたPanI (XbaI isoschizomer)など収量も多く酵素の精製も容易で従来報告されている酵素の代わりに利用されうる可能性があるのではないかと考えられる。

第5節 考察

1970年にSmithらがはじめて Haemophilus influenzae Rdから HindIIが発見して以来多くのII型制限酵素が見いだされ分子生物学、遺伝子工学の研究分野に欠くべからざる道具として使われてきている。これまでかなりのII型制限酵素が実用化されているが、遺伝子研究の多用性から新しい特異性を持つII型制限酵素が望まれている。また実用化されていても菌の生産性が悪く、精製が難しいため非常に高価な酵素試薬となるものが認められる。この観点からこれまで制限酵素の検索に使われていない菌株からII型制限酵素の検索と分離精製を試みた。その結果約150種の菌株の検索より新特異性をもつII型制限酵素としてAatII, BanIIを見いだし、その特異性つまりその酵素の識別する認識塩基配列とその切断部位を決定した。AatIIはGACGTCの塩基配列を認識し、CとTの間を切断する。本酵素はクローニングベクターとしてきわめてよく利用されるpBR322, pUC18, 19を1箇所切断するのできわめて貴重な酵素であると考えられる。BanIIはGPuGCPyCの塩基配列を認識しCとPyの間を切断することを明かにした。本酵素はpBR322のTetR遺伝子を非常に近い位置で2箇所切断する。本酵素もpBR322ベクターを利用するクローニングに使用できる酵素である。

Isoschizomerとして見いだされた酵素のうち、AatI, BanI, BanIIIの特異性を塩基配列既知のDNAにたいする特異的切断パターンで決める他に塩基配列決定レベルでも確認し切断部位も決定した。BanIはHerpetosiphon giganteus HP1049の生産するHgiCIのisoschizomerであるが本酵素の生産性が良いことから、現在BanIが遺伝子工学研究試薬酵素として使われている。AatI, BanIIIはそれぞれStreptomyces tubercidicusの生産するStuI, Caryophanon latum Lの生産するClalのisoschizomerであつた。これらの酵素はよく利用される酵素のひとつであり、AatIはAatIIと同一の菌体から、BanIIIはBanI, BanIIと同じ菌体から精製の難易度を別にすれば、精製分離される利点がある。以上のAatI, AatII, BanI, BanII, BanIIIの酵素的性質について検討し、それぞれの最適反応条件を設定した。更にアミノ酸、核酸生産菌からMicrococcus roseus SがAcinetobacter calcoaceticusの

生産するAccIIIおよびBacillus species Mの生産するBspMIIのisoschizomerであったが、MroIはメチル化されたDNAの切断性が異なっている事を示した。遺伝子工学試薬として貴重である。AccIIIがpBR322を切断出来ないのに対しMroIは切断出来る特徴があり、遺伝子工学試薬として貴重である。

第六節 要約

新しい特異性をもつ制限酵素あるいはisoschizomerでも従来から使われている酵素と異なる特徴、一高生産性、メチル化DNAの切断性が異なるーを有する制限酵素を見つけるため種々の菌株を検索した。結果下記の表に表す制限酵素を得た。

Table 11. 検索制限酵素、生産菌株と特異性の一覧表

Enzymes	Bacteria	Specificity
<u>Aat</u> I	<u>A. aceti</u> IFO 3281	AGG↓CCT isoschizomer of <u>Stu</u> I
<u>Aat</u> II		GACG↓TC new enzyme
<u>Ban</u> I	<u>B. aneurinolyticus</u>	C↓GPyPuCC isoschizomer of <u>Hgi</u> CI
<u>Ban</u> II	IAM 1077	GPuGCPy↓C new enzyme
<u>Ban</u> III		AT↓CGAT isoschizomer of <u>Cla</u> I
<u>Mro</u> I	<u>M. roseus</u> S	T↓CCGGA isoschizomer of <u>Acc</u> <u>III</u> and <u>BspM</u> <u>II</u>
<u>Eco</u> <u>ICR</u> I	<u>E. coli</u> 2bT ICR 0020	GAGCTC isoschizomer of <u>Sst</u> I
<u>Gin</u> I	<u>G. gluconicus</u> IFO 3260	GGATCC isoschizomer of <u>Bam</u> HI
<u>Mau</u> I	<u>M. aurantiacus</u> IFO 12422	CTGCAG isoschizomer of <u>Pst</u> I
<u>Pai</u> I	<u>P. alkaligenes</u> ATCC12815	GGCC isoschizomer of <u>Hae</u> III
<u>Pan</u> I	<u>P. alkanolytica</u> IF012319	C↓TCGAG isoschizomer of <u>Xba</u> I
<u>Ppu</u> I	<u>P. putida</u> C-83	GGCC isoschizomer of <u>Hae</u> III
<u>Spa</u> I	<u>S. phaeochromogenes</u> IFO 3108	GCATGC isoschizomer of <u>Sph</u> I

検索した菌株のなかからAat II, Ban II の二つの新しい特異性をもつ制限酵素を見いだした。その他 isoschizomer として Aat I, Ban I, Ban III, Mro I について特異性を塩基配列レベルで調べ識別する塩基配列と切断部位を決定した。これらの酵素の酵素的性質をそれぞれ検討した。

第2章 Ban I と Ban III 制限一修飾系の E. coli へのクローニングと発現

第1節 緒言

制限一修飾系は二つの遺伝子、即ちエンドリボヌクレアーゼをコードする遺伝子(R)とメチルトランスフェラーゼ(M)をコードする遺伝子から成り立っている。この二つの遺伝子は同一の特異的DNA塩基配列を識別する。この制限修飾酵素系が1970年⁵⁾に発見されて以来、このII型制限酵素は分子生物学、遺伝子工学等のさまざまな研究分野で必須の道具として使われてきた。一方これらの研究試薬酵素を多数常に利用することは、高価なものとなり安く供給することが望まれている。これを解決する方法としてつぎのようなことが考えられる。1) isoschizomerで生産性の高い菌株を検索する。2) 制限修飾系の遺伝子をクローニングして強く発現させる^{7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16)}。

1)についてはII型制限酵素が発見されて以来、新しい特異性の酵素を検索するなかで、多数のisoschizomerが見いだされており⁶⁾、isoschizomerでも実用化されているものがある。しかしながら目的の酵素を収量高く生産する菌株をみつけることは容易でない。このため近年2)の方法で生産性を向上させる試みが行われている。同時にその菌株の制限修飾系機構の解明についても関心が寄せられている。特に同じ細胞から1種以上のII型制限酵素を生産する時相互の精製分離が困難である場合、2)の方法は効果的と考えられる。B. aneurinolyticus IAM 1077は前章でBan I, Ban II, Ban IIIの3種類の酵素を生産することを論述した^{35, 36)}。しかしこれらの酵素を工業的に生産する時、再現性高くお互いの分離精製を完全におこなうことが難しいという問題に遭遇した。これを解決して純度の高い酵素を収量高く得るために各遺伝子をクローニングし大腸菌内で発現させることがもっとも良い方法と考えられる。同時に同一の菌株におけるこれらの3種の制限一修飾系の遺伝子の関係も興味ある課題であり、クローニングと発現を検討した。

第2節 実験材料及び方法

菌株と培地

Bacillus aneurinolyticus IAM 1077 は東京大学応用微生物研究所から分与された。使用大腸菌は E. coli HB101 [pro leu thi lacY hsdR hsdM ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 endA1 recA rpsL20] と E. coli JM109 [recA endA1 gyra thi hsdR supE44 relA1(lac pro), F' traD proAB lacZ m15] である。

使用したベクターは E. coli HB101に保持されていたpBR322を用いた。Phage virは京都大学理学部山岸秀夫博士から分与された。Bacillus aneurinolyticus IAM 1077 と E. coli は LB培地でそれぞれ37 °C, 30 °Cで培養した。

酵素と試薬

制限酵素, T4 DNA ライゲース, バクテリア アルカリフェオスマーカーは東洋紡製を使用した。他の試薬は一般市販の試薬グレードを使用した。

DNAの取扱い

B. aneurinolyticus IAM 1077を好気的にLB培地で30°Cにて静止初期まで培養した。バクテリア染色体DNAは Harris-Warrick et al⁵⁷⁾ の方法で精製した。プラスミドの調製, 大腸菌の形質転換, 制限酵素マッピング, アガロースゲル電気泳動は標準方法にて行った⁵⁸⁾。

BanI及びBanIII制限-修飾系遺伝子のクローニング

B. aneurinolyticus IAM1077の染色体DNAを Sau3AIで部分分解した。この部分消化DNAをT4 DNA ライゲースで予め BamHIで消化しバクテリアアルカリフェオスマーカーで処理したプラスミドpBR322にライゲーションした。このようにしてライゲートしたDNAを E. coli HB101への形質転換に使用した。形質転換後50 μg/mlのアンピシリンを含む LB培地500 mlで飽和状態まで生育させた後、菌体を集めプラスミドの調製に使用した。調製したプラスミドを BanIまたは BanIII 制限酵素で消化し、切断されなかったプラスミドを E. coli HB101に再形質転換した。生育した個々のコロニーから得られたプラスミドの BanIまたは BanIII 制限酵素に対する感受性

を調べた。また同時に個々のコロニーからの細胞抽出液に下記に示す方法でBanIまたはBanIII制限酵素活性が存在するか調べた。

BanIまたはBanIII制限酵素活性の検出

クローンニングしたBanIまたはBanIII制限-修飾系遺伝子を保持する *E. coli* HB 101を充分生育させた培養液1mlから菌体を集め50 mM Tris-HCl(pH8.0)で洗浄し20mM Tris-HCl(pH7.5)-7 mM 2-mercaptoethanol-10mM MgCl₂0.5mlに再懸濁後超音波破碎した。破碎液を遠心分離し得られた上澄みの酵素活性を測定した。BanIおよびBanIII制限酵素活性は次のようにして測定した。BanI測定には50 μlの液量中1μgのλ-DNA, 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 10 mM MgCl₂, 1mM dithiothreitolからなっている組成の反応液を使用した。BanIII測定には50 μlの液量中1μgのλ-DNA, 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 10 mM MgCl₂, 1mM dithiothreitolを含有している反応液を使用した。反応はすべて37 °Cで1 hr行い1%アガロースゲル電気泳動を行い分析した。

In vivo 制限活性の測定

非修飾 (nonmodified)と修飾(modified)phage virはpBR322を保持する*E. coli* HB 101あるいはBanIまたはBanIII制限-修飾系遺伝子を組み込んだプラスミドをもつ*E. coli* HB 101に感染させることにより調製した。in vivo 制限活性の測定は制限比率で測定した。Plating効率(e. o. p.)はDavisら⁵⁹の標準法で決定した。

第3節

実験結果

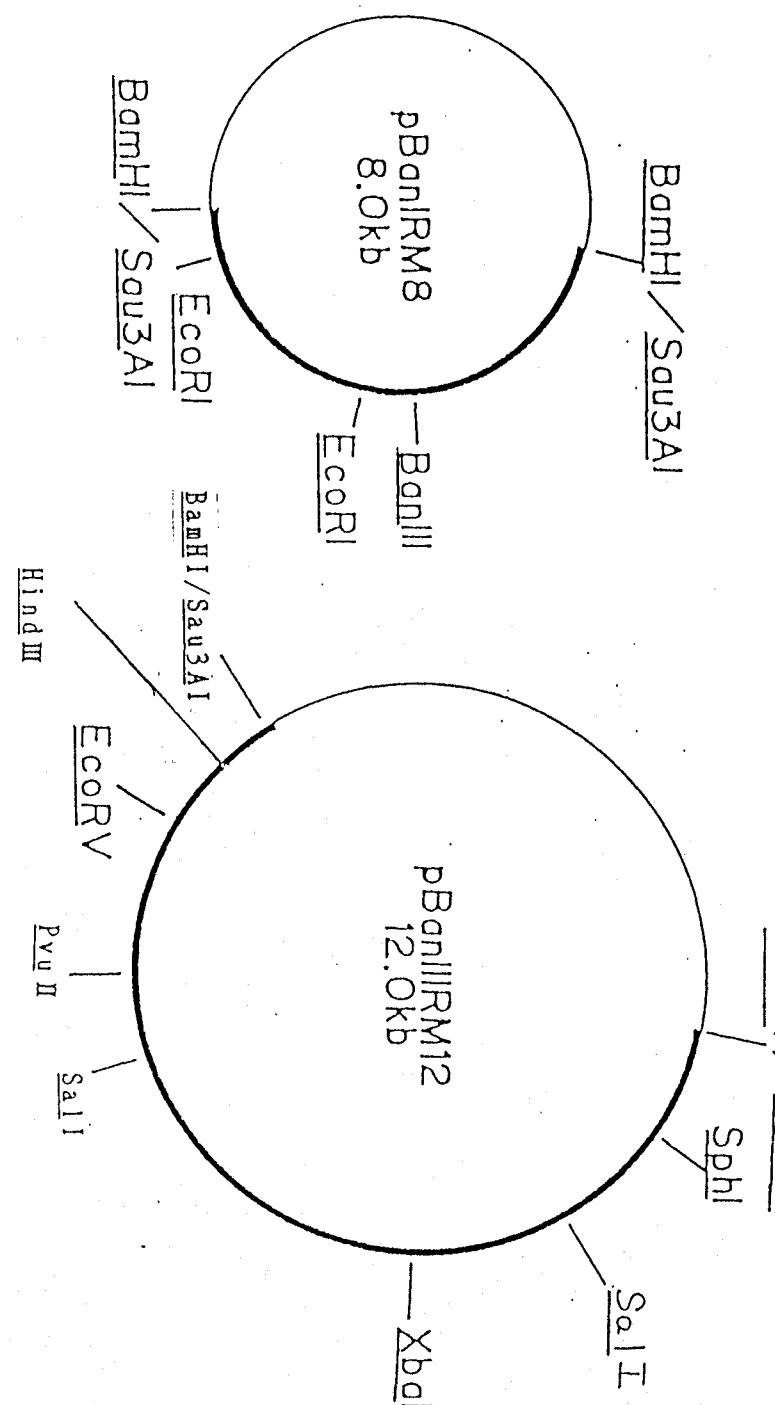
3-1. BanIおよびBanIII制限-修飾系遺伝子のクローニングと発現

BanIおよびBanIII制限-修飾系遺伝子をもつ組換えプラスミドを上記の実験方法で記載した選択方法で分離した。それぞれの酵素処理で耐分解性を示したプラスミドのうちでpBanIRM8とpBanIRM12を取得した(Fig. 1)。プラスミドpBanIRM8はBanIによる分解にたいして抵抗性がありプラスミドpBanIII RM12はBanIIIによる分解にたいして抵抗性があった。これらのプラスミドはそれぞれの制限酵素の認識塩基配列が各メチルラーゼによりメチル化されているためであり、メチラーゼがクローニングされたことを示している。pBanIRM8およびpBanIII RM8をもつ菌株の培養液からそれぞれ菌体を集め超音波破碎で抽出液を調製し、これらの抽出液の制限酵素活性を方法の節で記載した方法で測定した。その結果、pBanIRM8をもつ菌株から得た抽出液からBanI活性が検出できた。またpBanIII RM12をもつ抽出液からBanIII活性が検出できた。Table 1に示すように組換えプラスミドpBanIRM8をもつE. coli HB101はB. aneurinolyticusに比べBanIを約10倍、組換えプラスミド pBanIII RM12をもつE. coli HB101はBanIIIを約50倍生産した。組換えプラスミドpBanIRM8およびpBanIII RM12を種々の制限酵素で消化し制限酵素地図を作成した。その作成したpBanIRM8および pBanIII RM12のマップを示す。(Fig. 2), (Fig. 3)

Table 1 Production of BanI and BanIII endonucleases

Strain	<u>BanI</u> Activity (u/ml broth)	<u>BanIII</u> Activity (u/ml broth)
<u>B. aneurinolyticus</u> IAM 1077	0.1	0.02
<u>E. coli</u> HB101(pBR322)	0	0
<u>E. coli</u> HB101(pBanIRM8)	1.0	0
<u>E. coli</u> HB101(pBanIII RM8)	0	1.0

A



B

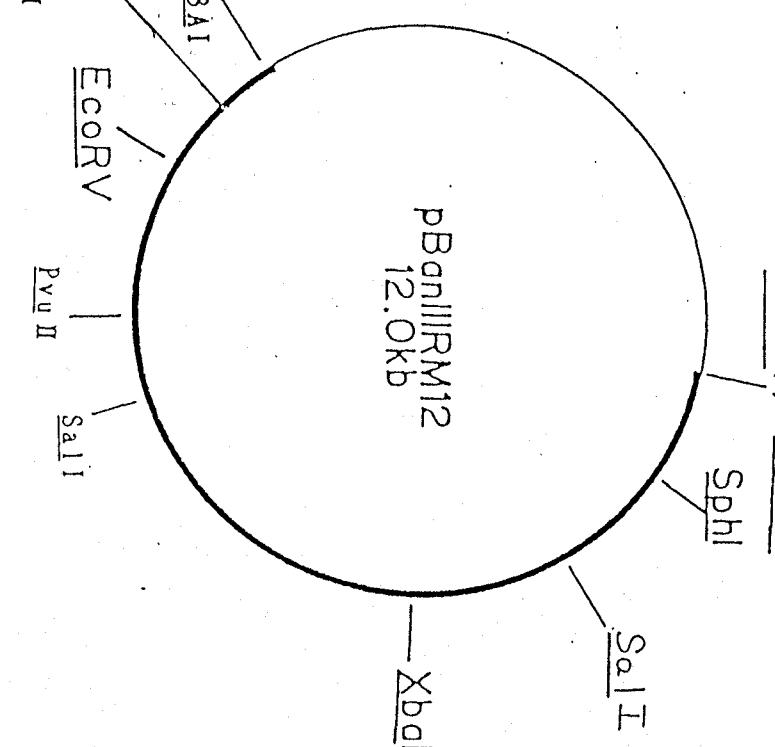
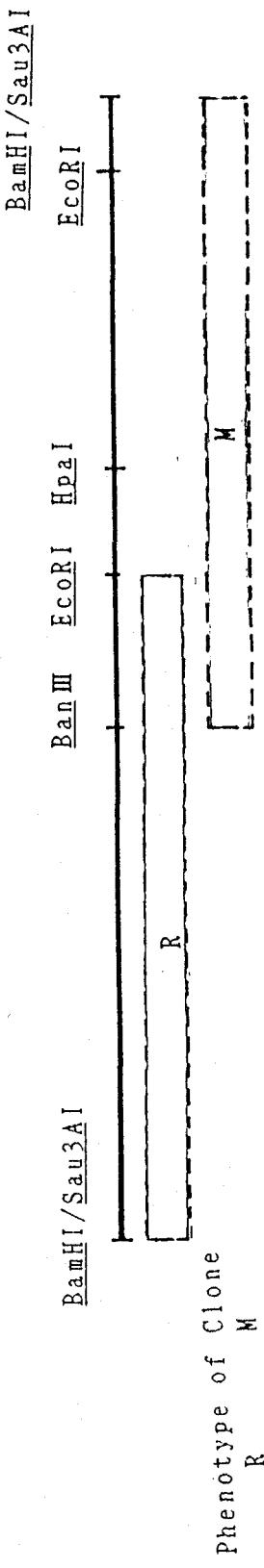


Fig. 1. Physical maps of plasmid pBanIRM8 (A) and pBanIRM12 (B).
The thin lines represent that pBR322 moieties and thick lines cloned DNA
moieties.



65

Fig. 2. Deletion derivatives derived from pBanIRM8.

The horizontal coordinate in the right part of the figures represents the physical map of 3.1 kb insert. Coding regions of the BanI restriction-modification system and remaining portions of the insert in derivatives are indicated by open box and lines, respectively. In the left part, the name of the derivatives and R-BanI(R) and M-Ban(M) activities, which were expressed in cells, are indicated. R-BanI activity was assayed *in vitro* as in the method section. M-BanI activity was assayed *in vivo* as in the method section.

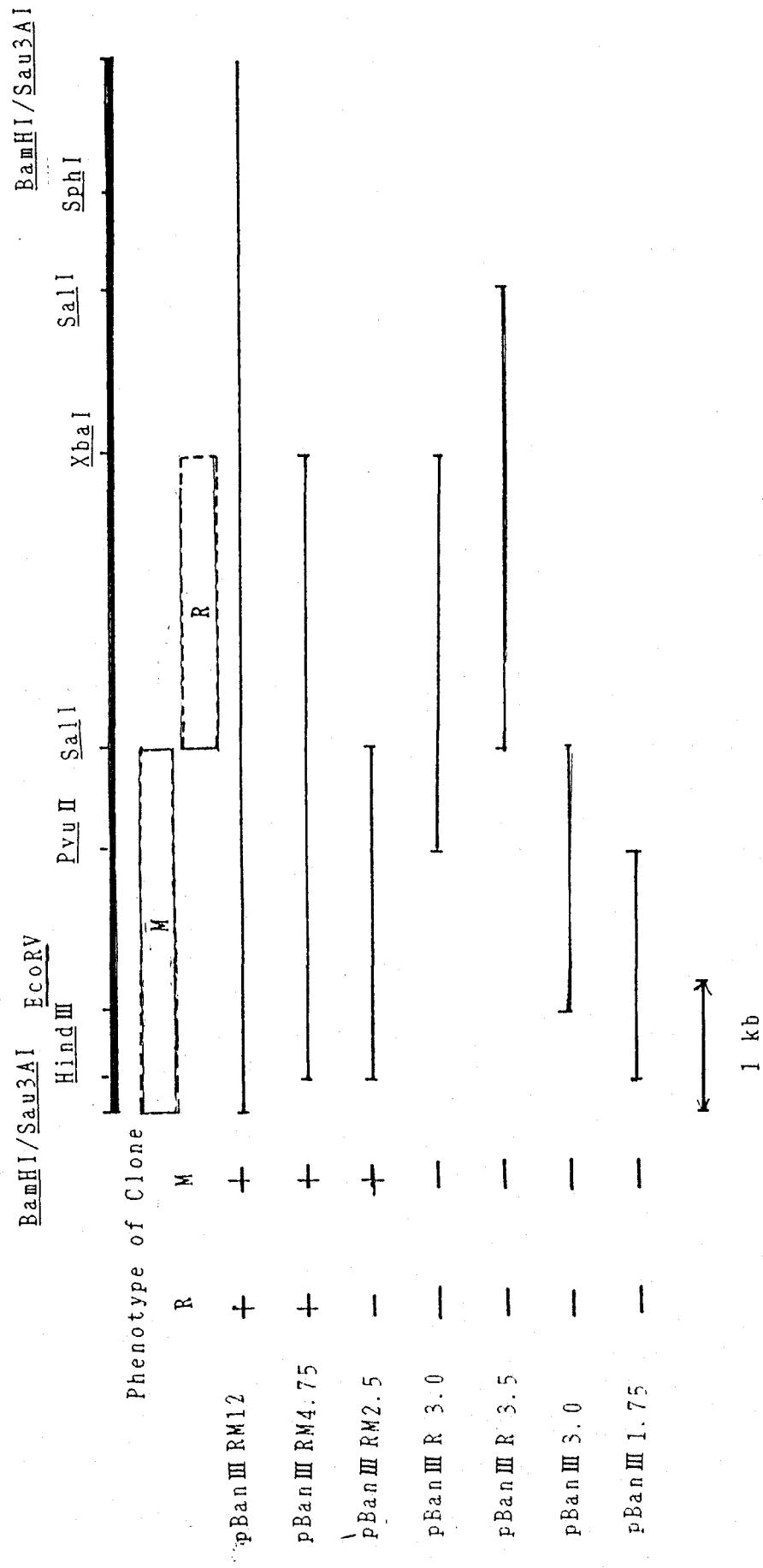


Fig. 3. Deletion derivatives derived from pBanIII RM12.

The horizontal coordinate in the right part of the figures represents the physical map of 8.1 kb insert. Coding regions of the BanIII restriction-modification system and remaining portions of the insert in derivatives are indicated by open box and lines, respectively. In the left part, the name of the derivatives and R-BanIII (R) and M-BanIII (M) activities, which were expressed in cells, are indicated. R-BanIII activity was assayed *in vitro* as in the method section. M-BanIII activity was assayed *in vivo* as in the method section.

3-2. BanIおよびBanIII制限-修飾系遺伝子の位置

pBanIRM8 および pBan_{III}IRM12上の制限-修飾遺伝子の位置を決定するため一連のサブクローン変異を作成し E. coli 上の制限-修飾の表現型を示す能力をしらべた。 (Fig. 2, Fig. 3)。個々のフラグメントを pBanIRM8 に対しては予め対応する制限酵素で切断した pUC18 に連結した。同様に pBan_{III}IRM12 に対しては M13mp18 に連結した。この様にして得た pBanIM1.7 は修飾の表現型をしめしたが、制限の表現型を示さなかった。pBanIRM8 から得たサブクローンの pBan11.0 pBan10.7 pBan11.4 はいずれも修飾、制限の両表現型を示さなかった。また、pBanIRM8 の挿入断片の EcoRI-BamHI/Sau3AI 断片を pUC18 に連結することを試みたがクローニングが生育せずこの断片を組み込んだ pUC18 の取得は不成功に終わった。他の断片の挿入を試みたが制限遺伝子のみをもつクローニングは得られなかった。これらの結果から EcoRI-BamHI/Sau3AI 断片には制限酵素の遺伝子がふくまれていると推測された。以上のサブクローニング分析の結果から、BanI 制限酵素系遺伝子の位置を決定できた。BanI 制限酵素系遺伝子のおよその位置を Fig. 2 に示す。

他方 pBan_{III}IRM12 に関してもサブクローンを行った。pBan_{III}RM4.75 は制限系、修飾系いずれの表現型をも示す。pBan_{III}M2.5 は修飾系の表現型を示すが、制限系を示さない。pBan_{III}RM3.0 pBanRM_{III}3.5 いずれも制限系は示すが、修飾系は示さない。BanIII では制限遺伝子だけ含むクローニング (pBanR 3.5) が修飾系が存在しない場合でも生存できた。pBan2.0 および pBan1.75 は制限、修飾いずれの表現型も示さなかった。これらの結果から得た BanIII 制限修飾遺伝子のおよその位置を Fig. 3 に示す。

3-3. バクテリアファージの制限

In vivo 制限活性の測定は λ -phage の plating の効率 (efficiency of plating) を測定することで行った (Table 2)。まず E. coli HB101 (pBR322) で調製した λ -phage の各プラスミドをもつ E. coli HB101 に対する plating の効率を調べた。その結果 E. coli HB101 (pBR322) で調製した λ -phage は E. coli HB101 (pBR322) に対する plating 効率 1 に比較して E. coli HB101 (pBanIRM8) のそれは、 7×10^{-5} e. o. p. であつ

た。他方 E. coli HB101(pBanIII RM12)では 4.5×10^{-1} e. o. p. を示し約1/10であった。E. coli HB101(pBanIRM8)で調製したphageはそれぞれの菌株に対しplatingの効率に顕著な差が認められなかった。しかしE. coli HB101(pBanIII RM12)で作成したλ-phageはE. coli HB101(pBanIRM8)に対し顕著な制限を受けた。また,E. coli HB101(pBanIRM8)で調製したλ-phageから抽出したDNAはBanI消化に対し耐性であり修飾されていることが判った。他方,E. coli HB101(pBR322)で調製したnon-methylated phageは完全にBanIで制限されるがBanIIIではわずか制限されるだけであつた。この様にE. coli HB101(pBanIRM8)にはphageを制限する系の存在を確認したが一方それに対応する修飾系がまだ存在するように考えられた。これを証明するためE. coli HB101(pBanIRM8)に入-phageを高タイマーで感染させて得られるphageを用いて検討した。この様にして調製したλ-phageのE. coli HB101(pBanIRM8)に対するplating効率は前回に比較して減少しなかった。このことから修飾系が存在することが証明された。なお pBR322保持する菌株より特別に修飾されることはない。

Table 2 Restriction and modification of λ vir by hybrid clones

phage-prepared Strains	Efficiency of plating of λ <u>vir</u> on strains pBR322/HB101 pBanIRM8/HB101 pBanIII RM12/HB101		
<u>E. coli</u>			
HB101(pBR322)	1	7×10^{-5}	0.45
HB101(pBanIRM8)	1	0.36	0.1
HB101(pBanIII RM12)	1	3.5×10^{-5}	0.7

3-4. 形質転換頻度の宿主依存性について

pBanIRM8およびpBanIRM12の形質転換力をE. coli HB101及びE. coli JM109をつかってpBR322のそれと比較した。両プラスミドpBanIRM8およびpBanIRM12を、それぞれE. coli HB101に形質転換するとTable 3に示すようにpBR322のそれと効率に顕著な差がなかった。しかしながらE. coli JM109はpBanIRM12で効率よく形質転換されたがpBanIRM8ではきわめて低い効率であった。(Table 3)

Table 3 Host dependence of transformation efficiency

Plasmid	Host strain	Transformation efficiency (1/ug)
pBR322	HB 101	1.4×10^6
	JM 109	1.1×10^6
pBanIRM8	HB 101	3.0×10^5
	JM 109	6.0
pBanIRM12	HB 101	7.0×10^4
	JM 109	6.0×10^4

第4節 考察

本節ではBacillus aneurinolyticus IAM1077からBanI, BanIII制限修飾系をE. coliにクローニングしその結果、BanI, BanIII制限修飾活性を増加させることに成功した。pBanIRM8がBanI制限酵素の切断にたいして抵抗性を示し、またpBanIRM12はBanIII制限酵素活性の切断に抵抗性を示した。E. coli HB101(pBanIRM8)とE. coli HB101(pBanIRM12)はBanI, BanIIIそれぞれ生産することを示した。サブクローニング実験ではpBanIRM12の5.0kb HindIII-XbaI断片がBanIII制限修飾系に必須であることを示した。これらの結果からBanI, BanIII制限修飾系遺伝子がクロモゾーム上近くに位置していない事を示している。

E. coli HB101(pBanIII RM12)ではなく E. coli HB101(pBanIRM8)が phageの増殖を制限することは興味ある事実である。同様な関係がM13mp18 phageに観察された。即ち、E. coli JM109(pBanIII RM12)ではこのphageは生育することが出来るがE. coli JM109(pBanIRM8)では出来ない。この相異に関与する機構はまだあきらかでないが BanI, BanIII 系間の制限修飾化の速度によるのではないかと考えられる。Ban III 修飾制限型と同様な現象として、TagIの制限修飾系を挿入したプラスミドを持つE. coli株にphageに対する弱い制限が存在することが報告されている⁶⁰⁾。

他の興味あることはBanIII 制限遺伝子のみをもつクローニングが、BanIII 修飾遺伝子が不在でも生存できることである。BanIII 制限修飾系では他の多くの制限修飾系と異なって制限遺伝子は修飾遺伝子がなくても致命的なものでないということである。これと同様な性質はTagIの制限修飾系に報告されている⁶¹⁾。この機構はまだ明らかにされていないが、これはE. coliのdam メチレーションや上記したように外因性のファージを制限する活性に関係しているのかもしれないと考えられる。

E. coli HB101及びE. coli JM109の形質転換効率はpBanIRM8とpBanIII RM12の間に相異が見られることを示した。pBanIRM8とpBanIII RM12はE. coli HB101を効率よく形質転換するがE. coli JM109の効率高い形質転換はpBanIII RM12のみにみられた。

(Table 3). Raleigh et al⁶²⁾ は 5-メチルシトシンを含むDNAがE. coli JM107により生物学的に制限されるが6-メチルアデニンを含むDNAは制限されないことを報告している。これらの結果はBanIメチラーゼがシトシンメチラーゼであり Ban III メチラーゼはアデニンメチラーゼであることを示唆している。

第五章 要約

Bacillus aneurinolyticus IAM 1077の生産する制限酵素BanIとBanIIIをコードする遺伝子をクローニングしE. coliで発現させた。生産性は元の親株にたいしBanIは10倍、BanIIIは50倍向上した。BanI制限-修飾系遺伝子を組込んだプラスミドpBanIRM8とBanIII制限-修飾系遺伝子を組込んだプラスミドpBanIII RM12それぞれをサブクローニングしその表現型をしらべ挿入断片ないの両遺伝子の位置を決定した。

BanI制限-修飾系遺伝子を組込んだプラスミドを持つE. coliが生育するためには修飾遺伝子を必須とするが、BanIII制限-修飾系の場合、制限系の遺伝子のみを持つクローニングでも生育することができ、制限修飾系に大きな差があることが認められた。BanI遺伝子(pBanIRM8)およびBanIII遺伝子(pBanIRI RM12)はいずれもE. coli HB101で効率よく形質転換されることがわかった。しかしながらバクテリオファージの生育はpBanIRM8を保持するE. coli HB101で顯著に制限された。E. coli JM109ではpBanIRI RM12は効率よく形質転換されるがpBanIRM8はきわめて低い形質転換効率を示し制限されることがわかった。この様にBanI制限-修飾系とBanIII制限-修飾系間に制限活性に著しい差があることを認めた。

第3章 Bacillus aneurinolyticus IAM1077の 制限一修飾系遺伝子の塩基配列決定

第一節 緒言

II型制限酵素は前章で述べた様に二つの遺伝子、即ちデオキシヌクレアーゼをコードする遺伝子とメチルトランスフェラーゼ(methylase)をコードする遺伝子から成り立っている。両酵素は同一のDNA配列を認識する。Walderら⁷⁾はPstI制限修飾系の両酵素をクローニングし発現させている。また遺伝子の塩基配列を決定し両酵素をコードするDNAフラグメントのサイズは約4,000塩基対でありこの中にこの系の内因性のプロモーターを含んでいることを明らかにしている。ミニセル法で二つの酵素分子量を決めメチルトランスフェラーゼは32,000であり、PstI制限酵素は35,000であることを報告している。H. Shonerら⁸⁾はHhaII制限修飾系遺伝子をクローニングし修飾遺伝子は長さ513塩基対であり、制限遺伝子は長さ681塩基対であることを決定した。両遺伝子は21塩基対離れて位置し内因性のプロモーターは挿入DNA上に含まれずベクター由来のプロモーターで転写が行われていることを報告している。Kissら⁹⁾はBsuRIの制限修飾系の塩基配列を決定し両酵素のアミノ酸配列を推定し両酵素のホモロジーは差が無いがBsuRI メチラーゼと他のGGCCを認識するメチルトランスフェラーゼBspRI メチラーゼ、SPR メチラーゼとはホモロジーを示す領域があることを報告している。Howardら¹⁰⁾はシトシンメチラーゼであるDdeI修飾系をクローニングしE. coliRR内ではmethylation活性が増加するとDdeIメチラーゼのクローンは生存率が低下することを見つけている。然るにシトシンメチラーゼを受け入れるようにされているE. coliER1467ではDdeI制限修飾系がクローニングされ維持されることを報告している。更にDdeI制限修飾系では高レベルのメチル化がE. coli内で制限酵素遺伝子を発現させるため必要であるとしている。その他、SinI¹²⁾, EcoR II¹³⁾, BepI¹⁶⁾, Hpa I⁵⁵⁾, MspI⁵⁶⁾についてそれらの制限修飾系について報告されている。

先に、Bacillus aneurinolyticus IAM 1077の制限-修飾系の酵素にはBanI, BanII, BanIIIの3種のII型制限酵素とメチルトランスフェラーゼがありその特性を明らかにした(第1章)。ついで各酵素の生産性と分離精製を向上させるためE. coliにクローニングを行い三種の酵素中BanI, BanIIIのクローニングに成功し酵素を発現させた(第2章)。更に本章ではBanI制限-修飾系遺伝子をコードする塩基配列を決定した、挿入DNAの塩基配列の決定、両酵素を電気泳動的に单一まで精製し、精製酵素のN-末端のアミノ酸配列、両酵素の分子量をきめた結果から両遺伝子の位置、分子量、アミノ酸配列のホモロジーについて論述する。

第2章 実験材料及び方法

使用菌株と培地

使用した菌株及び培地は第2章と同一である。

酵素と試薬

使用した制限酵素、修飾酵素は東洋紡製品を使用した。また塩基配列決定に使用したにはSequenase™を使用した。

DNAの取扱

第2章と同一である。

R-BanIとM-BanI活性の測定

R-BanI活性の測定は第2章と同一である。M-BanI活性は細胞破碎液を1μg入-DNA, 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 7 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂, 80 mM S-adenosyl-L-methionineを含む反応液50 μlで37 °Cで1 hrインキュベートとした。反応を15 min 65°Cで加熱して停止させる。次にR-BanI10 単位を加え溶液に1 hr, 37°Cでインキュベートした後生成物を1%ゲル電気泳動で分析した。

R-BanIの精製

pBanIIRM8を保持する菌体約10gを 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 7 mM 2-mercaptoethanolからなる緩衝液500 mlで懸濁し超音波で菌体を破碎する。菌体残査を遠心分離（20 min, 8,000rpm）で除去し上澄みを得る。上澄みに固体食塩を加え最終濃度を0.2 M NaClとし10%ポリエチレンイミン溶液を加えて 最終濃度0.2%とし、沈澱を生成せしめ、遠心分離で除去する。この後固体硫酸安を70%飽和になるように加えた。生成した沈澱を遠心分離で集め、10 mM リン酸カリ(pH7.5), 7 mM 2-mercaptoethanol, 5% glycerol (緩衝液 A)で溶解し、同一緩衝液で透析した。透析した溶液をホスホセルロースカラム(whatman p11 6 x 10 cm)にチャージした。これをNaClの直線濃度勾配(緩衝液A→緩衝液 A+1M KC1, 800 mlずつ)で溶出した。BanI活性は 0.4-0.5 M NaClで溶出された。ホスホセルロースカラムからの溶出された活性画分をヒドロキシアバタイトカラム(生化学工業3 x 15 cm)に吸着させた後リン酸カリ緩衝液(pH7.5)の直線濃度勾配(0.01→0.5 M, 320 mlずつ)で溶出した。活性画分は0.15-0.2 Mの緩衝液濃度で溶出された。活性画分を緩衝液Aで透析した後、予め 緩衝液 Aで平衡化したDEAE-セファロースカラム(Pharmacia 1.5X 15 cm)に吸着させた。活性はカラム通過液に回収された。酵素活性画分をプールした後PEG6000とglycerolで濃縮し、-20 °Cで貯蔵した。

M-BanIの精製

pBanIM4を保持する菌体(約100g)を10 mM Tris-HCl, pH7.5, 10 mM MgCl₂, 7 mM 2-mercaptoethanol溶液500mlに懸濁し超音波破碎した。細胞残査を除去後、上澄みを予め緩衝液 Aで平衡化したDEAE-セファロースカラム(Pharmacia, 6 x 10 cm)に吸着させNaClの直線濃度勾配(緩衝液 A→緩衝液 A+1M NaCl200 mlずつ)で溶出した。M-BanI活性は0.3-0.4 M NaClで溶出された。活性画分を緩衝液Aで透析した後、ホスホセルロースカラム(Whatman p11 3 x 15 cm)に吸着させNaClの直線濃度勾配(緩衝液 A→緩衝液 A+1M KC1, 100 ml ずつ)で溶出した。活性画分を集めPEG6000とGlycerol)で濃縮し-20°Cで保存した。

ゲル泳過による分子量の決定

酵素の元の形のおよびその分子量をセファクリル S-200カラム (Pharmacia LKB Biotechnology 2 X 40 cm)によるゲル泳過で決定した。最終精製段階における各酵素の活性ピークと標準タンパクマーカー (aldolase, bovine serum albumin, egg albumin, chymotrypsin)の混合物をカラムに吸着させ0.5M NaClを含む緩衝液Aで溶出し溶出フラクションを照合することで決定した。

DNA sequencing

DNA塩基配列の決定は dideoxy chain termination法でSequenaseTMを用いて行った。作成したサブフラグメントは M13mp18あるいは pUC18の適当な位置に挿入して鋳型を作成した。pBanIRM8およびpBanIM4の幾つかの領域はDNA synthesizer 381A(Applied Biosystems)で適当に合成したプライマーを使って直接塩基配列を決めた。R-BanI, M-BanI遺伝子の両DNA鎖を完全にシーケンスした。

N-末端アミノ酸の配列の決定

HPLC 120Aとon-lineでつながっている蛋白アミノ酸シーケンサー470A(Applied biosystem)を使ってN-末端を決定した。

第3章

実験結果

3-1 BanI制限酵素及びBanIメチラーゼの発現

前章で述べた様に生存選択操作で分離した組換えプラスミドの制限酵素BanIに対する耐性をしらべ、その内のクローンの一つpBanIRM8と命名したクローンは BanIにたいし 耐性が認められた。pBanIRM8をもつHB101培養し培養液から菌体を集め破碎し抽出液を調製し制限酵素活性を実験方法の節で記載した方法で測定した。Bacillus aneurinolyticus IAM 1077では0.1単位/mlの生産性に対し, E. coli HB101(pBanIRM8)はBanI1単位/mlを生産し約10倍生産性が増加した。pBanIRM8を種々の制限酵素で消化し制限地図を作成した。挿入された断片内の制限遺伝子、

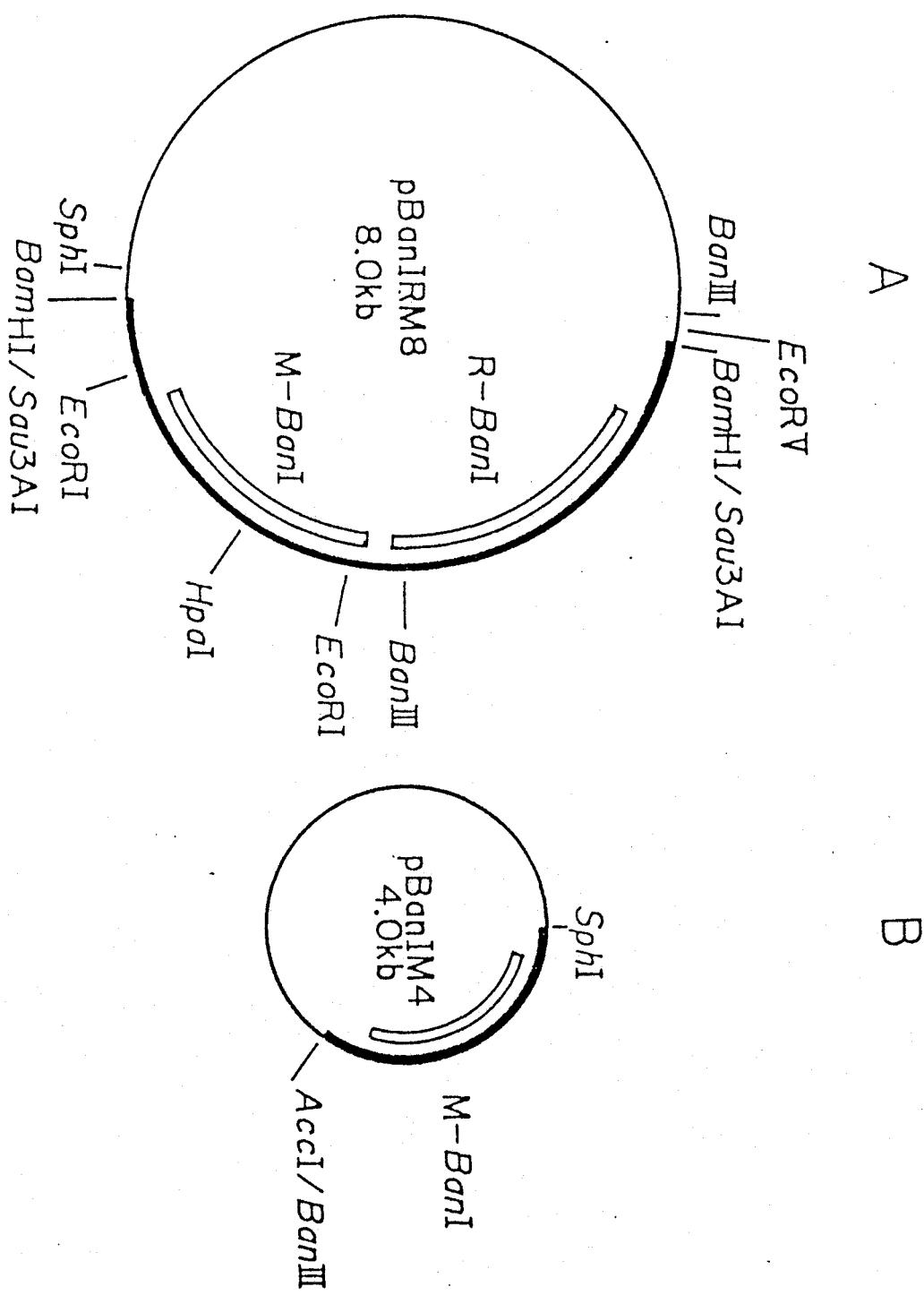


Figure 1. Physical maps of plasmid pBanIRM8(A) and pBanim4(B).

The thin lines represent the pBR322 or pUC18 moieties and thick lines cloned DNA moieties. Open boxes inside the circle show the coding regions for R-BanI and M-BanI, assigned by deletion and sequencing analyses.

修飾遺伝子の両遺伝子の位置を決めるため欠失変異クローンを調製し、*E. coli*に対する制限-修飾の表現型を調べた。制限酵素遺伝子と修飾酵素遺伝子の位置をFig. 1に示した（詳細は第2章で論述した）。次にBanIメチラーゼ遺伝子のみ保持するプラスミドを構築した。プラスミドpBanIRM8をBanIIIとSphIで消化し生じたDNA断片約1.3kbをAccIとSphIで予め切断しておいたpUC18に挿入し組み換えpBanIM4を作成した。プラスミドpBanIM4はBanI分解にたいして耐性を示した。しかし*E. coli*HB101(pBanIM4)を培養し菌体を集めその抽出液の活性を調べるとBanI制限酵素活性は検出されずメチラーゼ遺伝子のみが挿入されていることがわかつた。

3-2 BanI制限-修飾系酵素の分子量

BanI制限-修飾系酵素をpBanIM8, pBanIM4それぞれからの菌体から精製し、ゲル汎過法で分子量を決定した(Fig. 2)。分子量標準マーカーとの相対溶出パターンから制限酵素とメチラーゼの分子量をそれぞれ72,000と45,000と決定した。また280 mMの吸光度パターンと酵素活性パターンは殆ど一致した。この吸収パターンのピーク画分をとりSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行うと、BanI制限酵素とBanIメチラーゼは分子量38,000と44,000と推定された(Fig. 3)。この結果は制限酵素がダイマー酵素でありメチラーゼがモノマー酵素であることを示す。

3-3 DNA 塩基配列

プラスミドpBanIRM8に挿入されている3.1kbの塩基配列を決定した(Fig. 4)。その結果決定した塩基配列よりの分析により1,062ヌクレオチドと1,287ヌクレオチドの二つの重複しない大きなopen reading frameがあることがわかつた。これらの二つのopen reading frameは同じ方向を向いておりその位置は欠出分析と一致した。制限酵素遺伝子のopen reading frameではATGコドンがヌクレオチド502位置にあり終止コドンは1564にある。DNA配列より予測されたBanI制限酵素の分子量がSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される制限酵素の分子量とよく一致することから開始コドンは502ヌクレオチドの位置にあることが判った。更に

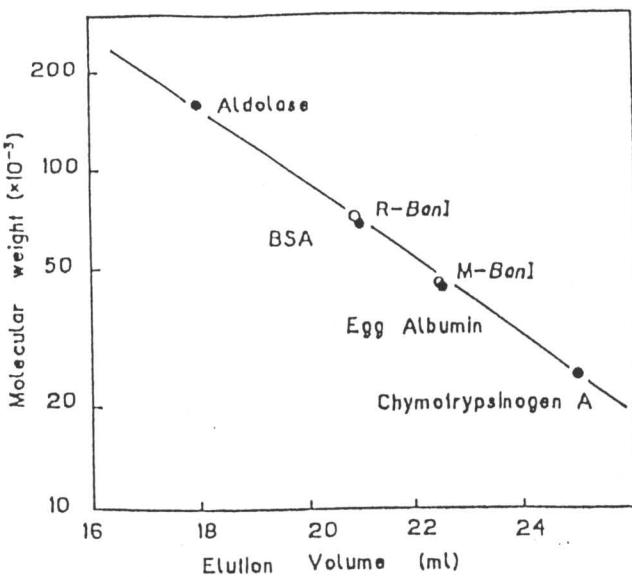


Figure 2. Estimation of the molecular weights of BanI enzymes by gel filtration. Activity peaks in the final purification step of R-BanI and M-BanI and molecular weight markers were chromatographed on Sephadryl S200 columns, and elution volumes at peak positions were plotted as the logarithmic function of molecular weights.

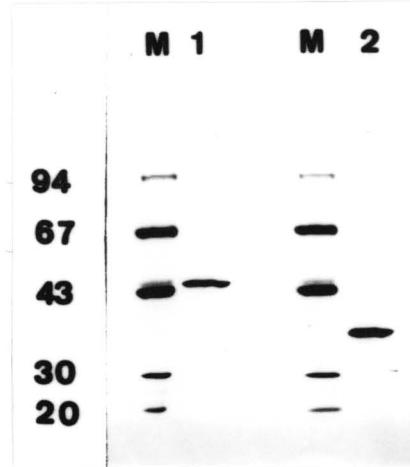


Figure 3. Estimation of molecular weights of BanI enzymes by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular weight markers (lane M) and activity peaks of M-BanI (lane 1) and R-BanI (lane 2), eluted from the sephadryl columns, were electrophoresed on gradient SDS-polyacrylamide gels (10-20%), and made visible with Silver Stains. Numbers by the side of the lane M are molecular masses in kilodaltons of marker proteins.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 ATCAAATGCCAATGCTTACCCGCGCCCCAAAGGCTTGATCAGCCGTTGGACACCATTCGACCACTAACGCCGAAACCTAATCTATCACTGAACTCCGCTAC
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 CC30GCCGCCACCTCCGATCTCGAACACGGGGTACAGGACATAGGGCCACCTGGCAATCTCCCATACCACTACGAGGACTCTGACTGTCAGGCAATGAA
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 ACTAAATGCCAATGCTTACCCGCGCTAACTGACTCTACCTAACGCCGTTTAACTTGGCCACACTATTCATTAAGGCTACCGCTAC
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 ACACCTACACTGAAATCACAACTTGGATCTGACCTACACCCCTCTCCCTATAAAATTCTGCTTACGCTAAACGAACTAACCTAACAAAATGATTAATGAA
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CTTTGGAGGTCACATATAAGATCAGCCACGCTTAACTCCAAATAATGATCCTTCCAAAGAACCTGAAAGCTGGCGGTTTCGACCTAACGGACCTGAA
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 ATTATTCCTAACTGCTTAACTCCAACTCCCTTAACTCTGCTTAACTCTGCTTAACTGACCTAACCCCTGGCAATGACCTAACGCTAACTGCAACCTGAA
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
 CTAAAGGCTTGTGTTAACTGACCTTGGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
 GGGAACTTCACTTGGTAACTGAGAAATATGCTGAACTTGGCTTACGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CCACCTCTGTTAACTGATGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GGGACCTGAACTTAACTGAGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CGATTCGGGCTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GGGATTCGATTTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GGGACGGGGAACTTCACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GAAATGTTTGGGAACTTCACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GTATCTCTGAACTTCACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 GGAATTCCTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 TTACAAATCTTGGGACGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 CGTCCTCCGAAACCCGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 TCTTATTAATGAACTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 GAAATCCGATCCGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 CCAAAATGAACTTCACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 AAAGATATTAAGGAACTTCACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 CAAACTTGGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 CACTGCGGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 AACCCGCAAACTTCTCCGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAACTGCTTAA
 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100

Figure 4. The entire nucleotide sequence of the cloned DNA fragment. The potential ribosome-binding sequences are dotted and a pair of arrows show palindromic sequences characteristic of the termination signal. The nucleotide sequence was numbered from one end of the cloned fragment, and its predicted amino acid sequences of the R-BanI and M-BanI coding regions were indicated under the nucleotide sequence.

リボゾーム結合配列、AGGAはATGコドンの6塩基上流に位置していた。また制限酵素BanI遺伝子の開始をN-末端アミノ酸配列分析より検討した。酵素のEdman分解より決定された最初の15のアミノ酸配列はAla-Gln-Leu-Lys-Tyr-Asn-Lys-Asp-Ile-Asp-Glu-Leu-Glu-Arg-Asnであつた。この配列はヌクレオチドの位置502から予測された配列と正しく相応していた。最初のメチオニン残基が無いことはプロセッシングにより除かれたと推定される。

M-BanI遺伝子のopen reading frameでは ATG コドンは1,585の位置にあり終止コドンは2,869の位置していた。DNA配列より予測されたBanIメチラーゼの分子量が SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定されるメチラーゼの分子量とよく一致することから開始コドンは1586ヌクレオチドの位置にあることを認めた。また、リボゾーム結合配列GGAGGがATGコドンの6塩基上流にあらわれた。

BanIメチラーゼ遺伝子の開始コドンをN-末端アミノ酸配列分析より検討した。

BanIメチラーゼの精製酵素をアミノ酸配列をEdman 分解より決定した所最初の15のアミノ酸配列はMet-()-Ile-()-Phe-()-Asp-Leu-Phe-Ala-Gly-Gly-Ileであり、1,585ヌクレオチド配列から予測された配列と一致していた。またメチラーゼ遺伝子の直下流にパリンドロミックな配列が認められた。

3-4 蛋白のアミノ酸配列の比較 (Fig. 5)

コンピューター解析による両BanI酵素の配列比較では 殆ど類似性が認められなかった。メチラーゼと制限酵素の間には同一の塩基配列を識別するが両酵素の間には類似性は認められておらず今まで報告されている制限修飾系¹³⁾と同様な結果を示した。BanIメチラーゼの配列を幾つかのシトシンメチラーゼの報告されている塩基配列と比較するとBanI メチラーゼはシトシンメチラーゼの特徴である幾つかのアミノ酸配列と類似性のあるアミノ酸配列を含んでいた。これらの類似性の認められる配列の殆どはSom et al¹³⁾, Kupper et al¹⁶⁾で定義されている6つのブロックにいれられた。

各ブロックの下に示した様にBanI メチラーゼは対応する位置に共通のアミノ酸を含んでいた。

A	BepI	2	KVLSLFSGCGGMDLGLEGGF	D	BepI	201	VLNAKNYGVAQNRERVIF
	BspRI	59	NVLSLFCGAGGLDLGFELAG		BspRI	225	LLNARDYGVPOIRERVII
	BsuRI	60	NVLSLFCGCGGLDLGFELAG		BsuRI	226	LLNARDYGVPOIRERVII
	NgoPII	13	KIISLFCGCGGLDLGFELAG		NgoPII	154	MANAKDYGVVAQERKRVFY
	SinI	76	KALSFFSGAMGLDLGIEQAC		SinI	245	LYNSANFGVPCIRERVII
	EcoRII	97	RFIDLFAIGGIRKGFTIG		EcoRII	273	KVIDGKHFLPQHRERIVL
	HhaI	13	RFIDLFAGLGGFRLALES CG		HhaI	151	VLNANDYGIPOKRERIYM
	DdeI	2	NIIDLFAQCGGF SHGFKMAG		DdeI	148	ILNACDYGVPOSRQRVFF
	BanI	4	KFVDLFAIGGIRIGFERAA		BanI	146	LLNSSTFGVPONRVRIYI
B	BepI	107	DVVTGGFPQDFSFAGKR	E	BepI	339	RRRLTVRECALIQSFPP
	BspRI	148	NLVIGGPPCPDPFSEAGPR		BspRI	345	RRLSVK EIKRIQTFPD
	BsuRI	149	NLILGGFPOPGFSEAGPR		BsuRI	346	RRLSVK EIA RVQTFPD
	NgoPII	76	DGIIGGPPCQSWSEAGAL		NgoPII	288	RRMTVREVARIQGFPD
	SinI	146	DLIMGGPPCQAFSTAGKR		SinI	382	RPLSVQEYKVVIQQFPE
	EcoRII	178	DVLIA GFPCQPFSLAGVS		EcoRII	409	RRLT PPRECARLMGFEK
	HhaI	73	DILCAGFPCQAFSISGKQ		HhaI	272	RKLHPRECARVMGYPD
	DdeI	68	DGIIGGPPCQGFSLSGNR		DdeI	312	RNF TAREGARIQSFPD
	BanI	68	DFLLAGFPCQPF SYAGKQ		BanI	364	RRIT PPRECARLQGFPD
C	BepI	159	ITKPKV FIAENVKG	F	BepI	369	SASAAYKIIIGNAVPPLL
	BspRI	184	QVQPEIFVAENVKG		BspRI	377	RLDKQYKQIGNAVPVFL
	BsuRI	185	QAQPEIFVAENVKG		BsuRI	378	RLDKQYKQIGNAVPVLL
	NgoPII	113	SKQPKFFLAENVSG		NgoPII	311	NVN DAYKMIGNAVPVNL
	SinI	183	DIRPKYIVI ENV RG		SinI	404	KLLDKYRQI GNA VPI GL
	EcoRII	224	AKKPAIFVLENVKN		EcoRII	435	SDT QSYRQFGNSVVV PV
	HhaI	110	EKKPKVVFMEN VKN		HhaI	294	STS QAYKQFGNSVVINV
	DdeI	104	FFSPKFFVMEN VLG		DdeI	342	KHLSQYQQIGNAVPPLL
	BanI	105	DNRFKAFLLEN VRG		BanI	386	NDNFAYKQLGN SVIVKV

Figure 5. Regions of cytosine methylases where amino acid sequence similarities are most apparent. Amino acids conserved in all the methylases are boxed. Numbers refer to the sequence-positions from the first amino acids of the methylases.

第4章 考察

B. aeuriolyticus は三種の異なった制限修飾系を含んでいるのでこれらの菌体から個々の酵素を別々に分離精製することはきわめて困難であった。これを解決する目的で、大腸菌に BanI 制限-修飾系遺伝子をクローニングしその培養菌体から BanI 制限酵素を電気泳動的に单一までに精製することが可能となった。pBR322の BamHI サイトに挿入して遺伝子をクローニングすることによって BanI 酵素の発現を増加させられることがわかったが、更に tac あるいは ラムダ PL プロモーターがコントロール出来るように遺伝子を挿入すれば、さらに収量を向上させられると思われる。BanI 制限酵素、及び BanI メチラーゼをコードしている遺伝子の塩基配列を決定した。制限酵素遺伝子はメチラーゼ遺伝子と 21 塩基離れて上流に位置し、更に 6 塩基上流にリボーザーム結合配列が存在している。またメチラーゼ遺伝子のすぐ下流にパリンドロミックな配列がありその後チミジン塩基が多い配列が続いていることが認められた。これは転写のターミネーターの構造を示唆しており BanI 制限酵素、BanI メチラーゼが一つのオペロンを形成していると考えられる。

また BanI 遺伝子の塩基配列を B. aeuriolyticus の生産する BanI 制限酵素でなく、E. coli で発現された BanI 制限酵素の N-末端アミノ酸配列にもとづき決定した。しかし Escherichia と Bacillus は遺伝子発現のシグナルが同一であるので、両属で発現されている酵素の構造は同一であると考えられる。

第5章 要約

GGPyPUCCを認識し切断する BanI 制限修飾系遺伝子を B. aeuriolyticus IAM 1077 由来の染色体DNAからクローニングを行い、その塩基配列を決定した。制限-修飾遺伝子は同じDNA鎖にコードされ、制限遺伝子は修飾遺伝子の 21 塩基 b. p. 上流に存

在した。組換え体より制限酵素（R-BanI），修飾酵素（M-BanI）をそれぞれ均一にまで精製した。両精製酵素のN-末端アミノ酸配列 及びサブユニットの分子量は塩基配列の結果と一致した。R-BanIおよびM-BanIIはそれぞれ分子量39,841と42,637のポリペプチドであった。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とゲル沪過による分析でR-BanIはダイマー酵素でありM-BanIIはモノマー酵素であると推定された。両酵素は同じ塩基配列を認識するにもかかわらず両酵素のアミノ酸配列にはホモロジーは認められなかった。他の関連する酵素との比較では M-BanIIはシトシンメチラーゼと共通するアミノ酸配列を含んでいた。

緒言

II型制限酵素として、1970年にはじめて Haemophilus influenzae Rdから分離された制限酵素 Hind II が特定の塩基配列部位 (GTPy↓PuAC) でDNAを切断することが認められた。さらに、Nathansらは、制限酵素をDNAの構造研究に利用してその有用性を明らかにした。その後、DNA分子の特定の塩基配列を認識して切断する酵素の探索が広く各種の微生物について進められて、それらの塩基配列の特異性の解明と利用について研究されてきた。しかしながら切断様式からみて新しい特異性の酵素はまだ見つかる可能性は強く、また利用する側からも新しい型の酵素が要求してきた。また制限酵素の酵素化学的性質は応用面で重要視されている程には検討充分に把握されていないし制限修飾系を構成する制限酵素及び修飾酵素の機能も不明といっても過言ではない。

著者は 新しい塩基配列を認識し切断する酵素、isoschizomerであっても従来酵素に比べ、生産上有利な特徴を持つisoschizomerあるいはDNAの切斷性に特徴のあるisoschizomerを見いだす目的として検索を行った。次に制限酵素 Ban I, Ban III 製造の改良を目的として、組換えDNA技術を用いて制限酵素高生産株の育種を行ない制限-修飾系の検討を行った。さらに Ban I 制限-修飾遺伝子をコードする塩基配列を決定し両酵素の分子量、アミノ酸配列のホモロジーについて検討した。その結果について第1章から第3章に記述した。

緒論：制限酵素の種類、特性、生産菌株の検索、育種について概観したのち、制限酵素の検索、育種に関する研究の背景と意義を説明し、本研究の位置づけを明確にした。

第1章：新特異性を持つII型制限酵素及び従来の酵素と生産性がよいisoschizomerを検索した。制限酵素活性を分析した結果、10種の菌株にその酵素活性をみいだすことができた。酵素活性の認められる菌株より酵素を部分精製し既知酵素によるDNAの切斷パターンと比較した結果から新しい特異性の可能性ある酵素を生産する菌株を選んだ。 Acetobacter aceti IF0 3281 および Bacillus aneurino-

lyticus IAM 1077菌体それぞれから酵素を精製した結果前者はAat I, Aat II, 後者はBan I, Ban II, Ban III生産することがわかった。Aat IIは(5')-GACGTC-(3')を識別しTとCの間を切断し, Ban IIは(5')-GPuCCPyC-(3')を認識しPyとCの間を切断する新しい特異性を有するII型制限酵素であることを明らかにした。その他isoschizomerであるがそれぞれの菌株が生産するAat I, Ban I, Ban IIIの特異性を決定した。またアミノ酸生産菌の生産するMro IはAcc III, Bsp M IIのisoschizomerであるがこれらの酵素とメチル化されたDNAに対する切断性が異なる特徴を有することを明らかにした。これらの制限酵素の酵素的性質を明らかにし遺伝子工学用酵素試薬として使用できる条件を設定した。

第2章: Bacillus aneurinolyticus IAM 1077のII型制限酵素Ban I, Ban IIIを生産に関する遺伝子をクローニングした。組換えプラスミドpBanIRM8はBan I制限酵素による切断にたいし抵抗性を示し、また組換えプラスミドpBanIII RM12はBan IIIに抵抗性を示した。これらの組換えプラスミドをもつE. coli HB101はBan I, Ban IIIを発現し、その生産性は元の親株に比較してBan Iは10倍, Ban IIIは50倍向上した。サブクローニング分析では種々のサブクローンを作成しE. coliにおける表現型をしらべ、そのpBR322に挿入されたDNA断片のなかでBan IおよびBan III制限修飾系遺伝子の位置を決定した。またこれらの組換えプラスミドのλ-virファージの増殖に対する制限をpBanIII RM12は示さないのにたいしてpBanIRM8は強い制限を示し両プラスミドに制限修飾に差があることを示した。次にこのふたつの組換えプラスミドの形質転換効率の宿主依存性を調べたところ、E. coli HB101にたいする宿主依存性は両者に大きな差はないがE. coli JM109ではpBanIRM8の形質転換効率は非常に低く顕著な差があることを示した。

第3章: (5')-GGPyPuCC-(3')を認識し切断するBan I制限修飾系酵素の遺伝子の構造を明きらかにするためまずクローニング株E. coli HB101(pBan I RM8)培養菌体よりBan I制限酵素を電気泳動的に单一にまで精製した。またBan I methylaseのみを生産するサブクローン株E. coli HB101(pBanIM4)培養菌体からBan I methylaseを同

様に单一の蛋白まで精製した。この精製酵素のN-末端アミノ配列を決定した。これをもとに、本制限酵素系をコードする領域の塩基配列を決定した。その結果制限遺伝子は分子量39,841、修飾遺伝子は分子量42,637のポリペプチドを同じDNA鎖にコードしていることをあきらかにした。また精製酵素のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とゲル汎過分析よりBan I 制限酵素の触媒的に活性な型は2量体でありBan I メチラーゼは1量体であることを明らかにした。遺伝子解析よりE. coliで生産される酵素は元株であるBacillus aneurinolyticus IAM 1077の生産する酵素と構造的に同一であることを明らかにした。

以上の様に1) 制限酵素の検索と特異性および酵素的性質の決定(第1章),
2) Ban I およびBan III 制限修飾系遺伝子のクローニングによる育種(第2章),
3) Ban I 制限修飾系酵素の遺伝子の構造と同酵素の分子量、活性型酵素形態の決定(第3章)について研究を行った。新特異性酵素と特色のあるisoschizomerの発見、組換えDNA技術の活用による生産製向上とBan I 制限修飾系酵素の構造決定により遺伝子工学用研究試薬酵素として実用化することが出来た。新特異性をもつII型制限酵素として、特にAat II はその特異性から試薬酵素としてきわめて有用であり、またBan I, Ban III のクローニング株による生産は2種以上の制限酵素を生産する菌株からの精製の課題を解決し、工業的生産に貢献している。

著者が開発した制限酵素は現在東洋紡の遺伝子工学研究用試薬として製品化され生産されている。

References

- 1) Linn, S., Arber, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59, 1300 (1968).
- 2) Meselson, M., Yuan, R.: Nature, 217, 1110 (1968)
- 3) Smith, H.O., Wilcox, K.W.: J. Mol. Biol., 51, 379 (1970)
- 4) Kelly Jr. T.J., Smith, H.O.: J. Mol. Biol., 51, 393 (1970)
- 5) Smith, O.H., Nathans, D.: J. Mol. Biol., 81, 419 (1973)
- 6) Roberts, R.J.: Nucl. Acids Res., 16, r271, (1988)
- 7) Walder, R.Y., Hartley, J.L., Donelson, J.E., Walder, J.A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1503, (1981)
- 8) Schoniger, H., Kelly, S., Smith H.O.: Gene 24, 227, (1983)
- 9) Kiss, A., Posfai, G., Keller, C.C., Velenetinaer, P., Roberts, R., J.: Nucl. Acids Res. 13, 6403 (1985)
- 10) Blumenthal, R.M., Gregory, S.A., Cooperider, J.S.: J. Bacteriology, 164, 501 (1985)
- 11) Howard, K.A., Card, C., Benner, J.S., Callahan, H.L., Maunus, R., Silber, K., Wilson, G., Brooks, J.E.: Nucl. Acids, Res., 14, 7393 (1986)
- 12) Karreman C., Waard D.A.: J. Bacteriology, 170, 2527 (1988)
- 13) Som S., Bhagwat, A.S., Friedman, S.: Nucl. Acids, Res., 15, 313 (1987)
- 14) Kita, K., Kotani, H., Sugisaki, H., Takanami, M.: J. Biol. Chem., (1989)
- 15) Sugisaki, H., Kita, K., Takanami, M.: J. Biol. Chem. (1989)
- 16) Kupper, D., Zhou, J.G., Venetianer, P., Kiss, A.: Nucl. Acids, Res., 17, 1075 (1989)
- 17) Maxam, A.M., Gilbert, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, (1977)
- 18) Brownlee, G.G., Sanger, F.: J. Biochem., 11, 395-399 (1969)
- 19) Sugisaki, H., Maekawa, Y., Kanazawa, S., Takanami, M.: Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., 60, 328 (1982)
- 20) Yoshimori, RN.: Ph.D. Thesis, University of California, San Francisco Medical Center (1971)
- 21) Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A., Murray, K.: J. Mol. Biol., 102, 157 (1976).
- 22) Gelimas, R.E., Myers, P.A., Olsen, J.A., Hanberg, F.A. and Roberts, R.J.: J. Mol. Biol., 118, 113 (1978)
- 23) Hiraoka, N., Kita, K., Nakajima, H., Obayashi, : J. Ferment., Technol. 62, 583 (1981)
- 24) Kato, F., Nakajima, C., Takano, T., Tanaka, K., and Murata, A.: Bull. Fac. Agr., Saga Univ., 59, 1 (1985)
- 25) Kita, K., Hiraoka, N., Oshima, A., Kadenishi and S., Obayashi, A.: Nucl. Acids Res., 13, 8685 (1985)
- 26) Nelson, M., and McClelland, : Nucl. Acids Res., 15, r219 (1985)
- 27) Labbe, S., Xia, Y. and Roy, P.H., : Nucl., Acids Res., 16, 7184 (1988)
- 28) Sugisaki, H.: Gene, 3, 17, (1978)
- 29) Sugisaki, H., Kanazawa, S.: Gene 16, 73 (1981)
- 30) Sanger, F., Coulson, A.R., Friedmann, T., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.N., Fiddes, J.C., Hutchison, C.A., III, Slocombe, P.M., Smith, M.: J. Mol. Biol., 125, 225, (1978)
- 31) Schimizu, M., Takahashi, H., Saito, H.: Gene 11, 219 (1980)
- 32) Sutcliffe, J.F. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,

- 43, 77 (1979)
- 34) Peden, K. W. C. : Gene, 22, 277 (1983)
- 35) Sugisaki, H., Maekawa, Y., Kanazawa, S., Takanami, M. : Nucl. Acids, Res. 10, 5747 (1982)
- 36) Maekawa, Y. and Kawakami, B. : J. Ferment., Bioeng.
- 37) 末竹司, 加藤富民雄, 村田晃, 向井常博 (1986) 日本農芸化学会西日本支部大学会講演要旨集 p. 23
- 38) Kato, F., Yoshimori, M., Araki, K., Motomura, Y., Matsufune, Y., Nobunaga, H., Murata, A., Agric. Biol. Chem., 48, 193 (1984).
- 39) Maekawa, Y. and Kawakami, B. : Applied Environmental Microbiol.
- 40) Maekawa, Y., Kawakami, B. and Yasukawa, Y. : J. Biochem., 70, 101 (1966).
- 41) Davis, B. J., Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 406 (1964).
- 42) Weber, K. and Osborn, M. : J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969).
- 43) Kroger, M., Hobom, G., Schutte, H., Mayer, H. : Nucl. Acids Res., 12, 3127, (1984)
- 44) Schidkraut, I., Lynch, J., Morgan, R. : Nucl. Acids Res. 15, 5492 (1987)
- 45) Polisky, B., Greene, P., Garfin, D. E., McCarthy, B. J., Goodman, H. M., Boyer, H. W. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3310 (1975)
- 46) Heininger, K., Horz, W., Zacaahu, H. G. : Gene, 1, 291, (1977)
- 47) Kolensnikov, V. A., Yashina, L. N., Karginov, V. A., Baclanov, M. M., Malyguin, E. G. : FEBS Letters, 132, 101 (1981)
- 48) George, J., Chirikjian, J. G. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2432 (1982)
- 49) Clarke, C. M., Hartley, B. S. : Biochem. J., 177, 49 (1979)
- 50) Nastri, M., Thomas, D. : Nucl. Acids Res. 15, 7677 (1987)
- 51) Oka, A., Nomura, N., Morita, M., Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M. : Mole. Gen. Genet., 172, 151 (1979)
- 52) Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M. : J. Mol. Biol., 147, 217, (1981)
- 53) Fuchs, C., Rosenvold, E. C., Honingman, A., Szybalski, W. : Gene, 10, 357, (1980)
- 54) Mayer, H., Grosschedl, R., Schutte, H., Hobom, G. : Nucl. Acids Res. 9, 4833 (1981)
- 55) Caserta, M., Zacharias, W., Nwankwo, D., Wilson, G., and Wells, R. D. : J. Biol. Chem. s262, 4770 (1987).
- 56) Lin, P. M., Lee, C. H., and Roberts, R. J. : Nucl. Acids Res., 17, 3001 (1989)
- 57) Harris-Warrick, R. M., Elkana, Y., Ehrlich, S. D. and Lederberg, J. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 72, 2207 (1975)
- 58) Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. : Molecular Cloning : A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory (1982), Cold spring Harbor, New York
- 59) Davis, R. W., Botstein, D. and Roth, J. R. (1980) A manual for Genetic Engineering. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 60) Barany, F. : Gene, 56, 13 (1987)
- 61) Slatko, B. E., Benner, J. S., Jager-Quinton, T., Moran, L. S., Simcox, T. G., Cott, E. M., and Wilson, G. G. : Nucl. Acids, Res., 15, 9781 (1987)
- 62) Raleigh, E. A., and Wilson, G. : Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 9070 (1986)

本論文に関係ある報告

- 1). Screening of Type II Restriction Endonucleases I. Isolation and Characterization of Enzymes from fifteen Bacterial Strains.
Sugisaki, H., Maekawa Y., Kanazawa S., and Takanami M.:
Bull. Inst. Chem., Res. Kyoto Univ., 60, 328 (1982).
- 2). New restriction endonucleases from Acetobacter aceti and Bacillus aneurinolyticus.
Sugisaki, H., Maekawa Y., Kanazawa S., and Takanami M.:
Nucl. Acids, Res. 10, 5747 (1982).
- 3). The relaxation of the specificity of BanI restriction endonuclease.
Maekawa Y., and Kawakami B.: J. Ferment., Bioeng. accepted.
- 4). Cloning and Expression in Escherichia coli of the BanI and BanIII Restriction-Modification Systems from Bacillus aneurinolyticus.
Maekawa Y., and Kawakami B:
J. Ferment., Bioeng., 投稿中
- 5). Cloning and Nucleotide Sequences of the BanI Restriction-Modification Genes in Bacillus aneurinolyticus.
Maekawa Y., Kawakami B., and Yasukawa H.: J. Biochem. 投稿中