



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 acetii</u> IFO 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>BanI</u> および <u>BanIII</u> 制限-修飾系遺伝子のクローニングと発現	63
3-2	<u>BanI</u> および <u>BanIII</u> 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>BanI</u> 制限酵素及び <u>BanI</u> メチラーゼの発現	75
3-2	<u>BanI</u> 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 言 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 Arbert¹⁾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、 Mg^{2+} 、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断片の産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少ない。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 Mg^{+2} 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、 λ 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, pA02, pA043 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、Acetobacter 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³⁹⁾。 BanI クローニング株 (pBanIRM8を保持する *E. coli* HB101) は元株に比べ10倍、BanIII クローニング株 (pBanIII RM12を保持する *E. coli* HB101) 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. coli* HB101で調製された λ -vir phage に対する制限活性を調べた。 *E. coli* HB101 (pBR322/HB101) で調製された phage は *E. coli* HB101 (pBanIRM8) によりきわめて著しく制限された。 *E. coli* HB101 (pBanIRM8) で調製された λ -vir phage は *E. coli* HB101 (pBR322) に比較し *E. coli* HB101 (pBanIRM8) は制限されない。しかるに *E. coli* HB101 (pBanIII RM12) で調製された λ -vir phage は *E. coli* HB101 (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 pBanIII RM12 をそれぞれ *E. coli* HB101 に形質転換しその効率を調べるといづれのプラスミドもよく形質転換された。しかしながら、 *E. coli* JM109 に形質転換した場合、pBanIII RM12 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. coli* HB101 (pBanIRM8) 菌体より BanI 制限ヌクレアーゼを電気泳動的に単一まで精製し、分子量を決定した。他方、 *E. coli* HB101 (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. coli* HB101 (pBanIM4) 菌体から BanI メチラーゼを電気泳動的に単一にまで精製し、分子量を決定した。決定した塩基配列から BanI 制限エンド

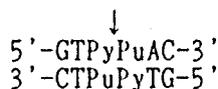
ヌクレアーゼと BanI メチラーゼは、それぞれ分子量39,841および42,637の蛋白であった。また、BanIメチラーゼのアミノ酸配列から他のメチラーゼのホモロジーを調べるといくつかのアミノ酸配列と類似性が見られた。

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^{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2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柝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% KH_2PO_4 , 10% Tomato juice, 0.1% Tween 80, 2% CaCO_3 (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 IFO 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 trypton, 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で通気攪伴条件を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で好氣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)}に従って調製した。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酸を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、1 M 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 ウイルス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 ボラロイド インスタント バック 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, Aat I, Aat II, Ban II, Ban III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の夾雑をしらべた。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みつめ、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 MgCl_2 , 7 mM 2-mercaptoethanol と λ -DNA の5'末端 ^{32}P 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% Na_2PO_4 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. coli ^3H -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 HpaII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

mM 2-mercaptoethanol, 80 μ 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'-末端ヌ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砕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 acetii IFO 3281, Bacillus aneurinolyticus IAM1077, Micrococcus roseus S, Escherichia coli2bT ICR0020, Gluconobacter gluconicus IFO 0020, Micrococcus auranticus IFO 12422, Pseudomonas alkaligenes ATCC 12815, Pseudomonas alkanolytica 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 acetii 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 acetii 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。懸濁液を超音波破器(Sonifier M450)で破砕した後, 14,000rpm, 20分遠心分離する。上澄みを分離し, 固形硫酸を加え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）をあらかじめ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、KCl の直線濃度勾配 (緩衝液 C → 緩衝液 C + 1M KCl 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 (4.5 x 13 cm) に吸着させ KCl の直線濃度勾配 (緩衝液 C → 緩衝液 C + 1M KCl 100ml ずつ) で溶出した。AatI 活性画分は 0.56 M KCl - 0.64 M KCl の間で溶出した。これをあらかじめPEG6000で濃縮後、50% glycerol を含む 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 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、KCl 直線濃度勾配 (緩衝液 C → 緩衝液 C + 0.5 M KCl 1500ml ずつ) で溶出した。AatII 活性画分は 0.3M KCl - 0.38 M KCl 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 (pH 7.5) - 2mM mercaptoethanol - 5% glycerol (緩衝液 B) で緩衝化しておいたヒドロキシアパタイトカラム (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 KPO_4) で溶出した。活性画分は 0.1M - 0.18M リン酸カリで溶出した。これをあらかじめ (50ml) 50% glycerol を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 100 mM KCl, 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, AatII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_{260nm}	Specificity $T.A/E_{260nm}$
I. Lysate	1400	—	136,780	—
II. Ammonium sulfate precipitation	520	—	62,504	—
III. Phosphocellulose column chromat.	1200	2400×10^3	487	4,928
IV. DEAE-Sephadex column chromat.	79	237×10^3	46	5,252
V. Heparin Sepharose column chromat.	20	40×10^3	2	20,000

Table 2. Summary of Purification of AatII

Step	Volume (ml)	Total activity (units)	E_{260nm}	Specificity $T.A/E_{260nm}$
I. Lysate	1,400	—	136,780	—
II. Ammonium sulfate precipitation	520	—	62,504	—
III. Phospho-cellulose column chromat.	1,020	525×10^3	597	879
IV. DEAE-Sephadex column chromat.	140	120×10^3	44	2,727
V. <u>AatI</u> - <u>AatI</u> Affinity column chromat.	55	110×10^3	42	2,619
VI. Hydroxyapatite column chromat.	50	60×10^3	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雑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 40DNA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). Aat I 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ォ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ジオグラムを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ジオグラムを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

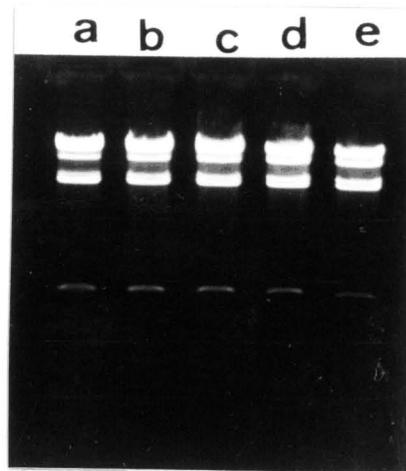


Fig.1. Effect of AatI Concentration on λ -DNA Digestions.

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) 6U; (b)12 U; (c) 18 U; (d) 24 U; (e) 30 U.

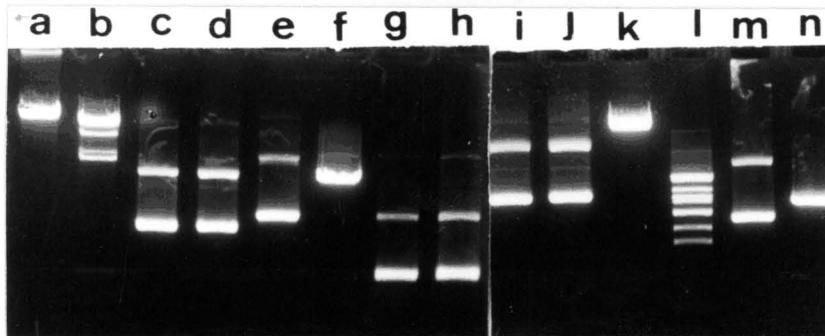


Fig.2 Cleavage Patterns of λ , pBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2 and SV40 DNAs after Digestions with AatI.

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

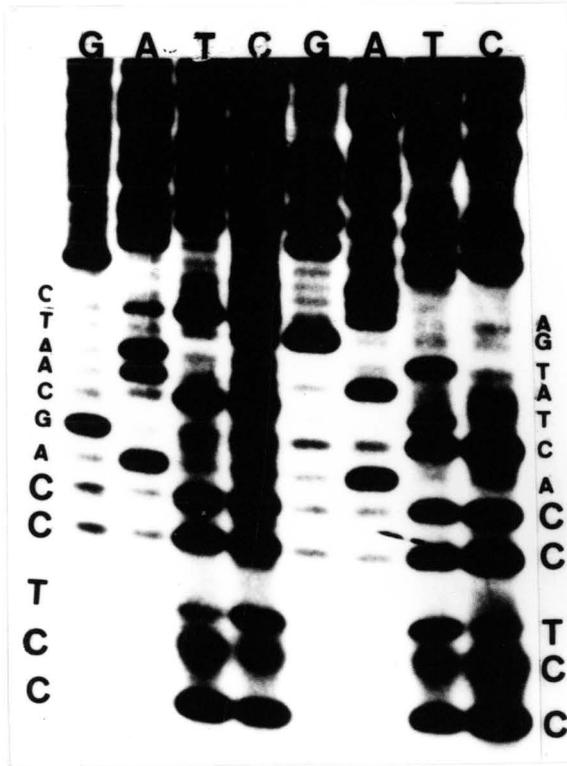


Fig. 4

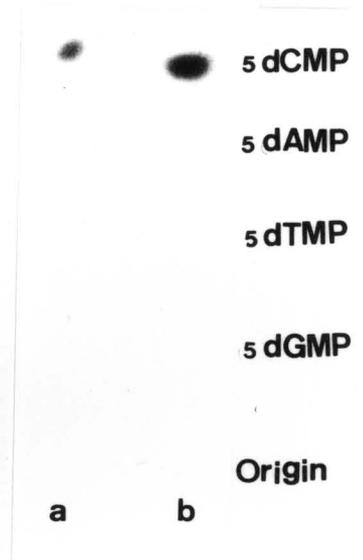


Fig. 3 Autoradiogram of 5'-³²P-labeled subfragments of ϕ x174RF1 DNA produced by double digestion with AatI and HinI.

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 x 174 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.

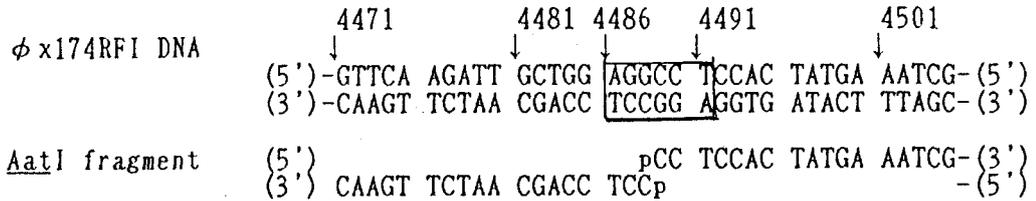
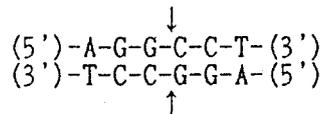


Fig. 5 Alignment of 5'-terminal sequences generated by AatI on the ϕ x174RFI DNA sequence³¹⁾. The number above the sequences indicate the nucleotide position from the PstI site of ϕ x174RFI DNA. The possible site was boxed.

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³²P-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 I³²⁾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1hr作用させ最適温度をしらべた。反応液50 μ l(10 mM Tris-HCl, pH7.5/7 mM MgCl₂/7 mM 2-mercaptoethanol)に λ -DNA 1 μ gを加え、インキュベートした後、電気泳動し λ -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 λ -DNA 1 μ gを加え37°C, 1hrインキュベートした後、電気泳動し λ -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 7.5であることが分かった(Fig. 7)。

Fig. 6.

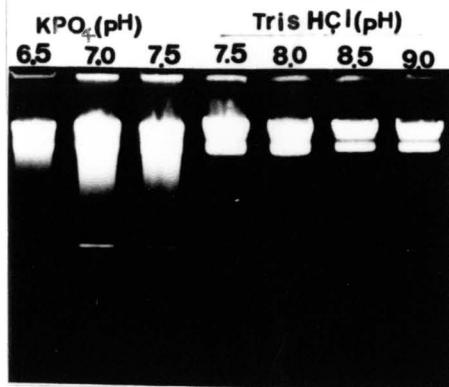


Fig. 7.

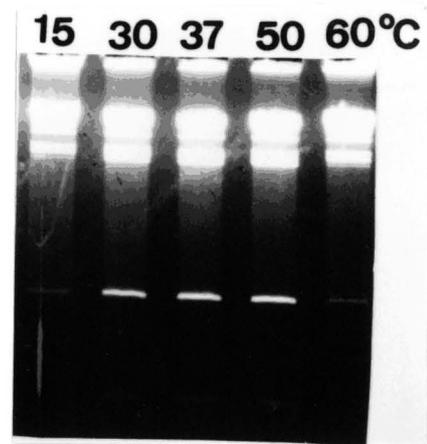


Fig. 8.

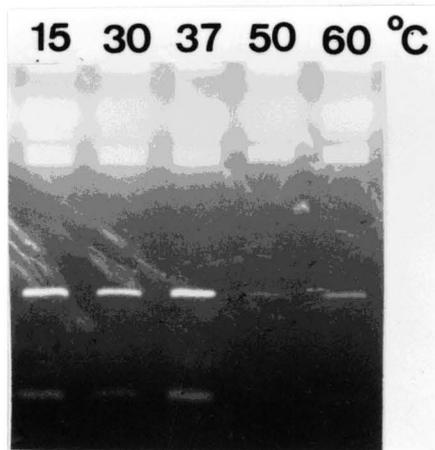


Fig. 9.

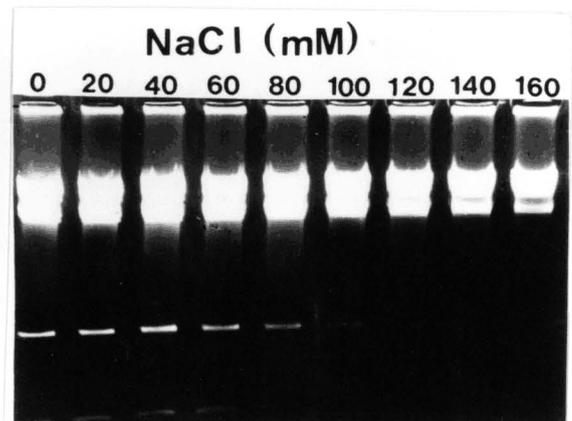


Fig. 6 and Fig. 7. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of AatI

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 μ g 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 $MgCl_2$ -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、30minブ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(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。10mM Tris-HCl(pH7.5)-7 mM-MgCl₂の存在下で0-160mMの間で濃度をかえλ-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0-60mMの間でよく作用し、最適濃度を40mMと決定した。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。

7) 酵素活性に及ぼす2価カチオンの影響

10mM 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、φx174 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、φx174 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φx174 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で切断されることが分かった。(データ略)

3-2 Aat IIの特異性と性質

1). λ-DNAの分解性

精製した酵素標品の種々の量を10mM Tris-HCl(pH7.5)-7 mM MgCl₂測定用緩衝液に1 μgのλ-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λ-DNAを7箇

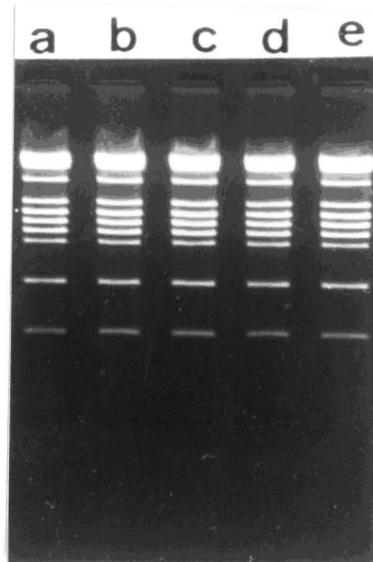


Fig.10. Effect of AatII Concentration on λ -DNA Digestions.

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.

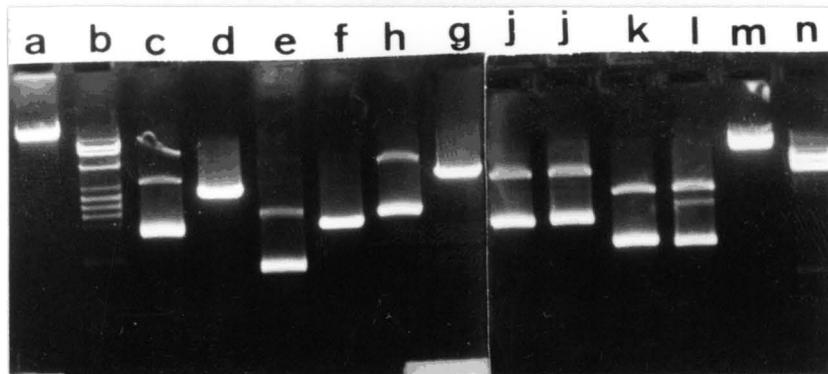


Fig.11. Cleavage Patterns of λ , PBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2 and SV40 DNAs after Digestions with AatII.

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 RF-I 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 Aat II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

Aat IIは pBR322を1箇所切断する。Aat IIの認識配列を決めるためAat II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Aat Iの場合と同様にバクテリアアルカリフォスファターゼで脱りん後, 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 Hae III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。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Aat II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'-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。

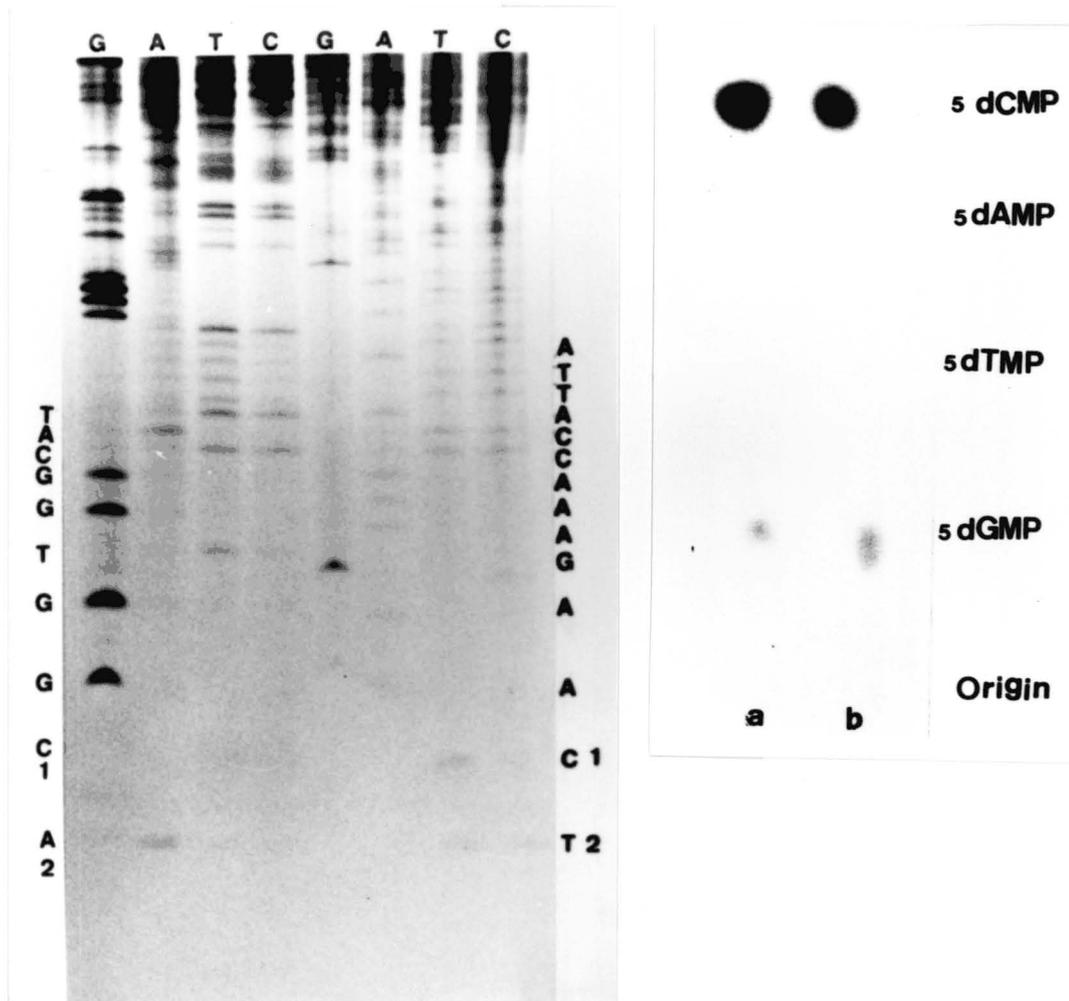


Fig.12. Autoradiogram of 5'-³²P-labeled subfragments of pBR322 DNA produced by double digestion with AatII and HaeIII.

The fragment was sequenced on a gel from 5'-AatII 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 CTAAGAAACCA... (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.

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ブ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λ-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.

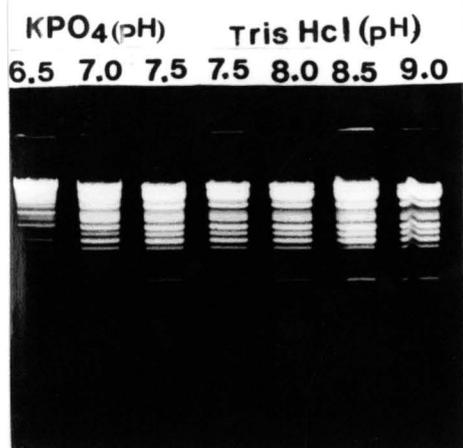


Fig. 16.

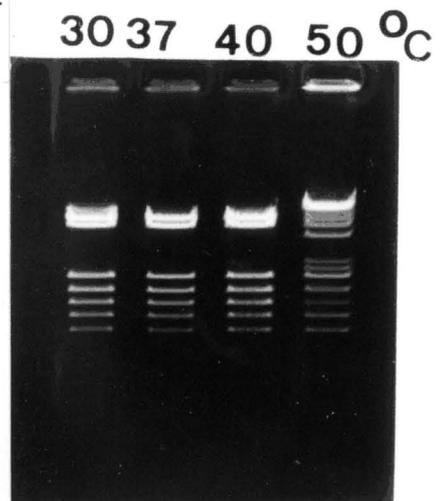


Fig. 15 and Fig. 16. Effect of pH and temperature on AatII Activity.

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

Fig. 17

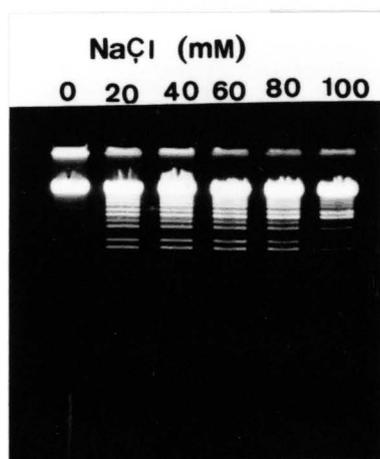


Fig. 18

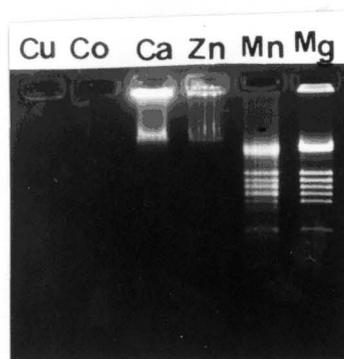


Fig. 17. Effect of NaCl Concentration on AatII Activity.

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 AatII Activity

The effect of divalent cations on AatII 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形食塩を攪伴しながら最終濃度0.15Mになるように加えた後, 中和した10%(W/V)ポリエチレンジアミン溶液を最終濃度0.2%になるように添加し30min穏やかに攪伴した。この後8,000rpmで20 min遠心した後, 沈澱を捨て上澄みに固形硫酸を攪伴しながら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KClの直線濃度勾配(緩衝液B→緩衝液B+1M KCl, 1 literずつ)で溶出し20 mlずつ集め, 2 μ lと取り活性を測定した。 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 KCl濃度(画分1), 0.42-0.46M KCl, (画分2), および0.53M-0.57M KCl(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 KCl, 1 literずつ)で溶出する。BanI活性は0-0.05 M KCl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パタイトカラム(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、ヘパリンセファール
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 KCl)で1ベッドカラム体積で洗浄後,
KCl直線濃度勾配で(緩衝液D→緩衝液D+0.5M KCl 40mlずつ)で溶出した。
BanI活性は0.2-0.3M KCl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-mercaptoethanol-100 mM KCl)に透析して濃縮し、
-20°Cで保存した。

4-2 Ban II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-mer-
captoethanol, 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
ーロースカラム(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 KCl, 500 mlずつ)で溶出した。Ban IIは
0.20-0.25 M KCl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、KCl直線濃度勾配(緩衝液B+0.20 M KCl→緩衝液B+0.8 M KCl, 500 mlずつ
)で溶出した。Ban II制限酵素は0.4M-0.5M KCl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パタイトカラム(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。Ban II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-mercaptoetha-
nolを含む 50% glycerolで透析した。透析液を-20°Cで保存した。

4-3 Ban IIIの精製

BanI制限酵素の精製過程で得た画分3をヒドロキシアパタイトカラム(2.7 cm
x 9 cm)に吸着させ洗浄後、KCl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。Ban III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-セファールーロス(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KCl直線濃度勾配（緩衝液B→緩衝液B+0.4 M KCl 250mlずつ）で溶出した。BanIII活性は0.1-0.13M KCl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ローース(1.1 cm x 10 cm)に吸着させた洗浄後、KCl直線濃度勾配（緩衝液B→緩衝液B+1M KCl, 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みつめ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され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. PEI precipitation	—	9,550	—	—
3. Ammonium sulfate precipitation	—	4,150	—	—
4. Phospho-cellulose column chromat.	500	93	7.9	100
5. DEAE-Sephrose column chromat.	424	22	19.3	84.8
6. Hydroxyapatite column chromat.	202	9.1	22.2	40.4
7. Heparin-sepharose column chromat.	130	4.0	32.5	26.0

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. PEI precipitation	—	9,550	—	—
3. Ammonium sulfate precipitation	—	4,150	—	—
4. Phospho-cellulose column chromat.	10,000	206	49	100
5. DEAE-Sephrose column chromat.	7,500	29	259	75
6. Phospho-cellulose column chromat.	4,900	18	272	49
6. Hydroxyapatite column chromat.	3,480	10	348	35

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. PEI precipitation	—	9,550	—	—
3. Ammonium sulfate precipitation	—	4,150	—	—
4. Phospho-cellulose column chromat.	122	53	2.3	100
5. Hydroxyapatite column chromat.	47	6.7	7.0	38
6. DEAE-Sephrose column chromat.	34	3.5	6.7	27.9
7. Heparin-sepharose column chromat. & Concentration	20	0.15	133.3	16.3

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 μ gの λ -DNAを含む反応液に、酵素量を変え24hr 37°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x16hr)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 x 16hr)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HindIIIで消化した後³²P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 μ g)を精製酵素(2単位)で37°C, 2hrインキュベート後、電気泳動しパターンを調べた。Ad2, ϕ x174 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	ϕ x 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ォスファターゼで脱リンし、T4 ポリヌクレオ

Fig. 19

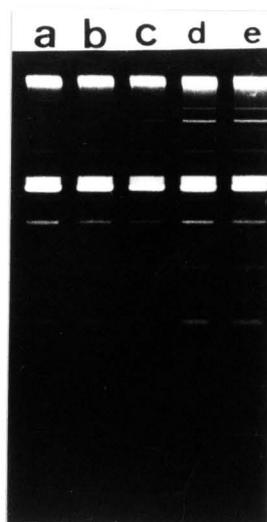


Fig. 20

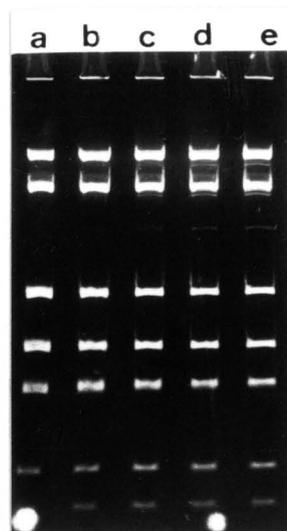


Fig. 19. Effect of BanI Concentration on λ -DNA Digestion.

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.

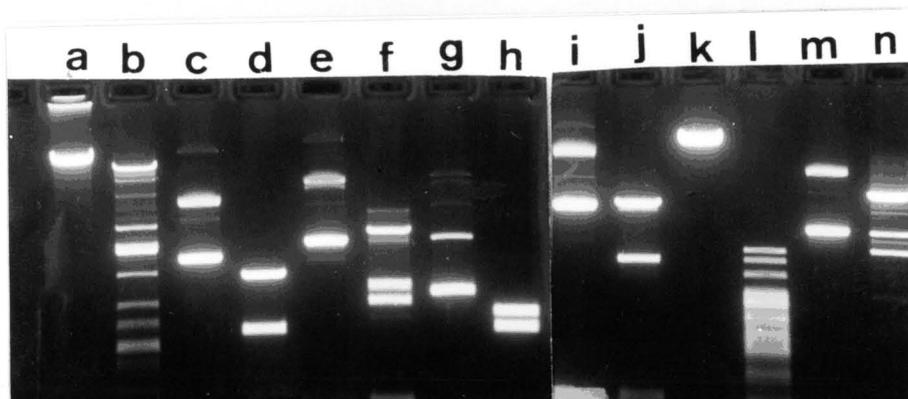
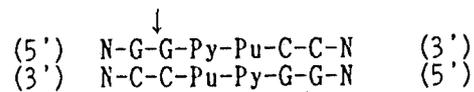


Fig. 21. Cleavage Patterns of λ , pBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2, and SV40 DNAs after Digestions with BanI.

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7 M 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HgiCI^{43, 44}の isoschizomer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知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。

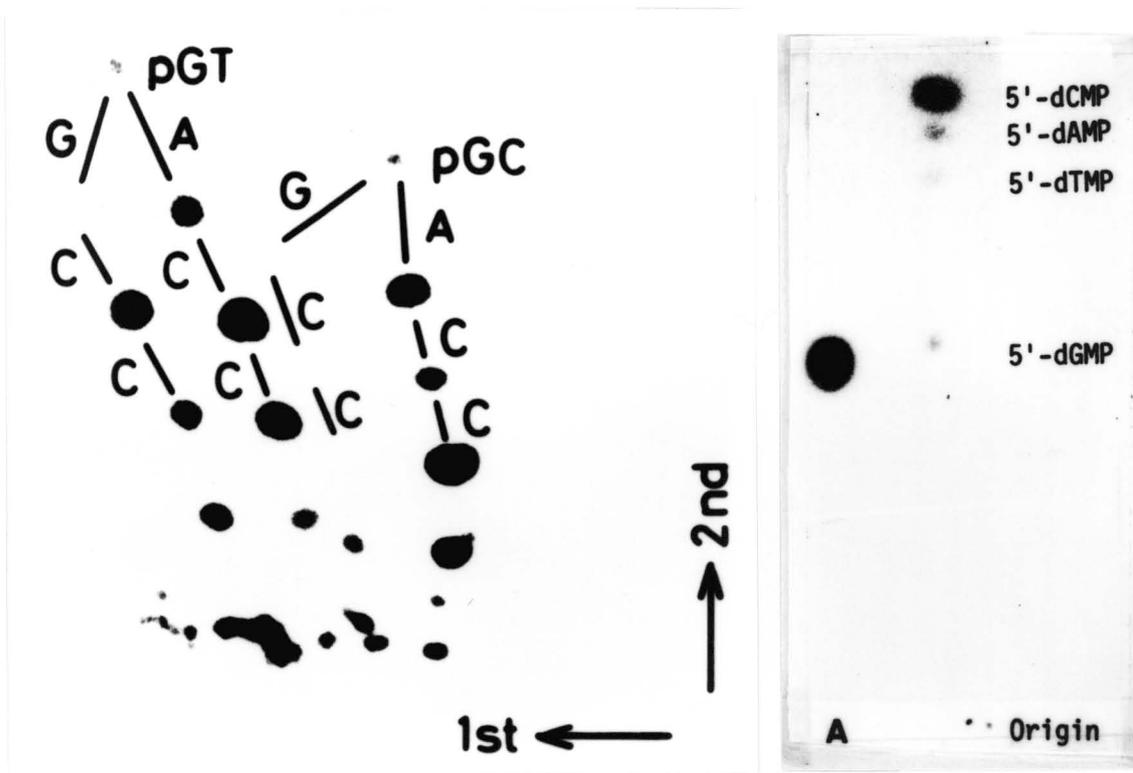


Fig. 22. Analysis of the 5'-ends sequenced generated at the λ -DNA.

5'- ^{32}P -labeled BanI fragments of λ -DNA were partially digested by DNase I 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'-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.

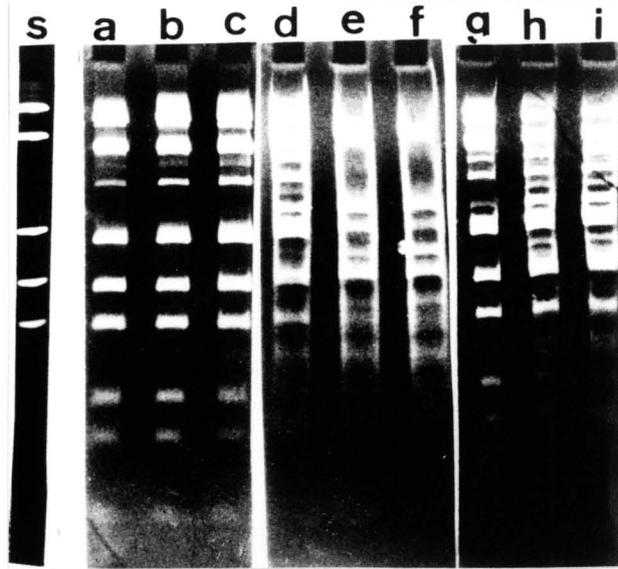


Fig. 24. Effect of Glycerol and DMSO on pBR322 Digestion with BanI.

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.

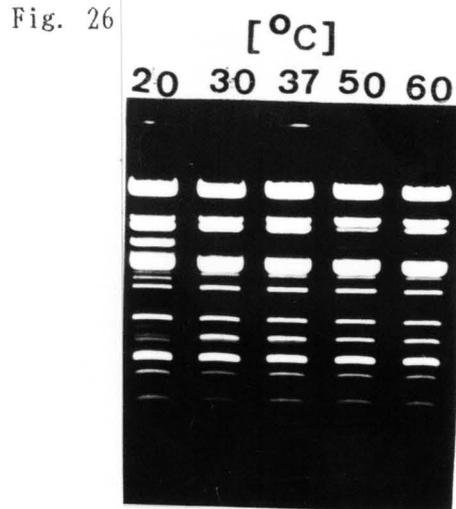
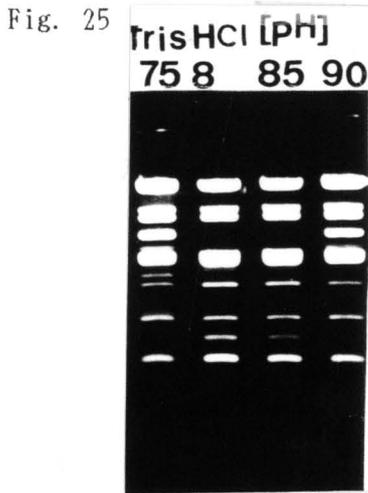


Fig. 25,, Fig. 26. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of Ban I

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; (2) pH 8.0; (3) pH 9.0. Temperature; (1) 20 °C; (2) 30 °C; (3) 37 °C; (4) 50 °C; (5) 60 °C.

5). 酵素活性におよぼす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 μ g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 μ g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). 酵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). 酵素活性におよぼす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った(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)。

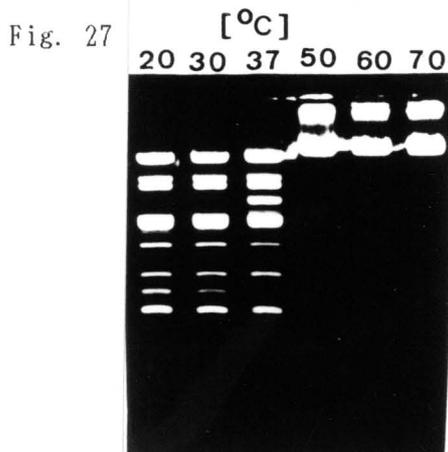


Fig. 27. Thermal Stability of BanI

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.

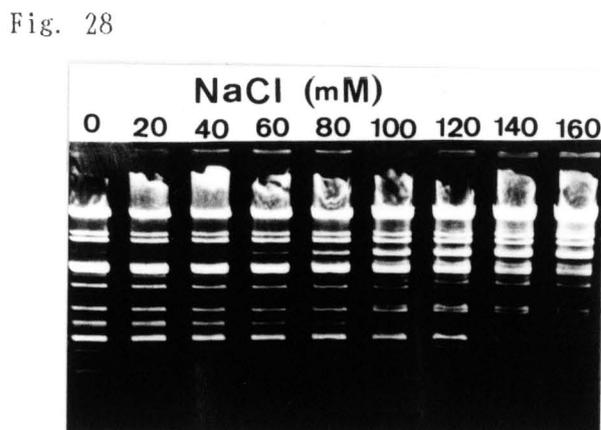


Fig.28. Effect of NaCl Concentration on Enzyme Activity of BanI.

The effect of NaCl concentration on enzyme activity was examined in the presence of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5-7 mM $MgCl_2$ -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

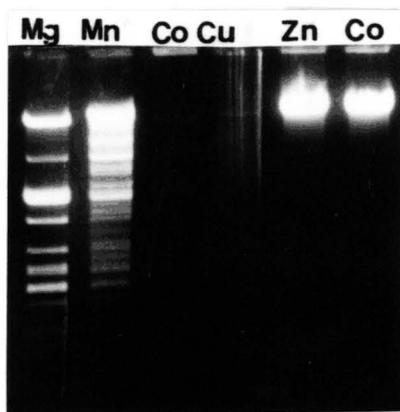


Fig.30

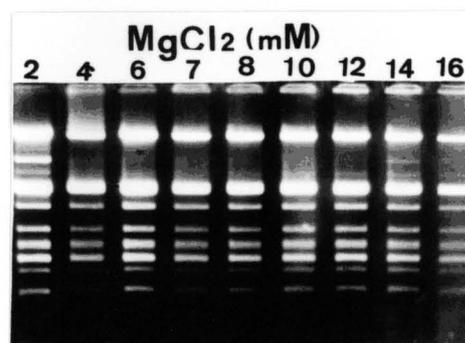


Fig. 29., Fig. 30. Effect of Divalent Cations and Mg^{2+} ion Concentration on Enzyme Activity of BanI.

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 $MgCl_2$. (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 μ 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 x 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%cpm/単位.hr以下であり上記の非特異性のヌクレアーゼの夾雑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 μ 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、 ϕ x174 RF1 DNA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	ϕ x174RF1	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

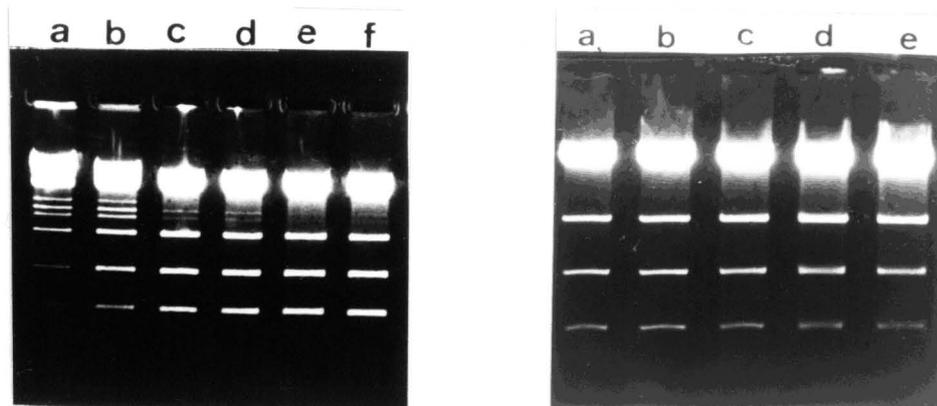


Fig. 31. Analysis of Cleavage Products of λ -DNA Incubated with Increasing Amounts of BanII.

Different amounts of BanII 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 $MgCl_2$ and 10 mM Tris-HCl (pH 7.5). (1) 0.5 U; (2) 0.6 U; (3) 0.6 U; (3) 0.8 U; (4) 0.9 U; (5) 1.0 U.

Fig. 32. Effect of BanII 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 $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol in total volume of 50 μ l with BanII. (a) 6 U; (b) 12 U; (c) 18 U; (d) 24 U; (e) 30 U.

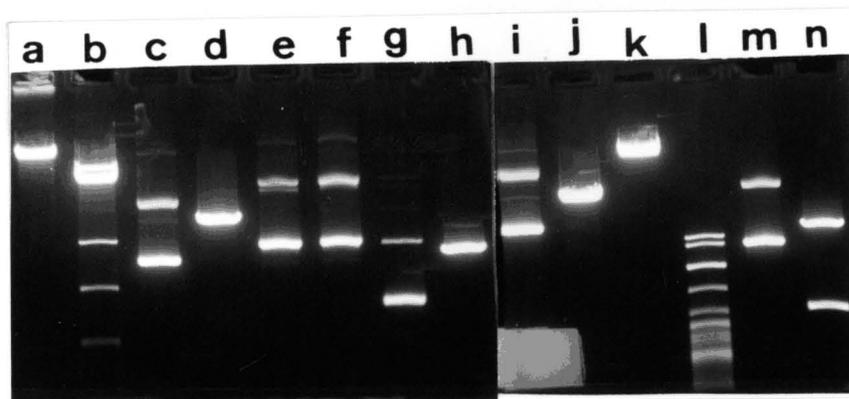


Fig. 33. Cleavage Patterns of λ , pBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2 and SV40 DNAs after Digestions with BanII.

2 units of BanII 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 BanII. 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).

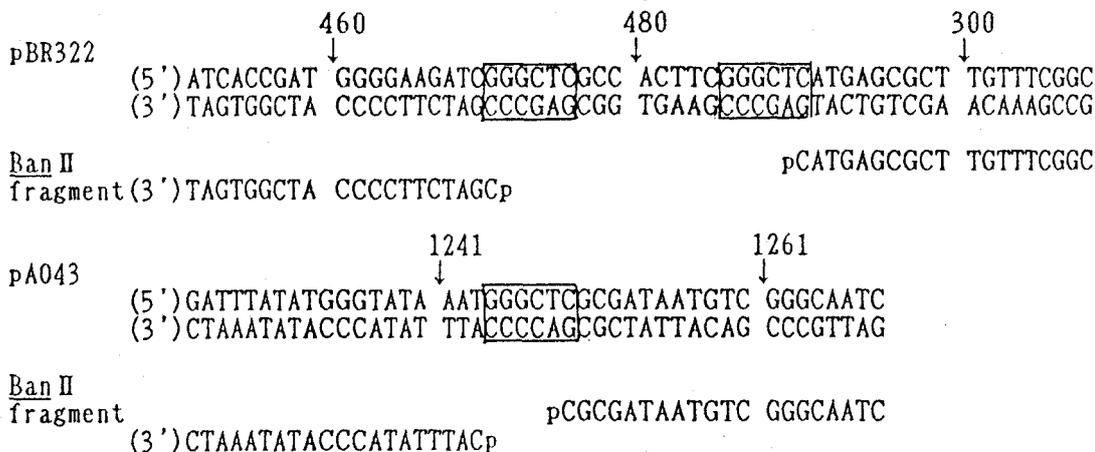


Fig. 37. Alignment of the 5'-terminal sequences generated by Ban II on the sequences of pBR322^{33, 34}) and pA043^{51, 52}) DNAs. The number above the pBR322 sequence indicates the positions from the EcoRI site^{33, 34}), and those above the pA043 sequence indicates the positions from the left end of 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Fucks⁵³) 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箇所切断し、 ϕ x174 RFI 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)。

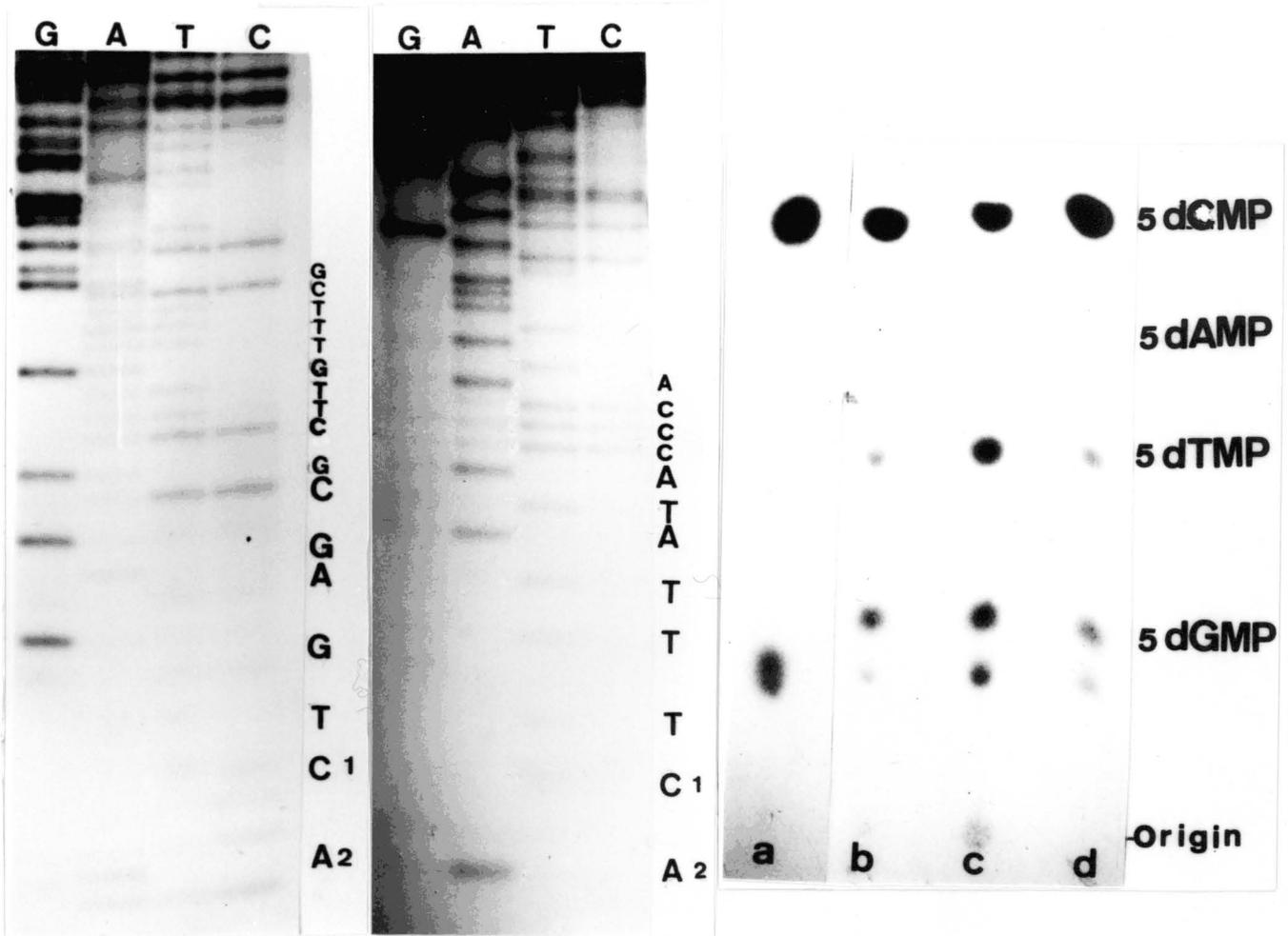


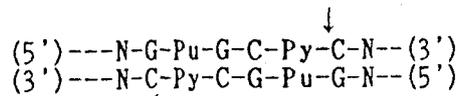
Fig. 34. Autoradiogram of 5'-³²P-labeled subfragments of pBR322 DNA produced by double digestion with BanII and AvaII.

The fragment was sequenced on a gel from 5'-BanII 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'-³²P-labeled subfragments of pA043 DNA produced by double digestion with BanII and PvuII.

The fragment was sequenced on a gel from 5'-BanII 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'CATTTATATCCCA....

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30-50mM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)。Mg⁺²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Mg⁺²イオンとほぼ同じ程度の活性が観察されBan I, Ban IIIと異なった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

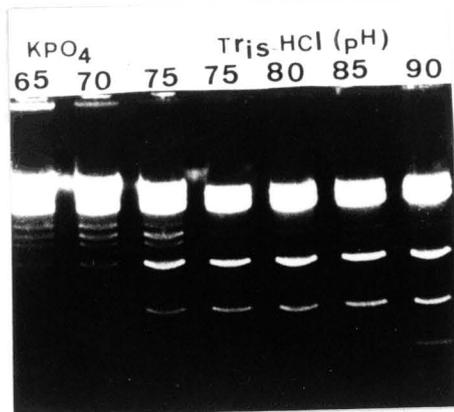


Fig. 39

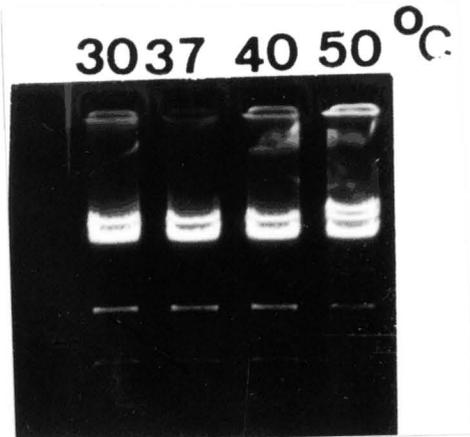


Fig. 38., Fig. 39. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of Ban II

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; (b) pH 8.0; (3) pH 9.0. Temperature; (1) 30 °C; (2) 37 °C; (3) 40 °C; (4) 50 °C.

Fig. 40

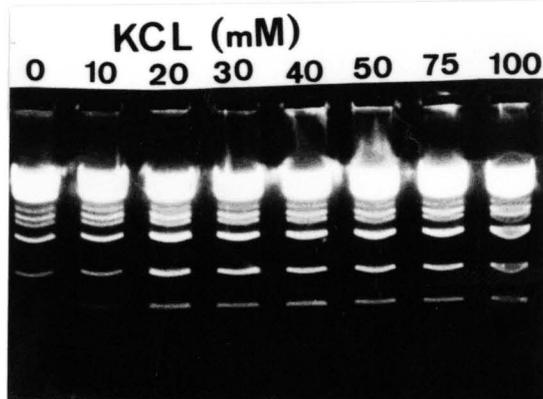


Fig. 41

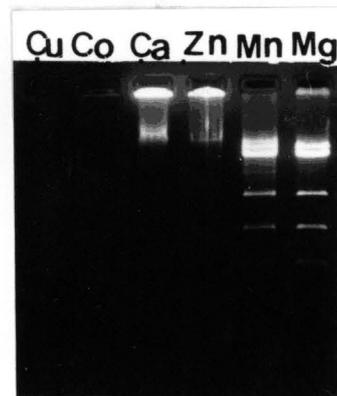


Fig. 40. Effect of KCl Concentration on Enzyme Activity of Ban II.

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 μ 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 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%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 μ 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)。いま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

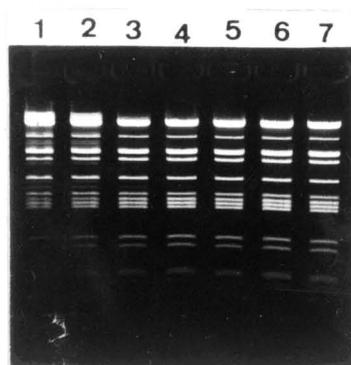


Fig. 43

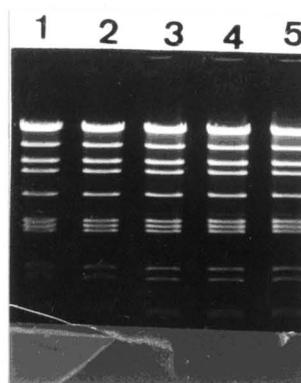


Fig. 42. Analysis of Cleavage Products of λ -DNA Incubated with Increasing Amounts of BanIII.

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 $MgCl_2$ 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 $MgCl_2$, 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.

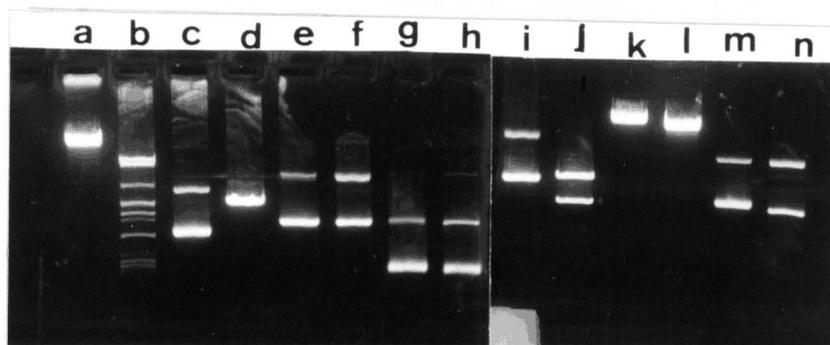


Fig. 44. Cleavage Patterns of λ , pBR322, ϕ X174, pUC18, M13mp18, Ad2 and SV40 DNAs after Digestions with BanIII.

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.

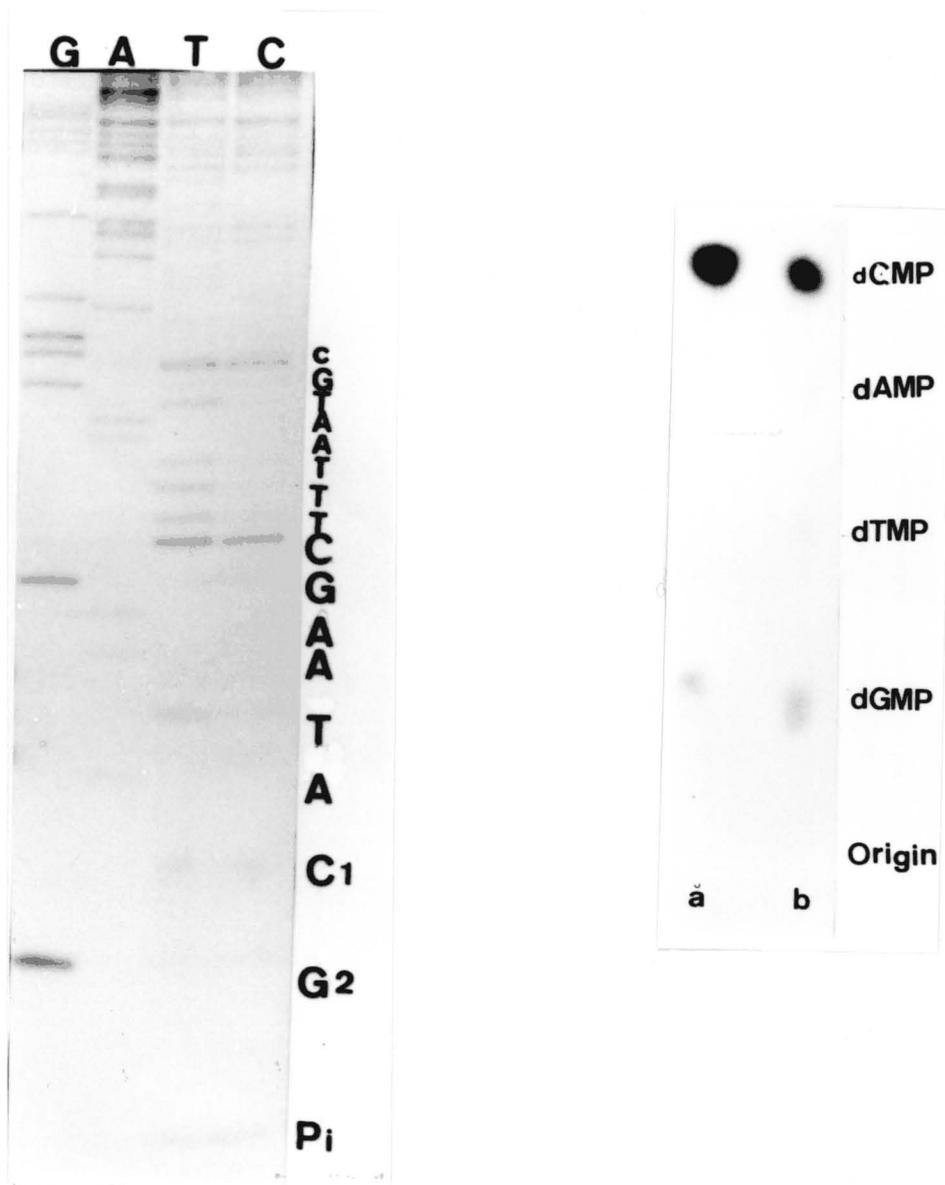


Fig. 45. Autoradiogram of 5'-³²P-labeled subfragment of pBR322 DNA produced by double digestion with BanIII and HaeIII.

The fragment was sequenced on a gel from 5'-BanIII 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.

Fig. 48

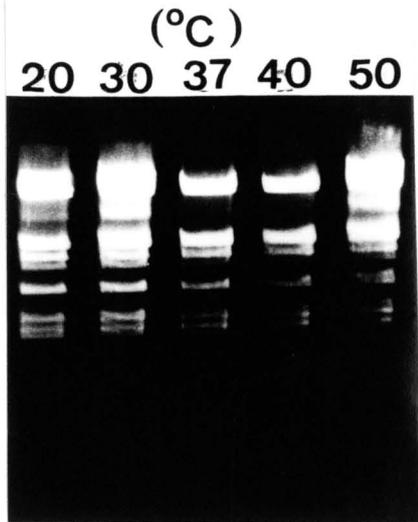


Fig. 49

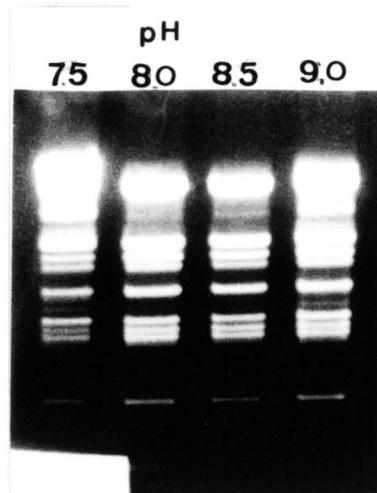


Fig. 48., Fig. 49. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of BanIII

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; (b) 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

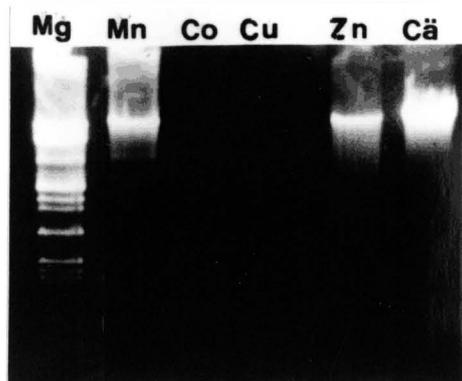


Fig. 52

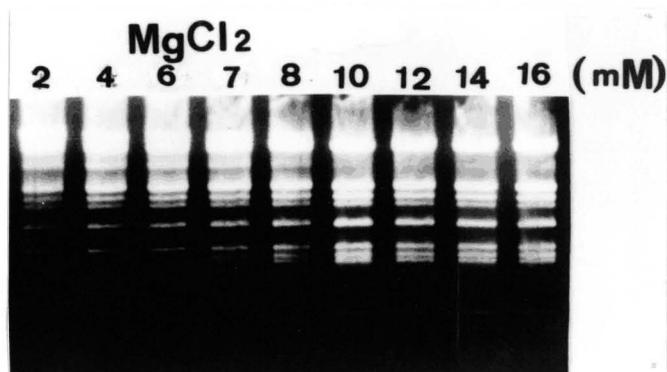


Fig. 51., Fig. 52. Effect of Divalent Cations and Mg^{2+} ion concentration on Activity of BanIII.

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 $MgCl_2$. (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 (pH 8.0) - 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 燐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 μ l酵素溶液5-20 μ l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酵素過剰量で一晩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, ColE1 DNA, pBR322 DNA, SV40 DNA, ϕ X174 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, ColE1 DNAを 4, pBR322を 1のフラグメントにそれぞれ切断し, SV40 DNA, ϕ x174RF1 DNAを分解しなかつた。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, ゲルより抽出し二つの断片の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

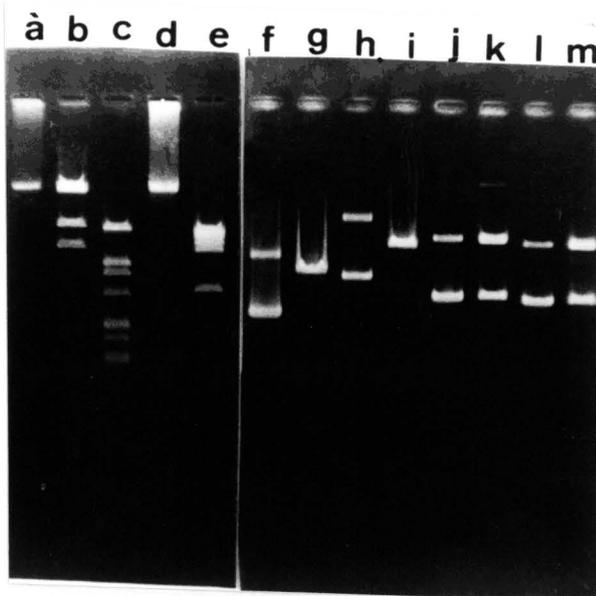


Fig. 53. Cleavage Patterns of λ , Ad-2, pBR322 and ColE1 DNAs after Digestions with MroI

One unit of MroI was incubated with 2 μ g each DNA in 40 μ l of reaction buffer for 3 hr at 37 $^{\circ}$ 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, pBR322 DNA; h and i, ColE1 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

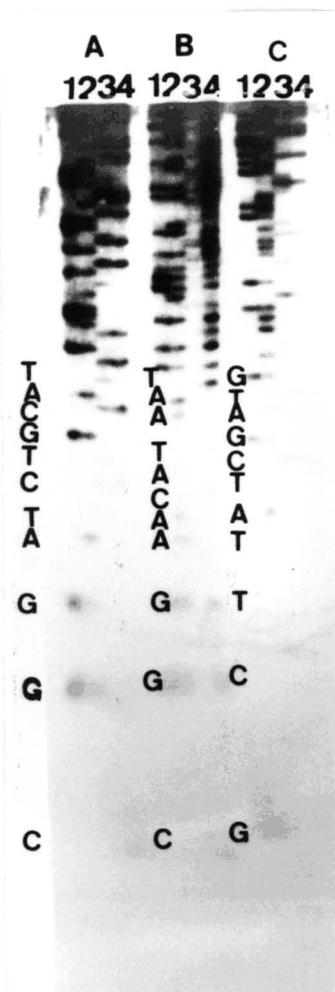


Fig. 54. Determination of MroI Cleavage

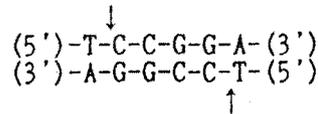
Ends.

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 MroI 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。 HapII 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 HapII 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. HapII* and *M. MspI* on *MroI* Digestion. *Dcm*⁻ λ -DNA was incubated with *M. HapII* 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*, *HpaII* and *NaeI*. a and i, λ -DNA; b and j, λ -DNA digested with *HindIII*; 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 *HpaII*; g, *dcm*⁻ λ -DNA digested with *M. HapII* and treated with *HpaII*; h, *dcm*⁻ λ -DNA digested with *M. HapII* and treated with *MroI*; m, *dcm*⁻ λ -DNA digested with *M. MspI* and treated with *NaeI*; n, *dcm*⁻ λ -DNA digested with *M. MspI* and treated with *MroI*.

MroI活性には10 mM Mg^{2+} を要求しpH7.2-7.8で最高の活性を示した。また Co^{2+} , Mn^{2+} の存在下ではわずかな活性を示すが Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} 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 $MgCl_2$, 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 $MgCl_2$, 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 (XhoI 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らをはじめて 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 Aat II, Ban IIを見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。Aat II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。Ban II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、Aat I, Ban I, Ban III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。Ban I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Ban Iが遺伝子工学研究試薬酵素として使われている。Aat I, Ban III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、Aat IはAat IIと同一の菌体から、Ban IIIは Ban I, Ban II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Aat I, Aat II, Ban I, Ban II, Ban III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 6 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 の切断性が異なる一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 I</u>	<u>A. aceti</u> IFO 3281	AGG↓CCT isoschizomer of <u>StuI</u>
<u>Aat II</u>		GACG↓TC new enzyme
<u>Ban I</u>	<u>B. aneurinolyticus</u>	C↓GPyPuCC isoschizomer of <u>HgiCI</u>
<u>Ban II</u>	IAM 1077	GPuGCPy↓C new enzyme
<u>Ban III</u>		AT↓CGAT isoschizomer of <u>ClaI</u>
<u>Mro I</u>	<u>M. roseus</u> S	T↓CCGA isoschizomer of <u>AccIII</u> and <u>BspMII</u>
<u>EcoICR I</u>	<u>E. coli</u> 2bT ICR 0020	GAGCTC isoschizomer of <u>SstI</u>
<u>Gin I</u>	<u>G. gluconicus</u> IFO 3260	GGATCC isoschizomer of <u>BamHI</u>
<u>Mau I</u>	<u>M. aurantiacus</u> IFO 12422	CTGCAG isoschizomer of <u>PstI</u>
<u>Pai I</u>	<u>P. alkaligenes</u> ATCC12815	GGCC isoschizomer of <u>HaeIII</u>
<u>Pan I</u>	<u>P. alkanolytica</u> IFO12319	C↓TCGAG isoschizomer of <u>XhoI</u>
<u>Ppu I</u>	<u>P. putida</u> C-83	GGCC isoschizomer of <u>HaeIII</u>
<u>SpaI</u>	<u>S. phaeochromogenes</u> IFO 3108	GCATGC isoschizomer of <u>SphI</u>

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時に利用することは, 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見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は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 lacI Z 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 アルカリフォスファターゼ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を好氣的に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ォスファターゼ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

クローニングしたBanIまたはBanIII制限一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 MgCl₂ 0.5ml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制限一修飾系遺伝子を組み込んだプラスミドをもつ *E. coli* HB101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pBanIRM12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pBanIRM12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pBanIRM12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pBanIRM12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pBanIRM12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pBanIRM12のマップを示す。(Fig. 2), (Fig. 3)

Table 1 Production of BanI and BanIII endonucleases

Strain	<u>Ban</u> I Activity (u/ml broth)	<u>Ban</u> III 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 (pBanIRM12)	0	1.0

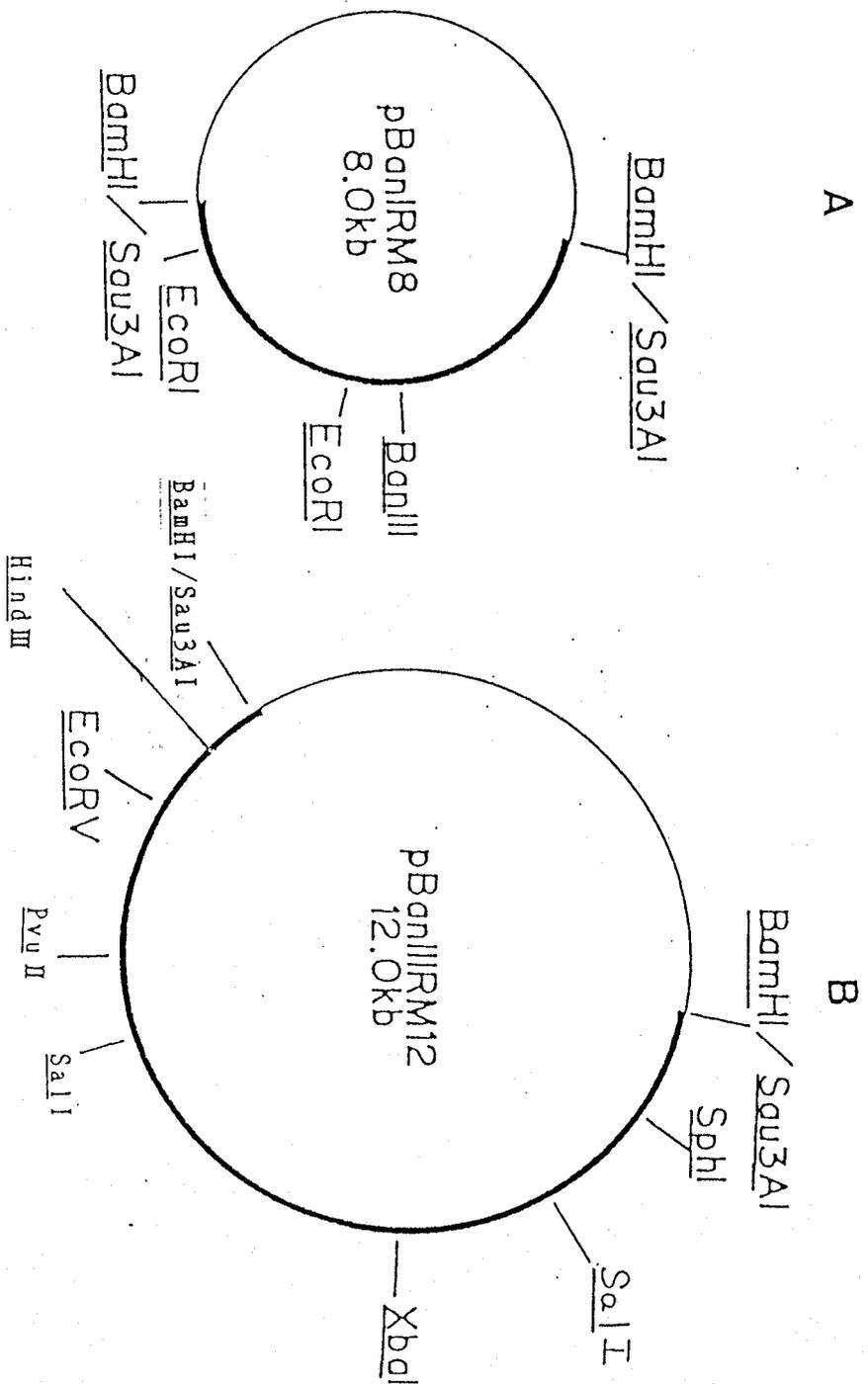


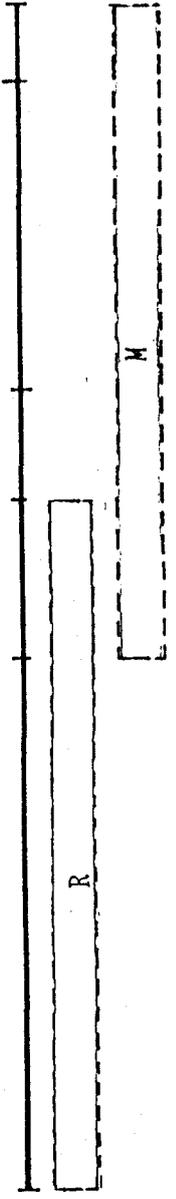
Fig. 1. Physical maps of plasmid pBanIRM8(A) and pBanIRM12(B). The thin lines represent that pBR322 moieties and thick lines cloned DNA moieties.

BamHI/Sau3AI

EcoRI

BanIII EcoRI HpaI

BamHI/Sau3AI



Phenotype of Clone
R M

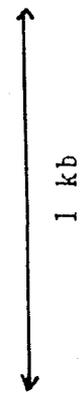
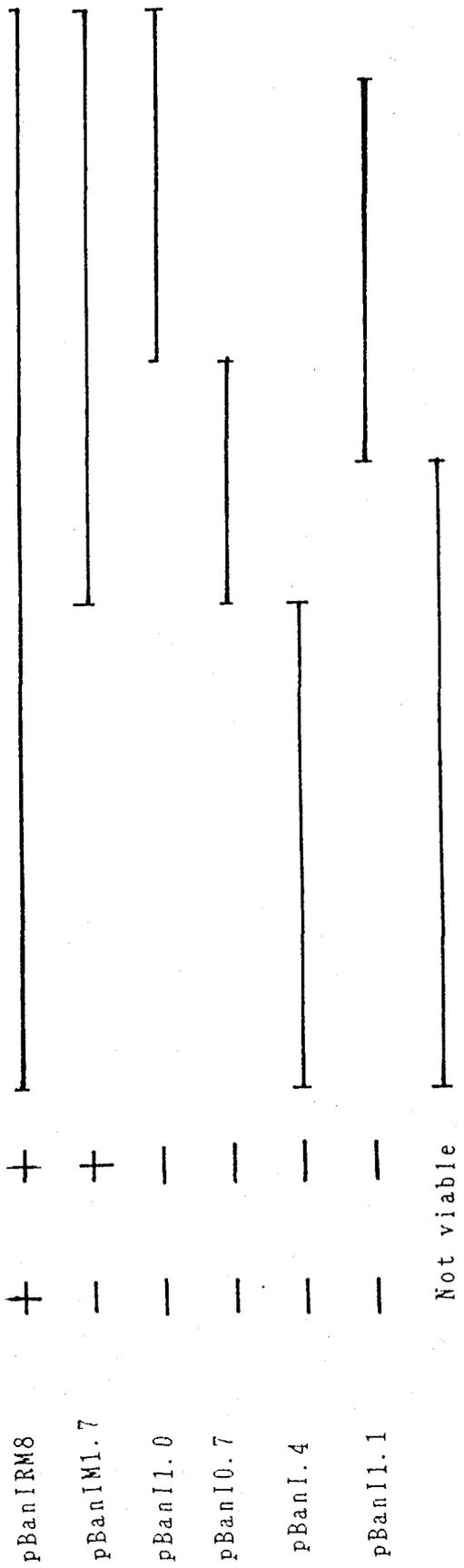


Fig. 2. Deletion derivatives derived from pBanIRM8.

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.

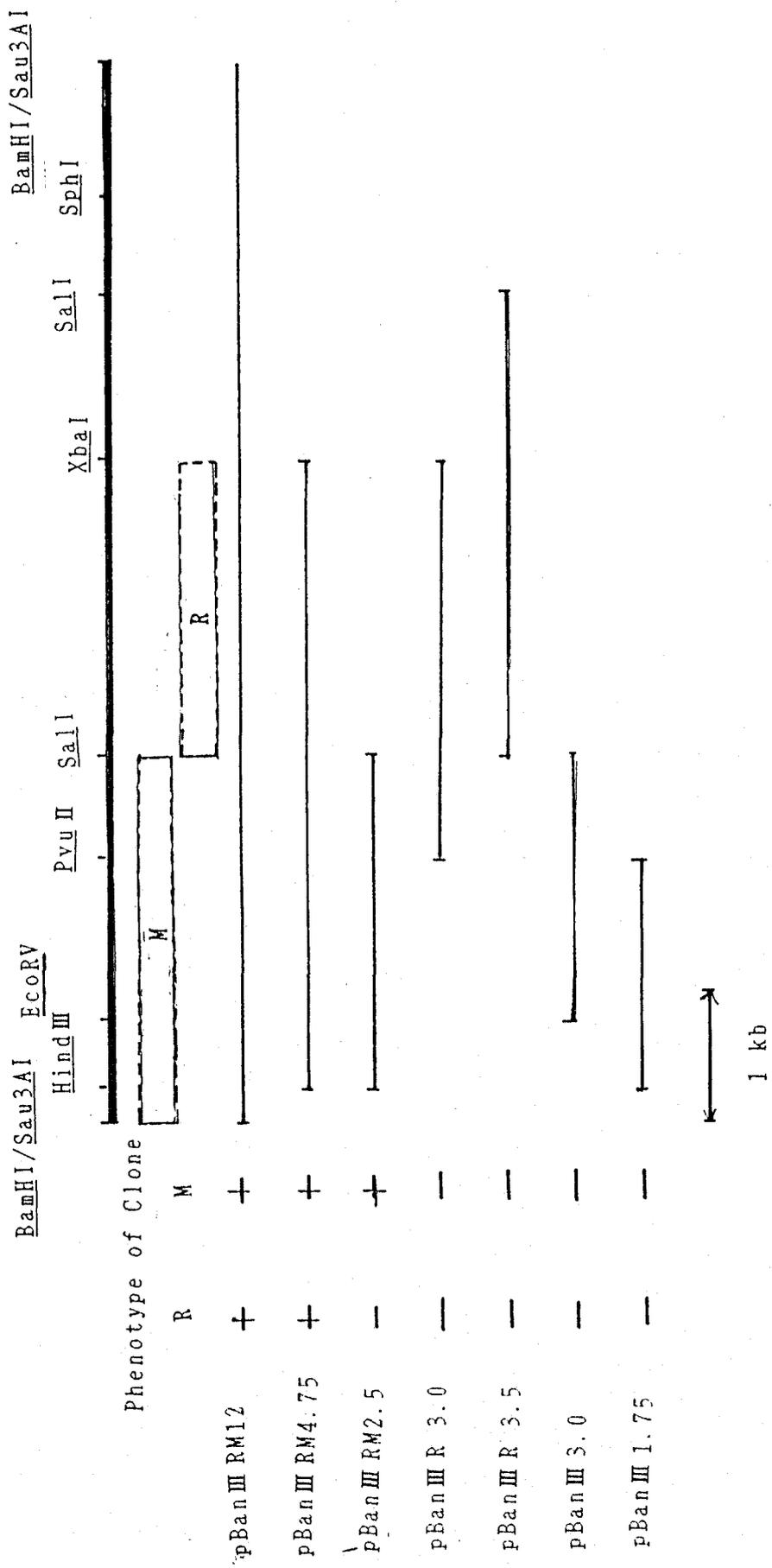


Fig. 3. Deletion derivatives derived from pBanIII RM12.

The horizontal coordinate in the right part of the figures represents the physical map of 8.1 kb insert. Coding regions of the BanIII restrict ion-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 pBanIII 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pBanIII 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pBanI1.0 pBanI0.7 pBanI1.4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ン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ンは得られなかった。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pBanIII IRM12に関してもサブクローンを行った。pBanIII RM4.75は制限系、修飾系いずれの表現型をも示す。pBanIII M2.5は修飾系の表現型を示すが、制限系を示さない。pBanIII RM3.0 pBanRMIII 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ン(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pBanI.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. であっ

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 ではわずかに制限されるだけであった. 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た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 λ -phage を高タイタ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かった.

Table 2 Restriction and modification of λ *vir* by hybrid clones

phage-prepared Strains	Efficiency of plating of λ <i>vir</i> on strains		
	pBR322/HB101	pBanIRM8/HB101	pBanIII RM12/HB101
<i>E. coli</i>			
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pBanIII RM12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pBanIII RM12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pBanIII RM12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
pBanIII RM12	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pBanIII RM12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(pBanIII RM12)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pBanIII RM12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の差によるのではないかと考えられる。BanIII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ンが、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 BanIII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5節 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ン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(pBanIII 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で顕著に制限された。E. coli JM109ではpBanIII 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—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¹¹⁾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. coli RR₁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. coli ER1467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⁾、EcoRII¹³⁾、BepI¹⁶⁾、HpaI⁵⁵⁾、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単一まで精製し, 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節 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活性は細胞破砕液を1 μ g λ -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 μ l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。菌体残渣を遠心分離(20 min, 8,000rpm)で除去し上澄みを得る。上澄みに固形の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。この後固形硫酸を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 KCl, 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パタイトカラム(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。細胞残渣を除去後、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 KCl, 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。

ゲル濾過による分子量の決定

酵素の元の形のおよその分子量をセファクリル S-200カラム (Pharmacia LKB Biotechnology 2 X 40 cm) によるゲル濾過で決定した。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 (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 Sequenase™ 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。

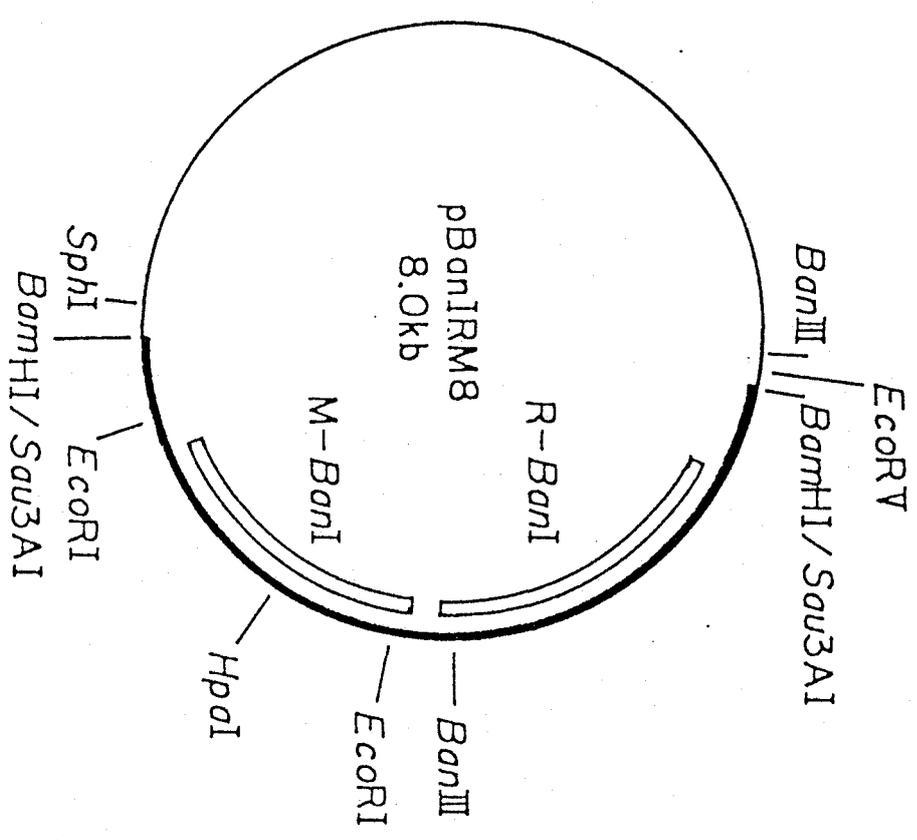
第 3 節

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 分解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 BanI 1 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、

A



B

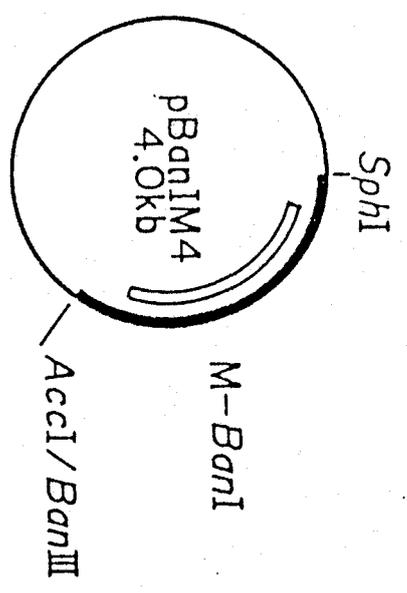


Figure 1. Physical maps of plasmid pBanIRM8(A) and pBanIM4(B). The thin lines represent the PBR322 or pUC18 moieties and thick lines cloned DNA moieties. Open boxes inside the circle show the coding regions for *R-Ban*I and *M-Ban*I, assigned by deletion and

sequence analysis

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った。

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、ゲル濾過法で分子量を決定した(Fig. 2)。分子量標準マーカ-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があることがわかった。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

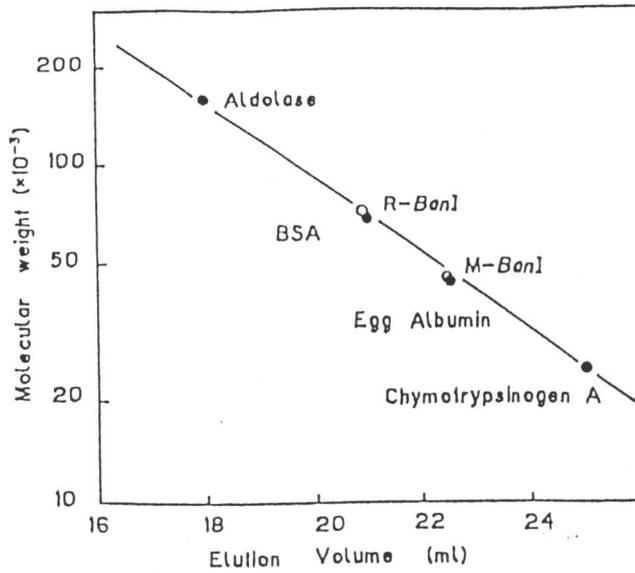


Figure 2. Estimation of the molecular weights of BanI enzymes by gel filtration. Activity peaks in the final purification step of R-BanI and M-BanI and molecular weight markers were chromatographed on Sephacryl S200 columns, and elution volumes at peak positions were plotted as the logarithmic function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

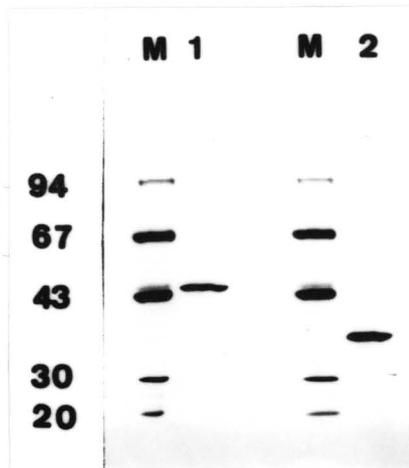


Figure 3. Estimation of molecular weights of BanI enzymes by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular weight markers (lane M) and activity peaks of M-BanI (lane 1) and R-BanI (lane 2), eluted from the sephacryl columns, were electrophoresed on gradient SDS-polyacrylamide gels (10-20%), and made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

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δρο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いま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。

第4節 考察

B. aeurinolyticus は三種の異なる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単一までに精製することが可能となった。pBR322の BanII 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塩基上流にリボゾ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ル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. aneurinolyticus 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ずき決定した。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節 要約

GGPyPUCCを認識し切断する BanI 制限修飾系遺伝子を B. aneurinolyticus 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-BanI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透過による分析でR-BanIはダイマー酵素でありM-BanI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-BanI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。

総括

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されてきた。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の切断性に特徴のある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見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の切断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')-GPuGCPyC-(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, BspM 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を生産に關与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フェ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単一にまで精製した。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

様に単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濾過分析より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) Schoner, H., Kelly, S., Smith H. O. : Gene 24, 227, (1983)
- 9) Kiss, A., Posfai, G., Keller, C. C., Velenetainær, 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., Manus, 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. Biochemi., 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)
- 31) Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. N., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A, III, Slocumoe, P. M., Smith, M. : J. Mol. Biol., 125, 225, (1978)
- 32) Shimizu, M., Takahashi, H., Saito, H. : Gene 11, 219 (1980)
- 33) 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. Chemi. , 48, 193 (1984).
 - 39) Maekawa, Y. and Kawakami, B. :Applied , Environmental Microbio.
 - 40) Maekawa, Y. Kawakami , B. and yasukawa, Y. :J. Biochem. ,
 - 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. , Zacahu, 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) Natri, 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. , Rosenfold, E. C. , Honingman, A. , Szybalski, W. :Gene, 10, 357, (1980)
 - 54) Mayer, H. , Grosscedl, R. , Schutte, H. , Hobon, 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. , Fritsh, 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