

論文内容の要旨

論文題目

Expression and Characterization of Hyperthermophilic DNA
methyltransferase M.PabI
(高度耐熱性 DNA メチル化酵素 M.PabI の発現と機能解析)

氏名 渡部 美紀

序論

DNA メチル化酵素とその役割 :

DNA のメチル化は、DNA 修復・複製、遺伝子発現の制御、そして外来 DNA に対する区別といった生物学的過程に関与する重要な要素である。この DNA メチル化反応を行う酵素が DNA メチル化酵素である。DNA メチル化酵素は、S-アデノシルメチオニン(AdoMet) をメチル基供与体として、基質 DNA の塩基に対しメチル基転移反応を行う。

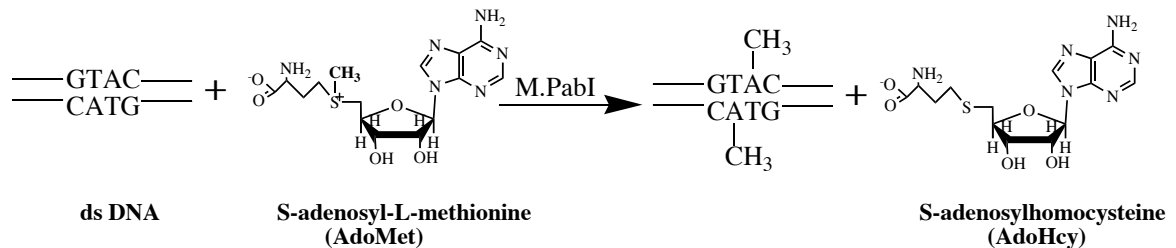


Fig. 1 DNA 修飾酵素によるメチル化反応

DNA メチル化酵素多くは、3種の反応生成物、シトシン5位のメチル化 (m5C)、シトシン4位の N のメチル化(m4C)、そしてアデニン6位の N のメチル化(m6A)のいずれかを生じる。このうち m4C と m6A を与えるメチル化酵素では、アミノ酸の配列において9つのモチーフ (活性サイト、AdoMet 結合領域) が保存されており、それらと TRD (target recognition domain) の並び方をもとに、主に α , β , γ のグループに分類される。

RM システムにおける DNA 修飾酵素 :

多くの原核生物における DNA メチル化酵素は、制限修飾システム(RM システム)を構成している。この制限修飾システムは Type I, Type II, Type III 等に分類されている。このうち、II 型の制限酵素は、特定の短い認識配列を認識して DNA の 2 重鎖切断を起こす。その認識配列をメチル化によって制限酵素による切断から保護するのが修飾酵素である。ほとんどの場合、その遺伝子 (m) にパートナーとなる制限酵素の遺伝子 (r) が隣接している。これら制限修飾系は侵入 DNA を攻撃するための細胞防御の道具と考えられてきた。ところが、私たちの研究室は、制限修飾遺伝子がウイルスゲノムやトランスポゾンのような「利己的な動く遺伝子」単位としてふるまう場合がある事を明らかにしてきた。

比較ゲノムによって見つけられた *Pyrococcus* ゲノムの制限修飾システム :

これまでに、「利己的な動く遺伝子」単位としてふるまう RM システムの可動性に関する証拠が、*Pyrococcus* の解析からも得られている。

Pyrococcus 属は、およそ 100℃の深海熱水孔に生息する超好熱古細菌である。このような超好熱菌由来の耐熱性タンパク質は、生理学、酵素学およびバイオテクノロジーへとといった分野への応用が期待されるものである。全ゲノム配列が明らかとなった *Pyrococcus abyssi* と *Pyrococcus horikoshii* のゲノム比較において、大きなゲノム多型が制限修飾遺伝子と連鎖している例が示された(Chinen *et al.* *Gene* 2000)。

更に、*P. abyssi* ゲノム中において、ゲノム多型に関与する制限修飾系らしい ORF 群が見つかり、そのうち PAB0105 遺伝子が、制限酵素活性を持つことが報告された (Ishikawa *et al.* *Nucleic. Acids Res.* 2005)。しかし、制限酵素遺伝子 PAB0105 と隣接する PAB2246 遺伝子が、DNA 修飾酵素として、その酵素活性を示すか否かについての報告は成されておらず、*P. abyssi* ゲノム中の、ゲノム多型に関与する制限修飾系として成立するかどうかは明らかではない。そこで本研究では、この DNA 修飾酵素をコードすると推定されている遺伝子に注目し、その産物の発現と精製を行い、それが修飾酵素である証拠を得、その反応の詳細な生化学的解析をおこなった。

結果

1. BLASTP 検索の結果、Related Structure として、*Thermus aquaticus* YTI 由来 DNA 修飾酵素である M.TaqI が得られた。更に、ゲノムにコードされる全タンパク質の配列データを解析したデータベース GTOP (GTOP : <http://spock.genes.nig.ac.jp/%7Egenome/gtop.html>)においても、M.PabI は、M.TaqI と立体構造上、最も高い相同性を示した。

更に、DNA 修飾酵素によく保存されている 9 つのモチーフの並び方から、M.TaqI は group γ に分類されている。M.PabI においても、これら 9 つのモチーフはよく保存されていた。従って M.PabI は DNA 修飾酵素の中で group γ に分類されることが明らかとなった。

また、M.PabI の N 端 228 アミノ酸 (メチル化活性に関与する 9 つのモチーフを含む領域) に対する、BLASTP サーチの結果、幾つかの TypeII DNA 修飾酵素の他に、TypeI 制限酵素の M サブユニットがヒットした。同様に M.PabI の C 端 210 アミノ酸 (TRD ドメイン領域) に対し検討した結果、TypeI RM システムにおいて、塩基認識に関与する S サブユニットがヒットした。このような M.PabI のアミノ酸配列の特徴から、M.PabI をコードする遺伝子(PAB2246)が、TypeI RM システムと進化的に近い可能性が示唆された。

2. M.PabI を大腸菌系 (pET システム) で His タグをつけて大量発現させた。ソニケーションによる細胞破碎後、Ni-NTA, Heparin のアフィニティーカラムにかけ、Thrombin でタグを切り、Benzamidine カラムをとおすことで、thrombin を取り除き、およそ 90% の純度で M.PabI を得ることができた。

3. 精製された M.PabI を用い、その認識配列及びメチル化される塩基を同定した。M.PabI の認識配列は、その隣接する制限酵素 PabI と同じ認識配列(5' -GTAC-3')が期待された。そこで、M.PabI の認識配列を決定するために、同位体ラベルされた S-アデノシルメチオニン(^{14}C -AdoMet)を用いて、この認識配列を持つオリゴ DNA 基質と持たないものに対し、メチル化活性の検出を試みた。その結果、前者にのみメチル化活性を示した。このことから M.PabI の認識配列は 5' -GTAC-3' であると結論した。

更に M.PabI によってメチル化される塩基を同定するために、ラベルされたメチル化産物の加水分解によって得られる塩基について薄層クロマトグラフィー(TLC)を行った。アデニン DNA 修飾酵素が示す移動度 (R_f 値) と同じ値を示した。従って、M.PabI はアデニン 6 位の N の修飾酵素であることが明らかとなった。

4. 超好熱菌由来 M.PabI のメチル化の至適条件

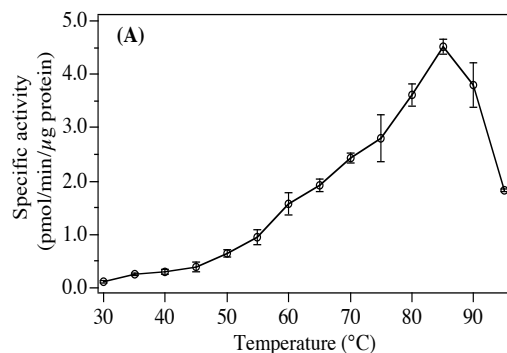


Fig. 2. メチル化の温度依存性

(温度、pH、塩濃度)を検討した。その結果、M.PabIの至適条件は、温度65~95 °C, pH 5.8~6.7, 塩濃度200~500 mMであることが明らかとなった。更に、M.PabIに対する二価カチオンの効果について検討した。M.PabIに対し、亜鉛が阻害効果を示した。

5. 超好熱菌由来M.PabIが持つ耐熱性について検討した。酵素反応前に、あらかじめM.PabIを温度75, 85, 95度で保温し、それぞれの温度における活性を75度における時間変化で測定した。その結果、M.PabIの耐熱性の半減期は95°C: 9 min, 85°C: 19 min, 75°C: 38 minであることが明らかとなった。

6. 温度75°CにおけるM.PabIの分子活性(k_{cat}), K_m^{DNA} , K_m^{AdoMet} を求めた。その結果、 $k_{cat}=0.041 \text{ sec}^{-1}$, $K_m^{DNA}=159 \text{ nM}$, $K_m^{AdoMet}=1.28 \text{ }\mu\text{M}$ であることが明らかとなった。

更に、37~85°CにおけるM.PabIのメチル化反応の速度定数を求め、アレニウスプロットを行った。その結果、この温度範囲におけるアレニウスプロットは直線的に変化したことから、この温度変化においてM.PabIは大きなコンフォメーション変化を伴わずにメチル化反応を行っていることが示唆された。また、75°Cにおける熱力学的パラメーターを求め、高温におけるM.PabIによるメチル化反応が熱力学的にも安定な反応であることが示唆された。

考察

今回解析を行ったDNA修飾酵素M.PabIは、これまで報告されているDNA修飾酵素の中で最も耐熱性を示す酵素である。好熱菌由来で扱いやすいという点からDNAメチル化反応機構を詳細に解明及び、タンパク質工学といった分野への応用も可能であると思われる。また、古細菌ゲノムDNAとの相互作用の機構の解析にも適している。