

論文審査の結果の要旨

氏名 渡部 美紀

本論文は、超好熱古細菌由来 DNA 修飾酵素の生化学的解析について述べられている。

様々な生物学的過程に関与する 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 の塩基シトシンの 5 位、シトシン 4 位の N あるいはアデニン 6 位の N にメチル基転移反応を行う。多くの原核生物における DNA メチル化酵素は、制限修飾系の修飾酵素であり、その遺伝子に制限酵素の遺伝子が隣接している。それらは対となる制限酵素の認識配列をメチル化して、制限酵素による切断から保護する。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、申請者の研究室は、制限修飾遺伝子が「利己的な動く遺伝子」としてふるまう事を明らかにしてきた。

申請者の研究室は、100℃の深海熱水噴出孔に生息する超好熱古細菌である *Pyrococcus* 属の二つの種 *P. abyssi* と *P. horikoshii* の全ゲノム配列比較によって、制限修飾遺伝子らしい DNA がその一方 (*P. abyssi*) へ挿入していることを発見し、その遺伝子の一つが、制限酵素活性を持つことを示した。しかし、隣接する PAB2246 遺伝子産物が修飾酵素か否かは不明だった。そこで申請者は、本研究で、この遺伝子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、その反応の生化学的解析をおこなった。

1. ホモロジーサーチの結果、Related Structure として、好熱菌 *Thermus aquaticus* 由来の M.TaqI(II 型修飾酵素)が得られた。更に、GTOP においても、M.PabI は、構造既知のタンパク質のうちでは M.TaqI と最も高い類似性を示した。更に、保存されたメチル化に関する 9 つのモチーフの並び方から M.PabI は M.TaqI 同様 group γ に分類された。

また、BLASTP の結果、M.PabI の N 端側の半分 (9 つのモチーフを含む領域) には、幾つかの II 型修飾酵素の他に、I 型制限酵素の M サブユニットとの高い類似性が検出された。同様に M.PabI の C 端側の半分 (標的配列認識領域) には、Type I 制限酵素の塩基配列認識 (S) サブユニットとの高い類似性が検出された。M.PabI が I 型制限修飾酵素系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。Ni-NTA, Heparin のアフィニティーカラムを通し、Thrombin でタグを切り、Benzamidine カラムで、thrombin を取り除き、およそ 90%の純度で M.PabI を得た。

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 (5' -GTAC-3')であることが予想された。この予想と一致して、¹⁴C-AdoMet によるメチル化は、この配列を持つオリゴ DNA では起きたが、別の持たないものでは起きなかった。ラベルされたメチル化 DNA の加水分解によって得られる塩基を、薄層クロマトグラフィーで分離したところ、アデニン 6 位の N のメチル化産物と同じ移動度を示した。

4. M.PabI によるメチル化の至適条件は、温度 65~95 ° C, pH 5.8~6.7, 塩濃度 200~500 mM であった。二価カチオンの中では、亜鉛が阻害効果を示した。

5. M.PabI は高度の耐熱性を示した。酵素反応前に、あらかじめ M.PabI を温度 75, 85, 95 度で保温してから、75°C で活性を測定した。その結果、M.PabI の活性の半減期は 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。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と考えられる。

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。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。

申請者が、これらの研究を非常に独立性高く進めてきたことが、審査の過程で明らかになった。また、生化学についての高い知識、実験技術のレベルの高さ、困難な問題を解決する力量が明らかになった。