

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14572

研究課題名(和文)塩基切り出し型制限酵素という驚き：構造と機能からエピジェネティクスの起源へ

研究課題名(英文)Base-excision restriction enzymes: structure, function and epigenetics

研究代表者

小林 一三 (KOBAYASHI, Ichizo)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30126057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：既に超好熱細菌由来のR.PabIが、塩基切り出し型制限酵素であることを報告している。カンピロバクター目の中温菌のホモログを発現精製し、塩基切り出し活性、APリナーゼ(DNA鎖切断)活性を証明した。これらの制限酵素をもつ大腸菌にファージを感染させ、制限が起きることを示した。R.PabIの場合 APエンドヌクレアーゼの変異体でこの制限が弱くなる。

この制限酵素遺伝子の分子進化を解析し、動く遺伝子であることを明らかにした。ピロリ菌では、東アジア株の一部とアメリカ先住民株で失われていること、東アジア株とインド株の組み換えがこの遺伝子座で起きていることを発見した。

研究成果の概要(英文)：We earlier reported that R.PabI from hyperthermophilic archaeon belongs to the base-excision class of restriction enzyme (DNA N-glycosylase). We purified its homologs from Campylobacteriales order and demonstrated its base excision and AP lyase (DNA strand breakage) activity. They show restriction activity towards phage in Escherichia coli. For R.PabI, AP endonuclease mutants decrease the restriction.

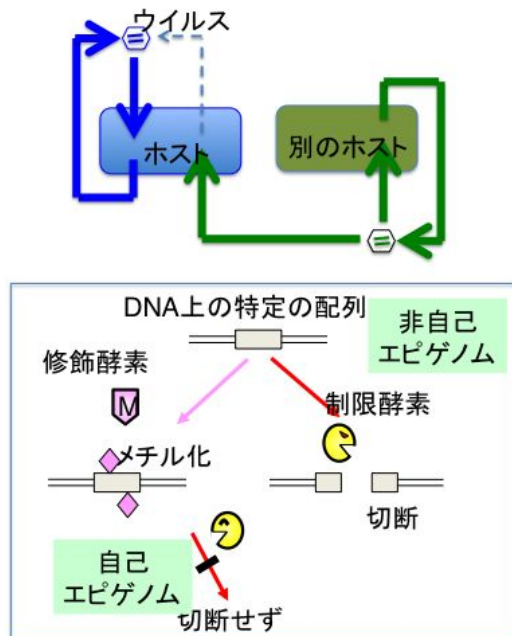
We analyzed their molecular evolution and demonstrated they represent mobile genes. In Helicobacter pylori, the gene was lost in some East Asian strains and all Amerind strains. Recombination between East Asian strains and Indian strains took place in this locus.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：制限修飾系 制限酵素 塩基除去 DNA切断酵素 キャンピロバクター ピロリ菌 APリナーゼ APエンドヌクレアーゼ

1. 研究開始当初の背景

<制限修飾系と制限酵素> 微生物が宿主生物に「適応」すること、つまり特定の宿主で一度増えると、その宿主で増えやすくなること(図)は、早くから知られていた。



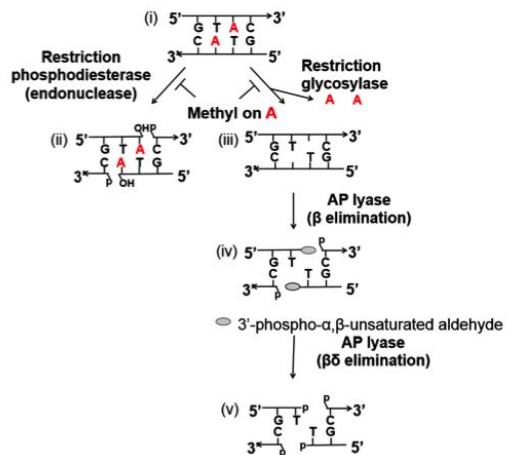
バクテリオファージなどの細菌への適応の研究から、DNA に特定配列でのメチル化などの修飾が行われ、その「自己」の印を持たないDNA は「非自己」として「制限酵素」によって破壊されるという、エピジェネティックなしくみが明らかになった。これら制限酵素は、ツールとして分子生物学に貢献し、その反応機構は DNA とタンパク質の配列特異的相互作用のパラダイムとなった。これまで研究されてきた全ての制限酵素は、DNA の背骨のリン酸ジエステル結合を加水分解し、3' OH 端と 5' P 端を残すフォスフォジエステラーゼであった。

<新しい基本立体構造を持つ制限酵素> 代表者らは、制限修飾系がウイルスゲノムのような「動く遺伝子」であることを明らかにしてきた(Naito et al., Science, 1995)。その性質を利用して、ゲノム配列の比較から動く遺伝子を検出する方法によって、既知の制限酵素とはまったく配列が似ていない制限酵素を発見した(Ishikawa et al., Nucleic Acids Res. 2005)。X 線結晶構造解析によって、この酵素 R.PabI は、ハーフパイプと名付けた新しい基本立体構造(フォールド)を持つことがわかった(Miyazono et al. Nucleic Acids Res. 2007)。

<制限酵素による塩基の切り出し> この制限酵素は 5'GTAC3'を認識、切断し、5'GTA_{OH}と pC3'を端に残すと結論された。しかし、その端が異常な構造をしていることが、産物のゲル電気泳動パターン、そして切断産

物の再結合しにくさから示唆された(K. Ishikawa, 私信)。また、2 価金属イオンを要求しないという、制限酵素としては例外的な性質を持っていた(Miyazono et al. Nucleic Acids Res. 2007)。変異体の一つと標的 DNA との共結晶では、フリーの A (adenine) が背骨が未切断の DNA の糖(デオキシリボース)から、離れたところに位置していた(Miyazono et al., Nature Communications, 2013)。これは、この塩基の切り出しが、鎖切断の前に起きたことを強く示唆していた。引き続き生化学的解析は、塩基の切り出しを証明した。

<塩基の切り出しとは> DNA の塩基の切り出しは、損傷塩基、ウラシル、ミスマッチ塩基対の塩基など、「あるべきでない」塩基に対しておき、その修復(除去修復)に繋がる。また、真核生物では、塩基切り出しがエピジェネティックなメチル化塩基に起きる。制限酵素が塩基を切り出すこと、それによって DNA の増殖能喪失がもたらされることは、まったく新しい発見である。



2. 研究の目的

本研究の目的は、この R.PabI ファミリーの制限酵素について、塩基切り出しとそれに続く反応の機構を解明し、制限活性などの生物学的意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

R.PabI ファミリーの制限グリコシラーゼモデル(下図)を検証し、その生物学的意義を明らかにするために以下の解析を実施する。

(1) **中温菌のホモログの解析。** 超好熱古細菌である *Pyrococcus* 由来の R.PabI と異なり、真正細菌・中温細菌であるイブシロンプロテオバクテリアのホモログは、常温で至適活性を示すと予想される。分子機構、生物学的意義を解明する。

(2) **In vivo**での解析。大腸菌内で R.PabI を発現し、通常の制限酵素の作用と比較する。

(3) **分子進化解析**。R.PabI は超好熱古細菌から得られたが、真正細菌にもホモログが多い。このファミリーの進化を、遺伝子配列、ゲノムコンテキストの比較から検討する。他の制限酵素の場合と同様に動く遺伝子として進化して来たか、他の動く遺伝子、ホスト細菌攻撃遺伝子との関係はないかを考察する。

4. 研究成果

(1) 中温菌のホモログの解析。

R.PabI のカンピロバクター *Campylobacter coli* およびピロリ菌 *Helicobacter pylori* のホモログを、遺伝子合成によって大腸菌で発現し、精製した。認識配列 GTAC での DNA 切断活性と、塩基切り出し活性を証明した。それらは、ともにこの認識配列内の A がメチル化されている場合には見られなかった。カンピロバクターのホモログ R.CcoLI については、AP リアーゼ活性を、AP サイトを持つオリゴヌクレオチドを基質として証明した。

(2) **In vivo**での解析。

R.PabI をもつ大腸菌に、バクテリオファージ・ラムダを感染させ、制限が効率よく起きることを示した。大腸菌の AP エンドヌクレアーゼの変異体では、この制限が著しく弱くなることを発見した。R.PabI で処理して鎖切断を起こしていないプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションで導入した時の効率の低下によって制限を見る系でも、大腸菌の AP エンドヌクレアーゼの変異体で制限が弱くなることを発見した。これらは、PabI ファミリーの制限作用を AP エンドヌクレアーゼが促進することを示す。AP エンドヌクレアーゼは、塩基切り出し後に、その 5' のサイトに切断を入れ修復を促進することが知られていた。私たちの以上の結果は、これまで DNA 損傷の修復にかかわると考えられていた塩基切り出し経路の酵素群が、DNA を損傷することに参与することを示す。中温菌のホモログではこのような AP エンドヌクレアーゼの作用は見られなかった。既に二重鎖切断が起きているためと考えられる。

(3) 分子進化解析。

この制限酵素遺伝子ファミリーの分子進化を解析した。それらが制限修飾系を単位とした動く遺伝子であること、*Campylobacter* 目で伝わってきたことを明らかにした。

ピロリ菌の完全ゲノム配列から、この遺伝子が東アジア株の一部とアメリカ先住民株で失われていること、マレーシアで東アジア株とインド株の組み換えがこの遺伝子座で起きたケースを発見した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

(1) Kenji K. Kojima, Ichizo Kobayashi. Transmission of the PabI family of restriction DNA glycosylase genes: mobility and long-term inheritance. **BMC Genomics** 16(1):817 (2015) (査読あり)

(2) Masaki Fukuyo; Toshiaki Nakano; Yingbiao Zhang; Yoshikazu Furuta; Ken Ishikawa; Miki Watanabe-Matsui; Hirokazu Yano; Takeshi Hamakawa; Hiroshi Ide; Ichizo Kobayashi. Restriction-modification system with methyl-inhibited base excision and abasic-site cleavage activities. **Nucleic Acids Research** 43: 2841-2852 (2015) (査読あり)

(3) Kenji K. Kojima, Ichizo Kobayashi. Epigenetic self-recognizing systems: base-excising restriction enzymes and beyond. *PLoS Genetics* (in press) (査読あり)

(4) 小林一三、進化の単位としてのエピゲノム：配列特異性を変える細菌の DNA メチル化系からの仮説。「種生物学研究」第 39 号「エコロジカル・エピジェネティクス - 生物の柔軟性の分子生態学 -」(責任編集者：荒木希和子・土畑重人) 文一総合出版、刊行中(査読あり)

(5) 小林一三、ゲノム育種からエピゲノム育種へ。「化学と生物」日本農芸化学会、刊行中、(査読なし)

[学会発表](計 7 件)

(1) 福世真樹、塩基切り出し型制限酵素、ゲノム微生物学会、東京工業大学、東京都目黒区、2016 年 3 月 4 日~6 日、口頭発表

(2) Ichizo Kobayashi, Genome/Epigenome Dynamics in Bacterial Evolution, MCB75: from Molecules to Organisms, December 11 ~ 14, 2015, Indian Institute of Science, Bangalore, India.

(3) Ichizo Kobayashi, Genome/epigenome evolution of *H. pylori*, *Campylobacter*, *Helicobacter* & Related Organisms (CHRO) 2015, November 1 ~ 5, 2015, Energy Events Centre, Rotorua, New Zealand.

(4) 小島健司、小林一三、塩基切り出し型制

限酵素修飾酵素系の進化と人類移動史、**日本進化学会第17回大会**、中央大学後楽園キャンパス、2015年8月20日~23日、東京都文京区、口頭発表、ポスター発表

(5) Masaki Fukuyo, Toshiaki Nakano, Kenji K. Kojima, Yingbiao Zhang, Yoshikazu Furuta, Ken Ishikawa, Miki Watanabe-Matsui, Hirokazu Yano, Takeshi Hamakawa, Hiroshi Ide and Ichizo Kobayashi, Restriction enzyme with base excision and abasic-site cleavage activities, 7th NEB Meeting on DNA Restriction and Modification, **グダンスク大学、グダンスク、ポーランド**、2015年8月24日~29日、口頭発表

(6) Masaki Fukuyo, Toshiaki Nakano, Kenji K. Kojima, Yingbiao Zhang, Yoshikazu Furuta, Ken Ishikawa, Miki Watanabe-Matsui, Hirokazu Yano, Takeshi Hamakawa, Hiroshi Ide and Ichizo Kobayashi, 塩基切り出し型制限酵素という驚き、**日本進化学会第17回大会**、S8-1、中央大学後楽園キャンパス、東京都文京区、2015年8月20日~23日、口頭発表

(7) Yoshikazu Furuta, Hirokazu Yano, Zobaidul M. Alam, Emiko Rimbara, Hiroe Namba-Fukuyo, Tomoko Shibata, Tomoaki Nishiyama, Shuji Shigenobu, Mitsuyasu Hasebe, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Keigo Shibayama, Ichizo Kobayashi, Methylome Diversification in Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*, **International Symposium of Corrective Gene System “Establishing Next-Generation Genetics”**, 奈良春日野国際フォーラム 麓~I・RA・KA~ (奈良県奈良市) 2015年5月28日~29日、ポスター発表

〔図書〕(計 2 件)

(1) I. Kobayashi. Genome evolution: *Helicobacter pylori* as an extreme model. pp.217-231. In: S. Backert, Y. Yamaoka, Eds. *Helicobacter pylori* Research - From Bench to Bedside, Springer Tokyo, Japan. 2016.

(2) I. Mruk, I. Kobayashi. Epigenetics mediated by restriction-modification systems. In: F. J. de Bruijn, Ed. **Stress and Environmental Control of Gene Expression in Bacteria**, two volume set, 1416 pages, Wiley. (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 一三 (KOBAYASHI, Ichizo)
東京大学大学院新領域創成科学研究科教授
研究者番号：30126057

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

矢野 大和 (YANO, Hirokazu)
東京大学大学院新領域創成科学研究科特任助教
研究者番号：20646773

井出 博 (IDE, Hiroshi)
広島大学理学(系)研究科(研究院) 教授
研究者番号：30223126

福世 真樹 (FUKUYO, Masaki)
千葉大学大学院医学研究院特任助教
研究者番号：40639085

小島 健司 (KOJIMA, Kenji)
東京大学大学院新領域創成科学研究科特任助教
研究者番号：90748774