

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2014～2014
課題番号：26650123
研究課題名(和文) DNAの鎖を切る代わりに塩基を切り出す制限酵素

研究課題名(英文) Base excising restriction enzymes

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、「動く遺伝子」としての性質に基づいて、新しい基本立体構造を持つ制限酵素(R.PabI)を発見し、それに「塩基の切り出し活性」(DNAグリコシラーゼ活性)を証明した(Miyazono et al. Nature Communications, 2014)。

本研究では、(1) 脱塩基サイトでDNAを切断する活性(AP リアーゼ)を証明した。(2) 鎖切断を作らないで、形質転換活性を損なうことを証明した。(3) 中温菌から、ホモログを精製し、DNA切断活性を証明した。

研究成果の概要(英文)：So far, all the restriction enzymes hydrolyze phosphodiester bonds linking the monomer units of DNA. We recently reported that a restriction enzyme (R.PabI) of the PabI superfamily with half-pipe fold has DNA glycosylase activity that excises an adenine base in the recognition sequence (5'-GTAC). We now found a second activity in this enzyme: at the resulting apurinic/apyrimidinic (AP) (abasic) site (5'-GT#C, # = AP), its AP lyase activity generates an atypical strand break. Its covalent DNA-R.PabI reaction intermediates can be trapped by NaBH₄ reduction. The base excision is not coupled with the strand breakage and yet causes restriction because the restriction enzyme action can impair transformation ability of unmethylated DNA even in the absence of strand breaks in vitro. The base excision of R.PabI is inhibited by methylation of the target adenine base. These findings expand our understanding of genetic and epigenetic processes linking those in prokaryotes and eukaryotes.

研究分野：ゲノム動態学

キーワード：エピジェネティクス 制限酵素 制限修飾系 細菌 塩基除去 AP リアーゼ DNA グリコシラーゼ

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで調べられた全ての制限酵素は、DNAのバックボーンのリン酸ジエステル結合を加水分解する(図)。私達は、制限酵素と修飾酵素(DNAメチル化酵素)からなる制限修飾系が「動く遺伝子」としてふるまうことに基づいて、ゲノム配列を比較解析し、全く新しい基本立体構造(ハーフパイプ・フォルド)を持つ制限酵素(R.PabI)を発見した。その標的DNAとの共結晶では、認識配列中の塩基が鎖から離れて存在していた。続く解析は、この酵素が「塩基の切り出し活性」(DNAグリコシラーゼ活性)を持つことを示した(Miyazono et al. Nature Communications, 2014)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この「制限酵素による塩基切り出し反応」についてさらに証拠を得ること、この反応とそれに続く鎖切断反応の分子機構と生物学的意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

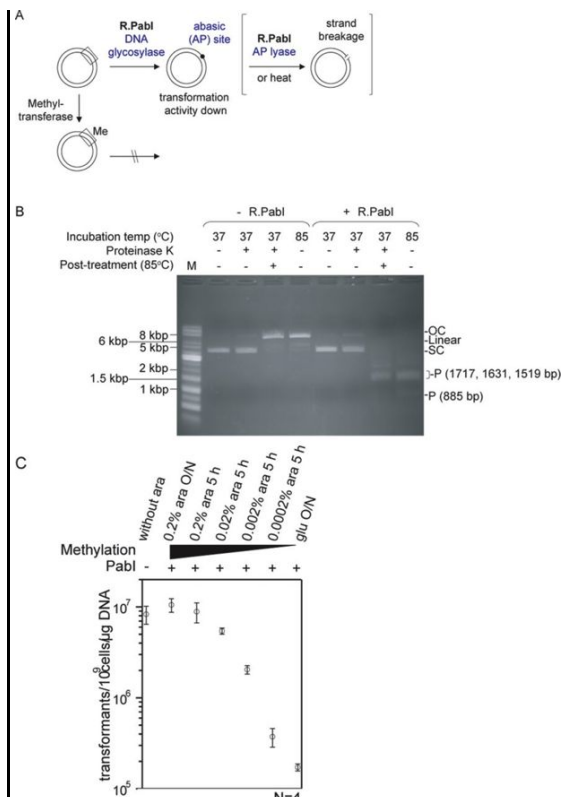
R.PabIにHisタグを付けたタンパクの遺伝子を、同じ配列(5'-GTm6AC)を認識するクロレラ由来のDNAメチル化酵素遺伝子と共に大腸菌に維持し、発現した。R.PabIはHisTrap、ヘパリンSepharose、Benzamideine Sepharoseで精製した。

DNAグリコシラーゼは、N,N-dimethylethylenediamine (DMED)をAPサイトに反応させて検出した。

認識配列にAの代わりにウラシルを含む二重鎖オリゴヌクレオチド(5'-GTUC/3'-CUTG)にuracil N-glycosylase (UNG)を反応させてAPサイトを作った。これの切断からAPリアーゼ活性を検出した。

4. 研究成果

(1) < AP リアーゼ活性の証明 > R.PabIが塩基切り出しによってできたAP



(脱塩基)サイトに働く、DNA切断活性(APリアーゼ)を持つ事を証明した。この活性は、合成APサイトを切断した。

AP リアーゼ反応が酵素に結合した中間体を、NaBH4還元によってトラップすることに成功した。

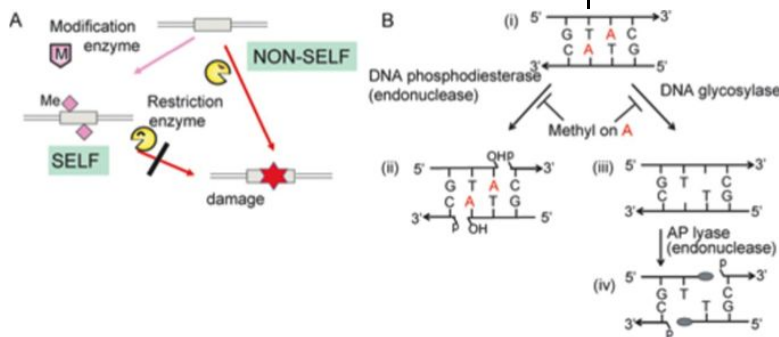
これによって、R.PabIがエンドヌクレアーゼでないという前報の誤りをたどすことができた。

(2) < 塩基切り出しが制限修飾の実体であることの証明 > そのDNAグリコシラーゼとAPリアーゼが、切り出される塩基の修飾酵素によるメチル化によって阻害されることを証明した。

さらに、二重鎖環状DNAをこの酵素で処理し、鎖切断をひとつも作らない状態でも、形質転換活性を損なうことを証明した(図)。この結果は、塩基切り出しが制限活性の実体であることの証明となる。

(3) < 中温菌のホモログの解析 > R.PabIは、超好熱古細菌Pyrococcusから得られた。真正細菌(イブシロンプロテオバクテリア)の中温菌であるCampylobacter coliとHelicobacter pylori(ピロリ菌)のR.PabIのホモログの活性を検討した。

まず、無細胞タンパク合成



系で発現した *Campylobacter* のホモログは、DNA 切断活性を持っていた。次に、タグを付けて大腸菌で *Campylobacter* ホモログと *Helicobacter* ホモログに、DNA 切断活性を証明した。

<引用文献>

Ken-ichi Miyazono, Yoshikazu Furuta, Miki Watanabe-Matsui, Takuya Miyakawa, Tomoko Ito, Ichizo Kobayashi, Masaru Tanokura. A sequence-specific DNA glycosylase mediates restriction-modification in *Pyrococcus abyssi*. **Nature Communications**, 5: 3178 (2014).

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)

(1) [雑誌論文] (計7件)

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). doi: 10.1093/nar/gkv116. 査読有。

(2) [学会発表] (計10件)

招待、基調講演

小林一三、エピジェネティクス駆動進化：細菌種内複数系列での OMICS 比較による実証、**インシリコメガバンク研究会セミナー**、2015年4月16日、東北大学メディカル・メガバンク機構（宮城県仙台市）

Ichizo Kobayashi, *H. pylori* evolution, **VI International Symposium of *Helicobacter pylori*: natural history and implications for human health**, December 3, 2014, San José, Costa Rica (Oral).

Ichizo Kobayashi, Genome/methylome evolution in *H. pylori*: oncogenic bacteria, **Center for Disease Control of China**, October 10, 2014, Beijing, China.

Ichizo Kobayashi, Epigenetics-driven

evolution?, S3-3, **16th Annual Meeting of the Society of Evolutionary Studies**, August 22, 2014, Takatsuki Gendai Gekijo, Takatsuki, Osaka.

Ichizo Kobayashi, Evolution of *H. pylori*, **11th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections**, July 2, 2014, Helsingør, Denmark, Oral.

口頭発表

Masaki Fukuyo, Toshiaki Nakano, Kenji 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**, August 24-29, 2015, Gdansk, Poland.

福世真樹、小林一三、塩基切り出し型制限酵素という驚き in (三谷啓志、小林一三世話人) シンポジウム「DNA 損傷・突然変異・がん: 生死の学としての進化学」、**日本進化学会第17回大会**、2015年8月20日~23日、中央大学後楽園キャンパス(東京都文京区)

Ichizo Kobayashi, Base-excising restriction enzymes! **Conference on Repair of Endogenous DNA Damage**, November 12-16, 2014, Santa Fe, New Mexico, USA. (Talk and Poster).

小林一三、WS1-1 DNA から塩基を切り出す制限酵素, In (小林一三、中別府雄作、世話人) WS1: DNA の破壊と修復と再編: 塩基切り出しの役割をめぐる新展開、**日本遺伝学会第86回大会**、2014年9月17日 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)

ポスター発表

小林一三、DNA methylation and base excision、**41th IMSUT Founding Commemorative Symposium (医科研創立記念シンポジウム)**、2014年5月30-31日、東京大学医科学研究所(東京都港区)

学会、シンポジウム、ワークショップなどの座長・Convener

小林一三: シンポジウム世話人 S3 Epigenomes in evolution. 16th Annual

Meeting of the Society of Evolutionary Studies, 日本進化学会第 16 回大会 August 22, 2014, Takatsuki Gendai Gekijo, Takatsuki, Osaka.

小林一三:ワークショップ世話人:WS1「DNA の破壊と修復と再編:塩基切り出しの役割をめぐる新展開 Recent excitements in DNA base excision」, 日本遺伝学会第 86 回大会、2014 年 9 月 17 日、長浜バイオ大学、(滋賀県長浜市)

〔図書〕(計 2 件)

Iwona Mruk and Ichizo Kobayashi. Epigenetics mediated by restriction-modification systems. Frans J. de Bruijn (editor), In: Stress and Environmental Control of Gene Expression in Bacteria, Wiley-Blackwell Publishers, in press.

Ichizo Kobayashi. Genome evolution: *Helicobacter pylori* as an extreme model. Steffen Backert and Yoshio Yamaoka (eds.) In: *Helicobacter pylori* Research: From Bench to Bedside, Springer, in press.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

小林研究室ホームページ:

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/ikobaya/index.html>

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) 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・医学研究院・特任助教
研究者番号: 40639085