

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 - 2008
 課題番号：19790316
 研究課題名（和文） 病原性薬剤耐性等の遺伝子の導入に対して細菌が備えるバリアーと細菌の生死
 研究課題名（英文） Barrier for transfer of foreign DNA stretch from environment to prevent break-out of new pathogenic bacteria
 研究代表者
 半田 直史（HANDA NAOFUMI）
 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：00396855

研究成果の概要：病原細菌の全ゲノム配列解読から、毒素薬剤耐性などの病原性因子がしばしば動く遺伝子に担われていることが明確になり、細菌感染の理解と制御には遺伝子の伝達過程の解明が不可欠となった。細菌自身が備える遺伝子導入を排除する機構として、制限修飾系とゲノム識別DNA分解酵素がある。前者は、自己遺伝子の維持を宿主細菌に強制する寄生遺伝子であるが、他のキラー・アンチキラー同様の自己強制維持機構を持つことを示した。また、この強制自己維持作用への細菌側の応答として、細菌からヒトまで保存されている相同組換え機構が貢献していることを示し、更に複数のタンパク質から構成される組換え機構の初期反応を試験管内で再構成することに、世界で初めて成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：微生物ゲノム、制限酵素、DNA分解酵素、相同組換え、病原細菌

1. 研究開始当初の背景

病原細菌の全ゲノム配列解読から、毒素薬剤耐性などの病原性因子がしばしば動く遺伝子に担われていることが明確になり、細菌感染の理解と制御には遺伝子の伝達過程の解明が不可欠であることが明らかになった。細菌自身が備える遺伝子導入を排除する機構として、細菌の世界に広く存在する制限修飾系がある。制限修飾系は自己の目印（メチル化）のないDNAを切断する。制限修飾系が細菌ゲノムを攻撃した際には、それを修復する

のは外来遺伝子を排除する第2の機構であるゲノム維持ナノマシンである。この機能を担うDNA分解修復酵素は、自己ゲノムを認識して選択的に修復する仕組みであり、病原遺伝子の有無とは別に病原細菌グループのゲノムレベルでのアイデンティティを規定する。

私はこれまで、制限修飾系遺伝子が外来DNAの侵入を防ぐばかりでなく、ホストゲノムを

攻撃して、自己の維持を宿主細菌細胞に強制する、いわゆる「利己的な遺伝子」として振舞うことを証明してきた (Handa and Kobayashi 1999)。すなわち、制限修飾系は単に宿主細菌のためにある道具ではなく、宿主細菌を攻撃するが故に存続する。この仮説は、制限修飾系の認識配列の多様性をうまく説明した (Kusano et al. 1995)。染色体に挿入した制限修飾系遺伝子をそれと相同な DNA で置き換えようとすると、大規模な染色体再編 (Handa et al. 2001)、あるいは爆発的な自己増幅が起こることを観察した (Sadykov et al. 2003)。細菌がもつ単独メチル化酵素 (Dcm) が、同じ認識配列を持つ制限修飾系 (EcoRII) の攻撃を防ぐ「ワクチン」として機能することを証明した (Takahashi et al. 2002)。制限修飾系が、宿主染色体を攻撃するのに対して、細菌のもつ相同組換え機構 (RecBCD 経路) が抵抗していることを証明した (Handa et al. 2000)。ある種の制限修飾系の働きは、バクテリオファージが持つ二本鎖切断修復に特化した組換え機能によって抑えられること、宿主である細菌が持つ RecBCD 組換え機能では反対に促進されることから、制限修飾系-ファージ-宿主 (RecBCD 系) の三つ巴の競争関係を示した (Handa and Kobayashi 2005)。染色体・プラスミド分配機構をめぐっても、制限修飾系とホストのかけひきが推測される。

第2の外来 DNA 排除機構であるゲノムの ID 配列に関して、RecBCD 酵素に生じた変異によって、自己の ID 配列が変化する場合を世界で初めて報告した (Handa et al. 1997)。これはゲノムの ID 配列によって細菌の種を定義するならば、種分化の瞬間とも言える。この変異 RecBCD 酵素-変異カイ配列の関係は、アメリカのグループと協力して生化学的解析を行った (Arnold et al. 2001, Handa and Kowalczykowski. in press)。染色体の二本鎖切断が実は頻繁に生じていることを、パルスフィールドゲル電気泳動の高感度な実験によって観察した (Handa and Kobayashi 2003)。これは、自己ゲノム中に侵入 DNA 配列があるかをパトロールするのに重要なのだろう。RecBCD 酵素が DNA 上を移動しながらカイ配列に出会う過程は、1分子レベルでリアルタイムに観察することに成功した (Cell 2003, Mol Cell 2005)。そこでは、RecBCD 酵素が ID 配列を認識するとそこで一時停滞し、その後減速して進むことが初めて明らかにされた。この停滞が、細菌の種を越え、遠縁のグラム陽性菌である枯草菌 (Bacillus) でも成り立つことを生化学的に示した (Chedin et al. 2006)。

自己ゲノムの認識機構の理解は、細菌のアイデンティティの理解であり、「病原細菌」という言葉の内実を問う問題でもある。つまり、「ゲノムの ID 配列によって規定される細菌のグループ」の一部が、「病原性遺伝子」を得ることによって、「病原細菌」が成立するというモデルである。

これまで、制限修飾系の消失によって、細菌に細胞死がプログラムされることを証明してきたが、「プログラム細胞死」が、これまで細菌の「ストレス応答」として理解されてきた様々なプロセスのひとつの面なのかもしれない。高等生物のプログラム細胞死では、プロテアーゼの関与が明らかにされている。細菌でも、プラスミドの自己維持強制的遺伝子から、毒素と解毒剤が発現され、遺伝子が細胞から喪失すると、解毒剤がプロテアーゼによって分解され、毒素が働いて細胞死をおこす。実際、I型の制限酵素である EcoKI について、C1pプロテアーゼによる制御が報告されている。

2. 研究の目的

これまでに明らかにされた300種を越える病原細菌ゲノム全配列決定、とくに近縁細菌ゲノムの比較から分かるのは、病原性・薬剤耐性といった性質が、「ゲノムアイランド」など「動く遺伝子」に担われていることである。細菌の世界では、外来遺伝子の取り込みが頻繁であり、単純化すれば、「非病原細菌」ゲノムが、外来遺伝子を受け取ることによって「病原細菌」に変貌すると言える。

細菌はこのような外来DNAの侵入を食い止める機構を備えており、それによってゲノムの恒常性を維持しようとする。この過程を理解することによって、病原性遺伝子の伝達をコントロールすることが可能になるだろう。侵入阻止の機構としては、以下のように、DNA エンドヌクレアーゼによる制限修飾系と、DNA エクソヌクレアーゼによるゲノム維持ナノマシンが知られており、それらは互いに関係している。

制限修飾系は、DNAの修飾(メチル化)の有無を見分けて、修飾を受けていないDNAを切断することで細菌ゲノムへの侵入を防ぐ。また、細菌がもつゲノム維持ナノマシンであるDNAエクソヌクレアーゼV(大腸菌ではRecBCD酵素)は、その強いDNAエクソヌクレアーゼ活性によって侵入してきたDNAをその末端から分解する。つまり、このシステムでは、DNAの末端さえあれば自身の染色体DNAをも分解しはじめる。ところが、このRecBCD酵素は、ある短いDNA配列(大腸菌ではカイ配列と呼ばれる8塩

基、5' -GCTGGTGG)に出会うと、分解のモードが変化して3'端をもつ一本鎖DNAを残し、RecAタンパク質に引渡して組換え修復を開始させる。すなわち、このゲノム維持酵素は、ゲノムのID配列に出会うことによって、DNAの破壊から修復へとスイッチし、それによって似ていない外来DNAの侵入を防いでいる。これらの過程を解明する事によって、病原性薬剤耐性遺伝子の伝達のレベルで細菌感染をコントロールするだけでなく、細菌の生死を直接コントロールする道が開かれるだろう。

本研究では、制限修飾系の宿主細菌攻撃に対する細菌の生死の選択を理解するために、プログラム死への経路を明らかにすることを目的とする。制限修飾系が仕組む「プログラム細胞死」の機構の詳細について解析する。また、制限修飾系による細胞死は、制限酵素がゲノムDNAを攻撃する、すなわちDNA二本鎖切断が引き起こす細胞死であるので、これへの応答としての相同組換え機構の解析を行う。特に、これまで二次的な経路と考えられてきたRecF相同組換え経路については、より詳細な検討が必要であると考えられる。なぜなら、RecF経路は細菌からヒトまで保存されている相同組換えの経路であり、染色体切断からDNA修復による再生の過程を理解するために、この経路のDNA二本鎖切断への応答を検証することが不可欠だからである。

3. 研究の方法

(1)制限修飾系の攻撃に対する宿主細菌側の応答

制限修飾系のプログラム細胞死をコントロールする修飾酵素の安定性

一般的なプラスミド安定化機構として知られるキラー・アンチキラー型遺伝因子においては、キラー遺伝子産物に対してアンチキラー遺伝子産物が不安定であることが重要である。制限修飾系においては、タンパク質自身の安定性には差が見られなかった(Ichige and Kobayashi J. Bacteriol 2006)。アンチキラーがより不安定であれば、制限修飾系遺伝子の安定化機構はより強固なものに変化すると考えられる。この仮説を検証するために、あえて弱められた変異を持つ修飾酵素と野生型制限酵素遺伝子のペアを作成し、そのときの細胞死の様子を観察する。また、ここでもプロテアーゼの関与の可能性があるので、上に挙げた種々のプロテアーゼ変異を組み合わせる。

制限修飾遺伝子によるプログラム細胞死

へのRecF組換え経路の応答

制限修飾系遺伝子の「利己的な」細胞死誘導に対して、宿主の組換え経路が抵抗していることを報告している(Handa et al. 2000)。しかし、大腸菌では中心的なこの組換え機構は、実は多くのほかの細菌はもっていない。それに対し、別の二次的だと信じられてきた組換え経路は、よく保存されており、制限修飾系遺伝子の分布ともよく合っている。そこで本研究では、代表的な制限修飾系遺伝子であるEcoRI系の細胞死誘導に対する、大腸菌のRecF経路の貢献を実験的に確かめる。RecF相同組換え系は、これまで一本鎖DNAギャップの修復をするとされてきたが、二本鎖切断をも修復できることを、精製したタンパク質を用いた、試験管内再構成実験で確認する。

(2)新規制限修飾系の発見とその生物学機能の考察

超高熱細菌から単離された新規PabI制限修飾系

私たちの研究室で、ゲノムコンテキスト比較法を用いて同定した新規のII型制限修飾系であるPabI(Ishikawa et al. 2005)について、その解析を進める。制限酵素については、先の論文で報告しているが、解析がされていない修飾酵素について、遺伝子をクローンしてタンパク質を発現・精製し、その特徴を生化学的に調べる。これが超高熱細菌由来であることを考慮して、特に熱耐性とメチル化能の関係について解析したい。遺伝子を失うような場合に、宿主細菌をDNA切断によって殺してしまう、「利己的な」制限修飾系遺伝子としての振る舞いを実験室で観察したい。

(3)I型制限修飾系の振る舞い

I型制限酵素の精製

I型制限修飾系は、私たちが主張するような、典型的な「プログラム細胞死」現象を起こさない。これは、非メチル化ターゲット配列に結合しても、そこですぐにDNAを切断するわけではなく、そこからDNAを「たぐって」、他の分子と邂逅したところで切断するという機構のせいかもしれない。以前私は、同様の作用機構をもつIII型制限酵素について、DNA複製の関与を示していた(Handa and Kobayashi 2005)。そこで、DNA複製とI型制限酵素の関係をより詳細に調べることを目的として、I型制限酵素を精製する。

複製フォーク擬似基質を用いたI型制限酵素切断実験

I型制限酵素は、非メチル化ターゲット配列

を認識すると、そこにとどまり DNA を「たぐる」。その際、複製フォークに追いつくことが予想され、もしそこで切断が起これば、これはゲノム構造を破壊してしまうだろう。上で精製した I 型制限酵素を、長い腕をもつ複製フォーク様の基質と反応させて、その切断活性を調べる。この実験により、新しい機能を見出すことができれば、I 型制限修飾系の存在意義を問えるかもしれない。

4. 研究成果

(1) 制限修飾系は他のキラー・アンチキラー遺伝子同様、自己の維持を細菌に強制する寄生遺伝子である。プラスミド安定化機構として働くことが知られるキラー・アンチキラー型遺伝因子においては、キラー遺伝子産物に対してアンチキラー遺伝子産物が不安定であることが重要であることが分かっている。制限修飾系では、アンチキラーが不安定ということは確認できていないが、弱められた変異を持つ修飾酵素（アンチキラー）と野生型制限酵素（キラー）遺伝子のペアでは、制限修飾系による細胞死が顕著に現われ、野生型の制限修飾系以上にプラスミドの安定化を増強した。これは制限修飾系が、他のキラー・アンチキラー同様の自己強制維持機構を持つことを強く示唆する（J. Bacteriol. 2008）。

(2) 超高熱細菌である *Pyrococcus abyssi* から制限修飾系遺伝子をゲノムコンテキスト比較から同定した。制限酵素についての解析をこれまでに行ってきたので、対となる修飾酵素の生化学的特徴を調べた。これは、これまで知られている DNA メチル化酵素の中で、最も高温で配列特異的なメチル化活性を示した（Proceedings of International Symposium on Extremophiles and Their Applications 2007）。

(3) I 型の制限酵素は、特定の DNA 塩基配列を認識しても、そこで DNA を切断しないで DNA を「たぐる」。そして、別の酵素分子に邂逅すると、そこで DNA を切断する。私たちは、この不思議な現象が正常な DNA 複製をモニターし、異常があれば複製フォークを切断してゲノムの、あるいは細胞の生死をコントロールする事を示唆する実験結果を得た（Nucleic Acids Res 2009）。

(4) II 型制限酵素が、その遺伝子を失った細菌のゲノムを切断して殺してしまう「分離後宿主殺し」に関して、その細胞死への抵抗手段として、細菌から高等生物まで広く保存されているメディアーター組換え経路（RecF 経

路）が重要であることを示した（Microbiology 2009）。

(5) 多くのタンパク質が同時に働くことが遺伝学的な解析から知られていた、この大腸菌の RecF 経路が二本鎖 DNA 切断を修復する様子を観察することに、試験管内再構成実験で初めて成功した（Genes Dev 2009）。

(6) 最近では、タンパク質に蛍光の「タグ」を付けて、その細胞内での挙動を調べたりすることが多くなっている。しかし、気をつけなくてはいけないのは、この蛍光タグの付加によって、タンパク質が不活性化したり、本来とは異なる働きをするかもしれないことである。相同組換えで中心的な役割を担う RecA タンパク質は、蛍光タグを付けると不活性化されることが知られていた。そこで私たちは、活性が向上している変異型の RecA タンパク質に蛍光タグを付けることで、機能を維持した蛍光 RecA タンパク質を作成することに成功した。これについて細胞内での挙動を遺伝学的に、タンパク質の性質を精製した蛍光 RecA タンパク質を使って生化学的に解析した。その結果、このタンパク質が以前解析された別の活性が弱められるタイプの変異型 RecA の特徴とよく似ていた（J. Biol. Chem. 2009）。

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 6 件）

Handa N, Morimatsu K, Lovett ST, Kowalczykowski SC. Reconstitution of Initial Steps of Double strand DNA Break Repair by the RecF pathway of *E. coli*. Genes Dev, 23, 1234-1245 頁、2009 年、査読有

Handa N, Amitani I, Gumlaw N, Sandler SJ, Kowalczykowski SC. Single molecule analysis of a red fluorescent RecA protein reveals a defect in nucleoprotein filament nucleation that relates to its reduced biological functions. J. Biol. Chem. 印刷中、2009 年、査読有

Handa N, Ichige A, Kobayashi I. Contribution of RecFOR machinery of homologous recombination to cell survival after loss of a restriction modification gene complex. Microbiology. 印刷中、2009 年、査読有

Ishikawa K, Handa N, Kobayashi I. Cleavage of a model DNA replication fork by a Type I restriction endonuclease. Nucleic Acids Research. 印刷中、2009 年、

査読有

Ohno S*, **Handa N***, Watanabe M, Takahashi N, Kobayashi I (*: Equal contribution), Maintenance forced by a restriction modification system can be modulated by a region in its modification enzyme not essential for the methyltransferase activity, *Journal of Bacteriology*, 190, 2039-2049 頁, 2008 年、査読有

Watanabe M, **Handa N**, Yuzawa H, Kobayashi I, Hyperthermophilic DNA methyltransferase, M.Pabl, from *Pyrococcus abyssi*, *Proceedings of International Symposium on Extremophiles and Their Applications*, 205, 161-166 頁, 2007 年、査読無

〔学会発表〕(計 21 件)

石川健、**半田直史**、小林一三、DNA複製フォークのI型制限酵素による切断、日本農芸化学会2009年度大会、福岡

古田芳一、**半田直史**、Marat Sadykov、小林一三、ゲノム中で自己増幅した制限修飾遺伝子とそれに連鎖した遺伝子の発現量の増加、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9-12日、神戸

半田直史、Genomic ID sequence recognition by a genome maintenance enzyme, 2nd International Symposium on Bio-nanosystems, 2008年10月31-11月2日、東京

半田直史、Kowalczykowski, SC、Behavior of a RecBCD enzyme with a RecB-RecD subunit fusion, 第6回3Rシンポジウム、2008年10月27-30日、静岡県 嬌恋

石川健、**半田直史**、小林一三、Cleavage of a DNA replication fork by a type I restriction enzyme, 第6回3Rシンポジウム、2008年10月27-30日、静岡県 嬌恋

石川健、**半田直史**、小林一三、DNA複製と制限のカップリング: *in vitro*での複製フォーク型DNAのI型制限酵素による切断、日本遺伝学会第80回大会、2008年9月3-5日、名古屋

Marat Sadykov, **半田直史**、鶴剛史、小林一三、利己的制限修飾遺伝子間に起きる、ゲノム上のメチル化サイトの取り合いが、ホスト殺しをもたらす、日本進化学会2008年大会、2008年8月24日、東京

石川健、**半田直史**、小林一三、複製フォーク型DNAのI型制限酵素による切断、第5回21世紀大腸菌研究会、2008年7月28-29日、静岡県藤枝市

古田芳一、鶴剛史、**半田直史**、小林一三、ゲノム中で自己増幅した制限修飾遺伝子とそれに連鎖した遺伝子の発現量の増加、2007年度日本農芸化学会大会、2008年3月24-28日、東京

半田直史、大腸菌の相同組換え酵素のサブユニット構成を変えた時の振る舞い、第82回日本細菌学会総会、2008年3月12-14日、名古屋

半田直史、市毛朝雄、小林一三、制限修飾系遺伝子を失ったときのRecFOR組換え経路による二本鎖切断の修復、2007年度組換え・染色体再編、第19回DNA複製・分配合同ワークショップ、2008年3月4-7日、伊豆

石川健、**半田直史**、小林一三、I型制限酵素EcoR124Iは複製フォーク型DNAを切断する、2007年度組換え・染色体再編、第19回DNA複製・分配合同ワークショップ、2008年3月4-7日、伊豆

半田直史、Stephen C. Kowalczykowski、二本鎖切断から開始されるホットスポットでの相同組換えに重要なRecAと一本鎖DNAの安定な結合、「染色体サイクルの制御ネットワーク」第1回公開領域会議、2008年1月7-8日、東京

大野里奈、**半田直史**、渡部美紀、高橋規子、小林一三、一般的なトキシン-アンチトキシン系同様のメカニズムによって、細胞死をより強く起こすように変化したEcoRII制限修飾系の解析、「染色体サイクルの制御ネットワーク」第1回公開領域会議、2008年1月7-8日、東京

石川健、**半田直史**、小林一三、I型制限酵素EcoR124Iによる複製フォーク型DNAの切断、「染色体サイクルの制御ネットワーク」第1回公開領域会議、2008年1月7-8日、東京

大野里奈、**半田直史**、渡部美紀、高橋規子、小林一三、変異型アンチキラー(メチル化酵素)によって増強された制限修飾系遺伝子による細胞死、第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月11-15日、横浜

Marat R Sadykov, **半田直史**、鶴剛史、小林一三、複数の制限修飾系の間でのDNAメチル化サイトの取り合いによって引き起こされる細胞死、第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月11-15日、横浜

石川健、**半田直史**、小林一三、複製フォークに対するI型制限酵素ecoR124Iの構造特異的活性、第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月11-15日、横浜

葛黎穎、**半田直史**、広瀬彩、小林一三、遺伝子の導入と維持の選択に、薬剤耐性遺伝子の代わりにDNA修飾遺伝子を利用する、第30

回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 11 - 15 日、横浜

GE L, Handa N, Hirose A, Kobayashi I, Use of DNA modification gene as an alternative to antibiotic-resistance genes for selection of transfer and maintenance of foreign genes、第79回日本遺伝学会大会、2007年9月19 - 21日、岡山

② 葛黎穎、半田直史、広瀬彩、小林一三、遺伝子の導入と維持の選択マーカーとして、薬剤の代わりに、DNA 修飾遺伝子を使用する、第4回21世紀大腸菌研究会、2007年7月17 - 18日、静岡

〔図書〕(計 2 件)

I. Kobayashi and N. Handa. DNA Double-strand Breaks and their Consequences in Bacteria, the Encyclopedia of Life Sciences (Nature Publishing Group, Macmillan Reference Limited, London) (on-line publication)、2009年

小林一三、半田直史、組換え酵素：今堀和友 山川民夫 監修 大島泰郎、鈴木紘一、脊山洋右、新井洋由、石浦章一、大隈良典、岸本健雄、正木春彦、山本一夫(編) 生化学辞典 第4版、東京化学同人、p.380、2007年

〔その他〕

ホームページ等

<http://>

www.ims.u-tokyo.ac.jp/ikobaya/index_ja.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

半田 直史 (HANDA NAOFUMI)

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：00396855

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし