

題名： 分離後細胞死を強める EcoRII 修飾酵素の高温感受性変異体の解析

さとな

名前： 大野 里奈

学生番号： 46607

指導教員： 小林一三教授

背景： II 型制限酵素は特定の DNA 配列を認識して切断し、それと対になる修飾酵素は同じ配列をメチル化して制限酵素による切断を防ぐ。制限酵素遺伝子と修飾酵素遺伝子はしばしば隣接して並んでおり、制限修飾遺伝子 (*rm*)と呼ぶことができる。制限酵素はウィルスやプラスミドのような外来 DNA を、それらが適当な修飾酵素で修飾されていないときに切断する。そこで「これら制限修飾遺伝子は、細胞を外来 DNA から守るために必要であるがゆえに、保持されてきたのだ」と広く信じられていた。しかし我々の研究室は、いくつかの II 型制限修飾遺伝子が、ひとたび細胞から失われると細胞死を引き起こす「分離後宿主殺し」(Kobayashi 2004a)という利己的な振る舞いにより、細胞内に維持されることを発見した。制限修飾遺伝子が細胞から無くなると、新しくできる染色体上の認識サイトのメチル化が不十分になり、そこを制限酵素が切断して細胞死を引き起こす。この「分離後宿主殺し」は、制限修飾遺伝子を他の遺伝子との競争で有利にしていると考えられる。つまり競争相手を宿主とともに殺すことによって制限修飾遺伝子は自己の遺伝子を細胞内に安定に保持させている(Mochizuki et al. in press)。我々の研究室は、さらに II 型制限修飾遺伝子が、「動く遺伝子」であり、ゲノム進化に対してゲノム安定化とゲノム再編の双方に関与しているという証拠を、実験・細菌ゲノム比較などから蓄積してきた。これらから制限修飾遺伝子が「利己的な動く遺伝子」であるという考えを提唱してきている(Kobayashi 2004b)。

分離後宿主殺しを起こすことが知られているトキシン-アンチトキシン(Toxin-antitoxin: TA)系では、アンチトキシンの方がトキシンよりも不安定であることが重要である。TA 遺伝子が細胞から無くなると、細胞内のプロテアーゼによりアンチトキシンが壊されて、トキシンによる作用で細胞死が起こる。アンチセンス RNA によってトキシンの発現が抑制されている分離後宿主殺しの系では、やはり遺伝子がなくなるとアンチセンス RNA が RNase に分解されてトキシンが発現し、細胞死が引き起こされる。制限修飾系の場合も、修飾酵素が制限酵素よりも不安定であれば、分離後宿主殺しを加速すると考えられる。しかし EcoRI 制限修飾系では両酵素の *in vivo* の安定性には差がないことが示された (Ichige and Kobayashi, 2005)。一方、当研究室では EcoRII 制限修飾遺伝子を高温感受性プラスミドに連結した場合(Takahashi et al. 2002)だけでなく、高温感受性でないプラスミドに連結した場合でも、高温へのシフトによって著しい細胞死が起こることが観察されていた(N.Takahashi & I.Kobayashi, unpublished)。

目的： 高温での細胞死という EcoRII 制限修飾遺伝子がもたらす形質の原因を突き止め、制限修飾系による細胞死の機構と意義を理解する。

計画・方法：

- (1) EcoRII 制限修飾遺伝子のシーケンスを決め、変異が入っていないか検討する。
- (2) EcoRII 制限修飾遺伝子に変異がある場合、野生型 EcoRII 制限修飾遺伝子の分離後宿主殺しの有無について調べる。
- (3) EcoRII 制限修飾遺伝子に変異がある場合、野生型 EcoRII 制限修飾遺伝子と次の点で比較する。
  - (3-1) 高温と低温での細胞死
  - (3-2) 高温と低温での修飾酵素のメチル化活性
  - (3-3) 低温での細胞死による遺伝子強制維持

結果：

- (1) [配列解析] 42 度で細胞死を起こす EcoRII 制限修飾遺伝子の配列を解読し、報告されている配列と比較したところ、修飾酵素の N 末端付近で一アミノ酸置換を起こす、一塩基対置換変異 (T239C = L80P)が入っていることがわかった。部位特異的変異導入法で

EcoRII 修飾酵素遺伝子の配列を報告されているものに戻した。

- (2) [野生型による分離後宿主殺し] 野生型 EcoRII 制限修飾遺伝子が分離後宿主殺しを起こすかどうかを調べるため、温度シフト実験を行った。野生型 EcoRII 制限修飾遺伝子を複製が温度感受性のプラスミドに連結し、高温にシフトすることで人為的にプラスミド（遺伝子）が失われる状況を作った。コントロールの *r*-ネガティブ変異体では、温度シフトによってプラスミドを保持する細胞は増加を停止したが、生存細胞は増加を続けた。一方 *r*<sup>+</sup>では、プラスミドを保持する細胞の増加の停止と共に、生存細胞も増加を停止した。さらに、この状態での細胞の形態観察や、プラスミドの競合実験などからも、野生型 EcoRII 制限修飾遺伝子が分離後宿主殺しを起こすことがわかった。
- (3) [変異体との比較]
  - (3-1) アミノ酸配列を元に戻した野生型 EcoRII 制限修飾遺伝子を持つ大腸菌では、42 度での細胞死が起きなかった。
  - (3-2) 大腸菌に低温で変異型修飾酵素を発現させ、タンパク質合成阻害剤クロラムフェニコール添加と同時に 42 度にシフトして新規タンパクの合成および細胞増殖を阻害し、プラスミドを複製させ続けた細胞から、プラスミドを回収し、*in vitro*での EcoRII 制限酵素切断から守られるか否かによって、*in vivo*のメチル化活性の有無を調べた。変異型ではメチル化活性がなかった。変異型修飾酵素が高温感受性であることが示唆された。
- (3-3) この L80P 変異のサイトを含めて、N 端 83 アミノ酸を欠失させた M.EcoRII は、低温でも高温でもメチル化活性をしめした。
  - (2-3) 低温での非選択培地での植え継ぎによって EcoRII 制限修飾遺伝子を持つプラスミドの細胞内維持の安定性を調べた結果、変異型 EcoRII 制限修飾遺伝子のほうが、野生型よりも安定維持効果が高いことがわかった。

#### 考察：

- (1) 今回の結果から、修飾酵素上の L80P という変異が、42 度でメチル化活性を減少させ細胞死を引き起こすことがわかった。*r*-ネガティブ変異体では細胞死が起きないことから、この細胞死はメチル化が不十分になった染色体を制限酵素が切断したためと考えられる。その機構として、(i)変異型修飾酵素が 42 度で活性を失う（壊れる可能性も含めて）、(ii) 42 度で合成される変異型修飾酵素のメチル化活性が弱い、(iii)変異型修飾酵素の発現が 42 度では不十分、などが考えられた。低温で活性のあった修飾酵素を 42 度にすることで活性が失われることがわかったので、(i)の可能性が指示された。(ii)、(iii)の可能性は否定されないが、それらを考えなくても細胞死は十分に説明できるだろう。
- (2) この変異がマップする N 端の領域がメチル化活性に必須でない事は、この領域がメチル化活性を何らかの形で負に制御している可能性を示唆している。これが、この変異の働きと関係している事も想像される。
- (3) 変異型 EcoRII 制限修飾遺伝子のほうが野生型よりも安定維持効果が大きいことは「アンチトキシンが弱いほど、細胞に対する毒性が強く、分離後細胞死を引き起こす遺伝子が安定に維持される」ことを示唆する。今回の結果は、TA 系でわかっているアンチトキシンが不安定であることによって分離後宿主殺しを引き起こす戦略と関係するかもしれない。

#### 引用文献：

- Asao Ichige, Ichizo Kobayashi. stability of EcoRI restriction-modification enzymes *in vivo* differentiates the EcoRI restriction-modification system from other postsegregational cell killing systems. **Journal of Bacteriology**, 187: 6612-6621 (2005).
- Ichizo Kobayashi. Restriction-modification systems as minimal forms of life. In **Restriction endonucleases**. A. Pingoud (ed.) (Springer-Verlag, Berlin), pp.19-62 (2004b).
- Ichizo Kobayashi. Genetic addiction --- a principle in symbiosis of genes in a genome. In **Plasmid Biology**. B.E. Funnell and G.J. Phillips, Eds. (ASM Press, Washington, D.C.), pp.105-144 (2004a).
- Atsushi Mochizuki, Koji Yahara, Ichizo Kobayashi, and Yoh Iwasa, Genetic addiction: selfish gene's strategy for symbiosis in the genome. **Genetics**, in press.