

氏名(本籍)	石渡尚子(千葉県)
学位	博士(学術)
学位記番号	博甲第5号
学位授与年月日	平成7年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	チフス菌D4株の産生する制限酵素の遺伝学的、生化学的研究
論文審査委員	(主査)教授 谷村 顕雄 教授 小此木 成夫 教授 木村 修一 教授 小崎 道雄 北里大学教授 檀原 宏文

#### 論文内容の要旨

制限酵素は一定のDNA塩基配列を認識して切断する酵素群であり、この酵素の発見と応用によって、今日隆盛を極めている組換えDNA技術が可能となった。制限酵素は制限切断解析、遺伝子のクローニングやシーケンシング、新型ベクターの開発など遺伝子操作のほとんど全ての分野に重要な役割をはたしている。現在まで多種の制限酵素が発見されているが、さらに多数の安価な酵素の開発が待望されている。今回、*Salmonella Typhi*のフェージ型別標準株の制限酵素スクリーニングを行なった結果、*S. Typhi* D4 中に StyD4I 制限酵素を見出した。この酵素は安定性が高く、制限酵素遺伝子を大腸菌にクローニングしたことにより、取り扱いが安全かつ簡便になったため、今後、組換えDNA実験に有用な制限酵素として利用できると思われる。制限酵素はその応用の重要性に比べて、酵素の細菌における役割や作用機構、DNA-タンパク質相互作用における分子認識機構など酵素そのものに関する研究はあまりなされていない。

そこで、本研究では StyD4I 制限酵素とその遺伝子の特性を明らかにし、本酵素の作用機構および分子認識機構についての知見を得ることを目的とした。

#### 1. *S. Typhi* D4 における制限酵素産生プラスミドの性状

*S. Typhi*フェージ型標準株65株について、リゾチーム溶菌法にて制限酵素のスクリーニングを行なった結果、フェージ型D4 にII型制限酵素が見出された。StyD4I 制限酵素遺伝子は 5.4 kbの多数コピー小型プラスミド pSTd4上に存在した。*S. Typhi* D4 から精製した pSTd4 は

S-aプラスミドと共に *E. coli* WA803 に形質転換した。こうした形質転換体のうちで宿主依存性変異を示したものは80株中3株であった。この3株はいずれも pSTd4 を受け取っており、*S. Typhi* D4 と同様の特異性を持つ制限酵素を産生した。*E. coli* WA803 [pSTd4, S-a] と命名された宿主依存性変異を示す形質転換体は *S. Typhi* D4 ではなく、*E. coli* WA803 の性状を示した。pSTd4 の制限酵素地図を完成し、遺伝学的特徴づけを行なうと共に、本プラスミドがチフス菌のファージ型決定プラスミドであることを証明した。

## 2. StyD4I 制限酵素の精製と特異性

StyD4I 制限酵素は *E. coli* WA803 [pSTd4, S-a] の細胞破碎液からポリエチレンイミン沈殿、続いてDEAEセルロース、ヘパリン・アガロース、Mono Q 陰イオン交換カラム（ファルマシアFPLCシステム使用）により、非特異的ヌクレアーゼが検出されなくなるまで精製した。StyD4I は反応温度25~45°C、反応pH 8.0~10.0で最も強い活性を示した。DNA切断は10mM Mg<sup>2+</sup>存在下で最適となったが 10mM Zn<sup>2+</sup>または 10mM Mn<sup>2+</sup>によっても切断は可能であった。分子量はゲル濾過法により約70,000、SDS-PAGE法により約36,000と算定され、本酵素は二量体であることが示唆された。StyD4I は5'-/CCNGG-3' の塩基配列を認識・切断し、5' 突出末端を生じた。本実験により、*S. Typhi* D4-Vi II ファージ系の宿主依存性変異の分子機構が明らかになった。

## 3. StyD4I 制限酵素遺伝子の解析

StyD4I 制限-修飾系酵素遺伝子は pSTd4 からクローニングした。pSTd4 の遺伝子地図はデリーション法とトランスポゾンを利用したインサージョン法により作成した。StyD4I 制限-修飾系酵素遺伝子の塩基配列を決定し、コンピューター解析を行なった結果、2つの大きなORF (open reading frame) が認められた。それぞれの ORF は修飾酵素遺伝子および制限酵素遺伝子と一致した。それぞれの遺伝子は互いに逆方向に転写されることが示唆された。制限酵素遺伝子は 250のアミノ酸 (750塩基対) からなるタンパク質で、この結果から算定される分子量(33,935) はゲル濾過法およびSDS-PAGE法により求めた分子量とよく一致した。StyD4I の認識・切断部位はこのAT-rich(66.0%)な遺伝子中には存在しなかった。StyD4I 制限酵素遺伝子と認識塩基配列が類似している他の制限酵素遺伝子の推定アミノ酸配列を比較した結果、ほとんど相同性を示さなかった。