

氏 名 (国籍)	鈴木 利 彦 (静岡県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第100号
学 位 授 与 年 月 日	平成9年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	<i>Acetobacter pasteurianus</i> および <i>Agrobacterium gelatinovorum</i> の制限修飾 系遺伝子の解析
審 査 委 員	主査 静岡大学 教授 田 原 康 孝 副査 信州大学 教授 寄 藤 高 光 副査 岐阜大学 教授 河 合 啓 一 副査 静岡大学 教授 杉 山 公 男 副査 静岡大学 助教授 徳 山 真 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

I型制限修飾系は、DNAの特定の塩基配列を認識、切断する制限酵素と同酵素と同一の塩基配列内の塩基をメチル化するメチラーゼによって構成されており、このうちの制限酵素は認識、切断の塩基配列が厳密であることから、遺伝子操作に不可欠の酵素試薬として多用されている。本研究は、酢酸菌*Acetobacter pasteurianus*由来のApaLI制限修飾系の制限酵素とメチラーゼの遺伝子と海生細菌*Agrobacterium gelatinovorum*由来のAgeI制限修飾系のメチラーゼ遺伝子をクローニングし、これら遺伝子の構造を解析したもので、得られた結果の要旨は次の通りである。

1) *Acetobacter pasturianus* IFO 13753由来ApaLI 制限修飾系遺伝子のクローニングと解析：Sau3AIで部分分解した同菌の染色体DNA断片をpUC18に挿入し、組換えプラスミドを大腸菌DH5 α MCRに形質転換して遺伝子ライブラリーを作製した。ApaLIメチラーゼ(M.ApaLI)遺伝子をApaLI制限酵素(R.ApaLI)に耐性を示す組換えプラスミドとしてクローニングし、得られたR.ApaLI耐性プラスミド(pAPALM3.2)の挿入断片にM.ApaLI遺伝子(429アミノ酸残基に相当する1287bp)とその下流にR.ApaLIのN末端アミノ酸配列(19アミノ酸残基)と一致するR.ApaLI(300bp)

を見出した。この領域の塩基配列に基づいて、染色体DNAからインバースPCR法によってR.ApaLI遺伝子の塩基配列(375アミノ酸残基に相当する1125bp)を決定した。これらの結果からApaLI制限修飾系の遺伝子はM.ApaLI、R.ApaLIの順序で2bp離れて、同一方向に座位していることが示された。ホモロジー検索の結果、M.ApaLIの推定アミノ酸配列はシトシン-5メチラーゼの遺伝子の一部(S-アデノシルメチオン結合部位および触媒活性部位と推定される領域)と類似性(30-35%)を示した。R.ApaLI遺伝子と他の制限酵素遺伝子との間の類似性は見られなかった。さらに、ApaLI制限修飾系遺伝子の上流付近に転移に関与するリゾルベースと類似性の高い遺伝子が存在した。制限修飾系の近傍にリゾルベース遺伝子が存在する例は、AcdI、PaeR7I、SniIの制限修飾系で報告されている。

2) ApaLI制限酵素遺伝子の大腸菌における発現：R.ApaLI遺伝子(1125bp)をPCRによって増幅し、pET11-aプラスミドのT7プロモーターの制御下に挿入した。この組換えプラスミドを大腸菌BL21(DE3)pLySに形質転換し、30°CでIPTG添加によってR.ApaLI酵素を誘導した。その生産量は湿菌体gあたり約 4×10^6 unitであり、この値は酢酸菌*A. pasteurianus*の生産する酵素量の約200倍に相当した。R.ApaLI遺伝子の発現にT7プロモーターを利用することによって、対応するメチラーゼ遺伝子の発現を伴わずにR.ApaLI酵素を大腸菌で生産させることができた。

3) *Agrobacterium gelatinovorum* IAM 12617由来Agelメチラーゼ遺伝子のクローニングと解析：Sau3AIで部分分解した同菌の染色体DNA断片をAgelサイトを導入したpUC18に挿入し、その組換えプラスミドを大腸菌DH5 α MCRに形質転換して遺伝子ライブラリーを作製した。Agelメチラーゼ(M.Agel)遺伝子をAgel制限酵素(R.Agel)に耐性を示す組換えプラスミドとしてクローニングし、得られたR.Agel耐性プラスミド(pAGEM1.7)の挿入断片にM.Agel遺伝子(429アミノ酸残基に相当する1287bp)を見出した。M.Agelの推定アミノ酸配列は上記のM.ApaLI遺伝子と同様にシトシン-5メチラーゼの遺伝子の一部(S-アデノシルメチオン結合部位および触媒活性部位と推定される領域)と類似性(30-35%)を示した。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、*Acetobacter pasteurianus*由来ApaLI制限修飾系の制限酵素とメチラーゼの遺伝子と*Agrobacterium gelatinovorum*由来Agel制限修飾系のメチラーゼ遺伝子をクローニングし、これら遺伝子の構造を解析したものである。

1) *Acetobacter pasturianus* IFO 13753由来ApaLI制限修飾系遺伝子のクローニングと解析：pUC18プラスミドを用いた同菌の染色体DNA断片の遺伝子ライブラリーから、ApaLIメチラーゼ(M.ApaLI)遺伝子をApaLI制限酵素(R.ApaLI)に耐性を示す組換えプラスミドとしてクローニングした。得られたR.ApaLI耐性プラスミド(pAPALM3.2)の挿入断片にM.ApaLI遺伝子(429アミノ酸残基に相当

する1287bp)とその下流にR.ApaLIのN末端アミノ酸配列(19アミノ酸残基)と一致するR.ApaLI(300bp)を見出した。この塩基配列に基づいて、染色体DNAからインバースPCR法によってR.ApaLI遺伝子の塩基配列(375アミノ酸残基に相当する1125bp)を決定した。これらの結果からApaLI制限修飾系の遺伝子はM.ApaLI、R.ApaLIの順序で2bp離れて、同一方向に座位していることが示され、ホモロジー検索の結果、M.ApaLIの推定アミノ酸配列はシトシン-5メチラーゼの遺伝子の一部と類似性を示した。R.ApaLI遺伝子と他の制限酵素遺伝子との間の類似性は見られなかった。

2) ApaLI制限酵素遺伝子の大腸菌における発現：R.ApaLI遺伝子(1125bp)をPCRによって増幅し、pET11-aプラスミドのT7プロモーターの制御下に挿入した。この組換えプラスミドを大腸菌BL21(DE3)pLySに形質転換し、30°CでIPTG添加によってR.ApaLI酵素を誘導した。その生産量は湿菌体gあたり約 4×10^6 unitであり、この値は酢酸菌*A. pasteurianus*の生産する酵素量の約200倍に相当した。

3) *Agrobacterium gelatinovorum* IAM 12617由来Agelメチラーゼ遺伝子のクローニングと解析：pUC18プラスミドを用いた同菌の染色体DNA断片の遺伝子ライブラリーから、Agelメチラーゼ(M.Agel)遺伝子をAgel制限酵素(R.Agel)に耐性を示す組換えプラスミドとしてクローニングした。得られたR.Agel耐性プラスミド(pAGEM1.7)の挿入断片にM.Agel遺伝子(429アミノ酸残基に相当する1287bp)を見出した。M.Agelの推定アミノ酸配列は上記のM.ApaLI遺伝子と同様にシトシン-5メチラーゼの遺伝子の一部と類似性を示した。

このように本論文の内容は、II型制限修飾系の遺伝子の研究に新しい知見を与えるものであり、II型制限修飾系の基礎と応用の発展に貢献するものと評価された。本審査委員会は論文の構成、内容ならびに下記に示す基礎となる学術論文等について慎重に審議し、審査委員全一致をもって本論文が博士の学位を授与されるに値すると判定した。

(1) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(3), 444-447, 1996

Cloning and Nucleotide Sequence of the Agel Methylase Gene from *Agrobacterium gelatinovorum* IAM 12617, a Marine Bacterium

(2) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(9), 1401-1405, 1996

Cloning and Nucleotide Sequence of ApaLI Restriction-modification System from *Acetobacter pasteurianus* IFO 13753