

# 制限酵素修飾酵素遺伝子によるゲノムの存続と進化に関する実験的情報学的研究

●小林 一三<sup>1)2)</sup> ◆内山 郁夫<sup>3)</sup>

1)東京大学新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻,2)東京大学医科学研究所,3)岡崎国立共同研究機構計算科学研究センター

## 〈研究の目的と進め方〉

「ゲノム構造がなぜ変わっていくのか」、言い換えれば「ゲノム構造がなぜ存続していくのか」を理解する事は、ゲノム生物学の中心的な課題である。本研究では、制限修飾遺伝子の活動とそれへの細菌ゲノムの対応を中心に、細菌ゲノムの大きな多型が作られる過程を解明する。具体的には、制限修飾系の関与するゲノム変化を、「ゲノム配列比較」と「実験的解析」の二つのアプローチから明らかにする。さらに、「制限修飾遺伝子のゲノム病原体としての諸戦略」と「ゲノム側の防御の諸戦略」を理論と実験によって解明する。

## 〈研究開始時の研究計画〉

A.制限修飾遺伝子とゲノム変化：ゲノム配列比較。ごく近縁の細菌の株の全ゲノム配列を比較して、大きなゲノム多型の形成機構を推測する。そのため、ゲノムアライメント上に様々な特徴をマップし、アライメント全体を探索できるツールを開発する。

B.制限修飾遺伝子とゲノム変化：実験的検証。制限修飾遺伝子によるゲノム攻撃に伴うゲノム再編の機構と役割を解明する。制限修飾遺伝子らしいORFが、制限酵素修飾酵素をコードするか否かを検討する。

C.「ゲノム寄生体」としての制限修飾遺伝子の戦略とゲノムの対抗戦略。制限修飾遺伝子による「分離後宿主殺し」の過程と役割を明らかにする。「分子ワクチン」「組み換え修復」など、ゲノム側の防御機構を明らかにする。

## 〈研究期間の成果〉

### A.ゲノム比較。

(A-1)近縁ゲノム比較解析ツールCGATの開発。

ゲノム間のアライメントと、各ゲノム上の種々の特徴領域の情報とを、アライメントビューア上で重ねて表示するものである。

(A-2)黄色ブドウ球菌*Staphylococcus aureus*。

*S. aureus*の複数株のゲノム配列を比較し、中規模多型をカタログ化し、形成機構を推測した(Takeshi Tsuru, Yoko Ui, Ikuo Uchiyama, Ichizo Kobayashi, Reconstruction of genome rearrangements through comparison of seven *Staphylococcus aureus* genomes, submitted)。動く遺伝子塊に乗っている制限修飾遺伝子ホモログを解析した。遺伝子水平伝達の候補を同定した。

(A-3)ヒト病原菌*Neisseria*。

*Neisseria* (髄膜炎菌)の4つの株を比較し、制限修飾遺伝子などと関連したゲノム多型を検出した。

### B.制限修飾遺伝子とゲノム変化：実験的検証。

(B-1)制限修飾遺伝子の増幅。枯草菌染色体上のBamHI制限修飾遺伝子がタンデムに増幅することを発見し、そのダイナミクスを解析した。

(B-2)制限修飾遺伝子の転移。大腸菌内で制限修飾遺伝子がプラスミドから染色体に移動する証拠を得た。

(B-3)染色体上の制限修飾遺伝子を排除しようとするISを介した不等交叉による大規模なゲノム再編が起こった。

(B-4)制限酵素切断によって、非同組換えが起きることを示した。

(B-5)ゲノム中の再編(多型)に連鎖している遺伝子の制限修飾酵素活性。*Pyrococcus*でゲノム多型に連鎖している制限修飾遺伝子らしいunknownのORFのうちに、DNA分解活性をもつものを複数同定し、解析した。

### C.制限修飾遺伝子とゲノムの対抗。

(C1)制限修飾遺伝子による「分離後宿主細胞殺し」の過程を解析し、制限酵素と修飾酵素の安定性に違いが無いことをEcoRIについて示した。影響する宿主因子を複数探しあてた。

(C2)制限修飾遺伝子が水平伝達と分離後宿主殺しによって細菌集団中で広まれる事を、理論生態学のreplicator dynamics方法で明らかにした。その進化には空間構造が重要であることが示された。

(C3)配列認識の短縮進化のもとになる制限修飾遺伝子間のゲノム配列を巡る競争を実験によって示した。

(C4)ゲノムの単独メチル化酵素(Dcm)による防御(分子ワクチン)。制限酵素とペアしないメチル化酵素Dcmの役割が「ゲノムをあらかじめメチル化しておいて、制限修飾遺伝子が失われてもゲノムが切断されないように守る」「分子ワクチン」機能である事を証明した。

(C5)ゲノムのアイデンティティ配列とDNA分解・修復系。大腸菌RecBCD分解・修復酵素の変異によるゲノムID配列の認識変化を試験管内反応系で実証した。

(C6)このRec系が自然に起きる染色体切断に対応している事を証明した。非同組換えの素過程をモデル化した。

## 〈国内外での成果の位置づけ〉

これらの研究によって、制限酵素修飾酵素遺伝子が「利己的な動く遺伝子」単位であるという研究代表者の仮説が裏付けられ、その生き物としての研究が展開しつつある。代表研究者のグループが独走しているが、ゲノム解析などからそれを支持する証拠が他のグループからも出ている。仮説は、制限酵素についての総説集に組み込まれた(Kobayashi, 2004, in Restriction endonucleases, Springer)。宿主殺しの問題は、制限修飾酵素研究のひとつの中心となり、I型の制限酵素による宿主攻撃の回避システムも他のグループによって明らかになった。代表研究者らの研究は、微生物遺伝学分野の標準的な教科書(例えば、Molecular Genetics of Bacteria, ASM Pressや Modern Microbial Genetics, 2/e, Wiley/Liss)でも取り上げられるに至った。ゲノム内コンフリクトによる細胞死という観点でも興味を集めた(Kobayashi, 2004, in Plasmid Biology)。さらに、ミトコンドリアによる細胞死が、共生の維持による真核生物の成立に重要だったという著者の仮説もアポトーシスの研究者に引用されている。

ゲノムアライメントのツールは近年いろいろ開発されているが、複雑なゲノム構造変化の詳細な観察を主目的としたアライメント可視化ツールという点で、CGATはユニークである。特に、ドットプロットとアライメントを連動して長大なアライメントを探索できる点や、各種

反復配列の情報などをアライメントと重ねて表示できる点などに特徴があり、今日においても一定の価値があると思われる。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

制限修飾遺伝子のバイオロジーの研究は、代表研究者の小さな研究室など少数で小研究費で進められている事が主な原因で、遅かった。CGATは外注で作成したが、精練される前に開発費が打ち切られてしまった。その後、内部的な利用にあわせて部分的な改良を加えたものの、不完全な部分があり、公開にはいたっていない。

#### 〈今後の課題〉

制限修飾遺伝子のウイルス・ゲノム様ライフ・サイクルとゲノム再編を実験によって再現したい。制限酵素修飾酵素には奇妙な構造・性質を示すものが続出している。それらの生化学的性質を、このような生き物としての活動から理解したい。制限修飾遺伝子によるゲノム再編の証拠は強いが、全ての解読ゲノムについて網羅的に証拠を集める事ができれば、全貌が明らかになる。この「禁断症状によって遺伝子が自己の維持を宿主生物に強制する」という「分離後細胞死（遺伝的中毒）」が、遺伝子の共生によるゲノム構築の原理である可能性を、実験によって検証する機も熟している。情報、数理生物、生化学、構造生物、細菌学など、他の分野の研究者と積極的に共同研究を進める必要がある。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) A. Mochizuki, K. Yahara, I. Kobayashi, Y. Iwasa, Genetic addiction: selfish gene's strategy for symbiosis in the genome. *Genetics*, in press.
- 2) Mikihiro Kawai, Ikuo Uchiyama, Ichizo Kobayashi, Genome comparison in silico in *Neisseria* suggests integration of filamentous bacteriophage by its own transposase. *DNA Research*, in press.
- 3) N. Handa, I. Kobayashi. Type III restriction is alleviated by bacteriophage (RecE) homologous recombination function but enhanced by bacterial (RecBCD) function. *Journal of Bacteriology*, 187: 7362-7373 (2005).
- 4) 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).
- 5) K. Ishikawa, M. Watanabe, T. Kuroita, I. Uchiyama, J. M. Bujnicki, B. Kawakami, M. Tanokura and I. Kobayashi. Discovery of a novel restriction endonuclease by genome comparison and application of a wheat-germ-based cell-free translation assay: PabI (5'GTA/C) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Nucleic Acids Research*, 33: e112 (2005).
- 6) S. Gautam, A. Sharma, I. Kobayashi. Programmed Cell Death in Microorganisms. In *Survival and Death in Bacteria*. M. Yamada, Ed. (Research Signpost, Kerala), pp.1-43 (2005).

- 7) I. Kobayashi. Death as a principle of symbiosis of genetic elements in a genome --- restriction enzymes, chromosomes, and mitochondria. *Endocytobiosis and Cell Research*, 15: 36-44 (2004).
- 8) I. 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 (2004).
- 9) I. Kobayashi. Restriction-modification systems as minimal forms of life. In *Restriction endonucleases*. A. Pingoud (ed.) (Springer-Verlag, Berlin), pp.19-62 (2004).
- 10) K. Kusano, Y. Asami, A. Fujita, M. Tanokura, and I. Kobayashi. Type I restriction enzyme with RecA protein promotes illegitimate recombination. *Plasmid*, 50: 202-212 (2003).
- 11) N. Handa, I. Kobayashi. Accumulation of large non-circular forms of the chromosome in recombination-defective mutants of *Escherichia coli*. *BMC Molecular Biology*, 4: 5 (2003).
- 12) Y. Katayama, F. Takeuchi, T. Ito, X.X. Ma, Y. Mizutani-Ui, I. Kobayashi, K. Hiramatsu. Identification in a Methicillin-Susceptible *Staphylococcus hominis* of an Active Primordial Mobile Genetic Element for the Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). *J. Bacteriol.*, 185: 2711-2722 (2003).
- 13) 0304011308 Uchiyama I., MBGD: Microbial genome database for comparative analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 58-62, 2003.
- 14) R.J. Roberts,, I. Kobayashi (23/47). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.*, 31: 1805-1812 (2003).
- 15) M. Sadykov, Y. Asami, H. Niki, N. Handa, M. Itaya, M. Tanokura, I. Kobayashi, Multiplication of a restriction-modification gene complex. *Mol. Microbiol.*, 48: 417-427 (2003).
- 16) Takami, H., Takaki, Y., Uchiyama, I., Genome sequence of *Oceanobacillus ihayensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments *Nucleic Acids Res.* 30, 3927-3935, 2002
- 17) 303241418 I. Kobayashi. Life cycle of restriction-modification systems, powers in genome evolution. In *Genome Science -- Towards a new paradigm?* H. Yoshikawa, N. Ogasawara, N. Satoh, Eds. (Elsevier Science, Amsterdam), pp. 191-202 (2002).
- 18) 303241423 N. Takahashi, H. Yoshikura, I. Kobayashi. An *Escherichia coli* strain, BJ5183, that shows highly efficient conservative (two-progeny) DNA double-strand

- break repair of restriction breaks. *Gene*, 303: 89-97 (2003).
- 19) 303241415  
Y. Fujitani, I. Kobayashi. Asymmetric Random Walk in a Reaction Intermediate of Homologous Recombination. *J. Theor. Biol.*, 220: 359-370 (2003).
- 20) 303241420  
N. Takahashi, Y. Naito, N. Handa, I. Kobayashi. A DNA methyltransferase can protect the genome from post-disturbance attack by a restriction-modification gene complex. *J. Bacteriol.*, 184: 6100-6108 (2002).
- 21) 303241424  
Y. Fujitani, S. Mori, I. Kobayashi. A reaction-diffusion model for interference in meiotic crossing-over. *Genetics*, 161: 365-372 (2002).
- 22) 20241133  
K. Nakao, A. Chinen, A. Nobusato, Y. Fujitani, I. Uchiyama, I. Kobayashi. Relation between restriction modification genes and genome rearrangements suggested from genome sequence comparison within Genus *Neisseria*. In *Genome Informatics 2001*. H. Matsuda, L. Wong, S. Miyano, T. Takagi, Eds. (Universal Academy Press, Tokyo, Japan), pp. 398-399 (2001).
- 23) 202411153 I. Kobayashi. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Research*, 29: 3742-3756 (2001).
- 24) 202411200  
M. Kuroda,, I. Uchiyama (3/37),,, I. Kobayashi (6/37),,, K. Hiramatsu, Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 35: 1225-1240 (2001).
- 25) 202131428  
N. Handa, Y. Nakayama, M. Sadykov, I. Kobayashi. Experimental genome evolution: large-scale genome rearrangements associated with resistance to replacement of a chromosomal restriction-modification gene complex. *Mol. Microbiol.*, 40: 932-940 (2001).
- 26) 202131615  
A. Chinen, I. Uchiyama and I. Kobayashi. Comparison between *Pyrococcus horikoshii* and *Pyrococcus abyssi* genome sequences suggests association of restriction-modification genes with gross genome polymorphism. *Gene*, 259: 109-121 (2000).
- 27) 20213609  
A. Nobusato, I. Uchiyama, S. Ohashi, I. Kobayashi. Insertion with long target duplication: A mechanism for restriction modification-mediated gene mobility suggested from comparison of two complete bacterial genomes. *Gene*, 259: 99-108 (2000).
- 28) 202131605  
A. Nobusato, I. Uchiyama and I. Kobayashi. Diversity of restriction modification gene homologues in *Helicobacter pylori*. *Gene*, 259: 89-98 (2000).
- 29)  
I. Uchiyama, T. Higuchi, I. Kobayashi. CGAT: Comparative Genome Analysis Tool for Closely Related Microbial Genomes. In *Genome Informatics 2000*. A.K. Dunker, A. Konagaya, S. Miyano, T. Takagi, eds. (Universal Academy Press, 2000) pp 341-343.
- 30) 202131518  
A. Chinen,, I. Kobayashi (4/4). Evolution of sequence recognition by restriction-modification enzymes: selective pressure for specificity decrease. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 1610-1619 (2000) .
- 31) 202141130  
D. A. Arnold, N. Handa , I. Kobayashi, S.C. Kowalczykowski. A novel, 11-nucleotide variant of  $\chi$ ,  $\chi$ : one of a class of sequences defining the *E. coli* recombination hotspot,  $\chi$ , *J. Mol. Biol.*, 300: 469-479 (2000).
- 32) 202141105  
K. Gerdes,, I. Kobayashi (9/13): Plasmid maintenance systems, in *The Horizontal Gene Pool*, C.M. Thomas, Ed. (Harwood academic publishers, 2000) pp. 49-86.
- 33) 202131534  
N. Handa, A. Ichige, K. Kusano, I. Kobayashi. Cellular responses to post-segregational killing by restriction-modification genes. *J. Bacteriol.*, 182: 2218-2229 (2000)
- 34) 202141111  
Y. Fujitani, S. Mori, I. Kobayashi. A Reaction-Diffusion Model for Genetic Interference, in *Currents in Computational Molecular Biology*. S. Miyano, R. Shamir, T. Takagi, Eds. (Universal Academy Press, 2000) pp. 230-231.
- <データベース/ソフトウェア>
- 1) 内山郁夫、微生物比較ゲノムデータベースMBGD  
<http://mbgd.genome.ad.jp>
- 2) 303241426  
I. Kobayashi. DNA double-strand break repair in bacteria. In the *Encyclopedia of Life Sciences*, (Nature Publishing Group, Macmillan Reference Limited, London)
- 3)  
I. Kobayashi. Action of restriction modification systems, in *International Collection for Microbiology Teaching and Learning*. (American Society for Microbiology, Washington DC)
- <特許> 2件出願中
- <その他>
- 1) 小林一三：ゲノムはなぜ変わるのか：原核生物を中心に。斎藤成也・佐藤矩行（編）、「進化学」2「遺伝子とゲノムの進化」、岩波書店、刊行中
- 2) 小林一三、石川健：制限酵素修飾酵素遺伝子の自己増殖の発見。海洋、号外33号、128-136。2003.
- 3) 内山郁夫、微生物ゲノム比較システム、日本臨床、61, Suppl. 3, 441-448, 2003
- 4) 内山郁夫、MBGD: 微生物ゲノム比較解析システム、生物物理、42, 266-269, 2002
- 5) 小林一三：メイナードスミス博士京都賞受賞記念ワークショップ講演：ゲームの場としてのゲノム — あるいは、遺伝子はなぜ愛し合うのか？ 遺伝、56, 70-76, 2002.
- 6) 20214242  
小林一三：ゲノム比較：ゲノムを造り替えていた制限酵素修飾酵素遺伝子。榊佳之、小原雄治、大木操、金久実、高木利久、菅野純夫、小笠原直毅（編）、蛋白質核酸酵素増刊「ゲノムサイエンスの新たなる挑戦」46：2393-2399、2001.

7)

小林一三: ゲノムはなぜ変わるのか? 利己的な動く遺伝子たちのコミュニティーとしてのゲノム. 科学70: 335-345, 2000.

8)

内山郁夫, ホモロジー解析とモチーフ解析、遺伝子医学, 4, 370-376, 2000