

[研究論文] 超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来の
メチル化酵素 M. Ape の認識配列の決定

林真央¹・菅原啓亮²・飯田泰広²

1 応用化学・バイオサイエンスコース専攻 博士前期課程1年

2 神奈川工科大学 応用バイオ科学部

Determination of recognition sequence of DNA methyltransferase M. Ape from
Hyperthermophilic archaea *Aeropyrum pernix*

Mao HAYASHI¹, Keisuke SUGAWARA², Yasuhiro IIDA²

Abstract

DNA methylation, one of the epigenetic modifications, is mainly reported *N*6-methyladenine(m6A), *N*5-methylcytosine(m5C) and *N*4-methylcytosine(m4C) and there exist in all of the domain of eukaryote, bacteria and archaea. The significant function of DNA methylation is gene regulation, control of cell cycle and Restriction-Modification system (R-M system) of bacteria. The Type II of R-M system is constituted by restriction enzyme and DNA methyltransferase and there recognize same sequence. In the R-M system of hyperthermophilic archaea *Aeropyrum pernix*, restriction enzyme already has been sale from New England Biolabs Inc., however, the DNA methyltransferase of the pair of restriction enzyme is only demonstrated by homology analysis on genome. In this report, we clarified that the properties of DNA methyltransferase M. Ape of R-M system Type II from *Aeropyrum pernix*.

The ORF sequence of M. Ape was introduced into pCold I vector and expression in *E. coli* JM109 strain. And then, it was purified by His-tag. The recognition sequence of M. Ape was decided by methylation activity and bisulfite sequence. As the result, it is clarified that M. Ape is cytosine-specific methyltransferase and it modify the second cytosine in GCTGC sequence. And also, it was suggested that the optimum temperature of M. Ape was 60 degrees Celsius.

Keywords: Epigenetics, DNA methylation, DNA methyltransferase, hyperthermophilic archaea

1. はじめに

DNA メチル化とは、エピジェネティックな遺伝子制御の1つである。DNA メチル化は、真核生物では X 染色体の不活化、ゲノムインプリンティング、遺伝子の発現制御に、原核生物では Restriction-modification system (R-M System)、DNA のミスマッチ修復に関与していることが明らかとなっている^[1-5]。メチル基は、メチル基供与体である *S*-adenosyl-L-methionine (SAM)がドナーとなり、メチル基転

移酵素によって、メチル基が修飾される^[6]。メチル化酵素は、*N*6-adenine, *N*4-cytosine および *N*5-cytosine に直接メチル基を修飾する。

*N*6-メチル化アデニン(*N*6-methyladenine: m6A)は、原核生物のゲノム DNA の解析によって同定され、DNA の複製および修復、遺伝子の発現制御および免疫システムである R-M システムとして機能していることが知られていた^[7]。しかし、真核生物の m6A は近年まで、存在が確認されていなかったが、免疫沈降法を利用したシーケンス解析であ

る Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP-seq) によって線虫で発見された^[8]。現在までに、m6A の修飾が、ショウジョウバエ、カイコ、シロイヌナズナ、ハツカネズミ、ヒトなど、多くの真核生物で同定され、その働きとして細胞周期の調節や遺伝子の発現調節の可能性が示唆されている^[9]。

N5-メチル化シトシン(N5-methylcytosine: m5C)は、広く研究されており、真核生物、原核生物およびウイルスで検出されている^[10]。m5C の働きとして、転写においてリプレッサーとして機能が報告されている。プロモーター領域の CpG アイランドに m5C が存在している場合、転写因子結合の直接的な阻害によるものまたはメチル結合ドメイン(MBD)タンパク質によって発現が抑制されていると考えられている^[11]。また、発達および分化にも関与していることが明らかとなっている^[10]。

N4-メチル化シトシン(N4-methylcytosine: m4C)は好熱性細菌および古細菌で同定されている^[12]。m5C は熱によって脱アミノ化が起き、変異する傾向があることが報告されている^[9]。好熱性細菌は最適培養温度が 60°C 以上であるため、ゲノムの変異を防ぐために脱アミノ化耐性を持つ m4C である可能性が考えられている^[13]。また、m4C の働きは、DNA の修復、発現の制御、複製に関与していることが明らかとなっている^[14]。

さまざまな生物種からメチル化酵素が同定されているが、耐熱性の性質を持つメチル化酵素の特性を評価しているものは少なく、いずれも N6-アデノシンメチル化酵素(DNA (N6-adenosine) methyltransferase)である。現在、最も至適温度の高い N6-アデノシンメチル化酵素は、M. Pab I であることが報告されている^[15]。この酵素は、超好熱性古細菌 *Pyrococcus abyssi* 由来の酵素であり、R-M System の Type II におけるメチル化酵素の働きを有しており、5'-GTAC-3'を認識する。また、至適温度は、85°C で、また 95°C でメチル化活性を示し、9 分間、インキュベートした場合でも半分の活性を保持することが知られている^[15]。しかしながら、耐熱性の N5-シトシンメチル化酵素(DNA(N5-cytosine) methyltransferase)の特性を評価したものは未だに報告がない。

本研究では、超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* に着目した。当該古細菌は、1999 年にゲノムが解読されている^[16]。National Institute of Technology and Evaluation (NITE)によると、至適生育温度は 90~95°C で、ゲノム解析データが公開されているものの内、最も生育温度の高い超好熱性古細菌であることが報告されている。*A. pernix* 由来のタンパク質は耐熱性の性質を持つため、例えば、*A. pernix* 由来のウラシル DNA グリコシラーゼをホットスタート PCR へ適用したことなどの応用例が報告されている^[17]。*A. pernix* は、認識配列が 5'-GCWGC-3'(W = A/T)の制限酵素 Ape K1(New England Biolab)を有していることが、報告されている。これに対応するメチル化酵素 M. Ape がホモロジー解析により同定されており(Accession number: Q9YDP3)、*A. pernix* においても R-M system を持っていることが示唆

されるが、実験での証明は未だに報告がない。R-M system は、約 50 年前に *E. coli* で発見された微生物における免疫システムである^[18]。このシステムはある特定の配列を認識し、切断する Restriction endonuclease (REase)と同様に特定の配列をメチル化する DNA methyltransferase (MTase)によって行われる。ファージなどから感染された場合、侵入してきたファージ由来 DNA(外来 DNA)を REase によって切断することで、自身をファージから守っている。このとき REase の認識配列と同じ配列が MTase によって、メチル化し REase の結合を阻害、ゲノム DNA を切断しないことが明らかとなっている^[19]。

本研究では、M. Ape の特性を明らかにすることを目的とした。その結果、*in vivo* および *in vitro* におけるバイサルファイトシーケンシングによるメチル化解析、Double-stranded Oligonucleotide を用いたメチル化活性評価から、M. Ape の認識配列が R. ApeK1 と同様に 5'-GCTGC-3'であることを実験レベルで明らかにした。さらに至適温度について検討した結果、M. Ape の至適温度は 60°C であることが示唆された。M. Ape は *A. pernix* 由来であるため、耐熱性機構を有していることが推測される。

2. 実験方法

2-1. 試薬および装置

本研究で、使用した試薬および器具について以下に示す。いずれの実験においても、Primer は Eurofins Genomics (Eurofins, Ebersberg, Germany)から購入し、シーケンス解析は FASMAC Co.,Ltd (Kanagawa Japan)に外注し、解析時には DDBJ の Clustal W を用いた。アライメント解析では、MEGA-X を用い、既知のメチル化酵素の配列はデータベースである Uniprot から引用した。

次にベクター構築では、大腸菌のコードンに最適化した M. Ape の合成遺伝子が pCTA2 ベクターに挿入されているものを Eurofins より購入した。また、PCR 試薬は TaKaRa Bio Inc.(TaKaRa, Shiga, Japan) の Ex Taq HS を用い、制限酵素は TaKaRa の EcoR I および Pst I を用いた。またベクターには TaKaRa の pCold I を使用した。ゲル精製には、FAVORGEN BIOTECH CORP. (FAVOGEN, Ping-Tung Taiwan) の FavorPreo™ GEL/PCR Purification Mini Kit を使用した。さらにライゲーション反応には TaKaRa の Ligation Mighty Mix を用いた。*E. coli* JM109 株は TOYOBO CO., LTD. (TOYOBO, Osaka, Japan) のものを、LB 培地および LB 液体培地は NACALAI TESQUE, INC. (ナカライテスク, Kyoto, Japan) のものを用いた。

M. Ape の抽出では、ナカライテスクの Protease Inhibitor Cocktail for General Use(100x) を使用し、超音波破砕機は、TOMY DIGITAL BIOLOGY CO., LTD.(Tokyo, Japan)の UD-260 を用いた。Promega Corporation (Promega, Wisconsin, United States)の HisLink™ Spin Protein Purification System で M. Ape を精製し、Pall Corporation (New York, United States)の Omega™ Membrane 3K で溶液を置換した。電気泳動後

の染色には、ATTO Corporation (Tokyo, Japan) の CBB 染色試薬 Ez Stain Aqua を用いた。

バイサルファイト処理には、QIAGEN (Hilden, Germany) の EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit を用い、バイサルファイト処理を行ったサンプルは TOYOBO の KOD -Mluti&Epi で増幅した。

メチル化の活性測定には、Promega の MTase-Glo™ Methyltransferase Assay Kit を使用し、測定には Berthold Technologies (Baden-Württemberg, Germany) の Mithras LB940 を用いた。Double-stranded Oligonucleotide には、Eurofins から購入した PCReady Primer を使用し、Techne (Staffordshire, United Kingdom) のサーマルサイクラー FTGENE-Y2 を用いた。λDNA には、TaKaRa の λHind III を用いた。

2-2. ベクターの構築

M. Ape を大腸菌に合成させるためにベクターを構築した。

M. Ape 合成遺伝子を鋳型とし、TaKaRa Ex Taq HS を使用して、PCR で M. Ape の ORF を増幅させた。PCR 条件は、94 °C、30 秒で反応後、98 °C で 10 秒、58 °C で 30 秒、72 °C で 1.5 分間を 25 回繰り返して増幅させた後、72 °C、1.5 分間で反応させ、4 °C で保存とした。プライマーには、EcoRI および Pst I の制限酵素サイトと終止コドンが付加したもの (Fw. 5'-GCGGAATTCATGTCACGATATAGTACC ATTAGC-3'/Rv. 5'-CATCTGCAGTTATCACACAGCATCCA GAAGTTC-3') を使用した。

増幅後、PCR 産物をゲル精製した。pCold I ベクターおよび精製した PCR 産物を Pst I および EcoRI で、37 °C で 2 時間反応させた。反応後、ゲル精製し、制限酵素処理をした pCold I vector と M. Ape をライゲーションした。ライゲーション産物を *E. coli* JM109 株および *E. coli* DH 5α 株にヒートショック法で形質転換した。形質転換した大腸菌をアンピシリンを含む LB 液体培地 50 mL で培養し、アルカリミニプレップ法でプラスミド抽出した。抽出したプラスミドはゲル精製を行い、組み込んだ M. Ape の配列のシーケンス解析をした。シーケンス解析の際のプライマーは、Fw. 5'-GTAAGGCAAGTCCCTTCAAGAG-3'/Rv. 5'-GGCAG GGATCTTAGATTCTG-3, 'walk Fw. 5'-AACGGGAACGCCT GGTAATCATCG-3'/walk Rv. 5'-CCAAGACGATCCAACGG TTGAC-3' を使用した。

2-3. M. Ape の抽出および精製

M. Ape を得るために作製したベクターを保持する大腸菌を用いて、抽出および精製を行った。

2-2. で作製した pCold I vector に M. Ape を組み込んだ plasmid を保持する *E. coli* JM109 株 (pCold I-M. Ape in *E. coli* JM109 株) をアンピシリンを含む LB 液体培地 100 mL で 37 °C で一晚培養した。その後、15 °C の水に 30 分間、インキュベートし、IPTG を加え発現誘導後、15 °C で 24 時間振とう培養した。50 mL ファルコンチューブに培養液

を加え、7000 ×g、5 分間、4 °C で遠心分離し、上清を廃棄した。これを培養液がなくなるまで行った。0.2 M リン酸バッファー (pH = 7.4) を 10 mL 加え、懸濁した。7000 ×g、10 分間、4 °C で遠心分離し、上清を廃棄した。0.2 M リン酸バッファーを 2 mL および Protease Inhibitor Cocktail for General Use (100x) を加え、懸濁した。超音波破碎機で、DUTY 50, on 30 sec./off 30 sec., output 3-4 で 5 回行い、これを抽出液とした。1.5 mL チューブに抽出液を 500 μL 加え、90 °C で 10 分間、加熱した。その後、9400 ×g、30 分間、4 °C で遠心分離した。上清を可溶性画分とした。M. Ape を His-tag 精製し、その後、限外ろ過によって、溶液を 1x Reaction Buffer (Promega Literature# TM453) に置換した。

2-4. メチル化活性測定

M. Ape のメチル化活性の確認および Oligo DNA を用いて認識配列を決定するためにメチル化活性を測定した。

Double-stranded Oligonucleotide 0.39 nmol, 精製した M. Ape 19 μg, AdoMet 32 nmol, BSA 0.1 mg/mL を混合し、40 °C で 2 時間反応させた。その後、反応液について発光量を測定し、メチル化活性を評価した。認識配列の決定では Double-stranded Oligonucleotide を用いた。PCReady Primer 45 μM, Annealing buffer (1 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) を混合し、サーマルサイクラーで、95 °C で 5 min. インキュベートした後、1 °C/min. の速さで 25 °C まで冷却した。Table. 1 に検討した Double-stranded Oligonucleotide の配列を示す。また、N は A、T、G、C のいずれかを示す。

Table. 1 Double-strand Oligonucleotide

name	Sequence	bp	Tm
CGCG	5'-CGCGCGCGCGCGCGCG-3'	16	75
GGCC	5'-GGCCGGCCGGCCGGCC-3'	16	72
CCNGG	5'-CCAGGCCCGCCGGCCCTGG-3'	20	73
GGNCC	5'-GGACCGGCCCGGGCCGTCC-3'	20	73
GCNGC	5'-GCAGCGCCGCGCGCGCTGC-3'	20	76
CGNCG	5'-CGACGCGCCGCGCGCGTGC-3'	20	75

また、活性評価ならびに至適温度の決定について λHind III digest を用いて、同様にメチル化反応を行い調査した。なお、活性評価は 37 °C で行い、至適温度の決定では、20 °C、40 °C、60 °C、80 °C で行った。

2-5. *in vivo* における大腸菌内での M. Ape のメチル化能解析

M. Ape を大腸菌で発現させた際に増殖阻害が観察されたため *in vivo* (大腸菌内) における M. Ape のメチル化能について Bisulfite Sequencing (BS-seq) を行った。

pCold I-M. Ape in *E. coli* JM109 株をアンピシリンを含む LB 液体培地 100 mL で 37 °C で一晚培養した。その後、15 °C の水に 30 分間、インキュベートし、IPTG を加え発現誘導後、15 °C で 24 時間振とう培養した。50 mL ファルコンチューブに培養液を加え、7000 ×g、5 min.、4 °C で遠心分離し、上清を廃棄した。アルカリミニプレップ法によ

プラスミドを抽出した後、ゲル精製した。バイサルファイト処理を行った後、バイサルファイト処理を行ったものを解析するプライマー (Fw. 5'-TTATTTTGAATGATTG GTTGAG-3'/Rv. 5'-CCCATATTATACAAAAACAATTA-3')、またはバイサルファイト処理を行っていないものを解析するプライマー (Fw. 5'-CTATTCTCAGAATGACTTG GTTGAG-3'/Rv.5'-CCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTA-3') を使用し、KOD -Mluti&Epi-を用いて PCR を行い目的の領域を増幅した。Table. 2 に目的領域の配列を示す。下線実線および下線点線は M. Ape の認識配列と推測される部分である。

Table. 2 目的領域

Experiment	Sequence (5'-to-3')
BS-seq	CTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACT
	CACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGAT
	GGCATGACAGTAAGAGAATTATGcagtgcctgcc
	ataaacatgagtataaacactgcggcCAACTTACTTCTGA
	CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGGCTAAC
	CGCTTTTTTGCACAACATGGG

PCR 条件は、94 °C で 2 分間、反応後、98 °C で 10 秒、53 °C で 30 秒、68 °C で 15 秒を 40 回繰り返す、その後 4 °C で保存とした。ゲル精製後、バイサルファイト処理を行ったものと同じものについて同様のプライマーを使用し、シーケンス解析を行った。

2-6. *in vitro*における精製 M. Ape のメチル化能解析

2-3. で精製した M. Ape の *in vitro* におけるメチル化能について BS-seq を行った。

pCold I の Amp R(β ラクターマーゼ)配列の一部を含んでいるアンプリコン 0.3 pmol, 精製した M. Ape 0.7 ng, SAM 2 pmol, 滅菌水 4.5 μ L, 4 xReaction Buffer(Promega Literature# TM453) 2.5 μ L 混合し、40 °C で 22 時間反応させた。反応溶液をバイサルファイト処理した。*in vivo* における解析と同様のプライマーを用いて、KOD -Mluti&Epi-を用いて PCR を行い目的の領域を増幅した。また PCR 条件も *in vivo* における解析と同様である。精製後、バイサルファイト処理を行ったものと同じものについて同様のプライマーを使用し、シーケンス解析を行った。解析を行った配列は Table. 2 に示した配列である。

3. 結果および考察

3-1. 作製した M. Ape を含む vector の *E. coli* への形質転換

2-2. で作製したベクターを *E. coli* DH5 α 株および JM109 株に形質転換した。*E. coli* DH5 α 株に形質転換した結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1-(A) は、pCold I のインサート配列を含んでいない (pCold I 空ベクター) で、Fig. 1-(B) は pCold I vector に M. Ape を組込んだもので (pCold I-M. Ape) ある。

E. coli JM109 株に形質転換した結果、pCold I 空ベクターおよび pCold I-M. Ape ともにコロニーを得ることができ

た。しかしながら、*E. coli* DH5 α 株では、pCold I 空ベクターを形質転換した場合にはコロニーが観察されたが、pCold I-M. Ape を形質転換した場合はコロニーが生えないまたは、得られたコロニーが保持するインサート配列に変異が認められた (Data not shown)。

使用した vector である pCold I は、lac I operator によって制御され、IPTG の添加によって発現誘導される。*E. coli* JM109 株ではプラスミド上のコードされている lac I だけでなく宿主由来の lac I q が発現しており、*E. coli* DH5 α 株と比較し、強く発現が抑制されることが想定される。よって、*E. coli* JM109 株では、目的配列を保持している pCold I-M. Ape を得ることができたと考えられる。本実験より、M. Ape は大腸菌に対し、増殖阻害を引き起こすことが示唆された。

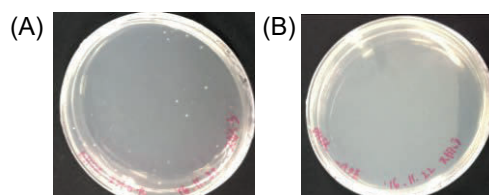


Fig.1 作製したベクターの *E. coli* DH5 α 株への形質転換 (A). pCold I 空ベクター(no-insert) (B). pCold I-M. Ape

3-2. M. Ape の抽出および精製

M. Ape の抽出および精製を確認するために SDS-PAGE を行った。結果を Fig. 2 に示す。なお、M. Ape の推定分子量は、56.4 kDa である。Fig. 2-(A) は、超音波破碎した破碎液を流した。Fig. 2-(B) に His-tag 精製の過程および限外ろ過のサンプルである。また pCold I は、インサートを含まない pCold I 空ベクターを *E. coli* JM109 株に組込み、pCold I-M. Ape と同様の操作を行ったものである。

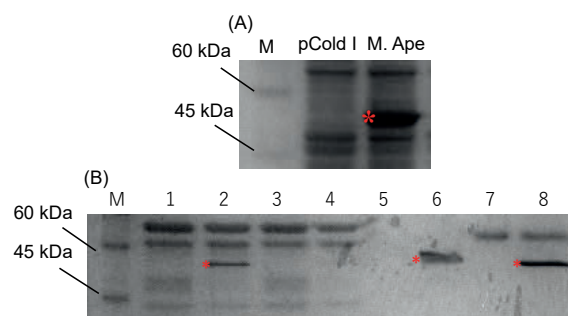


Fig.2 M. Ape の抽出(A)および精製(B)

(A) M = PM2500(SMOBIO), pCold I = pCold I no-insert
(B) L1 = Soluble fraction of pCold I, L2 = Soluble fraction of pCold I, L3 = His-tag purification flow of pCold I, L4 = His-tag purification flow of M. Ape, L5 = Elution flow of pCold I, L6 = Elution of M. Ape, L7 = ultrafilter fraction of pCold I, L8 = ultrafilter fraction of M. Ape

抽出および精製を行った結果において、M. Ape のレーン((A)の M. Ape, (B)の L2, L6, L8)に確認されたバンドが、M. Ape の推定分子量である 53.2 kDa 付近であることから、得られたバンドは M. Ape であると考えられる。また、M. Ape の限外ろ過サンプルにおいて、マーカーの 60 kDa よ

りにバンドが得られた。本研究では、実験にこのサンプルを用いているが、pCold I(no-insert)の限外ろ過サンプルにおいても、同一にバンドが得られている。これを実験においてネガティブコントロールとして用いており、以下の実験結果より、60 kDa より上のバンドが M. Ape の活性評価に影響がないことを確認できていると考えている。

3-3. M. Ape の活性評価

M. Ape のメチル化能を評価するために活性を測定した。結果を Fig.3 に示す。縦軸は発光量[RLU]、横軸はサンプル名をそれぞれ示した。M. Sss I は、CG 配列の C を認識し、メチル化することが明らかとなっている酵素で、本研究ではポジティブコントロールとして用いた。また pCold I はインサート (M. Ape) を含まないサンプルでネガティブコントロールとして用いた。

その結果、pCold I と比較し M. Sss I では 16.3 倍、M. Ape では 6.7 倍の活性が観察された。よって、M. Ape はメチル化の活性を示すことが明らかとなった。

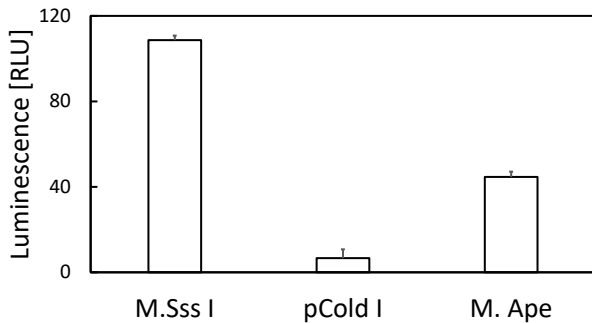


Fig.3 メチル化活性評価

3-4. M. Ape の至適温度

M. Ape の至適温度を決定するために、基質として λ Hind III digest を用い、基質と M. Ape を 20 °C, 40 °C, 60 °C, 80 °C で 2 時間反応させ、その活性を測定した結果を Fig.4 に示した。縦軸は発光量、横軸は検討した温度を示した。

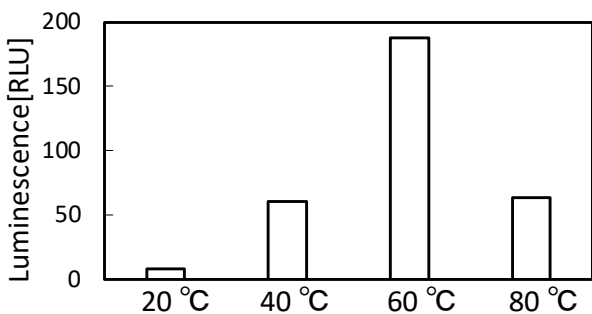


Fig.4 M. Ape の至適温度の決定

反応温度が 20 °C のものが最も活性が低く、40 °C および 80 °C において同程度の活性が認められた。また、反応温度が 60 °C のとき、最も活性が大きくなった。しかし、SAM は高温で急速に分解する報告があり^[20-22]、本実験においても SAM が分解した結果である可能性が考えられる。また本実験で使用した基質である λ DNA について、反応時間

が 2 時間と長時間であることから解離し、1 本鎖となってしまったため、基質として認識されなくなり、活性が低く見積もられている可能性が示唆される。そのため、M. Ape の至適温度は測定上 60 °C であったが、議論の余地があると思われる。M. Ape は、生育温度が 90 °C である超好熱性古細菌 *A. pernix* 由来の酵素であることならびに抽出時に 90 °C で加熱処理を行っていることから、M. Ape は本実験の結果よりもさらに高い温度でも活性をもつことが推定される。

3-5. M. Ape の認識配列の推定

Fig.5 に M. Ape の認識配列を特定するために、Table. 1 に示した Double-stranded Oligonucleotide を用いた際の活性評価の結果を示す。反応温度は Double-stranded Oligonucleotide の変性を考慮し、40 °C で 2 時間反応させた。

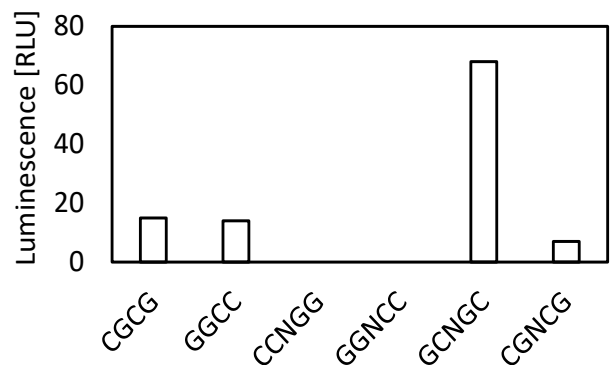


Fig.5 M. Ape の認識配列の推定

CGCG および GGCC では同程度の活性が認められたが、GCNGC と比較すると約 1/4 倍であった。また CCNGG、GGNCC の活性は認められなかった。GCNGC において、最も高い活性が確認された。CGNCG 配列は、CGCG および GGCC の約半分程度の活性が認められた。以上より、GCNGC において最も高い活性が確認された。本実験では、目的配列に関し、モル数および Oligo DNA の長さが異なるため、定量的な考察はできないと考えられる。しかしながら、GCNGC の活性が最も高かったことから、定性的に GCNGC が M. Ape の認識配列であることが推定された。そのため、次に GCNGC の N について BS-seq を用いて評価し、認識配列の決定を行うこととした。

3-6. M. Ape の認識配列の決定および *in vivo/in vitro* における M. Ape のメチル化能解析

Fig.6 に M. Ape の認識配列の決定および *in vivo/in vitro* における M. Ape のメチル化能を確認するために BS-seq (Bisulfite sequencing) を用いて評価した結果を示す。Fig.6 で示した配列は Table. 2 において小文字で示した配列であり、GCTGC を枠線実線で、GCGGC を枠線点線で、それぞれ表記した。Fig.6-(A) *in vivo* は大腸菌内におけるプラスミドのメチル化、Fig.6-(B) *in vitro* は精製したサンプルと反応させた基質のメチル化を示している。また、バイサルファイト処理を行ったサンプルを BS-seq、バイサルファイト



Fig.6 BS-seq による M. Ape のメチル化解析

ト処理を行っていないサンプルを Non-BS-seq と表記した。Fig.6-(A)*in vivo* では、M. Ape を含む大腸菌由来のサンプルを Including M. Ape、M. Ape を含まない大腸菌由来のサンプルを Non-Including M. Ape と表記し、Fig.6-(B)*in vitro* では、pCold I(no-insert) を保持した大腸菌の精製産物と反応させたサンプルを Treated with pCold I、精製 M. Ape と反応させたサンプルを Treated with M. Ape と表記した。パイサルファイト処理を行ったサンプルは、メチル化されているシトシンはシトシンとして、メチル化されていないシトシンはチミンとして検出される。

Non-including M. Ape (*in vivo*) および Treated with pCold I (*in vitro*) のパイサルファイト処理を行ったサンプル (BS-seq) について、基質 DNA の配列中のすべてのシトシンがチミンへと変換され、メチル化シトシンは確認されなかった。一方で、Including M. Ape (*in vivo*) および Treated with M. Ape (*in vitro*) のパイサルファイト処理を行ったサンプル (BS-seq) では基質 DNA の配列における認識配列と推定される部分である GCTGC について、2 番目のシトシンが変換されず、シトシンとして検出され、メチル化が確認された。GCGGC については、メチル化シトシンが観察されなかった。よって、M. Ape の認識配列は、5'-GCTGC であり、2 番目のシトシンにメチル基を修飾することが明らかとなった。なお、GCTGC の 2 番目のシトシン以外にメチル化されたシトシンは観察されなかった。

in vivo においても、*in vitro* と同様の位置にメチル化シトシンが確認されたことから、M. Pab I^[15] および M. MthTI^[23] の報告と同様に M. Ape が、大腸菌内 (*in vivo*) でメチル化活性をもつことが明らかとなった。「3-1. 作製した M. Ape を含む vector の *E. coli* への形質転換」において示した大腸菌の増殖阻害は、M. Ape によるメチル化修飾が原因であることが示唆された。細菌における DNA メチル化の働きは、不明な点が多いため、増殖阻害に関し、詳細を検討して必要があると考えられる。

4. 結論

以上より、M. Ape は、5'-GCTGC-3' の 2 番目のシトシンに対し、メチル基を修飾することが明らかとなった。また当該酵素の至適温度は、60 °C であることが示唆された。

しかしながら、現在の方法では高い温度において安定してメチル化活性を測定することができないため、今後検討する必要があると考えられる。

また現在、m5C が細菌に与える影響に関して遺伝子発現制御について不明な点が多い。当該酵素が大腸菌に対し増殖阻害を引き起こしていることが明らかとなったが、5'-GCTGC-3' の 2 番目のシトシンは本来大腸菌ではメチル化されることがないため、この影響を調査することで、細菌の遺伝子発現制御のメカニズム解明の一助になり得ると考えられる。

5. 参考文献

- [1] Sado Takashi, Fenner, Martin H., Tan Seong Seng, Tam Patrick, Shioda Toshihiro and Li En, "X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: Distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation", *Dev. Biol* **225**, 294-303 (2000)
- [2] Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R., "Role for DNA methylation in genomic imprinting", *Nature* **366**, 362-365 (1993)
- [3] Lisa D Moore, Thuc Le and Guoping Fan, "DNA Methylation and Its Basic Function", *Neuropsychopharmacology* **38**, 23-38 (2013)
- [4] Josep Casadesus, "DNA methyltransferases-role and function", *Adv Exp Med Biol* **945**, 35-61 (2016)
- [5] Bujnicki, Janusz M., "Understanding the evolution of restriction-modification systems: Clues from sequence and structure comparisons", *Acta Biochim Pol* **48**, 935-967 (2001)
- [6] Cheng, X. and R. J. Roberts. "AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping." *Nucleic Acids Res.* **29**, 3784-3795 (2001)
- [7] Vasu K and Nagaraja V, "Diverse function of restriction-modification systems in addition to cellular defense", *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 53-72 (2013)
- [8] Greer EL, Blanca MA, Gu L Sendinc E, Liu J, Aristizabal-Corrales D, Hsu CH, Aravind L, He C and Shi Y, "DNA Methylation on N6-Adenine in *C. elegans*", *Cell* **161**,

- 868-878 (2015)
- [9] Zhiging Li, Ping Zhao and Qingyou Xia, “Epigenetic Methylations on N6-Adenine and N6-Adenosine with the same Input but Different Output”. *Int J Mol Sci* **20**, 1-13 (2019)
- [10] Kumar Suresh, Chinnusamy Viswanathan and Mohapatra Trilochan., “Epigenetics of Modified DNA Bases: 5-Methylcytosine and Beyond.” *Front. Genet* **9**, 1-14 (2018)
- [11] Deaton, A. M. and Bird, A., “CpG islands and the regulation of transcription”, *Genes Dev* **25**, 1010-1022 (2011)
- [12] O’Brown, Zach K., Bouliasis, Konstantinos, Wang, Jie, Wang, Simon Yuan, O’Brown, Natasha M., Hao, Ziyang, Shibuya, Hiroki, Fady, Paul-Enguerrand, Shi, Yang, He, Chuan, Megason, Sean G., Liu, Tao and Greer, Eric L., “Sources of artifact in measurements of 6mA and 4mC abundance in eukaryotic genomic DNA”, *BMC Genomics* **20**, Article number 445 (2019)
- [13] M Ehrlich, M A Gama-Sosa, L H Carreira, L G Ljungdahl, K C Kuo and C W Gehrke, “DNA methylation in thermophilic bacteria: N4-methylcytosine, N5-methylcytosine, and N6-methyladenine.”, *Nucleic Acids Res* **13**, 1399-1412 (1985)
- [14] Wenying He, Cangzhi Jia, and Quan Zou, “4mCPred: machine learning methods for DNA N4-methylcytosine sites prediction”, *J. Bioinform* **35**, 593-601 (2019)
- [15] Watanabe, Miki Yuzawa, Harumi Handa, Naofumi Kobayashi, Ichizo. “Hyperthermophilic DNA methyltransferase M.PabI from the archaeon *Pyrococcus abyssi*.”, *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5367-5375 (2006)
- [16] Kawarabayasi, Y., Y. Hino, H. Horikawa, S. Yamazaki, Y. Haikawa, K. Jin-no, M. Takahashi, M. Sekine, S. Baba, A. Ankai, H. Kosugi, A. Hosoyama, S. Fukui, Y. Nagai, K. Nishijima, H. Nakazawa, M. Takamiya, S. Masuda, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. Aoki, K. Kubota, Y. Nakamura, N. Nomura, Y. Sako, and H. Kikuchi., “Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1”, *DNA Res.* **6**, 83–101 (1999)
- [17] Zi-Peng Liu and Jian-Hua Liu, “Characterization of family IV UDG from *Aeropyrum pernix* and Its Application in Hot Start PCR by Family B DNA polymerase”, *PLoS One* (2011)
- [18] G. Bertani and J. J. Weigle, “Host controlled variation in bacterial viruses”, *J Bacteriol* **65**, 113-121 (1953)
- [19] Josep Casadesus and David Low, “Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World”, *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 830-856 (2006)
- [20] Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker, and L. A. Marky., “Predicting DNA duplex stability from the base sequence.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3746–3750 (1986)
- [21] Marguet, E., and P. Forterre. “Protection of DNA by salts against thermodegradation at temperatures typical for hyperthermophiles.”, *Extremophiles* **2**, 115–122 (1998)
- [22] Parks, L. W., and F. Schlenk. “The stability and hydrolysis of S-adenosylmethionine; isolation of S-ribosylmethionine.”, *J. Biol. Chem.* **230**, 295–305 (1958)
- [23] Nolling, J. De Vos, W. M. “Characterization of the archaeal, plasmid-encoded type II restriction- modification system MthII from *Methanobacterium thermoformicum* THF: Homology to the bacterial NgoPII system from *Neisseria gonorrhoeae*.” *J. Bacteriol* **174**, 5719-5726 (1992)