

制限酵素物語～発見からゲノム編集まで～

川上 文清

はじめに

制限酵素はDNAの4～8の特異的な塩基配列を認識してホスホジエステル結合を加水分解し、5'位にリン酸基、3'位に水酸基を生ずる酵素である。ファージ感染を制限する現象で働く酵素であることから制限酵素と名付けられた。DNAの構造や機能の解析には欠くことのできない酵素であり、制限酵素の発見がなければ今日の組換えDNA技術を基盤としたバイオテクノロジー産業の発展はなかったといっても過言ではない。

筆者は、前職（東洋紡敦賀バイオ研究所勤務）で制限酵素をはじめとした生命科学用酵素の開発に従事した。本稿では、制限酵素の発見から今日までの流れについて、前職での経験も交えて紹介する。

制限酵素の発見

1950年代はじめ、イリノイ大学のLuriaらはT2ファージ、Bertaniらはλファージの大腸菌への感染実験において、増殖させた大腸菌株（たとえばK株）とは異なる大腸菌株（たとえばB株）にファージを感染させると、感染が大幅に制限されることを見いだした^{1,2)}。

長年この現象の理由は説明できないでいたが、1960年代に入り、ジュネーブ大学のArberやハーバード大学のMeselsonらは、これは大腸菌株がそれぞれ持つ酵素によるものであることを明らかにした。MeselsonらがEcoKIは、分子量40万以上の巨大なタンパク質で、DNAの特異的な塩基配列を認識して切断を行うとともに、認識配列中の1塩基を修飾（メチル化）し、自身の染色体DNAの切断を防いでいた。現在I型制限酵素とよばれるものであるが、残念ながらこの酵素は、認識配列から1000塩基以上離れたところをランダムに切断することから、生命科学研究ではまったく使われていない^{3,4)}。

一方、1970年にジョンズ・ホプキンス大学のSmithらは、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae* Rd) の細胞抽出液中にも同様な酵素が存在することを見いだした。幸運なことにこの酵素は、DNAの特異的な6塩基配列 (GTYRAC: YはC/T, RはA/G) を認識して、

これを中央で切断した。Meselsonらの酵素とは異なり、分子量は7万程度と小さく、DNA切断作用のみ有した。今日II型制限酵素とよばれる酵素の一つ、HindIIの発見である。なおインフルエンザ菌では、HindIIと同じ塩基配列を認識し、配列中のアデニンをメチル化して自身の染色体DNAを保護する修飾酵素 (HindIIメチラーゼ) が別に存在する^{5,6)}。

1971年、ジョンズ・ホプキンス大学の同僚であったNathansらは、ラジオアイソトープ (RI) ラベルしたSV40ウイルスDNAをSmithらが発見した酵素で切断後、アクリルアミドゲル電気泳動、オートラジオグラムを行うことにより、DNAの精密な構造解析ができることを明らかにした⁷⁾。制限酵素とアクリルアミドゲル電気泳動を組み合わせることにより、DNAの構造や機能の解析ができることを示したわけである。この論文は、その後のDNAの構造や機能の解析に大きなブレークスルーをもたらした。

また、Meselsonらはシヨ糖密度勾配遠心分離、Smithらは粘度測定により酵素活性を測定していたが、Nathansらが開発したアクリルアミドゲル電気泳動を用いることで、非常に容易に制限酵素活性の測定が行えるようになった。

その後1973年に、コールドスプリングハーバー研究所のSharpらは、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色を組み合わせた新たな方法を開発した⁸⁾。これによりRIを用いない簡便な制限酵素活性測定法が確立され、世界中でさまざまな微生物から新規な制限酵素の探索が進められることになった。Sharpらの論文が発表された1973年当時発見されていた制限酵素は8種ほどであったが、現在では4000種を超える数の制限酵素 (アイソザイムを除けば約350種) が発見されている⁹⁾。

【コラム1】

読者の中で、アガロースゲル電気泳動によるDNAの分析を行ったことがない方はいらっしやらないと思う。分子サイズマーカーを同時に泳動させれば、DNAの分子サイズを簡単に求めることができ、DNAの簡便な構造解析法として生命科学の研究室では頻繁

に実施されている。正確には、Sharpらが用いたのは縦型の電気泳動装置であり、現在よく用いられている水平型の電気泳動装置は、1977年にブルックヘブン研究所のMcDonellらによって完成された¹⁰⁾。

制限酵素の活性は、通常は37°C 1時間の反応（反応液量 50 μ l）で、1 μ gの λ -DNAを完全分解する酵素量を1 Unitと定義している。正確な酵素活性値は、希釈系列を作った酵素液でこの反応を行い、 λ -DNAが完全分解される酵素希釈液の希釈倍数から逆算して算出される。非常に煩雑でアナログな方法であるが、これに代わる方法は現在まで開発されていない。当然のことながら制限酵素の製造工程前段では、酵素抽出液に大量のDNA分解酵素が含まれており、この方法では活性測定できないことが多い。

制限酵素の商業化

1971年のNathansらの論文により制限酵素の有用性が分かり、多くの生命学者が制限酵素の供給を求めることになった。当初は研究者自らが精製し、研究者同士で融通しあっていたが、品揃えや商業化を求める声が大きくなり、1975年に制限酵素の製造販売を行うNew England Biolabs (NEB) が米国ボストンに誕生した。その後、米国ではGibco-BRL（現ライフテクノロジー）、Promega、欧州ではBoehringer Mannheim（現ロシュ）などが追随した。国内では、1979年に宝酒造（現タカラバイオ）、その後、東洋紡、ニッポンジーンが同市場に参入した。

宝酒造と東洋紡は、制限酵素を商業化するにあたって、京都大学化学研究所（京大化研）の高浪満先生、相崎弘幸先生のご指導を受けた。東洋紡では、前川宜彦博士が中心となって商業化を進め、1982年に京大化研で発見された新規な制限酵素5種（AatI, AatII, BanI, BanII, BanIII）を上市した。その後、使用頻度の高い制限酵素を中心に品揃えを進めたが、生産菌の多くは、当時コールドスプリングハーバー研究所におられたRoberts博士より分譲いただいた。

商品化されている制限酵素の性質や使用上の留意点などの情報については、販売各社のカタログやホームページが充実しており、これを参照いただきたい。

コールドスプリングハーバー研究所からNEBに移ったRoberts博士らは、これまでに発見されたすべての制限酵素や修飾酵素の認識配列、切断箇所、入手方法、メチル化の影響、結晶構造解析、塩基配列などの情報をまとめたデータベース（REBASE, <http://rebase.neb.com>）

を構築している。適時更新され、非常に充実したデータベースとなっている。

【コラム2】

制限酵素を使用する上でもっとも留意いただきたいのは、制限酵素はメチル化の影響を受けるということである。HindII発見のところでも記載したが、制限酵素を生産する微生物は、制限酵素と同じ配列を認識して配列中のアデニン（A）またはシトシン（C）をメチル化する修飾酵素を同時に生産し、自身の染色体DNAの制限酵素からの切断を免れている。たとえばEcoRIはGAATTCを認識してGとAの間を切断するが、EcoRIメチラーゼは中央のAをメチル化する。したがって中央のAがメチル化されたGAATTCをEcoRIは切断できない。

生命科学研究では専ら大腸菌が宿主として用いられる。話はややこしくなるが、大腸菌にはdamメチラーゼ、dcmメチラーゼがある。damメチラーゼはGATCの配列を認識してAをメチル化するため、通常の大腸菌で増幅したプラスミドはGATCのAがメチル化されている。BclIはTGATCAを認識してTとGの間を切断する酵素であるが、中央のAがメチル化されると切断できなくなるため、BclIでプラスミドを切断する場合はdamメチラーゼを欠損した大腸菌（遺伝子型：*dam*）での増幅が必要になる。またSau3AIとMboIはどちらもGATCを認識してGの外側を切断するが、Sau3AIはdamメチラーゼの影響を受けない一方、MboIは影響を受ける。これはそれぞれの修飾酵素のメチル化する塩基の違いによるものである（前者はC、後者はAをメチル化する）。通常の大腸菌で増幅したプラスミドをBamHIで切断できるのも同じ理由である。実験に使用する大腸菌の遺伝子型にも十分留意する必要がある。

制限酵素の種類および命名法

制限酵素は、Meselsonらが発見したI型、Smithらが発見したII型、さらにIII型、IV型に分類されるが、生命科学の研究に用いられるのは、専らII型である。II型制限酵素にも、認識配列数、認識配列、切断部位などが異なる多数の酵素があり、11のサブタイプに分類されている。4-6塩基の回文配列（パリンδροーム）を認識し、認識配列内を特異的に切断する酵素（Type IIP）が多いが、FokIのように、非回文配列を認識して、認識配列から離れたところを特異的に切断する酵素（Type IIS）

も発見されている。生命科学研究ではType IIP型酵素が良く利用されるが、Type IIP型にもパリンドロームの中央で切断し平滑末端を生ずる酵素や、5'末端あるいは3'末端が突出した粘着末端を生ずる酵素があり、用途に応じた酵素が使用されている¹¹⁾。

酵素の種類増加に伴う混乱を防ぐため、SmithやNathansらの提案により制限酵素は命名法が定められている。通常は、生産菌の属名の頭文字1文字(大文字)に種名の頭文字2文字(小文字)を加えた3文字であるが、株名がある場合はさらにそれを加える。そのあと発見された順にローマ数字の番号をつける。たとえば、EcoRIは大腸菌(*Escherichia coli*) R株で発見された最初の酵素である。当初の命名法では頭の3文字はイタリック体にするというルールであったが、2003年にそのルールは廃止された¹²⁾。同じ塩基配列を認識する酵素をアイソシゾマー、同じ配列を認識し異なる切断部位を有する酵素をネオシゾマーとよぶ。

組換えDNA技術による制限酵素生産菌の育種

制限酵素の製造は、はじめに培養した生産菌の細胞破碎抽出液にポリエチレンジアミン処理などを行い、核酸などの夾雑物を除去する。次にDEAEセルロースなどの数段のカラムクロマトグラフィーを行い、制限酵素の働きを妨害する核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)などの夾雑酵素を除去する。制限酵素は、DNAに働く酵素であることから、ホスホセルロースカラムクロマトグラフィー

は夾雑タンパク質の除去に効果的である。最終的に、ホスファターゼ、各種ヌクレアーゼがほとんどないことが確かめられた後、安定化剤として牛血清アルブミン(BSA)が添加され、50%グリセロール溶液の形状で商品化される。

制限酵素の商業化が始まった頃の市販酵素は純度も低く、過剰に用いてトラブルが発生することもあった。多くの制限酵素生産菌の生産性は低く、製造工程後段のクロマトグラフィーを行った後でも、多数の夾雑タンパク質の混在が認められた。しかしながら現在では、多くの制限酵素生産菌について組換えDNA技術による育種が行われ、ほぼ純品にまで精製された高純度の制限酵素が販売されている。

制限酵素遺伝子のクローニングの流れを図1にまとめた。制限酵素遺伝子をクローニングするには、宿主のDNAを保護するため、対応した修飾酵素遺伝子も同時にクローニングすることが必要になる。幸運なことに、制限酵素とそれに対応した修飾酵素の遺伝子は近傍に存在する。そこでまず修飾酵素遺伝子のクローニングを行い、得られたクローンの中から制限酵素遺伝子も含まれているクローンを選抜するという方法が考案され、この方法で多くの制限酵素遺伝子がクローニングされている¹¹⁾。修飾酵素遺伝子のクローニングは、生産菌のDNAで調製したプラスミドライブラリーを目的の制限酵素で切断し、残存した制限酵素耐性のプラスミドを探すことにより、比較的に行うことができる。修飾

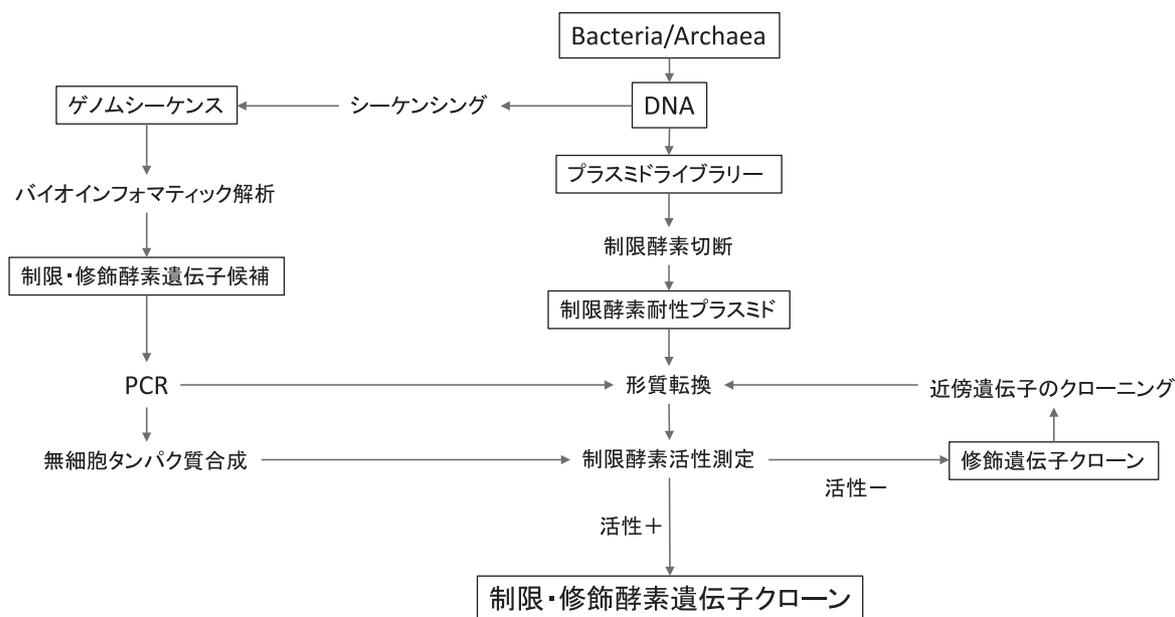


図1. 制限酵素遺伝子クローニングの流れ

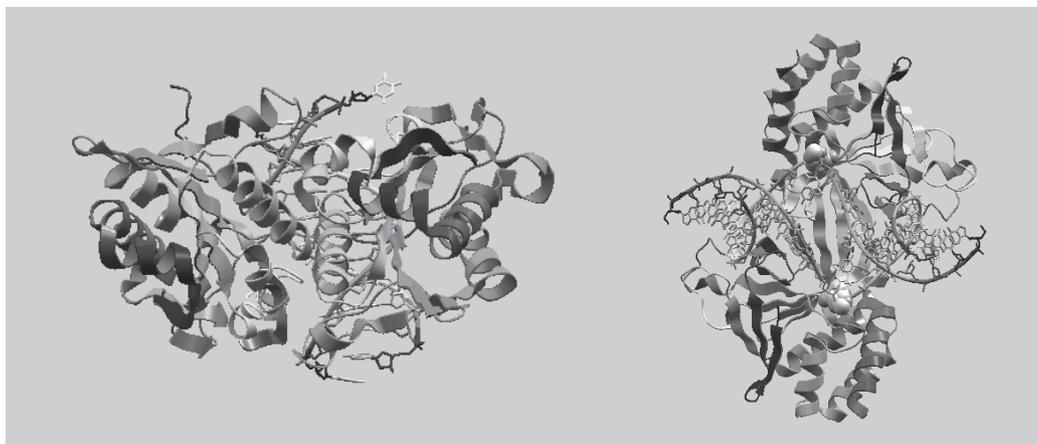


図2. 制限酵素の結晶構造 (左:BamHI ID: 3BAH, 右:PabI ID: 3WAZ). 日本タンパク質構造データバンク (PDBj) より引用.

酵素遺伝子がクローニングされたプラスミドは、メチル化を受け制限酵素耐性となっている。なおライブラリーの構築に用いるプラスミドには、目的の制限酵素の認識、切断部位が含まれていることが必要である。

筆者らも、この方法でいくつかの制限酵素遺伝子のクローニングを行った¹³⁾。宿主はほとんどの場合大腸菌が用いられるが、筆者らは当時大阪大学におられた今中忠行先生（現立命館大学）らと、枯草菌を宿主としたBamHI遺伝子のクローニングを行った。同時期にNEBでは大腸菌を宿主としたBamHI遺伝子のクローニングが行われた¹⁴⁾。BamHI遺伝子を安定発現させるのに大腸菌では、コピー数の異なる2種類のベクターを用いて修飾酵素を制限酵素より高発現させることが必要であるが、枯草菌の場合は、1種類のベクターで安定に発現させることができた¹⁵⁾。

クローニングされた制限酵素や修飾酵素遺伝子の塩基配列解析もこれまで精力的に行われている。同じ塩基配列を認識するにもかかわらず、制限酵素と対応した修飾酵素のアミノ酸配列の間にはほとんどホモロジーは見られない。制限酵素間のアミノ酸配列にもほとんどホモロジーがないが、修飾酵素間には高いホモロジーを示す領域が存在することが分かった。次世代シーケンサーなどDNAシーケンシング技術の進歩により、比較的簡単に全ゲノム配列が取得できる時代となり、アミノ酸配列のホモロジー検索から新規な修飾酵素遺伝子の推定が容易になった。推定された修飾酵素遺伝子近傍の遺伝子をクローニングすることで、制限酵素遺伝子を取得することができる。筆者らも東京大学医科学研究所の小林一三先生らと共同で、*Pyrococcus abyssi*の修飾酵素遺伝子と推定されたORF近傍のORFを無細胞タンパク質合成系で発現させることにより、新規な制限酵素PabIの発見

に成功している¹⁶⁾。

これまでに、300種以上のII型制限酵素の遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定されている。Type IIPの制限酵素の中で、もっとも大きな酵素はClaI (サブユニット分子量41.6 kDa)、もっとも小さな酵素はPvuII (サブユニット分子量18.3 kDa)である。制限酵素は通常ダイマー構造をとり二重鎖DNAに結合して、両鎖のホスホジエステル結合をサブユニットがそれぞれ切断すると推定されている¹¹⁾。

【コラム3】

1988年頃であったと思うが、Roberts博士が来日され、大阪の本社で打合せを行った。非常に粗末な資料と下手な英語でお話させていただき大変申し訳なかったが、あまり強い印象はなく、長く制限酵素生産微生物の収集家と思っていた。その後Roberts博士はコールドスプリングハーバー研究所からNEBに移られ、アカデミアではやっていけなくなりベンチャーに移られたと勝手に思っていた。1994年だったと思うが、何気なくNEBの季刊情報誌を見てみると、トップページにRoberts博士のノーベル賞受賞記者会見の写真が載っていた。当時はまだ日本人研究者のノーベル賞受賞は少なく、あれほど驚いたことはこれまでにない。恥ずかしいことであるが、その時初めて、Roberts博士がRNAスプライシングを発見された方と知った。前述のアガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色を組み合わせたDNA解析法を開発されたSharp博士とともに、RNAスプライシングの発見で、1993年のノーベル医学・生理学賞を受賞されている。

個人的な話になるが、筆者は運よく制限酵素のクローニングなどの仕事で学位を取得でき、NEB訪問

時に学位論文をNEBの研究者に渡していた。NEBに移ったRoberts博士から同論文について問合せの手紙をいただいたが、博士のサイン入りの手紙は今も大切に保存している。

制限酵素の結晶化および構造解析

1986年McClarinらによって初めて制限酵素の結晶構造解析が行われた。McClarinらは、EcoRIとその認識配列を有するオリゴDNAの複合体の結晶についてX線による構造解析を行った¹⁷⁾。2015年10月の時点で、BamHI, FokI, PabIなど54の制限酵素についてX線結晶構造解析が行われている(図2)¹¹⁾。得られた構造情報とこれを基にした部位特異的変異体解析から、制限酵素のDNA切断活性中心のアミノ酸配列については、PD-(D/E)XK, HNH, GIY-YIGといったモチーフが発見されている¹¹⁾。ところで東京大学大学院の田野倉らは前述のPabIについて、ホスホジエステル結合を切断する酵素ではなく、糖と塩基の間の結合を切断する酵素(DNAグリコシダーゼ)であることを結晶構造解析の結果から明らかにしている¹⁸⁾。

人工制限酵素

次世代シーケンサーの登場により、比較的簡単に全ゲノム配列が取得できる時代となり、プラスミドなどを用いた遺伝子クローニングの時代から、ゲノムの1か所だけを特異的に切断し、修復エラーによる変異の導入や、相同組換えによる遺伝子挿入を行うゲノム編集の時代となった。ヒトゲノムにおいて1か所だけを特異的に切断するには、計算上は16の塩基配列($4^{16} > 30$ 億)を認識できればよいが、通常は20ほどの塩基配列を認識し、これを切断する人工制限酵素の実用化が進められている。これまでに、ZFN, TALEN, CRISPRといった人工制限酵素が開発されている。ZFNは、配列特異的にDNAに結合できるZinc Fingerタンパク質、TALENは同様のTALEタンパク質にFokIの切断ドメインを結合させたものである^{19,20)}。CRISPRは、RNA誘導型のCas9ヌクレアーゼを利用するが、配列の異なるRNAを用いれば、異なる部位での切断や複数の部位での切断も可能である²¹⁾。本システムは、その取扱いの簡便性などから現在急速に生命科学者の間に広まりつつある。

【コラム4】

人工制限酵素には、制限酵素FokIのDNA配列認識・結合ドメインを除いた切断ドメインがよく用いられ

る。最近注目されているCRISPRでも、オフターゲット作用低減のため、Cas9のDNA切断ドメインを不活化し、代わりにFokIの切断ドメインを融合する検討が行われている²²⁾。FokIは、認識配列から少し離れたところの配列で切断を行うType IISの制限酵素であるが、DNA配列認識・結合ドメインがN末端側、切断ドメインがC末端側に離れて存在する。切断ドメインだけを配列特異的なDNA結合タンパク質に連結すれば、DNAを特異的に切断する人工制限酵素を作製できる。

なおFokIは、京大化研の相崎や高浪らによって、*Flavobacterium okeanokoites* IFO12539株から世界ではじめて発見され、遺伝子クローニング、塩基配列決定が行われた制限酵素である^{23,24)}。

おわりに

筆者は、教員採用試験に不合格となり、研究所が郷里に近かったことからたまたま東洋紡に入社した。東洋紡が制限酵素の商業化を始めたことから、生命科学研究用酵素の仕事に携わるようになったが、ヒトゲノム解析に至るこの数十年間のダイナミックな生命科学研究の進展や組換えDNA技術を基盤としたバイオテクノロジー産業の発展を間近で見ることができた。また制限酵素の仕事を通して、Roberts博士をはじめとする国内外の多くの方々と知り合えたことは、その後の人生の貴重な財産となった。阪神大震災後に真っ先にお見舞いのファックスをくれたのはリトアニアの制限酵素の研究者であった。民間企業に就職し、Mustの仕事をする中で、Can(できること)が増え、Will(やりたいこと)も見つかったと思う。

Roberts博士は最近、Ten Simple Rules to Win a Nobel Prizeと題する論文をPLoS Comput. Biol.誌に発表している²⁵⁾。もっとも大事なルールは、Never Start Your Career by Aiming for a Nobel Prizeとのことである。生命科学者を志しておられる方は是非ご一読ください。

謝 辞

執筆に際しご助言、ご指導いただきました京都大学大学院喜多恵子教授に深く感謝申し上げます。また前職で、制限酵素遺伝子のクローニングの仕事を手伝っていただいた黒板敏弘さん、木村直樹さん、北山美和さんに深謝いたします。

文 献

- 1) Luria, S. E. and Human, M. L.: *J. Bacteriol.*, **64**, 557 (1952).

- 2) Bertani, G. and Weigle, J. J.: *J. Bacteriol.*, **65**, 113 (1953).
- 3) Aber, W.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **19**, 365 (1965).
- 4) Meselson, M. and Yuan, R.: *Nature*, **217**, 1110 (1968).
- 5) Smith, H. O. and Wilcox, K. W.: *J. Mol. Biol.*, **51**, 379 (1970).
- 6) Kelly, T. J., Jr. and Smith, H. O.: *J. Mol. Biol.*, **51**, 393 (1970).
- 7) Danna, K. and Nathans, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2913 (1971).
- 8) Sharp, P. A. *et al.*: *Biochemistry*, **12**, 3055 (1973).
- 9) Roberts, R. J. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **43**, D298 (2015).
- 10) McDonnell, M. W. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **110**, 119 (1977).
- 11) Pingoud, A. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7489 (2014).
- 12) Roberts, R. J. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1805 (2003).
- 13) Kawakami, B.: Recombinant microbes for industrial and agricultural applications, Marcel Dekker, Inc, 311 (1994).
- 14) Brooks, J. E. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **17**, 979 (1989).
- 15) Kawakami, B. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 211 (1990).
- 16) Ishikawa, K. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **33**, e112 (2005).
- 17) McClarin, J. A. *et al.*: *Science*, **234**, 1526 (1986).
- 18) Miyazono, K. *et al.*: *Nat. Commun.*, **5**, 3178 (2014).
- 19) Kim, Y. G. and Chandrasegaran, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1156 (1996).
- 20) Joung J. K. and Sander J. D.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 49 (2012).
- 21) Cong, L. *et al.*: *Science*, **339**, 819 (2013).
- 22) Guilinger, J. P. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **32**, 577 (2014).
- 23) Sugisaki, H. and Kanazawa, S.: *Gene*, **16**, 73 (1981).
- 24) Kita, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **264**, 5751 (1989).
- 25) Roberts, R. J.: *PLoS Comput. Biol.*, **11**, e1004084 (2015).