

好酸性細菌 *Acidocella facilis* 22M の制限修飾系遺伝子のクローニングと塩基配列決定

山岡 誠司・田村 隆・竹信 尚典・古城 俊之
田中 英彦・稲垣 賢二

(生物資源化学講座)

Cloning and Nucleotide Sequence of the Genes Encoding Restriction-Modification System from Acidophilic Bacterium *Acidocella facilis* 22M

Seiji Yamaoka, Takashi Tamura, Hisanori Takenobu
Toshiyuki Kojo, Hidehiko Tanaka, and Kenji Inagaki

The gene encoding the *Afa22MI* restriction-modification system recognizing the sequence 5'-CGATCG-3' was cloned from *Acidocella facilis* 22M and sequenced. The cloned DNA fragment contained three genes encoding the *Afa22MI* methylase (M. *Afa22MI*), the putative restriction endonuclease *Afa22MI* (R. *Afa22MI*) and a very short patch repair endonuclease (*Afa22MI vsr*). M. *Afa22MI* gene has the conserved motifs of C5-cytosine methyltransferase. *Afa22MI vsr* gene was localized upstream of M. *Afa22MI* gene in opposite orientation, and an open reading frame of R. *Afa22MI* gene was localized downstream of M. *Afa22MI* gene in the same orientation. M. *Afa22MI* has about 63% sequence similarity to the entire amino acid sequence of M. *XorII*, and about 53% sequence similarity to the amino acid sequence for the variable region of M. *XorII*. *Afa22MI vsr* has about 66% sequence similarity to the amino acid sequence of *XorII vsr* which was associated with M. *XorII*.

Key words : restriction-modification system, restriction endonuclease, C5-cytosine methyltransferase, very short patch repair endonuclease

緒 言

制限修飾系は、細菌等において、ファージ等の外来 DNA の侵入に対して、異物である外来 DNA を制限酵素に分解することにより防御する一方で、自己の DNA をメチラーゼによるメチル化により修飾することにより、対応する制限酵素による自己の DNA の分解を防いでいると考えられている。また、近年では、制限修飾系が、水平伝播し、自己保存的に働くことも示唆されている。

かかる制限修飾系は、酵素の反応形式、コファクターの要求性に基づき、I 型、II 型、III 型及び IV 型に分類されている¹⁻³⁾。

I 型の制限修飾系は、DNA 配列を認識する S サブユニット、制限酵素活性の発現に寄与する R サブユニット、メチラーゼ活性の発現に寄与する M サブユニットからなり、同じタンパク質が制限酵素活性、修飾酵素活性、ATPase 活性を合わせ持つ酵素である。I 型においては、制限酵素活性の発現には、コファクターとして Mg^{2+} 、ATP、S-アデノシルメチオニン (SAM) が要求され、

ATP の分解を伴う。また、修飾酵素活性には SAM が要求される。また、I 型の酵素は、一応の認識配列を有するものの、DNA 鎖の切断は、認識配列から 400~700 塩基離れた不特定な部位で起こるので、決まった大きさの DNA 断片の生成は見られない。

II 型の制限修飾系は、二本鎖 DNA 分子内の 4~6 個の塩基配列のパリンドロームからなる特定塩基配列を認識し、その配列内の特定塩基間、あるいは認識配列から一定塩基離れた所を 5' 末端型、3' 末端型または平滑末端型で切断する制限酵素と、認識配列の特定塩基をメチル化する修飾酵素とからなる。II 型制限酵素は、活性発現に Mg^{2+} のみを必要とし、遺伝子工学に欠くことのできない酵素である。

III 型制限修飾系は、I 型と II 型の中間の性質を示し、1 つのタンパク質が、制限酵素活性と修飾酵素活性とを合せ持っている。III 型においては、制限酵素活性には Mg^{2+} と ATP が必要であるが、I 型と異なり ATP の分解は

伴わない。また、切断部位は認識部位から25~27塩基離れており、ATP及びSAMの共存下ではDNAの分解とメチル化が同時に起こる。

当研究室では、今まで、pH 3.0-6.5という酸性条件下に生育する好酸性従属栄養細菌である *Acidiphilium* 属細菌（現在ではそのうちの一群を *Acidocella* 属と呼ぶ。*Acidocella* 属は *Acidiphilium* 属と異なり、Zn²⁺含有バクテリオクロフィルを産生しない。）において、種々の制限酵素の存在を明らかにした⁴⁻⁹⁾ (Table 1)。

なかでも、同属同種である *Acidocella facilis* 22M及び *Acidocella facilis* 16Rからは、CGATCGを認識し、TとCとの間を切断する制限酵素 *PvuI* (R. *PvuI*) のイソチゾマーである制限酵素 *Afa22MI* (R. *Afa22MI*) 及び *Afa16RI* (R. *Afa16RI*) が精製され、その諸性質が検討されている⁷⁾。R. *Afa22MI* と R. *Afa16RI* は、メチル化による影響や反応至適条件等が互いに異なり、その構造と反応メカニズムを解明することにより、巨大タンパク質による分子認識機構、構造活性相関等の新たな知見を得ることができると考えられる。そこで、本研究では *A. facilis* 22Mより *Afa22MI* 制限修飾系遺伝子をクローニングし、塩基配列の決定を行った。

材料と方法

使用菌株、プラスミド及び培地

DNA 供与菌として、*Acidocella facilis* 22Mを用い、宿主として、メチル化の影響が生じにくい *Escherichia coli* XL 1-blue MRF' [Δ (*mcrA*) 183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA* 1 *supE44thi*-1 *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac* [*F'* *proAB* *lacIqZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)] を用いた。また、クローニングベクターには、R. *Afa22MI* の認識配列 CGATCG を2つ有する pUC19を用いた。*Acidocella facilis* 22Mの培養は、HGYE 培地 {(NH₄)₂SO₄ 0.3%,

K₂SO₄ 0.01%, K₂HPO₄ 0.01%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, glucose 0.4%, Yeast Extract 0.05%, pH 3.0} 中、30℃で行った。また、大腸菌の培養は、LB培地を用い、37℃で行った。

Afa22MI 制限修飾系遺伝子のクローニング

Acidocella facilis 22MのDNAを制限酵素 *EcoRV* で部分消化し、pUC19の *SmaI* 部位に連結した。得られたハイブリッドプラスミドを用い、*E. coli* XL 1-blue MRF' を形質転換し、形質転換体を、アンピシリン含有液体LB培地で培養して、組換え体を含む培養液を得た。ついで、培養液中の組換え体から、プラスミドを抽出し、R. *Afa22MI* で切断し、アルカリホスファターゼ処理又は Bal31ヌクレアーゼ処理を行った。処理後のプラスミドを用いて、再度、*E. coli* XL 1-blue MRF' を形質転換した。なお、メチラーゼ M. *Afa22MI* 遺伝子を含まない組換え体を極力減らすため、これらの一連の操作を繰り返した。その後、プラスミドを R. *Afa22MI* で処理し、アルカリホスファターゼ処理又は Bal31ヌクレアーゼ処理したものを、アガロースゲルで電気泳動した。未処理のプラスミドと同じサイズの産物 (M. *Afa22MI* 遺伝子を含む可能性のある断片) をゲルカットし、それを用いて、*E. coli* XL 1-blue MRF' を形質転換した。形質転換体を、固体LB培地で培養し、生じたコロニーのそれぞれからプラスミドを単離し、R. *Afa22MI* により切断されるか否か (*in vivo* メチラーゼ活性) を調べた。また、R. *Afa22MI* に対する耐性を示したポジティブクローンについて、超音波破碎 (12,000W, 10min) して、無細胞抽出液を調製した。この無細胞抽出液を以下の活性測定に用いた。

in vitro メチラーゼ活性の測定

1 μ g の λ DNA を含む反応用緩衝液 {100mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, 1mM Dithiothreitol} に S-Adenosyl-L-methionine を終濃度80 μ M になるよ

Table 1 Properties of Restriction Endonucleases from the Genus *Acidiphilium*¹⁰⁾

	<i>AfaI</i>	<i>Aor13HI</i>	<i>Aor51HI</i>	<i>Afa16RI</i>	<i>Afa22MI</i>	<i>Asp35HI</i>	<i>AcpI</i>	<i>AcpII</i>
Source	<i>A. facilis</i> 28H	<i>A. organovorans</i> 13H	<i>A. organovorans</i> 51H	<i>A. facilis</i> 16R	<i>A. facilis</i> 22M	<i>Acidiphilium</i> sp. 35H	<i>A. cryptum</i> 25H	—
Production (U/g cell)	60,000	30,000	50,000	1,000	8,000	—	—	—
Molecular weight	30,000	64,000	—	—	—	—	62,000	66,000
Subunit	Monomer	2 identical (32,000)	—	—	—	—	2 identical (31,000)	Monomer
Isoschizomer	<i>RsaI</i>	<i>BspMII</i>	<i>Eco47III</i>	<i>PvuI</i>	<i>PvuI</i>	<i>BsmI</i>	<i>AsuII</i>	<i>PfI</i>
Recognition & cleavage site	GT↓AC	T↓CCGGA	AGC↓GCT	CGAT↓CG	CGAT↓CG	GAATGC N↓CTTACG↓N	TT↓CGAA	CCANNNN↓NTGG
Optimum temperature	50℃	55℃	37℃	25℃	37℃	37℃	50℃	30℃
Optimum pH	8.0	7.5	8.0	8.5	8.0	8.0	7.5-9.0	8.5
Optimum salt conc.								
NaCl (mM)	30-50	100-150	60-70	0-40	0-30	60-100	0-50	100
KCl (mM)	30-50	100	40-70	0-50	0-25	80-140	0-50	100-150
Optimum Mg ²⁺ conc. (mM)	5-10	7.5-10	7.0	5-10	5-10	7.5-10	5.0	10.0
Substitution for Mg ²⁺	Mn ²⁺ , Co ²⁺ Pb ²⁺ , Ni ²⁺	Mn ²⁺	—	Mn ²⁺	Mn ²⁺ , Co ²⁺ Pb ²⁺ , Ca ²⁺	Mn ²⁺	None	None
Purification	Homogeneous	Homogeneous	Partial	Partial	Partial	Partial	Partial	Partial
Reference	<i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1009 , 83 (1989)	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 57 , 1716 (1993)	<i>Nucl. Acids Res.</i> 20 , 365 (1992)	<i>J. Ferment. Bioeng.</i> 69 , 60 (1990)	<i>Nucleic. Acids Res.</i> 18 , 6155 (1990)	<i>Nucleic. Acids Res.</i> 19 , 6335 (1991)		

うに加え総量20 μ lの反応系中, 37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。65 $^{\circ}$ Cで15分間の熱失活処理後, 10倍濃度の制限酵素反応用緩衝液{100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol}を加え, 37 $^{\circ}$ Cで1時間制限酵素処理を行った。R. *Afa22MI* に対する耐性の度合いは, 0.7%アガロースゲル電気泳動により調べた。1 Uは1 μ gの λ DNAを完全にメチル化する酵素量とした。

制限酵素活性測定

1 μ gの λ DNAを含む制限酵素反応用緩衝液{10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 7 mM MgCl₂, 0.01% BSA}を用いた反応系20 μ l中, 37 $^{\circ}$ Cで, 1時間反応させた後, 0.7%アガロースゲル電気泳動によりその切断の度合いを調

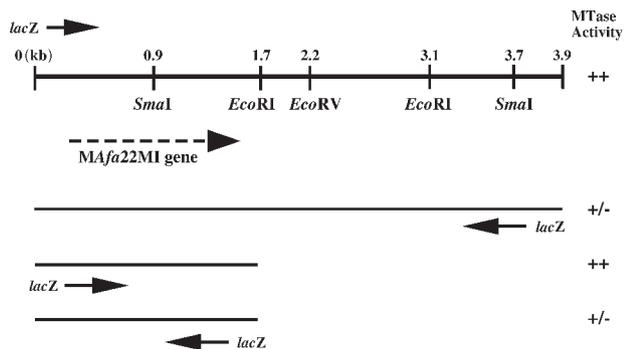


Fig. 1 Restriction map of DNA fragment containing M. *Afa22MI* gene.

++ shows the resistance of M. *Afa22MI*-treated lambda DNA to digestion with R. *Afa22MI*. +/- shows complete digestion with R. *Afa22MI*. The dotted arrow indicates the orientation of M. *Afa22MI* gene.

べた。本反応系で1 μ gの λ DNAを完全に分解する酵素量を1 Uと定義した。

結果と考察

R. *Afa22MI* に耐性なハイブリッドプラスミドを有する組換え体をスクリーニングした結果, 3.9 kbのEcoRV断片含むハイブリッドプラスミドが, R. *Afa22MI* に対して耐性を示した (data not shown)。また, このプラスミドは, 市販のR. *PvuI* に対しても耐性であった。し

```

000 CGGCTTGCTCGAAACCCAATGAGAGGCCCGCCGCCGCGCAACAGGTTCGATTTCCAATGG 060
    GCCGACGAGCTTTGGGTTACTCTCCGGCGCCGCGCGCTTTGCCAGCTAAGGTTACC
      A Q E F G L S L G G A G A F L D I G I P
061 GTTCACGTTACGCTCTTTTCCAAATTCCTATCTCGAGCCGCGATATGCACACTGCCGC 120
    CAGATG :Afa22MI Methylase
      R V
121 CGATTCTGTGATCGGATTTTCATCGGTGGCCAGCCCCCCCCCAAAAAATCGCCCCCCC 180
181 GACCGCCCTTCGGGAATAAGCGGGATGATCGTCCGGCACCCGCCGATTCCGGCGCGCG 240
241 TATGGCGTCTCGCGGTTGAACCCGGCATCTTCCTCGACACATCGTTCGAGAGGTCGAG 300
301 ATGACAGATACCCGAAACGCCAGAACAGCGCCGCAAAATCATGCAGGCGCTCCGGTCTCAC 360
vsr: M T D T R T P E Q R R Q I M Q A V R S H 20
361 GATACCTTACCGAAATGACGGTCCGACGGCGCTTTGGCAGCCGGTCTGCGTATCGT 420
    D T L P E M T V R R A L W A A G L R Y R 40
421 TTGCATGTCCTACCTTCGCCGAGCGCGGATATCGTTCGGCCGCGCGCATCGCC 480
    L H V R T L P G R P D I V L A G R R I A 60
481 GTATTGCTCCATGGATGCTTTTGGCACGGTATCCCGGCTGCCACGTATAGGATACCC 540
    V F V H G C F W H G H P G C P R H R I P 80
541 AAAACCCGATCCGACTTCTGGGGCGGAAATCGCGCAACAGGAAACGAGACCGAGCG 600
    K T R S D F W G A K I A R N Q E R D R A 100
601 CCGGCGTGCCTGGAGGCTCGGGCTGGCAGCTCAAGTTCATTTGGGATGCGAGCG 660
    A A A A L E A A G W H V K V I W G C E T 120
661 GAAAACCCGCAAGTCCGACGCTTCGTGGCGAAATACGCTCGTCGGGAAATCTCG 720
    E N P H K V A T F V A E I A S S R E I S 140
721 AAGAGTCCGCGTCCGCCAGCTTAAGGCTCAGCGACTAGCTAATCTCCGAGATTATG 780
    K S A R S A T L K A Q R L A * (End vsr) 154
    
```

Fig. 2 Nucleotide sequence of gene encoding *Afa22MI* vsr-like protein and deduced amino acid sequenc.

The gene encoding *Afa22MI* vsr-like protein is localized upstream of M. *Afa22MI* gene. Asterisk indicates stop codon of the gene encoding *Afa22MI* vsr like protein.

	10	20	30	40	50	60
1. <i>Afa22MI</i> -vsr	MTDTRTPEQRRQIMQAV	-RSHDTLP	PENTVRRALWAAGL	RLVRLHVRTL	PGRPDIVLAGRR	IA
2. <i>XorII</i> -vsr	MTDRLSPERRRYLMQV	-RSKNTRPEKAVR	SLLSHIA YRFR	LHRKDLPGT	PDI VFP	SRRLLV
3. <i>dcm</i> -vsr	MADVHDKATRSKNMRAI	-ATRDTAIEKRLAS	LLTGQGLAFRVQ	DASLPGR	PDFVVEYRCV	
4. <i>HPAII</i> -vsr	-MDKLTPEQRKCKM	KASSKNKGT	KPELLLAKYLWAL	GLRYRKNDRS	IFGTPDL	SFKRYKIA
consensus	--D---p--R---M-a-----	T-pE-----	L---glr-R-----	lpG-PD-v-----	r--	
	70	80	90	100	110	120
1. <i>Afa22MI</i> -vsr	VFVHGC	FWHGHG	PCPRHRIPK	TRSDFWGAKI	ARNQERDRA	AAAALEAAGWHV
2. <i>XorII</i> -vsr	LFVHGC	FWHGHG	-GCRIGQLPKS	RLDYWSPKIEAN	RARDQRKEA	ALAEAGWRVAVVWQ
3. <i>dcm</i> -vsr	IFTHGC	FWHHHH	-CYLFKVPAT	RTEFWLEKIGKN	VERDRRDISRL	QELGWRVLIWV
4. <i>HPAII</i> -vsr	IFIDGC	FWHGKDW	DIRKYDIKSN	KDFWISKIEHN	MNRDKKVN	DYLSNGWVIFRFW
consensus	-F-hGcFWHgh--c-----	pk---dfw--KI--N--RD-----	L---GW-V---W-c--			
	130	140	150			
1. <i>Afa22MI</i> -vsr	E-NPHKVATFVAE	IASREISKSARS	SATLKAQRLA--			
2. <i>XorII</i> -vsr	SDLGALEARL	RNILDPS-----				
3. <i>dcm</i> -vsr	RGREKLTDEAL	TERLEEWICG	GASAIQIDTQGIHLLA			
4. <i>HPAII</i> -vsr	LKNPEKFSLEI	QKAIYERCVR-----				
consensus	-----					

Fig. 3 Comparison of deduced amino acid sequence of *Afa22MI* vsr-like protein with other vsr or vsr-like proteins. The residue number is based on the number of amino acid residue in the *Afa22MI* vsr-like protein. The sequences are aligned by BLAST algorithm. 1, vsr-like protein from *Acidocella facilis* 22M; 2, vsr homolog from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; 3, *Escherichia coli* vsr; 4, *Haemophilis aphrophilus* vsr.

たがって、この3.9kb断片中に少なくとも M. Afa22MI 遺伝子が存在することが推定された。また、制限酵素活性について調べたが、活性は確認できなかった。

そこで、3.9kb断片について、デレーションクローンを作成して、in vivo メチラーゼ活性を調べた (Fig. 1)。その結果、M. Afa22MI 遺伝子は、Fig. 1の右向きの矢印の位置及び方向に局在することが示された。また、シーケンスを行ったところ、Fig. 1の右向きの矢印の位置及び方向に局在するM. Afa22MI 遺伝子とは逆向きに、vsr 様タンパク質と相同性がある ORF の一部が存在することが示唆された。さらに、3.9kb断片の上流及び下流をクローニングし、シーケンスを行った。

M. Afa22MI 遺伝子の上流に局在する vsr (very short patch repair) endonuclease の塩基配列と推定アミノ酸配列を Fig. 2 に示す。vsr endonuclease (Afa22MI vsr) 遺伝子のコード領域は、462 bp であり、154アミノ酸からなるタンパク質をコードすることが示唆された。Afa22MI vsr の推定アミノ酸配列を基に、BLAST Search により

ホモロジー検索を行ったところ、C5-シトシンメチラーゼに付随する種々の vsr と高い配列類似性を示した (Fig. 3)。特に、M. Afa22MI と同様に CGATCG を認識するC5-シトシンメチラーゼである Xanthomonas oryzae pv. oryzae 由来M. XorII に付随する XorII vsr¹¹⁾とは、約66%という高い配列類似性を示した。

XorII メチラーゼ遺伝子は、Xanthomonas oryzae pv. oryzae のいくつかの株には見出されることが報告されており、XorII メチラーゼ遺伝子が、水平伝播により獲得されたものである可能性が示唆されている¹¹⁾。同属同種である Acidocella facilis 22M及び Acidocella facilis 16 Rに見出されている Afa22MI 及び Afa16RI についても、共通の祖先から、同じ制限修飾系遺伝子を獲得し、その後、変異により異なる性質を獲得した可能性も考えられる。

Afa22MI vsr は、他の生物種において見出されている vsr と同様に、C5-メチルシトシンに起因する T : G ミスマッチ塩基対を C : G 塩基対に正す役割があることが

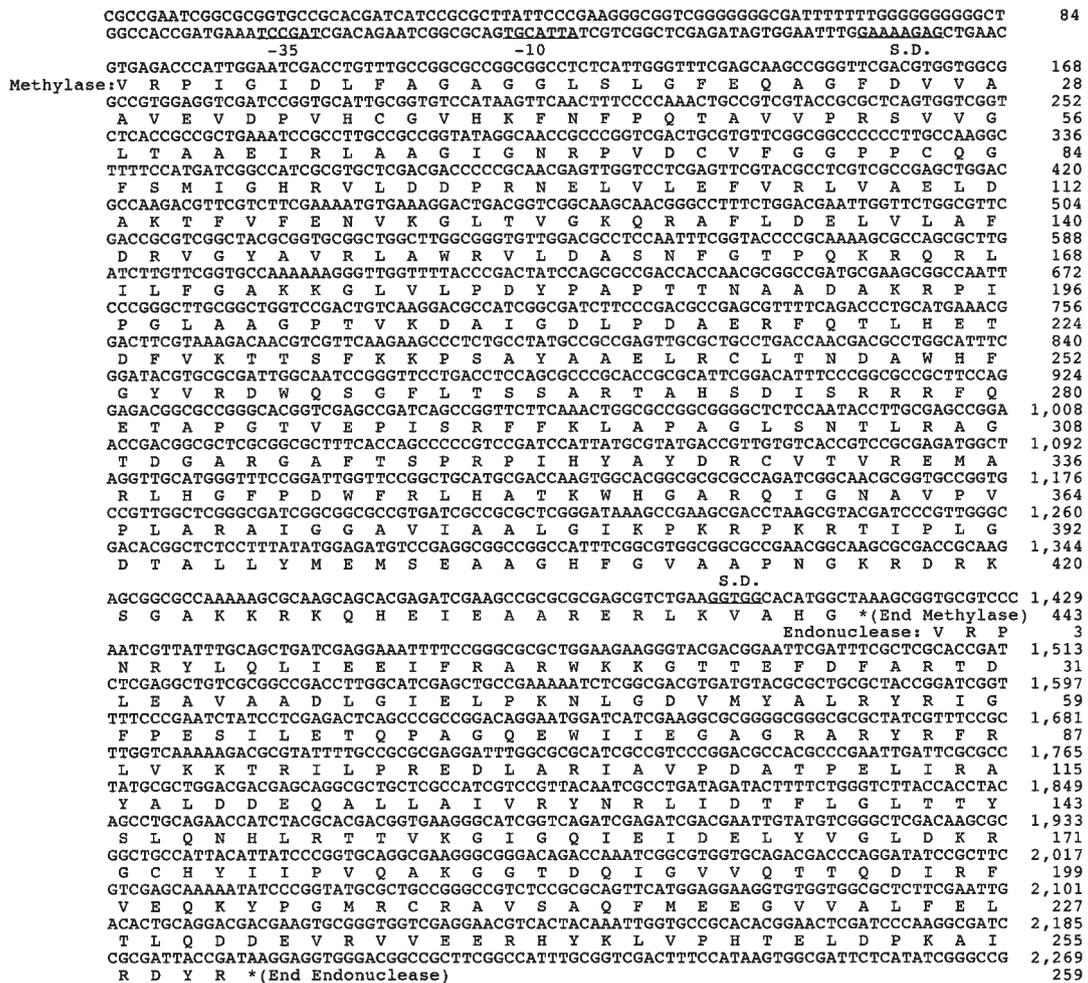


Fig. 4 Nucleotide sequences of M. Afa22MI and R. Afa22MI, and deduced amino acid sequence. S. D. indicates Shine-Dalgarno sequence. -35 and -10 indicate putative -35 and -10 regions, respectively.

推定される。近年、ヒトゲノム DNA の少なくとも約35%がレトロトランスポゾン由来であり、それらはメチル化され、不活化の状態にあることが示されている。一方、癌細胞においては、メチル化レベルが著しく低いことも

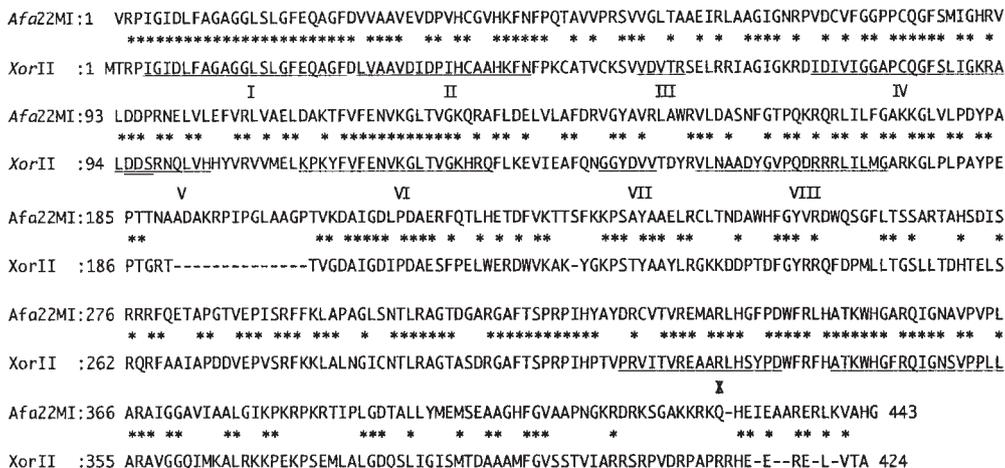


Fig. 5 Sequence alignment of M. Afa22MI and M. XorII. The items I-X indicate the highly conserved domains of C5-cytosine methyltransferases. Asterisks indicate identical residues.

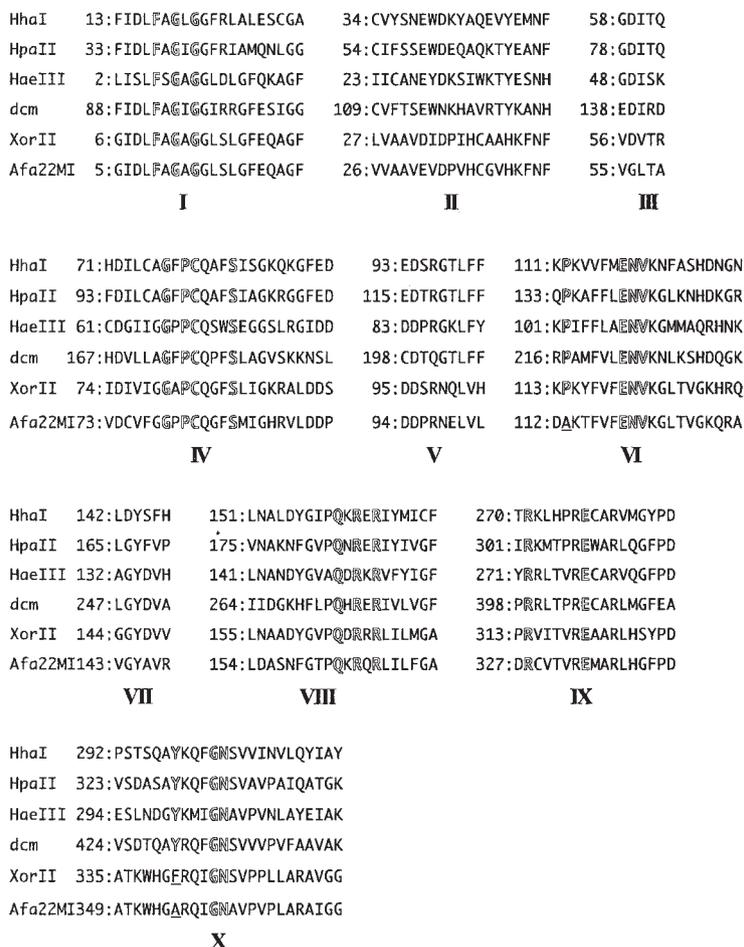


Fig. 6 Comparison of amino acid sequence of C5-cytosine methyltransferases. The highly conserved regions are indicated by numbers, I-X. The open characters indicate the highly conserved residues.

報告されているが、その原因として、5-メチルシトシンの脱アミノ化を経由するチミン塩基への置換変異が考えられている。C5-シトシンメチラーゼをもつ細菌に、自己に致命的になりうる変異を正す機構として、*vsr* が存在することは興味深い。

ついで、*M. Afa22MI* 遺伝子とその下流の ORF の塩基配列と推定アミノ酸配列を Fig. 4 に示す。*M. Afa22MI* の ORF は、GTG (Val) を開始コドンとする1329 bp からなり、433アミノ酸からなるタンパク質をコードすることが示唆された。開始コドンの上流には、リボソーム結合部位領域 SD: GAAAAGAG, プロモーター領域 (-10領域: TGCATTA, -35領域: TCCGAT) が存在することが確認された。また、*M. Afa22MI* の推定分子量は、48,153 Da であった。

M. Afa22MI の推定アミノ酸配列を基に、BLAST Search によりホモロジー検索を行ったところ、シトシン特異的メチラーゼと高い配列類似性があり、なかでも、*M. Afa22MI* と同様に CGATCG を認識する C5-シトシンメチラーゼである *M. XorII* と約63%の高い配列類似性を示した (Fig. 5)。

C5-シトシンメチラーゼは、決まった順番で局在する10箇所の保存領域 I~X を有する。保存領域 I, II と保存領域 X は、SAM を DNA に受け渡す SAM 結合ポケットを形成していると考えられ、保存領域 IV と V は、DNA との結合に関与すると考えられている。*M. Afa22MI* においても、これらの保存領域は、よく保存されていた (Fig. 6)。また、C5-シトシンメチラーゼの配列認識特異性に関与すると考えられている、いわゆる variable region に相当する部分のアミノ酸配列は、*M. XorII* と約53%の配列類似性をもっていた。このように、*M. Afa22MI* と *M.*

XorII の間の配列類似性が高いため、この *M. Afa22MI* の variable region を、*M. XorII* と入れ替えた場合、メチラーゼ活性を発現するかという点も興味深く、構造活性相関の研究モデルとして有望である。

II 型の制限修飾系においては、制限酵素遺伝子とメチラーゼ遺伝子とは、互いに隣接して存在していることが知られている。したがって、*M. Afa22MI* 遺伝子の下流の ORF は、*R. Afa22MI* 遺伝子であることが推定された。そこで、Fig. 7 に示す発現ベクターを構築し、制限酵素活性を調べたが、*in vitro* での活性は、確認することができなかった (data not shown)。これは、宿主として用いた大腸菌により認識されるプロモーターが存在しないことが原因ではないかと思われる。今後、制限酵素遺伝子である推定される ORF 部分を、ランナウェイプラスミド等に導入して、大腸菌に認識されるプロモーターの支配下に発現させ、確認する必要がある。

要 約

CGATCG を認識する *Afa22MI* 制限修飾系遺伝子を好酸性細菌 *Acidocella facilis* 22M より、クローニングし、塩基配列を決定した。その結果、C5-シトシンメチラーゼに特徴的なモチーフが保存された *M. Afa22MI* 遺伝子、その上流に、*M. Afa22MI* 遺伝子とは逆方向に、very short patch repair endonuclease 様タンパク質遺伝子 (*Afa22MI vsr*)、*M. Afa22MI* 遺伝子下流に *M. Afa22MI* 遺伝子と同方向に、制限酵素 (*R. Afa22MI*) 遺伝子と推定されるオープンリーディングフレームが見出された。*M. Afa22MI* の推定アミノ酸配列は、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 由来 *M. XorII* の配列と全体で約63%、variable region 内で約53%の高い配列類似性を示した。また、*Afa22MI vsr* の推定アミノ酸配列も、*M. XorII* に付随する *XorII vsr* の配列と約66%の高い類似性を示した。

文 献

- 1) Geoffrey, G. W.: Organization of restriction of modification system. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2539-2566 (1991)
- 2) Janulaitis, A., M. Petrusyte, Z. Maneliene, S. Klimasauskas and V. Butkus: Purification and properties of the *Eco57I* Restriction endonuclease and methylase-prototypes of a new class (type IV). *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6043-6049 (1992)
- 3) Janulaitis, A., M. Petrusyte, Z. Maneliene, S. Klimasauskas and V. Butkus: Cloning and sequence analysis of the genes coding for *Eco57I* type IV restriction-modification enzyme. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6051-6056 (1992)
- 4) Dou, D., K. Inagaki, K. Kita, A. Ohshima, N. Hiraoka, N. Kishimoto, T. Sugio and T. Tano: Restriction Endonuclease *AfaI* from *Acidiphilium facilis*, a New Isoschizomer of *RsaI*: Purification and Properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **1009**, 83-86 (1989)
- 5) Inagaki, K., T. Hikita, S. Yanagidani, Y. Nomura, N. Kishimoto, T. Tano, and H. Tanaka: Restriction Endonu-

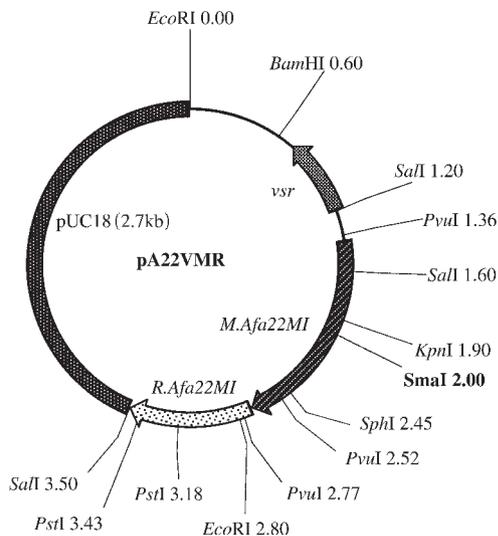


Fig. 7 Restriction map of pA22VMR. The orientation of genes are shown by the arrows.

- clease *Aor*13HI from *Acidiphilium organovorum* 13H, a New Isoschizomer of *Bsp*MII: Purification and Characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1716-1721 (1993)
- 6) Sagawa, H., H. Kotani, Y. Omura, K. Inagaki, T. Tano, N. Kishimoto, M. Takagi and K. Nakajima : Isolation and Identification of Restriction Endonuclease *Aor*51HI from *Acidiphilium organovorum* 51H. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 365 (1992)
 - 7) Inagaki, K., D. Dou, K. Kita, N. Hiraoka., N. Kishimoto, T. Sugio and T. Tano : Isolation and Characterization of Restriction Endonucleases from *Acidiphilium* sp. 16R and 22M. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 60-62 (1990)
 - 8) Inagaki, K., F. Kobayashi, D. Dou, Y. Nomura, H. Kotani, N. Kishimoto, T. Sugio, T. and Tano : Isolation and Identification of Restriction Endonuclease *Asp*35HI from *Acidiphilium* species 35H. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6155 (1990)
 - 9) Inagaki, K., T. Ito, H. Sagawa, H. Kotani, N. Kishimoto, T. Sugio, T. Tano and H. Tanaka : *Acp*I, a Novel Isoschizomer of *Asu*II from *Acidiphilium cryptum* 25H, Recognizes the Sequence 5' TT↓CGAA 3'. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6335 (1991)
 - 10) 稲垣賢二 : 好酸性細菌の機能開発と利用に関する研究. *日本農芸化学会誌*, **71**, 1~8 (1997)
 - 11) Choi, H. S. and J. E. Leach : Identification of *Xor*II methyltransferase gene and a *vsr* homolog from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Gen. Genet.*, **224**, 383-390 (1994)