

Brevibacterium lactofermentum の生産する制限酵素 Bla I

加藤富民雄・中島真子・高野智子・田中啓子・村田晃
(発酵生産学研究室)

昭和60年4月27日 受理

Bla I, a Restriction Endonuclease from *Brevibacterium lactofermentum*

Fumio KATO, Chikako NAKASHIMA, Tomoko TAKANO
Keiko TANAKA and Akira MURATA
(Laboratory of Applied Microbiology)

Received April 27, 1985

Summary

Bla I, a Class II restriction endonuclease, was isolated by phosphocellulose column chromatography from an amino acid producing bacteria, *Brevibacterium lactofermentum*. This enzyme was optimally active at 37°C at pH 7.5 and required 100—150 mM NaCl for the enzyme reaction. The enzyme cleaved lambda, adenovirus-2 and pBR 322 DNAs at the 21, 9 and 1 sites, respectively. The enzyme had an absolute requirement for Mg^{2+} , but 40 mM or more concentration of Mg^{2+} inhibited the enzyme activity. The enzyme activity was also observed at 2 mM Mn^{2+} . No contaminating nuclease activity could be detected in the enzyme fraction from phosphocellulose column chromatography. The enzyme fraction obtained from 50 g of cells was found to contain approximately 10,000 units of Bla I activity.

Bla I was found to be an isoschizomer of Eco RV, a restriction endonuclease of *Escherichia coli* J62 pLG74, and recognized the DNA nucleotide base sequence GATATC.

緒 言

細菌細胞には、他の生物種由来の DNA が何らかの経路、例えば、バクテリオファージの感染、によって侵入した場合、その外来の DNA を自己の DNA と見分け分解して制限するか、あるいは自己型に修飾する制限修飾系が存在することが知られている¹⁾。

制限酵素は、この系を構成する酵素の 1 つで、外来の DNA を分解するが、自己の DNA には作用しないという作用特異性をもち、DNA 塩基配列を特異的に認識し、一定の末端配列をもつ断片に DNA を切断する。この酵素を利用することにより、プラスミド DNA に特定の遺伝子を含む DNA 断片を結合させた組み換え体 DNA を試験管内で作ることが容易にできる。このことは、いかなる生物種の DNA をも微生物内に組み込ませ増殖しうること、即ち遺伝子操作が可能になったことを意味する。

1970年に Smith ら^{12,25)}は初めて *Haemophilus influenzae* Rd から、今日“II型制限酵素”と呼ばれる酵素を分離した。これは、DNA 上の特定の塩基配列を認識して、そこを切断するという、それまで全く知られていなかった新型のエンドヌクレアーゼであった。このII型酵素の活性発現には、 Mg^{2+} のみが必要とされる。その後、同じような活性を持つ酵素が各種微生物から分離され、現在 Robert²²⁾の報告によると、その数は400以上である。

このように、各種微生物から多くの制限酵素が見い出されているが、核酸やアミノ酸を生産する有用細菌からの制限酵素の報告は少ない。そこで、当研究室保存の核酸やアミノ酸を生産する有用細菌とその類縁菌80株¹¹⁾を用いて制限酵素の検索を行い、グルタミン酸生産菌の1株である *Brevibacterium lactofermentum* からII型制限酵素を分離し、Bla I と名付けた。

本報文では、この Bla I の反応条件や認識部位について検討した結果について述べる。

実 験 方 法

1. 使用菌株と培地

制限酵素生産菌として *Brevibacterium lactofermentum* No.28を用いた。培地は10%ポリペプトン、10%肉エキス、5%塩化ナトリウム、3%酵母エキス、および水道水からなるブイヨン培地を使用した。菌の保存には、ブイヨン培地に1.7%の寒天を加えた斜面培地を用いた。

2. 培養方法

10mlのブイヨン培地を含むモノーL字管に斜面培地から *B. lactofermentum* No.28を1白金耳接種し、モノー恒温振盪培養機（中島製作所）を用いて、30°Cで20時間振盪培養を行った。この全量を40mlのブイヨン培地を含む250ml三角フラスコに加え、回転振盪培養機（いわしや生物科学）を用い、30°Cで24時間培養した。さらに、1ℓのブイヨン培地を含む5ℓ三角フラスコに上記の種培養40mlを加え、回転振盪培養機を用いて30°Cで約30時間振盪培養した。

3. 粗酵素液の調製

上記培養液を5000×g、15分間遠心分離し、集菌した。その菌体10gを10mM リン酸緩衝液 (pH7.0)・7mM 2-メルカプトエタノール・1mM EDTA に0.4M 塩化ナトリウムを加えた溶液40ml中に懸濁した。この懸濁液を冷却しながら、超音波発生装置（久保田製作所、インソネーター200M）を用い、200ワットで30分間処理した。超音波で破壊した菌体懸濁液を、日立超遠心分離機55P-2を用い、100,000×g、60分間遠心分離し、上清を得た。この上清の塩化ナトリウム濃度を0.2M になるように約2倍に希釈し粗酵素液とした。

4. ホスホセルロースカラムクロマトグラフィー

ホスホセルロースはWhatman P11を用いた。常法²⁸⁾により調製したホスホセルロースを、1.4×20cmのカラムに充填し、0.2M 塩化ナトリウムを含む10mM リン酸緩衝液 (pH7.0)・7mM 2-メルカプトエタノール・1mM EDTA 溶液で平衡化した。約80mlの粗酵素液を吸着させた後、上記緩衝液で溶出液の280nmの吸光度がほぼ0になるまでカラムを洗った。次いで、0.2M から1.0M の塩化ナトリウム濃度勾配をもつ緩衝液200mlで酵素を溶出し、5mlずつ画分を集めた。

5. 制限酵素の活性測定

DNA 基質として直鎖状のλファージDNA (Bacteriophage λc 1857S 7, 宝酒造㈱)を用いた。緩衝液として、6mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)・6mM 塩化マグネシウム・6mM メルカプトエタノールを用いた。ホスホセルロースカラムで分画した酵素液20μℓ、基質4μℓ

(DNA 1 μ g), 緩衝液16 μ lの反応混合液を30°C, 3時間反応させた後, 1.25% SDS 4 μ lを加え反応を停止した。

6. アガロースゲル電気泳動

アガロース (Sigma) を40mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.9) - 5 mM 酢酸ナトリウム - 1 mM EDTA (pH7.7) 溶液に, 1% w/v となるように溶かし, 約50°Cに冷やしてから10mg/mlのエチジウムブロミド (Sigma) 溶液を加え, 終濃度0.5 μ g/mlとした。これを垂直型平板ゲル作成装置 (アートー社) で平板ゲルを作り用いた。泳動は0.5 μ g/mlのエチジウムブロミドを含む40mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.9) - 5 mM 酢酸ナトリウム - 1 mM EDTA (pH7.7) 溶液をスラブゲル電気泳動装置 (アートー社) の上下両槽に満たして行った。酵素反応の終わった試料を8% ショ糖 - 0.025% ブロムフェノールブルーとなるように調整し, ゲルの試料溝に静かにのせ, 100V, 2時間泳動させた。泳動後, 長波長紫外線ランプ (ウルトラバイオレット TL-33) を照射し, 活性を測定し, 必要に応じポラロイドフィルム (タイプ667) で写真撮影した。

アガロースの濃度を0.8% w/v 以下で用いる際には, 水平式アガロースゲル電気泳動装置 (和科盛, AH-16) を使用した。

7. 試薬および酵素

基質 DNA として使用した pBR322DNA は宝酒造(株), アデノウイルス-2 DNA (BRL 製) は丸善石油(株)から購入した。制限酵素類は宝酒造(株)および和光純薬工業(株)から購入した。

結果および考察

1. ホスホセルロースカラムクロマトグラフィー画分の活性

B. lactofermentum No28から得られた酵素のホスホセルロースカラムクロマトグラフィーの画分を3本おきにとり, λ DNA と反応させ, その活性をスラブ電気泳動で検討した。Fig. 1 に示すように, 13本目から22本目の画分に活性が現われており, 数本の DNA のバンドが確認できた。活性は16本目の画分が最も強く, 塩化ナトリウム濃度約0.5Mで溶出された。この酵素を制限酵素の命名法に従い, Bla I と名付けた。

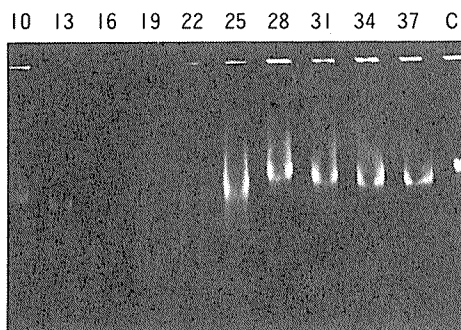


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis patterns of λ DNA digested with fractions from phosphocellulose chromatography of lysate of *Brevibacterium lactofermentum* No 28. Portions (20 μ l) of column fractions (5 ml) were incubated at 30°C for 3 hr in a 40 μ l reaction mixture containing 1 μ g λ DNA, 3 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM $MgCl_2$, 3 mM 2-mercaptoethanol. The reaction was stopped by adding 4 μ l of a solution containing 1.25 % (w/v) sodium dodecyl sulfate. Then 10 μ l of a solution containing 40 % (w/v) sucrose and 0.2 % (w/v) bromphenol blue were added and samples were loaded onto 1.0 % (w/v) agarose slab gel 15 cm \times 15 cm \times 0.2 cm thick. The gel was subjected to electrophoresis at 100 v for 2 hr in the presence of 0.5 μ g/ml ethidium bromide and photographed under ultraviolet light with Polaroid film (type 667). Fraction numbers are shown above each lane of the gel. C; undigested λ DNA.

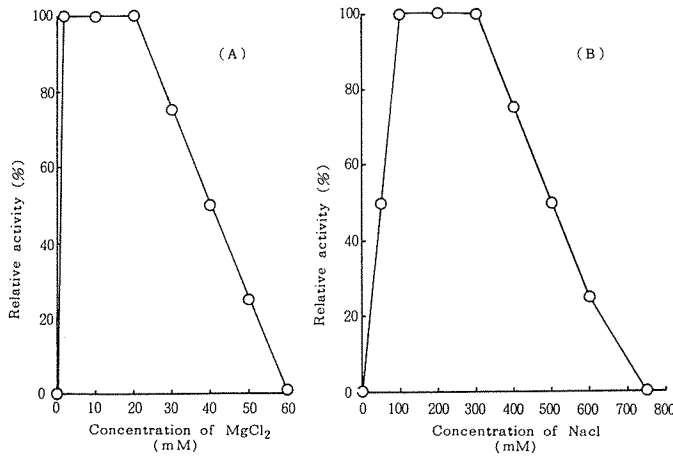


Fig. 2 The effects of metal concentrations on the Bla I activity. The experimental conditions are the same as described in the legend to Fig. 1, except for $MgCl_2$ or NaCl concentration. In (A), the enzyme activities in reaction mixtures with different Mg^{2+} concentrations were compared. In (B), indicated concentrations of NaCl were added to the standard reaction mixtures, and the enzyme activities were compared.

Na^+ が存在する。この Na^+ を除去するため、10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) - 7 mM 2-メルカプトエタノール - 1 mM EDTA 溶液に対し一夜透析した。透析した酵素液を用いて Bla I の活性に対する Na^+ の影響について Na^+ の濃度と反応時間を変えて検討した。Fig. 2 (B)に示すように、 Na^+ 濃度100mM から300mM の範囲で活性は100%であったが、それより低濃度でも高濃度でも活性は阻害された。この結果から、Bla I は至適塩濃度が比較的高い制限酵素であると考えられた。

2. 3 Mn^{2+} の影響

Bla I の活性が Mg^{2+} のかわりに Mn^{2+} でも発現するかどうかについて検討した。 Mn^{2+} の濃度を0.4mM から10mM まで変え、3 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) - 3 mM 2-メルカプトエタノールで反応を行った。 Mn^{2+} 濃度 2 mM 付近の狭い範囲で活性が発現したが、高濃度では

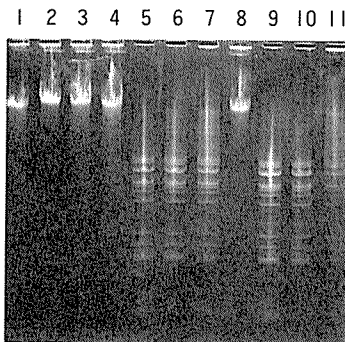


Fig. 3 Effect of Mn^{2+} concentration on the Bla I activity. The experimental conditions are the same as described in the legend to Fig. 1. Lane 1; 0.4 mM $MnCl_2$, Lane 2; 0.6 mM $MnCl_2$, Lane 3; 0.8 mM $MnCl_2$, Lane 4; 1 mM $MnCl_2$, Lane 5; 2 mM $MnCl_2$, Lane 6; 5 mM $MnCl_2$, Lane 7; 10 mM $MnCl_2$, Lane 8; undigested λ DNA, Lane 9; standard reaction condition, Lane 10; 0.4 mM $MnCl_2$ plus 3 mM $MgCl_2$, Lane 11; 10 mM $MnCl_2$ plus 3 mM $MgCl_2$.

2. 酵素活性に及ぼす金属イオンの影響

2. 1 Mg^{2+} の影響

II型制限酵素の活性発現には Mg^{2+} が必須であるが、Bla I の活性に対する Mg^{2+} の影響を Mg^{2+} の濃度と反応時間を変えて検討した。Fig. 2 (A)に示すように、 Mg^{2+} が存在しない時は活性は全く現われず、2 mM から20mM の Mg^{2+} 濃度で活性は100%であった。高濃度の Mg^{2+} で活性は阻害され、60mM 以上で活性は全くみられなかった。

2. 2 Na^+ の影響

Bla I はホスホセルロースカラムクロマトグラフィーで塩化ナトリウムの濃度勾配で溶出されたので、酵素液中には約0.5M の

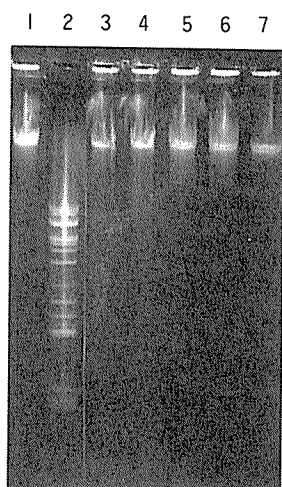


Fig. 4 Effect of Ca^{2+} concentration on the Bla I activity. The experimental conditions are the same as described in the legend to Fig. 1. Lane 1; undigested λ DNA, Lane 2; standard reaction condition, Lane 3; 2 mM CaCl_2 , Lane 4; 5 mM CaCl_2 , Lane 5; 20 mM CaCl_2 , Lane 6; 10 mM CaCl_2 plus 3 mM MgCl_2 .

阻害された。また、 Mg^{2+} を同時に 3 mM 存在させて反応すると、それ単独では活性がみられなかった Mn^{2+} 0.4 mM でも活性が発現した。しかし、 Mg^{2+} が適量存在しても Mn^{2+} の濃度が 10 mM になると酵素活性は阻害された。これらの結果は Fig. 3 に示す。

2. 4 Ca^{2+} の影響

2. 3 同様に Mg^{2+} のかわりに Ca^{2+} を用いて反応を行った。 Ca^{2+} の濃度を 2 mM から 20 mM まで変えて検討したが、Fig. 4 に示すように、酵素活性は全く現われなかった。 Mg^{2+} を 3 mM 同時に存在させても、 Ca^{2+} 濃度が 10 mM のとき、活性は阻害された。

3. 酵素活性に対する pH と温度の影響

pH を 7.0, 7.5, 8.0 に調整した 3 mM トリス塩酸緩衝液を用い、3 mM 塩化マグネシウム、3 mM 2-メルカプトエタノール存在下で λ DNA を基質として 30°C で酵素反応を行った。その結果、pH 7.5 が酵素活性の至適 pH であることが明らかになった。

3 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を用い、3 mM 塩化マグネシウム、3 mM 2-メルカプトエタノール存在下で、反応温度を 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C と変えて 3 時間反応させた。30°C 以下では活性に大差はなかったが、37°C が酵素活性の至適温度であった。

4. 酵素反応の完全系と酵素活性単位の設定

Bla I の活性発現に影響する因子について種々検討した結果、酵素反応の完全系として、3 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)、3 mM 塩化マグネシウム、3 mM 2-メルカプトエタノール存在下、基質 λ DNA と酵素液を 37°C で反応させたときとした。なお、酵素液としてホスホセルロースカラムからの画分を使用する際は問題がないが、透析などで脱塩した酵素液を用いる場合には塩化ナトリウムを 100 mM から 150 mM 上記の系に加える必要がある。

Bla I の酵素活性 1 単位は基質 λ DNA 1 μ g を 37°C, 1 時間で切断する活性とした。このことから、Bla I は *B. lactofermentum* No. 28 の菌体 50 g から約 10,000 単位得られた計算になる。

5. Bla I の経時的反応

Bla I を基質 λ DNA と反応させ、経時的にサンプリングして反応経過を調べた。その泳動パターンを Fig. 5 に示す。4 時間の反応でほぼ完全に λ DNA は切断されており、24 時間反応させたものでも DNA の切断パターンは変化していない。このことから、この酵素液中には他のエンドヌクレアーゼの混入がほとんどないことが明白である。ホスホセルロースカラムクロマトグラフィーを行うだけで、このような酵素試料が得られることは、Bla I の精製が簡単であるという有利性を示すものである。

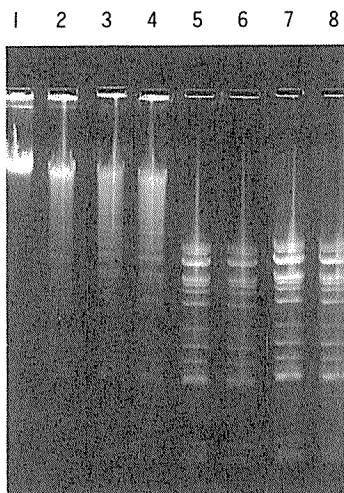


Fig. 5 Time course of λ DNA digestion with Bla I. Twenty μ l of enzyme solution was incubated for various times at 37°C in a 40 μ l reaction mixture containing 3 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM $MgCl_2$, 3 mM 2-mercaptoethanol and 2 μ g λ DNA. Lane 1; undigested λ DNA, Lane 2; 1 hr, Lane 3; 2 hr, Lane 4; 3 hr, Lane 5; 4 hr, Lane 6; 6 hr, Lane 7; 8 hr, Lane 8; 24 hr.

Fig. 6 Analysis of the cleaved fragments produced from various DNAs by Bla I digestion. The enzyme solution (20 μ l) was incubated with 2 μ g of phage, virus and plasmid DNAs for 6 hr at 37°C in a 40 μ l reaction mixture containing 3 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM $MgCl_2$ and 3 mM 2-mercaptoethanol. The reaction mixtures were analyzed by horizontal electrophoresis on 0.7 % agarose gel (13.5 cm \times 13.5 cm \times 0.3 cm thick) and other experimental conditions are the same as described in the legend to Fig. 1. Lane 1; undigested λ DNA, Lane 2; Bla I digests of λ DNA, Lane 3; undigested adenovirus-2 DNA, Lane 4; Bla I digests of adenovirus-2 DNA, Lane 5; undigested pBR322 DNA, Lane 6; Bla I digests of pBR322 DNA, Lane 2'; the positions of fragments of Lane 2 and nucleotide number of fragments, Lane 4'; the positions of fragments of Lane 4 and nucleotide number of fragments.

6. Bla I の各種 DNA 切断数

Bla I と基質として λ DNA, アデノウイルス-2 DNA, pBR322DNA を反応させて, その切断数を検討した. 反応は各基質をそれぞれ 2 μ g になるようにとり, Bla I 酵素液 20 μ l, 3 mM トリス塩酸緩衝液, 3 mM 塩化マグネシウム, 3 mM 2-メルカプトエタノール存在下, pH7.5, 37°C で 6 時間行った. それぞれの泳動パターンを Fig. 6 に示す. λ DNA の場合, レーン 2 に示すように 15 本のバンドが確認できた. アデノウイルス-2 DNA の場合は, レーン 4 にみられるように, 10 本のバンドに切断された. pBR322DNA では, 二量体, 三量体があるため, 未反応のものでもレーン 5 に示すように 4 本のバンドが認められる. これを Bla I で切断するとレーン 6 のように, 1 本のバンドが見えるだけになる. これは Bla I によって環状の pBR322DNA が 1 か所切断されて直鎖状の DNA になったことを示す. このことから, Bla I は λ DNA を 14 か所, アデノウイルス-2 DNA を 9 か所, pBR322DNA を 1 か所切断すると考えられた. しかし, λ DNA の切断された 15 本のバンドのおおよその塩基数 (Fig. 6 のレーン 2') を合計しても 48,500 塩基にはならないことから, Bla I による λ DNA の切断数は 14 か所より多いと考えられた.

7. Bla I の認識部位の決定

上述のように Bla I は, λ DNA を 14 か所以上, アデノウイルス-2 DNA を 9 か所, pBR322DNA を 1 か所切断する制限酵素である. この酵素の認識部位

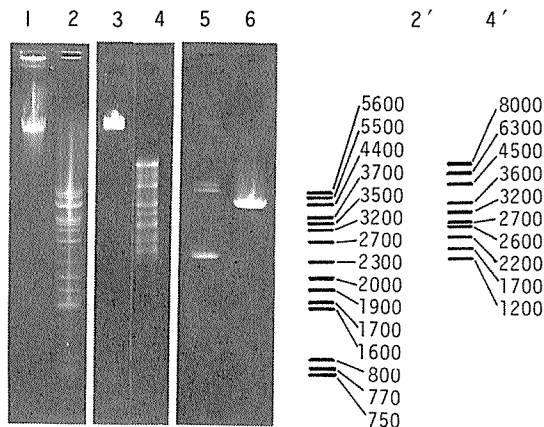


Table 1. Recognition sequences of restriction enzyme cleaving pBR322 DNA at one site.

sequence	enzyme	number of cleavage sites		reference
		λ DNA	Ad-2	
5'-A ↓ AGCTT-3'	Hind III	7	12	19)
5'-A ↓ CRYGT-3'	Afl III	20	25	30)
5'-AT ↓ CGAT-3'	Cla I	15	2	17)
5'-AGT ↓ ACT-3'	Sca I	5	5	14)
5'-CAG ↓ CTG-3'	Pvu II	15	24	8)
5'-CA ↓ TATG-3'	Nde I	7	2	29)
5'-CGAT ↓ CG-3'	Pvu I	3	7	8)
5'-C ↓ GGCCG-3'	Xma III	2	19	15)
5'-CTGCA ↓ G-3'	Pst I	28	30	3), 24)
5'-C ↓ YCGRG-3'	Ava I	8	40	18)
5'-G ↓ AATTC-3'	EcoRI	5	5	9)
5'-GACGT ↓ C-3'	Aat II	10	3	27)
5'-GACN ↓ NNGTC-3'	Tth III I	2	12	23)
5'-GAT ↓ ATC-3'	EcoRV	21	9	12)
5'-GCATG ↓ C-3'	Sph I	6	8	5)
5'-G ↓ GATCC-3'	BamHI	5	3	31)
5'-GTATAC-3'	Sna I	3	3	20)
5'-G ↓ TCGAC-3'	Sal I	2	3	2)
5'-TCG ↓ CGA-3'	Nru I	5	5	4)
5'-TGG ↓ CCA-3'	Bal I	18	17	6)

Y=C or T, R=A or G, N=A, C, G or T.

を決定するために、分子量が小さく全塩基配列がすでに明らかになっている pBR322DNA を用いて検討を行った。pBR322DNA を 1 か所切断する酵素とその認識部位は Table 1 に示すようにすでに 20 種知られている。これらの酵素の λ DNA とアデノウイルス-2 DNA に対する切断数も合せ表示している。この表から λ DNA を 14 か所以上切断する酵素を探すと、Afl III³⁰⁾ (20 か所)、Cla I¹⁷⁾ (15 か所)、Pvu II⁸⁾ (15 か所)、Pst I^{3), 24)} (28 か所)、Eco RV¹²⁾ (21 か所)、Bal I⁶⁾ (18 か所) の 6 種である。また、アデノウイルス-2 DNA の切断数をみると Bla I と同じ切断数 9 というのは Eco RV だけである。これらの DNA の切断数から、Bla I は Eco RV に類似していることが明らかとなった。

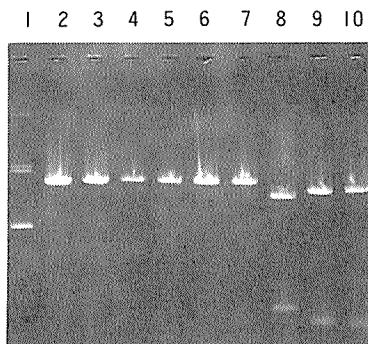


Fig. 7 Single and double digestion patterns of Bla I, EcoRI, Hind III and Pst I on pBR322 DNA. The experimental conditions are the same as described in the legend to Fig. 6. Lane 1 ; undigested pBR322 DNA, Lane 2 ; Bla I, Lane 3 ; EcoRI, Lane 4 ; Hind III, Lane 5 ; Pst I, Lane 6 ; Bla I and Hind III, Lane 7 ; Bla I and EcoRI, Lane 8 ; Bla I and Pst I, Lane 9 ; Hind III and Pst I, Lane 10 ; EcoRI and Pst I.

このことを確認するため、pBR322DNAを1か所切断する他の酵素、Eco RI、Hind IIIおよびPst IとBla IでpBR322DNAの二重切断を行った。この結果はFig. 7に示す。レーン2から5までは各酵素単独でpBR322DNAを切断したもので4363塩基の直鎖状のDNAのバンドがみられる。Hind IIIやEco RIとBla Iとの二重切断（レーン6, 7）でもバンドは単独のときとほぼ同じ位置にあり、これはBla Iの切断位置がHind IIIやEco RIのごく近傍にあることを示している。Bla IとPst Iでの二重切断では2本のバンドがみられ（レーン8）、Bla IとPst Iの切断位置がかなり離れていることが示された。この2本のバンドの大きさを検討するため、切断位置のわかっているPst IとHind III、Eco RIによる二重切断を行ったのがレーン9, 10である。また、pBR322DNAを1か所切断する酵素の切断位置をFig. 8に示す。レーン9の下方のバンドは784塩基、レーン10の下方のバンドは752塩基で、レーン8の下方のバンドはこれより大きく泳動距離から計算すると約940塩基であった。一方、Eco RVとPst Iの切断によって生じる小さなバンドの塩基数は940であり、Bla IのpBR322DNAの切断位置がEco RVと同じであると確認された。そこで、Bla Iの認識する塩基配列はFig. 9に示すように、5'-GATATC-3'であると考えられた。Bla Iによる切断DNAの末端の塩基配列については検討していないので、この6塩基対のどこを切断するのかは明らかでない。

以上の諸結果は、Bla Iが*Escherichia coli* J62 pLG74から分離されたEco RV¹²⁾のisoschizomerであることを示している。しかし、既報のEco RVとBla Iの性質を比べてみると、Bla Iは塩化ナトリウム濃度の広い範囲で活性を発現する点でEco RVと異なっている。なお、Mn²⁺で活性が発現する点については、Eco RVでは報告がないので比べられない。

工業的にグルタミン酸発酵に用いられている細菌の1菌株である*Brevibacterium lactofermentum*からII型制限酵素が分離されたが、この酵素は遺伝子操作のベクターとしてよく使用されているpBR322DNAを1か所で切断するため、有用細菌の新しい宿主・ベクター系の開発に役立つものと考えられる。

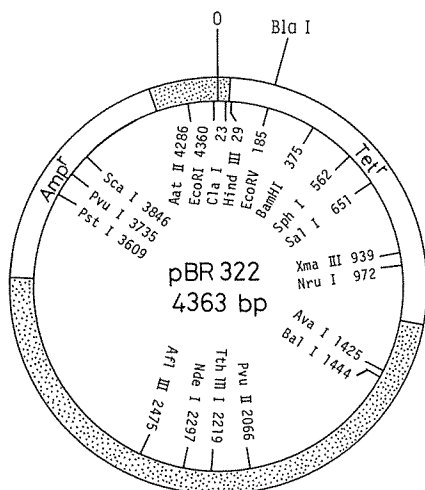


Fig. 8 Restriction map of pBR322 DNA. Numbers show length of nucleotide base from 0 point in the clockwise direction. All listed enzymes cleave pBR322 DNA at one site.

摘 要

グルタミン酸生産菌の1株である*Brevibacterium lactofermentum* No.28からII型制限酵素を分離した。酵素はホスホセルロースカラムクロマトグラフィーで塩化ナトリウム濃度0.5M付近で溶出された。この制限酵素Bla Iの至適反応条件は、3mM トリス塩酸緩衝液(PH7.5), 3 mM 塩化マグネシウム, 3 mM 2-メルカプトエタノール, 150mM 塩化ナトリウム存在下で基質と37°C

5'-GATATC-3'
3'-CTATAG-5'

Fig. 9 Recognition sequence of Bla I.

で反応させることであった。Mg²⁺は反応に必須であったが、40mM 以上では著しく活性を阻害した。Mg²⁺の代わりに 2 mM の Mn²⁺でも活性は発現した。Bla I は λ DNA, アデノウイルス-2 DNA, pBR322DNA をそれぞれ、21か所、9か所、1か所切断した。Bla I は *Escherichia coli* J62 pLG74 から分離された制限酵素 Eco RV と isoschizomer と考えられ、その認識する塩基配列は 5'-GATATC-3'であった。

謝 辞

本研究を行うにあたり有益な御助言を頂いた佐賀医科大学向井常博助教授に感謝する。

文 献

- 1) Arber, W. and S. Linn (1969). *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 467-500.
- 2) Arrand, J. R., P. A. Myers and R. J. Roberts (1978). *J. Mol. Biol.*, **118**, 127-135.
- 3) Brown, N. L. and M. Smith (1976). *FEBS Letters*, **65**, 284-287.
- 4) Comb, D. G. and I. Schildkraut, unpublished observations.
- 5) Fuchs, L. Y., L. Covarrubias, L. Escalante, S. Sanchez and F. Bolivar (1980). *Gene*, **10**, 39-46.
- 6) Gelinis, R. E. and I. Schildkraut, unpublished observations.
- 7) Gingeras, T. R., P. A. Myers, J. A. Olsen, F. A. Hanberg and R. J. Roberts (1978). *J. Mol. Biol.*, **118**, 113-122.
- 8) Gingeras, T. R., L. Greenough, I. Schildkraut and R. J. Roberts (1981). *Nucleic Acids Res.*, **5**, 4525-4536.
- 9) Hedgpeth, J., H. W. Goodman and H. W. Boyer (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3448-3452.
- 10) Hiraoka, N., K. Kita, H. Nakajima and A. Obayashi (1984). *J. Ferment. Technol.*, **62**, 583-588.
- 11) Kato, F., M. Yoshimi, K. Araki, Y. Motomura, Y. Matsufune, H. Nobunaga and A. Murata (1984). *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 193-200.
- 12) Kelly, T. J. Jr. and H. O. Smith (1970). *J. Mol. Biol.*, **51**, 393-409.
- 13) Kholmina, G. V., B. A. Rebentish, Y. S. Skoblov, A. A. Mironov, N. K. Yankovsky, Y. I. Kozlov, L. I. Glatman, A. F. Moroz and V. G. Debabov (1980). *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **253**, 495-497.
- 14) 児島宏之, 大橋幸男, 高橋秀夫, 齊藤日向 (1982). 日本農芸化学大会講習要旨集, p. 533.
- 15) Kunkel, L. M., M. Silberklang and B. J. McCarthy (1979). *J. Mol. Biol.*, **132**, 133-139.
- 16) Langdale, J. A., P. A. Myers and R. J. Roberts, unpublished results.
- 17) Mayer, H., R. Grosschedl, H. Schutte and G. Hobom (1981). *Nucleic Acids Res.*, **9**, 4833-4845.
- 18) Murray, K., S. G. Hughes, J. S. Brown and S. A. Bruce (1976). *Biochem. J.*, **159**, 317-322.
- 19) Old, R., K. Murray and G. Roizes (1975). *J. Mol. Biol.*, **92**, 331-339.
- 20) Pope, A., S. P. Lynn and J. F. Gardner, unpublished observations.
- 21) Roberts, R. J. (1976). *J. Mol. Biol.*, **102**, 157-165.
- 22) Roberts, R. J. (1984). *Nucleic Acids Res.*, **12**, r167-r204.
- 23) Shinomiya, T. and S. Sato (1980). *Nucleic Acids Res.*, **8**, 43-56.
- 24) Smith, D. I., F. R. Blattner and J. Davis (1976). *Nucleic Acids Res.*, **3**, 343-353.
- 25) Smith, H. O. and K. W. Wilcox (1970). *J. Mol. Biol.*, **51**, 379-391.
- 26) Smith, H. O. and D. Nathans (1973). *J. Mol. Biol.*, **81**, 419-423.

- 27) Sugisaki, H., Y. Maekawa, S. Kanazawa and M. Takanami (1980). *Nucleic Acids Res.*, **10**, 5747-5752.
- 28) 高木康敬 (1980). 遺伝子操作実験法, 講談社, 東京, p. 16-17.
- 29) Watson, R. J., I. Schildkraut, B. -Q. Qiang, S. M. Martin and L. P. Visentin (1982). *FEBS Letters*, **150**, 114-116.
- 30) Whitehead, P. R. and N. L. Brown (1983). *FEBS Letters*, **155**, 97-102.
- 31) Wilson, G. A. and F. E. Young (1975). *J. Mol. Biol.*, **97**, 123-125.