

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580110

研究課題名（和文）高機能逆転写酵素を用いた cDNA 合成法と RNA 増幅法の性能評価と用途拡大

研究課題名（英文）Evaluation of cDNA synthesis and RNA amplification with highly efficient reverse transcriptases and expansion of their use

研究代表者

保川 清（YASUKAWA KIYOSHI）

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30397559

研究成果の概要（和文）：部位特異的変異導入により、熱安定性が顕著に向上したモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素（E286R/E302K/L435R/D524A）とトリ骨髄芽球症状ウイルス逆転写酵素（V238R/L388R/D450A）を創出した。このことから、鋳型プライマー（T/P）との結合領域への正電荷の導入が逆転写酵素の熱安定性向上に有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We generated highly thermostable reverse transcriptases from Moloney murine leukemia virus and avian myeloblastosis virus (E286R/E302K/L435R/D524A and V238R/L388R/D450A, respectively) by site-directed mutagenesis. It is suggested that introduction of positive charges into reverse transcriptases at positions that have been implicated in the interaction with T/P is effective to stabilize reverse transcriptases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素利用学

1. 研究開始当初の背景

(1) 逆転写酵素：逆転写酵素はDNA合成活性とRNase H活性を有し、分子生物学的研究やRNAウイルスの臨床分析において必要不可欠な酵素である。今日、モロニーマウス白血病ウイルス（Moloney murine leukaemia virus, MMLV）RTとトリ骨髄芽球症ウイルス（avian myeloblastosis virus, AMV）RTが実用化されている。AMV RTは分子量 63,000 のサブユニットと分子量 95,000 のサブユニットからなるヘテロダイマーである。サブユニットはサブユニットが断片化して生じる。

MMLV RTは分子量 75,000 のモノマーである。AMV RT サブユニットとMMLV RTはともに、Fingers、Palm、Thumb、Connection、RNase H領域をもつ。AMV RT サブユニットはこの5つの領域とインテグラーゼ領域をもつ。DNA合成活性はF/P/Tからなる領域に、RNase H活性はRNase H領域に存在する。AMV RTはAMVに感染したトリ血清から精製されたものが市販されている。MMLV RTは大腸菌で生産された組換え酵素が市販されている。RNAは高温では二次構造をとらないため、高温で逆転写反応を行うことが望ま

れるが、RTの熱失活が問題となる。RNase H活性を消失させるとDNA合成活性の熱安定性が向上することが知られている。これを利用して、変異導入によりRNase H活性を消失させたMMLV RTが実用化されている。

(2) 逆転写酵素の熱安定性：我々は、AMV RT (Life Sciences Advanced Technology, St. Petersburg, FL) とMMLV RT (大腸菌で発現させた組換え体、自家調製品) の熱安定性を比較した。10 分間の熱処理により逆転写活性が 50%に低下する温度 (T_{50}) は、AMV RT では鋳型プライマー (TP) 非存在下で 47、TP存在下で 52 であった。また、MMLV RT ではTP非存在下で 44、TP存在下で 47 であった。このことから、AMV RTはMMLV RTより熱安定性が高いことと、AMV RTはMMLV RTよりもTPにより強く安定化させることが示された (Yasukawa, K. et al. J. Biochem. Vol 143, 261-268 (2008))。

(3) 逆転写酵素の各領域の役割：Fingers、Palm、Thumb、RNase HのうちひとつがAMV RT由来で他はMMLV RT由来のキメラ酵素 4 種を大腸菌で作製した。いずれのキメラ酵素も逆転写反応の比活性はMMLV RTの 0.1%以下であり大きく減少したが、RNase H反応の比活性はMMLV RTの約 20%であり相当量が保持された。また、RNase H活性の最適温度はAMV RTとMMLV RTでは 44 - 50 であったが、キメラ酵素では 48 - 52 であった。このことから、逆転写酵素の活性や熱安定性は特定の領域によるものではないことと、DNA合成活性を消失させるとRNase H活性の熱安定性が上昇することが示された (Yasukawa, K. et al. J. Biochem. Vol 145, 315-324 (2009))。

2. 研究の目的

本研究では、性能が向上した逆転写酵素を開発し、それを用いた cDNA 合成法や RNA 増幅法の感度・迅速性は、野性型の逆転写酵素を用いたときよりも向上することを実証し、cDNA 合成法や RNA 増幅法の用途拡大につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌でのMMLV RTの発現と精製：C末端に (His)₆ をもつMMLV RTの遺伝子が pET-22b(+) に挿入されたプラスミドである pET-HisMRT (図 1) を大腸菌BL21(DE3) に導入した。この細胞から硫酸分画、陰イオンクロマトグラフィー、Ni²⁺ セファロースアフィニティークロマトグラフィー、透析によりMMLV RTを精製した。

(2) 昆虫細胞でのAMV RT サブユニットの

発現と精製：C末端に (His)₆ をもつAMV RT サブユニットの遺伝子が挿入された Baculovirus transfer プラスミドである pFastBac1-ART α (図 3) と Baculovirus DNAを昆虫細胞Sf9 に導入した。この細胞を 28 で 5 日間培養し、細胞から硫酸分画、陰イオンクロマトグラフィー、Ni²⁺ セファロースアフィニティークロマトグラフィーによりAMV RT サブユニットを精製した。

(3) RTのpoly(rA)・p(dT)₁₅へのdTTP取込み活性の測定：反応を 25 μ M poly(rA)・p(dT)₁₅ (TP) 0.4 mM [³H]dTTP存在下で行い、経時的に反応液を採取し、酸不溶性画分への放射能の取込みから初速度を求めた。

(4) 逆転写活性の熱安定性の評価：逆転写酵素を 28 μ M TP存在下あるいは非存在下で、一定温度で一定時間熱処理した後に、37 で逆転写活性を測定した。

(5) RTのcDNA合成活性の測定：*Bacillus cereus*の *cesA* 遺伝子の一部に相当するRNA (1,014 塩基長) をインビトロ転写で合成した。cDNA合成反応を 0.08 pg/ μ l 本RNA, 50 ng/ μ l *E. coli* RNA, 0.5 μ Mプライマー存在下で、一定温度で 30 分間行った。この反応物をPCRに供し、アガロース電気泳動で増幅バンドを解析した。

(6) RTのRNA増幅活性の測定：RNA増幅反応を 0.5 mMフォワードプライマー、0.5mMプロモーターリバースプライマー、5 U/ μ l T7 RNA ポリメラーゼ存在下で、41°Cで 60 分間行った。その後、アガロース電気泳動で増幅バンドを解析した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌でのMMLV RT生産系の確立：(His)₆をC末端に結合させたMMLV RT発現プラスミド (図 1) で形質転換された大腸菌を 30 で培養した。この培養液 800 mlの菌体から 10 mgの精製酵素が得られた (図 2)。

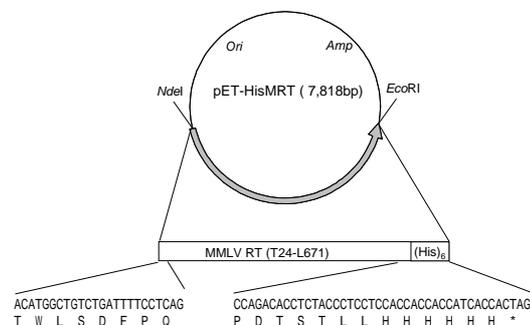


図1. MMLV RT発現プラスミドの構造

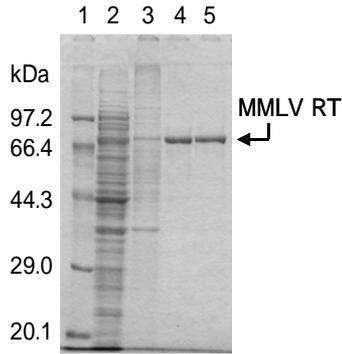


図2. MMLV RTの精製. レーン2:可溶性画分, 3:硫安分画の活性画分, 4: Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーの活性画分, 5: 精製標品を10%SDS-PAGEにかけた。

(2) 昆虫細胞でのAMV RT サブユニット生産系の確立: pFastBac1-ART α (図3)とBaculovirus DNAが導入された昆虫細胞 Sf9の培養液 100 mlの細胞から AMV RT サブユニット (Thr1-Tyr572)を精製した。この培養液 800 mlの菌体から 20 μg の精製酵素が得られた(図4)(文献2)。

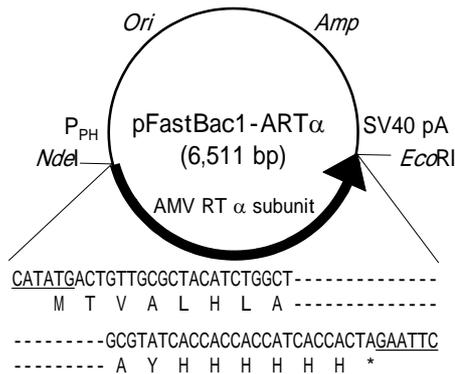


図3. MMLV RT発現プラスミドの構造. P_{PH} はpolyhedron promoter, SV40 pAはSV40 polyadenylation signalを示す。

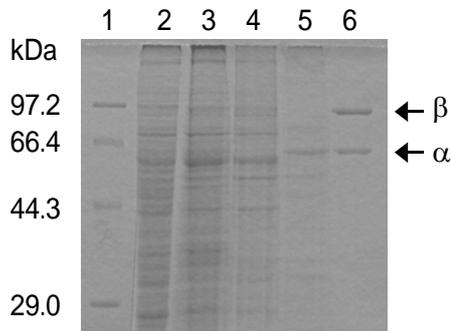


図4. AMV RT サブユニットの精製. レーン2:可溶性画分, 3:硫安分画の活性画分, 4:陰イオンクロマトグラフィーの活性画分, 5: 精製標品, 6: 天然型AMV RTを10%SDS-PAGEにかけた。

(3) cDNA合成活性測定系とRNA増幅活性測定系の構築: 嘔吐型セレウス菌は 12 アミノ酸から成る毒素環状ペプチドであるセレウリド[(D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val) $_3$; Oはオキシ酸]を産生する。セレウリド合成酵素遺伝子は5つのオープンリーディングフレームから成る (*cesH*, *cesP*, *cesT*, *cesA*, *cesB*)。今回、*cesA*のmRNAを標的としたcDNA合成活性測定系とRNA増幅活性測定系を構築した。どちらの測定系においても、目的の増幅産物(cDNA合成活性測定系では 601 bp, RNA増幅活性測定系では 201 base)が得られた(文献5)。

(4) MMLV RTの耐熱化: MMLV RTとAMV RTの熱安定性は鋳型プライマー(T/P)により向上する。このことから、MMLV RT分子内のT/Pとの結合領域に正電荷をもつ残基を導入すると、T/Pとの親和性が高くなり、熱安定性が上がると仮説をたてた。MMLV RTのE69, Q84, D108, D114, E117, E123, D124, E286, E302, W313, L435, N454(図5)をそれぞれK, R, Aに置換した変異型酵素計36種、ならびにRNase H活性に必須の残基D524をAに置換してRNase H活性を消失させることにより熱安定性を向上させた変異型酵素 D524A を作製した。これらをT/P存在下で、50 で15分間熱処理後、37 で逆転写活性を測定した。全36種中24種の熱処理後の残存活性は1.8-24%であり、野生型酵素(WT)(1.4%)よりも高かった。また、全36種中6種の熱処理後の相対活性は15-24%であり、D524A(14%)よりも高かった(図6)。さらに、熱安定性を上げる変異を組み合わせさせた多重変異型酵素E286R/E302K/L435R (MM3)とE286R/E302K/L435R/D524A (MM4)を作製した。52 で熱処理すると、WTとD524Aの活性は急速に低下したが、MM3とMM4はほとんど低下しなかった(図7)。MM3とMM4はモデルRNAを用いたRT-PCRにおいて、WTではcDNA合成の反応温度の上限は54であったが、MM3とMM4では60であった(図8)(文献3)。

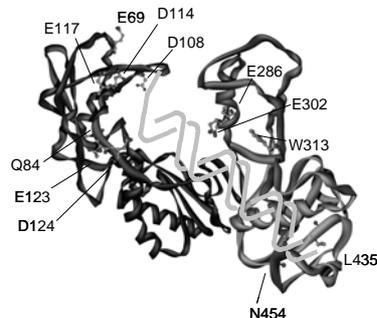


図5. MMLV RTの全体構造(1RW3). 変異を導入した残基は“ball and stick”で示した。

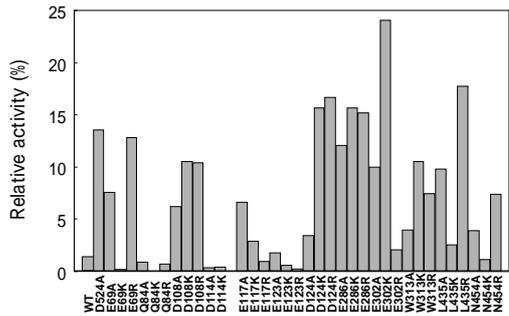


図6. 変異型MMLV RTの熱安定性. 相対活性は、 $\text{poly}(\text{rA}) \cdot \text{p}(\text{dT})_{15}$ へのdTTP取込みにおいて、熱処理前の反応速度を1としたときの熱処理後の反応速度の相対値をそれぞれ示す。

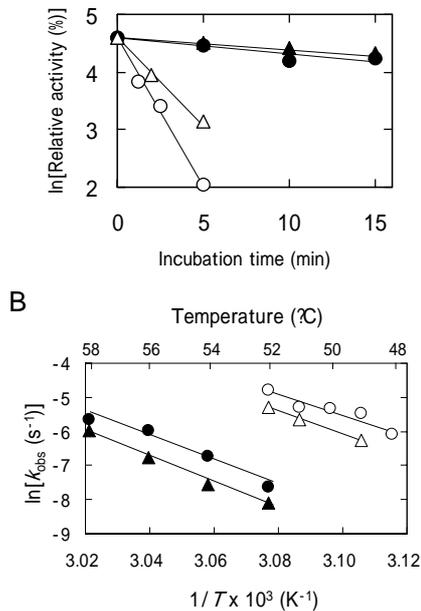


図7. MMLV RTの熱失活. WT (○), D524A (△), E286R/E302K/L435R (□), E286R/E302K/L435R/D524A (◇)を28 μM $\text{poly}(\text{rA}) \cdot \text{p}(\text{dT})_{15}$ 存在下で48~58 $^{\circ}\text{C}$ で一定時間一定してから37 $^{\circ}\text{C}$ で $\text{poly}(\text{rA}) \cdot \text{p}(\text{dT})_{15}$ へのdTTP取込みの反応速度を測定した。(A)52 $^{\circ}\text{C}$ で熱処理したときの熱失活. 相対活性は、熱処理前の後の反応速度を1としたときの熱処理後の反応速度の相対値。(B)アレニウスプロット.

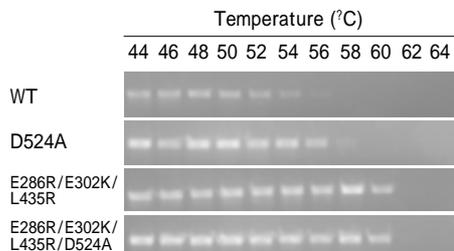


図8. MMLV RTのcDNA合成活性の反応温度依存性. 各温度で30分間cDNA合成反応を行った後、PCRを行い、反応物を1%アガロース電気泳動にかけた。

(5) **AMV RTの耐熱化**: MM4の作製のためにMMLV RTに導入した変異に相当する変異をAMV RTに導入することにより、熱安定性の向上したAMV RT α サブユニット (Thr1-Tyrを作製することを目的とした。AMV RTとMMLV RTのアミノ酸配列は23%の相同性をもつ。MMLV RTのアミノ酸残基E286、E302、L435、D524は、AMV RT のV238、K254、L388、D450に相当する。C末端に $(\text{His})_6$ をもつ野生型AMV RT α サブユニット (WT)と変異型AMV RT α サブユニット V238R/L388R/D450A (AM4)を昆虫細胞Sf9で発現させ、細胞の可溶性画分から精製した。52 $^{\circ}\text{C}$ で熱処理すると、WTとD524Aの活性は急速に低下したが、MM3とMM4はほとんど低下しなかった。T/P非存在下および存在下における T_{50} は、AM4では50 $^{\circ}\text{C}$ であり、WTでは44 $^{\circ}\text{C}$ であった。cDNA合成反応後、PCRで増幅産物が得られたcDNA合成反応の反応温度の上限は、AM4では64 $^{\circ}\text{C}$ であり、WTでは60 $^{\circ}\text{C}$ であった。このように、AM4はWTよりも高い熱安定性を有した。このことから、部位特異的変異によりT/Pとの結合領域に正電荷を導入して逆転写酵素の熱安定性を向上させる方法は、MMLV RTに対してだけではなくAMV RTに対しても有効であると考えられた(文献1)。

(6) **逆転写反応に対する有機溶媒の効果**: AMV RT、MMLV RTによる逆転写反応に対するジメチルスルホキシド (DMSO)、ホルムアミド、グリセロールの効果調べた。モデルRNAを鋳型としてcDNA合成反応を30分間行った後にPCRを行い、反応物をアガロース電気泳動により解析した。24%(v/v) DMSO、12-14%ホルムアミドは42 $^{\circ}\text{C}$ でのcDNA合成反応を阻害した。しかし、12% DMSO、6-8%ホルムアミドは低温(25-34 $^{\circ}\text{C}$)での反応効率を向上させた(図9)。DMSOとホルムアミドによる低温でのこの反応効率の向上はプライマーの融解温度の低下によるものと考えられた。

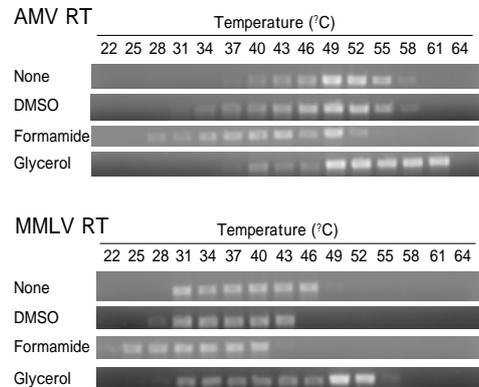


図9. 有機溶媒存在下でのcDNA合成活性の反応温度依存性. 有機溶媒非存在下、12% v/v DMSO、8% v/vホルムアミド、10%グリセロール存在下、各温度で30分間cDNA合成反応を行った後、PCRを行い、反応物を1%アガロース電気泳動にかけた。

また、10%グリセロールは高温(49-61)での反応効率を向上させた(図10)。グリセロールによる高温でのこの反応効率の向上は逆転写酵素の熱安定性の向上によるものと考えられた(文献4)。

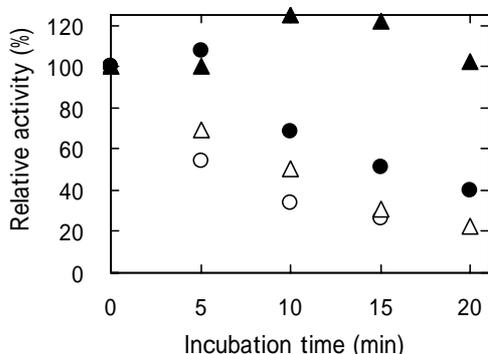


図10. 逆転写酵素の熱失活に対するグリセロールの効果. AMVRT (●, ▲)とMMLVRT (○, △)をグリセロール非存在下(○, △)あるいは10% v/v 存在下(●, ▲)で、46 (AMVRT)あるいは43 (MMLVRT)で一定時間熱処理してから37 でpoly(rA)•p(dT)₁₅へのdTTP取込みの反応速度を測定した。相対活性は、熱処理前の後の反応速度を1としたときの熱処理後の反応速度の相対値を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Konishi, A., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Improving the thermal stability of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase α subunit by site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Lett.* in press, doi: 10.1007/s10529-012-0904-9

Konishi, A., Nemoto, D., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Comparison of the thermal stabilities of the $\alpha\beta$ heterodimer and the α subunit of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 Vol 75, 1618-1620 (2011) doi.org/10.1271/bbb.110238

Yasukawa, K., Mizuno, M., Konishi, A., and Inouye, K.: Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis. *J. Biotechnol.* 査読有 Vol 150, 299-306 (2010) doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.961

Yasukawa, K., Konishi, A., and Inouye, K.: Effects of organic solvents on the reverse transcription reaction catalyzed

by reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 Vol 74, 1925-1930 (2010) doi.org/10.1271/bbb.100337

Yasukawa, K., Agata, N., and Inouye, K.: Detection of *cesA* mRNA from *Bacillus cereus* by RNA-specific amplification. *Enzyme Microb. Technol.* 査読有 Vol 46, 391-396 (2010) doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.12.009

Mizuno, M., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Insight into the mechanism of the stabilization of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by eliminating RNase H activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 Vol 74, 440-442 (2010) doi.org/10.1271/bbb.90777

[学会発表](計18件)

保川清、篠村まゆ、井上國世. 組換えHIV-1 逆転写酵素の調製と性状解析. 2012年度日本農芸化学会大会. 2012年3月23日. 京都女子大学

小西篤、保川清、井上國世. 部位特異的変異導入によるAMV逆転写酵素 α サブユニットの熱安定性の向上. 2012年度日本農芸化学会大会. 2012年3月23日. 京都女子大学

小西篤、根本大資、保川清、井上國世. AMV逆転写酵素ヘテロダイマーとサブユニットの安定性の比較. 2011年度日本農芸化学会近畿・中部合同支部大会. 2011年10月2日. 京都大学

保川清、水野匡貴、小西篤、井上國世. 部位特異的変異によるMMLV逆転写酵素の熱安定性の向上. 2011年度日本生物工学会大会. 2011年9月27日. 東京農工大学小金井キャンパス

小西篤、根本大資、保川清、井上國世. Comparison of the thermal stabilities of the $\alpha\beta$ heterodimer and α subunit of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase. 2011年度日本生化学会大会. 2011年9月23日. 国立京都国際会館

小西篤、水野匡貴、保川清、井上國世. 部位特異的変異による耐熱性MMLV逆転写酵素の作製. 2011年度日本生化学会近畿支部例会. 2011年5月21日. 関西医科大学

保川清. タンパク質工学による逆転写酵素の耐熱化(シンポジウム: タンパク質工学による耐熱化酵素創製の新しい戦略). 2011年度日本農芸化学会大会. 2011年3月28日. 京都女子大学

保川清、根本大資、井上國世．昆虫細胞で発現させた組換えAMV逆転写酵素サブユニットの精製と性状解析．2011年度日本農芸化学会大会．2011年3月26日．京都女子大学

小西篤、水野匡貴、保川清、井上國世．部位特異的変異導入によるMMLV逆転写酵素の熱安定性の向上．2011年度日本農芸化学会大会．2011年3月26日．京都女子大学

保川清、小西篤、井上國世．Effects of organic solvents on the reverse transcription reaction catalyzed by reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus．BMB2010．2010年12月7日．神戸ポートアイランド

保川清、小西篤、井上國世．AMV逆転写酵素とMMLV逆転写酵素による逆転写反応に対する有機溶媒の効果．2010年度日本生物工学会大会．2010年10月29日．フェニックス・シーガイア・リゾート（宮崎市）

保川清、小西篤、井上國世．AMVおよびMMLV逆転写酵素による逆転写反応に対する有機溶媒の効果．2010年度日本農芸化学会関西支部大会．2010年10月3日．近畿大学農学部

保川清、小西篤、井上國世．逆転写反応に対する溶媒の効果．2010年度日本農芸化学会大会．2010年3月29日．東京大学 駒場キャンパス

水野匡貴、保川清、井上國世．RNase H活性を消失させることによるモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素（MMLV RT）の安定化の解析．2010年度日本農芸化学会大会．2010年3月29日．東京大学 駒場キャンパス

水野匡貴、保川清、井上國世．部位特異的変異によるMMLV逆転写酵素の活性と熱安定性の向上．2009年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部 日本食品科学工学会西日本支部合同沖縄大会．2009年10月31日．琉球大学 千原キャンパス

水野匡貴、保川清、井上國世．A MMLV/AMVキメラ逆転写酵素の性質決定．2009年度日本生化学会大会．2009年10月23日．神戸国際会議場

保川清、根本大資、井上國世．AMV逆転写酵素とMMLV逆転写酵素の熱安定性に対する鋳型プライマーの効果．2009年度日本生物工学会大会．2009年9月24日．名古屋大学 東山キャンパス

水野匡貴、保川清、井上國世．

MMLV/AMVキメラ逆転写酵素の酵素化学的性質の決定．2009年度日本生化学会近畿支部例会．2009年7月18日．大阪医科大学 本部キャンパス

〔図書〕(計1件)

保川清：核酸増幅法．産業酵素の応用技術と最新動向(井上國世、監修)p.194-202、シーエムシー出版、東京、2009

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：変異型逆転写酵素

発明者：保川清、小西篤、井上國世

権利者：京都大学

種類：特許

番号：特願2012-30848

出願年月日：2012年2月15日

国内外の別：国内

名称：変異型逆転写酵素

発明者：保川清、井上國世

権利者：京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2011/68157

出願年月日：2011年8月9日

国内外の別：外国

名称：変異型逆転写酵素、それをコードする核酸、変異型逆転写酵素の製造方法、核酸関連酵素の熱安定性の向上方法、逆転写方法、逆転写反応キットおよび検査キット

発明者：保川清、井上國世

権利者：京都大学

種類：特許

番号：特願2010-181471

出願年月日：2010年8月13日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.enzchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

保川 清 (YASUKAWA KIYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30397559

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし