

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580104
 研究課題名(和文)組換えAMV逆転写酵素発現系の構築と蛋白質工学による生産性、活性、熱安定性の向上
 研究課題名(英文)Expression of recombinant AMV reverse transcriptase and improvement of its productivity, activity, and stability by protein engineering
 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：AMV 逆転写酵素は MMLV 逆転写酵素よりも熱安定性が高く、鋳型プライマーにより強く安定化された。昆虫細胞を宿主として組換え AMV 逆転写酵素を発現させた。変異 Asp505 Ala を導入すると AMV 逆転写酵素の熱安定性が向上した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

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：逆転写酵素は分子生物学研究や臨床診断において必要不可欠な酵素である。逆転写酵素は逆転写活性(RNA依存性DNAポリメラーゼ活性)のみならず、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性とRNase H活性(DNAとRNAのヘテロ2本鎖中のRNAを分解する活性)を有する。反応効率、耐熱性、転写の正確性という観点から、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素(avian myeloblastosis virus reverse transcriptase、以下 AMV RT と略称)とモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素(Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase、以下 MMLV RT と略称)が実用化されているが、

反応効率や耐熱性の改良が求められている。(2) AMV RT：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。AMV RTはAMVに感染したトリ血清から精製されたものが使用されている。その生産には特殊な設備と技術を必要とし大量生産ができないため高価である。また、AMV RTは立体構造が決定されておらず、蛋白質工学を用いた研究も進んでいない。一方、MMLV RTは大腸菌で生産された組換え体で使用されており、立体構造も決定されている。われわれは本研究の準備としてこれまでに、AMVを含有するトリ血清から、データベー

スの塩基配列情報をもとに、RT-PCR により AMV RT 遺伝子をクローニングした。

2. 研究の目的

本研究では、組換え AMV RT の発現系を構築する。(当初計画では宿主は大腸菌としたが、その後昆虫細胞に変更した。)さらに、蛋白質工学により生産性、活性、熱安定性を向上させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 逆転写活性の測定: 反応を 25 μ M poly(rA)·p(dT)₁₂₋₁₈ (鑄型プライマー、Template-primer、以下 TP と略称) 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。

(2) RNase H 活性の測定: 反応を 25 mM [³H]-poly(rA)·p(dT)₄₅ 存在下で行い、経時的に反応液を採取し、酸可溶性画分への放射能の取込みから初速度を求めた。

(3) 逆転写活性の熱安定性の評価: 逆転写酵素を TP 存在下あるいは非存在下で 40 - 55 で一定時間熱処理した後に、37 で逆転写活性を測定した。

(4) 大腸菌を宿主とした AMV RT の発現: コールドショックプロテインプロモーターを有する各ベクターに AMV RT α サブユニット、サブユニットの遺伝子を挿入し、大腸菌 JM109 あるいは BL21 に導入し発現させた。

(5) 昆虫細胞を宿主とした AMV RT の発現: 大腸菌と昆虫細胞の両方で自律増殖可能なベクターに AMV RT α サブユニットの遺伝子を挿入し、昆虫細胞 High Five に導入し発現させた。

(6) 大腸菌を宿主とした MMLV/AMV キメラ酵素の発現: AMV RT と MMLV RT はともに、Fingers (F)、Palm (P)、Thumb (T)、Connection (C)、RNase H (R) 領域をもつ。F、P、T、R 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 (それぞれ MRT-AP、MRT-AT、MRT-AR と命名) をコードする遺伝子を作成し、T7 プロモーターを有するベクターに遺伝子を挿入し、大腸菌 BL21(DE3) に導入し発現させた。

4. 研究成果

(1) AMV RT と MMLV RT の逆転写活性の熱安定性の比較: AMV RT はウイルスから精製された市販品 (Life Sciences 社製品) を、MMLV RT は大腸菌で発現させた組換え体 (自家調製品) を用いた。AMV RT (図 1) と MMLV RT (図は示さず) はともに一次の熱失活曲線を示した。AMV RT の T_{50} (10 分間の熱処理により逆転写活性が 50% に低下する温度) は、TP 非存在下では 47 であ

ったが、TP 存在下では 52 に上昇した。MMLV RT の T_{50} は、TP 非存在下では 44 であったが、TP 存在下では 47 に上昇した。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。熱失活の一次の速度定数のアレニウスプロットを作成し熱力学的解析を行った結果、TP の添加により AMV RT では熱失活による活性化エンタルピー (ΔH^\ddagger) と活性化エントロピー (ΔS^\ddagger) はともに増大するが、MMLV RT では ΔH^\ddagger と ΔS^\ddagger はともに減少することが明らかとなった (表 1)。すなわち、TP による安定化のメカニズムが AMV RT と MMLV RT で異なることが示唆された。

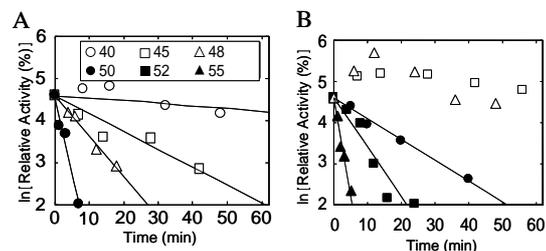


図 1. AMV RT の熱失活曲線. A. TP 存在下. B. TP 非存在下

表 1. AMV RT と MMLV RT の熱失活の熱力学的パラメータ

	Template-primer	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
AMV RT	minus	358 ± 36	91 ± 0	355 ± 36	819 ± 112
AMV RT	plus	393 ± 8	94 ± 0	390 ± 8	917 ± 24
MMLV RT	minus	280 ± 33	87 ± 0	278 ± 33	589 ± 101
MMLV RT	plus	272 ± 22	90 ± 0	269 ± 22	553 ± 42

AMV RT と MMLV RT の逆転写活性の反応温度依存性 (30-60) を調べた (図 2)。反応最適温度はともに 44-50 であった。しかし、52-60 での相対活性は AMV RT の方が MMLV RT よりも高かった。一方、40 以下での相対活性は MMLV RT の方が AMV RT よりも高かった。

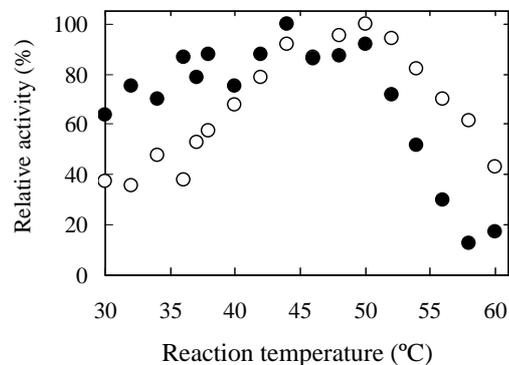


図 2. 逆転写酵素の逆転写活性の反応温度依存性. 相対活性は、最適温度での反応初速度を 100% としたときの各温度での反応初速度の相対値を示す. ●: AMV RT, ○: MMLV RT.

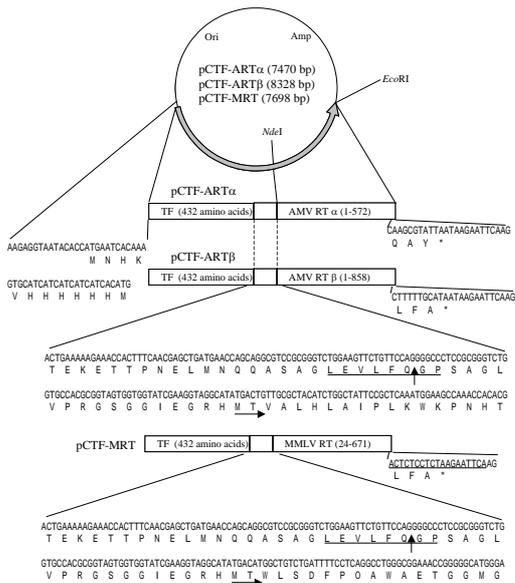


図3. プラスミド (pCTF-RTα, pCTF-RTβ, pCTF-MRT) の構造 . 垂直の矢印はHRV 3Cプロテアーゼ切断部位を、水平の矢印は逆転写酵素のN末端を、下線はHRV 3Cプロテアーゼ認識部位を示す .

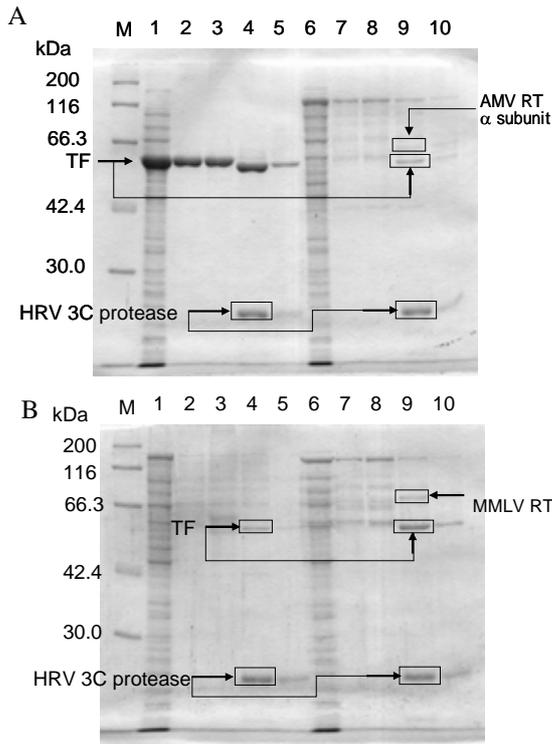


図4 . 10% SDS-PAGE . pCTF (逆転写酵素遺伝子をもたない図3に示されるプラスミド) (Aのレーン1-5), pCTF-RTα (Aのレーン6-10), pCTF-RTβ (Bのレーン1-5), pCTF-MRT (Bのレーン6-10) で形質転換したJM109由来の可溶性画分(レーン1と6)、His-tag樹脂の溶出画分(レーン2と7)、ゲルろ過の活性画分(レーン3と8)、HRV 3Cプロテアーゼによる消化物(レーン4と9)、His-tag樹脂の素通り画分(レーン5と10)をアブライした .

(2)大腸菌を宿主とした AMV RT の発現 :
シャペロンタンパク質との融合タンパク

質としての発現 : 図3に示すプラスミドで形質転換したJM109を培養したところ、AMV RT サブユニット、AMV RT サブユニット、MMLV RT とシャペロンタンパク質 Trigger factor (以下TFと略称)との融合タンパク質はいずれも可溶性画分に発現した(それぞれ図4Aレーン6、図4Bレーン1、図4Bレーン6)。His-tag樹脂によりAMV RT α サブユニットとTFとの融合タンパク質(図4Aレーン7)とMMLV RTとTFとの融合タンパク(図4Bレーン7)は精製されたが、AMV RT サブユニットとTFとの融合タンパク(図4Bレーン2)は精製されなかった。この精製物にHRV 3Cプロテアーゼを作用させると、AMV RT サブユニット(図4Aレーン9)とMMLV RT(図4Bレーン9)がそれぞれ得られた。このことは、TFが分子内シャペロンとして機能し、従来大腸菌で発現させると不溶性であったAMV RT サブユニットがフォールディングしたことを示す。しかし、このAMV RT サブユニットは逆転写活性をもたなかった。一方、MMLV RTは活性を有した(データは示さず)。理由として、大腸菌ではリン酸化などの翻訳後修飾が起こりやすいことから、AMV RTではMMLV RTと異なり、特定の残基の翻訳後修飾が活性発現に必須であると考えられる。今後、AMV RTにランダムに部位特異的の変異を導入し、この翻訳後修飾が起ころなくとも活性を有する変異型酵素の作製を行う。

シャペロンタンパク質との共発現 : 図5、6に示すプラスミドを作製し、シャペロンタンパク質(DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES, TF)発現プラスミドを有する各種BL21を形質転換し培養した。

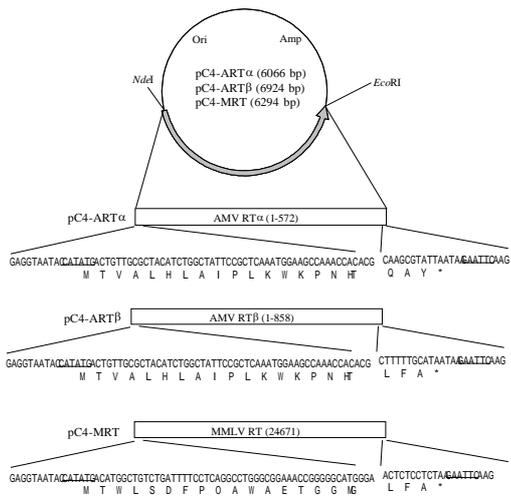


図5 . プラスミド pC4-ARTα, pC4-ARTβ, pC4-MRT の構造 .

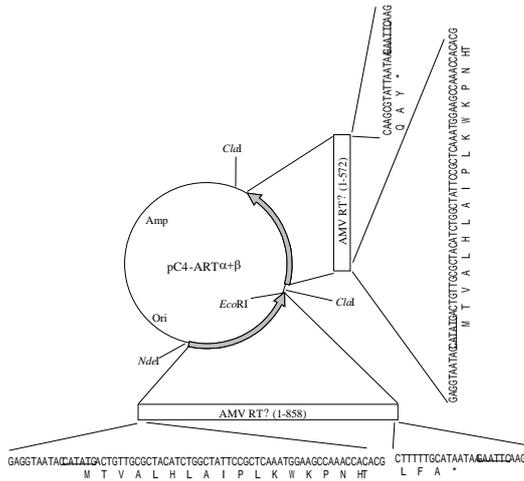


図6. プラスミドpC4-ART α + β の構造.

SDS-PAGE による解析の結果、AMV RT サブユニットと AMV RT サブユニットは いずれも可溶性画分に発現しなかった。さらに、可溶性画分に逆転写活性は検出されなかった。一方、MMLV RT は可溶性画分には発現し、逆転写活性が検出された(データは示さず)。このように、シャペロンタンパク質と共発現させても AMV RT が可溶性タンパク質として発現しなかったことから、これらのシャペロンタンパク質存在下でも AMV RT はフォールディングしないことが示された。

(3) 昆虫細胞を宿主とした AMV RT の発現 : 図7に示すプラスミドを作製し、AMV RT サブユニットを昆虫細胞で発現させた。細胞の破砕物の可溶性画分に逆転写活性が見られ、活性を有する AMV RT サブユニットが可溶性タンパク質として発現したことが示された。この可溶性画分から AMV RT サブユニットを硫酸分画、陰イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより部分精製した。

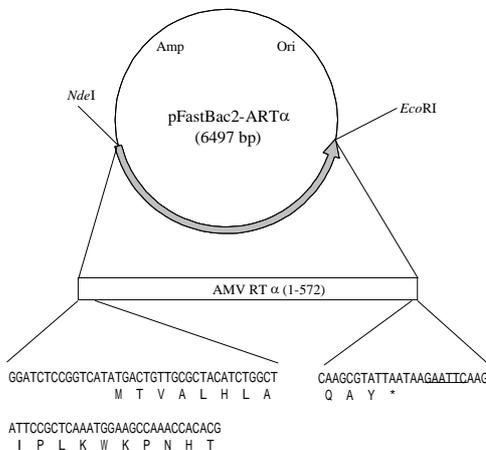


図7. プラスミドpFastBac2-ART α の構造.

(4) 変異による熱安定性の向上 : RNase H 領域に存在し RNase H 活性に重要な Asp505 を Ala に置換した変異型 AMV RT α サブユニット (D505A) を作製した。野生型 AMV RT サブユニット (WT) と D505A を熱処理すると、TP 非存在下存在下のいずれにおいても D505A は WT よりも緩やかに失活した(図8)。WTの T_{50} は、TP 非存在下では 46 であったが、TP 存在下では 47-48 に上昇した。D505Aの T_{50} は、TP 非存在下では 47 であったが、TP 存在下では 48-49 に上昇した。これは、変異 Asp505 Ala が AMV RT の逆転写活性を安定化させることを示す。しかし、TP による安定化の程度は AMV RT ヘテロダイマーである市販品(図1)よりも小さかった。今後、昆虫細胞で、Asp505 を Ala に置換した変異型 ヘテロダイマーを発現させる。

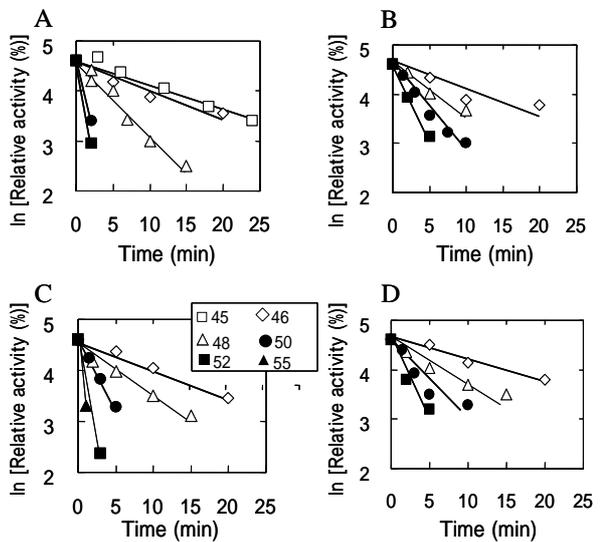


図8. AMV RT α サブユニットの熱失活曲線. WT (A, C) とD505A (B, D)をTP非存在下 (A, B)あるいは存在下(C, D)で熱処理した.

MMLV RT でも同様に、RNase H 領域に存在し RNase H 活性に重要な Asp524 を Ala に置換した変異型 MMLV RT (D524A) を作製した。熱処理したところ、TP 非存在下存在下のいずれにおいても D524A は WT よりも緩やかに失活した(図9)。

以上の結果から、RNase H 活性に重要な Asp 残基を部位特異変異で Ala に置換することにより、逆転写活性の熱安定性が、TP 非存在下存在下のいずれにおいても向上することが示された。これは、この熱安定化が逆転写酵素の TP との親和力の増大によるものではなく、逆転写酵素の内在的な熱安定性の向上によるものであることを示唆する。

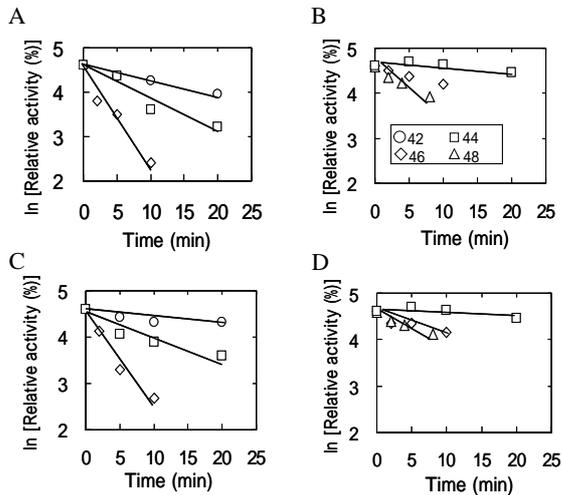


図9. MMLV RT の熱失活曲線. WT (A, C)とD524A (B, D)をTP非存在下 (A, B)あるいは存在下 (C, D)で熱処理した.

(5) 組換えAMV RTによるcDNA合成: 組換えAMV RTサブユニットのWTとD505Aを用いてRT-PCRを行った。モデルRNAを鋳型として50℃で逆転写反応を行った後にPCRを行い、反応物をアガロース電気泳動で解析した(図10)。WTとD505Aのいずれの反応物中にも、ネイティブAMV RT(ウイルスから精製された市販品)と同様の増幅産物(300 bp)が見られ、昆虫細胞で発現させた組換えAMV RTサブユニットはcDNA合成に使用できることが示された。

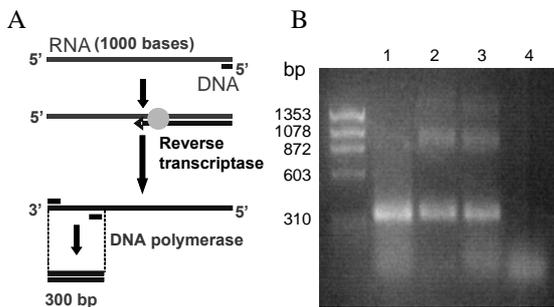


図10. A. RT-PCRの概要. B. RT-PCRの反応物の0.8%アガロース電気泳動. ネイティブAMV RT (レーン1)、昆虫細胞で発現させた組換えAMV RTサブユニット野性型酵素 (レーン2)、D505A (レーン3)、逆転写酵素非存在下 (レーン4)で逆転写反応を行った後にPCRを行い、反応物をアプライした.

(6) MMLV/AMV キメラ酵素の解析: 逆転写酵素の各領域の役割を解析するために、MRT-AF、MRT-AP、MRT-AT、MRT-AR(図11)を大腸菌で発現させ精製した。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(表2)。

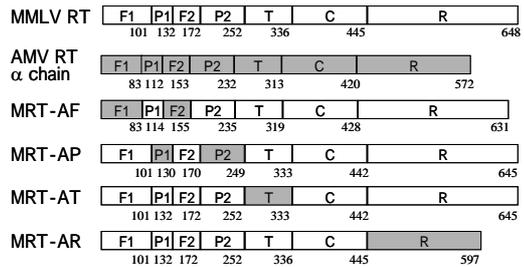


図11. AMV/MMLVキメラ酵素の構造. F1はFingersのN末端領域、P1はPalmのN末端領域、F2はFingersのC末端領域、P2はPalmのC末端領域、TはThumb、CはConnection、RはRNase Hをそれぞれ示す。数字は各領域の最後のアミノ酸残基の番号を示す。

表2. 逆転写酵素の逆転写反応とRNase H反応の比活性

	Reverse transcription (units/mg) ^a	RNase H (units/mg) ^b
MMLV RT	130,000 ± 70,000 (1.0)	53,000 ± 2,000 (1.0)
AMV RT	32,000 ± 6,000 (0.25)	192,000 ± 6,000 (3.6)
MRT-AF	120 ± 50 (9 × 10 ⁻⁴)	10,000 ± 4,000 (0.19)
MRT-AP	90 ± 49 (7 × 10 ⁻⁴)	10,000 ± 5,000 (0.19)
MRT-AT	6 ± 3 (5 × 10 ⁻⁵)	13,000 ± 6,000 (0.25)
MRT-AR	15 ± 8 (1 × 10 ⁻⁴)	11,000 ± 6,000 (0.21)
MRT-D224A	ND ^c	42,000 ± 10,000 (0.79)
MRT-D524A	134,000 ± 32,000 (1.0)	ND ^c

^a 1 unit は37℃で10分間反応させたとき、1 nmol の dTTP を poly(rA)-p(dT)₁₂₋₁₈に取り込ませる酵素量である。 ^b 1 unit は37℃で20分間反応させたとき、1 pmol のオリゴAを酸可溶性にする酵素量である。 ^c ND: 検出されず。カッコ内の数値はMMLV RTの値を1.0としたときの相対値である。

また、RNase H活性の至適温度は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(図12)。キメラ酵素の至適温度の上昇は逆転写活性の消失によるものと考えられた。

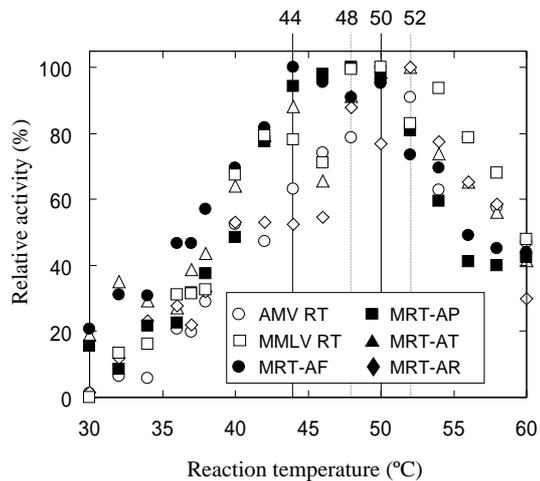


図12. RNase H活性の反応温度依存性. 相対活性は、最適温度での反応初速度を100%としたときの各温度での反応初速度の相対値を示す。

MRT-AF、MRT-AP、MRT-AT で見られた逆転写活性の減少は、キメラ化による逆転写反応の活性部位の構造変化と考えられる。しかし、MRT-AR で見られた逆転写活性の減少は、逆転写酵素では、Fingers、Palm、Thumb を含む領域と RNase H の間で相互作用があり、この相互作用が逆転写活性に大きく影響を与えることを示唆する。

MMLV RT の結晶構造は、Fingers、Palm、Thumb、Connection を含む領域と RNase H 領域がそれぞれ独立に決定されているが、分子全体の構造は決定されていない。MMLV RT の分子全体の構造については、RNase H 領域が Fingers、Palm、Thumb 領域から離れて存在するモデル(図 13A)と Palm 領域と相互作用するモデル(図 13B)が提唱されている。本研究のキメラ酵素の解析で得られた知見は後者のモデルを支持する。

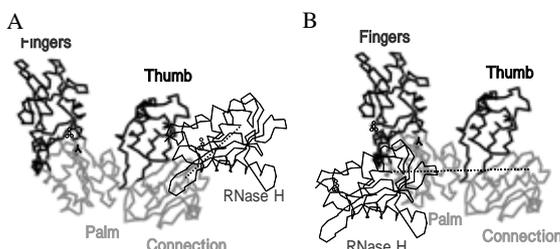


図13. MMLV RTの立体構造のモデル。AはM. L. Cote *et al.*, *Virus Res.* **134**, 186, 2008より引用。BはP. K. Pandey *et al.*, *Mol. Cell. Biochem.* **225**, 135, 2001より引用。

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2件)

Yasukawa, K., Nemoto, D., Inouye, K.: Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *J. Biochem.* **143**, 261-268 (2008) 査読有

Yasukawa, K., Mizuno, M., Inouye, K.: Characterization of Moloney murine leukaemia virus/avian myeloblastosis virus chimeric reverse transcriptases. *J. Biochem.* **145**, 315-324 (2009) 査読有

[学会発表](計8件)

根本大資、保川清、井上國世. AMV 逆転写酵素と MMLV 逆転写酵素の熱安定性に関する比較研究. 2007年度日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会. 2007年9月22日. 中部大学

根本大資、保川清、井上國世. AMV 逆転写酵素と MMLV 逆転写酵素の熱安定性

の比較. 2008年度日本農芸化学会大会. 2008年3月28日. 名城大学天白キャンパス

根本大資、保川清、井上國世. AMV 逆転写酵素と MMLV 逆転写酵素の熱安定性に関する熱力学的研究. 2008年度日本生化学会近畿支部大会. 2008年5月24日. 大阪市立大学杉本キャンパス

根本大資、保川清、井上國世. 昆虫細胞を宿主とした組換え AMV 逆転写酵素の発現. 2008年度日本農芸化学会関西支部大会. 2008年9月13日. 京都学園大学

水野匡貴、保川清、井上國世. MMLV および AMV 逆転写酵素をもとに作製したキメラ酵素の酵素化学的性質. 2008年度日本農芸化学会関西支部大会. 2008年9月13日. 京都学園大学

保川清、根本大資、井上國世. Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. 2008年度日本分子生物学会・日本生化学会合同大会. 2008年12月9日. 神戸ポートアイランド

根本大資、保川清、井上國世. 昆虫細胞で発現させた組換え AMV 逆転写酵素 α サブユニットの熱安定性. 2009年度日本農芸化学会大会. 2009年3月29日. マリンメッセ福岡

水野匡貴、保川清、井上國世. MMLV および AMV 逆転写酵素をもとに作製したキメラ酵素の酵素化学的性質の決定. 2009年度日本農芸化学会大会. 2009年3月29日. マリンメッセ福岡

保川清. 逆転写酵素の活性と熱安定性. 2009年度日本農芸化学会大会(シンポジウム: 核酸に関わる酵素の化学 - 基礎から応用まで). 2009年3月29日. 福岡国際会議場

[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

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