

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655164

研究課題名(和文) 外部因子に対応した選択的複製系の再構成

研究課題名(英文) reconstruction of an external stimulus-dependent replication system

研究代表者

渡部 暁 (Watanabe, Satoru)

独立行政法人理化学研究所・独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：80300945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：膨大な抗体分子の中から目的の抗原にのみ結合する分子を選択する仕組みは本来的にヒトの中に備わっているが、これを試験管内で人工的に再現する技術は十分に成熟していない。個々のDNA分子そのものを反応容器として考えるという全く新しい発想により既存の技術の主な制約(取り扱える元の分子集団数の限界)を桁外れに拡大させる挑戦的な新技術を提案し、実現の可能性について実験的に検討した結果、いくつかの要素となる技術は可能であることを示すなど、再構成に向けて有意義な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Human has a natural gift to select appropriate antibody molecules from huge variety of molecular library, while an engineering technique that reconstructs the selection process against an antigen of interest in a test tube is immature because the variety of the library molecules is a critical and limiting factor of the current technique. I propose a new and challenging idea that breaks the limitation by looking each DNA molecule as a test tube. The feasibility of the idea was experimentally studied and some elementary steps of the idea were shown to be realized.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学、生体関連化学

キーワード：複製 合成生物学 DNA 抗体

1. 研究開始当初の背景

あるタンパク質をコードする DNA の一部をある割合でランダムな配列に置換したライブラリーから発現されるタンパク質群を対象に、ある特性を指標にしてタンパク質分子を選択してそのコードする DNA 配列に変換し、その DNA を増幅・変異導入のサイクルを繰り返すことで当該タンパク質(の変異体)を試験管内で分子進化させて高機能なタンパク質を取得する方法は確立されていたが、技術的な制限から、取り扱える母集団の多様性に限界があり、アミノ酸がとりうる広大な配列空間(n 個のアミノ酸残基で 20 の n 乗)のごく一部(高々ランダムなアミノ酸残基数で数アミノ酸程度)の探索しかできないため、潜在的な高機能タンパク質の創出の足かせとなっていた。他方、天然には自身をコードする DNA のみを選択的に複製する cis-特異的な DNA 複製開始因子が知られている。この cis-特異的な DNA 複製開始因子の系ではタンパク質をコードする DNA (遺伝情報)と発現タンパク質(表現型)が1対1でリンクしていることとなる。この複製開始反応については試験管内で再構成した文献が知られていた。複製開始因子 RepA の3次元構造もスプリット酵素化についての先行研究は知られていなかった。

2. 研究の目的

cis-特異的な DNA 複製開始因子をコードする DNA 分子そのものを独立した反応容器と考えれば、取り扱う母集団ライブラリーの多様性を格段の桁違い(従来法に比べて 10 の 7 乗倍~)に拡大できる。さらにその中から目的の(機能を持ったタンパク質をコードする)DNAのみを選択する方法が得られれば、格段に広範囲な配列空間の中から結果として超高機能なタンパク質の創成することが可能となる。したがって本研究はその要素技術、すなわち、cis-特異的な DNA 複製開始因子による DNA 複製系を試験管内で再構築すること、および対象となる特定の DNA 分子のみが選択的に増幅される仕組みを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

cis-特異的な DNA 複製開始因子(RepA)タンパク質を2分割(スプリットタンパク化)し、薬剤 Rapamycin 存在下でのみ結合する2種のタンパク質(FRB,FKBP)をそれぞれの RepA 断片に連結したキメラタンパク質を作成し、Rapamycin 存在下で FRB と FKBP が結合に伴い RepA 機能が相補されて当該 DNA のみが増幅・複製されるモデル系を設計した。

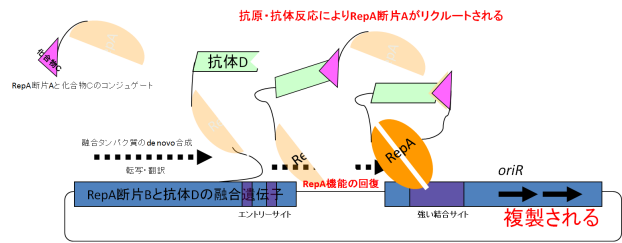


図1. RepA 機能の相補による選択的複製の概念図

その実現のために以下の4項目を検討した。(1)RepA 発現系構築、(2)酵素相補アッセイ系の構築、(3)複製開始関連タンパク質群の調製、(4)複製反応の効率化

4. 研究成果

(1) RepA 発現系構築

DNA 結合が予想される C 末端は天然配列のまま、N 末端に融合タンパク質を付加した発現コンストラクト数種を構築し、無細胞合成系でタンパク質発現を行ったところ、いずれの発現コンストラクトでも不溶性画分に発現産物が見られたため、変性剤存在下で沈殿を可溶化と精製を行い、高純度の RepA 試料を得た。

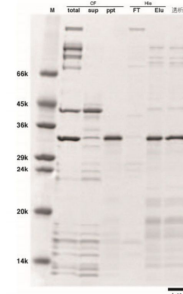


図2. RepA タンパク質の可溶化と精製

(2) 酵素相補アッセイ系の構築

RepA のスプリット化の先行研究はなく、立体構造情報も無いため、スプリット化に最適な RepA の断片化サイトの探索は試行錯誤と時間を要することが予想された。そこで、迅速な探索系の立ち上げを検討した。概念を図3に記す。

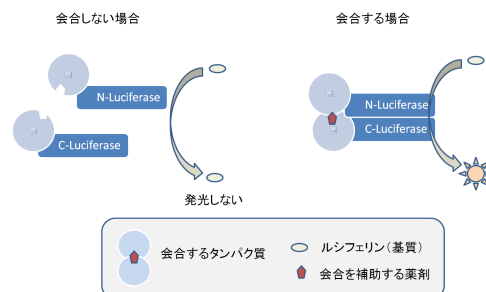


図3. 相補アッセイ概念図(ルシフェラーゼ)

まずは既知のスプリット化 Luciferase を用いて FRB,FKBP とのキメラタンパク質を作成した。2 種のキメラ分子の発現鑄型のモル比を振って無細胞合成系で発現させたところ、2 種のキメラ分子が存在し、かつ、Rapamycin 存在下でのみ Luciferase 活性が発現されることが確認された (図 4)。

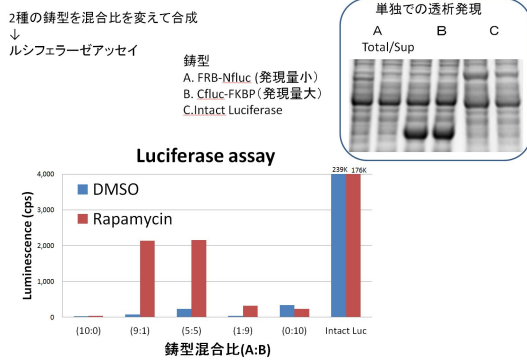


図 4 . 相補アッセイ結果 (ルシフェラーゼ) 2 断片化されたルシフェラーゼは FRB/FKBP の Rapamycin 依存的に結合により酵素活性の回復が見られた。

次に RepA のアミノ酸配列を基に RepA の二次構造を予測し、二次構造を壊すことのないように適切な断片化サイト 10 サイトにより切断された 20 断片の RepA 断片と FRB,FKBP のキメラコンストラクトを設計し、評価系の構築を進めた。

(3) 複製開始関連タンパク質群の調製 replisome 関連タンパク質や娘プラスミドの分離に関連タンパク質の発現系を構築し無細胞タンパク質合成系で発現を検討し全てのタンパク質の発現を確認した。

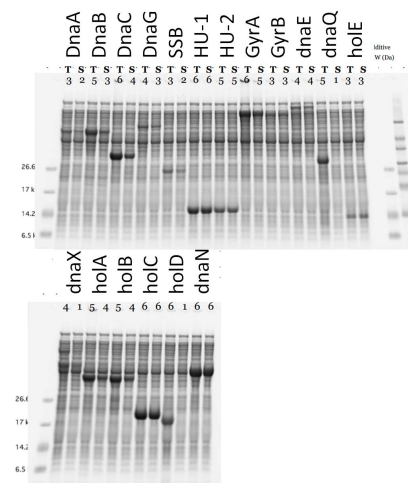


図 5 . 各種複製関連因子の発現結果 (抜粋) 各タンパク質の全画分と上清画分とを SDS-PAGE で泳動し、発現量と可溶性を確認した。

多くのタンパク質因子 (holB,holA,holC,dnaN,HU-2,HU-1,holE,DnaB,DnaG,GyrA,GyrB,および XerC)について各種クロマトグラフィーにより高純度品の調製に成功した。他方、一部の試料 (holD,DnaA,DnaC,dnaE,dnaN,dnaX,XerD,FtsK)については沈殿傾向または分解物が多いなどの物性不良のため、条件検討にもかかわらず高純度品は得られなかった。天然の複製系の完全な再構築はこれらすべてが揃うことが前提のため、実用化の観点からは当初の想定ほど簡単ではないことが判明した。

(4) 複製反応の効率化

複製反応の効率化は実用化に向けた肝となるステップである。まず夾雑する DNA 分解活性の測定系、複製産物の Real Time PCR による評価系などの準備を進めた。その結果、試験した系では DNA 分解活性がみられ、DNA 合成活性から分解活性を差し引いた正味の増幅量が少なくみられることが分かった。本系は完全な再構成系ではなく一部にクルードな抽出液を用いることから、持ち込みの DNA 分解活性の影響と考えられる。上述のように天然の複製系の完全再構築は簡単ではなく、夾雑 DNA 分解活性が問題となることが判明したため、発想を転換して天然の機能の一部をより単純な酵素で代替することを検討した。対象となる機能性タンパク質を変性させない温度 (37 以下) で複製反応を継続する方法についてファージ由来の複製酵素と Nickase の併用を検討したところ、特異性と再現性について更なる検討の余地はあるものの、長時間継続する予備的な結果を得た。

以上のように、DNA 複製開始因子の再構成に向けた要素技術について、予想ほど簡単でなかったものもあったが、いくつかのステップで準備が整った。選択精度、再現性、および効率化などの点でまだ課題があり更なる検討が必要であるが、本研究で得られた知見により、選択的な自己複製系による有用抗体分子などのスクリーニングの実用化に向けた検討がさらに加速することであろう。

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)

Matsuda, T., S. Watanabe and T. Kigawa (2013). "Cell-free synthesis system suitable for disulfide-containing proteins." Biochemical and Biophysical Research Communications 431(2): 296-301. (査読有)

Ohori, Y., H. Okazaki, S. Watanabe, N.

Tochio, M. Arai, T. Kigawa and C. Nishimura (2014). "Flexible and rigid structures in HIV-1 p17 matrix protein monitored by relaxation and amide proton exchange with NMR." *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1844(3): 520-526. (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡部 暁 (Watanabe Satoru)

独立行政法人理化学研究所・生命システム
研究センター・上級研究員

研究者番号：80300945