

論 文 内 容 の 要 旨

論文題目 高度好熱菌を用いた酵素の進化工学的耐熱化

氏名 玉 腰 雅 忠

生体内で多様な機能を果たす蛋白質は不安定なものが多いが、それらを安定化できれば多くの分野への利用が期待できる。そのための手法として従来は蛋白質工学の手法が用いられていたが、詳細な立体構造が不可欠であることに加え、安定化のための設計精度が現段階では低いため、安定化が難しい場合が多い。本研究ではそれらの制約がない進化分子工学の手法を用い、酵素を好熱菌内で耐熱化するための実験系の開発を行った。

モデル酵素として、ロイシンの生合成に関与する 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (IPMDH) を用いた。本酵素に関しては、好冷菌から超好熱菌までの様々な耐熱性の酵素の遺伝子が単離されており、また結晶構造が明らかにされているので、耐熱化機構を調べる上で有利な材料である。また宿主好熱菌としては、形質転換が可能な好熱菌のうち、最も生育温度の高い *Thermus thermophilus* を用いた。

まず、*T. thermophilus* の IPMDH 遺伝子を含むロイシン合成系オペロンの遺伝子構造を解析した。以前の報告では、そのオペロン内にある IPMDH の遺伝子とイソプロピルリンゴ酸イソメラーゼの遺伝子が互いにオーバーラップし、機能的に重要な領域が同じ DNA によってコードされている可能性が示唆されていた。それが真実ならば、*T. thermophilus* 内で好熱菌自身の IPMDH のかわりに他種生物の IPMDH を発現させて機能を相補させることは困難になる。その

真偽を確かめるために塩基配列解析をやりなおしたところ、以前に報告された配列解析に間違いが見つかり、それらの遺伝子は互いに重複することなく別々の遺伝子として存在することがわかった。

次に好熱菌 IPMDH と枯草菌 IPMDH の間のキメラ酵素を耐熱化するための実験系を以下のように作製した (図1)。まずノックアウトベクターを構築し、相同組換え能を利用して好熱菌 IPMDH をコードする遺伝子を染色体から完全に欠失させた。次にインテグレーションベクターを用いてキメラ IPMDH の遺伝子を染色体中に挿入した。その形質転換株は培地中にロイシンがない場合、70℃では生育できたが、耐熱性の低いキメラ酵素を用いて生育しなければならないために 76℃以上では生育できなかった。そこで、自然に起きる突然変異やニトロソグアニジンの変異誘発により、76℃以上でも生育できるようになった株を 2 株得た。IPMDH 遺伝子をクローニングして塩基配列を調べたところ、それぞれ Ile93Leu および Ala172Val のアミノ酸置換が起きていることがわかった。次に大腸菌内で大量発現させ、酵素を精製した。それを用いて熱処理後の残存活性を指標にした耐熱性を調べたところ、それらの変異酵素は共に元のキメラ酵素よりも確かに耐熱化していた。立体構造を解析したところ、それらは側鎖内の高いエネルギー状態の解消や蛋白質内部の疎水性パッキングを高めるなど、以前なら設計が困難な微妙な変化によって耐熱化したことがわかった。

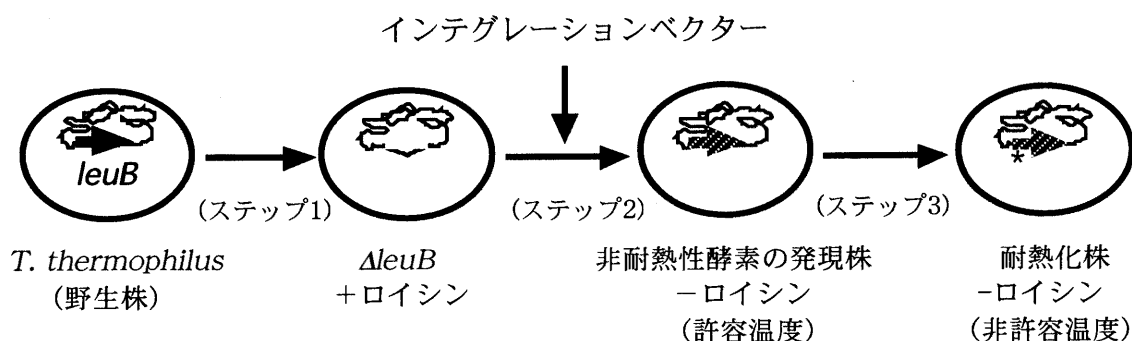


図1 好熱菌を用いた耐熱化酵素の選択系

*T. thermophilus*の野生株から耐熱化の対象とする酵素遺伝子を完全に欠失させ (ステップ1)、その株の染色体中に非耐熱性酵素遺伝子を挿入して発現させる (ステップ2)。その株を出発として選択培地で高温下に生育できるようになった耐熱化株を取得する (ステップ3)。耐熱化株の*は変異部位を示す。

キメラ酵素よりも更に耐熱性の低い酵素として、酵母 IPMDH の進化工学的耐熱化を試みた。まず、好熱菌内で複製可能なプラスミドベクターを構築し、IPMDH 欠失株内で酵母 IPMDH を発現させた。得られた形質転換株は、培地中にロイシンがない場合 50℃程度まで生育できた。それを出発として、60、62、65、67、および 70℃でも生育できるようになった株を段階的に得た（図 2）。それらの IPMDH 遺伝子の塩基配列を解析したところ、選択温度が上昇するにつれてアミノ酸変異が 1 つずつ蓄積していった。pET システムを用いて酵素を大量発現させ、精製法を新たに検討して電気泳動上単一バンドにまで精製した。それを用いて耐熱性を調べたところ、どの変異酵素も酵母の野生型 IPMDH より耐熱性が上昇しており、かつ選択温度が上昇するにつれて耐熱性も上がっていることがわかった（図 3）。また、酵母の野生型 IPMDH は室温付近でもグリセロールなどの保護剤がないと急速に失活することが知られていたが、得られた耐熱化酵素は全て保護剤がなくても活性を維持できることがわかった。一方、触媒活性を調べたところ、耐熱化の程度が比較的大きな変異酵素でわずかに活性の低下が見られたが、どの酵素も野生型酵素と同じオーダーであり、著しい変化は見られなかった。キメラ酵素の場合も活性はほとんど変化しなかったことから、何れの場合も活性を維持したまま酵素を耐熱化できた。

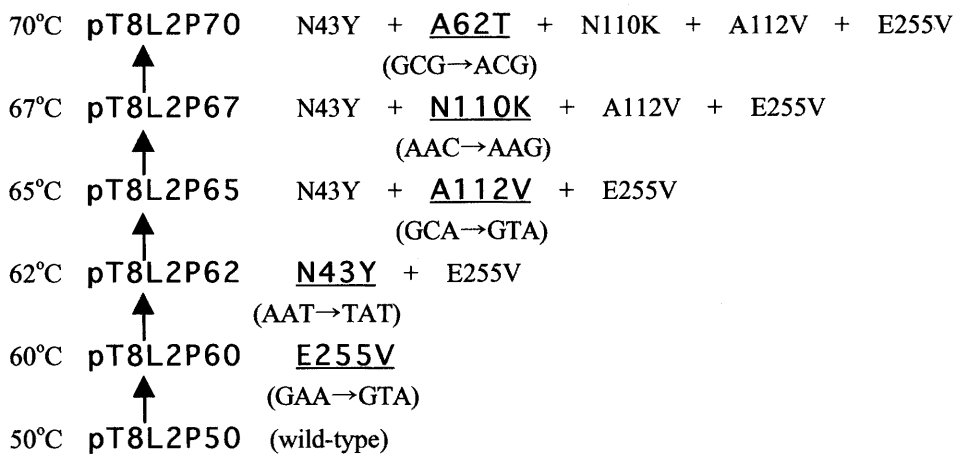


図 2 酵母 IPMDH の進化工学的耐熱化

図に示す各温度で耐熱化株を選択し、それらの株が保持するプラスミドの IPMDH 遺伝子の塩基配列解析をした。各ステップで得られた変異を下線で示した。

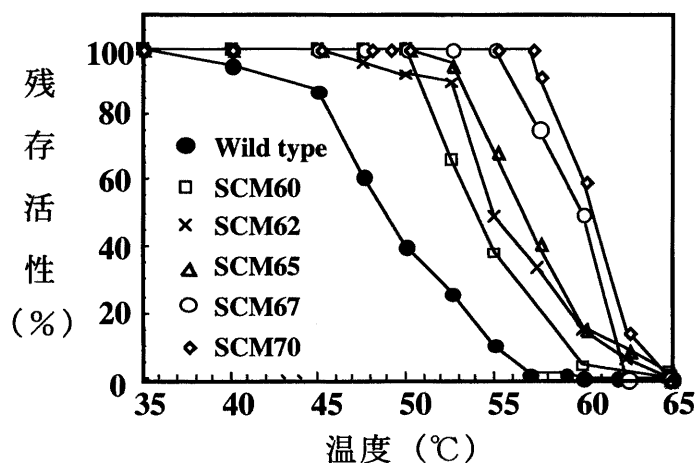


図3 変異酵母IPMDHの耐熱性

温度を変えて10分間熱処理した後の残存活性を測定した。
熱処理前の酵素活性を100%とした。

進化分子工学の手法を用いると耐熱化酵素を効率よく選択できることがわかったが、IPMDH以外の多くの酵素にも進化実験系を適用できるように好熱菌の宿主ベクター系を改良した。まず、形質転換の際のマーカーとして、新たにピリミジン合成に関わる *pyrE* 遺伝子(オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする)をマーカーとするベクター系を構築した。薬剤である 5-フルオロオロチン酸(5-FOA)が培地中にある場合、野生株ではオロト酸の代わりにその薬剤を取り込んで増殖が阻害されるが、*pyrE* 遺伝子が欠損するとそれが取り込まれなくなり、かわりにウラシルが培地中に存在すると生育が可能になる。このことを利用して、*pyrE* 遺伝子欠失株を作製した。また、*pyrE* 遺伝子を発現させるためのベクターも構築した。さらに *pyrE* 遺伝子をマーカーとしたベクターを用いて染色体中の遺伝子を *pyrE* 遺伝子と置換し、かつそのように挿入された *pyrE* 遺伝子も5-FOAと適当なノックアウトベクターを用いて形質転換すれば、再び *pyrE* 遺伝子を欠失できることがわかった。このように染色体を自在に改変できる技術を確立した。

以上をまとめると、高度好熱菌内で酵素を進化分子工学的に耐熱化するための実験系を開発し、実際に多くの耐熱化酵素を効率よく選択できた。技術改良を重ねることによって、より多くの酵素を耐熱化の対象とすることができるようにもなった。これらを発展させれば、有用な酵素を耐熱化できるばかりか、立体構造に基づいた安定化設計の精度向上にも貢献する筈である。