

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 13 年度博士課程 入学
氏名 二井 一樹
指導教員名 正木 春彦

論文題目 遺伝子の共進化過程を模倣した蛋白質の進化分子工学的研究

新しい機能や構造をもつ蛋白質を創出するために、既存の蛋白質の知識を再構築して創り出す方法はいまだ発展途上にある。そのような現状で、生物進化の仕組みを取り入れて蛋白質を創出する進化分子工学的手法は、蛋白質に関する正確な情報が無くても新たな蛋白質の創出が可能な点で非常に有望である。進化分子工学による蛋白質創出の流れは、まず多様なアミノ酸配列からなる蛋白質集団を作製し、そこから目的の機能を持つものを選ぶ。そして、選ばれた蛋白質のアミノ酸配列にランダムな変異を導入し、新たな蛋白質集団を作製し、より優れたものを選択する操作を繰り返す。アミノ酸配列はランダムに変えるので、蛋白質に関する正確な情報は必要無く、いかに多様な蛋白質集団を作製し、どのようにして目的の蛋白質を選ぶかということが重要になる。ただし、作製できる蛋白質集団の多様性には操作上の限度がある。本論文で提唱する“共進化を模倣した蛋白質の進化分子工学的概念”は、この点を克服することに着目して生まれた。選択の対象となる蛋白質はそれ自体を増幅させるため生きて細胞が必要になる。そのため蛋白質をコードする遺伝子を大腸菌細胞内に導入する必要があり、その段階で蛋白質集団の多様性は技術的制約から約 10^{5-6} レベルに制限される。そしてこの多様性の制限は、目的の蛋白質を選ぶ際大きな障害となる。例えば殺菌活性の非常に強いヌクレアーゼ型コリシンに対して耐性を与える、優れた蛋白質を選ぼうとしても、蛋白質集団の多様性が低いと目的の蛋白質の存在確率が低くなり、選択が困難になる。しかし、コリシン生産菌自身は殺菌活性の強いヌクレアーゼ型コリシンにも、その活性を抑えるインヒビター蛋白質を創出している。そこには生物進化の巧妙な仕組みが存在するのである。ヌクレアーゼ型コリシンとインヒビター蛋白質は、両者それぞれのもととなる、活性の低い蛋白質同士が互いに作用し、一方の進化が他方の進化を引き起こす“共進化”で現在の高い活性を獲得したと考えられる。共進化を模倣した進化分子工

学は、この“能力の低い蛋白質どうしが互いに進化しあう”仕組みを取り入れたもので、例えば殺菌活性を下げたヌクレアーゼ型コリシンになら耐性を与える蛋白質を選択し、得られた蛋白質をもとに多様な蛋白質集団を作製、そこから殺菌活性を上げたヌクレアーゼ型コリシンに対して耐性を与える蛋白質を選択する。このような操作を繰り返すことで、最終的に活性の強いヌクレアーゼ型コリシンに耐性を与える蛋白質の選択を目指すものである。この方法の利点はいきなり優れた蛋白質を選ぶ必要はないので、多様性の低い蛋白質集団からでも目的の蛋白質を選択することが可能になる点である (Fig.1)。

本研究ではこの概念の有用性を、 $tRNA^{Tyr}$ 、 $tRNA^{His}$ 、 $tRNA^{Asn}$ 、 $tRNA^{Asp}$ を切断して大腸菌を死滅させるコリシンE5の低活性化変異体コリシンE5K60Qを選択圧とし、それに対して耐性を与える蛋白質を選択、コリシンの殺菌活性と選択された蛋白質の耐性機能を進化させ、最終的に野性型のコリシンE5 に対しても耐性を与える蛋白質を選択することで明らかにする。

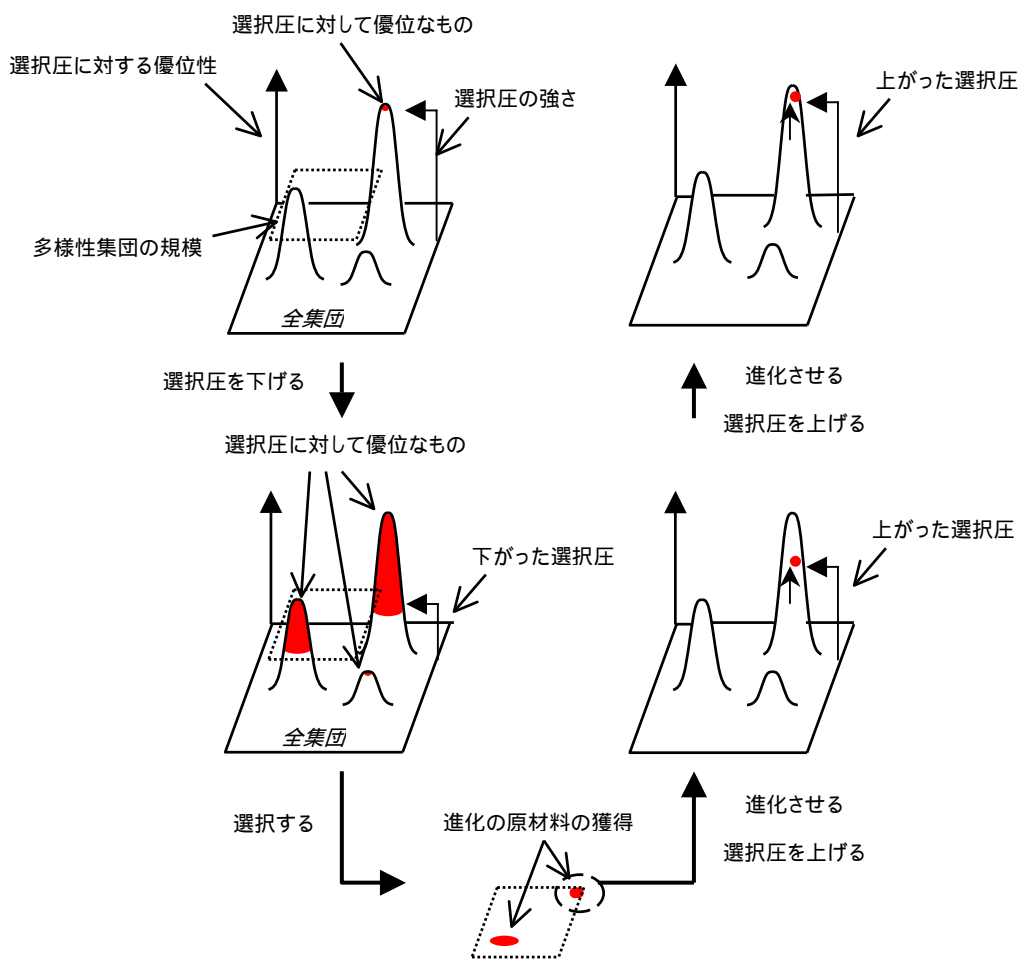


Fig.1 共進化を模倣した進化分子工学の概念

1. スクリーニング系の構築

低活性化変異体コリシンE5K60Qを選択圧とし、それに対して耐性を与える蛋白質を得るためには、耐性を与える蛋白質をコードするDNAをスクリーニングする必要がある。そのような理由から、目的とするDNAの効率の良いスクリーニング系の構築をまず試みた。大腸菌K-12 W3110 株のゲノムDNAを制限酵素 *Sau3AI* で部分分解したものをpUC系のプラスミドベクターに組み込み、それを用いて大腸菌DH5 株を形質転換した。そして、その形質転換体をコリシンE5K60Q存在下で培養し、コロニー形成する株を選択した。次に、そのような株からプラスミドを抽出し、そのプラスミドで新たに大腸菌DH5 株を形質転換し、形質転換体を対象にコリシンE5K60Qを用いてクロスストリークテストした。クロスストリークテストでは培地上にまずコリシンをストリークしておき、それに交差するよう形質転換体をストリーク、そしてコリシンと交差した場所にも形質転換体が生育しているかどうかを調べることによりコリシンに対する耐性を判断した。最後に、コリシンE5K60Q耐性を示した株に挿入された大腸菌ゲノムDNA断片をシーケンスにより決定した。その結果、コリシンE5の標的遺伝子の1つであるtRNA^{Tyr}をコードするDNAを含んだ全く異なる6種類の大腸菌ゲノムDNA断片が獲得された。

2. E5K60Q 特異的に耐性を与える蛋白質の獲得

コリシン E5K60Q に耐性を与える、獲得された DNA 断片を解析し、この DNA 断片にコードされた蛋白質が耐性に関与しているのかどうかを調べた。その結果、コリシン E5K60Q に耐性を与える RffE・D、RstA、TatA-RecN といった蛋白質が確認された。そこで、これらの蛋白質が大腸菌細胞に構造的変化を引き起こし、コリシンの侵入を妨げることによりコリシン類全般に対して耐性を与えるようになるのか、あるいはコリシン E5K60Q 特異的に耐性を与えるものか調べたところ、RffE・D は調べた全てのコリシンに、また RstA は同じ E 群コリシンであるコリシン E3D510E にも耐性を与えた。一方、ゲノム DNA の 2 つの *Sau3AI* 断片が偶然繋がることで誕生した蛋白質 TatA-RecN はコリシン E5K60Q 特異的に耐性を与え、野性型コリシン E5 には耐性を与えなかった。TatA-RecN 融合蛋白質は大腸菌ゲノム上に遺伝子として存在しない新規な蛋白質なので、この蛋白質を進化させ耐性機能を上昇させることにした。

3. 共進化の模倣による蛋白質機能の進化

野性型コリシン E5 には耐性を与えず、殺菌活性の低いコリシン E5K60Q 特異的に耐性を与える蛋白質 TatA-RecN を用いて、そのアミノ酸配列にランダムに点変異を導入し、野性型コリシン E5 に対しても耐性を与える蛋白質を獲得することを試みた。まず、TatA-RecN をコードする DNA 配列に変異を導入するため EP-PCR で増幅した。増幅産物をクローニング後、形質転換し、新たな選択圧下でスクリーニングした。選択圧は野性型コリシン E5 では強すぎると考え、E5K60Q よりは殺菌活性が強いが、E5 よりは弱い変異型コリシン E5I94M を用いた。スク

リーニングの結果コリシン E5I94M に耐性を与える蛋白質 TatA-RecNEP-1-2 が得られた。そして、TatA-RecN に点変異を導入した場合と同様の操作を行うことで、蛋白質 TatA-RecNEP-1-2 をもとに多様な変異を含む蛋白質集団を作製し、野生型コリシン E5 に対して耐性を与える蛋白質を選択した。最終的に野性型コリシン E5 に耐性を与える TatA-RecNEP-2-1、EP-2-2 の 2 種の蛋白質が獲得された。最後に、これら蛋白質のアミノ酸配列の決定を行ったところ、いくつかの変異が確認された。特に終止コドンが入ったことでこれら蛋白質が 52 アミノ酸にまで小さくなっていることが明らかになった。

4. TatA-RecN 系蛋白質の解析

共進化を模倣した進化分子工学を行うことで、野性型コリシン E5 に耐性を与える TatA-RecNEP-2-1、EP-2-2 の獲得に成功した。そこで TatA-RecN、EP-1-2、EP-2-1、EP-2-2 といった TatA-RecN 系蛋白質がどのような仕組みで E5、E5I94M、E5K60Q といった E5 系コリシンに耐性を与えるのかを考察するため、TatA-RecN 系蛋白質を構造的な面から解析した。まず、TatA-RecN 系蛋白質の E5 系コリシンに対する耐性が TatA-RecN という融合形で発揮されるのかどうかを明らかにするため、TatA、RecN、TatAN 末端、RecNC 末端それぞれをクローニングし、E5 系コリシンに対する表現型を調べた。その結果、いずれもコリシン E5K60Q 耐性を示さず、耐性には TatA-RecN といった融合した形が必要であることが明らかになった。次に TatA-RecN 系蛋白質に見られるドメイン構造を調べた結果、TatA 由来の内膜貫通ドメインが TatA-RecN に確認され、進化処理を経てもそのドメインが保持されていることが推定された。そこで、この内膜貫通ドメインを除去した TatA-RecNEP-2-1、EP-2-2 を作製し、E5 系コリシンに対する表現型を調べたところ、いずれもコリシン E5K60Q 耐性を示さなかった。これらのことから TatA-RecN 系蛋白質は内膜蛋白質で、膜に位置することで、その耐性機能をつかさどっていることが明らかになった。

以上、共進化を模倣した進化分子工学的手法から野性型コリシン E5 に対して耐性を与える内膜蛋白質 TatA-RecNEP2-1、2-2 を獲得した。そして、大腸菌を介した多様性の低い蛋白質集団から目的の蛋白質を獲得する共進化の概念の有用性を明らかにした。この概念を用いれば、多様性の限られた蛋白質集団からでも目的の蛋白質の獲得が可能になり、進化分子工学による蛋白質の創製がさらに発展すると期待される。また、non-coding RNA が極めて重要になりつつあるが、RNase でそれらを制御する手段は有効で、その制御の際に用いる RNase のインヒビターを新たに創出する上で本方法は有効な寄与をするかもしれない。