

耐熱性逆転写酵素を用いた迅速高感度な病原微生物の検出

京都大学大学院 農学研究科

准教授 保川 清

はじめに

RNAを標的とした遺伝子診断（結核菌、エイズウイルス等）においては、逆転写酵素の耐熱性が低いために低温（約40℃）で反応させているが、RNAが二次構造（塩基どうしの水素結合による複雑な構造）をとり、反応効率が低くなり、試薬の性能低下につながるものが問題となっている。従って、逆転写酵素の耐熱性の向上が求められている。

逆転写酵素はRNAをゲノムとするウイルスがもつ酵素で、RNAを鋳型としてDNAを合成する活性（逆転写活性）、DNAを鋳型としてDNAを合成する活性、ならびにRNase H活性（RNA・DNA二本鎖中のRNAを分解する活性）を有する（図1）。モロニー Maus 白血病ウイルス逆転写酵素（Moloney, murine leukemia virus reverse transcriptase, MMLV RT）とトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, AMV RT）がcDNA合成酵素として分子生物学的研究や臨床診断に広く用いられているが、反応効率をあげるために酵素の耐熱化が求められている。一方、ヒト免疫不全ウイルスタイプ1逆転写酵素（human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, HIV-1 RT）はエイズ治療薬であるHIV-1 RT阻害剤の開発のツールとして実用化されている。しかし、最近、HIV-1 RTを用いたcDNA合成の例が報告された。

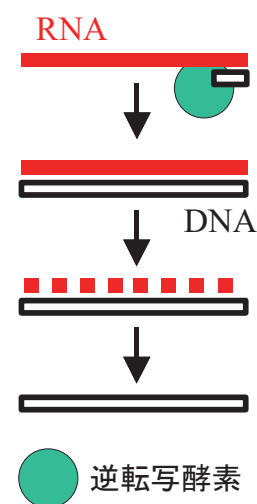


図1: 逆転写酵素によるDNA合成

MMLV RTは分子質量75 kDaのモノマーで、Fingers, Palm, Thumb, Connection, RNase Hの5個のドメインから成る。AMV RTは63 kDaの α サブユニットと95 kDaの β サブユニットから成るヘテロダイマーである。 α サブユニットはFingers, Palm, Thumb, Connection, RNase Hの5個のドメイン、 β サブユニットはこの5個のドメインとIntegraseドメインから成る。HIV-1 RTは51 kDaのp51と66 kDaのp66から成るヘテロダイマーである。p51はFingers, Palm, Thumb, Connection, RNase Hの4個のドメイン、 β サブユニットはこの5個のドメインとRNase Hドメインから成る。

我々はMMLV RTの耐熱性を向上させるために、MMLV RT分子内の鋳型プライマー（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、耐熱性が上がると仮説をたてた。この仮説に基づき、MMLV RT分子内でT/Pと相互作用すると思われる12個

のアミノ酸残基（図2）をそれぞれリシン、アルギニン、アラニンに置換した単変異型酵素36種を評価することにより、耐熱性をあげる変異を見出した。さらに、耐熱性をあげる変異を組み合わせることにより、三重変異型酵素E286R/E302K/L435R（MM3）と四重変異型酵素E286R/E302K/L435R/D524A（MM4）を作製した。野生型酵素（WT）を50℃で15分間熱処理後、37℃で逆転写活性を測定したときの残存活性は1.4%であったが、MM3では82%、MM4では101%であった⁽¹⁾。

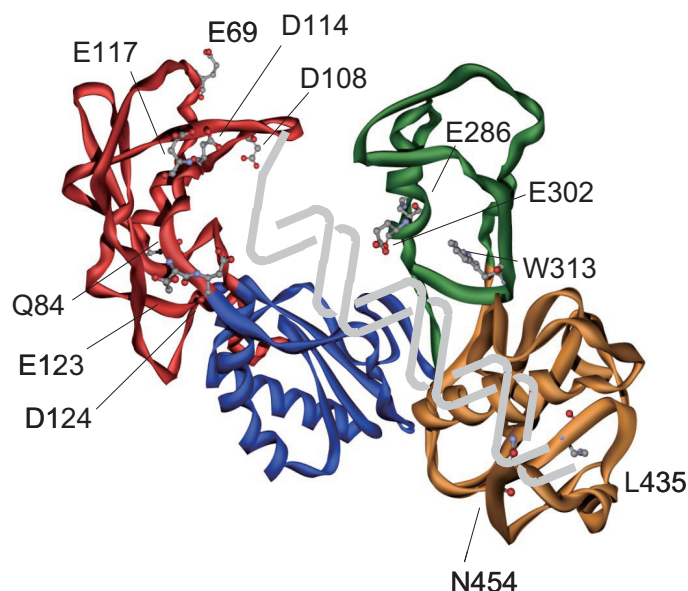


図2. MMLV RTの全体構造 (Protein data bank 1RW3). 変異を導入した残基は“ball and stick”で示した。赤はFingers、青はpalm、緑はthumb、黄はconnectionドメインを示す。RNase Hドメインは省略した。

本研究は、耐熱性逆転写酵素を用いた病原微生物の検出系の作製と評価を目的とし、以下の課題に取り組んだ。

- I. 耐熱性MMLV RTを用いた嘔吐型セレウス菌産生毒素セウリド合成酵素mRNA検出系の構築
- II. 組換えAMV RTの作製と蛋白質工学による耐熱性の向上
- III. 組換えHIV-1 RTの作製と蛋白質工学による耐熱性の向上

I. 耐熱性MMLV RTを用いた嘔吐型セレウス菌産生毒素セウリド合成酵素mRNA検出系の構築

*Bacillus cereus*株NC7401のゲノムDNAからPCRにより、GenBankにDQ360825として登録されている配列中の8353～9366に相当する配列を増幅した。これをベクターpET-22b(+)のXbaIサイトとEcoRIサイトに挿入し、pET-cesAを構築した（図3）。pET-cesAをEcoRIで切断し直鎖状DNAとした。このDNAを鋳型としてインビトロ転写を行い、RNAを調製した（図4）。このRNA中の特定の26塩基と相補的な配列を3'末端に有するプライマーを用いて、MMLV RTを加えて、各温度で30分間cDNA合成反応を行った。その後、PCRを行い、反応物をアガロース電気泳動で解析した（図5）。

cDNA合成反応が進行した最大温度は、野生型酵素では54℃、D524Aでは56℃、三重変異型

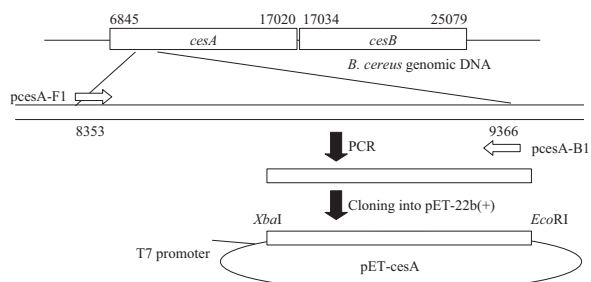


図3. cesA遺伝子のクローニング.

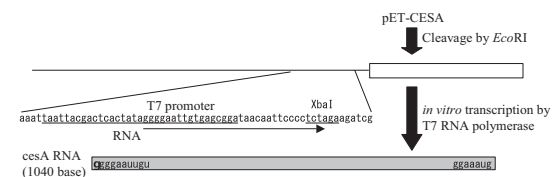


図4. インビトロ転写によるcesA RNAの合成.

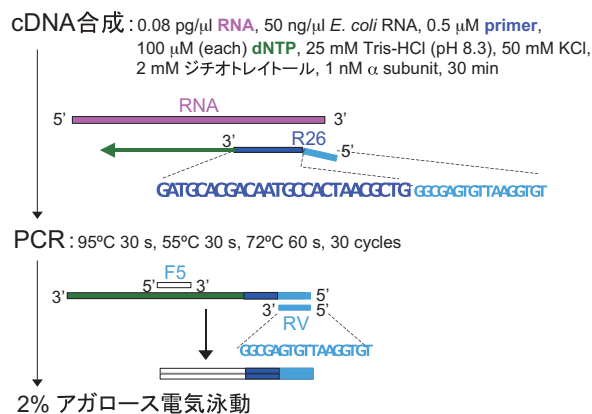


図5. セレウリド合成酵素mRNA検出系.

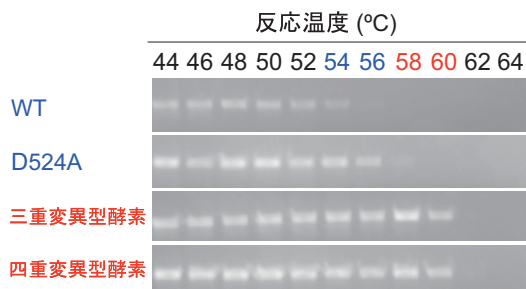


図6. 耐熱性MMLV RTによるcDNA合成.

表1. 耐熱性MMLV RTを用いたセレウリド合成酵素 mRNA検出系による嘔吐型セレウス菌の検出.

株	年 ^a	セレウリド の産生	RT-PCR による検出
<i>Bacillus cereus</i>			
NC1457	2005	+	+
NC1462	2005	+	+
NC1474	2007	+	+
NC1496	2008	+	+
NC1500	2008	+	+
NC526	1983	+	+
NC1399	2004	+	+
NC1470	2006	-	-
NC1482	2008	-	-
NC1390	2003	-	-
NC1459	2005	-	-
NC1460	2005	-	-
NC1202	2996	-	-
<i>Bacillus mycoides</i>			
NC1428	2004	ND ^b	-
NC1458	2005	ND	-
<i>Bacillus subtilis</i>			
IFO3001	Not reported	ND	-
IFO3025	Not reported	ND	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>			
kurstaki	1999	ND	-
aizawai	2000	ND	-
<i>Escherichia coli</i>			
NC03-29	2003	ND	-
NC99-14	1999	ND	-
<i>Salmonella enteritidis</i>			
NC28	2008	ND	-
<i>Salmonella minnesota</i>			
NC33	1991	ND	-
<i>Staphylococcus aureus</i>			
NC25	2007	ND	-
ATCC25923	Not reported	ND	-
<i>Clostridium perfringens</i>			
NC05-41	2005	ND	-
NC96-45	1996	ND	-
<i>Campylobacter jejuni</i>			
NC05-50	2005	ND	-
NC07-22	2007	ND	-

^a 菌株が単離された年

^b 実施せず

酵素と四重変異型酵素では60°Cであった（図6）。このことから、三重変異型酵素MM3と四重変異型酵素MM4は用いると野生型酵素（WT）あるいはD524Aを用いたときよりも、高い温度でcDNA合成ができることが示された。

Bacillus 属、Escherichia 属、Salmonella 属、Staphylococcus 属の菌はLB培地を用いて37℃で24時間培養した。Clostridium 属とCampylobacter 属の菌はbrain heart infusion培地を用いて37℃で48時間培養した。1 mlの培養液を15,000 × gで5分間遠心することにより菌体を得た。菌体を超音波で破碎し、TRIzol Reagent（インビトロジェン）を用いて得られたエタノール沈殿物を300 μlの水に溶解したものをRNA抽出物とした。表1に、このRNA抽出物からMM4を用いたRT-PCRによる結果を示す。MM4を用いたRT-PCRはcesA RNAを特異的に増幅し、嘔吐型セレウス菌を特異的に検出することが示された。

II. 組換えAMV RTの作製と蛋白質工学による耐熱性の向上

C末端に(His)₆をもつAMV RT α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 αサブユニットを精製した⁽²⁾。

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。耐熱性が向上したAMV RT αサブユニット(Thr1-Tyr572)を作製するために、AMV RTに変異V238→R/L388→R/D450→Aを導入した。C末端に(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。42～50℃で一定時間熱処理するとAM4の活性はWTより緩やかに減少した。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WTでは60℃、AM4では64℃であった。このように、AM4はWTよりも高い耐熱性を有した。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耐熱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⁽³⁾。

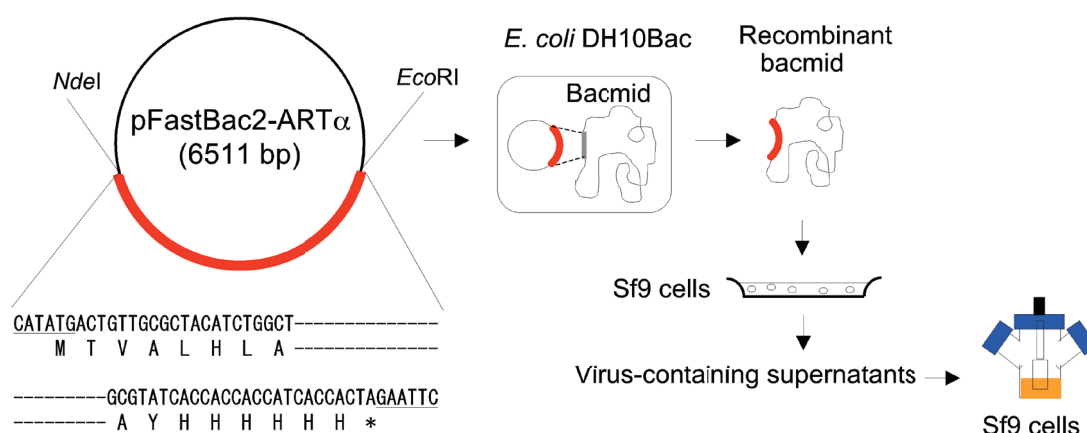


図7. AMV RTの発現.

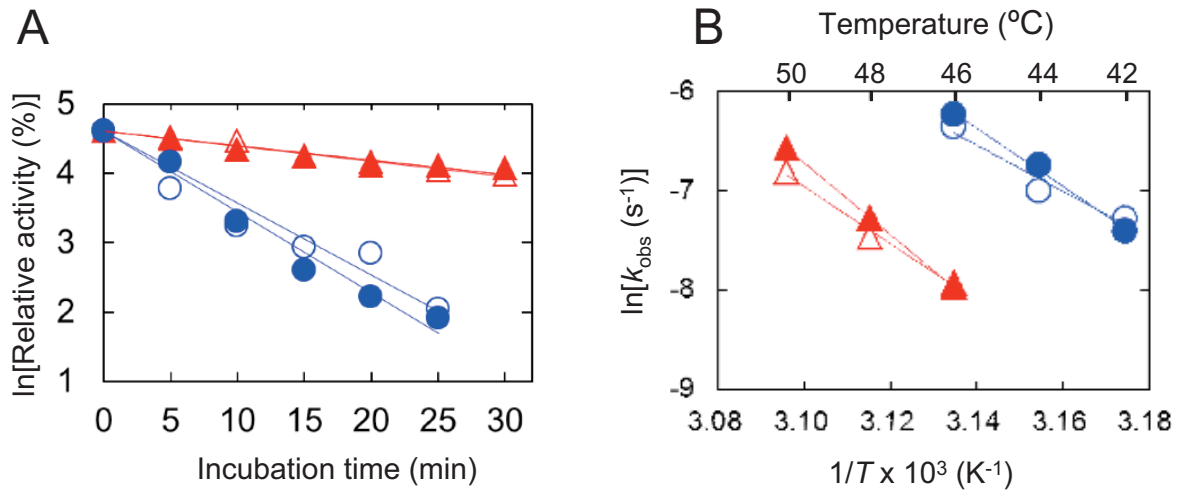
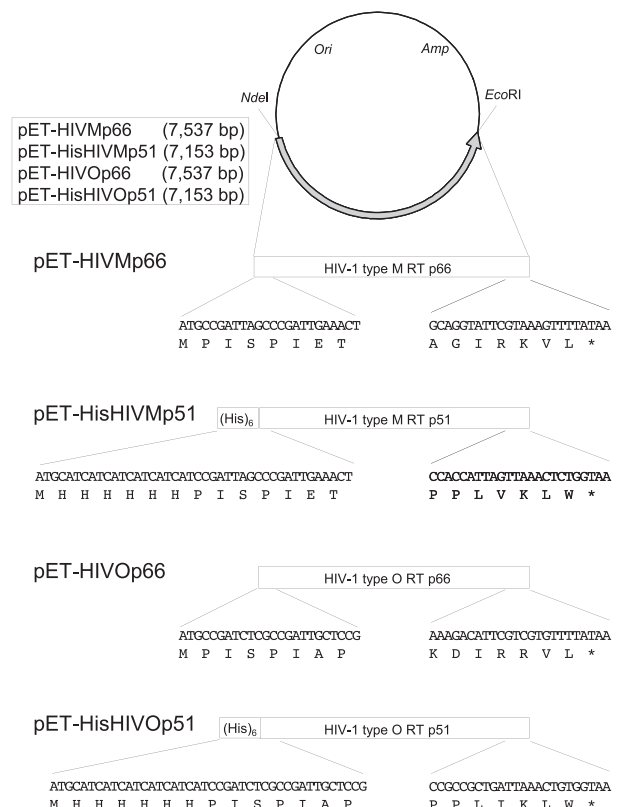


図8. AMV RT α サブユニットの熱失活. WT (○, ●)とV238R/L388R/D450A (△, ▲)を poly(rA)•p(dT)₁₅非存在下(○, △)あるいは28 μ M 存在下(●, ▲)で42~50°Cで一定時間熱処理してから37°Cでpoly(rA)•p(dT)₁₅へのdTTP取込みの反応速度を測定した。(A)46°Cで熱処理したときの熱失活. 相対活性は、熱処理前の後の反応速度を100%としたときの熱処理後の反応速度の相対値を示す。(B)アレニウスプロット.



Ⅲ. 組換え HIV-1RT の作製と蛋白質工学による耐熱性の向上

HIV-1 は M (main), O (outlier), N (non-M, non-O) という3つの主要な系統学的グループに分類される。このうち、グループM は世界中で最も広まっているタイプで、グループO は西アフリカの一部に見られるタイプである。本研究では、MとOのそ

図9. HIV-1 RT発現プラスミド

れぞれに対し、N末端に (His)₆ をもつ p51 (Pro1-Trp426) と (His)₆ を含まない p66 (Pro1-Leu561) を大腸菌 BL21 (DE3) で別々に発現させた。これらの菌体の可溶性画分の混合物から p51 と p66 のヘテロダイマーを精製した (図9) ⁽⁴⁾。

HIV-1 RT と MMLV RT のアミノ酸配列は19%の相同性をもつ。MMLV RT のアミノ酸残基 E286、E302、L435、D524 は、HIV-1 M RT と HIV-10 RT の P243、K259、K390、D443 にそれぞれ相当する。耐熱性が向上した HIV-1 RT を作製するために、p66 に変異 P243→R/D443→A を導入した。現在、変異型酵素の精製を進めている。

まとめ

耐熱性 MMLV RT を用いた嘔吐型セレウス菌産生毒素セレウリド合成酵素 mRNA 検出系を構築した。この検出法により、セレウリドを産生する *B. cereus* の RNA から特異的に増幅産物が得られた。さらに、組換え AMV RT を作製し、蛋白質工学により耐熱性を向上させた。耐熱性 AMV RT を用いたセレウリド合成酵素 mRNA 検出系は現在構築中である。耐熱性逆転写酵素を用いた RT-PCR による病原微生物の検出は、従来酵素を用いたものよりも感度および迅速性において優位性が期待される。これらを実証することを今後の課題とする。

文 献

1. Yasukawa, K., Mizuno, M., Konishi, A., & Inouye, K. J. *Biotechnol.*, 150, 299–306 (2010).
2. Konishi, A., Nemoto, D., Yasukawa, K., & Inouye, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 1618–1620 (2011).
3. Konishi, A., Yasukawa, K., & Inouye, K. *Biotechnol. Lett.*, 34, 1209–1215. (2012).
4. Konishi, A., Shinomura, M., & Yasukawa, K. Manuscript submitted (2012).