

In vivo directed evolution によるハイグロマイシンリン酸化酵素の耐熱化と
耐熱化酵素に関する酵素学的解析

***In vivo* directed evolution for thermostabilization of hygromycin B phosphotransferase
from *Escherichia coli* and *Streptomyces hygroscopicus*, and their enzymatic analysis**

高倉康彰¹、白木堅太郎²、星野貴行¹、中村顕¹

Yasuaki Takakura¹, Kentaro Shiraki², Takayuki Hoshino¹, and Akira Nakamura¹

(筑波大学¹生命環境科学研究科, ²数理物質科学研究科)

(¹Grad. School of Life Environ. Sci, and ²Grad. School of Pure Appl. Sci, Univ. Tsukuba)

e-mail: a-nak@agbi.tsukuba.ac.jp

高度好熱菌 *T. thermophilus* HB27 株の有する特徴のひとつに、高い自然形質転換能が挙げられる。本菌株は、100%の菌が増殖段階によらず常に DNA 取り込み能を有しているため、培養液に DNA を添加するのみで形質転換を行うことができる上、その効率も染色体 DNA による形質転換(栄養要求性変異の回復)の場合で、生菌数あたり 1-10%程度と高効率である。そのため本菌株の遺伝子操作系は、最も高温で利用可能な遺伝子操作系として捉えられ、逆遺伝学的手法による本菌株の遺伝子機能の解析や、他の好熱菌・超好熱菌由来遺伝子の発現、そして *directed evolution* による常温生物由来蛋白質の耐熱化に利用されてきている。

我々は本菌株のこのような特徴に着目し、特に外来遺伝子産物の高効率発現系の構築を目指して HB27 株の宿主・ベクター系の開発・改良を行ってきたが、本菌株の形質転換系が抱える問題点のひとつに利用可能な選択マーカーが少ないことが挙げられる。通常の生物の形質転換では選択マーカーとして薬剤耐性遺伝子が用いられるが、*Thermus* 属細菌では元来薬剤耐性遺伝子が存在しないため、常温菌由来の薬剤耐性酵素の耐熱化変異体を取得し、その遺伝子を利用することが必要である。このようにして開発されたものには、現在最も広く用いられているカナマイシン耐性マーカー(HTK)がある。また最近になってブレオマイシン耐性マーカーの開発が報告されたが、まだ一般に利用可能な状態ではなく、新しい選択マーカーの開発が望まれている。

一方 Cannio らは大腸菌由来ハイグロマイシンリン酸化酵素(hygromycin B phosphotransferase; HPH)に 2ヶ所のアミノ酸置換(S52T, W238C)を導入することにより、好熱性古細菌 *Sulfolobus solfataricus* の宿主・ベクター系で 82°Cまで選択マーカーとして利用可能であると報告した。そこで我々は、HPH の同様の変異、あるいは新たな変異体の取得を通じて HPH の耐熱化変異体を取得し、HB27 株の宿主・ベクター系で利用可能なのではないかと考え、HPH の耐熱化変異体の取得を試みた。また同時に、*Streptomyces hygroscopicus* 由来のハイグロマイシンリン酸化酵素(HYG)についても耐熱化変異体の取得を試みることにした。HPH と HYG は ATP を用いて同一の基質をリン酸化するが、リン酸化部位は異なっており(Fig. 1)、また酵素のアミノ酸配列もほとんど相同性を示さない。

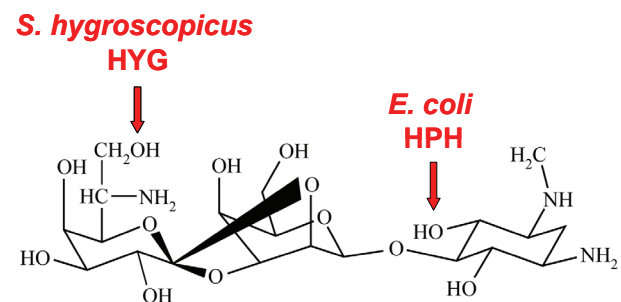


Fig. 1 HPH 及び HYG による HygB のリン酸化部位

HPHの耐熱化変異体の取得と選択マーカーとしての利用¹⁾

野生型(wt) *hph* 及び上記の 2 アミノ酸置換変異を含む変異 *hph* 遺伝子(*hphAB*)、あるいはいずれか片方の変異のみを保持する変異遺伝子(S52T, *hphA*; W238C, *hphB*)を、pTT8 ベースの発現プラスミドを用いて *T. thermophilus* HB27 株へ導入したところ、いずれの場合も当初は HB27 株の生育下限温度に近い 55°Cでも 40 µg/ml ハイグロマイシン B (HygB)に対する耐性を示さなかった。ところが 4 日間ほど培養を継続したところ、wt 及び 3 種類の変異型 *hph* 遺伝子を保持している形質転換体のいずれからもマイクロコロニーの形成が認められた。得られたマイクロコロニーからプラスミドを回収して新たに HB27 株へ導入し、HygB 存在下で 55°C、1 日でコロニー形成が認められる株を選択した。このようにして計 5 種類の独立したクローンを取得し、それらの株の持つ *hph* 遺伝子領域について塩基配列を決定したところ、5 種のクローンは前述の変異に加えて、新たに A118V あるいは T246A の変異を有していることが明らかになった(Fig. 2)。これらの変異は HPH

の熱安定性向上に寄与しているものと推定した。得られた 5 種類のクローンを出発材料として、同様の方法で徐々に選択温度を上昇させて耐熱化変異体の取得を

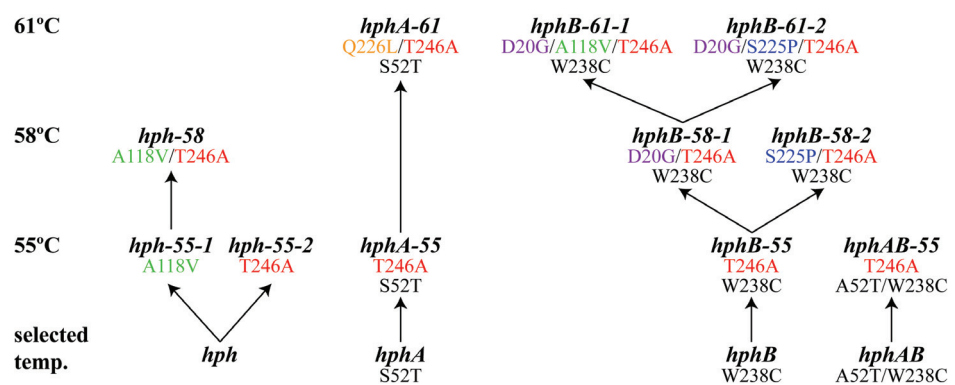


Fig. 2 *in vivo* directed evolution による変異 *hph* 遺伝子の取得

目指したところ、最終的に 61°C で HygB 耐性を示すクローンを 3 つ取得した。これらのクローンには、合わせて 3 種類の新たな変異(D20G, S225P, Q226L)が認められ、耐熱性の上昇に伴ってこれらの変異が組み合わさって存在していた。

このようにして得られた計 5 種類の変異が HPH の耐熱性に相加的に寄与するかどうかを調べるため、これらの変異のうちいずれか 4 種類を組み合わせた遺伝子(*hph4*)、あるいは 5 種全部を組み合わせた遺伝子(*hph5*)を部位特異的変異により作製し、HB27 株に導入した。液体培養により HygB 耐性を示す上限温度を検討したところ、wt *hph* 遺伝子保有株では 51°C、*hph4* 遺伝子保有株では変異の種類により 62-64°C、*hph5* 遺伝子保有株では 67°Cであった。以上より 5 種類のアミノ酸置換を保持する HPH5 は、野生型酵素と比較して少なくとも *in vivo* で 16°Cの耐熱化がなされたものと結論した。また、*hph5* 遺伝子が実際に選択マーカーとして利用可能かどうかを検討したところ、pTT8 をベースとしたプラスミドに導入した場合(8 コピー)、あるいはゲノム上に 1 コピーで導入した場合のいずれでも、65°Cまでは HTK 遺伝子を選択マーカーとした場合と同程度の効率で形質転換体を選択することができたが、選択温度を 67°Cに上昇させるとその効率は急激に減少した。このことより、*hph5* 遺伝子は *T. thermophilus* 形質転換系で 65°Cまでは選択マーカーとして利用可能であると結論した。

HPH5 に関する酵素学的解析

次に HPH5 の示した”*in vivo*”での耐熱性の上昇が、実際に酵素蛋白質レベルでの耐熱性の上昇によるものかどうかを検討することとした。wt HPH 及び HPH5 を、pET system を用いて大腸菌を宿主として発現・精製し、酵素学的な解析を行った。wt HPH は当初 inclusion body を形成し、不溶性画分に生産されたが、pGro7 を用いた *E. coli groESL* との共発現により可溶性画分に生産することができた。

酵素活性の至適温度は、wt HPH が 50°C、HPH5 が 55°C と大きな変化は認められなかったが、30 分熱処理後の残存活性で測定した熱安定性及び CD スペクトル分析による蛋白質二次構造の変性温度は、全体に *in vivo* で観察された温度よりも低いものの、HPH5 の方が wt HPH よりもそれぞれ 17°C、19°C 高かった。また、常温での kinetic parameter を測定したところ、HygB 及び ATP に対する K_m 、 k_{cat} 共に両者の間で差は認められなかった。

以上の結果より、*in vivo* で見られた HPH5 の耐熱性の上昇は、明らかに酵素蛋白質レベルで耐熱性が上昇した結果であり、また今回の 5 アミノ酸置換は、酵素活性にはほとんど影響を与えずに酵素の耐熱性のみを向上させていることが示された。現在 HPH5 について結晶作製に成功し、X 線構造解析を行っている(東京農大・矢嶋俊介助教授との共同研究)。

HYGの耐熱化変異体の取得と酵素学的解析

S. hygroscopicus 由来 HYG についても、前述と同様の手法により耐熱化を試みた。wt *hyg* 遺伝子を HB27 株に導入したところ、60°C 一晩で明確なコロニー形成が認められたが、65°C ではコロニーは形成しなかった。そこで wt *hyg* 遺伝子を保持する株をプレート上 65°C で培養したところ、2 日後にマイクロコロニーの形成が多数認められた。これらのうちのいくつかについて、プラスミドを HB27 株へ再導入して 65°C で明確な HygB 耐性を示すことを確認した上で、*hyg* 遺伝子の配列を決定したところ、合計 6 種の独立したアミノ酸置換変異が認められた(Fig. 3)。これらの変異

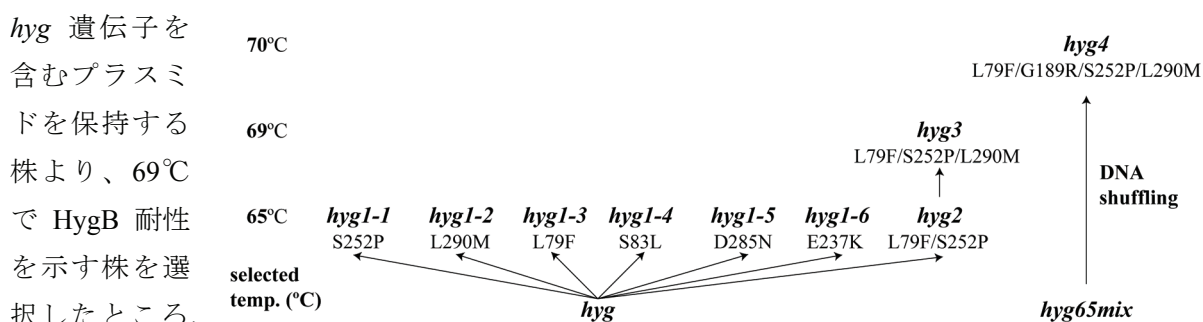


Fig. 3 *in vivo* directed evolution による変異 *hyg* 遺伝子の取得

3 つのアミノ

酸置換が組み

合わさった HYG3 を取得することができた。

また、当初の 65°C 選択で得られたマイクロコロニーよりプラスミドを mixture として回収し、それらを鋳型として *hyg* 遺伝子領域の DNA-shuffling を行った。shuffling により得られた *hyg* 遺伝子を HB27 株に導入したところ、70°C で HygB 耐性を示すコロニーが一株得られた。この株の持つ *hyg* 遺伝子には、4 種のアミノ酸置換変異(HYG3 で認められた L79F, S252P, L290M)に加え、新たに G189R)が認められた(*hyg4*)。wt *hyg* 遺伝子及び *hyg4* 遺伝子を保持する株は、液体培養でそれぞれ 60°C、68°C まで Hyg 耐性を示したので、これら 4 アミノ酸置換により HYG の *in vivo* での耐熱

性が 8°C 上昇したものと結論した。

次に wt HYG 及び HYG4 を、大腸菌を宿主として発現・精製し、酵素学的な解析を行った。HPH の場合と同様、酵素反応至適温度や常温での kinetic parameter については両者の間で差は認められなかったが、熱処理後の残存活性で測定した熱安定性や CD スペクトルによる熱変性温度は、HYG4 の方がそれぞれ 9°C、10°C 高く、*in vivo* での耐熱性上昇の結果と良い一致を示した。

以上のように、*in vivo directed evolution* の手法を利用して *T. thermophilus* で利用可能な新たな HygB 耐性マーカーの開発に成功すると共に、耐熱化酵素に関する酵素学的解析を行った。今後は同様の手法による HPH 及び HYG の更なる耐熱化や X 線結晶構造解析による酵素立体構造の解析、そして立体構造を元にした蛋白質工学的手法による更なる耐熱化を目指す予定である。

1) A. Nakamura *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 158-163, 2005.