

Streptomyces hygroscopicus 由来ハイグロマイシン不活化酵素の耐熱化
**Directed evolution for thermostabilization of hygromycin B phosphotransferase from
*Streptomyces hygroscopicus***

杉本直久、高倉康彰、星野貴行、中村顕

Naohisa Sugimoto, Yasuaki Takakura, Takayuki Hoshino, Akira Nakamura

(筑波大学生命環境科学研究科)

(Grad. School of Life Environ. Sci, Univ. Tsukuba)

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

高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27 株は、絶対好気性、グラム陰性の真正細菌で、50°C ~82°Cで生育可能であり、70°C~75°Cに至適生育温度を有している。また HB27 株は、ゲノム情報も明らかにされており、自然形質転換能を有するという特徴がある。このため同株は、容易に遺伝子操作が可能な生物の中で現在最も高温で生育できる宿主菌株のひとつとして捉えられている。

T. thermophilus を用いた遺伝子操作系では、ゲノム情報を基にした遺伝子機能解析や、その生育温度の高さを活かした超好熱菌由来遺伝子の発現と機能解析、そして directed evolution による常温生物由来酵素の耐熱化などが行われている。HB27 株の宿主・ベクター系は、*Escherichia coli* など常温菌の系にはない有利な点を含んでおり、産業や基礎科学へ多大な貢献をすると考えられるが、*E. coli* の系と比較して外来遺伝子の発現量が圧倒的に少ない点や、制限修飾系によって外来遺伝子導入の効率が低下する点など、更なる改良を行う必要がある。とりわけ、*T. thermophilus* の形質転換を行う際に最も困難なのは、利用可能な抗生物質選択マーカーがカナマイシン(Km)耐性遺伝子(*htk*)のみである点であり、新たな選択マーカーの作製は *T. thermophilus* の遺伝子機能解析、外来遺伝子の導入、機能解析の効率化に必要なだけでなく、他の好熱菌、超好熱菌の宿主・ベクター系への応用も期待される重要課題である。

このような観点から、我々は様々な抗生物質耐性遺伝子を用い、*T. thermophilus* の選択マーカーとしての利用を検討した。通常抗生物質耐性遺伝子は常温菌由来であるために、コードする酵素は耐熱性が低く、好熱菌で利用できないと考えられる。そのため *T. thermophilus* で利用可能な選択マーカーを開発するには、抗生物質耐性遺伝子に酵素熱安定性を向上させる様な変異を導入する必要があるが、立体構造を基盤にした酵素の高度耐熱化は一般的にまだ難しいのが現状である。そこで我々は、*T. thermophilus* を用いた *in vivo* directed evolution により、選択マーカーを *T. thermophilus* で利用可能なレベルまで耐熱化する試みを行った。その結果、*E. coli* 由来ハイグロマイシン B (HygB)耐性遺伝子の耐熱化変異遺伝子(*hph5*)が *T. thermophilus* で機能する選択マーカーとして開発された¹⁾。同時に、*E. coli* 由来の HygB 不活化酵素(HPH)とはアミノ酸配列上相同性を示さないが、同様のリン酸基転移活性を有する *Streptomyces hygroscopicus* 由来 HygB 不活化酵素(HYG)も耐熱化できるのではないかと考え、directed evolution による高度耐熱化を試みた。

Directed evolution による HYG の耐熱化変異体の獲得

①固体培養による耐熱変異体の取得

野生型(wt)の *hyg* 遺伝子を強力プロモーターP31 の下流に接続して、*hik* を含む pT8S-P31 プラスミドベクターを用いて *T. thermophilus* HB27 株に導入し、Km 選択により形質転換体を得た。この株が HygB 耐性を示すか検討したところ、HygB (40 µg/ml)プレート上で 60°C、一晩で明確に生育を確認することができたが、65°Cでは生育することができなかった。そこで、この形質転換体約 10000 コロニーを HygB プレートに移植し、65°Cで生育するコロニーの取得を試みた。2日間培養を継続したところ、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からプラスミドを取得し、再度 HB27 株に導入して 65°Cでも HygB 耐性を示すことを確認したうえで、*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(S252P、L290M、L79F、S83L、D285N、E237K)を持つ変異体、及び L79F/S252P の 2 重変異を持つ *hyg2* を取得した。さらに、これらの株を HygB プレートにストリークし、69°Cでも HygB 耐性を示す株の選択を行ったところ、*hyg2* を元に、L290M が導入された HYG3 を取得することができた(Fig. 1)。

②DNA-shuffling による耐熱変異体の取得

上述の 65°C選択により得られたマイクロコロニーから、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、70°Cで HygB 耐性を示す株を選択したところ、HYG3 に加え G189R の変異が導入された HYG4 を取得することができた(Fig. 1)。

③変異の蓄積による高度耐熱化

hyg4 を保持する株は、固体培地上で 70°C、液体培地中では 68°Cまで HygB 耐性を示したが、既に取得した耐熱化変異、S83L、E237K、D285N を *hyg4* に対して導入することにより、更なる耐熱化が図れるのではないかと考えた。そこで、*hyg4* を元に *hyg5* (+E237K)、*hyg6-1* (+S83L、D285N)、*hyg6-2* (+E237K、D285N)、*hyg6-3* (+S83L、E237K)、*hyg7* (+S83L、E237K、D285N)を作製し HB27 株へ導入した。得られた株が液体培養で HygB 耐性を示す上限温度(*in vivo* 耐熱性)を検討したところ、どの株でも *hyg4* 保有株と比較して 1~2°Cの耐熱の上昇が認められた(Table 1)。興味深いことに、*hyg5*、*hyg6-2*、*hyg6-3* 保有株は、70°Cまで耐熱性を示したものの、これら変異株の保有する 3 種の変異(S83L、E237K、D285N)を共存させた *hyg7* 保有株では耐熱性が 70°Cから 1°C減少して 69°Cになっていた。このことから、これら 3 種の変異は独立している場合には耐熱性向上に寄与するものの、共存した場合には立体構造障害などにより逆に耐熱性を低下させてしまうことが考えられた。

④液体培養を用いた *in vivo* directed evolution による新たな耐熱化変異の取得

次に *in vivo* 耐熱性が 70°Cに上昇した *hyg6-2* 遺伝子を出発材料として、液体培養による *in vivo* directed evolution を用いて更なる耐熱化変異体の取得を試みた。同遺伝子を保持する HB27 株を 75°Cで前培養した後、HygB 液体培地に 10%接種し、*in vivo* での耐熱温度よりも 2°Cだけ高い 72°Cで培養し、HygB 耐性株の取得を試みた。すると生育速度は通常より遅れるものの、72°Cでも生育が観察された。そこで、この培養液を fresh な HygB 液体培地に 10%接種し、さらに 2°Cだけ高い 74°C培養したところ、同様に生育が観察された。この培養液中の株を分離し、*hyg* 遺伝子部分の塩基配列を決定したところ、*hyg6-2* の持つ変異に加えて、9-11 番目のアミノ酸(LDR)が重複した変異を有する *hyg9* が見出された。同様の手法を用いて 76°Cで培養した菌体より、*hyg9* に E300D

変異を新たに持つ遺伝子 *hyg10* を分離した(Fig. 1)。*hyg9*、*hyg10* 遺伝子を保持するプラスミドを改めて HB27 株に導入したところ、それぞれ 72°C、74°C まで HygB 耐性を示したので、これらの新たに得た変異により *in vivo* 耐熱性がさらに上昇したことが示された(Table 1)。

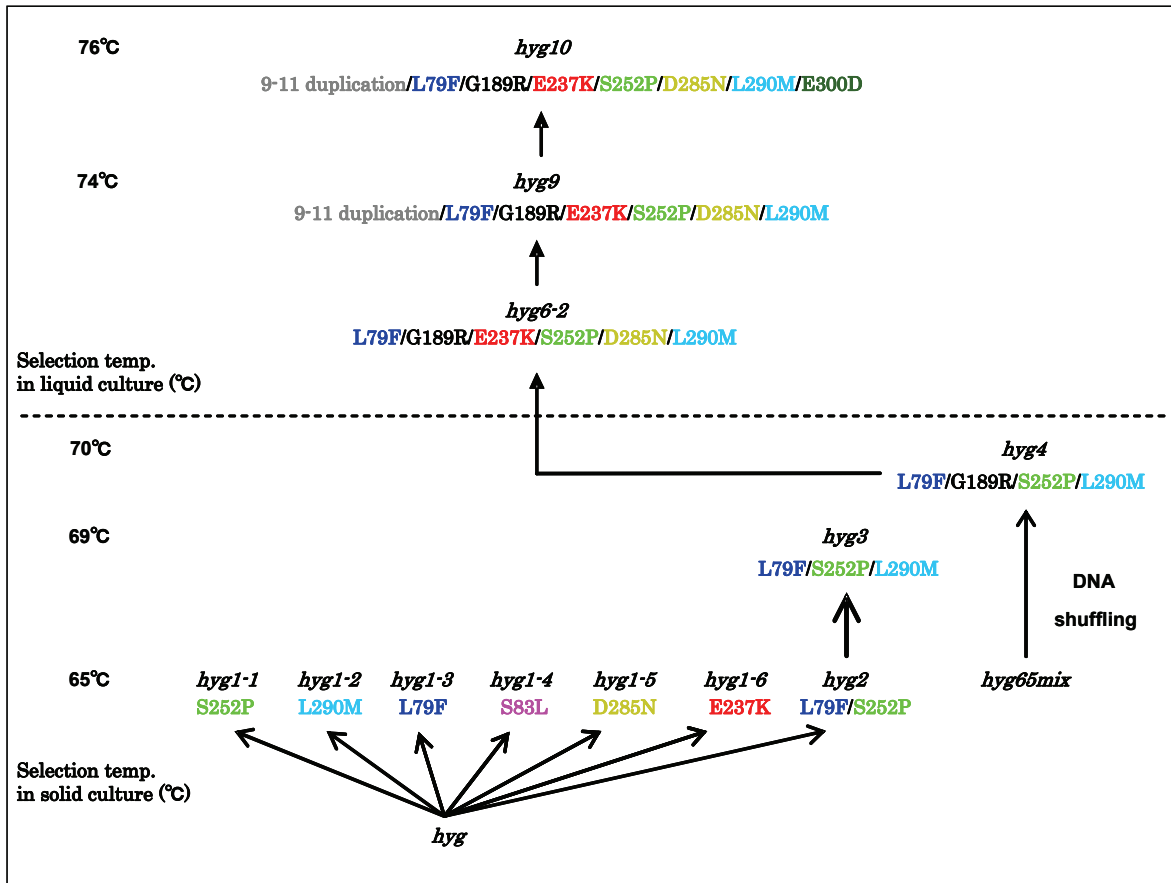


Fig. 1. directed evolution による HYG の耐熱化と取得した変異体の系譜

Table 1 *hyg* 遺伝子の変異箇所と各遺伝子保有株が液体培養で HygB 耐性を示す上限温度

Mutants	Amino acid substitutions at position									Maximum temperature (°C)
	9-11	79	83	18	23	25	28	29	30	
<i>hyg</i> (wt)	LDR	L	S	G	E	S	D	L	E	60
<i>hyg2</i>		F				P				65
<i>hyg4</i>		F		R		P		M		68
<i>hyg5</i>		F		R	K	P		M		70
<i>hyg6-1</i>		F	L	R		P	N	M		69
<i>hyg6-2</i>		F		R	K	P	N	M		70
<i>hyg6-3</i>		F	L	R	K	P		M		70
<i>hyg7</i>		F	L	R	K	P	N	M		69
<i>hyg9</i>	duplication	F		R	K	P	N	M		72
<i>hyg10</i>	duplication	F		R	K	P	N	M	D	74

野生型酵素と耐熱変異型酵素の酵素学的解析

野生型の HYG および、*in vivo* で最も高い耐熱性を示した HYG10 を、*E. coli* pET system を用いて大量発現し、Ni-NTA カラムおよびゲルろ過カラムにより精製した。精製した酵素を用いて、耐熱性を中心とした酵素活性レベルでの検討を行った。酵素活性は反応に伴う ATP の減少を、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いて定量することにより測定した。30 分間の熱処理による熱安定性を検討したところ、HYG および HYG10 の活性が半減する温度は、それぞれ 35°C、48°C であり、HYG10 は耐熱性が 13°C 向上していることが確認された。*in vivo* での耐熱性の向上は 14°C であったので、*in vivo*、*in vitro* での耐熱性がよく一致した結果となり、耐熱化は酵素レベルで起こったものと結論した。また至適反応温度を測定したところ、HYG では 45°C、HYG10 では 55°C であり、10°C の上昇が確認された。また、反応至適 pH を測定したところ、HYG は pH 4.8 では活性がなくなるのに対し、HYG10 は同じ条件である程度の活性を有しており、酸耐性も同時に獲得していることが示された。

今後は HYG10 の耐熱性についてより詳細な解析を行うと共に、結晶化・X 線結晶構造解析を通じて同酵素の立体構造を明らかにし、耐熱化メカニズムについて検討を加える予定である。

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