

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	小西 篤
論文題目	Studies on the thermostabilization of reverse transcriptases from Moloney murine leukemia virus and avian myeloblastosis virus (モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素およびトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素の耐熱化に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>逆転写酵素 (reverse transcriptase、RT) はレトロウイルスのゲノム複製に必須の酵素であり、RNA 依存性および DNA 依存性の DNA ポリメラーゼ活性と RNase H 活性 (DNA/RNA ハイブリッドの RNA を分解する活性) を有する。RT は分子生物学的研究および臨床診断において cDNA 合成反応に用いられており、反応効率、耐熱性、逆転写の正確性という観点から、モロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) 由来の RT とトリ骨髄芽球症ウイルス (AMV) 由来の RT が広く用いられている。MMLV RT は、Fingers、Palm、Thumb、Connection、RNase H の 5 つのドメインを有する分子量 75,000 のモノマーである。一方、AMV RT は、MMLV RT と同じ 5 つのドメインを有する分子量 63,000 の α 鎖と 5 つのドメインに加えて Integrase ドメインを有する分子量 95,000 の β 鎖からなるヘテロダイマーである。cDNA 合成反応は、鋳型 RNA の二次構造やプライマー同士の非特異的結合を解消させるために高温で行うことが望まれるが、RT の熱失活が問題となる。本論文は、RT による cDNA 合成反応の応用範囲の拡大を目的として、タンパク質工学により RT の耐熱性を向上させることならびにその耐熱化機構を解析した結果をまとめたものであり、以下の 3 章よりなっている。</p> <p>第 1 章では RT の鋳型プライマー (T/P) との相互作用に影響を与えると考えられた領域に正電荷の側鎖をもつアミノ酸を導入することで、MMLV RT の耐熱化を試みた。12 個のアミノ酸残基 (E69、Q84、D108、D114、E117、E123、D124、E286、E302、W313、L435、N454) を正電荷の側鎖をもつアミノ酸 (Lys、Arg) および Ala に置換した計 36 種の変異型酵素を大腸菌で作製した。このうち 24 種が野生型酵素 (WT) よりも、6 種がこれまでに知られている耐熱型酵素 D524A (RNase H 活性に必要な Asp524 が Ala に置換され、RNase H 活性が消失している) よりも高い耐熱性を有した。耐熱性を向上させる 4 種の変異を組み合わせた E286R/E302K/L435R/D524A (MM4) の 10 分間の熱処理で活性が半減する温度 (T_{50}) は 56°C であり、WT (45°C) よりも高かった。PCR で増幅産物が得られた cDNA 合成の反応温度の上限は、MM4 を用いた場合は 60°C であり、WT (54°C) よりも高温での反応が可能であった。このように、T/P との結合領域への正電荷の側鎖をもつアミノ酸の導入は、MMLV RT の耐熱化に有効であった。本章ではさらに、分子表面の疎水性残基である Val433 に変異を導入した V433R と V433K が WT よりも高い耐熱性をもつことも見出した。</p>			

第2章では、第1章で見出されたMMLV RTの耐熱化変異 E286→R、L435→R、D524→Aに相当する変異 V238→R、L388→R、D450→Aを導入することで、AMV RTの耐熱化を試みた。大腸菌の発現系では、AMV RT α 鎖と β 鎖のいずれにおいても活性を有する酵素が得られなかった。一方、昆虫細胞の発現系では α 鎖においてのみ活性を有する酵素が得られたので、本 α 鎖を用いて以下の検討を行った。変異型酵素V238R/L388R/D450A (AM4)の T_{50} は49°Cであり、WT (44°C)よりも高い耐熱性を示した。また、PCRで増幅産物が得られたcDNA合成の反応温度の上限は、AM4を用いた場合は64°Cであり、WT (60°C)よりも高温での反応が可能であった。このように、T/Pとの結合領域への正電荷の側鎖をもつアミノ酸の導入は、MMLV RTだけではなくAMV RTの耐熱化にも有効であった。

第3章では、耐熱型MMLV RTのT/Pとの親和性とRNase H活性を評価し、耐熱化機構を考察した。まず、T/Pとの親和性を評価するために、37°Cで一塩基伸長反応を行い、バーストの大きさのT/P濃度依存性を調べることで、各酵素のT/Pとの解離定数(K_d)を求めた。WTおよび第1章で得られた耐熱型酵素E286R、E302K、L435R、D524A、MM4のDNA/DNAハイブリッドであるT/Pに対する K_d は、順に 2.9 ± 0.3 、 3.5 ± 0.6 、 6.5 ± 1.2 、 5.4 ± 0.5 、 3.3 ± 0.4 、 2.9 ± 0.3 nMであり、同程度であった。また、RNA/DNAハイブリッドであるT/Pに対する K_d は、順に 2.0 ± 0.3 、 1.7 ± 0.2 、 2.9 ± 0.3 、 2.7 ± 0.4 、 2.6 ± 0.2 、 1.2 ± 0.2 nMであり、これも同程度であった。次に、RNase H活性を評価するために、鎖長と配列が異なる4種類のRNA/DNAハイブリッドを基質として37°CでRNase H反応を行った。いずれのハイブリッドにおいても、WTでは反応開始15秒後にRNAが分解されたが、E286R、E302K、L435R、D524A、MM4では、反応開始40分後においても分解されなかった。以上の結果は、E286R、E302K、L435Rの耐熱化機構は、MMLV RTとT/Pの親和力の向上によるものではなく、RNase H活性の活性部位から離れた部位に変異が導入されているにもかかわらずRNase H活性の消失に起因することを示唆した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、逆転写酵素 (RT) による cDNA 合成反応の応用範囲の拡大を目的として、タンパク質工学によりモロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) 由来の RT とトリ骨髄芽球症ウイルス (AMV) 由来の RT の耐熱性を向上させた。また、その耐熱化機構について解析した。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. MMLV RT の鋳型プライマー (T/P) との相互作用に影響を与えると考えられた領域に正電荷の側鎖をもつアミノ酸が導入された 36 種の変異型 MMLV RT を大腸菌で作製し、24 種が野生型酵素 (WT) よりも高い耐熱性を有することを見出した。耐熱化変異を組み合わせた E286R/E302K/L435R/D524A (MM4) を作製し、野生型酵素 (WT) よりも顕著に高い耐熱性を有することを示した。さらに、分子表面の疎水性残基である V433 に変異を導入した V433R と V433K が WT よりも高い耐熱性をもつことも見出した。
2. 昆虫細胞の発現系を用いて活性を有する AMV RT α 鎖を生産する系を構築した。本生産系を用いて、第 1 章で見出された MMLV RT の耐熱化変異に相当する変異が導入された変異型 AMV RT α 鎖である V238R/L388R/D450A を作製し、本酵素が WT よりも顕著な耐熱性を有することを示した。このことから、T/P との結合領域への正電荷の側鎖をもつアミノ酸の導入は、MMLV RT だけではなく AMV RT の耐熱化にも有効であることを示した。
3. WT および第 1 章で得られた耐熱型酵素 E286R、E302K、L435R、D524A、MM4 の DNA/DNA ハイブリッドおよび RNA/DNA ハイブリッドである T/P に対する K_d は同程度であることを示した。次に、RNA/DNA ハイブリッドを基質として RNase H 反応を行ったところ、WT は RNase H 活性を有するが、E286R、E302K、L435R、D524A、MM4 では本活性が欠失していることを見出した。以上のことから、E286R、E302K、L435R の耐熱化は、MMLV RT と T/P の親和力の向上によるものではなく、RNase H 活性の消失に起因することを示唆した。

以上のように、本論文は、タンパク質工学によって RT の耐熱性を向上させるとともに、その耐熱化機構について解析したものであり、酵素化学、分析化学、分子生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 27 年 1 月 9 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)