

無細胞 DNA 組換え系を用いた人工蛋白質創製技術の確立

研究代表者

美川 務 理化学研究所生命機能科学研究センター 専任研究員



1. 研究の背景と達成目標

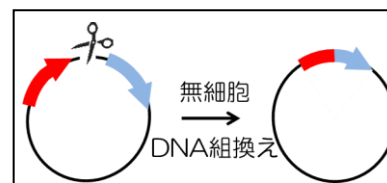
思いのままの機能を持った蛋白質を創製できれば、その技術は世の中を一変するであろう。現時点では、蛋白質を一からデザインすることは不可能だが、機能ユニットを組み合わせることで、新たな蛋白質を創製することはそれほど難しくはない。事実、生命は様々な遺伝子を組み合わせ、より複雑な機能を持った蛋白質を創出して進化してきた。DNA 相同組換え (相同組換え) 反応は時に互いに似た配列を持つ領域で DNA 組換え、新しい蛋白質を創出する。私は相同組換えに関与する蛋白質の研究を行ってきており、本プロジェクトの開始当時、試験管内で相同組換えを行うことができつつあった。そこで、本プロジェクトでは、試験管内に相同組換え系を再構成し、無細胞蛋白質合成系と組み合わせることにより、生命が行うのと同じ方法で蛋白質の創製を試みることを目標とした。具体的な対象蛋白質としてはスクリーニングが容易なセルラーゼを選択し、様々な条件下 (高温、強酸下、高圧下など) で働くセルラーゼの獲得を目指すことにした。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・相同組換えに必要な蛋白質群を調製し、主に加える蛋白質の量をコントロールすることにより、高効率の無細胞 DNA 組換え系の確立に成功した。同じプラスミド上に 2 つの遺伝子を載せ、その組換え効率を確認したところ、1 回の操作で 150 近い無細胞 DNA 組換えを確認できた。このことは、本手法により簡単な操作で多くの人工遺伝子を発生させられることを意味しており、そのインパクトは大きいと考えられる。
- ・実際に超好熱菌及び常温菌由来のセルラーゼ遺伝子を準備し、無細胞 DNA 組換え系を用いて新規セルラーゼ遺伝子を発生させた。そして、最終的に 44 種の新規セルラーゼの獲得に成功した。このことは、本手法により簡単な操作で多くの人工蛋白質を発生させられることを意味しており、そのインパクトは大きいと考えられる。
- ・超好熱菌のセルラーゼは常温では働かず、常温菌のセルラーゼは高温では働かない。これら遺伝子が無細胞 DNA 組換え系で混合することにより、常温で活性を保持しつつ耐熱化された新規セルラーゼ 19 種を得ることに成功した。このことは得られた多くの人工蛋白質が機能することを示しており、本手法が酵素を扱う多分野において役立つ技術に発展すると考えられる。

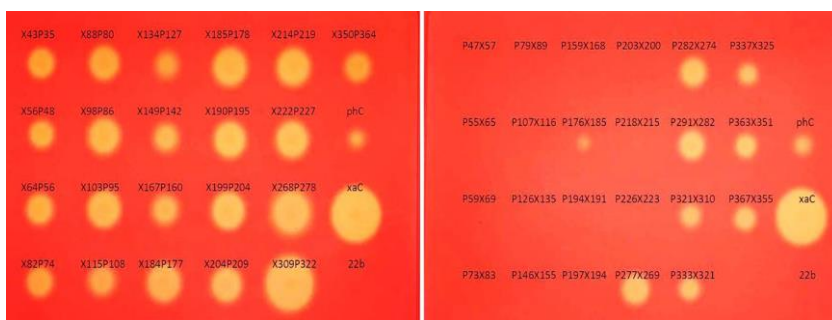
3. 研究成果

その塩基配列の相同性が約 70% である超好熱菌 *Pyrococcus* 及び常温菌 *Xanthomonas* 由来のセルラーゼ遺伝子を準備した。これらを右図のように同一プラスミド上に並べ、両遺伝子間を制限酵素で切断した。そこに、相同組換えに関与する酵素群を加えることにより試験管内でキメラセルラーゼ遺伝子を発生させた。それぞれのキメ



ラ遺伝子を分離してシーケンスを確認した結果、N 末端側に *Xanthomonas* C 末端側に *Pyrococcus* のセルラーゼ遺伝子を並べたものから創出したキメラセルラーゼ (XP 系列) では 21 箇所、逆に並べたもの (PX 系列) では 23 箇所組換わっていた。組換えが生じた部分はいずれも相同性の高い部分であったが、全領域にまんべんなく渡っていた。驚くべきことに、組換えによってフレームシフトが生じて遺伝子が破壊されているものはひとつも確認されなかった。次に、得られたキメラ遺伝子からキメラセルラーゼを発現させ、そのセルラーゼ活性をセルロースの誘導体であるカルボキシメチルセルロース (CMC) プレートに対するプラーク形成により評価した (右図)。

XP 系列ではすべてのキメラで活性が確認され、かなり C 末端領域側で *Pyrococcus* のセルラーゼに組換わる2種以外はすべてのキメラセルラーゼで耐熱化が確認された。PX 系列に関してはフレームシフトが無いにもかかわらず、23 種中 14 種が活性を失っていたが、残りのほとんどは常温で野生型よりも高い活性を示した。以上のように、セルラーゼ遺伝子では、試験管内相同組換え系と無細胞蛋白質合成系を用いて無数のキメラセルラーゼを発生させ、希望する条件下で活性の強いセルラーゼをスクリーニングできることが確認された。



CMC プレートによるセルラーゼ活性の評価。左が XP 系列、右が PX 系列、組換わったアミノ酸の位置の番号を表記。phC, *Pyrococcus* のセルラーゼ遺伝子産物、xaC, *Xanthomonas* のセルラーゼ遺伝子産物、22b, セルラーゼ遺

するプラーク形成により評価した (右図)。XP 系列はすべてのキメラで活性が確認され、かなり C 末端領域側で *Pyrococcus* のセルラーゼに組換わる2種以外はすべてのキメラセルラーゼで耐熱化が確認された。PX 系列に関してはフレームシフトが無いにもかかわらず、23 種中 14 種が活性を失っていたが、残りのほとんどは常温で野生型よりも高い活性を示した。以上のように、セルラーゼ遺伝子では、試験管内相同組換え系と無細胞蛋白質合成系を用いて無数のキメラセルラーゼを発生させ、希望する条件下で活性の強いセルラーゼをスクリーニングできることが確認された。

4. 今後の展開

今後はセルラーゼだけでなく、他の遺伝子セットなどを用いて本手法の検証を進めていく。また、相同性の低い遺伝子間ではどうなるのか、あるいは部分的に相同性は高いが全く異なる遺伝子間からはどのような新規蛋白質が生じるかなども調べていきたい。また、本手法では組換えにより遺伝子が破壊されている例はひとつも確認されなかった。このことから、遺伝子にはどこで組換われればよいのかを知らせる未知の情報が埋め込まれている可能性もある。その点についても追及していきたいと考えている。

5. 発表実績

- [1] A specific single-stranded DNA induces a distinct conformational change in the nucleoid-associated protein HU, Y. Nishida, T. Ikeya, T. Mikawa, J. Inoue, Y. Ito, Y. Shintani, R. Masui, S. Kuramitsu and S. Takashima, *Biochem Biophys Res.*, **8**, 318-324 (2016)
- [2] Homologous joints are formed by RecA-dimer as minimum multimer without filament-formation, T. Shinohara, Y. Iikura, M. Kasagi, T. Masuda-Ozawa, Y. Yamaguchi, T. Shibata and T. Mikawa, The 10th International 3R (DNA Replication, Recombination, and Repair) Symposium, Nov13-17, 2016, Matsue
- [3] 出芽酵母 Rad51 の N 末端領域の機能について、田辺真太郎、新井直人、新宮良宣、美川務、柴田武彦、第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30, 12 月 1, 2 日、横浜市
- [4] RecA/Rad51 による正確な DNA 修復維持機構、柴田武彦、新井直人、篠原昶、廣田耕志、美川務、第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2017 年 11 月 27, 28, 29 日、岐阜市
- [5] RecA/Rad51 によるゲノム維持の分子基盤、柴田武彦、新井直人、此村直人、篠原昶、廣田耕志、美川務、第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会、2017 年 12 月 20, 21, 22 日、西尾市
- [6] RecA requires two molecules of Mg²⁺ ions for its optimal strand exchange activity in vitro, R. Kim, S. Kanamaru, T. Mikawa, C. Prévost, K. Ishii, K. Ito, S. Uchiyama, M. Oda, H. Iwasaki, S. K. Kim and M. Takahashi, *Nucleic Acids Research*, **46**, 2548–2559 (2018)