

D305

大腸菌の増殖に及ぼす組み換え PCNA 発現の影響

(中央大理工)○(学)鈴木 里沙・(東大工)(正)平川 秀彦・(中央大理工)石井 洋一・(東大工)(正)長棟 輝行*

【緒言】

生体内では、複数の酵素による多段階反応が行われており、脂肪酸合成酵素などによる脂肪鎖の伸長反応は各酵素が複合体を形成することにより高効率な反応を触媒している。また、リン酸化シグナル伝達を担うプロテインキナーゼでは、タンパク質間相互作用を強めるために酵素を足場タンパク質に結合させてタンパク質同士の空間配置や配向を制御している。最近、Acetyl-CoA からメバロン酸への人工的な多段階反応系において、複数の酵素の空間配置を制御することによりメバロン酸の生産効率の向上が可能であるということが報告されている。したがって、反応に関与する酵素やタンパク質の空間配置をナノメートルスケールでのコントロールを可能にする足場タンパク質の構築は、多段階酵素反応の反応効率を向上させ、その菌体内利用は生体触媒としての機能向上に有効であると考えられる。

本研究では、リング状タンパク質である *Sulfolobus solfataricus* 由来核内増殖抗原(PCNA)を人工的な足場タンパク質として利用することに着目した。*S. solfataricus* は3つのPCNA遺伝子を有し、それらはヘテロ三量体を形成する。各サブユニットのC末端は同じ方向に露出しているため、C末端に多段階反応に関わる酵素やタンパク質を融合し、それぞれを近接させることにより反応効率の向上が期待できる。しかし、PCNAリングの内側にはDNAとの安定的な結合に寄与している塩基性アミノ酸が多数存在するため、大腸菌内で利用する場合、ゲノムDNAと結合して、内在性のDNA結合タンパク質とDNAとの結合を阻害し、毒性を示す可能性がある。そこで本研究では、PCNAの発現が与える大腸菌の増殖への影響と、DNAとの結合に関わるPCNAのアミノ酸残基の特定を試みた。

【結果及び考察】

pET15b に PCNA の遺伝子を挿入し、発現ベクター pPCNA1, pPCNA2, pPCNA3 を得た。それぞれの発現ベクターで形質転換した BL21 Star (DE3) pLysSRARE は、IPTG 誘導により PCNA を発現することを確認した。形質転換した大腸菌をグルコース添加または非添加の LB 培地で 16 時間培養した後、コロニー形成能により大腸菌に対する毒性評価を行った。グルコースを添加し PCNA の発現を抑えると、非添加培地よりも多くのコロニーが形成した。したがって PCNA の発現は大腸菌に対して毒性を有することが明らかとなった。次に、PCNA の発現が大腸菌の増殖速度に与える影響を調べた。IPTG 非添加培

地と比べて、IPTG 添加培地で PCNA を発現させた場合では、対数増殖期における倍化時間は PCNA1 では約 1.6 倍、PCNA2 では約 1.3 倍、PCNA3 では約 1.3 倍長くなり(Fig. 1)、PCNA は大腸菌の増殖速度を低下させることが明らかとなった。さらにこの結果は、PCNA1 は PCNA2, 3 よりも DNA に結合しやすいことが示唆している。また、表面プラズモン共鳴測定により二重鎖 DNA と PCNA1 は相互作用することを確認した。したがって、PCNA はゲノム DNA に結合し、大腸菌の増殖を阻害すると考えられる。

次に、PCNA リングの内側に存在する塩基性アミノ酸残基(リジン又はアルギニン)を酸性アミノ酸(グルタミン酸)に置換した変異体を作製した。変異体の発現ベクターで形質転換した大腸菌を用い、コロニー形成能によって大腸菌に対する変異体の毒性を評価した。PCNA1 では、R213E 変異体が野生型よりも多くのコロニーを形成し、毒性低下に最も効果的であった。PCNA2 では、R17E と K85E の単変異体で毒性低下が見られ、R17E/K85E の多重変異体ではさらに毒性が低下した(Fig. 2)。以上より、PCNA リングの内側に存在する塩基性アミノ酸残基は、大腸菌に対する毒性に大きく関与していることが明らかとなった。

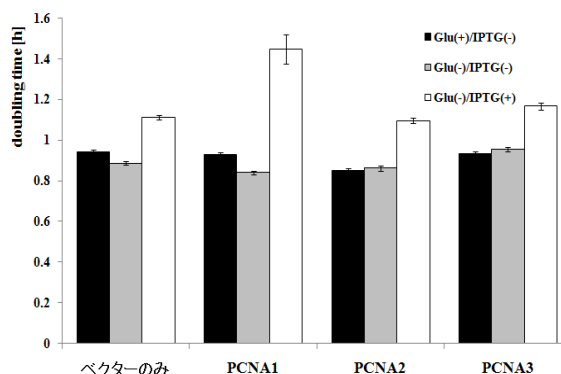


Fig. 1 PCNA 毒性評価 (2 倍増殖期比較)

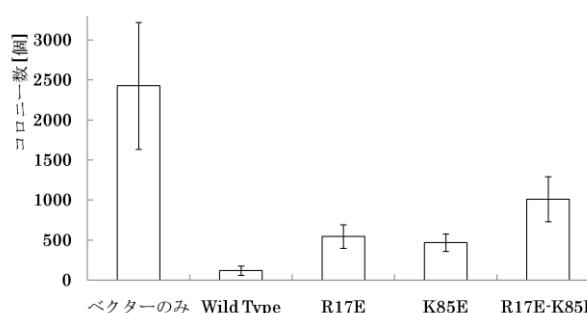


Fig. 2 PCNA2 の 16 時間後の菌体生存量

* E-mail: nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp