

大腸菌を用いたトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素 生産技術の開発

野 口 惇*¹
牧 野 友理子*²
佐 藤 寛*³
井 出 輝 彦*⁴

Production of Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase in *Escherichia coli*

Atsushi NOGUCHI
Yuriko MAKINO
Hiroshi SATO
Teruhiko IDE

Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase, one of the important enzymes in biotechnology, is used for diagnostics of infectious disease such as COVID-19 and tuberculosis, as well as for research use. The mature form of AMV reverse transcriptase is $\alpha\beta$ heterodimer, and consists of a β subunit and an α subunit that is a cleavage product of the β subunit. In this study, we have developed a new and unique production method of AMV reverse transcriptase $\alpha\beta$ heterodimer, using the recombinant *Escherichia coli* transformed by the plasmid containing the β subunit gene without the α subunit gene.

The AMV reverse transcriptase β subunit gene was optimized for codon-usage of *E. coli*, and expressed in *E. coli* W3110 strain without co-expression of the gene coding chaperon protein. Long-time cultivation over 70 hours promoted the formation of the α subunit from the β subunit, and the production of the $\alpha\beta$ heterodimer. The $\alpha\beta$ heterodimer produced in the recombinant *E. coli* was highly purified by two-step column chromatography. The activity of the purified $\alpha\beta$ heterodimer was similar to that of the native one in a diagnostic test for infectious disease.

Our method can effectively produce the active-form AMV reverse transcriptase, and will contribute to human health by a stable supply of diagnostic reagents.

1. 諸言

トリ骨髄芽球症ウイルス (Avian Myeloblastosis Virus、以下 AMV) 逆転写酵素は、RNA を鋳型とし

て DNA を合成する逆転写酵素の一種であり、バイオテクノロジーの分野において重要なツールとなっている。当社では、AMV 逆転写酵素を用いてウイルスや細菌の RNA を迅速・簡便・高感度に検出する TRC 法¹⁾を開発し、新型コロナウイルスや結核菌などの感染症検査に貢献している。

TRC 法は、AMV 逆転写酵素と T7 RNA ポリメラーゼ (RNA 合成酵素) によって標的 RNA を増幅する

* 1 ライフサイエンス研究所 バイオプロセスグループ
* 2 ライフサイエンス研究所 生物機能工学グループ
* 3 バイオサイエンス事業部 第二開発部 遺伝子グループ
兼 ライフサイエンス研究所 装置開発グループ
* 4 ライフサイエンス研究所

TRC (Transcription - Reverse transcription - Concerted) 反応と、増幅 RNA へ特異的に結合することにより蛍光を発する INAF (Intercalation Activating Fluorescence) プローブを組み合わせた方法であり、標的 RNA の増幅と検出を 1 つの容器内で同時に行うことが可能である (Fig. 1)。同様の用途で用いられる PCR 法は、反応温度の昇降を繰り返す必要があるのに対し、TRC 法は一定温度 (46°C) で反応を進めることができ、迅速・簡便な検査を可能としている。

AMV 逆転写酵素には、95 kDa の β サブユニットと 65 kDa の α サブユニット (β サブユニットの N 末端側の配列と相同) の 2 種類のサブユニットが存在し、 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体 ($\alpha\beta$ 体) や $\beta\beta$ ホモ二量体 ($\beta\beta$ 体) などを形成する²⁾ が、TRC 反応には $\alpha\beta$ 体が適している³⁾。

AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体の生産方法として、トりに AMV を感染させてウイルスを増殖させ、ウイルス粒子から AMV 逆転写酵素を抽出する方法が知られている⁴⁾。AMV のゲノム上には AMV 逆転写酵素 α 体のみをコードする遺伝子領域は存在せず、 β 体をコードする遺伝子領域が翻訳されて $\beta\beta$ 体が生産された後、部分的な開裂によって $\alpha\beta$ 体が形成される²⁾。前述のウイルスを用いた生産方法では、ウイルス本来の仕組みを用いて AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体を効率的に取得することができるが、ウイルスの複製機構は正確性が低く AMV 逆転写酵素遺伝子に突然変異が生じるリスクがあり、工業的に均質な AMV 逆転写酵素を大量に生産するには不向きである。

一方、遺伝子を安定的に保持可能な大腸菌を用いて、AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体を生産する方法も報告されている⁵⁾。この方法では、遺伝子組換え技術を用いて、

AMV 逆転写酵素の α 体をコードする遺伝子および β 体をコードする遺伝子を同一の宿主大腸菌へ導入し、各遺伝子から α 体ポリペプチド・ β 体ポリペプチドをそれぞれ発現させて $\alpha\beta$ 体を形成させる。しかしながら、大腸菌での生産では、発現した AMV 逆転写酵素の約 90% が正しい立体構造を形成できずに不溶化してしまう⁶⁾。また、立体構造の形成を補助するシャペロンタンパク質との共発現により、活性型 AMV 逆転写酵素の生産性を向上させることができるが、シャペロンタンパク質は AMV 逆転写酵素との分離精製が難しく、精製 AMV 逆転写酵素へのコンタミネーションが懸念される。

そこで、我々は新たに、大腸菌を用いたシャペロンタンパク質不要の AMV 逆転写酵素生産技術を開発したので報告する⁷⁾。驚くべきことに、我々の方法では、AMV 逆転写酵素 β 体をコードする遺伝子のみで、遺伝子組換え大腸菌体内で $\alpha\beta$ 体を効率的に生産することが可能であった。本技術により、AMV 逆転写酵素の大量生産を可能とし、感染症検査試薬の安定供給を通じて、すべての人の健康と福祉に貢献することを目指している。

2. 方法

[1] 発現用プラスミドベクターの構築

AMV 逆転写酵素 β 体のアミノ酸配列情報を元に、大腸菌のコドン使用頻度に合わせて最適化した AMV 逆転写酵素 β 体をコードするポリヌクレオチド配列 (AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子) を設計した。設計に基づき、DNAWorks 法⁸⁾ を用いて、120 種類のプライマーから全長の AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子を作製し

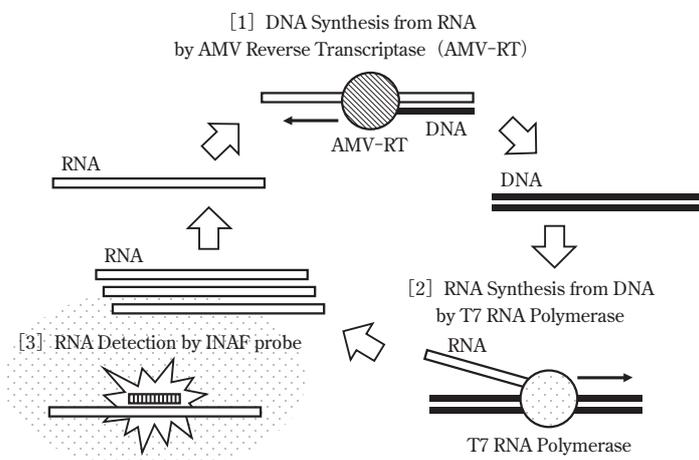


Fig. 1 TRC method

た。作製した AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子を、プラスミドベクター pTrc99A の trc プロモーター下流に挿入し、発現用プラスミドベクター pTrcAMVB を構築した。同様に、コドン最適化を行わない天然型 AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子を挿入した発現用プラスミドベクター pTrcAMVBwild も構築した。

構築した発現用プラスミドベクターを用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、LB 培地での AMV 逆転写酵素の生産性を評価した。

[2] 宿主大腸菌の検討

発現用プラスミドベクター pTrcAMVB を用いて、種々の大腸菌株を形質転換することで、AMV 逆転写酵素生産大腸菌を作製した。得られた形質転換体を、カルベニシリンナトリウムを含む $2 \times$ YT 培地に植菌し、 37°C で振とう培養した。光学密度 (OD) が約 0.5 になるまで大腸菌を増殖させた後、終濃度 5 mM となるように IPTG を添加し、 25°C で 45 時間培養を継続した。その後、遠心分離により菌体を回収し、湿菌体量の 5 倍の破砕バッファー (20 mM Tris-HCl、10% グリセロール、1 mM ジチオトレイトール、0.2% Triton[®] X-100、pH7.4) に懸濁して超音波破碎を行った。遠心分離により菌体残渣を除去して抽出液を調製し、抽出液中の AMV 逆転写酵素の活性を TRC 法によって測定した。

[3] AMV 逆転写酵素生産大腸菌の培養

発現用プラスミドベクター pTrcAMVB で形質転換した大腸菌 W3110 株を、カルベニシリンナトリウムを含む $2 \times$ YT 培地へ植菌し、 37°C で 1 晩前培養した。前培養液 35 mL を、5 L 培養槽 (サクラ精機製) に調製したカルベニシリンナトリウムを含む生産用培地 3.5 L へ植菌し、 37°C で培養した。培養開始から 3 時間後、培養温度を 25°C に下げ、終濃度 5 mM となるように IPTG を添加した。なお、培養中は適宜 pH や通気攪拌などの制御を行った。

[4] AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体の精製

培養槽を用いて調製した菌体を超音波破碎し、遠心分離により菌体残渣を除去して抽出液を調製した。抽出液にストレプトマイシンを添加し、得られた沈殿を再溶解することで粗精製を行った。粗精製液へ硫酸ナトリウムを添加後、TOYOPEARL[®] PPG-600M (東ソー製) を充填したカラムを用いて精製し、透析により脱塩を行った。続いて、回収したサンプルを P11 phosphocellulose (Cytiva 製) を充填したカラムへア

プライし、塩化ナトリウム濃度 0 M から 1.0 M へのリニアグラジエントで溶出した。溶出画分を SDS-PAGE 法で分析し、AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体が含まれる画分を回収した。回収した精製 AMV 酵素は、適宜バッファー交換や濃縮を行い、各種分析へ供した。

[5] TRC 法による AMV 逆転写酵素の活性評価

AMV 逆転写酵素の活性評価は、TRC 法によるノロウイルス RNA 検出試薬を用いて、陽性標準 RNA (*in vitro* で合成・精製した濃度既知のノロウイルス RNA) を測定することで行った。測定は、温調機能付き蛍光分光光度計 TRCRapid[®]-160 (東ソー製) を用いて蛍光強度の変化を 20 ~ 30 分間モニタリングすることで行い、蛍光測定値が初期蛍光値の 1.2 倍になった時間を検出時間とした。

3. 結果と考察

[1] 発現用プラスミドベクターの構築

DNAWorks 法を用いて、AMV 逆転写酵素 β 体のアミノ酸配列情報を元に、大腸菌でのコドン使用頻度に合わせて最適化したポリヌクレオチド配列を合成した⁹⁾。AMV 逆転写酵素 β 体のアミノ酸配列は、天然型バリエーションとして GenBank No. AAB31929 や特開 2002-315584 号公報の配列番号 7 が知られている。両者では 3 ヶ所のアミノ酸が異なっているが、本研究では後者のアミノ酸配列を用いた。大腸菌のコドン使用頻度に最適化したポリヌクレオチド配列と天然型ポリヌクレオチド配列の相同性は、74% であった¹⁰⁾。

合成した AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子をプラスミドベクター pTrc99A に挿入し、発現用プラスミドベクター pTrcAMVB を作製した。DNA シーケンス解析により、pTrcAMVB の塩基配列が設計通りであることを確認した。

得られた発現用プラスミドベクターを用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、SDS-PAGE 法で AMV 逆転写酵素の発現量を評価した。天然型コドンの AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子からはほとんど発現が認められなかったのに対し、大腸菌型コドンに最適化した AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子では顕著な AMV 逆転写酵素 β 体の発現を確認することができた。

[2] 宿主大腸菌の検討

発現用プラスミドベクター pTrcAMVB を用いて種々の大腸菌株を形質転換し、AMV 逆転写酵素の生産性を評価した¹¹⁾。大腸菌抽出物を用いて TRC 法で

陽性標準 RNA を測定したところ、大腸菌 W3110 株、JM101 株、GM31 株、HB101 株、MV1184 株などを宿主として用いた場合に、比較的短時間で検出を行うことができ、良好に AMV 逆転写酵素を発現していることが確認できた (Fig. 2)。一方、タンパク質生産用途で汎用される、タンパク質分解酵素が欠損した大腸菌 BL21 株を用いた場合は、抽出物を用いた TRC 法で陽性標準 RNA を検出できず、AMV 逆転写酵素の生産性が低いことが示された。

[3] AMV 逆転写酵素生産大腸菌の培養

発現用プラスミドベクター pTrcAMVB により形質転換した大腸菌 W3110 株 (AMV 逆転写酵素生産菌) を用いて、5 L 培養槽での AMV 逆転写酵素の培養生産を行った。前培養液を植菌後、37°C で 3 時間培養した後、培養温度を 25°C に下げて IPTG を添加することで AMV 逆転写酵素の発現を誘導した。AMV 逆転写酵素生産菌の生育は、培養開始から 24 時間以内に定常期に達し、その後培養開始から 90 時間以上経過しても同等の菌体濃度が維持された¹²⁾。一方、TRC 法による菌体抽出物の分析では、培養開始から 20 時間後以降に徐々に活性が増加し、70 時間以上培養を継続することで顕著な活性の増加が確認された。一般的な大腸菌の培養時間 (24 時間以内) と比べて長時間の培養を行うことで、AMV 逆転写酵素 β 体から α 体への分解が促進され、活性が向上したものと考察している。

[4] AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体の精製

約 100 時間の培養を行った菌体から AMV 逆転写酵素を抽出し、ストレプトマイシン沈殿法による粗精製、TOYOPEARL® PPG-600M および P11 phosphocellulose によるカラムクロマトグラフィー精製を行った。P11 phosphocellulose を用いたカラムク

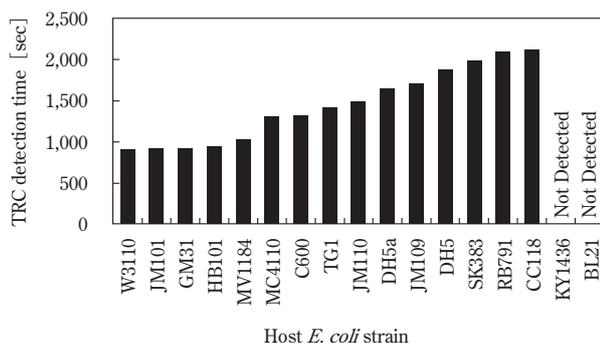


Fig. 2 Detection time of the TRC reaction using the extracts from the various host *E. coli* strains

ロマトグラフィーでは、3つの溶出ピークが確認された (Fig. 3 a)。各ピークに対応するフラクションを SDS-PAGE で分析したところ、ピーク 1、2、3 はそれぞれ α 体、 $\alpha\beta$ 体、 β 体に対応していることが分かった (Fig. 3 b)。各フラクションの活性を TRC 法で測定したところ、ピーク 2 が最も高い活性を示した (Fig. 3 c)。以上の結果から、本技術では、大腸菌の菌体内において AMV 逆転写酵素 β 体が部分的に分解されて α 体となり、活性型の $\alpha\beta$ 体を形成していることが示された。

続いて、得られた AMV 逆転写酵素 α 体および β 体のアミノ酸配列解析を実施した。N 末端側のアミノ酸配列は α 体と β 体で同一であり、遺伝子配列から予測されるものと一致することが確認された。一方、 α 体の C 末端アミノ酸配列を LC/MS/MS 法で分析すると、 β 体の 572 位のアラニン (開始コドンのメチオンを 1 位とする、以下同様) と 573 位のチロシンの間で切断されて α 体が形成されていることが判明した。天然型の AMV 逆転写酵素 α 体は、 β 体の 573 位のチロシンと 574 位のプロリンとの間で切断されて形成さ

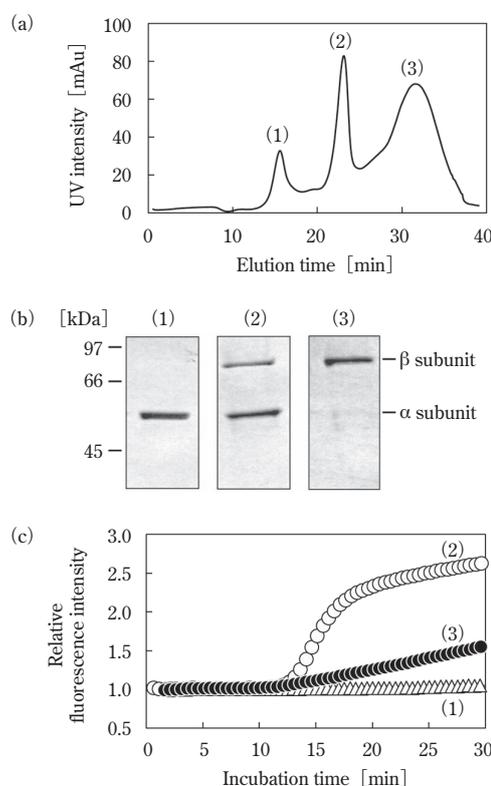


Fig. 3 Purification of AMV reverse transcriptase by P11 phosphocellulose column chromatography

- (a) Elution profile of AMV reverse transcriptase from P11 phosphocellulose column chromatography
 (b) SDS-PAGE analysis of each fraction corresponding to the peak 1, 2 and 3
 (c) RNA amplification activity of the fractions analyzed by TRC method

れることが知られている⁶⁾。作用するプロテアーゼの相違などによって切断部位が若干変化したものと考察している。

最後に、本技術に従い大腸菌で生産した AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体と、ウイルスから抽出した天然型 AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体 (Life Sciences Advanced Technologies 製) の活性を比較した。TRC 法による陽性標準 RNA の測定において、両者でほぼ同等の活性を確認することができ、AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子のみを導入した遺伝子組換え大腸菌を用いて、天然型と同等の活性を持つ AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体を生産できることが示された (Fig. 4)。

4. まとめ

以上のとおり、遺伝子組換え大腸菌を用いた新規な AMV 逆転写酵素の生産技術を開発した。我々の方法では、AMV 逆転写酵素遺伝子のコドン最適化や宿主大腸菌株の最適化により AMV 逆転写酵素の生産性を向上させているため、AMV 逆転写酵素との分離精製が難しいシャペロンタンパク質との共発現は不要である。また、AMV 逆転写酵素 β 体遺伝子のみを導入した遺伝子組換え大腸菌を比較的長期間培養することで、 β 体から α 体への分解を促進し、AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体の生産性を向上させている。そのため、比較的簡便な培養・精製プロセスにより、高純度な AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ 体を効率的に生産することが可能である。

本技術により得られた遺伝子組換え AMV 逆転写酵素は、ウイルス粒子から抽出・精製される天然型 AMV 逆転写酵素と同等の活性を有し、TRC 法による感染症検査へ利用できる。AMV 逆転写酵素の効率的な生産を通じて、感染症検査試薬の普及や安定供給へ寄与することが期待される。

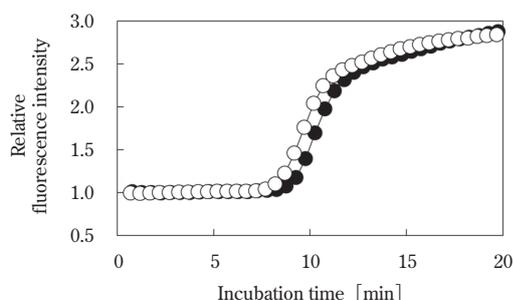


Fig. 4 RNA amplification activity of the recombinant and native AMV reverse transcriptase analyzed by TRC method

Open circle: recombinant AMV reverse transcriptase $\alpha\beta$ heterodimer,
closed circle: native AMV reverse transcriptase

5. 参考文献

- 1) T. Ishiguro *et al.*, *Anal. Biochem.*, **314**(1), 77 (2003)
- 2) B. Perbal, *Retrovirology*, **5**, 49 (2008)
- 3) 特許第 4329365 号
- 4) G. E. Houts, *et al.*, *J. Virol.*, **29**(2), 517 (1979)
- 5) 特開 2002-315584 号公報
- 6) D. A. Soltis, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3372 (1988)
- 7) Y. Makino, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**(6), 1464 (2021)
- 8) D. M. Hoover, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **30**(10), e43 (2002)
- 9) 特開 2012-120506 号公報
- 10) F. Madeira *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **50**, W279 (2022)
- 11) 特開 2013-146235 号公報
- 12) 特許第 6107101 号

TOYOPEARL[®]、TRCRapid[®] は東ソー株式会社の商標です。

Triton[®] はザ・ダウ・ケミカル・カンパニー (Dow) またはダウの関連会社の商標です。

