

第4章 *Photobacterium damsela* JT0160株の生産する β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子のクローニング及びその組換え体蛋白質の発現

4.1. 緒論

1987年に、精製酵素に対するポリクローナル抗体を用いてラット肝臓由来のGal β 1-4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子が、Weinsteinらによりクローニングされ[47]、さらに1992年にはGal β 1-3GalNAc α 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子及びGal β 1-3(4)GlcNAc α 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子がクローニングされ[37, 41]、現在までに10種類以上の動物由来シアル酸転移酵素遺伝子がクローニングされている[58]。これまでにクローニングされた動物由来のシアル酸転移酵素ファミリーの推定一次アミノ酸配列の比較・解析から、これら酵素の触媒部位と考えられる部分に45アミノ酸残基からなる"シアリルモチーフL"[41]、及び23アミノ酸残基からなる"シアリルモチーフS"[109]と呼ばれる、高度に保存された領域が存在することが明らかになっている (Fig. 4-1)。さらに、"シアリルモチーフL"はシアル酸転移酵素ファミリーの共通の糖供与体であるCMP-シアル酸の結合部位であることも明らかになっている[110]。また、これまでにクローン化されたシアル酸転移酵素遺伝子から推定される一次構造から、動物由来のシアル酸転移酵素は他の動物由来の糖転移酵素と同様にII型の膜結合トポロジーを有し (Fig. 4-2)、N末端の短い細胞質領域、膜結合領域、ゴルジ内腔幹領域と酵素蛋白質のC末端部分からなるゴルジ内腔活性領域からなるものと考えられて

Sialylmotif L (44-45 amino acids)		Residues
1	CRRCAVVGNSGNLKDSSYGPEIDSHDFVLRMNKAPT-VGFEADVGSRT THHLVYPE	(142-190)
2	CRRCAVVGNSGNLRGSSYGQEVDSHDFIMRMNDAPT-VGFEKDVGSR TTHFMYPE	(155-203)
3	WGRCAVVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFNQAPT-ANFQQDVGTKT TIRLMNSQ	(187-235)
4	LKKCAVVGNGGILLKSSGGRQIDEANFVMRCNLPPLSSEYTKDVGSKS QLVTANPS	(141-190)

Sialylmotif S (23 amino acids)		Residues
1	GRYPSTGILSIIIFSIIHCDEVDLYGFGADSK	(269-299)
2	GRYPSTGMLVLFALHVCDEVNVYGF GADSR	(282-312)
3	PNPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEF LPSKR	(324-354)
4	AKRLSTGLFLVSAALGLCEEVAIYGF WPFSV	(278-308)

Fig. 4-1 シアリルモチーフのアミノ酸配列

動物由来シアル酸転移酵素の”シアリルモチーフL”、“シアリルモチーフS”のアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列左横の数字は酵素とその起源を示し、右横はアミノ酸残基数を示す。以下、STはシアル酸転移酵素を示す。1; α 2,3-ST, マウス, 2; α 2,3-ST, マウス, 3; α 2,6-ST, ヒト, 4; α 2,8-ST, ヒト, (文献109より引用、一部改変)

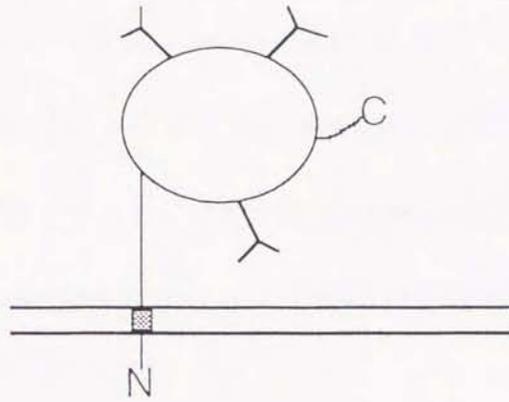


Fig. 4-2 これまでにクローニングされた動物由来シアル酸転移酵素のトポロジー

これまでにクローニングされた動物由来のシアル酸転移酵素の推定一次アミノ酸配列から、いずれのシアル酸転移酵素も他の動物由来の糖転移酵素と同様にII型の膜結合トポロジーを有し、N末端の短い細胞質領域、膜結合領域、ゴルジ内腔幹領域及び酵素蛋白質のC末端側に存在する活性領域からなると推定されている。

いる[58, 111]。

これまでに、STase 0160 以外の細菌由来シアル酸転移酵素は精製されてはいないが、1991年に *Escherichia coli* K-1 より α 2,8-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子が[33]、また1996年には *Neisseria meningitidis* 及び *Neisseria gonorrhoeae* より α 2,3-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子が[34]、それぞれクローニングされている。これらの推定一次アミノ酸配列と動物由来のシアル酸転移酵素ファミリーとの相同性解析の結果から、これらの間には相同性が認められないことが明らかにされている。

近年の遺伝子工学の進展に伴い、有用な蛋白質をコードする遺伝子を発現プラスミドに組み込み、その発現プラスミドで大腸菌や酵母等の微生物を形質転換し、目的とする蛋白質を大量に発現させることは、既に一般的な技術となっている。さらに、この技術を用いて本来の酵素が持つ基質特異性を改変した酵素蛋白質の生産や、膜結合型酵素を可溶性酵素として生産する等のことも可能になっている。STase 0160 は、細菌より初めて精製された β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素である。第2章及び第3章で、その酵素化学的性質や糖受容体基質特異性等を明らかにしてきたが、STase 0160 の一次構造及び高次構造に関する知見はほとんど得られていない。従って、STase 0160 をコードする遺伝子をクローニングし、そのDNA塩基配列を決定することにより、本酵素の一次構造や、酵素蛋白質分子の構造に関する知見が得られると期待される。また、STase 0160 を *P. damsela* JT0160 の菌体より可溶化するために、界面活性剤の添加が必

須であったことから、本酵素は膜結合型酵素と考えられた。従って、STase 0160の膜結合領域を明らかにして、その膜結合領域を欠損させた組換え体酵素を生産することにより、可溶性酵素の生産も可能になると考えられる。そこで、精製した本酵素の部分アミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列に基づいて、STase 0160 をコードする DNA 配列をもつオリゴヌクレオチドを合成し、本酵素をコードする遺伝子 (*bst*) のクローニングを試みた。

本章では、STase 0160 遺伝子のクローニング及び DNA 塩基配列の決定、また、その遺伝子や酵素蛋白質の構造、さらにこのクローニングした遺伝子の*大腸菌*での発現と本酵素の可溶化について述べる。

4.2. 実験材料及び方法

4.2.1. 試薬

ギガパック II パッケージングイクストラクト、 λ Dash II/BamHI ベクターキット、*Escherichia coli* XL-1Blue MRA (P2) はストラタジーン社 (カリフォルニア、米国) より、低融点アガロース (タカラ EP; DNA 断片の回収用)、*E. coli* MV1184、pUC19、HindIII リンカー、XbaI リンカーは宝酒造 (京都、日本) から購入した。

4.2.2. 制限酵素と修飾酵素

制限酵素は、宝酒造・ベーリンガーマンハイム社 (インディアナポリス、米国) ・ニューイングランドバイオラブズ社 (マサチューセッツ、米国) ・日本ジーン (東京、日本) の製品を使用した。また、T4 DNA リガーゼ・アルカリフォスファターゼ (*E. coli* C75 由来) ・DNA ポリメラーゼ (クレノウフラグメント) は宝酒造の製品を使用した。これらの制限酵素や修飾酵素の使用方法は各社の使用説明書に従った。

4.2.3. 菌株及び培養条件

遺伝子組換え操作では、*E. coli* MV1184 [*ara* Δ (*lac-pro*) *strA thi* ϕ 80*dlacIZ* Δ M15 Δ (*srl-recA*) 306::*Tn10* (Tet^r) ; F'*:traD* 36 *proABlacI* ⁺*Z* Δ M15] をプラスミド DNA の宿主として用い、LB 培地で培養した。培養温度は 30°C、もしくは 37°C で行った。ただし、必要に応じて抗生物質 (アンピシリン) を最終濃度 100 μ g/ml となるように添加した。なお、LB 培地は、1.0% (W/V) バクトトリプトン (デ

イフコ社、セントルイス、米国)、0.5% (W/V) バクト酵母エキス (ディフコ社)、0.5% (W/V) 塩化ナトリウムを混合し、pH 7.2 に調整したものを使用した。*E. coli* MV1184 のコンピテント細胞は Cohen らの方法で調製した[112]。

ファージの宿主として、*E. coli* XL-1 Blue MRA (P2) [Δ (*mcrA*) 183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac* P2 lysogen]を用いた。なお、*E. coli* XL-1 Blue MRA (P2) は、0.2% (W/V) マルトース、10 mM 硫酸マグネシウムを含む LB 培地で培養した。培養後、遠心を行い、菌体を 10 mM 硫酸マグネシウムに懸濁した後にファージの宿主とした。

4.2.4. シアル酸転移酵素の部分アミノ酸配列の決定

精製した STase 0160 (10 μ g) をシリコン処理した 1.5 ml 容チューブに分取し、100% (W/V) トリクロロ酢酸溶液 150 μ l を加えた。これを、20 分間氷上で放置して酵素を沈殿させ、遠心分離して沈殿を回収した。得られた沈殿を冷アセトンで 2 回洗浄して、これをスピードバック (大洋科学工業社モデル VC-36、東京、日本) で乾燥させた。これに、8 M 尿素と 0.4 M 重炭酸アンモニウム溶液をそれぞれ 25 μ l ずつ添加した。更に 45 mM ジチオスレイトール溶液 2.5 μ l を加えて、50°C で 15 分間保温して、蛋白質中のジスルフィド結合を切断した。溶液を室温に戻し、100 mM ヨードアセタミド溶液 2.5 μ l を加え、室温で 15 分間放置し切断した SH 基を修飾した。これに純水 70 μ l と塩化カルシウムを最終濃度 5 mM となるように加え、5 U のトリプシンを含むトリプシン溶液 10 μ l を加えて 37°C、

24 時間放置し、STase 0160 のトリプシン消化を行った。トリプシン消化で生じた STase 0160 由来のペプチドは、以下の方法で分取した。ペプチド分離システムとして、スマートシステム（ファルマシア社、ウプサラ、スウェーデン）を、ペプチド分離用カラムとして、 μ RPC C₂/C₁₈ SC2.1/10（ファルマシア社）を用いた。溶液 A {0.06% (V/V) トリフルオロ酢酸、2% (V/V) アセトニトリル} で平衡化したカラムに、STase 0160 トリプシン消化溶液を添加後、溶液 A と溶液 B {0.052% (V/V) トリフルオロ酢酸、100% アセトニトリル} を用いて、溶液 A 濃度 100% から開始し、180 分で最終的に溶液 B が 50% となるように濃度勾配をかけて、ペプチドを溶出し分取した。流速は 100 μ l/min とした。ペプチドは、220 nm、280 nm、215 nm の吸収で検出した。得られたオリゴペプチドのアミノ酸配列は、自動プロテインシーケンサー（パーキンエルマー社モデル 476A、カリフォルニア、米国）を用いて、アミノ末端から順次決定した。

4.2.5. オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーション

得られたアミノ酸配列のうち、対応するコドンの少ないアミノ酸配列を多く含む部分を選定して、そのアミノ酸配列から推定されるオリゴヌクレオチドを作成した。合成したオリゴヌクレオチドは、ECL3'-オリゴラベリングキット（アマシャム社、バッキンガム、英国）を用いて 3'-末端を蛍光標識し、プローブを作成した。また、蛍光標識したプローブを用いたハイブリダイゼーションは、ECL3'-オリゴラベリング・ディテクションキット（アマシャム社）を用いて行った。

4.2.6. *P.damsela* JT0160 株のゲノム DNA の調製

P.damsela JT0160 株のゲノム DNA の抽出・単離は、Saito-Miura の方法[113]に従って、以下のように行った。

P.damsela JT0160 株をマリンプロス 2216-寒天培地に画線培養し、生じたコロニーから一白金耳の菌体を採取して、2% (W/V) 塩化ナトリウム濃度となるように調製した 1 liter のニュートリエントプロス液体培地 (オキソイド社、シェフィールド、英国) に植菌して、回転式振とう培養機で 30℃、16 時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、培養上清を除去して、湿重 4 g の菌体を得た。これを、セーライン-EDTA 溶液 (0.15 M 塩化ナトリウム、0.1 M EDTA、pH 8.0) に懸濁して、リゾチームを加え、37℃、15 分間インキュベートした。その後、この溶液を-20℃で 60 分間凍結し、さらに、トリス-SDS 緩衝液 {100 mM トリス-塩酸、1% (W/V) SDS、100 mM 塩化ナトリウム、pH 9.0} を加え、60℃、60 分間融解した。これに、トリス-SDS 緩衝液で飽和したフェノールを加え、15 分間攪拌した。この溶液を、遠心分離して、遠心上清を得た。この上清から、さらに蛋白質を除去するために、遠心分離を行い、水層を得た。この水層に含まれる粗抽出の DNA をエタノール沈殿させ、沈殿を遠心分離により回収した。得られた粗抽出の DNA を、トリス-EDTA 緩衝液 (10 mM トリス-塩酸、1 mM EDTA、pH 8.0、以下 TE と略す) に溶解させ、これに RNaseA、RNaseT1 を加え、37℃、30 分間インキュベートした。その後、DNA をエタノール沈殿させ、沈殿を遠心分離により回収し、精製 DNA を得た。

4.2.7. ゲノム DNA ライブラリーの作成

得られた精製ゲノム DNA (50 μ g) を、*Sau*3A1 で部分消化し、得られた遺伝子断片を入 DASH II の *Bam*H1 部位に組込んだ。これを、ギガパック II パッケージングイクストラクトを用いてパッケージングして、ゲノム DNA ライブラリーを調製した[114]。

調製したゲノム DNA ライブラリーを増幅するために、宿主として *E. coli* XL-1 Blue MRA (P2) を用いて、LB 培地で 37°C、150 rpm で一晩培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して培養上清を除去し、菌体を 10 mM 塩化マグネシウム溶液で希釈した。この希釈液に調製したゲノム DNA ライブラリーを加えて、37°C、15 分間振とうした。これに予め 48°C に保温した LB-トッパアガロースを加えて攪拌した後に、予め 37°C に保温した LB-プレートに重層した。これを室温で乾燥させた後に、37°C で 8 時間培養した。重層した LB-トッパアガロース上の宿主が完全に溶菌した後に、SM 緩衝液を加えて 15 分間放置し、トッパアガロースを SM 緩衝液とともに回収した。得られた LB-トッパアガロースを遠心分離して、その遠心上清を増幅ゲノム DNA ライブラリーとした。

4.2.8. アルカリ溶菌法によるプラスミド DNA の分離・調製

E. coli からのプラスミドの調製は Birnboim の方法を基本として行った[115]。得られたプラスミド溶液は、塩化リチウムを用いて脱蛋白質・脱 RNA を行った後に、遺伝子操作に用いた。

コロニーを LB 培地に植菌し、30°C、もしくは 37°C で 18 時間培養した。集菌

後、140 μ l の溶液 I [50 mM グルコース、25 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、10 mM EDTA] に懸濁した。5 分間室温に放置後、280 μ l の溶液 II [0.2 N 水酸化ナトリウム、1% (W/V) SDS] を加えて混合した後に、氷中で 5 分間放置した。次に、210 μ l の溶液 III [5 M 酢酸カリウム (pH 4.8)] を加えて混合・中和して、氷中で 5 分間放置した。さらに、水和したフェノールとクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) を等量混合した溶液を 500 μ l 加えて混合した。5 分間室温で放置し、遠心した。その上層 (水層) をエッペンドルフチューブに移し、等量のイソプロピルアルコールを加えて 5 分間室温に放置後、遠心して沈殿を回収した。得られた沈殿を乾燥後、30 μ l の TE 緩衝液 [10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1 mM EDTA] に溶解した。これに等量のリチウム溶液 [5 M 塩化リチウム、50 mM MOPS-水酸化ナトリウム (pH 8.0)] を加えて混合後、氷中で 5 分間放置した。これを遠心し、上清をエッペンドルフチューブに移し、エタノール沈殿を行い、プラスミド DNA を回収した。得られたプラスミド DNA を 70% エタノールで洗浄し、この沈殿を乾燥した後に適当量の TE 緩衝液に溶解し、遺伝子操作に用いた。

4.2.9. DNA 断片のアガロースゲルからの回収

アガロースゲルからの DNA 断片の回収は、Perbal らの方法に従って行った [116]。0.8% (W/V) 低融点アガロースゲルを使用し、TAE 緩衝液 [40 mM トリス-酢酸、1 mM EDTA (pH 7.5)] で DNA 断片の電気泳動を行った後に、臭化エチジウムで DNA を染色し、目的の断片を切り出した。得られたアガロース断片を 70°C で 15 分間加温して融解した後に、倍量の TE 緩衝液を加え、さらに 5 分間

加熱融解を行った。最終液と等量の水とフェノールを加え混合した後に、室温で15分間放置した。4℃で遠心分離後上層を回収し、等量のクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)混合液で処理し、これをエタノール沈殿しDNAを回収した。

4.2.10. ライゲーション及び形質転換

回収したDNAをpUC系のプラスミドに挿入する際には、Birboimの方法に従ってライゲーションを行った[114]。プラスミドDNAによる大腸菌の形質転換は、塩化カルシウム/塩化ルビジウム法で行った[117]。

4.2.11. ハイブリダイゼーションレプリカの調製

サザンハイブリダイゼーション用のアガロースゲルのレプリカは以下の方法で調製した[118]。制限酵素で消化したDNAをTAE緩衝液を用いた0.8%(W/V)アガロースゲルで電気泳動した。泳動後、アガロースゲルを変性溶液(0.5M水酸化ナトリウム、1.5M塩化ナトリウム)中に15分間浸し、ゲル中のDNAをアルカリ変性させた。次に、このゲルを中和溶液{0.5Mトリス-塩酸(pH7.5)、1.5M塩化ナトリウム}に5分間浸し、アルカリを中和した。このゲル中のDNAをHybond N+ (アマシャム社)に転写させて、レプリカを調製した。

コロニー及びブランクハイブリダイゼーション用のレプリカは以下の方法で調製した[119]。

プレートと同じ大きさに調製したHybond N+を用いて、コロニー又はブランク

のレプリカを調製した。なお、マスタープレートは4°Cで保存した。レプリカを変性溶液に浸した濾紙上に5分間放置して、コロニー又はプラークをアルカリ変性させた。次に、アルカリ変性させたレプリカを、中和溶液に浸した濾紙上に3分間放置して、中和した。

調製したレプリカを2x SSC緩衝液で洗浄し、濾紙上、室温で乾燥させた。乾燥終了後、レプリカを80°Cで2時間ベーキングした。

4.2.12. ファージ DNA の精製

ファージ DNA の精製は、スプレッド DNA 精製キット（プロメガ社、ウィスコンシン、米国）を用いて行った。

4.2.13. DNA 塩基配列の決定

DNA 塩基配列の決定は、プラスミド DNA の場合にはオートリードシーケンシングキット（ファルマシア社）を用い[120]、ファージ DNA の場合にはオートサイクルシーケンシングキット（ファルマシア社）を用い[121]、ALF red DNA シークエンサー（ファルマシア社）を用いて行った。電気泳動用ゲルには、0.5 mm ロングレンジャーゲルを用いた。DNA 塩基配列の解析は DNASIS（日立ソフトウェアエンジニアリング社、横浜、日本）を用いて行った。また、DNA 及びアミノ酸配列の相同性検索は、Genbank 及び EMBL のデータベースで行った。

4.2.14. 酵素活性測定法

酵素活性は、2.2.2.に記した方法で測定した。2.2.2.の条件で、1分間に $1\mu\text{mol}$ のシアル酸をラクトースに転移させる酵素量を1単位 (U) とした。

4.2.15. 組換え体酵素の発現と精製

発現プラスミド pEBST シリーズで形質転換した *E.coli* MV1184 を、0.02 mM IPTG、アンピシリンを含む LB 培地で培養した。培養は 30°C で8時間行った。その後、培養液を遠心分離し、得られた菌体をカゴジレート緩衝液に懸濁し、超音波処理を行い菌体を破碎した。この菌体破碎液を超遠心分離して遠心上清を集め、この画分を可溶性蛋白質画分とし、それぞれの菌体破碎液と可溶性蛋白質画分の酵素活性を測定した。

また、発現プラスミド pEBST Δ 178 で形質転換した *E.coli* MV1184 の生産した組換え体酵素は、上記の可溶性蛋白質画分から、2.2.6.の方法で精製した。

4.2.16. 酵素反応生成物の同定

酵素反応生成物の同定は、2.2.12.の方法で行った。糖受容体基質としてピリジルアミノ化ラクトース (宝酒造) を用いて酵素反応を行い、反応生成物を HPLC で分析した。

4.3. 結果

4.3.1. シアル酸転移酵素の部分アミノ酸配列

4.2.4.の方法に従い、トリプシンで STase 0160 を加水分解し、生じたペプチドを高速液体クロマトグラフィーによって分離して STase 0160 の部分アミノ酸配列 (7 種類) を決定した。得られたアミノ酸配列と第 2 章で決定した N 末端アミノ酸配列を Table 4-1 に示す。得られた部分アミノ酸配列 No.3 のアミノ酸配列よりオリゴヌクレオチド HTY01[5'-GCIAAITHTIGCIGGIACIIICCIGAIGC-ICCIAA-3']を作製し、ハイブリダイゼーションプローブとして用いた。

4.3.2. ゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーション

*Hind*III で消化した *P. damsela* JT0160 のゲノム DNA を、蛍光標識したオリゴヌクレオチドプローブ HTY01 を用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った結果、約 2.8kbp 付近に強いシグナルが検出された。そこで、ゲノム DNA を *Hind*III で消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、2.8 kbp の DNA 断片を含むゲル断片を切り出し、ゲルから DNA を抽出した。抽出した DNA を、*Hind*III で消化後、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (BAP) 処理で脱リン酸化した pUC19 に組込んだ。次に、得られたプラスミドで *E.coli* MV1184 を形質転換した。生じた約 3,000 のコロニーを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行ったが、HTY01 とハイブリダイズするプラスミドが組込まれたコロニーは得られなかった。

Table 4-1 シアル酸転移酵素のN末端アミノ酸配列と部分アミノ酸配列

No.	アミノ酸配列
N末端	XNSDNTSLKETVSSXXAXV
No.1	DYLGSSAKK
No.2	FVSWKIVN
No.3	ANYLAGTSPDAPK
No.4	ETVXXNSAVVVEETETY
No.5	YNWHK
No.6	QAISFDVAPELK
No.7	QLIHIIQAK

X: 未同定アミノ酸残基

4.3.3. *bst* 遺伝子断片を含むと推定されるファージの単離

P. damsela JT0160 のゲノム DNA ライブラリーを対象として、蛍光標識した HTY01 を用いて、ブランクハイブリダイゼーションを行った結果、*bst* 遺伝子断片を含むと推定されるファージ 7 株が得られた。これらのファージをそれぞれ増幅してファージ DNA を調製し、*Hind*III で消化したファージ DNA を、HTY01 を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、すべてのファージについて 1.6 kbp に強いシグナルがみられた。

4.3.4. サブクローニング

4.3.3. で得られた 7 株のファージから 1 株 (λ -7) を選定し、そのファージ DNA 5 μ g を *Hind*III で消化して、アガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動後、アガロースゲル中の約 1.6 kbp の DNA 断片を含むゲル断片を切り出し、ゲルから DNA を抽出した。抽出した DNA 断片を、*Hind*III で消化後、BAP 処理した pUC19 に組み込み、得られたプラスミドで *E. coli* MV1184 を形質転換した。生じたコロニーについてコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、HTY01 とハイブリダイズするプラスミドが組み込まれた 3 コロニーを得た。この 3 コロニーをそれぞれ寒天培地から釣菌して、LB-アンピシリン液体培地に植菌して 37 $^{\circ}$ C、16 時間振とう培養し、増殖させた。培養後、培養液から菌体を回収し、菌体からプラスミド DNA の調製を行った。得られたプラスミド DNA を *Hind*III で消化後、アガロースゲル電気泳動を行った結果、いずれの菌株から精製されたプラスミド DNA にも 1.6kbp の DNA 断片が挿入されていることが確認できた。また、

HTY01 を用いて、この電気泳動したゲルについてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、この 1.6kbp の DNA 断片に強いシグナルがみられた。以上の結果から、これらのプラスミドに挿入された 1.6 kbp の DNA 断片に STase 0160 をコードする遺伝子断片が含まれていると考えられた。

4.3.5. 1.6 kbp 遺伝子断片の DNA 塩基配列

上記のプラスミドに挿入されていた約 1.6 kbp の DNA 断片について、その塩基配列からアミノ酸配列を推定したところ、DNA の 5'末端の 396 番目以降の ATG (メチオニン残基) から始まり、3'末端の *Hind*III 部位まで続く塩基配列部分が、414 個のアミノ酸をコードすることが推定された。この塩基配列部分から推定されるアミノ酸配列と 4.3.1. で得られた STase 0160 由来のアミノ酸配列を比較したところ、N 末端アミノ酸配列を含む全てのアミノ酸配列を確認することができた。以上の結果から、この塩基配列部分が STase 0160 の N 末端側をコードする遺伝子を含んでいると考えられ、このプラスミドを pBSTN と命名した。しかし、この塩基配列中に停止コドンと推定される部位が存在しなかったこと、STase 0160 の分子量は 61kDa であったことから、*bst* 遺伝子の構造遺伝子に存在する C 末端側アミノ酸配列をコードする遺伝子部分をクローニングする必要があると考えられた。

4.3.6. シアル酸転移酵素の C 末端側アミノ酸配列をコードする

遺伝子断片の単離

pBSTN に挿入された STase 0160 の N 末端側アミノ酸配列をコードする DNA 断片の塩基配列を基に、塩基配列解析用オリゴヌクレオチド STY01 を合成した (Table 4-2)。この STY01 を用いて、4.3.3. で得られた *bst* 遺伝子を含むと考えられたファージ DNA の塩基配列をシークエンスした。その結果、pBSTN の 3' 末端の *Hind*III 部位下流の 150bp の塩基配列を決定することができた。得られた塩基配列を基にオリゴヌクレオチド HTY02 を作製した (Table 4-2)。次に、 λ -7 より精製したファージ DNA を *Hind*III で消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、蛍光標識した HTY02 を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、約 1.1 kbp 付近に強いシグナルが検出された。そこで、 λ -7 由来のファージ DNA 5 μ g を *Hind*III で消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、泳動終了後、アガロースゲル中の約 1.1kbp の DNA 断片を含む部分を切り出し、ゲルから DNA を抽出した。抽出した DNA を、*Hind*III で消化後、BAP 処理した pUC19 に組込み、得られたプラスミドで *E.coli* MV1184 を形質転換した。HTY02 を用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行った結果、HTY02 とハイブリダイズするプラスミドが組込まれた 5 コロニーを得た。得られたコロニーをそれぞれ寒天培地から釣菌して、LB-アンピシリン液体培地に植菌して 37°C、16 時間振とう培養した。培養後、培養液から菌体を遠心分離によって回収し、菌体からプラスミド DNA を精製した。得られたプラスミド DNA を *Hind*III で消化後、アガロースゲル電気泳動を行った結果、いずれの菌株から精製されたプラスミド DNA にも約 1.1 kbp の DNA 断片が挿入されていることが確認できた。また、HTY02 を用いて、この電気泳動したゲルを対象にサザンハイブリダイゼーションを行っ

Table 4-2 各種合成オリゴヌクレオチドの塩基配列

プローブ	塩基配列
HTY02	5'-AAGATTTCATTTGAGGT-3'
STY01	5'-ATTTTCAAGGGGCATCCCTGG-3'
MTY01	5'-CAAAACAATTACTGATTAATAGTGAATTGGCGATGTGGCAG-3'
MTY02	5'-TGTCTGTTCTGGGCTTAGTGATAAGATCTCTCGATGGAAAGTTGCC-3'
MTY03	5'-TTTTTATGTGAATGTGGAATTCATGAGAAAACTGA-3'

HTY; ハイブリダイゼーションプローブ, STY; シークエンシングプローブ, MTY; 部位特異的変異用プローブ

た結果、この 1.1 kbp の DNA 断片にシグナルが検出された。

4.3.7. シアル酸転移酵素の C 末端側アミノ酸配列をコードする遺伝子断片の DNA 塩基配列の解析

4.3.6. で得られた 1.1 kbp の DNA 断片の塩基配列を解析し、その結果を推定されるアミノ酸配列に翻訳したところ、5'側の *Hind*III 部位から 262 個のアミノ酸残基をコードする塩基配列部分が存在し、停止コドンと推定されるコドン (TAA) も存在した。なお、この塩基配列部分の 3'下流側には 8bp からなるステム部分と 12bp からなるループ部分で構成されるステムアンドループ構造が存在していた。以上の結果から、この遺伝子断片中に存在した塩基配列部分は STase 0160 の C 末端側をコードする遺伝子を含んでいると考えられ、このプラスミドを pBSTC と名付けた。ここまでのクローニングの概略を Fig. 4-3、Fig. 4-4 に示す。

4.3.8. *bst* 遺伝子の DNA 塩基配列及び推定アミノ酸配列の解析

pBSTN と pBSTC の塩基配列より推定した *bst* 遺伝子 (2.8kbp) の制限酵素地図を Fig. 4-5 に、全長の DNA 塩基配列と推定される STase 0160 のアミノ酸配列を Fig. 4-6 に示す。2,743bp の DNA 断片中に、5'末端側の *Hind*III 部位から 396 番目に存在する開始コドン (ATG) から始まり、5'末端側の *Hind*III 部位から 2423 番目に存在する停止コドン (TAA) で終了する、675 個のアミノ酸をコードすると推定される 2,028bp のヌクレオチドからなるオープンリーディングフレーム

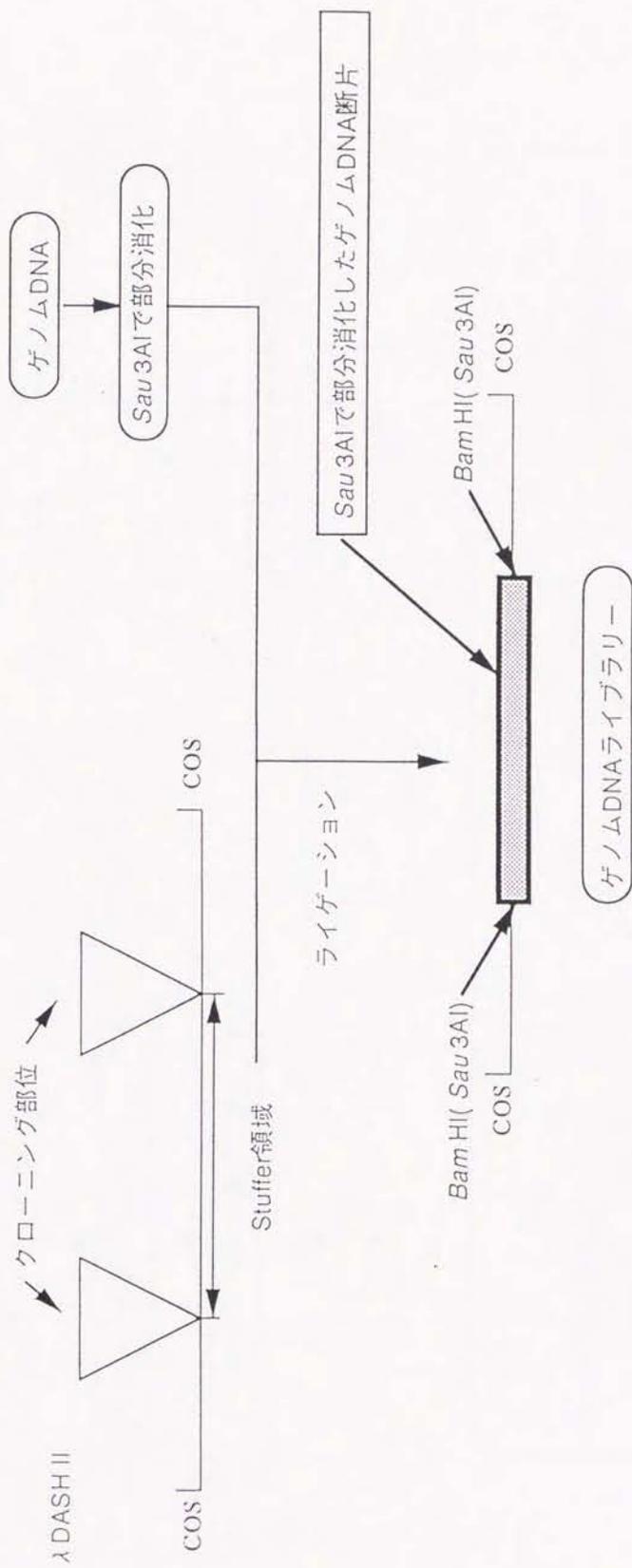


Fig. 4-3 *P. damse* la JT0160のゲノムDNAライブラリーの構築概略

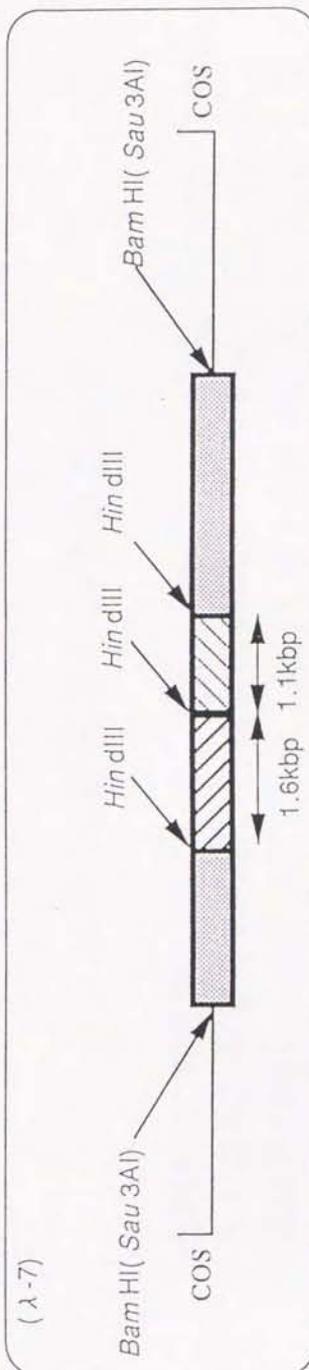
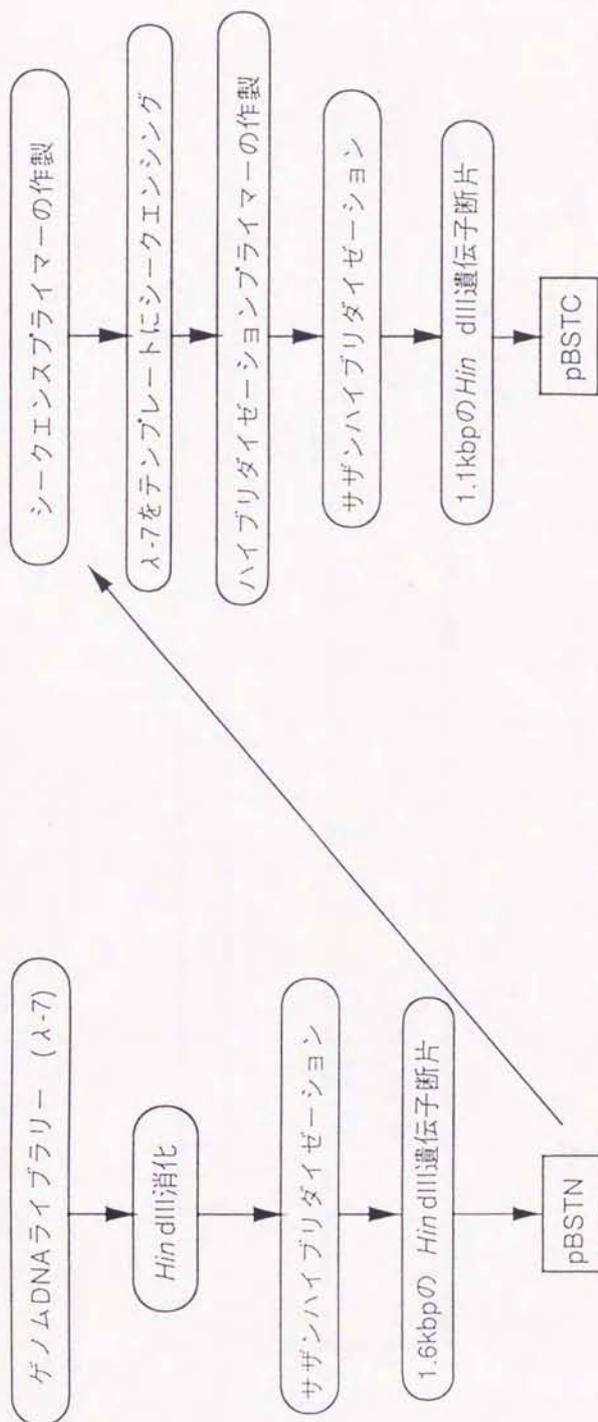


Fig. 4-4 *bs*遺伝子クローニングの流れ

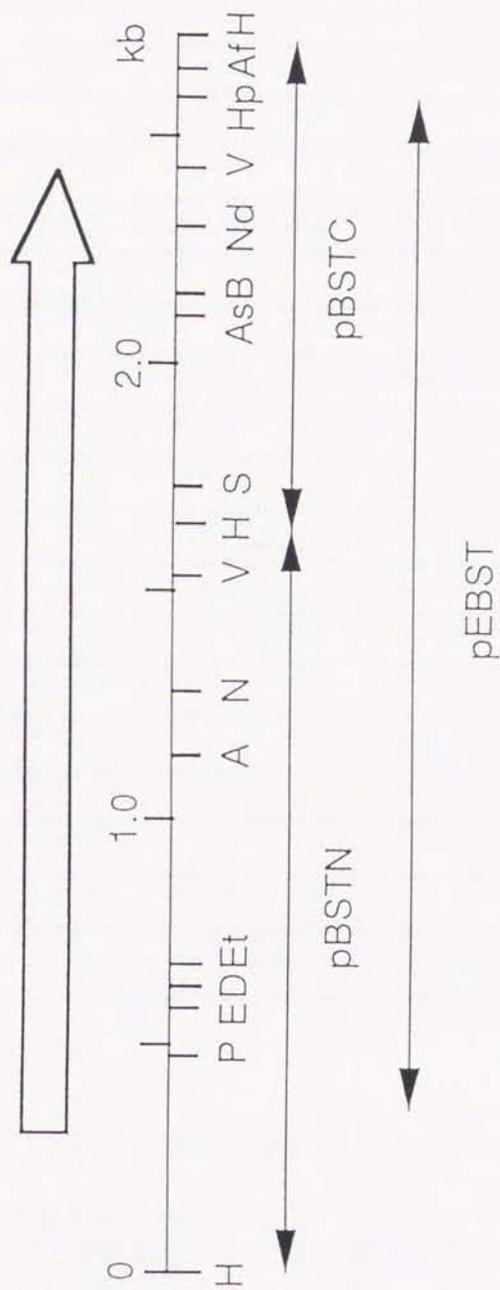


Fig. 4-5 *bst*遺伝子の制限酵素地図

*bst*遺伝子の制限酵素地図とプラスミドpBSTN、pBSTC及びpEBSTに組込まれた塩基配列部分を示す。白抜き矢印は、ORF部分を示している。制限酵素の略称を以下に示す。A ; *AccIII*, Af ; *AfII*, As ; *AsuI*, B ; *BsuI*, D ; *DraI*, E ; *EcoRV*, Et ; *EcoT22I*, H ; *HindIII*, Hp ; *HpaI*, N ; *NcoI*, Nd ; *NdeI*, P ; *PstI*, S ; *SacI*, V ; *VspI*

(ORF) が存在した。また、この ORF より推定されるアミノ酸配列の中に存在する 17 番目からのアミノ酸配列と、STase 0160 の N 末端アミノ酸配列の 2 番目の Asn 残基から始まるアミノ酸配列は完全に一致していた。また、Kyte-Doolittle の疎水度分布法を用いて、STase 0160 の推定アミノ酸配列を解析した結果を Fig. 4-7 に示す[122]。メチオニンから始まる最初の 15 残基のアミノ酸部分は疎水性が高く、さらにメチオニンの下流に 2 個の+チャージを持つ、リジンが存在した。

STase 0160 の推定一次アミノ酸配列と動物由来のシアル酸転移酵素間の相同性を解析したが、STase 0160 には動物由来のシアル酸転移酵素に保存されているシアリルモチーフは存在しなかった。また、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae* 由来のシアル酸転移酵素間の相同性を解析したが、高い相同性は認められなかった。しかし、本酵素の推定一次アミノ酸配列の C 末端側には、大腸菌のリン酸輸送システム制御蛋白質 (PhoU 蛋白質) [123] と非常に相同性の高い部分が存在した (Fig. 4-8)。さらにこの相同性の高い部分の 2 次構造を解析したところ、この部分は α -ヘリックス構造を形成することが、さらに、疎水性アミノ酸が一方向に配列されていることが推定された (Fig. 4-9)。

4.3.9. 発現プラスミド (pEBST シリーズ) の構築

bst 遺伝子のクローニングを行った際に、サザンハイブリダイゼーションで本遺伝子を含むと推定された 2.8kbp の *Hind*III 断片がプラスミド pUC19 に挿入できず、1.6kbp と 1.1kbp の 2 つの *Hind*III 断片としてクローニングされたことから、本遺伝子が大腸菌にとって致死遺伝子である可能性が示唆された。そこで、2 つ

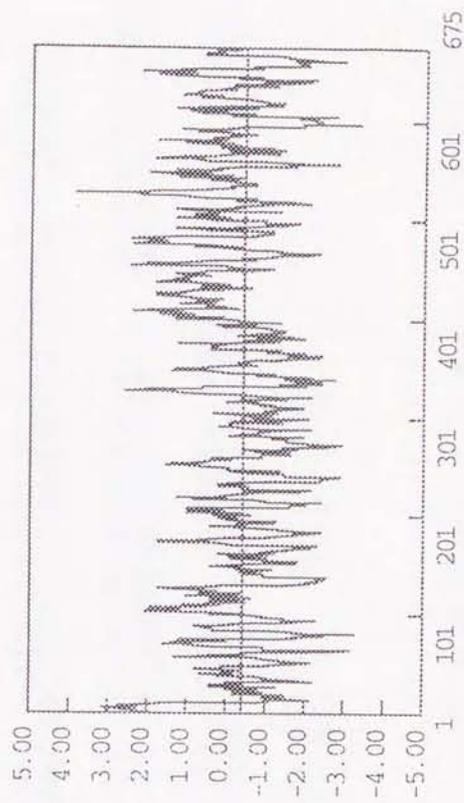


Fig. 4-7 シアル酸転移酵素のhydropathy profile

推定されたシアル酸転移酵素のアミノ酸一次配列の、hydropathy profileをKyteとDoolittleの方法に従って計算した結果を示す。
 なお、計算の際にspanは6アミノ酸とした。
 図の中で水平線 (-0.4) より上にある部分が疎水性領域である。

1	D H K V N S M E V A I D E A C T R I I A K R Q P T A S D E R L V I A I I K T I T D L E R I G D V A E (498-547)
2	D K H U N V M E V A I D E A C V R I I A K R Q P T A S D E R L V M V A I S K T I A E L F R I G D V A D (56-105)
1	I A K V A L E S F S N K Q Y N L L V B L E S L G Q H T V R M L H E V L D A P A R M D V K A A I E V (548-597)
2	K I C R T A L E K F S Q Q H Q P L L V S L E B L G R H T I Q M L H D V L D A P A R M D I D E A V R I (106-155)
1	Y Q E D D R I D Q E Y E S I V R Q L M A H M E D P S S I P N V M K V M W A A R S I E R V G D R C Q (598-647)
2	Y R E D K K V D Q E Y E G I V R Q L M T Y M N B D S R T I P S V L T A L F G A R S I E R I G D R C Q (156-205)
1	N I C E Y I I Y F V K G K E V R R T K P D D F G T M D D (648-675)
2	N I C E F I F Y Y V K G Q D F R H V G G D E L D K L L A G K D S D K (206-235)

Fig. 4-8 シアル酸転移酵素と大腸菌PhoU蛋白質の相同性

シアル酸転移酵素の推定一次アミノ酸配列のC末端側アミノ酸配列部分と高い相同性を示した、大腸菌PhoU蛋白質のアミノ酸配列部分を示す。アミノ酸配列左横の数字1は、シアル酸転移酵素のアミノ酸配列を、2は、PhoU蛋白質のアミノ酸配列を示している。また、右横の数字は、それぞれのアミノ酸番号を示している。

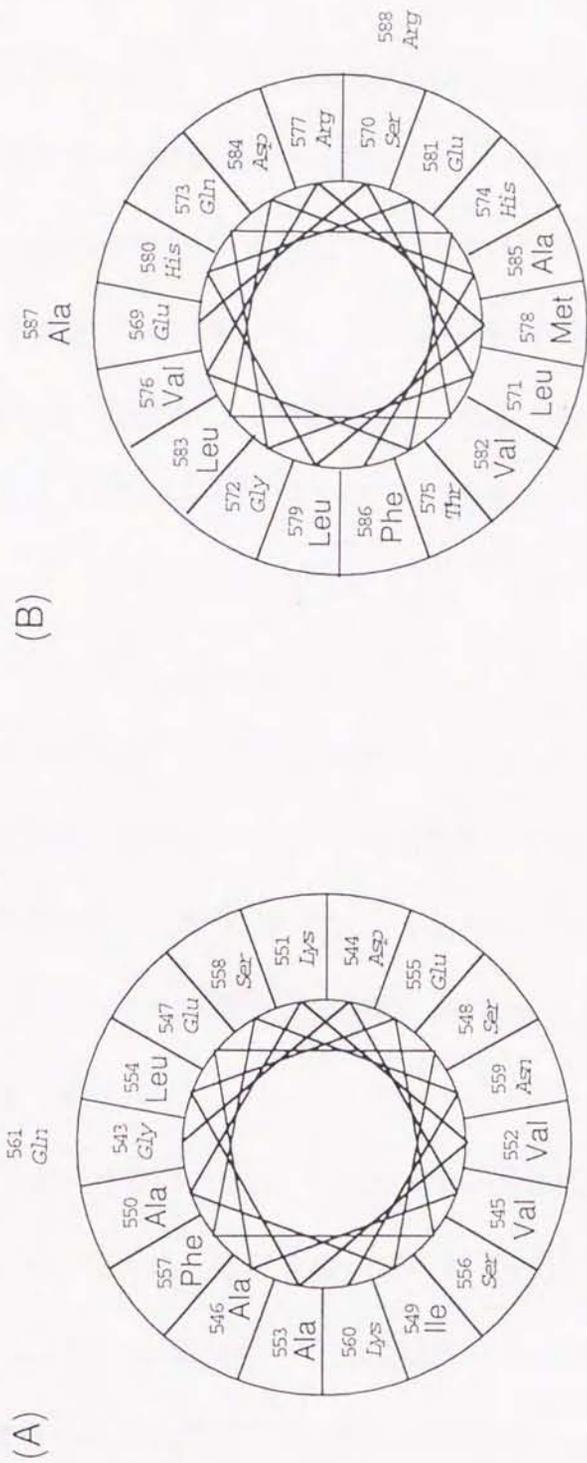


Fig. 4-9 シアル酸転移酵素のC末端側に存在すると推定される α -ヘリックス構造

(A)は、アミノ酸残基543 (Gly)からアミノ酸残基561 (Gln)間で形成されると推定される α -ヘリックス構造を、
 (B)は、アミノ酸残基596 (Glu)からアミノ酸残基588 (Arg)間で形成されると推定される α -ヘリックス構造を
 それぞれ示している。(A)、(B)で形成される α -ヘリックス構造中で疎水性アミノ酸残基が一方向に存在すること
 が推定され、また、(A)、(B)の α -ヘリックス構造のハイドロパシティーはそれぞれ、0.63、0.96と計算された。

に分けてクローニングされている *bst* 遺伝子の連結を、挿入した構造遺伝子の発現を制御可能な *tac* プロモーターの制御下で行うこととした。

発現プラスミドとして、pAQN を用いた[124]。本プラスミドは、*tac* プロモーターの直後の *EcoRI* 部位と *rrnBT1T2* ターミネーターの直前の *HindIII* 部位の間に、*Thermus aquaticus* YT-1由来のセリンプロテアーゼであるアクアライシンIをコードする遺伝子(*aquI*)を持ち、*aquI* 遺伝子中には制限酵素部位が *EcoRI* 部位と *HindIII* 部位を含めて 10 箇所存在し、遺伝子操作を行う際に有利である。また、本プラスミドは、*tac* プロモーターを制御する *lacI^q* をプラスミド中に持ち、*tac* プロモーターをコントロール可能であることから、*bst* の発現プラスミドを構築するために有利であると考えられる。

bst 遺伝子発現プラスミド (pEBST シリーズ) の構築は、pBSTN と pBSTC に含まれる遺伝子断片がいずれも *HindIII* 断片であることから、方向性を持たせてこれらの断片を pAQN の *tac* プロモーターの下流に挿入する必要があったため、以下の方法で行った。なお、この際に *bst* 遺伝子の持つ本来のプロモーターは完全に削除した。

まず、pAQN の改良を行った。pAQN の制限酵素部位は *tac* プロモーター直後から順に *EcoRI* 部位、*BglII* 部位、*XbaI* 部位、*HindIII* 部位と並んでいる (Fig.4-10) [145]。これを *EcoRI* 部位、*HindIII* 部位、*XbaI* 部位の順に改良した。次に、pBSTC に含まれる塩基配列部分の下流に存在する *HpaI* 部位を *XbaI* 部位に改変し、STase 0160 の C 末端部分をコードする塩基配列を改良した pAQN に *XbaI-HindIII* 断片で挿入した。最後に、pBSTN に含まれる塩基配列中に存在する、STase 0160

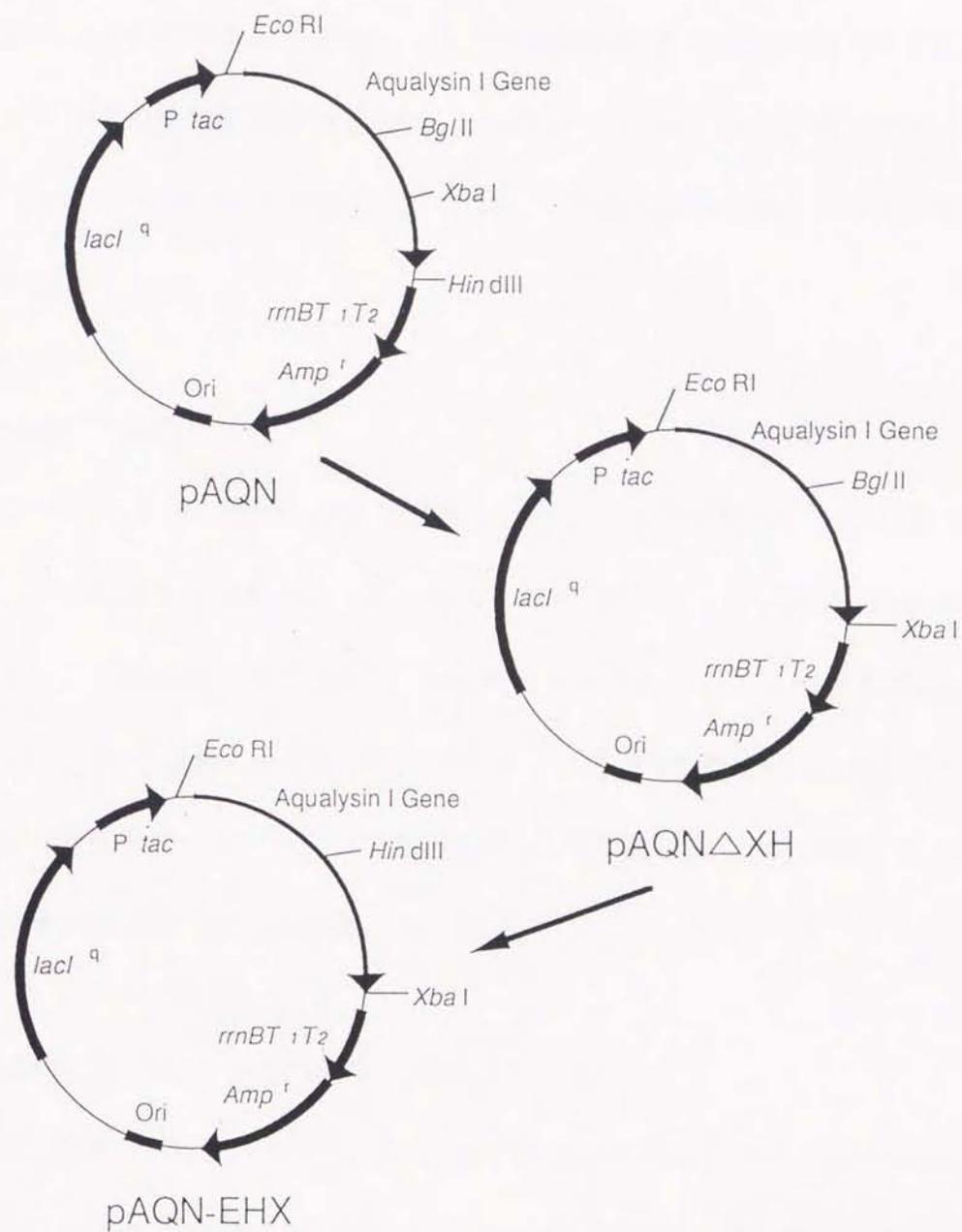


Fig. 4-10 発現プラスミドpAQNの改変

Thermus aquaticus YT-1由来のセリンプロテアーゼ (アクアライシン1) の発現プラスミド、pAQNの制限酵素部位改変の概略を示している。

の N 末端部分のメチオニンをコードする塩基配列部分の上流に *EcoRI* 部位を挿入し、STase 0160 の N 末端部分をコードする塩基配列を、STase 0160 の C 末端部分をコードする塩基配列部分を挿入した pAQN に *EcoRI-HindIII* 断片で挿入し、発現プラスミド pEBST を構築した。なお、C 末端部分を欠損させた変異株も併せて作製した。

(1) pAQN の改良

まず、pAQN を *HindIII* と *XbaI* で切断し、クレノウフラグメントで処理（平滑化）し、そのままライゲーションした。この操作により、pAQN より *HindIII* 部位が消失し、*XbaI* 部位が再生した（pAQN Δ XH, Fig. 4-11）。引き続き、pAQN Δ XH を *BglIII* で切断し、クレノウフラグメント処理（平滑化）した後に、*HindIII* リンカーを加えてライゲーションを行った。この処理により、*BglIII* 部位を *HindIII* 部位に置き換えた（pAQN-EHX, Fig. 4-10）。

(2) pBSTC の改変と pAQN-EHX への挿入

pBSTC に挿入されている STase 0160 の C 末端側をコードする 1.1kbp の *HindIII* 断片をプラスミド M13mp18 のクローニング部位に挿入した（Fig. 4-12）。この際に、STase 0160 の C 末端側がクローニング部位の *EcoRI* (*XbaI*) 部位に位置するものを選択した（pMBSTC, Fig. 4-12）。次に、pMBSTC を *HpaI* で切断し、クレノウフラグメント処理（平滑化）した後に、*XbaI* リンカーを加えてライゲーションを行った。この処理により、*HpaI* 部位が *XbaI* 部位に置き換えた

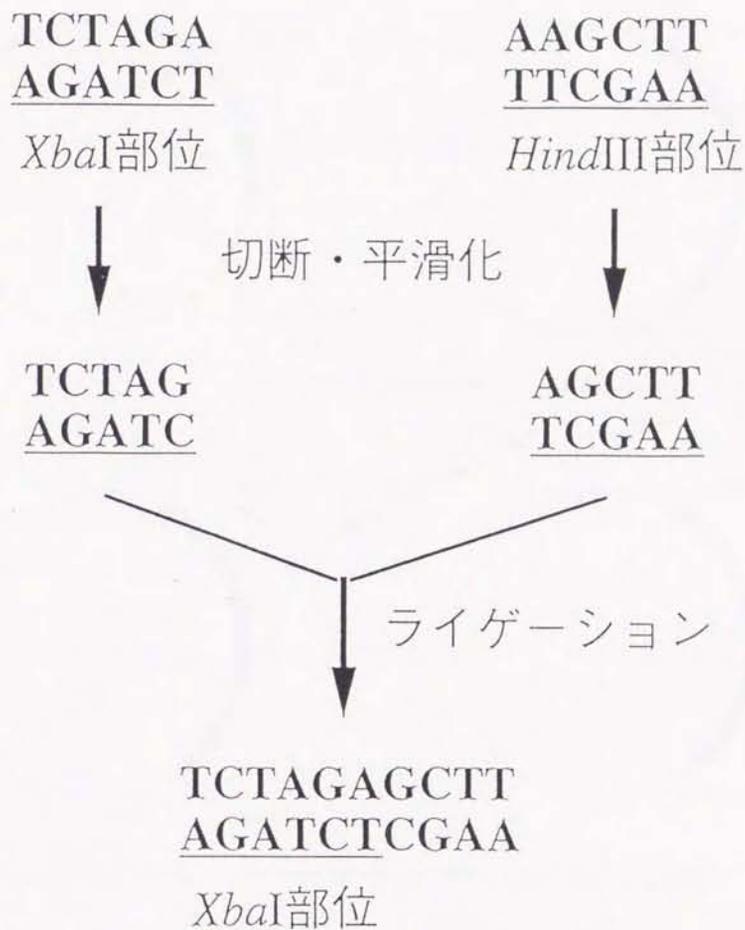


Fig. 4-11 XbaI部位の再生

制限酵素XbaIとHindIIIで切断して、この部分を平滑化した後に、ライゲーションすることにより、XbaI部位が再生することを示している。

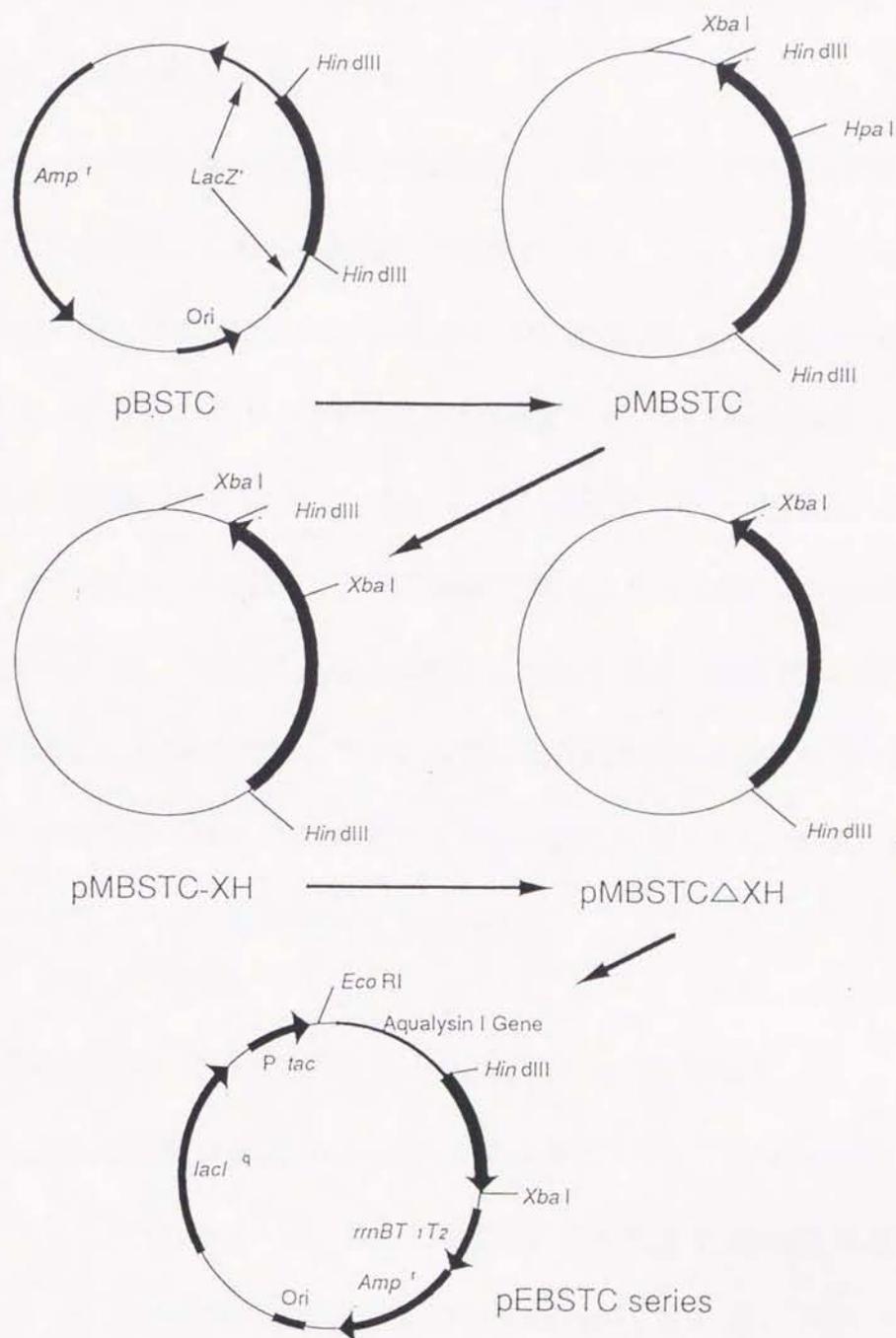


Fig. 4-12 プラスミドpEBSTCシリーズの構築

プラスミドpBSTCから、プラスミドpEBSTCシリーズを構築した流れを示す。

(pMBSTC-HX, Fig. 4-12)。次に、pMBSTC-HX を *Xba*I で切断し、これをそのままライゲーションした。この処理により、内部に *Hind*III 部位を含む *Xba*I 断片を削除した (pMBSTC Δ X, Fig. 4-12)。

引き続き、膜結合領域と推定される領域及び PhoU 蛋白質と相同性の高い領域の機能解析のために、これらの領域を欠損させた改変 STase 0160 の作製を行った。具体的には、pMBSTC Δ X の ORF 中の 539 番目のロイシンを MTY01 を用いて、また 498 番目のアスパラギン酸を MTY02 を用いて (Table 4-2)、それぞれ部位特異的変異法[125]により、終止コドンに改変した (pMBSTC Δ C137, pMBSTC Δ C178)。この際に、完全に翻訳を終止させるために、3 種類の終止コドン挿入した。pMBSTC Δ X、pMBSTC Δ C137 及び pMBSTC Δ C178 をそれぞれ *Hind*III と *Xba*I で切断して、それぞれの *Hind*III-*Xba*I 断片を pAQN-EHX の *Hind*III-*Xba*I 部位に挿入して、プラスミド pEBSTC シリーズ (pEBSTC、pEBSTC Δ 137、pEBSTC Δ 178) を作製した (Fig. 4-12)。

(3) pBSTN の改変と発現プラスミド (pEBST シリーズ) の構築

pBSTN に挿入されている STase 0160 の N 末端側をコードする 1.6kbp の *Hind*III 断片をプラスミド M13mp19 のクローニング部位に存在する *Hind*III 部位に挿入した (Fig.4-13)。この際に、STase 0160 の N 末端側がクローニング部位の *Eco*RI 部位側に位置するものを選択した (pMBSTN, Fig.4-13)。次に、MTY03 (Table 4-2) を用いて部位特異的変異[125]を行い、pMBSTN の ORF のメチオニン残基の上流に *Eco*RI 部位を挿入した。この際、MTY03 を使用して *Eco*RI 部位とメチ

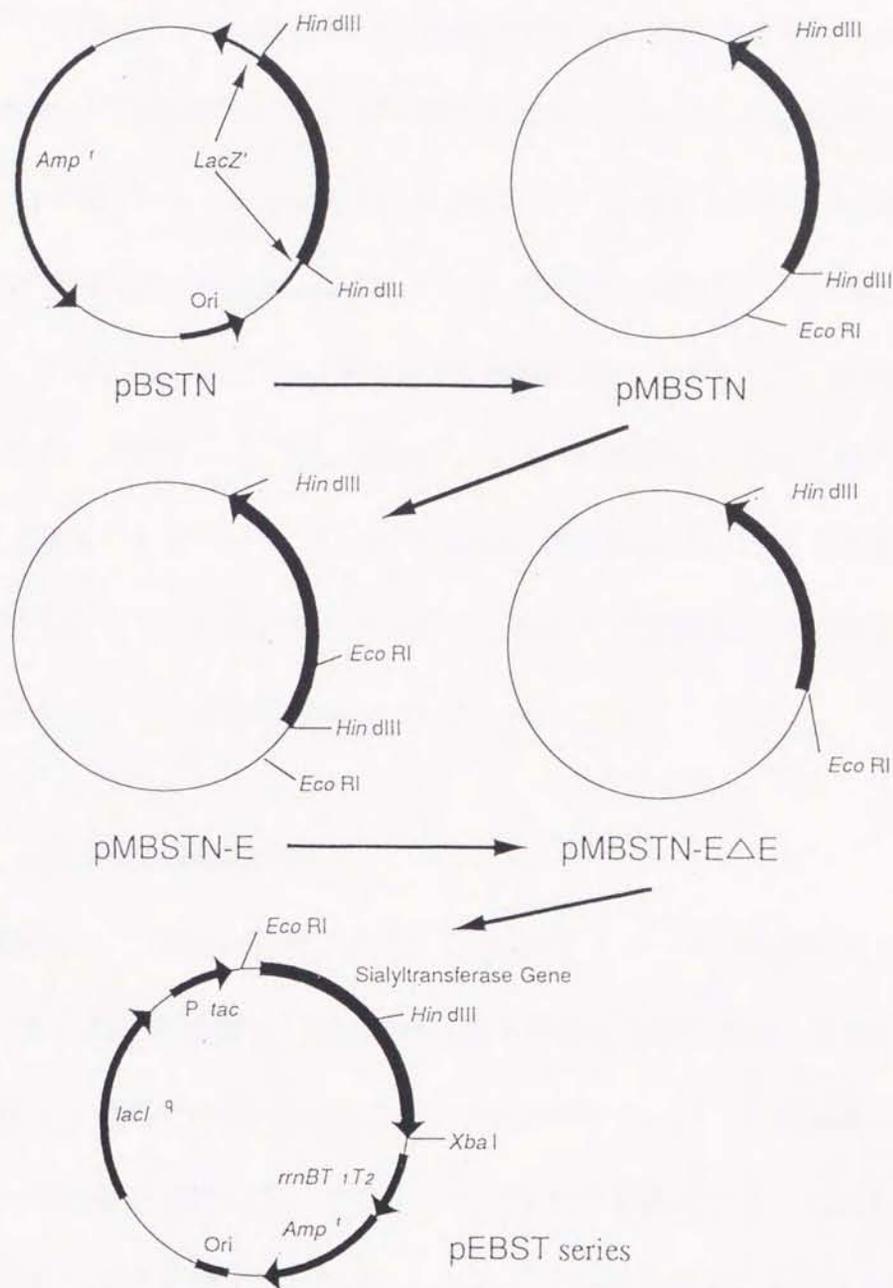


Fig. 4-13 発現プラスミドpEBSTシリーズの構築

プラスミドpBSTNから、発現プラスミドpEBSTシリーズを構築した流れを示す。

オニン残基をコードする開始コドン (ATG) との間を 0bp とした (pMBSTN-E, Fig.4-13)。続いて、pMBSTN-E を *EcoRI* で切断し、これらをそのままライゲーションした。この処理により *HindIII* 部位を含む *EcoRI* 断片を pMBSTN-E から削除した (pMBSTN-E Δ E, Fig.4-13)。pMBSTN-E Δ E を *EcoRI* と *HindIII* で切断し、pMBSTN-E Δ E の *EcoRI-HindIII* 断片を pEBSTC, pEBSTC Δ 137 及び pEBSTC Δ 178 の *EcoRI-HindIII* 部位に挿入し、3 種類の発現プラスミド、pEBST シリーズ (pEBST, pEBST Δ 137 及び pEBST Δ 178) を構築した (Fig.4-13)。これらの発現プラスミドを用いて、4.2.10.の方法に従い *E.coli* MV1184 を形質転換し、形質転換体を得た。なお、いずれの形質転換体も培養液をグリセロールストック (最終グリセロール濃度 40%) にして、-80°C で保存した。

4.3.10. 組換え体酵素の発現

今回構築した 3 種類の発現プラスミド pEBST シリーズで形質転換した *E.coli* MV1184 をそれぞれ培養し、培養液から菌体を遠心分離によって集菌した。得られた菌体を、それぞれ 20 mM カコジレート緩衝液 (pH 5.0) に懸濁し、超音波処理を行い菌体を破碎した。この菌体破碎液を酵素源として、4.2.14.の方法でシアル酸転移活性を測定した結果、いずれの菌体破碎液中にもシアル酸転移活性が認められたことから (Table 4-3)、今回クローニングした遺伝子はシアル酸転移酵素の遺伝子と判断した。

これら 3 種類の形質転換体由来の菌体破碎液を、超遠心分離して可溶性蛋白質画分のシアル酸転移活性を測定した。その結果、pEBST で形質転換した *E.coli*

Table 4-3 各種発現プラスミドで形質転換した大腸菌による
シアル酸転移酵素の生産

発現プラスミド名	菌体破砕液の酵素活性 (U/L)	可溶性蛋白質画分の酵素活性 (U/L)
pEBST	25.2	N.D.
pEBST Δ 137	56.6	37.3
pEBST Δ 178	224.5	121.3

酵素活性はいずれも培養液1 liter当たりの酵素量で示している。
N.D.: 検出不能

MV1184 の可溶性蛋白質画分には、シアル酸転移活性は認められなかったが (Table 4-3)、pEBST Δ 137 及び pEBST Δ 178 で形質転換した菌体破碎液の可溶性蛋白質画分には、シアル酸転移活性が認められた (Table 4-3) ことから、発現プラスミド pEBST Δ 137 及び、pEBST Δ 178 で生産される組換え体 STase 0160 は、可溶性蛋白質となっているとが推定された。

また、pEBST、pEBST Δ 137 及び、pEBST Δ 178 で形質転換した *E. coli* MV1184 をそれぞれ培養したところ、いずれの場合も誘導時間の後に菌体の増殖が認められたが、誘導時間の長さは大幅に異なり、pEBST > pEBST Δ 137 > pEBST Δ 178 の順であった (データは示さない。)

4.3.11. 組換え体酵素の精製

発現プラスミド pEBST Δ 178 で形質転換した *E. coli* MV1184 を、IPTG、アンピシリンを含む LB 培地 (1 liter) で培養した。培養後、菌体をカコジレート緩衝液に懸濁し超音波処理を行い菌体を破碎した。菌体破碎液を超遠心 (100,500 xg, 1 時間) して粗酵素液を調製し、組換え体 STase 0160 を精製した。粗酵素液からシアル酸転移酵素を各種カラムクロマトグラフィーを用いて、SDS-PAGE で単一なバンドにまで精製した。組換え体酵素の分子量は 54 kDa であった。粗酵素液からの収率は 3.5% で、酵素の比活性は 7.0 U/mg であった。精製した組換え体 STase 0160 の SDS-PAGE を Fig. 4-14 に示す。

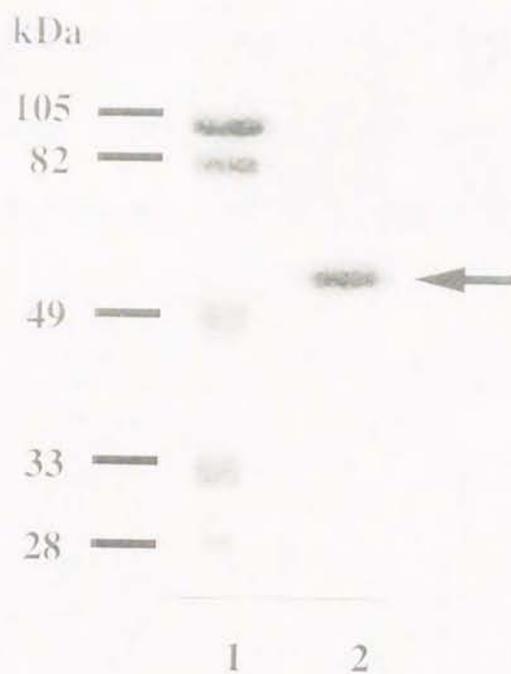


Fig. 4-14 C末端領域欠損組換え体酵素標品のSDS-PAGE

10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。蛋白質の染色には、クマジブリリアントブルー-R250を用いた。

1, 分子量マーカー [ホスホリラーゼ B (105kDa)、牛血清アルブミン (82 kDa)、オブアルブミン (49kDa)、カルボニックアンハイドラーゼ (33.3 Da)、大豆トリプシンインヒビター (28.6kDa)]、

2, C末端領域欠損組換え体シアル酸転移酵素精製標品 (pEBST Δ 178 由来)

4.3.12. 酵素反応生成物の同定

4.2.16.に記した方法で、反応生成物を分析した。その結果、発現プラスミド pEBST Δ 178 で形質転換した *E.coli* MV1184 由来の組換え体酵素を用いた場合の反応生成物の保持時間は 5.6 分で、STase 0160 を用いた場合の反応生成物の保持時間と一致したことから、組換え体酵素もラクトースのガラクトース残基の 6 位にシアル酸を転移させていることが明らかとなった (Fig. 4-15)。

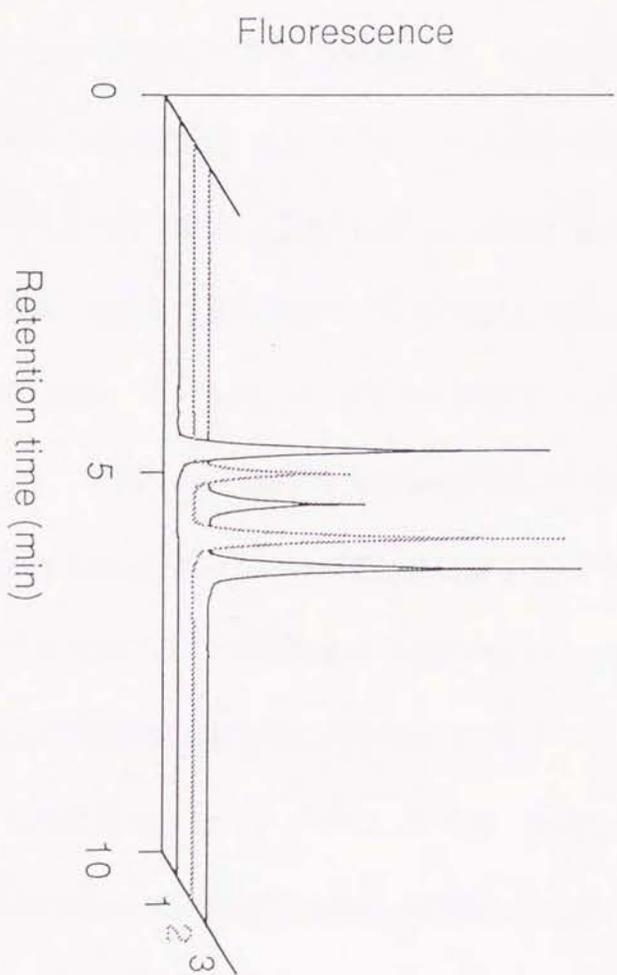


Fig. 4-15 ピリジルアミノ化糖を用いた反応生成物の同定

ピリジルアミノ化ラクトースを糖受容体として、酵素反応を行い、反応生成物の同定を行った。1: ピリジルアミノ化ラクトース、2: *P. damselae* JT0160 株由来のシアル酸転移酵素を用いた場合の反応生成物、3: C末端領域欠損組換え体シアル酸転移酵素 (pEBST Δ 178 由来) を用いた場合の反応生成物

4.4. 考察

大腸菌の SD 配列の一般的な配列（コンセンサス配列）は、AGGAGGT であると報告されている[126]。その機能は、以下のようなものであると考えられている。蛋白質合成の際にリボソームが SD 配列に結合することにより、SD 配列のすぐ下流の ATG を開始コドンとして認識し、蛋白質の合成が開始される。この SD 配列の機能は数種類の細菌の 16SrRNA の 3'末端領域の塩基配列から明らかにされている。その 16SrRNA の 3'末端領域には AUUCCUCCA という配列が存在しており、この配列が SD 配列と塩基対合することにより結合すると考えられている。STase 0160 の構造遺伝子上流には大腸菌の SD 配列のコンセンサス配列とかなり相同性の高い ATGAGG という配列が存在しており、この配列が *bst* 遺伝子の SD 配列であると推定される。

また、大腸菌の一般的なプロモーター領域を構成している -10 領域、-35 領域の配列は、TATAAT (-10 領域) 及び TTGACA (-35 領域) である[127, 128]。これらの配列は転写反応の最初の段階において RNA ポリメラーゼが結合する領域であると考えられている。転写反応開始時に RNA ポリメラーゼが特定の DNA 配列を認識し、適切な構造をとって結合し転写されるべき塩基に近づけるように DNA 2 本鎖を部分的に開裂させ、最終的に RNA 合成を開始すると考えられている。この際に、RNA ポリメラーゼが認識する DNA 配列がプロモーター領域である。*bst* 遺伝子の場合、SD 配列の上流約 80bp に大腸菌の -10 領域に対応すると推定される GATATT という配列が存在しており、またさらにその上流 25bp に大腸菌の -35 領域に対応すると推定される ATGACA という配列が存在していた。

これら 2 つの配列は大腸菌のコンセンサス配列と比較してその配列間の距離は若干異なるものの、塩基配列はよく一致しており、これらの配列を含む領域が *bst* 遺伝子のプロモーター領域であると推定される。またこの領域の上流には約 30bp に渡って(A+T)含量のさらに高い領域が存在していた。A-T の塩基対は G-C と比較して結合力が弱いことから、(A+T) 含量の高い領域では DNA の 2 本鎖が部分的に開裂しやすく、従って RNA ポリメラーゼが結合する頻度が高く、遺伝子の転写効率も高いと考えられている[129, 130]。この場合も同様にこの領域において RNA ポリメラーゼが結合するものと推定される。

RNA 合成の終結を起こすターミネーター領域の構造には、自己終結する単純なターミネーターと、補助的な因子 (Rho 因子) を必要とするターミネーターの 2 つのタイプがあるといわれている。一般に細菌の単純なターミネーターは以下に示す 3 つの特徴を持っている。(1) 中心に非反復配列を含む逆向き反復配列が存在し、その RNA 転写産物はステムアンドループ構造を作る。(2) そのステム構造のループ側に隣接した部位に (G+C) 含量の高い領域がある。(3) この配列の後ろに一連の A/T 塩基対が存在する[131]。*bst* 遺伝子の終始コドンの下流に 12bp の非反復配列をはさむ 8bp からなるステム構造を形成すると考えられる塩基は (G+C) 含量が高く、かなり安定な構造を取ると推定される。このステム構造の直後には T が 7 つ連続で存在しており、これらの領域が *bst* 遺伝子のターミネーターであると推定される。

オリゴヌクレオチドプローブ HTY01 を用いて、*Hind*III で消化した *P. damsela* JT0160 株のゲノム DNA についてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、

約 2.8kbp 付近に強いシグナルが検出された。この大きさは *Hind*III 断片としてそれぞれ pBSTN と pBSTC に挿入された遺伝子断片を合わせたものの大きさにほぼ等しかった。このことは STase 0160 の構造遺伝子中に *Hind*III 部位があるにも関わらず、ゲノム DNA では *Hind*III で切断されなかったことを意味しており、*P. damsela* JT0160 株の菌体内でゲノム DNA がメチル化などの修飾を受け *Hind*III で切断できなかったものと推定された。*bst* 遺伝子中に存在する *Hind*III の外側の塩基配列は GGAAGCTTCC であり、パリンドローム構造をもっていることが明らかになった。一般に、制限酵素部位やメチル化酵素部位の配列はそのほとんどがパリンドローム構造をとっていることが知られており、この GGAAGCTTCC という 10bp の塩基配列は *P. damsela* JT0160 株の持つ DNA メチル化酵素の認識配列の可能性がある。なお、pBSTN と pBSTC に挿入された遺伝子断片の両端に存在する *Hind*III の外側の塩基配列は AAGCTTA (5'上流側) と AAAGCTT (3'下流側) であり、上述の配列ではないためにこれらの部位はメチル化されず、*Hind*III で切断されたと考えられる。遺伝子工学的研究を行う際に制限酵素を用いることは必須であり、現在多くの 6bp の配列を認識する制限酵素が使用されている。特に最近は高等動物の遺伝子を扱うことが多くなっているため、8bp 以上の配列を認識する制限酵素が要望されている。しかし現在のところ、市販されている 8bp 以上の配列を認識する制限酵素はそれほど多くはない。一方、多くの細菌が生体防御の機構として同じ塩基配列を認識する DNA メチル化酵素と制限酵素を合わせ持つことが知られている。上述のとおり、今回クローニングした *bst* 遺伝子の ORF 中に存在する *Hind*III 部位の塩基配列は、GGAAGCTTCC

という 10bp からなるパリンδροーム構造をとっており、この塩基配列部分が *P. damsela* JT0160 株の持つ DNA メチル化酵素の認識配列の可能性が考えられた。さらに、*P. damsela* JT0160 株が 10bp の塩基配列を認識する DNA メチル化酵素を持つことが考えられることから、この配列を切断する制限酵素 (*PdaI*) が存在することが推定される。今後、この制限酵素に関する知見を得ることも有益と考えられる。

現在までに動物由来の 10 種類以上のシアル酸転移酵素遺伝子がクローニングされている[58]。これらクローニングされた動物由来のシアル酸転移酵素ファミリーの推定一次アミノ酸配列の比較・解析結果から、これら酵素間には高度に保存された領域が存在することが明らかにされている[41,109]。また、1991 年に *Escherichia coli* K-1 より α 2,8-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子が[33]、1996 年に *Neisseria meningitidis* 及び *Neisseria gonorrhoeae* より α 2,3-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子がクローニングされている[34]。今回、明らかになった STase 0160 の推定一次アミノ酸配列中には、動物由来のシアル酸転移酵素に普遍的に保存されているシアリルモチーフが存在しなかった。また、STase 0160 と *Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae* 由来のシアル酸転移酵素及び *Escherichia coli* K-1 由来 α 2,8-シアル酸転移酵素間の相同性解析の結果、これら間には高い相同性が認められなかったことから、STase 0160 はこれまでに知られている動物及び微生物由来のシアル酸転移酵素とも進化的に全く異なる酵素であることが強く示唆され、本酵素は新規なシアル酸転移酵素であると考えられ

る。

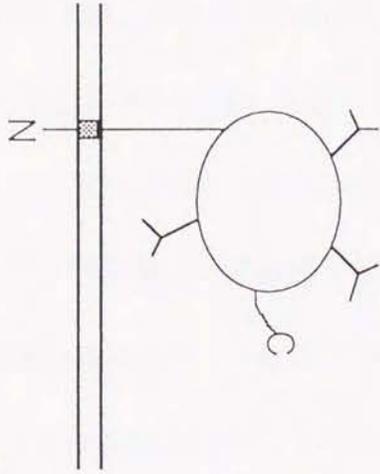
上述のとおり、STase 0160 の推定アミノ酸配列は、これまでに知られているシアル酸転移酵素とは高い相同性は認められなかったが、その C 末端側には、大腸菌のリン酸輸送システム制御蛋白質 (PhoU 蛋白質) と非常に相同性の高い部分が存在した。この相同性の高いアミノ酸配列部分の二次構造の解析から、この部分が α -ヘリックス構造を形成する可能性の高いこと、さらに疎水性アミノ酸が一方向に配列される可能性の高いことが推定された。STase 0160 を、菌体から抽出するために界面活性剤の添加が必須であったことから、これまでに知られている動物由来のシアル酸転移酵素と同様に本酵素は膜結合性蛋白質と考えられる。そこで、STase 0160 の C 末端側に存在する α -ヘリックス構造の機能を解析するため、すなわち、酵素蛋白質の膜結合にこのアミノ酸配列部分が関与していることを確かめるために、 α -ヘリックス構造を形成すると推定されるアミノ酸配列を含む発現プラスミド (pEBST) 及び、 α -ヘリックス構造を形成するアミノ酸配列の上流に停止コドン挿入した 2 種類の発現プラスミド (pEBST Δ 137 及び pEBST Δ 178) を構築し、それらが大腸菌で発現させて、それぞれの菌体破碎液と可溶性蛋白質画分の酵素活性を測定した。その結果、いずれの発現プラスミドで形質転換した大腸菌の菌体破碎液中にもシアル酸転移活性が認められた。一方、発現プラスミド pEBST で形質転換した大腸菌の可溶性蛋白質画分にはシアル酸転移活性は認められなかったが、C 末端側の α -ヘリックス構造を形成するアミノ酸配列の上流に停止コドン挿入した発現プラスミド

(pEBST Δ 137 及び pEBST Δ 178) で形質転換した大腸菌の可溶性蛋白質画分には、培養液 1 liter あたり 37 U (pEBST Δ 137) 及び 121 U (pEBST Δ 178) のシアル酸転移活性が認められたことから、これらの組換え体酵素は可溶性蛋白質として生産されていることが推定された。さらに、C 末端側に形成される α -ヘリックス構造が STase 0160 の膜結合領域である可能性が示唆された。また、組換え体酵素の比活性は STase 0160 のそれと比較してほぼ同程度であった。動物由来の Gal β 1,4-GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子を大腸菌で発現させると、不溶性蛋白質として蓄積され、これを可溶性蛋白質にするために蛋白質を変性させる必要があったが[132]、今回構築した発現プラスミドではその必要がないことから、本発現プラスミドは Gal β 1,4-GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素を生産するために非常に有効と考えられる。

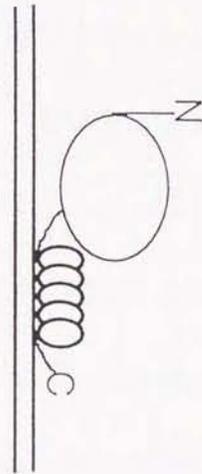
これまでにクローン化された動物由来のシアル酸転移酵素の推定一次構造から、シアル酸転移酵素は他の動物由来の糖転移酵素と同様に II 型の膜結合トポロジーを有し、N 末端の短い細胞質領域、膜結合領域、ゴルジ内腔幹領域と酵素蛋白質の C 末端部分からなるゴルジ内腔活性領域からなるものと考えられている[58,111]。今回、STase 0160 の膜結合領域と推定された C 末端部分に存在する α -ヘリックス構造部分を削除した組換え体 STase 0160 が可溶性蛋白質になったと推定されることから、大腸菌から精製されているピルビン酸酸化酵素と同様に (1) 本酵素は C 末端部分に存在する α -ヘリックス構造を介して膜に結合している[133]、(2) STase 0160 の活性領域は、酵素蛋白質の上記 α -ヘリックス構

造よりも N 末側に存在する、と考えられた。動物由来のシアル酸転移酵素は、他の糖転移酵素と蛋白質分子の構造的に類似性が認められているが、本酵素は、これまでに知られている糖酸転移酵素と蛋白質分子の構造的にも全く異なり、新規なものであることが明らかとなった。今回得られた結果から推定される STase 0160 の蛋白質分子の構造と動物由来のシアル酸転移酵素の推定構造の模式図を Fig. 4-16 に示す。

bst 遺伝子の一次転写産物は 675 アミノ酸残基からなり、その推定分子量は 76.5kDa と見積もられた。*P.damsela* JT0160 株から精製された STase 0160 の N 末端アミノ酸配列は、*bst* 遺伝子の一次転写産物の 17 番目から 29 番目のアミノ酸配列と完全に一致していた。また、*bst* 遺伝子の一次転写産物の N 末端側に疎水性の領域が存在し、また ORF の始めのメチオニン残基の直後には、+チャージをもつリジン残基が 2 残基存在していたことから、このメチオニン残基から 16 番目のシステイン残基の前までの 15 アミノ酸からなるアミノ酸配列が、STase 0160 のシグナル配列であると考えられた。それゆえ、成熟した ST0160 は、推定分子マス 74.8kDa で 660 個のアミノ酸残基からなると考えられるが、*P.damsela* JT0160 株から精製された STase 0160 は、SDS-PAGE で 61kDa、ゲルろ過で 64kDa の分子マスを示すことから、成熟酵素は C 末端部分及び N 末端部分でプロセッシングを受けた後に形成されるものと考えられる。今後、STase 0160 の C 末端アミノ酸配列の解析を行い、この点について明らかにする必要がある。また、*bst* 遺伝子の一次転写産物にはシグナルペプチドと考えられる部位が存在することから、成熟した酵素は細胞質側から分泌され、ペリプラズム空間に存在する



動物由来シアル酸転移酵素の構造

*P. damsela* JT0160由来シアル酸転移酵素の構造Fig. 4-16 *P. damsela* JT0160由来シアル酸転移酵素と動物由来のシアル酸転移酵素の構造

動物由来のシアル酸転移酵素は、N末端側の膜貫通領域で膜結合していることが明らかにされている。一方、*P. damsela* JT0160由来のシアル酸転移酵素は、C末端側に形成されると推定される α -ヘリックス構造を介して膜に結合することが推定された。

ものと推定される。

発現プラスミド pEBST Δ 178 で形質転換した大腸菌内で、組換え体酵素は可溶性酵素として生産されることが考えられるものの、その回収率は非常に低く、酵素の大量供給のためには改善すべき問題である。この問題を解決するために、今後組換え体酵素を菌体外へ分泌させる生産系の構築が必要と考えられる。微生物による有用な異種蛋白質の大量生産を考えた際に、生産した異種蛋白質を菌体外に分泌させることができれば、その連続生産が可能となり、さらにその精製が容易になると考えられる。しかし、大腸菌はコリシン、ヘモリシン等若干の例を除き菌体外へ分泌する蛋白質はないことから、大腸菌における蛋白質の菌体外分泌機構はないと考えられている。これまでに大腸菌を宿主として異種蛋白質を菌体外に分泌する例も報告されているが、これは生産された蛋白質自身の性質による分泌の可能性が高く、汎用性のある分泌生産系ではないと考えられていることから、将来的には酵母を宿主細胞として α 因子リーダー配列を用いる組換え体酵素の分泌生産系等を構築することにより、可溶性酵素の大量供給が可能になると期待される。

本章では、原核生物の生産するシアル酸転移酵素として最初に精製された、*P. damsela* JT0160 株由来の STase 0160 をコードする遺伝子 (*bst* 遺伝子) をクローニングし、大腸菌において活性な酵素蛋白質として発現させることに成功した。さらに、STase 0160 の膜結合領域や酵素蛋白質分子の構造に関する知見が得られ、組換え体酵素を可溶性蛋白質として発現させることに成功した。今後、今回得られた知見をもとに、可溶性 STase 0160 の更なる高生産系が構築できる

と考えられる。