

平成 23 年度新潟薬科大学薬学部卒業研究Ⅱ

論文題目

ランダム突然変異導入による

キラートキシン HM-1 活性への影響

The effect of random-mutagenesis
in the killer toxin HM-1 on fungicidal activity

生化学研究室 6 年

06P190 山崎 道穂

(指導教員:宮本 昌彦)

要 旨

キラートキシンは他の酵母の生育を阻害する活性(キラー活性)をもつ、酵母が生産するタンパク質の総称である。これまでに数種のキラートキシンの性質が明らかにされている。そのうち酵母 *Williopsis saturnus* var. *mrakii* が産生するキラートキシンの HM-1 は安定性が高く、*Saccharomyces cerevisiae*、*Hansenula anomala* などの酵母には強い抗真菌活性を示す。しかし、*Candida albicans*、*Cryptococcus* 属などには活性を示さないため、医療への応用、実用化には至っていない。HM-1 の活性を活かし医療への応用、実用化につなげるために本研究では HM-1 の遺伝子の一部をランダムに変異させ、その活性の変化を比較した。

今回分析したランダム突然変異導入クローン中にはキラー活性が上昇したものはなく、キラー活性が見られなかった。この結果から、本研究により変異させたアミノ酸が HM-1 のキラー活性に重要であることが確認できた。ランダム変異を同時に複数のアミノ酸に導入することによってキラー活性を上げることは容易ではないのかもしれない。

キーワード

- | | | |
|-------------|-------------|----------|
| 1. 酵母 | 2. キラートキシン | 3. キラー活性 |
| 4. HM-1 | 5. ランダム突然変異 | 6. 形質転換 |
| 7. DNA 配列分析 | 8. PCR | |

目 次

1. 序	1
2. 方法	1
3. 結果	5
4. 考察	6
謝 辞	9
引用文献	10

論文

1. 序

酵母が産生するキラートキシンはタンパク質であり、他の酵母の生育を阻害する活性(キラー活性)をもっている。キラー現象が 1963 年に Makower と Bevan によって発表されたのを始まりとして¹⁾、キラートキシンに関する研究が行われてきた。研究によりこれまでに数種のキラートキシンの遺伝子の所在、分子構造、最適 pH、性質などが明らかにされている。

酵母 *Williopsis saturnus* var. *mrakii* が産生するキラートキシン HM-1 は 88 アミノ酸残基で構成されている。分子内に 5 つのジスルフィド結合を持っているため、キラートキシンの中でも熱や pH 変化に対しての安定性が高い²⁾。HM-1 は *Saccharomyces cerevisiae*、*Hansenula anomala* などの酵母には強い活性を示す^{3,4)}。しかし、*Candida albicans*、*Cryptococcus* 属などには活性を示さない。そのため医療への応用、実用化はされていない。そこで病原真菌に対して殺菌作用を示すように、HM-1 の活性を強化し医療への応用、実用化につなげるため、本研究では HM-1 の遺伝子の一部を変異させ、その活性の変化を比較し、考察を行った。

2. 方法

2. 1. 試薬等

r Taq DNA polymerase、エメラルド Amp、EX taq HS polymerase は TaKaRa から購入した。100 μ M cHM1_T26-V34_3、⑩X(39-41)、⑩X(45-47)はインビトロジェンに注文し作製した。YE_pSFHM-1、 λ /HindIII + EcoR I (λ -DNA 溶液、10 \times M buffer、HindIII、EcoR I)、KOD plus polymerase、ligation high Ver.2 は TOYOBO から購入した。Quantum Prep Plasmid Mini Prep Kit(Cell Resuspension Solution①、Cell Lysis Solution②、Neutralization Solution③、Quantum Matrix④、Wash Buffer⑤)は BioRad から購入した。*S.cerevisiae* BY4743 と Yeast Ez frozen Transformation II Kit はフナコシから購入した。ザイモリアーゼは生化学工業から購入した。50 μ M primer 5HM1D と 50 μ M primer 3HM1D はシグマに注文して作製した。

各プライマーの DNA 配列を表 1 に示した。DNA 配列分析用試薬等(Quick Start Mix、Sample Loading Solution)はベックマンコールターから購入した。LB 培地は 0.5% yeast extract、1% tryptone、1% NaCl の組成、YPD 培地は 1% yeast extract、2% peptone、2% glucose の組成、SD(+H+U)培地は 0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid、2% glucose、20μg/ml histidine、20μg/ml uracil の組成、YPGal+Suc 培地は 1% yeast extract、2% peptone、2% galactose、0.5% sucrose の組成で調製した。

表 1 各プライマーの DNA 配列

cHM1_T26-V34_3	GACATTAGCTCCTATGCCTACACAAG
ⓈX(39-41)	CACTGGATGGTTNNKNNKNNKAGCACTGATGGGAA GCAAGGGTGTGCTACAATCTGGGAAGGC
ⓈX(45-47)	CACTGGATGGTTACAGGCGGCAGCACTGATNNKNN KNNKGGGTGTGCTACAATCTGGGAAGGC
5HM1D	CACTGTCCTCCACATC
3HM1D	GTTGGTGTGGTATCCTC

(ただし、K = G または T、N = AGCT のどれか)

2. 2. プラスミド作製

PCR 反応は比較的合成の正確性が高い Ex taq polymerase を用いて行った。鋳型には YEp SF HM-1、プライマーには HM1-T26-V34-3 とⓈX(39-41)又はⓈX(45-47)を用い、サーマルサイクラーを使用して 94℃15 秒→45℃30 秒→72℃7 分を 40 サイクル行った。PCR 反応液を 0.7% アガロース／1×TBE ゲルを用いて電気泳動し、DNA の増幅を確認後、エタノール沈殿を行い、さらに平滑末端処理を行った。(平滑末端処理:KOD plus polymerase で、15 秒間 96℃→10 分間 68℃で反応させた)。平滑末端処理後にエタノール沈殿を行い、滅菌水、ligation high Ver.2 を加え、1 時間、16℃で保温した。保温後エタノール沈殿を行い、プラスミドサンプルとした。

2. 3. 大腸菌の形質転換

LB 液体培地に大腸菌(DH5 α 株)を加え、37℃で振とう培養した。Abs600nm が 0.7 ～1.0 になったことを確認したのち、培地を水に置き換えて形質転換用大腸菌とした。エ

レトロポレーション装置を用いて作製したプラスミドを形質転換用大腸菌に導入し、LB/アンピシリンプレート培地にまき、37℃で一晩培養した。コロニーが形成されていることを確認し、プレートに LB 液体培地を注ぎ、コロニーを LB 液体培地に懸濁した。これを大腸菌培養液とした。

2. 4. プラスミド採取

大腸菌培養液を 12,000rpm、2 分間遠心し、沈殿を集めた。この沈殿に Cell Resuspension Solution ①を加え、懸濁した。懸濁後 Cell Lysis Solution②、Neutralization Solution③を加え、12,000rpm、5 分間遠心した。遠心後 Spin Filter 上の Quantum Matrix④に遠心上清を加え、ゆっくり混合したのち 12,000rpm、1 分間遠心した。遠心後、Spin Filter を Wash Buffer⑤で 2 回洗浄した。Spin Filter を別の tube にセットして水を加え、12,000rpm、1 分間遠心し、tube の底に得られた液をエタノール沈殿し、プラスミド溶液とした。

2. 5. 酵母の形質転換

YPD 液体培地に *S.cerevisiae* BY4743 を加え、30℃で振とう培養した。Abs600nm が 1.0 になったことを確認し、10,000rpm、1 分間遠心し、沈殿を集めた。この沈殿に Yeast Ez frozen Transformation II Kit の Solution1 を加え、よく混ぜたのち 10,000rpm、1 分間遠心し、沈殿を集め、Yeast Ez frozen Transformation II Kit の Solution2 を加えた。この酵母液に前述のプラスミド、Yeast Ez frozen Transformation II Kit の Solution3 を加え、よく混合したのち、ローテーターを用いて回転させながら 45 分間、30℃で保温した。混合物の一部を SD(+H+U)プレート培地にまき、30℃で 2～3 日間培養した。HM-1 変異体遺伝子導入酵母コロニーが形成されていることを確認した。

2. 6. HM-1 の活性の評価

YPGal+Suc プレート培地に検定菌(*S.cerevisiae* BY4743)をスポットし、乾燥させた。HM-1 変異体遺伝子導入酵母コロニーをまず SD(+H+U)プレート培地(レプリカ用)に植え、次に YPGal+Suc プレート培地(検定用)のスポットの縁に植えた。30℃で一晩培養し、生育阻止円の有無を観察してデジタルカメラで撮影した。

2. 7. コロニーPCR

HM-1 変異体遺伝子導入酵母コロニーをつつき、SD(+H+U)液体培地に植え、30℃で一晩振とう培養した。一晩培養させた酵母を 3,000rpm、5 分間遠心し、沈殿を集めた。沈殿に 1mol/l ソルビトール、0.1mol/l EDTA を加え、懸濁し、さらに 10mg/ml ザイモリアーゼを加え、1 時間、37℃で保温した。保温後、12,000rpm、10 秒間遠心し、沈殿を集めた。沈殿に TE を加え、固まりがなくなるまでよく混ぜたのち、10% SDS 溶液を加え、5 分間、65℃で保温した。保温後、酢酸カリウムを加えてよく混ぜ、5 分間、0℃で冷却した。冷却後、12,000rpm、5 分間遠心した。上澄みをエタノール沈殿し、PCR に使用した。

あるいは TE、ザイモリアーゼを tube に入れてこの混合液に SD(+H+U)プレート(レプリカ用)からつついた HM-1 変異体遺伝子導入酵母コロニーを入れ、懸濁させ、60 分間 30℃→5 分間 98℃で反応させた。12,000rpm、1 分間遠心し、上澄みを PCR に使用した。

PCR 反応は r taq DNA polymerase を用いて行った。プライマーには 50μM primer 5HM1D と 50μM primer 3HM1D を用い、サーマルサイクラーを使用して 94℃ 15 秒→45℃ 20 秒→72℃ 1 分を 30 サイクル行った。PCR 反応液を 0.7% アガロース／1×TBE ゲルを用いて電気泳動し、DNA の増幅を確認後エタノール沈殿を行った(PCR 産物)。

エメラルド Amp を用いた PCR 反応も行った。プライマーには 50μM primer 5HM1D と 50μM primer 3HM1D を用い、サーマルサイクラーを使用して 94℃ 15 秒→45℃ 20 秒→72℃ 1 分を 35 サイクル行った。PCR 反応液を 0.7% アガロース／1×TBE ゲルを用いて電気泳動し、DNA 増幅を確認後エタノール沈殿を行った(PCR 産物)。

2. 8. DNA 配列分析

Quick Start Mix、50μM primer 5HM1D、PCR 産物を tube に入れ、サーマルサイクラーを用いて、94℃ 20 秒→45℃ 20 秒→60℃ 4 分を 30 サイクル行った。この反応液をエタノール沈殿した。Sample Loading Solution を加えて沈殿を溶かし、「DNA 配列分析用サンプル」とした。DNA 配列分析機を用いて、サンプルの分析を行い、データ整理を行った。

3. 結果

野生型 HM-1 は通常 *S.cerevisiae* BY4743 株に対しキラー活性を示す。また、HM-1 分子の 39 番目～48 番目のアミノ酸が抗真菌活性に重要であるという報告がある⁵⁾。そこで、39～41、44～47 番目のアミノ酸を変異させて抗真菌活性の変化を観察した。これ以降、BY4743 株に対しキラー活性を示した HM-1 変異体導入酵母クローンを陽性、キラー活性を示さなかった HM-1 変異体導入酵母クローンを陰性とする(図 1)。

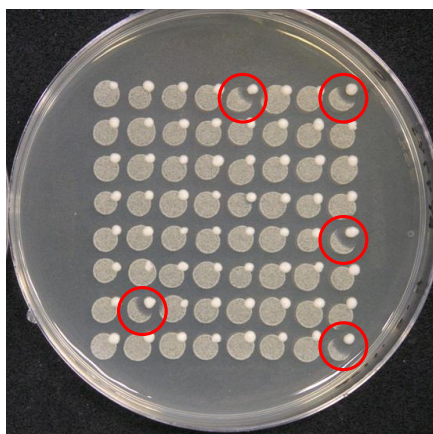


図 1 キラー活性の評価

○:キラー活性を示している(生育阻止円が見られる) ⇒ 陽性

○以外:キラー活性を示していない(生育阻止円が見られない) ⇒ 陰性

アミノ酸残基 39～41 変異 HM-1

検定した 200 クローンのうち、陽性は 18 クローンであり、陽性率は 9%であった。そのうち、DNA 配列が解読できた 6 クローンは、すべて野生型と同じ配列であった。また任意に選び分析した陰性のうち、解読できた 12 クローンの DNA 配列は表 2 のようになった。

アミノ酸残基 44～47 変異 HM-1

検定した 221 クローンのうち、陽性は 10 クローンであり、陽性率は 4.5%であった。そのうち、DNA 配列が解読できた 2 クローンは、どちらも野生型と同じ配列であった。また任意に選び分析した陰性のうち、解読できた 6 クローンの DNA 配列は表 3 のようになった。

表 2 アミノ酸残基 39～41 変異 HM-1 の陰性クローンの DNA 塩基配列

アミノ酸残基番号	39		40		41	
	DNA	アミノ酸	DNA	アミノ酸	DNA	アミノ酸
Wild type	ACA	Thr	GGC	Gly	GGC	Gly
陰性クローン 1	CAT	His	GTC	Val	AGC	Ser
2	GTT	Val	TTT	Phe	TTT	Phe
3	TCG	Ser	TGT	Cys	AAG	Lys
4	GGG	Gly	AGT	Ser	CAT	His
5	GTG	Gly	GTT	Val	AAT	Asn
6	GTG	Val	CCG	Pro	TTT	Phe
7	TGT	Cys	TTG	Leu	TAT	Tyr
8	GGG	Gly	CTG	Leu	GGT	Gly
9	CTT	Leu	TTT	Phe	CAG	Gln
10	GTT	Val	TCT	Ser	CTG	Leu
11	CGT	Arg	TCT	Ser	GCG	Ala
12	GTG	Val	TGT	Cys	GGT	Gly

表 3 アミノ酸残基 45～47 変異 HM-1 の陰性クローンの DNA 塩基配列

アミノ酸残基番号	45		46		47	
	DNA	アミノ酸	DNA	アミノ酸	DNA	アミノ酸
Wild type	GGG	Gly	AAG	Lys	CAA	Gln
陰性クローン 1	TGT	Cys	CTT	Leu	TTG	Leu
2	TTT	Phe	GGG	Gly	GTG	Val
3	AGT	Ser	TGT	Cys	CGT	Arg
4	GTG	Val	TCA	Ser	AGT	Ser
5	TCT	Ser	CTT	Leu	GCG	Ala
6	CCG	Pro	GGT	Gly	CTG	Leu

4. 考察

検定した全 421 クローンのうち、28 クローンしかキラー活性を示さなかった。そのキラー活性を示したクローンのうち、解読できた 8 クローンの HM-1 遺伝子配列はすべて野生型と同じ配列であった。そこで次に、キラー活性を示さなかった陰性クローンに着目した。

39 番目の Thr は、陰性クローンでは His、Val、Ser、Gly、Cys、Leu、Arg に変異している。Val、Leu への変異により活性が低下したのは親水性が大きく減少したと官能

基(ヒドロキシ基)が喪失したことに起因していると考えられる。表 2 のクローン 3 では Ser へ変異しており、Ser は類似アミノ酸でメチル基の有無の違いだけでも関わらず活性が低下している。このことから、同時に変異が起こっている 40、41 番目のアミノ酸がキラー活性に影響していることも考えられる。Cys への変異により活性が低下した理由として、以下のことが考えられる。HM-1 は分子内に 5 ヶ所のジスルフィド結合を持っているが、他のアミノ酸から Cys に変わることにより、ジスルフィド結合の形成ミスを起こし、それがタンパク質の構造に影響を与え、構造が大きく崩れたためだと考えられる。そのため、生成した HM-1 が効率よく細胞外へ分泌されなくなった可能性がある。His、Arg への変異により活性が低下したのはヒドロキシ基からそれぞれイミダゾール基、グアニジノ基に変わり、官能基の性質が大きく変化したことが起因していると考えられる。

40 番目と 41 番目と 45 番目はいずれも野生型 HM-1 では Gly であり、陰性クローンではそれぞれ以下のように変異していた。40 番目の Gly は陰性クローンでは Val、Phe、Cys、Ser、Pro、Leu に変異している。また、41 番目の Gly は陰性クローンでは Ser、Phe、Lys、His、Asn、Tyr、Gln、Leu、Ala に変異している。そして、45 番目の Gly は陰性クローンでは Cys、Phe、Ser、Val、Pro に変異している。40 番目と 45 番目のアミノ酸に見られた Cys への変異による活性の低下の理由は前述の通りジスルフィド結合の形成ミスが考えられる。40 番目と 45 番目のアミノ酸に見られる Pro への変異による活性の低下の理由として、以下のことが考えられる。Pro は環状イミドであるためペプチド結合の角度が固定され、タンパク質の立体構造に影響を与え、その結果、活性部位の構造が大きく崩れた可能性が考えられる。また、それに伴い、分泌効率も低下しているのかもしれない。また、陰性クローンには Gly→大きいアミノ酸の変異のケースが多い。このケースにおいても、タンパク質の構造が崩れたことが原因だと考えられる。

46 番目の Lys は陰性クローンでは Leu、Gly、Cys、Ser に変異していた。Leu への変異により活性が低下したのは官能基(アミノ基)が喪失したことに起因していると考えられる。Cys への変異による活性の低下の理由は前述の通りである。Ser への変異により活性が低下したのはアミノ基からヒドロキシ基に変わり、官能基の性質が変化したことに起因していると考えられる。

47 番目の Gln は陰性クローンでは Leu、Val、Arg、Ser、Ala に変異していた。Leu、Val、Ala への変異により活性が低下したのは親水性が大きく減少し、タンパク質の構造が崩れたことに起因していると考えられる。Arg、Ser への変異により活性が低下したのは

アミド基からそれぞれグアニジノ基、ヒドロキシ基に変わり、官能基の性質が変化したことに起因していると考えられる。

変異による抗真菌活性減少の理由を 39、40、41 また 45、46、47 番目のアミノ酸それぞれ単独で考えてきたが、実際にはアミノ酸が複数同時に変わっているため、アミノ酸残基の位置が問題なのか変異した官能基のタイプが問題なのか判断しにくい。だが、これらの領域が変異するとほぼ確実に活性が低下することから、これらのアミノ酸が HM-1 のキラー活性に重要であることが再確認できた。そのため、これらの領域のアミノ酸を変異させてキラー活性を上げることは難しく、医療への応用、実用化につなげることは容易ではないのかもしれない。

謝 辞

本研究を行うにあたり丁寧なご指導および、本論文作成にあたり多くのご助言を賜りました、宮本昌彦助教に深く感謝いたします。

共同研究者として本研究における議論、検討を通じて多くの知識や示唆をいただきました、大谷麻由良さんに深く感謝いたします。

研究を進めるにあたり激励を賜りました、同研究室の皆様に深く感謝いたします。

引 用 文 献

1. Bevan, E.A., and Somers, J.M. (1969) Somatic segregation of the killer (k) and neutral (n) cytoplasmic genetic determinans in yeast. *Genet Res.* **14**, 71-77
2. Yamamoto, T., Imai, M., Tachibana, K., and Mayumi, M. (1986) Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. *FEBS Lett.* **195**, 253-257
3. Young, T.W., and Yagiu, M. (1978) A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **44**, 59-77
4. Kimura, T., Kitamoto, N., Ohta, Y., Kito, Y., and Iimura, Y.J. (1995) Structural relationships among killer toxins secreted from the killer strains of the genus *Williopsis*. *J Ferment Bioeng.* **80**, 85-87
5. Selvakumar, D., Zhang, Q.Z., Miyamoto, M., Furuichi, Y., and Komiyama, T. (2006) Identification and characterization of a neutralizing monoclonal antibody for the epitope on HM-1 killer toxin. *J Biochem.* **139**, 399-406