

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	T7 RNA ポリメラーゼおよび Avian myeloblastosis virus 由来逆転写酵素の耐熱化による RNA 増幅反応の高効率化
Title(English)	
著者(和文)	牧野友理子
Author(English)	Yuriko Makino
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12040号, 授与年月日:2021年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:八波 利恵,和地 正明,福居 俊昭,蒲池 利章,平沢 敬,中村 聡
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12040号, Conferred date:2021/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of (工学)
学生氏名： Student's Name	牧野 友理子		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main) 八波 利恵
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

TRC 反応 (transcription reverse-transcription concerted reaction) は、等温で迅速に RNA を増幅する反応である。臨床現場において、TRC 反応により病原体中の RNA を増幅して検出することで、結核菌やノロウイルスなどの病原体の有無を確認できる。TRC 反応では、avian myeloblastosis virus (AMV) 由来逆転写酵素 AMV-RT によって、標的 RNA から T7 プロモーター配列を付加した cDNA を合成したのち、T7 RNA ポリメラーゼによって RNA を増幅する。この反応は 42-43°C の一定温度で繰り返され、増幅した RNA は蛍光色素を結合したプローブで特異的に蛍光検出される。検出可能な RNA の分子数は 10³ コピー程度であり、PCR に比べて検出感度の低いことが課題であった。TRC 反応産物のアガロースゲル電気泳動では、検出対象の核酸バンド以外にも複数のバンドがみられ、反応中に副反応が起こっていることがその原因と考えられた。そこで、反応温度を上昇させ、検出対象ではない核酸 (副反応産物) の生成を抑制することで、検出感度の向上が可能と考えた。本研究では、TRC 反応で用いる T7 RNA ポリメラーゼおよび AMV-RT について、大腸菌における発現を行い、進化分子工学およびタンパク質工学による耐熱性の向上を目指した。

まず、T7 RNA ポリメラーゼの耐熱性向上を目指し、エラーブローン PCR により、T7 RNA ポリメラーゼの変異体ライブラリーを作製した。T7 プロモーター配列を有する DNA 断片とともに 46°C で 60 分反応して得られた RNA 量を測定することで、各変異体の耐熱性を評価した。耐熱化変異体に含まれる変異を組み合わせることにより、二置換変異体 V685A/Q786L および M490V/Q786M を選抜した。これらの変異体を疎水カラム、陰イオンカラム、ゲルろ過カラムを用いて精製し、高純度精製品を得た。示差走査熱量測定 (DSC) に供したところ、いずれの変異体も野生型に比べ、変性中点温度が高温側にシフトし、耐熱性が向上していることがわかった。V685A/Q786L は酵素添加量増加に伴い活性が低下する挙動を示したため、M490V/Q786M についてのみ耐熱性をより詳細に評価した。その結果、野生型 T7 RNA ポリメラーゼでは 45°C 以上の温度で RNA ポリメラーゼ活性が大幅に低下したのに対し M490V/Q786M では 47°C 付近まで活性を維持していることがわかった。さらに、TRC 反応産物をアガロースゲル電気泳動に供した結果、M490V/Q786M を使用した高温 TRC 反応 (47°C) において、副反応産物の生成を低減できることがわかった。同時に、従来の野生型による中温 TRC 反応 (43°C) と比較したところ、より低コピー試料においても検出対象の核酸が確認でき、高感度化していることが明らかになった。

次に、AMV-RT の大腸菌における発現および耐熱性向上を目指した。AMV-RT は、AMV が感染したトリ細胞においてまず β 鎖が生成し、その C 末端領域におけるタンパク質分解により α 鎖が生じ、細胞内には α 体、αβ ヘテロ二量体、β ホモ二量体の 3 種類の構造が存在する。αβ ヘテロ二量体が TRC 反応に最適であることが知られているが、これまでに、αβ ヘテロ二量体の大腸菌における高効率発現は行われていない。そこで、使用コドンで大腸菌に最適化した AMV-RT β 鎖発現型プラスミド pTrcAMVB を作製し、大腸菌における発現を試みた。pTrcAMVB を有する大腸菌 W3110 株を培養し、IPTG を添加してさらに 25°C で 3 日間培養した。無細胞抽出液を SDS-PAGE に供した結果、約 95 kDa の β 鎖のバンド以外に、約 65 kDa の α 鎖と思われるバンドも観察された。これら 2 本のバンドの N 末端アミノ酸配列が一致したことから、大腸菌においても β 鎖のタンパク質分解により α 鎖が生成していることが示唆された。

さらに、αβ ヘテロ二量体の高純度精製を試みた。疎水カラムおよびホスフォセロースカラムを用いて精製し、α 体、αβ ヘテロ二量体、β ホモ二量体の高純度精製に成功した。TRC 反応によりそれぞれの活性を調べたところ、αβ ヘテロ二量体の活性が最も高く、その比活性は Native AMV-RT と同程度であった。次に、AMV-RT の耐熱化を試みた。ここで、TRC 反応には、本研究で取得した耐熱化 T7 RNA ポリメラーゼ変異体 M490V/Q786M を使用した。まず、エラーブローン PCR により AMV-RT αβ 鎖の変異体ライブラリーを作製し、無細胞抽出液を用いて高温 TRC 反応 (46°C) を行うことで、耐熱性が向上した一置換変異体 S65G および A689V を取得した。別途作製した二置換変異体 S65G/A689V とともに精製を行い、46°C、10 分間の熱処理を施した後、高温 TRC 反応 (46°C) に供した。その結果、いずれの変異体も、野生型と比較して、熱処理後の“検出時間” (反応前後の蛍光強度比が 1.2 となるまでの時間) の遅延が抑制されていることが確認された。また、高温 TRC 反応 (46°C) による結核菌の検出を試みたところ、AMV-RT の耐熱化による検出時間の短縮は見られなかったものの、低コピー試料において検出時間のばらつきを抑えることに成功した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工学 系
Department of Graduate major in 生命理工学 コース
学生氏名： 牧野 友理子
Student's Name

申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員 (主)： 八波 利恵
Academic Supervisor(main)
指導教員 (副)：
Academic Supervisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

TRC reaction is one of the isothermal amplification reactions used for detecting RNA of pathogens such as viruses. The reaction is conducted at 42-43°C with AMV-RT and T7 RNA polymerase. However, the detection sensitivity was lower than that of PCR due to the generation of by-products during the reaction. It is expected that the detection sensitivity can be improved by increasing the reaction temperature. On the other hand, the AMV-RT and T7 RNA polymerase do not have sufficient thermostability, and this has been a bottleneck in the practical application of the TRC reaction. In this study, T7 RNA polymerase and AMV-RT $\alpha\beta$ heterodimer which is known to be active form for TRC reaction were expressed in *E. coli*, and the thermostability was improved by directed evolution and protein engineering.

Random mutations were introduced into the T7 RNA polymerase gene by error-prone PCR. Thermostable T7 RNA polymerase were selected by detection of RNA polymerase activity at 46°C. Obtained mutants V685A/Q786L and M490V/Q786M were purified and the thermostability was measured by DSC. Both mutants showed high thermostability compared to the wild type (WT) and M490V/Q786M was more optimal for TRC reaction. In the high-temperature TRC reaction (47°C) using M490V/Q786M, it was found that the generation of by-products could be reduced. In addition, compared with the conventional medium-temperature TRC reaction (43°C) using WT, the high-temperature reaction achieved higher sensitivity and shorter detection time.

Codon usage of β -subunit gene was optimized for *E. coli* and culture conditions were examined. The active AMV-RT $\alpha\beta$ heterodimer was successfully expressed in *E. coli* without any chaperons and tags. N-terminal amino acid sequences suggested that α subunit component of $\alpha\beta$ heterodimer could be generated by proteolysis of β subunit at the C-terminal side in *E. coli* cells. RNA amplification activity of *E. coli*-produced $\alpha\beta$ heterodimer was compared with that of native AMV RT (Life Sciences Advanced Technologies, St. Petersburg, FL). Both enzyme preparations showed almost the same activity.

AMV-RT mutants were generated by random mutation and their thermostability was measured by TRC reaction. The high-temperature TRC reaction (46°C) combining the heat-resistant AMV-RT mutant S65G/A689V and T7 RNA polymerase mutant M490V/Q786M was conducted. As a result, although the detection time was not shortened, the variation of the detection time was suppressed in low-copy samples, indicating that thermostability of AMV-RT and T7 RNA polymerase may contribute to the improvement of the sensitivity of the TRC reaction.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).