

原核微生物の生命機能メカニズムに関する研究～バクテリアからアーキアへ～



九州大学大学院農学研究院 教授 石野良純

はじめに

遺伝子操作技術は、大腸菌を中心とした原核微生物の分子生物学から生まれた。制限酵素、DNA リガーゼを用いた試験管内での遺伝子切り貼りの操作は、PCR の開発によって著しく簡便になり、生命科学の飛躍的な発展へと繋がった。そして、現在注目を集めるゲノム編集技術は、生命科学の発展をさらに加速している。これらのキーテクノロジーは、バクテリアやアーキアが産生する DNA 関連酵素の利用によって生み出されたものである。筆者は大学院入学後から今日まで一貫して核酸に作用する酵素の研究を行ってきた。本受賞講演では、生命現象を理解するための基礎研究から発見した種々の酵素、タンパク質の性質解析と、それらが有用技術に繋がった成果を紹介したい。

1. 遺伝子工学用酵素

1-1. DNA リガーゼ

初期の遺伝子操作技術を応用し、大腸菌のゲノム DNA から DNA リガーゼをコードする *lig* 遺伝子をクローニングすることに成功し、多量発現系を構築した。これにより DNA 複製にとって重要な酵素である DNA リガーゼタンパク質の構造がはじめて明らかになるとともに、有用酵素として商品化された。

1-2. 制限酵素

遺伝子操作のハサミ役として重要な制限酵素は、タンパク質による DNA 認識機構の研究にとって有用なモデルである。認識配列を化学修飾して認識機構解析を行うとともに、製品化を目指した新規酵素の探索や、組換え産生系により生産効率を高めるために遺伝子クローニングを行った。

2. PCR 酵素の開発

2-1. *Taq* ポリメラーゼ多量産生系による高品質化

PCR の標準酵素である *Taq* ポリメラーゼの多量産生系を構築して、独占輸入製品であった Ampli Taq を国産化した。さらに、その酵素をもとに TakaRa Ex Taq, TaKaRa LA Taq などの多くの *Taq* 関連製品が生み出され、現在も世界市場で活躍している。

2-2. *Taq* DNA ポリメラーゼの高速化

環境中 DNA のメタゲノム解析からファミリー A DNA ポリメラーゼ遺伝子を詳細に解析した結果、*Taq* ポリメラーゼには含まれない挿入配列を有するグループを見出し、その配列を *Taq* ポリメラーゼに移植することによって、DNA 合成反応をより高速化することに成功した。本酵素も実用化されている。

2-3. Clamp-assisted PCR の開発

DNA ポリメラーゼを補助するクランプ分子である PCNA の蛋白工学によって“Clamp-assisted PCR”を開発した。これは、正確性は高いものの伸長性が低いアーキア由来の DNA ポリメラーゼを補助して優れた PCR パフォーマンスを可能にする PCNA 変異体を創製して利用した独創的な技術である。この技術も実用化され、多くの製品の中で利用されている。

3. アーキアのゲノム安定性維持機構解析

地球上の生物の 3 ドメインの一つを形成するアーキアの生命機構を理解するために、世界に先駆けて DNA 複製と組換え修復機構研究を進めた(図)。

3-1. DNA ポリメラーゼ

超好熱性アーキアの *Pyrococcus furiosus* がバクテリアと同様な原核単細胞生物でありながら、ヒトと同じような真核型のファミリー B の DNA ポリメラーゼ (PolB) を有していること、さらにアーキア特有の DNA ポリメラーゼ (PolD) を発見し、新規のファミリー D を提唱した。また、別の門に属する *Pyrodictium occultum* や *Aeropyrum pernix* が一つの細胞に二種類の PolB を有していることを発見し、真核生物と同様に複数のファミリー B 酵素が複製を分担することを示唆した。超好熱性アーキア由来の酵素は熱安定性に優れ、PCR 用酵素として利用できる。特にアーキアの酵素は *Taq* ポリメラーゼには無い校正機能を担う 3'-5'エキソ活性を有するため、より正確性が求められる PCR に適している。*P. furiosus* の PolB は広く世界的に使われている。

3-2. DNA 複製起点と複製開始因子

PolD 遺伝子の upstream にコードされるタンパク質を Orc1/Cdc6 と名付け、アーキア DNA 複製のイニシエータであることを提唱した。さらにその upstream に複製起点が存在することを実験的に証明し、アーキアで初めて複製起点を同定した。アーキアがバクテリアと同じ環状ゲノム構造をとり、特定の起点から真核生物と類似したイニシエータを用いて複製することを示唆したことから、世界のアーキア DNA 複製研究が活発化した。その後、我々は *P. furiosus* の Orc1/Cdc6 が複製起点領域の二本鎖を開裂できることを *in vitro* 実験で示した。*P. furiosus* は複製起点が一箇所であるが、二、三、四箇所を有するアーキアが次々報告され、さらには四箇所を有する好塩性アーキアの全てを欠失させても死なずにむしろより早く増殖することが報告されるなど、アーキアの複製機構研究はますます面白くなっている。

3-3. DNA 鎖伸長機構

DNA 複製は二本鎖が開裂して、それぞれが鋳型になって新生

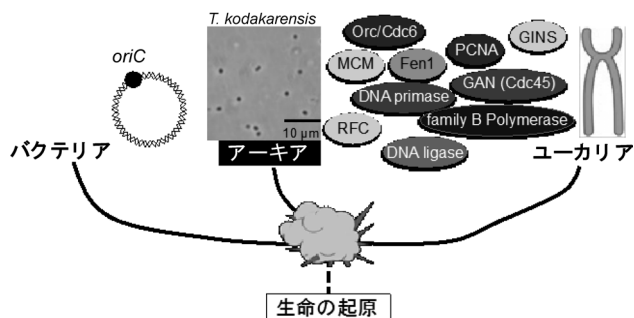


図 地球上の生命のゲノムとその複製 地球上の生物は 3 ドメインに分けられる。アーキアはバクテリアと同じように環状ゲノム上の特定の位置に複製起点を有するが、複製装置は真核生物と同じタンパク質から構成される。

鎖が合成される。DNA ポリメラーゼがDNA鎖に乗ったまま連続的に新生鎖を合成するために必要なクランプと呼ばれる分子は全ての生物に保存されていて、バクテリアでは β クランプ、真核生物ではPCNAと呼ばれていた。アーキアのクランプを探索してPCNAを発見した。またクランプをDNA鎖に載せるためのクランプローダー(RFC)も同定した。*P. furious*のPCNAとRFCを用いて、電子顕微鏡単粒子解析により、RFCがPCNAをDNA上に載せる瞬間を観察した。さらに、この手法を不連続合成鎖であるOkazaki断片のプロセッシング過程の解析に応用し、DNAポリメラーゼが不連続鎖を合成し、下流に存在するOkazaki断片のプライマーを除去するFEN1、その後形成されるニックを連結するDNAリガーゼの三者がPCNA上でどのように連携して働くのかをモデル構築して提唱した。

3-4. 相同組換え機構

アーキアの相同組換えの分子機構も全く未解明であったので、まず相同鎖を結合させるための、バクテリアのRecA、真核生物のRad51に相当するリコンビナーゼを解析した。*P. furious*にはRad51に類似したタンパク質が二種類存在し、RadA、RadBと名付けた。RadAが中心的なリコンビナーゼであることを証明したが、RadBも未解明ながら重要な機能を担っている。

リコンビナーゼが形成する組換え中間体ホリディジャンクション(HJ)を解消して組換わった二組の二本鎖に分離するリゾルバーゼ活性を検索した結果、全く新規の酵素が見つかりHjc(Holliday junction cleavage)と名付けた。Hjcはアーキアにおいては高度に保存されているが、バクテリアにも真核生物にもないアーキア特有の酵素である。次に、組換える範囲を広げるための、HJ中間体分岐点移動活性を探索した結果、新規のヘリカーゼ活性が見つかり、Hjm(Holliday junction migration)と名付けた。これらのタンパク質が関わるアーキアの分子機構は未だ解明されておらず、研究が続いている。

3-5. 複製フォーク停止の修復機構

アーキアの相同組換え機構の研究の過程で、ヘリカーゼとエンドヌクレアーゼが融合した新たなタンパク質を発見した。このタンパク質の基質特異性を詳しく調べていくと、複製フォーク構造をより好むことがわかり、複製の進行と関係することが示唆された。Hef(helicase-associated endonuclease for fork-structured DNA)と名付けたタンパク質のヌクレアーゼ活性はフォーク構造の分岐点の位置を切断し、付随するヘリカーゼはフォークの分岐点を移動させることから、複製フォークが停止した際の修復に関わることを提唱した。その後、ヒトの遺伝病の一つであるファンコニ貧血症の原因遺伝子産物の一つがHefのホモログであるという報告がなされ、ヒトHef(hHef)が正しく機能しないことが発症の原因になることから、ファンコニ貧血症の理解が急速に進んだ。

3-6. 損傷塩基の修復機構

塩基の脱アミノ化は生体内で頻繁に起こり、特に高温環境においては起こりやすいので、超好熱アーキアは優れた修復機構を有していると予想して、損傷塩基の除去修復機構の研究を始めた。他の生物で知られているウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)とその後に続く脱塩基エンドヌクレアーゼ(APE)、また脱アミノ化塩基の近傍のリン酸ジエステル結合を直接切断するエンドヌクレアーゼV(EndoV)をコードする遺伝子を*P. furious*のゲノム上に見つけ、これらの酵素の機能解析を

行ったが、その過程でEndoVとは異なるエンドヌクレアーゼ活性を発見し、エンドヌクレアーゼQと名付けた。

3-7. ミスマッチ修復

DNAの塩基対にミスマッチが生じると突然変異の原因になるので、素早く修復する必要がある。ミスマッチ修復は重要なDNA修復機能の一つとして知られている。この修復に働くMutS、MutLはバクテリアからヒトまで保存されているが、アーキアからは同定されず、ミスマッチ修復の有無が不明であった。我々はミスマッチ塩基対を含んで5'-突出型に二本鎖切断する活性を有する酵素を発見し、EndoMS(mismatch specific)と名付けた。EndoMSは一部のMutS、MutLを有さないバクテリアにも存在し、同様の活性を有することから、新規のミスマッチ修復系の存在を提唱し、長年のミステリーの一つであったアーキアのミスマッチ修復機能解明への道を開いた。

4. CRISPRの発見

筆者のこれらの研究の基礎に、大腸菌の環境適応応答の分子機構研究があり、リン酸代謝に関わるアルカリホスファターゼのアイソザイム変換機構解析の過程で発見したのがCRISPRである。1987年に発見した極めて規則正しく一定間隔をおいて繰り返される奇妙な配列が、実用的なゲノム編集に応用されて人類に大きく貢献しようとしている。発見した際には、あまりに綺麗に等間隔で繰り返される配列は偶然のものではなく、必ず生物学的意味を持っていると予想したが、30年前にはDNA配列データが乏しく比較する対象もなかった。時を経てその意味が解明され、実用的なゲノム編集技術の開発に繋がった。

おわりに

現代生命科学を進歩させた3回の革命的技術、①試験管内遺伝子切り貼りによる操作技術、②PCR増幅技術、③ゲノム編集技術、はすべてバクテリアやアーキアという原核生物の分子生物学研究が基盤となっている。原核生物の分子生物学研究は、今後もさらに新たな有用技術開発をもたらすであろう。特にアーキアはまだ未知の部分が多く、宝の山である。

謝辞 筆者は阪大薬学部の池原森男、大塚栄子先生のもとで核酸の有機化学、生化学を、阪大微生物病研究所の中田篤男、品川日出夫先生のもとでバクテリアの分子生物学を、そしてYale大学のDieter Söll先生のもとでRNA酵素について学びました。宝酒造の研究所においては、大林 晃、加藤郁之進所長のもとで遺伝子工学酵素やPCR酵素の研究を行いました。生物分子工学研究所(BERI)では、志村令郎所長、森川秋右部長のもとでアーキアの分子生物学を開拓しました。これらを基盤にして、九大農学研究院に赴任してから今日まで、超好熱性アーキアの基礎と応用研究を続けています。このような研究環境を与えてくださり、ご指導ご支援くださいました先生方に深く感謝申し上げます。また多くの成果を上げられたのは、一緒に頑張った宝酒造、BERIの核酸酵素グループのメンバー、九大の蛋白質化学工学研究室のスタッフ、学生たち、そして多くの共同研究者の方々のおかげです。また、共に励まし刺激合ってきた世界の極限微生物、アーキアの研究仲間感謝申し上げます。特にPatrick Forterre (Institute Pasteur), Francine Perler (New England Biolab), Haruyuki Atomi (Kyoto Univ)には常に励まされました。最後になりますが、九大農学研究院で共に過ごさせていただき、本受賞に際してご推選くださいました大島敏久先生に深く御礼申し上げます。