様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：８２４０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｈ０６８５９

研究課題名（和文）デザイナーメタボロンの形成による高効率有用物質生産技術の開発

研究課題名（英文）The Development of Novel Protein Intracellular Affinity Pairs for Fabrication of Designer Metabolons.

研究代表者

森　裕太郎（Mori, Yutaro）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：５０７５８５３９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では、大腸菌内で連続して反応を行う代謝酵素群を集積化させることにより、糖を炭素源とした目的の物質生産の効率を向上させるシステムの開発を行う。具体的には、まず大腸菌細胞内で十分な結合力を示す新規のタンパク質ータンパク質相互作用ペアを複数個探索・設計する。これまでの研究成果により、大腸菌内での安定的なタンパク質相互作用ペアの発現およびin vitroにおいて相互作用することを確認した。

研究成果の概要（英文）：By assembling metabolic enzymes that continuously perform reactions inside E. coli, this study aims to construct a system that improves efficiency of production of valuable chemicals being targeted. As a preliminary step toward that, the applicant developed and designed new protein affinity pairs that exhibit binding affinity within E. coli cells. In this study we achieved the protein expression of affinity pairs in E. coli, and we confirmed that the protein pairs shows the binding affinity in vitro assay.

研究分野： Enzyme Engineering

キーワード： Protein Design

１．研究開始当初の背景

植物の光合成を通した二酸化炭素の固定化により生産されるバイオマスを再生可能資源として、バイオ燃料やバイオベース製品を生み出すバイオリファイナリーは、資源・エネルギー枯渇問題と地球温暖化等の環境問題の双方を克服しうることから、近年精力的に研究開発と工業化が進められている技術分野である。化石資源に依存した現在のオイルリファイナリー社会から脱却し、持続可能な環境調和型社会を実現するバイオリファイナリーは、環境と経済の面から世界規模で求められている。

バイオリファイナリーにおいて微生物を生体プラントとして用いて、基幹原料となる C5 糖・C6 糖から有用物質を生産する試みは非常に重要な分野の１つとされている。ここで、微生物を用いた有用物質生産の研究において重要な要素の 1 つとなりうるのが、植物細胞の Calvin-Benson 回路・フラボノイド生合成代謝経路などの一部で形成される代謝酵素集合体：メタボロンである。

メタボロンとは、細胞内において代謝経路に関わる酵素群が、非共有結合的なタンパク質―タンパク質間相互作用によって集積化した代謝酵素集合体である。このメタボロンを形成することで、代謝中間体をある酵素から次の酵素へ迅速に受け渡す連続した反応が可能となる。また触媒活性の低い酵素を複数局在化させることにより反応経路を強化し、細胞内における物質変換の高効率化が達成されている。しかしながら、このようなメタボロンを人工的に構築した研究は、未だ数例程度しか報告されていない。一番の原因としては、生体内で使用可能な相互作用ペアが非常に少ないことにあると推察される。そのため細胞内において人工メタボロン化できるのは、目的物質生産に関わる反応前後のごく一部の代謝酵素に限られてしまっていた。また既往の報告では、単純に足場上に酵素を配列させただけであり、迅速な基質受け渡しに必要である集合体中での代謝酵素の配向制御は行われていない。これまで申請者は、効率的なタンパク質集合体の形成には結合の配向性が重要であることを明らかとし、また構造を最適化することによって酵素の触媒反応を加速することを達成している。

そこで本申請では、生体内で使用可能な新規の相互作用ペアを合理的に探索・設計し、これを用いることで、鍵となる反応に関わる代謝酵素を「最適な数だけ最適な構造で」集積化した’デザイナーメタボロン’を用いた高効率な有用物質の生産技術の開発を行った。

２．研究の目的

本研究では、デザイナーメタボロンの形成による高効率有用物質生産法の開発に向けて、細胞内で利用可能な新規タンパク質相互作用ペアの探索および開発を行う。本研究に必要な、細胞内でも結合力を示す新規タンパク質相互作用ペアを、全くゼロから複数種類作り出すということは現実的ではない。そこで申請者は、すでに発見されているタンパク質―タンパク質相互作用ペアをテンプレートとし、改変を加える事で細胞内でも使用可能とすることとした。

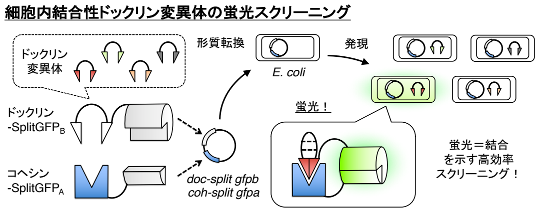
テンプレートとして、一部の嫌気性細菌において観察されるバイオマス分解酵素集合体（セルロソーム）を形成するタンパク質相互作用ペアである「コヘシンとドックリン」に着目した。このセルロソームは、コヘシンが複数並んだ足場タンパク質上に、ドックリン部位を持つバイオマス分解酵素が非共有結合的に相互作用することで形成される。この相互作用は Ca^{2+}依存的であり、ドックリンの EF-hand Like モチーフと Ca^{2+}との結合によりドックリンの構造が安定化し、コヘシンとドックリンは相互作用が可能になる。しかしながら、例えば大腸菌などの細胞内では Ca^{2+}濃度が低いため、天然のコヘシンとドックリンでは細胞内で結合力を示さないとされている。一方で EF-hand Like モチーフはタンパク質相互作用界面には存在していないため、この部分に改変を加えても直接的には相互作用に影響を与えない。よって、EF-hand Like モチーフに改変を加えて「Ca^{2+}非依存的な結合を示すドックリン変異体」を作成することで、大腸菌等の細胞内でも使用可能な相互作用ペアの獲得が達成されると考えた。申請者は、これまでにタンパク質のループ構造部分に改変を加える事で、本来のタンパク質の機能を損なうことなく望む機能を付与することを達成している。

現在までに、コヘシンとドックリンペアは 10 種類以上の嫌気性細菌中で発見されており、特に魅力的な点として由来（宿主）の異なるコヘシン-ドックリン同士は結合しないという結合特異性が挙げられる。つまり、EF-hand Like モチーフの改変技術を確立することによって、細胞内で結合可能かつ結合が交差しないタンパク質相互作用ペアの複数獲得が達成されると考えた。

よって本研究においては、天然に存在するコヘシンとドックリンのタンパク質相互作用ペアを鋳型として、アミノ酸変異を導入することで、Ca^{2+}非依存的な相互作用を示す新規タンパク質相互作用ペアの開発を目的とした。

３．研究の方法

細胞内で利用可能な新規タンパク質相互作用ペアの開発のため、Split-Green fluorescein protein (GFP) を用いたドックリン変異体の大腸菌内蛍光スクリーニングを行った。スプリットタンパク質とは機能性タンパク質を分割したものであり、それぞれの分割部位が近接することで元の機能が回復する。緑色蛍光タンパク質である GFP は天然で蛍光を示すことから、スプリットタンパク質化した際には、分割状態では蛍光を示さず、分割された両方のユニットが近接することで蛍光が回復することとなる。よってコヘシン-SplitGFP$_A$ とアミノ酸変異導入ドックリン-SplitGFP$_B$ を大腸菌内で共発現した際に、GFP の蛍光が観察されれば、そのドックリン変異体は大腸菌内でも結合力を示すことを意味する。これにより、GFP の蛍光と細胞内コヘシン-ドックリンの相互作用とがリンクしたスクリーニング系が構築出来ると期待した。



ドックリンの変異導入箇所の絞り込みには、ドックリン結晶構造および、それを鋳型として構築した結晶構造モデルを用い、シークエンスアライメントから EF-hand Like モチーフ部位の同定を行った。これらモチーフ部位に対して、Ca^{2+}を捕捉するアミノ酸残基に変異を導入し、ドックリン変異体の構築および評価を行った。

物質生産を行う宿主としては一般に広く使用される大腸菌 (*Escherichia coli*) をモデル宿主として選択した。大腸菌は工業的に利用が可能であるだけでなく、研究レベルでは非常に多くの知見があり、遺伝子組換えが容易で、更に生育速度が非常に早いため施した実験操作の結果をすぐに得ることが可能であるため、研究速度を更に加速させることができる。

４．研究成果

（１）大腸菌における Split-GFP 融合タンパク質の発現および精製

細胞内で利用可能な新規タンパク質相互作用ペアのテンプレートとして、由来の異なるコヘシン－ドックリンペアを 5 種類選択した。選択したコヘシンおよびドックリンの由来と天然でその部位を持つタンパク質名を表 1 に示す。また GFP をスプリット化し、N 末端側の GFP$_A$ と C 末端側 GFP$_B$ について、コヘシンとドックリンとの融合タンパク質化を行った。

表 1. 使用したコヘシン－ドックリンの由来タンパク質および略称一覧

由来	Cohesin	Dockerin
Archaeoglobus fulgidus	AfDoc (AF2375)	AfDoc (AF2375)
Bacteroides cellulosolvens	BcDoc (ScaA)	BcCoh (ScaB)
Clostridium cellulovorans	CcCoh (CbpA)	CcDoc (EngE)
Clostridium thermocellum	CtCoh (CipA)	CtDoc (CelS)
Ruminococcus flavefaciens	RfCoh (ScaB)	RfDoc (ScaA)

ここでまず、コヘシンおよびドックリンの挿入位置と組み合わせ、およびリンカー長について検討した。GFP の結晶構造を考慮すると、GFP 本来の N 末端および C 末端が近傍に位置していることから、相互作用ペアの挿入位置としては、a) GFP$_A$ の N 末端および GFP$_B$ の C 末端、もしくは b) GFP$_B$ の N 末端および GFP$_A$ の C 末端の組み合わせとすることが、コヘシン-ドックリンの近接による相互作用および蛍光回復の促進につながると考えた。また Split-GFP とコヘシンまたはドックリン間のリンカーとして、一般的に用いられるフレキシブルリンカーである GGGS 配列および$(GGGS)_2GS$ 配列を選択した。これら 5 種類のコヘシン-ドックリンペアについて 8 パターンずつ pET22b(+)ベクターに導入した全 40 個の発現用プラスミドを構築した。また発現タンパク質のフォールディングこれら調製したプラスミドを各々、大腸菌 BL21(DE3)株にヒートショック法により導入し、Split-GFP 融合ドックリンおよび Split-GFP 融合コヘシンを発現する形質転換体を調製した。これら形質転換体を、アンピシリンおよび 0.1 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した LB 培地にて 37℃−18 時間培養することでタンパク質の発現を行った。その後、菌体を遠心分離で集菌し、Tris Buffered Saline (TBS 緩衝液)で洗浄後、タンパク質抽出試薬を加え大腸菌を破砕した。遠心分離を行い得られた無細胞抽出液を、融合タンパク質末端にあるポリヒスチジンタグを利用して Ni-NTA カラムにて精製を行った。変性バッファーにより熱処理を行った後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により、融合タンパク質の発現評価を行った。

しかしながら、評価を行った大部分の融合タンパク質において、目的のタンパク質由来のバンドが非常に薄く、また分解物と思われるバンドが多く確認さてしまった。これは発現を行った大腸菌内においてミスフォールディングを起こし、内在性のプロテアーゼによって分解されてしまったのではないかと推察された。

実際に、発現検討を行った一部においてはインクルージョンボディが形成されている様子が確認された。よって安定的なタンパク質の発現を行うため検討を行うこととした。発現用大腸菌株を C41(DE3)株に変え、またフォールディングを促進させることを目的として、シャペロンである groES/groEL をコードした pGro7 プラスミドを形質転換し、融合タンパク質との共発現を行った。また培養温度をおよび培養時間、培地組成の条件を検討し、同様に SDS-PAGE によって発現した融合タンパク質の評価を行った。その結果、たしかに融合タンパク質由来のバンドが確認され、また分解物と思われるバンドも見られなかった。このことから、発現条件の最適化により、安定的に SplitGFP 融合ドックリンおよびコヘシンの発現に成功した。安定的な融合タンパク質の発現条件の確立は、以後の蛍光スクリーニングの結果にも関係することから非常に重要である。上述の操作により発現および精製を行い得られたタンパク質を用いて、以後の検討を行った。

(2) 蛍光を用いた *in vitro* でのタンパク質相互作用試験

次に、得られた融合タンパク質を用いて、*in vitro* におけるタンパク質の相互作用試験を行った。具体的には、5mM Ca^{2+} を添加した TBS 緩衝液中に、SplitGFP 融合コヘシンおよび SplitGFP 融合ドックリンを当量混合し、GFP 由来の蛍光を測定した。得られた蛍光測定結果について、観察された蛍光の最大値を 1.00 とした蛍光強度比の一部を下表 2 に示す。

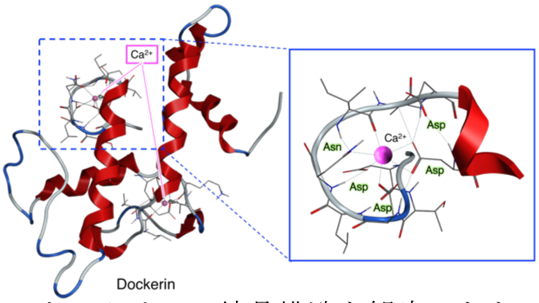
表 2. C. *thermocellum* 由来コヘシンおよびドックリン融合 SplitGFP を用いた蛍光回復試験

	CtDoc-GFP$_A$	GFP$_A$-CtDoc	CtDoc-GFP$_B$	GFP$_B$-CtDoc
CtCoh-GFP$_B$	0.92	0.28	0.02	0.03
GFP$_B$-CtCoh	0.31	0.68	0.02	0.01
CtCoh-GFP$_A$	0.02	0.01	0.82	0.31
GFP$_A$-CtCoh	0.02	0.02	0.29	1.00

まず SplitGFP$_A$ と SplitGFP$_B$ が共に存在しない組み合わせについては、GFP が再構築されないため、蛍光は回復しない。また SplitGFP に対してコヘシンおよびドックリンを挿入する位置については、一般的な SplitGFP を用いた相互作用の検討と同様に、タンパク質相互作用部位であるコヘシンとドックリンが近接して存在することになる組み合わせにおいて、蛍光回復効率が高いことが示された。また用いるコヘシンとドックリンの由来によっては、GFP との間のリンカー長の組み合わせを変更することで、蛍光の回復が促進された。これは用いた各コヘシンおよびドックリンによって、N または C 末端の自由度が異なるためであり、それに伴い融合タンパク質化した際の SplitGFP からの距離が異なるためであると推察された。上記の *in vitro* における蛍光回復試験を、由来の異なる 5 種類のコヘシン-ドックリンペアについて、リンカー長の 4 つの組み合わせを合わせた全 320 通りについて検討を行った。各由来のコヘシン-ドックリンペアについて、最大の蛍光強度が得られたものを鋳型とし、以降の検討に用いた。

(3) ドックリン変異体の設計および Split-GFP 融合ドックリン変異体の構築

次に得られた SplitGFP 融合ドックリンの Ca^{2+} binding loop（EF-hand Like モチーフ）に対して変異を導入することにより、Ca^{2+}非依存的な結合を示す新規相互作用用ペアの開発を試みた。以下に RfDoc の結晶構造モデルを示す。



ドックリンの結晶構造を観察したところ、通称の通り loop 部分で Ca^{2+}を捕捉しており、これによってドックリンは結合可能モードへと変化することが知られている。その Ca^{2+} binding loop を見てみると、Asp や Asn などドナー性のアミノ酸残基が多く存在し、これら結合性アミノ酸残基が通常 4~5 残基、Ca^{2+}へと配位している。特に報告されているドックリンについてシークエンスアライメントを行うと、結合性アミノ酸残基として Asp の出現頻度が非常に高く、またそれ以外のループを構築するアミノ酸残基としては Gly や Ala など比較的小さなアミノ酸残基により、自由度が高くなっていることが推察された。よって本研究の目的とする Ca^{2+}必要性の解消は、Ca^{2+}結合性アミノ酸残基の一部を、正電荷を持つアミノ酸残基に変異させることで達成されるものと考えた。実際に、タンパク質シミュレーションソフトを用い、正電荷を持つアミノ酸へと置換した変異体モデルの構築を行い、評価した所、導入したアミノ酸と Ca^{2+}結合性アミノ酸残基とが相互作用する様子が確認された。また変異を導入する数が増えると、導入したアミノ酸同士で反発してしまう様子も観察された。

これより、上記設計戦略に従い、一つの Ca^{2+} binding loop につき、Ca^{2+}結合性アミノ酸残基のうち 1 残基を、Arg もしくは Lys へと変異させたドックリン変異体を構築し、これを評価することとした。

（4）大腸菌内における Split-GFP 融合相互作用用ペアの発現および蛍光スクリーニング

研究結果（2）において構築した Split-GFP 融合ドックリンを鋳型として、各変異が導入されたアミノ酸配列をコードするプライマーを用いることで、Split-GFP 融合ドックリン変異体を発現可能なプラスミドベクターを構築した。調製したプラスミドを前述の操作により大腸菌へと形質転換し、Split-GFP 融合コヘシンと共発現可能な形質転換体を得た。得られた形質転換体について、培養およびタンパク質の発現を行い、洗浄後に集菌したペレットについて 490 nm の励起光を照射し、Split-GFP の蛍光回復から、細胞内でのコヘシン-ドックリン相互作用の形成を分析した。

しかしながら、本申請研究期間内に構築したドックリン変異体 250 検体について分析を行ったものの、融合タンパク化していない Split-GFP のみのコントロールと比較して、細胞内での split-GFP の明らか蛍光回復を確認することは出来なかった。また集菌後のペレットに対しタンパク質抽出液を加え、簡便な Ni-NTA を用いた精製を行った後、*in vitro* での蛍光スクリーニングを行ったものの、同様の結果であった。これは、今回用いた 5 種類のドックリンと同様に、天然に存在するドックリンの多くが、1 分子につき 2 箇所の Ca^{2+} binding loop を持っているため、Ca^{2+} 要求性を解消するためには、同時に 2 箇所変異を加え、かつどちらも Ca^{2+}無しの状態で天然の構造を維持する必要があるためである。また GFP の分析感度により、どちらか片方が Ca^{2+}非依存性のループとなったとしても判別できなかった可能性も考えられた。

今回、本研究期間内においては、残念ながら細胞内で利用可能な新規タンパク質相互作用ペアの開発には至らなかったものの、今後も継続して本研究内容は行っていく予定である。具体的には、まず GFP の高感度化を目的として、既に報告されている変異を導入することで、細胞内でコヘシン-ドックリン相互作用の形成を判別しやすくすることを行う。またループ部分の設計として、上述の正電荷を持つアミノ酸残基である Arg と Lys の変異導入に加えて、自由度の高い Gly や Ala などの残基の一部分について、Pro への置換を行う。ループ内で形成される静電相互作用に加えて、ループ構造を剛直化することで、結合モードのドックリンの構造を再現し、これにより Ca^{2+}要求性の解消を狙いたい。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

６．研究組織
(1)研究代表者
森　裕太郎（MORI, Yutaro）
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員
研究者番号：50758539

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし