

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14228

研究課題名(和文) タンパク質プレニル化経路の分子進化学

研究課題名(英文) Evolutionary design of protein prenylation pathways

研究代表者

梅野 太輔 (Umeno, Daisuke)

千葉大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：00400812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物は、疎水的なプレニル基の付加によって、様々なタンパク質を膜周辺に局在化する機構を有する。本研究は、酵母プレニル化酵素Ram1/2系の大腸菌内で発現させ、タンパク質の局在調節機構の再構築を目的とした。自在なタンパク質の機能制御には至らなかったが、プレニルリン酸に対するプレニル化酵素の基質消費活性スクリーニング系の確立、およびプレニル化システムによる転写抑制因子の細胞活性のオンオフ制御にむけた基礎的な知見の収集に成功した。

研究成果の概要(英文)：The ultimate purpose of this study is to reconstitute the protein-localization system via reconstitution of yeast prenylation enzymes Ram-1/-2 system in Escherichia coli. We succeeded in establishing the colorimetric screening method to indirectly visualize the activity of protein prenylation systems. Also established was the selection platform for protein prenylation by way of the monitoring of expression level of reporter genes under the control of transcription factors with prenylation tags. We also succeeded in the improvement of the selection system by elevating the efficacy of incorporating reagent called dP, the hyper-mutagenic nucleoside analogues, into genomic DNA thereby reducing the necessary concentration of dP added to the selection media. This way, we could have established the robust and reproducible selection system for improving protein prenylation systems in heterologous hosts.

研究分野：進化合成生物学

キーワード：合成生物学 制御 翻訳後修飾 進化分子工学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質局在化法としてのプレニル化

生合成経路や制御ネットワークを細胞内に導入するときの問題は、宿主細胞における生合成ネットワークとのクロストークや競合である。これを軽減するため、タンパク質の局在化や区画化機構が注目されている (*Trends Cell Biol.*, 22, 662 (2012))。様々な局在化装置が試されているが、いずれも大きなタンパク質と融合する必要があるものであり、汎用性のある局在化システムは未だに提案されていない。

一方、真核生物には、C15 および C20 からなるプレニル基の付加によってタンパク質を膜にアンカーするシステムが存在する (図1)。この方法における膜局在化機構は、以下の優れた特長を持つ；

- (1) タグのサイズ：タグ配列はわずか4アミノ酸と短い。
- (2) 独立性：真核生物特有の系であり、大腸菌など原核細胞の内在システムとは高い独立性が保証されている。
- (3) スイッチ性：プレニル化酵素の作用によって初めて標的タンパク質は膜に局在化する：プレニル酵素の発現 off→on によって、任意のタイミングで標的タンパク質の局在化を起動できる。
- (4) 持続性：チオエーテル結合形成による不可逆な反応であり、一旦誘起した膜への固定は高い持続性（メモリ性）をもつ。

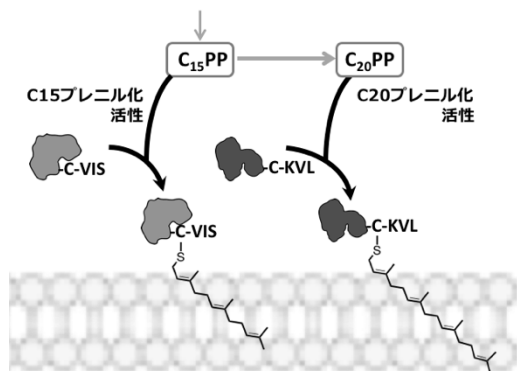


図1 タンパク質のプレニル化による膜移行システム

2. 研究の目的

タンパク質のプレニル化機構を細胞機能の制御技術として確立するため、以下4つの研究項目を実施することを目的とする。

項目1 出芽酵母のプレニル化システムによる GFP 膜移行の可視化：プレニル化システムを内在している出芽酵母を用い、プレニル化タグ配列 (CIIS) の融合のみで GFP の局在に変化が生じるかを調べる。

項目2 プレニル化酵素活性のスクリーニング技術の開発：ファルネシルピリン酸 (C₁₅PP) はタンパク質のプレニル基質であり、そして C₃₀ カロテノイドの基質でもある。このことを利用して、基質消費活性に基づくプレニル化酵素の活性スクリーニング系を確立する。

項目3 プレニル化システムを使った転写スイッチの開発：リガンド結合により転写抑制を解除する転写因子 TetR システムを、プレニル化により制御できるシステムとして構築する。

項目4 プレニル化によるタンパク質膜局在化システムを使ったネガティブ選択の開発：細胞質で機能するタンパク質の毒性を、プレニル化に伴う膜局在によって隔離することで回避するシステムを、我々が既に開発し汎用しているヌクレオシドキナーゼ HsvTK と非天然ヌクレオシド dP を用いて確立する。

3. 研究の方法

1) 出芽酵母におけるプレニル化システムを使った GFP の膜移行観察

出芽酵母 (*S. cerevisiae*) W303 株および緑色蛍光タンパク質 (sfGFP) を用いて、タンパク質のプレニル化機構を可視化した。sfGFP には、実際に出芽酵母の中でプレニル化タグとして用いられている 4 アミノ酸配列 CIIS, CHC および CAIL を C 末端に融合した。プレニル化による sfGFP の膜移行は、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行なった。また、プレニル化 sfGFP の膜局在を、可溶性および不溶性画分に分けて SDS-PAGE および Western blot 法により確認した。

2) プレニル化酵素の基質消費活性スクリーニング系の構築

C₁₅PP を基質とする色素カロテノイドであるリコペンの生合成代謝経路を構成する CrtE, CrtB および CrtI を大腸菌 XL1-Blue に導入し、リコペンを大腸菌に蓄積させた。この CrtE と C₁₅PP 基質を取り合うであろう *S.*

cerevisiae 由来のプレニル基転移酵素 Ram1-Ram2 複合体, そして C₁₅PP の転移先としてプレニル化タグ配列 CIIS 融合 TetR を導入し, C₁₅PP 基質を取り合うことによるリコペン蓄積量の違いを赤色素の量で評価した。リコペンの細胞内蓄積は, TB 培地で 24 時間大腸菌を培養し, 細胞を遠心により沈殿させ, 着色した細胞沈殿物をスキャナーで取り込むことにより撮影した。また, その細胞沈殿物をアセトンにより溶菌および生産物を抽出し, 吸光スペクトル解析により生産物の物性を調べた。

3) プレニル化による転写抑制因子 TetR の制御系の構築

大腸菌 BW25113 株にプレニル化システムを構築すべく, アラビノース発現誘導型のプレニル基転移酵素 Ram1-Ram2 を導入した。そしてプレニル化により機能制御できるようにプレニル化タグ CIIS を融合した TetR, その機能を評価するために下流に sfGFP をレポーターとして配置した *tetO* を導入した。TetR の転写抑制解除は, 0.2% アラビノース添加後 12 時間の OD あたりの蛍光強度で評価した。

4) ヌクレオシドキナーゼ HsvTK と非天然ヌクレオシド dP によるネガティブ選択系の改良

我々が開発したヌクレオシドキナーゼを用いたネガティブ選択法 (Tashiro, *NAR*, 39, e12 (2011)) は, その選抜効率で世界一であるのみならず, dP という非天然ヌクレオシドを加えるまでは全く毒性を示さない点で, カウンターセレクションの心配のない堅牢な選抜手法といえる。この選抜法と標的タンパク質のプレニル化を経る膜移行とカップリングさせるためには, この選抜法の致死効率をさらに上げ, 変異原性試薬 dP をさらに一桁低い使用濃度で実施できることが望ましい。dP がゲノムに取り込まれるまでの経路に関与する可能性のある因子を文献検索により洗い出した。候補として用いた因子は, 外膜トランスポーター T_{sx}, 内膜トランスポーター NupC および NupG, ヌクレオシドキナーゼ Tmk, Tdk および Ndk, ヌクレオシドホスファターゼ YjjG である。これら因子の欠損株 (KEIO 株) および過剰発現株 (BW25113 株) における 0-100 nM dP に対する感受性を, コロニー数 (CFU) により算出した。この濃度範囲の dP を添加した LB 液体培地で 1 時間処理した後, LB 寒天培地に

スポットし, CFU を調べた。

4. 研究成果

1) 出芽酵母のプレニル化システムによる sfGFP 膜移行の可視化

GALI プロモーター下流につないだプレニル化タグ融合 sfGFP の発現誘導後 4 h の蛍光を, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。sfGFP はプレニル化タグ依存的に形質膜に局在していることがわかった (図 2 (a))。また, この現象を生化学的に検証するために, 酵母破碎液を遠心し, 全画分 (図 2 (b) T のバンド), 上清画分 (図 2 (b) S のバンド) そして沈殿 (膜) 画分 (図 2 (b) P のバンド) に分け, SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行なった。抗 GFP 抗体により, プレニル化タグ融合 sfGFP は沈殿画分に検出され, 一方タグのない sfGFP は上清画分に検出された。これらの結果により, プレニル基転移酵素を内在している出芽酵母では, 組換え sfGFP はプレニル化タグ依存的に膜に移行することがわかった。また, 今回試した 3 種類のタグにおいては, 膜局在の効率に差は見られなかった。

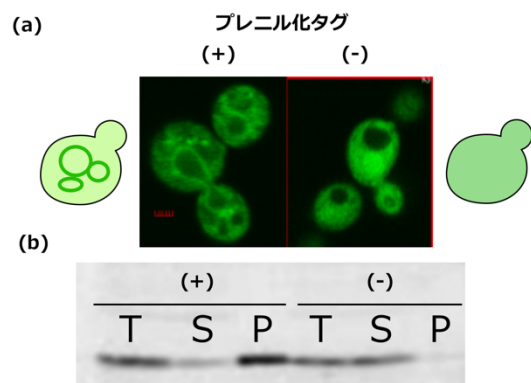


図 2 出芽酵母における sfGFP のプレニル化タグ依存的な膜移行。(a) sfGFP のプレニル化タグ依存的膜移行を確認した共焦点レーザー顕微鏡による画像。(b) ウェスタンブロッティングによる不溶性画分 (下段 (+) の P のバンド) の確認。T は全画分, S は上清画分, P は不溶性画分。

2) プレニル化酵素の基質消費活性スクリーニング系の構築

赤色素カロテノイドであるリコペンの生合成において CrtE から, その基質である C₁₅PP を Ram1-Ram2 複合体が引っ張って消費できるか, 細胞の赤色素蓄積の度合いを見ることで評価した。C₁₅PP の転移先となるプレニル化タグ CIIS を融合した TetR

(TetR-CIIS) を発現させた大腸菌とタグを融合していない non-tag TetR を発現させた大腸菌とで赤色蓄積の程度を比較すると、non-tag TetR 発現株は濃い赤色沈殿であったのに対し (図3 (-)), TetR-CIIS 発現株は、若干ではあるが赤色の低減が見られた (図3 (+))。

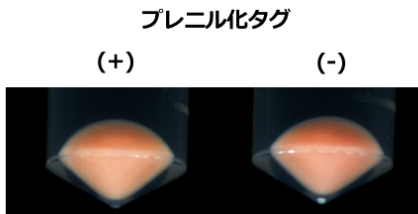


図3 タンパク質のプレニル化に依存したリコペン生産量の低減

細胞から抽出される色素量を比べると TetR-CIIS 発現株の培地あたりのリコペン生産量 (0.29 mg/L) は、同じ発現系で non-tag TetR 発現する株のそれ (0.33 mg/L) に比べて 1 割程度低い結果となった。素直に解釈すれば、Ram1-Ram2 複合体が C₁₅PP を消費し、CrtE によってリコペン生合成にまわる原料量が低減したと考えられる。

一方で、この生産量の差は 1 割程度とわずかであり、Ram1-Ram2 の大腸菌内でのプレニル基転移活性にはまだまだ改良の余地がある。このリコペン生産の差を指標にしたスクリーニング系を用いれば、大腸菌内でより高いタンパク質プレニル化活性を有する Ram1-Ram2 変異体を取得することも可能であると期待される。

3) プレニル化による転写抑制因子 TetR の制御の試み

プレニル化された酵素は、膜に局在すると考えられる。タンパク質の機能によっては、この局在変化によって細胞活性が大きく変化すると期待される。一つの試みとして、転写制御因子 TetR の末端にプレニルタグ CIIS を付して TetR-CIIS を作製し、Ram1-Ram2 複合体の発現誘導による機能調節 (図4) を試みた。

Ram1-Ram2 の発現によって、若干 *tetO* 下流のレポーター-sfGFP の蛍光強度が上昇する結果が得られた (図5)。転写「スイッチ」と呼べるほどのオン・オフ差は見られていないが、これは、現行の Ram1-Ram2 系では、TetR のプレニル化活性が低いのかかもしれない。本研究 1) で確立した C₁₅PP の基質消費スクリーニング系を用いて、Ram1-Ram2 高活性

変異体の探索をする必要があるかもしれない。

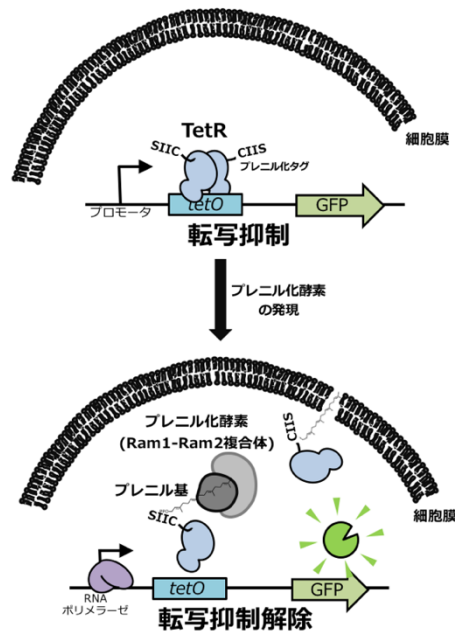


図4 転写抑制因子 TetR のプレニル化による機能制御

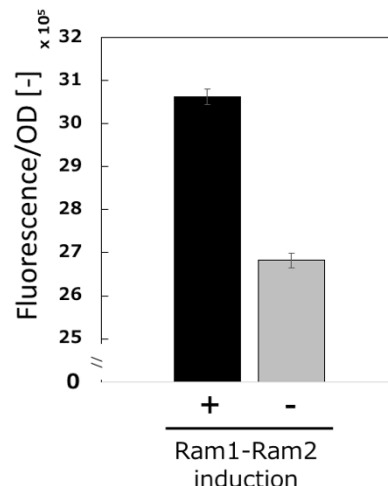


図5 Ram1-Ram2 の発現誘導の有無による TetR-CIIS の抑制力の変化

あるいは、この「切れの悪さ」は、TetR の作用点である標的配列 (TetP/O) がマルチコピー型プラスミド上に存在するため、膜への局在だけでは完全に隔離されないことを反映しているのかかもしれない。そうなのであれば、レポーター (sfGFP) は、大腸菌の染色体 DNA の上に再構築することによって、その挙動変化がより明確に観察できるかもしれない。

4) ヌクレオシドキナーゼを用いた選択系の改良

我々は以前、ヌクレオシドのキナーゼ

HsvTKを用いるポジティブ・ネガティブ選択系を開発している (Tashiro, *NAR*, 39, e12 (2011)). プレニル化にともなう RNA ポリメラーゼや転写因子の細胞活性の切れ味良いオン・オフ調節が可能であれば、本選抜系のポジティブ・ネガティブ選択を生き残るはずである。プレニルタグを付した転写因子の「切れ味」に対する選抜を繰り返すことによって、Ram1/2の大腸菌活性そのものをと期待される。

一方、多世代にわたって本系を使うためには、ネガティブ選択に使う変異原性ヌクレオシド dP の濃度を一桁下げることが強く望まれる。現在の dP の処理濃度 (100 nM) は宿主内の変異頻度を有意に増大させること、そして培地に添加する dP 濃度を 10 μ M まで下げれば変異発生率に変化がないことがわかった。そこで、dP というヌクレオシド化合物のゲノム取り込みに関わり得る遺伝因子を、データベースや文献情報をたよりに洗い出した(図6)。それら遺伝子の過剰発現および欠損株解析を行ったところ、外膜トランスポーター-Tsx, 内膜トランスポーター-NupC, キナーゼ Ndk の共過剰発現によって、一桁低い dP の添加でも再現性高い選抜実験ができるようになった (図7), この濃度の dP を培地に添加しても細胞の突然変異頻度を全く変化させないことから、転写因子などの「オン・オフ変換の切れ味」に対する複数世代にわたる選抜が可能となった。

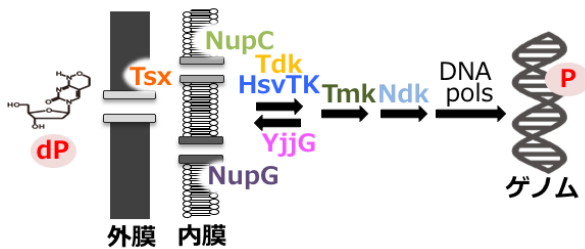


図6 dP 取り込みに関与すると考えられる因子

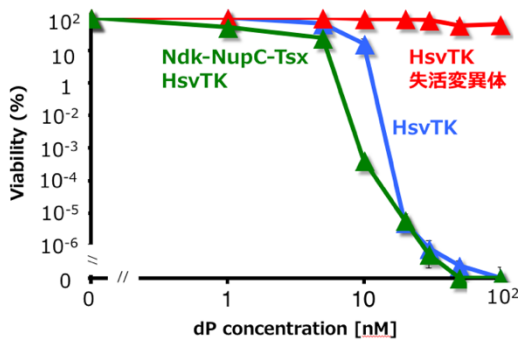


図7 Ndk, NupC および Tsx の過剰発現による dP 感受性の上昇

本研究は、酵母プレニル化酵素 Ram1/2 系の大腸菌内での再構築と、それを用いたタンパク質の局在調節機構の実現を目的としている。今日現在、プレニル化活性によるタンパク質機能のオン・オフ制御などには至ってはいないが、若干の表現型変化が観察できていること (図 3, 5), そして新たにその「切れ味」の選抜系が整備できたこと (図 7) から、細胞機能の制御機構としての可能性を探索する余地は十分にあると考える。今後は、期間内に果たせなかったタンパク質プレニル化の直接検出 (マス分析およびウエスタン解析), そしてプレニル化/膜局在がより明確に読み出せる細胞機能モチーフの探索、そして Ram1/2 そのもの大腸菌活性の改良など、本研究の目標達成に向けた継続的な努力を続けてゆきたいと考えている。

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5件)

1. Tashiro, M., Ono, K., Kimura, O., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.: Tweezing the cofactor preference of gymnosperm pinene synthase.: *Biosci. Biochem. Bioeng.*, 82, 1058-1061 (2018)
2. Tashiro, M., Fujii, A., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.: Directed evolution and expression tuning of geraniol synthase for efficient geraniol production in Escherichia coli.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* doi:10.2323/jgam.2017.01.006 (2017)
3. Tashiro, M., Kiyota H., Kawai-Noma S., Saito K., Ikeuchi M., Iijima Y., Umeno, D. Bacterial production of pinene by laboratory-evolved pinene synthase. *ACS Synth. Biol.* 5, 1011-1020 (2016)
4. 田代美希, 梅野太輔
テルペノイド合成酵素の機能進化デザイン
化学と生物, 54(8), 562-567 (2016)
5. Saeki, K., Tominaga, M., Kawai-Noma, S., Saito, S., Umeno, D.: Rapid Diversification of BetI-Based Transcriptional Switches for the Control of Biosynthetic Pathways and Genetic Circuits.: *ACS Synth Biol.*, 5, 1201-1210 (2016).

〔学会発表〕(計13件)

1. 梅野太輔

非天然トリテルペノイド生合成の進化合成生物学

日本農芸化学会 2018 大会 (招待講演)

2018 年

2. 梅野太輔

カロテノイド生合成経路の「進化能」の探索
日本植物学会第 81 回大会シンポジウム (招待講演) 2017 年

3. 梅野太輔

分子スイッチ機能 進化から創発へ
生命の起源および進化学会 & 日本アストロバイオロジーネットワークジョイント夏の学校 (招待講演) 2017 年 08 月 19~20 日

4. Daisuke Umeno

Directed evolution of carotenoid/terpenoid biosynthetic pathways.

9th US-Japan Symposium on the Biosynthesis of Natural Products (招待講演) (国際学会) 2017 年

5. 梅野太輔

トリテルペン生合成経路を実験室内で「進化」させる

JBA 発酵と代謝研究会セミナー (招待講演)

2017 年 03 月 27 日

6. Daisuke Umeno

Directed Evolution of carotenoid/terpenoid biosynthesis.

Fusion Conference on Synthetic Biology for Natural Products (招待講演) (国際学会) 2017 年 03 月 05~08 日

7. Daisuke Umeno

Rapid Diversification and Compression of the Genetic Networks via Directed Evolution.

Biosystems Design 3.0 (招待講演) (国際学会) 2017 年 02 月 16 日

8. 梅野太輔

カロテノイド・テルペノイドの「リデザイン」技術

かずさ DNA 研究所公開セミナー (招待講演)

2017 年 01 月 25 日

9. 梅野太輔

Evolutionary design of biosynthetic pathways and regulatory networks

OIST seminar series (招待講演)

2016 年 11 月 17~18 日

10. 河合(野間)繁子, 佐伯和哉, 湯本達弥, 斎藤恭一, 梅野太輔

変異原性ヌクレオシド dP による細胞死誘発に
関与する遺伝子の特定と、その集積によっ

て構築された高効率ネガティブ選択系

第 68 回日本生物工学会大会 2016 年 9 月 28
~30 日

11. 梅野太輔

生体分子の協働機能形式を進化デザインする

生物工学会夏のセミナー2016 (招待講演)

2016 年 07 月 16~17 日

12. Daisuke Umeno

Evolutionary design of biosynthetic pathways and regulatory networks

Biosystems Design Synposium 2.0 (招待講演) (国際学会) 2016 年 03 月 21 日

13. 梅野太輔

遺伝子発現制御系とその集積回路の進化工
学

第 17 進化学会 (招待講演) 2015 年 08 月
20 日

〔図書〕(計1件)

1. 梅野太輔

生物を作る-新薬を生み出すスーパー酵母を
創る, バイオベンチャーの冒険者たち
幻冬舎 p200 (2018)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb02/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅野 太輔 (Daisuke Umeno)

千葉大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 00400812

(2)研究分担者

河合 繁子 (Shigeko Kawai)

千葉大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 40638920