

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14880

研究課題名(和文) 合成生物学的手法を利用した人工生合成経路設計技術の開発

研究課題名(英文) Development of method using synthetic biology to design artificial biosynthetic pathway.

研究代表者

勝山 陽平 (Katsuyama, Yohei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：50646437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：m-トルイル酸を認識する転写制御因子XylISの認識能の改変を試みた。そのためのスクリーニング系を構築し、6サイクルの指向性進化を行い、p-トルイル酸を認識する変異XylISの取得を試みた結果、5箇所に変異の入ったXylISが得られた。また、これらのうち、3箇所が特にp-トルイル酸の認識に重要であることを示した。この位置に飽和変異を導入し、よりp-トルイル酸の認識する変異XylISを得た。本改変系を改良し、生合成経路の構築に用いられる改変系の構築を目指す。また、FdeRやQdoRを利用してスチルベン合成酵素の環化特異性改変の構築を目指したが、これらの転写制御因子は改変に適切な特性を持っていなかった。

研究成果の概要(英文)：We constructed screening system to modify the ligand specificity of XylIS which is a transcriptional activator which recognize m-toluic acid. Based on this system we carried six round of directed evolution and obtained XylIS mutant which recognized p-toulic acid. This mutant has 5 mutations. Further analysis showed that three of them are important for p-toluic acid recognition. Saturated mutagenesis at these three sites resulted in XylIS mutant which recognize p-toluic acid more selectively. By improving this screening system, we would like to develop a system to design artificial biosynthetic pathway. We also attempted to construct screening system to engineer stilbene synthase by using FdeR and QdoR. However, these enzymes do not have appropriate property for screening.

研究分野：生合成

キーワード：engineering biosynthesis

1. 研究開始当初の背景

微生物の持つ代謝能力に関する研究は近年、一時ルク進展しており、生物の持つ様々な酵素の多様な触媒能力とその反応メカニズムが明らかになりつつある。それらの知見は酵素エンジニアリングへと応用することにより、微生物の持つ代謝経路をエンジニアリングすることで、新規化合物を生産する微生物の構築も可能になりつつある。しかし、代謝経路の改変を行う場合、多段階の酵素のエンジニアリングをする必要があるため、微生物が本来持つ代謝経路とは大きく異なる経路を設計する場合、既知の知見からだけでは困難な場合も多い。その解決策として指向性進化を利用した酵素エンジニアリングが多くの研究者により行われている。しかし、そのような場合、目的活性を持つ酵素を効率よく選抜可能なスクリーニング系の存在なしには現実的に新規代謝経路の設計には多大な労力がかかる。そのため、新規な方法論の開発が常に求められている。

2. 研究の目的

上記の問題を可決するため、合成生物学のツールである低分子認識型の転写制御因子を利用することを試みた。最終産物のターゲットとしてテレフタル酸を設定し、テレフタル酸の生合成経路の設計を目指す。そのために、まず、転写制御因子の低分子認識能改変系を確立する。ついで、それを利用してテレフタル酸を認識する転写制御因子を開発する。最後にその転写制御因子を利用して効率的な酵素改変系を設計し、テレフタル酸を生産可能な微生物の構築を目指す。

3. 研究の方法

まず、転写制御因子の低分子認識能改変のモデル実験を行う。薬剤耐性遺伝子を利用したスクリーニングシステムを構築し、そのスクリーニング系により低分子認識能改変が可能か検証する。

平行して転写制御因子を利用した酵素改変が可能か検証する。そのために、スチルベン合成酵素 (STS) をカルコン合成酵素 (CHS) に変換するモデル実験を行う。これを用いて酵素の活性の改変系を構築する。

最後にこれら2つの方法を組み合わせ、テレフタル酸生合成経路の設計を試みる。まず、テレフタル酸を認識する転写制御因子を構築する。得られた転写制御因子を用いて、反応経路の下流の反応を担う酵素から順次改変することで、生合成経路の設計を目指した。

4. 研究成果

XyIS 認識機構改変のためのスクリーニング系の構築

まず、モデルとして XyIS の低分子認識能の改変を試みた。XyIS は芳香族化合物分解酵素の発現を制御する転写制御因子であり、*m*-トルイル酸を認識することが知られている。

まず、*xyIS* 遺伝子を *lac* プロモーターの下流に配置したプラスミドを構築した (pCDFlac-*xyIS*, 図 1)。また、*P_m* プロモーター (XyIS により認識され活性化されるプロモーター) の下流にアンピシリン耐性遺伝子と *tetR* 遺伝子からなるオペロンを配置した遺伝子断片と、*tetR* プロモーターの下流にクロラムフェニコール耐性遺伝子を配置したプラスミドを構築した (pUKN009, 図 1)。XyIS を改変する際に抗生物質耐性をレポーターとして目的リガンドを認識する XyIS の取得を試みることにした。しかし、大腸菌内在性の化合物を認識する変異 XyIS やリガンド非存在下でも転写活性化を行う変異 XyIS もスクリーニング系に偽陽性として混入してくる可能性がある。そこで、その偽陽性を排除するシステムとして *tetR* 遺伝子とクロラムフェニコール遺伝子を用いている。TetR は DNA に結合して転写抑制をするタンパク質である。そのため、TetR が発現すればそれがクロラムフェニコール耐性遺伝子のプロモーターに結合し転写を抑制するはずである。そのため、偽陽性が生じた場合、クロラムフェニコール感受性となることが期待されるため、この耐性の変化を利用して偽陽性を排除することが可能となる。

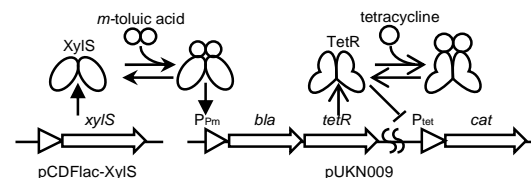


図 1 本研究で用いたプラスミドの模式図とスクリーニング系の概要。

XyIS 改変スクリーニング系の実用性の検証

これら2つのプラスミドをもつ大腸菌は XyIS のリガンドである *m*-トルイル酸存在下ではアンピシリン耐性、クロラムフェニコール感受性に、一方、*m*-トルイル酸非存在下では逆にアンピシリン感受性、クロラムフェニコール耐性と期待された。*m*-トルイル酸存在下では期待通りの表現形を示したが、予想外なことに *m*-トルイル酸非存在下ではアンピシリンとクロラムフェニコール双方に感受性となった。これは微弱に *m*-トルイル酸非存在下で発現している *TetR* が *tetR* プロモーターを強力に抑制しているため起こったと考えられる。そこで、*TetR* の転写抑制能を弱めるために微量のテトラサイクリンを添加したところ、期待通りのフェノタイプを示した。期待通りのフェノタイプが得られていることを確認するために異なる *m*-トルイル酸濃度で菌体をアンピシリン、もしくはクロラムフェニコール存在下で培養し、培養 10 時間後に OD₆₀₀ を測定した (図 2)。その結果、*m*-トルイル酸濃度が増加するほどアンピシリンに耐性、クロラムフェニコールに感受性と

なることがわかった。

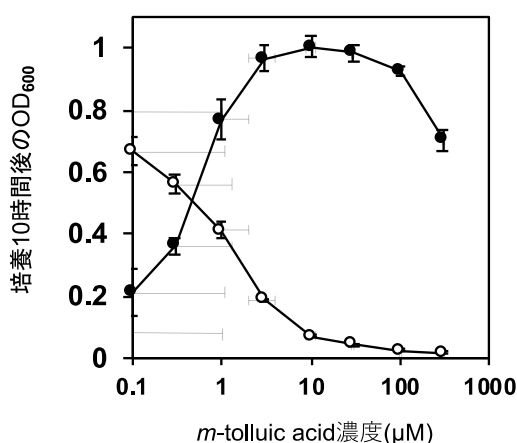


図2 *m*-トルイル酸存在下で培養した時の大腸菌の生育。(○)アンピシリン存在下、(●)クロラムフェニコール存在下で培養した時。

次にこのシステムを用いて目的の菌体を濃州区できるか確認するためにモデル実験を行った。pUKN009に加え、pCDF-1 (XylISなし)もしくはpCDFlac-xylISを添加した大腸菌を構築した。これらの菌体を混合し、*m*-トルイル酸存在下で液体培養を行なった。その結果、アピシリン存在下では培養36時間後にはpCDFlac-1を持つ大腸菌は淘汰された。一方、クロラムフェニコール存在下ではpCDFlac-xylISを持つ大腸菌が淘汰された。これにより、本スクリーニング系が機能していることがわかった。

XylIS リガンド認識能の改変

この大腸菌を利用して、偽陽性を排除しつつ、指向性進化によりXylISの低分子認識特異性の改変を目指した。まず、モデル実験として *p*-トルイル酸を選択的に認識する変異XylISの構築を目指した。6サイクルの変異実験の結果、*p*-トルイル酸を優位に認識する変異XylISの取得に成功した。取得したXylISの変異点を解析した結果、このXylISは5つのアミノ酸置換変異を持つことが明らかとなった。次に、この変異XylISのリガンド認識能をPmプロモーターの下流にmCherryを配置したプラスミド(Pm-mCherry)を用いて詳細に検討した。その結果、このXylISは *p*-トルイル酸と *m*-トルイル酸を同程度認識することがわかった。

次にこれらのうちどの変異がリガンド認識能の変化に必須か調べるために、これらの変異を一つずつ導入したXylISを構築した。次にこれらのリガンド認識能を調べたところ、これらのうち3つにおいて *p*-トルイル酸の認識能が上昇していることがわかった。次に、これら3箇所に飽和変異を導入し、*p*-トルイル酸よりも *m*-トルイル酸を強く認識する変異XylISの取得を試みた。その結果、*m*-トルイル酸よりも *p*-トルイル酸を2倍程度強く認

識する変異XylISの取得に成功した(図3)。この変異XylIS遺伝子とPmプロモーターの下流にmCherry遺伝子を配置したプラスミドを大腸菌に形質転換し、蛍光タンパク質の生産量を基準に認識活性を評価した。その結果を図3に示す。

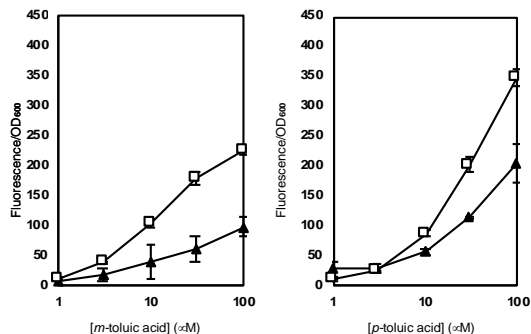


図3 得られた二つの変異XylISの *m*-トルイル酸と *p*-トルイル酸の認識能。いずれにおいても *m*-トルイル酸よりも *p*-トルイル酸を用いた時の方がより高い蛍光活性を示している。

しかし、現状、*m*-トルイル酸の認識能が低下した変異XylISはなかなか得られていない。この原因は様々な原因が考えられるが、抗生物質添加の際に生じるパースタントなど生き残ってしまう、リガンド非存在かでも微弱に耐性遺伝子が発現しているため、完全に菌を殺しきれないなどの原因が考えられる。

転写抑制型の転写制御因子 QdoR リガンド認識能改変系の構築

また、フラボノイドを認識する転写制御因子、QdoRを用いて同様のスクリーニング系の構築を目指した。しかし、構築した組換え大腸菌はリガンドの有無でクロラムフェニコール耐性に大きな差が生じなかった。そのため、転写抑制因子であるQdoRはこのスクリーニングに向かないと判断した。

転写制御因子を利用したスチルベン合成酵素の環化特異性の改変

次に、フラボノイドを認識する別の転写活性化因子であるFdeRを利用して、III型ポリケタイド合成酵素の環化特異性改変系の構築を目指した。fdeRをlacプロモーターの下流に、クロラムフェニコール耐性遺伝子をFdeR認識プロモーターの下流に配置したプラスミドを構築した。このプラスミドを用いてスチルベン合成酵素(STS)のエンジニアリングが可能か検証した。しかし、検証の過程で、FdeRはフラボノイドを認識すると文献に報告されていたが、フラボノイド以外にも様々な芳香族化合物を認識することが明らかとなった。また、特に深刻であったのが、FdeRがSTSの基質である *p*-coumaroyl-NACも認識した点である。そのため、STSのエンジニアリングを行うためにはまず、FdeRのエン

ジニアリングが必要であることが示された。
そのため、FdeRを用いた STS のエンジニア
リング研究には至らなかった。

まとめ

上述のように、XyIS のリガンド改変系の構
築に成功するとともに、低分子認識転写制御
因子の利用と改変における様々な問題が明
らかとなりつつある。本研究により得られた
知見を元に、この改変系をさらに改良し、テ
レフタル酸生産系の構築に向け研究を継続
する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 5 月 23-27 日 18th International
Symposium on the Biology of
Actinomycetes (International
Convention Center JEJU) S03_P04,
Modification of Ligand Specificity of
XyIS through Directed Evolution.
Yohei Katsuyama, Yuki Ogawa, Kento
Ueno and Yasuo Ohnishi (2017)
2. 3 月 18 日 2017 年日本農芸化学会大会
(京都女子大、指向性進化による転写因
子 XyIS のリガンド認識能の改変、勝山
陽平、小川 友希、上野 堅登、大西 康
夫 (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

勝山 陽平 (KATSUYAMA, Yohei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准
教授

研究者番号：50646437