

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：19K06555

研究課題名（和文）新規有用タンパク質のライブラリ構築と高速スクリーニング系の基盤確立

研究課題名（英文）Library construction and establishment of high-throughput screening system for the discovery of novel useful proteins

研究代表者

横田 亜紀子（Yokota, Akiko）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20415764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、新規有用タンパク質を、迅速かつ簡便に探索する手法を確立することである。その目的に向けて、各種タンパク質の変異ライブラリを構築した。また、それらをw/oエマルジョンに内包し、マイクロ流体デバイスを利用して評価することで、高速スクリーニング系の基盤を確立することができた。さらに、スクリーニングで利用する蛍光プローブの性能評価や、取得したタンパク質に関する詳細な解析を実施することで、数々の有用な知見の獲得にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した基盤技術は、様々なタンパク質のスクリーニングに適用可能であり、汎用性が高く、社会的意義のある研究成果であると言える。また、本研究においては、配列特異的エンドリボヌクレアーゼを変異ライブラリ作製の対象としたが、当該分子はRNA分析技術での利用や、RNAワクチン等の品質管理への応用が可能であり、医療・産業への貢献が期待される。その他にも、モデル分子として蛍光タンパク質の変異ライブラリの作製と評価を行った。様々な分野で利用されている蛍光タンパク質は、新しい性能を持つ分子の創成が望まれており、その新規蛍光タンパク質の探索・開発において本研究成果が威力を発揮すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish a high-throughput and simple method to search for novel useful proteins. To this end, we have constructed mutant libraries for different types of proteins. We have also established the basis for a high-throughput screening system by encapsulating them in w/o emulsions and evaluating them using a microfluidic device. We also evaluated the performance of the fluorescent probes used in the screening, performed detailed analysis of the acquired proteins, and succeeded in obtaining a lot of useful findings.

研究分野：機能生物化学

キーワード：変異ライブラリ w/oエマルジョン 高速スクリーニング 蛍光検出

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生命現象において様々な役割を担っている。そのため、欲しい機能を有するタンパク質分子の設計・創成を目指して、多岐にわたる研究が世界中で進められてきた。進化工学的手法を用いて新規タンパク質を設計・創成する場合、変異ライブラリとスクリーニング系が必要であるが、いかにして大きな変異ライブラリを作製し、その中から効率良く目的分子を探索するシステムを構築できるか、が鍵となる。しかしながら、従来、探索における反応場として使用されてきた 96 well ないし 384 well などのマイクロプレートでは、数万、数十万という規模のクローンのスクリーニングを想定した場合、その処理能力の限界が課題となる。そこで、変異ライブラリと water-in-oil (w/o) エマルジョン等を利用したスクリーニング系を組み合わせることで、進化工学的手法をベースとする、目的機能を有するタンパク質を探索・設計する手法の構築を試みた。w/o エマルジョンとは、油相の中に水滴が分散している系のことであり、1950 年代に提唱され始めたが、長らく注目されてこなかった。しかし 1990 年代半ばから急速に研究が進み、近年は酵素反応デジタル PCR や次世代シーケンサーなどに 10~100  $\mu\text{m}$  程度のサイズの w/o エマルジョンが利用されるようになった。このアイテムを、本研究提案当初 (~2018 年) の主流であった 1 分子 PCR の単なる酵素反応場としてではなく、タンパク質のスクリーニングシステムとして上手く利用できないか? という試みに挑戦したいと考え、本研究開始に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、変異ライブラリと、w/o エマルジョンを利用したスクリーニング系とを組み合わせ、目的機能を有する有用タンパク質を、迅速かつ簡便に探索する新しい手法を構築することである。また、その成果として、医療・産業応用を踏まえつつ、多種多様な機能や特性を有する新規もしくは改変型有用タンパク質分子を取得し、社会的ニーズに応えることを目指す。さらに、取得したタンパク質分子を、多角的かつ詳細に解析することで、生体内での作用機序に関する知見を獲得し、分子生物学などの研究分野における学術的貢献も目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ターゲット分子の選択と変異ライブラリの調製

スクリーニングの対象分子として、研究代表者および研究分担者が以前より研究を進めていた MazF タンパクを候補とした。MazF 分子は、微生物において普遍的に存在し、ストレス応答やプラスミドの維持に關与するとされる Toxin-Antitoxin (TA) システムを構成する Toxin 分子の一種である。この TA システムは、遺伝子座など dry な解析をベースとする情報は蓄積されつつあるものの、wet な実験に基づく分子レベルにおける詳細な作用機序などについては未知の部分も多い。本研究を通じて取得した MazF (Toxin) 分子を、精密かつ多角的に解析することで、微生物におけるストレス適応や生存戦略に関する興味深い知見が得られると考えた。また、MazF は配列特異的のエンドリボヌクレアーゼとしての側面を持つ。そこで、学術的価値だけでなく、医療・産業応用などを考慮してターゲット分子を選定した。さらに MazF と並行して、機能評価や変異効果の検出が比較的容易と考えられる蛍光タンパクもモデル系構築のためのターゲット分子として選定し、発現ベクターの設計・作製を進めた。蛍光タンパク質はバイオイメージング分野を始め、様々な研究分野において利用されており、新しい性能や特徴を有する分子の開発や既存分子の機能改変に対する需要は極めて大きい。このようにして選定した分子について、各 DNA 配列を出発配列(鋳型)とし、Error-prone PCR や部位特異的変異導入法などの技術を利用して、十分な大きさの変異 DNA ライブラリを作製した。

### (2) ライブラリのコンパートメント化とアッセイ系の構築

(1) で作製したライブラリについて、w/o エマルジョン等のコンパートメントに封入し、実験の進行状況や、後述のアッセイ系との相性も鑑みて、無細胞タンパク質発現系あるいは大腸菌発現系などを用いてタンパク質を発現させ、蛍光検出を利用してライブラリ中のクローンの活性や機能を評価した。例えば、蛍光タンパク質の場合であれば、形質転換体である大腸菌が発する蛍光を直接的に検出することが可能である。Toxin 分子の場合は、両末端を蛍光色素で標識し、内部を任意の RNA 配列に設計した基質 RNA 蛍光プローブを共存させ、コンパートメント内で切断活性を進行させることで、蛍光上昇がポジティブクローンの選別を試みる。このような方法で、目的機能を有するタンパク分子を迅速・簡便に発現・選別するシステムの構築に取り組んだ。

### (3) 目的機能を有するターゲット分子の詳細な解析

(1)(2) で取得した分子の詳細を調べるため、個々のクローンについて、タンパクの発現と精製を行い、多角的かつ精密な解析を実施し、野生型と異なる特性を持つ新規タンパク分子の創成を試みた。可能な場合は、構造情報等も組み合わせ、その機能発現のメカニズムや、分子間相互作用における特異性・親和性創出機構などについて考察していく。さらに、その結果として蓄積された知見について、将来的には、タンパク質の合理的設計の指針として活用し、タンパク質工学分野の発展に還元していく。

#### 4. 研究成果

##### (1) Toxin 分子の変異ライブラリの調製と変異体の機能評価

前項で記述した通り、Toxin 分子 MazF タンパクについて、変異ライブラリの作製を試みた。市販のキットを用いたランダム変異導入を実施したところ、野生型クローンの割合が極めて高く、十分な大きさの変異プールの作製には至らなかった。一方、部位特異的変異導入法を用いての MazF 変異体クローンの作製には成功した。それらの変異導入発現プラスミドを使用して無細胞発現系にてタンパクの発現を試みたところ、その後の詳細な活性評価に十分な純度・量のタンパクが取得でき、多数の変異体の機能解析にも成功した。その結果、標的 RNA に対する特異性や親和性創出に対して重要な役割を担う残基を同定し、宿主微生物と Toxin 分子の進化の過程に関する学術的な理解を深めることができた。また、今回はタンパク発現の反応場としてマイクロチューブを使用した。今後はマイクロドロップレット (w/o エマルション) 内でのタンパク発現にも挑戦していきたいと考えている。

さらに、一度は失敗に終わったランダム変異導入であるが、新しい別の変異導入用キットの使用や PCR 条件の再検討などを経て、多数の変異クローンの取得に成功した。現在、DNA に対する制限酵素は数多く存在し、市販されているが、RNA に相当するものは極めて数が少ない。この配列特異的エンドリボヌクレアーゼである MazF の変異ライブラリの作製により、様々な配列特異性を有する RNA 版制限酵素が取得できれば、核酸編集技術のツールとしての利用や、ここ数年で急速に開発が進んだ RNA ワクチン等の品質管理に資する RNA 分析技術への応用が期待される。また、本 MazF 分子は、非常に有用であるものの、大量生産が難しいなどの課題点もある。本研究で作製した変異ライブラリを活用し、安定的に発現するタンパク分子 (変異体) の取得を目指す、などの展開も検討していきたい。

##### (2) 蛍光タンパク質の変異ライブラリの調製と w/o エマルションを用いたスクリーニング

(1) と並行して、検出系のモデル構築のためにターゲットとして選定した蛍光タンパクについて、発現ベクターの設計・作製を行った。しかしながら、光るはずの組換え大腸菌が全く光らない、という想定外の事態が発生し、実験が滞ってしまった。発現ベクターの設計と作製を繰り返し、宿主大腸菌の種類を変更するなど、試行錯誤を重ねた結果、ようやく当初想定していた蛍光を発する菌体の取得に成功した。これを出発点として、蛍光タンパクの変異ライブラリの構築を試みた。ランダム変異を導入して 30 クローンほどサンプリングして配列を確認したところ、多種多様な変異が導入されており、変異ライブラリの調製に成功したことが確認できた。そこで、この変異ライブラリを w/o エマルションに封入・培養し、クローンの特性の違い (変異効果) を、それらが発する蛍光の違いとしてソーティングできるかどうか、について検討を行った。個々のクローン (菌体) の特性を観察するために、1 エマルション当たりの封入菌体数が 1 以下 (複数のクローンが混在しないように、シングルコロニーもしくは空) になるように菌体濃度を調整してエマルションに封入した。菌体封入直後のエマルションにおいては、顕微鏡でもソーティング装置でも蛍光を検出することが出来なかった。培養開始から 2 日後に、ようやく蛍光の検出が可能となった。これらの事実は、菌体 1 細胞の状態 (封入当日、培養 0 日) では蛍光の検出が難しいことを意味する。そこで、1 エマルションあたりの菌体数を増やしたエマルションを作製し、2 日間培養した後に、ソーティング装置にサンプルを流した。その際、蛍光強度の閾値を設定し、蛍光強度の違いによるソーティングを実施し、回収したエマルションを顕微鏡で観察した。その結果、A) 蛍光を発する菌体が封入されたエマルション群、B) 蛍光を発しない菌体が封入されたエマルション群、C) 空のエマルション群、の 3 つに分離できることが分かった。次の段階として、変異導入の効果を蛍光強度や蛍光波長の変化として検出可能かどうかの検証を進めたいと考えている。

##### (3) その他の有用分子の高速スクリーニングに向けた評価系の構築

(1)(2) とは異なるタンパク質を新たなスクリーニングの対象分子として、その活性評価のための検出システムの構築に取り組んだ。低分子化合物を基質として認識する酵素をモデルとして、評価系のストラテジーの設計、活性検出用の試薬やプローブ類の調査・選定を行い、マイクロプレートおよび w/o エマルションを用いた予備検討を実施した。その結果、w/o エマルション内での試薬・プローブの安定性や活性検出能の持続性、さらに、試薬・プローブ本体や付随する Buffer、基質など内包物の w/o エマルションからのリーク状況など、その試薬・プローブの特性およびそれらを用いた場合の活性評価系に関する有用な知見やノウハウを得ることができた。本評価系は、同様のメカニズムを持つ他の酵素にも適用可能な汎用性が高い技術であるため、本研究期間終了後も研究を続けていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okabe Takuma, Aoi Rie, Yokota Akiko, Tamiya-Ishitsuka Hiroko, Jiang Yunong, Sasaki Akira, Tsuneda Satoshi, Noda Naohiro	4. 巻 300
2. 論文標題 Arg-73 of the RNA endonuclease MazF in <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> contributes to guanine and uracil recognition in the cleavage sequence	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105636 ~ 105636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2024.105636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Jiang Yu-Nong, Tamiya-Ishitsuka Hiroko, Aoi Rie, Okabe Takuma, Yokota Akiko, Noda Naohiro	4. 巻 16
2. 論文標題 MazEF Homologs in <i>Symbiobacterium thermophilum</i> Exhibit Cross-Neutralization with Non-Cognate MazEFs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 81 ~ 81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins16020081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tamiya-Ishitsuka Hiroko, Tsuruga Masako, Noda Naohiro, Yokota Akiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Conserved Amino Acid Moieties of <i>Candidatus Desulforudis audaxviator</i> MazF Determine Ribonuclease Activity and Specificity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.748619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岡部 拓真、葵 理恵、横田 亜紀子、石塚 寛子、江 雨濃、佐々木 章、常田 聡、野田 尚宏
2. 発表標題 The specific amino acid of the MazF RNA endonuclease in <i>Salmonella enterica</i> is directly responsible for the RNA cleavage sequence
3. 学会等名 Microbe & RNA 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部 拓真、葵 理恵、横田 亜紀子、石塚 寛子、江 雨濃、常田 聡、野田 尚宏
2. 発表標題 Unraveling Stress Response Mechanisms via Salmonella enterica MazF Cleavage Sequences
3. 学会等名 第36回 日本微生物生態学会 & 第13回ASME (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横田 亜紀子、宮本 龍樹、大田 悠里、釣賀 雅子、葵 理恵、石塚 寛子、岡部 拓真、江 雨濃、常田 聡、野田 尚宏
2. 発表標題 配列特異的エンドリボヌクレアーゼMazFのライブラリ構築とその応用可能性
3. 学会等名 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江 雨濃、石塚 寛子、葵 理恵、岡部 拓真、横田 亜紀子、野田 尚宏
2. 発表標題 Function analysis of type II toxin-antitoxin MazEF in symbiotic thermophile S
3. 学会等名 The 14th Japan-China-Korea International Postgraduate Academic Forum (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石塚 寛子、釣賀 雅子、野田 尚宏、横田 亜紀子
2. 発表標題 極限環境微生物Candidatus Desulforudis audaxviator MazFの高度に保存されたアミノ酸の役割
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石塚寛子、江 雨濃、岡部 拓真、横田 亜紀子、野田 尚宏
2. 発表標題 極限環境微生物由来トキシンタンパクMazFの高温下における機能および安定性の評価
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横田 亜紀子、宮本 龍樹、大田 悠里、釣賀 雅子、常田 聡、野田 尚宏
2. 発表標題 Clostridium perfringens由来Toxin-AntitoxinシステムMazEFについて：分子認識機構と生理機能の考察
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	野田 尚宏  (Noda Naohiro)  (70415727)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 グループ付    (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------