

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640133

研究課題名(和文)合理的な空間配置による超複合酵素の創成

研究課題名(英文)Synthesis of complex enzymes with rational spatial arrangement

研究代表者

渡部 暁(Watanabe, Satoru)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：80300945

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)：近年の合成生物学の目覚ましい進展により、複雑な遺伝子回路を人工的に作成する要素技術はほぼ揃ったが、合成効率が低いため、有用化合物の実用的な生産にはまだ至っていない。有用化合物は、通常、多種の酵素が協調・連鎖して簡単な基質から順次合成されるが、個々の酵素の発現量の制御は難しく、その空間的な配置の制御は殆ど考慮されていないことが問題と考え、本研究では任意のDNA配列に結合するTALエフェクターに着目し、発現量と空間配置の制御に利用できるかを探索した。

研究成果の概要(英文)：Owing to recent development of synthetic biology, a set of basic tools are now available by which you can design and prepare artificial genetic circuits. These circuits can synthesize desired compound but their efficiency is generally still low especially when they are composed of many enzymes and are complicated. In this research, I tried to control expression levels and spatial arrangement of these enzymes using artificial TAL effector.

研究分野：合成生物学

キーワード：酵素 人工代謝系 空間配置 遺伝子回路

1. 研究開始当初の背景

近年の合成生物学の目覚ましい進展により、標準化された遺伝子回路とその組み合わせでできたモジュールが整備され、複雑な遺伝子回路を人工的に作成できるようになり、微生物による環境修復技術、持続可能なエネルギー生産、薬剤の生産などが、現実味を帯びてきている。中でも、年間2億以上の症例があり、65万人以上が死亡したマラリア症例に対する有効な治療薬であるアルテミシニンの前駆体を生物工学的に微生物に全合成させる技術基盤を開発し、その知財権を無料で提供して希少薬剤の安定的な供給に道を開いたことは、合成生物学の社会還元の高塔である (Nature 2013 496, 528-532)。

一方で、その生産性のさらなる向上は課題であるが、合成経路の14種以上の酵素の各々の発現量の制御が十分でないことに加え、その空間配置は全く考慮されていないなど、改善の余地が多く残されている。その理由は、遺伝子の発現を独立に制御するモジュールの種類が限られていることと、複数のタンパク質の空間配置についてはまだ萌芽的な状態で、その効率的な配置の原理も手法も未開拓という、技術的な制約のためである。自己集合するDNA構造体 (以後、足場と表記) についてはナノテクノロジー分野での目覚ましい発展がみられており、DNA折り紙など配列操作により任意の構造体の作成が可能となっている。また、分子生物学では任意の配列に結合するTALエフェクターが発見され、TALエフェクターを酵素との融合タンパク質として発現させれば、任意のDNA配列に特異的に結合する酵素が得られる (以後、TAL酵素と表記)。足場の細胞での発現 (または導入) は、まだ技術の発展を待たねばならないが、仮に細胞内に足場が確保できとすれば、細胞内で設計どおりに目的の酵素群の選択的な空間配置が可能となる。先駆的な研究によると、たった2個の酵素からなる系でも、2つの酵素を適切な距離におくことで10倍以上の活性が得られるという (J.Am.Chem.Soc. 2012 134, 5516-5519)。

2. 研究の目的

DNA折り紙など自己集合するDNAを足場として抗マラリア薬剤の人工合成系酵素群を設計したとおりに空間配置し、酵素の活性量に与える空間配置の影響を評価する。足場の有無、酵素間の距離、各酵素の比率、反応順序やキネティクスと空間配置の関連など、最適な空間配置の原理の構築をめざすとともに、多種類の酵素が最適に空間配置されて一連の合成系の総合的な生産性が格段に向上された「超複合酵素」の創成を目的とする

する

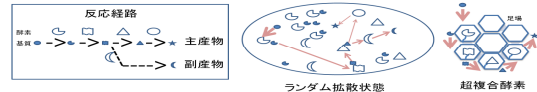


図1. 多段に渡る反応を触媒する酵素群の空間配置

(矢印は次の反応工程に移動する基質の経路を、その太さは到達する基質の量を表す。)

3. 研究の方法

上述のように、現在の合成生物学では、独立に制御できる (直行した) 制御系の個数がまだ数個しかなく、実利を求める複数酵素の連鎖反応では1種の化合物の生合成に多数 (10個以上) の酵素が働くため、厳密な制御はできていないが、以下に示す本研究の狙いが実現したならば、多種の発現量の制御も可能となる (図2)。即ち、特定のDNA配列 (D1) を認識するTAL酵素を、D1様配列 (D1') を直下にもつプロモーター支配下に置く。発現されたTAL酵素は、足場のD1にトラップされるか (必要ルート)、または、D1' に結合し (余剰ルート)、後者は自身の遺伝子の転写を抑制する。この系では、必要量は足場の量が規定し、その量だけ合成され、過剰量は生産されない仕組みである。TAL酵素で認識されるDNA配列は自由に設定できるため、必要な数だけ異なる塩基配列を認識するTAL酵素を準備して対応するプロモーターの支配下に置けば、理論上は、他の系路に影響を与えない直行した制御系が作成できることになる。従って、従来の技術では不可能であった多種類の発現量の最適化と、空間配置の最適化を同時に行うことができる。

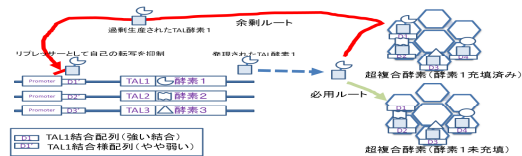


図2. 余剰産物のフィードバックによる発現調節

4. 研究成果

発現系構築

Acetyl-CoA 以後の抗マラリア薬剤の人工合成系酵素群 (図3) のうち、初期の3酵素からなるメバロン酸合成系 (図3、破線内) に着目して、試験管内での再現を検討した。

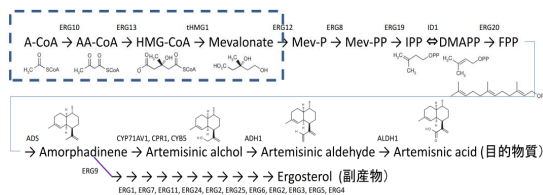


図3 アルテミシニン酸 (アルテミシン前駆体) の工学的な生合成経路。破線内はメバロン酸合成系を示す。

このうち、予備的な検討により ERG10 が触媒する最初の反応 (acetyl-CoA \leftrightarrow acetoacetyl-CoA) は化学平衡が大きく左方向 (逆反応) に傾いていることがわかった。試験管内での検討には、正反応が主となる経路が望ましい。このため、正反応が主となる新たに明らかになった経路 acetyl-CoA + malonyl-CoA \rightarrow acetoacetyl-CoA を採用し、試験管内での再現を検討した (図 4)。

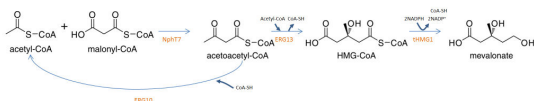


図 4 本研究で検討したアルテミシニン酸 (アルテミシン前駆体) の生合成経路。

まず、対応する酵素 NphT7, ERG13, tHMG1, ERG10 の発現系を構築した。N 末端に His タグ様配列を付加して無細胞タンパク質合成系にて発現させたところ、分子量から想定させる位置に、可溶性に発現することが確認され (図 5 a)。さらに、Ni-sepharose を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行ったところ、SDS-PAGE 上でメインバンドとして見られた (図 5 b)。

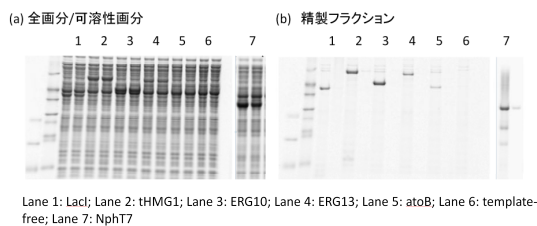


図 5 無細胞タンパク質合成系での酵素の発現と精製

これらの精製酵素を用いて、試験管内で各基質の代謝過程を NMR 法により観測することにした。

本実験系で想定される代謝産物の化学構造は複雑で (図 6)、主産物以外の副産物のピークも生じるため、目的ピークを ^1H 1 次元 NMR スペクトルだけで分離観測することが難しかった。

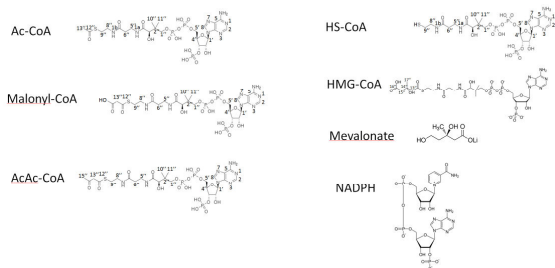


図 6 本実験系で想定される代謝産物の化学構造

そこで、 ^1H - ^{13}C 相関スペクトルで 2 次元に展開することで、目的産物を分離・同定して観測することを計画した。実際に、NphT7 反応について、単独の基質のみでスペクトルを観測すると、代謝によって生じる産物 (AcAc-CoA) のうち、多くのピークが基質である Ac-CoA や Malonyl-CoA のシグナルと重なっているが、確実に分離して見えるピークがみられた (図 7、緑色の矢印)。基質と酵素を終夜反応させた反応液のスペクトルでは、AcAc-CoA に特異的なシグナルが確かに観測された (図 7、青色の矢印)

NphT7 reaction

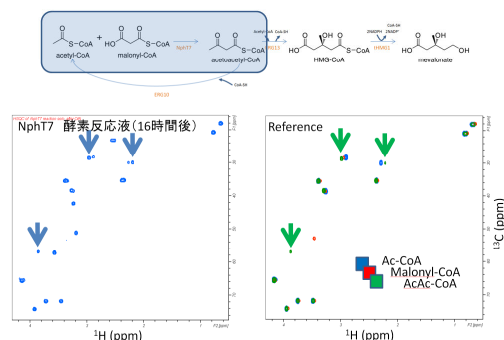


図 7 ^1H - ^{13}C 相関スペクトルによる代謝産物の検出 (酵素: NphT7)

同様に、他の反応について解析したところ、いずれの反応においても、目的産物の分離したピークが観測され、反応時間の経過に伴い、その強度が上がるのがスペクトル上で確認できた (図 8、図 9)。

ERG13 reaction

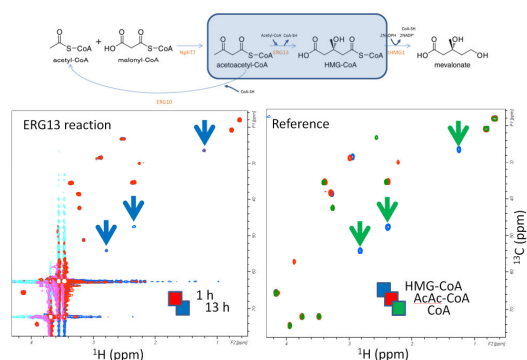


図 8 ^1H - ^{13}C 相関スペクトルによる代謝産物の検出 (酵素: ERG10)

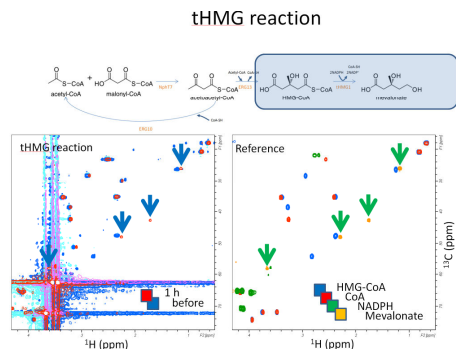


図9 1H-13C 相関スペクトルによる代謝産物の検出 (酵素: tHMG)

2次元NMRスペクトルは測定に時間を要する(上記の測定で2.5時間)が、酵素による代謝経路の時間は数時間から数日の間で起こる条件を得た。すなわち、試験管内で遊離のERG10, ERG13, tHMG1, NphT7と各基質を添加した13C-1H相関2次元NMRスペクトルにより、中間産物を個別に、かつ、数時間のオーダーで定量的に代謝速度を迫る観測系の構築に成功した。

次に、酵素をDNAに固定化した状態での観測のため、各酵素をTALエフェクターとの融合タンパク質(TAL酵素)として発現させる発現系の準備を進めた。

しかしながら、遊離の酵素でうまくいった系をTALエフェクターとの融合酵素の系に置き換える段階で、試行錯誤の検討を進めたものの、いずれの遺伝子でも発現は見られなかった。そのため、発現量の制御と空間配置についての直接的な影響の評価は残念ながら得られず、本研究の当初目的からすると、その予備的なデータを得たという位置づけとなる。国内外でのインパクトは現段階ではない。

今後は、複雑で人工的な代謝経路について、細胞毒性の少ない設計などを考慮した発現量・空間配置の工夫により、より高収量化・実用化へ向けた研究が展開されるものと考えている。

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 暁 (WATANABE, Satoru)

国立研究開発法人理化学研究所

生命システム研究センター

上級研究員

研究者番号: 80300945