

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20485

研究課題名（和文）診断酵素の実用新規進化デザインプラットフォーム

研究課題名（英文）Novel evolutionary design platform for engineering of diagnostic enzymes

研究代表者

関 貴洋（Seki, Takahiro）

早稲田大学・理工学術院総合研究所（理工学研究所）・次席研究員

研究者番号：20836530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の進化分子工学は、遺伝子レベルの多様化と機能選抜の繰り返しによって、新規なタンパク質機能を創出する技術である。その発現と機能選抜は、生細胞で行われてきたが、細胞内環境では機能発現が困難なタンパク質モチーフも多い。最近、申請者は大腸菌ペリプラズム空間に任意のタンパク質を提示するDisplay技術を開発した。この技術は、提示したタンパク質の活性を非破砕に評価できるだけでなく、その基質との結合によるタンパク質の安定化を足場となる膜タンパク質の機能によって読み出すことができる。本研究では、本技術を利用して診断酵素の機能進化を試み、新規進化工学プラットフォームの確立に挑戦した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

診断に利用される酵素の多くは、細胞から分泌されるタンパク質であり、そのほとんどが生細胞内での発現が困難あるいは機能選抜不可である。本研究により、診断酵素の進化工学プラットフォームが確立されたことで、これまで機能改良が困難だった多くの診断酵素の改良がハイスループットに行えるようになる。また、ペリプラズムという化学的環境を自在操作可能な空間での酵素改良が行えるようになったことで、診断酵素以外についてもさまざまな新規機能を付与可能となり、タンパク質機能の再デザインの歩留りが大きく高まるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Evolutionary engineering for protein is a technology to create novel protein functions through repeated gene-level diversification and functional selection. However, there are many protein motifs that are difficult to express in the intracellular environment. Recently, I have developed a technique to display of arbitrary proteins in the periplasmic space of *E. coli*. This technology can not only evaluate the activity of the displayed protein in living cells, but also readout the stabilization of the protein by binding to its substrate through the function of a scaffold membrane protein. In this study, we attempted to use this technology to evolve the function of diagnostic enzymes, and challenged the establishment of a novel evolutionary engineering platform.

研究分野：進化分子工学

キーワード：進化分子工学 合成生物学 酵素工学 膜タンパク質 ペリプラズム空間

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の進化分子工学は、遺伝子レベルでの多様化とその機能選抜を繰り返すことで、新規なタンパク質機能を創出する技術である。これまで、その殆どにおいて生細胞を利用して機能選抜が行われてきた。細胞は遺伝子のタンパク質への翻訳と立体構造形成を保証するのみならず、選抜された遺伝子の安定な増幅を約束する堅牢な「進化容器」である。実際、大腸菌や酵母などの生細胞を宿主とした進化工学技術によって、受容体機能や酵素触媒機能、生合成経路など、様々な分子機能が創出可能となった。

一方で、生細胞には、進化容器としての不都合な点も指摘されており：(1) 細胞膜によって水溶性・イオン性の分子(分配係数 $\text{LogP} < 3$) が内部へ送達できない、(2) 宿主の代謝ネットワークやホメオスタシス機構とのコンフリクトにより機能選抜が困難、(3) 宿主の構成要素を分解するプロテアーゼや制限酵素などのタンパク質が毒性を示してしまう、(4) 細胞内部が還元的に保たれているためジスルフィド結合形成が困難、といった問題が挙げられる。これらの問題から、無細胞系を利用した進化工学技術も検討されているが、選抜した遺伝子の増幅サイクルやリボソーム内への基質の送達など生細胞以上の問題を抱えているため、まだ実用的ではない(Arnold, Angew Chem Int Ed., 58, 14420 (2019))。

グラム陰性菌には、ペリプラズムと呼ばれる外膜と内膜に囲まれた細胞表層構造がある。ペリプラズムは細胞膜によって細胞内部の代謝ネットワークやホメオスタシス機構からは隔離されている。一方で、細胞外膜には多数のポーリンが存在し、600Da 以下の小分子は自由に行き来するため、限りなく外環境に近い。そこで働くタンパク質は内在システムによって細胞内部から送られてくるため、細胞の進化容器としての恩恵を受けることができる。そのため、ペリプラズムは充電器のついた無細胞系と見立てることができ、上記の問題点を解決できる可能性を秘めている。しかしながら、これまでペリプラズムを利用した進化工学はスクリーニング系やセレクション系が確立されている一部のタンパク質にしか適応できておらず、ペリプラズム空間の利点を生かしきれていない。そのため、より汎用性高く様々なタンパク質に利用でき、ペリプラズム空間を使い倒すための新規な進化工学プラットフォームが求められている。

2. 研究の目的

筆者は、膜タンパク質である Tetracycline(Tc)耐性に寄与する輸送タンパク質 TetA を介して、任意のタンパク質をペリプラズム空間に提示する技術を開発した(図1)。この技術では、ペリプラズム空間において提示した酵素の活性を解析することができる。さらに、タンパク質が小分子(基質など)との結合の強さに応じて安定化する原理に基づいて(Kohn & Plaxico, PNAS, 102, 10841 (2005); Kimura, ACS Syn. Biol. 9, 567 (2020))、ペリプラズム空間でのタンパク質と基質との結合挙動を TetA 機能によって読み出せるのみならず、細胞質側に挿入された第3のタンパク質機能としても読み出すことが可能である。本研究では、このペリプラズム Display 技術を酵素の進化工学プラットフォームとして確立し、細胞内において難発現性の診断酵素の機能進化に挑戦する。

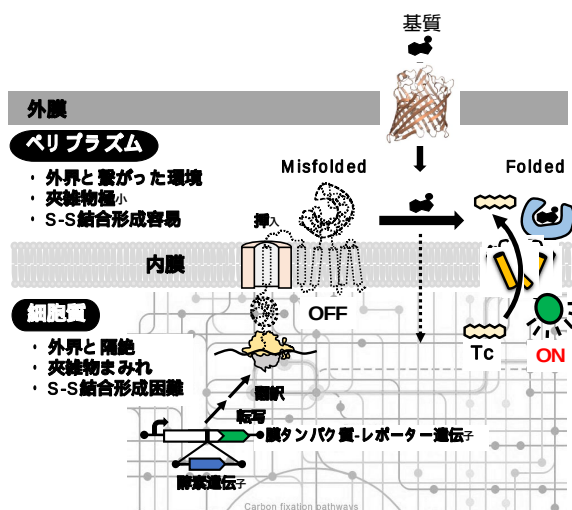


図1 ペリプラズムDisplay技術

3. 研究の方法

(1) **ペリプラズムでの酵素活性を指標とした機能進化**: TetA の細胞外ループに大腸菌由来 PhoA を挿入しペリプラズムに提示した。提示した PhoA が活性を示すことを比色基質 5-Bromo-4-Chloro-3-indryl-phosphate (BCIP) および蛍光基質 4-Methylumbelliferyl-phosphate (4-MUP) を用いて確認した。phoA 遺伝子を、error prone PCR 法および site saturation mutagenesis 法により多様化し、tetA 遺伝子の細胞外ループ部位にあたる箇所へ挿入し、キメラ遺伝子ライブラリを作成した。このライブラリから、活性向上変異体および夾雑イオン耐性向上変異体を探索した。

(2) **足場である TetA 機能による提示酵素の挙動解析**: TetA と PhoA を繋ぐリンカー部分のアミノ酸配列をランダム化し、PhoA 基質の存在に依存して TetA が活性を示すようなリンカー変異体を取得した。この TetA-PhoA リンカー変異体において PhoA の複数の基質へ応答性および PhoA への変異導入の影響を調査した。

4. 研究成果

1-1. 診断酵素アルカリホスファターゼのペリプラズム Display

大腸菌のアルカリホスファターゼ PhoA は、 Mg^{2+} と Zn^{2+} を補因子とし、ジスルフィド (S-S) 結合を 2 つ持つペリプラズム局在性の金属タンパク質である。ウェスタン解析などの診断酵素としても使われており、安定性や酵素活性の改良の需要が見込まれる。この PhoA はペリプラズム輸送シグナル配列を除去し、細胞内で発現させると S-S 結合が形成できず失活する細胞内での難発現酵素でもある。もともとペリプラズムタンパク質であるが、TetA を介してペリプラズムへと提示する様式でも活性解析が可能か調査を行った。

ペリプラズム輸送シグナルを除去した PhoA を GS リンカーとともに、TetA の 6 つある細胞外ループのうち、基質結合サイトに近い 1 番ループと 4 番ループを除いた 4 箇所の細胞外ループに挿入し、BCIP を用いて PhoA のホスファターゼ活性を解析した。各 TetA-PhoA を発現する大腸菌を植菌した培地に BCIP を添加して培養したところ、2 番目、3 番目、6 番目の細胞外ループに PhoA を挿入した TetA-PhoA を発現する大腸菌の培養液が青色に着色し PhoA 活性を示すことが確認できた。さらに、4MUP を用いて速度論解析を行なった。各 TetA-PhoA を発現する大腸菌培養液をそのまま、4MUP を含む反応液に添加し、5 分ごとに蛍光を観察したところ、2 番目、3 番目、6 番目の細胞外ループに PhoA を挿入した TetA-PhoA を発現する大腸菌において、時間経過に伴う蛍光強度の増加が観察された。特に、6 番目のループに PhoA を挿入した TetA-PhoA がもっとも高いホスファターゼ活性を示した。

これらの結果から、ペリプラズム Display 技術を利用することで、PhoA の活性を解析可能であり、さらに煩雑な精製工程を経ずとも非破砕のまま酵素活性の速度論的解析が可能なハイスループットな系であることが示された。

1-2. ペリプラズムに提示した PhoA の機能進化

ペリプラズムに提示した PhoA の機能進化が可能か検証した。PhoA 遺伝子の全域に error prone PCR 法によりランダム変異を導入することで多様化し、それを PhoA 活性が適度に低下する TetA の 3 番目の細胞外ループに当たる位置に挿入したキメラ遺伝子ライブラリを作成した。これを、大腸菌に導入し、BCIP 添加プレート上にまき、形成されたコロニーの着色具合から高い PhoA 活性を示す変異体を発現する大腸菌コロニーをハイスループットに分別し、3 つの変異体を選抜した (図 3 A)。選抜した変異体について、BCIP を利用してそれらの PhoA 活性を生細胞のまま比較したところ、どれも野生型 TetA-PhoA よりも培養液が青色に着色し、高い PhoA 活性を示す変異体であることが確認できた (図 3 B)。さらに、4MUP を利用して、速度論的解析によりそれぞれの酵素活性を解析したところ、もっとも PhoA 活性が高いものは野生型に対して約 1.6 倍の活性を示した (図 3 C)。これらの結果から、ペリプラズムへと提示する様式においても、酵素活性を指標とした進化工学によるタンパク質の機能改良が可能であることが実証できた。

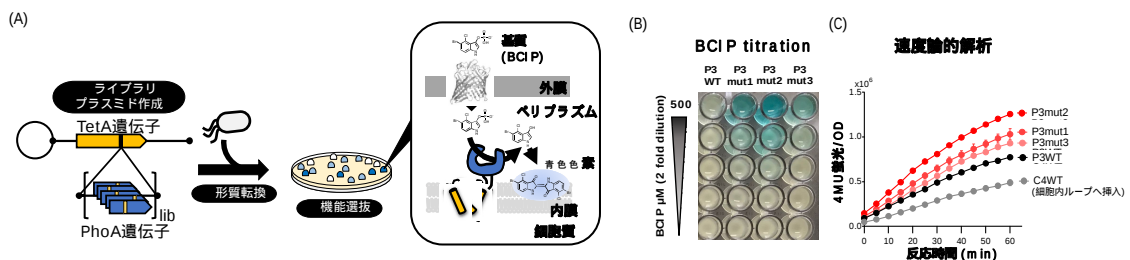


図2 ペリプラズムDisplayでのPhoAの活性進化

1-3. ペリプラズムに提示した PhoA の夾雑イオン耐性の強化

大腸菌 PhoA は Co イオンなどの夾雑イオン存在下では、その酵素が阻害されることが知られている。そこで、ペリプラズム Display 技術を利用して、夾雑イオン存在下でも機能発現可能な PhoA 変異体の創出を試みた。phoA 遺伝子の全域に error prone PCR 法によりランダム変異を導入することで多様化し、それを高い PhoA 活性を示す TetA の 6 番目の細胞外ループに当たる位置に挿入したキメラ遺伝子ライブラリを作成した。これを、大腸菌に導入し、BCIP と $CoCl_2$ 添加プレート上にまき、形成されたコロニーの着色具合から $CoCl_2$ 存在下でも高い PhoA 活性を示す変異体を発現する大腸菌コロニーをハイスループットに分別し、3 つの変異体を選抜した。4MUP を用いて選抜した変異体の PhoA 活性を比較したところ、野生型 TetA-PhoA では、 $CoCl_2$ 存在下では Pho 活性が低下したが、取得した変異体達は活性の低下が見られず、Co 耐性変異体であることが確認できた。これにより、ペリプラズム空間を利用し、細胞が死なないが酵素活性が阻害される夾雑イオン濃度での進化工学を実施することで、酵素の夾雑イオン耐性を向上させるといった機能改良が可能であることが実証できた。

現在、Co イオン以外の夾雑イオンやキレート剤に対する耐性を付与するための機能改良も行っており、今後も継続して酵素活性改良を行なって行く予定である。また、PhoA 以外の診断酵素でもペリプラズムへ提示する様式で機能改良を行えるか検証も進めていく予定である。

2-1. PhoA 基質に依存して TetA 活性を示す TetA-PhoA リンカー変異体の取得

提示酵素の安定性や基質との結合による安定化度合いを足場である TetA の薬剤排出機能によって読み出すことができれば、提示酵素の安定性や基質特異性の改良が可能となり、比色基質が無いような酵素の改良にも利用できるプラットフォームになると期待できる。そこで、PhoA と TetA の繋ぎ目にあたるリンカー部分のアミノ酸配列を調整し、PhoA の基質に依存して TetA 機能を示すリンカー変異体の探索を行なった。PhoA の N 末端と C 末端に負荷したリンカー部分のそれぞれ 3 アミノ酸をランダム化したキメラ遺伝子ライブラリを大腸菌に導入し、BCIP と Tc を含んだ培地に塗布し、PhoA 活性と TetA 活性の両方を示す大腸菌コロニーを選抜した。選抜したリンカー変異体の中で、PhoA 基質に対してその濃度依存的に TetA 活性を示すリンカー変異体を 4 つ取得することができた(図 3)。これは、ペリプラズム空間で起こる PhoA と基質の結合による安定化がリンカーを通して TetA に伝達し、それにより TetA が安定化し機能発現したことに他ならない。

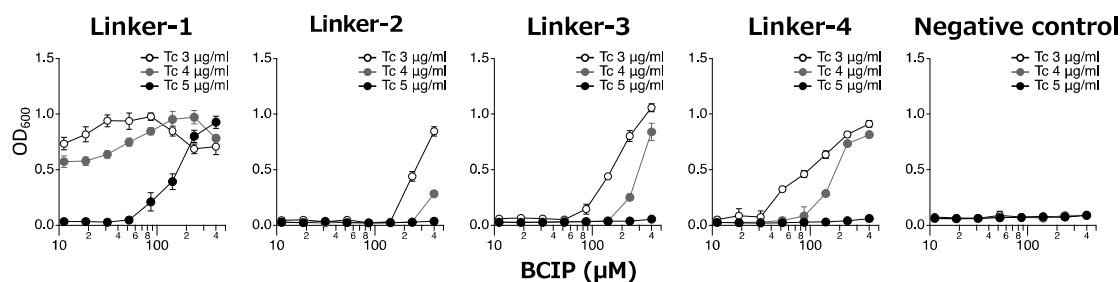


図3 TetA-PhoAリンカー変異体の基質応答性解析

2-2. TetA 活性を指標とした PhoA の各基質に対する親和性の解析

PhoA は多くのリン酸化物を基質として脱リン酸化する非特異的なアルカリホスファターゼであるが、各基質に対する親和性は異なるはずである。そこで、その PhoA の各基質に対する親和性の違いを TetA 機能として読み出すことが可能か検証した。Linker-1 変異体について、BCIP と p-nitrophenylphosphate (pNPP)、Pyridoxal phosphate (PLP) に対する TetA 活性の用量応答性を調査した。その結果、それぞれの基質に対して、用量応答性が観察できる Tc 濃度が異なっており、BCIP に対しては 10 μg/ml の Tc 濃度まで TetA 活性が見られたが、pNPP は 5 μg/ml の Tc 濃度のみ TetA 活性が見られ、一方で PLP に対してはどの Tc 濃度でも TetA 活性が見られなかった。これらの結果は、TetA を介してペリプラズムへと提示された PhoA の各基質に対する親和性の違いを反映しており、このペリプラズム Display の様式では BCIP がもっとも強く PhoA と結合することということを示唆している。

2-3. TetA 活性を指標とした PhoA への変異導入の影響の調査

さらに、提示酵素への変異導入の影響を TetA 機能として読み出せるかについて調査した。PhoA の活性部位に存在し、金属結合に関与する D153 および基質結合に関与する R166 について、既知の変異(それぞれ D153A, D153G, R166S)を単独導入した TetA-PhoA 変異体を作成し、その BCIP に対する TetA 機能の用量応答性を調査した。その結果、活性向上変異である D153G (Dealwis et. al., Biochemistry, 34, 43, 13967, (1995)) の導入によって、野生型 PhoA よりも、低濃度 BCIP で応答が見え、さらに野生型よりも基底レベルの TetA 活性が高くなっていった(図 7)。これは D153G 変異が、安定化と基質に対する親和性の両方が向上するような変異であることを示唆している。また、同じく活性向上変異である D153A (Matlin et. al., Biochemistry 31, 8196, (1992)) を導入した変異体も D153G 変異体よりはるその効果が小さいが、野生型よりも低濃度 BCIP で応答が見え、基底レベルの TetA 活性がわずかに高くなっており、安定化と基質に対する親和性の向上が見られる変異体であることが示唆された。一方で、基質に対する親和性が低下する R166S 変異 (Sunden et al., elife, 4:e06181, (2015)) を導入した変異体では、TetA 活性は示したものの、野生型よりも高濃度の BCIP へ応答し、BCIP に対する親和性が低下している変異であることが示唆された。これらの結果から、提示した酵素への変異導入の影響を足場である TetA の機能活性を指標に読み出せることが実証された。

以上から、ペリプラズム Display を利用した酵素の新規進化工学プラットフォームが完成したと判断した。現在、これを利用して PhoA の基質特異性改変および安定性改良を行なっている。一方で、本技術は、酵素を挿入するという形で膜タンパク質融合しているため、提示可能な酵素は N 末端と C 末端の位置が二次平面上にできる限り揃っている必要がある。そのため、このプラットフォームを利用できる酵素には制限がある。また、NADH などの補酵素必要とする酵素についても利用が難しいという問題点がある。そのため今後は、現段階で本技術を適応可能な酵素について機能改良を実施するとともに、プラットフォームやペリプラズム空間自体を機能拡張し、さまざまな酵素に対応可能な技術へと深化させていく予定である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1．発表者名 関 貴洋，田中琴葉，木村友紀，梅野 太輔
2．発表標題 ペリプラズムDisplayシステムを利用した環境異依存性酵素の実験室進化
3．学会等名 第75回 日本生物工学会大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 関 貴洋，田中 琴葉，矢内 祐希，梅野 太輔
2．発表標題 膜貫通型シグナル伝達系のゼロベース設計
3．学会等名 日本遺伝学会 第95回大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 関貴洋，梅野太輔
2．発表標題 酵素の金属補酵素選択性の実験室内進化
3．学会等名 日本遺伝学会 第94回大会
4．発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞外化学環境の細胞内伝達機構を有する細胞及び該細胞の用途	発明者 梅野太輔，関貴洋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-10382	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------