

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05163

研究課題名(和文) 進化分子工学の可能性を無限大にするコドンのランダム置換・InDel法の開発

研究課題名(英文) Development of a codon-based mutagenesis method enabling deletion, substitution, and insertion of codons

研究代表者

岡野 憲司 (Okano, Kenji)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：40623335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 酵素遺伝子に突然変異を導入し、高機能変異体を選抜する進化分子工学は、酵素の機能改善のための強力な手法である。本研究では変異のパラエティの拡充を目指し、目的遺伝子の標的コドンに対して、コドンの欠失・置換・挿入が可能な手法の開発を行った。

まず、目的遺伝子を挿入したプラスミドを鋳型に、標的コドンの両末端にアダプター配列が付加するようインバースPCRを行った。アダプター配列は3種のType IIS制限酵素の認識配列を含み、使用する制限酵素の使い分けとセルフライゲーションにより、コドンの欠失・置換・挿入に成功した。また、本法を標的遺伝子の全コドンに適用し、変異酵素ライブラリーの作成にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ市場はかつてない活況を呈しており、酵素や多数の酵素が協奏的に働く微生物細胞による物質生産も多分に漏れず、各国が技術開発に鎔を削っている。望みの機能を有する酵素の開発は、未だランダム変異に頼るところが大きいものの、エラーブローンPCRに代表される既往の変異導入法は「変異体のパラエティ」と「発生頻度の均一性」に乏しい。したがって、変異体の解析数とラウンド数は自ずと増加し、多大な時間を有する。一方、本研究で開発した作成した変異酵素群は変異のパラエティに富み、同一の変異を含む確率は従来法より低い。従って、高機能な変異体を短時間で取得できるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)： Directed evolution of enzyme, which is based on introduction of mutation and following selection of functional mutant enzyme, is a powerful technique for improving the function of enzyme. To expand the variety of mutant, in this study, I developed a mutagenesis method allowing deletion, substitution, and insertion of codons for the target codon of the target gene.

Specifically, inverse PCR was performed using a plasmid containing the target gene as a template, and adapter sequences were added to both termini of the target codon. The adapter sequence contains recognition sequences for three types of Type IIS restriction enzymes. By using different types of restriction enzymes and following self-ligation, deletion, substitution, and insertion of codons into target site were successfully achieved. The method was also successfully applied to all codons of the target gene to create a mutant enzyme library.

研究分野：生物化学工学

キーワード：進化分子工学 コドン 置換 欠失 挿入

1. 研究開始当初の背景

所望の機能を有した酵素を、自由自在に設計・合成する技術の開発は生物工学者の大志の一つである。近年の計算科学的なシミュレーション技術の発展に伴い、立体構造が既知のタンパク質に対しては合理的な機能改変が可能となりつつあるが、構造未知のタンパク質に対しては、その方法論の開発が立ち遅れている。一方、DNA に突然変異を誘発し、高機能変異体を選抜する「進化分子工学」は、設計指針の有無によらずタンパク質を高機能化できる強力な手法である。変異と選択というダーウィン進化を模倣・加速する本手法は、今や産業酵素の創出の常套手段の一つとなっている。

進化分子工学的手法によって高機能な変異体を効率的に取得するためには、「変異体のバラエティ」と「発生頻度の均一性」が重要となる。つまり、1つのアミノ酸を19種のアミノ酸に等確率で変化させる技術の開発が重要である。また、近年ではアミノ酸の挿入・欠失(InDel)により、反応特異性の劇的な変化が見られたという報告もあり【Biochemistry (2012) 51:6047】、InDel変異技術への需要も高い。しかしながら、既往のエラープローン PCR に代表される1塩基置換に基づく突然変異導入方法では、1つのアミノ酸は平均して5~6程度のアミノ酸にしか変化しない。また、コドンバイアスにより各々のアミノ酸変異の取得率にも偏りが生じる。変異導入の原理上、InDel変異体が得られることはなく、限定された配列空間の探索にとどまる。

2. 研究の目的

上述のような変異導入法の制約から解放され、進化分子工学の可能性を無限大にするためには、標的DNAに対してアミノ酸を規定する「コドン単位」で「置換・InDel変異」を導入する技術が必要ではないか？という考えのもと、本研究ではこれらの要望を満たす新規変異導入技術の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) プラスミドのランダム開環に基づく変異導入法の開発

研究開発当初はプラスミドのランダム開環に基づく変異導入法の開発を行った。具体的には変異導入の標的となる遺伝子をプラスミドに挿入し、これをプラスミド上の様々な位置でランダム開環し、生じた直鎖上DNAの両末端にDNAアダプターの付加を行う。このアダプターは認識配列の外側を切断するTypeIIS制限酵素の認識配列を有し、切断する酵素の種類によってアダプターを異なる位置で切り離すことができる。その結果、コドンの付加・置換・欠失がなされ、セルフライゲーションすることで、コドンが付加・置換・欠失した遺伝子を取得することができる。本プロセスにおいて鍵となる工程は環状DNAのランダム開環であるが、本工程にはNEBより販売されているdsDNA fragmentaseを使用した。本酵素はDNAの断片化酵素であり、2種の酵素のカクテルとなっている。一番目の酵素は、DNA二本鎖の片側にランダムでニックを挿入する酵素であり、二番目の酵素はニックを認識し、その相補鎖を切断する。本研究では、本酵素を低濃度で使用すれば、環状DNAを一箇所でのみ切断し、ランダム開環に利用できるのではないかと、この過程のもと、その検証を行った。

(2) インバースPCRに基づく変異導入法の開発

研究過程で上記変異導入方法に問題点が見いだされたため、インバースPCRを利用した新たな変異導入方法を考案した。上記手法と同じくまず変異導入の標的となる遺伝子をプラスミドに挿入する。標的遺伝子としては、大腸菌の抗生物質耐性で酵素の機能評価が可能なchloramphenicol acetyltransferase 遺伝子(*cat*)を用いた。図1には*cat*の二番目のコドンであるACCコドンに対する変異導入を例に、本変異導入方法の概要を示す。まず、標的コドンの上流および下流にアニーリングするプライマー対によってインバースPCRを行う。この際、プライマーの5'側にアダプター配列を付加することで、DNAの両端にアダプター配列が付加された線状DNAを作成できる。このアダプター配列内には認識配列の外側を切断する3種類のTypeIIS制限酵素の認識配列とランダムコドン導入のためのNNS配列(S=G or C)が含まれており、使用する酵素の種類によって異なる位置でアダプター配列を除去することができる。例えば、コドンの欠失を行いたい場合、*BpuEI*という制限酵素で処理することで、認識配列であるCTTGAGから16塩基先とその相補鎖の14塩基先で切断が行われる。これによって、多機能アダプター配列が除去され、図1左下のような線状プラスミドを得ることができる。その後、セルフライゲーションを行うことでACCコドンが欠失したプラスミドを得ることができる。コドンの置換を行いたい場合は*MlyI*、コドンの挿入を行いたい場合は*BceAI*という制限酵素を用いて処理することで、図1の下部に示すような線状プラスミドを得ることができ、セルフライゲーションによって、置換変異体や挿入変異体を得ることができる。

以上のような手法を*cat*の全216コドンに対して適用することで、欠失・置換・挿入変異体を網羅的に取得できると期待できる。

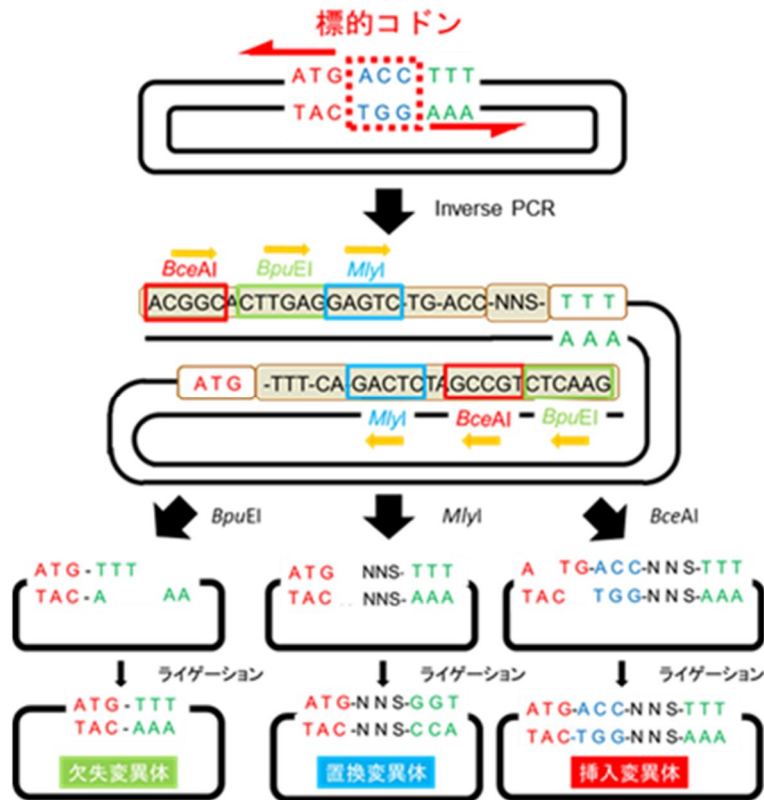


図1 新規分子進化法の概要

4. 研究成果

(1) プラスミドのランダム開環に基づく変異導入法の開発

環状のプラスミドを大腸菌から抽出した際は、スーパーコイルまたはオープンサーキュラーの構造を有するため、電気泳動をした際にプラスミド本来のサイズよりは小さい位置と大きい位置にバンドが得られる。一方で、線状になることで、本来のサイズの位置にバンドが生じる。従って、環状プラスミドにランダム開環技術を適用した際に、プラスミドが一箇所だけで切断された場合、スーパーコイルやオープンサーキュラー構造のバンド位置が線状プラスミドの位置にシフトする。この現象を利用して、dsDNA fragmentase によるプラスミドのランダム開環を評価した。残念ながら、低濃度の dsDNA fragmentase では線状プラスミドがほとんど得られず、逆にスーパーコイルやオープンサーキュラー状のプラスミドが消失する濃度で酵素処理を行った場合は、線状プラスミドを得られるものの同時に過分解したプラスミドが生じることがわかった。その結果、コドン単位での変異導入ができないことが示され、本手法の利用を断念した。

(2) -1 インバース PCR に基づく変異導入法の開発 (6 コドンへの適用)

そこでインバース PCR に基づく変異導入法の開発へと研究をシフトさせ、本手法に基づいて変異導入を行った。まずは、本変異導入方法が実際に機能することを確認するため、*cat* 中の 32, 62, 93, 124, 155, 186 番目の 6 つのコドンに対して、置換、欠失、挿入変異を導入した。本手法によって変異導入を行った場合、欠失の場合は標的コドンが欠失し、置換の場合は標的コドンがランダムコドンである NNS に置換され、挿入の場合は標的コドンの 3' 側にランダムコドンである NNS が挿入される (図 1)。実際に変異導入を試み、得られたコロニーに対して、欠失の場合は各 2 コロニーずつ、置換、挿入の場合は各 4 コロニーずつシーケンス解析を行った。欠失の場合は、186 番目のコドンの欠失を試みた 2 コロニーの内、1 コロニーにおいては、標的コドンの欠失が行われず、鋳型プラスミドを保持した菌体を得られた。その他のコロニーに関しては目的通りの標的コドンの欠失が行われていることを確認できた (図 2)。置換の場合は、124 番目のコドンに置換を試みたサンプルの変異体 15 において、forward primer に付加されている多機能アダプター配列の挿入が見られた。155 番目のコドンに置換を試みたサンプルの変異体 18 において、多数の箇所での塩基の欠失が見られた。サンプルの変異体 12, 19, 21, 24 においては、1 から 6 塩基の欠失が見られた。その他のサンプルに関しては、目的通りランダムコドンへの置換が確認できた (図 3)。挿入の場合は、62 番目のコドンに挿入を試みたサンプルの変異体 5 において、一塩基欠失が見られた。その他のサンプルに関しては、目的通りランダムコドンの挿入が確認できた (図 4)。以上の結果から、75% 以上の確立で目的の部位に目的の変異を導入できることが判明した。

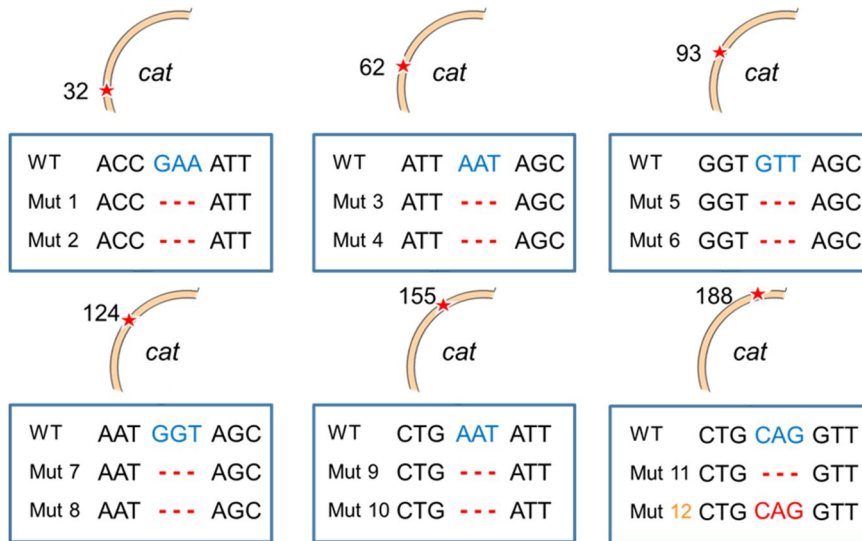


図2 欠失変異の導入結果

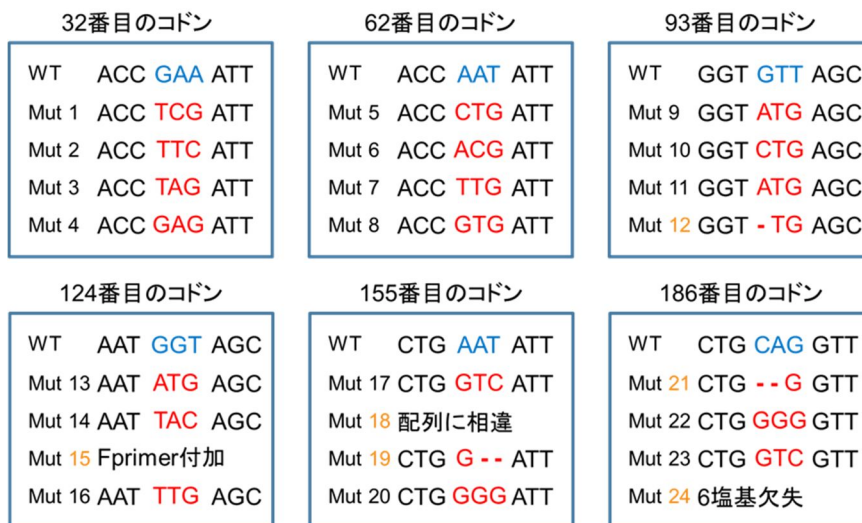


図3 置換変異の導入結果



図4 挿入変異の導入結果

(2) -2 インバース PCR に基づく変異導入法の開発 (*cat* 全 216 コドンへの適用)

続いて本手法を *cat* の全 216 コドンに対して適用し、欠失変異の導入を行った。96 well プレートにプライマーを除く PCR マスターミックスを分注し、その後 216 コドンそれぞれに対応するプライマー対を加え、インバース PCR を行った結果を図 5 に示す。185, 211, 212, 213 番目のコドンに欠失変異導入を試みたサンプルに関しては、電気泳動で目的の長さ(1822 bp)のバンドを確認することはできなかったが、その他のコドンに対しては目的サイズのバンドが確認できた。

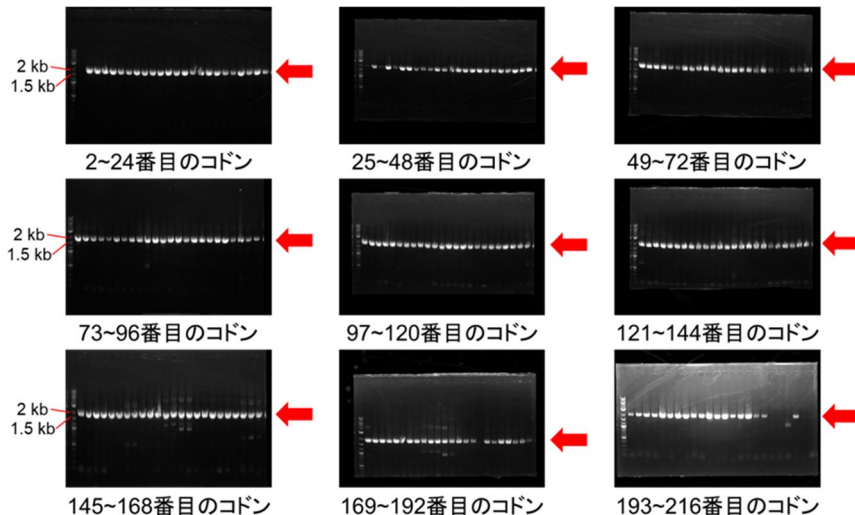


図 5 216 コドンを対象にインバース PCR を行った結果

得られた PCR 産物を *Bpu*EI で処理し、セルフライゲーションを行った後、大腸菌 TG1 の形質転換を行った。なお、形質転換は 96 well プレートに寒天培地を作成することで、プレートの各 well 中で各形質転換体のコロニー形成を起こさせた。その結果、PCR でバンドが確認できたサンプルに関しては、全てコロニー形成を確認できた。また、今回取得した欠失変異体ライブラリーにおいて目的の変異体が得られているかどうかについて検証するため、得られた形質転換体の中から 12 コドンを選別し、各 2 コロニーずつシーケンス解析を行った (図 6)。195 番目のコドンに欠失を試みたサンプルの変異体 6 において、9 塩基欠失が見られた。また、210 番目のコドンに欠失を試みたサンプルの変異体 21 において、他の箇所(203 番目のコドン)におけるコドンの欠失が見られた。その他の変異体に関しては、目的通りの欠失変異の導入を確認できた。

<p>193番目のコドン</p> <p>WT TTG GAT GGT</p> <p>Mut 1 TTG --- GGT</p> <p>Mut 2 TTG --- GGT</p>	<p>194番目のコドン</p> <p>WT GAT GGT TAT</p> <p>Mut 3 GAT --- TAT</p> <p>Mut 4 GAT --- TAT</p>	<p>195番目のコドン</p> <p>WT GGT TAT CAT</p> <p>Mut 5 GGT --- CAT</p> <p>Mut 6 9塩基欠失</p>
<p>199番目のコドン</p> <p>WT GGT CTG TTT</p> <p>Mut 7 GGT --- TTT</p> <p>Mut 8 GGT --- TTT</p>	<p>201番目のコドン</p> <p>WT TTT ATG AAT</p> <p>Mut 9 TTT --- AAT</p> <p>Mut 10 TTT --- AAT</p>	<p>202番目のコドン</p> <p>WT ATG AAT AGC</p> <p>Mut 11 ATG --- AGC</p> <p>Mut 12 ATG --- AGC</p>
<p>203番目のコドン</p> <p>WT AAT AGC ATT</p> <p>Mut 13 AAT --- ATT</p> <p>Mut 14 AAT --- ATT</p>	<p>204番目のコドン</p> <p>WT AGC ATT CAA</p> <p>Mut 15 AGC --- CAA</p> <p>Mut 16 AGC --- CAA</p>	<p>205番目のコドン</p> <p>WT ATT CAA GAA</p> <p>Mut 17 ATT --- GAA</p> <p>Mut 18 ATT --- GAA</p>
<p>208番目のコドン</p> <p>WT TTA AGC GAT</p> <p>Mut 19 TTA --- GAT</p> <p>Mut 20 TTA --- GAT</p>	<p>210番目のコドン</p> <p>WT GAT CGT CCG</p> <p>Mut 21 203番目が欠失</p> <p>Mut 22 GAT --- CCG</p>	<p>214番目のコドン</p> <p>WT GAT TGG CTG</p> <p>Mut 23 GAT --- CTG</p> <p>Mut 24 GAT --- CTG</p>

図 6 形質転換体の変異解析結果

今後は、本手法を用いて置換変異体や挿入変異体を作成し、次世代シーケンス解析に供し、コドン置換や挿入の均一性の確認を行う。さらに、変異体群から *cat* 活性や耐熱性が向上した変異体をスクリーニングする。得られたデータを総合的に解析することで、置換変異体に比して欠失変異体や挿入変異体でどの程度活性向上が見られるかを評価し、本手法の有効性を示していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenji Okano, Yu Sato, Tatsuya Hizume, Kohsuke Honda	4. 巻 132
2. 論文標題 Genome editing by miniature CRISPR/Cas12f1 enzyme in Escherichia coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 120-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Okano, Qianqin Zhu, Kohsuke Honda	4. 巻 129
2. 論文標題 In vitro reconstitution of non-phosphorylative EntnerDoudoroff pathway for lactate production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 269-275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴廣太郎、岡野憲司、本田孝祐
2. 発表標題 コドンの欠失・置換・挿入を可能にする新規分子進化方法の開発
3. 学会等名 酵素工学研究会 第87回講演会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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