

遺伝子協働機能の実験進化学

研究代表者 梅野 太輔
(先進理工・応用化学専攻 教授)

1. 研究課題

実験進化学 (Experimental Evolution) とは、系統学や古生物学的な「現存するものから過去を類推する」のではなく、実験室内で実際に起こしてみることによって、現在の生命分子の起源、機能的可塑性、そして今見る生物の来し方について考察する新興の学問である。実際、進化分子工学 (2018年ノーベル化学賞) の技術革新と普及は、単に産業界に有用な酵素・タンパク質を多数提供するだけにとどまらず、タンパク質や核酸の分子機能がどのように生まれ、どう進化するかについて、多くの知見を与えてきた。

本研究PJでは、分子よりもう一段上の階層、すなわち、生合成経路、制御ネットワーク、物質輸送経路、光合成・電子伝達系など、複数の生体高分子の集合・協働によって生まれる「デバイス機能」の創発と進化の原理探究を目指し、複数の遺伝子の集積体 (遺伝子クラスタ、あるいはオペロン) の実験室内進化を目指す。

3年間のプロジェクト期間は有限である。ゆえに、興味を以下4つのサブジェクトに絞り、それぞれについての独自方式の実験室内進化実験を行う。そこで観察したことを整理・再構成し、以下4つの疑問について、何らかの学術的貢献を得たいと考えている。

1. 自然界にみられない新規分子の生合成経路はどう生まれ、どう特異性を獲得するのだろうか。いわば生合成の多様化と分化は、どのようなトラジェクトリーをもって実現するのだろうか。
2. 生合成機能が強制的にある宿主に移植されるとき、細胞宿主の代謝ネットワークは大きな摂動を受けることになる。とくにその入植者が最大のリソース享受を主張しなければならないとき、すでに存在するバイオ生産経路とどのように「融和的」環境を達成できるのだろうか。そして細胞の持つ生理ネットワークは、どのように、この新しい「入植者」を受け入れ、その存在と折り合ってゆくのだろうか。
3. 生物 (細胞) は、細胞内外の様々な情報・状態を感知し、それらを統合し、そして正しく出力変換する。これを担う「情報処理能力」はいかにして生まれ得るのだろうか。酵素や生合成経路への自律的な自己調節機能の普遍的な「埋め込み形式」があるとすれば、それはどんな形式なのだろうか。
4. 細胞の自己と環境を隔て、そして繋いでいるのは、細胞膜である。この内外を結ぶ鉄火場としての細胞膜は、外界と内界の物流と情報フローを一手に担う。おの「内と外」の情報と物質の流れを仲介する分子機能は、どのようにして生まれ得るのだろうか？

本PJが問うのは、現在みる地球生命の「来し方」ではなく、複雑な分子協働機能の最も歩留まりよい「生まれ方」である。分子協働は、それ自身が多体問題であるところの生体高分子の「共進化」の所産であり、合理的設計はなおのこと不可能である。進化デザイン技術は、それぞれの分子システム機能の設計原理に組み込まれるべきものであり、次世代の生物学（合成生物学）の高度化にも資する重要な基礎学問である。本研究では、代表者らが培ってきたさまざまな多様性創出技術（遺伝子の多様性工学）と、同じく培ってきた様々なスクリーニング・選抜技術を総動員し、この「分子協働機能」の創発と発展のメカニズムを明らかにすることを目的としている。

2. 主な研究成果

2.1 酵素と酸化酵素の機能発散

自然界の酵素には、それと類似した配列が無数にデータベース空間に存在し、それらは進化的に近縁である。そしてそれらの多くは類似しているが異なる機能を持つ。これらはどのようにして機能を多様化したのだろうか。そしてさらに興味深いのは、しばしば、これら近縁酵素間に、機能の完全なる直交性がみられることである。これらはどのような淘汰のもと、どれほどの進化的コスト（世代数 $\times$ 世代あたりの試行数：あるいは、単純に、機能発散・分化に必要なアミノ酸置換数）を払えば、実現するのだろうか。

本研究では、さまざまな反応を担う酵素に対して、遺伝子変異を多世代にわたって超高速に蓄積し、生合成酵素の反応特異性の浮動を観察することにした。プロジェクト初年度である本年度は、このような実験を可能にするために、①多世代にわたる進化工学が楽に実施できるよう、作業への負担の少ない遺伝子の多様化技術の開発を目指した。また、②活性の低い変異体を淘汰しながら、より高い活性をもつ変異体を濃縮する「スクリーニング技術」の開発を、種類の異なるさまざまな酵素に対して行った。2022年現在、アセチル転移酵素、リン酸の脱離酵素、メチル転移酵素の活性のスクリーニング系が完成しており、酸化酵素については、ほぼほぼ、起こしたい現象までは抑えることができた。概ね順調と判断している。来年度は、実際に多世代進化を開始し、新規活性がどう生まれるか、新規活性がどう特異性を得るか、実験室内でいよいよ観察実験を開始する。

2.2 テルペン酵素と前駆体経路の共進化

これまでに我々は、タイヤ原料などに使われるイソプレンの合成酵素（IspS）を標的とし、その活性の進化実験を行ってきた。わずか2ラウンドで「超」活性と言えるものまで達成した；これらの変異体は、むしろ活性がつよすぎて、その発現に大腸菌が耐えられなくなってしまったのである。この現象を逆手にとり、こんどは、前駆体供給を担う上流経路の進化工学を行ったところ、通常の170倍の活性を持つ前駆体経路を得ることができた。本年度は、この上流経路をそれ以上強いものに改良（進化）させるため、さまざまなライブラリを試作したが、さらに高効率な上流経路がどうしても得られなかった。もろもろ調査したところ、特に優れたものほど、強いカウンター選択を受けやすいことが明らかになった。上流経路も下流経路も、ともに単独発現では宿主増殖をゆるさないほど馬力が高いこと、両者が同時に一つの細胞で共存するときは、その毒性がかなり軽減されることが確認できた。来年度は、クローニングプロセスから機能スクリーニング、さらにはイソペン製造に至るまで、この上・下流酵素どうしに、互いに解毒しあいながら共存・協働することに

よって、高い代謝安定性が保証されることを実証するとともに、互いの解毒活性を利用した上下流のさらなる共進化によって、未踏のフラックスを実現した超高効率イソプレネン合成経路を目指したい。

2.3 酵素活性「制御」の創発原理の探求

最近我々は、遺伝子レベルで融合した2つのタンパク質融合体において、しばしば、一方の基質・リガンド結合イベントが、他方の酵素・タンパク質機能の変化をもたらすことを発見した。これは、一方のリガンド（あるいは基質）との相互作用による構造安定化が、他方のフォールディング効率に正の影響を与えるためである。これは、非常にプリミティブながら、タンパク質機能の外的調節技術となり得るものであり、バイオテクノロジー応用の可能性はもちろんのこと、そもそもタンパク質の高度な制御・被制御ネットワークがどのように生まれてきたのか、その来し方についても、構成的で客観的な情報をたくさんあたえてくれるものと期待される。本年度は、酵素やレセプタ、転写因子から膜タンパク質、機能性ペプチドに至るまで、さまざまなタンパク質をさまざまな方法で融合し、それらの相互制御現象の表出のための条件を探った。まだ、「制御の生まれかた」についての包括的な理解が得られたわけではないが、モチーフや物性にかかわらず、実に多くのペアにおいて、相互の機能調節は現れ得ることが確認できた。そして興味深いことに、ここで創発する相互制御機構は、おそらくはアロステリック調節のようなものではないことが繰り返し示唆された。来年度以降は、得られた「相互作用」方式の詳細な解明をすすめるとともに、このようにして生まれた「制御」方式の性能向上に取り組む予定である。

3. 共同研究者

木野 邦器（総合理工学研究所・所長，応用化学科・教授）

関 貴洋（総合理工学研究所・次席研究員）

木村 友紀（先進理工学部・応用化学科・助教）

4. 研究業績

4.1 学術論文

- 1) A methodology for creating thermostabilized mutants of G-protein coupled receptors by combining statistical thermodynamics and evolutionary molecular engineering : Kanna Sugaya, Satoshi Yasuda, Shingo Sato, Chen Sisi, Taisei Yamamoto, Daisuke Umeno, Tomoaki Matsuura, Tomohiko Hayashi, Satoshi Ogasawara, Masahiro Kinoshita, Takeshi Murata, *Protein Sci.* 31, e4404 (2022).
- 2) Redesigning carotenoid-producing *Escherichia coli* to geranyl pyrophosphate accumulator. Takumi Ojima, Yusuke Otani, Shigeko Kawai-Noma, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno, *Car. Sci.*, *in press* (2022).
- 3) A novel carotenoid biosynthetic route via oxidosqualene.: Yusuke Otani, Takashi Maoka, Kawai-Noma Shigeko, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 599, 75 – 80 (2022).
- 4) Oxidosqualene-based carotenoid pathway for the detection of triterpene cyclase activities: Yusuke Otani, Takumi Ojima, Miho Takemura, Norihiko Misawa, Shigeko,

Kawai-Noma, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno, *Car. Sci.*, in press (2022).

- 5) Off-switching property of quorum sensor LuxR via As(III)-induced aggregation.: Rina Ayuba, Daisuke Umeno, Shigeko Kawai-Noma, *J. Biosci. Bioeng.* **133**, 335-339 (2022).

4.2 総説・著書

該当なし

4.3 招待講演

- 1) 梅野太輔, 「分子システムの進化工学システムの進化」, 生物工学会第9回 SBJ シンポジウム～未来の生物工学のあらたな潮流をつくる～, 2022年5月26日, オンライン
- 2) 梅野太輔, 「超天然天然物経路の進化デザイン」, 極限生物学会シンポジウム, 2022年7月3日, オンライン
- 3) 梅野太輔, 「知覚する分子系の進化デザイン学」, 日本分析化学会若手の会シンポジウム, 2022年7月29日, オンライン
- 4) 梅野太輔, 「進化工学がもたらした, センサ工学と酵素工学の邂逅」, ATI バイオ単分子研究会, 2022年10月6日, オンライン
- 5) 梅野太輔, 木村友紀, 関 貴洋, 「安定性駆動型バイオセンサーの機能的可塑性」, 生物工学会シンポジウム～バイオセンシングの新潮流～, 2022年10月18日, オンライン
- 6) D. Umeno, 「Directed evolution of information processing」, New Horizons in Developmental Biology, 2023年2月6日, 熊本大学医学部
- 7) D. Umeno, 「Directed evolution of biocomputing」, TUM-Waseda Joint Symposium, 2023年3月6日, Straubing, Germany

4.4 受賞・表彰

該当なし

4.5 学会および社会的活動

【国内学会・研究会発表】

- 1) 関貴洋, 梅野太輔, 「酵素の金属補酵素選択性の実験室内進化」, 日本遺伝学会 第94回大会, 2022年9月, 北海道(札幌), 口頭発表
- 2) 栗田 凌, 梅野太輔, 「実験進化学的手法によるモノテルペン合成酵素の特異性発散」, 日本遺伝学会 第94回大会, 2022年9月, 北海道(札幌), 口頭発表
- 3) 塚田美結, 梅野太輔, 「融合パートナーの安定性がもたらす酵素進化能への影響」, 日本遺伝学会 第94回大会, 2022年9月, 北海道(札幌), 口頭発表
- 4) 千野朋希, 梅野太輔, 「ロドプシン機能拡張のための非天然アポカロテノイド生合成 第34回カロテノイド研究談話会」, 2022年9月30日(関西学院大), 口頭発表
- 5) 尾島 匠、河合(野間) 繁子、梅野太輔, 「稀少ポリエン実現のための非対称骨格カロテノイド生合成」, 第34回カロテノイド研究談話会, 2022年9月30日(関西学院大), 口頭発表
- 6) Yuki Kimura, Shinsaku Kanetsuna, Mei Nonoshita, Ryo Kurita, and Daisuke Umeno, 「Enzyme

evolution as biosensor components for forward engineering its catalytic properties」, Symposium on Active Enzyme Molecules, 2022 年 9 月 30 日, (札幌), ポスター発表

- 7) 阿由葉 里奈, 田中 佑樹, 小椋 康光, 梅野 太輔, 河合 繁子; 転写因子 ArsR-LuxR 融合タンパク質のヒ素添加に伴う OFF スイッチ原理の解明
- 8) 塚田美結, 河合 (野間) 繁子, 梅野太輔, 「融合パートナーを介したクロラムフェニコールアセチル転移酵素の活性・進化能調節」, 第 12 回 CSJ 化学フェスタ, 2022 年 10 月 18 日, 東京船堀, ポスター発表
- 9) 松本惇生, 関貴洋, 河合 (野間) 繁子, 梅野太輔, 「GPCR を入力素子とする大腸菌センサーの開発」, 第 12 回 CSJ 化学フェスタ, 2022 年 10 月 18 日, 東京船堀, ポスター発表
- 10) 金網真作, 渡邊太郎, 木村友紀, 梅野太輔, 「基質結合による構造安定化を指標とした非ヘム鉄酸化酵素の進化デザイン」, 第 12 回 CSJ 化学フェスタ, 2022 年 10 月 18 日, 東京船堀, ポスター発表
- 11) 関貴洋, 梅野太輔, 「難進化酵素の改良を可能とするペリプラズム Display」, 2022 年度国立遺伝学研究所研究会「微生物の生理ネットワーク～その解明とリデザイン～」, 2022 年 11 月, 早稲田大学 (オンライン), 口頭発表
- 12) Synthetic Biology for Future Health, 2023 年 3 月 13 日. Wellcome Genome Campus, UK, ポスター発表

【学会・社会的活動】

- 13) ACS Synthetic Biology: Editorial Board
- 14) Journal of General and Applied Microbiology: Editorial Board
- 15) 生物工学会和文誌 編集委員

5. 研究活動の課題と展望

本年度は, 初年度に予定していた 3 つの課題において, 概ね期待どおりの結果が得られたと考える. 来 2023 年度は, それぞれの課題において, 進化ラウンドを多数世代にわたって回し続け, (1) 酵素機能の発散と分化がどのようにおこるか, (2) 宿主毒性のあるものどうしの共進化がどのように堅牢に持続しえるのか, そして (3) タンパク質機能の制御機構がどのように生まれ得るのか, などの疑問に答える多くの知見を得たい.