

遺伝子協働機能の実験進化学

研究代表者 梅野 太輔
(先進理工学部・応用化学専攻 教授)

1. 研究課題

実験進化学 (Experimental Evolution) とは、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、タンパク質協働によるデバイス機能など、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 (遺伝子クラスター、あるいはオペロン) の実験室内進化を目指す。

本研究PJでは、独自方式の実験室内進化実験によって以下4つの疑問に何らかの知見を得ることを目指している。

1. **新しい代謝物の発明の瞬間を【創って理解する】** : 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、どのように実現するのだろうか。
2. **生合成入植の瞬間を【創って理解する】** : 生合成機能が強制的にある宿主に移植される時、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. **情報処理機能と判断を担う瞬間を【創って理解する】** : 生物 (細胞) は、細胞内外の様々な情報・状態を感知し、それらを統合して、正しい決断を行うことによって40億年の生存競争を生き延びてきた。これを担う「情報処理能力」はいかにして生まれ得るのか。酵素や輸送装置、転写因子やシグナル伝達タンパク質など、生物がもつ様々な分子機能に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・環境の関係性構築過程を【創って理解する】** : 細胞の自己と環境を隔てながらも繋いでいるのが、細胞膜である。この内外を結ぶインターフェースとして位置付

けられる細胞膜は、外界と内界の物流と情報伝達を一手に担う。この「内と外」を仲介する情報と物流の共役は、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、合理的設計は元来不可能である。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。人間学の止揚に社会学が不可欠であったように、化学（chemistry）と生物学（biology）の統一には、分子の「社会学」（Molecular Sociology）、否、「社会工学」の試みが是非とも必要である。

その百万歩の道程の第一歩として、本研究で目指すのは、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。

2. 主な研究成果

2.1 酵素と酸化酵素の機能発散

次世代シーケンサーの登場により、データベース空間には無数の酵素の遺伝子配列が存在し、そしてそのラインナップは爆発的に増加の途にある。この無尽蔵ともいえる遺伝子資源の中には、産業的に有用（選択的かつ高活性）な触媒機能が数多く含まれていることであろう。米国のバイオニシアチブ宣言以来、この遺伝子データベースのサイズを飛躍的に高める計画が世界中で進行中である。しかし、いくら遺伝子配列が膨張しても、「価値のある配列」の特定技術が不在であるかぎり、価値のある配列と同様、有象無象も同じ速度で膨張することになる：かくして迷宮のサイズだけが膨張する現在、研究者の迷い箸は、その極に達している。

本研究では、望む反応を担う酵素の超高速オンデマンド提供をする技術プラットフォームの開発を目指す。活性が高く熱安定性に優れた酵素（変異耐性の高い酵素）を出発点（親）とし、それに独自の変異導入技術を駆使した多重遺伝子変異を与える育種サイクルを高速にまわし、多世代にわたって超高速生合成酵素の反応特異性を発散させる研究を行うことを目的としている。

昨年度は、そ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達成した。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。アセチル転移酵素、リン酸脱離酵素、メチル転移酵素、酸化酵素、の活性のスクリーニング系が完成した。

これを受けて本年度は、これらの酵素の実際に多世代進化を開始し、さまざまな新規活性をもつ酵素の創出を目指した。具体的には、

- ① アセチル転移酵素においては、七世代の進化工学ラウンドを経て、野生型にはない無数のアセチル転移活性を得ることができた（論文準備中）
- ② あらたに、SAM依存型メチル転移酵素の進化分子工学技術を開発した（特願 2023-139902）。この方法は、SAMの消費活性を可視化するハイスループットスクリーニングであ

るため、基質を問わずあらゆる酵素に利用できるものである。実際に EgtD という N-メチル転移酵素のポケット内の3つの残基をランダム化した。

- ③ 脱離酵素については、基質を問わずあらゆる酵素に利用できる選抜技術を開発済みである。この方法を用いて、バクテリア由来のテルペン酵素 CinS の反応ポケット内の残基を集中的にランダム化し、機能を維持している変異体を選抜した。野生型酵素はシネオールのみを特異的に合成する酵素であるが、このランダム化/基質消費能に対する選抜、のサイクルを五世代にわたって繰り返したところ、遺伝型・機能ともにその反応物特異性は大きく発散することになった。本研究では、基質消費能の維持以外のいかなる「方向づけ」も行っていないにもかかわらず、合計100に満たない変異体群の中に、ピネン、リモネン、サビネンなどを選択的につくる酵素変異体が見出された（投稿準備中）。
- ④ 酸化酵素については、非ヘム依存型酸化酵素（2OGD, 2-oxoglutarate dependent oxygenases）の活性選抜技術を確立し、その選抜効率を飛躍的に高めることに成功した。2OGD のひとつである EctD という水酸化酵素の反応ポケットへの多重残基置換によって得られた変異体集団の中から、この手法を用いて活性の高い（あるいは維持した）変異体を選抜したところ、その反応特異性は大きく拡張された。わずか2～3残基置換の導入によって、その特異性は飛躍的に拡張・発散した。活性を維持していた変異体を無作為に8つ選択し、その基質・反応性を調査したところ、さまざまな新規基質の水酸化活性が認められた。変異体によっては、水酸化ではなくクロロ化産物を与えるものも認められた（投稿準備中）。この酵素の高い可塑性が確認できた。

2.2. 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、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、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。

昨年度は、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、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。今年度は、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くんだ。

具体的には：

- ① 先行研究において、アラビノース応答型転写因子 AraC のリガンド認識部位をなす5つの残基に変異を導入すると、サリチル酸応答センサーとして働くことが報告されている。この5つの残基置換「有無」の全パターン（ $2^5=32$ ）を網羅した AraC 変異体セットを用意し、そのサリチル酸センサーとしての機能を「アロステリックモード」「非アロステリックモード」の2つの作動原理において比較した。アロステリックセンサーではその5つの変異全てがなければサリチル酸応答機能は得られなかったが、非アロステリックモード（Ligand-induced folding モード）では32変異体の大多数がサリチル酸センサーとして機能した。つまりアロステリックセンサーにくらべて、非アロステリックな作動原理で働くセンサーの進化能は

圧倒的に高いことが示された。自然界にはAraCをはじめ、高度なアロステリック機構によってセンサー機能を発現するタンパク質が数多く知られている。本研究の結果は、このアロステリック機構を損なうことなく、タンパク質は高頻度に「Ligand-induced folder」としての性質を簡単に帯びることができることを明確に示す結果となった。Ligand-induced folder はリガンド結合による安定化効果を自らの folding エネルギーに算入することによって ligand 依存的な機能スイッチングを示す。ランダム変異の蓄積によりこの特質を帯びることによって、アロステリックタンパク質は高い進化能を一時的に獲得し、新規特異性を得るのかもしれない。来 2024 年度は、この仮説の検証のために、多方向への発散進化実験を継続したい。

- ② 全く無関係のタンパク質を融合させたとき、両者にはどのような関係が生まれるのであろう。上述の AraC (転写因子) とアセチル転移酵素 CAT をさまざまなリンカーによってさまざまな部位で融合させたキメラを作出した。興味深いことに、多くのキメラ変異体が、AraC のアンタゴニストとして知られるフコースを加えることによって、その CAT 活性を大きく変化させることがわかった。フコース添加で活性が上がるもの (Fucose-ON 型)、逆に下がるもの (Fucose-Off 型) のいずれも、数世代にあたるランダム変異導入プロセスによって、簡単にその Signal-to-noise 比を拡大してゆき、極めて切れ味のよいスイッチとなった。この結果は、融合したタンパク質が、ランダム変異の蓄積によって極めて容易に相互制御関係を得ることを示している。なお、十分に「切れ味進化」を遂げた Fucose-ON 型 CAT、Fucose-Off 型 CAT の遺伝子全域にランダム変異を導入すると、頻繁にその逆の振る舞いをする変異体が現れることがわかった。複数のタンパク質遺伝子が遺伝子レベルで融合し、多機能「ドメイン」型のタンパク質を構成することは、自然界でも散見される。これら「互いに繋がれたタンパク質機能」の進化は、生理学的には、協働するタンパク質どうしの時空間的な共局在を保証する効果があると認知されているが、じつは連結状態にあるタンパク質は、互いにより積極的な相互調節機能を果たしているのかもしれない。来 2024 年度は、この仮説に加え、これまでに見過ごされてきた「ありえる戦略的互惠関係」の創発を促す進化工学を実施し、ナノテクノロジー素材としてのタンパク質の隠れた facet を引き出す研究を継続したい。

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) MetJ-based Mutually Interfering SAM-ON/SAM-OFF Biosensors : Taro Watanabe, Yuki Kimura, Daisuke Umeno, *ACS Synth. Biol.*, 13(2), 624-633 (2024), doi: 10.1021/acssynbio.3c00621.
- 2) Systematic promoter design for plasmid-encoded S-adenosylmethionine sensing systems : Taro Watanabe, Yuki Kimura, Daisuke Umeno, *JGAM*, (2024), doi: 10.2323/jgam.2024.01.002.

- 3) Mutational destabilization accelerates the evolution of novel sensory and network functions : Yuki Kimura, Shigeko Kawai-Noma, Daisuke Umeno, *BioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.11.23.564566> (2024).
- 4) Imparting As(III) Responsiveness to the Choline Response Transcriptional Regulator BetI: Ryo Yamaguchi, Tetsuaki Yamamoto, Daisuke Umeno, Katsumasa Kamiya, Shigeko Kawai-Noma; *ACS Omega*, 9(14), 16035-16043 (2024), doi: [10.1021/acsomega.3c09604](https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09604)

4.2 総説・著書

- 1) 石原大地, 長島綾, 梅野太輔, 「カロテノイドの科学 II編第12章 進化分子工学とカロテノイド」監修: 高市真一 ISBNコード: 978-4-7813-1798-4 シーエムシー出版, 2024年3月19日.

4.3 招待講演

- 1) Daisuke Umeno, 「Breaking symmetry: laboratory evolution of carotenoid pathways to explore extra-natural space of carotenoid functions」, The 19th International Symposium on Carotenoids, 2023年7月, 富山(富山)
- 2) 梅野太輔, 「Bio-DBTLのキラーツールとしてのメタボライトセンサの高速開発DBTL」, 発酵と代謝研究会 2023年度講演会「さまざまな視点から『発酵と代謝』研究をあらためて考える(4)」, 2024年3月13日, Teamsと現地のハイブリット開催
- 3) 梅野太輔, 「Bioものづくり革命を志向した「よろづセンサ」計画」, 日本農芸化学会2024年度大会 新資源生物変換研究会シンポジウム「生物変換を司る代謝機能の新基軸とその応用展開」, 2024年3月27日, 口頭発表
- 4) 梅野太輔, 「Evolutionary Complete? モノリシック合成生物学」, 微生物奨励会・バイオテクノロジー懇談会, 2024年3月29日, 口頭発表

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) 矢内祐希, 塚田美結, 金綱真作, 木村友紀, 梅野太輔, 「リガンド依存的なアンフォールディングスイッチの進化デザイン」, 第23回日本蛋白質科学会年会, 2023年7月, 愛知(名古屋), ポスター発表
- 2) Hiroto Ando, Takumi Ojima, Daisuke Umeno; “Converting squalene synthase into carotenoid synthase for biosynthesis of minisqualene“. The 19th International Symposium on Carotenoids, 2023年7月, 富山(富山), ポスター発表
- 3) Daichi Ishihara, Yumi Onozato, Katsuya Minakata, Miki Iwasaki, Shigeko Kawai-Noma, Daisuke Umeno; “Directed evolution of high-titer non-mevalonate pathway“. The 19th International Symposium on Carotenoids, 2023年7月, 富山(富山), ポスター発表

【Travel Award】

- 4) Tomoki Chino, Yohei Saito, Kayo Takemoto, Shigeko Kawai-Noma, Takahiro Seki, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno: “In situ feeding of non-cognate apocarotenoids to Bacterialrhodopsins”. The 19th International Symposium on Carotenoids, 2023年7月, 富山(富山), ポスター発表 **【Travel Award】**
- 5) Yui Araki, Takumi Ojima, Hiroto Ando, Daisuke Umeno; “Molecular breeding of C 20 carotenoid pathways”. The 19th International Symposium on Carotenoids, 2023年7月, 富山(富山), ポスター発表 **【Presentation Award】**
- 6) Aya Nagashima, Daichi Ishihara, Yui Araki, Hiroto, Ando, Miki Tashiro, Takumi Ojima, Daisuke Umeno; “Promiscuous carotenoid pathways as indicators for intercellular proportion of IPP and DMAPP”. The 19th International Symposium on Carotenoids, 2023年7月, 富山(富山), ポスター発表
- 7) 関貴洋, 田中琴葉, 木村友紀, 梅野太輔, 「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」, 第75回日本生物工学会大会, 2023年9月, 愛知(名古屋), 口頭発表
- 8) 田中琴葉, 関貴洋, 梅野太輔, 「ランタノイドセンサ開発を指向したペリプラズム Display」, 第75回日本生物工学会大会, 2023年9月, 愛知(名古屋), 口頭発表
- 9) 安藤大翔, 尾島匠, 関貴洋, 梅野太輔, 「スクアレン合成酵素のカロテノイド合成酵素としてのサイズ進化」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), 口頭発表 **【Best Paper 賞】**
- 1 0) 金綱真作, 野々下芽以, 木村友紀, 関貴洋, 梅野太輔, 「構造安定化を指標とした非ヘム鉄酸化酵素特異性の定向進化」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), 口頭発表
- 1 1) 早川葵咲, 矢内祐希, 塚田美結, 関貴洋, 梅野太輔, 「クロラムフェニコールアセチル転移酵素機能の高速発散進化」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), 口頭発表
- 1 2) 荒木 優衣, 尾島匠, 関貴洋, 梅野太輔 「ミニカロテノイド生合成経路の実験室内進化」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), ポスター発表
- 1 3) 加藤涼大, 長谷川悟史, 塚田美結, 早川葵咲, 木村友紀, 関貴洋, 梅野太輔, 「転写因子機能を用いたタンパク質の構造安定性因子の探索」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), 口頭発表
- 1 4) 栗田凌, 市川智之, 木下葵子, 石原大地, 関貴洋, 梅野太輔, 「モノテルペン合成酵素特異性の高速発散」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), 口頭発表 **【Best Paper 賞】**
- 1 5) 田中琴葉, 関貴洋, 梅野太輔, 「金属結合モチーフのハイスループット解析・進化プラットフォーム」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), ポスター発表
- 1 6) 丸山慶一, 塚田美結, 関貴洋, 梅野太輔, 「指向性ミューテータを用いた酵素「進化能」のスクリーニング技術」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), 口頭発表
- 1 7) 矢内祐希, 「酵素機能の非アロステリックな制御機構の実験室内創発」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), ポスター発表

- 18) 関貴洋, 田中琴葉, 矢内祐希, 梅野太輔, 「膜貫通型シグナル伝達系のゼロベース設計」, 日本遺伝学会 第95回大会, 2023年9月, 熊本(熊本), 口頭発表
- 19) 石原大地, 長島綾, 小野里由美, 南方克哉, 田代美紀, 梅野太輔, 「原料枯渇を選抜原理とした非メバロン酸経路の進化工学」, 第33回イソプレノイド研究会例会, 2023年9月, 島根(松江), 口頭発表
- 20) 矢内祐希, 塚田美結, 関貴洋, 木村友紀, 梅野太輔, 「Rapid evolution of controlling mechanism of enzyme activity」, 微生物研究会 2023年10月, 早稲田大学西早稲田キャンパス, ポスター発表
- 21) 安藤大翔, 尾島匠, 梅野太輔, 「サイズ特異性変異と反応特異性変異の掛け合わせを利用した新規トリテルペン合成酵素の創出」, 微生物研究会 2023年10月, 早稲田大学西早稲田キャンパス, ポスター発表
- 22) 石原大地, 長島綾, 小野里由美, 南方克哉, 田代美希, 梅野太輔, 「前駆体枯渇を利用した非メバロン酸経路の進化工学」, 微生物研究会 2023年10月, 早稲田大学西早稲田キャンパス, ポスター発表
- 23) 千野朋希, 斉藤遥平, 関貴洋, 梅野太輔, 「ロドプシン機能拡張のための生合成工学」, 微生物研究会 2023年10月, 早稲田大学西早稲田キャンパス, ポスター発表
- 24) 早川葵咲, 矢内祐希, 塚田美結, 梅野太輔, 「アセチル転移酵素の機能発散を指向した実験室進化」, 微生物研究会 2023年10月, 早稲田大学西早稲田キャンパス, ポスター発表
- 25) 小野里由美, 尾島匠, 石原大地, 田代美希, 梅野太輔, 「テルペン増産を目指した非メバロン酸経路の進化デザイン」, テルペン・精油学会 2023年10月, 千葉大学西早稲田キャンパス, 口頭発表
- 26) 安藤大翔, 尾島匠, 多田和樹, 梅野太輔, 「カロテノイド合成酵素化を経たスクアレノ合成酵素の特異性進化」, 酵素工学研究会 2023年11月, 東京大学, ポスター発表
- 27) 関貴洋, 田中琴葉, 梅野太輔, 「ペリプラズム Display を利用したレアメタルセンサーの開発」, 令和元年度遺伝研研究会「微生物バイオプロダクションのための微生物機能の理解とリデザイン」, 2023年11月, 静岡(三島), 口頭発表
- 28) 荒木優衣, 尾島匠, 関貴洋, 梅野太輔, 「Mini-Carotenoid 生合成酵素の創出と活性進化」, 第35回カロテノイド研究談話会・第17回アスタキサンチン研究会(合同開催)・2023年度カロテノイド若手の会, 2023年11月, 東京, 口頭発表
- 29) 長島綾, 梅野太輔, 「多能性カロテノイド経路を用いた細胞内 IPP/DMAPP 比の可視化技術の開発とスクリーニング応用」, 第35回カロテノイド研究談話会・第17回アスタキサンチン研究会(合同開催)・2023年度カロテノイド若手の会, 2023年11月, 東京, 口頭発表
- 30) 安藤大翔, 多田和樹, 坂本康二, 眞岡孝至, 梅野太輔, 「カロテノイド酵素化を介したボトリオコッセン合成酵素のサイズ進化」, 第35回カロテノイド研究談話会・第17回アスタキサンチン研究会(合同開催)・2023年度カロテノイド若手の会, 2023年11月, 東京, 口頭発表

- 3 1) 早川葵咲, 矢内祐希, 加藤涼大, 塚田美結, 梅野太輔, 「クロラムフェニコールアセチル転移酵素機能の高速発散進化」, 第 46 回日本分子生物学会年会, 2023 年 12 月, 兵庫 (神戸), ポスター発表
- 3 2) 長島綾, 石原大地, 梅野太輔, 「新規 IPP/DMAPP 比スクリーニング法を用いた 4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルニリン酸レダクターゼ IspH の生産物特異性の改変」, 日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 3 月, 千葉 (船橋), ポスター発表
- 3 3) 長谷川悟史, 加藤涼大, 梅野太輔, 「電子伝達鎖のスイッチングによる酸化酵素活性の外的制御」, 日本化学会第 104 春季年会, 2024 年 3 月, 千葉 (船橋), ポスター発表

【学会・社会的活動】

- 1) ACS Synthetic Biology: Editorial Board
- 2) Journal of General and Applied Microbiology: Editorial Board
- 3) 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 つの課題のうち、2 つにおいて、期待以上の結果が得られた。来 2024 年度は、これらの課題において、さらに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、(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。また、本年度棚上げていたテーマ、(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を調べる研究を再開したいと考えている。