

バイオセンサ開発と難進化酵素の改良を指向したペリプラズム Display 技術

研究代表者 関 貴洋
(理工学術院 総合研究所 次席研究員)

1. 研究課題

グラム陰性菌の持つペリプラズム空間は、細胞質（細胞内）とは比べものにならないほど、化学的環境を操作しやすく、新たな進化工学の間として有望である。最近、申請者は、このペリプラズム空間を利用するための新規進化工学プラットフォーム技術を開発した。本研究では、この技術を最大限発展させ、細胞内外の情報を仲介する機構の実験進化的な創発や、細胞内とはイオン組成が全く異なる環境でのタンパク質の適応メカニズムの解明を目的とする

2. 主な研究成果

2.1 ペリプラズム Display による酵素の提示

大腸菌のアルカリフォスファターゼ PhoA は、 Mg^{2+} と Zn^{2+} を補因子とし、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。この酵素はウェスタン解析などの診断酵素としても利用されており、安定性や酵素活性の改良の需要が見込まれるうえ、色素や蛍光試薬が充実しており酵素活性を解析しやすい。また、PhoA はペリプラズム輸送シグナルを除去すると、細胞内では適切な S-S 結合を形成できないことから、融合タンパク質がペリプラズムへと輸送されたどうかを解析するレポーターとしても利用されている。そのためこの酵素を用いて、膜タンパク質を介したペリプラズム Display 技術によって、酵素が適切にペリプラズムに提示されるかを確認することにした。12 回膜貫通タンパク質の TetA には、ペリプラズムループが 6 箇所ある。どのループが酵素活性を解析するうえで最も適切な挿入点になり得るか検討を行った。シグナル配列を除去した PhoA 遺伝子を TetA 遺伝子上の各ペリプラズムループに該当する位置に挿入した融合遺伝子を用意し、それら大腸菌に導入し、PhoA の比色基質を含む培地に塗布し TetA-PhoA を発現させた。その結果、最も C 末端側に位置する 6 番目のループに挿入した場合において、最も着色の濃いコロニーが形成された。一方で、ネガティブコントロールとして細胞内ループへ挿入した場合には全くコロニーの着色は見られなかった。これらの結果は、TetA の 6 番目のペリプラズムループであれば PhoA が適切にペリプラズムに提示され、活性を示すことを意味している。

さらに、この PhoA の機能発現において S-S 結合形成が重要であることを確認するため、S-S 結合形成に関与するシャペロンタンパク質 DsbA 欠損株においてペリプラズム Display した PhoA の活性を解析した。DsbA 欠損株に TetA-PhoA を導入し、比色基質を含んだ培地に塗布したところ、無色のコロニーが形成された。さらに、野生型株と DsbA 欠損株それぞれに TetA-PhoA を導入し、1 対 1 で混合し、比色基質を含んだ培地に塗布したところ、着色したコロニーと無色のコロニーが 1 対 1 の割合で出現した。これらの、S-S 結合形成がペリプラズム Display による PhoA の機能発現においても必須であることを意味している。

2.2 夾雑イオン存在下でも活性を示す変異体の取得

酵素の多くは、金属イオン補因子の力を借りて精緻な触媒機能を発揮する。しかし、異なる金属イオンが存在するような夾雑環境ではその触媒活性が阻害されることがある。そこで、ペリプラズム Display 技術を利用し、ペリプラズムへと提示した標的酵素が細胞内とは全く異なるイオン環境においても高い酵素活性を示す変異体の取得を試みた。

大腸菌アルカリフォスファターゼは、 Co^{2+} 存在下においてその活性が阻害されることが知られている。ペリプラズム Display を利用して酵素を提示した場合でも、夾雑イオン存在下で機能する PhoA を取得することができるかを調査するため、 Co^{2+} 存在下で進化工学を実施した。PhoA の金属結合に関与するアミノ酸を部位特異的飽和変異によりランダム化した遺伝子を用意し、それを TetA 遺伝子の 6 番目のペリプラズムループに当たる位置に挿入したライブラリを作成した。それを大腸菌に導入し、比色基質と CoCl_2 を含んだ培地へ塗布したところ、野生型より濃く着色したコロニーが 1/10 ほどの割合で出現した。着色したコロニーについて、PhoA 活性を再解析したところ、 Co^{2+} によって活性阻害は受けるものの野生型 PhoA の活性に対して約 8 倍ほど活性が上昇した変異体を取得することができた。さらに、error-prone PCR によって PhoA 遺伝子全体にランダム変異を導入した場合においても同様に活性スクリーニングを行ったところ、活性が上昇する変異体だけではなく、 Co^{2+} 存在下でも活性が低下しない、夾雑イオン耐性能を獲得した変異体を取得することができた。これらは、夾雑イオン存在下において、活性の進化工学を実施することで、夾雑イオン存在下でも十分な活性を示す変異体だけではなく、金属選択性が変化し夾雑イオン耐性を有する変異体を取得可能であることを示す結果である。

3. 共同研究者

梅野 太輔 (先進理工学部・応用化学科・教授)

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

該当なし

4.2 総説・著書

該当なし

4.3 招待講演

該当なし

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) 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

【学会・社会的活動】

- 1) 第 20 回 微生物研究会 世話人
- 2) 2022 年度 国立遺伝学研究所研究会 幹事

5. 研究活動の課題と展望

本研究結果から，ペリプラズム Display を利用することで酵素の機能改変が可能であることが実証され，酵素の環境適応メカニズムの一端が見え始めている．今後はさらに，細胞内酵素や分泌酵素などについても本技術によって機能改変を実施し，どのように環境に適応していくのかを調査する．また，本技術を利用したバイオセンサ開発へも展開していく．