

ペリプラズム空間を利用したタンパク質の進化分子工学

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

申請者が開発したペリプラズム Display 技術は、膜タンパク質を介して任意のタンパク質を、化学的環境を操作しやすく夾雑物も少ない大腸菌ペリプラズム空間に提示する技術である。本研究では、この技術をさらに、提示した酵素を改良する進化学プラットフォームや細胞外情報を感知するバイオセンサーの設計技術へと発展させ、これら技術を駆使し、膜貫通型バイオセンサーの実験進化学的な高性能化メカニズムの解明および酵素の新規機能獲得メカニズムの解明を目的とする。

2. 主な研究成果

2.1 TetA 機能を示す TetA-PhoAmut の創出

ペリプラズム Display 技術により、tetracycline (Tc) に対する耐性を齎すトランスポーター TetA を足場としてアルカリホスファターゼ PhoA をペリプラズムへ提示した。比色基質を利用した方法により PhoA 活性は確認できたものの、Tc を含む培地において大腸菌の生育が見られず足場である TetA の機能は失活していることがわかった。そこで、TetA 機能を復活させるため、TetA と PhoA の融合点のアミノ酸配列を調整した TetA-PhoAmut を作出した。これを大腸菌に導入したところ、PhoA 基質存在下において Tc 添加培地で生育すること (=Tc 耐性) が確認でき、TetA 機能を復活させることに成功した。さらに、PhoA 機能も維持していることを確認できた。

2.2 提示酵素の Folding の読み出し

TetA 機能により提示したタンパク質の Folding 状態を読み出すことができるか調べることにした。大腸菌のアルカリホスファターゼ PhoA は、2つのシステインから形成されるシスルフィド(S-S)結合を2つ持ち、PhoA の立体構造形成にこの S-S 結合が必須である。そこで、この PhoA の S-S 結合依存性を TetA の機能で読み出せるかどうか調査することにした。S-S 結合形成に関与するシャペロンタンパク質 DsbA を欠損した大腸菌株に TetA-PhoAmut を導入したところ、Tc 添加培地での生育は確認できなかった。さらに、PhoA のシステインをセリンに置換し、S-S 結合を排除した変異体を作成したところ、この変異体も Tc 添加培地では生育できなかった。これらの結果は、S-S 結合の形成できないことで PhoA が立体構造を形成することができず、それにより足場である TetA も機能発現できなくなったと解釈することができる。

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, 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」日本生物工学会, 2023 年, 9 月, 愛知 (名古屋), 口頭発表

2) 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, 口頭発表

【学会・社会的活動】

1) 第 21 回 微生物研究会 世話人代表, (早稲田大学開催)

5. 研究活動の課題と展望

本研究から, 足場である TetA の機能からペリプラズムに提示したタンパク質の Folding や発現をハイスループットかつリアルタイムに確認することができるようになった. 今後はこの技術をさらに深化させ、細胞内酵素などへも適応し, ペリプラズムへ細胞内酵素を発現できるように改良する技術へと展開していく.