

膜タンパク質の機能拡張を指向したペリプラズム Display 技術の深化

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

ペリプラズム Display 技術は、膜タンパク質を介して任意の水溶性タンパク質を大腸菌ペリプラズム空間に提示する技術である。この技術を応用し、土台となる膜タンパク質の細胞内側に露出した領域に、さらに細胞内レポータータンパク質を融合することで、細胞外で起こる提示酵素とリガンドとの結合情報を細胞内へと伝達する人工情報伝達タンパク質の設計技術を構築した。しかしながら、この細胞外から細胞内への情報伝達の効率が不十分であり、細胞外の分子情報を感知するバイオセンサーとしての機能に課題があった。そこで本研究では、土台である膜タンパク質から細胞内出力素子であるレポータータンパク質への情報伝達に焦点を当て、その伝達効率の向上を目的とし、細胞膜環境の変化を感知する膜環境センサーの開発を行なった。

2. 主な研究成果

2.1 温度変化を感知する膜タンパク質をベースとしたバイオセンサーの開発

ペリプラズム Display 技術を用いた人工情報伝達タンパク質の設計では、土台膜タンパク質としてテトラサイクリントランスポーターTetA を利用し、細胞内の出力素子として枯草菌由来シグマ因子の 1 つである SigV の活性を抑制するアンチシグマ因子 RsiV の部分構造 RsiV_{cyto} を利用した (特願 2023-103802)。この TetA から RsiV_{cyto} への伝達効率を向上させるため、TetA と RsiV_{cyto} のみを融合した TetA-RsiV_{cyto} を作成した。これを大腸菌に SigV と共に発現させたところ、この TetA-RsiV_{cyto} は 37℃での培養条件では RsiV 活性 (SigV 抑制能) を示さなかったが、30℃での培養条件において、およそ 6.7 倍の RsiV 活性を示した。一方で、RsiV_{cyto} のみを SigV と共に大腸菌に発現させた場合では、温度変化による RsiV 活性の変化は 1.3 倍ほどにしかならなかった。そのため、30℃の条件において TetA が安定化し、これが融合パートナーである RsiV_{cyto} へと伝わり機能構造形成が可能になったものだと考えられる。

さらに、この TetA-RsiV_{cyto} の構造遺伝子全域にランダム変異を導入したライブラリを作成し、より温度応答性が向上した変異体の探索を試みた。その結果、37℃培養と 30℃培養での RsiV 活性が 60 倍にも広がった変異体を取得することができ、温度変化という条件ではあるが十分な signal-to-noise 比を出すことに成功した。

2.2 TetA-RsiV_{cyto} は膜環境変化へ応答する

TetA から RsiV_{cyto} へと安定性情報がうまく伝達できているのであれば、膜環境の変化による TetA の安定性変化を RsiV 活性として読み出せると期待できる。そこで、膜流動性を上昇させることが知られているジメチルスルホオキシド (DMSO) を培地に添加し、TetA-RsiV_{cyto} が機能発現する 30℃の条件で、その RsiV 活性を調べた。その結果、添加した DMSO 濃度が上昇

するにつれ、TetA-RsiV_{cyto}のRsiV活性が低下していった。さらに、細胞膜を構成している脂質分子の脂肪酸を不飽和化し膜の流動性を上昇させる働きを担う酵素FabBを追加発現させたところ、こちらでもTetA-RsiV_{cyto}の機能の低下を引き起こした。これらの流動性の上昇は膜上に局在しているTetA部分にしかその影響を与えない。そのため、これらの結果は、膜の流動性が上昇することで膜のパッキングが低下し、それによってTetAが機能構造を形成できなくなり、それがRsiV_{cyto}へと伝達したことでRsiV活性が喪失したものだとして解釈することができる。

2.3 TetA-RsiV_{cyto}による膜組成変化の可視化

細胞膜環境は、膜を構成している脂質分子の組成によって決定されている。今回開発したTetA-RsiV_{cyto}は、膜環境変化を読み出すことができる遺伝子コード型のバイオセンサーであると解釈できる。そこで、このバイオセンサーを大腸菌において異種脂質の合成による膜組成変化のモニタリングに利用可能か調査した。大腸菌で機能発現可能なスクアレン合成酵素遺伝子を発現誘導制御下におき、これをTetA-RsiV_{cyto}とSigVを持たせた大腸菌に導入し、培地にさまざまな濃度の誘導剤を添加し培養した。その結果、誘導剤濃度が高いほどTetA-RsiV_{cyto}のRsiV活性が向上した。スクアレンは炭素数30から成る疎水性の不飽和炭化水素化合物であり、膜の流動性を低下させることが知られている。このスクアレンは炭素数5のイソプレノユニットが単結合で連なってできており、比較的自由的な構造を取れる。そのため、スクアレンが細胞膜内に蓄積することによって膜を構成しているリン脂質の疎水性部分の隙間を埋めるような構造で配置し、それにより膜のパッキングが向上しTetAの安定化を引き起こしたものではないかと考えられる。

3. 共同研究者

梅野 太輔（先進理工学部・応用化学科・教授）

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

令和6年 グラム陽性菌ゲノム機能会議 最優秀発表賞（口頭発表）

4.5 学会および社会的活動

【国際学会発表】

- 1) Kotoha Tanaka, **Takahiro Seki**, Daisuke Umeno, “Redesigning metal-binding proteins using periplasmic display system, The Protein Society Annual Symposium 2024 (PS38), Vancouver, Canada, July, 2024, ポスター発表
- 2) **Takahiro Seki**, Daisuke Umeno, “Protein-based sensors for high throughput and real-time monitoring of cellular membrane fluidity of *Escherichia coli*”,

IUMS2024:International Microbiological Societies Congress, Florence, Italy,
October, 2024, ポスター発表

【国内学会・研究会発表】

- 1) 関貴洋, 梅野太輔, 「枯草菌 SigV-RsiV 系を利用した膜パラメーターセンサーの創出」, 令和 6 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議, 長野（長野）2024 年 8 月, 口頭発表（**最優秀発表賞**）
- 2) 関貴洋, 梅野太輔, 「異種脂質生合成のモニタリングを指向した膜タンパク質型センサーの創出」, 日本遺伝学会第 96 回大会, 2024 年 9 月, 高知（高知）, 口頭発表
- 3) 竹本佳世, 田中琴葉, 関貴洋, 梅野太輔, 「タンパク質のリガンド誘導フォールディングに基づく細胞内外の情報伝達」, 第 76 回日本生物工学会大会, 2024 年 9 月, 太田区（東京）, 口頭発表
- 4) 関貴洋, 梅野太輔, 「膜タンパク質を素材とした膜流動性バイオセンサーの開発」, 第 76 回日本生物工学会大会, 第 76 回日本生物工学会大会, 2024 年 9 月, 太田区（東京）, 口頭発表
- 5) 田中琴葉, 関貴洋, 梅野太輔, 「ペリプラズム Display 技術を用いた金属結合タンパク質の金属依存性進化」, 令和 6 年度遺伝研研究会「細胞のシステム理解とデザインに向けた微生物研究の統合と革新」, 2024 年 10 月, 三島（静岡）, 口頭発表
- 6) 大出和輝, 関貴洋, 梅野太輔, 「Carbonic anhydrase のペリプラズム発現を活用したエネルギー産生を伴う炭素固定系の構築」, 令和 6 年度遺伝研研究会「細胞のシステム理解とデザインに向けた微生物研究の統合と革新」, 2024 年 10 月, 三島（静岡）, 口頭発表
- 7) 田中琴葉, 関貴洋, 梅野太輔, 「ペリプラズム Display 技術を利用したランタノイド結合タンパク質 LanM の金属依存性進化」, 日本農芸化学会 2025 年度札幌大会, 2025 年 3 月, 札幌（北海道）, ポスター発表
- 8) 関貴洋, 梅野太輔, 「膜流動性センサーを利用した脂質生合成酵素の進化工学」, 日本農芸化学会 2025 年度札幌大会, 2025 年 3 月, 札幌（北海道）, ポスター発表

5. 研究活動の課題と展望

今年度は、十分な効率を持って細胞膜から細胞内へと情報を伝達するシステムの構築に成功した。取得した変異体をペリプラズム Display の土台とすることで、細胞外から細胞内への情報伝達がよりスムーズに起こる人工情報伝達タンパク質を構築することが可能になると期待される。また、今回取得した TetA-RsiV_{cyto} は、膜環境変化をモニタリングするユニークなバイオセンサーである。このセンサーとしての振る舞いをスクリーニング原理に利用することで、異種脂質分子の合成酵素の機能改良にも利用可能であると期待できる。