

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

論文題目

*S*-adenosyl-L-methionineバイオセンサの開発と  
酵素工学への応用

Development of *S*-adenosyl-L-methionine biosensors  
and their application to enzyme engineering

申請者

渡邊 太郎  
Taro WATANABE

応用化学専攻 応用生物化学研究

2023年12月

SAM (*S*-adenosyl-L-methionine) は様々な生物学的プロセスに関与する重要な代謝物質である。SAM は生体内におけるメチル基ドナーとして、遺伝子の転写・翻訳などの生命の根幹を担うプロセス制御に必須な DNA・RNA・タンパク質などのメチル化を支えているほか、細胞膜脂質やオスモライトの生合成や修飾にも必須な機能性分子である。そして二次代謝産物の生合成経路にも、SAM を介したメチル化反応は広く存在する。その中には、医薬品 (例: morphine) や健康食品原料 (例: ferulic acid)、香料 (例: vanillin) などの産業上重要な物質も多い。これらメチル化物質の工業的生産は専らそれらを微量含む動植物からの抽出や化学合成に依存しているため、持続的な供給の観点から微生物生産による安定かつ大量供給法への代替が強く望まれる。しかし、SAM の細胞内供給・再生系の強化や内在の SAM 消費系の遮断など、既存の知見に基づく従来の代謝工学的手法では限定的な効果しか得られていない。SAM は細胞の中心代謝経路に深く埋め込まれた生体分子であるため、未発見の制御要素が数多く存在することは容易に推察できる。また、高活性なメチル化酵素の探索や改変による活性向上の試みも他の酵素に比べると遅れているのが現状である。

この現状の最大の理由の 1 つが、メチル化酵素活性や SAM 供給活性に対するスクリーニング系の不在である。メチル化物質の実用生産を達成するためには、メチル化反応の更なる高速化、そして細胞内の SAM 供給力のさらなる向上が不可欠であるが、SAM 濃度に影響を与える遺伝的要素を既存知識から予測することは難しい。すなわち、順遺伝学的なアプローチによりゲノムワイドに有効因子の探索を行うことが必要となる。これを実現するためには SAM 濃度検知システムが必須であるが、従来のバイオセンサでは検出性能が不十分であり、その変化をハイスループットに検出することは困難であった。また、メチル化酵素の活性検出法も、特定基質のメチル化産物をバイオセンサ等で検出する汎用性の低いものである。これらの障害ゆえ、これまでに開発された SAM 依存性メチル化反応による物質生産プロセスでは、その前駆体であるメチル化基質よりも生産収量は 1 桁ほど低い値に留まっている。

上記背景のもと、本論文ではあらゆるメチル化物質の生産性向上に資する SAM バイオセンサの開発と基質や生成物を問わずあらゆる SAM 依存性メチル化酵素の活性測定を可能とする迅速かつ汎用的なスクリーニング系の構築に取り組んだ。

本論文は五章で構成されている。

第一章では、細胞生理におけるメチル化の役割や代謝経路及び SAM との関わりを概説し、メチル化反応を含む有価二次代謝産物の微生物生産における既報の代謝工学戦略を整理した。その過程でメチル化物質の生産ボトルネックが、宿主細胞の SAM 供給力不足とメチル化酵素の活性不足にあると結論づけ、SAM 供給力を高める未知の遺伝的要素の探索とメチル化酵素活性 (SAM 消費力) を向上させることが、現状打破における最も有効な手段だと提案した。続いて SAM とメ

チル化活性のハイスループット検出を目指した既往研究を精査した。それら研究での技術的問題点を指摘し、本研究の目的をメチル化物質の生産性向上に資する SAM とメチル化酵素活性の汎用的な検出技術を構築することと定め、具体的な戦略策定へ展開した。

第二章では、大腸菌由来の転写因子 MetJ を利用した SAM バイオセンサ構築について述べた。転写因子 MetJ は SAM と結合して構造変化を起こし、特定の DNA 配列 (metbox) を認識して下流遺伝子の転写を抑制する。本章では MetJ による遺伝子発現制御系を合成生物学的手法により再構成し SAM バイオセンサ系の構築を進めた。強力な構成型プロモータの周辺の様々な位置に metbox を配置した MetJ 応答性プロモータを複数設計し、ゲノム中の MetJ を介した抑制強度や SAM 濃度変化に対する応答をプロモータ下流に配置した GFP (green fluorescent protein) の蛍光強度で評価した。多コピー型プラスミドで発現した MetJ は過度に抑制的であったため、metJ 遺伝子を error-prone PCR により増幅しランダムに変異を与え、SAM 濃度に応じた蛍光強度を指標にスクリーニングを行った。選抜された MetJ 変異体からは SAM 濃度変化に良好な応答性を示したものが複数得られ、SAM 濃度が上昇すると出力が減少する "SAM-OFF" 型センサの構築に成功した。

第三章では TI (transcriptional interference) という現象をバイオセンサのレポーター設計に導入した。2 つのプロモータを対向させると、それぞれのプロモータから転写を開始した RNA ポリメラーゼどうしが衝突を起こし遺伝子発現が相互抑制される (TI)。本研究では、抑制型転写因子 MetJ によるプロモータ制御が対向する定常プロモータより出力されるタンパク質の転写への抑制効果を上下する様式をデザインして出力反転を実現し、"SAM-ON" センサとして振る舞うセンサ系の構築に成功した。これをさらに発展させ、対向したプロモータのそれぞれの制御下に色の異なる蛍光タンパク質をそれぞれ配置し、その蛍光強度比をバイオセンサの出力とするセンサ方式を試作したところ、SAM の消費活性、SAM の供給活性の双方が蛍光強度の変化として検出できることを確認した。さらに、このセンサ形式には 2 つの利点、すなわち (1) 互いに反転関係にある 2 つの蛍光シグナルの比をとるため、出力ダイナミックレンジが向上すること、(2) 転写因子駆動型のセンサの弱点である細胞の翻訳リソース変動による出力ノイズが大幅に軽減され、サンプル間の出力誤差が著しく減少すること、が認められた。このセンサ構成は原理的にあらゆる転写制御系に適用できる新規な技術であり、様々な転写誘導系の高性能化・堅牢化に貢献すると期待される。さらに、SAM の生合成遺伝子 metK (SAM synthetase) のランダム変異ライブラリから、細胞内活性の向上した新規変異体を取得することによって、本章で開発した SAM バイオセンサが細胞内 SAM 濃度の変動因子の探索に応用可能であることを実証した。

第四章では、あらゆるメチル化酵素に適用できる汎用的な蛍光検出系の構築と応用について述べた。メチル化酵素には様々な基質が想定されるが、全てに共通

するのはその SAM 消費活性である。本章では、個々の生産物の検出ではなく、この SAM の消費活性の可視化の方法を考案した。具体的には、uroporphyrinogen III と SAM を基質に 3 段階のメチル化反応によって、鮮やかな桃色蛍光を発する trimethylpyrrocorphin を与える酵素変異体 CysG<sup>(A)</sup> を大腸菌細胞に定常発現させる。この細胞に評価対象のメチル化酵素を導入し、同じ細胞内で SAM 消費を CysG<sup>(A)</sup> と競合させる。目的のメチル化酵素が十分に高いメチル化活性を示すと、その高い SAM 消費活性により CysG<sup>(A)</sup> へ供給される SAM 量を減じる。すなわち、trimethylpyrrocorphin に由来する蛍光強度の減少を、目的メチル化酵素の活性の強度としてハイスループットに評価できる。実際に 2 つのメチル化酵素 (EgtD; L-histidine N-methyltransferase と CCS1; caffeine synthase) をそれぞれ大腸菌に発現させたところ、同細胞に共発現させた CysG<sup>(A)</sup> に由来する細胞蛍光が、対応する基質 (L-histidine と theobromine) の添加量に従い減少することが観察された。CysG<sup>(A)</sup> 活性による trimethylpyrrocorphin の蛍光強度と CCS1 活性による caffeine 生産量との関係を検証したところ、相関係数  $r = -0,952$  (決定係数  $r^2 = 0,906$ ) で表される、負の相関関係が明らかになった。

さらに、構築したスクリーニング系の堅牢性を高めるために、CysG<sup>(A)</sup> へ sfGFP を融合させた。これにより sfGFP に由来する一定強度の緑色蛍光が CysG<sup>(A)</sup> 活性による桃色蛍光と合わさり、黄色から緑色への蛍光色変化として目的メチル化酵素の活性の強度を検出できることが分かった。以上より、視認性の低かった上述のスクリーニング系のダイナミックレンジを高め、評価に用いた大腸菌菌体の色の変化を指標とするハイスループットな検出が可能となった。

基質特異性改変酵素の創製にも本スクリーニング系が有効であることを実証した。EgtD の基質ポケットに位置する 3 つの残基 (T213、M252、E282) に関する飽和変異ライブラリを作製し、L-phenylalanine、L-tryptophan、L-leucine に加え非標準アミノ酸である L-phenylglycine を培地に添加して培養したところ、それぞれ CysG<sup>(A)</sup> の産物に由来するコロニーの桃色蛍光が低下し、緑色蛍光のコロニーを与える EgtD 変異体が多数取得された。それぞれの培養液からはそれぞれのアミノ酸基質の N-メチル化体が確認され、コロニー蛍光色の変化が EgtD 変異体の機能と対応することが確認された。なお L-leucine や L-phenylglycine をトリメチル化する酵素はこれまでに報告がない。以上より、CysG<sup>(A)</sup> との競合を利用した SAM 消費活性の可視化システムを用いることによって、新たな基質特異性を示すメチル化活性の創出や活性の向上を目的としたスクリーニングへの展開が可能であることを明らかとした。

第五章では、本論文の研究内容を総括した上で、今後のメチル化物質生産研究を展望し、本研究成果である細胞内 SAM 濃度の検出系 (バイオセンサ) および SAM の消費活性のスクリーニング技術がもたらす波及効果について論じた。

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名： 渡邊 太郎

印

(2024年2月2日 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
a. 論文	
○	1. (報文) ”MetJ-Based Mutually Interfering SAM-ON/SAM-OFF Biosensors”, <i>ACS Synthetic Biology</i> , in press (2024, 01) (doi: 10.1021/acssynbio.3c00621) Taro Watanabe, Yuki Kimura, and Daisuke Umeno
○	2. (報文) ”Systematic promoter design for plasmid-encoded S-adenosylmethionine sensing systems”, <i>The Journal of General and Applied Microbiology</i> , in press (2024, 01) (doi: 10.2323/jgam.2024.01.002) Taro Watanabe, Yuki Kimura, and Daisuke Umeno
e. その他	特願2023-139902 酵素活性の評価方法、及び酵素活性評価用キット、2023年8月30日出願 (博士論文に直接関係する特許)