

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

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

2024年2月

SAM (*S*-adenosyl-L-methionine) は生体内におけるメチル基ドナーとして、遺伝子の転写や翻訳などの生命の根幹を担う制御システムに必須な DNA、RNA、およびタンパク質などのメチル化を支えている重要な代謝物質であるほか、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。また、産業上有用なメチル化物質も多く存在し、それら化合物の効率的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、メチル化酵素の活性や SAM 供給活性に対するスクリーニング系の不在により、細胞宿主のメチル化能の高い宿主細胞や高活性メチル化酵素の開発は進んでいない。上記背景のもと、本論文では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、および基質や生成物を問わず 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。その結果、細胞内の SAM 濃度、および SAM の消費活性を検知する新規バイオセンサを創出するとともに、それらをスクリーニングツールとして利用した SAM 合成酵素やメチル化酵素の機能改良に成功した。

以下、各章の評価を述べる。

第一章では、細胞生理におけるメチル化の役割や SAM と関連する代謝経路を概説し、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包括的に整理し、宿主細胞の SAM 供給力不足とメチル化酵素の活性不足がメチル化物質の生産ボトルネックである可能性を詳細に論じている。SAM 供給力を高める未知の遺伝的要素の探索およびメチル化酵素の活性 (SAM 消費力) を向上させるためのバイオセンサの必要性を指摘している。

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ている。転写開始頻度の高い構成型プロモータ周辺の様々な位置に、MetJ の結合 DNA 配列 (metbox) を配置した MetJ 応答性プロモータを複数設計し、それらが細胞内の SAM 濃度変化に良好な応答性を示すことを実証した。SAM センシングに必要な全遺伝子要素を搭載したプラスミド型 SAM バイオセンサの初めての開発例であり、汎用的な細胞生理学ツールとして学術的にも工業的にも価値があると評価できる。

第三章では、バイオセンサの高感度化および信頼性向上を実現する新規な方法論として、TI (transcriptional interference) という現象の利用を検討している。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 ポリメラーゼ同士が衝突を起こし遺伝子発現が相互抑制される。本研究では、抑制型転写因子 MetJ プロモータの SAM による ON/OFF 制御によって、対向する構成型プロモータの出力レベルを正反対に応答させ得ることを発見した。この発見をさらに発展させ、対向したプロモータのそれぞれの制御下に配置した蛍光波長の異なる蛍光タンパク質の蛍光強度比をとることによって、(1) 実質的な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を著しく減少させることができること、を実証した。ここで提案されたセンサ構成は、あらゆる転写制御系に適用できる普遍的なものであり、それらの高性能化および堅牢化に貢献する重要な成果であると評価できる。さらに本章では、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、センサの示す蛍光強度変化を指標に、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利用可能であることも実証している。

第四章では、新規な細胞内活性の検出系の開発について述べている。具体的には、細胞内のポルフィリン代謝経路を改変し、メチル化反応に依存するかたちで桃色蛍光色素 trimethylpyrrocorphin を蓄積する大腸菌を作出した。そして、この trimethylpyrrocorphin に由来する細胞蛍光は、共存させたメチル化酵素の SAM 消費活性にしたがって減少することを実証した。そして L-histidine N-methyltransferase の反応ポケットにランダム変異を導入して作製した多様な変異体群の中から、これらを発現する大腸菌コロニーの蛍光色の変化だけを頼りに、L-leucine や L-phenylglycine をトリメチル化してベタイン化する新規酵素活性の取得に成功している。本系は、基質や生産物の別を問わず、あらゆるメチル化酵素の活性改良に応用できる普遍的なスクリーニング原理として、学術的にも工業的にも価値が高い。

第五章では、本論文の研究成果を総括した上で、今後のメチル化物質生産研究を展望し、細胞内 SAM 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、的確に論じている。

以上、申請者は、微生物細胞内の SAM 濃度の変化を検知するバイオセンサ系を構築し、微生物育種や酵素改良のためのスクリーニングツールとして利用可能であることを示した。本論文の成果は、重要代謝化合物 SAM の非破壊、リアルタイム、および一細胞レベルでのモニタリングツールを提供するのみならず、センサ出力の反転や堅牢化を可能とする新規技術を提案した点において、合成生物学分野の発展に寄与するものと高く評価できる。よって、本論文を博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

2024年2月

審査員

(主査) 早稲田大学教授 博士(工学) (九州大学) 梅野 太輔

早稲田大学教授 工学博士 (早稲田大学) 木野 邦器

早稲田大学教授 工学博士 (早稲田大学) 桐村 光太郎

早稲田大学教授 博士(工学) (早稲田大学) 小柳津 研一