

「進化分子工学的手法によるバクテリアバイオセンサーの機能改変」

国立研究開発法人 情報通信研究機構 未来 ICT 研究所

佐川 貴志

1 研究の背景と目的

近年、線虫の化学物質応答を利用したガン診断技術に代表されるように、生物の化学物質検出能力を利用した分子センシング技術が注目を集めている。一方で、これまで申請者らは遺伝子組み換えによる機能改変や培養が容易な微生物であるバクテリアを利用した化学物質センシング技術の開発に取り組んでおり、現段階で構造の類似したアミノ酸の種類を判別することが可能なセンシングシステムを開発することに成功している（論文投稿準備中）。この結果は、僅か原子数個分の違いに起因する、化学物質の微小な立体構造の違いを判別できていることを示しており、生物を使った分子センシング技術の大きな可能性を示唆するものである。しかしながら、現状の微生物センサーは、微生物にもともと備わっている受容体を化学物質の検出器として利用しているため、ごく一部の化学物質しか検出することができなかった。ガンのような特定の疾患の診断や、アミノ酸の判別だけではなく、環境測定や食品検査など、幅広い分野において微生物センサーの社会展開を実現するためには、任意の化学物質を認識することができる微生物センサーを設計するための技術が必須である。そこで我々は、遺伝子組み換えによるタンパク質の機能改変が最も容易にできる大腸菌に注目した。本申請における研究の目的は、大腸菌の化学物質の受容器である走化性受容体の化学物質特異性を、遺伝子操作の手法である進化分子工学的手法により改変することで、任意の化学物質に応答することができるバクテリアセンサーを構築する手法を開発することである。

2 研究方法・研究内容

I 走化性受容体の変異ライブラリの構築

最初に、様々な化学物質に応答する大腸菌群を構築するために、遺伝子にランダムな変異を導入する手法である Error-Prone PCR を用いることで、大腸菌の走化性受容体の機能改変を行う。走化性受容体は大腸菌の走化性を制御するための化学検出器であり、大腸菌は走化性受容体が検出した環境中の化学物質に応じて、べん毛モーターの回転方向を制御することで好ましい環境に向かって遊泳していく。したがって、走化性受容体の化学物質認識特異性を制御することで、バクテリアバイオセンサーとしての大腸菌の化学物質認識特性を改変することができる。

本研究では、走化性製受容体の発現プラスミドを構築し（図 1A）、プラスミド上における走化性受容体の遺伝子に Error Prone PCR によるランダムな遺伝子変異を加えることで、多種多様な化学物質認識特性を持つ受容体を発現させることができる変異プラスミドライブラリを構築する（図 1B）。変異プラスミドライブラリを走化性受容体の遺伝子を欠失した細胞に取り込ませることで（図 1C）、様々な化学物質に向かって遊泳することができる大腸菌群を構築する（図 1D）。

II. バクテリアの走化性を利用した個体選別法の確立

次に、大腸菌の走化性を利用したバクテリアバイオセンサーの選別法を確立する。走化性は生物が特定の化学物質に向かって集合（あるいは逃避）する性質であり、大腸菌も溶液環境中において誘引物質に向かって遊泳する。すなわち、様々な化学物質を誘引物質として認識する大腸菌群を構築し、その中から標的分子である任意の化学物質に向かって泳いできた個体を選出することで、目的の化学物質に応答する個体の

みを選別することが可能であると考えられる(図2A)。本研究では、軟寒天培地を用いたスクリーニング用のプレートを用いてバクテリアバイオセンサーの選出を行う。図2Bは、一日培養したスクリーニング用の軟寒天プレートの写真である。培養を行う前に、野生型大腸菌の菌液(○)と誘引物質(□)を、プレート上に距離を離して滴下している。写真中の白濁は、滴下された大腸菌の細胞集団を示す。写真の矢印が示すように、滴下された大腸菌(○)は誘引物質が滴下された地点(□)に向かって遊泳する。すなわち、誘引物質を滴下した地点(□)の軟寒天をピペットで吸い取ることで、誘引物質に集まってきた個体のみを選出することができる。II. で作成されたスクリーニング用のプレートを用いて、I. で構築された細胞集団から標的分子に集合してきた個体を収集することで、目的の化学物質に応答するバクテリアバイオセンサーを選別する。

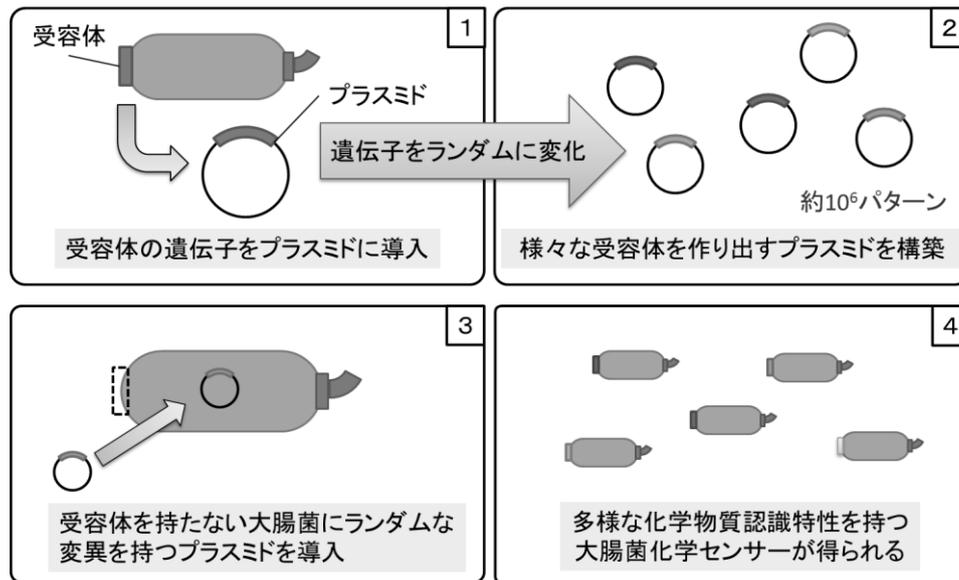


図1: Error-Prone PCRによるプラスミドライブラリの構築と細胞への導入

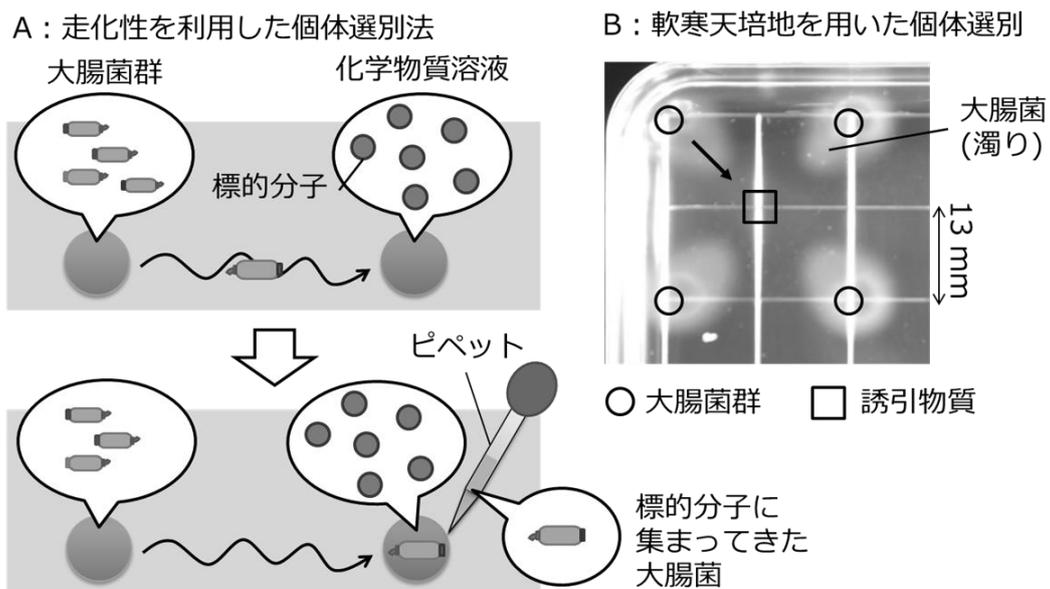


図2: 大腸菌の走化性を利用したバイオセンサー選別法

3 研究成果

本研究では、任意の化学物質に応答できるバクテリアセンサーを作成するため、走化性受容体の化学物質特異性を分子進化工学的手法により改変しようと試みた。まず、最初に申請者らは大腸菌の L-アスパラギン酸受容体である Tar をその他のアミノ酸、ピルビン酸（酒造のマーカー）、リン酸エタノールアミン（うつ病のバイオマーカー）に応答できる受容体に改変しようと試みた。Tar の化学物質認識ドメインに特異的にランダムな変異を加えた変異ライブラリをエラープローン PCR により作成した（図 1）。変異ライブラリの作成には GeneMorph II Random Mutagenesis kit (Agilent Technologies) を使用し、ライブラリの大きさは約 10^6 であった。変異ライブラリを保有する細胞集団から、走化性を指標とした細胞選別法（図 2A）を用いてアミノ酸に応答する細胞を選別したところ、特異性の改変は見られなかった。この結果は、変異ライブラリの大きさ（ $\sim 10^6$ ）が受容体の特異性改変を実現するためには不十分であったためと考えられる。

そこで申請者は、より大きなサイズの変異ライブラリを容易に作成するために、細胞内でプラスミドに直接変異を導入する細胞内進化の手法を用いて変異ライブラリを構築しようと試みた。今回、申請の段階で計画していた変異ライブラリの作成方法は、PCR を用いて *in vitro* において変異ライブラリを作成し、変異ライブラリを細胞内に形質転換したうえで細胞の振る舞いを指標とした *in vivo* のスクリーニングを行う。しかしながら、*in vitro* で大きなライブラリを構築できても、プラスミドの形質転換効率が悪いために最終的なライブラリのサイズには制限がある（ $< 10^6$ ）。一方で、細胞内進化は標的遺伝子への変異導入を細胞内で行うために、形質転換効率の低さに由来するライブラリサイズの制限が無くなり、より大きな変異ライブラリを構築できると期待される。今回は、エラーを起こしがちな DNA 合成酵素である Error Prone polymerase I (EP PolI) を用いた two plasmid system を採用した^[1]。Two plasmid system は、EP polI 発現プラスミドと、変異を導入したい遺伝子を保有する ColE1 型の複製起点を保有するプラスミド（ターゲットプラスミド）の二つを細胞に形質転換する。DNA polymerase I は ColE1 型の複製起点を保有するプラスミドの複製を行うために、two plasmid system において EP polI によりターゲットプラスミドが複製される。したがって、ターゲットプラスミド上の遺伝子に特異的に変異を導入することが可能である。

JS200 は EP polI を用いた two plasmid system で用いる大腸菌宿主であり、ゲノム DNA 上の polymerase I の遺伝子発現を温度依存的に制御することで、変異を導入率が低い WT polI と変異導入率が高い EP polI の発現を切り替えることができる。本研究では、細胞の走化性を指標とした個体選別を行うために、細胞内進化を行うための宿主が走化性を示す必要がある。そこで、JS200 が走化性を保有する細胞であるかどうかを調べるために、走化性を評価するためのアッセイである軟寒天培地を用いた swarm assay を行った。Swarm assay の結果、JS200 は走化性を持たない菌株である事が明らかになり、今回の個体選別を行う大腸菌宿主として不適切である事が分かった。

このように、two plasmid system の最大の欠点は、大腸菌宿主に制限がある事である。申請者は two plasmid system の宿主の制限を緩和するために、JS200 以外の株へ two plasmid system を適用しようと試みた。UU2612 は走化性において野生型の表現型を示す RP437 をベースに走化性受容体の遺伝子を欠失させた菌株であり、今回の個体選別において実際に使用されている。UU2612 は JS200 と異なり、温度依存的に WT polI と EP polI の発現を切り替える事ができないため、常に WT polI と EP polI が共発現している状態になる。そのため、JS200 と比較して、JS200 は EP polI による変異導入率

がより低くなると考えられる。しかしながら、UU2612 に EP polI 発現プラスミドを形質転換し、ターゲットへの変異導入率を定量したところ、予想に反して変異導入率の低下は JS200 の 1/5 程度であった (表 1)。また、実際に個体選別を行う際の培養条件である、貧栄養条件 (M63 培地) で培養を行った場合でも、変異導入率は富栄養条件における値と変わらなかった。貧栄養条件で培養した場合における変異ライブラリの大きさを定量したところ、 10^7 オーダーであった。この数字は、あくまでスクリーニングを開始した時点のライブラリのサイズであり、細胞内進化の場合は、プラスミドが複製、すなわち細胞分裂の度に標的遺伝子に変異が入り続けるため、実効のライブラリのサイズは 1 オーダー以上大きくなると期待される ($>10^8$)。したがって、本研究により① JS200 以外の大腸菌宿主を用いた場合でも、two plasmid system による変異導入は有効、② 細胞内進化のアプローチを用いることで、Error prone PCR と比較してより大きなライブラリがより平易に構築できることが明らかになった。

最後に、UU2612 に EP polI による細胞内進化を適用した系を用いて、走化性受容体の細胞内進化に取り組んだ。EP polI の発現プラスミドと、走化性受容体の発現プラスミドの両方を UU2612 に形質転換し、軟寒天培地を用いたスクリーニングを 5 サイクル行ったところ、EP polI を発現しないコントロールと比較して細胞集団の遊泳パターンがより直線的になる結果が得られた (図 3)。この結果は、選別された個体が標的分子に対してより特異的に応答する受容体を保有しているため、標的分子の滴下地点に向かって明確な方向性をもって遊泳した結果であると考えられる。現在、スクリーニングされた受容体の標的分子への感度を定量中である。

表 1. Two plasmid system による標的遺伝子への変異導入率

宿主	培地 (温度)	走化性	変異導入率 ($\times 10^{-8}$ cell)	Repellence
JS200	2xYT (37°C)	-	1.9×10^5	[1]
UU2612	2xYT (37°C)	+	3.7×10^4	This study
UU2612	M63 (30°C)	+	4.1×10^4	This study

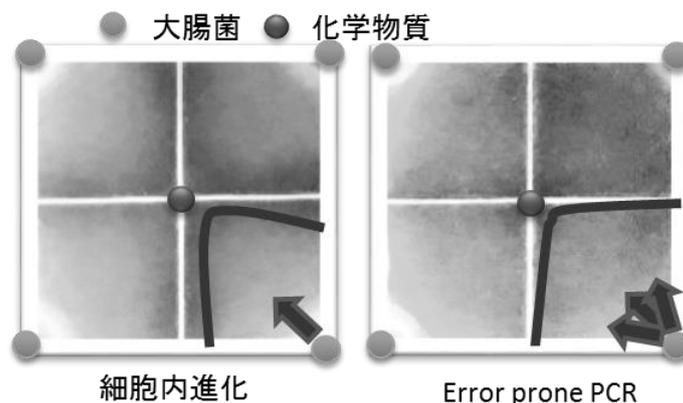


図 3. スクリーニングされた細胞の走化性の比較 (5 サイクル目)

[1] Camps M, Naukkarinen J, Johnson BP, Loeb LA (2003) Targeted gene evolution in Escherichia coli using a highly error-prone DNA polymerase I. Proc Natl Acad Sci U S A 100(17):9727-9732.

4 生活や産業への貢献および波及効果

大腸菌を用いたバクテリアセンサーは、線虫を用いた既存微生物センサーと比較して、遺伝子改変が容易である。そのため、センサーの特異性改変が容易に行えると期待され、幅広い分野に対して潜在的な社会展開の可能性を秘めている。本研究では、分子進化工学的手法によりバクテリアセンサーにおけるセンサータンパク質である走化性受容体の特異性改変技術の開発に取り組み、細胞内進化を利用した汎用で平易な変異導入法を開発することができた。本研究により開発された変異導入法は、two plasmid systemやXL-1 red (Agilent Technologies) のような従来のmutator strainの問題点である、宿主の制限を大幅に軽減することに成功した。本手法がより平易なタンパク質の機能改変法として応用される事を期待する。