

遺伝子スイッチの進化工学と遺伝子発現誘導系への応用

梅野 太輔

千葉大学大学院 工学研究院

研究の目的

発酵生産などにおいては、十分な菌密度に達するまでの「増殖モード」と、できるだけ多くの炭素源を有価物質の生産に振り向ける「物質生産モード」の両者をタイミングよく切り換え、生産プロセス全体の最適化がはかられる。研究室レベルでは、アラビノース誘導系、テトラサイクリン誘導系など、切れ味の良い転写誘導系が幾つか知られており、これをつかって生合成酵素群の発現誘導を切れ味良く行うことも可能である。しかしこれらは誘導剤が高価であるため、化成品などグラム単価の低い化合物の生産プロセスなどには使えない。本研究では、安全・安価な誘導物質を用いた切れ味良い誘導系を開発・改良し、大スケールでの実使用に耐える遺伝子誘導系を完成させることを目指した。

方法

本研究においては、大腸菌において、2つの遺伝子誘導系の改良を行った。

(1) コリン誘導系の超高感度化

コリンは卵黄成分として知られる安全な化合物であり、大量に入手可能な安価な化合物でもある。大腸菌の浸透圧応答のひとつとして、このコリンを分解しグリシンベタインに転化する。この機構を担う **Bet** オペロンには、コリン応答リプレッサ **BetI** が存在する。我々は最近、この進化工学的手法を用いて **BetI** を改良し、緊縮性がたかく、かつ発現強度の強い転写誘導系を開発した^{1) 2)}。しかし、本系には、じつに 10mM ものコリンを要するという問題があった。

本研究では、コリンの取り込みに関わるインポーター、**BetT** をプラスミド発現させることにした。また、細胞内に入ったコリンを代謝させずに残留・蓄積させるため、これをベタインに転化する **BetAB** のノックアウトも試みた。次に、**Bet** プロモータの制御下に緑色蛍光タンパク質 **sfGFP** を配置したレポータ系を作製した。これらのプラスミドで共形質転換された大腸菌の細胞あたりの蛍光強度のコリン濃度依存性をモニターすることによって、上で作製した種々の誘導系の性能評価を行った。

(2) トリプトファン誘導系の出力強化

安全・安価な誘導剤になり得る物質のひとつとして、アミノ酸が挙げられる。なかでもトリプトファン誘導系 (**TrpR/ TrpP**) は、インシュリンの大腸菌生産に使われるなど、実績ある古典的誘導系である。大腸菌の場合、内在の **TrpR** では僅かに

漏出するうえ、インドール酢酸添加による発現誘導時の誘導強度に大いに改良の余地がある。本研究では、その性能面での改良を試みることにした。

Trp プロモータの配列をみると、誘導強度に影響があると云われる-10 配列が、TrpR の結合配列と重複しており、そのため、コンセンサス配列から少なからず外れていることに着目した。この部位をなす3つの塩基をランダム化した。また、大腸菌の Trp プロモータは、TrpR 二量体が3対、協奏的に結合してプロモータへのポリメラーゼ結合を阻害する形式をとる。3つの TrpR 結合サイト (TrpO) のうち、最上流配列は TrpR のコンセンサス配列 (GNACT: NはA,G,T,Cの等モル混合物) から有意に外れていた。この部分の2つの塩基にもランダム化を施し、合計 $4^5=1,024$ 通りの多様性をもつミニライブラリを構築した。得たライブラリを大腸菌に形質転換し、GFP 発現強度が強く、そして最も強いものを選抜した。

結果

(1) コリン誘導系を3,600倍高感度化できた

研究開始時に我々が保有していたコリン誘導システム (ver.1) は、10mM 以上のコリンを培地に足して初めて誘導がかかるものであった。これでは、せっかく安価 (1kg で 500 円程度) なコリンであるが、培地 1L あたり 200 円近くかかる計算になる。BetT をプラスミド発現させると、誘導に要するコリンの添加濃度は2桁程度落ち、その EC50 (最大誘導レベルの 50% に達するのに要するコリン濃度) は 0.09mM となった (ver.2) (図1)。1L 培地あたりの誘導剤コストは、2 円程度となる計算である。さらに、このシステムを BetA 欠損株に導入すると (ver.3)、その応答濃度はさらに一桁以上下がり、4.5 μ M となった。こうして、事実上、誘導剤コストはほぼ無視できる誘導系が完成した。なお、コリン誘導系の応答感度の向上に伴う緊縮性の低下 (漏出發現) などにはとくに影響がなかった。ただし、トリプトンなど天然培地には、サブ mM レベルのコリンが含まれているため、ver.3 は常に誘導状態になってしまう。Ver.2 であれば、緊縮性を犠牲にせずコリン誘導できることを確認済みである。

(2) トリプトファン応答系の改良

作製したミニライブラリはわずか $4^5=1,024$ 種類の配列しか持たないながら、そのスイッチ特性における多様性は大きであった (図2)。緊縮性を犠牲にすることなく、さまざま ON/OFF 比を持つ優れたトリプトファン誘導系 (野生型を ON/OFF 比で一桁以上うわまわるものを含む) をシリーズで作製することができた。

結論

自然界には数多くの転写因子が知られており、これらを使えば、さまざまな分子を入力とした遺伝子発現の ON/OFF 制御が可能である。しかしこれらの転写因子のス

スイッチ挙動は、細胞の生理ネットワークの一部をなすものであるため、そのままのシステムを用いた遺伝子誘導は、同時に生理応答をも伴うものである。我々の開発した遺伝子スイッチや回路の進化デザインプラットフォーム^{3) 4)}を用いれば、さまざまな遺伝子誘導系に、実用に適したスイッチ特性を与えることができる。本研究の成果を、浸透圧応答系や有機酸、光応答系などに拡張してゆき、多様化する微生物生産プラットフォームに柔軟に対応した安全・安価・高性能な遺伝子誘導系をオンデマンド供給してゆきたい。

文献

- 1) Ike K., et al.: Evolutionary design of choline- inducible and -repressible T7-based induction systems. *ACS Synthetic Biology*, 4, 1352-1360 (2015).
- 2) Saeki, K, et al.: Rapid diversification of BetI-based transcriptional switches for the control of biosynthetic pathways and genetic circuits. *ACS Synthetic Biology*, 5, 1201-1210 (2016).
- 3) Tominaga M, et al.: Rapid and liquid-based selection of genetic switches using nucleoside kinase fused with aminoglycoside phosphotransferase. *PLOS One*, 10, e0120243, 1-11 (2015).
- 4) K. Ike and Umeno D: Nucleotide kinase-based selection system for genetic switches: *Methods in Mol Biol*, 1111, 141-152 (2014).

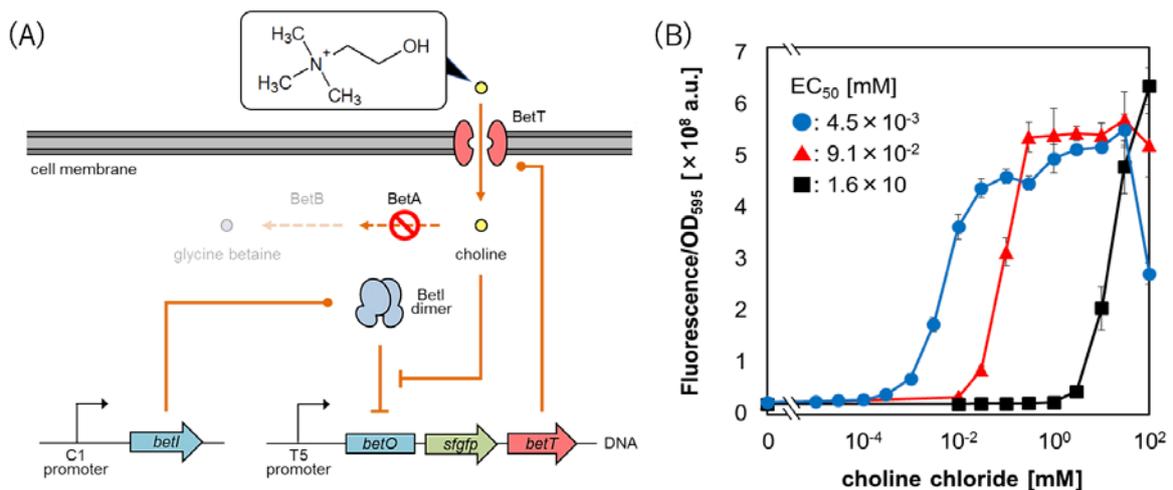


図1 コリン誘導系の改良 (A) コリン誘導系 T5 プロモータ直下に BetI の結合サイト betO が配置されており、コリン不在下では下流遺伝子が非誘導状態にある。培地にコリンを添加すると、コリンと結合した BetI が構造変化を起こし、BetO から脱着して標的タンパク質（ここでは GFP）の転写が亢進する。Ver.2 システムで

