

## 海水微量成分分析のための Whole Cell Sensor 開発

梅野 太輔

早稲田大学大学院理工学術院応用化学専攻

**概要** 化学工業の著しい成長に伴い、様々な有毒な成分による河川・土壌汚染が世界じゅうで進行しており、各種有害分子の海水への流れ込みも深刻化しつつある。日本では、海水を濃縮・電気分解ミネラルや塩分の取得源としている。使う海水における重金属や毒性物質(ヒソなど)の不在を迅速・正確に確認する必要がある。本研究では、とくに各種重金属イオンを標的とした Whole cell sensor の制作を目標とした。金属イオンが細胞膜を通過できないため、膜内外の情報伝達性能を担う人工たんぱく質の自在な構築技術の開発を試みることにした。とくに、デザイン困難なアロステリデザインをさけ、Ligand-induced Folding という現象に着目したセンサー構成を考案した。

まず私たちは、膜タンパク質の膜外ドメインに酵素や金属結合タンパク質を提示し、その接合部にランダム変異による適度な不安定化を施すことによって、膜タンパク質の機能を、外側に提示したタンパク質や酵素のリガンド・基質に依存的にふるまうよう再デザインすることに成功した。

次に、膜タンパク質の膜内に配向するように、転写因子などのサイトソールタンパク質をテザリングした。するとこのサイトソールタンパク質機能も、細胞外部に提示したタンパク質のリガンド・酵素の相互作用標的に依存してオンオフできた。外部のタンパク質を取り替えることによって、自由度高く、細胞外→膜貫通タンパク質→細胞内機能への人工情報伝達系が迅速に構成できるようになった。

### 1. 研究目的

発展途上国の化学工業の著しい成長に伴い、様々な有毒な成分による河川・土壌汚染が世界中で進行しており、各種有害分子の海水への流れ込みも深刻化しつつある。日本では、海水を濃縮・電気分解ミネラルや塩分の取得源としている。使う海水における重金属や毒性物質(ヒソなど)の不在を迅速・正確に確認する必要がある。

海水中のイオン組成などは、融合適合プラズマ分析法(ICP-MS)などの機器分析技術によって、元素によっては ppt (pg/mL あるいは  $10^{-14}$  mol/L) レベルに迫る高感度検出が可能である。しかしこれらは、高額機器・施設に依存したコストの高い測定形態であり、もちろんフィールドワークなどには向かない。

究極の携行性をもつものとして、しばしばバイオセンサーが取り沙汰されるが、なかなか実用性能が出ないことが

問題となる。本研究は、各種重金属イオンを標的とした Whole cell sensor の制作(図 1)に挑んだ。

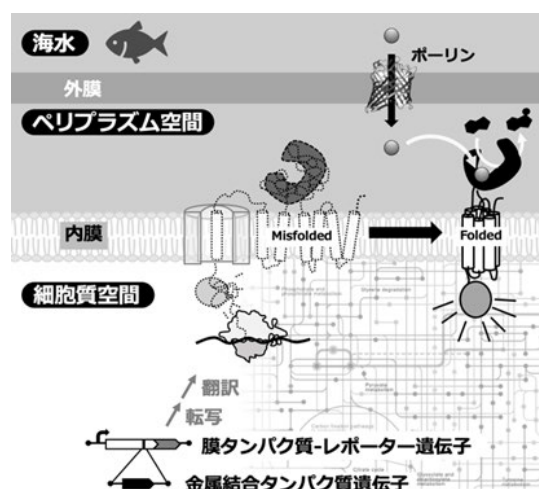


図 1 本研究の概要

本研究では、このような、膜内外の情報伝達性能を担う人工たんぱく質の自在な構築ができる、全く新しい技術の開発を試みることにした。タンパク質のアロステリックデザインは、数多くの相互作用しあうアミノ酸のふるまいをデザインする究極の「多体問題」であると同時に、複数の状態間の遷移をデザインする「4次元デザイン問題」でもある。最近では、計算機科学を駆使することによって、GPCRのアロステリックシグナルの再デザイン<sup>5)</sup>や二成分系シグナルの再配線<sup>6)</sup>などを力技で実現した報告も出始めているものの、センサータンパク質の自由な設計は、いまだ極めてハードルの高い挑戦である。海水に含まれる成分は多岐にわたる:ヒ素や重金属などの毒物に加え、ウランやバナジウム、ヨウ素などの価値の高い元素、そして数多くの有機物が海水モニタリングの標的になり得る。このことを考えれば、そのセンサーは、標的自由度が高く、そしてアロステリックデザインを回避するかたちで設計することが理想であると考えた。

上記をふまえ、我々は、Ligand-induced Folding という現象に着目したセンサー構成を考案した。センサー素子として進化してきたタンパク質とは異なり、酵素などのタンパク質の多くは、標的分子(リガンドや基質)との結合によって、読み出し可能な構造変化をしない。しかし、選択的かつ安定な標的分子との複合化能はもちあわせている。つまり、あらゆるタンパク質は、標的分子との特異的な相互作用によって、大きな安定化を受ける。この「安定化」を読み出すメカニズムが、Ligand-induced folding である。タンパク質はランダムなアミノ酸置換(変異)によって不安定化しやすい。私たちは、適度に不安定化させることによって、タンパク質の多くが Ligand 不在では Folding できず、Ligand があるときだけ、機能構造をとれる状態にできること<sup>7)</sup>、この現象が遺伝子レベルで融合した様々なタンパク質の細胞内機能をオンオフできることを見出した<sup>8)</sup>(図2)。

この現象を使うことによって、さまざまなタンパク質~酵素さえも!~をセンサーの素子とし、アロステリックデザインをまったくせずに、センサーが迅速に構築できるようになった<sup>9)</sup>。本研究では、この Ligand-induced folding を膜貫通タンパク質に適用することにした(図1)。

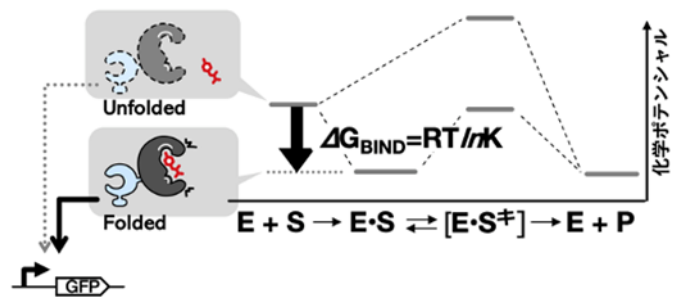


図2 Ligand-induced folding というセンサー原理

## 2. 研究方法

我々のデザインしたセンサー構成を図3に示す。センサーの「情報伝達部」となる膜貫通タンパク質として、TetAというタンパク質を選んだ。このタンパク質は、いわゆる微生物の多薬剤耐性を担うタンパク質であり、抗生物質テトラサイクリンなど排出する輸送タンパク質である。情報伝達とは、おおよそ関係のない機能を持つタンパク質であるが、その機能構造の形成の成否が簡単に読み出せることから選出した。すなわち、TetA が正しくフォールディングできるとき、この遺伝子を導入した微生物宿主は、テトラサイクリンを含む培地で増殖できる。興味深いことに、このTetA が機能発揮するとき、宿主菌はニッケルやコバルト、カドミウムなどに対しては、逆に感受性を示すようになるという。TetA は、薬剤の細胞外への放出の際、プロトンを細胞内に引き込む「対向型」輸送タンパク質であるが、このプロトンのかわりに、高濃度のときに限り、これらの金属イオンが引き込まれることが原因らしい。ゆえに、TetA がフォールディングしている状態に対しても、フォールディングできない状態に対しても、選抜をかけることが可能である。これは、センサーの感度やSwitching性能のチューニングなどに極めて有用な特質である。

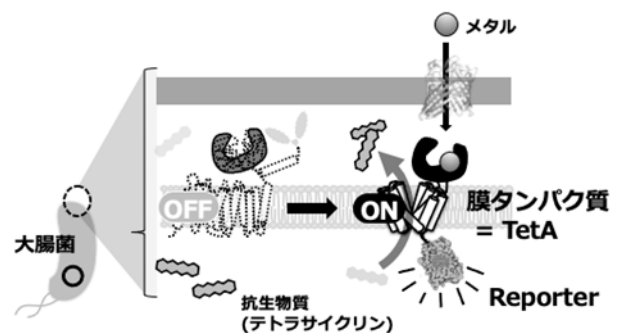


図3 本研究 Whole cell sensor の基本構成

### 3. 研究結果

#### 3.1 Display 技術の完成

TetA は 12 のアルファヘリックスをもつ「12 回貫通型」のタンパク質であり、細胞外に 6 つ、細胞内に 5 つの「ループ」をもつ。我々は、細胞外(ペリプラズム空間)側へのタンパク質の提示(ディスプレイ)可否を調べる最初の実験として、アルカリフォスファターゼ(PhoA)を選んだ。この酵素は、ELISA アッセイなどで多用する診断酵素である。この酵素の基質となるリン酸化された有機物は、イオン性をもつため細胞内に入ることはない。細胞外に正しく配置されたときのみその活性を「みる」ことができる。このタンパク質の遺伝子を、TetA の 4 つの膜外ループ (P2, P3, P5, P6) に in frame で挿入したものを大腸菌株に導入し、得られた形質転換体のアルカリフォスファターゼ活性を調べた(図 4)。

その結果、試した 4 つ全てのループにおいて、挿入した PhoA は正しく機能することがわかった。大腸菌のペリプラズム空間は、細胞内側の代謝ネットワークとは全く隔離しているが、ポーリンという外膜タンパク質によって、ほぼ完全に外界(培地~ゆくゆくは海水)とほぼ同じ組成となる。実際、BCIP というアルカリフォスファターゼ基質を培地に添加すると、PhoA を挿入した TetA(TetA::PhoA)を発現する大腸菌は濃青色のコロニーを形成した。細胞質側に PhoA 遺伝子を挿入した場合はこの呈色反応は観察されなかった。なお、TetA の C 末端には、蛍光タンパク質 GFP を遺伝子レベルで融合した。蛍光顕微鏡で観察したところ、正しく細胞膜に蛍光が局在していることが確認できた。以上、TetA は正しく細胞膜にてフォールディングしており、そのペリプラズム側に PhoA を活性な状態で提示できていたことがわかった。

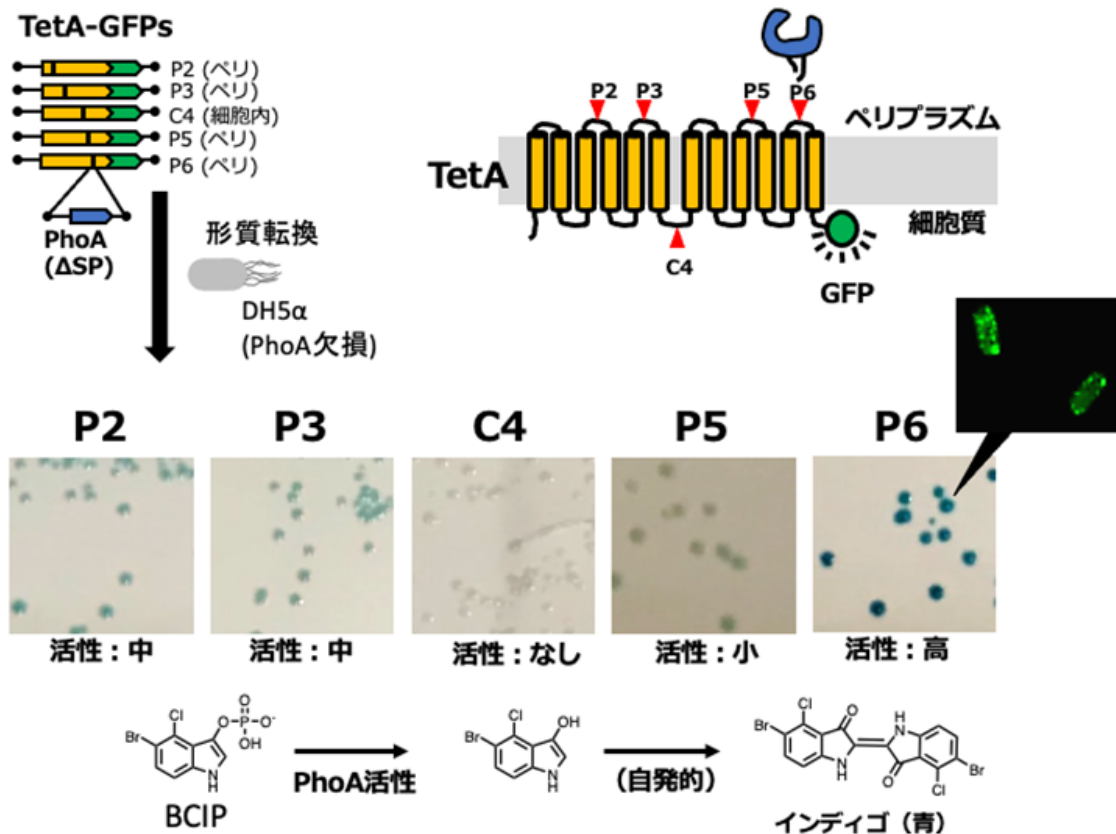


図 4 TetA::PhoA 融合体の機能確認

### 3. 2 Displayされた酵素の実験室内進化

ちなみに、アルカリフォスファターゼ(PhoA)は、診断用酵素としてさまざまなシーンで使われている酵素である。しかるに、そのフォールディングは2つのS-S結合に依存するうえ、活性に金属補酵素を要する酵素である。サンプルの状態や診断環境によって、安定な活性が得られないこともあり、その実用活性には改良の余地がある。我々は、このPhoAの実用活性を「TetAにテザリングされた状態で」進化工学することを試みることにした。

具体的には、PhoAの遺伝子全域にエラープローンPCR法によってランダム変異を導入して遺伝型を多様化させ、得られたPhoAライブラリをTetA-GFPのP3ループに導入した。こうして得た遺伝子を大腸菌に導入した。形質転換体を、BCIP(比色基質; 図4)を含む寒天培地の上でコロニー形成させた(図5)。

数百のコロニーにひとつ程度、親よりも明らかに青色の濃いコロニーが現れた。これらはより高い活性を持つ

PhoA変異体をコードしているものと期待された。そこでこれらを単離・DNA回収し、その遺伝型を調べるとともに、簡易キネティクス解析を行った(図6)ところ、確かにこれらは野生型よりも高い活性をしめすとともに、触媒活性部位周辺にアミノ酸置換が認められた。

このことは極めて重要な意味を有する:我々が作出したTetAシステムは、正しくタンパク質をペリプラズム側に提示し、細胞外環境と同じ環境で活性を、一切そのタンパク質を精製することなく調べることができる。ゆえに数千数万の酵素変異体「ライブラリ」を提示した場合、どの変異体が一番優秀なのかを迅速に選び出すことができることになる。さらに本系ではPhoAは、細胞外にありながら、ペリプラズムという保護された空間で保護されている。しかもTetAという命綱によって、物理的に細胞内に繋がっている。あたかも、親の仕送りを受けつつ親もと離れて自由環境をエンジョイする大学生さながら、「至れり尽くせり」の進化アリーナを、本技術は提供できることになる。

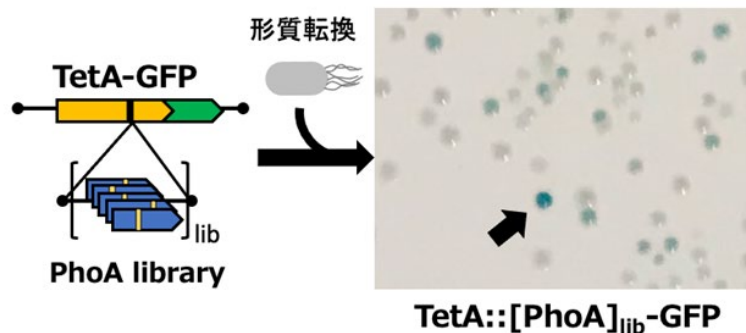


図5 TetAにつながったままPhoAの活性を「進化」させる

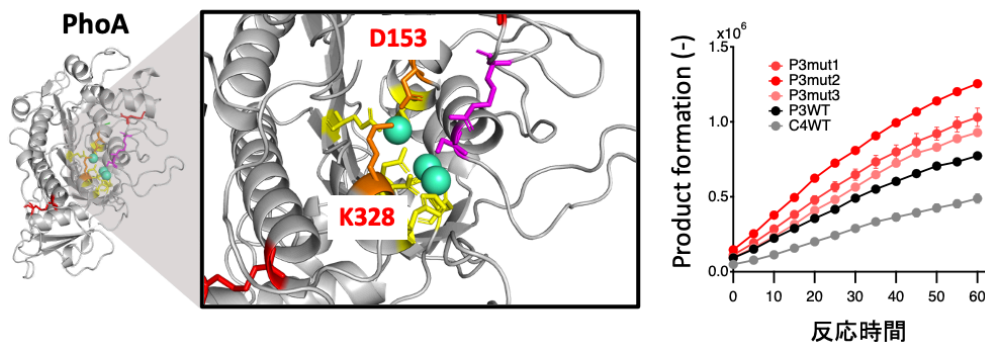


図6 高活性なPhoA変異体



### 3.3 センサーとしての TetA の振る舞い

次に我々は, TetA の機能を PhoA のフォールディングに依存的に改造することにした。図 2 に示すように, 適度に不安定化させることによって, あらゆるタンパク質は自立的なフォールディング能を失い, なんらかの安定化効果に依存する「条件付きフォールド性」を帯びることがこれまでの研究でわかっている。おそらく, 膜タンパク質も例外ではないはずである。この「適度な不安定化」は, 構造全域へのランダム変異導入によっても実現するだろうが, そもそも TetA というタンパク質の構造の中に異質なタンパク質を挿入する段階で不安定化は起きている。その融合による不安定化の程度を微調整することで「PhoA 依存的な TetA 機能が作れるのではないかと考えた。

そこで図 7 に示すように, その連結部のアミノ酸残基を PhoA の両端で 3 アミノ酸ずつランダム化「連結部ライブラリ」を作成した(理論ライブラリサイズ =  $20^6 = 6400$  万)。

これら大腸菌に導入し, PhoA の基質 BCIP を含む培地でテトラサイクロン耐性を示すものを選抜した。すなわち, 形質転換体をリンカーの存在下, その具体的すように, その連結部のアミノ酸残基を PhoA の両端で 3 アミノ酸ずつランダム化「連結部ライブラリ」を作成した(理論ライブラリサイズ =  $20^6 = 6400$  万)。これら大腸菌に導入し, PhoA の基質 BCIP を含む培地でテトラサイクロン耐性を示すものを選抜した。

こうして選抜されてきた変異体の多くは, TetA 機能に, ある程度の BCIP 依存性が観察された。すなわち, これらを発現する大腸菌株は, BCIP を培地に入れたときのほうが, テトラサイクリンの存在下での細胞増殖速度が高かった(図 8a)。さらに詳しく調べてみると, これらのテトラサイクリン培地での増殖性には, 明らかな BCIP 濃度依存性がみられた(図 8b)。

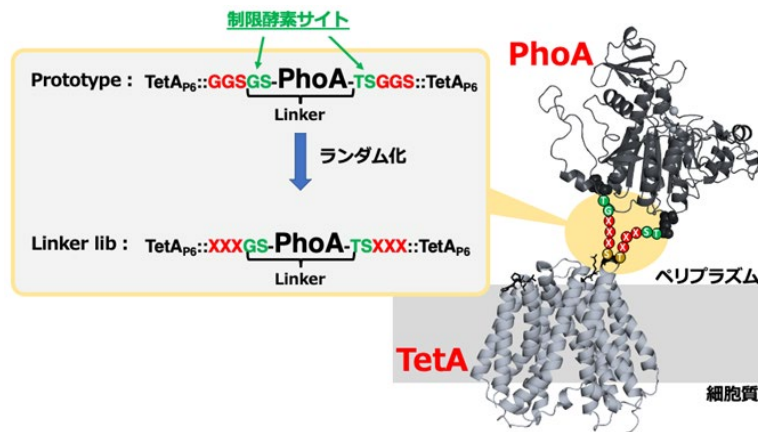


図 7 連結部のランダム化による TetA フォールディングの PhoA 「Addiction」

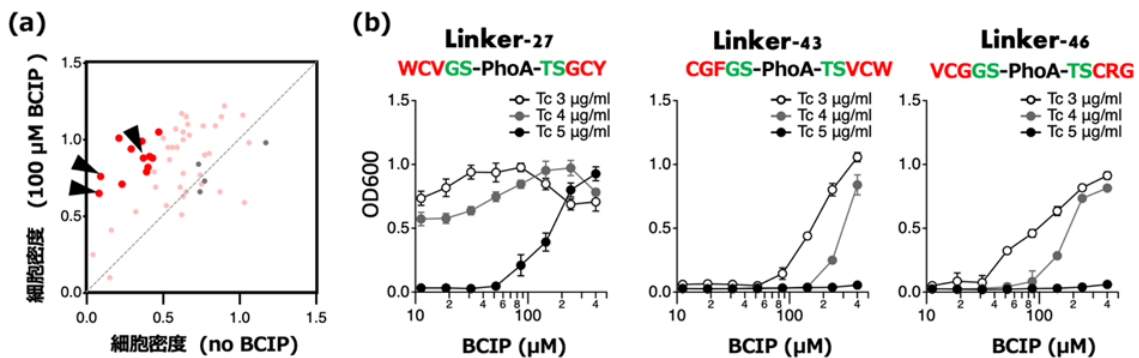


図 8 PhoA 基質のあるとき「だけ」テトラサイクリン耐性を示す TetA

TetA::PhoA 融合タンパク質の TetA 部分の機能が、結合パートナーである PhoA の基質(BCIP)に依存するということはどういうことか。これは、PhoA が基質との結合(相互作用)によって安定化される条件ではじめて、TetA の機能構造形成が許されていることを示している。これは、水溶性の数々の酵素・タンパク質について、我々の研究室が繰り返し示してきた現象であるが<sup>8,9)</sup>、膜タンパク質モチーフでこれを確認するのは本成果が初である。こうして、細胞の外で行われる分子認識イベントが、膜貫通タンパク質の機能のオン・オフとして「見える化」できたことになる。

### 3.4 細胞内部への信号伝達の確立

これらの TetA::PhoA 変異体たちの C 末端側に、GFP ではなく RsiV というタンパク質を遺伝子レベルで融合した。この RsiV というタンパク質は枯草菌の膜ストレス応答に関わるタンパク質であり、SigV プロモータ下流の遺伝子発現を亢進するシグマ因子 SigV というシグマ因子を捕獲・不活性化するアンチシグマ因子である。RsiV の有効濃度(細胞内での数)が多いほど多くの SigV が不活性化されるため、SigV プロモータ下流の遺伝子の発現頻度は低くなる。もし本当に TetA のフォールディングが PhoA の BCIP 結合による安定化に依存しているのであれば、その C 末端にテザリングした RsiV の実効濃度も、BCIP 依存的になると期待される。そしてその BCIP の有効濃度の変化は、SigV プロモータ下流のレポータ遺伝子(蛍光タンパク質)の発現量に翻訳されることとなる。

実際に試してみると、果たして、細胞の出力する蛍光は BCIP 濃度によって大きく変化することが確認できた(図9)。

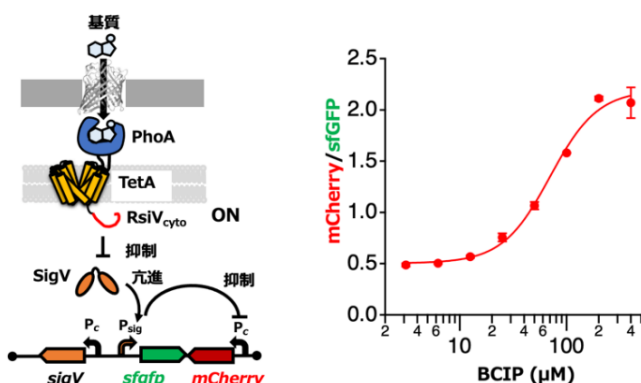


図9 細胞内部の転写因子の機能出力の PhoA 基質(BCIP)に対する応答

ついに、細胞外部での分子認識イベントが、細胞内部に届き、その内部に配置されたタンパク質(RsiV)を介して、遺伝子発現量という細胞内部の分子イベントの調節に使われた瞬間である。TetA::PhoA-RsiV という三元融合体タンパク質は、PhoA の基質結合による安定化を、TetA を介して RsiV に、なんのアロステリック機構も介さず、ダイレクトに伝達することができた。

### 3.5 金属イオンの検知システム

TetA::PhoA-RsiV という三元融合体タンパク質の「細胞外センサーユニット」である PhoA の遺伝子を金属結合タンパク質にスワッピングすることによって、さまざまな金属へのセンサーが構成できるはずである。

我々は、2018年に発見され世界を驚かせた、ランモジュリン(LanM)というタンパク質<sup>10)</sup>に着目した。LanM は、*Methylobacterium extorquens* 由来のランタノイド結合タンパク質(133 aa)で、ペリプラズムに存在する。ランタノイドおよび Y<sup>3+</sup>が存在していない場合、二次構造をほとんど持たないが、10<sup>-9</sup> M 程度のランタノイドが存在している場合、~50%の二次構造を形成するという。このタンパク質はカルシウムセンサーであるカルモジュリンと進化的に近縁な新規タンパク質であり、ランタノイドに極めて高い親和性・選択性で結合できることがわかっている。PhoA とこの LanM を置換して TetA::LanM-RsiV を作成したところ、はたして、SigV プロモータ下流のレポータ遺伝子(蛍光タンパク質)の発現量がネオジム(Nd)などのランタノイドに応答するようになった(図10)。

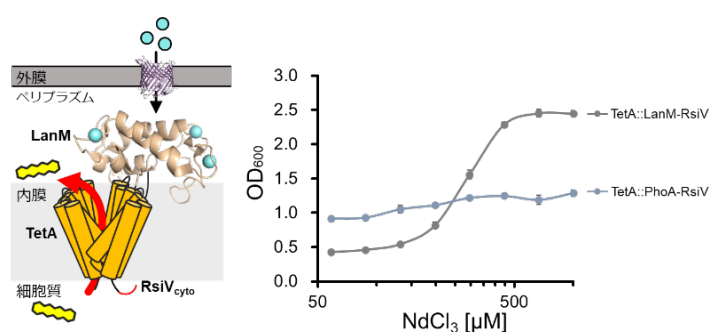


図10 細胞外のランタノイド捕獲の細胞内伝達

#### 4. 考察

海水には無数の分子が溶け込んでおり、これらの濃度を正しく迅速に判定するのは、環境保全や健康維持の観点から重要である。また海水は、ランタノイドや貴金属、ウランなどの稀少資源の漁場でもある。それらは希薄であり、その検出も回収も極めて困難ながら、挑戦する価値のあるテーマだと考える。本研究は、世界ではじめて、究極の携行性をもつ Whole Cell Sensor に「外で感じて細胞内部の機能で出力する」という全く新しいデバイス機能を付与することに成功した。PhoA やランモジュリンのかわりに、世界中で報告のあるさまざま金属結合タンパク質（カドミウム: CadC, 水銀: MerR, 亜鉛: SmtB/ZntR, 銅: CueR, 鉛: PbR, ヒ素: ArsR）などに変更することによって、さまざまな金属へのバイオセンサーをシリーズ開発することができると思われる。細胞内で働く金属結合タンパク質は、共存する無数のタンパク質に競り勝って捕捉するために $\sim 10 \mu\text{M}$ も存在する金属イオンに対して、 $K_D < 10^{-20} \text{ M}^{-1}$ もの結合親和性を実現している<sup>11)</sup>。競合タンパク質不在のペリプラズム空間で、この高すぎる親和性が発揮されれば、世界最高感度の金属イオン検出・定量系の開発が可能となるものと期待される。

#### 5. 文献

- 1) The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics. Q.Gui, T.Lawson, S. Shan, L. Yan, Y. Liu., *Sensors*, 1623 (2017): doi:10.3390/s17071623.
- 2) Whole cell biosensors.: L. Bousse: *Sensors and Actuators B: Chemical*, 34, 270-275 (1996).
- 3) Engineered whole-cell-based biosensors: sensing environmental heavy metal pollutants in water—a review.: S. Kannappan, B.C.M Ramisetty.: *Appl Biochem Biotechnol.*,194, 1814–1840 (2022).
- 4) Structural insights into G-protein-coupled receptor allostery.: Thal, D.M., Glukhova, A., Sexton, P.M. et al.: *Nature*, 559, 45–53 (2018).
- 5) Computational design of G protein-coupled receptor allosteric signal transductions.: K.Y.M. Chen, D. Keri, P. Barth: *Nat. Chem. Biol.*, 16, 77–86 (2020).
- 6) Rewiring bacterial two-component systems by modular DNA-binding domain swapping. S.R. Schmidl, F. Ekness, K. Sofjan, et al.: *Nat. Chem. Biol.*, 15, 690–698 (2019).
- 7) Directed evolution of stringency of the quorum sensor without Off-state selection.: Kimura, Y., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.: *ACS Synth. Biol.*, 9, 567-575 (2020).
- 8) 代謝物センサ及び酵素活性のスクリーニング方法: 梅野太輔, 木村友紀, 野々下芽以: 特願 2020-034548
- 9) 多入力・多出力型遺伝子スイッチおよびその製造方法: 梅野太輔, 木村友紀, 大内恭平, 河合繁子: 特願 2018-057314 (US 16/650,899)
- 10) Lanmodulin: A highly selective lanthanide-binding protein from a Lanthanide-utilizing bacterium.: J.A. Cotruvo Jr., E.R. Featherston, J.A. Mattocks, J.V. Ho, and T.N. Laremore: *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 15056-15061 (2018).
- 11) Extreme zinc-binding thermodynamics of the metal sensor/regulator protein, ZntR.: Y. Hitomi, C. E. Outten, T.V. O'Halloran: *J. Am. Chem.Soc.*, 123, 8614-8615 (2001).

## Whole Cell Sensors for the Detection of Molecules Dissolved in Seawater

Daisuke Umeno

Department of Applied Chemistry, Waseda University

### Summary

With the remarkable growth of the chemical industry, river and soil pollution by various toxic components is progressing throughout the world, and the flow of various harmful molecules into seawater is becoming serious. In Japan, seawater is used as a source of minerals and salt. It is necessary to monitor the presence/absence of heavy metals and toxic substances (e.g., arsenic) in the seawater used for quickly and accurately. In this study, we aimed to create a whole cell sensor that specifically targets various metal ions. Since metal ions cannot pass through cell membranes, we attempted to develop a technology for constructing artificial proteins that can freely transmit the information. We focused on the non-allosteric phenomenon called ligand-induced folding in our sensor configuration.

First, we displayed enzymes and metal-binding proteins on the outer domains of membrane proteins, and by destabilizing the junctions with random mutations, we succeeded in redesigning membrane proteins into the conditionally functional ones to the ligands, cofactors, and/or substrates of the proteins and/or enzymes displayed outside the cell.

We then tethered reporter proteins, such as transcription factors, to the membrane proteins so that they are in the cytosolic spaces. The functional output of the reporter proteins was found to be dependent on the molecular recognition of the protein displayed on the other side of the membrane. By replacing the input component displayed to the periplasmic space, we could have created different artificial signal transduction devices where information flows from extracellular space to intracellular protein functions, by way of transmembrane proteins. With this remarkable plug and play-ability and unnecessary for designing allosteric mechanisms, the method described herein could rapidly provide the arrays of sensory tools to synthetic biologists as well as for those who need to monitor the chemical analysis of seawater.