

プログラム名：豊かで安全な社会と
新しいバイオものづくりを実現する人工細胞リアクタ
PM名：野地 博行
プロジェクト名：「つくる」人工細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平 成 2 9 年 度

研究開発課題名：

人工細胞デバイスを活用した高速進化実験系の開発と

臨床診断用スーパー酵素の創成

研究開発機関名：

国立研究開発法人産業技術総合研究所

研究開発責任者

宮崎 健太郎

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本課題では、産業上有用な臨床診断酵素 Alkaline Phosphatase [ALP]を、進化分子工学的手法により機能改良する。特に、人工細胞リアクタを活用した超並列型スクリーニングを行うことを念頭に、種々の変異手法を駆使した大規模な変異ライブラリーを構築し、スクリーニングに供する。変異手法に応じた活性変動をフィットネスランドスケープの形で描画し、適切な変異一選択条件を見極め次世代の進化実験系へとフィードバックする。これらの工程を繰り返し、短期間に効率的な機能（特に活性向上）進化を実現する。獲得されたスーパー酵素を既存の診断系に適用し、性能評価を行い、酵素改良系へとフィードバックする。本年度は ALP の酵素活性を 10 倍以上向上させることを目標に以下の項目について実施した。

1. ALP 第 2 世代進化

課題 1A で用いられる臨床診断用酵素（ALP、BGAL、HRP）のうち、ALP についての活性向上変異体の取得を継続する。前年度までに人工細胞リアクタ系でのスクリーニングに適したサチュレーション変異ライブラリーの構築を終了し、活性向上変異体の取得を行っており、数種類の変異体を得ている。また、大腸菌発現系でのスクリーニングに適したサチュレーション変異ライブラリーの構築もほぼ終了し、数種類の変異体を得ている。双方の異なるスクリーニング系で得た変異酵素について、精製酵素を用いた酵素のキャラクタリゼーションを行い、活性向上の再確認を行う。

2. 高活性 ALP 変異酵素の評価

活性向上の見られた複数の変異酵素について、活性向上に寄与する変異アミノ酸置換を重ね合わせるなどしてさらなる活性向上変異体の獲得を目指す。活性向上の程度の高い酵素について、精製酵素を用いた酵素のキャラクタリゼーションを行い、活性向上の再確認を行う。

また、高活性変異酵素を実施想定企業に提供し、実利用条件での適性評価を受け、フィードバック情報に基づき、次の指針を立てる。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

これまでに得た高活性変異酵素を大腸菌 DH5 alpha 株を宿主として発現させ、疎水及びイオン交換カラムクロマトグラフィーによるタンパク質精製をおこなった。いくつかの変異酵素について、確かに既知変異酵素と比較し、高い活性を示した。また、大腸菌を宿主とした発現スクリーニングで得られた変異酵素を T7 発現ベクターに載せ替え、人工細胞デバイスを用いた活性評価もおこなった（課題 2A（東京大学）実施）。その結果、野生型と比べて 30 倍以上の活性向上が認められている。

一方、大腸菌発現系においても人工細胞デバイスにおいても、活性測定データのブレが発生することが問題となっている。そのため、実施企業への提供と性能試験については一部遅れが生じている。

2-2 成果

4アミノ酸置換を含む変異酵素において、野生型と比べて30倍以上の活性向上が認められ、当初の目標である「10倍以上」を上回る成果を得た。

また、ラクトース誘導型の野生型ALP遺伝子をレポーターとしてラクトース誘導とは直交する大腸菌発現ベクターを開発した。

2-3 新たな課題など

酵素機能改良前には大腸菌発現系において最適化したシステムが、酵素活性の向上とともにデータのブレを生む事態が生じている。脱リン酸活性によるものか、タンパク質の毒性か、ミスフォールドによるものかなど、種々の要因が考えられるが、人工細胞デバイスにおいても偏差の大きなデータが得られることから、ミスフォールドの可能性が最も疑わしい。高発現宿主よりも安定発現可能な宿主を探索するなどして、確定的なデータを取得する方向性を検討する。

3. アウトリーチ活動報告

なし。

