

ビーズディスプレイ法を用いた糸状菌由来リグニン分解酵素の ハイスループットスクリーニング系の構築

二宮 涼子・朱 博・小林 功*・児島 孝明・岩崎 雄吾・中野 秀雄

名古屋大学大学院生命農学研究科 生命技術科学専攻 *農研機構

〒464-8603 名古屋市千種区不老町

E-mail: hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

Home Page: <http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~molbiote/>

ビーズディスプレイ法とは、W/O エマルジョン中での一分子 PCR と無細胞蛋白質合成系とを組み合わせることで、マイクロビーズ上に蛋白質とそれをコードする遺伝子とを同時に提示できる技術である。セルソーター、マイクロ流路デバイスなどと組み合わせることで、ハイスループットな機能分子スクリーニングが可能である。本研究では、木質バイオマス分解能の高いことが知られている白色腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) が産生するリグニン分解酵素の一つである Manganese peroxidase (MnP) の機能進化を目的に、MnP のビーズ上への提示とハイスループットアッセイ法の構築を目指した。

1. はじめに

近年、バイオエタノールは化石燃料の新規代替エネルギーとして注目を集めている。このバイオエタノールの生産手法の一つとして、木質バイオマスを用いた糖化・発酵法が挙げられる。しかし、この木質バイオマス中に含まれるリグニンの分解は、高圧・強酸条件を必要とするため、低コスト化を目指すバイオエタノール生産における大きな障害となっている。現在、酵素を用いたリグニンの分解に関する研究が盛んに行われている。そのアプローチのひとつとして、糸状菌の分泌性リグニン分解酵素 Manganese peroxidase (MnP) の機能改変が挙げられる。

MnP は、過酸化水素を用いて Mn^{2+} を Mn^{3+} に酸化し、oxalate などの有機酸と Mn^{3+} の複合体がリグニンなどのフェノール性基質を酸化する。この Mn^{3+} キレート複合体は、強力な非特異的な酸化剤であり、ペルオキシダーゼの活性部位に直接近づくことのできない嵩高い化合物の酸化も可能にすることから、MnP の様々な分野への応用が期待されている。

しかし、MnP は高い pH や温度、そして活性化に必須である過酸化水素に対する安定性が低く失活しやすいという欠点がある。したがって、MnP を産業的に実用化するためには、これらに対する安定性を高めることが必要とされる。そこで、本研究では、白色腐朽菌

Phanerochaete chrysosporium 由来の MnP を対象として、pH、温度及び過酸化水素に対する高安定性、さらに高活性な MnP 変異体を取得することを最終目的とし、ビーズディスプレイ法とフローサイトメトリーによるスクリーニング系を用いた変異 MnP ハイスループットスクリーニング法の構築を目指している。

2. 解析データおよび方法

ビーズディスプレイ法

ビーズディスプレイ法とは、W/O エマルジョン内での一分子 PCR[1]と無細胞蛋白質合成系とを組み合わせることによって、磁性マイクロビーズ上に蛋白質とそれをコードする遺伝子を同時にディスプレイすることができる技術である[2] (図 1)。つまり、一つのビーズ上で表現型と遺伝子型を連結させることができる。

まず、一方の PCR プライマーを固定化したビーズを用いてエマルジョン内で PCR を行う。この時、一エマルジョンあたりプライマー固定化ビーズと鋳型 DNA がそれぞれ一つずつ含まれるような条件に設定することで、一ビーズ上に一種類の DNA が増幅・固定化される。

次に、エマルジョンを破壊して回収したビーズに、DNA と目的蛋白質をつなぐ足場として抗体を付加する。その後、W/O エマルジョン内で無細胞蛋白質合成反応

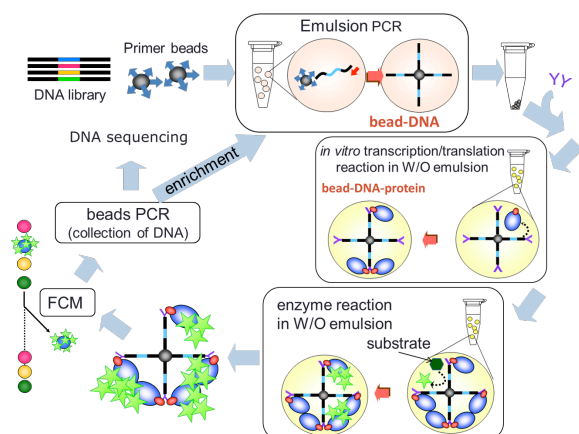


図 1. ビーズディスプレイ法とフローサイトメトリーを用いたスクリーニング系の例

を行う。すると、発現した蛋白質が抗体に結合し、遺伝子型と表現型の一致したビーズ-DNA-蛋白質複合体が形成される。

形成されたビーズ-DNA-蛋白質複合体を用いて蛍光基質との酵素反応を行うと、活性を示す蛋白質を提示したビーズのみが蛍光標識される。その後、フローサイトメトリーを用いてそのビーズを分取する。分取したビーズ上にある DNA を PCR によって増幅し、塩基配列を解析する、あるいは次のスクリーニングの鋳型 DNA とする。このように、ビーズディスプレイ法とフローサイトメトリーを組み合わせることにより、多数のサンプルをハイスループットにスクリーニングすることが可能となる。

3. 結果と考察

(1) MnP の無細胞蛋白質合成系における DsbC の添加効果の検討

MnP は分子内に 5 個のジスルフィド結合を有する。そのため、無細胞蛋白質合成系で発現させた MnP は、

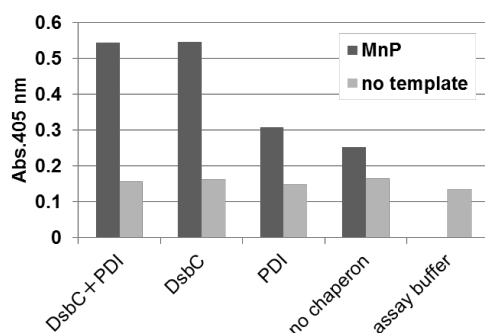


図 2. ウシ PDI と DsbC 添加時の MnP の活性

正確なフォールディングがされていない不活性型のものが多いという問題点が挙げられていた[3]。そこで、MnP の大腸菌由来無細胞蛋白質合成系に、ジスルフィド結合異性化酵素であるウシ PDI と DsbC を添加し、発現量の確認と活性測定を行った。その結果、DsbC の添加により、活性型 MnP の合成量を 2 倍増加させることに成功した(図 2)。

(2) 蛍光強度による MnP の活性測定

ビーズディスプレイ法とフローサイトメトリーを用いたスクリーニング系を MnP に応用するため、活性を蛍光強度により検出することを試みた。基質は Amplex Red を用いた。Amplex Red は酸化されると波長 590 nm の蛍光を発する Resorufin となる。

はじめに、MnP 標品を用いて酵素の濃度と蛍光強度に相関関係があるかを検討した。その結果、MnP の濃度と蛍光強度は相関関係を持つことが示された。次に、無細胞蛋白質合成系で発現させた MnP を用いて酵素反応を行ったところ、MnP の活性を検出することができた。したがって、Amplex Red を基質とした蛍光強度による MnP の活性検出が可能だということが示された。

(3) ビーズに固定化した MnP の活性測定

Carboxylic acid (CA) ビーズに固定化された MnP の活性を検出することを試みた。抗体を付加させた CA ビーズに、無細胞蛋白質合成系で発現させた MnP を提示させ、酵素反応を行った。その結果、MnP の活性を検出することができた。したがって、MnP はビーズに固定された状態でも活性を保持していることが示された。

4. 今後の展望

現在までに、無細胞蛋白質合成系での活性型 MnP の発現、蛍光強度による MnP の活性検出、ビーズに固定された状態での MnP の活性検出に成功した。今後は、フローサイトメトリーを用いた変異 MnP のハイスループットなスクリーニング系構築の検討を行う。

酸化還元酵素の活性に基づくスクリーニング手法が確立することにより、関連する様々な酵素の機能改変に用いることも可能となると期待できる。

参考文献

- [1] Kojima T, *et al.* : Nucleic Acids Res., 33, e150 (2005)
- [2] Gan R, *et al.* Biotechnol. Prog., 24, 1107-1114 (2008)
- [3] Miyazaki C, *et al.* : FEBS Lett., 509(1), 111-4 (2001)