

持続可能なバイオ産業のための酵素研究とタンパク質工学の 新技術開発と応用

名古屋大学大学院 生命農学研究科 ダムナニョヴィッチ・ヤスミナ

はじめに

酵素研究はヒトの健康やバイオ産業にとってますます重要となりつつある。酵素の構造・機能相関に関する知識は、酵素阻害剤などの医薬品の開発に貢献し、バイオ産業プロセスは、持続可能性を高めるためにオーダーメイド酵素を利用している。このような酵素の研究開発において、ランダム変異導入とスクリーニングに大きく依存しており、時間、コスト、労働効率の面でボトルネックとなることが多く、医薬品開発やバイオ産業化の進展を大きく制限している。博士論文研究を始めて以来、筆者は酵素工学の研究に取り組み、酵素開発の時間短縮、コスト削減、省力化により酵素開発の効率化を図り、産業界への酵素プロセスの導入を加速することを目標に、従来の酵素工学的研究に加え、無細胞タンパク質合成を駆使した酵素工学の新規プラットフォームの開発に取り組んできた。

ホスホリパーゼD (PLD) のタンパク質工学とその生理活性リン脂質合成への応用

リン脂質は生体膜の重要な構成成分であり、細胞シグナル伝達、分化、アポトーシス、病態形成において重要な役割を果たしている。多くの生理活性PLは、栄養補助食品やドラッグデリバリーシステムの成分として利用できる大きな可能性を秘めているが、大豆に豊富に含まれるホスファチジルコリンを除いては、天然の存在量が少ないため、天然の供給源からの抽出が妨げられている。一方、化学合成は多段階反応で収率が低く、高コストである。過去10年間、筆者らが所属するグループは、細菌コロニースクリーニングに基づく合理的および半合理的設計により、1-ホスファチジルイノシトール¹、1-β-ホスファチジルグルコース、ホスファチジルスレオニン²、および環状ホスファチジン酸のワンステップ合成³を効率的に触媒できる、独自の基質特異性を持つ一連の変異体PLD酵素群を開発した。

一分子ディスプレイ法を駆使したトランスグルタミナーゼの網羅的基質特異性解析

PLDの研究を通して、筆者は、低スループット測定法(例えば、HPLCとLC-MSを使用して、所望の特異性を持つ変異体をスクリーニングした)、細胞タンパク質発現(高い活性を持つPLDは、細胞毒性のため、生きた細菌細胞では発現が乏しい)等に関する苦難を克服するために多大な努力を払った。このことが、酵素研究に応用できる無細胞技術を研究する動機となった。

トランスグルタミナーゼ(TG)はタンパク質架橋酵素として、多くの生理学的過程や疾患において役割を持ち、近年非常に注目されている酵素群である。疾患プロセスにおけるTGを研究するために、アイソザイム特異的基質プローブおよび阻害剤の開発が活発に行われているが、TG基質プロファイルの網羅的知識の欠如が課題となっている。TG基質プロファイルを網羅的解析することを目的として、一分子ディスプレイ技術であるcDNAディスプレイに、次世代シーケンシングおよびバイオインフォマティクスを組み合わせたプラットフォームを構築し(図1)、TG2⁴およびTG1⁵の包括的な基質プロファイルを得た。この情報を用いることで、各TGアイソザイムに対して高い反応性と特異性を有する基質プローブを開発し、TG効果的阻害剤の設計にも利用できるようになった。さらに解析によって得られた基質プロファイルを用いてヒトデータベースに適用することで、TG2およびTG1に対する既存のタンパク質基質が検出でき、さらにこれまで知られていなかった新規天然タンパク質基質候補を特定した。現在、TG3の基質プロファイリングに取り組んでおり、立ち上げたプラットフォームの使用をキナーゼやプロテアーゼ(組織プラスミノゲン活性化因子など)と他のタンパク質修飾酵素に拡大する予定である。

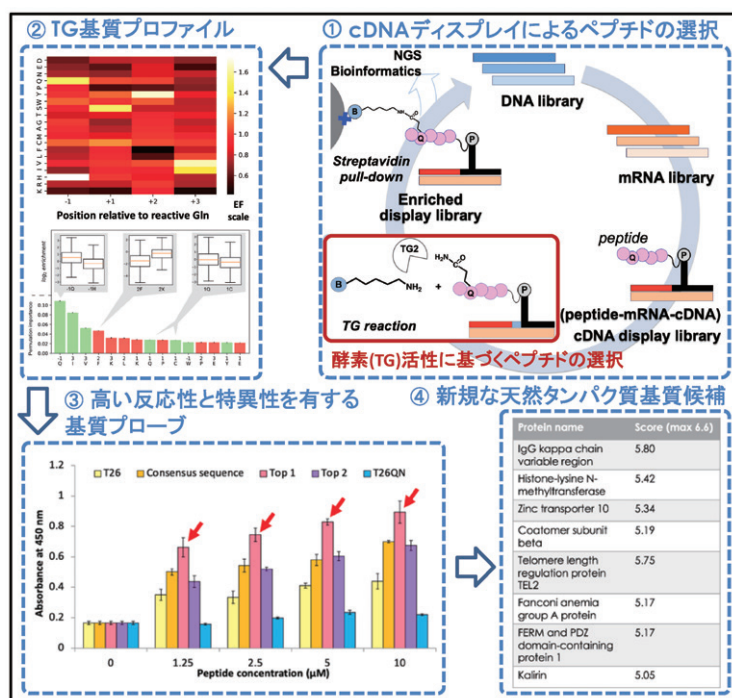


図1. 筆者が立ち上げたcDNAディスプレイプラットフォームを用いたTG2基質プロファイリングのワークフローと結果

酵素進化のための新たな一分子ディスプレイ法

細胞の使用に起因する従来のスクリーニング手法の限界、例えば細胞の形質転換効率によって制限されるライブラリーサイズ（最大 10^9 変異体/mL）、発現が良好で毒性の

ないタンパク質への偏りなどに対処するために、筆者は、酵素の迅速、簡単、手頃な価格でロバストな進化を実現する SMART (Single Molecule Assay on Ribonucleic acid by Translated product) と呼ばれる無細胞技術を開発した (図2)。

図2にSMARTの概要を示す。通常mRNAディスプレイ法により酵素ライブラリーをmRNAに結合させ、そのmRNAとハイブリダイズするヘアピン一本鎖DNAとそれに結合する一本鎖Cro (scCro) を利用して、活性による選択が可能とする補助ユニットを導入する。ここでは分裂酵母由来のD-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) を変異対象酵素とし、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ2 (APEX2) -scCro融合タンパク質を補助ユニットとして系を構築した。すなわち系に加えたD-アミノ酸に対して反応するDAAO変異体は過酸化水素を発生し、それを使って隣接するAPEX2はビオチン化チラミドを活性化し、近傍タンパク質をビオチン化修飾する。そのためアビジン磁気ビーズで吸着・洗浄することで、活性を有するDAAO変異酵素がそのmRNAとともに濃縮される⁶。例としてDAAOの触媒残基Y232にランダム変異を導入したライブラリーを作製し、D-アラニンを経験としてSMARTを1ラウンド行い、濃縮されたmRNAを次世代シーケンシングにより解析した。その結果、基質特異性が異なる酵素変異体を数日で特定できた⁷。SMARTは、速度、コスト、ライブラリーサイズ、および精度の点で、生細胞を用いたスクリーニング手法に対して優位であり、また補助ユニットを変えることで、多様な酵素のセレクションが可能である。

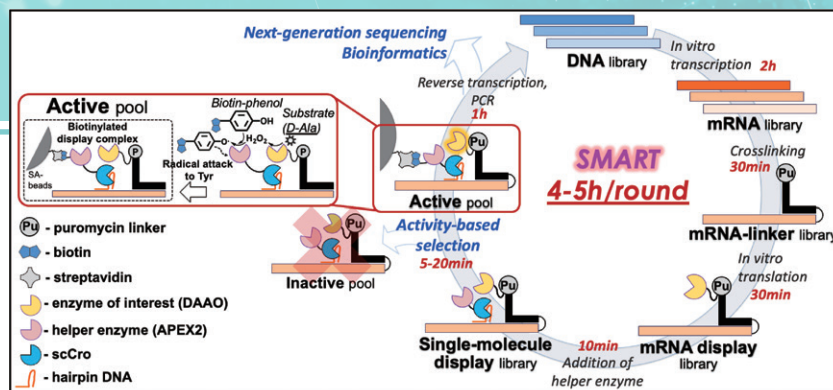


図2. SMART技術を用いたDAAO進化の概要

謝辞

親身になって研究を支えてくれた恩師、名古屋大学の中野秀雄先生および岩崎雄吾先生（現中部大学）に心から感謝したいと思います。真摯なサポートをしてくれた共同研究者の皆様、名古屋大学生命農学研究科分子生物工学研究室の現職および元職スタッフの皆様、指導学生の皆様にご協力いただきまして、心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Damjanovic J. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 113, 62-71 (2016)
 2. Damjanovic J. et al., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 120, 1800089 (2018) (Cover page)
 3. Damjanovic J., et al., *Protein Eng. Des. Select.*, 32, 1-11 (2019)
 4. Damjanovic, J.* et al., *Sci. Rep.*, 12, 13578 (2022)
 5. Munaweera T.I.K, Damjanovic, J.* et al., 88, 620-629 (2024)
 6. Damjanovic J., Nakano H., 特願2024-210782号
 7. Munaweera T.I.K, Damjanovic, J.*, Nakano H. #, et al., bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2025.03.23.644798> (2025)
- * Corresponding author; # Co-corresponding author

略歴

- 2009年 5月 University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy 修士課程修了・修士(工)
- 2013年 9月 名古屋大学大学院 生命農学研究科 生命技術科学専攻 博士課程修了・博士(農)
- 2013年10月 名古屋大学大学院 生命農学研究科 生命技術科学専攻 博士研究員
- 2014年 4月 名古屋大学大学院 生命農学研究科 特任助教
- 2015年 4月 名古屋大学大学院 生命農学研究科 応用生命科学専攻 助教
- 2020年 2月 University of Western Australia, School of Molecular Sciences Visiting Research Fellow (一ヶ月)
- 2020年 4月 名古屋大学大学院 生命農学研究科 応用生命科学専攻 講師
- 2024年 4月 名古屋大学大学院 生命農学研究科 応用生命科学専攻 准教授

Development and application of new technologies for enzyme research and protein engineering aiming at sustainable bioindustry

Jasmina Damjanovic, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Introduction

Studying enzymes is becoming increasingly important for human health and bioindustry. Understanding the structure-function relationship of enzymes is essential for developing pharmaceuticals such as enzyme inhibitors, while many industrial processes require tailor-made enzymes to increase their sustainability. In enzyme research and development, we frequently rely on repeated cycles of mutagenesis and screening (e.g. in directed evolution), which can be time-consuming, costly, and labor-intensive, thus significantly hindering the progress of industrial transformation. Throughout her doctoral thesis research, the author explored enzyme engineering relying on conventional screening methods, and realizing their drawbacks, she has been focusing on the development of an *in vitro* platform for rapid, affordable, simple, and labor-efficient enzyme evolution with the ultimate goal of accelerating the integration of enzymatic processes in industry.

Protein engineering of phospholipase D and its application to the synthesis of bioactive phospholipids

Phospholipids (PLs) are the key components of biological membranes and play critical roles in cell signaling, differentiation, apoptosis, and pathogenesis. While many bioactive PLs hold significant potential for use as dietary supplements or components of drug delivery systems, their low natural abundance hinders extraction from natural sources, except for phosphatidylcholine (PC), abundant in soybeans. On the other hand, chemical synthesis of PLs often involves complex multi-step reactions having low yields and raising health concerns. In response to these challenges, our research group has successfully developed a series of mutant phospholipase D (PLD) enzymes with unique substrate specificities using rational and semi-rational design coupled with conventional colony screening. These engineered enzymes enable the efficient one-step synthesis of rare bioactive PLs, namely 1-phosphatidylinositol¹, 1- β -phosphatidylglucose, phosphatidylthreonine², and cyclic phosphatidic acid³.

Comprehensive substrate profiling of transglutaminases using cDNA display platform

Throughout the PLD research, the author experienced difficulties related to low-throughput screening assays (e.g., HPLC and LC-MS used to screen mutants with desired substrate specificity) and low protein expression (highly active PLDs are poorly expressed in living bacterial cells due to cytotoxicity), which motivated her to investigate *in vitro* technologies that could be applied to enzyme research.

Transglutaminases (TGs) are protein cross-linking enzymes receiving considerable attention due to their roles in many physiological processes and diseases. To study TGs in disease processes, isozyme-specific substrate probes, and peptidomimetic inhibitors have been actively pursued, but the lack of comprehensive knowledge of TG substrate specificity profile posed a challenge in these efforts. To address this problem, the author established an *in vitro* platform combining cDNA display with next-generation sequencing (NGS) and bioinformatics (Fig. 1) and applied it to obtain comprehensive substrate profiles for TG2⁴ and TG1⁵. Using this information, substrate probes with high reactivity and specificity for each TG isozyme have been developed with the potential of being re-designed into effective TG inhibitors in the future. Furthermore, by applying the substrate profiles obtained from the bioinformatic analysis to the human database search, the author identified novel, previously unknown native substrate candidates of TG2 and TG1. The author's group is currently working on substrate profiling of TG3 and plans to expand the use of the existing platform to kinases and proteases (such as tissue plasminogen activator) as well as other protein-modifying enzymes of interest for human health.

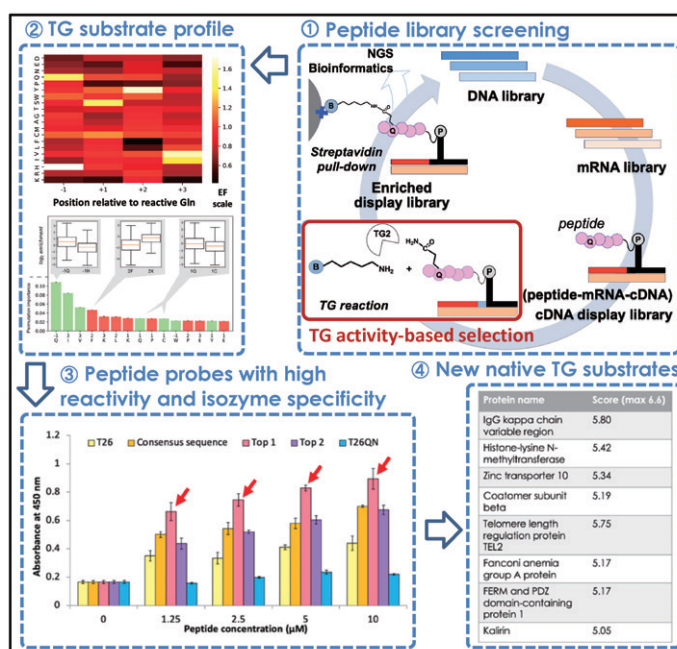


Figure 1. Workflow and results of TG2 substrate profiling using the cDNA display platform developed by the author.

Novel single-molecule display platform for enzyme evolution

To address the limitations of conventional screening methods stemming from the use of cells, such as library size (up to 10^9 variants/mL) limited by cell transformation efficiency and a bias toward well-expressed, non-toxic proteins, the author developed a rapid, simple, affordable, and robust platform for evolution of enzymes, SMART (Single Molecule Assay on Ribonucleic acid by Translated product).

Figure 2 shows an overview of the SMART platform for the evolution of D-amino acid oxidase (DAAO), an enzyme important for the enzymatic measurement of D-amino acids. Here, DAAO from yeast was used as the displayed enzyme, and ascorbate peroxidase 2 (APEX2)-scCro fusion protein was used as the auxiliary unit. During the selection, DAAO variants react with D-amino acids added to the system to generate hydrogen peroxide, which is used by the nearby APEX2 to activate a biotinylated tyramide and chemically label the neighboring proteins. Therefore, we can use the streptavidin beads pulldown to enrich the active DAAO variants together with their mRNA⁶. A library containing random mutations in the catalytic residue Y232 of DAAO was prepared, and one round of SMART was performed with D-alanine as a substrate, allowing us to identify variants with distinct activity and substrate specificity⁷.

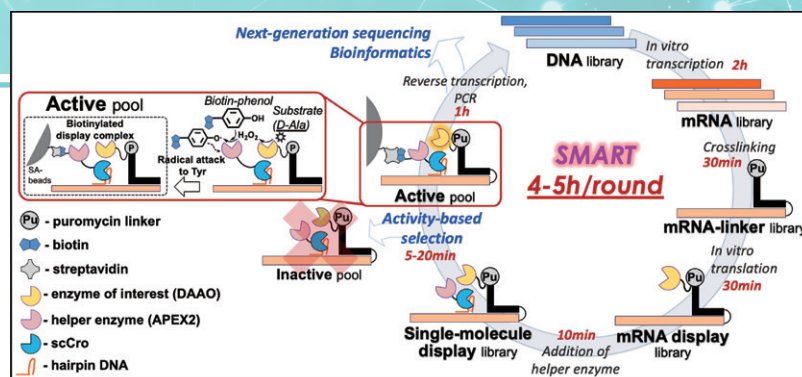


Figure 2. Outline of SMART platform for DAAO evolution.

Acknowledgement

I would like to express my sincere gratitude to my mentors, Prof. Hideo Nakano (Nagoya University) and Prof. Yugo Iwasaki (currently at Chubu University), for their generous support of my research. I extend my appreciation and thanks to my collaborators, the current and former staff of the Laboratory of Molecular Biotechnology at the Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, and to all of my students, for their efforts and cooperation.

References

1. Damjanovic J. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 113, 62-71 (2016)
2. Damjanovic J. *et al.*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 120, 1800089 (2018) (Cover page)
3. Damjanovic J., *et al.*, *Protein Eng. Des. Select.*, 32, 1-11 (2019)
4. Damjanovic, J.* *et al.*, *Sci. Rep.*, 12, 13578 (2022)
5. Munaweera T.I.K, Damjanovic, J.* *et al.*, 88, 620-629 (2024)
6. Damjanovic J., Nakano H., 特願2024-210782号
7. Munaweera T.I.K, Damjanovic, J.*, Nakano H.#, *et al.*, bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2025.03.23.644798> (2025)

* Corresponding author; # Co-corresponding author

Brief Biography

May	2009	Univ. of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, M.Eng (Biotechnology)
September	2013	Nagoya Univ., Graduate School of Bioagricultural Sciences, PhD (Bioeng. Sciences)
October	2013	Nagoya Univ., Graduate School of Bioagricultural Sciences, Postdoctoral researcher
April	2014	Nagoya Univ., Graduate School of Bioagricultural Sciences, Designated Assistant Professor
April	2015	Nagoya Univ., Graduate School of Bioagricultural Sciences, Assistant Professor
February	2020	Univ. of Western Australia, School of Molecular Sciences, Visiting Research Fellow
April	2020	Nagoya Univ., Graduate School of Bioagricultural Sciences, Lecturer
April	2024	Nagoya Univ., Graduate School of Bioagricultural Sciences, Associate Professor