

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17076011

研究課題名（和文） 試験管内タンパク質合成の分子基盤と細胞機能模倣に向けたその応用

研究課題名（英文） Characterization of cell-free protein synthesis system and the application for the synthesis of cell membrane protein

研究代表者

片岡 正俊（KATAOKA MASATOSHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：20224438

研究成果の概要（和文）：細胞機能の模倣を行うため膜タンパク質の再構成を目標とした。そこで我々は、膜移行性が知られているバクテリオファージのコートペプチドをシーズペプチドとして、細胞膜モデルとしてリポソームを利用して、方向性を持って自発的に膜に移行・挿入されるペプチドの合成を試みた。この結果、膜貫通領域にロイシンによる疎水性の付与を行うと同時に、ペプチド両末端にアミノ酸変異を加え荷電をコントロールすることで特定の方向性を持ってリポソームに移行できるペプチドの調整を行っている。この中でペプチド内のアミノ酸変異による疎水性変化により、ペプチドに対する抗体との反応性が大きく異なることを見出した。この疎水性に基づく抗体との反応性の変化は、ニトロセルロース膜や PVDF 膜など通常の生物学の分野で頻用されるウエスタンブロット法で抗原の固定を行い抗原抗体反応の反応場として利用される膜上でも確認された。これはこれら膜上でペプチドがフォールディング構造を形成することで抗体との反応性が大きく変化するものと示唆された。

研究成果の概要（英文）： We reconstructed the membrane protein for the mimicking the cell function. During the replication processes, coat proteins of Pf3 phage is synthesized in the bacteria and inserted into bacteria membrane. Since one mutant of coat protein Pf3 phages, 3L-Pf3, having longer hydrophobic region could be inserted into lipid bilayer membrane even in the absence of membrane proteins, studies on the interaction of coat protein of bacterial phages with lipid bilayer membrane are expected to fundamental principles on the formation of membrane protein. Using 3L-Pf3 as a template, we prepared two mutants of 3L-DR and 3L-RD. Modification of the peptide with His-tag enabled the simple and rapid purification of the synthesized peptide, and those with T7- and Myc-tags enabled clear determination of their topologies in the liposomal membrane. The two peptides were found to be spontaneously and directionally inserted into negatively charged large unilamellar vesicle, according to the charge distribution in the peptides. Substitution of amino acids in a peptide caused remarkable differences in their immunoreactivities with antibodies. Observed differences in immunoreactivities among the peptides were not due to the differences in efficiencies of their transfer onto nitrocellulose or PVDF membranes. Rather, possible folding of the peptide on the membrane was considered to be the reason for their distinct immunoreactivities with the antibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,900,000	0	16,900,000
2006年度	16,900,000	0	16,900,000
2007年度	16,100,000	0	16,100,000
2008年度	16,100,000	0	16,100,000
2009年度	16,100,000	0	16,100,000
総計	82,100,000	0	82,100,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：膜タンパク質、リポソーム、試験管内タンパク質合成、コートペプチド、細胞機能模倣、再構成

1. 研究開始当初の背景

細胞機能の模倣を目的として、機能的なタンパク質の発現、特に膜タンパク質の機能的な発現をいかに再現するかが大きな問題になる。そして細胞内で合成された膜タンパク質は、自発的に膜構造に取り込まれることから、人工的なタンパク質合成系を用いて膜移行性ペプチドをデザインして、細胞膜を模倣したリポソームとの相互作用の検討を行い膜タンパク質の再構成を試みた。

2. 研究の目的

タンパク質の機能を理解するためには、人工的にタンパク質を合成するタンパク質発現系が有用と考えられる。タンパク質合成では、従来は生細胞を用いた発現系が用いられているが、ホストの培養のための特定培養条件が必要なこと、ホストに有害なタンパク質は発現しないなどの問題がある。そこで生細胞を用いない試験管内タンパク質合成系に着目して、試験管内タンパク質合成システムのタンパク質の効率的な合成を目指した基本原理の洗い出しを行う。また膜タンパク質の効率的な発現系構築を進め細胞機能の模倣を目指す。

3. 研究の方法

試験管内タンパク質合成における効率的なタンパク質合成のための条件の洗い出しを行うため、転写・翻訳共役系（大腸菌、小麦胚芽および網状赤血球抽出液）と翻訳系（小麦胚芽由来）の各試験管内タンパク質合成システムを用いて、G3PDHの発現量を比較した。

さらに膜タンパク質の発現・動態を検索するため、合成ペプチドのアミノ酸配列を変えることでニトロセルロースやPVDFなどの膜

上に転写されたペプチドのフォールディングによる抗原性変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 4種類の転写・翻訳共役系試験管内タンパク質合成系を用いて、発現ベクター-pET及び5'-globin leader sequenceと3'末端 poly(A)を付加したpTnTの二種類のベクターをベースに、pET/G3PDHおよびpTnT/G3PDHを作製してDNAを鋳型としてタンパク質の発現量をウェスタンブロット法にて比較検討した(図1)。その結果、原核生物由来抽出液を用いたRTS500およびS30システムで目的とするタンパク質の大量発現を認めた。さらにTnTシステムでの使用が推奨されるTnTベクターを用いた場合は、麦芽胚芽由来TnT wheat germシステムでより大量のタンパク質発現が認められた。試験管内タンパク質合成システムの由来や発現ベクターにより、タンパク質の発現量が大きく影響されることが明らかになった。

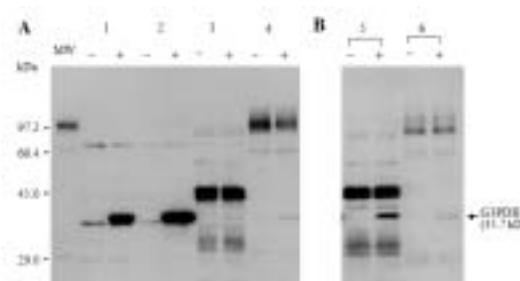


図1. RTS500 (1), S30 システム (2)、TnT wheat germ(3, 5)および TnT reticulocyte lysate system(4, 6)を用いた G3PDH の発現量の比較。A ではベクター-pET/G3PDH、B ではベクター-TnT/G3PDH を使用して、それぞれウ

ウェスタンブロット法を用いて発現タンパク量の比較検討を行った。

(2) 前述4種類の試験管内タンパク質合成系に含まれる T7 RNA ポリメラーゼ量には大きな差は認められず、さらにこれら反応系に含まれる合成 RNA 量と合成タンパク量に明らかな相関は認められなかった。RNA を鋳型とする PROTEIOS を用いて、pET/G3PDH および翻訳増強配列であるオメガ配列を含む pEU/G3PDH を用いて RNA を合成して鋳型として利用すると、pET/G3PDH に比較して pEU/G3PDH 由来合成 RNA を用いた場合が大幅なタンパク合成が認められた。これは、mRNA のリーダーシーケンスとして利用され翻訳活性を上昇させるオメガ配列の存在により、タンパク質合成が増加したと考えられた。このように、RNA を鋳型とする場合には、タンパク質合成において翻訳増強配列の存在が大きな因子となることが明らかになった。

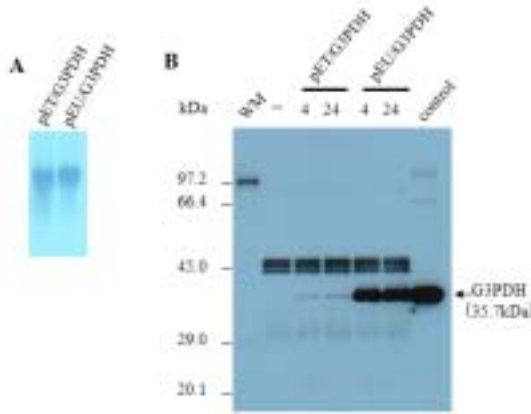


図2 . A. pET/G3PDH および pEU/G3PDH を鋳型として RNA を合成。B. それぞれの合成 RNA を鋳型としてタンパク質合成を行い、ウェスタンブロット法にて合成 G3PDH 量を比較検討した。

(3) 緑膿菌ファージ Pf3 のコートタンパク質は、膜貫通領域にロイシン残基3個を付与し疎水性を高めることで(Pf3 (3L-4N))、タンパク質を含まないリポソームに自発的に組み込まれることが知られている。そこで、これをリードペプチドとして、図3に示す変異ペプチドを用いて「膜に挿入されるか」、「膜中でのトポロジーを決定するペプチドの構造特性は何か」について検討した。



図3 . N末端に負の荷電を有する Myc タグ、C末端に中性の T7 と正の荷電を有する His タグ

グを付けた 3L-DR。基本の amino 酸はそのままで、ペプチド中の N 末端側にあるマイナス荷電の amino 酸を C 末端側のプラス荷電の amino 酸と入れ替え、さらに N 末端に His と T7 タグ、C 末端に Myc タグを付加した 3L-RD を作製。ペプチドの荷電性 amino 酸の存在がトポロジー形成を支配する可能性があるため、荷電性 amino 酸とタグの荷電は統一している。

amino 酸変異を行った合成ペプチドを各タグ抗体でニトロセルロース膜を用いたウェスタンブロットを行い、その反応性を比較検討した(図4)。一つの amino 酸の置換により抗体反応性が大きく異なることが示された。これは、タンパク質の膜上でのフォールディングを反映する可能性が考えられた。このフォールディングの可能性は PVDF 膜においても認められた。

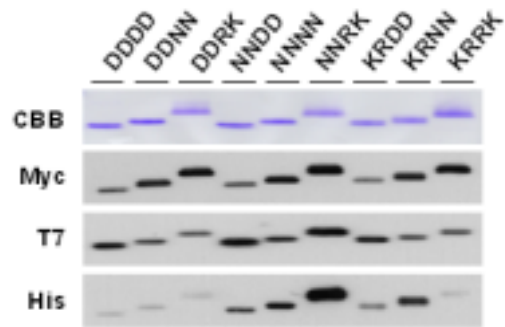


図4 . amino 酸変異を行った各ペプチドについて、抗 Myc、抗 T7 および抗 His タグ抗体を用いてウェスタンブロット法にて抗体反応性を検討した。CBB 染色により、ウェスタンブロット法に供された amino 酸量はほぼ同等と確認されている。

以上のことから、図5に示す特定の界面活性剤(この場合は Triton X-100)の存在下でフォットプリント効果として認識されると考えられる。

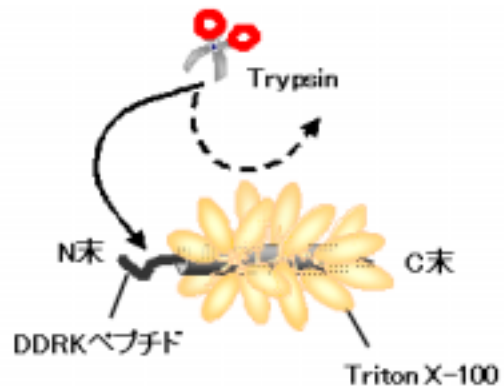


図5 . 特定の界面活性剤の存在により、N 末端のみトリプシン消化を受けることで、これはペプチドのフットプリント効果と認識される。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 27 件 )

1. Analysis of DNA ligation by microchip electrophoresis. Umemoto Y, Kataoka M, Yatsushiro S, Yamamura S, Ooie T, Kido J, Yamamoto T, Shinohara Y, Baba Y.

J Pharm Biomed Anal. 2010 Jun 5;52(2):323-8 査読あり

2. Modulation of calprotectin in human keratinocytes by keratinocyte growth factor and interleukin-1alpha.

Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Herzberg MC, Ross KF, Shinohara Y, Yamamoto T, Nagata T, Kido J.

Immunol Cell Biol. 2010 Mar;88(3):328-33 査読あり

3. Replacement of C305 in heart/muscle-type isozyme of human carnitine palmitoyltransferase I with aspartic acid and other amino acids.

Matsuo T, Yamamoto A, Yamamoto T, Otsuki K, Yamazaki N, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y.

Biochem Genet. 2010 Apr;48(3-4):193-201 査読あり

4. Direct endonuclease digestion and multi-analysis of restriction fragment length polymorphisms by microchip electrophoresis.

Akamine R, Yatsushiro S, Yamamura S, Kido J, Shinohara Y, Baba Y, Kataoka M.

J Pharm Biomed Anal. 2009 Dec 5;50(5):947-53. 査読あり

5. Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions.

Yamada A, Yamamoto T, Yoshimura Y, Gouda S, Kawashima S, Yamazaki N, Yamashita K, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Pfeiffer DR, Shinohara Y

Biochim Biophys Acta. 2009 Dec;1787(12):1486-91. 査読あり

6. Classification of FABP isoforms and tissues based on quantitative evaluation of transcript levels of these isoforms in various rat tissues.

Yamamoto T, Yamamoto A, Watanabe M, Matsuo T, Yamazaki N, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y.

Biotechnol Lett. 2009 Nov;31(11):1695-701. 査読あり

7. Sequential analysis of RNA synthesis by microchip electrophoresis.

Umemoto Y, Kataoka M, Yatsushiro S, Watanabe M, Kido J, Kakuhata R, Yamamoto T, Shinohara Y, Baba Y.

Anal Biochem. 2009 May 1;388(1):161-3. 査読あり

8. Differential permeabilization effects of Ca<sup>2+</sup> and valinomycin on the inner and outer mitochondrial membranes as revealed by proteomics analysis of proteins released from mitochondria.

Yamada A, Yamamoto T, Yamazaki N, Yamashita K, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Shinohara Y.

Mol Cell Proteomics. 2009 Jun;8(6):1265-77. 査読あり

9. Distinct behaviors of adenylate kinase and cytochrome c observed following induction of mitochondrial permeability transition by Ca<sup>2+</sup> in the absence of respiratory substrate.

Yamamoto T, Yoshimura Y, Yamada A, Gouda S, Yamashita K, Yamazaki N, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Shinohara Y.

J Bioenerg Biomembr. 2008 Dec;40(6):619-23. 査読あり

10. Substitution of certain amino acids in a short peptide causes a significant difference in their immunoreactivities with antibodies against different epitopes: evidence for possible folding of the peptide on a nitrocellulose or PVDF membrane.

Matsuo T, Yamamoto T, Katsuda C, Niiyama K, Yamamoto A, Yamazaki N, Ohkura K, Kataoka M, Shinohara Y.

Biologicals. 2009 Jan;37(1):44-7. 査読あり

11. Construction of plasmids suitable for in vitro synthesis of full-length mRNAs having a 3'-poly (A)+tail.

Matsuo T, Obana E, Yamamoto T, Kakuhata R, Yamazaki N, Kataoka M, Baba Y, Hori T, Shinohara Y.

Biotechnol Lett. 2009 Feb;31(2):203-7. 査読あり

12. Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis.

Watanabe M, Yamamoto T, Mori C, Okada N, Yamazaki N, Kajimoto K, Kataoka M, Shinohara Y.

Biol Pharm Bull. 2008 May;31(5):775-84. 査読あり

13. Accurate quantitation of salivary and

pancreatic amylase activities in human plasma by microchip electrophoretic separation of the substrates and hydrolysates coupled with immunoinhibition.

Maeda E, Kataoka M, Yatsushiro S, Kajimoto K, Hino M, Kaji N, Tokeshi M, Bando M, Kido J, Ishikawa M, Shinohara Y, Baba Y.

Electrophoresis. 2008 May;29(9):1902-9 査読あり

14. Functionally important conserved length of C-terminal regions of yeast and bovine ADP/ATP carriers, identified by deletion mutants studies, and water accessibility of the amino acids at the C-terminal region of the yeast carrier. Iwahashi A, Ishii A, Yamazaki N, Hashimoto M, Ohkura K, Kataoka M, Majima E, Terada H, Shinohara Y.

Mitochondrion. 2008 Mar;8(2):196-204 査読あり

15. Importance of probe location for quantitative comparison of signal intensities among genes in microarray analysis.

Kakuhata R, Watanabe M, Yamamoto T, Obana E, Yamazaki N, Kataoka M, Ooie T, Baba Y, Hori T, Shinohara Y.

J Biochem Biophys Methods. 2008 Apr 24;70(6):926-31 査読あり

16. Synchronized changes in transcript levels of genes activating cold exposure-induced thermogenesis in brown adipose tissue of experimental animals.

Watanabe M, Yamamoto T, Kakuhata R, Okada N, Kajimoto K, Yamazaki N, Kataoka M, Baba Y, Tamaki T, Shinohara Y.

Biochim Biophys Acta. 2008 Jan;1777(1):104-12. 査読あり

17. Efficiency of cell-free protein synthesis based on a crude cell extract from Escherichia coli, wheat germ, and rabbit reticulocytes.

Hino M, Kataoka M, Kajimoto K, Yamamoto T, Kido J, Shinohara Y, Baba Y.

J Biotechnol. 2008 Jan 20;133(2):183-9. 査読あり

18. Label-free detection of protein-protein interactions at the GaAs/water interface through surface infrared spectroscopy: discrimination between specific and nonspecific interactions by using secondary structure analysis.

Onodera K, Hirano-Iwata A, Miyamoto K, Kimura Y, Kataoka M, Shinohara Y, Niwano M. Langmuir. 2007 Nov 20;23(24):12287-92 査読あり

19. Determination of human blood glucose levels using microchip electrophoresis.

Maeda E, Kataoka M, Hino M, Kajimoto K, Kaji N, Tokeshi M, Kido J, Shinohara Y, Baba Y.

Electrophoresis. 2007 Aug;28(16):2927-33. 査読あり

20. Interleukin-1alpha regulates antimicrobial peptide expression in human keratinocytes.

Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Shinohara Y, Herzberg MC, Ross KF, Nagata T, Kido J.

Immunol Cell Biol. 2007 Oct;85(7):532-7 査読あり

21. Possible utilization of in vitro synthesized mRNAs specifically expressed in certain tissues as standards for quantitative evaluation of the results of microarray analysis.

Kakuhata R, Watanabe M, Yamamoto T, Akamine R, Yamazaki N, Kataoka M, Fukuoka S, Ishikawa M, Ooie T, Baba Y, Hori T, Shinohara Y.

J Biochem Biophys Methods. 2007 Aug 1;70(5):755-60. 査読あり

22. Regulation of calprotectin expression by interleukin-1alpha and transforming growth factor-beta in human gingival keratinocytes.

Hayashi N, Kido J, Kido R, Wada C, Kataoka M, Shinohara Y, Nagata T.

J Periodontol Res. 2007 査読あり

23. Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species.

Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, Ooie T, Baba Y, Shinohara Y.

J Biochem Biophys Methods. 2007 Apr 10;70(3):481-6 査読あり

24. VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues.

Yamamoto T, Yamada A, Watanabe M, Yoshimura Y, Yamazaki N, Yoshimura Y, Yamauchi T, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Shinohara Y.

J Proteome Res. 2006 Dec;5(12):3336-44 査読あり

J Periodontol Res. 2006 Jun;41(3):159-64 査読あり

25. High-turnover osteoporosis is induced by cyclosporin A in rats.

Wada C, Kataoka M, Seto H, Hayashi N, Kido J, Shinohara Y, Nagata T.

J Bone Miner Metab. 2006;24(3):199-205. 査読あり

他、計 27 件

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Rapid detection of malaria-infected erythrocytes using a cell microarray chip, 山村 昌平、八代 聖基、山口 裕加、民谷 栄一、片岡 正俊, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC'09), 神戸、2009/11/26
  2. Development of a Single-channel Multiple Immunoassay Chip, 田中 正人、大家 利彦、山瓶子 勇次、中原 伴徳、日野 真美、赤峰 理恵、片岡 正俊, LAMP2009, 神戸、2009/06/30
  3. IL-1 $\alpha$  and KGF regulate keratinocyte expression of antimicrobial peptides, 板東 美香、廣島 佑香、片岡 正俊、M.C. HERZBERG、K.F. ROSS、永田 俊彦、木戸 淳一, 86th International Association for Dental Research, トロント、2008/07/05
  4. Sho-saiko-to increase calprotectin expression in human oral epithelial cells, 廣島 佑香、板東 美香、片岡 正俊、M.C. HERZBERG、K.F. ROSS、永田 俊彦、木戸 淳一, 86th International Association for Dental Research, トロント、2008/07/03
  5. Detection of biomarker for periodontal disease using a microchip, 片岡 正俊、日野 真美、八代 聖基、板東 美香、T. KANIE、M. KATAYAMA、木戸 淳一, 86th International Association for Dental Research, トロント、2008/07/05
  6. A Micromachined Fluorescence Detector for Microfluidic Separation of DNA Restriction Fragment Digests and Glucose, 亀井 利浩、松廣 健二郎、片岡 正俊、石川 満, APCE2007, シンガポール、2007/12/19
- 他、計 14 件

〔図書〕(計 1 件)

1. 片岡正俊、篠原康雄 バイオセンサ・ケミカルセンサ事典 第2章第2節「キャピラリー型 DNA 検知システム」(株式会社テクノシステム、2007) pp. 770-777.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: 感染症における感染血液細胞の検出方法  
発明者: 山村 昌平、八代 聖基、片岡 正俊  
権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所  
種類: 特許権  
番号: 特願 2008-225193  
出願年月日: 2008/09/02  
国内外の別: 国内

名称: 抗原抗体反応を利用した標的物質検出用チップ

発明者: 大家 利彦、田中 正人、中原 伴徳、山瓶子 勇次、片岡 正俊、日野 真美、八代 聖基

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許権

番号: 特願 2008-165059

出願年月日: 2008/06/24

国内外の別: 国内

名称: リポソームに抗体結合能を付与するペプチド、および当該ペプチドで修飾されたリポソーム

発明者: 篠原康雄、際田弘志、石田竜弘、山崎尚志、片岡正俊

権利者: 国立大学法人徳島大学、独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許権

番号: 特願 2007-288728

出願年月日: 2007/11/06

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 正俊 (KATAOKA MASATOSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・研究チーム長

研究者番号: 20224438

(2) 研究分担者

篠原 康雄 (SHINOHARA YASUO)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授  
研究者番号: 60226157

(3) 研究分担者

石田 竜弘 (ISHIDA TATSUHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 50325271

(2) 研究分担者

森 秀治 (MORI SHUJI)

岡山大学・医歯薬総合研究科・准教授

研究者番号: 5022009

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: