

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2007～2011  
課題番号：19770136  
研究課題名(和文) 無細胞タンパク質合成系を利用した光受容膜タンパク質の発現法と機能解析への応用  
研究課題名(英文) Development of Expression System for Photoreceptor Using Cell-free Protein Synthesis and Application of Its system for Their Functional Analysis  
研究代表者  
下野 和実 (SHIMONO KAZUMI)  
松山大学・薬学部・助教  
研究者番号：30415187

研究代表者の専門分野：生物物理学, 光生物学, 無細胞生命科学  
科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学  
キーワード：光受容膜タンパク質, 無細胞タンパク質合成, ステロイド系界面活性剤, リポソーム, フォトサイクル

### 1. 研究計画の概要

膜タンパク質の大量発現系構築は困難である場合が多く試料調製が容易ではない。そのため、その重要性にも関わらず膜タンパク質についての理解は、可溶性蛋白質と比較して遅れているのが現状である。そこで本研究では、モデル膜タンパク質としてバクテリオドプシン (BR) を用いて、無細胞タンパク質合成技術を利用し大量機能発現系を開発し、詳細な機能解析に応用できる系を構築することを目的とする。以下に示す課題をもとに研究を進めた。

#### (1) 大量機能合成系の開発

膜タンパク質は疎水性であるので、反応液に疎水性場を提供する必要がある。翻訳物の疎水性場への移行を安定かつ高効率に行なうことができる条件を探索する。

#### (2) 機能発現機構の理解

膜移行速度と凝集速度およびリポソーム形成速度の関係を検討することで、BR の機能発現過程を理解し、系の改良を遂行する。

#### (3) 他の光受容膜タンパク質への適用

BR 以外の光受容膜タンパク質に対して、本系を適用して、その有用性を確認する。

#### (4) アミノ酸ラベル体の調製

無細胞タンパク質合成系の利点の 1 つとして、ラベルアミノ酸導入が容易であることが挙げられる。実際に、アミノ酸ラベル体を合成し、構造・機能解析に利用可能か確認する。

### 2. 研究の進捗状況

#### (1) 大量機能合成系の開発

様々な種類の界面活性剤 (11 種) を検討し

た結果、ステロイド系界面活性剤 (コール酸, CHAPS, ジギトニン) と卵黄フォスファチジルコリンを反応液のみに共存させ、透析による界面活性剤除去と脂質リポソーム形成を同時に行わせた時に BR の機能体を脂質層に挿入された状態で大量に合成 (約 0.5 mg/mL 反応液) できることを見いだした。さらに本法によって合成された BR は、天然試料と同様の光化学反応と光誘起プロトン移動機能を有していることを確認した。また BR の機能合成に対する脂質組成の影響も検討した結果、脂質の相転移温度や曲率圧力が活性体合成に影響を与えることがわかった。

#### (2) 機能発現機構の理解

コール酸/卵黄フォスファチジルコリン共存系において機能発現過程を解析した結果、高濃度のコール酸存在下では、タンパク質合成は阻害されていた。透析による界面活性剤除去が進むとタンパク質合成が開始され、リポソームも同時期に形成されていた。さらにリポソーム形成速度とフォールド分子生成速度は一致していた。従って本法では、脂質ディスクまたは脂質・界面活性剤混合ミセルが、疎水性の高いポリペプチド鎖を保護して凝集体の形成を抑制しながら、BR の脂質膜移行が起きる。このため、フォールディングが効率良く進行すると考えられる。

#### (3) 他の光受容膜タンパク質への適用

大腸菌で大量発現が困難とされている光受容膜タンパク質 (海洋性藻類由来のロドプシン (ARI, ARII)) に対し本技術を適応し、その有用性を検証した。その結果、ARI, ARII ともに構造を保持したと思われる状態で大量

合成できることを確認した。従って、本技術は、これまで大量試料調製が困難であった光受容膜タンパク質の構造・機能解析のための試料調製法として有用であると考えられる。レーザーフラッシュフォトリス法により、それらの光化学反応を測定した結果、ARI は、センサー型 (SRI, II) のようにフォトサイクルが完結する時間が遅く秒オーダーであったのに対し、ARII は、ポンプ型 (BR, HR) と同様に速いミリ秒オーダーのフォトサイクルであることがわかった。また透明ガラス電極 (ITO) による光誘起プロトン移動を測定した結果、中性付近では両者ともに BR と異なりタンパク質内部へのプロトン取り込みが放出に先立ち観測された。

#### (4) アミノ酸ラベル体の調製

高度好塩好アルカリ性菌の光駆動型クロライドポンプ (NpHR) を特定のアミノ酸数種の  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ラベルアミノ酸存在下で機能合成した。合成量はラベルアミノ酸導入によって変化はなく、アミノ酸ラベル体合成にも有用であることを確認した。現在、北海道大学理学研究科出村教授との共同で、ラベル体の固体 NMR による測定を行っている。

### 3. 現在までの達成度

#### ①. 当初の計画以上に進展している (理由)

当初、膜タンパク質の無細胞合成系の確立に多くの期間を要すると考えられたが、ステロイド系界面活性剤と脂質共存下で合成すると BR が大量に機能合成できることを、比較的早い段階で見いだすことができた。そのため他の光受容膜タンパク質への適用に時間をかけることができた。特に大腸菌での大量発現系が確立していない海洋性藻類由来のロドプシン (ARI, ARII) の無細胞タンパク質大量機能合成の成功、および機能解析への応用は、光受容膜タンパク質研究分野でのさらなる進展をもたらすと考えられる。

### 4. 今後の研究の推進方策

無細胞タンパク質合成系の開発、改良はほぼ完了した。今後は、機能解析への応用を中心に進める。本年度が最終年度であるため、これまでの研究を継続する。固体 NMR 測定のための選択アミノ酸導入や無細胞タンパク質合成を利用しなければ大量試料調製ができない ARI, ARII を中心に進める。ARI や ARII は赤外分光法を含めた更なる詳細な機能解析を行う。また現在、着手している大腸菌で大量発現が困難とされている別の光受容膜タンパク質 (チャンネルロドプシン) について、合成条件 (脂質や界面活性、合成温度) の検討を行う必要がある。またポリペプチド鎖は大量合成できるため、可溶化、界面活性剤除去によるリフォールドを試みる予定である。

### 5. 代表的な研究成果

(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 1 件)

- ①. Kazumi Shimono, Mie Goto, Takashi Kikukawa, Seiji Miyauchi, Mikako Shirouzu, Naoki Kamo, and Shigeyuki Yokoyama (2009) "Production of functional bacteriorhodopsin by an *Escherichia coli* cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid" *Protein Science*, **18**, 2160-2171. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ①. 下野 和実「等温滴定型熱量計による多剤輸送担体 EmrE と基質との相互作用解析」日本薬学会第 130 年会, 平成 22 年 3 月 29 日 (岡山)
- ②. 下野 和実「SMR 型多剤輸送担体と基質の相互作用に伴う熱量変化」日本生物物理学会第 47 回年会, 平成 21 年 10 月 31 日 (徳島)
- ③. Kazumi Shimono "Functional Overexpression of Membrane Proteins Using Cell-free Protein Synthesis System Supplemented with Steroid Detergent and Lipid" Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium 2008, 平成 20 年 9 月 26 日 (Matsuyama)
- ④. 下野和実「SMR 型多剤排出タンパク質の無細胞大量機能発現および等温滴定型熱量計による基質との相互作用解析」平成 21 年 8 月 7 日 (札幌)
- ⑤. 下野和実「無細胞タンパク質合成系を利用した新規膜タンパク質機能発現系の開発」日本生物物理学会第 45 回年会, 平成 19 年 12 月 21 日 (横浜)