

機関番号：36301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2010

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

研究成果の概要 (和文)：一般に膜タンパク質は、無細胞タンパク質大量合成は困難である。本研究では、透析法によりステロイド系界面活性剤除去・脂質二重膜形成・タンパク質合成を同時に行わせる無細胞タンパク質合成技術を開発した。本法では、バクテリオロドプシンの機能体を大量に合成 (約 0.5 mg/mL 反応液) でき、従来法に比べ 5-25 倍の収量であった。さらに生細胞系では、大量発現ができない海洋性藻類と好塩真正細菌由来のロドプシンの大量機能合成にも成功した。

研究成果の概要 (英文)：In general, a functional cell-free protein synthesis for membrane proteins at high yield is difficult. In the present study, we developed the novel cell-free protein synthesis technology that was performed the steroid derived detergent removal, the lipid bilayer formation, and the protein synthesis by the dialysis method at the same time. We obtained the functional Bacteriorhodopsin in a large amount (0.5 mg/mL reaction solution), and this yield was 5-25 times higher than previously described preparations. In addition, it succeeded a functional overexpression of the rhodopsin from marine algae and eubacteria that could not be obtained in large amount using the living cell expression system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,300,000	690,000	3,990,000

研究分野：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：膜タンパク質, 大量発現, ステロイド系界面活性剤, 脂質二重膜, フォトサイクル, ロドプシン

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の大量発現系には大腸菌や酵母, 昆虫細胞, 高等動物細胞などの生細胞を用いた系が一般的である。しかし, 生物種の異なる膜タンパク質を生体膜に大量に機能的に発現させることは, 膜組成の違いや膜

移行過程の違いなどから困難である場合が多い。

無細胞タンパク質合成系を利用した膜タンパク質の発現系では, 通常その高い脂溶性のため, 翻訳後に凝集体を形成し, 沈殿物として回収され, その後技術的に困難な場合が

多いリフォールドの過程を必要とする。従って、膜タンパク質の無細胞合成では、凝集体形成を回避する必要がある。この方法としては、翻訳産物の可溶性増大と疎水性場の提供の2つの方法に大別される(図1)。

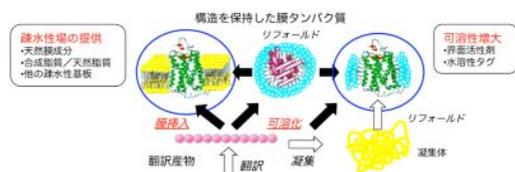


図1. 膜タンパク質凝集体形成の回避法

前者では、大きな水溶性タンパク質タグを融合して翻訳産物の水溶性を増大させる系と温和な界面活性剤を系に添加することで膜タンパク質を可溶性画分として得る方法が開発されている。疎水性場の提供としては、生体膜成分を共存させる系がある。しかしこの系では、合成量が少なく、夾雑膜タンパク質が多量に存在しているため、精製、再構成過程が必要となり、物理化学的手法に対する試料調製法としては困難となる。一方、脂質リポソーム中に膜タンパク質を合成する系では、目的タンパク質以外の膜タンパク質がリポソーム上に存在しないことからリポソームを分離するのみで非常に純度が高い安定な試料を得ることができるという試料調製の上で大きな利点がある。しかし、合成脂質リポソームを添加した系では、唯一細菌の多剤排出タンパク質 EmrE の成功例1例が報告されているのみである。

このような背景のもと、脂質リポソーム中への膜タンパク質の無細胞大量機能合成系を確立するために、本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

膜タンパク質は、生体膜を隔てたエネルギー変換、物質輸送、そして情報伝達といった、生命にとって極めて重要な機能を担っている。このため膜タンパク質は医薬品開発の標的として、現在盛んに研究が行われている。しかし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。このことが、ボトルネックの1つとなり、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。

無細胞タンパク質合成系は、生命体の細胞機能維持性などの束縛条件が少なく合成系を構築できるため、生細胞発現系に比べ系の改変が容易などの利点をもつ。そのため生細胞を用いた膜タンパク質の大量発現系構築の問題点を克服できる手法として、無細胞タンパク質合成系が期待できる。

そこで本研究では、無細胞タンパク質合成技術を利用して合成脂質リポソーム中に光受容膜タンパク質を大量機能発現できる系

を開発することを目的とし、さらに開発した方法を用い詳細な機能解析に応用する。

3. 研究の方法

理化学研究所タンパク質構造・機能研究グループ(横山茂之グループリーダー、現生命分子システム基盤研究領域)で開発された大腸菌抽出液を用いた高収率無細胞タンパク質合成系を利用し、膜タンパク質を膜環境に移行させる無細胞機能合成系確立を目指した。無細胞タンパク質合成は、反応内液に種々の界面活性剤と脂質を共存させ 30 °C、6時間透析法(透析膜、分画サイズ 15 kDa)により行った。反応スケールは、0.9 mL 反応内液とし、外液は 9 mL とした。

系の改良、確立には、モデルタンパク質として細菌の光受容膜タンパク質であるバクテリオロドプシン(7回膜貫通型)を用いた。バクテリオロドプシンは、最も構造機能が詳細に解明されている膜タンパク質の1つであり、安定性が高いことでも知られる。また発色団であるレチナールの周辺環境の違いにより正常なフォールドとそれ以外の状態を可視吸収により区別できるので、機能を保持しているかどうかを簡便に評価出来る利点をもつ。さらに光をトリガーとして反応を開始するため高時間分解能での計測が可能である。総タンパク質量は、SDS-PAGE CBB 染色でのバンド染色強度比から算出し、機能体量は、550 nm の吸光度から算出した。標品は、金属アフィニティーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより高純度に精製した試料を用いた。

光化学反応や光誘起プロトン移動測定といった機能解析は、合成反応液超速心沈殿物または、金属アフィニティーカラム精製物や卵黄フォスファチジルコリン再構成物を用いた。測定は、北海道大学大学院薬学研究科および松山大学薬学部加茂直樹教授と共同で行った。

4. 研究成果

研究期間内に得た成果は、膜タンパク質の無細胞合成技術の開発、改良として、1) 光受容膜タンパク質の大量機能合成系の開発、2) 開発した系の機能発現機構の解析である。さらに開発した手法の有用性確認、機能解析への応用として、3) 他の光受容膜タンパク質への適用および構造・機能解析、4) アミノ酸ラベル体の調製である。以下に具体的な内容を記す。

(1) 光受容膜タンパク質の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 の機能体を脂質二重膜層に挿入された状態で合成できることを見いだした（図2）. 本法による機能体 BR の収量は、約 0.5 mg/mL 反応液であり、従来法に比べ 5-25 倍の収量であった。また本法では、従来法と異なり合成産物を沈殿画分として得るため、遠心操作により簡単に BR を分離することができる。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。

界面活性剤 (内液)	-	OG	TX	DDM	B58	Dig	Cho	Cho	Cho	Cho	Cho	Cho
脂質 (外液)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
菌質	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

図2. 様々な界面活性剤と脂質共存下でのバクテリオロドプシンの無細胞タンパク質合成: 界面活性剤が Dig (ジギトニン), Cho (コール酸) と脂質を添加した時に、バクテリオロドプシンが正常に合成されたことを示す紫色をしている。

また、構成脂質として DMPC (ジミリスチルホスファチジルコリン), アズレクチン, ウシ脳抽出脂質, 高度好塩菌抽出脂質が適用可能であり、界面活性剤として CHAPSO, デオキシコール酸, タウロコール酸を用いた場合でも同程度の収量で BR を合成することができた。これらの結果から本手法は、界面活性剤として様々なステロイド系界面活性剤と広範囲の脂質の組み合わせが適用でき、発現させたい膜タンパク質の性質に合わせ選択できる。従って、本手法は、新規膜タンパク質大量調製法として有用であると考えられる。

(2) 機能発現機構の解析

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（図3）。

(3) 他の光受容膜タンパク質への適用および構造・機能解析

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（海洋性藻類と好塩真正細菌由来のロドプシン (ARI, ARII, XR),) 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。さらにレーザーフラッシュフォト

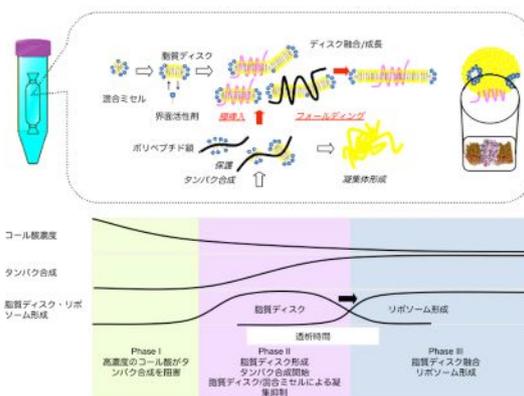


図3. 開発した膜タンパク質の無細胞タンパク質合成手法の模式図: 合成された膜タンパク質の効率の良い膜移行のために、界面活性剤により不安定な疎水性の高いポリペプチド鎖を保護し、凝集体形成を抑制しつつ、同時にリポソームに再構成させる方法を開発した。

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) のように光化学反応が完結する時間が遅く秒オーダーであったのに対し、ARIII 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 (Kikukawa, T. et al. 投稿準備中)。さらに理化学研究所生命分子システム基盤研究領域横山茂之領域長と共同で結晶構造解析も進めている (Wada, T. et al. 審査中)。

XR も、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できた。合成産物のフォトサイクルは、第2の発色団であるサリニキサンチンを化学的分解除去した天然 XR と同様であった。しかし可溶化効率が悪く、混入しているアンフォールド分子を除去することができなかったため、さらなる詳細な解析が不可能であった。そこで可溶化効率をあげるために、バッファー pH, 塩濃度を検討した結果、酸性状態 (pH 5.7) で収量が増加し、純度の高い試料を得ることができた。しかし、測定に十分とは言えず、現在、さらなる効率化のために無細胞タンパク質合成条件 (共存脂質の量や種類, 共存界面活性剤の種類) の検討を行っている。

これらの結果から、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。

(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 (Arg, His, Phe, Gly, Tyr ラベル体および Asp, Thr, Met, Pro, Gly, Val ラベル体の2種類合成) の ^{13}C , ^{15}N ラベルアミノ酸存在下で機能合成した。無細胞合成系は、アミノ酸の代謝活性が低く抑えられているため高効

率で特定のラベルアミノ酸を導入できる。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誠教授との共同で、ラベル体の固体NMRによる測定を行っている。

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 8 件)

- ①. 下野和実, 白水美香子, 横山茂之 (2011) 「無細胞タンパク質合成による膜タンパク質の生産」 *生物物理*, 51 (3), 128-129. 査読有
- ②. Nakao, Y., Kikukawa, T., Shimono, K., Tamogami, J., Kimitsuki, N., Nara, T., Unno, M., Ihara, K., and Kamo, N. (2011) “Photochemistry of a Putative New Class of Sensory Rhodopsin (SRIII) coded by xop2 of Haloarcula marismortu” *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 102, 45-54. 査読有
- ③. 下野和実, 白水美香子, 横山茂之 (2010) 「無細胞タンパク質合成系を活用した膜タンパク質合成方法」 *実験医学*, 28 (11), 1775-1780. 査読無
- ④. 下野和実, 白水美香子, 横山茂之 (2010) “無細胞タンパク質合成系を活用した膜タンパク質合成法の開発” *BIO INDUSTRY*, 27, 55-63. 査読無
- ⑤. Shimono, K., Goto, M., Kikukawa, T., Miyauchi, S., Shirouzu, M., Kamo, N., and Yokoyama S. (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
- ⑥. Shimono, K., Kikukawa, T., Nara, T., Someya, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Miyauchi, S. (2008) “Functional overexpression of SMR-type multidrug transporter using cell-free protein synthesis system and analysis of interaction between transporter and its substrates by isothermal titration calorimetry” *Yakugaku Zasshi Journal of The Pharmaceutical Society of Japan*, 128, (Suppl. 2), 139-140. 査読無
- ⑦. Sudo, Y., Nishihori, T., Iwamoto, M., Shimono, K., Kojima, C., and Kamo, N. (2008) “A long-lived M-like state of

phoborhodopsin that mimics the active state” *Biophysical Journal*, 95, (2), 753-760. 査読有

- ⑧. Kawamura, I., Ikeda, Y., Sudo, Y., Iwamoto, M., Shimono, K., Yamaguchi, S., Tuzi, S., Saito, H., Kamo, N., and Naito, A. (2007) “Participation of the surface structure of Pharaonis phoborhodopsin, ppR and its A149S and A149V mutants, consisting of the C-terminal alpha-helix and E-F loop, in the complex-formation with the cognate transducer pHtrII, as revealed by site-directed C-13 solid-state NMR” *Photochemistry and Photobiology*, 83, (2), 339-345. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ①. Kazumi Shimono “Thermodynamic characterization of interaction between small multidrug resistance transporter (EmrE) and its substrate at various pHs” Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, 平成 22 年 11 月 16 日 (New Orleans, LA, USA)
- ②. Kazumi Shimono “Thermodynamic study of pH dependence on interaction between small multidrug resistance transporter (EmrE) and its substrate” 日本生物物理学会第 48 回年会, 平成 22 年 9 月 20 日 (仙台)
- ③. 下野和実 「等温滴定型熱量計による多剤トランスポーター EmrE と基質との相互作用解析」 第 4 回トランスポーター研究会九州部会, 平成 22 年 9 月 11 日 (長崎)
- ④. 下野和実 「多剤輸送担体 EmrE と基質との pH 依存的相互作用変化の熱力学的特性」 日本生物物理中国四国支部例, 平成 22 年 5 月 8 日 (松山)
- ⑤. 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)
- ⑥. 下野和実 「SMR 型多剤排出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)
- ⑦. 下野和実 「Na+共役型モノカルボン酸輸送担体 (SMCT) に対する柑橘類抽出成分の効果」 第 4 回トランスポーター研究会, 平成 21 年 5 月 23 日 (東京)
- ⑧. 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, Japan)

- ⑨. 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」第 30
回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム,
平成 20 年 8 月 7 日 (東京)
- ⑩. 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)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: METHOD FOR PRODUCING MEMBRANE
PROTEIN

発明者: Shigeyuki Yokoyama, Kazumi Shimono,
Mikako Shirouzu, and Mie Goto

権利者: RIKEN

種類: 特許権

番号: WO/2009/060857

公開年月日: 2009 年 5 月 14 日

国内外の別: 国外

名称: 2 型ヒスタミン受容体タンパク質に結
合し, かつ 2 型ヒスタミン受容体とヒスタミ
ンとの結合を阻止し得るモノクローナル抗
体

発明者: 渡邊武, 横山茂之, 白水美香子, 寺
田貴帆, 下野和実

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許権

番号: 特許公開 2008-167738

公開年月日: 2008 年 7 月 24 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 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