

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24681028

研究課題名(和文)有機-無機ハイブリッドベシクルを用いた高効率・完全無細胞膜タンパク発現システム

研究課題名(英文) Highly efficient cell-free membrane protein expression in organic-inorganic hybrid vesicles

研究代表者

安原 主馬 (Yasuhara, Kazuma)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：90545716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、有機-無機ハイブリッドベシクルの有する分子ふるい機能を利用することで、極めて高効率に膜タンパク質を無細胞で発現できるシステムを構築することを目的とした。表面に分子間架橋されたセラミック様骨格をもつ有機-無機ハイブリッドベシクルは低分子の透過を許容し、高分子は透過しない分子ふるい機能を有する。有機-無機ハイブリッドベシクルの構造や分子ふるい機能は、各種両親媒性分子との混合によりチューニングできる。有機-無機ハイブリッドベシクルの内部に酵素反応系をカプセル化することで、ベシクルの有する分子ふるい機能を活用した膜タンパク質の発現システムを構築可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the development of a highly efficient cell-free membrane protein expression system using organic-inorganic hybrid vesicles. The organic-inorganic hybrid vesicles with a crosslinked ceramic-like surface have a semi-permeable feature in which small molecules can permeate across the membrane whereas large molecules cannot. The structure and semi-permeable feature of the organic-inorganic hybrid vesicles can be tuned by the incorporation of various amphiphiles. It was suggested that the encapsulation of enzymatic reaction system enables the development of a membrane protein expression system, which utilizes the semi-permeable feature of the organic-inorganic hybrid vesicles.

研究分野：界面物理化学、高分子化学

キーワード：バイオリアクター マイクロ・ナノデバイス 有機-無機ハイブリッド ベシクル 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は、膜タンパク質と脂質二分子膜が複合化した超分子集合体であり、細胞内外を隔てる隔壁としての役割のみならず、様々な細胞機能を担う高度なインターフェースである。膜タンパク質は、細胞膜における機能モジュールであり、エネルギー変換や物質輸送・シグナル伝達といった重要な細胞機能を果たしている。また、近年では様々な疾病における創薬のターゲットとしても膜タンパク質は大きな注目を集めている。膜タンパク質は、ゲノムの約30%を占めるが、他の可溶性タンパク質と比較してその理解は大きく遅れている。これは、膜タンパク質は脂質膜に組み込まれた状態においてのみ構造が維持可能であり、水溶液中では凝集・変成を容易に引き起こすために試料の大量調製が困難になっているからである。

膜タンパク質の発現においては、生きた細胞を用いたものが一般的であるが、目的とする膜タンパク質の単離・精製が困難な点や、異なる生物種での発現における効率の低さが問題となっている。そこで、代替手法として注目されるのが大腸菌抽出液等を用いた無細胞発現系である。これまでに、リン脂質リポソームを用いた無細胞膜タンパク質発現システムが報告されているが、この場合においても、低い発現効率が解決すべき課題となっており、これはタンパク質合成の原料となるアミノ酸およびエネルギー源であるATPがリポソーム内ですぐに枯渇してしまうことに原因がある。したがって、本研究では、低分子の透過のみを許容する分子ふるい機能を有するベシクルを開発・作成し、無細胞タンパク質発現系と組み合わせることで、従来とは異なる新しい膜タンパク質の発現システムを提案できると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、有機-無機ハイブリッドベシクルの有する分子ふるい機能を利用することで、極めて高効率に膜タンパク質を無細胞で発現できるシステムを構築することを目的とした。膜タンパク質は様々な疾病の創薬ターゲットとして注目されているが、取り扱いの困難さからDNAの翻訳から膜への再構成までを高効率で行える発現系は未だ確立していない。本研究においては、膜タンパク質の大量発現から脂質膜への組み込みに至る一連のプロセスを単一操作・完全無細胞で高効率に行えるシステムを構築し、幅広い膜タンパク質を簡便に取り扱うことのできるシステムをめざした。

3. 研究の方法

本研究課題の目的を達成するために、以下の方法により検討を行った。

(1) 有機-無機ハイブリッド脂質の合成とベシクル形成

分子ふるい機能を有するベシクルを形成

するための脂質分子として、本研究では有機-無機ハイブリッド構造を有する脂質分子(図1)の合成を行った。本分子は、ジヘキサデシルアミンを出発原料として、4段階で得た。

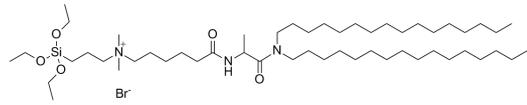


図1.有機-無機ハイブリッド脂質の構造式

得られた有機-無機ハイブリッド脂質を用いて、薄膜法により水中で多重層ベシクルMLVを形成し、エクストルージョンを行うことで、均一な粒径を有する単一層ベシクル(LUV)の調製を行った。また、蛍光顕微鏡での観察を目的として、細胞サイズのジャイアントベシクル(GUV)についても静置水和法により作成した。

(2) 有機-無機ハイブリッドベシクルの構造および分子ふるい機能の評価

得られた有機-無機ハイブリッドベシクルの構造及び特性について、動的光散乱(DLS)、示差走査熱量分析(DSC)およびCryo-TEM法によって評価を行った。また、ベシクルの有する分子ふるい機能すなわち膜透過における分子量依存性を評価するために、異なる分子量を有するポリエチレングリコールに対して蛍光色素(FITC)を導入したマーカー分子を合成し、その漏出挙動について蛍光分光光度計を用いて評価した。また、膜透過における境界分子量を評価するために、MALDI-TOFMS測定による漏出マーカー(PEG)の分子量測定も行った。

(3) ベシクル内部への酵素反応システムの組み込みと遺伝子発現

ベシクル内部での酵素反応について定量的に評価するために、 α -キモトリプシンによる加水分解反応をモデル系として用いた。ベシクルに未封入の α -キモトリプシンは、ゲル濾過クロマトグラフィーにより除去した。ベシクル内部での酵素反応は、*p*-ニトロアニリドを末端に有するペプチドを基質として用い、加水分解に伴う吸収スペクトル変化から定量的に評価を行った。

有機-無機ハイブリッドベシクル内での遺伝子発現について、大腸菌由来の無細胞遺伝子発現系を組み込んだジャイアントベシクルの調製を行った。ベシクル内での遺伝子発現については、緑色蛍光タンパク(GFP)に由来する蛍光を顕微鏡観察することによって評価した。

4. 研究成果

(1) 分子ふるい機能をもつ有機-無機ハイブリッドベシクルの作成と評価

図1に示した有機-無機ハイブリッド脂質を水中に分散させることで、直径数百ナノメ

一トル程度の MLV を自発形成することが可能である。また、ベシクルサイズおよび膜の多重度は、MLV に対してエクストルージョン法を併用することによって制御可能であることを、ベシクル分散液の DLS 測定及び Cryo-TEM 観察より明らかにした。

つづいて、有機-無機ハイブリッドベシクルの有する分子ふるい効果について検討を行ったところ、ベシクルからのマーカー分子の漏出は、その分子量に大きく依存し、低分子量のマーカーは高分子量のものと比較してより顕著に漏出することが確認された(図 2a)。また、分子量分布を有する PEG を封入し、漏れ出した画分に対して MALDI-TOFMS 測定によって分子量測定を行ったところ、約 $1,500\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ に漏出における境界分子量が存在することを明らかにした(図 2b)。

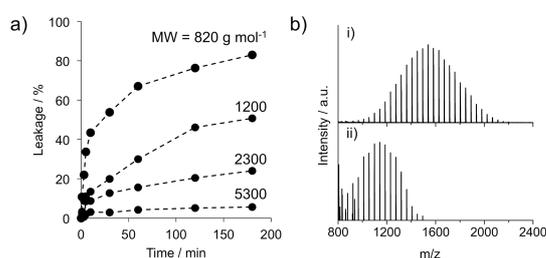


図 2. 有機-無機ハイブリッドベシクルの分子ふるい効果 a)分子量に依存したマーカー分子の漏出挙動と b)ベシクルに封入した PEG(i) および漏出した画分(ii)の MALDI-TOFMS 測定結果

(2) タンパク質発現にむけたベシクルの構造チューニング

有機-無機ハイブリッドベシクルの有する分子ふるい機能および、膜構造のチューニングを行うため、種々の合成および天然の両親媒性分子を有機-無機ハイブリッド脂質と混合して形成されたベシクルの評価を行った。前者に関して、一本鎖のアルキル基を有し、頭部にトリエトキシシリル基を有する両親媒性分子を合成し、図 1 に示した脂質分子と混合してベシクルの形成を行った。マーカー分子である FITC-PEG 漏出の分子量依存性は、修飾した一本鎖両親媒性分子の添加量に依存して変化し、その添加量に応じて境界分子量を大きくもしくは小さくチューニングできることが示された。このことから、ベシクル表面でのシロキサン骨格の架橋度を変化させることで分子ふるい機能を制御できることが明らかになった。

後者に関してはリン脂質との混合により、膜タンパク質組み込み部位としての脂質ドメイン構造を有するベシクルの形成について検討を行った。有機-無機ハイブリッド脂質と大きくゲル-液晶相転移温度が異なるリン脂質と混合し、形成した GUV の顕微鏡観察を行ったところ、位相差像においては均一な球状の像が観察されたのに対し、蛍光像からは、蛍光プローブ分子(DiI-C₁₈)が不均一に局

在する様子がみられた(図 3)。このことから、有機-無機ハイブリッド脂質は、リン脂質と混合することで、ドメイン構造を有するハイブリッドベシクルを形成可能であることを明らかにした。

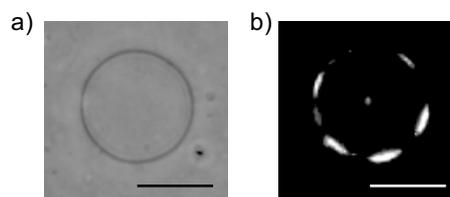


図 3. ドメイン構造を有する有機-無機ハイブリッドベシクルの位相差像(a)および DiI-C₁₈ 蛍光像(b) スケールバーは 10μm

(3) 有機-無機ハイブリッドベシクル内部への酵素封入とタンパク質発現

有機-無機ハイブリッドベシクルの内水相に対する酵素反応システムの組み込みとその評価を行った。はじめに、 α -キモトリプシンをモデルとして有機-無機ハイブリッドベシクルに組み込み、その酵素反応について追跡を行った。 α -キモトリプシンを封入したベシクルの外部に、基質として Bz-Tyr-pNA を添加したところ、加水分解反応に由来する吸光度の変化が見られた。従って、低分子量の基質は有機-無機ハイブリッドベシクルを透過可能であり、 α -キモトリプシンは、有機-無機ハイブリッドベシクルに封入した状態でもその酵素活性を維持していることが明らかになった。加えて、各種阻害剤添加による酵素反応制御を試みたところ、 α -キモトリプシンの酵素反応は膜を透過できる銅イオンによって阻害されるものの、膜透過できない高分子量のウシ膝臓トリプシンインヒビター(BPTI, MW = 6.5 kDa)によっては阻害されないことが示され(図 4)、分子ふるい効果を利用した酵素反応制御が可能であることを明らかにした。

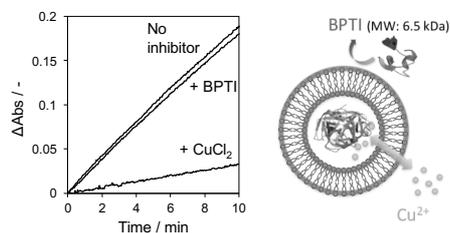


図 4. 有機-無機ハイブリッドベシクルの分子ふるい機能を利用した酵素反応制御

続いて、有機-無機ハイブリッドベシクル内部での無細胞遺伝子発現系によるタンパク質発現について検討した。ベシクル内部に無細胞遺伝子発現系を組み込むために、w/o エマルションを用いた界面通過法によりジャイアントベシクルの形成を行った。GFP をコードしたプラスミドを用いて遺伝子発現を行ったところ、ジャイアントベシクルは

GFP に由来する緑色蛍光を示すことを蛍光顕微鏡観察によって確認したことから、有機-無機ハイブリッドベシクルの内部においても無細胞遺伝子発現システムは機能し、タンパク質の発現が可能であることを明らかにした。

(4) まとめと今後の展望

以上より、有機-無機ハイブリッドベシクルは低分子の透過は許容し、高分子は透過しない分子ふるい機能を有することが示された。有機-無機ハイブリッドベシクルの構造や分子ふるい機能は、各種両親媒性分子との混合によりチューニングできることが明らかになった。有機-無機ハイブリッドベシクルを利用し、内部に酵素反応系をカプセル化することで、ベシクルの有する分子ふるい機能を活用した膜タンパク質の無細胞発現システムを構築可能であることが示された。本研究で得られた技術基盤は、多様なタンパク質研究に適用可能であると考えられ、タンパク質の工学的利用をはじめとする新たな応用展開が可能であると期待される。

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 12 件)

- ① K. Yasuhara, (他 1 名, 1 番目), Kinetic study of all-or-none hemolysis induced by cationic amphiphilic polymethacrylates with antimicrobial activity, *Chinese Chemical Letters*, 2015, 26, 479-484. 査読有, Back cover として採用
- ② K. Yasuhara, (他 10 名, 7 番目), Porphyrin-uptake in liposomes and living cells using an exchange method with cyclodextrin, *RSC Advances*, 2015, 5, 105279-105287. 査読有
- ③ K. Yasuhara, (他 6 名, 7 番目), Lipid-membrane-incorporated hydrophobic photochromic molecules prepared by the exchange method using cyclodextrins, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2015, 13, 6175-6182. 査読有, Front cover として採用
- ④ K. Yasuhara, (他 3 名, 4 番目), Modulation of raft domains in a lipid bilayer by boundary-active curcumin, *Chemical Communications*, 2014, 50, 3427-3430. 査読有
- ⑤ K. Yasuhara, (他 4 名, 2 番目), Morphological Change of Cell Membrane by Interaction with Domain-Swapped Cytochrome *c* Oligomers, *ChemBioChem*, 2014, 15, 517-521. 査読有
- ⑥ K. Yasuhara, (他 5 名, 6 番目), Dynamic behaviour in giant unilamellar vesicles induced by the uptake of [70] fullerene,

Chemical Communications, 2014, 50, 1228-1291. 査読有, Inside Front cover として採用

- ⑦ K. Yasuhara, (他 3 名, 2 番目), Synthetic cell division system: Controlling equal vs. unequal divisions by design, *Scientific Reports*, 2013, 3, 3475. 査読有
- ⑧ K. Yasuhara, (他 4 名, 1 番目), Spontaneously formed semipermeable organic-inorganic hybrid vesicles permitting molecular weight selective transmembrane passage, *Chemical Communications*, 2013, 49, 665-667. 査読有
- ⑨ 安原主馬, セラミック表面によって安定化された脂質二分子膜ナノディスクの形成, *C&I Commun.* 2013, 38, 29-32. 査読無
- ⑩ K. Yasuhara, (他 2 名, 1 番目), Thermal stability of synthetic lipid bicelles encompassed by siloxane surfaces as organic-inorganic hybrid nanodiscs, *Chemistry Letters*, 2012, 41, 1223-1225. 査読有

ほか 2 件

[学会発表] (計 23 件)

- ① K. Yasuhara, Self-Assembly of Organic-Inorganic Hybrid Lipids in Water Toward Fabrication of Bio-nanomaterials, Rensselaer Polytechnic Institute MTLE department seminar, 2014.11.13, Troy, NY, USA. 招待講演
- ② K. Yasuhara, Fabrication of semipermeable organic-inorganic hybrid vesicles and their application to nanocapsule for enzymatic reaction, The 7th International Workshop on ADVANCED MATERIALS SCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, 2014.11.4, Ha Long City, Vietnam. 招待講演
- ③ K. Yasuhara, Organic-inorganic Hybrid Vesicles as Spontaneously Formed Semipermeable Nanocapsule, XXIII INTERNATIONAL MATERIALS RESEARCH CONGRESS 2014, 2014.8.18, Cancun, Mexico.
- ④ K. Yasuhara, Spontaneously formed semipermeable organic-inorganic hybrid vesicles and their application to bio-nano reactors, XVII International Sol-Gel Conference, 2013.8. 29, Madrid, Spain.
- ⑤ 安原主馬, 有機-無機ハイブリッド脂質の自己組織化とバイオ応用, 奈良先端未来開拓コロキウム, 2013.8.9, 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市) .
- ⑥ 安原主馬, 有機無機ハイブリッドベシクルの選択的膜透過を利用した酵素反応制御, 日本化学会第 93 春季年

- 会, 2013.3.24, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市) .
- ⑦ 安原主馬, 有機-無機ハイブリッドベシクルの分子ふるい機能とバイオナノリアクターへの応用, 日本化学会第 93 春季年会, 2013.3.23, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市) .
- ⑧ K. Yasuhara, Organic-Inorganic Hybrid Vesicle as Semipermeable Nano-capsule, The Macro/NAIST Joint Workshop for Emerging Researchers, 2012.10.24, Ann Arbor, MI, USA. 招待講演
- ⑨ 安原主馬, 有機-無機ハイブリッドベシクル「セラソーム」における分子量選択的膜透過とその制御, 日本ゾルゲル学会 第 10 回討論会, 2012.7.27, 慶應義塾大学矢上キャンパス (神奈川県横浜市) .
- ⑩ 安原主馬, セラソームの半透膜機能とその制御, 第 61 回高分子学会年次大会, 2012.5.29, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) .

ほか 13 件

[その他]

- ・ 日本化学会第 93 春季年会において優秀講演賞(学術)を受賞.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安原 主馬 (YASUHARA KAZUMA)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号: 90545716