

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14475

研究課題名(和文)細胞膜改変大腸菌による膜タンパク質発現系の構築

研究課題名(英文)Construction of E. coli expression system for eukaryotic membrane proteins

研究代表者

今井 友也 (Imai, Tomoya)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号：90509142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の細胞膜はホスファチジルコリン(PC)を主成分として含む。一方で異種発現系によく使われる大腸菌の細胞膜の主成分はホスファチジルエタノールアミン(PE)であり、PCを全く含まない。膜タンパク質の機能や構造は、周囲の脂質分子に影響を受けることが報告されていることから、大腸菌のPEをPCへ変換して膜脂質環境を真核生物的にすることで、真核生物の膜タンパク質を大腸菌で発現できる可能性を調査した。

NMT(N-メチル基転移酵素)遺伝子を導入することで、大腸菌の脂質をPCリッチに成功することには成功したが、用いた真核生物由来の膜タンパク質の細胞膜への発現には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The cell membrane of eukaryotic cells includes phosphatidyl choline (PC) whereas that in E. coli cells does not have PC but phosphatidyl ethanolamine (PE). Given this lipid composition, we tested the idea to use Escherichia coli expression system for expressing eukaryotic membrane protein by using a transformed E. coli that produces PC in its cell membrane. We successfully produced an E. coli transformant producing PC in its cell membrane. This transformant was used for expressing cellulose synthase complex of Gluconacetobacter (a bacterium producing PC), CesaA - the catalytic subunit of cellulose synthase - of a green algae, CesaA of a tunicate, and a glycosyltransferase from plant. Although this strategy did not work well in most of the experiments, one of the experiments for expressing green algae CesaA showed the expression in the cell membrane of E. coli transformant. Further study will be necessary for reproducible result for concluding if this strategy is realistic.

研究分野：生化学

キーワード：膜タンパク質 真核生物 細胞膜脂質 ホスファチジルコリン 大腸菌発現系

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、様々な生物の様々な生命現象で、大変重要な役割を果たしている。しかし、その生化学実験は一般に難しく、水溶性のタンパク質と比較して、膜タンパク質の生化学的研究は遅れている。タンパク質一般の研究において、発現系を使って得られる組換え体タンパク質は、多量の試料が入手可能である、変異導入などの修飾が容易に行える等、天然由来のタンパク質にはない利点を持ち、タンパク質の研究に必須のツールであるが、膜タンパク質の場合は、発現系構築が難しく、組換え体タンパク質の利用が現実的でないこともしばしばである。真核生物由来の膜タンパク質であればさらに難しく、膜タンパク質研究の遅れの一因となっている。

2. 研究の目的

本申請では、真核生物由来の膜タンパク質を発現できる大腸菌発現系の構築を目指す。様々な発現系の中でも、大腸菌発現系は、簡便さという点で大変優れた実験系である。一方で、原核生物である大腸菌で、真核生物由来の膜タンパク質を発現させようとすると、発現しなかったり、発現してもミスフォールド状態で発現されるなどの問題が頻繁に生じる。その改善のために、封入体化を防ぐ融合タグタンパク質や、使用コドンの最適化などの様々な方策が提案されているが、それでも発現できない場合は多い。本申請課題では、上記の方策のような、タンパク質発現の改良ではなく、膜タンパク質を取り巻く細胞膜の脂質に着目し、脂質組成の改変により、膜タンパク質のための効率的な大腸菌発現系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1)大腸菌脂質組成の改変

大腸菌と真核生物の細胞膜脂質成分の大きな違いとして、大腸菌はホスファチジルコリン(PC)を含まないことが挙げられる。この点に注目し、大腸菌のPEをPCに変えることで大腸菌の脂質環境が真核細胞的になり、真核生物由来の膜タンパク質発現に適当な脂質環境になるのではと考えた(図1)。

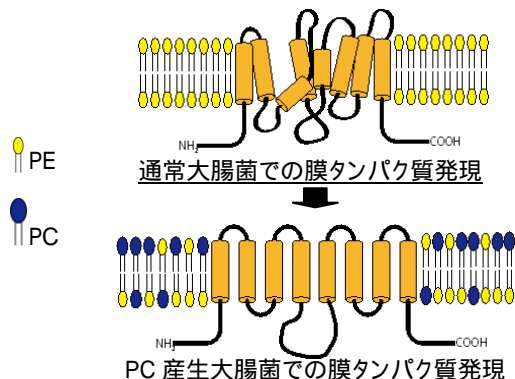


図1 本課題で構築を目指す真核生物由来膜タンパク質の大腸菌発現系のイメージ図

PEのPCへの変換は、既報を参考にして酢酸菌のPE-N-メチル基転移酵素(PE-NMT)を発現させることで行った(GeneBank: AB019196.1)。PE-NMTタンパク質のチオレドキシニン融合タンパク質発現系を、pBAD33ベクターを使い構築した。このプラスミドDNAはp15A由来の複製起点をもち、pETやpQEなど多くの汎用大腸菌発現用ベクターと共存できることから選択した。本発現系はアラビノース添加によりPE-NMTタンパク質を誘導発現する。

脂質組成の変化の確認は、Bligh & Dyer法で抽出した脂質液をLC/MS分析に供することで行った。

(2)真核生物由来の膜タンパク質発現系構築
上述のPE-NMTをととも発現させる膜タンパク質として、下記5つを選択した。

- (i) 緑藻(*Microcystis denticulata*)のセルロース合成酵素触媒サブユニットCesA
- (ii) ホヤ(*Ciona intestis*)CesA
- (iii) 植物(*Poplar tremendas*)のマンナン合成酵素(Cs1A, Cellulose synthase like protein A)
- (iv) 植物由来のガラクトチュロン酸転移酵素GalAT

以上をコードする遺伝子を、大腸菌コドン最適化をほどこして人工合成し、汎用的な発現ベクターに導入し、4つの膜タンパク質発現系を構築した。その際、HisタグをN末あるいはC末に挿入し、のちに行うウェスタンブロットでHisタグ抗体を使ってタンパク質発現の確認を行えるようにした。

以上に加えて、酢酸菌(*Komagataeibacter sucrofermentans*)のセルロース合成酵素複合体も使用した。酢酸菌は細菌類としては珍しく細胞膜にPCを含むので、本課題におけるもっとも簡単モデルとして設定した。酢酸菌のセルロース合成酵素複合体の最小機能単位はCesABと考えられているが、フル複合体はCesABCDとさらにGH-8、ccp2の6つを含むと考えられている。そこでCesABおよびCesABCDの共発現系を用いた。CesAB共発現系については既報のものを使い、CesABCD共発現系については今回初めて使用した。

(3)タンパク質発現実験

以上のモデル膜タンパク質発現系それぞれと、PE-NMT発現系を共形質転換により大腸菌の細胞に導入し、アンピシリンとクロラムフェニコールに耐性を持つコロニーを選抜し、2xYT培地により液体培養で通常通りの培養を行った。

PE-NMT発現をアラビノース添加により誘導したうえで、膜タンパク質の発現をIPTGで誘導することで、PCを細胞膜に含んだ大腸菌で膜タンパク質を発現させた。得られた細

胞は SDS-PAGE/ウェスタンブロットに供し、膜タンパク質の発現を調査した。

4. 研究成果

➤ PE-NMT 発現による大腸菌脂質組成の変化
PE-NMT 発現により、大腸菌の細胞膜に PC を含ませることができることを確認した。

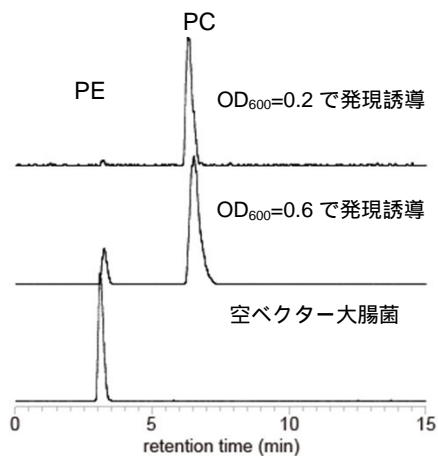


図2 PE-NMT 発現大腸菌より抽出した脂質のLC/MS分析; 発現条件により、PC比 (PC/(PC+PE)) を制御可能

発現誘導のタイミングや発現の強さ、培養温度を変えることで、PEとPCの比率を調節可能であることも判明した。場合によっては、大腸菌の主要脂質成分であるPE以上にPCの比率を高めることも可能であることが判明した。また25℃培養では不飽和脂肪酸を含まなかったのが、15℃培養では不飽和脂肪酸を含むようになることも確認した。

次に、モデルとして用いた5つの膜タンパク質の大腸菌での発現の結果について各論的に述べる。

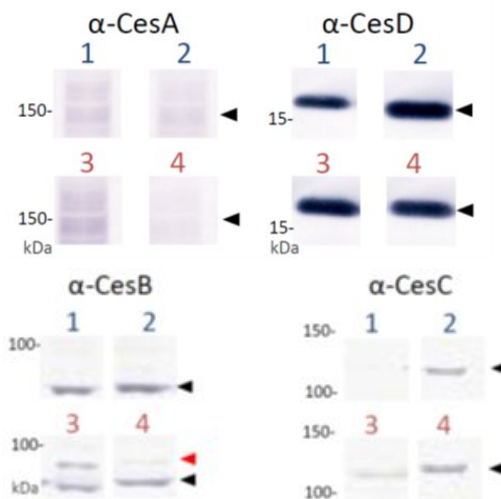
(1) 酢酸菌セルロース合成酵素複合体

pQEベクターにタグをつけずにCesABおよびCesABCD遺伝子を挿入して酵素複合体の発現系を構築した。これらを、XL1-Blue株を使ってPE-NMTタンパク質との共発現実験を試みた。

CesAB発現実験ではタンパク質発現量と、遠心分画法で単離した細胞膜画分の界面活性剤による可溶化法で、通常の大腸菌と、PE-NMTを共発現したPC産生大腸菌を使った場合で比較を行った。しかしPC産生大腸菌を使用することに明確な優位性を認めるには至らなかった。さらなる調査が必要であると考えられる。

一方でCesABCDの共発現をPC産生大腸菌で行った場合、CesAとCesDについては発現の変化は認められなかったが、CesBについてはPC産生大腸菌を使った場合でS-S結合が入らない様子を確認できた(図3)。またCesCタンパク質については、PC産生大腸菌を使った場合で発現量が上昇する様子が認められ

た。以上から、PE-NMT発現により脂質を各膜タンパク質の発現パターンが変化しうることが判明した。この変化が膜脂質組成の変化によるものか、PE-NMTという別タンパク質の発現による細胞活動の変化に起因するのかは慎重に判断しなければならない。また最終目的である膜タンパク質の適正で効率的な発現のためには、さらなる検討が必要である。



- 1: 空ベクター (通常 E. coli))
- 2: PE-NMT の発現誘導なし (通常 E. coli))
- 3: PE-NMT 発現誘導後に CesABCD 発現誘導
- 4: PE-NMT と CesABCD を同時に発現誘導

◀: 目的のタンパク質 ▶: S-S 結合のない CesB タンパク質

図3 GxCesABCDの大腸菌発現の SDS-PAGE/ウェスタンブロットによる確認

(2) 緑藻 CesA

pQE-80LベクターおよびpBAD/myc-HisCベクターに遺伝子を導入し、Hisタグとの融合タンパク質としてCesAを発現する発現系を構築し、実験に使用した。大腸菌株として、XL1-Blue株のほかに、BL21(DE3)、C41(DE3)、C43(DE3)を利用し、PE-NMTタンパク質との共発現実験を行った。

pQEベクターとXL1-Blueを利用した場合でCesAが発現する様子が一度確認された。さらに興味深いことに、PE-NMT発現なしでは膜タンパク質であるCesAがアルカリ分画試料のアルカリ可溶性画分にも見られた一方、PE-NMT発現時にはアルカリ不溶性画分のみでシグナルが確認された(図4)。このことは、PE-NMT発現によりCesAタンパク質が細胞膜に適正に発現したことを意味しており、PC産生大腸菌を使用することで真核生物由来の膜タンパク質を大腸菌で発現させるという本研究の狙い通りの結果である。しかし現在まで再現性を得ることができず、引き続いての検討が必要である。

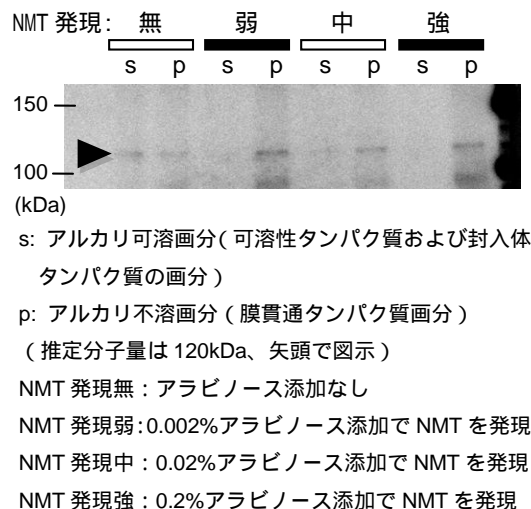


図4 MdCesA 発現大腸菌のアルカリ分画試料の SDS-PAGE/ウェスタンブロット

(3)ホヤ CesA

pQE-60 ベクターおよび pBAD/myc-HisC ベクターに遺伝子を導入し、His タグとの融合タンパク質として CesA を発現する発現系を構築し、実験に使用した。試した限りでは、封入体としての発現も含めて発現を確認することはできなかった。

(4)植物由来 CslA

pQE-60 ベクターに遺伝子を導入し、His タグとの融合タンパク質として CslA を発現する発現系を構築し、実験に使用した。試した限りでは、封入体としての発現も含めて発現を確認することはできなかった。

(5)植物由来 GalAT

pET ベクターに遺伝子を挿入し、His タグとの融合タンパク質として GalAT を発現する発現系を構築し、実験に使用した。試した限りでは、封入体としての発現も含めて発現を確認することはできなかった。

以上から、本課題の結論は以下の二つである。

酢酸菌セルロース合成酵素複合体を使った実験からは、脂質組成変化が複合体のタンパク質発現に何らかの変化を及ぼしうることが判明した。しかしその傾向を統一的に説明することはできなかった。
真核生物由来膜タンパク質を使った実験では、現在まで試した限りにおいては、緑藻 CesA タンパク質において PC 産生大腸菌で適正に発現できる可能性が確認された。

ただし(11)に関しては、8 回試行した中で 1 度しか成功しておらず、再現性に問題がある結果である。だが仮にこの結果を確実に再現できるようになった場合には、研究開始当初の目的に掲げたように、簡便安価な膜タンパク質研究ツールの開発に直結する。したがって、成果としてまだ広く公表できる段階にないものの、引き続き研究を進めることで発展しうる結果と考えており、本報告書に記載した次第である。

緑藻 CesA で一回しか発現に成功していないこと、それ以外の膜タンパク質では一度も発現に成功しなかったことから、脂質組成を PC リッチに改変することが真核生物由来の膜タンパク質を大腸菌で発現するための十分条件でないことは明らかである。本戦略を成功させるためには、従来から行われてきたような転写・発現に工夫を加えることも重要と考えられる。

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0件)

該当なし

〔学会発表〕(計0件)

2017 年度生命科学系学会合同年次大会での発表を検討中

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 友也 (IMAI Tomoya)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号: 90509142

(2)研究分担者

石水 毅 (ISHIMIZU Takeshi)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号: 30314355

中島 啓介 (NAKASHIMA Keisuke)
沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミク
スユニット・研究員
研究者番号：10422924

(3)連携研究者

鈴木 史朗 (SUZUKI Shiro)
京都大学・生存圏研究所・助教
研究者番号：70437268

(4)研究協力者

なし