

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21760635

研究課題名（和文） 構造タンパク質を用いたナノ小胞への膜タンパク質集積化技術の開発

研究課題名（英文） Development of techniques for membrane protein assembly into nano vesicles using structural proteins

研究代表者

吉野 知子 (YOSHINO TOMOKO)

東京農工大学・大学院工学研究院・特任准教授

研究者番号：30409750

研究成果の概要（和文）：本研究では、脂質膜成分で構成されたナノ構造物を自発的に形成可能なタンパク質である構造タンパク質を用いて標的分子を集積化した「ナノ小胞」を創製する技術を開発した。特に、磁性細菌が合成する磁性粒子膜に特異的に発現している Mms13 タンパク質を用いることで、異種細胞内での小胞様物質の形成と、標的分子の集積化に成功した。さらに、細胞内に生産された小胞様物質の精製法を確立し、標的分子を解析できるツール開発を実施した。

研究成果の概要（英文）：In this study, the techniques for production of “target molecule-assembled nano vesicles” using structural proteins have been developed. We succeeded in forming vesicles and integrating proteins onto the vesicles using Mms13, which was isolated as a protein tightly bound to bacterial magnetic particles. Furthermore, the method for purification of the vesicles from cell homogenates have been established, and a novel tool was developed toward the analysis of target molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：小胞、構造タンパク質、細胞、遺伝子融合

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に存在する膜タンパク質は、物質の認識やシグナル伝達などの場として生命現象を司る重要な役割を果たしており、創薬分野を始め様々な基礎研究において注目を集めている。膜タンパク質は疎水領域を多く含み脂質二重膜に埋め込まれることによって、その機能を保持する。したがって、このような膜タンパク質の解析には、ターゲットタン

パク質が脂質二重膜の環境内で、正しくフォールディングされることが重要である。脂質二重膜には、動物細胞膜、大腸菌などの微生物膜、またはその環境を模倣して脂質成分などで調製されたリポソーム膜、脂質を模倣してつくられたブロックコポリマー等が利用されている。

一方、細胞内ではカベオラと呼ばれる脂質とタンパク質で構成された小胞が存在する。

このカベオラは、ウイルス等の巨大分子の輸送や細胞内外でのシグナル伝達に関与しており、50-80 nm のナノサイズの小胞である。また、細胞膜に存在する小胞形成関連タンパク質であるカベオリンと呼ばれるV字型の膜タンパク質を主成分としており、特殊な脂質成分環境により、自発的に形成されることが知られている。カベオラの形成機構やその機能に関しては未だ完全に解明されていないが、カベオリンを発現していない細胞にカベオリンを強制発現させると、カベオラ小胞が形成されたことから、カベオリンが小胞を形成する構造タンパク質として働くことが分かっている(*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92, 8655 (1995); *J. Biol. Chem.*, 271, 28647, (1996))。同様の機能を持つカベオリン様タンパク質は、相同性は低いが、ほ乳類細胞をはじめ、線虫、酵母に存在することが明らかとなっており、その他の生物種においても存在の可能性が示唆されている。

当研究グループでは、脂質膜に覆われた磁性粒子を合成する磁性細菌を研究対象としている。この磁性粒子膜上には、いくつかの磁性粒子膜特異的タンパク質が確認されており、その一つとして Mms13 タンパク質が存在する。この Mms13 タンパク質が磁性粒子の合成段階でみられる小胞形成に関与している可能性が示唆されたため、その機能解明が求められている。

2. 研究の目的

そこで、小胞等の脂質膜で構成されたナノ構造体を自発的に形成可能なタンパク質である構造タンパク質を用いてターゲットタンパク質を小胞に集積した「ナノ小胞」を創製する技術を開発する。特に、磁性粒子膜タンパク質である Mms13 タンパク質が、構造タンパク質である可能性が示唆されているため、その特性解析と Mms13 を用いた小胞作製への応用を試みた。細菌類におけるカベオリン様タンパク質の報告はなく、Mms13 の小胞形成能の解明が期待されている。本研究は、小胞形成に関連した構造タンパク質を用いた新たな膜タンパク質解析ツールの開発を目指す研究である。

3. 研究の方法

(1) 発現ベクターの構築

磁性細菌内で複製可能な pUMG(Amp^r, 6.4 kbp) をベースとして、高コピーベクターを使用した。このベクターのクローニングサイトに Mms13 または Mms13- Green fluorescence protein(GFP) 遺伝子を導入し、

発現ベクターを構築した。また、発現誘導用のベクターとして、テトラサイクリンリプレッサー(TetR) 遺伝子、及び標的遺伝子の上流に TetR が結合するオペレーター配列を組み込んだプロモーターを含むテトラサイクリン発現誘導ベクターを設計し、Mms13 と GFP の融合遺伝子を標的遺伝子とし、テトラサイクリン発現誘導ベクターを構築した。

動物細胞用の発現ベクターとして pIRESneo(Amp^r, Neor, 5.3 kbp) の CMV プロモーター下流に存在するマルチクローニングサイトに Mms13-GFP または GFP 遺伝子を導入し、発現ベクターを構築した。

得られたベクターを用いて、磁性細菌に対しては、エレクトロポレーション法により導入し、形質転換体を作製した。また、動物細胞(CHO細胞)に対しては、リポフェクション法により一過性の発現を試みた。

(2) 細胞の培養及び観察

磁性細菌またはCHO細胞の培養は、それぞれ推奨プロトコルを用いた。磁性細菌の好気培養では、140 rpm の条件でエアレーションを行い、マグネタイトを合成しない、条件を設定した。また、発現誘導においては、Anhydrotetracycline (ATc) の濃度検討を行い、生育阻害が起こらない条件で、ATc の添加を行った。各段階の細胞を蛍光顕微鏡で観察するとともに透過型電子顕微鏡を用いた細胞内の小胞様物質の観察を行った。

(3) 小胞様物質の精製

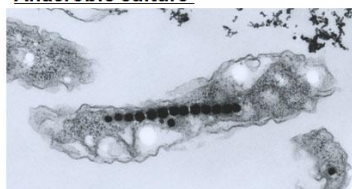
細胞内で発現したターゲットタンパク質を集積した小胞を精製するために、以下2つの方法を試みた。抗GFP抗体を導入した磁性ビーズを細胞破砕液と混合し反応させた後、磁石を用いて破砕液と標的小胞の分離を行った。洗浄操作を数回繰り返し、非特異的に吸着したタンパク質を除去した。その後、磁性ビーズに1%SDS溶液を添加し、30分間煮沸した後、回収してきたタンパク質溶液をSDS-PAGEにより解析した。また、第2の方法として、細胞破砕液を密度勾配を形成させたスクロース溶液の上層に導入し、超遠心を用いて密度勾配遠心を行った。各密度の層からタンパク質溶液を回収し、SDS-PAGEによる分画を行った。さらに、抗GFP抗体を用いて、ウェスタンブロットを行い、各条件における小胞様物質の回収過程を評価した。

4. 研究成果

(1) 磁性細菌内での小胞の確認

磁性細菌粒子膜タンパク質として単離された Mms13 は、これまでの研究により、マグネタイトに強固に結合していること、磁性粒子膜上に高発現であること、及び膜 2 回貫通型の V 字構造をもち、C 末端が磁性粒子表面に局在していることが明らかとなっている。そこで、本研究では磁性細菌内でマグネタイト形成させない条件における Mms13 の局在解析を実施した。Mms13 タンパク質発現ベクターを磁性細菌に導入し、形質転換体を作製した。この菌体を磁性粒子が合成されない条件(好気培養)により培養し、得られた磁性細菌内を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、通常の培養法(嫌気培養)では、ナノサイズの磁性粒子が細胞内で多数観察されるのに対し、好気条件で Mms13 遺伝子を過剰発現させた際において、細胞内に小胞

Anaerobic culture



Aerobic culture

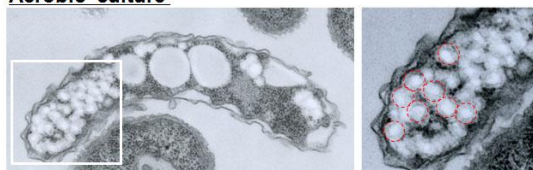


図 1 Mms13 高発現ベクターを導入した磁性細菌を好気培養した際の透過型電子顕微鏡写真。赤丸は小胞様物質を示す。

様物質が多数観察された(図1)。また、好気条件で培養を行った細胞内には、マグネタイトの形成はみられなかった。そこで、細胞内で起きる小胞様物質の形成を、経時的に観察するため、Mms13 遺伝子の下流に GFP 遺伝子を組み込み、さらにアンヒドラテトラサイクリンで発現誘導可能なシステムと組み合わせた発現ベクターを構築した。このベクターを磁性細菌に導入し、細胞内において、誘導物質(-)の状態から、誘導物質(+))の状態に変化させた過程を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、極短時間の間に、ナノ小胞と思われる蛍光のドットが多数観察された。また、経時的な観察により、小胞形成は細胞内の一カ所から開始されている可能性が示唆された。

(2) CHO 細胞での小胞形成の評価

磁性細菌内で小胞様物質が観察されたた

め、Mms13 を構造タンパク質として、動物細胞内での小胞形成を試みた。Mms13-GFP 融合遺伝子を動物細胞内で発現可能なベクターに組換え、チャイニーズハムスターの卵巣細胞である CHO 細胞にリポフェクション法により導入した。また、コントロールとして Mms13 遺伝子を導入していない GFP 単独で発現可能なベクターを構築し、CHO 細胞に導入した。遺伝子の一過性発現を行った細胞を蛍光顕微鏡により観察した結果、コントロールである GFP のみの発現においては、細胞全体に蛍光が観察されるのに対し、Mms13-GFP 融合タンパク質を発現させた

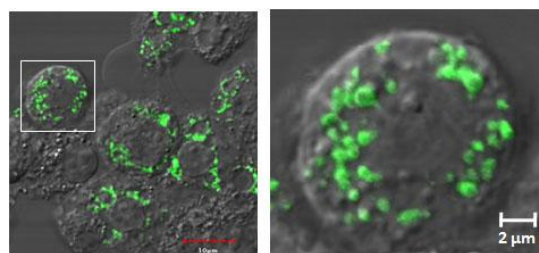


図 2 Mms13-GFP 融合タンパク質発現ベクターを導入した CHO 細胞の蛍光顕微鏡像

際には、培養の過程で複数の小胞様物質の形成が促進されていることが示された(図2)。

得られた小胞様物質はナノサイズであることが蛍光像より確認でき、Mms13 がナノ構造体を形成可能な構造タンパク質としての有効性が示唆された。さらに GFP をターゲットタンパク質として小胞内へ集積することに成功し、今後ターゲット分子を膜タンパク質にすることで小胞への膜タンパク質集積が可能であることが示唆された。

(3) 小胞精製法の検討

細胞内に形成された小胞を回収するために、以下の2つの手法により目的小胞の回収を検討した。細胞を破碎した後、破碎液に対して小胞に結合する抗体を固定した磁性ビーズを導入し、磁気分離により目的の小胞回収を試みた。得られた磁性ビーズ上に存在するタンパク質群を SDS-PAGE により確認したが、目的の融合タンパク質は確認できなかった。そこで、カベオラの精製で利用される密度勾配遠心の条件により、目的の小胞の精製・回収を試みた。細胞破碎液を密度勾配の上層部に積層し、遠心により分離を行った。各画分から得られたタンパク質層を SDS-PAGE、及びウェスタンブロットにより確認した。その結果、得られた密度勾配遠心画分の一部に Mms13-GFP の融合タンパク質が確認された。また、得られた画分は、高

い蛍光シグナルを発していること、また顕微鏡観察により微少なドットの蛍光が観察されたことより、本手法により、Mms13-GFPを含む小胞の精製が可能であることが示唆された。本結果より、ターゲット分子を融合したMms13タンパク質が、自発的に小胞を形成し、その小胞を細胞破碎液から精製することに成功した。本研究の成果より、Mms13が小胞様物質を形成できることを示し、このMms13を用いてターゲットタンパク質を小胞に集積化した「ナノ小胞」を創製する技術を確立した。

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4件)

①Tomoko Yoshino, Akiko Shimojo, Yoshiaki Maeda, Tadashi Matsunaga: "Inducible expression of transmembrane proteins on bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1." *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有, 76(4), 1152-1157 (2010)

②Tomoko Yoshino, Yoshiaki Maeda and Tadashi Matsunaga: "Bioengineering of Bacterial Magnetic Particles and their Applications in Biotechnology" *Recent Patents on Biotechnology*, 査読有, 4(2), 214-225 (2010)

③田中剛、吉野知子、松永是: 「磁性ビーズを利用した生体分子の分析技術」 *ぶんせき*, 査読無, 3, 133-138 (2010)

④Tomoko Yoshino, Taisei Nishimura, Tetsushi Mori, Shigeya Suzuki, Hideki Kambara, Haruko Takeyama and Tadashi Matsunaga: "Nano-sized bacterial magnetic particles displaying pyruvate phosphate dikinase for pyrosequencing" *Biotechnol. Bioeng.*, 査読有, 103, 130-137 (2009)

[学会発表] (計6件)

①鐘築由香・吉野知子・松永是: 「磁性細菌ホストの改変によるバイオナノ磁性粒子上への外来タンパク質発現量の向上と機能評価」、日本化学会第91春季年会、2011年3月11日 (講演予稿集発行日)、講演予稿集
②吉野知子: 「医療応用を目指したバイオナノ磁性粒子の分子設計」、第7回農工大・電通大合同シンポジウム、2010年12月11日 電気通信大学

③吉野知子、内山 諒、米山健太郎、堀部卓郎、久原基樹、松永 是: 「バイオナノ磁性粒子を用いた血清中の自己抗体検出技術の開発」、第50回化学センサ研究会、2010年9月2日 神奈川工科大学

④Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino and Tadashi Matsunaga: "Nanocomposites Consisting of in vivo-biotinylated Bacterial Magnetic Particles and Quantum Dots for Magnetic and Fluorescent Labeling of Cancer Cells." 19th MRS-J Symposium, 2009年12月8日 横浜

⑤吉野知子、下条明子、前田義昌、松永是: 「バイオナノ磁性粒子膜上への効率的な膜タンパク質ディスプレイに向けた発現誘導システムの構築」、第61回日本生物工学会大会、2009年9月24日 名古屋大学

⑥鳴田知沙・近藤有美子・前田義昌・吉野知子・河野芳明・松永是: 「バイオナノ磁性粒子上への嗅覚受容体ディスプレイに向けた発現方法の検討」、第12回バイオテクノロジー一部会シンポジウム、2009年9月15日 九州大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉野 知子 (TOMOKO YOSHINO)
東京農工大学・大学院工学研究院・
特任准教授
研究者番号: 30409750