

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282239

研究課題名(和文) 無細胞翻訳系を用いた膜タンパク質進化分子工学的手法の開発と応用

研究課題名(英文) Directed evolution of membrane proteins using cell-free protein synthesis system

研究代表者

松浦 友亮 (Matsuura, Tomoaki)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50362653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*in vitro*で膜タンパク質をスクリーニング可能な技術であるリポソームディスプレイ法を確立し、これを利用した膜タンパク質の機能進化を行うことを目的とした。大腸菌由来の多剤排出トランスポーターEmrEをモデル膜タンパク質として用い、これの2つの機能である輸送活性と膜挿入活性を指標に機能進化が行える技術を確立した。次にランダム変異を導入した遺伝子ライブラリーから野生型EmrEよりも基質輸送活性の高い遺伝子プールを取得した。また、リポソームディスプレイ法に膜タンパク質輸送装置であるトランスロコンを導入することで、ディスプレイ可能な膜タンパク質のレパートリーの拡張に成功した。

研究成果の概要(英文)：Liposome display is an evolutionary method that enables the directed evolution of membrane proteins *in vitro*. The method is based on the syntheses of membrane proteins using an *in vitro* transcription–translation system (IVTT) inside cell-sized phospholipid vesicles. Here, using EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, as a model protein, the screening was performed based on two functions of EmrE: substrate transport activity and membrane integration activity. Starting from a mock gene library prepared by mixing an active and an inactive gene, 10- to 35-fold enrichment of the active genes was obtained. In addition, from a random mutagenized library of EmrE, gene pool exhibiting higher activity than the wild-type was obtained. We also succeeded in introducing the membrane protein transport machinery to the liposome display method, which expanded the repertoires of the membrane protein that can be applied to liposome display.

研究分野：生物工学

キーワード：進化分子工学 無細胞翻訳系

1. 研究開始当初の背景

進化分子工学的手法は、変異と選択のステップを繰り返し行うことで生体高分子の性質を改良、進化させる方法である。本手法は、有用タンパク質の創出やタンパク質の機能解析に大きく貢献してきた(Matsuura *et al.*, *J Biosci Bioeng*, 2006; Turner, *Nat Chem Biol*, 2009)。本手法が使われ始めた1990年代の当初は有機溶媒中で働く酵素の創出、最近では製剤の大量生産、生体内のドーパミンを可視化、神経ガスを分解する酵素の創出などが報告されている。また、得られた多数の変異体の配列-機能相関解析などから、タンパク質の機能発現メカニズムの解明にも寄与してきた。

これまでの進化分子工学の標的タンパク質のほとんどは可溶性タンパク質(酵素)であり、膜タンパク質を対象とした例は非常に少ない(Magliery *et al.*, *Curr Opin Chem Biol*, 2011)。細胞がコードする遺伝子の20-30%、製剤のターゲット分子の50%以上は膜タンパク質であるとも言われている。しかし、一般に不溶性であり、かつ異種細胞での発現が困難な膜タンパク質は、少数の例を除いて、進化分子工学の標的タンパク質として扱われてこなかった。膜タンパク質を標的とする手法が構築できれば、タンパク質工学領域におけるイノベーションとなり、膜タンパク質研究だけでなく、創薬、膜タンパク質の産業利用など多方面への波及効果が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、迅速かつ効率的に、膜タンパク質進化分子工学を可能とする手法リポソームディスプレイ法を構築し、これを高機能型膜タンパク質変異体取得に応用することを目指した。リポソームディスプレイ法では、一般に調製が困難な膜タンパク質を再構成型無細胞翻訳系を用いて Giant Unilamellar Vesicle (GUV) 内で合成することで機能発現可能な状態で調製し、その技術を膜タンパク質の進化分子工学に適用する(図1)。これまで予備的な結果を得ていたが、リポソームディスプレイ法を用いた膜タンパク質の進化分子工学は達成されていなかった。そこで本研究では、具体的には以下の3つの項目を達成することを目的とした。

- (1) リポソームディスプレイ法を構築する。大腸菌由来多剤排出トランスポーターの1つである EmrE をモデル膜タンパク質として用いる。
- (2) 構築した手法を用いて高機能 EmrE 変異体を創出する。
- (3) GUV 内へ膜タンパク質の膜輸送系を導入する。主要な膜タンパク質輸送経路である Sec 経路 (Papanikou, *et al*, *Nat Rev Microbiol*, 2007) を GUV 内に再構成し、リポソームディスプレイ法をより広範な膜タンパク質に適用可能とする。

3. 研究の方法

リポソームディスプレイ法では、膜タンパク質を再構成型無細胞翻訳系を用いて GUV 内で合成する。本研究では、無細胞翻訳系として東京大学の清水らの開発した PURE system (Shimizu *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2001) をベースに、これのタンパク質合成活性の向上させたシステムを用いた。これは研究代表者ら独自に開発したものである (Kazuta *et al.*, *J Biosci Bioeng*, 2014)。再構成型無細胞翻訳系を内部にもつ GUV の調製は界面通過法 (Nishimura *et al.*, *Langmuir*, 2014) を用いて行い、膜タンパク質変異体のハイスループットスクリーニングには蛍光セルソーター (FACS) を用いた。

4. 研究成果

(1) リポソームディスプレイ法の構築

リポソームディスプレイ法では、図1に示したように、膜タンパク質の機能評価を FACS により行う。

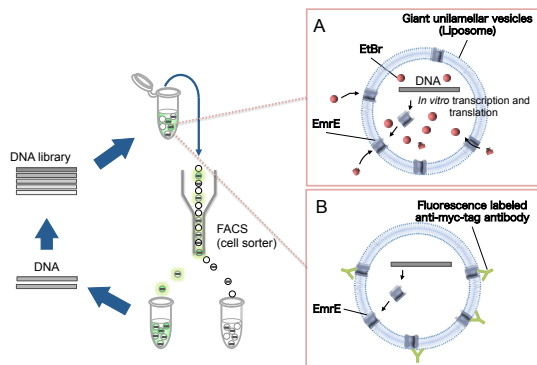


図1 : EmrE を用いた
リポソームディスプレイ法の概略図

まず、GUV 内に再構成型無細胞翻訳系 PURE system と一緒に低濃度の DNA を封入することで DNA 約1分子を各リポソームに封入する。次にリポソームを 37°C で incubation することで EmrE を内部で合成し、挿入させる。

進化工学を行うためには膜タンパク質の機能を可視化する必要がある。EmrE トランスポーターには2通りの方法が考えられる。活性でスクリーニングする方法(図1 A)と膜挿入効率でスクリーニングする方法(図1 B)である。FACS を用いた進化実験では、これら2つのタンパク質の機能(活性と膜挿入効率)を蛍光に変換する必要がある。前者は、EmrE の基質の一つである EtBr を用いることで達成した。EtBr は EmrE の基質としてよく知られており、これがリポソーム内に取り込まれると内部の核酸 (Ribosome, tRNA など) と結合し蛍光を発する。後者は EmrE の C 末端に myc-tag を付加した配列を使用することで達成した。リポソーム内部で EmrE が合成されこれが膜挿入されると myc-tag がリポソ

ーム外部に提示される。これを anti-myc alexa488 ラベル抗体で標識した。

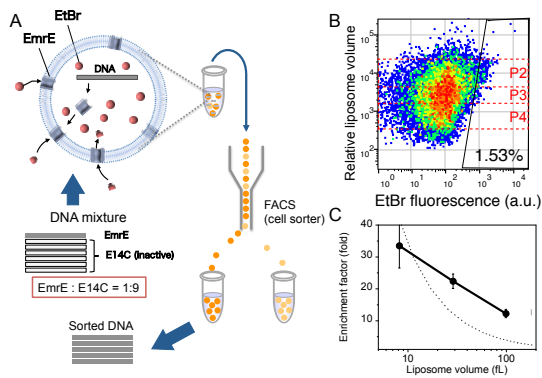


図2 : EmrE の EtBr 輸送活性を指標とした遺伝子スクリーニングの概略図

次に、EmrE の活性をベースにスクリーニングが可能かを調べた。そのために、EmrE の野生型とトランスポーター活性を持たない変異体 E14C の遺伝子を 1:9 で混合したプールを調製し、ここから野生型遺伝子を濃縮できるかを検討した (図 2 A)。その結果、野生型遺伝子の濃縮が確認された。図 2 B に示したようなゲートを 3 種類設定しソート実験を行った結果、小さいリポソームほど濃縮率が高くなる傾向が観測された (図 2 C)。これは、理論上リーズナブルである。リポソームサイズが大きいかほど遺伝子のコピー数が増えるために、計算上濃縮率が下がる。また、同様の濃縮実験を EmrE の膜挿入活性をベースとしたスクリーニングを行い、これが可能であることも示した。

(2) 高機能 EmrE 変異体を創出

上記で確立した実験系を用いて EtBr の輸送活性の高い EmrE をランダム変異ライブラリーから取得することを目指した。ランダム変異の導入には GeneMorph II Random Mutagenesis Kit を使用し、8 種類のランダム変異ライブラリーを作製した。その結果、得られた最も高い平均変異率 4.17 アミノ酸置換/クローンをもつ DNA ライブラリーをリポソームディスプレイ法へ適用した。

EmrE の基質の 1 つである EtBr の輸送速度を指標とし、EtBr 蛍光強度の高いリポソームを FACS により分取することで高機能変異体を取得することを目指した。DNA ライブラリーから高機能タンパク質をコードする DNA を分取した。このスクリーニングを 3 回行い、遺伝子プールを取得した (R0-R3 : R3 は 3 回スクリーニング実験を行った後に得られた遺伝子プール)。その結果、野生型よりも EtBr 輸送活性の高い遺伝子プールが得られた。今後、得られた遺伝子プールに含まれるクローンの配列・機能解析することで高機能 EmrE 変異体を得られることが期待される。

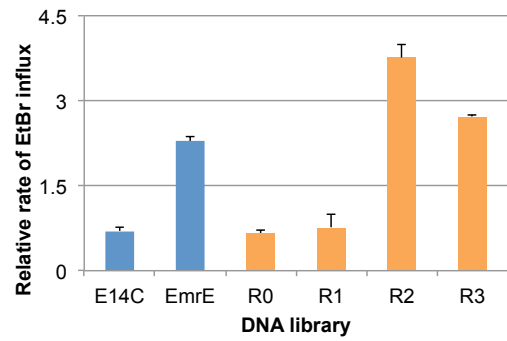


図3 : EmrE をのランダム変異ライブラリーを用いた機能進化実験の結果

(3) GUV 内へ膜タンパク質膜輸送系を導入大腸菌で代表的な膜タンパク質輸送系である specialized translocation complex (Sec トランスロコン)のうち、膜タンパク質の膜挿入に寄与する signal recognition particle (SRP) /SRP receptor (SR)と SecYEG heterotrimer をリポソーム内に再構成した。具体的には SRP/SP は精製タンパク質として、SecYEG はこれをコードする遺伝子を GUV 内に封入し、標的膜タンパク質を合成した。

Sec トランスロコンを再構成することで、リポソーム膜に挿入された EmrE の量は約 3 倍向上した (図 4 上)。加えて、合成された EmrE の EtBr 輸送活性も約 3 倍向上した (図 4 下)。さらに Sec トランスロコンを 13 種類の大腸菌由来膜タンパク質に適用し、そのうち 6 種で膜挿入量の向上が確認できた。このことは Sec トランスロコンの導入により GUV の膜上にディスプレイできる膜タンパク質の種類や量が増加したことを意味している。

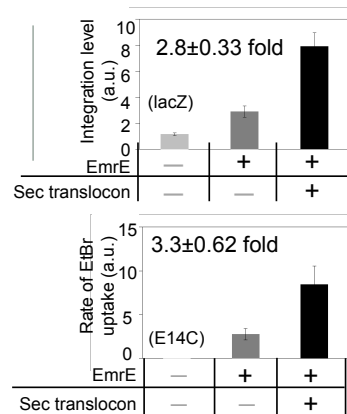


図4 : GUV 内への Sec トランスロコンの導入による EmrE の提示率・活性への影響

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 13 件)

- ① Uyeda A, Watanabe T, Kato Y, Watanabe H, Yomo T, Hohsaka T, Matsuura I Liposome-Based in Vitro Evolution of Aminoacyl-tRNA Synthetase for Enhanced Pyrrolysine Derivative Incorporation. *Chembiochem* **16**(12), 1797-802 (2015).
- ② Fujii S, Matsuura I, Yomo T In vitro directed evolution of alpha-hemolysin by liposome display. *Biophysics* **11**(0), 67-72 (2015).
- ③ Fujii S, Matsuura I, Yomo T Membrane Curvature Affects the Formation of alpha-Hemolysin Nanopores. *ACS Chem Biol* **10**(7), 1694-701 (2015).
- ④ Usui K, Ichihashi N, Kazuta Y, Matsuura I, Yomo T Effects of ribosomes on the kinetics of Qbeta replication. *FEBS Lett* **588**(1), 117-23 (2014).
- ⑤ Uno K, Sunami T, Ichihashi N, Kazuta Y, Matsuura I, Yomo T The evolutionary enhancement of genotype-phenotype linkages in the presence of multiple copies of genetic material. *Chembiochem* **15**(15), 2281-8 (2014).
- ⑥ Soga H, Fujii S, Yomo T, Kato Y, Watanabe H, Matsuura I In vitro membrane protein synthesis inside cell-sized vesicles reveals the dependence of membrane protein integration on vesicle volume. *ACS Synth Biol* **3**(6), 372-9 (2014).
- ⑦ Okano T, Matsuura I, Suzuki H, Yomo T Cell-free Protein Synthesis in a Microchamber Revealed the Presence of an Optimum Compartment Volume for High-order Reactions. *ACS Synth Biol* **3**(6), 347-52 (2014).
- ⑧ Nishimura K, Matsuura I, Sunami T, Fujii S, Nishimura K, Suzuki H, Yomo T Identification of giant unilamellar vesicles with permeability to small charged molecules. *Rsc Adv* **4**(66), 35224-32 (2014).
- ⑨ Kazuta Y, Matsuura I, Ichihashi N, Yomo T Synthesis of milligram quantities of proteins using a reconstituted in vitro protein synthesis system. *J Biosci Bioeng* **118**(5), 554-7 (2014).
- ⑩ Fujii S, Matsuura I, Sunami T, Nishikawa T, Kazuta Y, Yomo T Liposome display for in vitro selection and evolution of membrane proteins. *Nat Protoc* **9**(7), 1578-91 (2014).

- ⑪ Usui K, Ichihashi N, Kazuta Y, Matsuura I, Yomo T Kinetic model of double-stranded RNA formation during long RNA replication by Qbeta replicase. *FEBS Lett* **587**(16), 2565-71 (2013).
- ⑫ Ichihashi N, Usui K, Kazuta Y, Sunami T, Matsuura I, Yomo T Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment. *Nat Commun* **4**2494 (2013).
- ⑬ Fujii S, Matsuura I, Sunami T, Kazuta Y, Yomo T In vitro evolution of alpha-hemolysin using a liposome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(42), 16796-801 (2013).

[学会発表] (計 15 件)

- ① 松浦友亮 (2016年4月14-15日) “in vitro で組み上げた生命システムから学べること”細胞システムの動態と論理 VIII (理化学研究所 (和光))
- ② 松浦友亮 (2016年1月29日) “無細胞タンパク質合成系を用いた膜タンパク質進化分子工学”第4回ネオバイオ分子研究会 (大阪府立大学 I-site なんば・大阪市)
- ③ 松浦友亮 (2015年12月1日-4日) “全成分タンパク質合成反応モデルの構築とこれを用いた反応ダイナミクス解析”第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド・神戸市)
- ④ Tomoaki Matsuura (2015年11月22日-23日) “Dynamics of biological systems constructed in vitro”新学術領域研究「動的機能と秩序」第4回国際シンポジウム (九州大学西新プラザ・福岡市)
- ⑤ 松浦友亮 (2015年10月26日-28日) “バイオ界面を利用した in vitro 進化分子工学”日本生物工学会第67回大会 (城山観光ホテル・鹿児島市)
- ⑥ 松浦友亮 (2015年6月24-60日) “無細胞タンパク質合成系を用いた膜タンパク質進化分子工学”第15回日本蛋白質科学会年会 (あわぎんホール, 徳島市)
- ⑦ 松浦友亮 (2014年12月14-15日). in vitro で生体分子を使って組み上げる生命システム. In 国際高等研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能ネットワークとダイナミクスの解明」第1回研究会
- ⑧ 松浦友亮 (2014年1月15日). 無細胞系を用いたタンパク質エンジニアリングの新技术. In 2013年度日本生物工学会技術セミナー (神戸大学).
- ⑨ 松浦友亮 (2013年12月3-6日). 無細胞タンパク質合成系を用いた構成的アプローチ. In 第36回日本分子生物学会年

- 会 (神戸国際会議場ほか).
- ⑩ Tomoaki Matsuura (2015年11月22日-23日) "Dynamics of biological systems constructed in vitro" 新学術領域研究「動的機能と秩序」第4回国際シンポジウム (九州大学西新プラザ・福岡市)
 - ⑪ Tomoaki Matsuura (2015年8月24-26日) "The time development of the protein synthesis involves a collapse and regrowth of the reaction network" QBic Symposium 2015, High-dimensional data for the design principles of life (RIKEN Quantitative Biology Center, Osaka)
 - ⑫ Tomoaki Matsuura (2015年6月15-20日) "In Vitro Selection and Evolution of Membrane Proteins" Gordon Research Conferences in Proteins (Boston, U.S.A.)
 - ⑬ Tomoaki Matsuura (2014年7月27-30日). IN VITRO EVOLUTION OF a-HEMOLYSIN USING A LIPOSOME DISPLAY. Young Investigators Talk session in Protein Society Meeting 2014 (SanDiego, U.S.A.).
 - ⑭ Tomoaki Matsuura (2014年4月10日). Engineering Membrane Proteins Entirely in vitro with Liposome Display Technology. In 2014 KSBB SPRING MEETING and INTERNATIONAL SYMPOSIUM (Hyundai Hotel, Gyeongju, Korea).
 - ⑮ Tomoaki Matsuura (2014年1月24日). "Origins of life". In Japan-France Frontier of Science Symposium (Organized by JSPS and CNS), (Metz, France).

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ez/project/system.html>

6. 研究組織
- (1)研究代表者
松浦友亮 (Matsuura, Tomoaki)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：50362653
 - (2)研究分担者
該当無し
 - (3)連携研究者
該当無し