

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440045

研究課題名(和文) 膜受容体・エフェクタータンパク質を構成した人工細胞システムによるシグナル伝達解析

研究課題名(英文) Analysis on signal transduction with membrane receptor-/ effector protein-reconstituted artificial cell systems

研究代表者

湊元 幹太 (Tsumoto, Kanta)

三重大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80362359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のGPCRシグナル伝達経路要素を人工2分子膜ベシクル(巨大リポソーム)膜に再構成しベシクルレベルで伝達機能の発現を見ようとした。私たちの報告した組換えバキュロウイルス出芽粒子とリポソームの膜融合を用いて、また、GUV膜への組込の顕微観察により、組換え受容体、エフェクターや下流タンパク質など、個別要素の導入は確認された。経路の完成は困難だったが、本課題の前進に有用な、界面通過法GUV利用の検討、培養法と組換えウイルス粒子の性状、に関する知見を得た。

研究成果の概要(英文)： We tried developing a protocol to reconstitute GPCRs and following other elements of cell signal transduction pathways on artificial lipid membrane vesicles such as giant liposomes for realizing microscopic observation on function of the pathway with individual GUVs. We used our method to prepare giant proteo-liposomes through membrane fusion between GUVs and envelopes of recombinant baculovirus budded virus particles, and demonstrated GUVs containing recombinant receptors, effectors, or some proteins following these in actual cells, by microscopic observation. It is now difficult to construct the full pathway; however, we have obtained results about the availability of GUVs formed with a droplet-transfer method and characterization of budded viruses prepared using some culture procedures, which give useful information to improve our study on reconstitution of membrane protein systems on giant proteoliposomes.

研究分野：分子生物学

キーワード：人工細胞モデル 細胞情報伝達 リポソーム 膜タンパク質 バキュロウイルス プロテオリポソーム
GUV アデニル酸シクラーゼ

1. 研究開始当初の背景

生物情報(遺伝子)は、分子遺伝学研究的の蓄積によって、たとえばデータベースやバイオリソースなどを利用すれば、情報も現物(cDNA)も、研究者が広く手に入れられるようになっている。細胞のシグナル伝達システムについても、膜経路や、その下流の転写にいたる流れにある要素についても同様である。これらの要素を、培養細胞に人為的に組み込んで、目的の細胞機能システムを成すような、実細胞のアッセイシステムなどが開発されており、研究に役だっている。一方では、人工脂質膜のベシクルを細胞様構造と見立てた、人工細胞という考え方に基づいた研究も多く取り組まれている。Giant Liposomes (Giant Unilamellar Vesicles, GUVs) は細胞サイズであり、その中に、生体物質を捕捉したり、特にタンパク質や核酸をトラップして転写や翻訳の反応へ導いたり、構成論的生物学の手法は細胞システムの人為的な構築を期待させる。

一方、要素や役割が分かっている GPCR 経路のようなものであっても、人工細胞膜の機能再構成は GUV を用いる場合、多くの困難があった。もし、上記のような組換え遺伝子から発現したタンパク質の要素を人工膜へ移していき GPCR 経路を GUV へ構築することができれば、そのことが可能となる。私たちは、組換えバキュロウイルスの出芽粒子を用いて、組換え膜タンパク質をプロテオリポソームに組み込む手法を、すでに開発していたので、本研究課題に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、GPCR 経路をモデルとして選び、人工細胞膜上に、シグナル伝達経路要素と応用する下流のセンサーとなるタンパク質とを組み込んだ細胞サイズの巨大リポソームを作製して、複雑でない、少数の要素の組換えタンパク質をもったプロテオリポソームで、シグナルの流れの感知を行い、定量的な解析も可能となる人工細胞システムを実現することを、目的とした。

とくに、GPCR 経路のうち、アデニル酸シクラーゼによる cAMP の産生を捉えることで、シグナルの流れを検知できるシステムを、GUV に構築することをめざした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光タンパク質 (TagRFP、TagGFP2 等) を融合した GPCR 経路の要素遺伝子を組み換えたバキュロウイルス出芽ウイルス粒子と巨大リポソームとの、弱酸性下ウイルスの GP64 タンパク質により惹起される膜融合により、巨大プロテオリポソームとした。GPCR 経路の終端のアデニル酸シクラーゼについて、巨大リポソーム膜への挿入ならびに酵素活性を、顕微鏡観察および競合アッセイにより、それぞれ検討した。

また、巨大リポソームの調製法についても、

これまで用いてきた乾燥リン脂質薄膜を形成後水性緩衝液で水和・膨潤する静置水和法に加えて、油/水界面に形成した脂質 1 分子膜を張り合わせる方法 (界面通過法 (張合せ法、droplet-transfer 法)) も用いた。

(2) アデニル酸シクラーゼによる cAMP 産生を検知する下流のセンサーとして、環状ヌクレオチド感受性陽イオンチャネル (CNG) をモデルとして選び、組換えウイルスの準備をし、多重感染効率、巨大リポソームへの組込などを検討した。

(3) プロテオリポソーム調製の成否に重要であるため、膜タンパク質を提示する出芽ウイルス粒子に関する他グループの先行研究を参考に、宿主細胞培養条件と得られる出芽ウイルス粒子の性状との関係を、再度検討した。

4. 研究成果

(1) GPCR 経路の各要素について、以前の課題において、GPCR (2 アドレナリン受容体 ADRB2、CRF (副腎皮質ホルモン放出ホルモン) 受容体 CRHR1 を用いた)、あるいはアデニル酸シクラーゼ (ADCY6) の C 末端側へ蛍光タンパク質 (TagRFP) を融合した組換え受容体、蛍光タンパク質を内部に含んだ GNAS (s サブユニット)、N 末に蛍光タンパク質を融合した CNGB1 (1) と GNG2 (2) の複合体、それぞれを発現する出芽ウイルス粒子と巨大リポソームとの融合により、これらが巨大リポソーム膜へ組み込めることを、確認できている。一方、タグの無い各要素を搭載したウイルス粒子の膜融合で作製した巨大プロテオリポソームでは、特異的なホルモン刺激により、要素間の相互作用をへて、エフェクターであるアデニル酸シクラーゼの活性が検出され得るかが、問題となっていたが、現時点では、シグナルの流れを明瞭に検知するには至っていない。

本課題では、経路の終端にあるアデニル酸シクラーゼの巨大リポソーム膜への取込と、基質を封入した巨大リポソームを用いてその活性の有無について検討した (発表論文)。静置水和法で、DOPC/DOPS から調製した巨大リポソームと C 末に TagRFP を融合した ADCY6 を発現する出芽ウイルス粒子のエンベロープが、GP64 を活性化する酸性の条件で融合し、巨大リポソーム膜に当該タンパク質が組み込まれたことが、共焦点蛍光顕微鏡で観察された (図 1)。フォールディングレポートでもある C 末の蛍光が認められたことから、全長の発現が確認できた。並行して、基質となる ATP を封入した巨大リポソーム懸濁液とタグの無い ADCY6 組換えウイルス出芽粒子とを膜融合後、外液を交換し、アデニル酸シクラーゼを特異的に活性化するためフォルスコリンを添加した。リポソーム内部で生じた cAMP を、ADCY6 と融合したリポソームの懸濁

液全体から抽出し、その産生を競合 ELISA により調べた。この試料と、特異的な阻害剤である SQ 22536 が存在する資料との間で差が見られたことから、ADCY6 の再構成が確かめられた (図 2)。

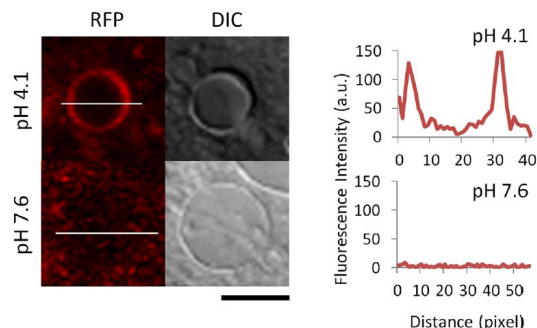


図 1. TagRFP-ADCY6 搭載バキュロウイルス出芽ウイルス粒子と巨大リポソームとの膜融合。弱酸性 pH ではリポソーム膜上に RFP の蛍光が見られたが、中性付近 pH では見られない。左: 共焦点像。右: 蛍光強度のプロファイル。発表論文より。

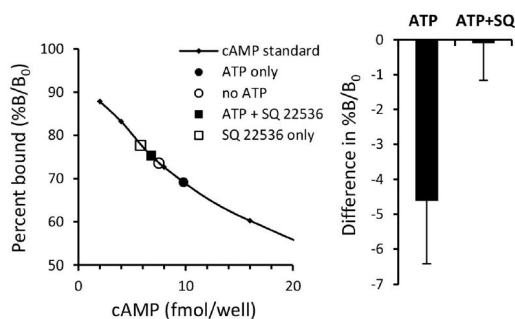


図 2. cAMP 競合アッセイによる ADCY6 搭載出芽ウイルス粒子と融合した ATP 封入巨大リポソーム内での cAMP 産生の評価。左: 検量線および測定条件。右: 阻害剤 SQ による阻害。発表論文より。

静置水和法では巨大リポソーム内外が同じ溶液となる。一方、最近頻繁に使われている界面通過法により調製する巨大リポソームは、操作の性質上、内水相と外水相の溶液の組成を変えることができる。特に内部に封入する成分を、ほとんど漏洩させることなく封入できる点は、利点のひとつである。本課題では、この方法により得た巨大リポソームも、静置水和法で調製した巨大リポソームと同様に、バキュロウイルス出芽ウイルス粒子との膜融合では、pH4-6 における蛍光顕微鏡観察から、GP64 に依存した特有の融合曲線が得られた。

(2) 細胞内ではアデニル酸シクラーゼの産生する cAMP が、セカンドメッセンジャーとして、下流の PKA へ作用し、さらに細胞内にシグナルが伝達される。本課題では、cAMP を感知のシステムの 1 つとして、人為的に環状ヌクレオチド感受性陽イオンチャンネル CNG を組み込んだ巨大リポソームが機能しないか、と考えて、適当なサブユニットを選択した (CNGA2, CNGA4, CNGB1)。まずは巨大リポソームへの組込を確認するため、それぞれの C 末を 3 色の蛍光タグ (TagRFP、TagGFP2、

TagBFP) と融合したサブユニットを提示するバキュロウイルスを作出した。4 量体形成 (3 遺伝子産物) を得るための感染・発現条件を、宿主細胞 (Sf9 細胞) レベルで検討し、単感染効率をそれぞれ乗じた効率で 3 重感染することが分かった。巨大リポソーム膜への効率的な取込のために、目下、さらなる条件検討を進めている。

(3) これまでの研究から、巨大リポソーム膜との融合によるプロテオリポソーム調製には、用いる組換えバキュロウイルス出芽ウイルス粒子の品質が、その成否に重要であることが経験的に分かっていた。膜タンパク質を提示する組換え出芽ウイルス粒子に関する他グループの先行研究を参考に、宿主細胞の感染前の培養条件と、回収して得られるウイルス粒子の性状との関係を、詳しく検討した (発表論文 および)。GPCR であるアドレナリン 2 受容体を発現する BV 粒子について、構成するタンパク質の解析や、透過電顕の観察を行った。宿主培養方法 (静置、振盪) に、組換えタンパク質の安定性、発現量や、粒子形態が強く関連していることが確かめられた。同じショ糖密度勾配のフラクションであっても、感染前後とも静置培養なら、ウイルス粒子は桿型でコンパクトの正常粒子であり、浮遊培養であればやや弛緩したマッチ棒型が多く見られ、さらに形態の乱れも目立った。感染後 48 時間目の TEM 観察から、ウイルス感染前の細胞の培養状態の違いに、大きな差が認められた (図)。リポソームとの膜融合実験や、搭載されている受容体とリガンドとの結合実験など、目的に応じて、性状の異なる BV 調製法を用いることの重要性が示唆され、今後の研究推進に大いに役立つ。

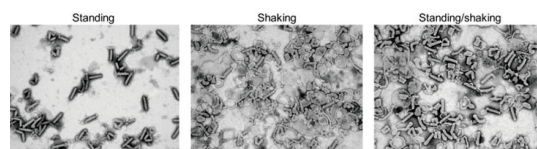


図 3. ADRB2 組換えバキュロウイルス感染後 48 時間後に回収したショ糖密度勾配の同一画分に含まれる出芽ウイルス粒子の TEM 画像。感染前/後は、静置/静置(左)、浮遊/浮遊(中央)および静置/浮遊培養(右)。発表論文より。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Tomomi Hattori, Kohei Nakanishi, Takaaki Mori, Masahiro Tomita, Kanta Tsumoto, The method used to culture host cells (Sf9 cells) can affect the qualities of baculovirus budding particles expressing recombinant proteins, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 80(3), 2016, 445-451

DOI: 10.1080/09168451.2015.1101331

Takaaki Mori, Koki Kamiya, Masahiro Tomita, Tetsuro Yoshimura, Kanta Tsumoto, Incorporation of Adenylate Cyclase into Membranes of Giant Liposomes Using Membrane Fusion with Recombinant Baculovirus-Budded Virus Particles, *Biotechnology Letters*, 査読有, 36(6), 2014, 1253-1261
DOI : 10.1007/s10529-014-1485-6

湊元幹太, 人工細胞システム構成に役立つ組換えプロテオリポソーム技術、日本化学会・生体機能関連化学部会ニュースレター、査読無、28巻、2014、pp.15-18
<http://seitai.chemistry.or.jp/newsletter/NL28-03.pdf>

〔学会発表〕(計40件)

服部那美、中西航平、富田昌弘、湊元幹太、組換えバキュロウイルス出芽粒子の性状解析：宿主細胞培養条件の影響、BMB2015(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)、2015年12月1日-12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

中西航平、西上美佐子、富田昌弘、湊元幹太、BMB2015(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)、2015年12月1日-12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

湊元幹太、脂質膜ベシクル：形成から細胞模倣まで、第46回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2015年11月7日-11月8日、三重大学工学部(三重県・津市)

Kanta Tsumoto, Jin Tabata, A reverse phase method for the formation of giant vesicles (GVs) of phosphatidylcholine, 第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13日-9月15日、金沢大学角間キャンパス自然科学本館(石川県・金沢市)

K. Tsumoto, M. Nishigami, T. Mori, M. Tomita, A Novel Method for Developing GUV Artificial Cell Membranes Displaying Recombinant Protein Receptors with Baculovirus Expression Systems, 8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014), 2014年12月4日-12月6日、愛媛大学南加記念ホール(愛媛県・松山市)

湊元幹太、吉村哲郎、リポソーム工学をベースとする人工細胞システムの構築、第66回日本生物工学会大会・シンポジウム「バイオベンチャーを創出する生体分子・バイオ界面工学のイノベーション」、2014年9月9日-9月11日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

湊元幹太、少数要素から構成する人工細胞ベシクルを用いた膜シグナル伝達モデル実験系の開発、第86回日本生化学会大会・シンポジウム3S02a 生体膜の動態から見える新たな膜生物学、2013年9月11日 9月13

日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
西上美佐子、森貴昭、吉村哲郎、吉川研一、富田昌弘、湊元幹太、界面通過法 GUV を用いたバキュロウイルス粒子の膜融合能の検討と細胞模倣への利用、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日 9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

森貴昭、西上美佐子、富田昌弘、湊元幹太、組換えバキュロウイルス-巨大リポソーム膜融合による GPCR 経路要素の個別組込み法、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日 9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

湊元幹太、組換えバキュロウイルスを用いた膜蛋白質の人工脂質膜ベシクルへの再構成、分子ロボティクス研究会4月定例会、2013年2013年4月27日、名古屋大学東山キャンパスベンチャービジネスホール(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

Google Scholar My Citation
http://scholar.google.com/citations?sortBy=pubdate&hl=en&user=HesLhbwAAAAJ&view_op=list_works
研究室 HP
<http://www.bio.chem.mie-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湊元 幹太 (TSUMOTO, Kanta)
三重大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80362359

(2) 連携研究者

木戸秋 悟 (KIDOAKI, Satoru)
九州大学・先端物質化学研究所・教授
研究者番号：10336018