

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25650020

研究課題名(和文) 哺乳類超巨大膜蛋白質発現系の構築

研究課題名(英文) Establishment of an over-expression system for mammalian large membrane proteins

研究代表者

小川 治夫 (Ogawa, Haruo)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：40292726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PDBに登録される膜蛋白質立体構造の数は、年々増加しているが、大部分はバクテリアの哺乳類のホモログを解析したものが、GPCR等の低分子量のものであり、哺乳類由来の超巨大蛋白質は手つかずである。これは、哺乳類由来の超巨大膜蛋白質を発現可能な簡便な系がないためでもある。そこで、我々の現有の哺乳類蛋白質発現システムを改良し、IP3受容体等、哺乳類由来の超巨大膜蛋白質を発現するシステムの構築を行うことを目的とした。これらの大量発現・精製法が確立すれば、これまで研究が不可能であった膜蛋白質のキネティック実験も可能になる。また、最終的に構造決定が成されれば、新規薬剤開発にも道が開けると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although the number of atomic structures of membrane proteins deposited in PDB increases year by year, most of them are bacterial homologues of mammalian ones or low molecular-weight ones such as GPCRs. X-ray crystallographic studies of mammalian large membrane proteins have not been conducted well. One of the reasons is that there is no easy as well as versatile system for the protein production of such proteins. Thus, we aimed to establish an over-expression system for mammalian large membrane proteins, such as IP3 receptor, with modifications of our own expression system. The new system should be useful for carrying out kinetic studies for such proteins which could not be studied so far. Moreover, high-resolution structure of such proteins should be useful for new drug-development.

研究分野：構造生物学

キーワード：大量発現 膜蛋白質 アデノウィルス 超巨大蛋白質

1. 研究開始当初の背景

立体構造が解析された膜蛋白質の数は、年々増加の一途を辿っている。その理由は、大腸菌や酵母等を用いた発現系の構築が簡便になったことや、cubic phase 法等の膜蛋白質の結晶化を一般化する手法が整ってきたことであろう。だが、実際に解析された立体構造の殆どは、哺乳類由来の膜蛋白質の構造を直接解く代わりに、その取り扱いの簡便性から大腸菌等の下等生物種のホモログを用いて行われたものである。哺乳類 GPCR 等の構造解析も多くは行われているものの、その対象分子の分子量は小さい。これは、哺乳類由来の膜蛋白質の簡便かつ万能な大量発現系が存在しないためでもある。実際、哺乳類の膜蛋白質を大腸菌等の下等動物種で発現することはまず不可能である。また、Sf9/バキュロウィルスの系でも、Sf9 細胞の脂質環境が哺乳類のものとは異なることから、発現した膜蛋白質が生来の活性を示さない例があることも知られている。従って、発現蛋白質の生来の環境を有する、哺乳類培養細胞を用いた発現系が最適であることは言うまでもない。

このような状況の中、我々は独自技術であるアデノウィルス/哺乳類培養細胞発現・精製系により、哺乳類の Ca^{2+} ポンプである SERCA1a や SERCA2a 等(両者とも分子量約 110K)の大量発現・精製の実用化に成功した。培養液約 1 L の培養で、実に 4 mg と驚異的な量の精製 SERCA1a 蛋白質を得ることができている。ウィルスを用いた一過的な発現のため、ステーブル発現細胞株等を利用して行う手法に比べ、細胞毒性も少ないと考えられる。実際、発現を行った SERCA1a からは既に結晶構造も得ることができている。従って、分子量 200K 程度の比較的大きな哺乳類由来の膜蛋白質でも発現・精製し、構造解析へ持って行くことも、十分現実的になってきた。

だが、申請者が実用化に成功したアデノウィルス/哺乳類培養細胞を用いた発現系には、導入できる遺伝子長に限界があるという致命的欠陥もある。実際、現在販売流通しており我々が用いている変異アデノウィルス作成システム(AdEasy-1 システム)は、アデノウィルスの遺伝子上で、E1 と E3 領域を欠損させたスペースを目的遺伝子の導入に利用したもので、組み込める遺伝子の最大長は 7.5 kbp(アミノ酸 2,500 残基)でしかない。従って、現行のシステムでは、遺伝子長 8.1 kbp の IP3 受容体等の超巨大分子の発現は不可能である。

その一方、より大きな外来遺伝子を導入可能な系として、市販はされていないが入手可能なシステムである、AdEasy-2 システムの存在が知られていた。これは、アデノウィルスの遺伝子上の E1 と E3 領域に加え、更に E4

領域も欠損させており、最大 10 kbp(アミノ酸 3,333 残基)まで外来遺伝子を導入可能なシステムである。そのため、このシステムであれば、IP3 受容体等の超巨大膜蛋白質の発現も大いに可能になる。だが、その一方で、ウィルスの作成や増幅が大変困難であることが知られていた。そこで本研究で、実際に AdEasy-2 システムによる発現系を立ち上げ、将来の IP3 受容体の発現へ結びつけることを試みた。

2. 研究の目的

哺乳類由来の超巨大膜蛋白質を発現するシステムの構築を行うことを目的とした。PDB に登録される膜蛋白質立体構造の数は、年々増加している。だが、大部分はバクテリアの哺乳類のホモログを解析したものか、GPCR 等の低分子量のものであり、哺乳類由来の超巨大蛋白質は手つかずである。そこで、本研究ではその代表例として分子量も適当な、細胞内 Ca^{2+} 濃度調節機構としても重要な役割を担う、イノシトール 3 リン酸 (IP3) 受容体(分子量 313k で 4 量体を構成)の大量発現・精製系の構築を行う。大量発現・精製法が確立すれば、これまで研究が不可能であった、受容体のキネティック実験も可能になる。また、最終的に構造決定が成されれば、新規薬剤開発にも道が開ける。

3. 研究の方法

最大遺伝子導入長が 10 kbp の AdEasy-2 システムを導入し、超巨大膜蛋白質の発現系を構築を試みた。AdEasy-2 システムのコントロールとして、まずは GFP の発現を行った。更に AdEasy-1 システムで実用化に成功している SERCA1a を用いることで発現条件の最適化を図った。また、全て分子の N 末には Halo-Tag を融合させており、簡便な精製を可能にした。AdEasy-1 システムの場合には、変異ウィルス作成の際、E1 蛋白質を恒常的に発現する 293 細胞等を用いる必要がある。一方、AdEasy-2 システムの場合には、変異ウィルス作成の際、E1 蛋白と同時に、E4 蛋白質をも発現させる必要がある。だが、E4 蛋白質は細胞に致死的であり、E1 蛋白質の様に恒常的な発現を行うことは不可能であった。そこで、最終的には E4 ウィルスを発現させる哺乳類細胞に感染可能なバキュロウィルスを作成し、これを 293 細胞に共感染させることで、変異アデノウィルスの作成を行った。

4. 研究成果

現在販売流通しており、実際我々が用いている変異アデノウィルス作成システムは AdEasy-1 システムである。アデノウィルスの遺伝子上で、E1 と E3 領域を欠損させてあり、その空いたスペース(組み込める遺伝子の最大長は 7.5 kbp(アミノ酸 2,500 残基))を発現したい遺伝子の導入に利用している。変異ウィルスの作成には、ウィルスのパッケージ

ングに必須な E1 蛋白質を外部から導入する必要がある。そのため、AdEasy-1 システムの場合では E1 蛋白質をステーブルに発現する 293 細胞等を用いてウイルス作成を行う。一方、本研究で実用化を目指した、市販はされていないが入手可能なシステム AdEasy-2 システムの場合、アデノウイルスの遺伝子上で、E1 と E3 領域に加え、更に E4 領域も欠損させており、最大 10 kbp(アミノ酸 3,333 残基)まで外来遺伝子を導入可能である。だが、変異ウイルスの作成には、ウイルスのパッケージングに必須な E1 蛋白質に加え、更に E4 蛋白質を外部から導入する必要がある。その一方で、E4 蛋白質は細胞に致命的なことが研究開始時点で知られていた。即ち、E4 蛋白質の発現をどのようにうまくコントロールし、変異アデノウイルスのパッケージングを行うことができるかが、本研究遂行の 1 つの鍵であった。そのためには、E4 蛋白質の発現を誘導可能な系が必須である。

以上の状況を踏まえて、市販の細胞の利用、FlpIn-TREx システムによる E4 蛋白質を発現誘導可能な細胞の作成、哺乳類細胞に感染可能なバキュロウイルスの利用、の 3 通りの手法でこの問題の克服に努めた。

市販の細胞の利用

911E4 細胞などが AdEasy-2 システム用のパッケージング細胞として知られているが、研究開始時点で市販されていて入手可能なものは、デキサメタゾンで E4 蛋白質の発現誘導が可能であるとされる Microbix 社の 293E4pIX 細胞のみであった。そこで 293E4pIX 細胞を購入し、実験を試みた。ところが 293E4pIX 細胞は極僅かな衝撃にも弱く、実際、通常の細胞継代もままならなかった。おそらく衝撃で E4 蛋白質の発現が誘導されてしまい、そのために細胞死に至るのではないかと考えられる。無論、衝撃を与えることを最小限にとどめることは物理的に可能ではある。だが、本研究の最終目標は、超巨大膜蛋白質の大量発現であり、100 枚程度の 15 cm ディッシュを常時ハンドリングする必要がある。それにはこのようにハンドリングが極度に難しい細胞を用いることは不可能と考え、本細胞の採用は断念した。

Flp-In T-REx システムによる E4 蛋白質を発現誘導可能な細胞の作成
Flp-In TREx システム(インビトロジェン社)は、ステーブル細胞株の樹立も容易であり、導入遺伝子をドキシサイクリンにより誘導を可能である。比較的遺伝子の漏れ出しが少ないとされる系でもあることから、Flp-In T-REx293 細胞を用いて、E4 蛋白質を誘導発現可能なステーブル細胞株の樹立を図った。マーカー分子として E4 遺伝子の発現のモニターを行うために、E4 遺伝子の後方に IRES 遺伝子を挟んで DsRed-Express2 遺伝子も導

入した。以上の遺伝子を同システムに導入後、抗生物質で細胞選別を図った。だが、抗生物質での選別を行うにつれ、次第に細胞の調子が崩れてきて、最終的に全ての細胞が死滅してしまった。実際、蛍光顕微鏡で DsRed-Express2 蛋白質の観察を行ったところ、死滅した細胞は全て赤い蛍光を発していることが明らかになった。これは導入した遺伝子からの極僅かな E4 蛋白質の発現の漏れ出しが細胞死をもたらしたことを意味する。以上のことから、本システムを用いた場合は E4 蛋白質を発現誘導可能な細胞株の樹立は困難と考え、本システムの採用は断念した。

哺乳類細胞に感染可能なバキュロウイルスの利用

哺乳類培養細胞に感染可能なバキュロウイルスへ E4 遺伝子を導入し、一過的に E4 蛋白質を発現する系(バキュロ-E4)を構築した。

と同様に、マーカー分子として E4 遺伝子の発現のモニターを行うために、E4 遺伝子の後方に IRES 遺伝子を挟んで DsRed-Express2 遺伝子も導入したので、バキュロ-E4 の感染の有無は容易に判別可能である。実際作成したバキュロ-E4 が細胞へ効率良く感染することを確認した。そこで、まずは GFP 遺伝子を AdEasy-2 システムへ導入し、293 細胞へトランスフェクションを行う際、バキュロ-E4 を同時に感染させた。感染した 293 細胞を 48 時間後に破碎し、パッケージングされたと考えられるウイルス(P1)を抽出し、再び 293 細胞に感染させたところ、GFP の蛍光を観測できた。以上の結果は、開発したシステムを用いて、AdEasy-2 システムでの変異アデノウイルスのパッケージングに成功したことを意味する。そこで、ハードルをより高くし、バキュロ-E4 と AdEasy-2 システムの利用により、SERCA1a を発現する変異アデノウイルスの作成に取り組んだ。SERCA1a 遺伝子の後方に IRES 遺伝子を挟んで GFP 遺伝子も導入したので、SERCA1a の発現を GFP の蛍光で確認可能である。そこで、GFP の時と同様に P1 ウイルスを作成し、これを再び 293 細胞に感染させたところ、GFP の蛍光を確認できた。一方、細胞を破碎し、ウェスタンブロッティングで SERCA1a の発現を確認したが、SERCA1a のバンドを確認することは現時点ではできていない。

本研究期間において、バキュロ-E4 を開発することができ、AdEasy-2 システムを作動させることに成功した。だが、まだ実用化には至っていない。実際、SERCA1a の発現実験でも、GFP の蛍光は観察できるがウェスタンブロッティングでは SERCA1a の発現を確認できてはいない。これは、現時点ではウイルスの力価を十分に上げることができていないことが原因と考えられる。実際、研究終了時点ではバキュロ-E4 ウイルスのハンドリングに精通していなかったこともあり、それ

を添加する最適のタイミングや、最適使用量を決定できてはいなかった。そこで、今後は最適タイミングと使用量を正確に見積もることで、力価の高いウイルスを得ようと考えている。また、今後もバキュロ-E4以外のE4蛋白質導入法も検討する予定であり、最終的にIP3受容体の発現を目指す予定である。

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 6件)

1. Murayama, T., Kurebayashi, N., Ogawa, H., Yamazawa, T., Oyamada, H., Suzuki, J., Kanemaru, K., Oguchi, K., Iino, M., Sakurai, T.,

Genotype-Phenotype Correlations of Malignant Hyperthermia and Central Core Disease Mutations in the Central Region of the RYR1 Channel, *Human Mutation*, 37, 2016, 1231-1241, 10.1002/humu.23072 査読 有

2. Ogawa, H., Cornelius, F., Hirata, A., Toyoshima, C.

Sequential substitution of K⁺ bound to Na⁺,K⁺-ATPase visualized by X-ray crystallography, *Nat Commun.*, 6, 2015, 8004, 10.1038/ncomms9004 査読 有

3. Habek, M., Haviv, H., Katz, A., Kapri-Pardes, E., Ayciries, S., Ogawa, H., Toyoshima, C., Karlisch, S.J., Stimulation, inhibition, or stabilization of Na,K-ATPase caused by specific lipid interactions at distinct sites, *J. Biol. Chem.* 290, 2015, 4829-4842.

10.1074/jbc.M114.611384 査読 有

4. Morita, M., Ogawa, H., Ohno, O., Yamori, T., Suenaga, K., Toyoshima, C. Biselyngbyasides, Cytotoxic Marine Macrolides, are Novel and Potent Inhibitors of the Ca²⁺ Pumps with a Unique Mode of Binding., *FEBS Lett.*, 589, 2015, 1406-1411,

10.1016/j.febslet.2015.04.056 査読 有

5. Zhao, Y., Ogawa, H., Yonekura, S., Mitsuhashi, H., Mitsuhashi, S., Nishino, I., Toyoshima, C., Ishiura, S.

Functional analysis of SERCA1b, a highly expressed SERCA1 variant in myotonic dystrophy type 1 muscle., *Biochim. Biophys. Acta.* 1852, 2015, 2042-2047

10.1016/j.bbadis.2015.07.006. 査読 有

6. 小川治夫, 金井隆太, 豊島近

ナトリウムポンプ蛋白質がナトリウムを選択的に運搬する機構 - How the Na⁺-pump

recognizes and transports Na⁺ selectively. *医学のあゆみ*, 254, 2015, 1186-1187

[学会発表](計 13件)

1. 小川治夫

Recent advances in structural studies of SR Ca²⁺-ATPase, 第94回日本生理学会 2017 3/28-30, 浜松アクロシティコンgresセンター(静岡県・浜松市)

2. Haruo Ogawa, Chikashi Toyoshima

Large-scale production of mammalian membrane proteins toward determination of high resolution structures

Biophysical Society 61st Annual Meeting 2017 2/11-15, New Orleans, Louisiana (USA)

3. 小川治夫, 樺島佳樹, 豊島近

Ca²⁺-ポンプ構造研究の最前線, 日本生体エネルギー研究会 第42回討論会, 2016 12/19-21, 名古屋工業大学4号館ホール(愛知県・名古屋市)

4. 小川治夫, 村山尚, 呉林なごみ, 豊島近
高分解能構造解析へ向けた哺乳類由来膜蛋白質の大量生産, 第89回 日本生化学会大会シンポジウム, 2016 9/25-27, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

5. Haruo Ogawa, Flemming Cornelius, Ayami Hirata, Chikashi Toyoshima

Kinetics by X-ray crystallography: sequential substitution of K⁺ bound to Na⁺,K⁺-ATPase, Biophysical Society 60th annual meeting, 2016 2/27-3/2

Los Angeles Convention center, Los Angeles, California (USA)

6. 小川治夫, 平田絢美, Flemming Cornelius, 豊島近

X線結晶構造解析によるキネティクス測定: Na⁺,K⁺-ATPaseに結合したK⁺は段階的に置換される, 日本生体エネルギー研究会 第41回討論会, 2015 12/21-23, 東京大学医学部1号館 講堂(東京都・文京区)

7. Haruo Ogawa, Flemming Cornelius, Ayami Hirata, Chikashi Toyoshima

Kinetics by X-ray crystallography: sequential substitution of K⁺ bound to Na⁺,K⁺-ATPase., BMB2015(第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会合同大会) ワークショップ, 2015 12/1-4, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

8. Haruo Ogawa, Flemming Cornelius, Ayami Hirata, Chikashi Toyoshima

Sequential substitution of bound K⁺ in the transmembrane binding sites of

Na⁺,K⁺-ATPase, kinetics by X-ray crystallography., 日本生物物理学会第53回年会シンポジウム, 2015 9/13-15
金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館 (石川県・金沢市)

9. Haruo Ogawa, Yimeng Zhao, Ayami Hirata, Junko Tsueda, Shoichi Ishiura, Giuseppe Inesi, Chikashi Toyoshima, Large Production of SERCA toward determination of three-dimensional structures, 14th International Conference Na,K-ATPase and related transport ATPases: Structure, mechanism, cell biology, health and disease, 2014 8/30-9/5, De Werelt Conference Centre, Lunteren (Netherlands)

10. Haruo Ogawa, Kanna Motoyama, Flemming Cornelius, Bente Vilsen, Chikashi Toyoshima, X-ray crystallographic study of Na,K-ATPase in complex with cardiotonic steroids, Biophysical Society 59th Annual meeting, 2015 2/7-11, Baltimore Convention Center, Baltimore, MD, (USA)

11. 森田真布, 小川治夫, 杖田淳子, 大野修, 矢守隆夫, 豊島近, 末永聖武, X-線結晶構造解析が明かすピセリングピアサイド類の Ca²⁺ポンプ阻害機構, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 3/26-29, 日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部 (千葉県・船橋市)

12. 趙一夢, 小川治夫, 米倉慎一郎, 三橋弘明, 豊島近, 石浦章一, 筋強直性ジストロフィーの病態に関わる筋小胞体 Ca²⁺-ATPase 1 スプライスバリエントの機能的差異, 第 87 回日本生化学会, 2014 10/15-18, 京都国際会館 (京都・京都市)

13. 小川治夫, 元山かん奈, Cornelius Flemming, Vilsen Bente, 豊島近, Na⁺,K⁺-ATPase と強心配糖体複合体の X 線結晶構造解析, 第 87 回日本生化学会, 2014, 10/15-18, 京都国際会館

〔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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
小川治夫 (OGAWA HARUO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：40292726

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()