

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660075

研究課題名(和文)シアノバクテリアを利用した膜タンパク質大量生産系の構築

研究課題名(英文) Construction of high-level production system for membrane protein using cyanobacteria

研究代表者

木村 成伸 (Kimura, Shigenobu)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：90291608

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)：細胞膜上にある膜タンパクは、細胞の代謝、物質輸送、信号伝達などに重要な役割を果たしている。膜タンパク分子の立体構造や機能解明を進めるためには、大量培養が容易な微生物を用いた遺伝子組換え型膜タンパクの大量生産系が必要である。本研究では、光合成微生物であるシアノバクテリア細胞内に豊富にあるチラコイド膜上の膜タンパクのN末端側ポリペプチドを利用して、遺伝子組換え型タンパクをチラコイド膜画分に産生できることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins are very important in cell systems such as metabolism, substance transport, and signal transduction. High-level production system of recombinant membrane protein using easily cultivable bacteria is strongly required for the development of structural and functional studies on various membrane proteins. In this study, it was founded that recombinant protein could be accumulated in the thylakoid membrane fraction of a plant-type photosynthetic microorganism, cyanobacteria, using an N-terminal polypeptide containing signal sequence of the thylakoid membrane protein of the cyanobacteria.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：膜タンパク質 発現系 シアノバクテリア チラコイド 膜移行シグナル

1. 研究開始当初の背景

X線結晶構造解析等によるタンパク質の立体構造解析技術の進歩によって、多くのタンパク質の立体構造が原子レベルで明らかにされている。しかし、その多くは細胞質内や細胞外に分泌される可溶性タンパク質や、膜タンパク質の可溶性ドメインであり、代謝、物質(膜)輸送、シグナル伝達、エネルギー代謝などの生命現象に重要な膜タンパク分子全体を構造解析した例はそれほど多くない。研究開始当初までに膜結合部分を含めて構造解析された膜タンパクとしては、*Rhodospseudomonas viridis* 光合成反応中心複合体、好熱性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PSI, 同 PSII, ミトコンドリア電子伝達系のウシ心臓シトクロム *c* 酸化酵素や酵母の複合体 III, チャネルタンパクであるウシ赤血球アクアポリン, 好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* の電位依存 K^+ チャネル KvAP などが挙げられる (D.Voet *et al.* *Fundamentals of Biochemistry*, 2006, Willey)。これらはいずれも大量培養が容易なバクテリアの細胞膜中にもともと大量に存在するか、あるいは家畜など大量に入手できる動物の組織から単離された膜タンパク質などである。しかし、レセプター分子などの動物細胞に微量しか存在しない膜タンパク質については、大腸菌や酵母に比べて動物細胞の遺伝子組換えと大量培養が容易でないことから、十分な量の試料が得られず、結晶構造解析の結晶化条件の検討にも至らない場合が多い。したがって、膜タンパク質の構造生物学研究を大きく進展させるためには、培養が容易な微生物宿主を用いた膜タンパク質の大量発現・精製技術の確立が不可欠であり、現在でもその状況に大きな変化はない。

光合成微生物の一種であるシアノバクテリア(ラン藻)は、その培養の容易さなどから、主として光合成の研究材料として用いられ、すでにその全ゲノム塩基配列も明らかにされている。しかし、これまで膜タンパクの大量発現用宿主としては利用されてこなかった。シアノバクテリアは、遺伝子組換えや大量培養などの取り扱いが比較的容易で、細胞内に発達した膜(チラコイド膜)を持つ(図1)

また、シアノバクテリアのチラコイド膜内には光合成系膜タンパクが大量に発現している。このことは、膜タンパク質発現の場としてチラコイド膜が膜タンパク質生産の場として十分なポテンシャルを有していることを意味する。また、光合成系タンパク質の膜移行シグナル配列は、膜タンパク質を大量にチラコイド膜内に移行させて埋め込むのに適した配列であるはずであり、これらを利用すれば、異種生物由来の膜タンパク質をチラコイド膜内に大量に発現できる可能性が高いと考え、本研究に着手した。

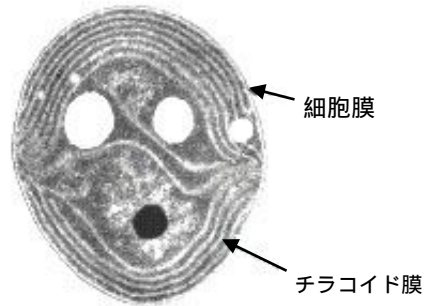


図1. シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の電子顕微鏡写真

(<http://www.c.u-tokyo.ac.jp/scholar/03.html> より引用、一部改変した)

2. 研究の目的

本挑戦的萌芽研究では、大量培養が容易で細胞内に発達したチラコイド膜を持つシアノバクテリアを宿主に用いて、異種膜タンパク質遺伝子を発現させ、合成されたタンパク質をチラコイド膜上に局在化、蓄積させて、単離・精製する方法の確立を目指し、異種生物由来の遺伝子組換え型タンパク質遺伝子をシアノバクテリア細胞内で発現させ、合成されたタンパク質をシアノバクテリアのチラコイド膜上に移行させることが可能かどうかを明らかにすることを主な目的とした。

本研究は、膜タンパク質の原子レベルでの構造・機能研究の推進に必要なブレイクスルー技術の提供を目指すものであり、最終的に異種細胞由来の遺伝子組換え型膜タンパク質をチラコイド膜上に局在化・大量発現させ、単離・調製する方法を確立することができれば、様々な膜タンパク質の構造・機能研究が大きく進展すると期待され、その波及効果は極めて大きいと考えられる。さらに、本研究を通じてシアノバクテリアの膜構造形成機構、光合成系タンパク質の合成と膜局在化機構などについての新知見が得られる可能性も期待できる。

3. 研究の方法

(1) シアノバクテリアの培養

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 は $40 \mu\text{M photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の白色蛍光灯照射下、BG11 培地中で震盪培養した。培養は、二酸化炭素濃度 0.3 %、湿度 70 %、30 に設定した人工気象器 (TOMY CLH-301) 中でおこなった。

(2) シアノバクテリア用発現プラスミドとシアノバクテリアの形質転換

Synechocystis sp. PCC6803 株の染色体 DNA から、*psbE* 遺伝子のプロモーター領域を PCR で増幅し、プラスミド pVZ321 (Zinchenko, *et al.* *Russian Journal of Genetics*, Vol.35, p.291-296, 1999) に導入して作製した光誘導型遺伝子発現用プラスミド pVEZ321(西澤明人ら、特許広報 P5751756)に目的の構造遺

伝子を導入してシアノバクテリア用発現プラスミドを構築した。 *Synechocystis* sp. PCC6803 株由来遺伝子の取得, His タグの付加, プラスミドに組み込むための制限酵素部位の付加は, PCR を利用して行った。

シアノバクテリアの形質転換はヘルパー大腸菌 R751 を用いた Zinchenko らの方法 (Zinchenko, et al. 同上) により行った。

(3) シアノバクテリアのチラコイド膜画分の調製

培養液から遠心分離したシアノバクテリア細胞を 1 mM ジチオトレイトール (DTT), 2% グリセロールを含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) 中に懸濁し, ガラスビーズを加えて破砕機 (Scientific Industries 社製 DISRPTER GENINE) にかけて細胞壁を破砕した。破砕物を 4 分, 遠心加速度 21,500g で遠心して不溶物を含む沈殿画分 (画分 P) と, チラコイド膜を含む上清画分 (画分 S) に分離した。分離した画分 S をさらに 4 分, 110,800g で超遠心分離して上清画分 (画分 SS) とチラコイド膜を含む沈殿画分 (画分 SP) に分画した (図 2)。

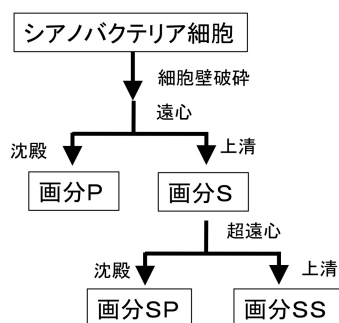


図 2. シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 細胞のチラコイド膜画分の分離

(4) シアノバクテリア細胞内の遺伝子産物の発現の確認

遺伝子産物の蓄積と局在は, SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) およびポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜を用いたウエスタンブロット法による免疫化学的検出法によって行った。

SDS-PAGE 後のゲルから PVDF 膜上にエレクトロブロットしたタンパクは, HRP 標識二次抗体によるルミノールの化学発光検出法によって検出した。His タグ付加タンパクの検出には, 一次抗体として抗 His タグマウスモノクローナル抗体, 二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG ヤギ抗体を, また, *Acidovorax* KKS102 由来フェレドキシン還元酵素 BphA4 の検出には一次抗体として抗 BphA4 ウサギポリクローナル抗体, 二次抗体として, HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を用いた。化学発光の検出には, スキャナー型化学発光検出器 (ウエスタンブロットイメージングシステム C-DiGit) を用いた。

4. 研究成果

(1) シアノバクテリアのチラコイド膜局在化タンパク遺伝子の pVE 系発現プラスミドの構築

シアノバクテリア細胞内で合成した目的タンパクをチラコイド膜上に効率的に蓄積させるために必要なチラコイド膜への移行シグナルを選定するために, *Synechocystis* sp. PCC6803 のチラコイド膜上に局在化しているタンパク質に関する文献 (Norling et al. J. Proteome. Res. 10, 3617-3631, 2011) を参考に, 3 種のチラコイド膜タンパク質遺伝子, *PetA* (sll 1317), *PsaF* (sll 0819), および *PsaL* (sll 1655) を選定し, これらのタンパクのチラコイド膜移行シグナルを利用することにした。これらの遺伝子のうち, *PetA* は光合成系のシトクロム *b₆f* 複合体を形成する Sec 型シグナル配列を持つ 1 回膜貫通領域を持つタンパクの遺伝子である。また, *PsaF* と *PsaL* は光化学系 I (PSI) のタンパク遺伝子で, このうち *PsaF* は Sec 型シグナル配列を持つ 1 回膜貫通領域を持つタンパクである。

まず, *Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノム DNA を鋳型として PCR でこれら 3 種類の遺伝子を取得し, C 末端側に His (His×6) タグ遺伝子を付加した構造遺伝子 (*PetAH*, *PsaFH*, および *PsaLH*) (図 3) を作製して, シアノバクテリアでのそれぞれの pVE 系発現用プラスミド, pVE*PetAH*, pVE*PsaFH*, および pVE*PsaLH* を構築した。

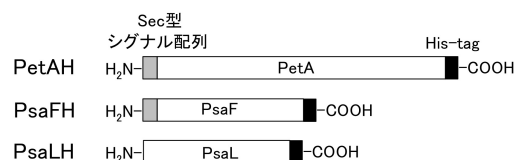


図 3. *PetAH*, *PsaFH*, および *PsaLH*

(2) pVE 系発現プラスミドによるチラコイド局在タンパク遺伝子産物のチラコイド膜画分への移行の確認

上記 (1) で構築したプラスミドを *Synechocystis* sp. PCC6803 に導入して, 産生される遺伝子産物の局在を, ウエスタンブロット法による抗 His タグ抗体を用いた免疫化学的発光検出系を構築して確認した。その結果, *PsaFH* および *PsaLH* の菌体内蓄積は確認できなかったが, *PetAH* については画分 P と S P への蓄積が確認された。この結果から, *PetA* の Sec 型シグナルを利用することによってチラコイド膜に異種タンパクを移行できる可能性が示唆された。また, 構築した抗 His タグ抗体を用いた免疫化学的発光検出系の有用性も確認することができた。

(3) *PetA* の膜移行シグナル配列を用いた BphA4 遺伝子の発現と遺伝子産物の局在

PetA の Sec 型シグナルを含む N 末端領域アミノ酸残基を利用して, 異種タンパクである *Acidovorax* KKS102 由来フェレドキシン還元酵

素 BphA4 を *Synechocystis* sp. PCC6803 のチラコイド膜上に蓄積できるかどうかをしらべた。PetA の Sec 型シグナル配列を含む N 末端から 45 残基、38 残基のポリペプチドを BphA4 の N 末端側に、C 末端に His タグを付加した構造遺伝子 (PetA45A4H および PetA38A4H) (図 4) を作製して、シアノバクテリアでのそれぞれの pVE 系発現用プラスミド、(pVE45AH および pVE38AH) を構築することにした。

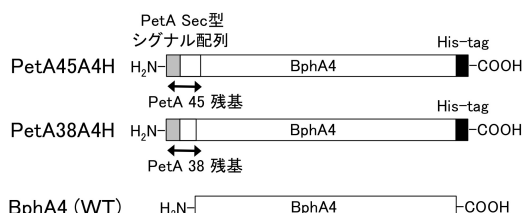


図 4. PetA45A4H, PetA38A4 および野生型 BphA4

構築した PetA45A4H 発現用プラスミドを *Synechocystis* sp. PCC6803 に導入して、産生される遺伝子産物の局在を、ウエスタンブロット法による抗 BphA4 ウサギポリクローナル抗体を用いた免疫化学的発光検出系を構築して確認した(図 5)。PetA45A4H 遺伝子を導入したシアノバクテリア (PCC6803/pVE45AH) では、画分 S P に野生型の BphA4 よりも高分子量側にバンドが観察され(図 5, SP 矢印位置)、チラコイド膜上への PetA45A4H の蓄積が示唆された。また、画分 S S には PCC6803/pVEA4 中で産生される野生型の BphA4 とほぼ同じ位置にバンドが現れたことから(図 5, SS), PetA45A4H のシグナルペプチドが切断された分子種が可溶性画分に存在することが示唆された。

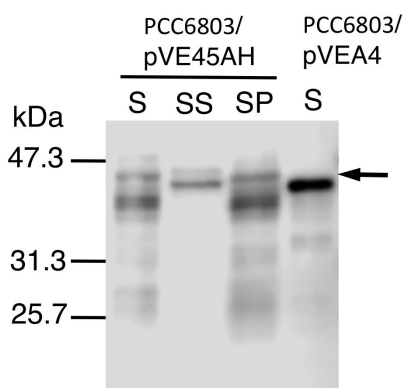


図 5. シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 細胞内での PetA45A4H 遺伝子産物の蓄積

以上のように、本研究では *Synechocystis* sp. PCC6803 のチラコイド膜に局在化する膜タンパク PetA の Sec 型シグナル配列を利用することによって、*Acidovorax* KKS102 由来フェレ

ドキシン還元酵素 BphA4 を *Synechocystis* sp. PCC6803 のチラコイド膜画分に蓄積できることが示唆された。この結果は、異種生物由来の遺伝子組み換え型膜タンパクをシアノバクテリアのチラコイド膜上に蓄積させることが可能であることを示唆する結果であり、本研究によって、膜タンパク質の構造生物学研究に必要な遺伝子組換え型膜タンパク質の生産系としてのシアノバクテリアの有用性を示すことができた。現在、pVE38AH 遺伝子産物の局在についても解析を進めている

今後も本挑戦的萌芽研究の成果を踏まえ、最終目的の達成に向けてチラコイド膜へのタンパク質の移行と局在機構について詳細にしらべると共に、他の異種生物由来膜タンパク質遺伝子の大量発現、遺伝子産物のチラコイド膜への大量蓄積、汎用的な精製法の開発を進める予定である。

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)

[学会発表](計 2件)

鈴木崇章, 池田未来, 野中千尋, 木村成伸, 『His タグ付加シアノバクテリアチラコイド膜タンパクの細胞内局在の解析』, 第 26 回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2015.11.27, 多賀市民プラザ (茨城県日立市)

池田未来, 大塚朱理, 西澤明人, 木村成伸, 『*Synechocystis* sp. PCC6803 株の SD 配列非依存型遺伝子発現機構の探索』, 第 24 回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2013.11.15, ワークプラザ勝田 (茨城県ひたちなか市)

[その他]

ホームページ等

<https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/12/0001143/profile.html>
http://www.biochem.ibaraki.ac.jp/05_kimura.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 成伸 (KIMURA SHIGENOBU)
 茨城大学・工学部・教授
 研究者番号: 90291608

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し