

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850071

研究課題名(和文) クリックケミストリーを応用した無細胞翻訳系によるタンパク質脂質修飾系の構築

研究課題名(英文) Establishment of post-translational modification system in the cell free protein system

研究代表者

泉 厚志 (Izumi, Atsushi)

富山県立大学・工学部・研究員

研究者番号：80637562

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)：FerrochelataseはFe(II)イオンをprotoporphyrin IX のテトラピロール位に挿入し、protohemeを合成する活性を有する。Ferrochelataseはミトコンドリア膜に局在しているが、膜貫通領域がなく、膜に接着しているが知られている。本研究では、生体内の環境を擬似的に再現できるLiposomeの介助により、活性型のferrochelataseを無細胞タンパク質合成系で調することさらに、密度勾配遠心法により簡便に精製タンパク質を調整できる方法の確率に成功した。本研究の技術は、様々な化合物の酸化酵素であるP450のようなタンパク質の調製に適応可能である。

研究成果の概要(英文)：We introduced a simple method to synthesize and purify a membrane-associated protein in the wheat germ cell free system as a model production system. We used ferrochelatase from *Saccharomyces cerevisiae*, catalyzing the insertion of ferrous ion into the tetrapyrrole center of protoporphyrin IX, as a model protein. The luminol-horse radish peroxidase assay indicated that the active ferrochelatase was only synthesized in the presence of asolectin liposomes. The Accudenz density gradient centrifugation experiment indicated that ferrochelatase clearly localized at the liposome fraction and the complex of the synthesized protein with liposomes can be simply separated from soluble protein fraction by a single step centrifugation.

研究分野：膜タンパク質

キーワード：膜タンパク質 フェロキラーゼ 脂質二重膜

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物のタンパク質の多くは、多彩な脂質修飾を翻訳後に受け、生体膜との親和性獲得をはじめとする機能制御に重要であることが広く知られている。優れたタンパク質生産系である無細胞翻訳系において、合成タンパク質の N-ミリスチル化やプレニル化は制御可能となっているが、S-パルミトイル化については実現していない。そこで本研究では、非天然のアミノ酸を合成タンパク質へ特異的に導入する系を利用することで、様々な脂質修飾を可能とする実験系の構築を進める。本研究課題は、脂質修飾による真核生物タンパク質の構造・機能制御の詳細を生化学的に解析する新たな実験手法の構築を目的とする。これに加えて、脂質二重膜を利用した安定的な膜タンパク質または膜接着型タンパク質の調整方法の構築を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では酵母由来で、膜に接着することで機能を発揮すると考えられている ferrochelatase に注目した。Ferrochelatase はプロトポルフィリン IX に二価鉄イオンをキレートさせ、protoheme を合成する反応を触媒する。本研究ではコムギ胚芽無細胞翻訳系により、脂質膜接着型タンパク質である ferrochelatase を活性型として合成する系を確立することさらに、そのタンパク質の精製条件の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 遺伝子のクローニングとタンパク質合成

ferrochelatase 遺伝子は *Saccharomyces cerevisiae* の cDNA を鋳型にして、PCR で増幅させた。増幅させた遺伝子は Gibson assemble 法で小麦胚芽無細胞タンパク質合成系により使用されるベクター、pYT08 にクローニングした。

無細胞タンパク質合成系で使用するプラスミドベクターを鋳型にし、mRNA を SP6 RNA ポリメラーゼにより調製した。mRNA の精製はセルフリースサイエンス社のプロトコールに従った。

タンパク質の合成はセルフリースサイエンス社の小麦胚芽無細胞タンパク質合成キットを使用し、透析法を採用した。Ferrochelatase の合成は 26 で行い必要に応じて、azolectin リポソームまたは  $^{14}\text{C}$ -Leu を添加した。

### ルミノール HRP 法による ferrochelatase の活性測定

Ferrochelatase の活性測定にはルミノール horseradish peroxidase (HRP) 法を使用

した。10  $\mu\text{l}$  タンパク質合成液、5  $\mu\text{l}$  1.0 M Tris-HCl pH 8.0、10  $\mu\text{l}$  118  $\mu\text{M}$  protoporphyrin IX、10  $\mu\text{l}$  60  $\mu\text{l}$  Fe(II)(NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、55  $\mu\text{l}$  イオン交換水を混合し、室温で 20 分間保温した。反応終了後 10  $\mu\text{l}$  の 25 nM apo 型 HRP を添加し、さらに室温で 30 分間静置した。最終的に 100  $\mu\text{l}$  20 mM ルミノール、0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.1 M Tris pH 8.0 を添加し、化学発光強度をプレートリーダーまたはルミノメーターで測定した。

### 密度勾配遠心法

150  $\mu\text{l}$  の  $^{14}\text{C}$  ラベルしたタンパク質を 150  $\mu\text{l}$  の 140 mM NaCl、5.4 mM KCl、10 mM Tris-HCl pH 8.0 と 300  $\mu\text{l}$  の 80% Accudentz を混合した。混合液を超遠心用の遠心管の底に移し、そこへ 650  $\mu\text{l}$  35% Accudentz、650  $\mu\text{l}$  30% Accudentz、100  $\mu\text{l}$  140 mM NaCl、5.4 mM KCl、10 mM Tris-HCl pH 8.0 を順に重層した。4°C、206,000 x g で 1 時間遠心した。遠心後のサンプルを遠心管の上部から順にサンプリングした。電気泳動後、それぞれの画分を SDS-PAGE で分離し、オートラジオグラフでラベル化されたタンパク質の有無を確認した。

## 4. 研究成果

### 脂質添加による活性型 ferrochelatase の合成

小麦胚芽無細胞タンパク質合成系により、ferrochelatase の合成を確認でき、 $^{14}\text{C}$  ラベルした ferrochelatase についても、その合成方法を確立できた (図 1 a-b)。その合成量は、無細胞タンパク質合成系により大量に合成されることで知られる GFP と同様であった。

次にルミノール HRP 法により、ferrochelatase の活性測定をした。Protoporphyrin IX、Fe(II)イオンが存在するときのみ protoheme の合成が観察され、無細胞タンパク質で合成した ferrochelatase に酵素活性があることが確認できた (図 1 c)。さらに、Ferrochelatase の合成の際に、アゾレクチンリポソームの有無によりその酵素活性の違いが観察された (図 1 d)。ルミノール HRP 法は半定量的な測定法であるが、リポソームの添加により、ferrochelatase の活性が 20 倍以上高くなることが分かった。

### 密度勾配遠心

密度勾配遠心法により、リポソームと結合した ferrochelatase を分離した (図 2)。Accudentz を利用した密度勾配遠心法では密度の高いリポソーム画分は遠心管の上部に移動し、密度の低い水溶性のタンパク質は遠心管の底に移動する。リポソームを添加して、かつ  $^{14}\text{C}$  ラベルした ferrochelatase または GFP 溶液を密度勾配遠心した結果、水溶性タンパク質である GFP が遠心管の底の方の画分から検出された。一方 ferrochelatase は遠

心管の上部から検出された。この結果から ferrochelatase はリポソームと結合していることを示唆している。

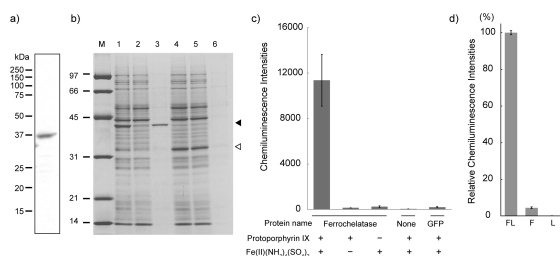


図1 Ferrochelatase の調整と活性測定

a) 無細胞系で  $^{14}\text{C}$  ラベルした ferrochelatase のオートラジオグラフ像。b) ferrochelatase または GFP の SDS-PAGE。1; ferrochelatase の合成反応液、2-3; ferrochelatase の合成反応液の上清と沈殿、4; GFP の合成反応液、5-6; GFP の合成反応液の上清と沈殿  
c) luminol-HRP アッセイ。タンパク質名、基質である protoporphyrin IX、 $\text{Fe(II)(NH}_2)_4(\text{SO}_4)_2$  の有無をそれぞれ +、- で示す。d) リポソームの有無の違いによる活性の違い。luminol-HRP で ferrochelatase 活性を測定した。FL; リポソーム存在下で合成した ferrochelatase。F; リポソームなしで合成した時の ferrochelatase 沈殿画分。L; リポソームのみ

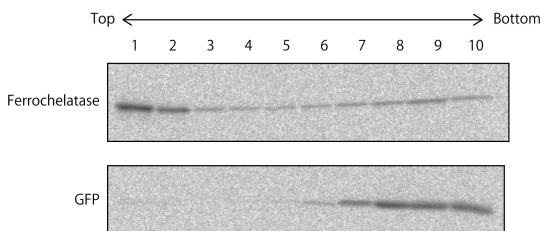


図2 合成したタンパク質のオートラジオグラフ像  $^{14}\text{C}$  ラベルした ferrochelatase と GFP はリポソームと一緒に合成し、accudenz 密度勾配遠心法により分離した。図の 1-10 はフラクション番号を示す。遠心管の上部から下部にかけて番号をふった。

## まとめ

Ferrochelatase は  $\text{Fe(II)}$  イオンを protoporphyrin IX のテトラピロール位に挿入し、protoheme を合成する活性を有する。Ferrochelatase はミトコンドリア膜に局在しているが、膜貫通領域がなく、膜に接着しているが知られている。本研究では、生体内の環境を擬似的に再現できる Liposome の介助により、活性型の ferrochelatase を無細胞タンパク質合成系で調ることさらに、密

度勾配遠心法により簡便に精製タンパク質を調整できる方法の確率に成功した。本研究の技術は、様々な化合物の酸化酵素である P450 のようなタンパク質の調製に適用可能である。一般的に P450 の調製には界面活性剤を利用して可溶化させたり、nanodisc を利用したりして調製することが知られている。本研究で示した密度勾配遠心法をこのタンパク質に適用することにより、簡易的に、大量に P450 を調製できる可能性が示唆された。

## 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 件)

[学会発表](計 1 件)

2013 年 日本農芸化学会 講演番号:3C12a11  
糖輸送体蛋白質の無細胞合成およびの構築

高林 泰斗 1、寺本 真一 1、泉 厚志 2、野澤 彰 2、渡辺 誠也 3、戸澤 譲 2 (1 愛媛大院理工、2 愛媛大・無細胞セ、3 愛媛大農)

Taito TAKABAYASHI1, Shinichi TERAMOTO1, Atsushi IZUMI2, Akira NOZAWA2, Seiya WATANABE3, Yuzuru TOZAWA2 (1Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ., 2CSTRC, Ehime Univ., 3Facul. Agr., Ehime Univ.)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

泉厚志 ( ATSUSHI IZUMI )

富山県立大学・工学部・研究員

研究者番号：80637562

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

(4)研究協力者

戸澤譲 ( YUZURU TOZAWA )

研究者番号：90363267