

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26630430

研究課題名(和文)光駆動ATP再生小胞を用いた新規な高効率無細胞タンパク質合成システムの創成

研究課題名(英文)Development of efficient protein production system by photo-driven ATP regenerating vesicle

研究代表者

原 清敬 (HARA, Kiyotaka)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・准教授

研究者番号：40434378

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)：既存の無細胞タンパク質合成系は、エネルギー源となるATPの減少により、反応の効率や持続性、コストの面で課題がある。本研究では、我々が開発したATPバイオセンサーおよび光駆動ATP再生小胞を用いて光のエネルギーから安価、持続的にATPを再生することで、本課題の解決を目指した。その結果、従来よりも高感度な蛍光ATPバイオセンサーの開発に成功したが、光駆動ATP再生小胞と無細胞タンパク質合成系、シャペロンが共に機能する条件を見出すことはできなかった。また、コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系を用いて、モデルタンパク質としてG蛋白質共役受容体の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Conventional cell-free protein synthesis system has fundamental problem in efficiency, sustainability and cost due to the shortage of ATP as an energy source. We aimed to resolve this problem by photosynthetic ATP supply using ATP biosensor and ATP photo-synthetic vesicle. As the result, we could not identify the condition in which the photo-synthetic vesicle, cell-free protein synthesis system and chaperon work together, although we succeeded to improve the sensitivity of the ATP biosensor. On the other hand, GPCR was synthesized using wheat cell-free protein synthesis system as a model of protein.

研究分野：Bioenergy

キーワード：ATP Protein Probe Photo Chaperone Structure

## 1. 研究開始当初の背景

各種タンパク質の大量生産は研究的にも産業的にも非常に重要であるが、細胞を用いる場合十分な量の発現が得られない場合がある。一方で無細胞タンパク質合成系は、目的タンパク質の発現に必要な因子のみから構成されるシンプルなシステムであり、タンパク質の大量生産につながるポテンシャルを有するが、反応の持続性やコスト面で課題が残る。特にエネルギー源の枯渇が目的タンパク質の持続的な合成効率を下げている、長時間の効率的な合成のためには継続的な ATP の添加が必要である。しかし ATP は高価であり、大量な添加は現実的でない。また、消費された ATP から生じるリン酸の蓄積によるタンパク質合成の阻害も問題である。また、目的タンパク質の効率的な構造形成を目的に、分子シャペロンがよく添加されているが、分子シャペロンもまた ATP を消費するという負の側面についてはほとんど検証されていないのが現状である。これらの背景から、ADP とリン酸からの ATP の再生がその実用化のボトルネックとなっている。応募者らも、従来のタンパク質合成系では目的タンパク質が大量に合成できない局面に数多く直面してきた。一方で、応募者らは ATP を光から再生する光駆動 ATP 再生小胞の開発【Hara et al, Sci Rep, 2013】や、ATP バイオセンサーの開発と細胞内 ATP レベル計測に成功してきた【Imamura et al, PNAS, 2009】。そこでこれらの技術を応用すれば、分子シャペロンの利用などで近年急速に進展している無細胞タンパク質合成系をエネルギーの観点から改良できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

既存の無細胞タンパク質合成系は、タンパク質の合成反応や分子シャペロンによる立体構造形成に必要な ATP の減衰により、反応の効率や持続性、コストの面で課題がある。本研究では、応募者らが開発した光駆動 ATP 再生系を用いて光のエネルギーから安価、持続的に ATP を再生することで、本課題の解決を目指した。また、応募者らが開発した ATP バイオセンサーの利用により反応系内の ATP 濃度を計測し、光照射強度等の反応条件を最適化するとともに、最適比率の分子シャペロンカクテルの利用により目的タンパク質の立体構造形成効率を高めることを目的とした。本システムによって合成された目的タンパク質は、立体構造形成効率を測定することで、量だけでなく質の面から評価する。最終的には、結晶構造解析に耐えうる高品質なタンパク質の大量合成を目指した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 光駆動 ATP 再生小胞の調製

光駆動 ATP 再生小胞の調製は、【Hara et al, Biotechnol Lett, 2011】に示した方法に従って行った。具体的には、好熱菌の ATP 合成酵素を細胞膜に過剰発現させた大腸菌を培養し、培養の途中でレチナルを添加した。培養終了後に大腸菌細胞を遠心分離により回収し、Buffer にて洗浄後、超音波破砕機にて細胞を破碎した。超遠心機により、細胞破碎液を回収し、Buffer にて洗浄を 2 回繰り返し行った。大腸菌細胞は破碎されると、自律的に本来の向きとは反対向きの反転膜小胞を形成することが知られている。得られた光駆動 ATP 再生小胞の TEM 画像を図 1 に示した。

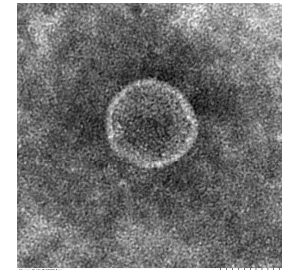


図 1 光駆動 ATP 再生小胞 (TEM 画像、bar は 10 μm)

### 3-2. 光駆動 ATP 再生小胞による無細胞タンパク質合成系への光駆動 ATP 供給

大腸菌、またはウサギ網状赤血球由来の無細胞タンパク質合成系を用いて、蛍光タンパク質である superfolderGFP (SFGFP)、あるいはシリウスを合成させ、蛍光強度から合成の様子を測定した。その際、デルタロドプシンと 3 - 1 で調製した光駆動 ATP 再生小胞を共存させた。550nm の光を照射することでデルタロドプシンを駆動し、生じたプロトンの濃度勾配で ATP を再生させた。光照射 (ATP 再生) の有無で、蛍光タンパク質の合成効率がどのように変化するかを調べた。

### 3-3. 新規蛍光 ATP バイオセンサーの構築

円順列変異緑色蛍光タンパク質 (cpEGFP) の N 末端側と C 末端側に、それぞれバクテリア ATP 合成酵素 サブユニットの N 末端部分と C 末端部分を様々なリンカー配列によって融合させた遺伝子ライブラリーを構築した。そのライブラリーからタンパク質を発現・精製したのち、ATP 結合による蛍光変化を計測し、大きな蛍光変化を示すクローンをスクリーニングした。

### 3-4. 新規蛍光 ATP バイオセンサーを用いた大腸菌内 ATP イメージング

新規蛍光 ATP バイオセンサーを発現させた大腸菌を蛍光顕微鏡下で観察した。405 nm の光と 480 nm の光で交互に励起し、510 nm の蛍光を冷却 CCD カメラで撮影した。

### 3-5. コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系を用いた ATP 駆動タンパク質合成

コムギ胚芽由来無細胞合成系を用いて、2種の G 蛋白質共役受容体の合成を試みた。合成したサンプルを用いて結晶化を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. 光駆動 ATP 再生小胞による無細胞タンパク質合成系への光駆動 ATP 供給

大腸菌由来タンパク質無細胞合成系と、SFGFP の組み合わせで実験を行った。その結果、蛍光分光光度計により、リアルタイムで SFGFP の合成を確認することができた。しかし、光駆動 ATP 再生小胞による合成促進の効果は見られなかった。

今回使用した大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系は市販品で、化学反応共役型の ATP 再生系がすでに含まれていたため、再生小胞による効果が現れにくかった可能性が考えられる。

そこで次に、化学反応共役型の ATP 再生系を含まない、ウサギ網状赤血球由来の無細胞タンパク質合成系を用いて実験を行った。ところが、SFGFP の蛍光は、光照射条件ではほとんど現れず、暗条件での合成でわずかに見られただけであった。

今回の実験で使用したプロモーターや SFGFP の遺伝子配列では、大腸菌に比べ、ウサギ網状赤血球由来の無細胞タンパク質合成系で、合成効率が大幅に落ちる可能性が考えられた。あるいは、ウサギ網状赤血球由来の無細胞合成系は、鮮血色をしているので、系自身が SFGFP の緑色の蛍光を吸収してしまう可能性も考えられた。また、この鮮血色のため、デルタロドプシン駆動用の光も光駆動 ATP 再生小胞に十分届かないことも懸念された。さらに、SFGFP の励起波長(485nm)がデルタロドプシンを駆動させる光の波長に近いいため、使用する無細胞合成系に関わらず、そもそも合成時に光を当て続けることで、SFGFP の蛍光団に悪影響を及ぼすことも懸念された。

そこで、SFGFP の代わりに、励起・蛍光波長の短い蛍光タンパク質であるシリウスを使用することとした。まず、大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系で実験を行ったところ、十分な蛍光の上昇が見られた。しかし、光照射の有無に関わらず、蛍光の上昇速度に大きな違いは見られなかった(図2)。

さらに、ウサギ網状赤血球由来の無細胞タンパク質合成系で、シリウスの合成を試みたが、明暗条件いずれの場合もシリウスの蛍光は見られなかった。ここにさらにシャペロニンを加えたが、蛍光は見られなかった。

今後の対策としては、化学反応共役型の ATP 再生系を含まず、かつ鮮血色のない無細胞

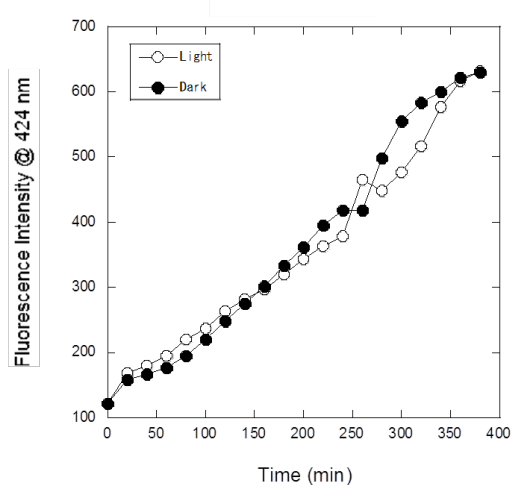


図2 シリウスの蛍光強度変化

胞合成系を用いる、より長波長域の光で駆動する、変異型デルタロドプシンを用いた ATP 再生小胞の開発する、などが考えられる。

### 4-2. 新規蛍光 ATP バイオセンサーの構築

従来よりも高感度な蛍光 ATP バイオセンサーの開発とそれを応用したバクテリア内 ATP イメージングを目的としたスクリーニングの結果、サブユニットの N 末端ドメインと cpEGFP のリンカーが Thr-Arg、cpEGFP とサブユニットの C 末端ドメインのリンカーが Leu-Gly であるクローン (QUEEN-7 $\mu$ ) を得た。QUEEN-7 $\mu$  は 2 つの励起ピーク (400 nm および 490 nm) と 1 つの蛍光ピーク (520 nm) を持ち、ATP 結合によって 400 nm の励起ピークが増加し、490 nm の励起ピークが減少した。400 nm と 490 nm で励起した際の蛍光強度の比 (400 ex/490 ex) は、ATP 結合によって最大 5 倍に達した。25 における ATP に対する解離定数は 14  $\mu$ M であった。一方、サブユニットの C 末端ドメインの配列を好熱製 *Bacillus* sp. PS3 のものから枯草菌のものに置換した QUEEN-2m は、解離定数が生理的濃度により近い 4.5 mM であった。QUEEN-2m のシグナルは pH7.3-8.8 の間ではほとんど変化が見られなかった。

### 4-3. 新規蛍光 ATP バイオセンサーを用いた大腸菌内 ATP イメージング

QUEEN-2m を発現した大腸菌の細胞内 ATP 濃度を蛍光スペクトルおよび既存のホタルルシフェラーゼ法によって定量した。その結果、両者の値はほぼ合致し、QUEEN-2m のシグナルは非常に定量性が高いことが明らかとなった。そこで、ひとつひとつの大腸菌の蛍光シグナルをイメージングによって取得し、大腸菌内 ATP 濃度を定量した。その結果、遺伝的に単一の大腸菌集団であっても、ATP 濃度は非常に大きなばらつきが存在することが明らかとなった。

#### 4-4 . コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系を用いた ATP 駆動タンパク質合成

X 線結晶構造解析のサンプルの効率的な生産方法として、ATP 再生小胞を用いたヒト膜受容体 GPCR の in vitro 合成系の確立を目指した。ATP 再生小胞を用いる前に、既に構造が決定されている G 蛋白質共役受容体 (ムスカリン M2 受容体、アデノシン A2a 受容体) での発現を試み、実験系の確立を目指した。

どちらの GPCR で発現が確認できたので、これらを用いて結晶化を行ったが、現在までに結晶は得られていない。活性の評価を、放射性ラベルリガンドを用いた結合実験で評価した。構造決定に用いた昆虫細胞で発現させたサンプルと比較したところ、顕著な結合がみられなかった。発現はするもののコムギ胚芽の in vitro 合成系では活性のある状態にターゲットサンプルがフォールディングしていない可能性が示唆された。今後はバッファー条件、特にリガンドの存在下での条件を検討して、より効率よくフォールディングする条件を検討する。特に ATP 再生小胞を用いて ATP をリガンドとする P2Y ファミリーの GPCR の発現を行い、小胞存在下での発現量の変化、活性の変化を検討する。

#### 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 1 件)

Yaginuma, H, Kawai, S, Tabata, KV, Tomiyama, K, Kakizuka, A, Komatsuzaki, T, Noji, H, Imamura, H. "Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging."

**Sci Rep**, 2014; 4: 6552

[学会発表](計 5 件)

1. 岩切竜太、垣塚彰、今村博臣「細胞外 ATP ダイナミクスの解明に向けた蛍光 ATP バイオセンサー QUEEN の反応高速化と光安定化  
生体エネルギー研究会第 40 回討論会  
2014 年 12 月 12 日 愛媛大学

2. 今村博臣「定量的 ATP イメージングから明らかになった集団内における単一大腸菌細胞内 ATP 濃度の多様性」  
生体エネルギー研究会第 40 回討論会  
2014 年 12 月 11 日 愛媛大学

3. 今村博臣「ミトコンドリア内 ATP 濃度計測のための蛍光バイオセンサーの開発」  
日本ミトコンドリア学会  
2014 年 12 月 4 日 九州大学

4. Kiyotaka Y. Hara "Construction of energetic cell factories" The 20th Symposium of Young Asian Biotechnological Engineerres' Community

2014 年 11 月 7 日

National Chung Cheng University

5. 今村博臣「細胞エネルギーを可視化する」  
第 23 回日本バイオイメージング学会

2014 年 9 月 6 日 大阪大学

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

原 清敬 (HARA Kiyotaka)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・

特命准教授

研究者番号: 40434378

##### (2) 研究分担者

今村 博臣 (IMAMURA Hiromi)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号: 20422545

渡辺 洋平 (WATANABE Yohei)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号: 40411839

寿野 良二 (SUNO Ryoji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・

研究員

研究者番号: 60447521