トピックス

無細胞タンパク質合成による膜タンパク質の生産

下野和実^{1,2}, 白水美香子², 横山茂之^{2,3}¹松山大学薬学部²理化学研究所生命分子システム基盤研究領域³東京大学大学院理学系研究科

1. はじめに

膜タンパク質は、生体膜を隔てたエネルギー変換、物質輸送、情報伝達といった生命にとってきわめて重要な機能を担っている。それらの重要性にもかかわらず、膜タンパク質についての理解は、可溶性タンパク質と比較して遅れているのが現状である。この理由の1つとして、大量試料調製が容易ではないことがあげられる。膜タンパク質の大量発現系には大腸菌や酵母、昆虫細胞、動物細胞などの生細胞を用いた系が一般的である。しかし、生物種の異なる膜タンパク質を生体膜に大量に機能的に発現させることは、膜組成の違いや膜移行過程の違いなどから困難である場合が多い。

このような生細胞を用いた発現系の問題点を克服できる手法として、無細胞タンパク質合成系が開発されている¹⁾。無細胞タンパク質合成系は、生命体の細胞機能維持性などの束縛条件が少なく合成系を構築できるため、生細胞発現系に比べ系の改変が容易などの利点をもつ。本稿では、無細胞タンパク質合成系を利用した膜タンパク質の生産方法について概説し、最近、われわれが開発した翻訳共役型リポソーム再構成法による膜タンパク質の大量機能合成法²⁾を紹介する。

2. 膜タンパク質の無細胞タンパク質合成

無細胞タンパク質合成は、反応液に転写・翻訳システムを含む細胞抽出液や鋳型 DNA、エネルギー源、適切な濃度の Mg イオンなどを含み、生命体に依存せずにタンパク質を合成できる。細胞抽出液としては、大腸菌、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球、ヒト細胞などの抽出液が用いられ、用途に応じて選択することが可能となっている。

しかし、一般的に、可溶性タンパク質と同じ手法を膜タンパク質にそのまま適用すると、疎水性の高さゆ

えに試料は凝集体として得られる。したがって、翻訳産物の凝集体形成を抑制することが、膜タンパク質を大量機能合成するためには必要である。その対応策としては、翻訳産物の可溶性増大または疎水性場の提供の2つの方法に大別される(図1)。

翻訳産物の可溶性を増大させる系には、穏和な界面活性剤(Brij35, ドデシルマルトシドなど)を添加し、膜タンパク質を可溶化する系^{3),4)}と膜タンパク質に大きな水溶性タンパク質のタグを付加し水溶性を増大させた系⁵⁾がある。

疎水性場の提供としては、生体膜を共存させる系が報告されていたが、最近、合成脂質2分子膜中に膜タンパク質を合成する技術が相次いで報告された。これらの方法は、脂質リポソームを反応液に添加する系⁶⁾、脂質2分子膜を固定化した系⁷⁾、足場タンパク質により脂質2分子膜の大きさを制御したナノ粒子上に合成する系⁸⁾であり、膜タンパク質の脂質膜移行性を利用している。合成脂質膜中に膜タンパク質を合成する系では、個々の膜タンパク質に適した脂質組成を選択できることや、目的タンパク質以外の膜タンパク質がリポソーム上に存在しないことから、リポソームを分離するのみで、高純度の試料を得ることができるといった構造・機能研究には大きな利点がある。最近、われわれは、従来の方法と異なり界面活性剤と脂質を反応液中に共存させて、脂質2分子膜形成と膜タ

図1 膜タンパク質凝集体形成の回避法。(電子ジャーナルではカラー)

Production of Membrane Proteins Using Cell-free Protein Synthesis

Kazumi SHIMONO^{1,2}, Mikako SHIROUZU² and Shigeyuki YOKOYAMA^{2,3}¹College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University²RIKEN Systems and Structural Biology Center³Graduate School of Science, the University of Tokyo

ンパク質合成を同時に行うことで、膜タンパク質を効率よく機能合成できる技術（翻訳共役型リボソーム再構成法）を開発した。

3. | 翻訳共役型リボソーム再構成法^{2), 9), 10)}

翻訳共役型リボソーム再構成法は、界面活性剤と脂質を反応液（透析内液）に添加し、透析法によりタンパク質合成と脂質2分子膜形成を同時に行う方法である。透析初期には界面活性剤により凝集体形成を抑制できる。透析が進むと界面活性剤が透析外液に移行し、透析内液中での界面活性剤濃度が減り、脂質2分子膜が形成され、脂質ディスク同士が融合し大きなサイズの脂質2分子膜となる。このときに合成された膜タンパク質は脂質2分子膜中に挿入される（図2）。すなわち、翻訳と共役してリボソームに膜タンパク質を再構成する方法である。本系に有効に作用する界面活性剤は、ステロイド由来の界面活性剤（コール酸、ジギトニン、CHAPS）である²⁾。ステロイド由来界面活性剤は、分子サイズが大きく流動性が低い界面活性剤である。これらは、多くの膜タンパク質に対して穏和であり、天然の構造を保ったまま可溶化できることが知られている。したがって、本系の場合、界面活性剤は、合成膜タンパク質に対し弱く相互作用して凝集体形成を抑制させる働きがあると考えられる。以下に実際の合成例を示す。

7回膜貫通型 α ヘリカルな膜タンパク質である光駆動型プロトンポンプ、バクテリオロドプシン（BR）の合成を試みた。1%のコール酸と6.7 mg/mLの卵黄レシチン由来フォスファチジルコリンを反応液に共存させた結果、正常なフォールドをもつBRを沈殿物として得ることができた。従来法^{6), 8)}と異なり本法では、合成産物を沈殿画分として得るため、遠心操作により簡単にBRを分離することができる。合成された機能体

図2 翻訳共役型リボソーム再構成法による膜タンパク質の無細胞合成法の概略図。（電子ジャーナルではカラー）

BRは、反応液1 mL当たり0.5 mgであり、従来法に比べ5-25倍の収量であった^{2), 6), 8)}。また、構成脂質としてDMPC（ジミリスチルホスファチジルコリン）やアズレクチン、界面活性剤としてジギトニンを用いた場合でも同程度の収量でBRを合成することができた。

われわれは、ヒト由来膜タンパク質（受容体など）を含む膜タンパク質に対しても本技術を適用した。標準条件（コール酸、卵黄フォスファチジルコリン共存）で30種類解析した時点では、8割にあたる24種類の膜タンパク質が脂質2分子膜に挿入された状態で合成できることを確認した¹⁰⁾。さらに数種の膜タンパク質については、構成脂質や界面活性剤の種類または量を変更し、天然と同様の多量体状態や機能を保持していることも確認している。

4. | おわりに

膜タンパク質は、すべて疎水性の高い部位をもつため、透析が進むにつれてタンパク質の置かれている疎水環境がなだらかに変化する本法は、広く膜タンパク質に適用できる可能性をもっている。さらに高純度の機能を保持した膜タンパク質を簡便にかつ大量に得ることができるため、膜タンパク質研究のための有用な試料調製法となる可能性がある。これまで大量の試料を必要とするために実現が不可能であった結晶構造解析や物理化学測定などが可能になり、膜タンパク質の構造・機能についてより理解が深まることが期待できる。

文 献

- 1) Spirin, A. S., Swartz, J. R. (2007) Cell-free Protein Synthesis, WILEY-VCH.
- 2) Shimono, K. *et al.* (2009) Protein Sci. **18**, 2160-2171.
- 3) Ishihara, G. *et al.* (2005) Protein Expr. Purif. **41**, 27-37.
- 4) Schwarz, D. *et al.* (2007) Nat. Protoc. **2**, 2945-2957.
- 5) 須藤雄気ら (2005) 実験医学 **23**, 1933-1937.
- 6) Kalmbach, R. *et al.* (2007) J. Mol. Biol. **371**, 639-648.
- 7) Robelek, R. *et al.* (2007) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **46**, 605-608.
- 8) Cappuccio, J. A. *et al.* (2008) Mol. Cell Proteomics **7**, 2246-2253.
- 9) 下野和実ら (2010) 実験医学 **28**, 1775-1780.
- 10) 下野和実ら (2010) BIO INDUSTRY **27**, 55-63.

下野和実

下野和実（しもの かずみ）

松山大学薬学部助教
2002年日本学術振興会特別研究員（北海道大学）。05年理化学研究所研究員。08年から現職。
研究内容：膜輸送担体の物理化学
連絡先：〒790-8578 愛媛県松山市文京町4番地2
E-mail: kshimono@cc.matsuyama-u.ac.jp

白水美香子（しろうず みかこ）

理化学研究所生命分子システム基盤研究領域上級研究員

横山茂之（よこやま しげゆき）

理化学研究所生命分子システム基盤研究領域領域長。東京大学大学院理学系研究科教授