

研究報告書

「高次構造制御による膜タンパク質機能発現リボソームの構築」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：野村 慎一郎

1. 研究のねらい

膜タンパク質は、脂質膜に組み込まれた状態で機能を発現する分子であり、膜によって自他を分けるすべての生物に本質的に重要である。創薬のターゲットとして、また高機能性バイオ界面のデバイス材料として有用性が期待できる。本研究では、遺伝情報に基づき合成された膜タンパク質が機能を発現するための「場」としての人工細胞膜モデルの構築を目的とする(図 1.)。脂質膜の高次構造の制御に基づく膜タンパク質の局在・機能化についての知見を得、機能化細胞モデルの構築手法を確立する。

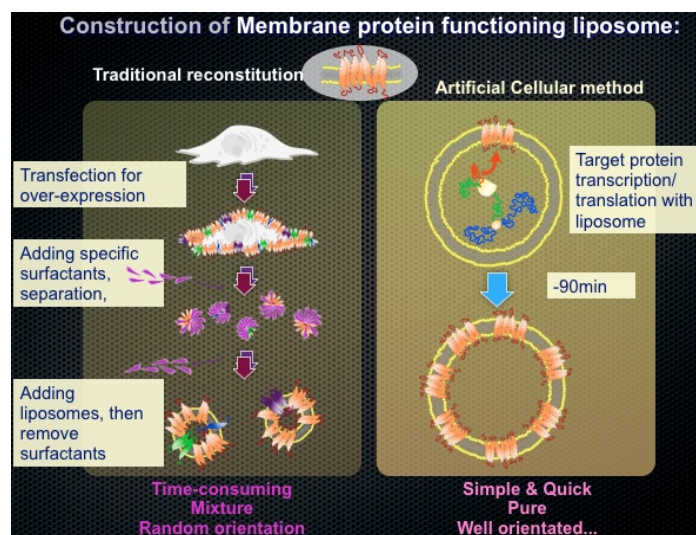


図 1. 一般的な膜タンパク質導入リポソーム調製法(左図)と対比させた本研究の概念図(右)

2. 研究成果

i) 新規な膜タンパク質合成リボソームの調製と機能評価

・コネキシン(Cx)は,細胞同士が細胞質間の小分子を交換するチャンネルを形成する膜タンパク質である.我々は,細胞サイズリボソーム環境での Cx 無細胞合成により,リボソームと培養細胞との間に上記チャンネルが形成され,小分子の薬剤(遺伝子発現抑制)を直接,細胞内に届ける事が可能となった[1] (図 2).さらに,直径 100-300nm の小型リボソームに対して外部から Connexin を無細胞合成した場合に,膜に挿入されたタンパク質の配向が均一に配向することを,消化法を用いて証明し,報告した[2].

・光応答性プロトンポンプである膜タンパク質・バクテリオロドプシン(bR)を無細胞合成し,その場でリボソーム膜に組み込むことに成功した.その際,遺伝暗号を拡張する 4 塩基コドン法を用いて,膜タンパク質の特定アミノ酸部位に蛍光ラベルを付与し,蛍光顕微鏡および FCS を用いることで,リボソームへの bR の組み込みを確認した[3].本手法は,特定の膜タンパク質内の局所部位をターゲットとした改変による機能化の手法として有効であることが示された.

・天然に存在する多種多様な生物種から有用なタンパク質を求める手法として,細胞への毒性の有無にかかわらず合成・抽出を可能とする無細胞合成への期待は大きい.そこで,膜タンパク質の直接機能化手法である本研究のアイデアを,様々な種に対応させるタンパク質機能化モデルの構築は重要かつ必須な技術的課題である.その一例として,生育温度の高い高度好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* の無細胞抽出液より調製したタンパク質合成溶液を調製し,リボソーム環境での無細胞タンパク質合成と機能化の試験を行った.25℃では進行しないタンパク質合成反応が 45℃で進行するという新奇な人工細胞モデルの構築に成功し,報告した [4].

ii) 細胞サイズリボソーム構築手法と評価系の検討

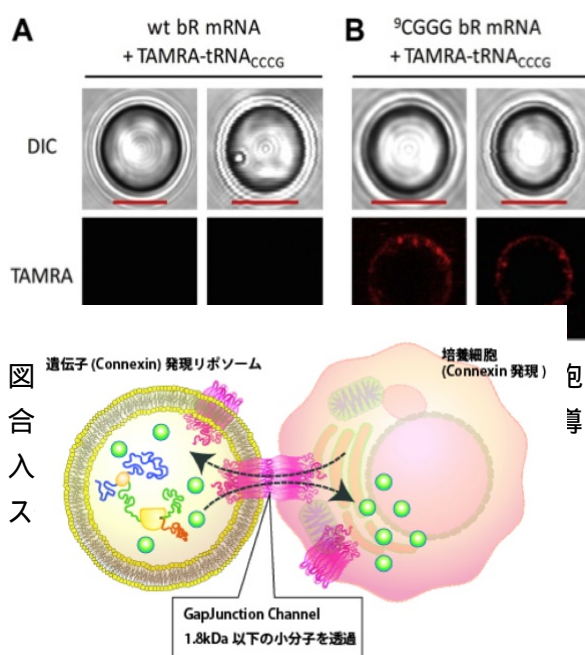


図 2. 膜タンパク質コネキシンの無細胞合成 & 直接挿入によるリボソーム膜上への導入とそれを用いた細胞との直接物質送達系の概念図.

・タンパク質の無細胞合成反応をリポソーム環境で行う細胞モデルは、しかし実際の細胞や菌体と異なり非常に壊れ(割れ)やすく、細胞用に市販されている各種のツールを流用することが殆どできない。また、リポソームおよびタンパク質の定量に頻繁に用いられる蛍光ラベルを用いた計測法は、小サイズのリポソームや蛍光分子のノイズの効果が大きいいため除去する必要がある。そのため、リポソーム分離・精製用のマイクロ流体デバイスの開発を行った。分離・精製効率を評価し、直径 3 μ m 以上の巨大リポソームを流路内に捕捉し、非破壊的な還流による染色操作が可能であることを示した[5]。

Analyzing device: microfluidics

Selection and collection device for giant liposomes

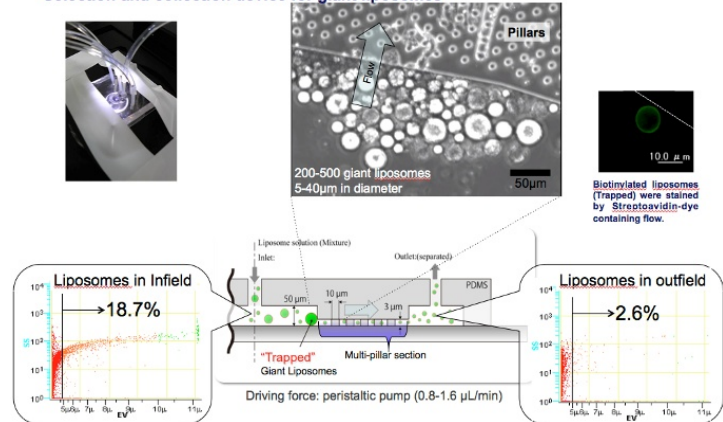
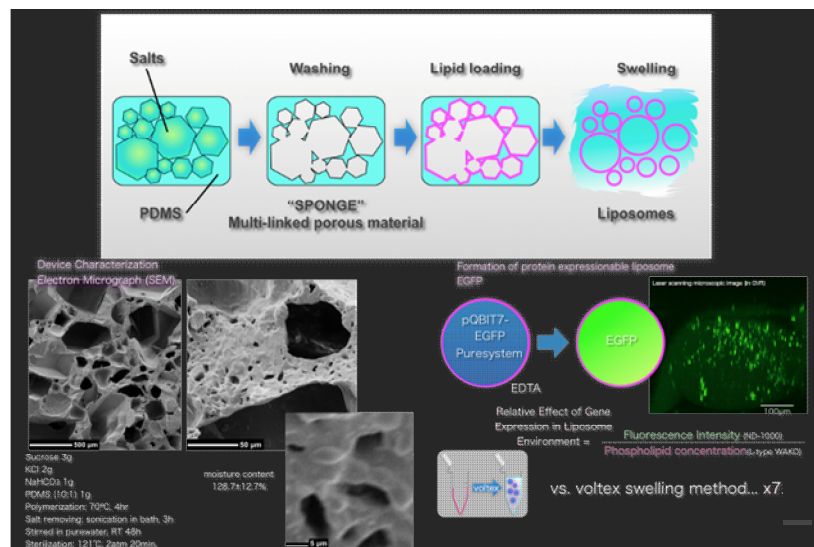


図 3. 細胞サイズリポソーム分離精製用マイクロ流体デバイス

・無細胞タンパク質合成には高濃度の塩・高分子電解質溶液が必須であり、リポソーム形成に不利な条件が揃っている。この溶液を高効率にリポソーム内に導入することを可能とする手法(スポンジ法)を新規に開発した。従来平面上で行われてきたリポソーム調製を 3 次元の連結性多孔質表面で行



う手法(右図)で、GFP 発現リポソームを従来法に比べ 7 倍の効率で得ることに成功した。前出の膜タンパク質 Cx の発現・提示においても 1.3 倍の効率上昇が得られた。その際、脂質組成により合成量と局在効率が異なる事、また脂質のアルキル鎖長と膜挿入効率との間に特徴的な相関があることを示した(論文作成中)。本法は特許申請[P1]を行っている。

以上のように、本研究により得られた細胞モデルの構築手法は、種々の細胞内要素を加算的に構築し要素間の相互作用を研究可能にし、薬剤スクリーニングに利用可能な受容体アレイや新規 DDS の構築を通じ生物学・医工学の分野へ貢献すると期待される。

3, 今後の展開

細胞は溶液内で生きる都合, 分子の拡散による輸送を利用する. その輸送は正確だが遅い. 例えば神経細胞は複数の膜電位依存性チャネルを用いた興奮波を併用し, 素早い通信を実現し, モータータンパク質は既設のレールを用いて, パケット的な通信を行う. いずれにせよ, 細胞同士がコミュニケーションを行うためには, 近隣の空間に居る必要がある. その距離を拡張することは将来的には可能であろう. こうしたいわば「分子通信」の概念は, 生体間をつなぐ次世代の通信プロトコルとして提唱され研究が進んでいる. その核心技術である生体との非侵襲通信デバイスとして, 膜タンパク質の利用は本質的に重要である.

近年, 無細胞合成系を用いて膜タンパク質の機能化の研究が加速しつつある[6]. かつて筆者の所属したグループにおいても, 接着性タンパク質の提示・機能化, また感覚を司る受容体の無細胞合成と組み込みが大きく進歩している. 欲しい配列のタンパク質のみが合成されるという点から, 複雑な相互作用を理解するためのモデルとして人工細胞系が利用されると期待できる. 特に, Puresystem に代表される再構成無細胞タンパク質合成系を用いることで, 未知の要素がなく, 目的のタンパク質を得られるため, 開拓的な研究に向いている. 目的分子が非修飾状態で得られるため, 修飾機構を知る目的でも利用されることと期待される.

一方で, 超えるべきハードルもまた明らかになった. たとえば直接接触による情報変換として有名な Notch-delta 系等は, 糖鎖が重大に関与するため, 糖鎖の簡便かつ自在な合成が出来るようになるまでしばらくは困難だろう. 無細胞系で利用可能性を検討した後は, 細胞に強発現させ抽出したタンパク質を用いることで, リボソーム膜に組み込むことが大量生産できて有効であろう. 細胞から生化学的手法で抽出した受容体をそのままリボソームに移植する, という伝統的な再構成実験は王道である. 既知材料から「本当に動く」システムをつくる手がかりに, また無細胞系の Positive Control としても有効である.

担体であるリボソームを高効率に得る手法は, 本研究を含め, この 10 年で急速に進歩した. w/o エマルジョンを用いる手法やその MEMS での応用など, ユニラメラの巨大リボソーム作成手法は様々提案されている. 膜タンパク質のユニラメラ GV への移植には, 膜融合ペプチドを用いる系が現時点では, もっとも効率が高いようである. Kahya らは WAE と呼ばれる配列を用い, 三重大学の吉村・湊元らはバキュロウィルスのエンベロープをリボソームに融合させる系を構築している. コネキシンも最近, この手法を用いて再構成され, 機能化が報告されている. さらに GPCR の関連3種の膜タンパク質を同一リボソーム膜に導入し, 協調動作させる試みも行われている. 膜タンパク質の連携動作は, 今後の極めて重要なテーマとなりうる. 神経細胞軸索のような, イオンチャネルを用いた同一膜内での側方伝搬コミュニケーションは, 無細胞合成では配向性の制御が不明な上, たとえば Na チャネルは極めて大きく (Nav1.6, 分子量 225kDa, 24 回膜貫通), 合成量が期待できない問題と, 不応期から膜電位を戻すためのイオンポンプをカップリングさせる必要, などの点で困難が大きい. MEMS 技術等を用いて, 内外にアクセス可能なチューブ状リボソームを構築し, 膜融合手法をチューブ内外から独立に行うことができれば, 困難はかなり解決されるものと考えられる.

ES/iPS 細胞の研究の進展により, 直接, 生細胞の代理として人工細胞モデル・リボソームを用いるという時代は終わったが, 理学・薬学・応用医工学などの各現場で用いられる基礎ツールとして, 人工細胞モデルが果たす役割はより重要になってきており, 野村はより汎用性の高

いモデルと、特定機能に特化したモデルの構築を行ってゆく。

4、自己評価

当初、脂質膜の高次構造変化に着目する予定であったが、リポソーム同士がチューブ構造で連結されたマルチリンク構造が無細胞タンパク質発現系環境ではきわめて不安定であったことで、次元制御による定量化に見切りをつけた。その見切りが遅くなった点は反省材料である。その後、無細胞発現を行う場としての球状のリポソームを得る手法の開発および定量化に当面の軸足をおいたために、多様な膜タンパク質への挑戦を縮小せざるを得なかったことは残念である。プロジェクトのポストドクを務めつつさがけの研究を進めるという立場で奇妙な経験も数多くあったが、さがけの年2回の領域会議における原理的で率直なディスカッションと、手厚い人的・金銭的支援を生かすことで、膜タンパク質発現・機能化リポソーム調製と評価に関する新規な手法を生み出し、今後の人工細胞モデルの新たな局面を迎える地ならしができたと自負している。

5、研究総括の見解

細胞内小器官を含め、細胞内の構成要素をリポソーム中に再構築し、人工細胞の創製を目指すという点で生命進化の道筋を探る方法論を提供しうる興味深い研究成果である。一方において、研究者本人も指摘しているとおり、細胞自身の解析的研究が近年、飛躍的に進みつつあり、生物物理的研究の目指す方向性について、生命のモデル化も含め、新しい切り口を提案する努力を続けて行って欲しい。

6、主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. M. Kaneda et al., "Direct formation of proteo-liposomes by *in vitro* synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes", *Biomaterials*, 30, (2009), 3971-3977.
2. Y. Moritani et al., "Direct integration of cell-free synthesized connexin-43 into liposomes utilizing chaperone-like function of liposomes", *FEBS Journal*, 277, (2010), 3343-3352.
3. T. Ohtsuka et al., "Synthesis and in situ insertion of a site-specific fluorescently labeled membrane protein into cell-sized liposomes", *Analytical Biochemistry*, 418, (2011), 97-101.
4. K. Yamaji et al., "Protein Synthesis in Giant Liposomes Using the In Vitro Translation System of *Thermococcus kodakaraensis*", *IEEE trans. Nanobiosci.*, 8, (2009), 325-331.
5. S.-i. M. NOMURA et al., "Giant liposome sorting/collection device: for individual analysis of artificial cell-models", *Int. Symp. Micro-Nanomechatronics & Human Science*, (2009), 620-622.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 野村 慎一郎

発明の名称: リボソームの製造方法

出 願 人: 科学技術振興機構, 京都大学

出 願 日: 2010/5/10

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

1. “Making a cell model: membrane protein expression/functioning on giant liposome”, S.-i. M. Nomura, Synthetic biology: from the present into the future, 京都, Mar., 2010.
2. “膜タンパク質の直接無細胞合成による細胞モデルの多機能化”, 野村 M. 慎一郎「細胞を創る」研究会 2.0, 東京, Oct. 2009.

著作物

1. “人工細胞モデルとコミュニケーション能” 野村 M. 慎一郎, 細胞を創る・生命システムを創る, 実験医学増刊 Vol.29 No.7, 2011, 竹内昌治, 上田泰己・編, 41-47.
2. “Construction of an In Vitro Model of a Living Cellular System” K. Yoshikawa, S.M. Nomura, K. Tsumoto, K. Takiguchi, The Minimal Cell, Edited by P.L. Luisi, 2011, Part 3, 173-193.
3. “細胞計算による Drug Delivery System” 自己組織化ハンドブック 第3編 システム・デバイス編第4節システム, 野村 M. 慎一郎 (分担執筆)(2009), 854-855, NTS, 総ページ数 940p.