

膜蛋白質のための *in vitro* スクリーニング法の開発

曾我 遥¹⁾・藤井 聡志³⁾・四方 哲也^{2,3)}・渡邊 肇¹⁾・松浦 友亮^{1,3)}

¹⁾阪大院・工・生命先端, ²⁾阪大院・情報・バイオ情報, ³⁾ERATO, JST

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2 番地 1 号 C2 棟

E-mail: matsuura_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Home Page: <http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ez/index.html>

進化分子工学的手法とは、変異と選択のステップを繰り返し行うことで、実験室内で蛋白質の性質を改変・改良する手法である。細胞を全く使わない *in vitro* 進化分子工学的手法は *in vivo* 法に比べて、細胞培養が必要ないため迅速にスクリーニングができる、細胞毒性のある蛋白質も扱うことが出来る、よりサイズの大きいライブラリーを取り扱えるといった利点があり、これまでに酵素活性の向上や抗原への結合能を向上させた抗体の取得などに貢献してきた。しかし、従来の *in vitro* 進化法はすべて可溶性蛋白質を対象としたものであり、不溶性の膜蛋白質については扱われてこなかった。そこで、我々は膜蛋白質を対象とした *in vitro* 進化工学的手法の開発に着手した。

1.はじめに

進化分子工学的手法は、変異と選択のステップを繰り返し行うことで、実験室内で生体高分子の性質を改変・改良させる方法である。この手法は、生細胞を用いる *in vivo* 法と生細胞を全く用いない *in vitro* 法に大別される。*in vitro* 法は、細胞を用いる *in vivo* 法に比べて、細胞培養が必要ないため迅速にスクリーニングができる、細胞毒性のある蛋白質も扱うことが出来る、よりサイズの大きいライブラリーを取り扱えるといった利点があり、これまでに酵素活性や抗体の抗原への結合能の向上などの例が報告されている[1]。しかし、*in vitro* 法は可溶性蛋白質を対象としているため、不溶性の膜蛋白質は扱われてこなかった。

細胞がコードする遺伝子の 20-30%、製剤のターゲット分子の 50%以上は膜蛋白質であるとも言われている。しかしながら、少数の例を除いて、適当な手法が存在しないために膜蛋白質は、進化分子工学の標的蛋白質として扱われてこなかった。膜蛋白質を対象とした *in vitro* 進化分子工学的手法が開発されれば、創薬、膜蛋白質の産業利用、さらには膜蛋白質研究に大きく寄与する。そこで、我々は、膜蛋白質進化分子工学を可能とする方法を開発することを目指し、研究を進めている。

2. 研究内容

膜蛋白質は、生理学的にも産業利用という観点からも研究価値が高い。しかし、細胞内での発現量が少ない、疎水領域が多いためにバッファー中で凝集体を形

成しやすい、大量発現によって細胞毒性を示すことがある、膜組成の違いによって異種発現蛋白質が機能しないなど、試料調製を困難にする性質も有している。

このような性質を有する膜蛋白質を蛋白質進化分子工学のプラットフォームに載せるためには、新たな技術が必要である。我々は、人工脂質二重膜リボソーム内部に、再構成系無細胞蛋白質合成システムと共に、膜蛋白質をコードしている遺伝子を一遺伝子レベルで封入し、膜蛋白質を合成することによって試料調製上の問題点に対処することで、膜蛋白質を対象とした *in vitro* 進化分子工学的が可能になると考えた[2-3]。図 1 に本手法の概略を記す（特願 2012-145795 も参照[4]）。

3. 結果と考察

我々は、大腸菌由来多剤排出トランスポーター EmrE をモデル蛋白質として *in vitro* 進化工学的手法の構築を試みている。EmrE は、アンチパラレル構造をとるホモダイマーとして機能し、プロトン輸送と共役して、Ethidium bromide などの細胞毒性のある化合物を細胞外へ排出する。本手法を構築するにあたり必要な要素技術は、(A)リボソーム内部で合成された EmrE が膜に局在し、かつトランスポーター活性を保持していること、(B)リボソーム膜に提示されている EmrE の性質（種類）によって、リボソームを選別できることである。ここでは、これら 2 つの要素技術に関する結果を紹介する。

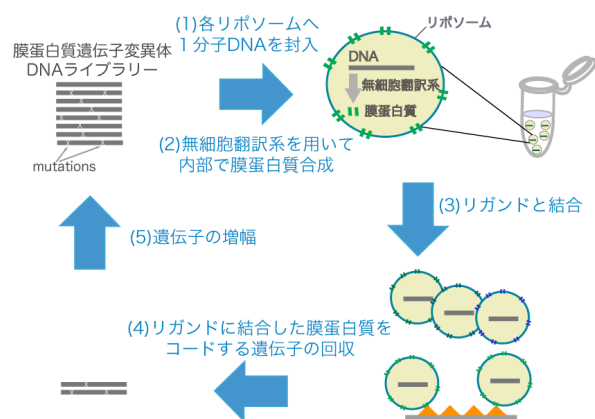


図 1：本方法の概略図。この図に示した一連の操作によって、特定のリガンドに強く結合する膜タンパク質を取得（スクリーニング）できる。(1)膜タンパク質変異体 DNA ライブラリを各リボソームに約 1 分子 DNA ずつ無細胞翻訳系と共に封入する。(2)内部で膜タンパク質を合成し、これを膜上に局在させる。(3)リボソームは膜上にディスプレイされた膜タンパク質を介して、固相上のリガンドと結合する。(4)結合しないリボソームを洗浄操作により取り除いた後に、結合したリボソームを回収すると、リガンドに結合する膜タンパク質をコードした遺伝子が得られる。(5)回収した遺伝子を増幅し、再び最初の遺伝子封入ステップに戻り、操作を繰り返す。

(A) 多剤排出トランスポーター EmrE のリボソーム内合成と機能発現：EmrE がリボソーム内で無細胞翻訳系を用いて発現可能であり、かつトランスポーター活性を有することを確認した。具体的には、EmrE の C 末端に myc-tag を付加した配列をリボソーム内部で発現させ、蛍光標識 α -myc 抗体でラベルしたところ、リボソーム上に明らかな蛍光物質の集積を確認した（図 2 右）。これは、EmrE が膜上に正しく局在していることを示唆している。次に、EmrE のトランスポーター活性を確認するため、リボソーム外部の溶液を pH の高い溶液に交換すると同時に外部に EtBr を加えた。その結果、リボソーム内部に EtBr が取り込まれ内部の蛍光強度が上昇した（図 2 左）。これは、EmrE が EtBr を輸送するトランスポーター活性を有していることを示唆している。図 2 では、顕微鏡写真を示している。

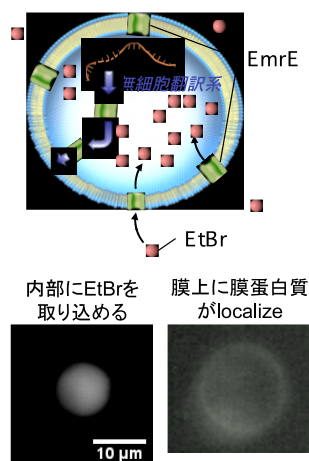


図 2：無細胞翻訳系（PURE system）を用いたリボソーム内 EmrE 合成反応。顕微鏡写真から EmrE は膜に局在し、機能していることがわかる。膜への局在は、蛍光標識 α -myc 抗体を用いて、生体毒性物質の取り込みはリボソーム外部に EtBr を加えることにより可視化した。

(B) 提示膜蛋白質によるリボソームの選別：目的とする膜蛋白質を呈示しているリボソームを選択的に回収できるかを検討するために、Myc タグを付加した EmrE、FLAG タグを付加した EmrE をそれぞれ内部で合成したリボソームの混合液を作成した。次に、抗 myc 抗体と結合するリボソームを選択し、選択操作前後の myc と FLAG タグ付加 EmrE の遺伝子の比率を定量 PCR により算出した。図 3 に、選別前後で混合液中に含まれる myc タグ付加 EmrE 遺伝子と FLAG タグ付加 EmrE 遺伝子の比を示す。最初ほぼ 1 : 1 で混合されたものが、選択後は約 10 倍 myc タグを付加した EmrE が濃縮されてきた。この結果は、リボソームの表面に呈示されている膜蛋白質の性質に依存したスクリーニングが可能であることを示している。

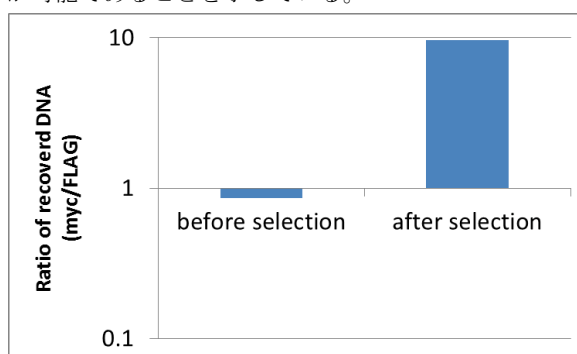


図 3：遺伝子濃縮実験の結果。

4. 今後の展望

本研究は、膜タンパク質進化分子工学を可能とする手法、Liposome display 法を開発する。本稿では、膜蛋白質のリガンドへの結合能に基づいたスクリーニング技術を紹介したが、セルソーターを用いたスクリーニング技術も既に開発済みであり、これら技術を併用することで、様々な膜蛋白質の変異体の取得が可能になることが期待される。進化分子工学を用いたタンパク質の機能改変のため、1990 年代から様々なディスプレイ技術（phage display, mRNA display, ribosome display, cell surface display）が開発されてきた。そのうち日本発ものは一つもない。本技術、liposome display を日本発のディスプレイ技術として発展させ、創薬、膜タンパク質の産業利用に展開できると確信している。

参考文献

- [1] Matsuura, T. et al. *J Biosci Bioeng* **101**, 449-56 (2006).
- [2] Nishimura, K. et al. *Langmuir* **28**, 8426-32 (2012).
- [3] Nishikawa, T., et al. *Anal Chem* **84**, 5017-24 (2012).
- [4] インビトロ膜タンパク質進化分子工学的手法、特願 2012-145795