

論文の内容の要旨

論文題目

必須因子からなるセルフリーの 膜・分泌タンパク質合成システムの構築

Development of a minimal cell-free translation system for the synthesis of
presecretory and integral membrane proteins

メディカルゲノム専攻 分子医科学分野

氏名 車 愈澈

序論

ヒトゲノム解析が終了しポストゲノム時代に突入した今、様々な分野においてタンパク質の精緻な研究が進められている。このような背景の中、セルフリー翻訳系はタンパク質の生化学的な解析を行う上で、単に生細胞をもちいずにタンパク質を合成するための手段としてだけでなく、翻訳反応の素過程を解析するためや、翻訳後のタンパク質の分子機構を解析するための有効な手段として現在までに多く利用されてきている。これまでのセルフリー翻訳系は一般に、大腸菌や出芽酵母などの細胞を破碎して得られる細胞抽出液に、基質となるアミノ酸やエネルギー源を添加し、*in vitro* でタンパク質合成をおこなう手法である。生細胞を用いたタンパク質発現系と比べ、これらセルフリーシステムは生体維持に支障を及ぼすタンパク質を発現する事が出来る点、鋳型となる DNA や RNA を加えるだけでタンパク質が容易に得られる点において優位である。しかしながら、セルフリー翻訳系をもちいたタンパク質の解析においても、膜タンパク質はその扱いくさから、細胞質タンパク質と比べて研究が遅れているのが現状である。このような背景から、私は膜タ

タンパク質の合成から局在化までを連続して行う事の出来る、セルフリー系の開発に努めてきた。大腸菌をモデルとし、post-translational におこるといわれる Sec 因子依存的なタンパク質の膜透過と、co-translational におこる SRP 因子依存的なタンパク質の膜挿入を、最小単位の細胞質因子のみで再構築した。また、細胞内を再現する意図をふまえ、両因子を一試験管内に共存させ、タンパク質の膜透過、膜挿入を同時に行いそれぞれの基質タンパク質の局在化も観察した。

構築したセルフリー系の概要

試験管内で、タンパク質の合成から、膜透過/膜挿入までが連続して行われる系の構築を行った。系の基礎となるセルフリータンパク質合成系は、転写翻訳に必要な因子を全て精製し、tRNA やアミノ酸を含む緩衝液中に再構成した試験管内タンパク質合成系 PURESYSYSTEM を用いた。この PURESYSYSTEM に大腸菌から調製した反転膜小胞 (INVs) と、翻

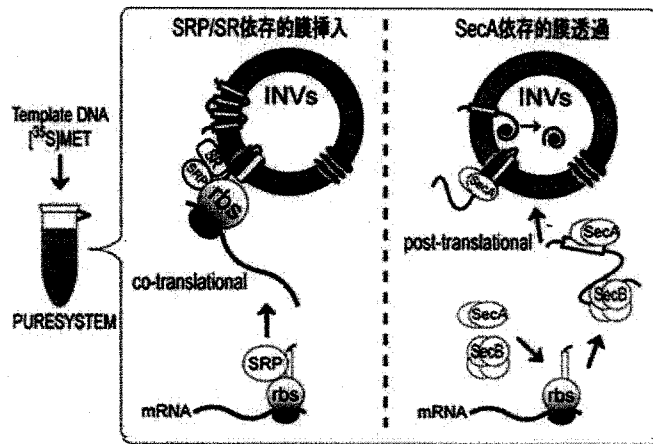


図1. 系内の概要図

訳終了後のタンパク質が膜までターゲティングされるために必要となる SecA/SecB、または SRP/SRP を統合し、膜タンパク質の合成をおこなった。タンパク質の細胞質膜への局在化には主に二つの経路がある。合成を終りリボソームから解離したタンパク質が、SecA 依存的に細胞質内膜を透過する SecA 依存型と、合成途中から SRP (signal recognition particle; Fih+4.5S RNA) と SR (SRP receptor; FtsY) を介して膜までターゲティングされ、膜挿入が起こる SRP/SRP 依存型である。一般的に SecA 依存型は翻訳と共役しない post-translational に、SRP/SRP 依存型は翻訳と共役した co-translational に進行すると考えられている。本研究では、SecA/SecB によるタンパク質膜透過と、SRP/SRP によるタンパク質膜挿入の両方の系の構築を行った (図 1)。また、両者を一試験管内にカップルさせた系の構築も行った。モデル膜タンパク質として、SecA 因子依存的膜透過タンパク質に pOmpA を、SRP/SRP 因子依存的膜挿入タンパク質に MtlA を、また SecA、SRP/SRP 両因子依存的に膜挿入するタンパク質のモデルとして FtsQ を用いた。

膜タンパク質の試験管内合成と可溶化率

まず始めに、PURESYSYSTEM を用いて、基質の膜タンパク質が系内で正常に合成されるかを確認した。全ての基質膜タンパク質 (pOmpA, MtlA, FtsQ) は鋳型 DNA プラスミドを投入することで合成を開始した。また転写翻訳反応終了後、合成されたタンパク質の可溶化率を観察した。その結果、細胞質局在タンパ

ク質の DHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) が 90%以上の可溶性を示したのに対し、3種の基質膜タンパク質は 30-50%と低い可溶化率を示した。

シャペロン添加による分泌タンパク質の可溶化

SecA 因子依存的な膜透過タンパク質として知られる pOmpA はリボソームによる翻訳後、N 末端に存在する疎水領域の相互作用によって膜透過する前に凝集し不溶化してしまう。この不溶化を防ぐため

に、シャペロンの補助によって細胞質内で可溶性を維持する必要がある。そこで、SecB、Trigger Factor (TF)、DnaKJ/GpE を PURESYSTEM に加え、合成された pOmpA の可溶化率の変化を観察した。その結果、SecB 存在化において、pOmpA の可溶度が 47%から 92%に上昇した (図 2)。DnaKJ/GpE に関しては SecB ほど顕著ではないが、可溶化を促進する結果が観察された。それに対し、TF は合成産物の可溶化を促進する結果は観察されなかった。

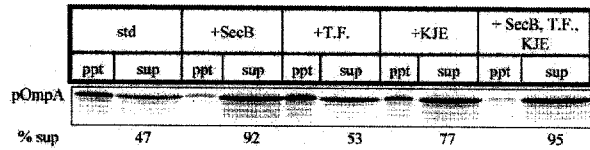


図2. 各種シャペロン存在下における pOmpA の可溶化率の変化

SecA 因子依存的なタンパク質の膜透過

SecB シャペロンの投入により十分な可溶化維持が確認できた pOmpA を、SecA、SecB、反転膜小包 (INVs) 存在下の PURESYSTEM で合成し膜透過を観察した。pOmpA の膜透過の評価については、反応後 INVs 内に膜透過されなかったタンパク質を ProteinaseK (PK) で分解し、膜により分解を免れたタンパク質を SDS-PAGE で解析することで膜透過の評価とした。その結果、INVs 非存在下の系では、PK 処理後、合成産物が全て分解されているのに対し、INVs 存在下の系では PK 処理後、N 末端のシグナル配列が切断された、成熟体型の OmpA が観察された。また、SecA の依存性を検証するため、INVs を尿素洗浄し粗純化した U-INVs を用いて、pOmpA 膜透過における SecA、SecB、TF、DnaKJ/GpE の寄与を観察した。その結果、pOmpA は、SecA、SecB に強く依存して膜透過した。その他の因子 (TF、DnaKJ/GpE) に関しては、SecB の効果には劣るものの、若干の膜透過の促進が観察された。

SRPSR 因子依存的なタンパク質の膜挿入

6 回膜貫通領域を持つ膜内在性タンパク質 MtlA を基質膜タンパク質として、Ffh、FtsY、INVs 存在下の PURESYSTEM でタンパク質の合成と共役した膜挿入を行った。45SRNA に関しては PURESYSTEM の組成因子内に十分な持ち込みがあるため新たに加えなかった。膜透過の実験同様、反応終了後 PK 処理により膜に保護されて分解を免れたペプチド鎖 (MtlA-MPF; membrane protection fragment) を SDS-PAGE のパターンから解析し MtlA の膜透過を観察した。その結果、膜挿入に十分な量の Ffh、FtsY を含む INVs (Urea 未処理) 存在下の

系で、効率のよい膜挿入が観察された。また U-INV を存在下の系について、Ffh、FtsY 依存的な MtlA の膜挿入が観察された。

タンパク質膜透過、膜挿入反応が共存した系

上記のように、SecA または SRP/SR 依存的なタンパク質の膜透過・膜挿入反応の再構成に成功した。次に、この膜透過・膜挿入反応を一試験管内に共存させることを試みた。PURESYSTEM 内に Ffh、FtsY、SecA、SecB、INVs または U-INV を投入し、pOmpA、MtlA 両基質膜タンパク質を合成させることによって、今までの個別の系よりもより細胞に近い条件で観察できる系を目指した。

その結果、図3に表したように pOmpA は SecA、SecB 存在下でのみ、MtlA は Ffh、FtsY 存在下でのみ、互いの膜局在化に干渉することなく U-INV への膜透過・膜挿入が観察された。また、新生タンパク質の両経路へのソーティングに関与するとの報告がある TF を、系内に投入し、pOmpA、MtlA 両者の膜局在化への影響を検討した。その結果、pOmpA、MtlA 両タンパク質は TF の存在・非存在に関わらず、正しく膜透過、膜挿入されることが明らかとなった。

結論

上述のように我々は、最小単位の細胞質因子のみを用いて、タンパク質の合成から膜透過、膜挿入を行えるセルフリー系の構築に成功した。これにより、タンパク質の膜透過は SecA のみが必須であること、タンパク質の膜挿入は SRP と SR のみが必須であることが証明された。また、両経路を共存させた系においても、良好な膜透過・膜挿入が行われた。これは早急な解析が望まれる膜タンパク質の機能解析を行ううえで、非常に有効な方法であることを表すものである。本セルフリータンパク質合成系の具体的な発展内容として、細胞由来の INVs を、リン脂質と SecYEG (膜タンパク質が分泌・挿入するためのゲートとなるチャネル) から再構成した、プロテオリポソームに置換する事で、完全に純化されたセルフリー系が構築されると期待できる。これにより、試験管内で容易に膜タンパク質が合成できるのみならず、脂質二重膜内でおこなわれる膜タンパク質の分子メカニズムを解析するうえでも大いに貢献できるものと期待される。

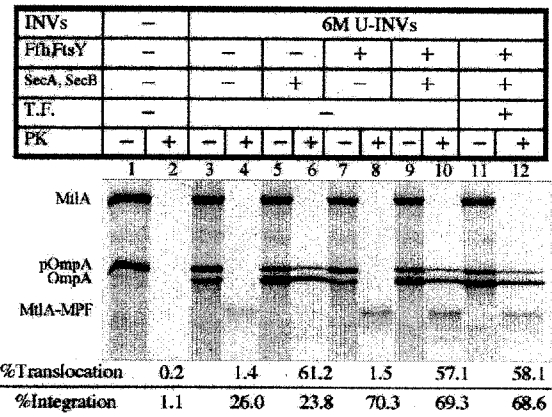


図3. SecA 依存的な膜透過と、SRP/SR 依存的な膜挿入