Osaka University Knowledge Archive

Title	膜タンパク質機能改変技術のための基盤技術の開発に関する研究
Author(s)	曽我, 遥
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61772
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

博士学位論文

膜タンパク質機能改変技術のための基盤技術の開発に関する研究

曽我　遥

2017 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

略称

ATP	Adenosine Tri Phosphate
CTP	Cytidine Tri Phosphate
CP	Phosphocreatine
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
D.W.	Distilled water
FD	N^5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutamic acid
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine Tri Phosphate
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
K-Glu	Monopotassium L-Glutamate
NTP	Nucleotide Tri Phosphate
PCR	Polymerase chain reaction
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
tRNA	transfer ribonucleic acid
UTP	Uridine Tri Phosphate
RNA	Ribonucleic acid
W/O	Water in Oil

要旨

進化分子工学とは、遺伝子の変異とコードされたタンパク質の機能による選択のステップを繰り返し行うことで、実験室内でタンパク質を改変・改良する技術である。創薬・化学等の産業分野で用いられる可溶性タンパク質（酵素・抗体など）の多くは、用途に合わせて性質を改良された変異体が用いられている。高い有機溶媒耐性、高い光学選択性などを有するこれらの変異体の創出には、進化分子工学が大いに貢献してきた。

膜タンパク質とは、細胞膜に存在するタンパク質で、細胞内外の物質輸送やシグナル伝達、エネルギー生産など、生命を維持するために重要な役割を果たしており、生物のゲノムの約 3 割が膜タンパク質をコードしている。また、創薬のターゲットの約 5 割が膜タンパク質をターゲットとしていると言われており、産業の面でも注目されている。

しかしながら、膜タンパク質は、一般的に、疎水性が高いために、凝集体を形成しやすいことや、細胞中での発現量が低いことなどから、細胞を用いて調製することが困難であるという性質を持つ。そのため、少数の例は近年報告されているものの、進化分子工学のターゲットとして扱われてこなかった。

そこで本研究では、膜タンパク質を扱う進化分子工学的手法の開発を目的とし、その基盤技術の開発を行った。

第 1 章　序論

第 1 章では、まず進化分子工学の概略とその発展の歴史について述べた。次に、膜

タンパク質と本研究においてモデルタンパク質が属するトランスポーターについての概略を述べた後に、本研究で用いた多剤排出トランスポーターEmrE についての概略を記述した。最後に本研究の目的を記述した。

第 2 章　GUV 内部膜タンパク質合成

細胞を用いて膜タンパク質を調製することは困難が伴う。無細胞翻訳系が膜タンパク質調製の有効なツールとして用いられてきた。無細胞翻訳系を用いた膜タンパク質の調製では、反応系に界面活性剤を添加する事で可溶化したり、様々な形で脂質二重膜を供する事で膜タンパク質を安定化する方法が採られる。本研究では、後に進化分子工学に応用するために、細胞サイズのリン脂質二重膜(リポソーム、Giant Unilamellar Vesicle; GUV)内部で合成を行った。リポソーム内部合成を用いた膜タンパク質合成は、これまで骨格タンパク質やポア形成タンパク質の例が報告されているが、膜タンパク質の主要なクラスを占めるトランスポーターについては行われていなかった。そこで本研究では、多剤排出トランスポーターEmrE の GUV 内部合成を行った。その結果、GUV 内部で合成された EmrE は輸送機能を保った状態で、GUV 膜に挿入されていることが明らかとなった。また、GUV 膜に挿入された EmrE を定量することによって、ベシクル体積と膜挿入効率の関係を見出した。さらに、EmrE の GUV 膜への自発的膜挿入を説明しうる数理モデルを構築した。

第 3 章　トランスポーターに対する Liposome display 法の適用

Liposome display は、GUV 内部で合成された変異体膜タンパク質ライブラリーを、膜タンパク質を介して GUV 内部に取り込まれた蛍光基質の蛍光強度を指標に、セル

ソーター(FACS)を用いて高機能型の変異体をセレクションする手法である。

Liposome display 法によるタンパク質の機能改変の例は、現在、水溶性の特殊な膜タンパク質に限られている。第 3 章では、既存技術である Liposome display 法を、一般的な疎水性の膜タンパク質である EmrE に応用するための実験条件を確立した。

第 4 章　バイオパニングを用いた Liposome display 法の開発

バイオパニングを用いた Liposome display 法では、基質とのアフィニティを利用して、膜タンパク質を呈示している GUV のセレクションを行う。第 3 章でのべた FACS による Liposome display 法では、蛍光基質を持つ膜タンパク質の機能改変に限られるが、バイオパニングを用いることで蛍光基質を持たない膜タンパク質の機能改変を行うことが可能となる。また第 4 章で述べる手法では、バイオパニングに磁性ビーズを用いているため、基本的な実験操作が確立されれば、市販のキットですべての実験操作を終えることができる利点がある。第 4 章では、磁性ビーズを用いて異なる種類の膜タンパク質呈示するリポソームの混合液から、目的の膜タンパク質を呈示するリポソームをセレクションするための実験操作や実験条件を確立した。

第 5 章　総括

本研究では、膜タンパク質をターゲットとする進化分子工学的手法の開発を目的として、その基盤技術を確立した。無細胞翻訳系による膜タンパク質の調製方法は、非常に拡張性が高い。よって今後、大腸菌由来の膜タンパク質に止まらず、哺乳類由来の膜タンパク質等、広範な膜タンパク質の機能改変への応用が期待される。

本学位論文に関与する論文

Soga H., Fujii S., Yomo T., Kato Y., Watanabe H., Matsuura T., *in vitro* membrane protein synthesis inside cell-sized vesicles reveals the dependence of membrane protein integration on vesicle volume., *ACS Synth Biol.*, **3**, 372–379 (2014).

目次

1 章　序論 8

1-1　進化分子工学的手法

1-2　膜タンパク質を対象とする進化分子工学

1-3　本研究の目的

2 章　GUV 内部膜タンパク質合成 19

2-1　材料と方法

2-2　結果

2-2-1　GUV 内部における EmrE の合成

2-2-2　EmrE を呈示しているベシクルによる EtBr 輸送

2-2-3　ベシクル内部で合成された EmrE の定量

2-2-4　ベシクル体積と EmrEno 表面密度の関係

2-2-5　EmrE の膜挿入効率と GUV 体積についてのモデリング

2-3　考察

3 章　トランスポーターに対する Liposome display 法の適用 55

3-1　材料と方法

3-2　結果

3-2-1　ND フィルターの検討

3-2-2　T7 RNA ポリメラーゼ濃度の検討

3-2-3　鋳型として用いる DNA 濃度の検討

3+2-4　タンパク質合成時間および BSA 濃度の検討

3-3　考察

4 章　バイオパニングを用いた Liposome display 法の開発　77

4-1　材料と方法

4-2　結果

4-2-1　パニング法予備実験

4-2-2　ベシクルの凝集を防ぐ実験条件の検討

4-2-3　BSA 濃度 1%で行ったパニング

4-2-4　パニングにおける未結合ベシクルの除去方法

4-3　考察

5 章　総括　103

参考文献　108

謝辞　111

1 章　序論

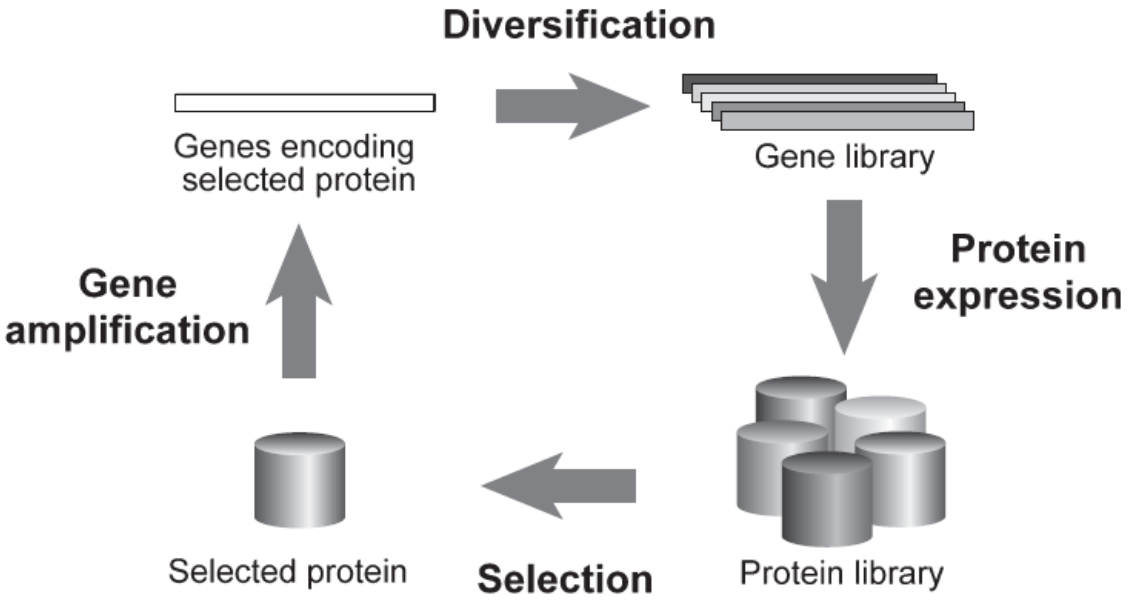
1-1　進化分子工学

幾多の世代を経て、変異と自然選択を繰り返すことにより生物は進化し、環境に適応してきた。初期の社会においては、人類は自然選択によって生み出された生物を、狩猟・採集することによって生活していた。しかしその後、数世紀にわたり、意識的か否かは別として、人類は、人為的選択を行い、より自らの求める性質を備えた作物や動物(家畜)を作り出していく。もちろん、初期の段階では個体群にバリエーションをもたらすメカニズムは不明であり、それを制御する技術などは無かったため、得られた作物や家畜をその性質を基準にスクリーニングするだけであったので長い時間を要するものの、人為的選択による品種改良は人類の社会の発展に寄与してきた。ごく最近になって、遺伝子組換え技術や PCR 技術等の発展に伴い、望みの性質を備えた生物やプロダクトを効率的に得ることが可能となった。進化分子工学はそのうちの一つであり、生物の土台をなしている遺伝子やタンパク質の機能改変を可能にした。

進化分子工学的手法とは、遺伝子の変異とコードされたタンパク質の機能による選択のステップを繰り返し行うことで、実験室内でタンパク質を改変・改良する手法である(図 1-1) [Matsuura *et al. J. Biosci. Bioeng.,* 2006]。つまり、変異導入することで目的遺伝子を多様化し、遺伝子ライブラリーを作る。次に、その遺伝子を

発現させることでタンパク質ライブラリーを創出する。このタンパク質ライブラリーから、酵素活性や基質特異性、安定性などの性質を指標にしてタンパク質を選択的に取得し、選択されたタンパク質をコードしている遺伝子を増幅・多様化する。このサイクルを繰り返すことによって、目的とする性質を備えた新規タンパク質を創出する技術である。

進化分子工学は、20 世紀半ばに発展した実験室内進化を原点としている。実験室内進化とは、進化のプロセスを解明するために、進化を実験室内で再構築しようという試みから始まり、1967 年に Spiegelman らが RNA の *in vitro* 進化に初めて成功した[Mills *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1967]。ここから遺伝子組み換え技術や PCR 技術の登場に伴い、1980 年代後半ダーウィン進化を用いて高機能分子を創出する学問として進化分子工学が提唱され、1990 年に相次いで進化分子工学の実験的な成功例が報告され始める[Kauffman, *J. theor. Biol.*, 1992] 。以降、進化分子工学は発展し、多くの機能分子を生み出してきた。例えば、ヒト成長ホルモン[Lowman and Well., *J. Mol. Biol.*, 1993]や、酵素活性と変性温度を上昇させた FLP リコンビナーゼ[Buchholz *et al., Nat. Biotechnol.,* 1998]や、その他にも、創薬・化学等の産業分野で用いられる可溶性タンパク質（酵素・抗体など）の多くは、用途に合わせて性質を改良された変異体が用いられている。高い有機溶媒耐性、高い光学選択性などを有するこれらの変異体酵素の創出には、進化分子工学が大いに貢献してきた[Cherry *et al., Curr. Opin. Chem. Biol.,* 2003]。



[Matsuura *et al. J. Biosci. Bioeng.,* 2006]

図 1-1　進化工学的手法
変異導入することで目的遺伝子を多様化し、遺伝子ライブラリーを作製する(Diversification)。その遺伝子からタンパク質を発現する(protein expression)。目的とする形質を持つタンパク質を選択的に取得する(selection)。選択されたタンパク質をコードする遺伝子を増幅する(Gene amplification)。増幅した遺伝子に変異を入れ、次のサイクルに供する。

1-2　膜タンパク質

1-2-1　膜タンパク質

細胞膜は、細胞を外界から隔てる境界であり、細胞外からの物質の侵入や細胞質の漏出を妨げている。しかしながら、細胞にとって必要な物質の細胞内への取り込みや、代謝の結果出た不要な物質の細胞外への排出は、生命の維持のために必須である。細胞膜を隔てた物質のやり取りを行う仕組みとして、細胞は膜タンパク質を持っている。膜タンパク質は、細胞やオルガネラ内外の物質輸送以外にも、細胞外からのシグナルを細胞内へ伝達する役割や呼吸鎖におけるエネルギー生産も行っている[Hedin *et al., J. Proteome. Res.,* 2011]。また、細胞の増殖に必須といえるリン脂質の生産も膜タンパク質が担っている[Kuruma *et al., Biochim. Biophys. Acta.*, 2008]。このように、細胞が生物として機能するための役割を担うという点で、膜タンパク質は生理学的に非常に重要である。産業的な観点から見ると、製薬の約 50%以上が膜タンパク質をターゲットとしている[Sanders *et al., ChemBioChem*, 2004]。このように、膜タンパク質の研究は、生理学的に重要なだけでなく、産業の点からも重要である。

しかしながら、膜タンパク質の研究は、水溶性タンパク質と比較すると進んでいるとは言い難い。例えば、生物のゲノムの約 30%が膜タンパク質をコードしているのにも関わらず、PDB に登録された構造のうち、膜タンパク質は約 1%を占めるに留まっている[Heijne, *J. Intern. Med.*, 2007]。これは以下に述べるような膜タンパ

ク質の性質上、試料調製が困難だからである。まず、膜タンパク質は、細胞中での発現量が非常に少ない上に、過剰発現によって細胞毒性を持つことがあるため、解析に必要な収量を得ることが難しい。また、疎水性が高いために、一般的なタンパク質精製用 buffer 中で凝集体を形成しやすい。さらに生物種間の膜組成の違いから、異種発現タンパク質が機能しないという問題もある。

膜タンパク質は、構造上β-バレル膜タンパク質とα-ヘリックス膜タンパク質に分けることができる。β-バレル膜タンパク質は、グラム陰性細菌、ミトコンドリアや葉緑体の外膜のみに存在し、拡散による物質の輸送を行っている。一方でα-ヘリックス膜タンパク質は、すべての生体膜に普遍的に存在し、受動輸送だけでなく能動輸送も行い、冒頭に述べたようにその機能も多岐にわたる。α-ヘリックス膜タンパク質については、3 次元構造から共通の性質を持っていることが明らかになっている[Heijne., *J. Intern. Med.,* 2007]。まず、ヘリックスの膜貫通部位のうち、脂質と接する部分は、主に非極性アミノ酸で構成されている。次に、非極性アミノ酸の間に存在している極性アミノ酸や電荷を持ったアミノ酸は、ヘリックスの内側に面する傾向にあり、タンパク質の機能に重要な役割を持っていることが多い。また、正の電荷を持つアミノ酸は、細胞質側に偏って存在している事などが明らかになっている。

1-2-1　トランスポーター

膜タンパク質のうち、膜を介して物質の輸送を行うタンパク質をトランスポーター(膜輸送体)という。細胞膜は、リン脂質二重膜で構成されるため、物理化学的な性質として、電荷を帯びた物質や、親水性の物質は透過できない。しかし、細胞の生存にはアミノ酸やイオン等の細胞膜を通過できない物質の摂取が必須である。また、細胞にとって害となる物質の排出も行うことは、生物の生存にとって重要である。実際、大腸菌や酵母の膜のプロテオーム解析では膜に存在するタンパク質の半数近くが物質輸送に関連するタンパク質であると言われている[Heijne., *J. Intern. Med.,* 2007]。

視点を変えてトランスポーターについてみてみると、製薬業界においても近年、ドラッグターゲットとして注目され始めている。現在もトランスポーターを標的とした製剤は存在する。例えば、ABC(ATP-binding cassette)トランスポーターファミリーに属する Na^+/K^+-ATPase や H^+/K^+-ATPase はそれぞれ強心剤や消化性潰瘍に対する薬として用いられている。また SLC(Solute carrier)トランスポーターファミリーに属する、カテコールアミントランスポーターや Na-Cl シンポーターは、それぞれ抗うつ剤や利尿薬として広く処方されている。しかしながら、トランスポーターの創薬のターゲットとしての割合は大きくない。現在、低分子薬のターゲットの約 1/4 が GPCR であるのに対して、トランスポーターはその 1/10 である[Overington *et al., Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2006]。ただし、ターゲットとなる候補の数は、トランスポーターと GPCR でほぼ同数である。実際、ヒトのゲノム中

に創薬に用いることができる GPCR として約 316 種類が同定されているのに対して、ABC トランスポーターは 40 種類以上、SLC ファミリーに属するトランスポーターは 370 種類以上発見されている。つまり、トランスポーターは、創薬のターゲットとして開拓の余地のある領域であり、その観点から重要視されているのである[Alexander, Br. *J. Pharmacol.*, 2011]。

1-2-1　モデル膜タンパク質 EmrE

本研究では、大腸菌由来薬剤排出トランスポーターである EmrE をモデルタンパク質として用いた。

EmrE は、Small multidrug resistance protein (SMR)ファミリーに属する膜タンパク質で、110 アミノ酸残基で構成される小さなトランスポーターである。また、α-ヘリックスからなる 4 つの膜貫通部位を持ち、バクテリアに Ethidium bromide や methyl viologen 、acriflavine 等、様々な細胞毒性を持つ化学物質に対する耐性を付与する機能を持つ[Shuldiner, *Biochim. Biopyhs. Acta.,* 2009]。EmrE は、分子量が小さく、有機溶媒に溶解するため、比較的簡単に精製することができる。また、界面活性剤を用いて可溶化してもその機能を維持する性質を持つことから、最も研究が進んでいる膜タンパク質のうちの一つである。よって、本研究のモデル膜タンパク質とした。

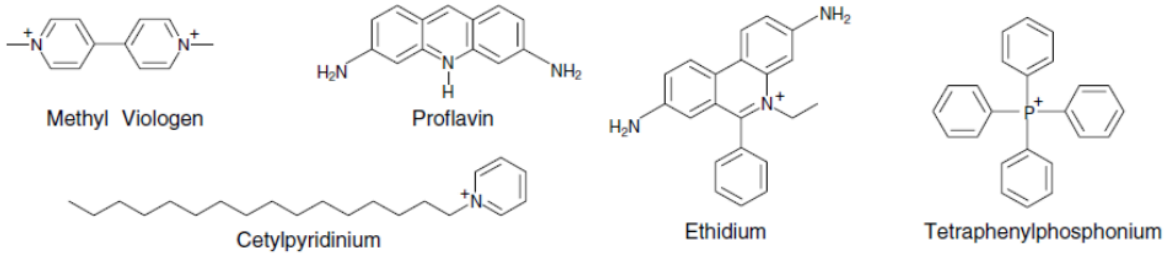
EmrE は、アンチパラレルホモダイマーとして機能発現し、プロトンとの共役輸送で基質を細胞質からペリプラズム空間に排出する[Shuldiner, *Biochim. Biopyhs.*

Acta., 2009]。図 1-2b に示す通り、ダイマーが、膜に対して内向きに開く構造と外向きに開く構造を遷移することで、基質の輸送を行っていることが明らかになっている。

このように膜タンパク質としては、比較的研究が進んでいる EmrE ではあるが、そのトポロジーや機能発現単位、また輸送モデルについては、近年まで長年議論の対象であった。

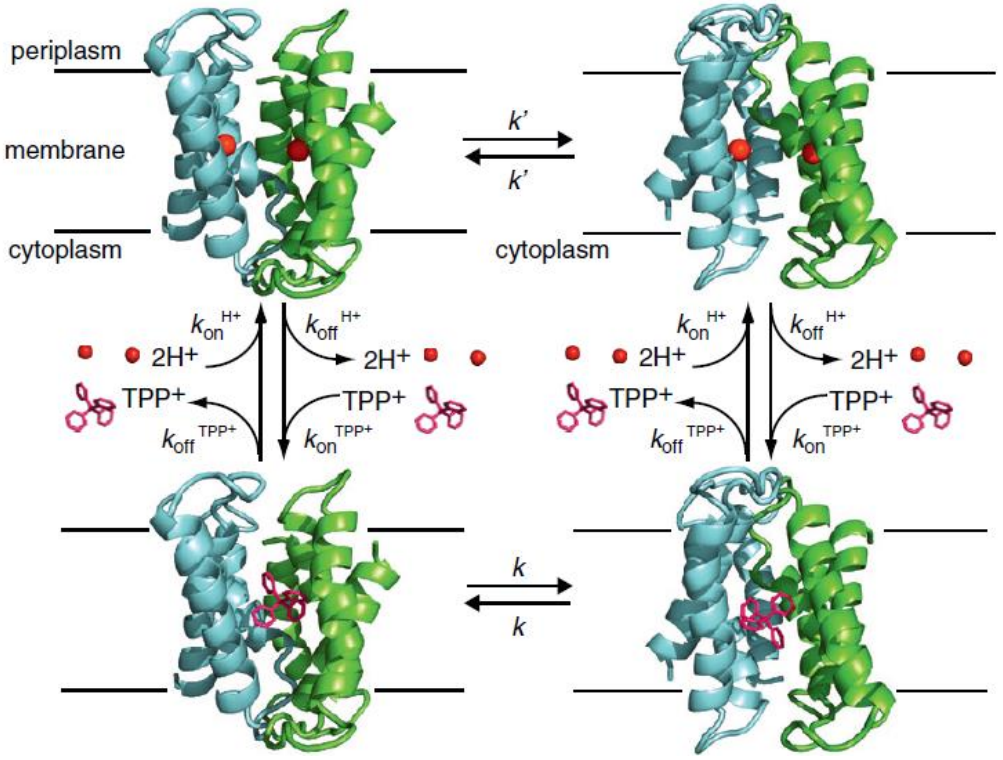
2003 年、基質結合状態の EmrE の結晶構造が解析され、アンチパラレルホモダイマーであることが明らかにされて後[Belandia *et al., EMBO J.,* 2003]、2006 年に Henzler-Wildman らにより図 1-2b の輸送モデルが提唱された[Henzler-Wildman, *Curr Opin Struct Biol.*, 2011]。そして、2012 年 Christopher らの行った NMR および FRET 解析によって、直接的に図 1-2b の輸送モデルが確認された[Morrison *et al.*, *Nature*, 2012]。

(a)



[Shuldiner, *Biochim. Biopyhs. Acta*., 2009]

(b)



[Henzler-Wildman, *Curr Opin Struct Biol*., 2011]

図 1-2　大腸菌由来多剤排出トランスポーターEmrE
(a) EmrE の基質の一部。(b) EmrE の輸送モデル。EmrE はアンチパラレルホモダイマーを形成して(a)に示すような基質をプロトンとの共役輸送でペリプラズム空間へ排出する。

1-3　本研究の目的

本研究の目的は、膜タンパク質を対象とする *in vitro* 進化分子工学的手法の開発である。本研究では、既存技術の膜タンパク質(トランスポーター)への応用と、新規手法の要素技術の開発を行った。1-2 で述べた通り、細胞中における膜タンパク質の発現は困難が伴う。これは膜タンパク質を進化分子工学の対象として扱う際にも障害となるため、*in vitro* ですべての操作が完了する手法の開発を行うことは、様々な種類の膜タンパク質を進化分子工学で扱うために意義がある。

2 章ではまず、進化分子工学への応用を見据え、リン脂質二重膜(リポソーム)内部でモデル膜タンパク質の合成を行った。進化分子工学では、表現型と遺伝子型の紐づけが必須である。さらに膜タンパク質を、活性を保った状態で発現させるためには、足場として脂質膜が必要である。この 2 点を満たす方法として、本研究ではリポソーム内部タンパク質合成を採用した。ここでは、EmrE をリポソーム(Giant unilamellar vesicle; GUV)内部で合成し、その活性測定や、膜への挿入効率を算出した。

次に、3 章では、既存技術の *in vitro* 進化分子工学的手法である Liposome display 法を EmrE に応用した。Liposome display は、変異体膜タンパク質をリポソーム膜に呈示させて蛍光基質をリポソーム内に取り込ませ、その蛍光強度を指標に、フローサイトメトリー(FACS)を用いて、高機能な変異体タンパク質をコードする遺伝子を回収する手法である[Fujii et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2013]。しかしながら、現在水溶性の特殊な膜タンパク質にそのターゲットは絞られている。そ

のため、本研究ではより一般的な不溶性の膜タンパク質への応用を試みた。

最後に 4 章では、アフィニティセレクションをベースにした新しい進化分子工学的手法の創出を目的として、その要素技術の開発を行った。3 章で行った Liposome display は、変異体のセレクションに FACS を用いるため、蛍光物質を基質とする膜タンパク質にターゲットが限定される。そこで、私は蛍光物質以外の物質を基質とする膜タンパク質の機能改変も可能にする技術として、磁性ビーズを用いたバイオパニングを Liposome display 法に応用する技術の開発を試み、その要素技術を確立した。

2 章　GUV 内部膜タンパク質合成

無細胞翻訳系は、細胞の生存・増殖の条件に縛られないため、細胞を用いた膜タンパク質の調製に伴う困難を克服するための有効な手段である。界面活性剤や脂質、ナノディスクを無細胞翻訳系に添加することで、活性を保った状態の膜タンパク質の調製が行われてきた[Katzen *et al.*, *Trends. Biotechnol.*, 2009]。こうした方法の一つとして、細胞サイズの脂質二重膜ベシクル(リポソーム)に無細胞翻訳系を封入し、内部で膜タンパク質を合成する方法がある。

リポソームは、生化学的反応を行うための細胞様の区画を作り出すことができるため、長年プロトセルの前駆体として考えられてきた。ベシクル内部への酵素の封入という観点から見ると、1970 年に Sessa と Weissmann が、リソソームのモデルを構築することを目的として、リゾチームを内封したベシクルの調製に成功して[Sessa and Weissmann, J. Biol. Chem., 1970]以来、ペプシンやプロテナーゼ等の酵素を運ぶ容器としてベシクルに封入した例[Koide and Karel, Int. J. Food Sci. Technol.. 1987][Treyer, Dissertation ETH, 2001]や、ベシクル内部で有機リン系殺虫剤の加水分解反応を行った例が報告され、[Petrikovics et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 1999][Petrikovics et al., Drug Deliv., 2000]ベシクル内部への酵素の封入から、内部における酵素反応に発展していく[Walde and Ichikawa, *Biomol. Eng.*, 2001]。ベシクル内部におけるタンパク質生合成反応も同じく、Qβ レプリカ

ーゼによるRNAの複製やポリメラーゼ連鎖反応、翻訳反応によるPOPCリポソーム内部におけるポリフェニルアラニンの合成と発展してきた[Luisi *et al., Naturwissenschaften*, 2006]。そして、2001年に無細胞翻訳系をベシクルに封入することによって初めて、機能を持ったタンパク質として、緑色蛍光タンパク質(GFP)を合成することに成功した[Yu *et al., J. Biosci. Bioeng.,* 2001]。そして近年、赤血球の膜にポアを形成する毒性タンパク質であるα-ヘモリシンや細菌の細胞骨格であるMreB等、膜タンパク質をベシクル内タンパク質合成によって再構成した例が報告され始めている[Fujiwara *et al., Biophysics (Nagoya-shi),* 2014]。

ベシクル内で膜タンパク質を合成する方法は、界面活性剤や脂質等を反応系に添加する方法と異なるいくつかの利点がある。まず、細胞サイズのベシクル内部でタンパク質合成を行うことで、細胞内の環境により近づけることができる。例えば、負の曲率を持った膜の内部で膜タンパク質を合成できる。膜の曲率は、*in vivo* では膜タンパク質の局在に重要な役割を果たしていることが知られている。細胞サイズのベシクルを用いることによって、正と負の曲率が膜タンパク質に与える影響を調べることができる。次に、細胞と同様の大きさを持つことで、フローサイトメトリー(FACS)や顕微鏡を用いて1細胞ずつ観察することができる。さらに、ベシクル内部でタンパク質合成を行うことによって、遺伝子スクリーニングに用いることが可能となる。このように様々な利点があるが、細胞サイズのベシクル内部で膜タンパク質が合成された例は限られており、膜タンパク質の多くの割合を占めるトランスポーターについてはまだ報告されていなかった。

本章では、細胞サイズのベシクル(Giant unilamellar vesicle; GUV)内部において大腸菌由来の EmrE をモデルタンパク質として合成し、顕微鏡と FACS を用いて解析を行った。その結果、基質の輸送機能を持った EmrE が膜上に呈示されていることが確認できた。さらに、ベシクルに挿入された EmrE の表面密度および、ベシクル内合成された EmrE の膜挿入効率を明らかにした。最後に各実験結果より、膜挿入効率とベシクル体積の関係を求め、その関係を説明しうる数理モデルを確立した。

2-1　材料と方法

プラスミド構築

EmrE をコードするプラスミド(pET-EmrE-myc と pET-EmrE-FLAG)は、PCR と In-Fusion HDkit(タカラバイオ、 滋賀、日本)をメーカーの説明どおりに用いることで、pCAN24N-EmrE (NBRP、静岡、日本)と pET-gusA から構築した。ベクターの pET-EmrE-myc と pET-EmrE-FLAG は、それぞれ C 末端に myc タグと FLAG タグが付加された EmrE がコードされており、T7 プロモーターによって制御されている。pET-E14C-myc は、部位特異的突然変異を用いて pET-EmrE-myc から構築された。PCR には、KOD FX (東洋紡)を特に断りの無い限りは、メーカーの説明通りに用いた。*in vitro* 転写翻訳システムに用いるための鋳型 DNA は、PCR を用いて調製した。PCR のプライマーとして T7F(5’-TAATACGACTCACTATAGGG-3’)と T7R(5’

-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3’)を用い、GFP をコードしている pET-Gtag、pET-EmrE-myc、pET-EmrE-FLAG および pET-E14C-myc を鋳型として用いた。PCR プロダクトは、QIAgen PCR purification kit (Qiagen, Hilden, ドイツ)をメーカー説明通りに用いて精製した。

細胞サイズのベシクル(Giant unilamellar vesicle; GUV)の調製

本研究における無細胞タンパク質合成は、旧四方研究室より提供された再構成系無細胞翻訳システム(PURE system）を用いて行った。PURE system を内封しているベシクルは、界面通過法を用いて調製した (図 2-1)。簡単に説明すると、鋳型となる DNA、200 mM のスクロース、0.8U /μL の RNase inhibitor (RNasin Plus; Promega, Madison, WI)および、1 μM の transferrin Alexa Fluor 647 conjugate (TA 647; Life technologies, Carlsbad, CA)を添加した PURE system(内封液) 20 μL を、2 mg の POPC(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)を含む流動パラフィン(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)200 μL に加えた。その混合液を、30 秒間ボルテックスして油中水滴(water in oil emulsion; W/O エマルション)を形成し、氷上で 10 分インキュベートした。この溶液から 200 μL 取って、200 μL の外液 (表 2-1)に重層し、4 ℃、18000×示で 20 分間遠心操作を行った。遠心操作後、ベシクルは、チューブの底面にペレットとなっているため、注射針(φ=0.8 mm)を用いてチューブに穴をあけ、沈殿物および外液を数滴、新しいチューブに取り出した。このベシクル溶液を懸濁した後、タンパク質合成反応を行うために 37 ℃で、

3 時間インキュベートした。外液は、PURE system の低分子成分を含んでいる。つまり、各アミノ酸を 0.3 mM、ATP を 3.75 mM、GTP を 2.5 mM、CTP と UTP をそれぞれ 1.25 mM、spermidine を 1.5 mM、クレアチンリン酸を 25 mM、ジチオトレイトール(DTT)を 1.5 mM、10-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid を 0.02 μg/μL、グルタミン酸カリウムを 280 mM、酢酸マグネシウムを 18 mM および HEPES(pH 7.6)を 100 mM 含む溶液であり、そこにさらにグルコースを 200 mM 加えたものが外液である(表 2-1)。

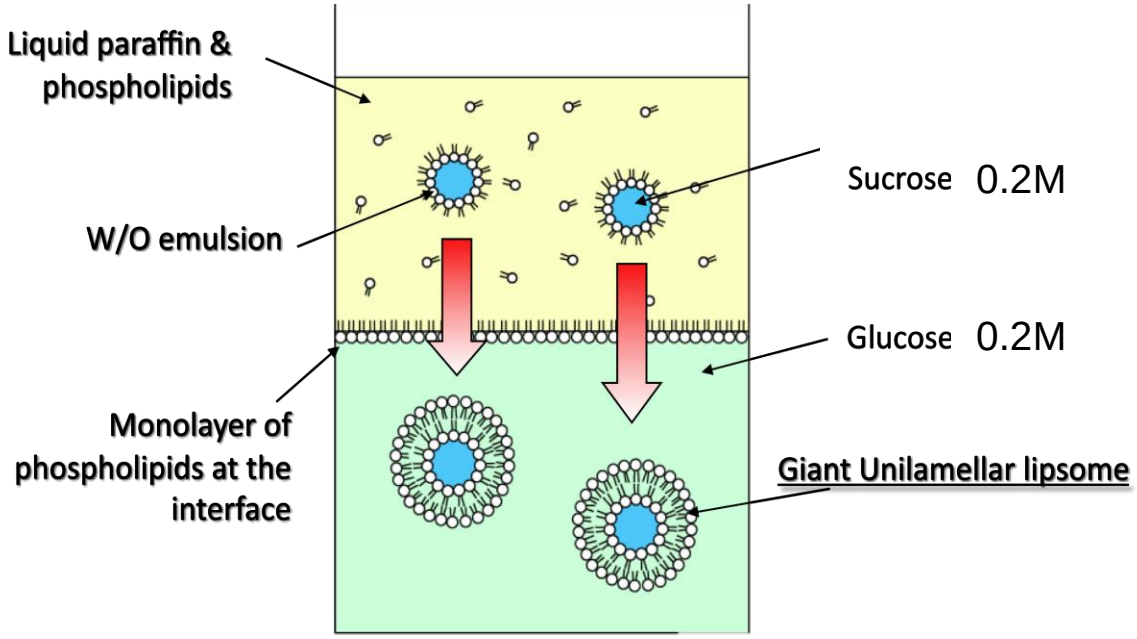


図 2-1　細胞サイズベシクル形成の概要図　PURE system を内封した W/O エマルションを水相に重層し、遠心することで油水界面を通過させる。その際、外膜が形成されベシクルが作製される。

表 2-1　内封液および外液の組成

内封液組成	
試薬	終濃度
各種 PCR プロダクト	1 nM
Sucrose	0.2 M
T7 RNA polymerase	2 μM
RNasin	0.2 U/μL
アミノ酸	0.3 mM
ATP	3.75 mM
GTP	2.5 mM
CTP	1.25 mM
UTP	1.25 mM
$Mg(OAc)_2$	18 mM
spermidine	1.5 mM
CP	25 mM
DTT	1.5 mM
FD	20 μg/mL
HEPES-KOH(pH 7.6)	50 mM
K-Glu	280 mM
tRNA mix	
PUREsystem soga Sol.B	

外液組成	
試薬	終濃度
アミノ酸	0.3 mM
ATP	3.75 mM
GTP	2.5 mM
CTP	1.25 mM
UTP	1.25 mM
$Mg(Oac)_2$	8.25 mM
CP	25 mM
DTT	1.5 mM
$Mg(OAc)_2$	11.75 mM
spermidine	1.5 mM
FD	0.01 μg/μL
HEPES-KOH(pH 7.6)	100 mM
K-Glu	280 mM
Glucose	0.2 M

色つきのセルは内液、外液で共通の成分を示している。

表 2-1　内封液および外液の組成　内封液は、鋳型 DNA を含む PURE system にスクロースを終濃度 200 mM で添加した溶液である。外液は、PURE system の蛋白質や tRNA を除く低分子要素に加え、終濃度 200 mM の glucose で構成されている。

ベシクル希釈液の組成

ペレット化したベシクルや、FACS 測定の際にベシクルを希釈する溶液として、HEPES-KOH (pH 7.6)を 100 mM、グルタミン酸カリウムを 280 mM、酢酸マグネシウムを 18 mM および、グルコースを 200 mM 含む溶液を使用した。

ベシクルの免疫染色

Myc タグを付加した EmrE を呈示しているベシクルを検出するために、AF 488 で修飾された抗 myc 抗体(MBL, 日本)を、終濃度 5 μg/mL になるようにベシクルの懸濁液に加えて、37 ℃で 30 分間インキュベートした。インキュベート後の溶液を 18,000 ×*g* で 5 分間遠心することで、ベシクルをペレット化し、上清を除くことで、未結合の抗体を除去した。続いて、ペレット化したベシクルを希釈液に再懸濁した。

免疫染色されたベシクルの顕微鏡観察

図 2-2c の顕微鏡画像は、倒立顕微鏡(BX50; Olympus、日本)に EM-CCD カメラ(ADT-100; Flovel、日本)を取り付け、60×の油浸レンズを用いて撮影した。AF 488 の蛍光画像は、対応するフィルターと、ダイクロミックミラーユニット(NIBA)を用いて撮影した。

FACS による GUV の解析（ベシクル体積および EmrE 呈示量の算出方法）

GUV を免疫染色した後、上と同様の希釈液に再懸濁して FACS で解析した。AF 488、GFP および TA 647 が発する蛍光シグナルは、FACS(FACS Aria Ⅱ; Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を用いて測定した。解析はすべて、調製したベシクル中に含まれる GUV について行った。

先行研究に基づいて、前方散乱光と側方散乱光の二次元プロットから GUV を定義している[Nishimura *et al., Langmuir*, 2009]。簡単に説明すると、蛍光脂質を用いて界面通過法を用いてベシクルを調製し、FACS で蛍光を測定する。次に脂質の蛍光強度とベシクル体積の二次元両対数プロットを描く。すると最もプロット密度が高い部分の稜線は、傾き 1.5 の直線となる。この結果は、この直線上のベシクルが単層膜の球(GUV)であることを示している。FACS データ解析によって、この部分のベシクルが、前方散乱光と側方散乱光の二次元プロット上で位置する場所を特定し、GUV として定義している。

AF488 は、波長 488 nm の半導体レーザーで励起し、波長 530±15 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出した。TA 647 は、波長 633 nm のヘリウムネオンレーザーで励起し、波長 660±10 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出した。100000 個の GUV の蛍光強度を測定し、解析を行った。

GUV の体積(V[fL])は、TA647 の蛍光強度(FI_{647})を用いて概算した。FI_{647} と Alexa Fluor 647 の分子数の対応関係は、キャリブレーションビーズ(Quantum Alexa Fluor 647 MESF, Bangs Laboratories, Inc.)とトランスフェリン 1 分子当たりに結

合している Alexa Fluor 647 の平均分子数から計算した。

各ベシクルに結合している抗 myc 抗体の分子数は、AF 488 の蛍光強度を用いて概算した。AF 488 の蛍光強度と抗 myc 抗体の分子数の対応関係は、キャリブレーションビーズ(Quantum Alexa Fluor 477 MESF、Bangs Laboratories, Inc.)を用いて、抗 myc 抗体 1 分子当たりに結合している AF488 の平均分子数から計算した。

EmrE を呈示している GUV による EtBr 取り込み

EtBr の取り込みを検出するために、GUV の免疫染色と同様の手法を用いてベシクルの外液を 0.5 μg/mL の EtBr を含むベシクル希釈液と交換した。この際、希釈液は、ベシクル内に対して外部の pH を上げる場合には、通常の希釈液に含まれる HEPES pH7.6 を HEPES pH8.1 に、ベシクル外部の pH を下げる場合には HEPES pH7.6 を HEPES pH 6.8 に置き換えたものを使用した。

ベシクルに呈示された EmrE による EtBr の顕微鏡観察

図 2-3c の顕微鏡画像は、倒立顕微鏡(BX50; Olympus、日本)に EM-CCD カメラ(ADT-100; Flovel、日本)を取り付け、60×の油浸レンズを用いて撮影した。AF488 の蛍光画像は、対応するフィルターと、ダイクロミックミラーユニット(WIG)を用いて撮影した。

FACS による GUV の解析(GUV 膜上の EmrE による EtBr 取り込み)

EtBr および TA647 が発する蛍光シグナルは、FACS(FACS Aria Ⅱ; Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を用いて測定した。解析はすべて、調製したベシクル中に含まれる GUV について行った。

EtBr は、波長 488 nm の半導体レーザーで励起し、波長 616±11 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出した。100000 個の GUV の蛍光強度を測定し、解析を行った。

共焦点顕微鏡による免疫染色された GUV の定量解析

図 2-7a の顕微鏡画像は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Leica TCS SP8; Leica microsystems、東京、日本)と 100×の油浸レンズを用いて撮影した。AF 488 のリガンドと TA 647 の画像は、波長 488 nm で励起し、検出する波長を 474-607 nm にセットしたハイブリッド検出器を用いて撮影した。

ベシクルの面積と膜の蛍光強度の関係の概算方法は以下に示すとおりである。始めに、およそ 300 個のベシクルについて、単位面積当たりの TA647 蛍光強度を定量した。その結果、TA647 の蛍光強度は、2 峰性の分布を示した。そのうち高い蛍光を持つベシクル (単位当たりの TA647 蛍光強度が 100 (a.u)以上の集団)を次の解析に用いることで、ベシクルではない粒子を取り除いた。次に各ベシクルについて膜の蛍光強度を測定した。膜の任意の 3 点における蛍光の平均値を、膜の蛍光強度とした。最後に、これらの解析により得られたベシクルの面積と膜の蛍光シグナル

の関係をプロットした。

2-2　結果

2-2-1　GUV 内部における EmrE 合成

まず初めに、GUV 内部で合成した EmrE を、そのリン脂質膜に挿入することが可能かどうか調べた。界面通過法を用いて、EmrE をコードする遺伝子とともに PURE system を GUV に封入した。GUV の脂質組成は POPC100 %で調製した。ここで留意すべき点は、GUV 外部の溶液に、リボソームや伸長因子などのタンパク質成分を含まない溶液を用いているため、本研究における GUV 調製方法では、GUV 外部でタンパク質合成反応が進まないことである。調製中に EmrE が合成されるのを防ぐために、GUV を 4 ℃で調製した。その後 37 ℃で 3 時間インキュベートし EmrE を合成した。この反応時間は、PURE system が失活してタンパク質合成が終了する時間に近い数字である。

合成された EmrE を検出可能にするために、C 末端に myc タグを付加した EmrE(EmrE-myc)をコードする遺伝子を用いた。EmrE は、4 回膜貫通タンパク質でアンチパラレルホモダイマーとして機能する。それゆえ、もし GUV 膜に正しいトポロジーで挿入されたならば、EmrE-myc の myc タグは、GUV 内外の両方向に露出するはずである（図 2-2a）。ここでは、異なる DNA 濃度（0, 0.3, 1, 3 nM)で EmrE-myc をベシクル内部で調製した。さらに、これを蛍光顕微鏡観察および

FACS による解析を行うために、Alexa Fluor 488 (AF488)で修飾された抗 myc 抗体で免疫染色した。ベシクル外部に myc タグを呈示している EmrE-myc の量（N_{myc}）は AF488 の蛍光強度から概算し、ベシクルの体積は、PURE system 中に 1 uM の濃度で加えている transferrin Alexa Fluor 647 (TA647)の蛍光強度から概算した。これらの変換についての詳細は、方法のセクションで述べている。

免疫染色されたベシクルの顕微鏡観察

DNA 濃度 0 nM のベシクル (No protein)が蛍光を持たないのに対し、EmrE-myc を内部で合成したベシクルは、ベシクルの外縁部に蛍光が見られた (図 2-2c)。これは、EmrE-myc がベシクル膜表面に提示されていることを示唆している。

FACS による GUV の解析

ベシクルの体積と *N*myc の二次元 FACS 解析のプロットは、反応溶液中の DNA 濃度が高いほど、より多くの EmrE が GUV 膜に挿入されることを示唆している(図 2-2d)。加えて、C 末端に FLAG タグを修飾した EmrE を呈示しているベシクルは、DNA を含まないベシクルと似た結果を示した。

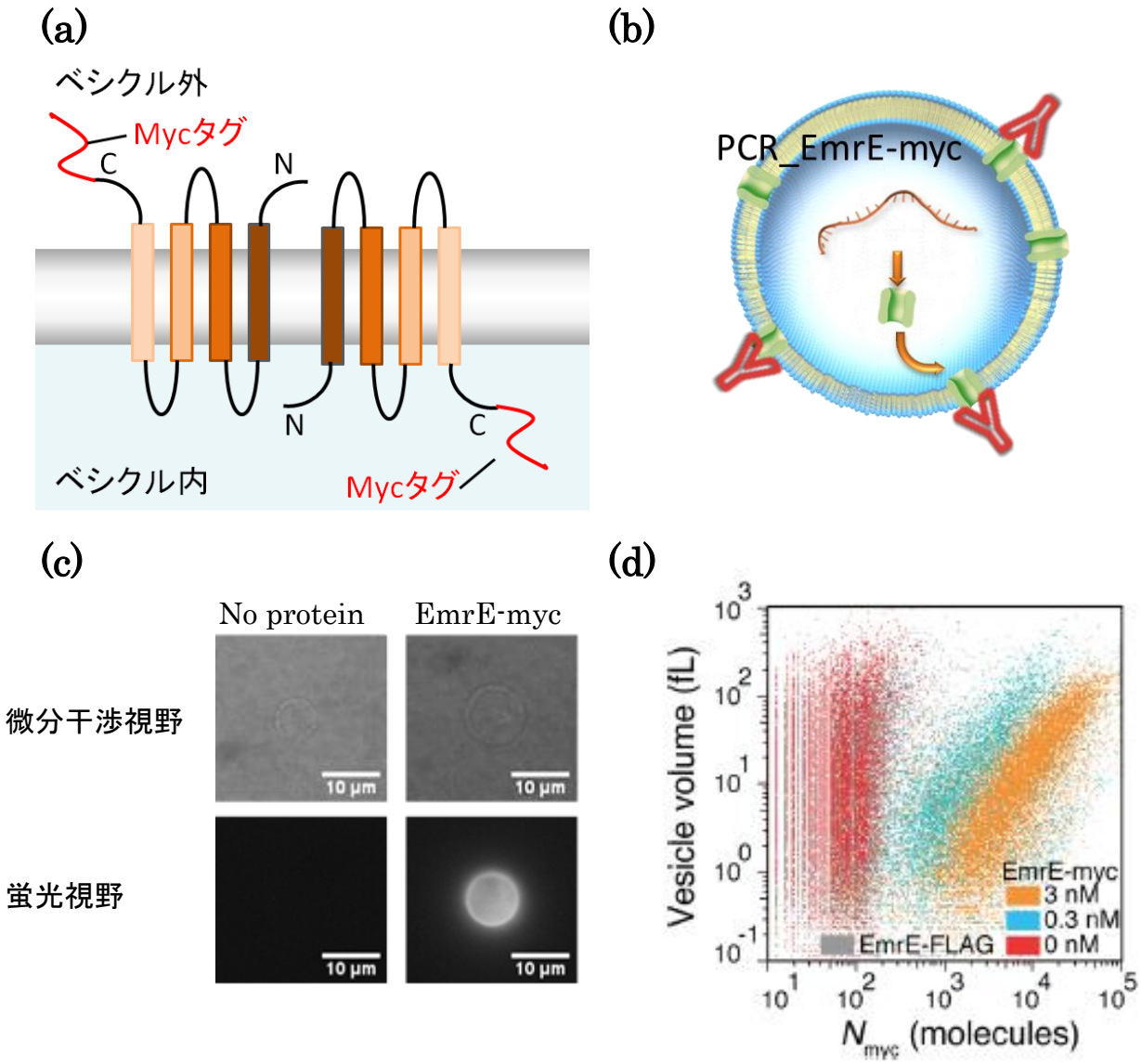


図 2-2　PURE system を用いた EmrE の GUV 内部合成
(a)アンチパラレルホモダイマーを形成した EmrE-myc の模式図。GUV 膜にアンチパラレルで挿入されたならば、EmrE-myc の myc タグは、GUV 内外の両方向に露出する。(b)EmrE の GUV 内部合成および、抗体染色の模式図。 (c)EmrE を呈示している GUV の顕微鏡画像の典型例。上段と下段が、それぞれ微分干渉視野と蛍光視野の画像である。(d)異なる DNA 濃度を用いた時(0、0.3、3 nM の EmrE-myc と 1 nM の EmrE-FLAG)に EmrE を呈示している GUV の二次元 FACS 解析。プロットの複雑さを低減させるために、DNA 濃度 1 nM のデータは記載していない。ベシクルの体積と myc タグが GUV 外部に露出する方向で膜に挿入されている EmrE 分子の数である Nmyc の関係を示している。

2-2-2　EmrE を呈示しているベシクルによる EtBr 輸送

次に、ベシクル膜に挿入された EmrE が活性を持つかどうか調べた。その際、EtBr をモデル基質として用いた。EtBr は一度ベシクル内部に輸送されると、ベシクル内部のみに存在する rRNA、tRNA、mRNA と結合して、蛍光を発する性質を持つためである。EmrE は、プロトンとの共役輸送によって基質を輸送する。よって、内液と外液の間に pH 勾配をつけるために、pH 7.6 の内液に対して、pH 6.8、pH 8.1 の外液を用いた。EmrE-myc を合成した後、EtBr を外液に加えて、顕微鏡観察および FACS による蛍光強度の解析を行った。

ベシクルに呈示された EmrE による EtBr の顕微鏡観察

EmrE-myc および E14C を合成した後、pH 6.8 の外液を用いて EtBr の取り込みを蛍光顕微鏡で観察した。EmrE-myc を呈示するベシクルが、EtBr の取り込みを示す蛍光を持っているのに対して、不活性型変異体(E14C)を呈示するベシクルは、蛍光を示さなかった(図 2-3b)。

FACS による GUV の解析

EmrE-myc (0, 1 nM)および E14C を合成した後、pH 6.8 および pH 8.1 の外液を用いて EtBr の取り込みを FACS で解析した。EmrE-myc を呈示する GUV は、不活性型変異体(E14C)や DNA 0nM (without DNA)の GUV よりも、著しく高い EtBr の蛍光を示していた。さらに、EtBr を示す蛍光は、pH 6.8 の外液を用いた場合と比較して、pH 8.1 を用いた場合の方が高かった (図 2-3c)。

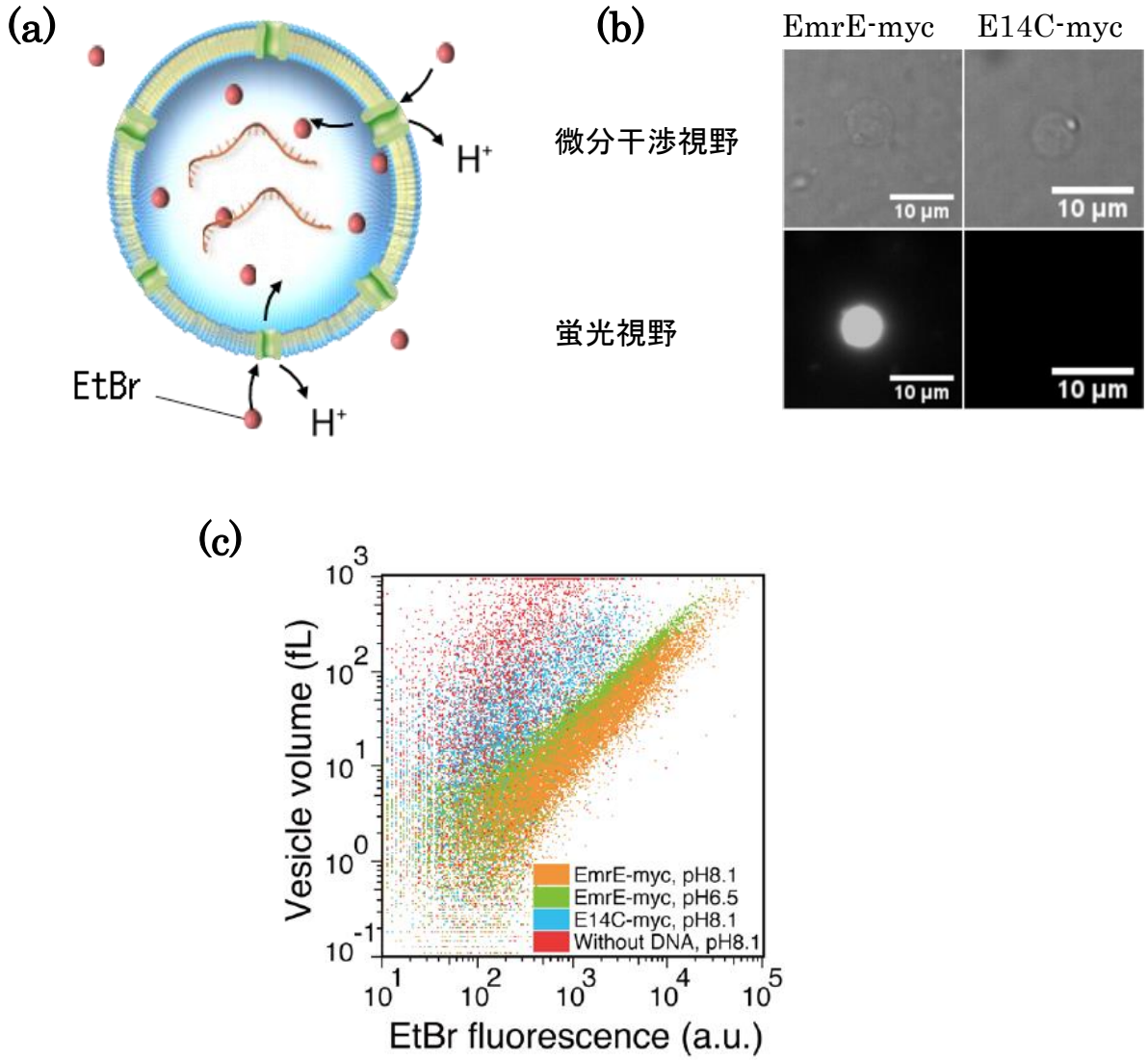


図 2-3　EmrE を呈示しているベシクルによる EtBr 輸送
(a)ベシクルに呈示された EmrE による EtBr 取り込みの模式図。(b)EmrE を呈示している GUV の顕微鏡画像の典型例。上段と下段が、それぞれ微分干渉視野と蛍光視野の画像である。(c)EmrE を呈示しているベシクルの EtBr 輸送活性についての二次元 FACS 解析。

2-2-3　ベシクル内部で合成された EmrE の定量

EmrE 合成がベシクル体積に依存するかどうかを明らかにするために、ベシクル内部で合成された全ての EmrE 分子数(N_{total})を概算した。発現させたタンパク質の定量を行う最も一般的な方法は、GFP のような蛍光タグを目的のタンパク質に付加する方法だが、EmrE には適さない。なぜならば、ベシクル内部で合成された EmrE は、少なくとも二種類の状態(膜に挿入されている状態・アグリゲーションしている状態)をとっているからである。異なる状態においては、1 分子当たりの GFP 蛍光が違う可能性があり、GFP の蛍光強度が必ずしも合成された EmrE の全量を反映しているとは限らない。

N_{total} の概算

まずは N_{total} を概算するために、タンパク質合成を GUV 内部で行った場合と、バッチで行った場合の違いを測定することから始めた。GFP をコードする遺伝子と EmrE をコードする遺伝子を、それぞれ 0.5 nM となるように 1:1 で混合し、無細胞翻訳系の鋳型として用いた。タンパク質合成反応は、GUV 内部とバッチで行った。タンパク質合成後、バッチの反応溶液は速やかに GUV に封入し、その後二種類のベシクルを FACS で解析した(図 2-4a)。EmrE を共発現している状態でも、GUV 内部で合成した場合と、バッチで合成した場合で GFP の収量に大差はなかった。

次に、GUV 内部の GFP の濃度([*GFP*])と GUV の体積の関係について調べた。

図 2-4a の結果より、ベシクルを体積ごとに 2.15- 10、10- 46.4、46.4- 215、215- 1000 fL で区分し、各体積区分の GFP 濃度と体積の中間値を計算してプロットした(図 2-4b)。その結果、GUV 内部の GFP の平均濃度は、バッチ合成の場合とほぼ一致した。また、GUV の体積に関わらず、合成された GFP の濃度は一定であった。したがって、体積 V のベシクル内部の GFP の分子数(N_{GFP})は、バッチ合成の値から得られる値である$[GFP]$を用いて $N_{GFP}=[GFP]V$ として表現できる。

最後に、ベシクル内合成とバッチ合成における EmrE と GFP の合成量の比率を調べた。そのために P24 で述べた PURE system 組成中の methionine を ^{35}S-methionine に置き換え、GUV 内部およびバッチで *in vitro* タンパク質合成を行った。この際、無細胞翻訳系の鋳型として、GFP と EmrE の遺伝子を 1:1 の比率(それぞれ 0.5 nM)で混合したものを用いた。その後、SDS-PAGE のオートラジオグラフィーから得られたバンドの強度から、合成したタンパク質量を概算した(図 2-4c)。図 2-4c の結果は、独立した 3 サンプルの結果を表示している。実線は、点 O を通る一次方程式にフィットすることを示唆している。この結果は、合成された GFP と EmrE の比率は、GUV 内部とバッチで変化しないことを示唆している。

GUV 内合成とバッチ合成で比較したときに、GFP の合成量はほぼ変化しないので、この結果は EmrE の合成量も GUV 内部合成とバッチ合成で同じであることを示唆している。よって、ベシクルの体積を V、バッチ合成で得られた EmrE 濃度を $[E]_0$ とすると、N_{total} は $N_{total}=[E]_0V$ と表現できる。

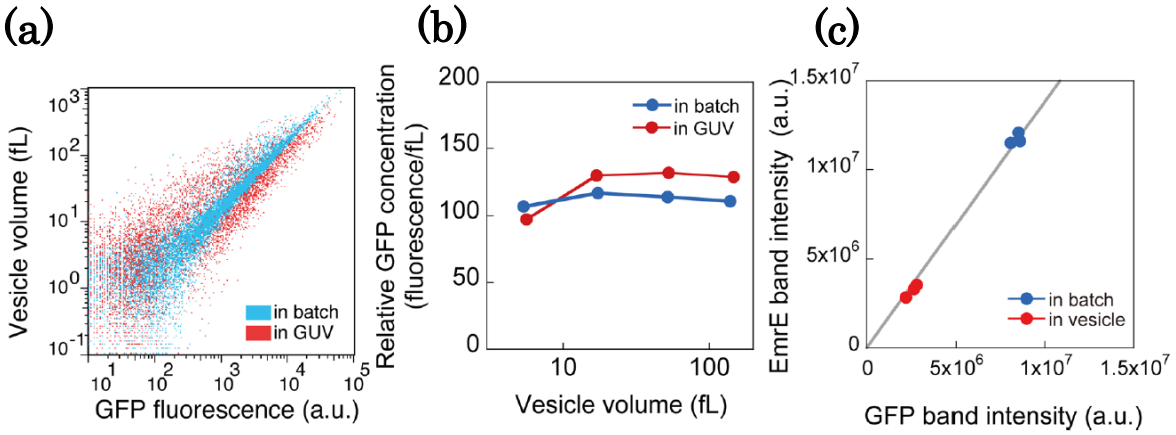


図 2-4　GFP と EmrE の GUV 内部合成とバッチ合成
(a)は、GFP と EmrE を GUV 内部で合成した時の二次元 FACS 解析結果である。この図は、ベシクル体積と GFP 蛍光の関係を示している。(b)は、GUV 内部およびバッチ合成した場合に、EmrE を共発現した際の GFP 蛍光とベシクル体積の関係をそれぞれ表した図である。GUV 内部の GFP の平均濃度は、バッチ合成の場合とほぼ一致した。(c)は、ベシクル内部もしくはバッチで GFP と EmrE を合成した時のそれぞれのタンパク質の比率の関係を表している。実線は、点 O を通る一次方程式にフィットすることを示唆している。

各 GUV 内部における N_{total} と N_{myc} の関係

ここではバッチ合成した EmrE 濃度$[E]_0$を求めるために、P24 で述べた PURE system 組成中の methionine を ^{35}S-methionine に置き換え、37 度で 3 時間インキュベートしタンパク質合成を行った。その際、異なる DNA 濃度条件でタンパク質を合成し、SDS-PAGE で得られたバンドの強度を Typhoon (GE ヘルスケア、Little Chalfont、イギリス)を用いて定量し、$[E]_0$を決定した(図 2-5a)。上で述べた通り N_{total} は $N_{total}=[E]_0 V$ である。これらを利用して各ベシクルについて N_{total} と N_{myc} の関係をプロットした(図 2-5b)。点線は、$\log N_{total}=1.5 \log N_{myc}+c$ のフィッティングカーブを表しており、c はフィッティングパラメーターである。このフィッティングには、等式 $\log N_{total}=n \log N_{myc}+c$ (n と c はフィッティングパラメーターである)を用いた。実験結果より、DNA 濃度 0.3 nM の場合は $n = 1.58$、$c = -0.93$、DNA 濃度 3 nM の場合は $n = 1.62$、$c = -1.48$ となった。

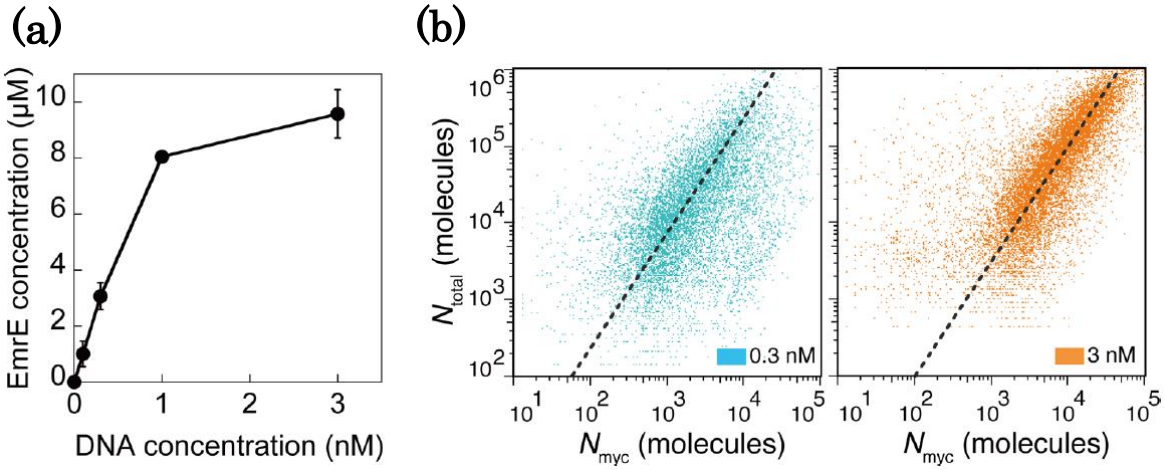


図 2-5　各 GUV 内部における N_{total} と N_{myc} の関係
(a)は、異なる DNA 濃度を用いて、EmrE をバッチ合成した時の DNA 濃度と EmrE 濃度$[E]_0$の関係を表している。^{35}S-methionine をタンパク質合成反応に用い、オートラジオグラフィーを用いて得た SDS-PAGE のバンド強度を解析した。独立した 3 つのサンプルの平均値と標準偏差を表している。(b)は、異なる DNA 濃度(0.3、3 nM)における N_{total} と N_{myc} の関係を示す二次元 FACS 解析結果である。それぞれの N_{total} は、等式 $N_{total}=[E]_0V$ を用いて算出した。点線は、$\log N_{total}=1.5 \log N_{myc}+c$ のフィッティングカーブを表しており、c はフィッティングパラメーターである。このフィッティングには、等式 $\log N_{total}=n \log N_{myc}+c$ (n と c はフィッティングパラメーターである)を用いた。実験結果より、DNA 濃度 0.3 nM の場合は n = 1.58、c = -0.93、DNA 濃度 3 nM の場合は n = 1.62、c = -1.48 となった。

2-2-4　ベシクル体積と EmrE の表面密度の関係

前項で得られた体積 Vのベシクルの N_{total} と N_{myc} を基にして、ベシクル膜に挿入された EmrE の表面密度を概算し、ベシクルの体積との依存性を調べた。さらに、共焦点顕微鏡を用いた定量解析も行った。

FACS 結果を用いた EmrE の表面密度の定量解析

膜に挿入された EmrE の膜表面における密度を概算した(図 2-6)。図 2-2c より、ベシクルが球であると仮定すると、その表面積(A)は体積 Vから計算できる。そして、EmrE の密度は、既知の値である N_{myc} を用いて求めることができる。まず、EmrE の密度は、合成に用いた DNA 濃度に依存することが明らかとなった(図 2-6)。また、ベシクルを 2.15- 10、10- 46.4、46.4- 215、215- 1000 fL の体積で区分し、各体積区分の〈N_{myc}〉と〈V〉の平均値を算出しプロットした結果、〈N_{myc}〉は、ベシクルの体積には依存しないことが明らかになった(図 2-6 差し込み図)。そして、最大濃度の DNA を用いた時(3 nM)、EmrE の表面密度は、1 μm^2 たりおよそ 300 分子であることが分かった。

共焦点顕微鏡を用いた定量解析

これらの FACS 解析結果を裏付けるために、蛍光抗体で免疫染色したベシクルの共焦点顕微鏡画像(図 2-7a)を撮影し、定量解析を行った(図 2-7b)。

始めに、FACS 解析結果が示唆する通り、ほとんどのベシクルが凝集しておらず、

各ベシクルが分離した状態であることを明らかにした(図 2-7a)。

次に顕微鏡写真の結果から、ベシクルの面積と、蛍光抗体で免疫染色された膜タンパク質の平均蛍光強度の関係を調べた(図 2-7b)。ベシクルの面積の平均値は、ベシクル体積を 3- 6.34、6.34- 13.42、13.42- 28.37、28.37- 60 μm^2 で区分し、各体積区分の平均を取った値である。その結果、蛍光強度のばらつきがとても大きく、およそ 50 倍の範囲でばらついていることが分かった。にもかかわらず、平均蛍光強度はベシクルのサイズの違いに関わらず顕著な違いはないことが明らかになった。すなわち、顕微鏡の画像から得られた結果は FACS 解析結果と整合性があることが明らかになった(図 2-6)。留意する点として、顕微鏡画像は共焦点顕微鏡を用いて取得している点である。得られたベシクルの面積は、任意の場所でベシクルをスライスした断面積と対応している。

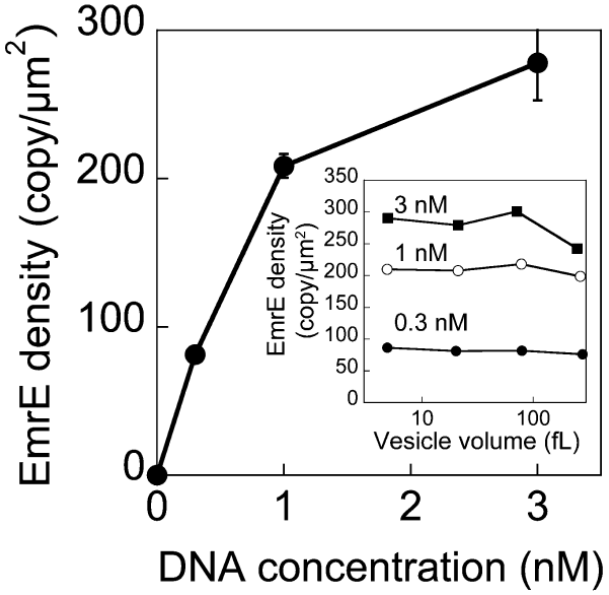
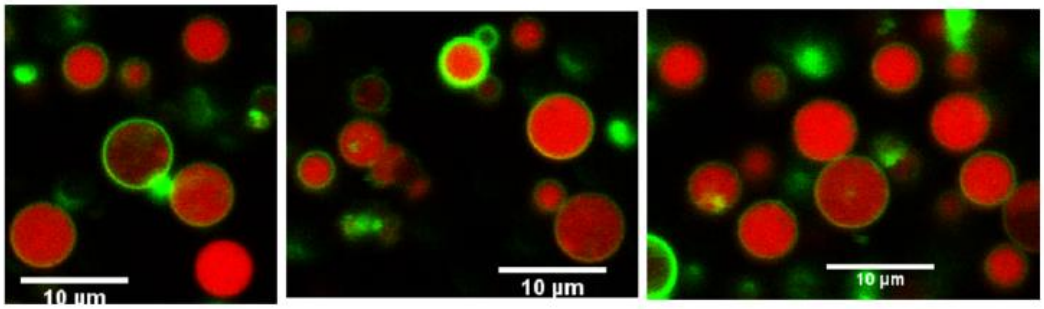


図 2-6　FACS 結果を用いた EmrE の表面密度の定量解析

この図は、ベシクル膜に挿入された EmrE の膜表面における密度と DNA 濃度の関係を示している。また、差し込み図は、各 DNA 濃度における、ベシクル体積と EmrE の表面密度の関係を示している。DNA 濃度一定の場合、すべての体積の GUV において、EmrE 密度がほぼ一定であることを示唆している。

(a)



(b)

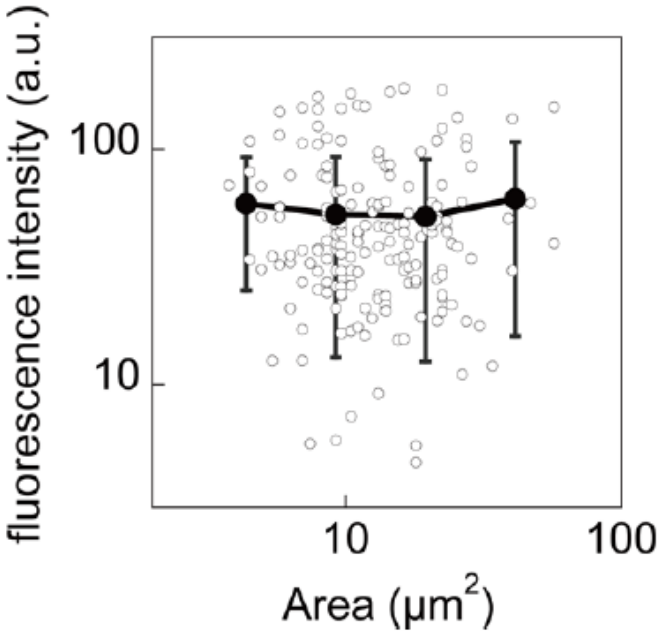


図 2-7　共焦点顕微を用いた EmrE の表面密度の定量解析
(a)は、3 つの典型的な顕微鏡画像である。緑の蛍光は AF 488 で修飾された抗 myc 抗体由来であり、赤の蛍光は、TA 647 由来である。(b)は、a の画像から取得した、ベシクルの面積と膜の平均蛍光強度の関係を示している。白丸は生値を示しており、黒丸はその平均値を表している。各面積の平均値は、ベシクルの面積を 3- 6.34、6.34- 13.42、13.42- 28.37、28.37- 60 μm^2 で区分して計算した。

2-2-5　EmrE の膜挿入効率 $f(N_{myc}/N_{total})$と GUV 体積についてのモデリング

最後に、セクション 2-2-3 で得られた、体積 Vのベシクルの Ntotal と Nmyc を基に、膜に挿入された EmrE の比率($f=N_{myc}/N_{total}$)を概算し、ベシクル体積に対する依存性について調べた。

膜挿入効率 fの GUV 体積依存性

体積 1 fL のベシクル内部では、約 20 %の EmrE が myc タグを外部に呈示した状態で挿入されていた。膜挿入効率 fは、ベシクルの体積が大きくなるほど減少した(図 2-8)。さらに、f は体積のみに依存し、$[E]_0$やタンパク質合成反応に用いた DNA 濃度には依存しないことが明らかとなった。

EmrE の膜挿入についてのモデリング

用いた GUV は球であると仮定できる。それゆえ、体積 Vのベシクルの脂質濃度を$[L]$とすると、表面積 A を用いて以下のように表すことができる。

$$[L] = \frac{\eta A}{V} = cV^{\frac{-1}{3}}$$

$$c = 3\eta(\frac{3}{4\pi})^{\frac{-1}{3}} \tag{1}$$

η は単位表面積当たりの脂質分子のモル数である。よって脂質濃度と比表面積とは線形性があり、ベシクル体積が小さくなると η は増加する。

次に、EmrE を(E)として以下の二つの不可逆的な反応を想定した。

$$E \xrightarrow{k1} Agg$$

$$E + L \xrightarrow{k2} EL$$

k_1、k_2 はそれぞれ速度定数である。一番目の数式は、ベシクル内部で EmrE が凝集することを示しており、二番目の数式は EmrE が膜に接触して挿入に成功することを示している。これらの式より f は以下のように表現できる。

$$f = \frac{N_{myc}}{N_{total}} = \frac{[EL]}{[E]_0} = \frac{[EL]}{[Agg] + [EL]}$$

$$= \frac{k_2[E][L]}{k_1[E] + k_2[E][L]} = \frac{[L]}{K + [L]}$$

$k_1/k_2 = K \gg [L]$ と仮定すると、以下のような式を導出できる。

$$f = \frac{[L]}{K}$$

$$= \frac{c}{K} V^{\frac{-1}{3}}$$

$$= \frac{c\left(\frac{4\pi}{3}\right)^{\frac{-1}{3}}}{K}\left(\frac{1}{r}\right) \tag{2}$$

この数式は、EmrE の膜挿入効率は、脂質濃度（eq2 の一行目)または、ベシクルの半径を r とした時、膜曲率 1/r (eq2 の三行目)と直線的な関係にあることを示している。さらに、N_{myc} と N_{total} は、以下のように書き表せる。

$$N_{total} = \left(\frac{K}{c}\right)^{\frac{3}{2}} [E]_0^{\frac{-1}{2}} (N_{myc})^{\frac{3}{2}}$$

(3)

$$\frac{N_{myc}}{A} = \frac{c}{K} [E]_0 (4\pi)^{\frac{-1}{3}} 3^{\frac{-2}{3}}$$

（4）

数式 2 からは、V と f の関係を両対数プロットすると、傾きが-1/3 になることが予測される。実際に、図 2-4b の結果を用いて、ベシクルを 0.464- 2.15、2.15- 10、10- 46.4、46.4- 215、215- 1000 fL の体積で区分し、各体積区分の〈f〉と〈V〉を算出した(図 2-8)。このデータを、等式 log〈f〉=n log〈V〉+c にフィッティングすると、実験結果より、n = -0.41、c = -0.53 となることが分かった。また、数式 3 からは、N_{total} と N_{myc} の関係を両対数プロットすると、傾きが 3/2 になることが予測される。数式 4 からは、EmrE の表面密度はタンパク質合成に用いた DNA 濃度に依存するが、ベシクルの体積には依存しないことが予測されている。すべての数式は、実験から得られた結果と一致していた(図 2-5b、2-6 差し込み図、と 2-8 の点線)。

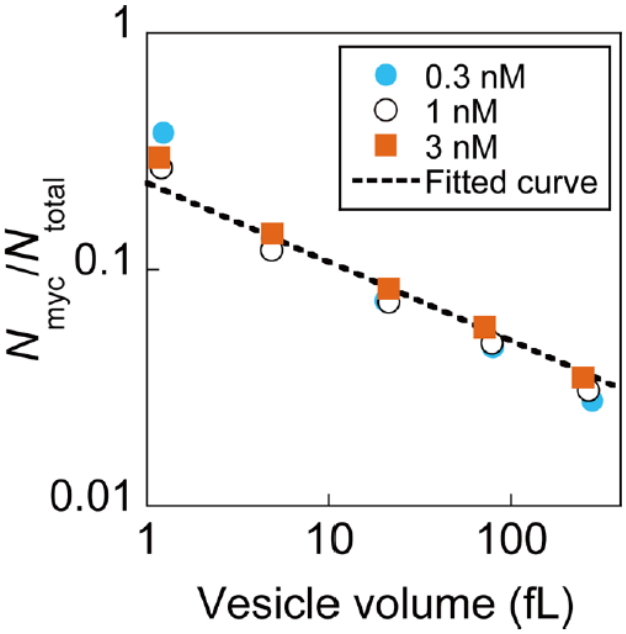


図 2-8　膜挿入効率 f(N_{myc}/N_{total})のベシクル体積依存性

この結果は、膜挿入効率 f (N_{myc}/N_{total})のベシクル体積の関係を表している。膜に挿入される EmrE の割合は、ベシクルの体積に依存するが、タンパク質合成に用いた DNA 濃度には依存しないことを示唆している。始めに、図 2-4b の結果を用いて、ベシクルを 0.464- 2.15、2.15- 10、10- 46.4、46.4- 215、215- 1000　fL の体積で区分した。続いて、各体積区分の〈f〉と〈V〉を算出した。このデータは、等式 log〈f〉=(-1/3) log〈V〉+c にフィットした。このフィッティングには、等式 log〈f〉=n log〈V〉+c（n と c はフィッティングパラメーターである）を用いた。実験結果より、n = -0.41、c = -0.53 となった。

2-3　考察

EmrE-myc をベシクル内部で合成した後、AF 488 で修飾された抗 myc 抗体で免疫染色し、顕微鏡観察を行った結果、タンパク質合成を行わなかったベシクルが蛍光を持たなかったのに対し、EmrE-myc を内部で合成したベシクルは、外縁部に蛍光が見られた。また、FACS による解析では、鋳型として用いる EmrE-myc 遺伝子の濃度が高いほどより強い蛍光を発しているのに対し、EmrE-FLAG を内部で合成したベシクルは、蛍光を持たなかった。これらの結果は、EmrE がベシクル内部で合成され、POPC 膜に挿入されたことを示唆している。また、抗 myc 抗体の濃度を増やしても、蛍光シグナルは増加しなかった(データは示していない)。このことから、用いた抗体の量は、ベシクル表面の myc タグをほぼすべて染色するのに十分な量であったことが示唆される。

ベシクル内部で EmrE-myc および E14C を合成した後 EtBr の取り込みを蛍光顕微鏡で観察した結果、EmrE-myc を呈示するベシクルが EtBr の蛍光を示したのに対し、E14C を呈示するベシクルは蛍光を示さなかった。FACS による解析においても、EmrE-myc を呈示する GUV は E14C を呈示する GUV よりも、著しく高い EtBr の蛍光を示していた。さらに、EmrE-myc を呈示する GUV の内外の pH 勾配を逆(GUV 外を内部より酸性にする)にすることによって、EtBr の蛍光が低下した。これらの結果より、ベシクル内部で合成された EmrE は、膜に挿入されただけでなく、輸送活性も示すことが明らかとなった。加えて、膜に挿入された EmrE は

活性を持つアンチパラレルホモダイマーとして存在していることが示唆される。

EmrE 合成がベシクル体積に依存するかどうかを明らかにするために、ベシクル内部で合成された全ての EmrE 分子数(N_{total})を概算する事を試みた。その結果、ベシクル内部とバッチの *in vitro* タンパク質合成量が同じであることを導き出した。つまり、体積 V のベシクルの N_{total} を、バッチ合成で得られた EmrE の濃度を用いて、$N_{total}=[E]_0V$ と書き表せることを確認した。この結果は、本研究で用いた界面通過法とは、異なるベシクル調製方法を用いた先行研究の結果とは一致しない[Saito et al., ChemBioChem, 2009][Kato et al., Sci. Rep., 2012][Nourian et al., Angrew. Chem., 2012]。それらと本研究の結果の間の相違の理由は、不明である。しかしながら、界面通過法でベシクルを調製すると、ベシクル内部とバッチ合成でほとんど合成量に差異が認められないことは重要である。また、この結果は界面通過法を用いて行われた先行研究とは整合性があり、再現性がある[Nishimura *et al., Langmuir*, 2009]。

FACS 解析の結果より求めた各ベシクルの体積と N_{myc} を用いて、単位表面積当たりの EmrE の密度を求めた結果、EmrE の密度は合成に用いた DNA 濃度に依存するが、ベシクルの体積には依存せず一定であることが明らかとなった。また、最大濃度の DNA を用いた場合(3 nM)の EmrE の表面密度は、1 μm^2 あたりおよそ 300 分子であることが明らかとなったが、*E.coli* 細胞の膜タンパク質の表面密度は 1 μm^2 あたりおよそ 10^5 分子である。よって GUV における膜タンパク質の表面密度は、*E.coli* よりも 1000 倍低いことが分かった。これは GUV に、さらに膜タンパ

ク質を挿入できる余地があることを示唆している。

最後に、単位表面積当たりの脂質モル濃度を η と定義し、合成された EmrE が凝集体を形成する場合と脂質膜に挿入される場合の 2 通りの不可逆的反応を想定し、反応速度式を解いた。その結果、セクション 2-2-5 において V と f の関係を両対数プロットすると、傾きが-1/3 となった事や、セクション 2-2-4 において EmrE の表面密度がベシクルの体積には依存しなかった事、さらにセクション 2-2-3 で N_{total} と N_{myc} の関係を両対数プロットすると、傾きが 3/2 になった事を合理的に説明できることを明らかにした。

モデルと実験結果が一致するということは、これまでの実験で膜挿入に関して得られた傾向(DNA 濃度が一定の場合に EmrE の表面密度が一定であることや、f と V の対数プロットをとった時に直線性があること)は、より小さいベシクルでは、脂質濃度が増加することによって説明できるということを示唆している。しかしながら、脂質濃度[L]は曲率と直線性がある。f は比表面積に依存することは明らかである。しかしながら、f の体積依存性が、$[L]$ もしくは、ベシクルの $1/r$ によるものかどうかは判別できない。それでも我々は、$[L]$ の効果の方が $1/r$ よりもずっと大きいと確信している。なぜならば、f と $[L]$ の直線性は質量作用の法則によって説明可能だが、f と $1/r$ の直線性を説明できるメカニズムは存在しないためである。

補足

式 1 の導出について

本文中に記述している通り、体積 V のベシクルの脂質濃度$[L]$は以下のように表せる。

$$[L] = \frac{\eta A}{V} \tag{a}$$

ベシクル半径 r と表面積 A、体積 Vの関係より、以下の式を得ることができる。

$$A = \frac{3}{r}V$$

これを式 a に代入すると、以下の式を得ることができる

$$[L] = 3\eta\frac{1}{r} \tag{b}$$

r は、V を用いて、

$$\mathrm{r} = (\frac{3}{4\pi})^{\frac{1}{3}}V^{\frac{1}{3}}$$

と表せる。これを式 b に代入すると、本文中の式 1 が得られる。

$$[L] = \frac{\eta A}{V} = cV^{\frac{-1}{3}}$$

$$c = 3\eta(\frac{3}{4\pi})^{\frac{-1}{3}}$$

式 3 の導出について

本文中に記述した通り、f は以下のように表せる。

$$f = \frac{[N_{myc}]}{[N_{total}]}$$

$$= \frac{c}{K} V^{\frac{-1}{3}}$$

(c)

$N_{total} = [E]_0 V$をこの式に代入すると以下の式を得ることができる。

$$\frac{[N_{myc}]}{[N_{total}]} = \frac{c}{K} V^{\frac{-1}{3}} = \frac{c}{K} \left(\frac{N_{total}}{[E]_0}\right)^{\frac{-1}{3}}$$

この式を N_{total} について解くと、本文中の式 3 を得ることができる。

$$N_{total} = \left(\frac{K}{c}\right)^{\frac{3}{2}} [E]_0^{\frac{-1}{2}} (N_{myc})^{\frac{3}{2}}$$

式 4 の導出について

式 c より、以下の式を得ることができる。

$$\frac{[N_{myc}]}{[N_{total}]} = \frac{c}{K} V^{\frac{-1}{3}}$$

これを N_{myc} について解くと、以下の式を得られる。

$$[N_{myc}] = \frac{c}{K} [E]_0 V^{\frac{2}{3}}$$

(d)

体積 V と表面積 A の関係から、式 d を変形すると本文中の式 4 を得ることができる。

$$[N_{myc}] = \frac{c}{K}[E]_0 \frac{A}{(4\pi)^{\frac{1}{3}} \cdot 3^{\frac{2}{3}}}$$

$$\frac{[N_{myc}]}{A} = \frac{c}{K}[E]_0 \frac{1}{(4\pi)^{\frac{1}{3}} \cdot 3^{\frac{2}{3}}} \qquad 4$$

表記法

V	GUV の体積
A	GUV の表面積
η	単位表面積あたりの脂質分子のモル数
L	体積 Vのベシクルの脂質濃度
N_{total}	体積 Vのベシクル中で合成された EmrE の総分子数
N_{myc}	体積 Vのベシクルの膜に挿入された EmrE の分子数
$[E]_0$	バッチ合成で得られる EmrE 濃度
f	EmrE の膜挿入効率
Agg	ベシクル中で凝集体を形成している EmrE 濃度
EL	ベシクル膜に挿入された EmrE 濃度
r	ベシクルの半径

3 章　トランスポーターに対する Liposome display 法の適用

1 章で述べたように、進化分子工学は、数々の水溶性の機能分子の創出に成功してきた。しかしながら、膜タンパク質の機能・性質の改変に関しては、未だ活用しきれていない。その原因は、膜タンパク質が持つ性質に寄るところが大きい。膜タンパク質は細胞中の発現量が少ないうえに、疎水性が高く、過剰発現させることで細胞中において凝集体を形成して細胞毒性を持つことが多い。また、膜組成は膜タンパク質の機能に関係があるため、本来の宿主と異なるホストを用いて過剰発現を行うことができたとしても、膜組成の違いからタンパク質の機能が損なわれてしまうことがある[Lagane *et al., J. Biol. Chem.*, 2000]。

こうした問題がありながらも、近年、進化分子工学的手法によって、膜タンパク質の発現を向上させた例が報告され始めている。2008 年 Plückthun らが、大腸菌の細胞内で野生型の生化学的活性を保ったまま、発現量が 10 倍増加したニューロテンシン受容体 1 (NTR1)の変異体を創出した[Sarkar., et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 2008]のを皮切りに、タキキニン受容体 NK1、アドレナリン受容体など数種類の GPCR に関して発現量を増加させた変異体の創出に成功している[Dodevski and Plückthun, *J. Mol. Biol.,* 2011]。また、2011 年 Weiss らが、ファージディスプレイを用いて β-バレル型の膜タンパク質の高発現型変異体を創出した [Lluis *et al., Protein. Eng. Des. Sel.,* 2012] 。

ただし、こうした細胞を用いた膜タンパク質の進化工学には制限も多い。細胞毒性を持つ膜タンパク質の変異体を得ることが出来ない他、宿主となる細胞によって発現量にバイアスがかかる可能性がある他、本来の宿主と進化実験に用いる宿主の膜組成の違いから膜タンパク質の生化学的活性が損なわれる可能性がある。

細胞をベースにした進化分子工学の問題点を克服する手法として、細胞を用いない *in vitro* 進化分子工学的手法である Liposome display が報告された[Fujii *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 2013]。Liposome display では、まず無細胞翻訳系を、膜タンパク質をコードする遺伝子ライブラリーと共に、細胞サイズの脂質二重膜ベシクル(リポソーム)に封入し、内部でタンパク質合成することによって膜タンパク質をベシクルに呈示させる。次に、膜タンパク質を介して蛍光基質を取り込んだベシクルを、FACS aria を用いてソートし、ベシクル内部の遺伝子を回収、増幅することで膜タンパク質を進化させる。Liposome display を用いた膜タンパク質の進化の例は、現在、可溶性の特殊な膜タンパク質に限定されている。そこで私は、Liposome display をより一般的な不溶性の膜タンパク質への応用を試みた。

本章では、EmrE を膜タンパク質のモデルとして用いて予備実験(図 3-1)を行い、不溶性の膜タンパク質に Liposome display を応用するための条件決定を行った。予備実験では、EmrE-myc と EmrE-FLAG をそれぞれコードする遺伝子プールから膜タンパク質を呈示したベシクルを調製し、蛍光標識された抗 myc 抗体で免疫染色されたベシクルを FACS aria を用いてソートすることで、EmrE-myc をコードする遺伝子を濃縮した。

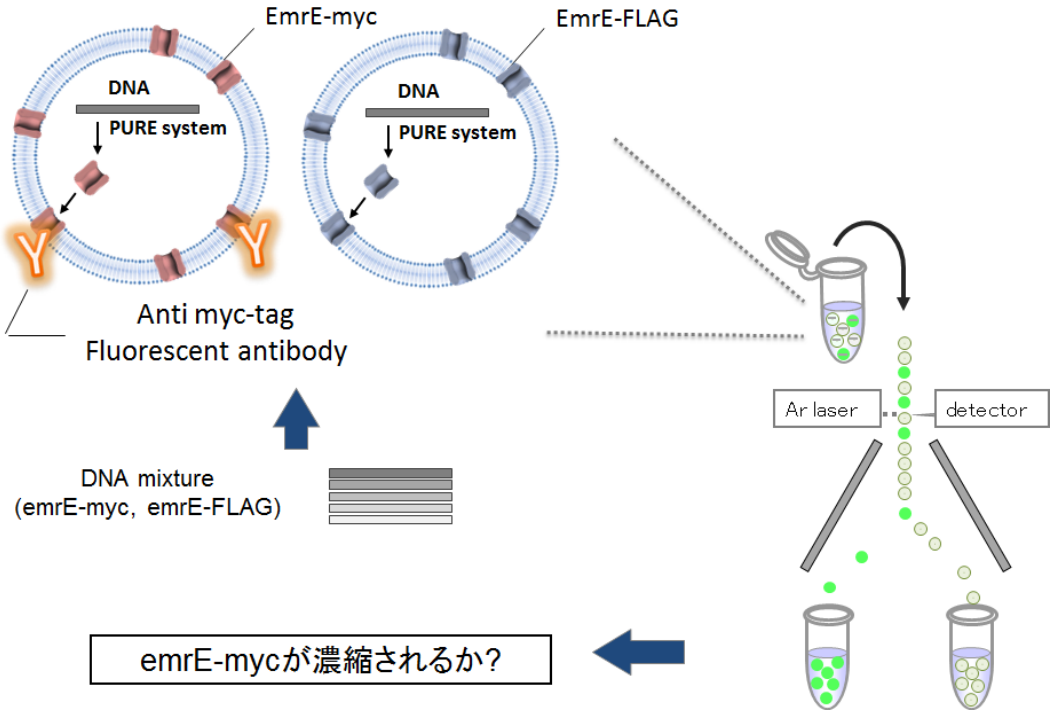


図 3-1　Liposome display 予備実験
始めに、EmrE-myc と EmrE－FLAG をそれぞれコードする遺伝子を 1:9 で混合した溶液を、DNA 1 分子レベルで PURE system と共にリポソームに封入し、内部でタンパク質合成を行う。次に、AF 488 で修飾された抗 myc 蛍光抗体を用いてリポソームを免疫染色する。その後、FACS を用いて AF 488 の蛍光強度を指標にソーティングを行う。ソート後溶液から DNA を回収し、EmrE-myc と EmrE-FLAG をコードする遺伝子の割合を求め、emrE-myc 遺伝子の濃縮率を算出した。

3-1　材料と方法

プラスミド構築

本章で使用したプラスミド、および PCR プロダクトの調製については 2 章「プラスミド構築」を参照。

GUV 内部タンパク質合成

本章における GUV 内部タンパク質合成に用いた試薬、GVU 調製方法につていては 2 章「細胞サイズのベシクルの調製」を参照。本章より、GUV 外部の DNA を除去する目的で、外液に DNase I (タカラバイオ)を終濃度 2.5 濃 10^{-2} U/μL で加えてタンパク質合成反応を行った。また、T7 RNA ポリメラーゼ濃度、鋳型として用いる PCR プロダクト濃度、および、タンパク質合成反応時間については、本章で検討するため、本文中に記載している。

ベシクルの免疫染色

本章における、抗 myc 蛍光抗体を用いた免疫染色方法、用いた抗体については 2 章「ベシクルの免疫染色」を参照。タンパク質合成反応後のリポソーム液 100 μL を BSA 入り希釈液で希釈し、終濃度 5 μg/mL となるように抗体を加え、さらに、DNase I を液量の 1/200 量加えて、37 ℃30 分インキュベートした。その後、遠

心沈降でリポソームをペレット化し、BSA 入り等張液を 630 μL 加えて懸濁した。ペレット化した免疫染色後ベシクルを懸濁する希釈液中に含まれる BSA 濃度は、特に記載がない限り 0.1 %の濃度で使用した。

FACS aria Ⅱによる GUV の解析とソート

GUV の免疫染色後溶液 100 μL に、540 μL の希釈液に再懸濁して FACS aria Ⅱで解析した。

解析に用いたレーザーの波長やバンドパスフィルターは、2 章「FACS による GUV の解析」を参照。GUV の定義についても、2 章「FACS による GUV の解析」を参照。

FACS によるソートでは、まず体積ごとに 3 種類のゲート(P7、P12、P13)を定義した。ゲートの定義は、50000 イベント測定した時に、各ゲート内に約 10000 イベントの GUV が検出されるように体積を三つに分割した。この際、体積の指標として TA647 の蛍光強度を使用した。

ソートに用いたゲートは、P7, P12, P13 ゲート中において、AF 488 の蛍光強度を指標に上位数%(本文中に記載)のベシクルを 15000 イベントソートした(それぞれ P7'、P8'、P9'ゲートとする)。また、ソート前のサンプルとして、P7, P12, P13 ゲートについて、それぞれ 15000 イベントソートした。

FACS verse による GUV の解析

3-2-2 の T7 RNA ポリメラーゼ濃度の検討では、FACS verse(Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を用いて GUV の解析を行った。AF 488 は、波長 488 nm の半導体レーザーで励起し、波長 527±16 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出した。TA 647 は、波長 640 nm のヘリウムネオンレーザーで励起し、波長 660±5 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出した。100000 個のベシクルの蛍光強度を測定した。

ソート後 GUV からの RNA の回収

ソート後 GUV からの RNA の回収は、RNeasy Mini Kit(QIAgen, Hilden, Germany)を用いて行った。ソート後サンプルに milliQ を加えて総量 100μL に調製した後、メーカー説明通りに操作を行い、milliQ 30 μL を用いて RNA をカラムから溶出した。

逆転写反応

回収した RNA の逆転写反応は、PrimeScript™ RT reagent Kit(タカラバイオ)を用いた行った。RNeasy Mini Kit で精製した RNA 溶液 27 μL を鋳型として用い、プライマーは EmrE484L(5' —ATGGTCTACAGCGCTATTCA —3')を用いてメーカー説明通りに試薬を混合した。逆転写反応は、42 ℃45 分行った後 85 ℃で 5 秒インキュベートして行った。

qPCR による定量

逆転写反応物中の EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子の定量は、SYBR® Premix Ex Taq™ II(タカラバイオ)を用いて行った。鋳型として用いる逆転写反応物は、PrimeScript™ RT reagent Kit 添付の EASY Dilution バッファー(タカラバイオ)を用いて 20 倍希釈して qPCR に用いた。50 μL 反応溶液中に、SYBR® Premix Ex Taq™ II 25 μL 、forward primer (10 μM) 2 μL、reverse primer(10 μM) 2μL, 10verse pe 1 μL, 鋳型 DNA 10 μL と milliQ を含む溶液を調製し、1 サンプルにつき、20 μl のスケールで反応させ、リアルタイム qPCR 機器（Mx3005P ；Agilent Technologies, カリフォルニア, 米国)で測定した。

emrE-myc と emrE-FLAG のコピー数の比を求めるために、同一 DNA サンプルにつき Myc R primer (5'—TTCACTTATTAATTTTTGCTCAA—3') と FLAG R primer (5'—TTTATCATCGTCATCCTTATAGTC—3'）を用いてそれぞれ測定した。Forward primer は、EmrE F primer (5'—GATTAGCTTACTGTCATGGG—3') を共通で用いた。qPCR 条件は、《95 ℃ 30sec → (95 ℃ 5 sec →60℃ 30sec) ×40 cycles → 95℃ 1 min → 50 ℃ 30 sec → 95 ℃ 30 sec 》とした。

濃縮率の算出方法

濃縮率は、P7、P8、P9 の各ゲートで算出した。P7~P9 の各ゲートの AF 488 蛍光強度上位数%(本文中に記載)から回収した EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝

子のコピー数の比を、P7~P9 の EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子の比で割った値を、濃縮率(Enrichment factor)と定義した。

例として、P7 ゲートの濃縮率の計算式を以下に示す。

$$\text{Enrichment factor} = \frac{(\mathrm{E}mrE - myc_{P7'}) \div (\mathrm{E}mrE - FLAG_{P7'})}{(\mathrm{E}mrE - myc_{P7}) \div (EmrE - FLAG_{P7})}$$

EmrE-myc_{P7}、EmrE-$FLAG_{P7}$、EmrE-$myc_{P7'}$、EmrE-$FLAG_{P7'}$ はそれぞれ、P7 ゲート内の EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数、P7'ゲート内の EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数とする。

3-2　結果

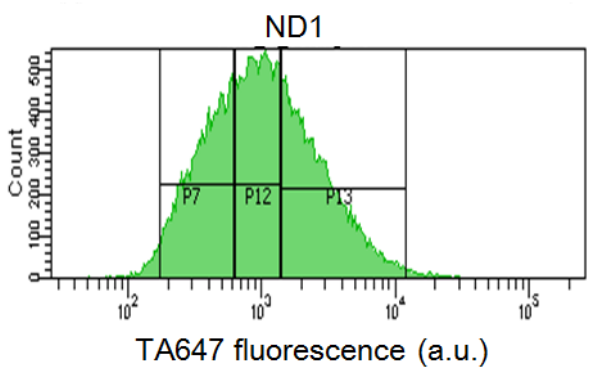
3-2-1　ND フィルターの検討

本実験においてタンパク質合成に用いる PURE system には、GUV の体積マーカーとして TA 637 を用いている。よって TA 647 の蛍光強度のヒストグラムは、ベシクル液に含まれる GUV の体積分布を表している。DNA はポワソン分布に従って GUV に封入されるため、体積が小さい GUV の方が DNA の 1 分子化が起こる確率が高い。したがって、進化実験では、小さい体積区分の GUV をソートする。FACS aria Ⅱ では、前方散乱光(FSC；粒子の体積を示す値)の検出器の前に ND フィルターが設置されており、これを変更することで検出する粒子の大きさを調整することができる。ND フィルター1 は、前方散乱光のシグナルを 10%まで減衰させ、ND フィルター2 は、前方散乱光のシグナルを 1%まで減衰させる。そこで EmrE-myc を呈示したベシクル溶液を調製して FACS aria Ⅱ を用いて解析を行い、ND フィルター1 と 2 を用いた場合の TA647 の蛍光強度のヒストグラム(GUV の体積分布)を取得した。その後体積の大きい方から P13、P12、P7 ゲートに区切り、P7 ゲートの GUV が多くなる条件を調べた。

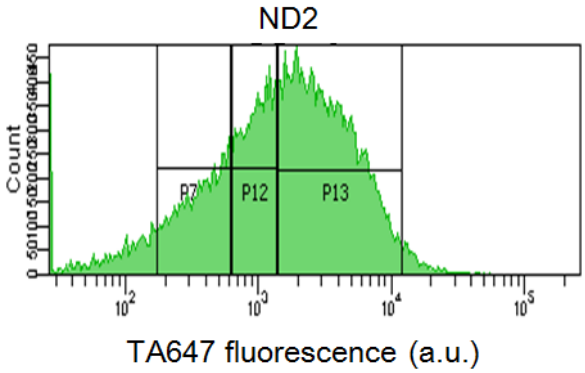
この実験では、T7 RNA ポリメラーゼ濃度 0.2 μM、EmrE-myc 遺伝子 50 pM を含む PURE system を用いて 37 ℃ 2 時間ベシクル内合成を行った。

ND フィルター1 を用いた場合、全ベシクル(50000 イベント)中の GUV の数は 39173 イベントであった。その内、一番小さい体積区分である P7 ゲート中に入る GUV は 10268 イベントであった(図 3-2a、c)。ND フィルター2 を用いた場合、全ベシクル(50000 イベント)中の GUV の数は 30484 イベントであった。その内、P7 ゲート中に入る GUV は 4453 イベントであった(図 3-2b、c)。P7 ゲートに入る GUV のイベント数が ND フィルター1 を用いた場合の方が多かったので、ソートには ND フィルター1 を利用する事に決定した。

(a)



(b)



(c)

	ND1	ND2
ベシクル溶液中のGUV数 (event)	39173	30484
P7ゲート中のGUV数 (event)	10268	4453

図 3-2 ND フィルターの設定と GUV の体積分布の関係
(a)(b)は、各 ND フィルターを用いた場合の GUV の体積分布を示している。横軸は TA 647 の蛍光強度、つまり GUV の体積を示している。縦軸は、イベント数を示している。P13、 P12、P7 は、GUV の大、中、小の体積区分である。この体積区分は、全ベシクル 50000 イベント中、各区分に GUV が 10000 イベント入るように決定した。(c)は、用いた ND フィルターごとに検出した全イベント数の中の GUV の数と、一番小さい体積区分 (P7)中の GUV の数を示した表である。

3-2-2　タンパク質合成反応に用いる T7 RNA ポリメラーゼ濃度の検討

ソート実験では、AF 488 で修飾された抗 myc 抗体が持つ蛍光強度を指標に、AF 488 の蛍光強度の上位数%のベシクルを選択的に取得する。よって、myc タグを呈示していないベシクルと myc タグを呈示しているベシクルの蛍光強度の差がより大きい方が望ましい。そこで、タンパク質合成量を T7 RNA ポリメラーゼの濃度で調整し、EmrE-FLAG を呈示するベシクルが示す AF 488 の蛍光強度と EmrE-myc を呈示するベシクルが示す AF 488 の蛍光強度の差が大きくなる条件を調べた。解析には FACS verse を用いた。ここでは、図 3-3a に示すように、EmrE-FLAG を呈示する GUV をネガティブコントロールとして用い、EmrE-FLAG を呈示する GUV を抗 myc 抗体で免疫染色したサンプルのうちの 0.32 %を含む領域を、AF 488 蛍光を持つベシクル集団(positive)と定義し、EmrE-myc を呈示する GUV と比較した。

この実験では、T7 RNA ポリメラーゼ濃度を 0.12、0.5、1、2 μM で条件を振り、EmrE-myc 遺伝子 25 pM を含む PURE system を用いて 37 ℃ 4 時間ベシクル内合成を行った。

図 3-3 b～e はそれぞれ T7 RNA ポリメラーゼを 0.12、0.5、1、2 μM 用いて EmrE-myc をベシクル内部で合成し、AF 488 で修飾された抗 myc 抗体で免疫染色した場合の FACS 解析である。AF 488 の蛍光を持つ GUV の割合はそれぞれ、0.73、2.36、3.41、3.49 %であった。よって T7RNA ポリメラーゼを 2 μM 用いた場合が、

positive ゲートに入った GUV の割合が一番多かったため、タンパク質合成に用いる T7 RNA ポリメラーゼ濃度は 2 μM に決定した。

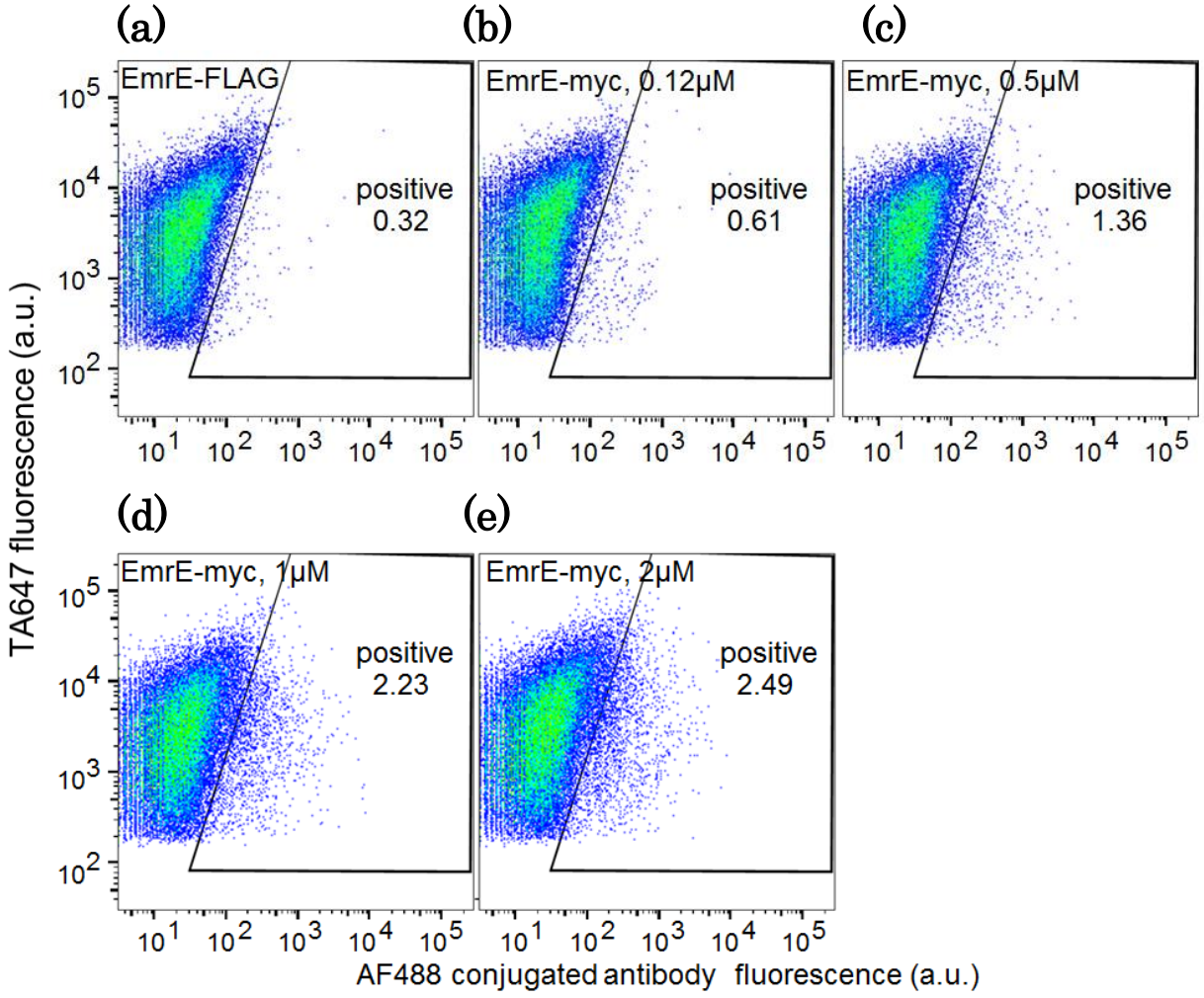


図 3-3 タンパク質合成反応に用いる T7 RNA ポリメラーゼ濃度の検討
(a)~(e)は、FACS 解析結果である。縦軸は体積マーカーである TA 647 の蛍光強度、横軸は AF 488 で修飾された抗 myc 抗体の蛍光強度を示している。それぞれのパネルの左上にベシクル内部で合成した膜タンパク質の種類と、合成に用いた T7 RNA 濃度を示している。パネル中の positive ゲートは AF 488 の蛍光を持つ GUV の集団を示しており、ゲート中の数値は、検出された GUV のうち positive ゲートに含まれるベシクルの割合(%)である。

3-2-3　鋳型として用いる DNA 濃度の検討

次に鋳型として用いる DNA 濃度と濃縮率の関係について調べた。タンパク質合成に用いる DNA 濃度を上げれば、FACS 解析上ではネガティブコントロールと試料の AF488 蛍光の差は大きくなるが、一方で、一つのベシクルに複数個の DNA が封入されてしまい、結果的に目的遺伝子の濃縮率を下げる要因になる。逆に、より薄い DNA 濃度にすれば、FACS 解析上でネガティブコントロールと試料の AF488 蛍光の差は小さくなることが予想されるが、目的遺伝子の 1 分子化が起こる確率が高くなり、結果的に濃縮率が高くなる可能性がある。そこで、EmrE-myc をコードする DNA と EmrE-FLAG をコードする DNA を 1:9 の割合で混合して、その DNA 混合液をタンパク質合成反応の鋳型として用い、ベシクルを調製した。その際 DNA 濃度を 25、50 pM で検討し、大中小 3 つの体積区分で AF 488 蛍光強度の上位 0.5 %を FACS aria Ⅱ でソートした。その後、ベシクル内部の DNA を回収して qPCR によって定量を行い、EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子の比を求めることで濃縮率を算出した。そして、用いた DNA 濃度と濃縮率との関係や濃縮率の体積依存性について調べた。

この実験では、上記の DNA 混合液濃度を 25、50 pM で条件を振り、T7 RNA ポリメラーゼ濃度 2 μM を含む PURE system を用いて 37 ℃ 6 時間ベシクル内合成を行った。

DNA 混合液を 25 pM 用いた場合、体積が大きい方のゲートから、濃縮率はそれぞれ 4.3、2.5、4.7 倍であった(図 3-4a)。DNA 混合液を 50 pM 用いた場合は、体積が大きい方のゲートから、濃縮率はそれぞれ 1.8、4.0、2.2 倍であった。よって、DNA 濃度は 25 pM の方が高く、ソートに適していることが明らかとなったため、DNA 濃度 25 pM でソートを行うことに決定した。

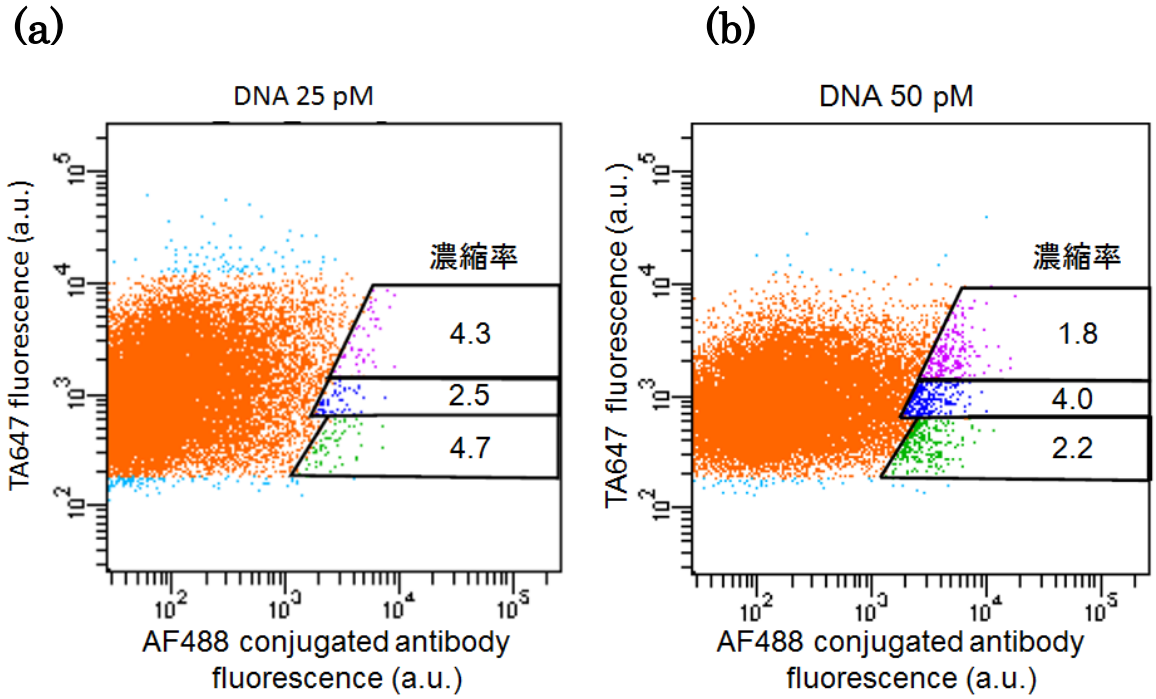


図 3-4 鋳型として用いる DNA 濃度と濃縮率の関係
(a)(b)は各 DNA 濃度を用いた場合の FACS 解析結果である。縦軸は、体積マーカーである TA 647 の蛍光強度を示しており、横軸は AF 488 で修飾された抗 myc 抗体の蛍光強度を示している。パネル中のゲートは、ソートを行ったゲートを示している(各体積区分の AF488 蛍光強度上位 0.5 %)。またゲート内の数値は各体積区分における EmrE-myc 遺伝子の濃縮率を示している。濃縮率の算出方法は、材料と方法に記述している。(a)は DNA 混合液を 25 pM 用いた時の GUV の各体積区分と濃縮率の関係。(b)DNA 混合液を 50 pM 用いた時の GUV の各体積区分と濃縮率の関係。

3-2-4　タンパク質合成反応時間および等張液中の BSA 濃度の検討

次にタンパク質合成反応時間および等張液中の BSA 濃度と濃縮率の関係について調べた。タンパク質合成時間を延ばすことによって、FACS 解析上ではバックグラウンドとシグナルの AF 488 蛍光の差は大きくなるが、より多くの膜タンパク質がベシクル膜に挿入されることで、ベシクルの崩壊や凝集を引き起こす可能性がある。よってタンパク質合成反応時間と濃縮率の関係について調べる必要があると考えた。また、一般に高分子化合物等の凝集・吸着を防ぐ目的で BSA が使用されているため、等張液中の BSA 濃度と濃縮率の関係も並行して調べた。

EmrE-myc をコードする DNA と EmrE-FLAG をコードする DNA を 1:9 の割合で混合して、タンパク質合成反応の鋳型として、その DNA 混合液を濃度 25 pM 用いた。その際 37 ℃でタンパク質合成を行う時間を 4、6 時間で検討した。また、抗 myc 抗体による免疫染色において用いる等張液中の BSA 濃度も 0.5、1.5 %で検討した。そして、大中小 3 つの体積区分で AF 488 蛍光強度の上位 0.4 %を FACS aria Ⅱ でソートした。その後、ベシクル内部の DNA を回収して qPCR によって定量を行い、EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子の比を求めることで濃縮率を算出した(濃縮率の算出方法は方法のセクションで述べている)。最後に、タンパク質合成時間および等張液中の BSA 濃度と濃縮率の関係や濃縮率の体積依存性について調べた。

図 3-5a は BSA 濃度 0.5 %の等張液を用いてタンパク質合成反応を 4 時間行った時の GUV の各体積区分と濃縮率の関係である。体積が大きい方のゲートから、濃縮率はそれぞれ 8.1、8.8、9.4 倍であった。図 3-5b は BSA 濃度 0.5 %の等張液を用いてタンパク質合成反応を 6 時間行った時の GUV の各体積区分と濃縮率の関係である。体積が大きい方のゲートから、濃縮率はそれぞれ 5.6、6.1、5.3 倍であった。図 3-5c は BSA 濃度 1.5 %の等張液を用いてタンパク質合成反応を 4 時間行った時の GUV の各体積区分と濃縮率の関係である。濃縮率は、体積が大きい方のゲートから、それぞれ 14.3、14.3、19.4 倍であった。図 3-5d は BSA 濃度 1.5 %の等張液を用いてタンパク質合成反応を 6 時間行った時の GUV の各体積区分と濃縮率の関係である。濃縮率は、体積が大きい方のゲートから、それぞれ 11.7、14.7、13.7 倍であった。つまり、合成時間 4 時間、BSA 濃度 1.5 %の条件で、濃縮率が一番高くなった。よってソートでは合成時間 4 時間、BSA 濃度 1.5 %を用いることに決定した。

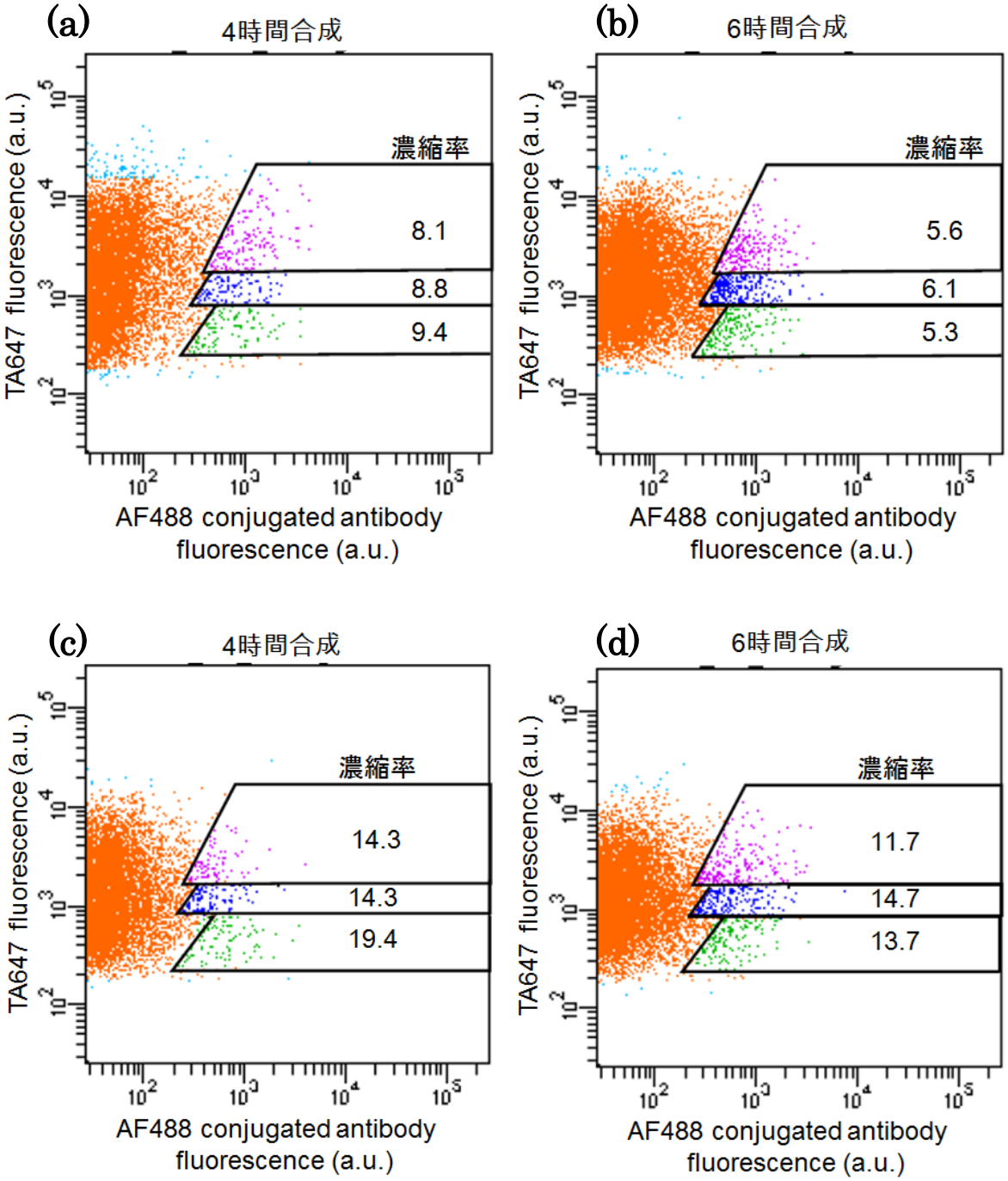


図 3-5 タンパク質合成反応時間および等張液中の BSA 濃度と濃縮率の関係
(a)～(d)はタンパク質合成時間と BSA 濃度を変えて調製したサンプルの FACS 解析結果である。図の縦軸は、体積マーカーである TA 637 の蛍光強度で、横軸は抗 myc 抗体を示す AF 488 の蛍光強度である。パネル中のゲートは、ソートを行ったゲートを示している(各体積区分の AF488 蛍光強度上位 0.4 %)。またゲート内の数値は各体積区分における EmrE-myc 遺伝子の濃縮率を示している。

3-3　考察

EmrE-myc を呈示するベシクル 50000 イベントを、ND フィルター1 と 2 を用いて FACS aria Ⅱ で解析し、体積分布を比較した。その結果、実際のソートに用いる P7 ゲートに入る GUV の数は、ND フィルター1 を用いた場合の方が多かった。このことから、ソートには ND フィルター1 を利用する事に決定した。

ベシクルを調製する際に使用する DNA 濃度を 25、50 pM で検討した結果、25 pM の方が、より濃縮率が高かった。これは、DNA 濃度が低い方が、GUV 内部における DNA の 1 分子化が起こりやすく、EmrE-FLAG 遺伝子と EmrE-myc 遺伝子の両方を含むベシクルを回収してしまう確率が下がるためであると考えられる。タンパク質合成時間を 4、6 時間で検討した結果、4 時間合成した場合の方が、濃縮率が高かった。これは、GUV 膜に多くの膜タンパク質が挿入されることによって、GUV の崩壊や凝集が起こったためと考えられる。また、同じ時間タンパク質合成を行った場合でも、等張液に用いる BSA 濃度を上げることによって、濃縮率が増加する事については、BSA が GUV 同士の結合や、崩壊したベシクル由来の EmrE-myc が EmrE-FLAG を呈示する GUV に結合する事を軽減したためであると考えられる。

濃縮率とその体積依存性については、理論的には、より小さい体積区分において DNA の 1 分子化が起こりやすくなるために、体積が小さくなるにしたがって濃縮率が高くなるはずである。しかし、DNA 濃度を検討した実験(3-2-3)、タンパク質

合成時間および等張液中の BSA 濃度の検討の実験(3-2-4)において、必ずしもそうはなっていない。3-2-4 の結果については、BSA 濃度に関係なく合成時間 4 時間の場合に、濃縮率の体積依存性がある(より小さい体積区分で濃縮率が高くなる)のに対し、合成時間 6 時間の場合は体積依存性が無かった。この結果は、膜タンパク質の呈示量が増加すると、濃縮率の体積依存性が崩れることを示唆している。これは、膜タンパク質の呈示量が多くなったために GUV の崩壊や凝集、崩壊したベシクル由来の EmrE-myc が GUV に挿入される事が起こったため、本来ソートされないベシクルを一緒にソートしてしまった結果であると考えられる。BSA にベシクル同士の結合や崩壊したベシクル由来の膜タンパク質が他のベシクルへの挿入される事を防ぐ効果があると仮定すると、同じ 4 時間合成の場合でも、BSA 濃度が高い方が、濃縮率が高くなる事を合理的に説明できる。

4 章　バイオパニングを用いた Liposome display 法の開発

Liposome display は、進化分子工学における *in vitro* compartmentalization と *in vitro* display の二つの性質を持つ手法である。

3 章の予備実験では、ベシクル表面に呈示された EmrE に付加されているエピトープタグの種類による遺伝子の選別を行ったが、EmrE の基質の 1 つである EtBr を内部に蓄積させることで、EmrE の輸送活性を指標に目的遺伝子を選別することも理論的に可能である。

ベシクル内部への蛍光基質の蓄積を可能にしているのは、Liposome display 法が、細胞様区画に変異体遺伝子を 1 分子レベルで“閉じ込める(compartmentalize)”ことによって、遺伝子型と表現型の一致を達成しているためである。*in vitro* compartmentalization による進化分子工学的手法では、基質や生産物、遺伝子を一つの区画に“閉じ込める”ことによって新規のタンパク質を創出する。このような手法には、油中水滴(W/O エマルション)を用いた IVC(*in vitro* compartmentalization)法 [Tawfik and Griffiths, *Nat. Biotechnol.,* 1998] や CSR(compartmentalized self-replication) [Ghadessy *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,* 2001]法や、高分子電解質で殻を形成する、GSB(polyelectrolyte gel-shell beads)法[Gupta *et al., Nat. Chem. Biol.,* 2011] などがある、いずれも、ターゲットとするタンパク質は、水溶性タンパク質や DNA・RNA ポリメラーゼに限定され

ている [Packer. and Liu, *Nat. Rev. Genet.,* 2015]。

一方で、Liposome display 法は、名前の通りターゲットとなるタンパク質をベシクル上に “呈示する(display)” するという側面も持つ。*in vitro* display による進化分子工学的手法では、遺伝子とそれに対応するタンパク質を紐づけ呈示することにより、多種存在する分子の中から特定の基質に強く結合する分子を親和性に応じて選別する。バインディングアフィニティは、触媒効率や反応生成物の解離にとって非常に重要な性質である。こうしたアフィティーによる選別は、砂粒の中から砂金をふるいわけることになぞらえて、バイオパニングと呼ばれる。バイオパニングは、1997 年に報告された mRNA display[Roberts. and Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,* 1997]や Ribosome display[Hanes. and Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,* 1997]に始まり、最近でも、これまでのバイオパニングでは困難であった多量体タンパク質の呈示法[Sumida *et al., J. Nucleic. Acids.,* 2012]や単量体タンパク質を多コピー呈示することで選択性を向上させる SNAP dendrimer display[Kaltenbach *et al., ChemBioChem,* 2011]など、新たな手法が報告されている。

バイオパニングを Liposome display に応用する動機として、まず FACS を用いる場合、蛍光物質を基質とする膜タンパク質しか扱うことができないという欠点が挙げられる。その点、パニング法ならば、無蛍光物質を基質とする膜タンパク質の機能改変が可能となる。また、バインディングアフィニティによる選別は、概念的に単純であるため、市販のキットを用いることが可能である。そのため、実験設備

や実験者の練度による制限を抑えられると考えられる。

そこで本章では、MACS 細胞分離テクノロジー(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いてパニングによるリポソームの選別を行った。パニングによる Liposome display では、基質を介して MACS マイクロビーズで磁気標識されたベシクルを選別し、内部の DNA を回収、増幅させることで膜タンパク質の機能改変を行う(図 4-1)。MACS マイクロビーズを用いた理由は、磁気標識されたベシクル懸濁液が、細胞の分離に用いる MACS カラム中のマトリックスを通過する際、ベシクルが直接マトリックスに結合することはないとされ、ベシクルに与えるストレスが少ないと考えたからである。

本章では、まず MACS マイクロビーズをリポソームに応用できるかどうかを確かめるために、EmrE-myc を呈示するベシクルと EmrE-FLAG を呈示するベシクルから EmrE-myc を呈示するベシクルを選別するという予備実験を行った。その際、MACS マイクロビーズをリポソームに応用するためのバッファー条件や、実験操作の検討を行い、MACS マイクロビーズで EmrE-myc を呈示するベシクルの選別を可能にする実験条件・操作を確立した。

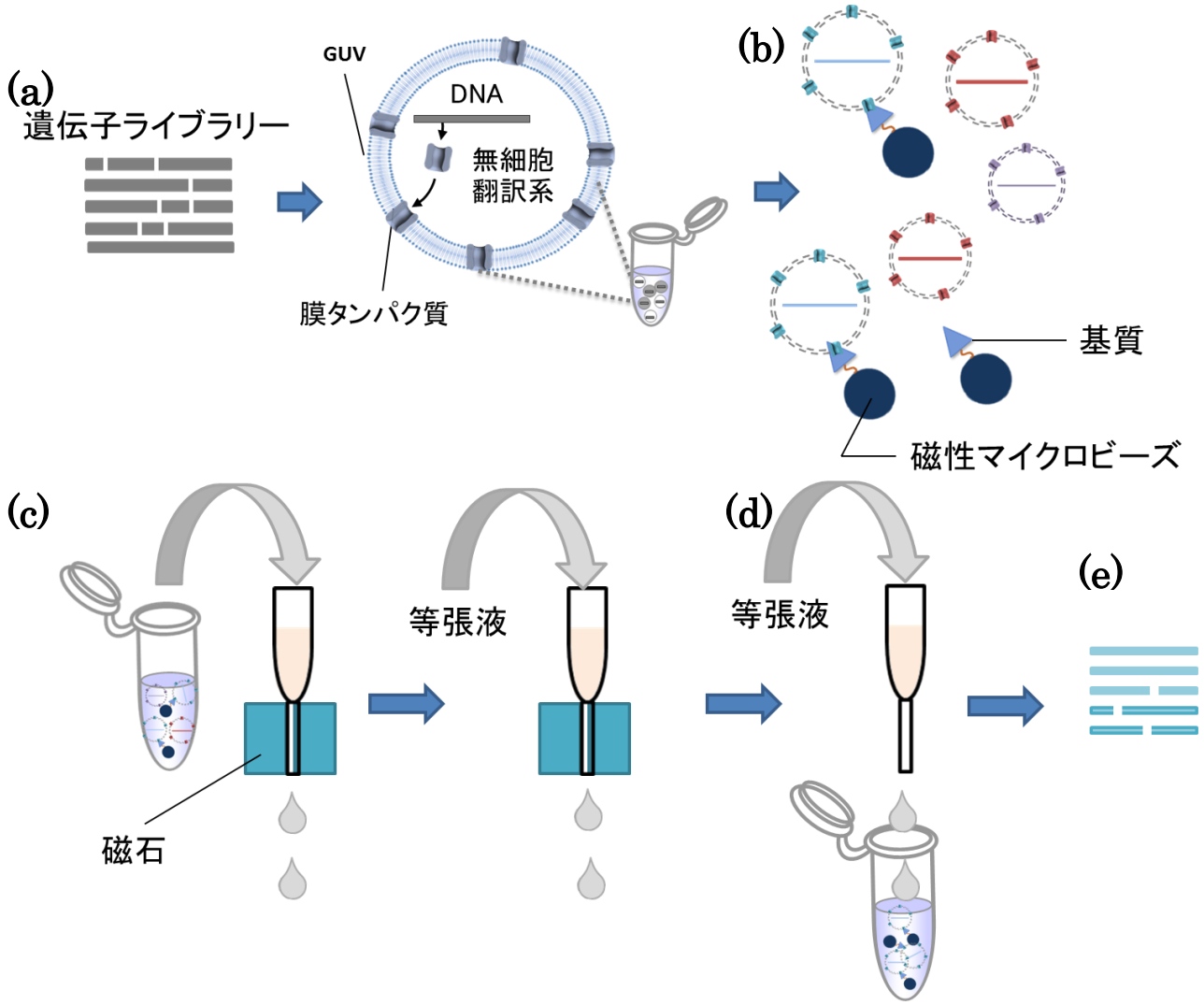


図 4-1 パニングによるリポソームディスプレイ法の模式図
(a)膜タンパク質変異体遺伝子ライブラリーを、各ベシクルに 1 分子レベルで無細胞翻訳系とともに封入し、タンパク質合成反応を行う。(b)ベシクル表面に呈示された膜タンパク質を介して、磁性マイクロビーズ上に固定された基質とベシクルを結合させる。(c)b の溶液を磁石に結合しているカラムにアプライする。そして、基質と未結合のベシクルは洗浄する。(d)カラムを磁石から取り外し、基質と結合したベシクルを回収する。(e)回収したベシクル中から精製した遺伝子を増幅し、(a)~(e)の操作を繰り返す。

4-1　材料と方法

プラスミド構築

本章で使用したプラスミド、および PCR プロダクトの調製については 2 章「プラスミド構築」を参照。

GUV 内部タンパク質合成

本章における GUV 内部タンパク質合成に用いた試薬、GVU 調製方法につついては 2 章「細胞サイズのベシクルの調製」を参照。GUV 外部の DNA を除去する目的で、外液に DNase I (タカラバイオ)を終濃度 2.5×10^{-2}U/μL で加えてタンパク質合成反応を行った。本章では、DNA 濃度は 25 pM でタンパク質合成反応を行い、EmrE-myc を合成するベシクルの内部体積指標として TA 647 を終濃度(1.5 μM)、EmrE-FLAG を合成するベシクルの内部体積指標として R-PE(終濃度 20 μM)で用いた。またタンパク質合成時の外液に BSA を 0.1 %加えた。T7 RNA ポリメラーゼ濃度と、タンパク質合成反応時間については、本文中に記載している。

FACS verse による GUV の解析

FACS verse(Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を用いて GUV の解析を行った。AF 488 は、波長 488 nm の半導体レーザーで励起し、波長 527±16 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出した。TA 647 は、波長 640 nm のヘリウムネ

オンレーザーで励起し、波長 660±5 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出した。R-PE については、波長 488 nm のヘリウムネオンレーザーで励起し、波長 586±21 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出した。100000 個のベシクルの蛍光強度を測定した。

ベシクルの免疫染色

本章における、抗 myc 蛍光抗体を用いた免疫染色方法、用いた抗体については 2 章「ベシクルの免疫染色」を参照。タンパク質合成反応後のリポソーム液 37.5 μL を 10 %BSA 入り希釈液で希釈し、終濃度 5 μg/mL となるように抗体を加え、さらに、DNase I を液量の 1/200 量加えて、37 ℃ 30 分インキュベートした。その後、6000 ×0、5 分間遠心沈降を行い、リポソームをペレット化して上清を取り除いた後、1.5 %BSA 入り等張液を 50 μL 加えて懸濁した。

MACS マイクロビーズと免疫染色後ベシクルの反応

免疫染色後のベシクル 100 μL に MACS マイクロビーズを 20 μL 加えて、8 ℃ で 10 分インキュベートした。その後 1.5 %BSA 入り希釈液 300 μL で希釈した。カラムアプライ前サンプルとして 50 μL 分取し、残りは MACS カラムによるベシクルのセレクションに用いた。

MACS カラムによるベシクルのセレクション

まず、カラムを平衡化するために、1.5 %BSA 入り希釈液 500 μL をカラムにアプライした。その後、MACS マイクロビーズと反応させたベシクルを全量、磁場に設置したカラムにアプライした。次に、1.5 %BSA 入り希釈液を 500 μL カラムに加え、カラムを洗浄した。カラムの洗浄を 3 回行った後、カラムを磁石から外し、1.5% BSA 希釈液を 500 μL 加えてベシクルを溶出した。最後に、6000 ×*g*、5 分間遠心沈降を行い、ベシクルをペレット化した後、上澄を取り除き、希釈液を 50 μL 加えて懸濁した。

カラムによるセレクション後ベシクルからの RNA の回収

ベシクルからの RNA の回収は、RNeasy Mini Kit(QIAgen)を用いて行った。サンプルに希釈液を加えて総量 100 μL に調製した後、メーカー説明通りに操作を行い、milliQ 30 μL を用いて RNA をカラムから溶出した。

逆転写反応

回収した RNA の逆転写反応は、PrimeScript™ RT reagent Kit(タカラバイオ)を用いて行った。RNeasy Mini Kit で精製した RNA 溶液 17.5 μl を鋳型として用い、プライマーは EmrE484L (5'—ATGGTCTACAGCGCTATTCA－3')を用いてメーカー説明通りに試薬を混合した。逆転写反応は、42℃45 分行った後 85℃で 5 秒インキュベートして行った。

カラムによるセレクション後ベシクルからの DNA の回収

4-2-3 カラム外しでは、qPCR を行うのに十分なコピー数の DNA が取れるため、ベシクルから直接 DNA を回収した。DNA の回収は、PCR purification kit (QIAgen) を用いて行った。メーカー説明通りに操作を行い、milliQ 16 μL を用いて DNA をカラムから溶出した。

qPCR による定量

逆転写反応物中の EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子の定量は、SYBR® Premix Ex Taq™ II を用いて行った。鋳型として用いる逆転写反応物は、PrimeScript™ RT reagent Kit 添付の EASY Dilution バッファーを用いて 20 倍希釈して qPCR に用いた。4-2-4 で直接ベシクルから回収した DNA はそのまま用いた。50 μL 反応溶液中に、SYBR® Premix Ex Taq™ II 25 μL 、forward primer(10 μM) 2 μL、reverse primer(10 μM) 2 μL, 10×ROX dye 1 μL, 鋳型 DNA 10 μL と milliQ を含む溶液を調製し、1 サンプルにつき、20 μL のスケールで反応させ、EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数を Mx3005P で測定した。

EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数の比を求めるために、同一 DNA サンプルにつき Myc R primer (5'—TTCACTTATTAATTTTTGCTCAA—3') と FLAG R primer (5'—TTTATCATCGTCATCCTTATAGTC—3') を用いてそれぞれ測定した。Forward primer は、EmrE F primer

(5'—GATTAGCTTACTGTCATGGG—3') を共通で用いた。qPCR 条件は、《95 ℃ 30 sec 用いた。TA℃ 5 sec 。TACT℃ 30 sec) c 。TACTGTCATGGGA℃ 1 min → 50 ℃ 30 sec → 95 ℃ 30 sec 》とした。

濃縮率の算出方法

濃縮率は、カラムアプライ前のベシクルから回収した EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数の比を、カラム溶出後のベシクルから回収した EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子の比で割った値を、濃縮率(Enrichment factor)と定義した。

例として、P7 ゲートの濃縮率の計算式を以下に示す。

$$\text{Enrichment factor} = \frac{(\mathrm{E}mrE - myc_{Elution}) \div (EmrE - FLAG_{Elution})}{(\mathrm{E}mrE - myc_{sample}) \div (\mathrm{E}mrE - FLAG_{sample})}$$

EmrE-myc_{sample}、EmrE-$FLAG_{sa,ple}$、EmrE-$myc_{PElution}$、EmrE-$FLAG_{Elution}$ はそれぞれ、カラムアプライ前のベシクルから回収した EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数、カラム溶出後のベシクルから回収した EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数とする。

4-2　結果

4-2-1　パニング法予備実験

膜タンパク質を呈示しているリポソーム内部の遺伝子を、磁性ビーズを用いて選択的に回収した例が無い。単純な脂質二重膜であるリポソームと細胞とは、膜の頑健さや凝集体の形成しやすさ等の物理化学的性質が異なるため、細胞用のビーズを適用できない可能性がある。そこで、磁性ビーズによって目的遺伝子を取得できるかどうか図 4－2 の予備実験を行うことで確かめた。予備実験では、T7 RNA ポリメラーゼ 2 μM、EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子各 25 pM を含む PURE system を用いてベシクルを調製し、37 ℃で 6 時間タンパク質合成反応を行った。その際、EmrE-myc を呈示するベシクルと EmrE-FLAG を呈示するベシクルで、内部体積指標としてそれぞれ TA 647 と R-PE を用いた。次に、それらを 1:1 で混合し、その混合液をマウス由来の抗 myc 抗体で免疫染色した。その後、未反応の抗体を外液交換で洗い、抗マウス抗体で修飾された磁性ビーズ (MACS ビーズ)と混合し、抗 myc 抗体を介してベシクルと MACS ビーズを結合させた。その溶液を磁石に結合した状態の MACS カラムに加え、すべて溶液が落ちた後に等張液でカラムを洗った。最後に、MACS カラムを磁石から取り外し、等張液を加えてカラム内部のベシクルを溶出した。この項では、MACS カラムに加える前の溶液(図 4-2c)と MACS カラムから溶出された溶液(図 4-2f)を FACS verse で解析した。

EmrE-myc を呈示するベシクルと EmrE-FLAG を呈示するベシクルをそれぞれ FACS verse で解析した結果、異なる蛍光物質を内部指標に用いているため、TA 647 と R-PE の蛍光強度を縦軸横軸にとってプロットすると、それぞれ Y 軸と X 軸に平行にベシクルが検出された(図 4-3a、b)。MACS カラムに加える前の溶液を FACS verse で解析した結果、プロットの対角線上にベシクルが検出された(図 4-3c)。これは EmrE-myc を呈示するベシクルの体積指標である TA 647 と EmrE-FLAG を呈示するベシクルの体積指標である R-PE の両方を持つベシクルがサンプル中に含まれることを意味している。つまり、MACS カラムに通す前にすでに一部のベシクルが結合していることを示唆している。MACS カラムから溶出された溶液の FACS verse で解析した結果、より多くの割合のベシクルがプロットの対角線上に検出された(図 4-3d)。この結果は、MACS カラムを通過する際にもベシクルの結合を引き起こす原因がある事を示唆している。よって、パニングによって目的遺伝子を選択的に回収するためには、ベシクルの結合を防ぐための条件検討が必要であるということが明らかとなった。

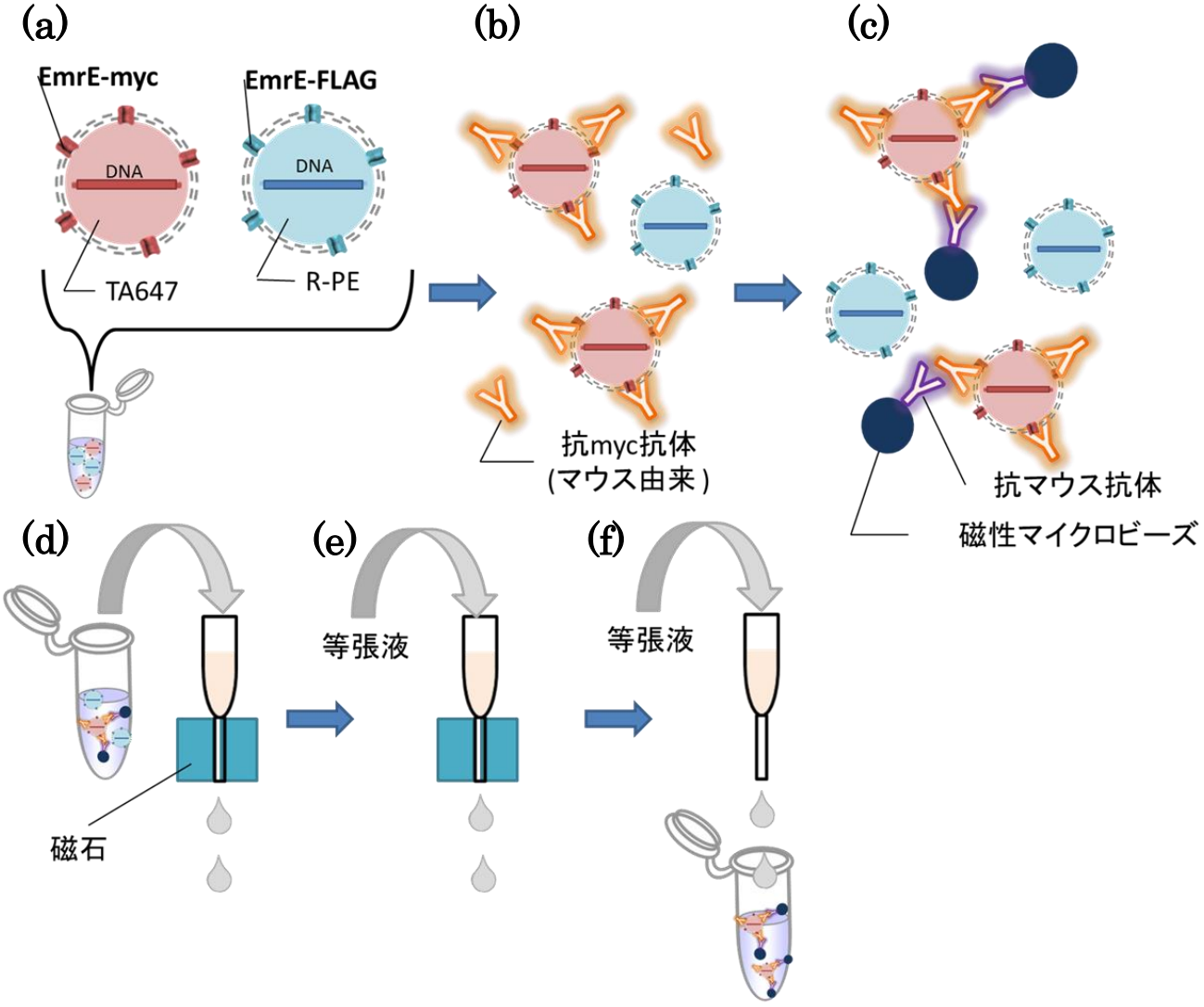


図 4-2 パニングによるリポソームディスプレイ法の予備実験
本章で述べるパニングによるリポソームディスプレイ法の予備実験の操作手順を示す。(a)TA 647 を体積指標として用いてベシクル内タンパク質合成を行い、EmrE-myc を呈示させたベシクル溶液と、R-PE を体積指標として用いた EmrE-FLAG 呈示ベシクル溶液を 1:1 の割合で混合した。(b)マウス由来抗 myc 抗体を用いて a の混合液と抗原抗体反応させた。(c)抗マウス抗体が結合した磁性マイクロビーズを b の溶液に加えて、抗 myc 抗体を介してビーズとベシクルを結合させた。(d)c の溶液を磁石に結合したカラムにアプライした。(e)等張液でカラムを 3 回洗浄した。(f)カラムを磁石から取り外し、等張液をアプライしてカラム中のベシクルを回収した。

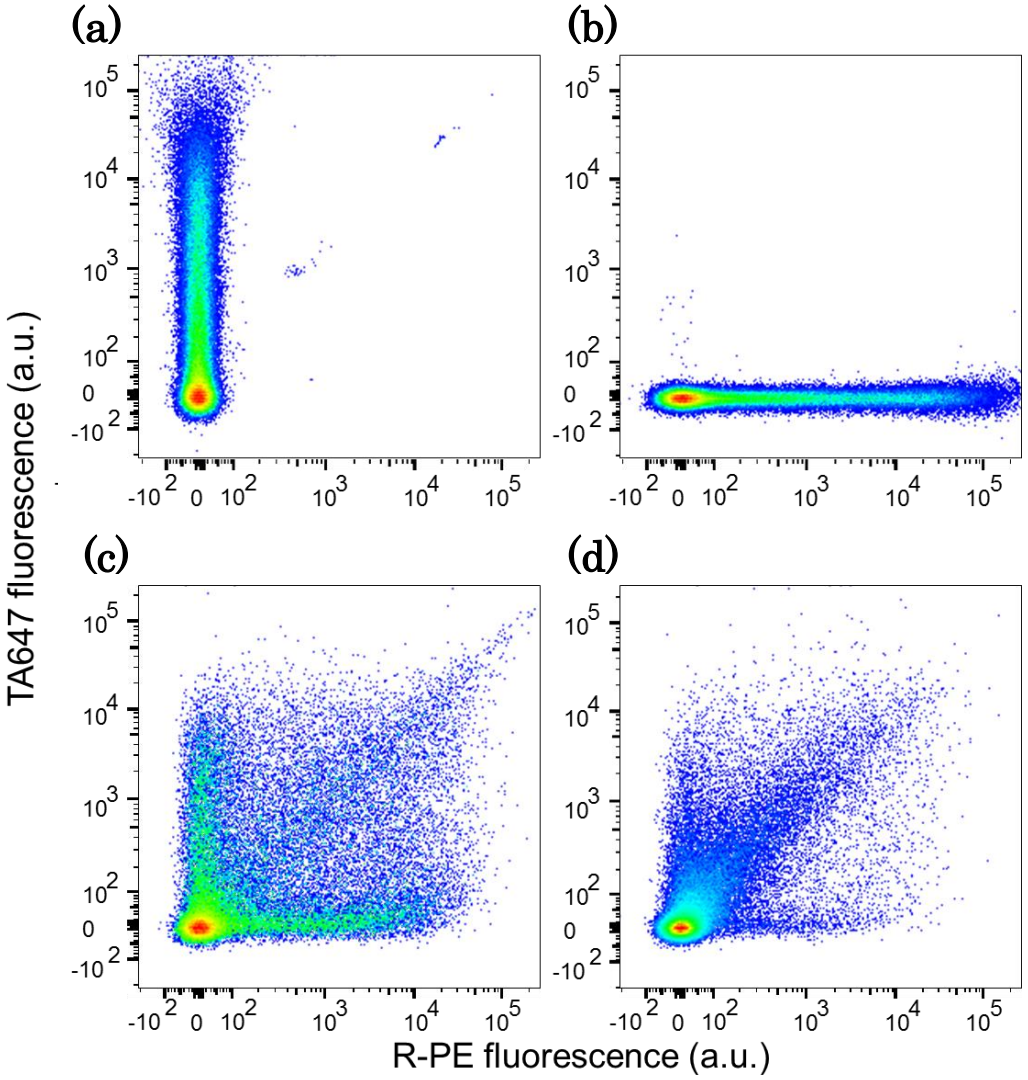


図 4-3 パニング操作前後のベシクルの状態の FACS 解析
図はパニング操作前後のベシクル状態の FACS 解析結果である。縦軸は、EmrE-myc を呈示するベシクルの体積マーカーである TA 647 の蛍光強度を示しており、横軸は、EmrE-FLAG を呈示するベシクルの体積マーカーである R-PE の蛍光強度を示している。
(a)EmrE-myc を呈示させたベシクル溶液の FACS 解析結果。(b)EmrE-FLAG を呈示させたベシクル溶液の FACS 解析結果。(c)図 4-2 (c)の操作後の溶液を分取し FACS 解析した結果。(d)図 4-2 (e)の操作後の溶出液を FACS 解析した結果。

4-2-2　ベシクルの凝集を防ぐ実験条件の検討

セクション 4-2-1 より、MACS カラムにベシクルを通す前に一部のベシクルが凝集していることが明らかとなったため、凝集の原因とそれを防ぐ条件を調べた。予備実験の操作の中で、未反応の抗体を洗浄するために行う遠心沈降の操作が、一番ベシクルに物理的な衝撃が加わると考えられる。そこで、等張液中の BSA の濃度と遠心沈降する際のサンプル液量について検討した。ここでは、まずベシクル自体の性質として凝集が起きるのか、膜タンパク質を呈示することによって凝集が起こるのかを調べた後に、凝集を防ぐ条件を用いて再度パニングを行った。

遠心沈降の条件の検討

まずベシクルの凝集が、ベシクルそのものの性質に起因するのかを調べるために、内部でタンパク質合成を行っていないベシクル(タンパク質合成時間 0 時間)を二種類の体積マーカー(TA 647 および R-PE)を用いてそれぞれ調製した。TA 647 を体積指標とするベシクル溶液と、R-PE を体積指標とするベシクル溶液を 1:1 で混合し、6000 ×*g* で 5 分遠心を行った。遠心沈降の実験条件は、等張液中の BSA 濃度を 0.1、1 %、遠心沈降時の液量を 100、200 μL の計 4 点で振った。

等張液中の BSA 濃度が 0.1 %の場合は、遠心沈降に用いるサンプル液量に関わらず、TA647 と R-PE の両方の蛍光を持つベシクルが検出された(図 4-4a、c)。これは、サンプル液量 100、200 μL のいずれの条件でもベシクルが結合していることを示唆している。等張液中の BSA 濃度が 1 %の場合は、遠心沈降に用いるサン

プル液量に関わらず、TA 647 の蛍光を持つベシクルと、R-PE の蛍光を持つベシクルがほぼ分離していた(図 4-4b、d)。これは、BSA 濃度が 1 %の場合、TA 647 を持つベシクルと R-PE を持つベシクルが分離していることを示唆している。よって、等張液中の BSA 濃度が高ければ、遠心沈降を行う際の液量に関わらず、ベシクルの結合は防ぐこと可能であると明らかとなった。また、等張液中の BSA 濃度が低い場合は、膜タンパク質の呈示の有無に関わらず、ベシクル自体の性質として、ベシクルの結合が起こることが明らかになった。

次に、膜タンパク質を呈示したベシクルでも、BSA 濃度を上げることで凝集を防ぐことが可能かどうか調べた。ここでは、T7 RNA ポリメラーゼ 2 μM、EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子各 25 pM を含む PURE system を用いてベシクルを調製し、37 ℃で 6 時間タンパク質合成反応を行った。TA 647 を体積指標として用いてベシクル内タンパク質合成を行い、EmrE-myc を呈示させたベシクル溶液と、R-PE を体積指標として用いて EmrE-FLAG を呈示させたベシクル溶液を 1:1 で混合し、6000 ×*g* で 5 分遠心を行った。遠心沈降の実験条件は、サンプルの液量は 100 μL とし、等張液中の BSA 濃度を 0.1、1 %で振った。

BSA 濃度 0.1 %の場合、TA 647 と R-PE の両方の蛍光を持つベシクルが検出された(図 4-5a)。それに対して、BSA 濃度 1 %の場合は、TA 647 の蛍光を持つベシクルと、R-PE の蛍光を持つベシクルがほぼ分離していた(図 4-5b)。以上の結果より、膜タンパク質を呈示しているベシクルにおいても、BSA 濃度 1 %の場合は、遠

心沈降によるベシクルの結合を防止できる事が明らかとなった。

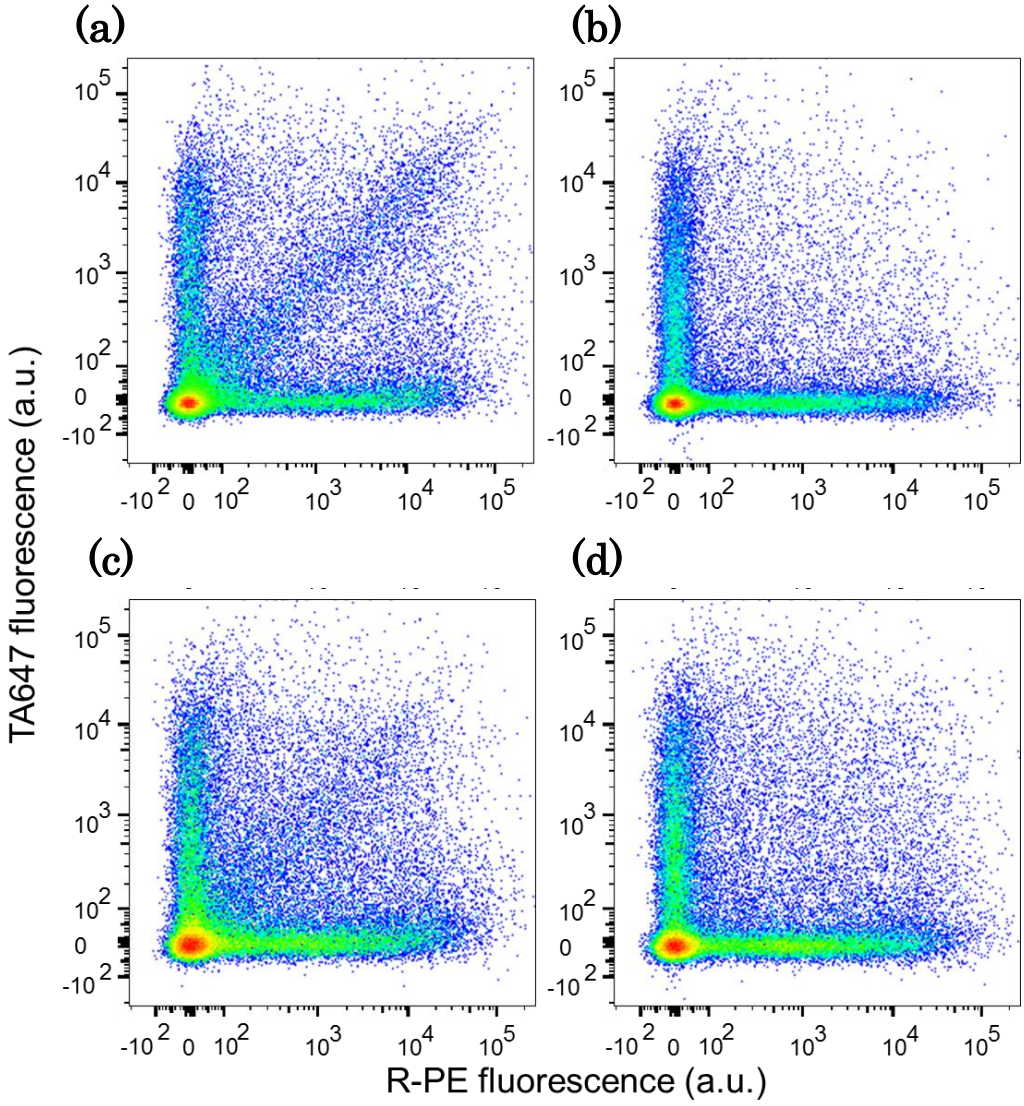


図 4-4 パニング操作中の遠心沈降において、等張液中の BSA 濃度とサンプル液量がベシクルに及ぼす影響

遠心沈降時の溶液量と BSA 濃度条件を変えて調製したサンプルの FACS 解析結果である。縦軸は、ベシクルの体積マーカーの TA647 の蛍光強度を示しており、横軸は、ベシクルの体積マーカーの R-PE の蛍光強度を示している。(a)、(b)はベシクル溶液量を 100 μL に調製し、それぞれ等張液中の BSA 濃度を 0.1、1 %に調製して遠心沈降を行った結果。(c)、(d)はベシクル溶液量を 200 μL に調製し、それぞれ等張液中の BSA 濃度を 0.1、1 %に調製して遠心沈降を行った結果。

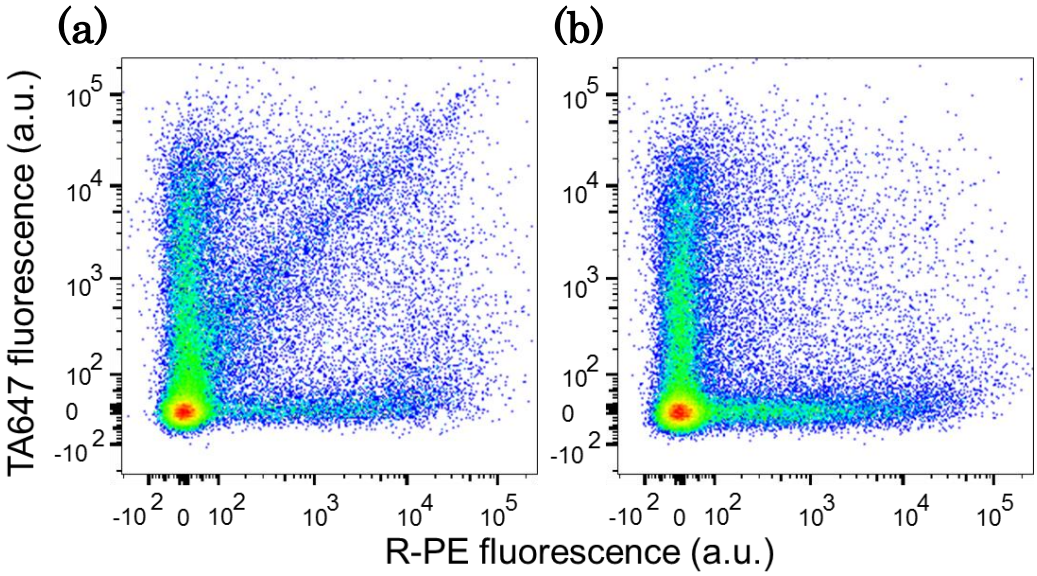


図 4-5 パニング操作中の遠心沈降において等張液中の BSA 濃度が膜タンパク質を呈示したベシクルに及ぼす影響
遠心沈降時 BSA 濃度条件を変えて調製したサンプルの FACS 解析結果である。縦軸は、EmrE-myc を呈示するベシクルの体積マーカーである TA 647 の蛍光強度を示しており、横軸は、EmrE-FLAG を呈示するベシクルの体積マーカーである R-PE の蛍光強度を示している。
(a)はベシクル溶液量を 100 μL に調製し、等張液中の BSA 濃度を 0.1 %に調製して遠心沈降を行った結果。(b)はベシクル溶液量を 100 μL に調製し、等張液中の BSA 濃度を 1 %に調製して遠心沈降を行った結果。

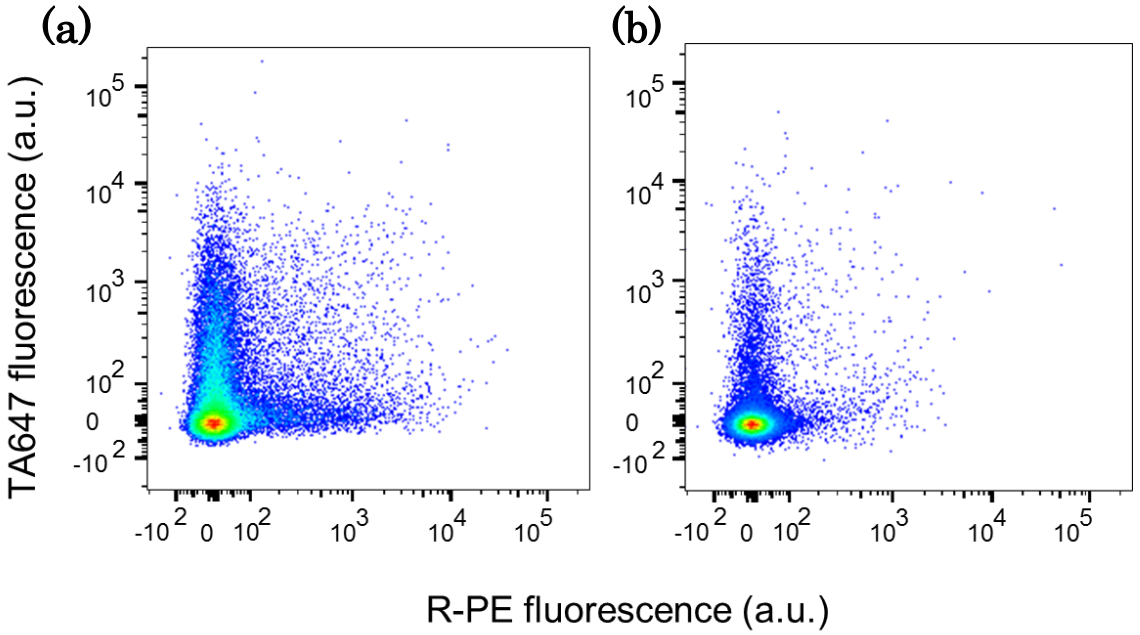
4-2-3　BSA 濃度 1%で行ったパニング

遠心沈降の条件を検討した結果、BSA 濃度 1 %の等張液を用いることでベシクルの凝集を防ぐことができると分かったので、この条件を用いて再度図 4-2 のパニング予備実験を行った。その際、パニングの前後のサンプルを FACS verse で解析した(図 4-6a,b)。この実験では、T7 RNA ポリメラーゼ 0.2 μM、EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子各 25 pM を含む PURE system を用いてベシクルを調製し、37 ℃で 6 時間タンパク質合成反応を行った。その際、EmrE-myc を呈示するベシクルと EmrE-FLAG を呈示するベシクルで、内部体積指標としてそれぞれ TA 647 と R-PE を用いた。パニング前後のサンプル中の RNA を回収し、逆転写反応を行った。その後、逆転写反応物から DNA を精製して EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子それぞれのコピー数を qPCR で定量し、EmrE-myc 遺伝子の濃縮率を調べた。

MACS カラムにアプライする前のサンプル溶液中の EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数は、それぞれ 4.15×10^4、1.03×10^5 コピーであった。そして、EmrE-myc 遺伝子のコピー数を EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数を割った値である Ratio は 0.4 であった(図 4-6c)。またカラム溶出液中の EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数は、3.55×10^4、1.15×10^4 コピーであった。EmrE-myc 遺伝子のコピー数を EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数を割った値である Ratio は 3.09 であった(図 4-6c)。カラム溶出液の Ratio をアプライする前の Ratio

で割った値を EmrE-myc 遺伝子の濃縮率と定義すると、濃縮率は 3.1 であった。

MACS カラムにアプライする前のサンプルの FACS 解析結果は、ベシクルに凝集が起きていないことを示唆しており、遠心条件の検討の結果を再現している(図 4-6a)。また、等張液中の BSA 濃度を上げることによって、MACS カラムから溶出されたサンプル中のベシクルの凝集も防ぐことができることが分かった(図 4-6b)。しかし、EmrE-myc 遺伝子を含むベシクルと EmrE-FLAG 遺伝子を含むベシクルを別々に調製しているにもかかわらず濃縮率が低く、実際の進化実験に用いるにはさらに条件検討が必要であることも明らかとなった。ベシクルの結合が起こっていないにもかかわらず、濃縮率が低い原因として、カラム内部に物理的にトラップされているベシクルが存在することが考えられる。



(c)

	emrE-myc (copies)	emrE-FLAG (copies)	Ratio (emrE-myc/emrE-FLAG)	濃縮率
前	4.15×10^4	1.03×10^5	0.4	
後	3.55×10^4	1.15×10^4	3.09	3.1

図 4-6 セクション 4-2-2 で決定した実験条件を用いてパニングを行った際の FACS 解析結果および、EmrE-myc をコードする DNA の濃縮率
(a)(b)は、セクション 4-2-2 で決定した実験条件を用いてパニングを行った際の FACS 解析結果である。(a)は MACS カラムにアプライする前のサンプル溶液、(b)はカラム溶出液の結果である。縦軸は、EmrE-myc を呈示するベシクルの体積マーカーである TA 647 の蛍光強度を示しており、横軸は、EmrE-FLAG を呈示するベシクルの体積マーカーである R-PE の蛍光強度を示している。(c)はパニング前後の EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数とその割合(Ratio)、およびパニングによる EmrE-myc 遺伝子の濃縮率を示している。ここで濃縮率は、カラム溶出液の Ratio をアプライする前の Ratio で割った値を EmrE-myc 遺伝子の濃縮率と定義した。

4-2-4　パニングにおける未結合ベシクルの除去方法

4-2-3 でベシクルの凝集が起きていないにも関わらず、濃縮率が低かった原因として、カラムの中に物理的にトラップされているベシクルがあると考えた。よって、次にカラムにトラップされているベシクルを除くための操作について検討した。この実験では、T7 RNA ポリメラーゼ 0.2 μM、EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子各 25 pM を含む PURE system を用いてベシクルを調製し、37 ℃で 6 時間タンパク質合成反応を行った。その際、EmrE-myc を呈示するベシクルと EmrE-FLAG を呈示するベシクルで、内部体積指標としてそれぞれ TA 647 と R-PE を用いた。従来の方法(メーカー説明準拠)が、希釈液をカラムに 3 回通してカラムの洗浄を行うのに対し、希釈液をカラムに逆流させる「逆流操作」と希釈液でカラムを洗浄した後、その都度カラムを磁石から取り外す「カラム外し」を行った(図 4-7)。

「逆流操作」を行ったサンプルでは、パニング前後のサンプル中の RNA を回収し、逆転写反応を行った。その後、逆転写反応物から DNA を精製して EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子それぞれのコピー数を qPCR で定量し、EmrE-myc 遺伝子の濃縮率を調べた。「カラム外し」を行ったサンプルでは、qPCR に十分な量の遺伝子を回収することができるので、サンプルから DNA を回収した。その後、EmrE-myc 遺伝子と EmrE-FLAG 遺伝子それぞれのコピー数を qPCR で定量し、EmrE-myc 遺伝子の濃縮率を調べた。

逆流操作でカラムを洗浄した場合、MACS カラムにアプライする前のサンプル溶液中の EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数は、それぞれ 6.18 ×10^5、2.94×10^5 コピーであった。そして、EmrE-myc 遺伝子のコピー数を EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数を割った値である Ratio は 0.62 であった。またカラム溶出液中の EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数は、9.93×10^5、1.05×10^5 コピーであった。そして、EmrE-myc 遺伝子のコピー数を EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数を割った値である Ratio は 2.8 であった。よって濃縮率は、4.49 倍だった。カラム外しを行い、カラムを洗浄した場合、MACS カラムにアプライする前のサンプル溶液中の EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数は、それぞれ 9.60×10^4、4.76×10^5 コピーであった。そして、EmrE-myc 遺伝子のコピー数を EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数を割った値である Ratio は 0.1 であった。またカラム溶出液中の EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数は、8.60×10^4、2.79×10^4 コピー であった。そして、EmrE-myc 遺伝子のコピー数を EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数を割った値である Ratio は 3.08 であった。よって濃縮率は、30.8 倍だった。カラムに等張液を逆流させて洗浄する方法では、濃縮率は顕著に上がらなかったが、「カラム外し」を行うと濃縮率が約 10 倍上がったため、リポソームに MACS ビーズを用いてパニングを行う場合、「カラム外し」を行う必要があることが明らかになった。

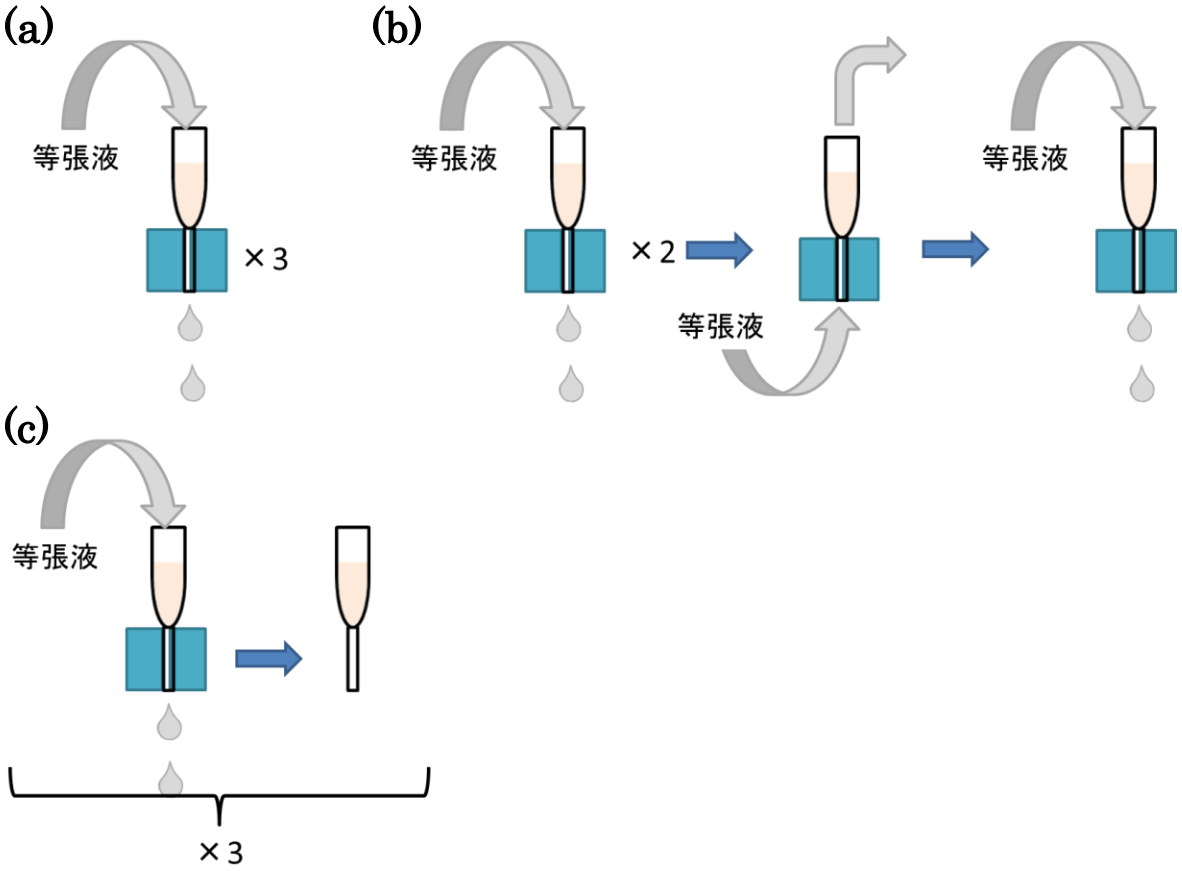
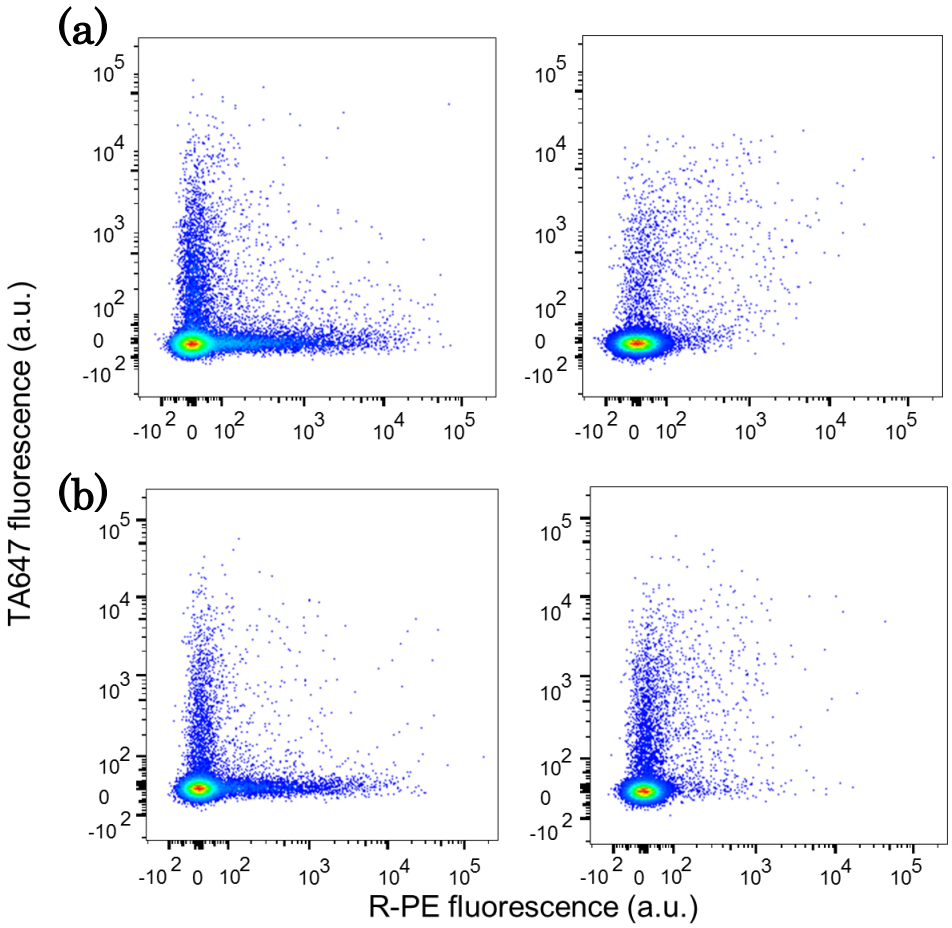


図 4-7 パニングにおける未結合ベシクルの除去方法
ここでは、従来法、逆流操作およびカラム外しの 3 種類のカラム洗浄操作方法を示している。(a)従来法。磁石に結合しているカラムに 500 μL の 1.5 %BSA を含む等張液を 3 回通す。(b)逆流操作。磁石に結合しているカラムに 500 μL の 1.5 %BSA 等張液を 2 回通した後、カラムの溶出口から 1 mL、1.5 %BSA 溶液を通す。最後にもう一度カラムに 500 μL の 1.5 %BSA 等張液を通す。(c)カラム外し。磁石に結合しているカラムに 500 μL の 1.5 %BSA を含む等張液を通し、等張液がすべて溶出された後に、一瞬磁石からカラムを取り外す。この操作を 3 回繰り返す。



(c)

逆流	emrE-myc (copies)	emrE-FLAG (copies)	Ratio (emrE-myc/emrE-FLAG)	濃縮率
前	6.18×10^5	2.94×10^5	0.62	
後	9.93×10^5	1.05×10^5	2.8	4.49

カラム外し	emrE-myc (copies)	emrE-FLAG (copies)	Ratio (emrE-myc/emrE-FLAG)	濃縮率
前	9.60×10^4	4.76×10^5	0.1	
後	8.60×10^4	2.79×10^4	3.08	30.8

図 4-8 MACS カラム中にトラップされたリポソームを除去する操作方法の検討
図(a)(b)は、逆流操作とカラム外しの２種類の方法でカラムを洗浄した時の FACS 解析結果である。縦軸は、EmrE-myc を呈示するベシクルの体積マーカーである TA 647 の蛍光強度を示しており、横軸は、EmrE-FLAG を呈示するベシクルの体積マーカーである R-PE の蛍光強度を示している。それぞれの図の左側がカラムにアプライする前のサンプルで、図の右側がカラムから溶出されたサンプルである。図(c)は、a および b の溶液中に含まれる EmrE-myc 遺伝子、EmrE-FLAG 遺伝子のコピー数を qPCR で定量した結果である。

4-3　考察

MACS 磁性ビーズによって目的遺伝子を取得できるかどうかを調べるために、EmrE-myc を呈示したベシクルと EmrE-FLAG を呈示したベシクルをそれぞれ TA 647 と R-PE を内部指標に用いて調製してパニングの予備実験を行った結果、MACS カラムの溶出されたサンプルだけでなく、アプライする前のサンプルにもベシクルの凝集が起きていることが明らかになった。このことから、MACS カラムにアプライする前段階の操作に、ベシクルの凝集の原因があると考えた。そこで、ベシクルの凝集の原因であると考えられる外液交換時の遠心沈降の液量と等張液中の BSA 濃度について検討した。その結果、ベシクル内部でタンパク質合成を行っていない場合でも、BSA 濃度が低い場合はサンプル液量に関わらず、ベシクルの凝集が起きることが分かった。これは、ベシクルの凝集が遠心時の物理的な衝撃によって引き起こされること、そして膜タンパク質の合成に関わらず、ベシクル自体の性質として凝集が起きることを示唆している。また、EmrE-myc と EmrE-FLAG を内部合成した場合についても同様の実験を行った結果、BSA 濃度が低い場合には、タンパク質を合成していない場合と同じくベシクルの結合が起こっていることが分かるが、TA 647 を含むベシクルと R-PE を含むベシクルの結合の比率が異なっていた。EmrE を呈示しているベシクルは、膜タンパク質を呈示していないベシクルと比較すると、EmrE-FLAG を呈示するベシクルにより多くの EmrE-myc を呈示するベシクルが結合していた。この理由については不明であるが、一連の結果よ

り等張液中の BSA 濃度を上げることによって、物理的な衝撃によるベシクルの凝集を防ぐことが可能であることが明らかになった。

等張液中の BSA 濃度を上げて再度パニングの予備実験を行った結果、MACS カラムにアプライする前のサンプル、カラム溶出後のサンプル共に、ベシクルの凝集は起きなかった。しかし、濃縮率は約 3 倍であった。カラムを 3 回洗浄した際のフロースルーには、ほとんどベシクルが含まれていなかったことや(データは示していない)、図 4-6b においてわずかに R-PE を内部体積指標として持つベシクルが検出されていたため、濃縮率を下げる原因として、カラム内部に物理的にトラップされているベシクルが存在すると推測した。後に行った、カラムの洗浄方法の検討において、「カラム外し」を行った際に濃縮率が約 10 倍上がったことから、磁性ビーズが結合したベシクルとカラムの間に EmrE-FLAG を呈示するベシクルが挟まった状態であったことが示唆される。本章で行ったパニングの予備実験において「カラム外し」用いることで約 30 倍の濃縮率を得られたため、MACS カラムを用いて EmrE 遺伝子変異体ライブラリーより高機能型の変異体をセレクションすることが可能であると考える。

5 章　総括

進化分子工学は、タンパク質の機能研究だけでなく、創薬・産業の分野でも用いられており、我々の生活に貢献してきた。その市場規模は、工業用酵素の分野でも150億ドルに上ると言われている[Cherry and Fildantsef, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003]。しかしながら、膜タンパク質に関しては限られた例が報告されるにとどまっている[Sarkar., et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 2008] [Lluis *et al., Protein. Eng. Des. Sel.,* 2012] [Dodevski and Plückthun, *J. Mol. Biol.,* 2011] [Fujii *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 2013]。それは膜タンパク質の疎水性の高さや、生体内での発現量の低さ、細胞毒性に起因している。この論文では、生体内で膜タンパク質を発現させる際の障害を避けるために、完全な *in vitro* の実験系で膜タンパク質の機能改変を行うための技術の開発を目的として、その要素技術の開発を行った。

まず始めに、膜タンパク質の主要なクラスを占めるトランスポーターについて、大腸菌由来多剤排出トランスポーターEmrE をモデルとして用い、Giant unilamellar vesicle(リポソーム、GUV)内部で機能を持った状態で発現させた。無細胞翻訳系を用いた膜タンパク質研究は、GUV 内部タンパク質合成に限らず、様々な形で反応系に脂質二重膜を添加することによって行われてきた。しかしながら、ここで GUV 内部タンパク質合成を採用した理由は、後に進化分子工学に応用するために遺伝子型と表現型をリンクさせる必要があったからである。近年、骨格タン

パク質やポア形成タンパク質等、GUV 内部で膜タンパク質合成が報告されているが、トランスポーターについては未だ報告されていなかった[Fujiwara *et al., Biophysics (Nagoya-shi),* 2014]。さらに、2 章では FACS を用いて、膜タンパク質と GUV の体積依存性について解析を行った。その結果、膜タンパク質のリポソーム膜への挿入効率は、鋳型として用いる DNA 濃度に関わらず一定であることや、ベシクルの体積が小さくなるほど膜挿入効率は上がることが明らかとなった。

次に、膜タンパク質を対象とした進化分子工学の既存技術である Liposome display 法への応用を行った。Liposome display 法は、GUV 内部で膜タンパク質合成を行い、蛍光基質を、膜タンパク質を介して GUV 内部に取り込ませ、その蛍光強度を指標に FACS で高機能型の変異体を創出する技術である。しかし Liposome display では、水溶性膜タンパク質という特殊な例に限られている。よって、3 章ではより一般的な疎水性膜タンパク質への応用を目的として、鋳型として用いる DNA 濃度やタンパク質合成時間、T7 RNA ポリメラーゼ濃度等の条件検討を行った。一般的には、FACS によるソートでは、バックグラウンドとソーティングを行うベシクルの蛍光値の差が大きいほどセレクションの精度が上がるが、疎水性の高い膜タンパク質の合成を行う場合は、タンパク質合成量を上げ過ぎるとリポソーム同士のアグリゲーションが起こるために、逆に濃縮率を下げてしまうことが分かった。4 章の条件検討で、リポソーム自体の性質として、物理的な衝撃(遠心沈降操作など)を加えることでもアグリゲーションが起こりやすいことが明らかとなった。しかし、同時に物理的な衝撃によるアグリゲーションは、希釈液中の BSA

濃度を 1 %以上にすることで回避することができる。よって、疎水性の膜タンパク質の FACS を用いた Liposome display では、タンパク質合成量の検討を中心に行うことが必要である。

上で述べた既存の Liposome display 法では、変異体のセレクションに FACS を用いるため、蛍光物質を基質とする膜タンパク質にしか用いることが出来ない。そこで、4 章では、基質とのアフィニティセレクション(バイオパニング)を行うことで変異体のセレクションをかける手法の開発を目標とし、その実験条件や実験操作の検討を行った。バイオパニングを用いる利点は、蛍光基質を持たない膜タンパク質の進化が可能になるという点である。ここではセレクションに MACS システムを用いた。MACS システムは、ナノメートルサイズの磁性ビーズを用いるキットである。よって、市販のキットを用いて変異体のセレクションを行うことが可能、実験設備や実験者の熟練度にとらわれず変異体のセレクションを行うことができる。4 章ではまず、リポソームの性質として、物理的接触でアグリゲーションが起こりやすいことが分かり、それをバッファーとして用いる希釈液中の BSA 濃度を上げることによって回避できることを明らかにした。次に、メーカー説明のプロトコールでは除去することが出来ていない（しかしながらアグリゲーションは起こしていない）ことが分かった。これは、物理的にカラム内部でリポソームがトラップされているためであると考えた。そこでカラムを洗浄する際の条件を検討し、カラムを一度磁場から離すことで、カラム内部で物理的にトラップされているリポソームを取り除く事ができることを明らかにし、バイオパニングによるセレクションを行う

手法の条件を確立した。

この論文で用いた GUV 内部膜タンパク質合成は、ターゲットとなる膜タンパク質に合わせて脂質組成や、タンパク質合成系の種類や組成を最適化することや、SecYEG のような膜挿入機構と共発現させることによって、正しい配向性で膜タンパク質を合成することが可能であるため、拡張性が高い。小麦胚芽由来の無細胞翻訳系等を用いることで真核生物の膜タンパク質など、広範な膜タンパク質に対する機能改変が可能となると考える。この先、GUV 内部膜タンパク質合成を用いた進化分子工学技術で、実際に疎水性膜タンパク質の高機能型変異体を創出できたとすれば、膜タンパク質を進化分子工学のプラットフォームに乗せることができるかもしれない。

また、EmrE はアンチパラレルホモダイマーを形成するため、各プロトマーは膜に対して逆の配向性を持つ、こういった性質を dual-topology という[Bowie, *Nat. Struct Mol. Biol.,* 2006]。通常膜タンパク質の配向性は高度に制御されており、膜貫通部位をつなぐ水溶性のループ部分で、ポジティブジャージのアミノ酸が多い方が、細胞の内側に来るように挿入される(positive-inside rule)。EmrE のプロトマーはチャージの偏りがないために dual-topology が可能になっていると考えられている。他方で、膜タンパク質（特にチャネルタンパク質やトランスポーター）の多くは、その分子内で逆向きの配向性を持ったリピート構造(inverted-repeat)を持っていることが明らかになっている[Forrest, *Annu. Rev. Biophys.*, 2015]。これは進化の過程で duplication と gene fusion を行った形跡であると言われている。その

ため、EmrE は膜タンパク質のトポロジーと進化の面で、その祖先タンパク質に近い性質を持ったタンパク質として注目されている[Schuldiner, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009]。これらの事から私は、EmrE の進化分子工学が可能になれば、膜タンパク質のトポロジーや進化の痕跡を実験的に辿れるかもしれないと考えている。

最後に、バイオパニングによるセレクションは、特定の物質に対して結合する膜タンパク質をスクリーニングする事にも用いることができる。序章で述べた通り、トランスポーターは、創薬分野において未開拓領域といえる。この原因の一つとして、オーファントランスポーターが多いことが挙げられる。例えば、Human ORF クローンライブラリーを GUV 内部で合成し、ドラッグスクリーニングによって得られた低分子化合物に結合する分子を特定することで、その作用機序を明らかにすることができる。さらに、FACS を用いた膜タンパク質の進化分子工学的手法についても、近年報告された snap-display 技術等と複合することで、トランスポーター阻害ペプチドの創出などにも応用できるのではないかと推測する。

参考文献

Matsuura *et al. J. Biosci. Bioeng.,* 2006

Mills *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1967

Kauffman, *J. theor. Biol.*, 1992

Lowman and Well., *J. Mol. Biol.*, 1993

Buchholz *et al., Nat. Biotechnol.,* 1998

Cherry *et al., Curr. Opin. Chem. Biol,* 2003

Hedin *et al., J. Proteome. Res.,* 2011

Kuruma *et al., Biochim. Biophys. Acta.*, 2008

Sanders *et al., ChemBioChem*, 2004

von Heijne, *J. Intern. Med.*, 2007

Overington *et al., Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2006

Alexander., Br. *J. Pharmacol.*, 2011

Shuldiner, *Biochim. Biopyhs. Acta.,* 2009

Belandia *et al., EMBO J.,* 2003

Morrison *et al.*, *Nature*, 2012

Henzler-Wildman., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2011

Fujii et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2013

Katzen *et al.*, *Trends. Biotechnol.*, 2009

Sessa and Weissmann*, J. Biol. Chem.,* 1970

Koide and Karel, Int. J. *Food Sci. Technol..* 1987

Treyer, *Dissertation ETH*, 2001

Petrikovics *et al., Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999

Petrikovics *et al., Drug. Deliv.*, 2000

Walde and Ichikawa., *Biomol. Eng.*, 2001

Luisi *et al., Naturwissenschaften*, 2006

Yu *et al., J. Biosci. Bioeng.,* 2001

Fujiwara *et al., Biophysics (Nagoya-shi),* 2014

Nishimura *et al., Langmuir*, 2009

Saito *et al., ChemBioChem*, 2009

Kato *et al., Sci. Rep.*, 2012

Nourian *et al., Angrew. Chem.*, 2012

Nishimura *et al., Langmuir*, 2009

Lagane *et al., J. Biol. Chem.*, 2000

Lluis *et al., Protein. Eng. Des. Sel.,* 2012

Tawfik and Griffiths., *Nat. Biotechnol.,* 1998

Ghadessy *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,* 2001

Gupta *et al., Nat. Chem. Biol.,* 2011

Packer and Liu, *Nat. Rev. Genet.,* 2015

Roberts and Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,* 1997

Hanes and Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,* 1997

Sumida *et al., J. Nucleic. Acids.,* 2012

Kaltenbach *et al., ChemBioChem,* 2011

Cherry and Fildantsef, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003

Bowie, *Nat. Struct. Mol. Biol.,* 2006

Forrest, *Annu. Rev. Biophys.*, 2015

謝辞

最後になりましたが、本研究の遂行にあたって、多大なるご指導と研究環境を与えてくださりました渡邉肇教授、松浦友亮准教授、加藤泰彦助教に心からお礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたって、PURESYSTEM を提供していただきました旧四方研究室の皆様、W/O エマルション界面通過法の御指導いただいた藤井聡志博士に心からお礼申し上げます。そして、研究生活を共に送ってきた渡邉研究室の皆様にもこの場を借りてお礼申し上げます