



Title	Quantitative analysis of cell-free synthesized membrane proteins at the droplet interface bilayer in a newly designed chamber
Author(s)	Elfaramawy, Maie
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92908
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (MAIE AHMED ELFARAMAWY)	
Title	Quantitative analysis of cell-free synthesized membrane proteins at the droplet interface bilayer in a newly designed chamber (新しく設計されたチャンバー内の液滴界面二重層における無細胞合成膜タンパク質の定量分析)
<p>Membrane proteins (MPs) are responsible for cellular sensing and transport which gave them high potential to be used for various biotechnology application, while they have hardly been used due to the difficulty to obtain functional MP by conventional techniques. An <i>in vitro</i> transcription-translation (IVTT) system has been used to rapidly synthesize the MP of interest independent of living cells. MPs require hydrophobic environments to fold and exhibit their function, which can easily be provided by reconstituting in bilayer vesical. Droplet Interface Bilayer (DIB) approach is one of the simplest ways of forming stable bilayers where proteins could incorporate. DIB can be prepared by contacting two droplets, bilayer appears between the two droplets. However, previous studies failed in making stable DIBs consist of an IVTT system. To the best of our knowledge, there have been no reports quantifying the number of synthesized MPs supplied to the DIB by an IVTT system, presumably due to DIB instability. In this study, I firstly investigated the experimental condition where protein can be expressed inside DIB by using an IVTT system without disrupting the DIB. Secondly, I synthesized and quantified the number of MPs localized at the DIB using fluorescence data derived from the function of MPs.</p> <p>I focused on stabilizing the DIB made by an IVTT system. For this purpose, I selected the suitable oil phase for preparing lipid dissolved oil solution that increase the formation and stability of DIB at 37 ° C for at least 2 h, which is required for protein synthesis. I also found that the chamber design affects the droplet shape and DIB contact length. I found that the setup for stable DIB made of an IVTT system is 20 mg/mL (DOPC) in a mixture of 10: 1 (v/v) hexadecane to decane inside RB2 chamber.</p> <p>As a first example, I used α-hemolysin (AH) a pore-forming protein from <i>Staphylococcus aureus</i>, that is expressed as a soluble monomer. AH was synthesized inside the droplet using an IVTT system. The pore formation was confirmed by the diffusion of FDGlcU through AH nanopore to the other droplet, and hydrolysed by β-glucuronidase to emit the fluorescent signal. I quantified the amount of AH inserted into bilayer based on the fluorescent data. I obtained the fraction of AH inserted into the bilayer was determined to be 2.4×10^{-6} % of the total amount of AH synthesized. As <i>in vitro</i> system is highly controllable and adjustable, it is possible to investigate various parameter affecting the AH insertion and consequence the fluorescence flux.</p> <p>I synthesized EmrE, a multidrug transporter from <i>Escherichia coli</i>, that expressed in an insoluble fraction. Then quantified the fraction of EmrE inserted into bilayer that was found to be 1.0×10^{-4} % of the total amount of EmrE dimers synthesized. Note that the fraction of AH inserted into bilayer to that obtained using FDGlcU and EtBr flux were similar, indicating the validity of our measurement. Finally, to demonstrate that observed EmrE function is not an artifact, I tested the substrate specificity by using tetraphenylphosphonium (TPP⁺), a very well-known substrate of EmrE, and calcein, an unrelated compound. I observed the inhibition of EtBr signal only with TPP⁺, indicating that synthesized EmrE exhibit proper substrate specificity.</p> <p>In summary, I was able to synthesize MPs using an IVTT system and quantified the number of MPs at the DIB inside the developed chamber that has been proved to aid in stabilizing the DIBs for at least 19 h. This study provides a platform for further improvement and understanding of how MPs are integrated and function into the lipid bilayer using a bottom-up approach.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (MAIE AHMED ELFARAMAWY)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	教授 渡邊 肇
	副 査	教授 内山 進
	副 査	教授 紀ノ岡 正博

論文審査の結果の要旨

膜タンパク質は、細胞においてセンシング、シグナル伝達、輸送などの機能を担っており、様々なバイオテクノロジーへの応用が期待されているが取り扱いが困難なため、ほとんど利用されていない。生細胞内で膜タンパク質を過剰発現させると、細胞の毒性や凝集を引き起こすことがある。発現させることに成功しても、続いて分離・精製する過程に時間を要しかつタンパク質が容易に失活するという問題がある。

生細胞から独立して目的の膜タンパク質を迅速に合成するために、無細胞転写翻訳 (in vitro transcription-translation (IVTT)) システムが使用されてきた。膜タンパク質は、機能を発現するために正しくフォールディングする疎水性環境を必要とするが、これはIVTTシステムにリポソームや界面活性剤を添加することで容易に提供できる。IVTTシステムに疎水性環境を提供するための多くの方法の中で、Droplet Interface Bilayer (DIB)アプローチは、様々なタンパク質が取り込まれる環境を提供する可能性がある安定な二重膜を形成する最も単純な方法の一つである。DIBは、リン脂質が油相に溶解している2つの水滴を接触させることで調製できる。2つの液滴の間に脂質二重層が現れる。しかし、これまでの研究では、安定したDIBをIVTTシステムで調製することは困難であった。また、我々の知る限りでは、DIBが不安定であるためか、IVTTシステムを用いてDIBに供給される膜タンパク質の合成量を定量化した報告はない。

本論文では、まず、IVTT システムを用い、DIB 内で緑色蛍光タンパク質を発現させることができる実験条件を検討し、次に、膜タンパク質の機能から得られた蛍光データを用い、DIB に局在する膜タンパク質を定量化したことを報告している。IVTT システムとしては、再構成 IVTT システムである PURE システムを用い、これで作られた DIB を安定化させることに着目している。DIB の安定化のため、PURE システムのタンパク質合成条件である 37℃での DIB の形成と安定性を高める脂質溶解液を調製するのに適した油相を選択している。その結果、10 : 1 (v/v) ヘキサデカンとデカンの混合物中の 20mg/mL (DOPC) で最高の DIB 形成効率と安定性が得られることを示している。また、チャンバーの設計が液滴の形状と DIB の接触長さに影響を与えること示している。液滴の位置が最も安定し、インキュベーション中の安定性が最も高かったのは、丸底 V2 (RB2) というチャンバーである事を示している。

構築した実験系の有用性を示すための第一の例として、黄色ブドウ球菌由来の孔形成タンパク質である α -ヘモリシン (AH) を用いている。AH を再構成 IVTT システムを用いて w/o 液滴の 1 つの内部で合成し、IVTT 溶液に低分子 (FDG1cU) を添加して細孔形成を調べている。FDG1cU が AH ナノポアを通過すると、まず FDG1cU がもう一方の液滴に拡散し、 β -グルクロニダーゼにより加水分解されて蛍光シグナルを発する。この蛍光データをもとに、二重層に挿入された AH の量を定量し、DIB あたり $N_{\text{pore}} = 4.8 \times 10^4$ 個のヘプタマーを形成する AH が存在することを示している。これは、二重層に挿入された AH の割合が $2.4 \times 10^{-6}\%$ になることと同等であった。In vitro システムは制御性が高く、実験条件の調整可能であるため、AH の挿入に影響を与える様々なパラメータを検討することが可能である。そこで、本論文では、脂質組成などのパラメータが AH の細孔形成に及ぼす影響を調べている。AH は可溶性タンパク質であるため、次のステップとして、脂質や界面活性剤が存在しない状態で不溶性画分で発現する膜タンパク質 (EmrE) の機能と DIB 局在性を試験している。

大腸菌由来の多剤排出トランスポーター EmrE を PURE システムを用いて RB2 チャンバー内で合成し、蛍光シグナルに基

づいて DIB における EmrE の量を定量している。その結果、二重層に挿入された EmrE の割合は、合成された EmrE 二量体の総量の 1.0×10^{-4} %であり、AH の 30 倍の割合であることを示している。また、FDGlcU と EtBr の流出データから得られた、DIB に挿入された AH の割合は非常によく似た値が得られており、申請者の測定系の妥当性を示している。最後に、観察された EmrE の機能がアーティファクトではないことを示すために、EmrE の基質として非常によく知られているテトラフェニルホスホニウム (TPP+) と、EmrE とは無関係の化合物であるカルセインを用いて、EtBr 輸送の阻害を試験し、TPP+が存在しているときのみ競合阻害が起こっていることを示している。これらの結果から、合成された EmrE は適切な基質特異性を示している。

総括すると、申請者は PURE システムを用いて DIB を安定に調製する条件を明らかにすることに成功し、DIB に存在する膜タンパク質の量を定量化することにも成功している。本研究成果は、膜タンパク質がどのように脂質二重膜に挿入され、機能するのかをボトムアップに理解するためのプラットフォームを提供することが期待される。

以上のように、本論文は IVTT と DIB を組み合わせることで膜タンパク質研究の新たなプラットフォームを提供できることを示した。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。