

A03 GUV内環境での脂肪鎖合成による動態変化観察とその物理

東京工業大学地球生命研究所 車 愈激

本研究グループは、モデル細胞膜であるベシクルの内環境で脂肪鎖合成反応を再構築する。これにより生ずると考えられるベシクルの形態変化を顕微鏡下で観察し、脂質膜上で起こるダイナミクスを解析することを目的としている。本年度の進捗状況は以下の通りである。

(1) 酵素精製

脂肪酸合成に関わる10種の酵素 (FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI, FabZ, TesA, ACP) (図1) について精製を完了した。スタンフォード大学の Khosla 教授から譲渡していただいた発現プラスミドを元に大腸菌発現株 BL21 (DE3) にて発現させ、超音波破碎し、細胞抽出画分を得た。これを、AKTA マシンを用いて、HisTrap カラムと HiTrapQ カラム (共に GE) により2段階で精製をした。その結果、図2に示すように、SDS-PAGE 上で単一バンドとして確認することができ、約95%以上の純度で精製できた。しかしながら、FabZ については、大腸菌破碎後から深刻な凝集化が観察されたため、破碎法をリゾチーム/界面活性剤法に変え、AKTA による精製段階で脱界面活性剤することにより対応した。また、ACP については、apo 型から halo 型にさせるため、枯草菌由来の *sfp* 遺伝子と共発現を行った。しかし、FabZ と同様、凝集化が見られたため、FabZ と同じ対処により精製を完了した。また最終精製として、HPLC を用いて C18 カラムによる精製を行った。これによりトレースアmountの apo 型 ACP を取り除いた。低温保存中、再度の凝集化が見られた TesA と FabZ については、精製サンプルを簡易遠心処理することで凝集体を沈殿させ、その上清を精製サンプルとした。すべての精製タンパク質をブラッドフォード法により定量し、以降のアッセイのために十分な量のサンプルを調製できたことを確認した。

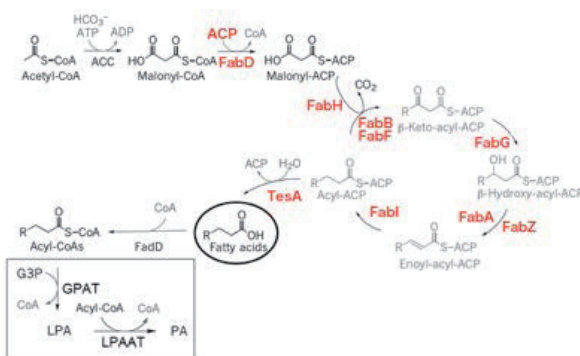


図1. 脂肪鎖合成代謝系。赤字が Fab 諸酵素と TesA, ACP.

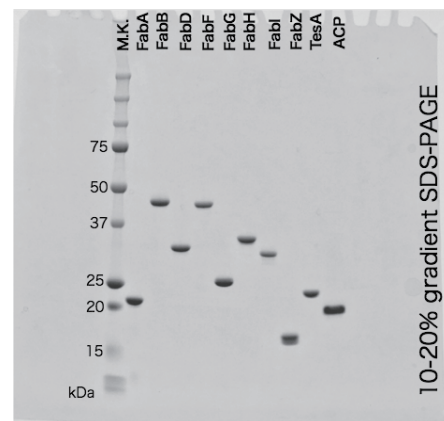


図2. 精製した Fab 酵素と TesA, ACP.

(2) FA vesicle 調製

2015年2月に、東京工業大学地球生命研究所とハーバードメディカルスクールによるジョイントワークショップに出席し、自己複製可能な人工細胞について口頭発表を行った。またそ

の際、Protocell 研究で有名なノーベル賞受賞者の Jack Szostak 博士と Protocell 研究と vesicle 研究について密な議論を交わし、Szostak 研究室で確立した、脂肪酸膜小胞形成のプロトコルを共有させていただいた。帰国後に、研究代表者によって再現実験を行った。

(3) 膜タンパク質合成

脂質膜小胞と無細胞タンパク質合成系を組み合わせた系により、Sec トランスロコンや ATP 合成酵素などの膜タンパク質複合体を、試験管内で合成することに成功した (図 3)。またこの成果を、*Nature Protocols* 誌等で発表した[1-3]。これまでに、無細胞系による膜タンパク質合成の成功例は前例があったが、本成果のように、複数種の膜タンパク質から構成されるタンパク質複合体の合成成功例はなかった。

本成果は、創薬プラットフォームに貢献する基礎技術として意味があるだけでなく、人工細胞構築における機能性人口細胞膜の構築を示唆するものである。

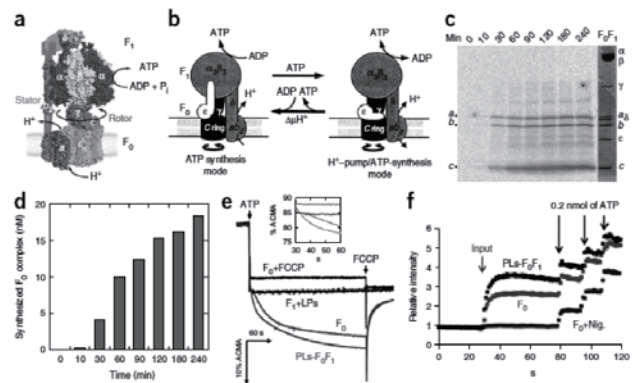


図 3. 試験管内で合成した ATP 合成酵素.

(4) 2015年8月、箱根で行われた国際ワークショップ「International Workshop on Challenge to Synthesizing Life」に参加した。Origin of Life 研究で有名な PL Luisi 博士や神奈川大学の菅原先生らと Origin of Life 研究[4-6]と vesicle 研究について密な議論を交わした。

- (1) Y. Kuruma and T. Ueda, *Nature Protocols* **10**, 1328-1344 (2015).
- (2) 車 愈澈, 上田卓也, 膜タンパク質の無細胞合成法, 生物物理 (in press).
- (3) 車 愈澈, 上田卓也, PURE システムを用いた膜タンパク質の無細胞合成, 実験医学 (in press).
- (4) H. Matsubayashi, Y. Kuruma, and T. Ueda, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **44**, 331-334 (2014).
- (5) Y. Kuruma, *Orig Life Evol Biosph.* **45**, 359-360 (2015).
- (6) P.L. Luisi, Y. Kuruma, *Orig Life Evol Biosph.* **44**, 267-268 (2014).