

細胞を使わないで、 膜タンパク質合成系を開発

「膜タンパク質」は、他の細胞からの信号を細胞内に伝えるなど、多様な生命活動を支えるカギとなる物質だ。このタンパク質は水溶性でなく、合成や精製、解析が非常に難しい。横山茂之博士らは、この膜タンパク質を、大腸菌などの細胞を使わずに、正しい立体構造を保ったまま大量合成する新しい手法を開発した。



よこやま しげゆき
横山 茂之

無細胞タンパク質合成系とは

—— Nature Digest : 細胞を使わずにタンパク質を合成するとは、どういうことでしょうか？

横山：タンパク質の合成というと、大腸菌や酵母、昆虫や哺乳類の培養細胞を使うのが一般的です。しかし、この方法だと、コストや時間がかかるほか、大量に作らせることが難しい、純度を均一に保つのが難しいといった問題があります。私たちは、こうした難点を克服する新たな手法として「無細胞タンパク質合成系」を開発し、1991年に実用化しました。

この合成法は、今では、合成から抽出、精製に至るまで、ロボットを駆使して自動化されています。実際の合成は、大腸菌の抽出液に、遺伝子（完全長 cDNA ライブラリーのものを用いる）、タンパク質の材料となるアミノ酸、エネルギー源の ATP などを加え、試験管内で遺伝子を発現させることで行います。この手法だと、高効率な試料調製が可能となります。

本格的な活用は、1997年のパイロットプロジェクトに続いて、2002年より本格始動した「タンパク 3000 プロジェクト」がきっかけとなりました。このプロジェクトでは、約1万種とされるタンパク質の基本構造（ドメイン）のうちの3分の1に当たる3000種類ほどの立体構造を明らかにすることが目的でした。基本構造が解明できれば、その機能解析や創薬などの応用研究につなげることができると期待されたからです。

私たちは、無細胞タンパク質合成系と従来からの細胞による合成を併用することで、プロジェクトが終了する2007年3月までに、目標を大きく超える約4600種のドメインの構造を決めることができました（理研を含む全拠点の合計）。例えば、ヒトの細胞内でシグナル伝達や転写制御を担う重要なドメインを、体系的に構築することに成功しました。

こうして構造を決めることができたタンパク質の大半は、細胞外、あるいは細胞質内で働くものです。膜貫通型タンパ

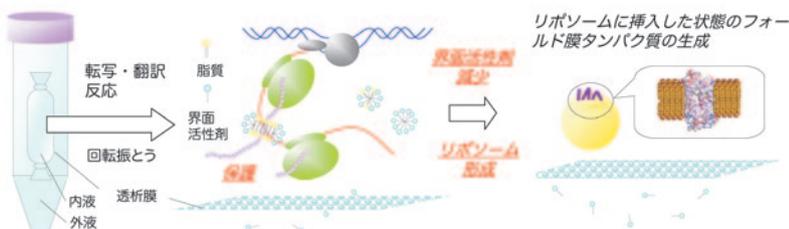
ク質については対象から外していたので、数個の解析にとどまりました。

—— 膜タンパク質とはどのようなタンパク質なのでしょう？

膜タンパク質とは、脂質の二重層構造の細胞膜に埋め込まれたタンパク質の総称で、細胞の内と外とのシグナル伝達や物質の輸送、エネルギー変換といった重要な機能を果たしています。このような膜タンパク質は「タンパク質」といっても、一般的なタンパク質とは全くの別物といえます。

一般的なタンパク質は細胞内外において水溶液に取り囲まれており、ほぼ球体の形を保ちつつ、外側が親水性、内側が疎水性の構造になっています。このようなタンパク質は単離しても水に溶け、結晶化も可能です。ところが膜タンパク質の方は、細胞の内と外に接している部分が親水性、脂質二重膜内に埋まった部分が疎水性です。つまり、内部と外部の化学的な性質が、一般のタンパク質と異なっており、水中に取り出すと、溶けずに沈殿してしまいます。

今のところ、脂質二重膜に埋まった疎水性部分のタンパク質を可溶化するには、その部分を界面活性剤で覆うしかありません。これまでに構造解析に成功していた数例も、すべて界面活性剤で溶かし出して結晶化させたものです。しかも膜タンパク質は可溶化の段階で変性しやすく、構造も崩れやすいので、解析に成功するには職人技が必要なことも珍しくありませんでした。



細胞を使わずに膜タンパク質を合成する系。

合成される膜タンパク質は疎水性で不安定だが、界面活性剤によって保護することで膜タンパク質どうしが凝集するのを防いでいる。さらに、界面活性剤とともに加えた脂質を脂質二重膜（リボソーム）として再構成させることで、膜タンパク質を効率よく脂質二重膜へ移行させ、活性を正常に保つことが可能になっている。

——疎水性部分のあることが、膜タンパク質合成の難しさなのですね。

はい。一言でいうと、疎水性の膜タンパク質には、親水性の一般的なタンパク質合成法を適用するのが難しいわけです。一方、生きた細胞を使って、膜タンパク質を作らせるのは不可能ではありませんが、細胞膜という空間的に限定された場所に発現させるために、合成量が多いと細胞死を招いてしまいます。また、異なる生物種だと膜の組成や膜への移行システムに違いがあるために、膜内にうまく入らないということもあります。例外的にうまく合成できたとしても、既に述べたように可溶化や結晶化が非常に難しいという問題が残ります。

膜タンパク質合成法、成功の秘密

——開発された膜タンパク質の合成法についてご説明ください。

私たちは、膜タンパク質無細胞合成系の開発のための最初のサンプルとして、バクテリオロドプシンを用いました。このタンパク質は構造と機能が詳しく解明されている数少ない膜タンパク質です。正しい立体構造を形作ると色素を取り込んで発色する特徴をもつので、視覚的に判定しやすいという利点もあります。

まず、既存の無細胞タンパク質合成系に界面活性剤を加えて合成を試みました。予想どおり、埋まるべき脂質二重膜がないために形が崩れやすく、うまくいきませんでした。そこで、この合成系の中に球体の脂質二重膜（リポソーム）を加えてみました。しかし、リポソームを加えた後でタンパク質が合成されることになり、やはり膜にはうまく埋まりませんでした。

しばらく、みんなで頭を抱えてしまったのですが、研究員の下野和実君（現在は松山大学助教）が、「タンパク質ができる過程で二重膜ができていくようにしたらどうか」と言い出しました。

試しに、cDNA、脂質、界面活性剤を混ぜておき、そこにアミノ酸を供給しつつ、透析膜で少しずつ界面活性剤を取り

除いていくと、界面活性剤で分断されていた脂質が集まり、二重膜ができていきました。同時に、タンパク質が合成されていき、できたばかりの膜にうまく埋まっていったのです。リポソームを用いたときに比べて、実に数十倍も効率よく膜に入りました。

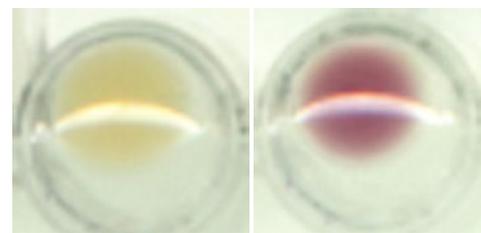
ただし、界面活性剤なら何でもよいというのではなく、ある特定のものがよいことがわかりました。その界面活性剤はタンパク質の合成を止めてしまうタイプのものでしたのですが、私たちは、界面活性剤を透析で除去しはじめると、合成が再開されることに気が付いたのです。

得られたバクテリオロドプシンには正しい発色が見られ、発案から5年をかけて無細胞の膜タンパク質合成系が完成しました¹。得られたバクテリオロドプシンの詳しい構造解析はこれからですが、おそらく、正常な構造と機能を保っているだろうと考えています。

ほかにも、数十種類のヒトの膜タンパク質の合成を試していますが、約8割の確率で脂質二重膜の中に埋まることがわかってきています。その中には、これまで不可能とされていた「細胞どうしの接着部位（タイトジャンクション）」の膜タンパク質もあり、やはり、これから構造解析を始めるところです。

期待される応用

——新しい合成系を駆使すると試料が大量に作れるので、膜タンパク質という物質そのものの解明が進むと思いますが、応用面ではどんな可能性が期待できますか？



合成されたバクテリオロドプシンは、正常な活性があることを示す紫色をしていた。活性のないもの（コントロール試料）は紫色を呈さないの、目で見て確認することができる。

例えば、創薬研究への利用が挙げられると思います。膜タンパク質そのものを薬剤にすることは考えにくいですが、新たな低分子化合物や抗体などが、膜タンパク質とどのような相互作用をもつかを調べることができます。既存の薬の半分は、膜タンパク質をターゲットにしていると考えられており、ハーセプチンなどの抗がん剤、インターロイキンなどの免疫関連薬といったように、既に膜タンパク質をターゲットにする薬が広く使われています。

さまざまな膜タンパク質の構造を明らかにできるようにになれば、その立体構造をベースに、より効き目の強い薬を設計できると期待しています。

——ありがとうございました。 ■

聞き手は、西村尚子（サイエンスライター）。

1 Shimono, K., Goto, M., Kikukawa, T., Miyauchi, S., Shirouzu, M., Kamo, N. & Yokoyama, S. *Protein Science*, **18**, 2160-2171 (2009)

AUTHOR PROFILE

横山 茂之

理化学研究所 横浜研究所 生命分子システム基盤研究領域 領域長。1975年、東京大学理学部生物化学科卒業、1981年、同大学大学院理学系研究科で博士号取得。5年間のポストドク研究を経て、1986年に東京大学理学部生物化学科の助教授となり、1991年に教授となる。1993年に、理研・細胞情報伝達研究室の主任研究員となり、後にゲノム科学総合研究センターのタンパク質構造・機能研究グループのプロジェクトディレクターに任命される。理化学研究所構造プロテオミクス研究推進本部（RSIG）のディレクターとして、タンパク質3000プロジェクトの網羅的解析プログラムを推進し、2008年からは、理研・生命分子システム基盤研究領域（SSBC）の領域長を務めている。