

タンパク質生産技術開発に基づく 「タンパク質発現ライブラリー基盤」の構築

生産
C1

代表機関：理化学研究所生命分子システム基盤研究領域

代表研究者：横山茂之

背景

- タンパク質の構造と機能を調べるには、タンパク質の合成・精製・結晶化が必要
- 重要な生命現象を担う膜タンパク質や巨大な複合体タンパク質は、特に合成・精製・結晶化が困難

成果

- 構造と機能を保持した状態の膜タンパク質を大量につくる技術を開発
- 脂質メソフェイズ法の技術開発を進め、複数の膜タンパク質の結晶化に成功
- タンパク質に非天然型アミノ酸を効率よく導入する世界初の新規酵素を開発

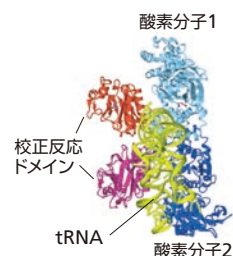
タンパク質の構造と機能を調べるためには、目的のタンパク質を大量に合成・精製して質のよい試料を用意しなければなりません。X線結晶構造解析によって立体構造を知るには、さらにこの試料を結晶化させることも必要です。しかし、重要な生命現象を担うタンパク質には、生体膜に埋まっている“膜タンパク質”や、さまざまな分子が結合した巨大な“タンパク質複合体”もあり、これらの合成や結晶化は特に困難です。私たちは、こうした難解析タンパク質を合成・精製・結晶化するための優れた技術を体系的に整備して、数多くの選択肢の中から各タンパク質に最適な方法を選択できるようにし、本プログラム内の多くの研究グループと連携を行ってきました。

膜タンパク質の多くは、膜に埋まっていないとその構造や機能を維持できません。そのため、私たちは膜に埋まった状態のタ

ンパク質を合成する技術の開発に力を入れました。以前に開発した無細胞タンパク質合成系を基本とし、さらに界面活性剤をうまく利用してタンパク質の合成と人工の脂質二重膜の形成を同時に行わせ、活性をもった膜タンパク質を合成する方法を開発しました。また、複合体タンパク質についても、無細胞タンパク質合成系の最適化や、生細胞の系における発現系の構築により、合成に成功しています。

さらに、膜タンパク質の結晶化のために、私たちは脂質メソフェイズ法の開発も進めています。タンパク質の性質に合わせた液晶材料の開発や、実験機器、実験手法の開発等により、複数の膜タンパク質の結晶化に成功しています。

一方で、非天然型アミノ酸をタンパク質に導入する多数の技術も確立しました。この技術により、タンパク質に新規な性質や



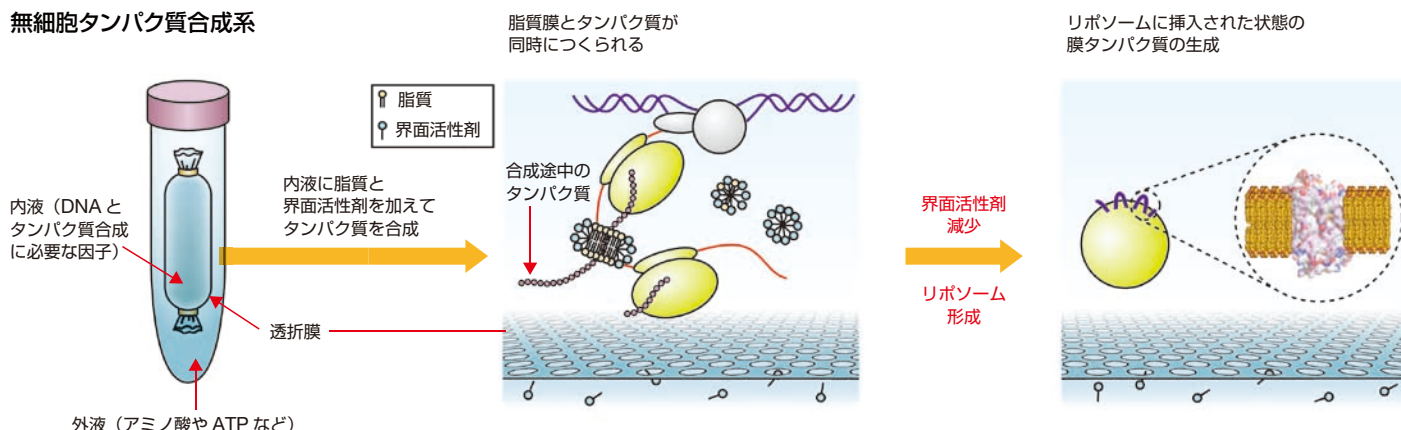
ヨードチロシンをタンパク質に組み込むtRNAをつくる酵素。X線結晶構造解析による立体構造情報をもとに酵素を設計し、まちがったアミノ酸をtRNAに結合させないように校正機能をもたせた。

図版提供：横山茂之

人為的な修飾を施すことが可能になります。例えば、蛍光をもつ非天然型アミノ酸を導入することで、細胞内で相互作用するようすをとらえたり、複合体の構造解析に活用したりできます。また、非天然型アミノ酸としてヨードチロシンを導入すると、ヨードチロシンに含まれるヨウ素がX線結晶構造解析の際に強力な目印となってくれるので、導入したタンパク質は、通常の実験室に設置可能な小型のX線発生装置でも立体構造解明に必須な位相決定を容易に行うことができるようになります。私たちは、より確実に非天然型アミノ酸を導入するために、「校正」機能のある新規酵素を世界で初めて開発しました。

今後は、こうした要素技術を高度化し、新規開発も行うことで、合成・精製・結晶化を自由自在に行えるシステムの構築を目指し、プログラム内外の多様なニーズに応えたいと思います。

無細胞タンパク質合成系



開発した膜タンパク質の合成法。反応液に脂質と界面活性剤を加えておき、透析により、界面活性剤の濃度を徐々に下げることによって、膜タンパク質合成と脂質二重膜（リボソーム）の構築を同時に行わせる。これにより膜に埋め込まれた状態の膜タンパク質が得られる。

図版提供：横山茂之