

Thermus thermophilus HB8 のシステム生物学へ向けて：
Mistic を用いた *Thermus thermophilus* HB8 由来膜タンパク質の大量発現

桑原直之^{1,2}、中川紀子^{1,2}、大谷直人³、倉光成紀^{1,2}、金澤浩¹

Naoyuki Kuwabara^{1,2}, Noriko Nakagawa^{1,2}, Seiki Kuramitsu^{1,2}

(¹ 阪大・院理・生物, ² 理研・播磨研・放射光科学総合研究センター ³ 慶応大・先端研)

(¹Dept. Biol. Sci. Osaka Univ., ²RIKEN Harima Inst. /SP-ring 8 Center, ³Keio Univ. Inst. Adv. Biosci.)

e-mail: kuwanao@bio.sci.osaka-u.ac.jp

さまざまな生物種的全遺伝情報が解読された結果から、いずれの種においても全タンパク質の 20 から 30% が膜タンパク質であることが明らかになっており、それらは光合成や呼吸などのエネルギー生産、細胞内の恒常性の維持、異物の排出など生命活動に非常に重要な働きをしている。それら膜タンパク質の機能や作動機構を詳細に明らかにする上ではその構造を明らかにすることが大変重要であり、これまでいくつかの膜タンパク質において X 線結晶解析によりその分子全体の構造が報告されてきた。分子全体の構造を明らかにする上では X 線結晶解析法を用いることが有用であり水溶性タンパク質においてはこれまでに膨大な報告がなされてきた。しかし膜タンパク質の X 線結晶解析を行う上では幾つかのボトルネックがあり、水溶性タンパク質と比べ非常に遅れている。そのボトルネックの 1 つとして膜タンパク質の発現量の問題がある。そこで今回 2005 年に報告された Mistic (Membrane Integrating Sequence for Translation of Integral Membrane Protein Constructs) をもちいて膜タンパク質の大量発現を行うことでこのボトルネックを解決することを試みた。その報告によると Mistic の C 末端側に真核生物の膜タンパク質を融合させると Mistic が膜へ入り込むのに引きずられて C 末端側の膜タンパク質も膜に挿入される。この現象の原理は未だ不明であるが、この方法を用いて幾つかの膜タンパク質が大量発現されている[1]。私はこの系を用いることによって *Thermus thermophilus* HB8 の膜タンパク質のプロテオーム解析に貢献できるのではないかと考えている。

現在幾つかの *T. thermophilus* HB8 由来の膜タンパク質をその発現系へ組み込み、大量精製ができる膜タンパク質を検討している。これまでに準備実験として行った結果、9 個中 7 個で良好な発現量が得られた。これらの膜タンパク質の中には pET11a に組み込んで発現量の検討を行った際に発現が見られなかったものも含まれており、この発現系により膜タンパク質の大量発現が可能になっていることが確認された。さらにこの発現系を利用して大量精製を行わなければならないが、この発現系が想定している原理に不安な部分があるため精製膜タンパク質の機能解析を行ない正しくフォールディングされているかどうかを確認しなければならない。現在活性を測定しやすい膜タンパク質に絞って大量発現・精製を行いこの系を確かなものにしてしようとしている。この系を用いて幾つかの膜タンパク質の構造解析ができるようになることを期待している。今回は本研究の経過報告をさせていただきます。

Reference

[1] Roosild TP, Greenwald J, Vega M, Castronovo S, Riek R, & Choe S (2005). *Science*, 307, 1317-1321