

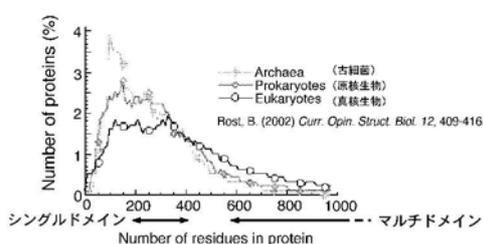
## 原核および真核生物由来無細胞翻訳系における 融合蛋白質ライブラリーの溶解性

愛媛大学ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー  
平野 展孝

一般に、真核生物は原核生物よりもゲノム上の総蛋白質数に対するマルチドメイン蛋白質の割合が多く(図1)、真核生物由来マルチドメイン蛋白質は、原核生物由来のものよりも複雑なドメイン構成を有している事が知られている。マルチドメイン蛋白質が、その進化過程において複雑なドメイン構成を獲得するためには、多種類のドメインの組み換えに対する翻訳系の高い許容性が必須であると考えられる。このドメインの組み換えに対する許容性は、翻訳に共なったN末端ドメインからの段階的なフォールディングによって達成される事から、真核生物由来翻訳系の方が翻訳に共なったフォールディングに優れているという仮説が提唱された。しかし、翻訳に共なったフォールディングは、原核および真核生物由来翻訳系における様々な蛋白質の合成において確認されているため、両翻訳系間の翻訳に共なったフォールディング能の違いについては、未だに議論が分かれている。

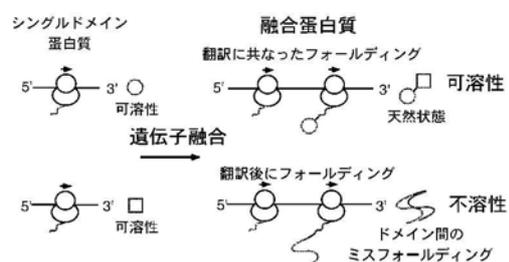
そこで本研究では、系統的なドメインの組み換えに対する両翻訳系の許容性を比較する事で、両翻訳系間の翻訳に共なったフォールディング能の違いについて新たな知見を与える事を目的とした。まず、実験の仮定として、可溶性ドメインを融合した場合、翻訳に共なってN末端ドメインからフォールディングしていれば可溶性、翻訳後にフォールディングしていればドメイン間のミスフォールディングが起り易く不溶性になる可能性が高いと仮定した(図2)。

この仮定に基づき、大腸菌および小麦胚芽無細胞翻訳系で合成した際に、溶解性に差のない6種類のモデル蛋白質(クラゲ緑色蛍光蛋白質(GFP)：可溶性、ヒトII型炭酸脱水素酵



真核生物は原核生物よりも長い蛋白質が多い  
↓  
真核生物は原核生物よりもマルチドメイン蛋白質が多い

図1 生物界の蛋白質の長さの分布



原核、真核生物由来翻訳系で溶解性に差の無い蛋白質から様々な組み合わせで融合蛋白質を構築し、両翻訳系で溶解性を比較する

図2 実験の仮定

素(hCAII)：可溶性、ヒトロダナーゼ(hRHO)：不溶性、ヒトジヒドロ葉酸還元酵素(hDHFR)：不溶性、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素(eDHFR)：可溶性、大腸菌トリプトファン合成酵素(サブユニット(eTRPA)：可溶性)を2個  
 或いは3個連結して計180種類(Double 60種類、Triple 120種類)の融合蛋白質から成るライブラリー(図3)を構築し、各無細胞翻訳系で透析法(30℃, 48時間)によって合成した際の溶解性と酵素活性を比較した。

その結果、合成量に大きな差の無い条件(0.2-0.4 mg/ml)で、小麦胚芽無細胞翻訳系で合成した方が、溶解性の高い融合蛋白質はDoubleで40/60種類、Tripleで114/120種類であった(図4-1, 4-2)。

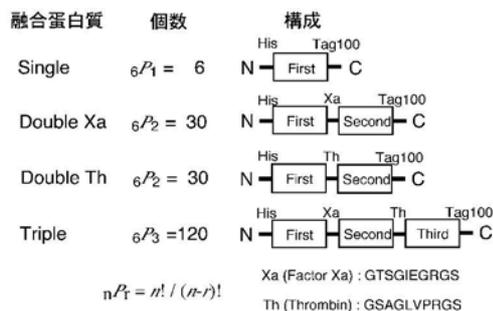


図3 融合蛋白質ライブラリーの模式図

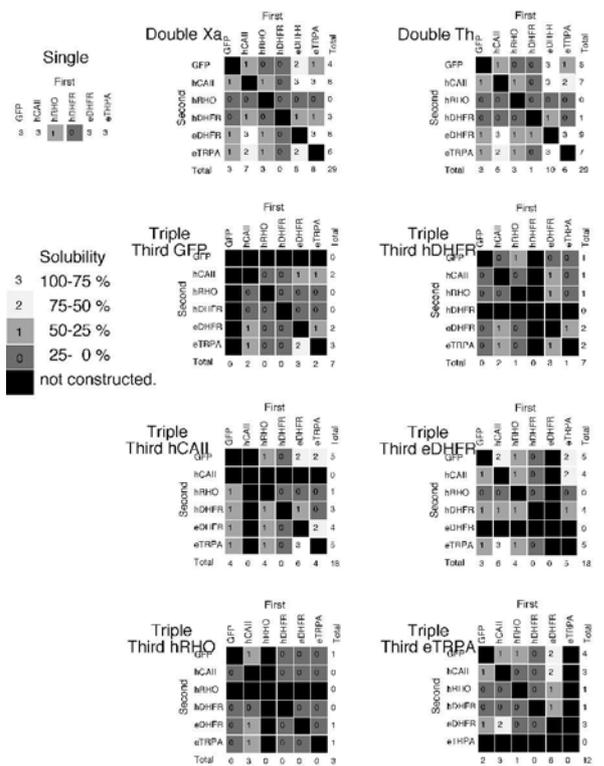


図4-1 融合蛋白質ライブラリーの溶解性 *E. coli*

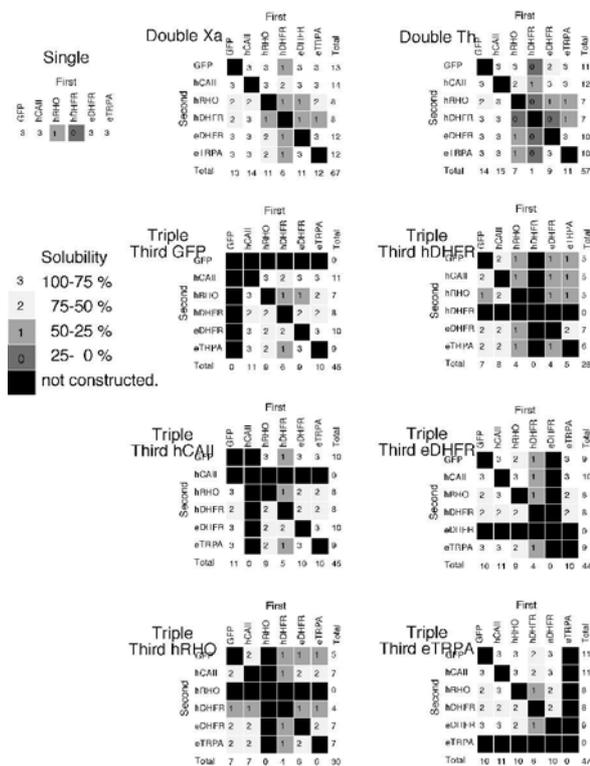
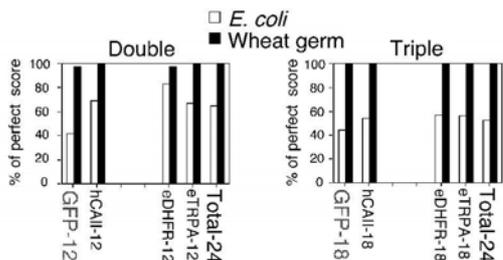


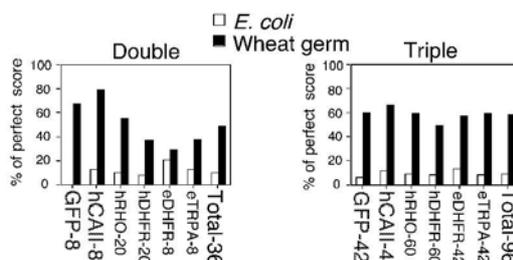
図4-2 融合蛋白質ライブラリーの溶解性 Wheat germ

次に、不溶性ドメイン(hRHO, hDHFR)の有無でライブラリーを分割して、各ドメインを含む融合蛋白質の平均溶解性を求めたところ、以下の傾向が明らかとなった(図5-1, 5-2)。



E. coli GFPが可溶性ドメインとの融合でも不溶化  
Wheat germ 不溶化効果のある可溶性ドメインは無い

図5-1 ドメインの種類と溶解性の関係  
不溶性ドメイン(hRHO, hDHFR)を含まないライブラリー



E. coli 不溶性ドメインを可溶化するドメインは無い  
Wheat germ GFP, hCAIIが不溶性ドメインを可溶化

図5-2 ドメインの種類と溶解性の関係  
不溶性ドメイン(hRHO, hDHFR)を含むライブラリー

GFPは大腸菌無細胞翻訳系においてのみ不溶化効果を示す。GFP, hCAIIは小麦胚芽無細胞翻訳系においてのみ不溶性ドメイン(hRHO, hDHFR)を可溶化する効果を示す。

その結果、大腸菌無細胞翻訳系で不溶化効果のあるドメイン(GFP, hRHO, hDHFR)を含む融合蛋白質の割合は、Doubleでは80%、Tripleでは95%にまで上昇し、その結果、ライブラリーの溶解性はDoubleからTripleで32%から18%にまで低下する。一方、小麦胚芽無細胞翻訳系で不溶化効果のあるドメイン(hRHO, hDHFR)を含む融合蛋白質の割合は、Doubleでは60%、Tripleでは80%にまで上昇するが、可溶化効果のあるドメイン(GFP, hCAII)も同じ割合で上昇し、その結果、ライブラリーの溶解性はDoubleからTripleで69%から66%と比較的高い溶解性を維持する(図6)。この事から、両翻訳系間の溶解性の差は、融合蛋白質中のドメイン数が増える事よりも、存在するドメインの種類に起因している事が示唆された。

E. coli 不溶化効果: GFP, hRHO, hDHFR 可溶化効果: 無し  
Wheat germ 不溶化効果: hRHO, hDHFR 可溶化効果: GFP, hCAII

E. coli	Double	Triple
GFP, hRHO, hDHFRを含む割合	48/60 (80%)	114/120 (95%)
ライブラリーの溶解性	32%	18%

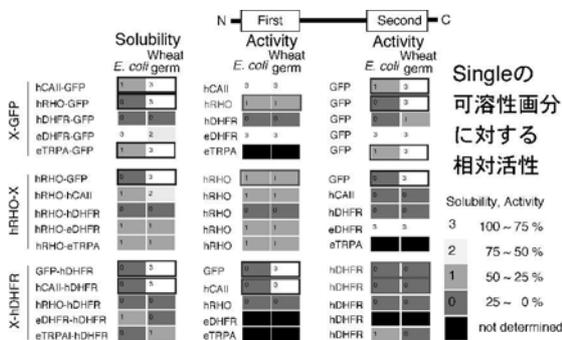
Wheat germ	Double	Triple
hRHO, hDHFRを含む割合	36/60 (60%)	96/120 (80%)
GFP, hCAIIを含む割合	36/60 (60%)	96/120 (80%)
ライブラリーの溶解性	69%	66%

溶解性の差 37% 48%

DoubleからTripleで溶解性の差が大きくなる理由は、構成ドメインの数が増える事よりも、GFP, hCAIIの効果の違いによると考えられる。

図6 ドメインの種類と溶解性

次に、Double(X-GFP, hRHO-X, X-hDHFR)の酵素活性を測定する事で、小麦胚芽無細胞翻訳系で合成した場合、ミスフォールドしている不溶性ドメイン(hRHO, hDHFR)の隣でも、可溶性ドメイン(GFP, hCAII)が正しくフォールディングしやすい事を明らかにした(図7)。この現象は大腸菌無細胞翻訳系で合成した場合には現れなかった。この事から、両翻訳系間の溶解性の差は、GFP, hCAIIの融合蛋白質中でのフォールディングの違いに起因している事が示唆された。



1. 溶解性の差は、GFP, hCAIIの活性の差に対応する
2. 可溶化してもhRHO, hDHFRは不活性

図7 Doubleの溶解性と活性

以上の結果から、真核生物由来翻訳系の方が、翻訳の際にドメイン間のミスフォールディングを起こしにくい事、また、マルチドメイン蛋白質を構成するドメイン種に対してより広い許容性を有する事を示した。この事は、真核生物由来翻訳系の方が、より多くのドメイン種に対して翻訳に共なったフォールディングが可能である事を示唆している。