

D208 リポソーム上における RNA の構造変化ならびに *in vitro* 翻訳への影響

(大阪大院・基礎工) ○(学)菅 恵嗣・(正)馬越 大*・(学)Bui Thi Huong・(学)田部 智之・
(正)島内 寿徳・(正)久保井 亮一

生命現象を解き明かすアプローチとして Genome や Proteome という知識体系が確立されてきた。近年、遺伝子およびタンパク質が高次機能を発現するためのもう一つの要素として生体膜が重視されており、「Membranome」が提唱されている。これまで、モデル生体膜(リポソーム)は *in vitro* 遺伝子発現系と相互作用することが報告されている。生体膜(リポソーム)は生体分子を膜上で認識・構造制御することで各種生体分子の機能活性を制御していると考えられる。このような生体膜による遺伝子発現制御を“生体膜干渉 **Biomembrane Interference**”と定義する。本研究では、種々のリポソームが *in vitro* GFP(Green Fluorescent Protein)合成系に及ぼす生体膜干渉効果を素過程レベルで検討した。生体膜共存下での遺伝子発現メカニズム解明を目指し、特に、翻訳過程における RNA の構造変化ならびに翻訳活性について検討した成果を報告する。

【実験】

1. リポソームの調製

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocoline (POPC), 1,2-dioleoyl-3-trimethyl-ammonium-propane (DOTAP) および cholesterol (Ch) から成る脂質薄膜を Tris-HCl 緩衝液(0.1M, pH=8.0)で水和し、凍結/融解(5cycle)の後、extrusion 法によりリポソーム(粒径 100nm)を調製した。

2. *in vitro* GFP 発現実験

大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系として RTS 100 *E. coli* HY Kit (以下 RTS-Kit, Roche Diagnostics 社)を使用した。リポソーム(1.17mM)を添加し、30°Cで6時間発現処理した。GFP 発現量は、蛍光強度($\lambda_{ex}=395\text{nm}$, $\lambda_{em}=509\text{nm}$)より解析した。

3. mRNA の分離・精製

DNA テンプレートとして pIVEX Control Vector GFP (Roche 社)を使用した。DNA を制限酵素 ApaI で処理し、GFP の配列をコードする DNA フラグメントを作成した。これを T7 RiboMAX™ (Promega 社)により転写し GFP をコードする mRNA を合成した。得られた mRNA は SV Total RNA Isolation System (Promega 社)により分離・精製し、吸光度 A_{260} により定量評価した。

4. CD スペクトルおよび T_m の計算

1.17 mM リポソーム共存下における mRNA の分子円二色性を CD スペクトルにて検討した。300 nm から 200 nm の CD スペクトルを 0.1 cm 長のクォーツセルを用いてスキャン速度 50 nm/min にて測定した。データは 5 回積算した。各温度における 208 nm の負のピーク(θ_{208})を規格化し、構造変化始めの温度と構造変化終わりの温度の中間点を RNA 融解温度、 T_m と定義し計算した。

【結果および考察】

リポソームはその組成に応じて様々な物理的性質を有する(膜流動性、表面電荷、ドメイン構造)。当研究室ではこれまでに、無細胞 GFP 発現系にお

ける種々のリポソームの役割について検討してきた(**Table 1**)。中性リポソーム(POPC/Ch)は GFP 発現量を増加させるが、正電荷リポソーム(DOTAP)は GFP 発現量を減少させた(**Fig.1**)。特に DOTAP は翻訳過程を完全に抑制している事がわかった。以下では、POPC/Ch と DOTAP について、翻訳過程におけるリポソームと RNA の相互作用について検討した。

UV スペクトルを用いてリポソーム-RNA 複合体形成について検討した。POPC/Ch, DOTAP 共に mRNA 共存下ではリポソーム懸濁液の濁度 OD₄₀₀ が増加した事から、リポソームと mRNA が複合体を形成している事が示唆された。さらに mRNA の二次構造を CD スペクトルにて検討したところ(**Fig.2**)、DOTAP は劇的に mRNA 二次構造を変化させた。一方、POPC/Ch では 30 °C における二次構造は大きな変化は見られないものの、熱ストレスに対する挙動が異なった。mRNA 自身の融解温度 T_m は 38 °C であったが、POPC/Ch 共存下では 33 °C、DOTAP 共存下では 48 °C である事がわかった。

以上の知見より、リポソームは生体分子と相互作用し、膜上で分子構造を制御する事で機能・活性を制御している事が示唆された。生体膜干渉効果に基づいた生体膜-生体分子間相互作用を検討する事で生命現象メカニズムの解明が期待される。

Table 1 *in vitro* GFP 発現における生体膜干渉効果

	Neutral POPC, PMPG, GPC, etc.	Microdomain POPC/Ch etc.	Negative-Charge POPG/POPG	Positive-Charge POPC/SA, DOTAP, DOTAP/Cholesterol stress		
DNA						
Transcription	+	++	++	++	--	~0
RNA						
Transcription	+	++	~0	--	--	-
Polypeptide						
Folding	+	+	-	+/-	+/-	+/-
Protein						

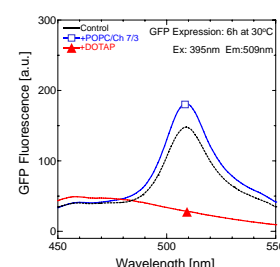


Fig.1 リポソーム共存下における GFP 発現

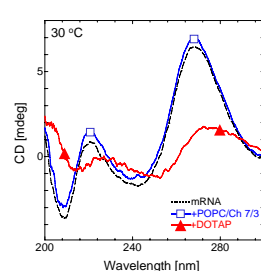


Fig.2 mRNA の CD スペクトル

【引用文献】

- 1) H.T.Bui, et al, *Langmuir*, **24**(19), 10537-10542 (2008).
- 2) H.T.Bui, K.Suga, et al., *Membrane*, **34**, 146 (2009).
- 3) H.T.Bui, K.Suga, et al., *Biochem. Eng. J.*, **32**, 154-160 (2009).
- 4) H.Umakoshi, K.Suga, et al., *JBB*, **108**(5), 450-454 (2009).
- 5) H.Umakoshi, K.Suga, et al., *Solv.Extr.Res.Dev.Japan*, **16**, 136-141 (2009).
- 6) K.Suga, et al., *Biotech.J.*, submitted (2009)

E-mail: msb@cheng.es.osaka-u.ac.jp
TEL/FAX: +81-(0)6-6850-6287