

自己評価報告書

平成23年 5月 6日現在

機関番号：13302

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20107005

研究課題名（和文） 非天然アミノ酸の部位特異的導入技術を用いたタンパク質の揺らぎ解析

研究課題名（英文） Study of protein fluctuations by introducing nonnatural amino acids

研究代表者

芳坂 貴弘 (HOHSAKA TAKAHIRO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号：30263619

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質・非天然アミノ酸・揺らぎ・4塩基コドン・無細胞翻訳系・マルトース結合タンパク質・蛍光共鳴エネルギー移動・一分子測定

1. 研究計画の概要

タンパク質中のアミノ酸変異は、タンパク質の揺らぎ研究において有効な研究手段である。しかし、従来の研究では使用できるアミノ酸は天然の20種類に限られていたために、精密な揺らぎの制御や揺らぎの計測は困難であった。本研究では、非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入技術を用いて、蛍光共鳴エネルギー移動のドナーおよびアクセプターとなる非天然アミノ酸をタンパク質の特定部位へ導入することで、タンパク質の構造揺らぎを計測するとともに、さらに20種類の天然アミノ酸に加えてそれらの類似体となる様々な非天然アミノ酸や修飾アミノ酸を導入することで、揺らぎを制御しつつ計測できる手法を確立することを目的として計画した。

2. 研究の進捗状況

(1) 蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の基質結合に伴う構造変化のFRET解析

モデルタンパク質としてマルトース結合タンパク質を使用して、その基質結合に伴う構造変化を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いて計測する手法を確立した。まず4塩基コドンCGGGを用いて15ヶ所のチロシン部位に蛍光標識アミノ酸BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを導入し、Tyr210とTyr242に導入した場合には、基質の結合に伴って蛍光強度が大きく増加することを見出した。これは基質非存在下ではBODIPYFLが近傍のトリプトファンにより消光されているが、基質の結合による構造変化によってトリプトワンの位置が変化し消光が起こらなくなったためだと確認された。また、Tyr210部位に

BODIPY558を導入しつつ、N末端部分にBODIPYFLを導入することでBODIPYFLからBODIPY558へのFRETの変化と、Tyr210でのBODIPY558の蛍光消光の変化により、蛍光強度比が大きく変化することも示した。

(2) リンカーを含まない蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の揺らぎ解析

蛍光基の位置揺らぎを抑制するために、FRETのドナーおよびアクセプターとアミノ酸の間にリンカーを含まない非天然アミノ酸を新たに設計し、マルトース結合タンパク質のN末端および内部の様々な部位にそれぞれ導入して、FRETの評価を行なった。その結果、ドナー・アクセプター間距離とその分布から、タンパク質の構造揺らぎを計測できる可能性を示すことができた。

(3) 揺らぎ制御に向けた種々の非天然アミノ酸の導入

揺らぎ制御に対する非天然アミノ酸の導入の効果を評価するために、様々なフェニルアラニンの類似体や、PEG鎖などを付加した非天然アミノ酸、翻訳後修飾アミノ酸などについて、新たにタンパク質への導入法を確立した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)当初の研究目的、研究計画・方法に対しては、概ね順調に達成されつつある。研究の過程では、いくつかの問題点および変更点も生じているが、これは当初懸念していた点を克服するものであり、適切な変更であったと判断している。また、当初想定した件数

以上の共同研究が進行しており、新たな学術領域の形成という目的の達成にも貢献している。

4. 今後の研究の推進方策

今後も引き続き、非天然アミノ酸の導入による揺らぎの計測および制御の研究を推進する。その際、これまでの研究において生じた問題点を改善できるよう、新たな非天然アミノ酸の設計・合成とタンパク質への導入も行なう。また、新学術研究領域内の共同研究により、タンパク質揺らぎの有用な計測方法が開発されつつあることから、その計測方法に適したタンパク質試料の合成にも注力する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Yasunori Tokuda, Takayoshi Watanabe, Kazushi Horiike, Kaori Shiraga, Ryoji Abe, Norihito Muranaka, Takahiro Hohsaka, Biosynthesis of proteins containing modified lysines and fluorescent labels using non-natural amino acid mutagenesis. *J. Biosci. Bioeng.*, 111, 402-407 (2011) 査読有
- ② Masanori Miura, Norihito Muranaka, Ryoji Abe, Takahiro Hohsaka, Incorporation of fluorescent-labeled non- α -amino carboxylic acids into the N-terminus of proteins in response to amber initiation codon. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 83, 546-553 (2010) 査読有
- ③ 芳坂 貴弘, 非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術ーバイオメディカル応用に向けてーメディカルバイオ別冊, 72-77 (2010) 査読無
- ④ Naoki Shozen, Issei Iijima, Takahiro Hohsaka, Site-specific incorporation of PEGylated amino acids into proteins using nonnatural amino acid mutagenesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 4909-4911 (2009) 査読有
- ⑤ Issei Iijima, Takahiro Hohsaka, Position-specific incorporation of fluorescent non-natural amino acids into maltose-binding protein for detection of ligand binding by FRET and fluorescence quenching. *ChemBioChem* 10, 999-1006 (2009) 査読有

[学会発表] (計 53 件)

- ① Yasunori Tokuda, Takahiro Hohsaka, Site-specific incorporation of two fluorescent nonnatural amino acids into proteins for single-molecule FRET, PACIFICHEM2010, 2010.12.17, Honolulu, USA
- ② Issei Iijima, Takahiro Hohsaka, Precise FRET analysis of protein structures by double-incorporation of nonnatural amino acids labeled with donor and acceptor, 第 48 回日本生物物理学会年会, 2010.9.20, 東北大学川内キャンパス
- ③ 聖前 直樹, 芳坂 貴弘, PEG 化非天然アミノ酸のインターフェロンへの部位特異的導入, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.11, パシフィコ横浜
- ④ 芳坂 貴弘, 非天然アミノ酸導入技術を利用したタンパク質の部位特異的蛍光標識と FRET 解析への応用, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009.5.22, 熊本全日空ホテル
- ⑤ Takahiro Hohsaka, Site-specific fluorescence labeling of proteins through extension of the genetic code and its application to FRET analysis of proteins, 揺らぎが機能を決める生命分子の科学第 2 回公開シンポジウム, 2009.3.17, 岡崎コンファレンスセンター