

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13302

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25102006

研究課題名(和文)生命分子システムの有機化学的拡張による動的秩序の創出

研究課題名(英文)Development of chemically expanded biomolecular systems with dynamic ordering function

研究代表者

芳坂 貴弘(Hohsaka, Takahiro)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：30263619

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 71,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、非天然アミノ酸および非天然分子を部位特異的に導入することで、タンパク質の動的秩序の検出および制御を試みた。本研究を通じて、抗原の結合を蛍光変化として検出できる抗体の発現、非天然アミノ酸を導入したタンパク質の生細胞内での発現、アミノアシルtRNA合成酵素のリポソーム内での分子進化、芳香族アミノ基含有非天然アミノ酸の導入と特異的修飾、非天然分子の部位特異的導入、光架橋アミノ酸の導入によるタンパク質分子間光架橋および立体構造に依存した分子内光架橋などの新たな手法を開発できた。これらの成果は、非天然分子導入により細胞外・細胞内でのタンパク質の動的秩序を捉えて制御することを可能にした。

研究成果の概要(英文):In this study, several attempts were made to detect and control the dynamic ordering of proteins by site-specific introduction of nonnatural amino acids and nonnatural molecules. Throughout this study, unique methods were developed for expression of fluorescent antibodies that can detect antigen-binding as fluorescence change, in vivo expression of proteins containing nonnatural amino acids, molecular evolution of non-natural aminoacyl-tRNA synthetase within liposomes, specific chemical modification of nonnatural amino acid-containing proteins, introduction of nonnatural molecules into proteins, and inter- and intramolecular photocrosslinking of protein-protein interaction and protein conformational change. These achievements based on the incorporation of nonnatural molecules allowed detection and control of the dynamic ordering of proteins in vitro and in vivo.

研究分野：生体関連化学

キーワード：タンパク質 非天然アミノ酸 光架橋 抗体 蛍光

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の動的秩序形成能は、生物の長い進化の過程でアミノ酸配列を最適化することで獲得されたものであり、その原理を理解して人為的に制御することは未だ容易では無い。その一方で、非天然分子を用いることで、人工的に設計された動的秩序形成系を創出することも試みられているが、タンパク質のような高度な機能発現を達成するには至っていない。非天然分子とタンパク質を機能的に融合させることは、タンパク質の動的秩序形成能に基づく高度な機能を人為的に制御できるだけでなく、動的秩序形成能を付与した非天然分子系によって細胞内の生命分子システムを制御することも可能にするだろう。

このような、生体分子と非天然分子のインターフェイスとして、研究代表者は、通常3塩基からなる遺伝暗号(コドン)を4塩基へ拡張することで、人工的に合成された非天然アミノ酸をタンパク質へ部位特異的に導入する手法を独自に開発してきた。これにより、通常の化学修飾法では困難な、非天然分子をタンパク質の狙った部位に定量的に導入することを達成し、タンパク質本来の機能と人工機能を併せ持つ人工タンパク質の設計と合成を可能にしてきた。代表者はこの手法を発展させて、蛍光基で修飾された非天然アミノ酸を導入することで、蛍光や蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によりタンパク質の構造や構造変化を解析する手法や、抗体と抗原の結合を蛍光により検出する手法を開発するなどの成果を挙げてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がこれまで開発してきた非天然アミノ酸の部位特異的導入技術を用いて、タンパク質の本来の機能と非天然分子の人工的な動的秩序制御・検出機能や動的秩序形成機能を併せ持つ人工タンパク質の創出を目指した。具体的には、光応答性分子や架橋分子、蛍光分子を有する非天然アミノ酸を導入することで、タンパク質の集合・離散過程を計測するとともに光などの外部刺激によって制御することを試みた。また、非天然アミノ酸導入技術以外の非天然分子導入法の開発も行った。加えて、細胞内などの生理的環境下でのタンパク質の動的秩序形成の検出・制御を試みた。

### 3. 研究の方法

非天然アミノ酸の導入は、代表者らが開発した4塩基コドン法およびアンバーサプレッション法を用いた(図1)。これは、非天然アミノ酸導入部位を4塩基コドンCGGGあるいはアンバーコドンTAGに置換しておき、それを読み取るtRNAに化学的アミノアシル化により非天然アミノ酸を結合させ、無細胞翻訳系においてタンパク質合成を行うものである。

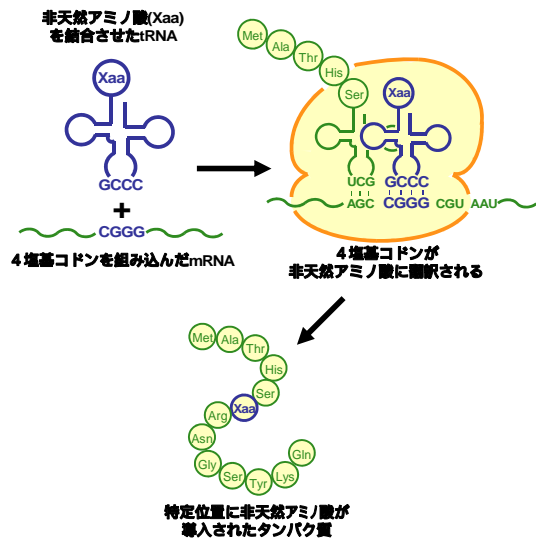


図1. 非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入

一方、非天然アミノ酸導入タンパク質の合成に使用する無細胞翻訳系は収量が低く、種々の機能評価を行なうために十分な量のタンパク質を得ることは困難な場合が多い。そこで本研究では、非天然アミノ酸導入タンパク質の細胞内での発現法の確立も行った(図2)。

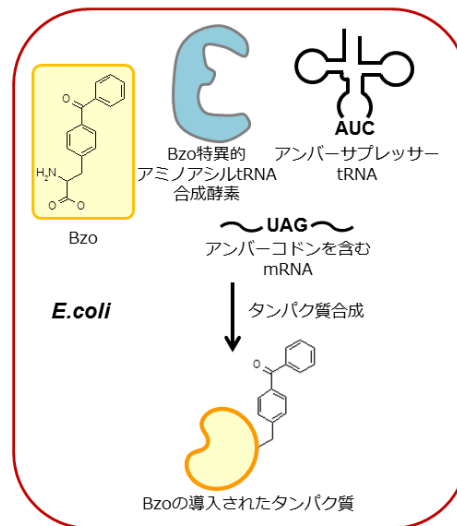


図2. アミノアシル tRNA 合成酵素変異体を用いた非天然アミノ酸導入タンパク質の細胞内発現

これは、非天然アミノ酸を基質とするアミノアシル tRNA 合成酵素変異体とアンバーサプレッサー tRNA を大腸菌中で共発現させ、非天然アミノ酸導入タンパク質を細胞内で発現させるものである。さらに、この手法により芳香族アミンを有する非天然アミノ酸をタンパク質に導入しておき、アルデヒド誘導体を弱酸性下で還元的アルキル化反応を行なうことで、部位特異的かつ高効率にタンパク質を修飾した。

また、非天然アミノ酸を用いずにタンパク質へ非生体分子を導入する手法も試みた。N末端領域に蛍光標識アミノ酸を導入することで、抗原の結合を蛍光変化として検出できる知見が得られていたことから、抗体のN末端領域に蛍光基を導入することで検証した。まず、N末端アミノ基が相対的に低いpKa値を示すことに基づいて、弱酸性溶液中で還元的アルキル化を行うことで、蛍光基やPEG鎖などを付加したアルデヒドにより、タンパク質のN末端を選択的に修飾した。一方、SNAPタグタンパク質を一本鎖抗体断片のN末端側に融合発現させて、蛍光基を連結させたSNAPリガンドを付加することで、N末端付近に蛍光基を配置した一本鎖抗体を得た。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では、タンパク質の本来の機能と人工的な機能を併せ持つ人工タンパク質の創出を目指し、まず蛍光標識非天然アミノ酸を用いて、タンパク質の機能を蛍光変化として検出することを試みた。既に一本鎖抗体のN末端部位に蛍光標識アミノ酸を導入することで、抗原の結合を蛍光変化として検出できることを見出している。今回、さらにC末端側に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)のドナーとなる蛍光標識アミノ酸を導入する、あるいは緑色蛍光タンパク質を融合することにより、抗原の結合を蛍光強度比の変化として検出できる手法を開発した(図3)。この手法は、細胞内などでの抗原の蛍光レシオイメージングへの応用も可能である。また、糖結合タンパク質(レクチン)に対しても糖基質の結合を蛍光変化として検出できることを示した。合わせて、糖タンパク質や膜タンパク質の発現を行い、本技術の適用範囲の拡大を図った。

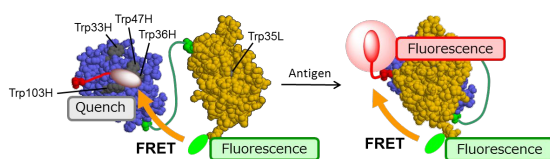


図3. 蛍光標識アミノ酸を二重導入した一本鎖抗体による抗原の蛍光レシオ検出

(2) 非天然アミノ酸導入タンパク質を細胞内で発現させる手法の確立を行なった。非天然アミノ酸を基質とするアミノアシルtRNA合成酵素変異体とアンバーサプレッサー-tRNAを大腸菌中で共発現させることで、非天然アミノ酸導入タンパク質を大量発現させた。これにより、光異性化分子や光架橋分子などを側鎖に有する非天然アミノ酸を導入したタンパク質の発現系を構築できた。その一方で、アミノアシルtRNA合成酵素変異体の活性向上とアミノ酸特异性改変を効率的に行うために、アミノアシルtRNA合成酵素変異体のin vitro selection法の開発を行った(松浦班員との領域内共同研究)。無細胞転写・翻訳

系とともに、アミノアシルtRNA合成酵素遺伝子とアンバーサプレッサー-tRNAをリボソーム内部に封入し、非天然アミノ酸が導入された場合のみGFPが発現する選択系を構築した(図4)。実際にランダム変異を加えたアミノアシルtRNA合成酵素遺伝子を用いて選択実験を行った結果、従来よりも活性の向上した変異体を取得できることを実証した。

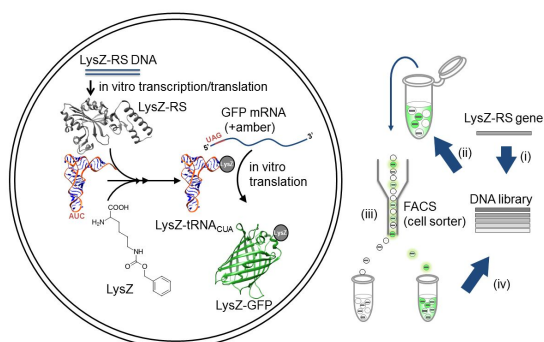


図4 無細胞翻訳系を内包したリボソームを用いた非天然アミノ酸用アミノアシルtRNA合成酵素変異体の分子進化

(3) タンパク質へ導入可能な非天然アミノ酸はアミノアシルtRNA合成酵素およびリボソームの基質となる必要があるため、分子構造・サイズには制限がある。一方でそのような制限を受けないよう、特異な反応基を持つ非天然アミノ酸をタンパク質へ導入した後、その非天然アミノ酸を化学修飾する手法を開発した。従来はアルキンやアジドなどの非天然反応性分子を用いることが一般的であったが、本研究では芳香族アミンを有する非天然アミノ酸を用いた。その結果、芳香族アミンのみが脱プロトン化する弱酸性溶液中において、アルデヒドを用いた還元的アルキル化反応により、特異的かつ高効率に蛍光分子などを付加できることが確認された(図5)。

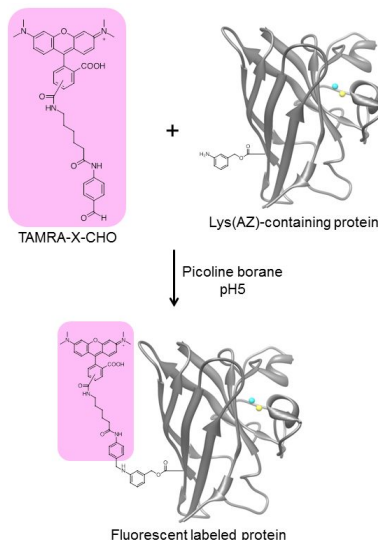


図5 芳香族アミン含有非天然アミノ酸を導入したタンパク質への非天然分子の特異的付加



この手法により、アミノ酸として直接導入するのが困難な非天然分子であっても、タンパク質へ部位特異的に付加することが可能になった。

(4) 非天然アミノ酸導入技術は遺伝子からの発現を必要とするため、タンパク質そのものを出発材料として用いることができない。この制限を克服するために、非天然分子をタンパク質へ直接導入する手法も試みた。N末端を修飾するための手法として、弱酸性溶液中でアルデヒド誘導体を用いてN末端アミノ基を還元的アルキル化する反応を検討した。その結果、アルデヒド添加量を調整することで、N末端アミノ基を選択的に修飾できることが示された(図6)。また、得られたN末端蛍光標識抗体は、抗原の結合により蛍光強度の変化を示し、非天然アミノ酸導入により合成したN末端蛍光標識一本鎖抗体と同様の蛍光特性を示すことが確認された。

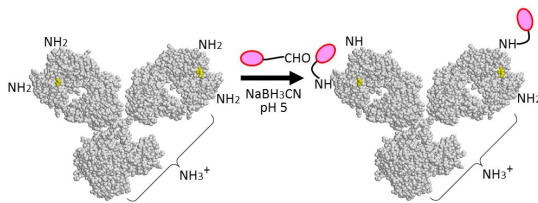


図6 タンパク質のN末端への非天然分子アルデヒド誘導体の特異的修飾反応

また、SNAP タグタンパク質融合と蛍光標識 SNAP リガンド添加により、非天然アミノ酸導入技術を用いることなく、タンパク質の近傍に蛍光分子を局在させることを試みた。SNAP タグと一本鎖抗体との連結位置とリンカー長を最適化することで、非天然アミノ酸導入により合成したN末端蛍光標識一本鎖抗体と同様に、抗原の結合により蛍光変化を示すことが見いだされた。さらに GFP(緑色蛍光タンパク質)を融合することで、FRETと蛍光変化を組み合わせ、蛍光レシオ変化により抗原を検出することも可能であった(図7)。

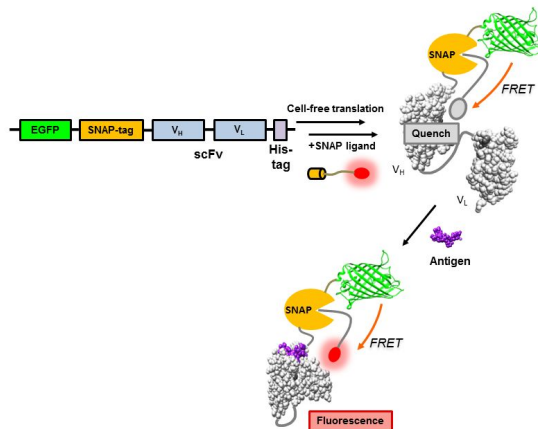


図7 EGFP-SNAP 融合一本鎖抗体による蛍光レシオ変化に基づく抗原検出

この場合、非天然アミノ酸の導入を必要とせず、EGP-SNAP 融合タンパク質を細胞に直接発現させることも可能であり、実際に培養細胞において抗原の有無を蛍光顕微鏡観察により検出できることも確認された。

(5) 光架橋分子を有する非天然アミノ酸を導入することで、タンパク質間相互作用を光架橋することを行った。ラクダ由来抗体と抗原タンパク質との相互作用において、まず無細胞翻訳系を用いて抗体の特定部位へ光架橋アミノ酸を導入することで、タンパク質複合体を効果的に光架橋できることが示された。さらに、大腸菌での発現系を用いて光架橋アミノ酸導入タンパク質を大量発現させた場合も、同様の光架橋が可能であることが確認された。

一方、分子間での光架橋の際に、その副反応としてタンパク質の分子内光架橋も生じることが観察された。そこでこの副反応に着目して、タンパク質のコンフォメーション変化を分子内光架橋の変化として捉えることのできる新規原理を見いだした。基質の結合に伴い立体構造変化を生じるマルトース結合タンパク質(MBP)をモデルとして選択して、種々の部位に光架橋アミノ酸を導入し、基質の有無による分子内光架橋の変化を調べた。その結果、特定の部位に導入した場合に、基質結合に伴う立体構造変化により、SDS-PAGE 上で区別可能な異なる光架橋体が見られることがわかった(図8)。さらにこれは、光架橋アミノ酸を導入したタンパク質を細胞内で発現させて光架橋を行った場合にも同様の結果が得られた。したがって、本手法を用いることで、細胞内でのタンパク質の立体構造変化を検出することが可能であり、細胞内でのタンパク質間相互作用だけでなくタンパク質の立体構造変化を解析するための手法としても有用であることが示された。

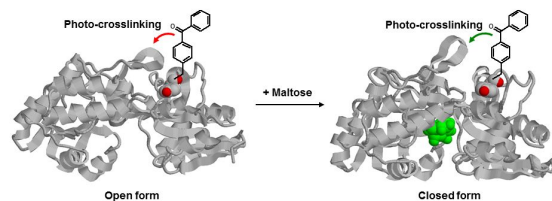


図8 光架橋アミノ酸を導入したマルトース結合タンパク質でのコンフォメーション依存的分子内光架橋。Open form および Closed form は分子内架橋体の変化により識別できる。

(6) N末端を蛍光標識した抗体による抗原の蛍光検出において、分子動力学計算(奥村班員との領域内共同研究)によりそのメカニズムを考察した。これにより、蛍光基が抗体内のトリプトファン残基に接近することで蛍光消光を起こすが、抗原の結合により重鎖と

軽鎖が強く会合して蛍光消光を抑制することを支持する結果が得られた(図9)。

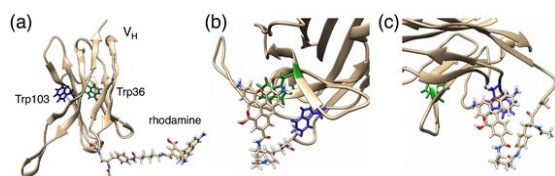


図9 N末端蛍光標識一本鎖抗体のMDシミュレーション。蛍光基と特定位置のTrpとの相互作用が示された。

以上の研究を通じて、タンパク質の複合体化などの動的秩序形成について、主に抗体を用いて検出する手法や、光架橋により固定化・不可逆化しつつその際のコンフォメーション変化を識別する手法、および、それらの研究に必要な非天然分子導入タンパク質の作製方法などを新たに確立することができた。今後これらの手法は、動的秩序形成能を示すタンパク質および非天然分子へも幅広く適用できるようになると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(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. Y. Mori, H. Okumura, T. Watanabe, T. Hohsaka, Antigen-dependent fluorescence response of anti-c-Myc Quenchbody studied by molecular dynamics simulations, *Chem. Phys. Lett.*, 698, 223-226 (2018) 査読有  
DOI: 10.1016/j.cplett.2018.03.011

2. K. Yoshikoshi, T. Watanabe, T. Hohsaka, Double-Fluorescent-Labeled Single-Chain Antibodies Showing Antigen-Dependent Fluorescence Ratio Change, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 89, 573-580 (2016) 査読有  
DOI: 10.1246/bcsj.20150384

3. K. P. Huynh Nhat, T. Watanabe, K. Yoshikoshi, T. Hohsaka, Antibody-based fluorescent and fluorescent ratiometric indicators for detection of phosphotyrosine, *J. Biosci. Bioeng.* 122, 146-154 (2016) 査読有  
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.010

4. Atsushi Yamaguchi, Takayoshi Matsuda, Kazumasa Ohtake, Tatsuo Yanagisawa, Shigeyuki Yokoyama, Yoshihisa Fujiwara, Takayoshi Watanabe, Takahiro Hohsaka, Kensaku Sakamoto, Incorporation of a Doubly Functionalized Synthetic Amino Acid into Proteins for Creating Chemical and Light-Induced Conjugates, *Bioconjugate Chem.* 27, 198-206 (2016) 査読有  
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00602

5. Atsuko Uyeda, Takayoshi Watanabe, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe, Tetsuya Yomo, Takahiro Hohsaka, Tomoaki Matsuura, Liposome-Based in Vitro Evolution of Aminoacyl-tRNA Synthetase for Enhanced Pyrrolysine Derivative Incorporation, *ChemBioChem*, 16, 1797-1802 (2015) 査読有  
DOI: 10.1002/cbic.201500174

[学会発表](計65件)

1. K. Fukunaga, D. Novitasari, T. Watanabe, and T. Hohsaka, A novel IgG-based fluorescent probe showing increased fluorescence upon binding of antigen, The 6th Official Conference of the International Chemical Biology Society, Shanghai, China, 10/17-20 (2017)

2. 芳坂豊弘, 非天然アミノ酸の導入によるタンパク質機能の人工的カスタマイズ, 招待講演, 第16回日本蛋白質科学会, 福岡, 6/7-9 (2016)

3. Kim Phuong, Huynh Nhat, Takayoshi Watanabe, Takahiro Hohsaka, Novel genetically encoded antibody-based biosensor for fluorescence ratio detection of antigen, PACIFICHEM2015, Honolulu, USA, 12/15-20 (2016)

4. Kensuke Yoshikoshi, Takahiro Hohsaka, Fluorescence ratiometric detection of antigen using double fluorescent-labeled scFv based on FRET and fluorescence quenching, PACIFICHEM2015, Honolulu, USA, 12/15-20 (2016)

5. Takahiro Hohsaka, Incorporation of nonnatural amino acids through expansion of the genetic code and its application to fluorescence analysis of proteins, 招待講演, BMB2015(第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会), 神戸, 12/2 (2015)

[図書](計2件)

1. 芳坂豊弘, 「非天然アミノ酸の導入」, 人工細胞の創製とその応用(植田充美監修) 1-5章, p39-46, シーエムシー出版, 2017

2. 芳坂豊弘, 「変異導入法」, 揺らぎ・ダイナミクスと生体機能(寺嶋正秀編) 6章, p91-102, 化学同人, 2013

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hohsaka>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

芳坂 貴弘 (HOHSAKA TAKAHIRO)  
北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技  
術研究科・教授  
研究者番号：30263619