

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21631

研究課題名(和文) 複数種の非天然型アミノ酸誘導体導入による高機能化タンパク質生産技術の高度化

研究課題名(英文) Development of highly functionalized protein production technology by incorporating multiple non-natural amino acid derivatives

研究代表者

大竹 和正(Ohtake, Kazumasa)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：80593631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では二種の非天然型アミノ酸及びその誘導体を生体内で同時に同一のポリペプチド鎖上に導入する手法の開発に成功した。本法は遺伝暗号を改変された大腸菌を用いることにより実現された。研究開始時点ではもとにした株の性質に依拠し導入出来るアミノ酸種が限られていたが本課題中でこの障壁を回避することに成功し、非酵素的に活性化可能な安定化トランスグルタミナーゼの生産を可能とした。他のターゲットについても同法の有用性を示しており、非天然型アミノ酸を用いたタンパク質工学への幅広い展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然界において生物が通常タンパク質合成に用いるアミノ酸は20種類に限られている。アミノ酸が連なって出来るタンパク質の機能や性質も、元々のアミノ酸の化学的特性が制限されることに由来した限界があると考えられる。新たな化学的特性をもつ非天然型アミノ酸をタンパク質に導入する技術はこの限界を超えたタンパク質を生み出すことを可能にする。本課題の成果はこのような研究を加速し、タンパク質の産業医療応用の可能性をさらに広げるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed a method in vivo to incorporate two non-natural amino acids or their derivatives simultaneously into the same polypeptide chain. This method was implemented by using E. coli codon redefined strains. At the beginning of this study, the type of amino acid species that could be introduced was limited, depending on the property of the original strain, but this barrier was successfully avoided, enabling the production of non-enzymatically activatable stabilized transglutaminase. The utility of this method has been demonstrated for other targets, and a wide range of applications to protein engineering using non-natural amino acids are expected.

研究分野：生化学 分子生物学 タンパク質科学 合成生物学

キーワード：応用生物化学 酵素化学 バイオテクノロジー タンパク質工学 微生物による生産 非天然型アミノ酸 拡張遺伝暗号 合成生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非天然型アミノ酸は通常の 20 種類のアミノ酸では得られない化学的特徴をタンパク質へと付与することが出来る。タンパク質はこれまで産業や医療に幅広く利用されているが非天然型アミノ酸を利用した高機能化タンパク質は、よりパワフルなツールとなると期待されていた。

申請者は本課題の申請時点までに大腸菌翻訳終結因子 1 遺伝子破壊株をはじめとする大腸菌遺伝暗号改変株の開発を進めていた。この成果により従前では不可能であったタンパク質中の部位特異的多数箇所への非天然型アミノ酸導入を可能とすると共に、複数種類の非天然型アミノ酸及び類似体の導入へと繋がる基礎的成果を得ていた。

2. 研究の目的

本課題申請時まで UAG 終止コドン在未定義状態にした後、様々な非天然型アミノ酸を割り当てられる株の作製に成功していた。(Mukai et al., 2015, *Sci. Rep.*) また、UAG コドン以外の非天然型アミノ酸導入についても取り組んでおり、大腸菌において最も希なセンスコドンである AGG アルギニンコドンをホモアルギニンに再定義した株の作製も報告していた。(Mukai et al., 2015, *Nucleic Acids Res.*) この時点で得られていた知見と大腸菌株を利用して同一のタンパク質鎖中に二種類の非天然型アミノ酸を効率的に導入出来る大腸菌株の作製を行いたいと考えた。二種類の非天然型アミノ酸を同時に導入した先例は報告されていたが (Neumann, H. et al., 2010, *Nature*) 各一箇所しか導入されておらず収量の面でも問題が大きかった。我々の技術を統合することにより複数種の非天然型アミノ酸の高効率での導入が可能となり、一種類の非天然型アミノ酸導入では実現困難なタンパク質生産へと道が拓かれると考え、本研究を立案した。

本研究期間において具体的には、ハロゲン化チロシンと α -ヒドロキシ酸を同時に導入出来る株の開発を行うことを目的とした。さらにこの株を利用して、非酵素的切断による成熟型トランスグルタミナーゼ (TG) を調製し、ハロゲン化チロシンにより安定化した TG の取得を行い、最終的には安定化 TG の効率的な生産を可能とすることを目標とした。さらにこのプロセスを通じ、複数の非天然型アミノ酸を独立かつ自由に用いることが出来る新たなタンパク質エンジニアリング手法の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、試験管内で有用であり高性能化が期待されるタンパク質として γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である TG をターゲットとした。TG は正しい立体構造を保持するため propeptide を付加した状態で発現させる必要がある。この propeptide により活性部位のシステイン残基がマスクされている。本研究では、二種の非天然型アミノ酸を導入出来る大腸菌株の開発を目指した。この株を利用することにより、ハロゲン化チロシンによる TG の安定化、 α -ヒドロキシ酸による非酵素的な propeptide 除去を行い、高機能化 TG の効率的な生産が可能になると考えた。TG の熱安定化は高温でケラチンに作用させることによるウールの改質、耐酸性の向上はコラーゲンの架橋による皮なめしなど産業面での様々な有望な応用が見込まれる。

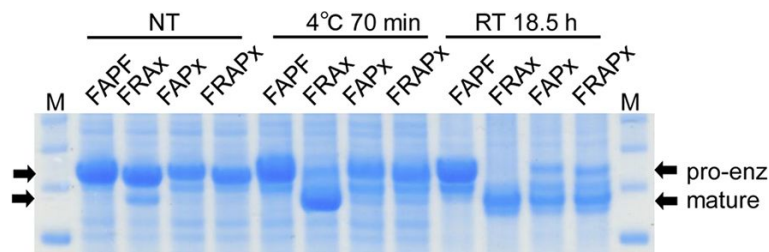
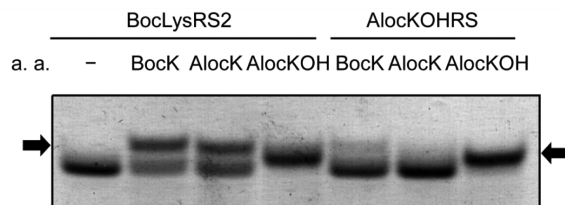
4. 研究成果

(1) α -ヒドロキシ酸導入株の作製

申請者の属する研究室ではアミノ酸のみならず α 位のアミノ基をヒドロキシ酸へと置換した α -ヒドロキシ酸の導入も報告している。(Kobayashi et al., 2009, *J. Mol. Biol.*)

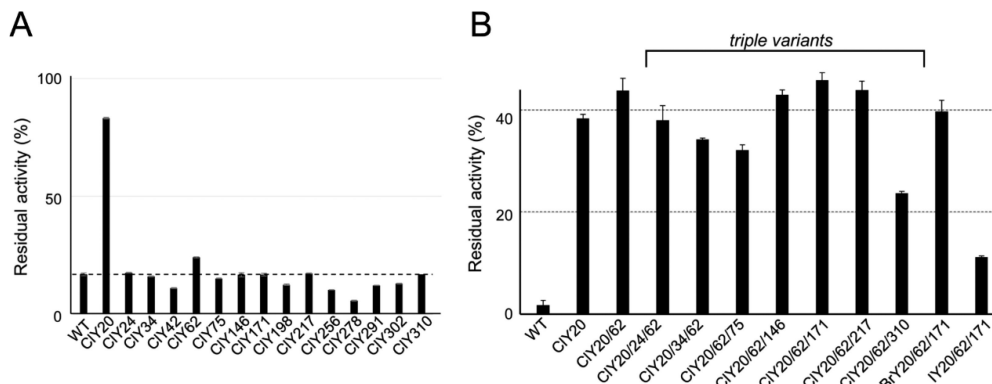
α -ヒドロキシ酸の側鎖部位の最適化や PyIRS のアミノ酸置換を行うことにより導入効率を実用的なレベルまで高めると共に、アミノ酸(AlocK)を認識しない α -ヒドロキシ酸(AlocKOH)特異的な酵素の開発にも成功した。(上図)

α -ヒドロキシ酸をタンパク質中へと導入することにより、主鎖のペプチド結合の一部をエステル結合に置き換えることが出来る。このエステル結合は塩基性条件下で非酵素的に切断が可能である。上述の報告ではアンモニア水で切断反応を行っていたが、アンモニア水はタンパク質へ深刻な損傷を与える。本研究では比較的穏和な塩基性緩衝液条件下でも切断が可能なることを示し、さらに周辺配列の最適化により切断効率を向上させることに成功した。(右図)



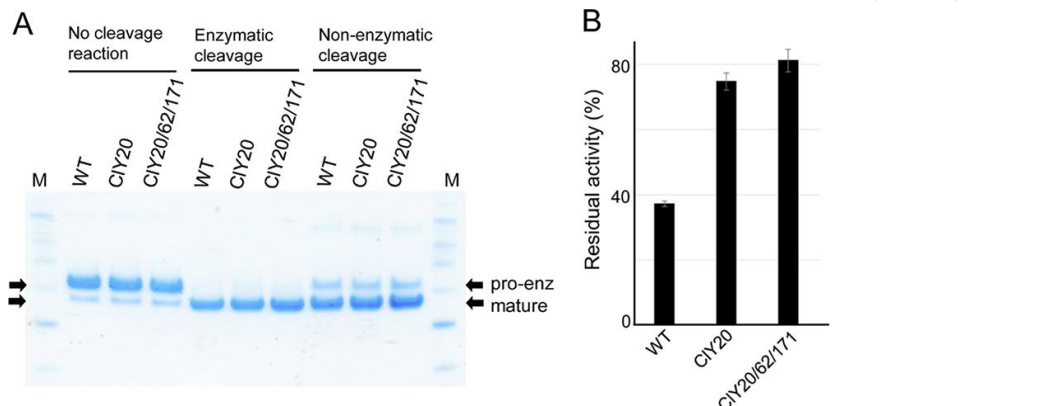
(2) ハロゲン化チロシンによる TG の安定化

申請者は 3-クロロチロシン(CIY)をはじめとするハロゲン化チロシンによりタンパク質の安定化が可能であることを報告している。(Ohtake et al., 2015, *Sci. Rep.*) TG においてもチロシン残基を CIY に置換した際に安定化する変異体が複数存在することを見出した。(下図 A) また、置換を組み合わせることにより、さらに安定化した三重置換体の作製に成功した。(下図 B) 最も安定な三重置換体 CIY20/62/171 は野生型に比べて約 1.4 倍の活性を保持していた。



(3) 非酵素的に活性化可能な安定化 TG の生産

(1), (2)の成果を踏まえ、AGG コドンに -ヒドロキシ酸を、UAG コドンに CIY をそれぞれ割り当てることとし、同時に TG へと導入することにより塩基性条件下で非酵素的に活性化可能な安定化 TG の生産を目指した。当初計画では AGG コドンが常に -ヒドロキシ酸へと翻訳される株の作製を想定していたが、発現量の最大化や他の非天然型アミノ酸等への応用を目指した際に一時的再定義の方が有利であると判断し方針転換を行った。培養/発現条件の最適化を行い、-ヒドロキシ酸/CIY 導入 TG の効率的生産を可能とした。(下図 A) ここで得られた TG は非酵素的に活性化可能であると同時に安定化効果も保持していることを示した。(下図 B)

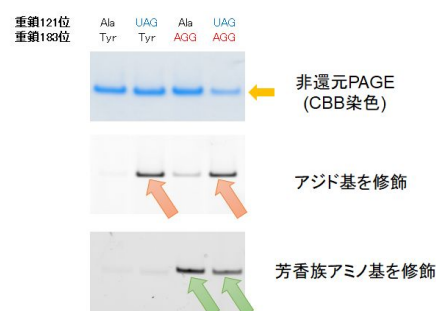


ここまでの研究成果について 2018 年に *ACS Synthetic Biology* 誌上において論文発表を行った。

(4) 抗体 Fab 断片への二種非天然型アミノ酸の同時導入

本研究において開発された手法は様々な非天然型アミノ酸の同時導入に応用可能であると考えられる。そこで他の研究や医療応用上有用なタンパク質である抗体をターゲットとし、バイオオーソゴナルな反応が可能である二種の非天然型アミノ酸の同時導入可能性の検討を行った。この結果、AGG コドンと UAG コドンにそれぞれアジド基と芳香族アミノ基をもつ非天然型アミノ酸が導入され、それぞれ独立に修飾可能な抗体断片の生産に成功した。(右図)

本課題において開発された手法は種々の非天然型アミノ酸のタンパク質への同時導入を可能とし、非天然型アミノ酸を利用したタンパク質科学/工学の進展に寄与するものと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1)

Ohtake, K.; Mukai, T.; Iraha, F.; Takahashi, M.; Haruna, K. I.; Date, M.; Yokoyama, K.; Sakamoto, K.

“Engineering an Automaturing Transglutaminase with Enhanced Thermostability by Genetic Code Expansion with Two Codon Reassignments.”

ACS Synth Biol **2018**, 7 (9), 2170-2176.

<https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00157>

査読あり

2)

Yamaguchi, A.; Iraha, F.; Ohtake, K.; Sakamoto, K.

“Pyrrolysyl-tRNA Synthetase with a Unique Architecture Enhances the Availability of Lysine Derivatives in Synthetic Genetic Codes.”

Molecules **2018**, 23 (10).

<https://doi.org/10.3390/molecules23102460>

査読あり

3)

Kato, A.; Kuratani, M.; Yanagisawa, T.; Ohtake, K.; Hayashi, A.; Amano, Y.; Kimura, K.; Yokoyama, S.; Sakamoto, K.; Shiraishi, Y.

“Extensive Survey of Antibody Invariant Positions for Efficient Chemical Conjugation Using Expanded Genetic Codes.”

Bioconj Chem **2017**, 28 (8), 2099-2108.

<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00265>

査読あり

〔学会発表〕(計 7件)

1)

大竹 和正、高橋 美穂子、春名 健一、坂本 健作

「二重コドン再定義を用いたトランスグルタミナーゼの高機能化」

「細胞を創る」研究会 11.0(仙台市)

2018年

2)

大竹 和正、春名 健一、坂本 健作

「二種非天然型アミノ酸同時導入による高機能化タンパク質生産」

日本農芸化学会 2018年度大会(名古屋市)

2018年

3)

大竹 和正、春名 健一、坂本 健作

「コドン再定義株を用いた二種非天然型アミノ酸同時導入」

第12回無細胞生命科学研究会(柏市)

2017年

4)

大竹 和正

「大腸菌を用いた非天然型アミノ酸導入～コドン再定義が拓く新たな可能性」

2017年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー(福山市)(招待講演)

2017年

5)

大竹 和正、春名 健一、坂本 健作

「大腸菌コドン再定義株を用いた二種非天然型アミノ酸導入によるタンパク質工学」

第17回蛋白質科学会年会(仙台市)

2017年

6)

大竹 和正、春名 健一、坂本 健作

「二種非天然型アミノ酸同時導入による非酵素的活性化可能な安定化トランスグルタミナーゼの生産」

日本農芸化学会 2017年度大会(京都市)

2017年

7)

大竹 和正

「大腸菌コドン再定義株を用いた二種非天然型アミノ酸同時導入法の開発」
日本農芸化学会関東支部 2016 年度第 2 回支部例会(武蔵野市) (招待講演)
2016 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

1)

名称：変異 V H H 抗体及びその製造方法

発明者：坂本健作、大竹和正 他

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-124289

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

2)

名称：非天然型アミノ酸導入抗体

発明者：横山茂之、坂本健作、柳沢達男、大竹和正 他

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2016/074056

出願年：2016 年

国内外の別： 外国

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。