

平成 22 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370063
 研究課題名（和文） 蛍光標識アミノ酸の部位特異的導入によるタンパク質構造変化の FRET 解析
 研究課題名（英文） FRET analysis of protein structural changes by site-specific incorporation of fluorescent 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

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまで開発してきた 4 塩基コドンなどを用いたタンパク質の部位特異的二重蛍光標識法をさらに発展させることで、タンパク質の立体構造やその変化を FRET により解析する手法の確立を行なった。実際に、マルトース結合タンパク質などについて基質結合に伴う立体構造変化の FRET を用いた検出や、二重標識に有用な N 末端特異的な非天然アミノ酸誘導体の導入法、高効率アンバーサプレッサー-tRNA の開発などを達成した。

研究成果の概要（英文）：In this study, FRET analysis of protein structures and structural changes were investigated through site-specific incorporation of fluorescent nonnatural amino acids in response to expanded genetic codes. Detection of structural changes of maltose-binding protein upon ligand-binding by FRET, N-terminal specific incorporation of nonnatural amino acid derivatives, and screening of highly active amber suppressor tRNAs were achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：蛋白質，非天然アミノ酸，生物物理，無細胞翻訳系，蛍光共鳴エネルギー移動，4 塩基コドン

1. 研究開始当初の背景

近年、X 線結晶構造解析などによりタンパク質の静的な立体構造に関する知識と理解は大幅に進んでいる。その一方で、タンパク質は生体内では構造変化を伴いながら、他のタンパク質や生体分子と相互作用して機能していると考えられており、そのようなタンパク質の構造変化を計測することのできる

手法は必要不可欠である。

研究代表者らは、これまで開発してきた 4 塩基コドンを用いた非天然アミノ酸導入技術を利用することで、タンパク質中の指定した 2 ヶ所の位置へ定量的に蛍光標識アミノ酸を導入しておき、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)によりタンパク質の立体構造変化を検出する手法を開発した。この手法では、4 塩

基コドン CGGG と GGGU (または UAG) を導入した遺伝子と、それらのコドンに相補的なアンチコドンを持ち2種類の蛍光標識アミノ酸を付加した tRNA を合成し、これらは無細胞翻訳系に加えることにより、4 塩基コドンなどで指定した位置に蛍光基を導入することができる。

この際、生命科学分野で広く使用されている可視光領域に蛍光を発する分子構造の大きな蛍光基を持つアミノ酸は、リボソームなどの翻訳系に基質として許容されないという問題があった。研究代表者らは非天然アミノ酸に対する翻訳系の基質選択性(p-置換フェニルアラニン誘導体が基質として好まれる)を明らかにした上で、翻訳系に許容されるようにパラ位に蛍光基を結合させたフェニルアラニン誘導体を設計・合成し、これらがタンパク質へ効率良く導入できることを明らかにしている。

FRET によるタンパク質の立体構造解析法自体は国内外で以前より行なわれており研究報告も多いが、これまでは特定の2ヶ所のみを定量的に二重蛍光標識することが困難だったために、厳密な解析はできなかった。研究代表者らが独自に開発した4塩基コドンによる二重蛍光標識法は、この困難を打ち破り、タンパク質構造変化の FRET による解析法を格段に発展させる契機となると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが独自に開発した部位特異的二重蛍光標識技術を利用したタンパク質の立体構造変化の FRET 解析法を発展させ、その有用性をさらに高めることを目的とする。そのために、基質の結合によるタンパク質の構造変化について注目し、それを FRET により解析することを試みた。さらにその FRET 効率の変化から蛍光基間の距離情報を得て、立体構造データとの相関について評価するとともに、二重蛍光標識タンパク質をタンパク質間相互作用やリン酸化などのプローブとして利用することの可能性についても検討することを目指した。

具体的には、まずマルトース結合タンパク質をモデルとして取り上げて、マルトースの結合に伴う立体構造の変化を FRET により解析することを試みた。マルトース結合タンパク質の構造変化(結合前後の構造は X 線結晶構造解析により決定されている)は比較的小さいが、蛍光基を適切な位置へ導入することでそのような小さな構造変化も検出できるかどうかについて検証した。さらに立体構造データ上での距離変化と FRET 効率変化の定量的な関係を評価することも試みた。

また、タンパク質の二重標識に有用な N 末端特異的な非天然アミノ酸誘導体の導入法

や、高効率なアンバーサプレッサー tRNA の開発なども合わせて実施した。

3. 研究の方法

(1)マルトース結合タンパク質の基質結合に伴う構造変化の FRET を用いた分析

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、まず4塩基コドン CGGG を15ヶ所のチロシン部位に導入した遺伝子を作製した。これらの変異遺伝子の mRNA を、蛍光標識アミノ酸 BODIPY FL-アミノフェニルアラニンを結合させ4塩基のアンチコドンを持つ tRNA とともに、大腸菌由来無細胞翻訳系へ加え、蛍光標識タンパク質の合成を行なった。遺伝子の C 末端に付加しておいた HisTag を利用して精製した後、マルトースの添加による蛍光スペクトル変化を測定した。蛍光強度の変化した導入部位については、トリプトファンによる蛍光消光の影響を調べるために、蛍光基の近傍のトリプトファンをそれぞれフェニルアラニンに置換して、蛍光消光に直接関与するトリプトファン残基を同定した。

続いて、4塩基コドンを用いて Tyr210 部位に BODIPY558 を導入しつつ、終止コドン UAG を用いて N 末端部分に BODIPYFL を導入した二重蛍光標識 MBP を合成した(図1)。その蛍光スペクトル変化を測定して、マルトースの結合に伴う2つの蛍光強度比の変化を評価した。

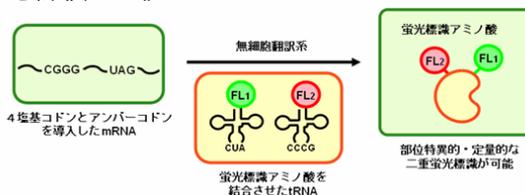


図1 拡張遺伝暗号を用いたタンパク質の部位特異的二重蛍光標識法

同様の手法により、シアル酸結合レクチンについても、糖基質の結合に伴う基質結合部位近傍のトリプトファンによる蛍光消光の変化、および、二重蛍光標識による蛍光強度比の変化の測定を行なった。

(2) タンパク質 N 末端への非天然アミノ酸誘導体の導入

続いて、蛍光標識アミノ酸の導入をタンパク質 N 末端特異的に行なうために、開始コドンに対して蛍光標識アミノ酸および蛍光標識非 α アミノ酸の導入を検討した。ストレプトアビジンおよびマルトース結合タンパク質の開始コドンを本来は終止コドンである UAG に置換しておき、一方で、大腸菌開始 tRNA のアンチコドンを CUA に置換して、蛍光標識された非天然アミノ酸、 α 置換アミノ

酸、非 α アミノ酸を結合させた。無細胞翻訳系における翻訳生成物を分析することで、開始コドンによるタンパク質 N 末端への蛍光基の導入を評価した。

(3) 蛍光基の位置揺らぎを抑制した二重蛍光標識法の開発

リンカーを含まない蛍光標識アミノ酸の N 末端への導入と、リンカーを含まない非蛍光性 FRET アクセプターとなる非天然アミノ酸の内部部位への導入を行なった。これにより、アミノ酸主鎖と蛍光基との間にリンカーを含まず、蛍光基の位置の揺らぎが生じないようにした。実際にマルトース結合タンパク質について、N 末端と種々の内部部位を二重標識して、蛍光スペクトル測定および蛍光寿命測定により、FRET 効率とドナーアクセプター間距離の算出を試みた。

(4) 非天然アミノ酸導入用 tRNA のスクリーニング

リン酸化アミノ酸などの導入効率の低い非天然アミノ酸を効率良く導入するために、終止コドン UAG を用いて非天然アミノ酸を効率良く導入できるアンバーサプレッサー tRNA の開発を行なった。まず、様々な生物種由来の tRNA を合成して、蛍光標識アミノ酸を結合させ、タンパク質への導入を電気泳動により評価した。また、蛍光検出をより簡便に行なうために、緑色蛍光タンパク質 GFP に BODIPY558 標識アミノ酸を導入する系を利用して、アンバーサプレッサー tRNA の翻訳活性をリアルタイム検出可能な手法を新たに開発した。

4. 研究成果

(1) マルトース結合タンパク質の基質結合に伴う構造変化の FRET を用いた分析

MBP の 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て、基質結合に伴う蛍光変化を測定したところ、Tyr210 と Tyr242 に導入した場合には、マルトースの結合に伴って蛍光強度が大きく増加することが見いだされた。これはマルトース非存在下では BODIPYFL が近傍のトリプトファンにより消光されているが、マルトース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て、消光が起こらなくなったためだと考えられた。そこで、基質結合部位近傍の 4 つのトリプトファンをそれぞれフェニルアラニンに置換したところ、Tyr210 に蛍光基を導入した場合は Trp340 が、Tyr242 の場合は Trp232 がそれぞれ主に消光変化を引き起こしていることが確認された。

続いて、Tyr210 または Tyr242 に BODIPY558-アミノフェニルアラニンを導入

しつつ、N 末端領域に BODIPY558 の FRET ドナーとなる BODIPYFL を導入することで、蛍光強度比の大きな変化が観察できた (図 2)。これは、BODIPYFL から BODIPY558 への FRET が起きるとともに、Tyr210 または Tyr242 での BODIPY558 の蛍光消光の変化が起こり、その結果、蛍光強度比が大きく変化したと解釈できた。

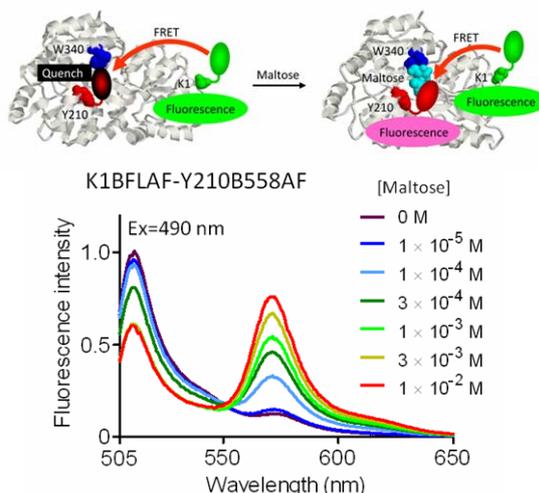


図 2 マルトース結合タンパク質の基質結合に伴う蛍光変化

この原理の一般性と応用可能性を評価するために、同様に基質結合部位近傍にトリプトファンを有するシアル酸結合レクチン (ミズ由来レクチン変異体) について、BODIPY 標識アミノ酸の導入と基質結合に伴う蛍光変化を測定した。その結果、基質結合部位近傍に BODIPY 標識アミノ酸を導入することで、基質の結合に伴い蛍光の大きな増加が観察された。また、別の部位に FRET ペアとなる蛍光基を導入することで、基質結合に伴う蛍光強度比の変化を検出することもできた。

これらの蛍光分析方法は、特定の基質の結合を蛍光で高感度に検出できるとともに、蛍光レシオイメージングも可能にすることから、様々な応用が期待される。

(2) タンパク質 N 末端への非天然アミノ酸誘導体の導入

上記の二重蛍光標識の際には、タンパク質の立体構造に大きな影響を与えないようにするために、一方の蛍光基を N 末端領域に導入している。このような N 末端への導入を効率的に行なうために、開始コドンに対して非天然アミノ酸誘導体を導入する手法を開発した。ただし通常の開始コドン AUG を用いた場合には、メチオニンと競合するため、本来は終止コドンであるアンバーコドン UAG を拡張開始コドンとして使用した。これまでに、翻訳開始過程では α アミノ基は必ずしも必要ないことが確認されていることから、そ

の基質選択性を明らかにするために、種々の鎖長を有するアミノカルボン酸に蛍光基を結合させて、N末端への導入効率を評価した。その結果、アルキル鎖長や蛍光基の種類がその導入効率に大きく影響することが明らかとなった。また、蛍光標識アミノ酸の α アミノ基にビオチンなどの別の標識分子を結合させて、N末端に導入することも可能であった(図3)。

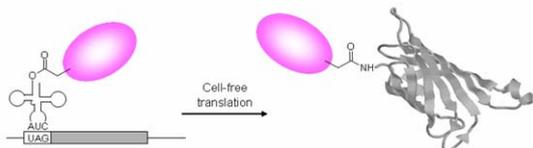


図3 非天然アミノ酸誘導体のタンパク質N末端への導入法

さらに、開始UAGコドンを用いたN末端への導入と、伸長UAGコドンを用いた内部部位への非天然アミノ酸の導入は、互いに独立して起こることも確認した。この手法を実際に上記の二重蛍光標識MBPの合成に応用して、従来の4塩基コドンなどを用いた場合と同様の蛍光変化を示す二重蛍光標識MBPが合成できることも示した。

(3) 蛍光基の位置揺らぎを抑制した二重標識法の開発

上記の研究により、蛍光標識アミノ酸の導入が、タンパク質の構造やその変化の解析に有用であることを実証したが、FRETによって2残基間距離を算出する場合には、蛍光基とアミノ酸主鎖の間にリンカーが存在するために、蛍光基の位置が揺らいでしまい、正確に測定できないという問題があった。そこで、リンカーを含まない蛍光標識アミノ酸(N-RhodamineGreen-アラニン)とその非蛍光性FRETアクセプターとなる非天然アミノ酸(NBD-アミノフェニルアラニン)を設計・合成した。これらは、開始および伸長UAGコドンを用いた二重導入法を用いてマルトース結合タンパク質のN末端および内部部位へ導入した。

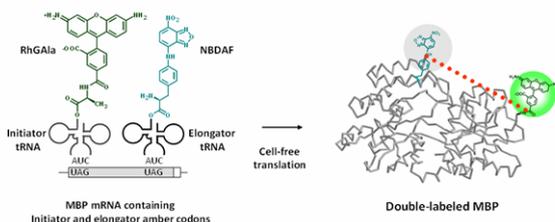


図4 リンカーを含まない標識アミノ酸のタンパク質への導入

得られた二重標識MBPについて、蛍光スペクトル測定および蛍光寿命測定を行ない、

FRET効率および2残基間距離の算出を行った。その結果、蛍光減衰曲線を通常の多成分解析した場合は複数の成分に分離され、見かけ上はFRETによる短寿命成分の他に、ほとんどFRETを起こしていない長寿命成分が現れることがわかった。そこで、2残基間距離に分布があると仮定して解析したところ、やや広い距離分布を有することが推測された。これについては、今後も最適な解析が行なえるよう、引き続き検討する予定である。

(4) 非天然アミノ酸導入用tRNAのスクリーニング

蛍光標識アミノ酸BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを用いて、スクリーニングを行なった結果、マイコプラズマのTrp tRNA変異体が非常に高い導入効率を示すことが見いだされた。ただし、スクリーニングの過程では蛍光標識アミノ酸を導入したタンパク質を電気泳動して蛍光イメージを取得する必要があり、大量のtRNAのスクリーニングを行なうためには、より簡便な検出法が必要であった。そこで、緑色蛍光タンパク質(GFP)のN末端領域にBODIPY558-アミノフェニルアラニンを導入して、GFPからBODIPY558へのFRETをリアルタイム測定することで、簡便に蛍光標識アミノ酸の導入を評価できる手法を確立した。

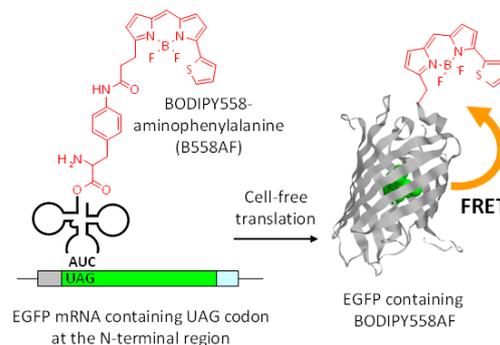


図5 非天然アミノ酸導入用アンバーサプレッサーtRNAの新規スクリーニング方法

実際に20種類程度のtRNAについてスクリーニングを行なったところ、既に得られていたマイコプラズマ由来のtRNAと同程度の活性を持つtRNAを取得することができた。今後、スクリーニングのスケールアップを行なうことで、さらに高い活性を持つtRNAの取得が可能になるとともに、そのようなtRNAを用いることで、導入効率の低いリン酸化アミノ酸なども効率よく導入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 8 件)

1. 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.*, 2010, 83, 546-553. 査読有
2. Ryoji Abe, Kaori Shiraga, Shogo Ebisu, Hiroaki Takagi, Takahiro Hohsaka, Incorporation of fluorescent non-natural amino acids into N-terminal tag of proteins in cell-free translation and its dependence on position and neighboring codons, *J. Biosci. Bioeng.*, 2010, 110, 32-38. 査読有
3. Tadayoshi Egusa, Kaori Shiraga, Takuya Chiba, Yasunori Tokuda, Issei Iijima, Takahiro Hohsaka, Incorporation of non-natural amino acids with two labeling groups into the N-terminus of proteins, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2010, 83, 176-181. 査読有
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.*, 2009, 19, 4909-4911. 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*, 2009, 10, 999-1006. 査読有
6. Takayoshi Watanabe, Yoichi Miyata, Ryoji Abe, Norihito Muranaka, Takahiro Hohsaka, N-Terminal specific fluorescence labeling of proteins through incorporation of fluorescent hydroxy acid and subsequent ester cleavage, *ChemBioChem*, 2008, 9, 1235-1242. 査読有
7. Takayoshi Watanabe, Norihito Muranaka, Takahiro Hohsaka, Four-base codon-mediated saturation mutagenesis in a cell-free translation system, *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, 105, 211-215. 査読有
8. Hikaru Taira, Yosuke Matsushita, Kenji Kojima, Kaori Shiraga, Takahiro Hohsaka, Comprehensive screening of amber suppressor tRNAs suitable for incorporation of non-natural amino acids

in a cell-free translation system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 374, 304-308. 査読有

[学会発表] (計 39 件)

1. 芳坂貴弘, 非天然アミノ酸導入技術のタンパク質の構造機能解析への応用, 第 12 回生命化学研究会, 2010.1.8, あわら市
2. 東 周作、飯島一生、三浦将典、芳坂貴弘、新規蛍光標識非天然アミノ酸の導入によるタンパク質立体構造の精密な FRET 解析の検討、第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.11、横浜
3. Issei Iijima, Takahiro Hohsaka, Screening of amber suppressor tRNAs suitable to introduce nonnatural amino acids into proteins by real-time monitoring of cell-free translation, The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2009.9.29, 高山
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
5. 飯島一生、芳坂貴弘、非天然アミノ酸の二重導入によるタンパク質構造変化の FRET 分析、日本生物物理学会第 46 回年会、2008.12.5、福岡
6. 江草忠義、飯島一生、芳坂貴弘、非天然アミノ酸導入技術を利用した二重蛍光標識タンパク質の合成と FRET 分析への応用、第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008.9.20、横浜
7. 飯島一生・芳坂貴弘、蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質機能の蛍光分析、日本生物物理学会第 45 回年会、2007.12.21、横浜
8. 芳坂貴弘、拡張遺伝暗号を用いたタンパク質のピンポイント蛍光標識法の開発、第 7 回日本蛋白質科学会年会、2007.5.24、仙台 他 31 件

[図書] (計 2 件)

1. 人工タンパク質の合成と応用、芳坂貴弘、超分子サイエンス&テクノロジー(国武豊喜監修)、pp890-895、エヌティーエス、2009.
2. 非天然型アミノ酸を含むタンパク質、芳坂貴弘、トコトンやさしいタンパク質の本(東京工業大学生命理工学研究科編)、pp112-113、日刊工業新聞社、2007.

[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・マテリアル
サイエンス研究科・教授

研究者番号：30263619

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：