

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19380195  
 研究課題名（和文）  
 生細胞における非天然型アミノ酸のタンパク質への導入技術の開発  
 研究課題名（英文）  
 Site-specific incorporation of non-natural amino acids into proteins in living cells  
 研究代表者  
 坂本 健作 (Sakamoto Kensaku)  
 独立行政法人理化学研究所・拡張遺伝暗号システム研究チーム・チームリーダー  
 研究者番号：50240685

## 研究成果の概要（和文）：

生物で遺伝的にコードされている20種類のアミノ酸以外の「非天然型アミノ酸」を生細胞内でタンパク質に部位特異的に導入する技術の開発を進め、タンパク質研究への応用を行った。この結果、(1) 哺乳類細胞内でタンパク質を部位特異的に蛍光標識すること、(2) 天然型の翻訳後修飾の人為的に導入すること、(3) 光クロスリンク法によって新規なタンパク質間相互作用を発見すること、(4) 昆虫細胞における非天然型アミノ酸の導入、が可能になった。

## 研究成果の概要（英文）：

I developed the technology for incorporating non-natural amino acids into proteins in living cells, and applied it for protein researches. Thus, (i) target proteins were labeled in mammalian cells, (ii) a naturally-occurring posttranslational modification was incorporated into protein at defined sites, (iii) novel protein-protein interactions were discovered by in vivo photo-crosslinking method, and (iv) non-natural amino acids were site-specifically incorporated into proteins in insect cells for the first time.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学 ・ 応用分子細胞生物学

キーワード：非天然型アミノ酸、遺伝暗号、タンパク質合成、光クロスリンク、翻訳後修飾、  
 蛍光修飾、昆虫細胞

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝的にコードされているアミノ酸は、セレノシステインやピロリジンを加えても 22 種類に過ぎない。一方、様々なタイプの“非天然型”のアミノ酸が存在し、これらは、蛍光を有するアミノ酸、光架橋能力（光クロスリンク能）を持つアミノ酸、アジド基やケト基などユニークな官能基を有するアミノ酸、重金属を含有するアミノ酸などである。これらの非天然型アミノ酸は、無細胞タンパク質合成系を用いてタンパク質の望みの部位に導入することは可能であった。しかし、タンパク質の生産量、手法の簡便さ、タンパク質研究への応用範囲などに点において、大腸菌などの生細胞を用いて非天然型アミノ酸を導入するシステムの開発が求められていた。

生細胞において非天然型アミノ酸を部位特異的に導入するシステムは、P.G. Schultzら(米国)によって、2001年に大腸菌で初めて開発され、翌年、私たちは独立に、動物細胞を用いたシステムの開発に成功していた。これらの技術的なブレイクスルーを受けて、さらなる改良と、様々な応用に適した個別要素技術の開発が求められていた。

タンパク質生合成系を利用した非天然型アミノ酸の導入技術の開発には、遺伝暗号翻訳の分子メカニズムに関する専門的な知識が必要であり、同時に、非天然型アミノ酸に特異的なアミノアシル tRNA 合成酵素を開発するための蛋白工学の技量が必要になる。このために、本技術の開発を推進できる研究室は限られており、少数精鋭の間での厳しい競争となっていた。

## 2. 研究の目的

(1) 生細胞における非天然型アミノ酸導入技

術の改良・拡充を行う。

本技術を実用的な研究ツールとするために必要とされる様々な改良・開発を行う。とくに、大腸菌、哺乳類細胞を用いるシステムの改良を進め、同時に他の系（昆虫細胞など）についても非天然型アミノ酸の導入を可能にする。

(2) 個別の応用技術の開発・改良を進め、タンパク質研究のための実用的なツール・キットの開発を行う。

a) 非天然型アミノ酸を用いてタンパク質を部位特異的に蛍光標識するための技術開発。蛍光を有するアミノ酸の導入を試みる。また、別のアプローチとして、蛍光物質と特異的に結合するアミノ酸を、タンパク質に部位特異的に導入する技術を開発する。

b) 天然型の翻訳後修飾の人為的な導入方法。天然に存在し、生物学的にも重要な働きをしているタンパク質の翻訳後修飾（リン酸化、アセチル化、メチル化など）を、非天然型アミノ酸としてタンパク質へ導入する手法を開発する。

c) 光クロスリンク法の改良。申請者らが既に開発した光架橋技術では、パラ・ベンゾイル・フェニルアラニン (p B p a) をタンパク質に導入していた。本研究では、トリフルオロメチル・ジアジリニル・フェニル基を側鎖に持つアミノ酸 (T m d P h e) の導入法を開発する。このアミノ酸は架橋形成が確認されるまでの時間が短いので、生細胞内でタンパク質間相互作用を解析するとき時間分解能を向上させることができる。

## 3. 研究の方法

「直交」するアミノアシル tRNA 合成酵素とサプレッサー tRNA を、目的の細胞で発現させることと、この酵素をあらかじめ目的の非天然型アミノ酸を特異的に認識できるように改変しておくことの 2 点が、本研究の基本的な研究手法になる。

例えば、動物細胞内で非天然型アミノ酸をタンパク質に導入するには、原核生物由来のアミノアシルtRNA合成酵素の変異体とサプレッサーtRNAを人為的に発現させることになる。非天然型アミノ酸は培地に添加することで、細胞に取り込まれ、酵素と反応してtRNAに付加される。酵素の改変は、立体構造情報に基づいて、ラショナル・デザインによって行った。目的の研究ツールの開発のためには、チロシルtRNA合成酵素とピロリジルtRNA合成酵素を用いるだけで十分との見通しを持っていたので、この2つの酵素についてのみエンジニアリングを行った。本研究で用いた非天然型アミノ酸のほとんどは市販されていないので、小ロット合成をおこなう業者から購入した。非天然型アミノ酸のタンパク質への取り込みは、質量分析による確認、および、機能面からの確認（蛍光修飾、光クロスリンク活性）を行った。非天然型アミノ酸導入のための宿主細胞は、大腸菌、哺乳類細胞、昆虫細胞の3つを選択し、それぞれに非天然型アミノ酸導入に最適な培養・タンパク質発現条件の検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 生細胞における非天然型アミノ酸導入技術の改良・拡充

従来利用できる哺乳類細胞がCHO細胞（ラット）に限られていたので、その他の細胞株も利用できるように、導入ベクター系の開発を行い、OriPシステムを利用したシステムを構築し、HEK293細胞（ヒト）の、接着型、浮遊型のいずれでも非天然型アミノ酸の導入を可能にした。非天然型アミノ酸の導入のためのアミノアシルtRNA合成酵素としては、従来のチロシルtRNA合成酵素に加えて、ピロリジルtRNA合成酵素の利用を可能にし、リジン誘導体を非天然型アミノ酸のレパートリーに加えることに成功した。ピロリジルtRNA合成酵素は、同

じ生物由来（古細菌）の酵素が動物細胞・大腸菌の両方のホストで利用できることを示した。さらに、同じ利便性をチロシルtRNA合成酵素についても実現するために、大腸菌ホストの改変を行って成功した。さらに、昆虫細胞を初めて非天然型アミノ酸のタンパク質への導入に利用することに成功した。

##### (2) 個別の応用技術の開発・改良

###### a) タンパク質の部位特異的蛍光標識法の開発。

蛍光を有するアミノ酸の導入は実施しなかった。他の研究グループから同様の目的の研究開発の報告が出たことと、非天然型アミノ酸として導入できる蛍光基に強く光るものがないことの2つの理由からである。そこで、もう1つのアプローチを採用し、アジド基を持つ非天然型アミノ酸をタンパク質に導入し、アジド基と反応する化合物に蛍光物質をつけておくことで、部位特異的で、効率的、実用的な蛍光標識に成功した。具体的には、アジドフェニルアラニン、およびアジドZリジン、アジドチロシンの導入に、動物細胞、改良型大腸菌、昆虫細胞で成功し、Staudinger-Bertozzi反応、およびクリック・ケミストリーによってフルオレセイン、ローダミンなどの蛍光基をアジド基に付加することによる標識法を開発した。

###### b) 天然型の翻訳後修飾の人為的な導入

ピロリジンtRNA合成酵素の採用によって、アセチル・リジンを部位特異的にタンパク質に導入することに成功した。アセチル・リジンの導入法は、動物細胞と無細胞タンパク質合成系を用いて利用することができる。無細胞系は、本来本研究の目的から外れるが、無細胞翻訳系を用いて、ヒストンの重要なリジン残基の修飾を再現することに成功したので報告する。この成果によって、他の天然型翻訳後修飾の人為的な導入にも道を拓くことができた。

###### c) 光クロスリンク法の改良

既に報告のある12種類の大腸菌チロシルtRNA合成酵素変異体を解析することで、このなか

ら T m d P h e を特異的に認識する酵素変異体を見出した。この変異体酵素を動物細胞で発現させることで、T m d P h e のタンパク質への部位特異的導入に成功し、細胞内における光クロスリンク活性を確認した。さらに、光クロスリンク法を質量分析法 (S I L A C) に適用するプロトコルを開発し、がん遺伝子産物である G R B 2 タンパク質の新規な相互作用因子を探索することに応用した。部位特異的導入法の利点を生かし、S H 2 ドメインに特異的な相互作用因子を探索し、直接結合因子として新規なタンパク質を複数同定することに成功した。

#### 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)

“Functional replacement of the endogenous tyrosyl-tRNA synthetase — tRNA<sup>Tyr</sup> pair by the archaeal tyrosine pair in *Escherichia coli* for genetic code expansion”, Iraha, F., Oki, K., Kobayashi, T., Ohno, S., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Yokoyama, S., Sakamoto, K., *Nucleic Acids Res.* (in press). (査読有)

“Genetic encoding of non-natural amino acids in *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells”, Mukai, T., Wakiyama, M., Sakamoto, K., Yokoyama, S., *Protein Sci.* 19, 440-448 (2010). (査読有)

“Genetic encoding of 3-iodo- L-tyrosine in *Escherichia coli* for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography”, Sakamoto, K., Murayama, K., Oki, K., Iraha, F., Kato-Murayama, M., Takahashi, M., Ohtake, K., Kobayashi, T., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., Yokoyama S., *Structure* 17, 335-344 (2009). (査読有)

“Recognition of non- $\alpha$ -amino substrates by pyrrolysyl-tRNA synthetase”, Kobayashi, T., Yanagisawa, T., Sakamoto, K., Yokoyama, S., *J. Mol. Biol.* 385, 1352-1360 (2009). (査読有)

“Multi-step engineering of pyrrolysyl-tRNA synthetase to genetically encode *N*-( $\sigma$ -azidobenzyl oxycarbonyl)lysine for site-specific

protein modification”, Yanagisawa, T., Ishii, R., Fukunaga, R., Kobayashi, T., Sakamoto, K., Yokoyama, S., *Chem. Biol.* 15, 1187-1197 (2008). (査読有)

“Transplantation of a tyrosine editing domain into a tyrosyl-tRNA synthetase variant enhances its specificity for a tyrosine analog”, Oki, K., Sakamoto, K., Kobayashi, T., Sasaki, H. M., Yokoyama, S., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 13298-13303 (2008). (査読有)

“Adding L-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases”, Mukai, T., Kobayashi, T., Hino, N., Yanagisawa, T., Sakamoto, K., Yokoyama, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 818-822 (2008). (査読有)

“Crystallographic studies on multiple conformational states of active-site loops in pyrrolysyl-tRNA synthetase”, Yanagisawa, T., Ishii, R., Fukunaga, R., Kobayashi, T., Sakamoto, K., Yokoyama, S., *J. Mol. Biol.* 378, 634-652 (2008). (査読有)

“Site-specific incorporation of non-natural amino acids into proteins in the mammalian cells with an expanded genetic code”, Hino, N., Hayashi, A., Sakamoto, K., Yokoyama, S., *Nature protocol* 1, 2957-2962 (2007). (査読有)

村山和隆、坂本健作「ヨードチロシンの部位特異的導入と長波長X線を用いた単波長異常分散法による結晶構造解析」、日本結晶学会誌 Vo. 51, pp. 251-257 (2009)

坂本健作、横山茂之「非天然型アミノ酸をタンパク質へ部位特異的に導入する技術の開発とその応用」、蛋白核酸酵素 (共立出版) Vol. 54, No. 12, 2009. (9月号増刊「融合発展する構造生物学とケミカルバイオロジー」長野哲雄・若槻壮市・高木淳一・古谷利夫 編)

坂本健作、樋野展正、横山茂之「非天然型アミノ酸によるタンパク質工学の拡充と生細胞への応用」、(「バイオプロセスハンドブック」p. 65-71, NTS出版, 2007年)

[学会発表] (計 5 件)

小林隆嗣、坂本健作、柳沢達男、横山茂之、「翻訳後修飾アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入」、第 4 回無細胞生命科学研究会 / 岐阜. 2009 年 11 月.

佐藤心、三樹信哉、佐藤文、樋野展正、坂本健作、梅原崇史、横山茂之「タンパク質複合体の光架橋による結晶構造解析技術の開発」、第 32 回日本分

子生物学会年会 / 横浜. 2009 年 12 月.

樋野展正、尾山大明、佐藤文、向井崇人、秦裕子、山本雅、坂本健作、横山茂之「光クロスリンク法を用いた特定のモチーフを介するタンパク質間相互作用の網羅的解析」、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会 合同大会(BMB2008) / 神戸. 2008 年 12 月.

坂本健作、大木健二、村山和隆、小林隆嗣、白水美香子、横山茂之「ヨードチロシンのタンパク質への部位特異的な導入と単波長異常分散法によるタンパク質結晶構造解析への応用」、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会(BMB2007) / 横浜. 2007 年 12 月.

伊良波史枝、向井崇人、佐藤文、林明子、樋野展正、保坂俊彰、山登一郎、大野敏、横川隆志、西川一八、坂本健作、横山茂之「非天然型アミノ酸の導入によるタンパク質の部位特異的な蛍光標識技術」、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会(BMB2007) / 横浜. 2007 年 12 月.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計3件)

名称：アミノアシル tRNA 合成酵素活性を有するポリペプチド及びその利用

発明者：大木健二、坂本健作、横山茂之

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2008-029236

出願年月日：平成 20 年 2 月 8 日

国内外の別：国内

名称：エステル結合を含む非天然タンパク質の製造方法

発明者：小林隆嗣，向井崇人，坂本健作，横山茂之，柳沢達男

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2007-302452

出願年月日：平成 19 年 11 月 22 日

国内外の別：国内

名称：変異体ピロリジルー tRNA 合成酵素及びこれを用いる非天然アミノ酸組み込みタンパク質の製造方法

発明者：小林隆嗣，坂本健作，横山茂之，柳沢達男

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2007-243574

出願年月日：平成 19 年 9 月 20 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ：

<http://protein.gsc.riken.go.jp/sakamoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 健作 (Sakamoto Kensaku)

独立行政法人理化学研究所・拡張遺伝暗号システム研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50240685

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし