

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780039
 研究課題名（和文） 非天然の官能基をもつシルクタンパク質の創製に向けた基礎研究
 研究課題名（英文） Basic Study for Developing Silk Protein Containing Unnatural Functional Groups
 研究代表者
 寺本 英敏（TERAMOTO HIDETOSHI）
 独立行政法人農業生物資源研究所・絹タンパク素材開発ユニット・主任研究員
 研究者番号：60391562

研究成果の概要（和文）：カイコ（*Bombyx mori*）の絹糸腺よりフェニルアラニル-tRNA 合成酵素（PheRS）遺伝子をクローニングし、その全アミノ酸配列を明らかにした。他生物種の同酵素との配列比較により、フェニルアラニン（Phe）の識別に関与する残基を特定し、その側鎖が小さくなるような変異を導入した改変型 PheRS 遺伝子 5 種を作製した。*In vitro* アッセイにより、Ala 450 を Gly に置換した改変型カイコ PheRS が、パラ位に置換基（Cl, Br）を有する Phe アナログを認識できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The genes encoding phenylalanyl-tRNA synthetase (PheRS) were cloned from the silk glands of silkworm, *Bombyx mori*. Based on the sequence comparison with PheRSs from other organisms, residues responsible for discriminating phenylalanine (Phe) from others were identified, and these residues were mutated to amino acids with smaller side chains to obtain five mutant PheRS genes. *In vitro* assays revealed that the PheRS mutant with Ala 450 to Gly mutation recognizes Phe analogs bearing Cl and Br at the *para* position of the phenyl ring.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：応用昆虫学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：シルク、カイコ、培養細胞、非天然アミノ酸、フェニルアラニル-tRNA 合成酵素

1. 研究開始当初の背景

カイコがつくるシルクは高い生体適合性と力学強度を示すことから、再生医療分野で用いる生体材料としての研究が国内外で進んでいる。再生医療用材料では、使用部位や

目的にあわせて細胞接着性などの生体との相互作用を自在に制御できることが重要な要素となる。シルクの特性を制御する方法として、化学修飾により機能性分子を導入する手法が有効であるが、反応部位や反応量の制

御が困難で副生成物や残留試薬による毒性の懸念があるなど、実用面では問題が多い。

この問題を打開する方法として、シルクタンパク質分子中に他の官能基と容易に区別できる非天然の官能基を導入することが有効であると考えられる。たとえば、ハロゲン(-Cl, -Br, -I) やアジド(-N₃) など、化学選択的な反応性を示す官能基を特異的な反応点として利用することで、カップリング反応や光誘起反応などの副反応や副生成物の少ないクリーンな反応を、分子内の特定の位置でのみ行うことが可能になる。

上記を実現する方法として、タンパク質中の特定のアミノ酸をその誘導体で *in vivo* で置換する手法に着目した。本手法は大腸菌で確立された手法であり、アミノアシル-tRNA 合成酵素(※特定のアミノ酸と対応する tRNA とを特異的に結合させる酵素群)のアミノ酸結合ポケットを空間的に拡張することで、アミノ酸誘導体を遺伝子翻訳システムに取り込ませることができる。本手法をカイコに適用し、アミノ酸誘導体を取り込む遺伝子組換えカイコをつくることできれば、シルクタンパク質分子中の標的アミノ酸を、一定の割合で非天然の官能基をもつ誘導体に置き換えることができるようになる。

2. 研究の目的

標的アミノ酸として、カイコの必須アミノ酸であり他生物種での知見が豊富なフェニルアラニン(Phe)を選び、Phe 誘導体をカイコの遺伝子翻訳システムへ取り込ませることが可能かを明らかにする。そのために、カイコ培養細胞を用いたシンプルな実験系を構築する。そのために重要となるのは、フェニルアラニル-tRNA 合成酵素(PheRS)のクローニングと、Phe 誘導体を認識させるための改変型 PheRS の作出である。

カイコ PheRS は未同定なため、その遺伝子をカイコ幼虫からクローニングし、アミノ酸配列を明らかにする。酵素活性サイトが既知である他生物種の PheRS との相同性解析からアミノ酸結合ポケットを形成する残基を推定し、これらを側鎖のより小さな残基に置換してポケットのサイズを拡張した改変型 PheRS を、カイコ培養細胞で発現させる。この細胞を、Phe 誘導体を含む培地中で培養し、同時に発現させるモデルタンパク質中への Phe 誘導体の取り込みについて、質量分析により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) カイコ PheRS の 2 つのサブユニット(α , β)のうち、アミノ酸結合ポケットは α サブユニット(PheRS- α)に存在する。他生物種の PheRS- α との配列比較から、カイコ PheRS- α の Thr407 および Ala450 が Phe

の識別に重要であることが示唆されている。そこで、これら残基を置換した 3 種の改変型カイコ PheRS- α (Thr407Ala, Thr407Gly, Ala450Gly) をコードする遺伝子を、PCR を用いた部位特異的変異導入法により作製する。

(2) カイコ PheRS の β サブユニット(PheRS- β) 遺伝子を、カイコ幼虫からクローニングする。

(3) 改変型 PheRS- α 遺伝子とモデルタンパク質(His-tag 融合緑色蛍光タンパク質(GFP)) 遺伝子を、卵巣由来のカイコ培養細胞(BmN)に導入する。形質転換した BmN 細胞中での改変型 PheRS- α および His-tag 融合 GFP の発現を、電気泳動・ウェスタンブロットおよび蛍光観察により確認する。

(4) 市販品として容易に入手できるパラ置換 Phe 誘導体(*p*-Cl-, *p*-Br-, *p*-I-Phe) をそれぞれ一定量添加した培地中で、(3)で作出した培養細胞を培養する。細胞溶解液より精製した His-tag 融合 GFP およびそのトリプシン消化物の TOF-MS 分析を行い、誘導体への置換にともなう分子量の増加を検出して置換率を算出する。

(5) カイコ PheRS- α (野生および改変型) および β (野生型) を His-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、精製する。同時に、カイコ tRNA^{Phe} を *in vitro* 転写により合成する。PheRS (野生および改変型)、tRNA^{Phe} および Phe(天然または誘導体)を基質とし、アミノアシル化反応のアッセイを行う。

4. 研究成果

(1) カイコ PheRS- α (図 1 A) に含まれるアミノ酸結合ポケットを空間的に拡張するため、Thr407 を Ala または Gly に置換した変異体(T407A, T407G)ならびに Ala450 を Gly に置換した変異体(A450G)、さらにこれらの二重変異体(T407A/A450G, T407G/A450G)の計 5 種の改変型 PheRS- α 遺伝子を、PCR を用いた部位特異的変異導入法により作製した。

(2) カイコ EST データベースおよびゲノムデータベースよりカイコ PheRS- β 遺伝子の配列を予測し、これに基づいて設計したプライマーを用いた RT-PCR により、同遺伝子をカイコ絹糸腺よりクローニングした。DNA シークエンスにより、その全アミノ酸配列を明らかにした(図 1 B)。

(A) PheRS- α

MELNERILKYLENSDKADTLKLCFEEFNEEHQKIVGAVKSLE

ALEMVISEAVKITKWELTEEGELVANNGSHEAVLYRSIPDS
 GVPQSEAMKMPVNAKVGFSKAMSSGWIYIDKSSGPPLVKRR
 VDSITDIVQENLSEIRKGIIDNLSNVNRNDYKRRKLLQEVTI
 KSFLLSKGPQFAITIKKLETDLTSDMLLSGSWKTELEFKPYN
 FDALGQPPECGLHPLKVRSEFREFIFLEMGFTMPTNKYV
 ESSFWNFDFALFQPPQHPARDAHDTFMSSPAATTEFPMEYL
 ERVKKVHSGGGYGSQGYRYDWKIEEAQKNLLRTHTTAVSAR
 MLYRLAQQTFTFPQKYFSIDKVFNRNETLDATHLAEFHQVEG
 VVADRGLGLADLITVLDADFVKRLGFDQLQFKPAYNPYTEPS
 MEIFAYHTGLAKWIEIGNSGVFRPEMLLPGLPEDVNVIAW
 GLSLERPTMIKYGLNIRDVLVGPVKVDLRMVYNNPICRLDK
 (491aa)

(B) PheRS-β

MPTISLKRDALFAALGSTYTDDEFQDLCKFKGLELDEVTTTE
 KQMLIKEQDQADAELSDEILYRIDIPANRYDLLCLEGLVD
 GLLVFGQKPPPPQYKVKYEDCNLSLHMTATAQIRPYAVAA
 VLRGITFTKESYDSFIDLQDKLHQNICRKRRLVAIGTHDLD
 TIHGPFYDALPPNEIKFKALNQPKELTAPELMELYSNHAQ
 LKQYLGIIKESPVYPIIKDKNGVILSMPPPIINSDHSKITLN
 TKNVFIETATDLTAKAIVVLDTVVSMFSKYCTSEYEVQOCK
 VFSPDGTYLELYPKLQYREELINVDKANNYIGISEEGDKLAS
 LLSRMCLQTAHEGSVLRVVRVPPTRHDVIAHCDLYEDIAIAY
 GYNRIARRPARAVTSGGQDPANKLTEQLRNECARAGYTEAL
 TFTLCSREDVSTKLGVKIEDVPAAHISNPKTLEFQVVRTLL
 LPGLLKTIAANKMPLPLKLFESIDVLLDENAESGARNVR
 RACGVHCGRAAGFQHVHGLLDRLMAQLRVRHRDQYALRPAQ
 DPAYFPGRCAEVVLQGVKIGKIGVHPNVLTA FELTNPCSA
 VEIDIEPFV
 (583aa)

図1. カイコ PheRS-α (A)および-β (B)の全アミノ酸配列

(3) 野生型および5種の改変型 PheRS-α ならびにモデルタンパク質として His-tag 融合 GFP をコードする高発現プラスミドベクターを作製した。これらベクターをトランスフェクションした BmN 細胞における PheRS-α および GFP 遺伝子の発現を、それぞれ RT-PCR 法および蛍光観察により確認した。

(4) モデルタンパク質として His-tag 融合 GFP を発現させた BmN 細胞から当該タンパク質を簡便な方法で精製し、このゲル内消化断片の MALDI-TOF-MS 解析により、フェニルアラニン (Phe) を含む断片を同定した。また、Phe を欠乏した培地中ではモデルタンパク質の発現が大幅に抑制されることを確認した。これにより、BmN 細胞を用いてモデルタンパク質への Phe 誘導体の取り込みをアッセイする実験系を確立した。天然の Phe をパラ位置換誘導体 (p-Cl-, p-Br-, p-I-Phe) へ置換した培地中で、改変型フェニルアラニル-tRNA 合成酵素 (PheRS) とモデルタンパク質を共発現させアッセイを試みたが、誘導体の取り込みを確認するには至らなかった。今後、アッセイに適した発現条件を詳細に検討する。

(5) 野生型および改変型カイコ PheRS を大腸菌で発現・精製する条件を確立した (図2)。In vitro においてこの組換え PheRS がカイ

コ tRNA^{Phe} をアミノアシル化する活性を有することを、電気泳動を用いた定性評価法で確認した (図2)。カイコ PheRS-α の A450G 変異体が、パラ位に置換基 (p-Cl-, p-Br-) を有する Phe 誘導体を基質として認識できることを明らかにした (図3)。これは、非天然アミノ酸を認識するカイコ由来アミノアシル-tRNA 合成酵素変異体の初めての作出例であり、カイコの遺伝子組換え技術を用いて非天然アミノ酸を含むタンパク質を大量に合成するための重要な知見として利用できる。

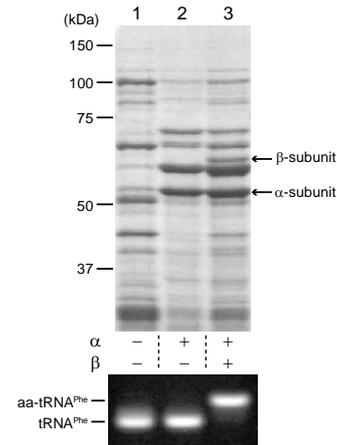


図2. 【上段】大腸菌で発現・精製したカイコ PheRS-α および-β の SDS-PAGE

トリプシン消化断片の MALDI-TOF-MS 解析によりバンドを同定

【下段】カイコ tRNA^{Phe} の酸性 PAGE

アミノアシル化されると移動度が変化することにより酵素活性をアッセイ

レーン1: 空ベクター

レーン2: PheRS-αのみ発現

レーン3: PheRS-α,-βを共発現

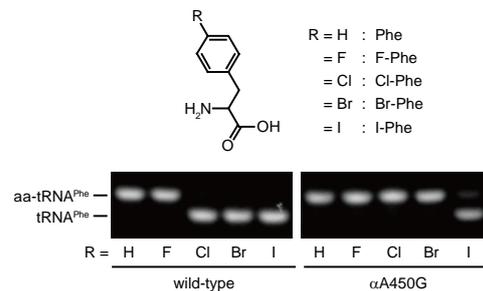


図3. 【上段】アッセイに用いたパラ位置換 Phe 誘導体の構造

【下段】カイコ tRNA^{Phe} の酸性 PAGE

アミノアシル化されると移動度が変化することにより酵素活性をアッセイ

左カラム: 野生型カイコ PheRS

右カラム: 改変型カイコ PheRS (A450G)

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)

[学会発表] (計2件)

① 寺本英敏、小島 桂、基質識別部位に変異を導入したカイコフェニルアラニル-tRNA 合成酵素によるパラ位置換フェニルアラニンアナログの認識、日本蚕糸学会第80回記念大会、平成22年4月4日、信州大学繊維学部

② 寺本英敏、小島 桂、カイコフェニルアラニル-tRNA 合成酵素遺伝子のクローニング、日本蚕糸学会第79回大会、平成21年3月21日、東京農工大学農学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 英敏 (TERAMOTO HIDETOSHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・絹タン

パク素材開発ユニット・主任研究員

研究者番号：60391562