

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24688008

研究課題名(和文)カイコタンパク質翻訳機構の改変による非天然アミノ酸含有シルクタンパク質の創製

研究課題名(英文) Modification of protein synthesis machinery of silkworms for the production of silk proteins bearing unnatural amino acids

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・新機能素材研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：60391562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：カイコが産生するシルクタンパク質に対してピンポイントな化学反応(クリック反応)が可能な非天然アミノ酸を導入する手法を開発し、医工学分野などへ高機能なシルクタンパク質材料を提供するための技術基盤を構築することを目的に研究を進めた。その結果、カイコの遺伝子組換え技術を利用し、クリック反応が可能なアジド基を有する非天然アミノ酸(AzPhe)をシルクタンパク質中に導入することに成功した。実際に、水溶液やフィルムなど異なる形態において、クリック反応によりシルクタンパク質中のアジド基を選択的に反応させられることを確認した。これにより、高機能なシルクタンパク質材料を作出するための技術基盤を構築できた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at developing a method to incorporate unnatural amino acids bearing functional groups available for selective chemical reactions (click reactions) into silk proteins in order to provide high-performance silk-based materials to biomedical fields. We have succeeded in incorporating unnatural amino acids bearing azide groups (AzPhe) available for click reactions into silk proteins using genetic modification techniques of silkworms. We verified that azide groups incorporated into silk proteins can be selectively modified with functional molecules using click reactions.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：昆虫 生体機能利用 バイオテクノロジー 非天然アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

カイコ (*Bombyx mori*) が産生するシルクタンパク質 (フィブロイン) は、機械強度に秀でること・縫糸糸としての長年の使用実績に裏打ちされた高い生体適合性を有することなど、医工学分野における材料候補として優れた特性を備えている。一方シルクタンパク質材料の欠点として、目的に応じてその特性を自在に改変するための実用的な手法がない点があげられる。

アミノアシル-tRNA 合成酵素 (AARS) は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で、タンパク質の正確な翻訳に主要な役割を果たしている。この AARS の厳密なアミノ酸識別能を遺伝子工学的に緩和することにより、天然アミノ酸に構造が類似した非天然アミノ酸をタンパク質中に導入することが大腸菌等において可能となっている。研究代表者らはこれまでにフェニルアラニン (Phe) に対応する AARS であるフェニルアラニル-tRNA 合成酵素 (PheRS) 遺伝子をカイコからクローニングし、アミノ酸置換を導入した PheRS 変異体が Phe に構造が類似した非天然アミノ酸 (Phe 類縁体) を *in vitro* で認識することを報告した (引用文献①)。さらに、この PheRS 変異体を発現するカイコ培養細胞において、タンパク質中に非天然アミノ酸が取り込まれることを明らかにした (引用文献②)。これにより、カイコのタンパク質翻訳機構を大腸菌と同様の手法で改変できることが示された。

<引用文献>

- ① Teramoto, H. and Kojima, K., Cloning of *Bombyx mori* phenylalanyl-tRNA synthetase and the generation of its mutant with relaxed amino acid specificity. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 79(2), 2010, 53-65.
- ② Teramoto, H., Kojima, K., Kajiwarra, H., and Ishibashi, J., Expansion of the amino acid repertoire in protein biosynthesis in silkworm cells. *ChemBioChem*, 13(1), 2012, 61-65.

2. 研究の目的

本研究では、カイコ培養細胞ですでに成功しているタンパク質翻訳機構の改変をカイコ幼虫個体へと拡張し、高選択的な化学反応が可能な非天然アミノ酸を含有するシルクタンパク質を創製することを目的とする。導入した非天然アミノ酸へのピンポイントな化学反応 (クリック反応) によって様々な機能性分子を穏和で安全な条件でシルクタンパク質に結合させる手法を開発し、医工学分野などへ高機能なシルクタンパク質材料を提供することを目指す。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために、以下の4点を

中心に研究を進めた。

(1) カイコ由来 AARS 変異体を絹糸腺で発現する GM カイコの作出

カイコ培養細胞を用いた実験で Phe 類縁体のタンパク質合成への取り込みに既に成功している PheRS A450G 変異体を、遺伝子組換え (GM) カイコの絹糸腺で発現させた。また、その他の PheRS 変異体について培養細胞でのアッセイを行った。さらに、メチオニン (Met) 類縁体を認識するメチオニル-tRNA 合成酵素 (MetRS) 変異体の作出を試みた。

(2) シルクタンパク質への Phe 類縁体取り込み解析

異なる官能基を有する Phe 類縁体のシルクタンパク質への取り込み効率をアッセイした。取り込み効率は、シルクタンパク質をトリプシン消化して得られるペプチド断片 (SGNEAGFR, 855.41 Da) (Phe を 2 残基含む) の質量分析により評価した。

(3) シルクタンパク質への Met 類縁体取り込み解析

異なる官能基を有する Met 類縁体のシルクタンパク質への取り込み効率をアッセイする。取り込み効率は、シルクタンパク質をトリプシン消化して得られるペプチド断片 (TFVITDSDGNESIVEEDVLMK, 2442.16 Da) (Met を 1 残基含む) の質量分析により評価した。

(4) 反応性官能基を導入したシルクタンパク質へのクリック反応

反応性官能基 (アジド基およびエチニル基) を有する Phe および Met 類縁体を導入したシルクタンパク質に対し、ビオチン基や蛍光基を有する機能性分子をクリック反応で選択的に結合できるか検討した。反応は、均一溶液中だけでなく、繊維やフィルムといった固体状態でも検討した。

4. 研究成果

(1) カイコ由来 AARS 変異体を絹糸腺で発現する GM カイコの作出

アミノ酸結合部位に変異を導入した3種のカイコ PheRS 変異体 (A450G, T407A, T407G) をカイコ培養細胞で発現させ、それぞれがタンパク質合成に及ぼす影響をレポータータンパク質 (GFP) の発現量から評価した。その際、通常の培地中、および、Phe 含量を約 1/9 に低減させた培地中でそれぞれ培養した (図 1)。

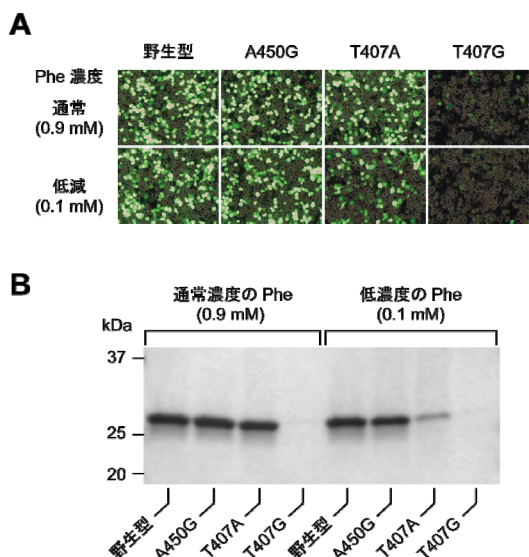


図1 培養細胞を用いたカイコ PheRS 変異体発現によるタンパク質合成への影響解析 (A) 野生型および各 PheRS 変異体とレポータータンパク質 (GFP) とを共発現させた培養細胞写真 (上段: 通常量の Phe を含む培地 / 下段: Phe を低減させた培地) (B) 培養細胞からアフィニティ精製した GFP の電気泳動像

A450G 変異体を発現させた場合は、通常培地および Phe 低減培地いずれでも GFP の合成量は変化しなかった。一方 T407A 変異体を発現させた場合は、Phe 低減培地中で培養した際に GFP の合成量が顕著に低下した。さらに T407G 変異体を発現させた場合は、いずれの培地中で培養した場合でも GFP の合成量が劇的に低下した。変異導入によってアミノ酸結合部位が拡張されたことにより、本来の基質でないアミノ酸が誤認識され、タンパク質合成能にネガティブな影響を及ぼしたものと推察される。この結果を基に、T407G 変異体を除いた 2 種のカイコ PheRS 変異体 (A450G および T407A) を絹糸腺で発現する GM カイコを作出し、それぞれの変異体遺伝子をホモで有する系統を確立した。

他グループによる大腸菌 MetRS での情報を基に、Met 類縁体を認識できるカイコ MetRS 変異体の作出を試みた。しかしながら、作出した全ての変異体においてアミノ酸認識活性の消失を示唆する結果が得られ、Met 類縁体を認識するカイコ MetRS 変異体は作出できなかった。

(2) シルクタンパク質への Phe 類縁体取り込み解析

A450G 変異体を発現させた GM カイコに対し、4 種の Phe 類縁体 (ClPhe, BrPhe, AzPhe, EthPhe) (図 2) を飼料に混合して投与した。その結果、全ての Phe 類縁体がシルクタンパク質中に導入されることが分かった。しかし、取り込み効率は類縁体ごとに異なっており、特に AzPhe の取り込み効率は低かった。そこ

で飼料中の Phe 含量を徐々に低減させたところ、Phe が通常量の 0.3 倍以下の場合に AzPhe の取り込み効率が大幅に向上した (図 3)。

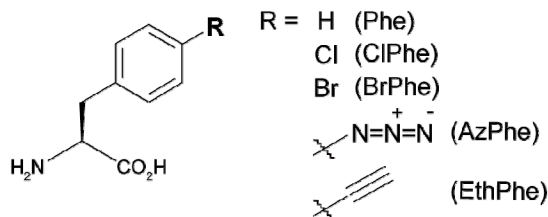


図2 カイコ幼虫への投与実験に用いた Phe 類縁体

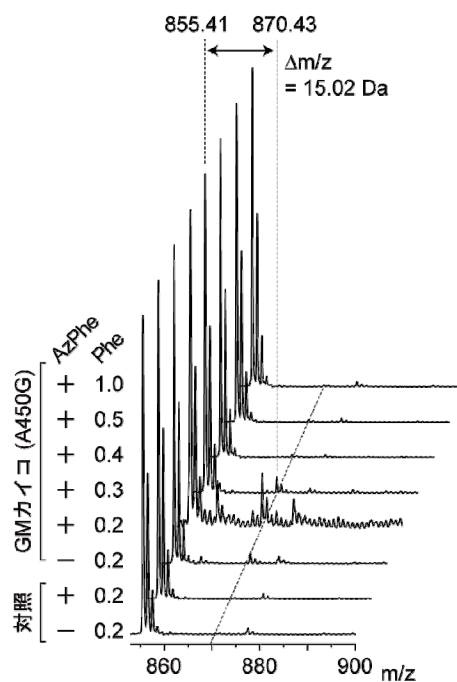


図3 AzPhe を含有するシルクタンパク質由来ペプチド断片 (SGNEAGFR) の MALDI-TOF-MS 解析

異なる Phe 含量の飼料で飼育した際の AzPhe 取り込み効率を、Phe から AzPhe への置換に伴う +15 Da ピークの相対強度から評価した。AzPhe の投与量は、通常量の Phe に対して 0.5 当量に固定した。対照として、非組換えカイコを用いた。

さらに、AzPhe 投与量を最適化することで、AzPhe が導入されたシルクタンパク質を効率的に生産する条件 (Phe 含量 × 0.3 倍, AzPhe 投与量 0.15 当量) を見出すことができた (図 4)。

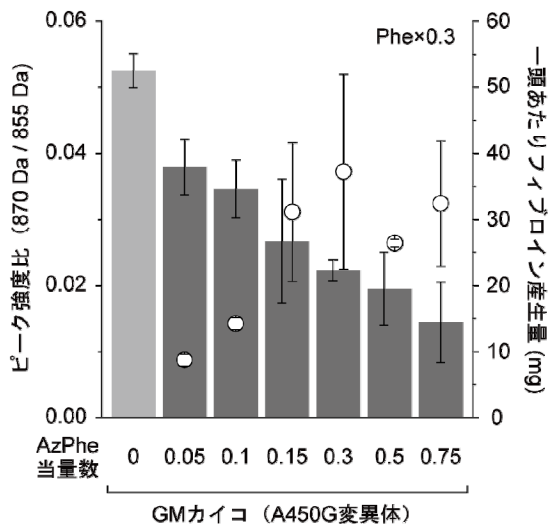


図4 AzPhe 導入シルクタンパク質生産条件の最適化

飼料中の Phe 含量を通常量の 0.3 倍に固定し、AzPhe の投与量 (通常量の Phe に対する当量数) を変化させた。AzPhe 導入量の指標として、図 3 で示した質量分析ピーク (855 および 870 Da) の比を用いた。

T407A 変異体を発現させた GM カイコでは、A450G 変異体を発現する系統と比較して Phe 類縁体の取り込み効率に優れることも見出した (データ公表準備中)。

(3) シルクタンパク質への Met 類縁体取り込み解析

Met の類縁体 (図 5) であるホモプロパルギルグリシン (Hpg)、アジドホモアラニン (Aha)、ホモアシルグリシン (Hag) は、大腸菌等において野生型の MetRS に認識されることが知られている。カイコ MetRS がこれら Met 類縁体を認識できるかどうか *in vitro* でアッセイしたところ、いずれの Met 類縁体もカイコ MetRS (野生型) に認識されることを確認した。そこで、これら 3 種の Met 類縁体を通常のカイコ幼虫に投与したところ、飼料中の Met 含量を低減した状態であれば、3 種全ての Met 類縁体がシルクタンパク質中に取り込まれることを見出した (図 6)。

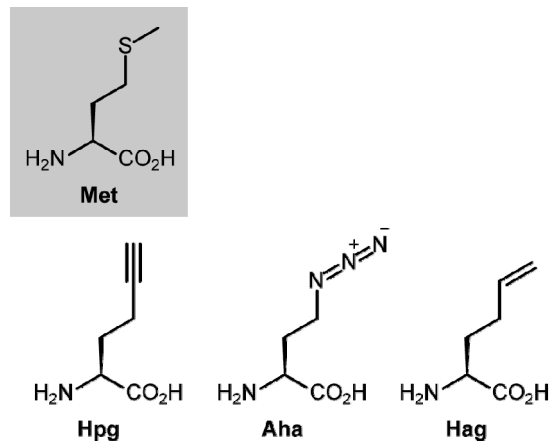


図5 カイコ幼虫への投与実験に用いた Met 類縁体

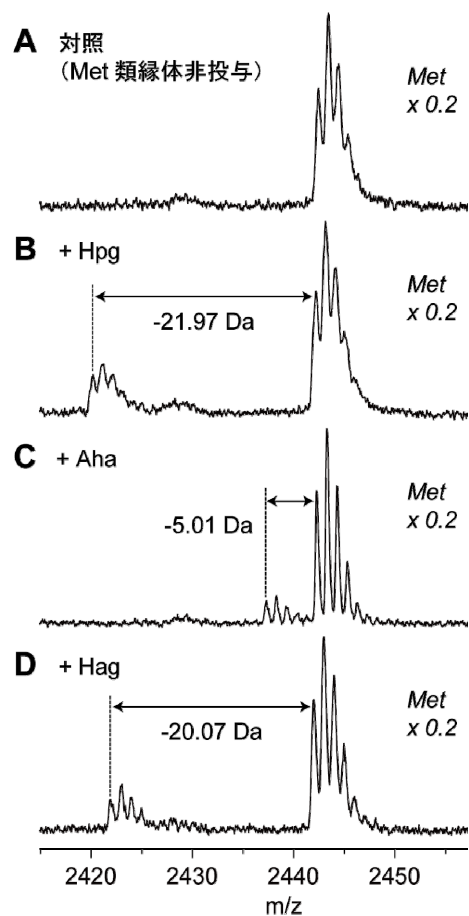


図6 Met 類縁体を含有するシルクタンパク質由来ペプチド断片 (TFVITDSDGNESIVEEDVLMK) の MALDI-TOF-MS 解析

- (A) Met 類縁体を投与していない対照試料
- (B) Hpg を投与した試料
- (C) Aha を投与した試料
- (D) Hag を投与した試料

いずれの試料も、Met 含量を通常の 0.2 倍に低減させ、かつ、各 Met 類縁体を通常量の Met に対して 0.5 当量添加した飼料で飼育して得られた。

(4) 反応性官能基 (アジド基およびエチニ

ル基)を導入したシルクタンパク質へのクリック反応

AzPhe を導入したシルクタンパク質に対し、機能性分子をクリック反応により結合できるか検討した。シルクタンパク質試料として、水溶液および繊維を用いた。水溶液はビオチン基をもつ機能性分子と、繊維は蛍光基をもつ機能性分子と反応させた (図7)。

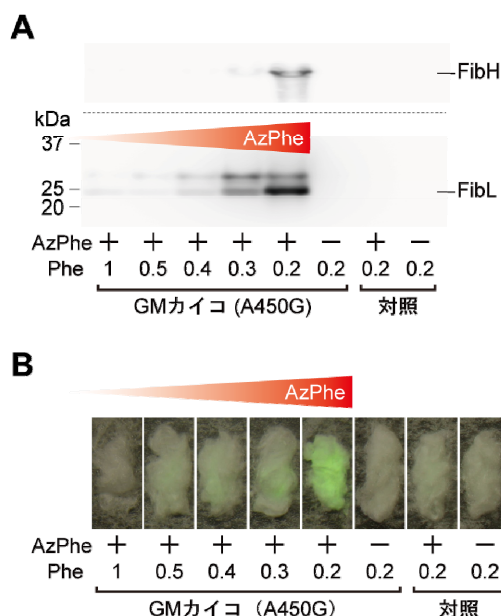


図7 AzPhe を導入したシルクタンパク質へのクリック反応

(A) 水溶液中のシルクタンパク質に対してビオチン基を有する機能性分子をクリック反応させ、その後 HRP-ストレプトアビジンでビオチン基を検出した。シルクタンパク質の主要成分であるフィブロイン H 鎖 (FibH) およびフィブロイン L 鎖 (FibL) のいずれにおいても、AzPhe 導入量の増大 (=飼料中の Phe 含量の低減) にともなうシグナル強度の増加が見られた。

(B) 繊維状態のシルクタンパク質に対して蛍光基を有する機能性分子をクリック反応させ、その蛍光を観察した。(A)と同様に、AzPhe 導入量の増大にともない蛍光強度の増加が見られた。

水溶液中および繊維状態のいずれにおいても、AzPhe が導入されたシルクタンパク質においてのみクリック反応が進行することを確認した。AzPhe が導入されていない対照試料 (非組換えカイコ由来) では反応が進行しなかったことから、クリック反応により高選択的に機能性分子を AzPhe のアジド基に結合させられることが分かった。

シルクタンパク質を医工学分野へ利用するためには、フィブロインタンパク質繊維の周りを覆っている糊状のセリシンタンパク質を完全に除去した上で、可溶化および透析処理等を経てフィルム等の形態へ加工する必要がある。そこで、このような加工プロセ

スを経た後でもアジド基の反応性が維持されるかどうか明らかにするため、AzPhe を導入したシルクタンパク質からフィルムを作製し、そのクリック反応性を調査した (図8)。

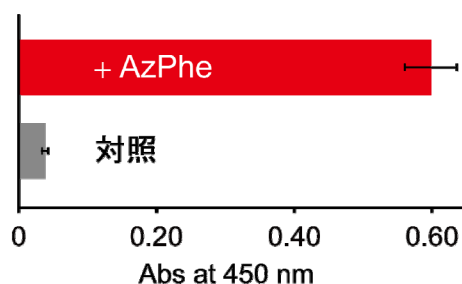


図8 フィルムへの加工後におけるアジド基へのクリック反応

マイクロプレートの底面に形成させた AzPhe 導入シルクフィルムに対してビオチン基を有する機能性分子をクリック反応させた後、ビオチン基への HRP-ストレプトアビジンの結合量を発色試薬により定量した。

AzPhe が導入されたシルクタンパク質から作製したフィルムでは、対照試料 (AzPhe を含まない) よりも顕著に多くビオチン基が結合していた。このことから、加工プロセスを経てフィルム化した後もアジド基は反応性を維持していることが確認できた。このことは、これまでに報告されている多様なシルクタンパク質由来材料にクリック反応性を付与できることを強く示唆している。

Met 類縁体を導入したシルクタンパク質についてもクリック反応性を調査したところ、エチニル基を有する Hpg およびアジド基を有する Aha を導入したシルクタンパク質において、ビオチン基を有する機能性分子を選択的に結合させることができた。

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4件)

- ① Teramoto, H. and Kojima, K., Incorporation of methionine analogues into *Bombyx mori* silk fibroin for click modifications, *Macromolecular Bioscience*, 査読有, in press (DOI: 10.1002/mabi.201400482)
- ② 寺本英敏, 中島健一, 小島 桂, 非天然型アミノ酸 (4-クロロフェニルアラニン) を導入した家蚕シルクの物性解析, *日本シルク学会誌*, 査読有, 23, 2015, 27-35 (<http://doi.org/10.11417/silk.23.27>)
- ③ Teramoto, H. and Kojima, K., Production of *Bombyx mori* silk fibroin incorporated with unnatural amino acids, *Biomacromolecules*, 査読有, 15(7), 2014, 2682-2690 (DOI: 10.1021/bm5005349)
- ④ Teramoto, H. and Kojima, K., Residue-specific incorporation of phenylalanine

analogues into protein biosynthesis in silkworm cultured cells, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 査読有, 82(3), 2013, 61-69 (http://doi.org/10.11416/jibs.82.3_061)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Teramoto, H. and Kojima, K. Azide-bearing silk as a clickable biopolymer produced by *in vivo* incorporation of unnatural amino acids. *The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2014)*, 2014 年 12 月 2~5 日, つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)
- ② Teramoto, H., Kojima, K., and Nakajima, K. Mutagenesis of *Bombyx mori* silk fiber by *in vivo* incorporation of unnatural amino acids into silk fibroin. *International Symposium on Fiber Science and Technology 2014*, 2014 年 9 月 28 日~10 月 1 日, ビッグサイト東京ファッションタウン (TFT) ホール (東京都・江東区)
- ③ 寺本英敏, 小島 桂, 中島健一, 天然にはない官能基を導入したシルク材料の創製, 平成 26 年度繊維学会年次大会, 2014 年 6 月 11~13 日, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
- ④ 寺本英敏, 小島 桂, 中島健一, 非天然アミノ酸を導入したシルクの物性解析, 第 61 回日本シルク学会研究発表会, 2014 年 5 月 16 日, 蚕糸科学研究所 (東京都・新宿区)
- ⑤ 寺本英敏, 小島 桂, 中島健一, シルクに非天然アミノ酸を導入できる遺伝子組換えカイコの作出, 平成 26 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2014 年 3 月 10~11 日, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県・藤沢市)
- ⑥ 寺本英敏, 小島 桂, クリック反応による誘導化が可能なシルク材料の創製, つくば医工連携フォーラム 2014, 2014 年 1 月 28 日, 産業技術総合研究所 (茨城県・つくば市)
- ⑦ 寺本英敏, 小島 桂, 遺伝子組換えカイコによる非天然アミノ酸含有シルクタンパク質の作出, 第 62 回高分子討論会, 2013 年 9 月 11~13 日, 金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市)
- ⑧ 寺本英敏, 小島 桂, カイコタンパク質合成系へのフェニルアラニン類縁体の導入, 平成 25 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2013 年 3 月 18-19 日, 農林水産技術会議事務局筑波事務所 (茨城県・つくば市)
- ⑨ 寺本英敏, 小島 桂, カイコにおけるタンパク質構成アミノ酸レパートリーの拡張, つくば医工連携フォーラム 2013, 2013 年 1 月 29 日, 産業技術総合研究所 (茨城県・つくば市)
- ⑩ 寺本英敏, 化学選択性に優れる官能基を

利用したシルク改変のための基礎検討, 第 59 回日本シルク学会研究発表会, 2012 年 6 月 2 日, 明星大学 (東京都・日野市)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: トランスジェニックカイコ、および該カイコを用いた非天然アミノ酸含有タンパク質の製造方法

発明者: 寺本英敏・小島 桂・飯塚哲也

権利者: 農業生物資源研究所

種類: 特許

番号: 特開 2015-15927

出願年月日: 平成 25 年 7 月 1 1 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.nias.affrc.go.jp/org/GMO/SilkMaterials/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺本 英敏 (TERAMOTO, Hidetoshi)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・新機能素材研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号: 60391562