

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870853

研究課題名(和文) 部位特異的かつ多部位への非天然型アミノ酸導入による新規タンパク質安定化法の開発

研究課題名(英文) Development of novel protein stabilization method with multiple site-selective nonnatural amino acids incorporation

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・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別研究員

研究者番号：80593631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質中の複数のチロシン部位へのハロゲン原子導入を基盤とする新規タンパク質安定化法の開発に成功した。この安定化タンパク質の生産には部位特異的多数箇所へのハロゲン化チロシン導入が必須であり、申請者らの独自技術である大腸菌遺伝暗号改変株によって実現された。また、X線結晶構造解析及び量子化学的計算を通じてハロゲン原子が構造安定化にをもたらす原理についても明らかにし、この原理に基づく安定化が広く応用可能であることも既存構造の解析から示唆された。

研究成果の概要(英文)：I developed novel protein stabilization method based on multiple incorporation of halogen atoms into tyrosine sites. For the production of such stabilized proteins, multiple site-selective incorporation of halogenated tyrosines is needed. The method was realized by our original technology, genetic code reassigned Escherichia coli strain. Stabilization manner was revealed by X-ray crystallographic analysis and quantum-chemical calculations technique. Then, application possibility to other proteins was suggested by the analysis of existing 3D structures.

研究分野：分子生物学 生化学 タンパク質科学

キーワード：応用生物化学 酵素化学 非天然型アミノ酸 タンパク質工学 生体分子の化学修飾 バイオテクノロジー
ジーン タンパク質の安定化 拡張遺伝暗号

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生物機能において最も重要な役割を担う生体物質であり、多彩な反応性を有している。この性質はタンパク質を生体外にとりだしても利用可能であり、一般の化学反応では難しい様々な反応を試験管内で実現するために用いられている。(Kirk *et al.*, **2002**, *Curr. Opin. Biotechnol.*)

タンパク質の有用性をより高めるために高機能化や高性能化のために様々な改変が試みられてきた。改変の方向性は大きく分けて化学的修飾と遺伝学的なタンパク質改変の二つに分けられる。さらに遺伝学的方法は通常の 20 種類のアミノ酸の範囲内での変異導入や進化的実験と、非天然型アミノ酸を利用した方法の二種に分けられる。通常のアミノ酸のみを用いて改変を行う手法は、アミノ酸の化学的特徴が限られているため機能的限界がある一方で、手法自体の簡便さにおいて優位性がある。これに対して、非天然型アミノ酸を用いた手法は通常のアミノ酸には存在しない化学的特徴を付与できる利点がある。非天然型アミノ酸を導入する手法としては以下に述べる二つの方法が従来用いられてきた。一つめが 20 種類のアミノ酸いずれか一つに変えてそのアミノ酸に類似のアミノ酸をタンパク質へと導入する「残基特異的」置換であり(Johnson *et al.*, **2010**, *Curr. Opin. Chem. Biol.*)、二つめが 20 種類のアミノ酸に加えて非天然型アミノ酸を UAG 終止コドンなどに「部位特異的」に導入する方法である。(Wang *et al.*, **2001**, *Science*) これら二つの方法であるが、非天然型アミノ酸を用いて自由なタンパク質改変を目指す上で障壁となる点がそれぞれに存在していた。残基特異的導入はタンパク質中の多数箇所非天然型アミノ酸を導入出来る一方で、置換するアミノ酸残基は場所を選ばず非天然型アミノ酸に置き換わってしまい、不利な置換を元のアミノ酸のまま保持したいという要求には応えることが出来ず、ビルディングブロックとしてのアミノ酸の種類も拡張されない。一方で、UAG コドンへの部位特異的導入ではこのような問題は起こらないが、UAG コドンへの非天然型アミノ酸導入は翻訳終結因子 1(RF-1)による翻訳終結と競合するため導入効率に制限があり、多数箇所への導入は困難であった。

申請者らは大腸菌において RF-1 遺伝子破壊株(RFzero 株)の作成を報告している。(Mukai *et al.*, **2010**, *Nucleic Acids Res.*) RF-1 は大腸菌において UAG コドンを認識し翻訳終結へと導く唯一の細胞内因子であり、その構造遺伝子である *prfA* のノックアウトは通常の大腸菌では致死である。しかしながら、7 つの必須遺伝子末端の UAG 終止コドンを置換することで、UAG コドンがアミノ酸へと翻訳される条件下で *prfA* をノックアウトできることを見出した。RFzero 株は「多数箇所」に「部位特異的」に非天然型

アミノ酸を導入可能であり、前述の二つの手法が抱えていた問題点を根本から解決した新しい非天然型アミノ酸の導入系である。このように RFzero 株を用いることにより、通常のアミノ酸を用いた手法と同様の自由度と簡便さで非天然型アミノ酸を利用したタンパク質改変が可能になると見込まれていた。

2. 研究の目的

非天然型アミノ酸を部位特異的、多数箇所に導入可能になり 20 種類の標準アミノ酸以外のビルディングブロックを自由に使ったタンパク質改変が可能となった。この手法を活用し、従来不可能であった多数の非天然型アミノ酸導入によるタンパク質改変法の開発を目指した。具体的には、タンパク質中へのハロゲン原子の導入による安定性の向上について着目した。タンパク質とりわけ酵素の安定化は実際に利用する上で長寿命化、高温反応による効率の上昇、使用量の低減など様々な恩恵をもたらす。ハロゲン原子の中でもフッ素原子による安定化は既に他のグループから報告がなされている。(Tang *et al.*, **2001**, *Angew. Chem. Int. Ed.*) フッ素よりサイズの大きい塩素、臭素、ヨウ素原子の適切な部位への導入は、より大きな安定化効果を期待できるが、その一方で不適切な場所に導入した場合の負の効果も大きく特に基質結合部位などの置換は致命的な影響をもたらすと考えられる。RFzero 株を用いることにより、これら負の影響を回避しつつ安定化に寄与するハロゲン原子をタンパク質中へと導入し、タンパク質を安定化する手法の開発を目的とする。また、改変のプロセスを通じて自由非天然型アミノ酸を足し引きできる新たなタンパク質エンジニアリング法を実験法及び改変戦略の両側面において確立することも目的とする。

3. 研究の方法

申請者らは 3-ヨードチロシン(IY)を導入するためのアミノアシル tRNA 合成酵素を報告している。(Sakamoto *et al.*, **2009**, *Structure*) その後の研究によりこの酵素は 3-プロモチロシン(BrY)、3-クロロチロシン(CIY)も同様に導入可能であることが明らかになっていた。この酵素と RFzero 株を組み合わせることにより、多数箇所にハロゲン化チロシンを導入したタンパク質を生産する。

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)中の 7 箇所のチロシン残基を BrY または CIY に置換した変異体(7bGST、7cGST)でわずかに安定性の向上が見られた。この変異体をもとに不安定化する置換の探索と除去を行う。続いて、追加で置換することによりさらに安定化に寄与する部位の探索を行い、最終的な安定化変異体の取得を行う。得られた GST 変異体について、尿素を用いて変性曲線を測定し安定化エネルギーの定量的解析を

行う。また、X線結晶構造解析により立体構造を決定し、この構造を元に量子化学的計算を行い安定化のメカニズムを明らかにする。これらの結果と、データベース上の既存構造の解析により本安定化法の応用可能性を探り、実際にGST以外の酵素においても安定化変異体の取得を試みる。

4. 研究成果

7bGST、7cGST から一箇所ずつチロシン残基へと逆置換したところ、155位をチロシンに戻した際に顕著に安定化し、逆に57位、73位、141位では不安定化した。(図1) このことから155位のハロゲン化チロシンへの置換は構造不安定化を引き起こし、57位、73位、141位へのハロゲン化チロシン導入は安定化に寄与することが明らかになった。さらに加算的に安定化に寄与する部位の探索を行ったところ32位の置換の安定化への寄与を見出した。7bGST、7cGSTから155位の置換を除き、32位の置換を加えることにより顕著に安定化し、野生型では完全失活する条件下で活性の大部分を保持する変異体7bGST-1、7cGST-1を得ることに成功した。

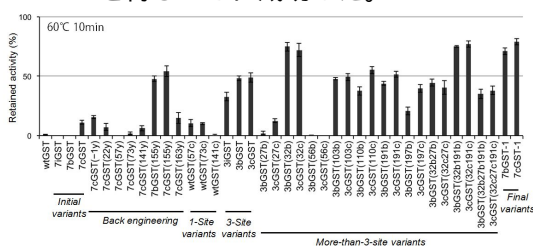


図1 ハロゲン化チロシン導入GST変異体熱処理後残存活性

7bGST-1、7cGST-1の尿素変性に対する構造安定性を円偏光二色計により測定し、理論曲線にフィッティングすることにより定量的な解析を行った。(図2) それぞれ5.6kcal/mol、5.2kcal/molと顕著な安定化が見られる一方で、溶媒露出面積には殆ど差がなく野生型と各変異体間で大きな構造変化はないことが示唆された。

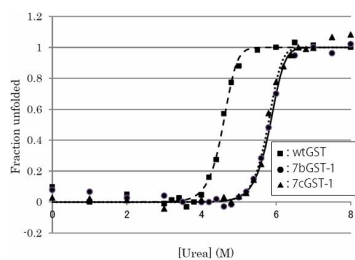


図2 尿素変性曲線

7bGST-1、7cGST-1をX線結晶構造解析によりそれぞれ分解能1.6、1.9で三次元構造を決定した。(図3) このとき、野生型と比較したCの平均二乗偏差は0.43、0.45と小さく、大きな構造変化が起こっていないことが裏付けられた。決定された構造中で、ハロゲン原子はタンパク質中またはダイマーインターフェースの空隙を充填するように存在していることが明らかとなった。(図4)

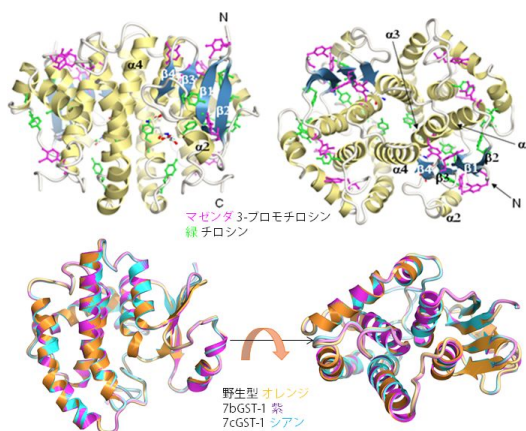


図3 変異体GST全体構造7bGST-1(上) 野生型との構造比較(下)

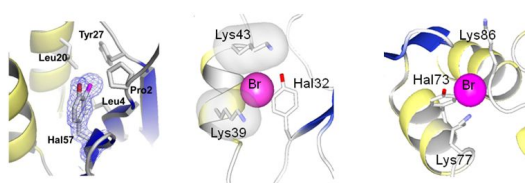


図4 7bGST-1安定化に寄与する置換部位の周辺構造

決定した構造をもとに、フラグメント分子軌道法を用いた量子化学的計算を行ったところ、静電的相互作用の寄与は小さく、構造安定化は主にvan der Waals相互作用に起因することが示唆された。そこで、PDB上の既存構造を用いてタンパク質中のチロシン残基meta位方向の空隙のサイズを解析したところ、約1/4が臭素または塩素原子に適したサイズであることが明らかになった。(図5)

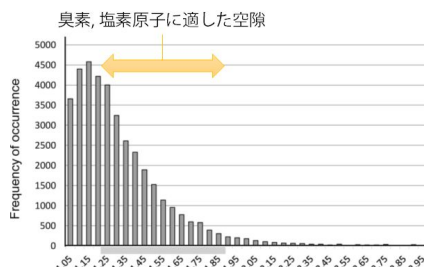


図5 タンパク質中のチロシン残基meta位の空隙サイズ(Å)

以上よりハロゲン化チロシンの導入により安定化できる可能性が多くのタンパク質に存在することが示唆された。そこでアゾ色素を分解する酵素であるアゾレダクターゼ(AZR)においてもGSTと同様に安定化できるか検証を行った。3箇所BrYを導入することにより加熱時の活性半減期が13倍に延長した安定化変異体を取得することに成功した。(図6)

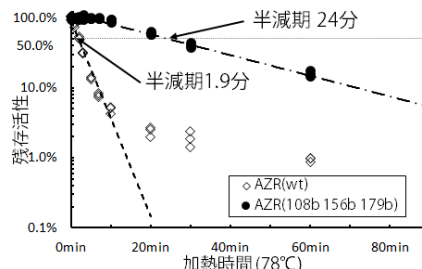


図6 変異体AZRの熱安定性

本研究において、ハロゲン化チロシンの多数箇所への導入によりタンパク質の安定化が可能であることを実証した。安定化メカニズムの検証により、この手法は本研究に用いたタンパク質に特有のものではなく広く他のタンパク質にも応用可能であることを明らかにした。

本研究では、多数箇所の置換から出発し自由な足し引きを行って最終産物へと至る改変戦略を採用した。また、安定化変異体を作成するに当たっては、構造不安定化や活性喪失を引き起こす置換を回避する必要がある。これらは従来法によっては実現されず、RFzero 株を用いることにより可能となった新たなタンパク質エンジニアリング法である。

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 6件)

Yamaguchi, A., Matsuda, T., Ohtake, K., Yanagisawa, T., Yokoyama, S., Fujiwara, Y., Watanabe, T., Hohsaka, T., Sakamoto, K., Incorporation of a Doubly Functionalized Synthetic Amino Acid into Proteins for Creating Chemical and Light-Induced Conjugates, *Bioconjugate Chemistry*, 27 (1), 198-206, **2016**, 査読あり, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00602

大竹 和正、坂本 健作、新規アミノ酸の導入によるタンパク質の安定化技術、バイオサイエンスとインダストリー、74(1)、34-36、**2016**、査読なし、http://www.jba.or.jp/pc/archive/2016/vol74_no1_1.html

Mukai, T., Yamaguchi, A., Ohtake, K., Takahashi, M., Hayashi, A., Iraha, F., Kira, S., Yanagisawa, T., Yokoyama, S., Hoshi, H., Kobayashi, T., Sakamoto, K., Reassignment of a rare sense codon to a non-canonical amino acid in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Research*, 43(16), 8111-8122, **2015**, 査読あり, doi: 10.1093/nar/gkv787

Ohtake, K., Yamaguchi, A., Mukai, T., Kashimura, H., Hirano, N., Haruki, M., Kohashi, S., Yamagishi, K., Murayama, K., Tomabechi, Y., Itagaki, T., Akasaka, R., Kawazoe, M., Takemoto, C., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Sakamoto, K., Protein stabilization utilizing a redefined codon, *Scientific Reports*, 5, 9762, **2015**, 査読あり, doi: 10.1038/srep09762

Mukai, T., Hoshi, H., Ohtake, K., Takahashi, M., Yamaguchi, A., Hayashi, A., Yokoyama, S., Sakamoto, K., Highly reproductive *Escherichia coli* cells with a blank assignment for the UAG codon, *Scientific Reports*, 5, 9699, **2015**, 査読あり, doi: 10.1038/srep09699

Ohtake, F., Saeki, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Nishikawa, H., Tsuchiya, H., Ohta, T., Tanaka, K., Kanno, J., Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation, *EMBO Reports*, 16, 192-201, 2015, 査読あり, doi: 10.15252/embr.201439152

[学会発表](計 7件)

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同時導入法の開発、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

大竹 和正、山口 純、春名 健一、坂本 健作、大腸菌コドン再定義株がもたらす新たなタンパク質工学の展開、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

大竹 和正、山口 純、春木 満、坂本 健作、部位特異的多箇所へのハロゲン化チロシン導入による新規タンパク質安定化法、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

大竹 和正、山口 純、坂本 健作、大腸菌コドン再定義が拓くタンパク質工学の新たな可能性、「細胞を創る」研究会 7.0、2014 年 11 月 13 日~14 日、東京大学弥生キャンパス(東京都・文京区)

大竹 和正、山口 純、春木 満、山岸 賢司、村山 和隆、白水 美香子、横山 茂之、坂本 健作、ハロゲン化チロシンの多箇所への部位特異的導入によるタンパク質の安定化、第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150526_2/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大竹 和正 (OHTAKE, Kazumasa)

理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤

研究センター・特別研究員

研究者番号： 8 0 5 9 3 6 3 1

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：