

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02416

研究課題名（和文）遺伝暗号の合成生物学的展開を目的とした翻訳分子の改変

研究課題名（英文）Engineering of translation molecules for synthetic biology approach on the genetic code

研究代表者

坂本 健作（Sakamoto, Kensaku）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50240685

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,800,000円

研究成果の概要（和文）：拡張遺伝暗号（遺伝暗号工学）には、非天然アミノ酸をタンパク質に導入するための技術基盤の開発と、技術の応用研究の2側面があり、本課題では双方で成果を上げることができた。拡張遺伝暗号技術の基本的なアイデアに遡って新規tRNA・aaRSペアの作製に取り組み、アイデンティティレスtRNAの開発法を見出した。遺伝暗号拡張をさらに大きく進めていく上で意義のある成果である。応用的究としては、抗体の抗原親和性を向上させる上で非天然アミノ酸の導入が役立つことを明らかにし、タンパク質工学の新しい方向性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝暗号は全ての生き物にとっての“OS（オペレーティングシステム）”と言っても過言ではなく、拡張遺伝暗号とはその遺伝暗号がバージョンアップされたものである。合成生物学とは、生体分子、微生物等における有用な新規機能を将来に涉って持続的に開発することを可能にする学問であり、本課題では、非天然アミノ酸をタンパク質に導入するための遺伝暗号技術を一層発展させるとともに、社会的ニーズに答えるための応用研究を推進した。

研究成果の概要（英文）：The field of ‘genetic code expansion’ or ‘genetic code engineering’ encompasses two directions: Technology developments for in vivo incorporation of non-natural amino acids into proteins and applications of this technology in medical and industrial spheres. The present study successfully addressed both aspects of the field. A new approach for creating ‘identityless’ tRNAs, which are of fundamental importance for expanding the code, was thus established. Another achievement was a novel method to improve the antigen-binding of antibodies, which illuminated a new direction of protein engineering based on expanded codes.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：拡張遺伝暗号 非天然アミノ酸 tRNA アミノアシルtRNA合成酵素 タンパク質合成 抗体 抗原親和性 Fab

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### 【遺伝暗号の合成生物的展開としての非天然型アミノ酸導入技術(又は拡張遺伝暗号)】

遺伝暗号には、タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸がコード化されている。これらのアミノ酸から作られるタンパク質配列の多様性は膨大なものだが、化学的官能基の種類はむしろ非常に限られている。このような天然の生物システムの限界を突破する研究領域が合成生物学であり、将来に涉って新しい生体機能・生体分子の持続的な開発を可能にするものである。遺伝暗号は「生物の OS(オペレーティングシステム)」とも言える基本的なしくみであり、非天然アミノ酸をコード化することでバージョン・アップされたものが拡張遺伝暗号である。注意深く選ばれた位置に非天然型アミノ酸を組み込むことで、タンパク質に新規の化学的性質や分子構造を賦与すること可能である。

この研究分野は、2001 年以降に生細胞(大腸菌、培養細胞、動植物個体)を使って非天然アミノ酸をタンパク質に導入することが可能になって以来大きく発展してきた。組み換えタンパク質生産への応用によって化学と生体分子工学を結び付けただけではなく、基礎生物学の研究分野にもユニークな貢献を行っている。例えば、タンパク質に光クロスリンカーを組み込んで、タンパク質間相互作用をマッピングすることができる。また、翻訳後修飾(アセチルリジンなど)を精密に部位特異的に導入することができ、修飾タンパク質の生物学的役割の解明に活用されている。産業的応用としては、抗体のエンジニアリングが有力なものである。

この研究分野の核心には「生物の遺伝暗号は改変できるか?」という学術的「問い」がある。遺伝暗号は全生物の共通祖先(LUCA)において 30 億年前に成立したとされ、それ以来基本的構造は変わっていない。遺伝暗号の解明が進んだ 1960 年代に提出された「偶然凍結説(F. H. C. Crick 博士)」は遺伝暗号の改変(コドンの再定義)の実現性を強く疑問視するものだった。私の研究室を含めた国際的な競争によって大腸菌におけるコドン再定義が実現された(2010 年以降)。今日、生物進化がダーウィンの自然淘汰から離れて人為的に進められる領域に入っていることは間違いなく、生物の在り方を考える上でも本研究分野の進展は興味深いものとなっている。

## 2. 研究の目的

遺伝暗号の改変は、翻訳分子[tRNA、アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)、ポリペプチド鎖延長因子、リボソームなど]の改変、ゲノム・エンジニアリング、宿主生物の代謝系の調整など含む複合的技術分野であるが、有用な tRNA・aaRS 分子ペアの探索・開発が最も大きなウェートを占めている。これまでに生物の遺伝暗号にコード化されてきた非天然アミノ酸の種類は 100 種類を超える膨大なものになっているが、わずか 2 種類の tRNA・aaRS ペア(tRNA・TyrRS ペアと tRNA・PylRS ペア)しか活用できておらず、遺伝暗号改変のポテンシャルが十分発揮されていない。このような制約は、tRNA・aaRS 分子間相互作用を改変する難しさ由来している。そこで本研究では、tRNA・aaRS 相互作用を改変するための基本ルールを明らかにし、遺伝暗号を一気に拡張するための新規技術の確立を目指した。

また当初の目的ではないが、拡張遺伝暗号の応用面でのポテンシャルを示すことも本研究では行った。本課題の申請以降に、抗体エンジニアリングへの非天然アミノ酸の応用がトレンドとなっており、社会的要請に答える意味もあって拡張遺伝暗号技術のこの分野への応用を試みた。

## 3. 研究の方法

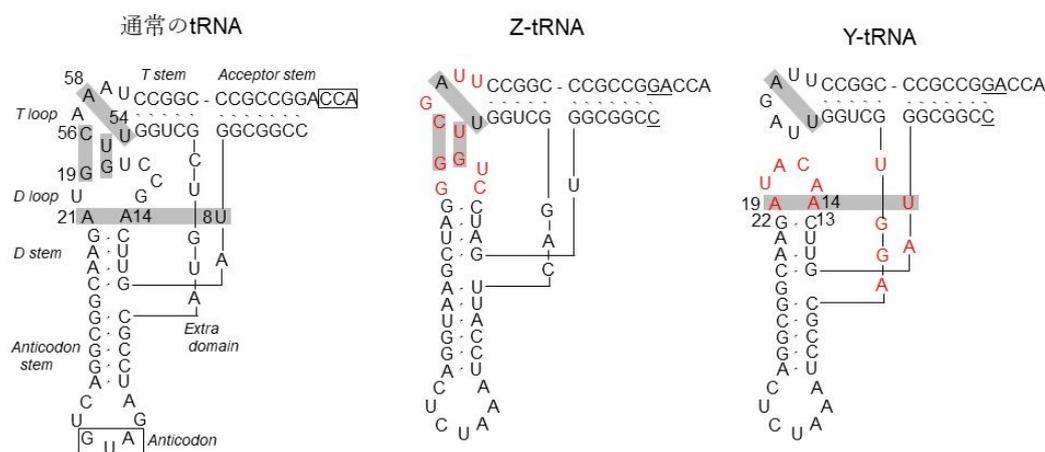
研究方法の記述に即して具体的な研究結果を合わせて記述する。研究結果の意義に関わる考察は「4. 研究成果」に記載した。

### 【tRNA の立体構造の改変に基づく「アイデンティティーレス」tRNA の開発】

「アイデンティティーレス tRNA」とは次の 2 つの条件を満たす tRNA 分子である。まず、細胞内のいずれの aaRS 分子種とも相互作用しない。よって細胞内で発現させてもアミノ酸と結合することはなく、タンパク質合成には参加できない。この条件は、aaRS 変異体を開発して tRNA を非天然アミノ酸のみと特異的に結合させるための必要条件である。tRNA のアミノ酸特異性を tRNA のアイデンティティーと呼ぶことから、アミノ酸特異性のない tRNA をアイデンティティーレスと呼んでいる。通常は「アミノ酸特異性がない(非特異的である)」とは、どのようなアミノ酸とも結合するという意味になるが、ここでは通常のアミノ酸とは結合しないという正反対の意味になっている。2 つめの条件は、立体構造が損なわれておらずインタクトであることである。tRNA はいったん非天然アミノ酸を受け取ればポリペプチド鎖延長因子やリボソーム等と相互作用してタンパク質合成に参加できる活性を保持していなければならない。この条件は、宿主細胞内の aaRS と相互作用しないという第一条件が立体構造の毀損によって満たされてしまうというケースを除くためのものである。「アイデンティティーレス tRNA」は 1990 年代に横山茂

之博士によって提唱されたコンセプトであり、遺伝暗号拡張のための中心的なコンセプトになってきた。例えば、大腸菌由来チロシン tRNA はヒト細胞の中ではアイデンティティーレスであり、この事実は動物細胞における遺伝暗号拡張に用いられた(2001年)。本課題の新しさは、tRNA の立体構造を大きく変えることがアイデンティティーレス tRNA 開発のための基本的なルールになり得ることを示したことである。

tRNA の立体構造(L字型構造)はコンパクトであり、多くの分子間相互作用のネットワークに支えられているために活性を損なわずに立体構造を変えることは困難であるとされてきた。本研究では、拡張遺伝暗号でよく利用されているピロリジン tRNA がユニークなL字型構造を持ちながら、大腸菌においても動物細胞でもタンパク質合成に参加する活性を有していることに着目した。そこで、tRNA のスタンダードな立体構造とピロリジン tRNA の構造とハイブリッド構造を多数作製し、天然にはない立体構造でありながら活性を保持している tRNA が存在することを見出した。これらのバリエーションは2つのタイプ(Y-tRNA と Z-tRNA)に分類することができ、いずれも非天然アミノ酸を高い効率でタンパク質に導入する活性を有していた。



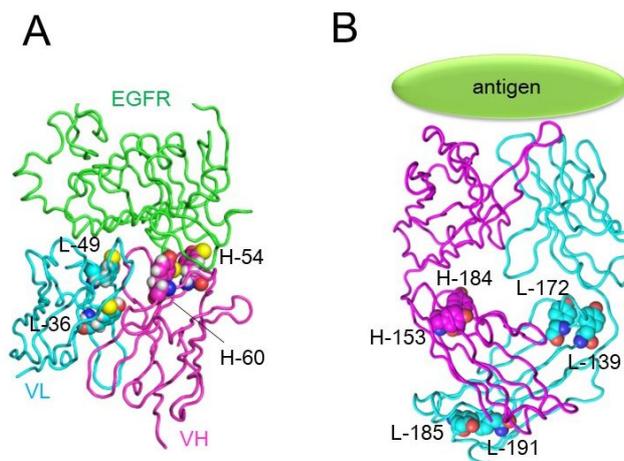
次のこれらのユニークな構造を持つ tRNA のアイデンティティーレス化を進めた。第1ステップとして、古細菌 TyrRS から認識されるヌクレオチド配列(以下、認識配列)を、Y型構造をもつ tRNA に導入し、この Y-tRNA が大腸菌内でタンパク質にチロシンを導入する活性を持っていることを確認した。そして、このようなチロシン特異的 Y-tRNA のバリエーションを20種類以上作製した。次のステップとして、古細菌 TyrRS の認識配列を大腸菌グルタミン tRNA 合成酵素(GlnRS)の認識配列にお置き換えた。この結果これらの Y-tRNA は古細菌 TyrRS からは認識されずチロシンを受け取る活性を失った。では、今度はグルタミンを受け取る活性を発現したかということ、多くの Y-tRNA バリエーションはグルタミンを受け取る活性が低下しており、いくつかのバリエーションはアイデンティティーレス化していることがわかった。これらのアイデンティティーレス Y-tRNA は GlnRS の認識配列を持っていながら、全くグルタミンを受け取る活性を失っている。ここで注意したいことは、古細菌 TyrRS からは効率よく認識されていたことから、これらのアイデンティティーレス tRNA の立体構造は毀損しておらず、インタクトであるという第2条件が満たされていることである。ユニークな立体構造上に配置された認識配列は GlnRS からは認識されにくくなっており、そのため Y-tRNA にアミノ酸を結合しなくなったと考えられる。このように立体構造の改変を活用したことで、アイデンティティーレス tRNA をシステムティックに何種類でも作製することが可能になり、遺伝暗号拡張のための基本的な技術開発を進めるといふ研究目的は達成することができた。

当然次のステップは、アイデンティティーレス化した Y-tRNA を効率よく認識する GlnRS の変異体を見出すことである。Y-tRNA・GlnRS 変異体のペアは、細胞内のグルタミン tRNA・野生型 GlnRS のペアとは交差反応しない新規 tRNA・aaRS ペアになる可能性がある。さらに GlnRS 変異体のアミノ酸特異性を非天然アミノ酸に特異的なものに改変することで、非天然アミノ酸特異的な新規 tRNA・aaRS ペアを創り出すことができると考えられる。Y-tRNA を効率よく認識できる GlnRS 変異体を作製するために、GlnRS のアンチコドン結合ドメインを含めた様々な部位にランダムにアミノ酸置換を導入した。最終的に10か所以上のアミノ酸残基を改変することで Y-tRNA を認識する GlnRS 変異体が見出された。しかし、この GlnRS 変異体が細胞内のグルタミン tRNA を認識しないという確証を得るところまでは研究を進めることができなかった。つまり、得られた GlnRS 変異体は Y-tRNA を認識するが、排他的な特異性は確認できていない。また、非天然アミノ酸としてメチルグルタミンを認識する GlnRS 変異体の取得を試みたが成果が得られなかった。

### 【ハロゲン化チロシンの導入による抗体の抗原結合能の向上】

非天然アミノ酸をタンパク質に導入することで、タンパク質には存在しないアジド基のような官能基を入れることもできる。アジド基に特異的なケミストリーを用いれば部位特異的の化学修飾も実現できる。このように非天然アミノ酸の利用法には明白なメリットがあるが、前提条件としてタンパク質の全体構造や本来の性質は変えていない。一方、非天然アミノ酸を導入してタンパク質の元の構造や機能を改変しようとするとき、非天然アミノ酸はタンパク質構造の構成要素として働くことになり、タンパク質の機能構造を「内側から可変する」ことになる。しかし、このような非天然アミノ酸の効果はこれまであまり研究が進んでいなかった。われわれはハロゲン化チロシンを酵素内の数か所に同時に導入することで構造安定性が増し、熱耐性が向上することを明らかにしていた（2015年）。本課題では、このようなアプローチはタンパク質間相互作用の強化にも応用できると考え、抗体のタンパク質性抗原に対する親和性の改善を試みた。抗EGF受容体抗体、及びリツキシマブのFab断片を題材に、1つのFabあたり最大4か所に同時にクロロチロシンを導入したところ最大で17倍の親和性の向上が認められた。改善メカニ

ズムとしては、1つには抗体・抗原の間の隙間をハロゲン原子が埋めることでShape Complementarityが向上する（つまり、相互作用面が隙間なくフィットする）ことの効果があった（図A；クロロチロシンに置換された残基をスペース・フィリング表記で示す）。もう1つのメカニズムは、興味深いことに相互作用面から遠いドメインへのクロロチロシンの導入による効果であり（図B；クロロチロシンへの置換を試みた残基をスペース・フィリング表記で示す）、当該ドメインの構造安定化の効果だと考えているが、将来的な検証が必要である。



## 4. 研究成果

拡張遺伝暗号 (Expanded Genetic Codes 又は Genetic Code Expansion) と呼ばれている研究領域は、端的には「遺伝暗号工学 (エンジニアリング)」を指している。遺伝暗号が改変可能であることを明白に最終的に示した成果が「コドン再定義」であり、2010年以降に複数の研究グループから報告されている。遺伝暗号工学は、無細胞や生細胞を使って非天然型アミノ酸をタンパク質に導入する技術であり、技術を利用する応用研究も広い意味ではこの研究領域の一部である。本研究では遺伝暗号工学の両方の面で成果を上げることができた。これまでに技術基盤の開発を進めてきた研究室は国内外でも少数であり、これらの成果を利用して研究を行っているグループの方が遥かに多い。コドン再定義では、例えば、終止コドンであるUAGコドンをゲノムから完全に除去すれば、このコドンを非天然アミノ酸を指定するコドンとして空けておくことができる。非天然アミノ酸に特異的な tRNA・aaRS ペアを導入すれば、このコドンは生体内で非天然アミノ酸のコドンとして再定義される。これまでに、UAGコドン以外にも複数のコドンがゲノムから除去された大腸菌が創られている。現在の課題は、このようにして「空けられたコドン」を再定義するには同じ数の新規 tRNA・aaRS ペアが必要になることである。この問題は未だ解決されておらず、遺伝暗号工学のポテンシャルは十全に引き出せていない。本研究では、拡張遺伝暗号技術の開発当初 (2000年代初め) の基本的なアイデアに遡って新規 tRNA・aaRS ペアの作製に取り組み、アイデンティティレス tRNA の開発法を見出した。今後の遺伝暗号拡張を大きく進めていくための意義のある成果である。

一方の応用的研究として、抗体の抗原親和性を向上させることに非天然アミノ酸導入が役立つことを示した。ここで導入されたクロロチロシンは、ハロゲン原子の化学的性質をタンパク質に賦与するためのものではなく、タンパク質の構成要素としてその機能や構造安定性に寄与する働きをしている。このアプローチは非天然アミノ酸の応用として新しい方向性を含んでいるが、その効果を見出すにはヒューリスティックな方法に頼ることになる。私の他の研究プロジェクトでは、非天然アミノ酸を導入した抗体の性質や構造を計算科学的に予測することを行っており、非天然アミノ酸含有タンパク質の開発をロジカルにシステムティックに行うことを目指している。本課題の成果はこの方向性の推進に大きく寄与すると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計23件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aditya K Padhi, Ashutosh Kumar, Ken-ichi Haruna, Haruna Sato, Hiroko Tamura, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Atushi Yamaguchi, Fumie Iraha, Mihoko Takahashi, Kensaku Sakamoto, Kam Y J Zhang	4. 巻 22
2. 論文標題 An integrated computational pipeline for designing high-affinity nanobodies with expanded genetic codes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Briefings in Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bib/bbab338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 坂本健作	4. 巻 93
2. 論文標題 生細胞における遺伝暗号の改変と応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Jpn. Biochem. Soc.	6. 最初と最後の頁 291-297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930291	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hidetoshi Teramoto, Yoshimi Amano, Fumie Iraha, Katsura Kojima, Takuhiro Ito, Kensaku Sakamoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Genetic code expansion of the silkworm Bombyx mori to functionalize silk fiber	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 801-806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.7b00437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Handoko, L., Kaczkowski, B., Hon, C.C., Lizio, M., Wakamori, M., Matsuda, T., Ito, T., Jeyamohan, P., Sato, Y., Sakamoto, K., Yokoyama, S., Kimura, H., Minoda, A., Umehara, T	4. 巻 13
2. 論文標題 JQ1 affects BRD2-dependent and independent transcription regulation without disrupting H4-hyperacetylated chromatin states	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Epigenetics	6. 最初と最後の頁 410-431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592294.2018.1469891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazumasa Ohtake, Takahito Mukai, Fumie Iraha, Mihoko Takahashi, Ken-ichi Haruna, Masayo Date, Keiichi Yokoyama, Kensaku Sakamoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Engineering an automaturing transglutaminase with enhanced thermostability by genetic code expansion with two codon reassignments	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 2170-2176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.8b00157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mihoko Takahashi, Kensaku Sakamoto	4. 巻 505
2. 論文標題 Engineering of Escherichia coli -lactamase TEM-1 variants showing higher activity under acidic conditions than at the neutral pH	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 333-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuya Osamura, Mitsuyoshi Okuda, Atsushi Yamaguchi, Kazumasa Ohtake, Kensaku Sakamoto, Yasushi Takimura	4. 巻 17
2. 論文標題 Variants of the industrially relevant protease KP-43 with suppressed activity under alkaline conditions developed using expanded genetic codes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BB Reports	6. 最初と最後の頁 93-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加藤明文、白石泰久、横山茂之、坂本健作	4. 巻 76
2. 論文標題 人工アミノ酸技術の抗体工学への応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 310-312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋井則貴, 坂本健作, 多田稔, 中木戸誠, 木吉真人, 柴田寛子, 鈴木琢雄, 青山道彦, 藤田理恵, 津本浩平, 石井明子	4. 巻 51
2. 論文標題 低分子抗体医薬品の品質安全性確保における留意事項	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 194-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eiko Seki, Tatsuo Yanagisawa, Mitsuo Kuratani, Kensaku Sakamoto, and Shigeyuki Yokoyama	4. 巻 9
2. 論文標題 Fully productive cell-free genetic code expansion with structure-based engineering of pyrrolysyl-tRNA synthetase from Methanomethylophilus alvus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 718-732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.9b00288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuta Ikami, Kazue Terasawa, Kensaku Sakamoto, Kazumasa Ohtake, Hiroyuki Harada Tetsuro Watabe, Shigeyuki Yokoyama, Miki Hara-Yokoyam	4. 巻 411
2. 論文標題 The two domain architecture of LAMP2A regulates its interaction with Hsc70	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aditya K Padhi, Ashutosh Kumar, Ken-ichi Haruna, Haruna Sato, Hiroko Tamura, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Atushi Yamaguchi, Fumie Iraha, Mihoko Takahashi, Kensaku Sakamoto, Kam Y J Zhang	4. 巻 22
2. 論文標題 An integrated computational pipeline for designing high-affinity nanobodies with expanded genetic codes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Briefings in Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 bbab338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bib/bbab338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坂本健作	4. 巻 93
2. 論文標題 生細胞における遺伝暗号の改変と応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 291-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terasawa, K., Y. Kato, Y. Ikami, K. Sakamoto, K. Ohtake, S. Kusano, Y. Tomabechi, M. Kukimoto-Niino, M. Shirouzu, J. Guan, T. Kobayashi, T. Iwata, T. Watabe, S. Yokoyama, M. Hara-Yokoyama	4. 巻 17
2. 論文標題 Direct homophilic interaction of LAMP-2A with the two-domain architecture revealed by site-directed photo-crosslinks and steric hindrances in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 4286-4304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2021.1911017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akifumi Kato, Kazumasa Ohtake, Yoshitaka Tanaka, Shigeyuki Yokoyama, Kensaku Sakamoto, Yasuhisa Shiraishi	4. 巻 546
2. 論文標題 An expanded genetic code facilitates antibody chemical conjugation involving the lambda light chain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Hayashi Dr. Ken ichi Haruna Haruna Sato Dr. Kenichiro Ito Dr. Chisato Makino Dr. Takuhiro Ito Dr. Kensaku Sakamoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Incorporation of Halogenated Amino Acids into Antibody Fragments at Multiple Specific Sites Enhances Antigen Binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 120-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terasawa, K., Y. Kato, Y. Ikami, K. Sakamoto, K. Ohtake, S. Kusano, Y. Tomabechi, M. Kukimoto-Niino, M. Shirouzu, J. Guan, T. Kobayashi, T. Iwata, T. Watabe, S. Yokoyama, and M. Hara-Yokoyama	4. 巻 Ahead of publication
2. 論文標題 Direct homophilic interaction of LAMP-2A with the two-domain architecture revealed by site-directed photo-crosslinks and steric hindrances in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 A of P
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2021.1911017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akifumi Kato, Kazumasa Ohtake, Yoshitaka Tanaka, Shigeyuki Yokoyama, Kensaku Sakamoto, Yasuhisa Shiraishi	4. 巻 546
2. 論文標題 An expanded genetic code facilitates antibody chemical conjugation involving the lambda light chain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Hayashi, Ken ichi Haruna, Haruna Sato, Kenichiro Ito, Chisato Makino, Takuhiro Ito, Kensaku Sakamoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Incorporation of Halogenated Amino Acids into Antibody Fragments at Multiple Specific Sites Enhances Antigen Binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem.	6. 最初と最後の頁 120-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuo Yanagisawa, Mitsuo Kuratani, Eiko Seki, Nobumasa Hino, Kensaku Sakamoto, Shigeyuki Yokoyama	4. 巻 26
2. 論文標題 Structural basis for genetic-code expansion with bulky lysine derivatives by an engineered pyrrolysyl-tRNA synthetase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 936-949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.03.00	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Sakamoto, A. Hayashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Synthetic tyrosine tRNA molecules with noncanonical secondary structures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20010092	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 J. Adachi, K. Katsura, E. Seki, C. Takemoto, M. Shirouzu, T. Terada, T. Mukai, K. Sakamoto, S. Yokoyama	4. 巻 20
2. 論文標題 Cell-free protein synthesis using S30 extracts from Escherichia coli RFzero strains for efficient incorporation of non-natural amino acids into proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20030492	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Yamaguchi, F. Iraha, K. Ohtake, K. Sakamoto	4. 巻 23
2. 論文標題 Pyrrolysyl-tRNA synthetase with a unique architecture enhances the availability of lysine derivatives in synthetic genetic codes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23102460	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本健作
2. 発表標題 遺伝暗号改変が拓くタンパク質工学
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁欽、藁科翔太、毛利浩太、高橋麻衣子、金山洋介、高橋美穂子、林明子、林中恵美、和田康弘、渡辺恭良、坂本健作、向井英史
2. 発表標題 非天然型アミノ酸含有抗体発現生産技術と生体直交反応性キレーター修飾の組み合わせによる高均一な64Cu標識トラスツズマブFabの作製
3. 学会等名 日本分子イメージング学会第14回学術総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本健作、林明子、山口純、柳沢達男、田村浩子、長門石暁、津本浩平、藏地理代、金山洋介、渡辺恭良
2. 発表標題 Xeno-protein engineeringの抗体開発への応用
3. 学会等名 第14回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本健作
2. 発表標題 人工遺伝暗号技術の抗体医薬への応用
3. 学会等名 理研シンポジウム「理研エンジニアリングネットワーク/精密武装抗体の合成と機能評価」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本健作
2. 発表標題 改変型抗体の作製のための技術基盤
3. 学会等名 兵庫県立こども病院 - 理研BDR第4回ジョイントシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本健作
2. 発表標題 ゼノバイオロジーを目指すタンパク質工学
3. 学会等名 日本薬学会第140年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野理沙、高橋美穂子、坂本健作、田中克典
2. 発表標題 糖鎖クラスターを利用した臓器選択的な酵素触媒反応
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akifumi Kato, Munetake Shimabe, Jun Taneo, Minako Oogi, Shigeyuki Yokoyama, Kensaku Sakamoto, Yasuhisa Shiraishi,
2. 発表標題 Modulation of Receptor Signaling Using Variabody; A Novel Bispecific Antibody Format Enables One-pot Synthesis of Fab-dimer Library
3. 学会等名 PEGS Boston 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidetoshi Teramoto, Yoshimi Amano, Fumie Iraha, Minoru Shirakawa, Katsura Kojima, Takuhiro Ito, Yasushi Tamada, Kensaku Sakamoto
2. 発表標題 Genetic code expansion of the silkworm <i>Bombyx mori</i> to enhance the utility of silk for biomedical applications
3. 学会等名 2018 Genetic Code Expansion Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本健作、林明子
2. 発表標題 ピロリジンtRNAの非正規構造を有するチロシンtRNAバリエーションの作製
3. 学会等名 第13回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhisa Shiraishi, Akifumi Kato, Kaname Kimura, Shigeyuki Yokoyama, Kensaku Sakamoto
2. 発表標題 Variabody: A Novel Bispecific Antibody Format Enables One-pot Synthesis of Wide Variety of Fab-dimer Library for Agonist Screening
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhisa Shiraishi, Akifumi Kato, Munetake Shimabe, Jun Taneo, Minako Oogi, Kaname Kimura, Shigeyuki Yokoyama, Kensaku Sakamoto
2. 発表標題 Modulating Receptor Signaling using Variabody; A Novel Bispecific Antibody Format Enables One-pot Synthesis of Fab-dimer Library
3. 学会等名 33rd Annual Symposium of the Protein Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋美穂子、坂本健作
2. 発表標題 Xeno-tRNAの作製と特異的アミノアシルtRNA合成酵素の開発
3. 学会等名 第14回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木吉真人、柴田寛子、橋井則貴、林明子、坂本健作、津本浩平、石井明子
2. 発表標題 長期安定性予測を指向したPEG化、薬物修飾Trastuzumab Fabの安定性評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋井則貴、坂本 健作、林明子、東阪嘉子、鈴木琢雄、岩崎紀之、石井明子
2. 発表標題 非天然型アミノ酸導入Fab抗体の構造特性評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ピロリシルtRNA合成酵素	発明者 坂本健作、山口純、 木村史枝、柳沢達 男、横山茂之、関英	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-163967	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 - ラクタマーゼ変異体	発明者 坂本健作、高橋美穂 子	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-16455	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	伊藤 拓宏  (ITO TAKUHIRO)  (70401164)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー   (82401)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------