

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658019

研究課題名（和文） カイコ蛋白質合成システムにおける非天然アミノ酸許容性の解明とその人為的拡張

研究課題名（英文） Expansion of the amino acid repertoire in protein biosynthesis of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*

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

研究成果の概要（和文）：

カイコ (*Bombyx mori*) 由来のフェニルアラニル-tRNA 合成酵素 (PheRS) のアミノ酸結合ポケットに点変異を導入し、基質アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe) に構造が類似したアナログ分子 (非天然アミノ酸) を認識できるカイコ PheRS 変異体を作成した。それら PheRS 変異体の *in vitro* でのアナログ分子認識能を明らかにするとともに、それらを発現させたカイコ培養細胞においてアナログ分子の一つである Cl-Phe がタンパク質合成に取り込まれることを明らかにした。また、カイコ由来メチオニル-tRNA 合成酵素 (MetRS) 遺伝子をクローニングしてその全長 cDNA 配列を解明するとともに、PheRS と同様にアミノ酸結合ポケットに点変異を導入した MetRS 変異体を作成し、それらの *in vitro* でのアナログ分子認識能を解析した。

研究成果の概要（英文）：

Mutants of phenylalanyl-tRNA synthetase derived from the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, recognizing phenylalanine (Phe) analogues (unnatural amino acids) as a substrate were generated by introducing point mutations into its amino acid binding pocket. The recognition capacity of the mutants toward several Phe analogues was elucidated *in vitro*, and the incorporation of Cl-Phe, one of Phe analogues, into protein biosynthesis in the cultured cells of *B. mori* overexpressing a PheRS mutant was verified. Moreover, a gene encoding methionyl-tRNA synthetase (MetRS) was cloned from *B. mori* and its complete cDNA sequence was clarified, and the recognition capacity of its mutants, generated by point mutation strategy similar to PheRS, toward methionine (Met) analogues was investigated *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	210,000	2,910,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫, カイコ, 蛋白質, 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

タンパク質工学の分野では、遺伝暗号としてコードされる20種のアミノ酸の枠を超え、天然にはない化学構造を有するアミノ酸（非天然アミノ酸）をタンパク質に導入する手法が確立されつつある。本手法は、自然界にはない新規な機能をもつタンパク質の作出を可能にすることから、タンパク質を用いた医薬品開発や材料開発に多大なインパクトを与える可能性を秘めている。

研究代表者は、カイコ (*Bombyx mori*) が産生するシルクタンパク質の物理的・化学的加工により、安全性が高く医療用途に利用可能な材料の開発を進めてきた。シルク材料の研究では、我が国で確立された遺伝子組換え (GM) カイコ技術による改変シルクタンパク質の生産とその産業応用に注目が集まっている。研究代表者は、カイコの GM 技術と非天然アミノ酸の導入手法とを組み合わせることで、改変シルクタンパク質を生産するための強力な手法が開発できる考え、本研究を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、カイコタンパク質翻訳機構の改変により非天然アミノ酸を含有するシルクタンパク質を創製し、医療用や産業用の素材として活用することにある。そのために本研究では、カイコタンパク質翻訳機構を改変するための一つの手法として、大腸菌等の生物種で報告されているアミノアシル-tRNA 合成酵素 (AARS) のアミノ酸認識能を拡張する手法に着目し、そのカイコへの適用可能性を検討した。具体的には、以下2点の達成を主な目的として研究を実施した。

(1) カイコ由来の AARS であるフェニルアラニル-tRNA 合成酵素 (PheRS) およびメチオニル-tRNA 合成酵素 (MetRS) のアミノ酸結合ポケットを改変し、各々の基質アミノ酸 (フェニルアラニン (Phe) およびメチオニン (Met)) に構造が類似したアナログ分子 (非天然アミノ酸) を認識できるような変異体を作出する。

(2) 作出した AARS 変異体をカイコ培養細胞で過剰発現させることにより、タンパク質合成にアナログ分子 (非天然アミノ酸) が導入されるかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

大腸菌等の他生物種由来 AARS において認識アミノ酸の拡張が報告されている変異導入部位に対応するカイコ由来 AARS のアミノ酸残基を配列比較により同定した。変異体候補として PheRS および MetRS それぞれ数種

類ずつ設計し、それらをコードする遺伝子を部位特異的変異導入法により作製した。各 AARS 変異体を大腸菌でリコンビナント発現させ、それらのアナログ分子認識能を *in vitro* で解析した。*In vitro* 解析においてアナログ分子の認識が確認できた変異体を卵巣由来カイコ培養細胞 (BmN) で過剰発現させ、アナログ分子を含む培地中で培養した。その際、解析が容易なレポータータンパク質として緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を同時に発現させた。細胞破碎液から単離・精製した EGFP をトリプシン消化し、生じたペプチド断片の精密質量分析 (MALDI-TOF-MS) により、タンパク質中へのアナログ分子の取り込み有無を解析した。

## 4. 研究成果

(1) カイコ由来メチオニル-tRNA 合成酵素 (MetRS) 遺伝子のクローニングと完全長 cDNA 配列解析

カイコゲノムデータベースから推定したカイコ MetRS 遺伝子配列より設計したプライマーを用い、カイコ絹糸腺由来トータル RNA から RT-PCR 法によりカイコ MetRS 遺伝子を増幅し、その塩基配列を決定した。また、5' および 3' RACE 解析によりカイコ MetRS の全長 cDNA 配列を明らかにした。

(2) カイコ MetRS 変異体遺伝子の作出

クローニングしたカイコ MetRS のアミノ酸配列を大腸菌 MetRS と比較し、認識アミノ酸を拡張するための変異導入部位を決定した (図1)。MetRS 変異体として1アミノ酸変異体2種 (L264G, L264A) をそれぞれコードする遺伝子を部位特異的変異導入法により作製した。

**Ec 9 LVTCALPYANG 19**  
**Bm 259 LITSALPYVNN 269**

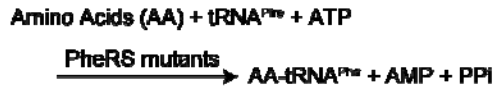
図1. 大腸菌 (Ec) およびカイコ (Bm) MetRS の配列比較

(3) フェニルアラニル-tRNA 合成酵素 (PheRS) 変異体の *in vitro* 非天然アミノ酸認識アッセイ

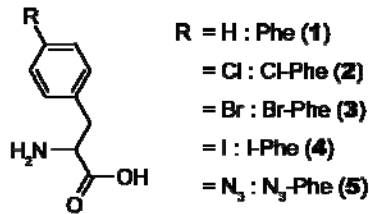
野生型および3種の点変異 (T407A, T407G, A450G) を導入したカイコ PheRS 変異体を大腸菌でリコンビナント発現させ、6×His タグによるアフィニティ精製を行った。調製した組換え酵素の *in vitro* におけるアミノアシル化活性を、尿素含有酸性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (acid-urea-PAGE) を用いる

定性評価法によりアッセイした。その結果、導入した点変異の種類によってパラ位に置換基を有する Phe アナログ分子の認識様式が変化することを見出した (図 2)。

(A)



(B)



(C)

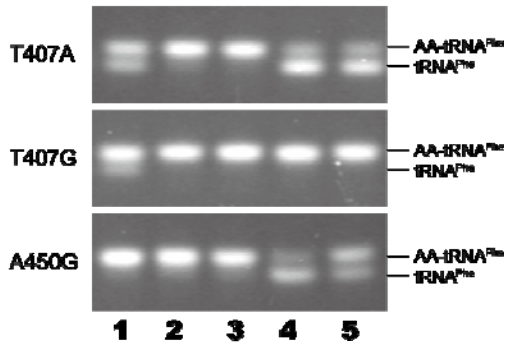


図 2. (A) *In vitro* アミノアシル化反応式  
 (B) アッセイに用いた Phe アナログ分子  
 (C) 各カイコ PheRS 変異体の Phe アナログ分子に対するアミノアシル化活性 Acid-urea-PAGE 解析

(4) MetRS 変異体の *in vitro* 非天然アミノ酸認識アッセイ

野生型カイコ MetRS を大腸菌でリコンビナント発現させそのアミノアシル化活性を *in vitro* でアッセイしたところ、Met に対する活性を有することを確認した。次いで、2 種類のカイコ MetRS 変異体 (L264G, L264A) を同様にリコンビナント発現させ、Met およびそのアナログ分子に対するアミノアシル化活性を *in vitro* でアッセイした。その結果、2 種の MetRS 変異体双方とも Met およびそのアナログ分子いずれに対する活性も示さないことが分かった。このことは、大腸菌 MetRS では認識アミノ酸の拡張に効果があった変異導入が、カイコ MetRS では酵素活性の失活を引き起こすことを示唆している。現在、他の変異体遺伝子を作製しそのアミノアシル化活性を解析する準備を進めている。

(5) PheRS 変異体を過剰発現するカイコ培養細胞におけるタンパク質へのアナログ分子取り込み解析

カイコ PheRS の A450G 変異体をカイコ培養細胞 (BmN) で過剰発現させ、1 mM の Cl-Phe を含む培地中で 9 日間培養した。その際、レポータータンパク質として EGFP を同時に発現させた。その後細胞を破碎し、アフィニティタグにより EGFP を精製した。得られた細胞数当たりの EGFP 量は、カイコ PheRS 変異体を発現させ Cl-Phe 存在下に培養した BmN 細胞において顕著に低下した (図 3; 条件 D)。

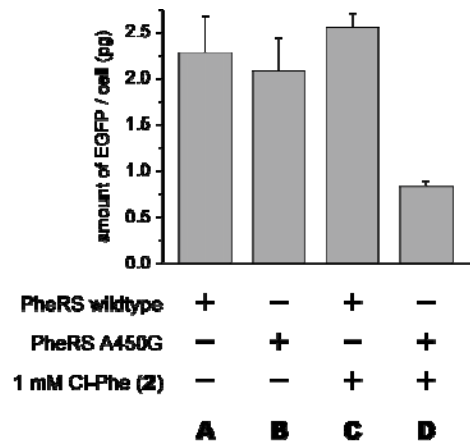


図 3. 各種条件で培養した BmN 細胞から精製した EGFP の細胞数当たり重量

精製した EGFP をトリプシンで消化し、そのペプチド断片の質量を MALDI-TOF-MS により解析した。その結果、条件 D で得られた EGFP では、Phe を含む数種のペプチド断片において Cl 基の付加に対応する 34 Da の質量増加ピークが観察された (図 4)。このことから、条件 D においては Cl-Phe がタンパク質中に取り込まれることが強く示唆された。

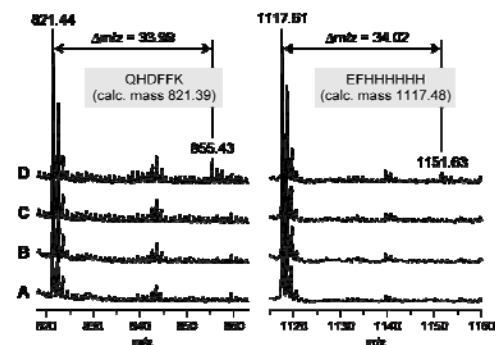


図 4. トリプシン消化した EGFP 断片ペプチドの MALDI-TOF-MS 解析 Phe を含む代表的なペプチド断片について示す。A~D は図 3 の各条件で得られた試料であることを示す。(次頁へ続く)

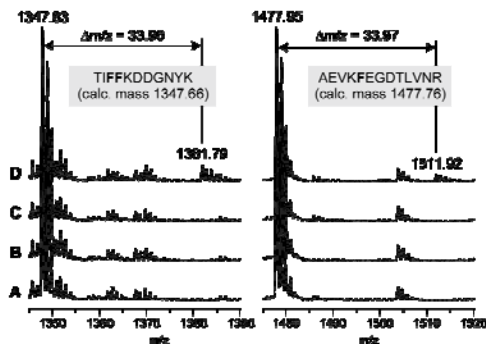


図4. (前頁からの続き)

さらに 34 Da の質量増加が見られた断片 (TIFFKDDGNYK) についてタンデム MS 解析を行ったところ、Phe の代わりに Cl-Phe がペプチド配列中に導入されていることを確認した (図5)。なお、Cl-Phe の導入率は MS ピークからの概算ではおよそ 5%であった。

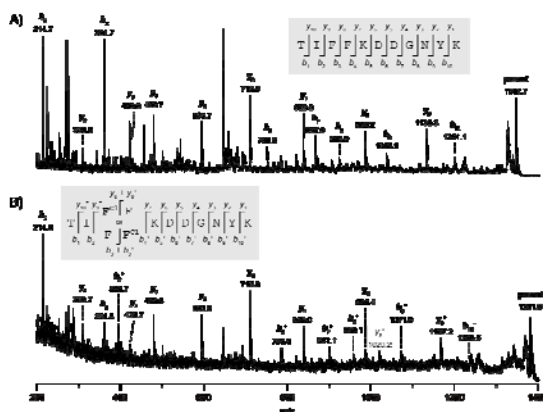


図5. ペプチド断片 (TIFFKDDGNYK) のタンデム MS 解析

- (A) Cl-Phe を含まないピークの解析結果  
(B) Cl-Phe を含むピークの解析結果

一方、*in vitro* アッセイにおいて A450G 変異体による認識活性が見られた Br-Phe を用いて同様の実験を行ったところ、タンパク質への取り込みは確認されなかった。これは、Cl-Phe と Br-Phe に対する酵素活性の差に起因すると推察している。現在、他の変異体酵素とアナログ分子との組み合わせについて同様の検討を進めている。

## 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 1 件)

- ① Teramoto H, Kojima K, Kajiwara H, Ishibashi J (2012) Expansion of the amino acid repertoire in protein biosynthesis in silkworm cells. *ChemBioChem* 13(1):61-65

[学会発表] (計 4 件)

- ① Teramoto H, Kojima K (2010) Generation of a *Bombyx mori* phenylalanyl-tRNA synthetase mutant with relaxed amino acid specificity. *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*
- ② 寺本英敏, 小島柱 (2011) 非天然アミノ酸をタンパク質合成系へ取り込むカイコ培養細胞の作出. 平成 23 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 p.72
- ③ 寺本英敏, 小島桂 (2011) 非天然アミノ酸をタンパク質合成系に取り込むカイコ培養細胞の作出. 第 60 回高分子討論会 60(2):4933
- ④ 寺本英敏, 小島桂, 梶原英之, 石橋純 (2012) カイコのタンパク質合成におけるアミノ酸レパートリーの拡張. 平成 24 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 p.56

[その他]

ホームページ等

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

## 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・遺伝子組換え研究センター新機能素材研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：60391562