

## 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25年 6月 3日現在

機関番号：13302

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20107005

研究課題名（和文） 非天然アミノ酸の部位特異的導入技術を用いたタンパク質の揺らぎ解析

研究課題名（英文） Analysis of protein fluctuation by introducing nonnatural amino acids

研究代表者

芳坂 貴弘 (HOHSAKA TAKAHIRO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号：30263619

研究成果の概要（和文）：本研究では、非天然アミノ酸導入技術を用いることで、天然および非天然アミノ酸への置換の影響を効率的・系統的に調べることでできる手法の開発や、蛍光標識非天然アミノ酸を導入してタンパク質の構造や機能を蛍光変化や蛍光共鳴エネルギー移動を用いて解析できる手法の開発などを行なった。また得られたタンパク質を診断薬などへ応用し、そのための非天然アミノ酸導入タンパク質の大量合成技術の開発も行なった。

研究成果の概要（英文）：In this study, an improved method for saturation mutagenesis allowing the substitution with natural and nonnatural amino acids to investigate the effect of the mutagenesis on proteins was developed. In addition, we developed a method for structural and functional protein analysis by introducing fluorescent nonnatural amino acids. Practical application of nonnatural amino acid-containing proteins as analytical tools and large-scale production of nonnatural proteins were also investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,300,000	3,990,000	17,290,000
2009年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2010年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2011年度	19,300,000	5,790,000	25,090,000
2012年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
総計	71,600,000	21,480,000	93,080,000

研究分野：生体関連化学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：蛋白質、生物物理、バイオテクノロジー、非天然アミノ酸、蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動、部位特異的変異導入

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、通常の3塩基からなるコドンに4塩基へ拡張することで、非天然アミノ酸をタンパク質へ部位特異的かつ効率的に導入できる手法を世界に先駆けて独自に開発してきた。研究代表者はまた、翻訳系に取り込まれる蛍光標識非天然アミノ酸を設計・合成し、タンパク質へ部位特

異的に導入することに成功し、さらに2種類の4塩基コドンと同時に使用して、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の供与体と受容体となる2種類の蛍光標識アミノ酸をタンパク質の特定の2ヶ所へ導入することで、タンパク質の構造変化をFRETの変化として検出することも可能にしている。例えばカルモジュリンの特定の2ヶ所に蛍光色素としてBODIPYFL

およびBODIPY558で標識された非天然アミノ酸を導入することで、基質ペプチドの結合によるタンパク質の立体構造変化をFRET変化として計測できることを実証した。

一方、タンパク質のアミノ酸配列は、その立体構造を決定するのと同様に揺らぎを制御していると考えられており、アミノ酸の置換や挿入は揺らぎ研究において有効な研究手段である。しかし、従来の研究では使用できるアミノ酸は天然の20種類に限られていたために、精密な揺らぎ制御は困難であった。そこで、上記の非天然アミノ酸導入技術を利用して、アミノ酸側鎖の構造を1原子単位で挿入あるいは欠損させることなどで、精密な揺らぎ制御が可能になると着想した。

また、蛍光標識アミノ酸の導入およびFRETを用いたタンパク質の解析手法は、X線結晶構造解析やNMR解析では困難な、様々な環境下での構造揺らぎを研究する手段としても非常に有用であり、さらに一分子蛍光測定法と組み合わせることで、個々の分子の揺らぎの特徴を捉えることができると期待された。

## 2. 研究の目的

以上のような背景の下、本研究では、4塩基コドンを用いた非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入技術を用いて、20種類の天然アミノ酸に加えて、天然アミノ酸に類似した構造を持つ多種多様な非天然アミノ酸のタンパク質への導入系を確立し、揺らぎに対するアミノ酸置換の影響を系統的に制御できるシステムを開発する。また、2種類の蛍光標識アミノ酸をタンパク質の特定部位へ導入する手法を用いて、タンパク質の構造揺らぎを蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いて計測することを試みる。これらの非天然アミノ酸導入タンパク質を、領域内研究者の物理化学的手法と組み合わせることで、タンパク質の構造揺らぎと機能との関係を明らかにすることを目指す。さらに、得られた蛍光標識タンパク質について、診断薬などへの応用も検討する。加えて、実用応用上の課題となる非天然アミノ酸導入タンパク質の大量発現法についての検討も行なう。

## 3. 研究の方法

非天然アミノ酸のタンパク質の導入は、研究代表者らが開発した4塩基コドンおよびアンバーコドンを用いて行なった。これは、まずtRNAの3'末端に相当するジヌクレオチド(pdCpA)を化学合成して、非天然アミノ酸で化学的にアミノアシル化しておく。一方、3'末端のジヌクレオチドを欠損させた4塩基コドン用あるいはアンバーコドン用のtRNAをRNAポリメラーゼにより転写して合成し、RNA連結酵素を用いてアミノアシル化ジヌクレ

オチドと連結することで、非天然アミノ酸でアミノアシル化されたtRNAを合成する。一方、発現遺伝子の非天然アミノ酸導入部位を4塩基コドンあるいはアンバーコドンに置換しておき、そのmRNAを作製する。得られた非天然アミノ酸-tRNAとmRNAを大腸菌由来無細胞翻訳系に加えることで、非天然アミノ酸導入タンパク質を合成する。ここで、4塩基コドンが非天然アミノ酸に翻訳された場合は完全長タンパク質が得られるが、3塩基のコドンとして翻訳された場合は読み枠がずれて下流の終止コドンによりタンパク質合成は途中で停止する。また、アンバーコドンを用いた場合も、非天然アミノ酸が導入された場合のみ、翻訳が継続して完全長タンパク質が得られる。そこで、タンパク質のC末端にヒスチジンタグを付加しておくことで、Niビーズを用いて完全長の非天然アミノ酸導入タンパク質を分離精製することができる。このようにして得られたタンパク質について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動とその蛍光イメージ測定あるいはウエスタンブロット分析を行ない、タンパク質の合成および精製を確認した。このようにして得られた非天然アミノ酸導入タンパク質を用いて、蛍光測定などの各種測定を行なった。

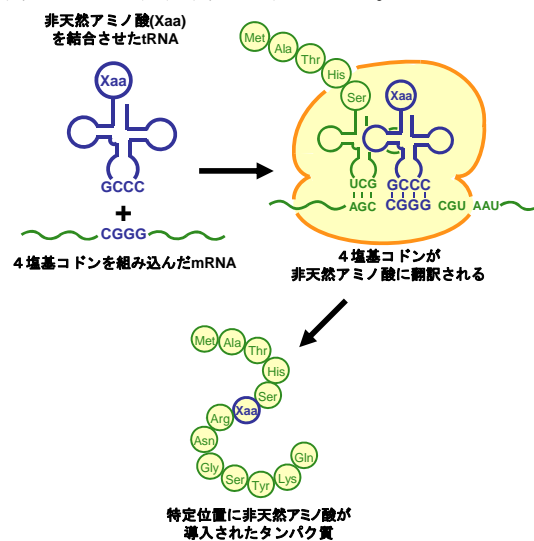


図1. 非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入

## 4. 研究成果

### (1) タンパク質の網羅的アミノ酸変異法の開発

タンパク質への変異導入は、タンパク質の構造機能解析や揺らぎの解析などに有用であるが、1つのアミノ酸変異体を作製するためには、1つの変異遺伝子を作製する必要があり、多種類のアミノ酸変異タンパク質を作製するのは大変手間と時間が必要となる。また、置換できるアミノ酸は20種類の天然アミノ酸に限られており、アミノ酸側鎖の構造

を自在に変更できるわけではない。そこで本研究では、20種類のアミノ酸と種々の非天然アミノ酸で置換されたタンパク質を、1種類の変異遺伝子から迅速に合成することのできる新規手法を開発した。大腸菌由来アンバーサプレッサー-tRNA と化学的にアミノアシル化 tRNA を組み合わせることで、1つのアンバーコドン置換遺伝子から、20種類のアミノ酸置換タンパク質を迅速に合成できることを実証した。さらに、天然アミノ酸の側鎖を1原子レベルで変化させた非天然アミノ酸を用いることで、アミノ酸側鎖の1原子レベルでの置換の影響を調べることが可能にした。

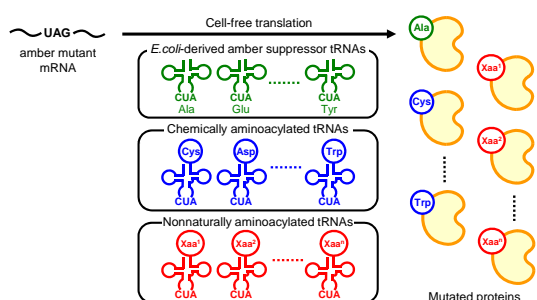


図2. 1つの変異遺伝子から多種類の天然・非天然変異タンパク質の発現

## (2) 蛍光消光を利用したタンパク質プローブの開発

タンパク質への蛍光基の導入は、その構造や機能および局在を解析する上で有用な手法であるが、従来の化学修飾では蛍光基をタンパク質の指定した部位へ付加することが困難という問題があった。一方、我々は非天然アミノ酸の導入技術を用いて蛍光標識された非天然アミノ酸をタンパク質へ部位特異的に導入することを可能にしている。今回、マルトース結合タンパク質 (MBP) をモデルタンパク質として、その基質結合部位近傍に蛍光標識アミノ酸を導入することで、基質結合を蛍光変化として検出することを試みた。

まず、蛍光標識アミノ酸の導入部位を探索するために、15ヶ所のチロシン残基とN末端、C末端部位のそれぞれについて、BODIPYFL 標識アミノ酸を導入した。基質の添加に伴う蛍光スペクトル変化を評価したところ、基質結合部位近傍の Tyr210 に導入した場合に10倍以上の著しい蛍光強度の増加が観察された。これはMBPの基質結合部位には複数の Trp 残基が存在するため、基質非存在下では Trp 残基により BODIPYFL の蛍光が消光されるが、基質の結合により蛍光消光が解消されたためだと推測された。実際に、各 Trp 残基を Phe に置換した場合、Trp340 が蛍光消光に大きく寄与していることが確認された。

上記の結果より、基質の結合を蛍光強度変化として検出できることが明らかとなったが、蛍光強度はタンパク質濃度にも依存する

ため、タンパク質濃度を一定に保つことが難しい細胞の蛍光イメージングなどに応用することは難しい。そこで、FRETのドナーとなる別の蛍光基を同時にタンパク質に導入しておくことで、FRETと蛍光消光を組み合わせることで基質の結合を2つの蛍光基の蛍光強度比の変化として検出することも試みた。MBPのN末端部分にBODIPYFL標識アミノ酸を、Tyr210部位にBODIPY558標識アミノ酸を導入した場合、基質存在下ではFRETが起こるもののBODIPY558の蛍光が大きく消光されるため主にBODIPYFLの蛍光が観測されるが、基質結合状態では同様にFRETが起こり蛍光消光が解消されるためBODIPYFLとBODIPY558の両方の蛍光が観測された。このような蛍光強度比の変化はタンパク質濃度には依存しないため、基質の定量的検出や細胞イメージング、一分子蛍光測定などに応用できると期待される。

同様の原理により、ドナーとなる蛍光標識アミノ酸を導入する代わりに、緑色蛍光タンパク質(GFP)をMBPのC末端側に融合発現することで、アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸を1つ導入することで、蛍光強度比の変化を検出することも示すことができた。さらに、GFPの代わりにルシフェラーゼを使用することで、BRET(生物発光共鳴エネルギー移動)により励起光を必要とせずに発光強度比の変化として基質の結合を検出することも実証した。これらの手法は、後述する非天然アミノ酸導入タンパク質の大量発現技術と組み合わせることで、蛍光(発光)強度比変化型のタンパク質プローブを合成するために有用となるだろう。

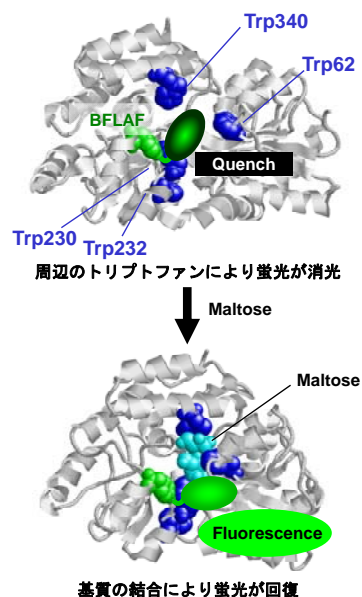


図3. マルトース結合タンパク質における基質結合に依存した蛍光消光

(3) 蛍光消光を利用した蛍光応答性抗体の開発

さらに、この原理を1本鎖抗体断片 scFv について応用した。scFv は抗体の抗原結合部位 VH ドメインと VL ドメインをリンカーペプチドで連結したものであり、抗体と同様の抗原結合活性を示す。その N 末端部分に蛍光基 Tetramethylrhodamine (TAMRA) で標識した非天然アミノ酸を導入した場合、抗原の結合に伴って、蛍光強度が増加する現象が観察された。これは、抗原非存在下では VH ドメインと VL ドメインの界面は揺らいでおり、その隙間に蛍光基が入り込み、そこに存在する Trp 残基によって蛍光が消光されるが、抗原の結合によって VH と VL の界面の結合が安定化されて、蛍光基が溶媒中に露出し蛍光消光が解消されるためと考えられる。VH と VL の界面の複数の Trp 残基は様々な抗体において保存されており、実際に種々の抗体について抗原の結合により蛍光変化が生じることが確認された。

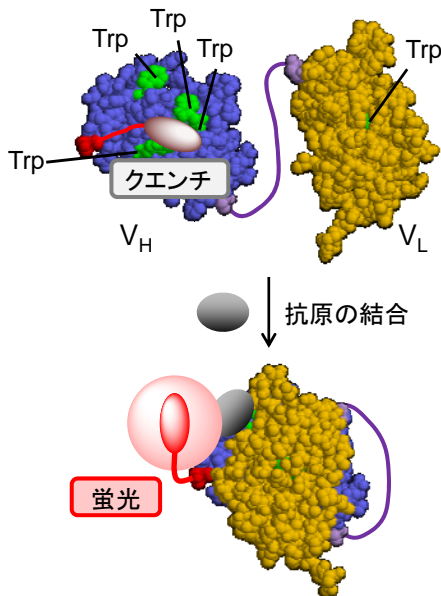


図4. 蛍光標識1本鎖抗体による抗原検出

このような蛍光応答性抗体は、従来のELISA法などの免疫測定法と比較して、短時間で簡便な操作により抗原の検出が可能となることから、新たな免疫測定法としての応用が可能になる。実際に、企業と連携して小型の蛍光検出器を開発して、不正薬物の迅速検出に利用できることを実証している。

さらに、FRETのドナーとなる別の蛍光基として RhodamineGreen を C 末端側に導入しておくことで、上記の MBP の場合と同様に FRET と蛍光消光を組み合わせることで抗原の結合を2つの蛍光基の蛍光強度比の変化として検出することも明らかにした。これについても今後は任意の分子を検出することが可能な細胞イメージング等への応用が期待される。

(4) 二重蛍光標識タンパク質の一分子蛍光観察

FRETのドナー・アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸を部位特異的に導入した二重標識タンパク質は、その構造変化や構造揺らぎを測定するためにも有用である。特に、一分子蛍光観察技術と組み合わせることで、バルク測定からは得られない、一分子レベルの構造揺らぎの情報を得ることが可能になると予想される。そこで、MBPをモデルタンパク質として使用して、一分子測定用の二重標識タンパク質の合成を行なった。

ただし、一分子測定のためには可視光領域に励起と蛍光波長を持ち、蛍光強度が大きく、かつ退色が起こりにくい蛍光色素を用いる必要がある。しかし従来主に用いてきたBODIPYの蛍光特性はこれらの条件を満たすものではなかった。そこで、まずタンパク質へ導入可能な蛍光分子の探索を行なった。可視光領域の蛍光分子である Fluorescein、Rhodamine、Indocyanineなどを結合させた非天然アミノ酸を合成して、タンパク質への導入を評価した。その結果、タンパク質の一次構造上の内部部位に導入を試みた場合は、これらの構造の大きな蛍光基はほとんど導入されないことがわかった。ただし Indocyanine のうち、IC3 と IC5 の蛍光分子は低効率ながら導入できた。一方、タンパク質の N 末端領域に導入を試みた場合は、多くの蛍光基が導入できることが確認された。これは、リボソームにおいて大きな構造の蛍光標識アミノ酸と伸長中のペプチド鎖の間でペプチド転移反応が起こる際に、タンパク質の N 末端領域に導入する場合はペプチド鎖が短いために立体障害が少なくその揺らぎも大きいためにペプチド転移反応が進行するが、内部部位に導入する場合はペプチド鎖が長いために立体障害が大きく揺らぎも小さいためにペプチド転移反応が進行しないのではないかと推測される。導入部位直前のアミノ酸をグリシンの繰り返し配列に置換したところ、タンパク質の内部部位であっても大きな構造の蛍光標識アミノ酸を導入できるようになったことから、この推測が支持されると言える。

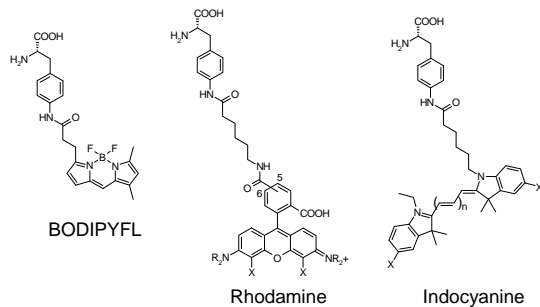


図5. 蛍光標識非天然アミノ酸の例

#### (5) 二重蛍光標識タンパク質の一分子蛍光観察

モデルタンパク質として MBP を用いて、その N 末端部位に RhodamineGreen を、内部部位に Indocyanine (IC5) を FRET のドナー・アクセプターとして導入した。MBP は X 線結晶構造解析により、基質の結合の有無により open 型と close 型のコンフォメーションを取ることが知られている。蛍光スペクトル測定では、基質の結合に伴い FRET 効率が減少しており、これは open 型から close 型への立体構造変化を反映していると考えられる。

この二重蛍光標識タンパク質を用いて、高橋聡教授（東北大学多元研）と共同で高橋教授が開発したフロー式一分子蛍光測定装置により、一分子での FRET 変化を測定した。その結果、open 型に対応する低 FRET 成分と、close 型に対応する高 FRET 成分が検出され、その比率は基質濃度に依存して変化する様子が観察された。今後、より詳細な測定および解析が必要であるが、本研究において合成方法を確立した二重蛍光標識タンパク質が、一分子蛍光測定に非常に有用であることを確認することができた。

#### (6) 非天然アミノ酸導入タンパク質の大量発現法の開発

以上のように、非天然アミノ酸導入タンパク質は基礎研究用だけでなく検査試薬などとして実用上の有用性も高い。しかし、これまでの合成方法は無細胞翻訳系を用いる必要があり、その収量の低さが実用化に向けた課題となっている。そこで、非天然アミノ酸導入タンパク質を大腸菌などを用いて細胞内で大量発現する手法と、非天然アミノ酸残基のみを特異的に化学修飾する手法の開発を試みた。

そのための非天然アミノ酸としてはまず、芳香族アミンを側鎖に有するアミノフェニルアラニンを選択した。芳香族アミンはリジンや N 末端アミノ基に比べて pKa が低い (pKa=5 程度) ことから、弱酸性溶液中ではリジンや N 末端アミノ基はプロトン化されて求核反応性を失っているが、芳香族アミンは一部脱プロトン化されて求核反応性を保持しており、特異的に化学修飾することが可能になると予想される。また、アミノフェニルアラニンは、特異的アミノアシル tRNA 合成酵素変異体が既に報告されており、大腸菌内で部位特異的にタンパク質へ導入することが可能である。

実際に、非天然アミノ酸導入部位をアンバーコドンに置換した発現遺伝子を、アミノアシル tRNA 合成酵素変異体とアンバーサプレッサー tRNA と共発現させたところ、アミノフェニルアラニン導入タンパク質を大腸菌内で比較的に大量に発現させることができた。

続いて、得られたタンパク質に対して、弱酸性溶液中でポリエチレングリコールのアルデヒド誘導体を用いて還元的アルキル化反応による修飾を行なったところ、効率良く修飾が起きていることが確認された。一方、アミノフェニルアラニンを導入していない野生型タンパク質では全く修飾が起きていないことから、修飾反応は芳香族アミン特異的であることも確認できた。さらに、種々のアルデヒド誘導体についても、同様に特異的修飾反応が可能であることが確認された。

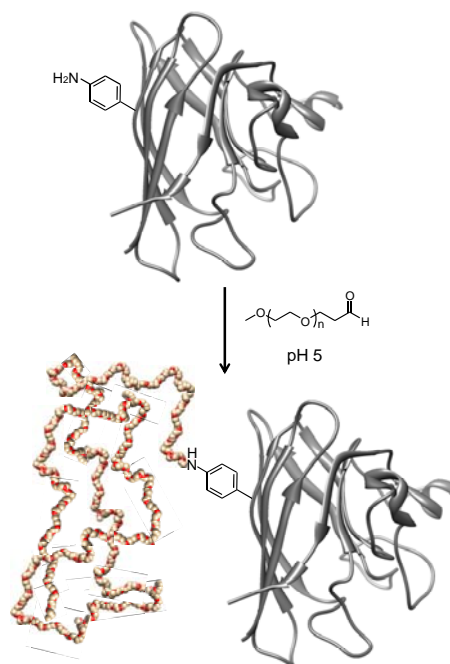


図6. 芳香族アミン含有非天然アミノ酸の導入と特異的化学修飾

本手法は、これまでの研究成果である非天然アミノ酸導入タンパク質を大量合成することを可能にして、診断薬や医薬品として実用化を進める上で、非常に有用となると期待される。

#### 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 17 件)

1. Atsushi Yamaguchi, Takahiro Hohsaka  
Synthesis of Novel BRET/FRET Protein Probes Containing Light-Emitting Proteins and Fluorescent Nonnatural Amino Acids  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 査読有, 85, 2012, 576-583.
2. Naoki Shozen, Takayoshi Watanabe, Takahiro Hohsaka  
Amber Codon-Mediated Expanded Saturation Mutagenesis of Proteins

using a Cell-Free Translation System  
*J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 113, 2012,  
704-709.

3. Ryoji Abe, Hiroyuki Ohashi, Issei Iijima, Masaki Ihara, Hiroaki Takagi, Takahiro Hohsaka, Hiroshi Ueda "Quenchbodies": Quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 133, 2011, 17386-17394.
4. Ryoji Abe, Kaori Shiraga, Shogo Ebisu, Hiroaki Takagi, Takahiro Hohsaka Incorporation of fluorescent non-natural amino acids into N-terminal tag of proteins in cell-free translation and its dependence on position and neighboring codons  
*J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 110, 2010, 32-38.
5. Issei Iijima, Takahiro Hohsaka Position-specific incorporation of fluorescent non-natural amino acids into maltose-binding protein for detection of ligand binding by FRET and fluorescence quenching  
*ChemBioChem*, 査読有, 10, 2009, 999-1006.

[学会発表] (計94件)

1. 渡邊貴嘉、山口純、白神かおり、芳坂貴弘、非天然アミノ酸導入技術を利用したタンパク質の部位特異的 PEG 化法の開発、日本化学会第 93 春季年会、2013. 3. 24、草津(滋賀)
2. Takahiro Hohsaka、Site-specific incorporation of fluorescent nonnatural amino acids into proteins and its application to fluorescence analysis of proteins、揺らぎが機能を決める生命分子の科学 第 6 回公開シンポジウム、2012. 12. 5、京都
3. Takahiro Hohsaka、Application of nonnatural amino acid mutagenesis to proving protein fluctuations、第 49 回日本生物物理学会年会、2011. 9. 19、姫路(兵庫)
4. 芳坂貴弘、非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術の開発とタンパク質の機能拡張への応用、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011. 6. 7、大阪
5. Issei Iijima, Takahiro Hohsaka、FRET analysis of protein structures by double-incorporation of fluorescent and non-fluorescent nonnatural amino acids、PACIFICHEM2010、2010. 12. 17、

Honolulu, USA

[図書] (計1件)

1. 芳坂貴弘、エヌティーエス、「人工タンパク質の合成と応用」、超分子サイエンス&テクノロジー(国武豊喜監修)、2009、890-895

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

1. 名称：芳香族アミノ基を有する非天然アミノ酸を導入したタンパク質の部位特異的な修飾方法  
発明者：芳坂貴弘  
権利者：国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学  
種類：出願  
番号：特願 2013-019526  
出願年月日：2013. 2. 4  
国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hohsaka>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳坂 貴弘 (HOHSAKA TAKAHIRO)  
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授  
研究者番号：30263619