

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20750138

研究課題名（和文） 新規蛋白質標識技術を用いたPETおよび蛍光イメージング

研究課題名（英文）

PET and fluorescence imaging by using novel protein modification techniques

研究代表者

瀧 真清（TAKI MASUMI）

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：70362952

研究成果の概要（和文）：

L/F-転移酵素による酵素反応を、蛋白質またはペプチドの蛍光修飾およびPETプローブ修飾へと応用した。さらに、非天然アミノ酸をN末端に導入した目的蛋白質を、大量・高効率・迅速かつ簡便に作製するため、反応系の改良を行った。具体的には、3つの触媒分子（アミノアシル tRNA 合成酵素変異体（PheRS）、L/F-転移酵素、tRNA）を、目的蛋白質またはペプチドと同じ混合液中に共存させておくことで、これを達成した。これを N-terminal EXtention with Transferase and ARS (NEXT-A) 反応と名付けた。

研究成果の概要（英文）：

We provided a novel method for N-terminal specific fluorescence labeling and PET labeling of peptide and proteins.

Moreover, combining L/F-transferase with *E. coli* phenylalanyl-tRNA synthetase (ARS), we achieved non-ribosomal N-terminal-specific introduction of various kinds of nonnatural amino acids to a protein. A nonnatural amino acid is once charged onto an *E. coli* tRNA<sup>Phe</sup> by a mutant ARS *in situ*, and successively transferred from the tRNA to a target protein, namely the NEXT-A reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

研究分野：化学、ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：L/F-転移酵素・タンパク質修飾、tRNA、アミノアシル tRNA合成酵素（ARS）、  
酵素工学、非天然アミノ酸、PETイメージング、蛍光修飾

## 1. 研究開始当初の背景

1) 申請者らはこれまでに、非天然アミノ酸変異導入法により、蛋白質の様々な位置に蛍光基を導入してきた。この方法は、蛋白質の任意の位置に蛍光基を導入することができるが、収率が低い点が問題である。

2) 開始コドン(AUG)は通常ホルミルメチオニンをコードするが、ホルミル基の代わりに種々のアシル基も導入できる。申請者はこの原理を利用して、ビオチン誘導体を蛋白質のN末端特異的に導入してきた。この方法も収率が低いのが欠点である。

3) さらに申請者らは、酵素的に蛋白質のN末端のみを標識する新しい手法を開発した。まず、N末端にアルギニンもしくはリジン残基を持つ蛋白質を申請者の開発した新手法にて大腸菌を用いて作成した。この蛋白質と、フェニルアラニンの放射性同位体でアシル化されたtRNAとを酵素(L/F-transferase)存在下で混合し、N末端特異的な放射性同位体標識を行った。この場合、酵素が認識する部位はN末端の1アミノ酸だけである。申請者は、フェニルアラニンの代わりに様々な非天然アミノ酸を用いて同様に反応を行い、様々な蛋白質のN末端特異的に非天然アミノ酸を導入できることを見いだした。

## 2. 研究の目的

申請者が新規開発した有機化学—酵素化学的手法によって、特定の癌細胞のみに結合する

蛋白質やペプチドのN末端特異的にPET

(Positron Emission Tomography) プローブや蛍光基を導入することを目的とした。具体的には、tRNAに担持されたアミノ酸を、蛋白質のN末端に付いたLysあるいはArg残基に結合させる酵素(L/F-transferase)を用い、種々の非天然アミノ酸を蛋白質に導入することで行った。標識された蛋白質やペプチドを、安全で患者負担の少ない画像診断技術(PET)や蛍光イメージングに応用し、特定の癌だけを超早期に発見することを目指した。この新規標識法は従来の化学修飾法や非天然アミノ酸変異法に比べて、迅速性・定量性や操作性の点で決定的に有利である。

## 3. 研究の方法

### \*PET 標識に関する方法：

1. D. Tirrell らにより報告されている、非天然アミノ酸を認識して tRNA の 3' 末端に結合する変異アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) を大腸菌を用いて作製する。
2. 様々なアミノ酸型放射性プローブは全て、すでに合成法が確立している。これらと同じ構造式を持つ非放射型アミノ酸を有機合成する。
3. 2の非放射型アミノ酸を用い、1にて作製した変異 ARS の存在下にて、アミノ酸-tRNA 結合体 (アミノアシル tRNA) を作製する。
4. N 末端にリジンまたはアルギニンを持つモデル蛋白質を、大腸菌を用いて作製する。具体的には、レクチン (糖結合蛋白質) を用いる。
5. 3にて作製したアミノアシル tRNA と

- L/F-transferase と、4にて作製した蛋白質とを混合し、蛋白質を非放射型アミノ酸で標識してTOF-MS等で同定する。
6. 変異ARSによるアミノアシル化反応とL/F-transferaseによる非天然アミノ酸の目的蛋白質またはペプチドへの転移反応を1つの試験管内で行うことができるか確かめる。この場合、tRNAはリサイクルされ触媒として働くため、標識反応の効率化および反応スケールの向上が期待できる。

#### 蛍光標識に関する方法：

1. 我々が新規に合成した蛍光性非天然アミノ酸は、PETプローブ型非天然アミノ酸よりも分子構造が嵩高い。そのため、前述した変異ARSによって認識されるとは考えにくい。従って、既存の化学的アミノアシル化法にてアミノアシルtRNAを作製する。
2. N末端にリジンを持つ蛋白質を大腸菌を用いて作製する。
3. 野生型L/F-transferaseとアミノアシルtRNA類縁体（ピューロマイシン）との複合体のX線結晶構造解析は富田先生（産総研）らによってなされている。また、蛍光プローブによってアミノアシル化されたtRNAは、立体障害によって野生型transferaseには認識されないことが分かっている。従って、転移酵素の基質結合ポケット付近に含まれる疎水性アミノ酸を立体障害の少ないアラニンにそれぞれ置換した変異transferase（計4種類）を作製する。
4. 1にて作製したアミノアシルtRNAと、2にて作製した癌細胞結合蛋白質と、3にて作製した変異transferaseとを混合し、蛋白質を蛍光性アミノ酸で標識する。これをTOF-MSやゲルイメージャー、アミノ酸配列解析等で同定する。
5. tRNAの作製は時間およびコストが嵩む。右図のようにアミノアシルマイクロRNAを（受託）化学合成して4と同様の実験を行い、蛋白質のN末端を蛍光標識する。

#### 4. 研究成果

##### PET標識：

申請者が新規開発した有機化学—酵素化学的手法を応用し、以下の1～6の手順に従って実験し、ペプチドのN末端特異的にPETプローブを導入することに成功し、特許出願および論文発表を行った。

1. D. Tirrellらにより報告されている、非天然アミノ酸を認識してtRNAの3'末端に結合する変異アミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を大腸菌を用いて作製した。
2. フッ素原子の入ったPETプローブ（非放射型）アミノ酸を有機合成した。
3. 2の非放射型アミノ酸を用い、1にて作製した変異ARSの存在下にて、アミノ酸-tRNA結合体（アミノアシルtRNA）を作製した。
4. N末端にリジンを持つタンパク質を大腸菌を用いて作製した。
5. 3にて作製したアミノアシルtRNAとL/F-転移酵素と、4にて作製したタンパク質とを混合し、蛋白質を非放射型アミノ酸で標識してTOF-MSおよびEdman分解法で同定した。
6. 変異ARSによるアミノアシル化反応とL/F-転移酵素による非天然アミノ酸の目的ペプチドへの転移反応を1つの試験管内で行った。この場合、tRNAはリサイクルされ触媒として働くため、標識反応の効率化および反応スケールが大幅に向上した。

##### 蛍光標識：

以下の1～4の手順に従って実験し、蛋白質のN末端特異的蛍光標識に成功した。

1. 化学的アミノアシル化法にて蛍光プローブによってアミノアシル化されたtRNAを作製した。
2. 変異L/F転移酵素(計4種類)を作製した。
3. 1にて作製したアミノアシルtRNAと、2にて作製した変異転移酵素とを混合し、目的蛋白質N末端に蛍光性アミノ酸を付与させた。これをTOF-MSやゲルイメージャー、アミノ酸配列解析等で同定した。
4. さらに基質であるアミノアシルtRNAを低分子化した1)アミノアシルマイクロヘリックス、2)アミノアシル1本鎖マイクロRNA、および3)アミノアシル核酸2量体(アミノアシルpdCpA)のいずれもが、L/F-転移酵素の基質となることを見いだした。

以上の論文発表を行い、学会講演賞を受賞した。

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3件;)

1. M. Taki, H. Kuroiwa, M. Sisido, The NEXT-A reaction, *Nucl. Acids Synp. Ser.*, **53**, 37-38 (2009). 査読なし
2. K. Ebisu, H. Tateno, H. Kuroiwa, K. Kawakami, M. Ikeuchi, J. Hirabayashi, M. Sisido, M. Taki, N-terminal specific point-immobilization of active proteins via the one-pot NEXT-A method, *ChemBioChem*, **10**, 2460-2464 (2009). 査読有り
3. M. Taki, H. Kuroiwa, M. Sisido, Chemoenzymatic transfer of fluorescent non-natural amino acids to the N terminus of a protein/peptide, *ChemBioChem*, **9**, 719-722 (2008). 査読

有り

[学会発表] (計4件)

1. 瀧 真清、黒岩 浩行、宍戸 昌彦、蛋白質およびペプチドのN末端特異的な18F標識法の開発、第二回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム、岡山市、2009年2月5日
2. 瀧 真清、L/F転移酵素を用いた蛋白質N末端特異的標識、第11回生命化学研究会、群馬県水上市、2008年11月29日
3. 瀧 真清、宍戸 昌彦、L/F-蛋白質転移酵素と新規蛍光基質を用いた蛋白質N末端特異的標識、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、横浜市、2008年9月18日(講演賞受賞)
4. 瀧 真清、L/F-transferaseを用いた蛋白質N末端特異的な蛍光および陽電子放射断層撮影(PET)プローブ標識、大阪大学蛋白質研究所セミナー:蛋白質合成法の最近の進歩と生命科学、大阪府吹田市、2008年9月26日

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 目的タンパク質または目的ペプチドにアミノ酸を導入する方法  
発明者: 瀧 真清、宍戸 昌彦  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-135410 および 2008-181303 (分割出願)  
出願年月日: 2008年5月23日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

- (1)研究代表者  
瀧 真清 (TAKI MASUMI)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：70362952