

## 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31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21550167

研究課題名(和文) ピロリジン転移リボ核酸合成酵素を利用した非天然型アミノ酸の蛋白質への導入

研究課題名(英文) Site-specific incorporation of non-natural amino acids into proteins by using pyrrolysyl-tRNA synthetase

研究代表者

柳沢 達男 (YANAGISAWA TATSUO)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・研究員

研究者番号：10450420

研究成果の概要(和文)：

研究代表者はピロリジンtRNA合成酵素(PyIRS)/tRNA<sup>Pyl</sup>システムを用いて新規のクロスリンカー含有リジン誘導体、TmdZLysをタンパク質に部位特異的に導入することに成功した。従来のクロスリンカー含有アミノ酸に比べて、TmdZLysを導入したタンパク質は細胞内ターゲットであるタンパク質と広い範囲でUVクロスリンクが可能であった。TmdZLys導入系を用いてタンパク質間相互作用ネットワークを解明することが期待される。

研究成果の概要(英文)：

Site-specific incorporation of *N*<sup>ε</sup>-(*p*-trifluoromethyl diazirinylbenzyloxycarbonyl)lysine (TmdZLys), a new lysine derivative with a diazirine photo-crosslinker, into proteins has been achieved by the pyrrolysyl-tRNA synthetases (PyIRS) / tRNA<sup>Pyl</sup> system. The incorporated TmdZLys enabled wide-range photo-crosslinking with target proteins. This system is useful for probing protein interaction networks in living cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学生物学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

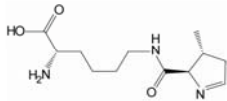
キーワード：

バイオテクノロジー、非天然型アミノ酸、タンパク質、クロスリンカー、ケミカルバイオロジー、翻訳、ピロリジン、アミノアシル tRNA 合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸は 61 種類のコードにコードされておりアミノ酸をコードしない UAA、UGA、UAG の 3 種類の終止コードで翻訳が終結する。しかし通

常終止コードとして読まれるコードが例外的に 20 種類以外のアミノ酸のコードとして読まれる場合がある。セレノシステインがその一つであり、もう一つはピロリジン (図 1) である。



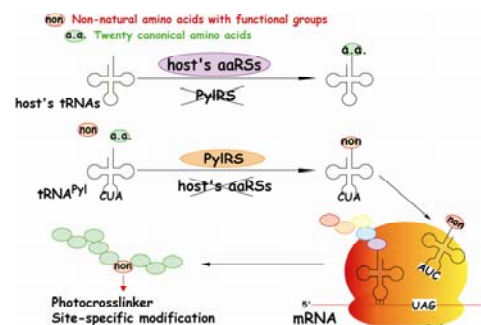
(図 1) ピロリジン (Pyrrolysine)の化学構造

ピロリジンは *Methanosarcina* 由来のメタン合成に関わるメチル基転移酵素 MtmB の活性中心に存在するが、ピロリジンの修飾に関わる遺伝子群とともに UAG コドンに対応するアンバーサプレッサー tRNA (tRNA<sup>Pyl</sup>) が発見されたことから *mtmB* 遺伝子内の終止 (UAG) コドンはピロリジンとして翻訳されると推定された (Srinivasan *et al.*, *Science* **296**, 1459-1462, 2002; Hao *et al.*, *Science* **296**, 1462-1466, 2002)。のちにピロリジンはピロリジン tRNA 合成酵素 (PylRS) によって tRNA<sup>Pyl</sup> にアミノアシル化されたのちリボソームに運ばれ (Blight *et al.*, *Nature* **431**, 333-335, 2004; Polycarpo *et al.*, *PNAS* **101**, 12450-12454, 2004)、タンパク質に取り込まれることが明らかとなった (Blight *et al.*, *Nature* **431**, 333-335)。

我々は *Methanosarcina mazei* 由来 PylRS 触媒ドメインの結晶化、ピロリジン複合体の構造決定に成功し PylRS がピロリジン認識に必要な疎水性の大きなトンネルを持つこと、疎水性トンネルと活性中心にある Asn346 側鎖を利用した他のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) には見られない特徴的なアミノ酸結合機序を有すること、活性部位ループのコンフォメーション変化、tRNA アンチコドン認識しないこと、tRNA 結合に関わるアミノ酸残基を明らかにした (Yanagisawa *et al.*, *Acta Crystallogr.* **F62**, 1031-1033, 2006; Yanagisawa *et al.*, *J. Mol. Biol.* **378**, 634-652, 2008)。また、結晶構造に基いた生化学的解析から PylRS はピロリジン以外の種々のアミノ酸をもアミノアシル化できることを見いだした。更に非天然型アミノ酸との複合体構造を決定し、PylRS はアミノ酸基質認識の緩い酵素であることを構造生物学的に証明した (Yanagisawa *et al.*, *Chem. Biol.* **17**, 1187-1197, 2008)。PylRS は他の aaRS と比較してアミノ酸基質の特異性が低く、バラエティーに富んだ非天然型アミノ酸を認識し得る特徴をもつ。

PylRS を用いた非天然型アミノ酸導入に関しては種々のピロリジン、リジン誘導体を野生型 PylRS、変異型 PylRS によりタンパク質へ導入できることが多数のグループにより報告されている (Polycarpo *et al.*, *FEBS Lett.* **580**, 6695-6700, 2006; Neumann *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **4**, 232-234, 2008; Mukai *et al.*, *BBRC* **371**, 818-822, 2008; Yanagisawa *et al.*, *Chem. Biol.* **17**, 1187-1197, 2008; Fekner and Chan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 387-391, 2011)。タンパク質の特定部位への非天然型アミノ酸導入法は様々な方法論が開発されており (Wang and Schultz, *Ann. Rev. Biophys.*

*Biomol. Struct.* **35**, 225-249, 2006)、いずれも宿主のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) が認識できないサプレッサー tRNA とそれに対応する aaRS が非天然型アミノ酸に対してのみ活性を持つ“直交性”の aaRS/tRNA を利用していることが特徴である。代表的な系としてはチロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) 変異体/tRNA (amb) が挙げられるが、既に 50 種類以上の非天然型アミノ酸が終止コドンや 4 塩基コドン特異的に翻訳されタンパク質に導入されている。PylRS/tRNA<sup>Pyl</sup> は大腸菌、酵母、動物細胞など宿主由来の aaRS/tRNA と交差しない理想的な非天然型アミノ酸導入システムであり (Mukai *et al.*, *BBRC* **371**, 818-822, 2008)、PylRS/tRNA<sup>Pyl</sup> の系により更に数多くの官能基をもつ非天然型アミノ酸をタンパク質に導入することが可能になってきた。



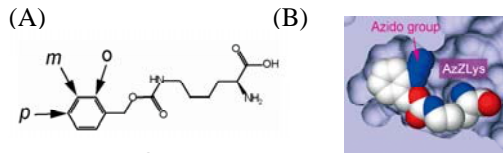
(図 2) PylRS/tRNA<sup>Pyl</sup> は大腸菌、酵母、哺乳類細胞など宿主の aaRSs/tRNAs と交差しない非天然型アミノ酸の導入系として優れている。

我々は PylRS/tRNA<sup>Pyl</sup> を利用した汎用性の高い非天然型アミノ酸導入系の開発を目指して *N*<sup>ε</sup>-(*tert*-butyloxycarbonyl)lysine (BocLys)、*N*<sup>ε</sup>-(allyloxycarbonyl)lysine (AlocLys) に対して導入効率の高い PylRS (Y384F) 変異体、構造ベースのアミノ酸置換によってより大きく嵩高い *N*<sup>ε</sup>-(benzyloxycarbonyl)lysine (ZLys) (図 4-2) を効率良くアミノアシル化できる PylRS (Y306A) 変異体を取得し、それらを組み合わせることによりオルト位にアジド基を有する ZLys 誘導体、*N*<sup>ε</sup>-(*o*-azidobenzyloxycarbonyl)lysine (AzZLys) (図 4-3) をタンパク質に導入した。更に AzZLys のアジド基を介してタンパク質を部位特異的に蛍光修飾することにも成功している (Yanagisawa *et al.*, *Chem. Biol.* **17**, 1187-1197, 2008)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は有用官能基である、重原子、反応性官能基、蛍光基、クロスリンカー等を有する非天然型アミノ酸を PylRS/tRNA<sup>Pyl</sup> の系によりタンパク質に部位特異的に導入し、非天然型アミノ酸を分子プローブとして生命現象を解明すること、また更に新規の非

天然型アミノ酸導入技術を開発したタンパク質が持つ構造と機能をより高度化、有用な技術として実用化することにある。そこで我々は有用な特徴をもつ ZLys 誘導体に注目した。ZLys はリジン側鎖部分がリンカーとして働くのでチロシン誘導体に比べ柔軟性の高い側鎖を持ち、特に反応性官能基やクロスリンカーを導入するアミノ酸骨格として適している。ベンジルオキシカルボニル(Z)基はペプチド合成の保護基として一般的には知られているが、可変性が高いうえ側鎖に酸素を含むため水溶性が比較的高く水溶液条件下でも扱いやすい。ZLys の Z 基ベンゼン環のオルト位は PylRS 活性部位と立体障害を起こしにくいと予想され多くのオルト位置換 ZLys 誘導体はタンパク質へ導入できる可能性が高い。またパラ位にも活性部位との間に隙間があり置換基の導入は可能と思われた。そこでオルト位、パラ位に有用官能基を置換した新規 ZLys 誘導体を設計、合成しタンパク質への導入を試みることにした。



(図3) (A)  $N^{\epsilon}$ -benzyloxycarbonyl-lysine (ZLys) の化学構造。オルト、メタ、パラ置換の位置を矢印で示す。(B) PylRS(Y306A)と AzZLys 複合体モデルの構造。AzZLys は立体障害無く PylRS の活性部位に収まる。

理研で使用できる遺伝子操作技術、タンパク質精製、活性測定などの生化学、X線結晶構造解析、NMR、質量分析、有機化学、錯体化学、分光学、無細胞タンパク質合成等の技術を駆使し、PylRS/tRNA<sup>Pyl</sup>の系で導入できる非天然型アミノ酸レパートリーを増やすと共に、アジド基やアルキン、アルケンなど反応性官能基を介した部位特異的修飾、蛍光ラベルによるタンパク質の局在検出、FRET ラベルやクロスリンカーを利用して細胞内で相互作用するタンパク質の網羅的検出、重原子ラベルによる結晶構造解析の位相決定等へ応用する。タンパク質が関与する病気の解明や診断薬の開発に貢献することを最終的な目標とする。

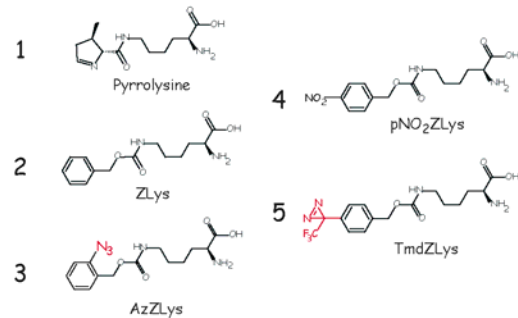
### 3. 研究の方法

本研究では反応性官能基含有 ZLys 誘導体、重原子含有 ZLys 誘導体導入系の開発と共に、クロスリンカー含有 ZLys 誘導体導入系の開発を中心に行った。当研究グループでは細胞内タンパク質間相互作用を網羅的に探索する目的で以前からクロスリンカー含有チロシン誘導体のタンパク質への導入系を利用してきた。タンパク質-タンパク質相互作用

の検出は一般的には免疫沈降やプルダウンアッセイを用いることが多いが、弱い相互作用は検出しにくいという弱点がある。一方、UV クロスリンク法は共有結合を伴うため弱いタンパク質間相互作用でも検出が可能という点で他の方法よりも優れている。AzZLys のアジド基は反応性官能基としてだけでなくクロスリンカーとしても利用可能であるが、オルト位はクロスリンカーの導入位置としてはあまり適していない。そこでパラ位にクロスリンカーをもつ ZLys 誘導体を設計合成し、タンパク質への導入を試みた。また同時に構造ベースおよびランダムスクリーニング法によりパラ位置換クロスリンカー含有 ZLys に対して活性の高い PylRS 変異体を取得することを試みた。有用性の高い新たなクロスリンカー含有 ZLys 誘導体の設計、タンパク質への導入系を開発し、細胞内で相互作用するタンパク質を検出する段階まで実験を行い、クロスリンカーとしての有用性を証明した。

### 4. 研究成果

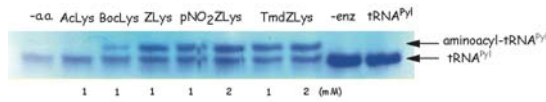
本研究では新規のクロスリンカー含有 ZLys、 $N^{\epsilon}$ -(*p*-trifluoromethyl diazirinylbenzyloxycarbonyl)lysine (TmdZLys) (図 4-5) を PylRS 変異体/tRNA<sup>Pyl</sup> システムを用いてタンパク質へ部位特異的に導入することに成功した。ドッキングモデルに基づいて設計した TmdZLys を 4-(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-ylbenzylalcohol および  $N^{\epsilon}$ -Boc-L-lysine から 3 段階で合成した。



(図 4) ピロリジンと ZLys 誘導体の構造。クロスリンカーを赤で示した。

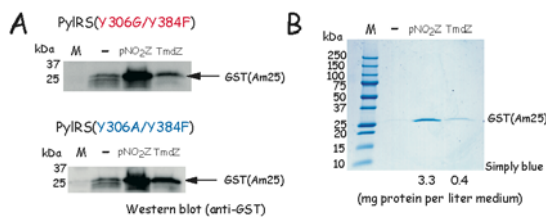
次に TmdZLys に対する認識能が高い PylRS 変異体を取得するために、Z 基のパラ位がニトロ基に置換された ZLys 誘導体、 $N^{\epsilon}$ -(*p*-nitrobenzyloxycarbonyl)lysine (pNO<sub>2</sub>ZLys) (図 4-4) の存在下で、PylRS の Y306、Y309、V413 をランダム化したライブラリーからクロラムフェニコール耐性を指標に pNO<sub>2</sub>ZLys のタンパク質への導入活性の高い PylRS をスクリーニングし PylRS(Y306G/Y384F) 変異体を得た。酸性 PAGE により PylRS (Y306G/Y384F) のアミノアシル化活性を調べたところ、ZLys や pNO<sub>2</sub>ZLys、TmdZLys を

効率良くアミノアシル化できることが判明した (図 5)。



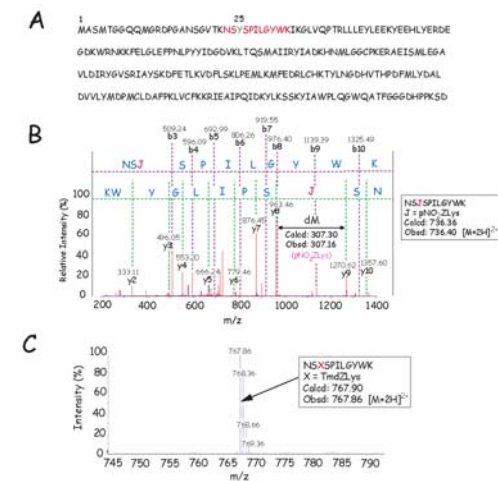
(図 5) 酸性PAGEによるPyIRS(Y306G/Y384F)変異体のアミノアシル化活性の測定

次に TmdZLys のタンパク質への導入を行った。まず大腸菌の系で PyIRS(Y306G/Y384F) 変異体および PyIRS(Y306A/Y384F) 変異体について pNO<sub>2</sub>ZLys、TmdZLys の GST(25amb) への導入効率を比較したところ、GST(25amb) への導入効率は PyIRS(Y306G/Y384F) よりも PyIRS(Y306A/Y384F) 変異体の方が高いことが明らかとなった (図 6)。



(図 6) PyIRS(Y306G/Y384F)変異体/tRNA<sup>Pyl</sup>、PyIRS(Y306A/Y384F)変異体/tRNA<sup>Pyl</sup> の系による GST(25amb)への pNO<sub>2</sub>ZLys、TmdZLys の導入

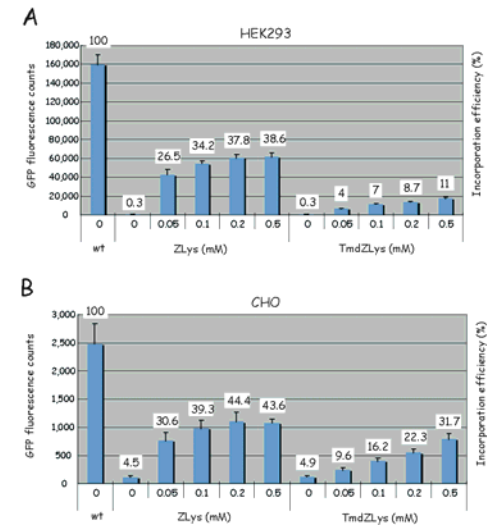
発現、精製した GST の質量分析を行い、pNO<sub>2</sub>ZLys、TmdZLys がそれぞれ部位特異的に導入されていることが確認された (図 7)。



(図 7) 質量分析による GST 中の pNO<sub>2</sub>ZLys、TmdZLys の同定

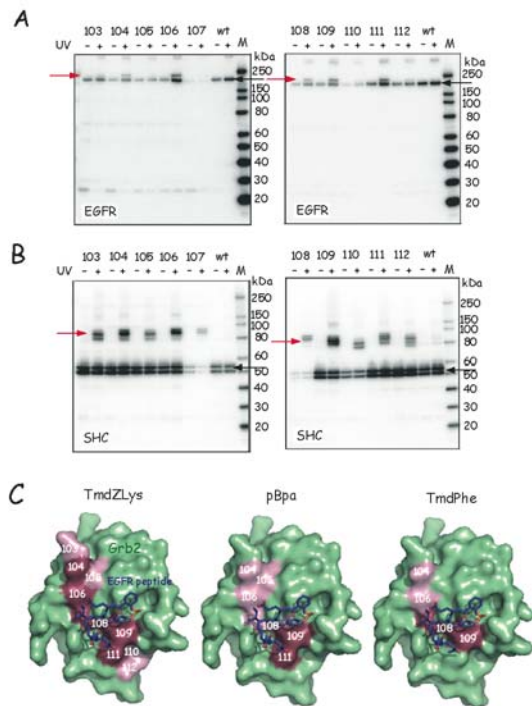
pNO<sub>2</sub>ZLys は GST タンパク質中に十分に導入されたが (培地 11 あたり 3.3mg)、TmdZLys の場合は培地 11 あたり 0.4mg、野生型 GST

の発現量と比較してタンパク質への導入効率は 1.2%程度であった。そこで次に哺乳類細胞の系で TmdZLys の導入を試みることにした。哺乳類細胞 (HEK293、CHO) において PyIRS(Y306G/Y384F) および PyIRS(Y306A/Y384F) 変異体を用いて EGFP を融合したシグナル伝達タンパク質 GRB2(amb) の蛍光強度を指標に TmdZLys のタンパク質への導入効率を調べたところ、野生型 GRB2-EGFP の発現量と比較して HEK293 で最大 11%、CHO 細胞で 32% もの導入効率を示した (図 8)。



(図 8) 哺乳類細胞における ZLys、TmdZLys の GRB2(111amb)-EGFP への導入効率

次に TmdZLys のクロスリンク能を調べるため、GRB2 の細胞内標的である EGFR、SHC との相互作用面のアミノ酸残基に TmdZLys を導入した GRB2 を EGFR、SHC と共に発現させたのち、UV 照射して GRB2 と EGFR または SHC とをクロスリンクさせた。従来のクロスリンカー含有チロシン誘導体、pBP<sub>a</sub> や TmdPhe を導入した GRB2 と比べて EGFR、SHC と広い範囲でクロスリンクしたことから、TmdZLys は広域性の優れた光クロスリンク能をもつことが明らかとなった (図 9)。



(図 9) HEK293 細胞で共発現させた GRB2(TmdZLys)と EGFR(A)、GRB2(TmdZLys)と SHC(B)を UV クロスリンクの後、GRB2-EGFR 複合体をウエスタンブロットで検出した。(C) GRB2(TmdZLys)、GRB2(pBpa)、GRB2(TmdPhe)と EGFR が UV クロスリンクする領域。GRB2(TmdZLys, 103-112)と EGFR とのクロスリンクの強度をワイン色 (強)、およびピンク色 (弱) で示す。

従って TmdZLys のタンパク質への導入系および UV クロスリンクを利用することで細胞内におけるタンパク質間相互作用ネットワークの解明が期待できる。本研究の成果は論文 (Yanagisawa *et al.*, *Mol. BioSyst.* **8**, 1131-1135, 2012)、および特許出願 (2011-253307) を行った。

#### 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 2 件)

- 1) Yanagisawa, T., Hino, N., Iraha, F., Mukai, T., Sakamoto, K., Yokoyama, S. *Mol. BioSyst.* **8**, 1131-1135 (2012). 査読有
- 2) Mukai, T., Yanagisawa, T., Ohtake, K., Wakamori, M., Adachi, J., Hino, N., Sato, A., Kobayashi, T., Hayashi, A., Shirouzu, M., Umehara, T., Yokoyama, S., Sakamoto, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**,

575-761 (2011) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

#### 1) 終止コドン UAG がセンス・コドンに再定義された大腸菌株を用いた

#### 非天然型アミノ酸のタンパク質への導入

坂本健作<sup>1</sup>、安達仁朗<sup>1</sup>、若森昌聡<sup>1</sup>、白水美香子<sup>1</sup>、梅原崇史<sup>1</sup>、柳沢達男<sup>1</sup>、向井崇人<sup>1</sup>、横山茂之<sup>1,2</sup> (1 理研・SSBC、2 東大・院理・構造生物)

第 6 回無細胞生命科学研究会 (2011 年 11 月 16 日、兵庫)

#### 5) 大腸菌、昆虫細胞、動物細胞を用いた非天然型アミノ酸のタンパク質への

#### 部位特異的導入法の開発

坂本健作<sup>1</sup>、向井崇人<sup>1</sup>、大竹和正<sup>1</sup>、伊良波史枝<sup>1</sup>、林明子<sup>1</sup>、佐藤文<sup>1</sup>、樋野展正<sup>1</sup>、柳沢達男<sup>1</sup>、脇山素明<sup>1</sup>、横山茂之<sup>1,2</sup> (1 理研・SSBC、2 東大・院理・構造生物)

第 10 回日本蛋白質科学会年会 (2010 年 6 月 17 日、札幌)

#### 7) 翻訳後修飾アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入

坂本健作<sup>1</sup>、小林隆嗣<sup>1</sup>、柳沢達男<sup>1</sup>、横山茂之<sup>1,2</sup> (1 理研・SSBC、2 東大・院理・生化)

第 4 回無細胞生命科学研究会 (2009 年 11 月 16 日、岐阜)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 新規非天然型アミノ酸とその応用に関する研究:

**N(epsilon)-(p-trifluoromethyldiazirinybenzyl)oxycarbonyl)lysine**

発明者: Yokoyama, S., Sakamoto, K., Yanagisawa, T., Hino, N., F. Iraha

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2011-253307

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳沢 達男 (YANAGISAWA TATSUO)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・研究員

研究者番号: 10450420

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし