

## 研究課題別評価

1 研究課題名： 蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の新規構造機能解析法の開発

2 研究者氏名： 芳坂 貴弘

3 研究のねらい：

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)は、通常の X 線結晶構造解析では知ることのできないタンパク質の立体構造変化を検出することができる手法として、非常に有用な手法である。しかし、タンパク質の特定の2ヶ所へ定量的に蛍光分子を導入することはこれまで困難であった。本研究では、研究者がこれまで開発してきた4塩基コドンによる非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術を利用して、FRET のドナー・アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸を特定の2ヶ所に導入したタンパク質を合成し、フォールディングやタンパク質間相互作用によるタンパク質の構造変化を FRET により検出することを検討して、タンパク質の新規構造機能解析法としての確立を目指した。

4 研究成果：

(1) FRET のドナー・アクセプターを導入したカルモジュリンの合成と蛍光分析

本研究ではまずモデルタンパク質としてカルモジュリンを用いることにし、4塩基コドン法により FRET のドナー・アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸の導入を行なった。まず、発現遺伝子の蛍光標識アミノ酸の導入部位のコドンを 4 塩基コドン CGGG および GGGT に置換した遺伝子を作製した。続いて、蛍光標識アミノ酸として BODIPY FL-aminophenylalanine (BODIPY FL-AF、ドナー) と、アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸 BODIPY558-AF を、対応する4塩基アンチコドンを持つ tRNA に化学的アミノアシル化法により結合させた。これらが大腸菌由来無細胞翻訳系へ加えることにより、4塩基コドンで指定した部位への蛍光標識アミノ酸の導入を行なった(図 1)。

カルモジュリンの N 末端領域および C 末端領域に、BODIPY 558-AF と BODIPY FL-AF の導入を行なった場合の SDS-PAGE を図 1 右に示す。両方の蛍光標識アミノ酸-tRNA を添加した場合のみ、完全長カルモジュリンの位置に二色の蛍光を発するバンドが確認されたことから、目的の二重蛍光標識されたカルモジュリンが合成されたと判断された。

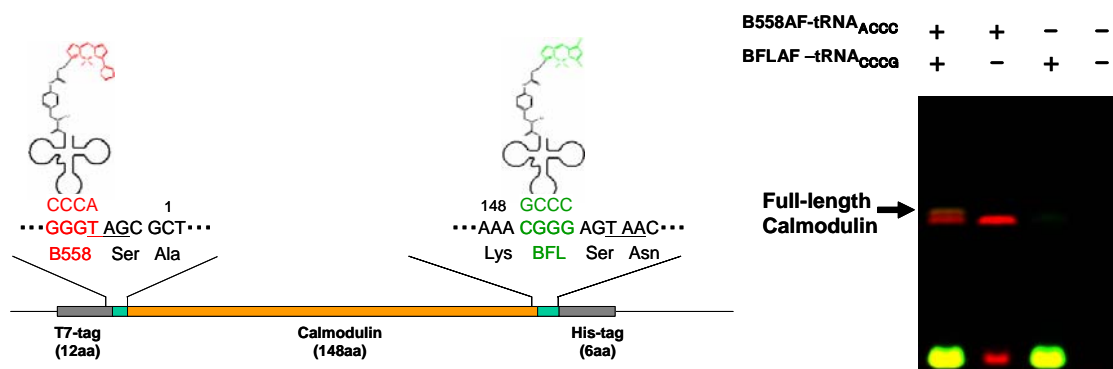


図 1 FRET のドナー・アクセプターを導入したカルモジュリンの合成

そこで続いて、C末端に付加したHisTagにより精製を行ない、その蛍光スペクトル測定を行なった。その結果、BODIPY FL(ドナー)を励起した場合に、BODIPY558(アクセプター)由来の強い蛍光ピークが観測され、FRETが起きていることが確認された。ここに変性剤として尿素を添加していったところ、尿素濃度の増加に伴ってドナーの蛍光が増加しつつアクセプターの蛍光が減少する様子が観察された。これは尿素変性によってカルモジュリンのN末端とC末端の距離が離れ、その結果FRETが生じなくなっていくためだと解釈される。従って、本手法により合成された二重蛍光標識カルモジュリンは、その立体構造に依存したFRETシグナルを与えることが確認された。

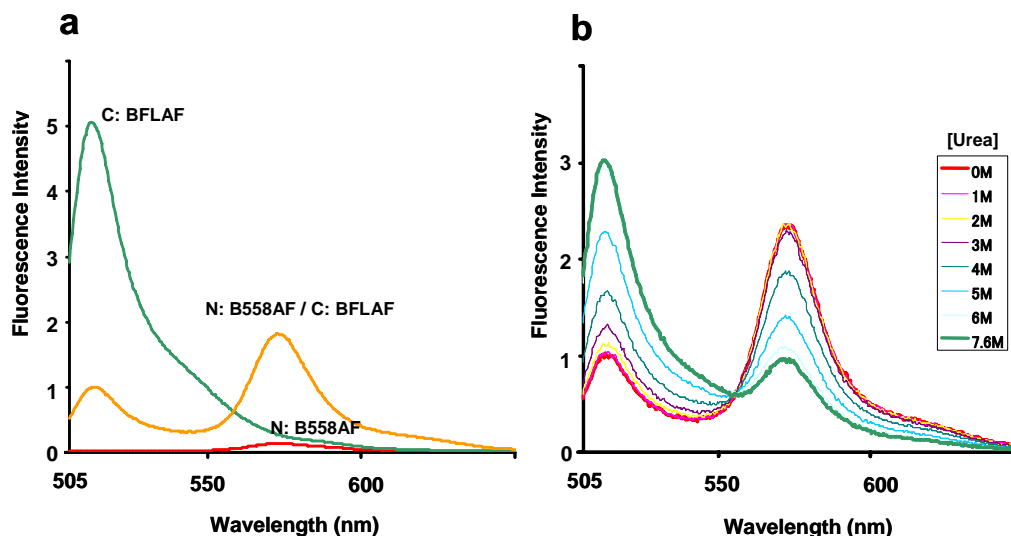


図2 N末端・C末端領域二重蛍光標識カルモジュリンにおけるFRET  
 (a) 励起波長490nmによる一重および二重蛍光標識カルモジュリンの蛍光スペクトル  
 (b) 尿素添加による二重蛍光標識カルモジュリンの蛍光スペクトル変化

カルモジュリンは、カルモジュリン結合タンパク質との相互作用によりその立体構造を大きく変化させることがX線構造解析によって既に明らかとなっていることから、ここではその変化をFRETにより検出することを試みた。しかし上述のN末端・C末端領域に二重蛍光標識したものでは、FRETの明確な変化は観測されなかった。そこで、BODIPY558(アクセプター)の導入位置をN末端領域に固定して、BODIPY FL(ドナー)を種々の部位へ導入した。翻訳生成物のSDS-PAGEからは、全ての二重蛍光標識カルモジュリンについて合成が確認できた。また、カルモジュリン結合ペプチドであるM13とマルトース結合タンパク質(MBP)の融合タンパク質(MBP-M13)を用いてゲルシフトアッセイを行なったところ、全てのものが結合活性を保持していることも確認された。そこで、HisTagによる精製後、蛍光スペクトルの測定を行なった。その結果、図3に示すように、M13ペプチドの添加に伴うFRET変化は導入部位に大きく依存しており、特にドナーを40位あるいは99位に導入したもので大きなFRET変化が生じることがわかった。このFRET変化曲線は、アクセプターを直接励起した場合の蛍光偏光度測定による結合曲線と一致したことから、MBP-M13の結合によりFRETの変化が生じたと言える。一方、59位あるいは69位ではFRETはほとんど変化しなかった。従って、立体構造の変化をFRETにより検出するためには、ドナー・アクセプターを適切な位置に導入することが必要であり、この結果はそれを可能にする4塩基コドンを用いた導入技術の有用性を証明していると言える(特許出願済み、論文準備中)。

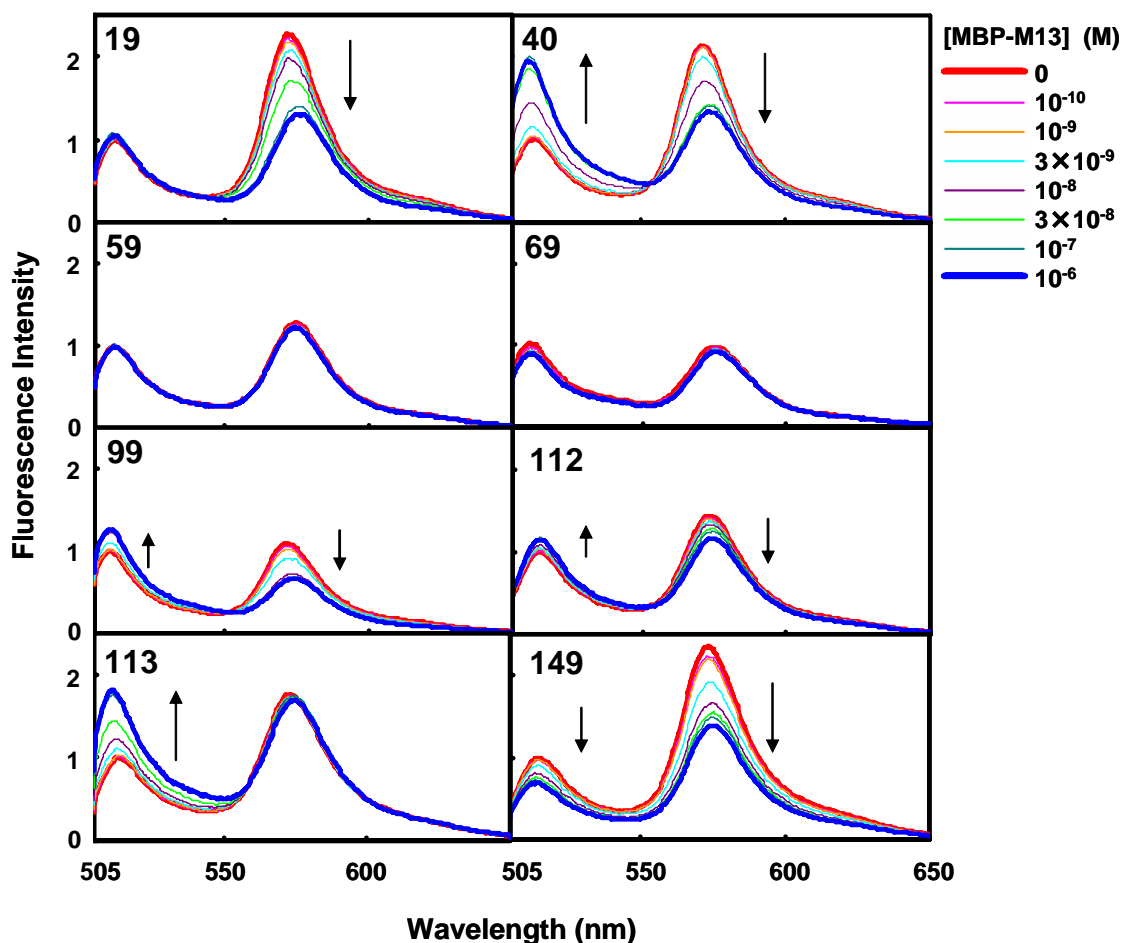


図3 N末端部分と種々の部位を二重蛍光標識したカルモジュリンにおけるM13ペプチドの結合に伴う蛍光スペクトル変化

### (2) シャペロニン依存タンパク質フォールディングの FRET 分析

タンパク質に FRET のドナー・アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸を導入することで、シャペロニン依存タンパク質フォールディングを FRET により分析する手法を開発した。実際に、マルトース結合タンパク質変異体を用いて、シャペロニンへの結合、シャペロニン上での構造変化、シャペロニン内部でのフォールディングに伴う基質タンパク質の構造変化を、FRET の変化として捉えた予備的な実験データを取得できた。これにより今後、基質タンパク質とシャペロニンとの相互作用を詳細に解析することが可能になると期待される。

### (3) 蛍光標識アミノ酸導入のための関連技術の開発

タンパク質の二重蛍光標識は 4 塩基コドン法によって実現されたが、遺伝子の配列によっては 4 塩基コドン部位以外への非特異的な蛍光標識アミノ酸の導入が起こってしまうことが観察された。そこで終止コドン UAG の利用も検討したが、4 塩基コドンに比べて蛍光標識アミノ酸の導入効率が低く、二重蛍光標識タンパク質の収量が極めて低くなってしまった、という問題があった。今回、これまで使用してきた酵母フェニルアラニン用 tRNA の代わりに、高効率な導入を行なうことのできる新たな tRNA の探索を試みた。その結果、マイコプラズマ由来 tRNA の中から、UAG を用いた場合でも 4 塩基コドンと同等の効率で蛍光標識アミノ酸の導入を行なうことのできる新たな tRNA を見出すことができた(特許出願済み、論文準備中)。

## 5 自己評価:

本研究ではまず、二種類の蛍光標識アミノ酸を導入して FRET によりタンパク質構造変化を解析する技術の開発に取り組んだ。そのためのモデルタンパク質としてカルモジュリンを選択し、アンフォールディングや基質ペプチドの結合に伴う構造変化を FRET の変化として捉えることに成功した。その過程では、特に蛍光標識アミノ酸の導入部位の選択が重要であり、場合によっては予想される FRET 変化が観測できないこともあった。これは、当初は主に蛍光基間距離が FRET 効率を決定すると予想していたが、実際には FRET が蛍光基の配向や環境変化の影響を強く受けたためだと考えている。これについては、導入部位の最適化を行なうと共に、環境変化を受けにくい蛍光基を使用するなど、今後もさらなる技術的改良が必要であると考えている。

また、この技術を利用してシャペロニンに依存したタンパク質のフォールディングの解析も試み、シャペロニンとの相互作用に伴う基質タンパク質の構造変化を測定することができた。その過程では、対象タンパク質の種類によっては、一部の 4 塩基コドンで蛍光基の部位特異的導入が達成されないという問題が生じた。そこで終止コドンの利用を検討し、従来よりも導入効率が大幅に向上する tRNA 変異体を見いだすことができた。これは、様々なタンパク質を対象にする上で大きな技術的改良である。

このようにタンパク質の種類に制限されずに、低分子蛍光基を特定部位へ導入して FRET により構造変化を検出できる技術は、世界的にも初めてのものである。ただし、当初はカルモジュリンをモデルタンパク質とし、その後様々なタンパク質について構造変化解析を行ない新しい知見の取得を試みる計画であったが、上記のように当初は予想していなかった問題が生じ、新しい知見の取得は実現できなかった。今後は、実際に様々なタンパク質に適用して新たな知見の取得を試みると共に、共同研究や試薬キットの事業化を通じてこの技術を普及させ、タンパク質研究の有用なツールに発展させて行きたいと考えている。

## 6 研究総括の見解:

さきがけ研究採択前に、4 塩基コドンによる非天然アミノ酸のタンパク質への導入という画期的で際立って斬新な手法を見出した。さきがけ研究においては、その技術を応用した FRET 解析法の開発を目指した。いくつかの技術障害をクリアして目的の FRET 解析法や導入効率を向上させる tRNA 変異体を見出し、特許出願 2 件に結び付けた点は評価できる。tRNA 変異体については生産試験検討も認められたので、今後の機能の実用化という点で成果が期待できる。

## 7 主な論文等:

論文 国際誌 4 件、国内誌 3 件

1. Daisuke Kajihara, Takahiro Hohsaka, Masahiko Sisido, Synthesis and Sequence Optimization of GFP Mutants Containing Aromatic Nonnatural Amino Acids at the Tyr66 Position. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2005, 18, 273-278.
2. Hikaru Taira, Masaharu Fukushima, Takahiro Hohsaka, Masahiko Sisido, Four-Base Codon-Mediated Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Proteins in a Eukaryotic Cell-Free Translation System. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 99, 473-476.
3. Takahiro Hohsaka, Norihito Muranaka, Chie Komiyama, Kinue Matsui, Satomi Takaura, Ryoji Abe, Hiroshi Murakami, Masahiko Sisido, Position-Specific Incorporation of Dansylated Non-natural Amino Acids into Streptavidin by using a Four-Base Codon. *FEBS Lett.*, 2004, 560, 173-177.
4. Takahiro Hohsaka, Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Proteins through Extension of the Genetic Code. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2004, 77, 1041-1049.
5. 芳坂貴弘、遺伝暗号を拡張して人工蛋白質を合成する。 *化学と生物*, 2005, 11, 753-757.

特許 2 件

1. タンパク質と他の分子との相互作用を検出するためのタンパク質プローブ  
発明者 芳坂貴弘、出願人 科学技術振興機構、特願 2005-230768(国際出願申請中)

2. 非天然アミノ酸をタンパク質に導入するための tRNA 変異体  
発明者 芳坂貴弘、出願人 科学技術振興機構、特願 2005-329115

受賞 3 件

1. 芳坂貴弘、日本化学会進歩賞(平成 15 年 3 月 20 日)
2. 芳坂貴弘、東京テクノ・フォーラム21 ゴールドメダル(平成 15 年 4 月 16 日)
3. 芳坂貴弘、第4回バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞(平成 16 年 4 月 16 日)

招待講演 国際学会 1 件、国内学会 4 件

1. Takahiro Hoshaka, Extension of the genetic code and its application to position-specific incorporation of caged amino acids into proteins in a cell-free translation system, PACIFICHEM2005, Honolulu (2005.12.16)
2. 芳坂貴弘、遺伝暗号の拡張による人工タンパク質の合成とその応用、第52回高分子学会年会(2003.5.29)
3. 芳坂貴弘、遺伝暗号の拡張によるタンパク質の新規部位特異的修飾技術の開発、第20回日本 DDS 学会(2004.7.15)
4. 遺伝暗号の拡張による非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入、第27回分子生物学会年会(2004.12.9)
5. 芳坂貴弘、遺伝暗号を拡張した人工タンパク質合成システムの開発とその応用、日本薬学会第125年会(2005.3.30)