



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	部位特異的にアジドチロシンを導入したタンパク質の高効率調製法の構築( 内容と審査の要旨(Summary) )
Author(s)	朴, 明宣
Report No.(Doctoral Degree)	博士(工学) 甲第442号
Issue Date	2013-06-30
Type	博士論文
Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/46755">http://hdl.handle.net/20.500.12099/46755</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	朴 明 宣 (大韓民国)		
学位の種類	博 士 (工学)		
学位授与番号	甲第 442 号		
学位授与日付	平成 25 年 6 月 30 日		
専攻	物質工学専攻		
学位論文題目	部位特異的にアジドチロシンを導入したタンパク質の高効率調製法の構築 (Construction of a highly efficient system to express proteins containing azidotyrosine at desired positions)		
学位論文審査委員	(主査) 教授 吉田 豊和		
	(副査) 教授 横川 隆志	教授 纈 纈	守

### 論文内容の要旨

アジドチロシンはチロシンのベンゼン環 3 位にアジド基を持つ非標準アミノ酸であり、アジド基はホスフィン誘導体やアセチレン誘導体、ジベンジルシクロオクチンなどと化学選択的に結合する。アジド基は天然のタンパク質には存在しない官能基なので、タンパク質の特異的な部位にアジドチロシンを導入できれば、任意の部位に 1 ヶ所だけ任意の修飾を施すことができる。過去には、大腸菌無細胞翻訳系によるアジドチロシン含有タンパク質合成法が報告されているが、この方法では一度に得られる量は少ない。そこで、本研究では mg オーダーのアジドチロシン含有タンパク質を調製することを目的として、大腸菌生細胞を利用する方法の開発を行った。

大腸菌生細胞でアジドチロシン含有タンパク質を発現するためには、基質として標準アミノ酸を認識せず、アジドチロシンを特異的に認識できるアミノアシル-tRNA 合成酵素 (aaRS) が必要である。そこで、古細菌由来チロシル-tRNA 合成酵素 (TyrRS) が大腸菌由来のどの tRNA も基質としない点に着目し、メタン生成古細菌 *Methanosarcina acetivorans* TyrRS とそれに対応できるアンバーサプレッサー tRNA を構造的に発現できるプラスミドを作製した。TyrRS のチロシン認識部位にあたると思われる 5 ヶ所にランダムな変異を導入し、アジドチロシンを特異的に認識できる TyrRS を選別した。この TyrRS 変異体とアンバーサプレッサー tRNA 遺伝子を含むプラスミドを大腸菌に導入し、またカルモデュリン遺伝子の 80 番目をアンバーコドンに変異させた (CaM80<sub>am</sub>) 発現ベクターを利用して、80 位にアジドチロシンを導入したカルモデュリン (CaM) を発現することを試みた。しかし、T7 プロモーター下に CaM80<sub>am</sub> を配したプラスミドでは、完全長の CaM を発現することができなかった。この原因が、T7 RNA polymerase の転写速度が早すぎるためではないかと考えて、大腸菌 RNA polymerase が認識する tac プロモーター下に CaM80<sub>am</sub> を配した発現ベクターを作製して再度発現を試みた結果、今度は完全長の CaM が発現された。

この CaM 変異体にアジドチロシンが導入されているかを調べるために、アジド基選択的な蛍光修飾を行った。蛍光化ジベンジルシクロオクチン誘導体を用いて野生型の CaM と CaM 変異体とをそれぞれ反応させた結果、CaM 変異体にのみ蛍光が観察された。この結果から、大腸菌生細胞を利用してアジドチロシン含有タンパク質が発現できることが示されたが、今後アジドチロシン含有タンパク質を利用して、そのタンパク質の構造・機能研究を行うためには、一度の培養でより多くのアジドチロシン含有タンパク質が発現するほうが好都合である。そこで、菌体内のアジドチロシル-tRNA の存在量を増加させれば、アンバーコドンがより効率よくサプレッサーされ、CaM 変異体の発現量が増加するのではないかと考え、アラビノースで発現の調節が可能な TyrRS 変異体遺伝子を追加した。この結果、CaM 変異体の発現量は 3 倍に増加した。

発現された CaM 変異体を質量分析で分析したところ、アジドチロシンは 80 位にのみ導入されていることがわかった。しかし、導入されたはずのアジドチロシンが、かなりの割合でアミノチロシンに還元されていることがわかった。そのため、アミノチロシンへの還元が起きにくく、アジドチロシン含有タンパク質の発現に適した宿主を検討した。その結果、大腸菌 SHuffle (K12) 株で発現した場合、100ml 培養あたり 2mg の CaM 変異体を発現し、導入されたアジドチロシンはほとんど還元されていないことが明らかになった。

ここまでの検討で、アジドチロシン含有タンパク質を効率的に発現する方法を確立することができたので、次にその利用法として、アジドチロシン含有タンパク質をアジド基選択的にビーズに固定化し、そのタンパク質と相互作用する分子の捕獲を試みた。まず、アミノ基が提示されたナノ磁性ビーズ (FG ビーズ) をジベンジルシクロオクチンが結合したスクシンイミジルエステルと反応させた。得られたジベンジルシクロオクチンが提示された FG ビーズに、72 位にアジドチロシンを導入した CaM を結合させた。このビーズを利

用して、マウス脳細胞抽出液に含まれる CaM 結合タンパク質を捕獲し、質量分析で分析した結果、phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)、Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)、alpha-enolase (ENOA)、malate dehydrogenase1 (MDH1)、及び annexin A5 (ANXA5) と Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の 6 種類のタンパク質が同定された。このタンパク質のうち、PGK1 以外のタンパク質は CaM との関係が明らかになっていないものであった。そこで、アジドチロシンが有する UV 照射によって近隣の分子と結合できる光クロスリンク能を利用して、捕獲したタンパク質が CaM と複合体を形成するかどうかを調べた。まず、PGK1、GPI、ENOA、MDH1、及び ANXA5 の 5 種類を大腸菌でそれぞれ発現させた。次に、CaM を固定化した 72 位とは異なる向きにある 80 位にアジドチロシンを導入した CaM を調製し、各々のタンパク質と光クロスリンク反応を行った。この結果、PGK1、ENOA、MDH1、及び ANXA5 は CaM との複合体が確認されたことから、これらのタンパク質が確かに CaM と相互作用している可能性が示された。一方、GPI は CaM との複合体を確認できなかったため、CaM と直接相互作用するか検証できなかった。

以上、本研究で開発した技術を用いれば、タンパク質遺伝子にアンバー変異を導入することで、タンパク質の種類によらず、アジドチロシンをアンバーコドン特異的に導入することができ、そのアジド基を足がかりとして蛍光プローブの導入や光クロスリンク反応に用いることができる。本研究がタンパク質間相互作用を調べる新たな方法として認知され、広く利用されることを期待する。

### 論文審査結果の要旨

この論文は、生物が通常はタンパク質合成に利用していないアミノ酸の一つであるアジドチロシンを部位特異的に含むタンパク質を、大腸菌生細胞を用いて簡便に、かつ効率的に合成する手法を確立したこと、また、実際に得られたアジドチロシン含有タンパク質をプロテオミクス研究のための有用なツールとして利用する手法を開拓したことが、主な内容である。以下に、その内容を簡潔に述べる。

第一章には、アジドチロシンが部位特異的に導入されたタンパク質を大腸菌生細胞に発現させる意義が記載されている。アジドチロシン中のアジド基は化学選択的な化学反応が存在する点で有用な官能基である。

一方、アジド基は天然のタンパク質には存在しないのでタンパク質の特定の部位にアジドチロシンを導入できれば、タンパク質の任意の部位に任意の修飾を施すことが可能である。これまでの無細胞タンパク質合成系を用いる方法では、得られるアジドチロシン含有タンパク質が少量であるという課題があった。そこで、申請者は、大腸菌生細胞を用いて得られるタンパク質量を増大させることを計画している。

第二章には、大腸菌生細胞にアジドチロシン含有タンパク質を発現させる戦略と、実際の実験結果が記載されている。申請者は分子進化学の手法を駆使することによって、大腸菌内のいかなるアミノアシル tRNA 合成酵素にも認識されないアンバーサプレッサー tRNA<sup>Tyr</sup> (WB-tRNA<sup>Sup</sup>) と、アジドチロシンを認識するがチロシンは認識しないチロシル tRNA 合成酵素変異体 (R3YRS) の取得に成功している。ここで、WB-tRNA<sup>Sup</sup> と R3YRS を大腸菌 SHuffle 株内で共発現させることによって、部位特異的にアジドチロシンを含んだカルモデュリンを 100 ml の培養あたり 2 mg 得ることに成功している。

第三章には、第二章で得られた部位特異的にアジドチロシンを含むカルモデュリンをプロテインフィッシングに用いることによって、カルモデュリンと相互作用するタンパク質群を効率的に回収できたことが記載されている。実際、これまで相互作用するという報告のないタンパク質がいくつか捕獲されている。さらにアリアルアジドが光架橋反応を起こすことを利用して、タンパク質間相互作用を検証する手法を確立している。

以上、この論文では、簡便にアジドチロシンを部位特異的に含んだタンパク質を調製できること、アジドチロシン含有タンパク質を利用してプロテオミクス研究に貢献できること、を示した点において高く評価できる。したがって、この論文を学位論文に値するものと判定した。

また、これらの結果は、以下の査読付き論文に掲載または受理されている。

1. A. Ikeda-Boku, S. Ohno, Y. Hibino, T. Yokogawa, N. Hayashi and K. Nishikawa

A simple system for expression of proteins containing 3-azidotyrosine at a pre-determined site in *Escherichia coli*.

*J. Biochem.*, 153, 317-326 (2013).

2. A. Ikeda-Boku, K. Kondo, S. Ohno, E. Yoshida, T. Yokogawa, N. Hayashi and K. Nishikawa

Protein fishing using magnetic nano-beads containing calmodulin site-specifically immobilized via an azido-group.

J. Biochem., (2013) in press.

### 最終試験結果の要旨

(1) 公表論文

この論文の主要部分は2編の審査付き論文として既に公表済みあるいは受理済みである。この論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

(2) 修得単位

指定された単位を修得していることを確認した。

(3) 審査

公聴会までに、指導教員ならびに審査委員の審問に対して十分な回答がなされた。

5月21日13:00より公聴会を開催し、学位論文の内容全体にわたって30分間のプレゼンテーションを行った後、約20分間、質疑応答を行った。申請者は、質問に対して的確に解答した。公聴会後に開催された学位審査委員会で審議の結果、申請者は最終試験に合格と判定した。