

博士論文

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

2013 年 6 月

岐阜大学工学研究科物質工学専攻

朴 明宣

目次

第 1 章	序論	1
	参考文献	12
第 2 章	大腸菌生細胞を利用したアジドチロシン含有タンパク質の発現	16
II-I.	背景と目的	16
II-II.	材料	20
II-III.	方法	23
II-III-I.	<i>M. acetivorans</i> 由来 TyrRS/tRNA ^{Tyr} 発現ベクターの構築	31
II-III-II.	pRNAPro プラスミドへの <i>M. acetivorans</i> TyrRS 遺伝子と tRNA ^{Tyr} (CUA) 遺伝子の導入	31
II-III-III.	大腸菌内在性 aaRSs に認識されない アンバーサプレッサー tRNA ^{Tyr} の選別	32
II-III-IV.	3 位置換チロシンアナログを基質として 認識できる <i>M. acetivorans</i> 由来 TyrRS の選別	33
II-III-V.	β -Galactosidase enzyme assay による アンバーサプレッション活性の検定	34
II-III-VI.	pRP_WB-Sup&R3YS へのアラビノース誘導 R3YS 遺伝子の導入	34
II-III-VII.	カルモデュリン発現用ベクターの構築	36
II-III-VIII.	N ₃ -Y を部位特異的に導入したカルモデュリンの発現と精製	36
II-III-IX.	発現したカルモデュリン変異体の LC-MS 分析	37
II-III-X.	発現したカルモデュリン変異体のアジド基選択的蛍光修飾	38
II-III-XI.	カルモデュリン結合ペプチド融合黄色蛍光タンパク質の 発現と精製	38
II-III-XII.	カルモデュリンと CBP-YFP との光クロスリンク反応	40

II-IV. 結果と考察	41
II-IV-I. 大腸菌内在性 aaRSs に認識されない	
WB-tRNA ^{Sup} のスクリーニング	41
II-IV-II. 3 位置換チロシンアナログを特異的に認識する	
<i>M. acetivorans</i> TyrRS 変異体のスクリーニング	45
II-IV-III. R3YRS の基質認識	47
II-IV-IV. N ₃ -Y を部位特異的に導入したカルモデュリンの発現	49
II-IV-V. 発現したカルモデュリンの蛍光修飾	50
II-IV-VI. pRP_WB-Sup&R3YS への	
アラビノース誘導可能な R3YS 遺伝子の導入	54
II-IV-VII. 様々な大腸菌株を利用した CaM80N ₃ -Y の発現	55
II-IV-VIII. CaM80N ₃ -Y と CBP-YFP の光クロスリンク反応	58
参考文献	61

第3章 3-アジドチロシンを介して部位特異的に固定化した

タンパク質を利用した相互作用分子の捕獲	65
III-I. 背景と目的	65
III-II. 材料	68
III-III. 方法	69
III-III-I. 部位特異的に N ₃ -Y を導入した	
カルモデュリンの調製	69
III-III-II. アジド基を介してカルモデュリンを固定化したビーズの作製	69
III-III-III. FG-CaM72 ビーズを用いたカルモデュリンと	
相互作用するタンパク質の捕獲	71
III-III-IV. 溶出したタンパク質の同定	72
III-III-V. マウス由来タンパク質のクローニングと発現	74

III-IV. 結果と考察	76
III-IV-I. 部位特異的にタンパク質を固定化したビーズの作製	76
III-IV-II. カルモデュリン固定化ビーズによる相互作用タンパク質の捕獲	76
III-IV-III. 質量分析による捕獲したタンパク質の同定	78
III-IV-IV. CaM80N ₃ -Y と PGK1 の光クロスリンク反応	80
III-IV-V. 捕獲されたタンパク質と CaM80N ₃ -Y との 光クロスリンク反応 (Ca ²⁺ 存在下)	82
III-IV-VI. 捕獲されたタンパク質と CaM80N ₃ -Y との 光クロスリンク反応(Ca ²⁺ 非存在下)	84
参考文献	87
第4章 総括	91
参考文献	94
発表論文	96
謝辞	97

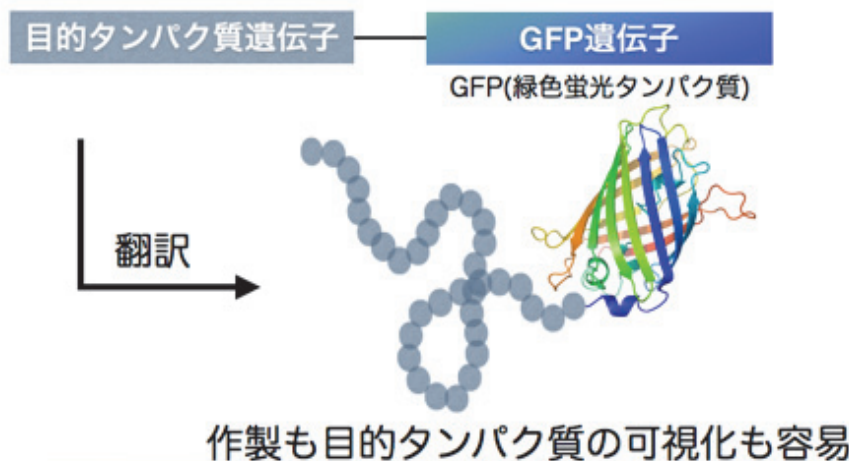
第1章 序論

タンパク質は原則として 20 種類の L- α -アミノ酸 (標準アミノ酸) で構成されている。20 種類の標準アミノ酸はそれぞれ異なる化学的性質を持ち、その標準アミノ酸の組み合わせでタンパク質の機能が決まっている。ヒトゲノムが解読され、ヒトが約 20,000 種類の遺伝子を持つことが報告された [1-1,2]。しかし、これらの遺伝子から作られるタンパク質の機能は依然としてわかっていないものがほとんどであり、これらのタンパク質の機能を調べる研究が進められている。タンパク質の機能を調べるうえで、目的とするタンパク質の相互作用分子を同定し、タンパク質の機能を推定する研究が行われている。タンパク質の相互作用を調べるための方法として様々な方法が開発されてきたが、その中にタンパク質を蛍光分子により標識し、タンパク質を可視化する方法が使われている。過去に、多くの研究者らによってこの標識タンパク質を利用して、細胞内での目的タンパク質の動態観察や FRET を利用した相互作用解析が行われてきた [1-3~10]。タンパク質を標識する方法には、遺伝子工学的な手法と、有機化学的に合成した標識分子でタンパク質を化学修飾する手法がある (図1-1)。

遺伝子工学的な手法としては、蛍光タンパク質の遺伝子を目的タンパク質の遺伝子とつなげる方法がある [1-3~9]。この方法は、融合した蛍光タンパク質の作製も容易で、かつ生細胞中で目的タンパク質を可視化できる点で非常に優れている。しかし、蛍光タンパク質の分子量が大きく、かさ高いため、目的タンパク質の機能に影響を与えてしまう可能性がある。また、蛍光タンパク質の融合部位が目的タンパク質の両末端に限定されてしまうという問題がある。

それに対して、有機化学的に合成した蛍光分子でタンパク質を化学修飾する手法は、一般にタンパク質に内在するリジン残基のアミノ基を標的としてアミノ基選択的に化学修飾する方法が使われる [1-10~13]。しかしながら、タンパク質 1 分子にリジン残基は多数存在するため、ラン

遺伝子工学的な手法

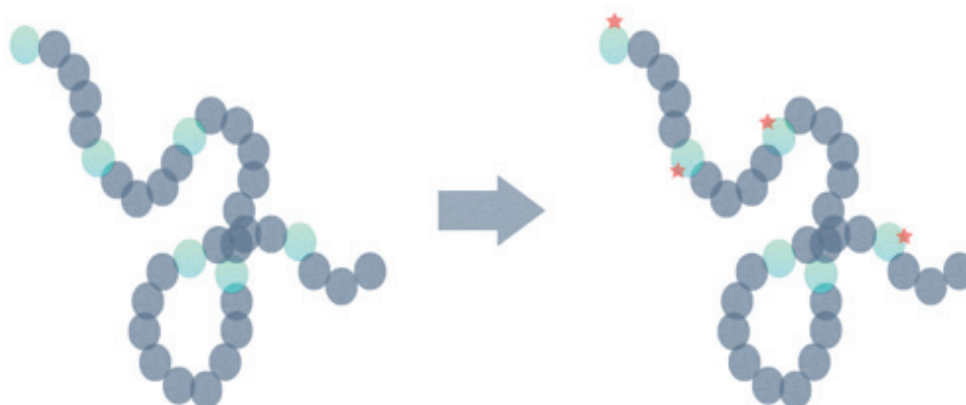


課題

GFPはかさ高い
→より小さい蛍光分子
の導入

GFPは末端修飾のみ
→目的タンパク質の様々
な部位に修飾したい

有機化学的に合成した標識分子を化学修飾する手法



作製も容易で、修飾する標識分子も小さい

課題

複数箇所が修飾される
→一分子のタンパク質の
1箇所にのみ修飾したい

修飾箇所がランダム
→目的タンパク質の
狙った部位に修飾したい

図1-1. タンパク質の修飾法

ダムな部位で修飾が起こり、タンパク質 1 分子に修飾される蛍光分子の数を制御できないという問題点がある。

タンパク質を部位特異的に標識するために、システイン残基を持たないタンパク質にあえてシステイン残基を導入し、チオール基選択的にタンパク質を蛍光修飾した例が報告されている [1-14~17]。この方法により、かさ高くない蛍光分子でタンパク質を標識できるようになったが、この方法はシステイン残基を持たないタンパク質や遺伝子工学的にシステイン残基を除いたタンパク質に利用可能であるが、全てのタンパク質に対して利用できる方法ではない。

近年、タンパク質の機能に影響を与えない部位に、任意の修飾を施す手法として、20 種類の標準アミノ酸以外のアミノ酸 (非標準アミノ酸) をタンパク質に導入する技術が開発されている [1-18~25]。

標準アミノ酸には専用のアミノアシル-tRNA合成酵素 (aaRS)、tRNA が存在し、それぞれのペアが交差反応を起こさないように厳密に制御されている。これら 20 種類の aaRS/tRNA ペアと交差反応を起こさずに、タンパク質に非標準アミノ酸を導入するためには、非標準アミノ酸専用の tRNA を作製し、その 3' 末端に特異的に非標準アミノ酸を結合させる必要がある。tRNA に非標準アミノ酸を結合させる方法として、有機化学的に合成した p(dC)pA-非標準アミノ酸を tRNA に結合させる方法と aaRS を利用する方法がある。

Chemical acylation 法を利用した非標準アミノ酸含有タンパク質の合成

Hecht らは tRNA の 3'末端に有機化学的に合成した p(dC)pA-標準アミノ酸を T4 RNA ligase で結合させる chemical acylation 法を提唱した [1-26]。この方法により、アルギニンやアラニンを結合した tRNA^{Phe} を作製することに成功している。Noren らは chemical acylation 法を利用して、*in vitro* 転写によってアンチコドンが CUA、すなわち UAG (アンバー) コドンを読める tRNA (Δ CA) を作製し、その 3'末端に有機化学的に合成した p(dC)pA-非標準アミノ酸を T4 RNA ligase で結合させた。そして、chemical acylation 法によって作製した非標準アミノアシル-tRNA と共に標的タンパク質遺伝子内にアンバーコドンを導入したプラスミド DNA を無細胞翻訳系に加えることで、非標準アミノ酸をタンパク質へ部位特異的に導入することに成功している (図1-2)[1-27,28]。さらに、Sisido、Hohsaka らは非標準アミノ酸をチャージする tRNA として、アンチコドンに四塩基を持つ tRNA を作製した (図1-3) [1-29~31]。この方法は標的遺伝子の非標準アミノ酸を導入したい部分のコドンに 4 塩基コドンに置換しておき、この部位が 3 塩基コドンとして読まれた場合には直後に現れる終止コドンによってタンパク質合成が停止するように設計してある。Chemical acylation された 4 塩基コドンを持つ tRNA が取り込まれた場合は、直後の終止コドンがフレームシフトにより読み過ごされて完全長の標的タンパク質が合成される。この方法を利用して、現在までに蛍光アミノ酸や PEG 修飾アミノ酸などがタンパク質の部位特異的に導入されてきた [1-32-34]。

この化学的に非標準アミノ酸を tRNA に結合させる方法は p(dC)pA-非標準アミノ酸を化学合成できさえすれば、タンパク質に導入できる点で優れている。しかし、この方法で化学合成された非標準アミノアシル-tRNA は turn-over しない (一度きりしか使用できない) ため、標的タンパク質の合成量は低いという問題点がある。

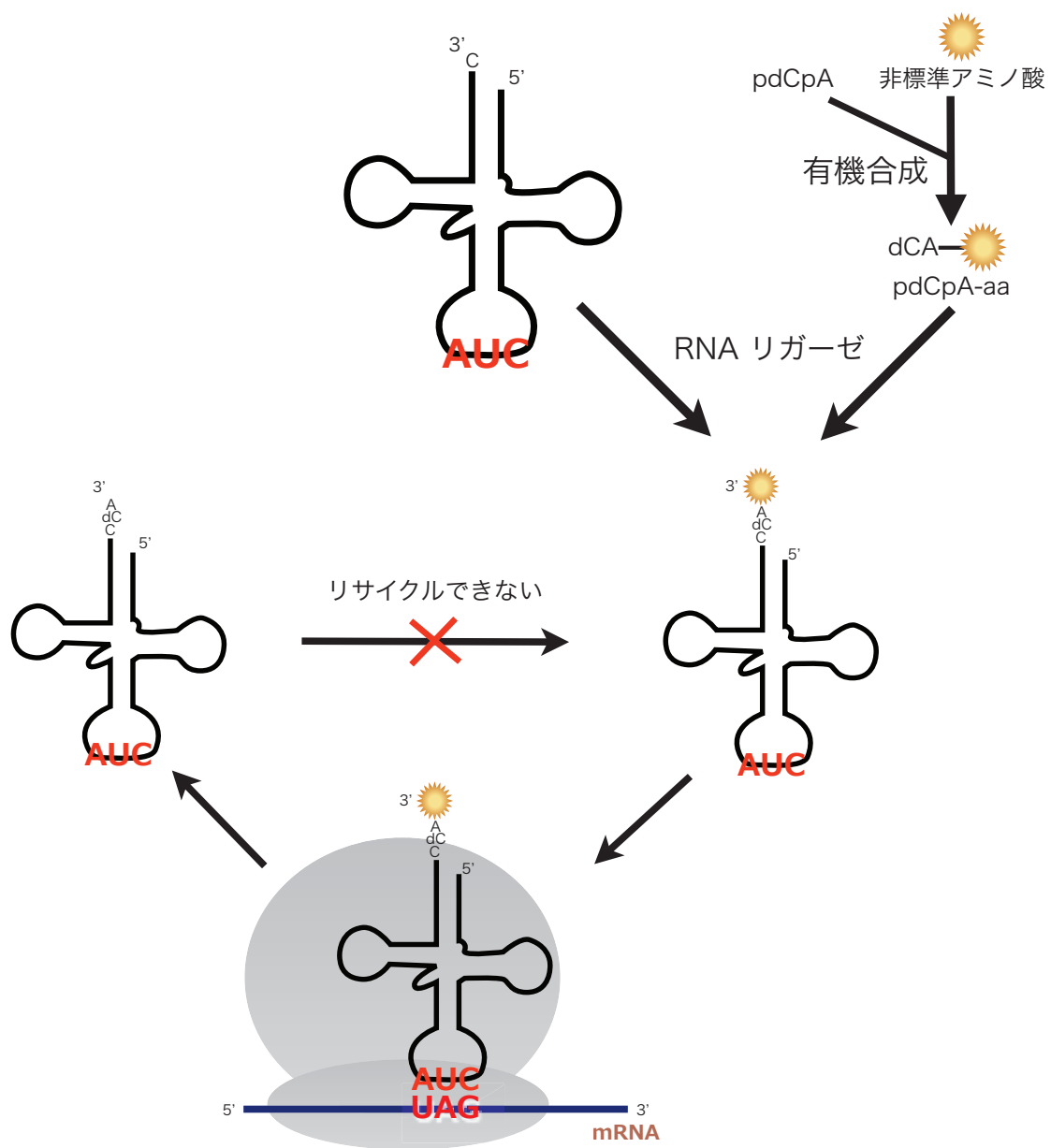
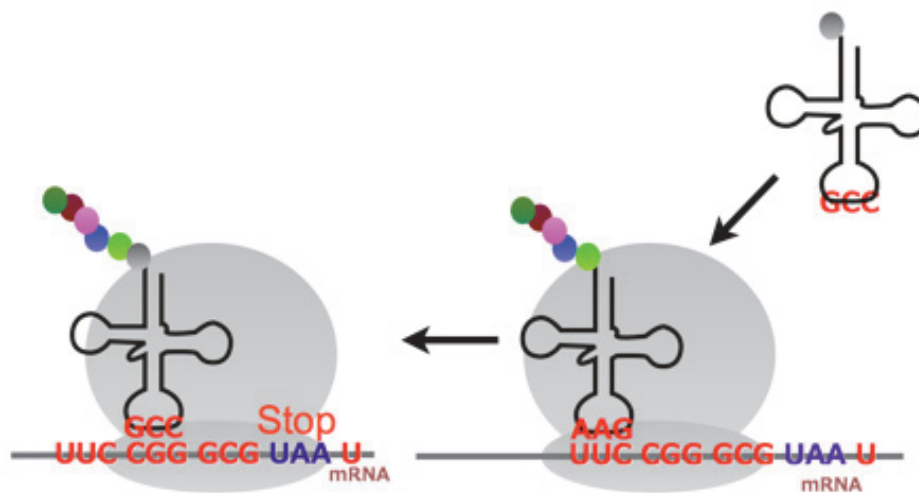


図1-2. Chemical acylation 法によるタンパク質への非標準アミノ酸導入

通常の三塩基コドンとして読まれた場合



四塩基コドンとして読まれた場合

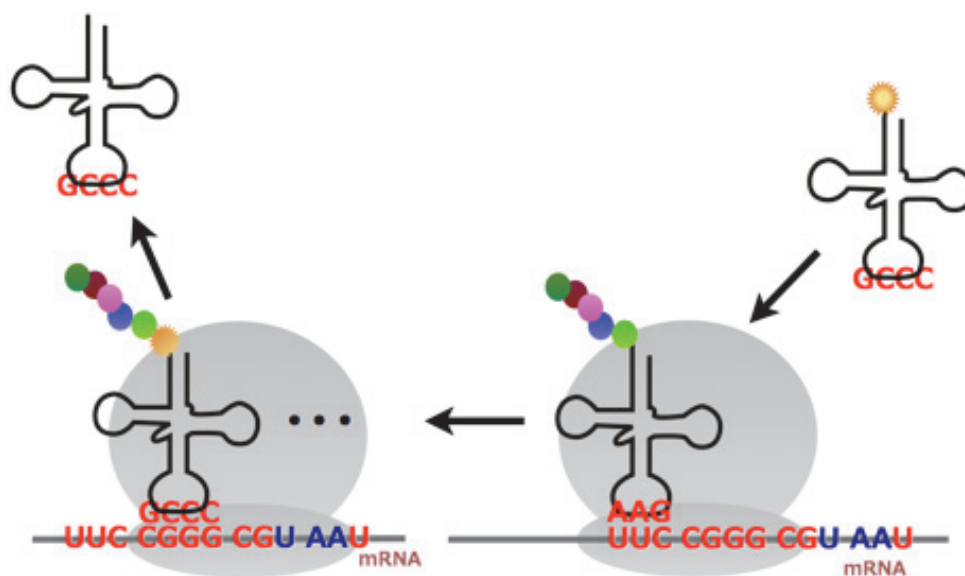


図1-3. 四塩基コドン法によるタンパク質への非標準アミノ酸導入

基質特異性を改変した酵素を用いる非標準アミノ酸含有タンパク質の合成

非標準アミノ酸含有タンパク質の合成量を向上させるために、aaRS 変異体を用いて非標準アミノアシル-tRNA が turn over させる試みがなされている。Ohno らは (1) 酵母 tRNA^{Tyr} が大腸菌 tRNAs とは異なり、C1-G72 対を有すること、(2) 酵母 tRNA^{Tyr} と大腸菌 tRNA^{Tyr} では、可変ループの長さが異なることから、それぞれが交差反応を起こさない (orthogonal である) ことに着目し、大腸菌無細胞翻訳系における非標準アミノ酸の運び屋として酵母由来 TyrRS 変異体とアンバーサプレッサー tRNA^{Tyr} を利用することを提唱した [1-35]。また、*Bacillus stearothermophilus* 由来 TyrRS の結晶構造を参考に、チロシンの 3 位の認識に関わると考えられる 43 番目のチロシン残基 (Y43) をグリシンに変異させたところ、チロシンの 3 位にヨード原子やブロモ原子、アジド基など様々な官能基が付加した非標準アミノ酸を認識できることを報告した [1-36]。そしてこれらを基に、無細胞翻訳系にこの TyrRS 変異体およびアンバーサプレッサー tRNA と標的タンパク質遺伝子内にアンバー変異を加えた遺伝子を加えることで、標的タンパク質へ部位特異的にアジドチロシン (N₃-Y) を導入できることを報告した [1-37]。

このように aaRS を改変して非標準アミノ酸を認識できるようにすることで、Chemical acylation 法ではリサイクルされなかった反応後のデアシル tRNA が、改変した aaRS により再び非標準アミノアシル-tRNA となるため chemical acylation 法によるタンパク質合成法よりも高いタンパク質合成量が期待された (図1-4)。

しかしながら、反応条件によってはアンバーコドン部位にアジドチロシンが導入されたタンパク質と元の基質であったチロシンが導入されたタンパク質の両方が合成されるという問題点があった。その理由として、この TyrRS 変異体 (Y43G) はチロシン結合ポケット内にある Y43 残基をより小さなアミノ酸であるグリシンに点変異させることで TyrRS の基質認識が甘くなり、3 位置換チロシンアナログも許容できるようになったものである。そのため、この Y43G 変異体には

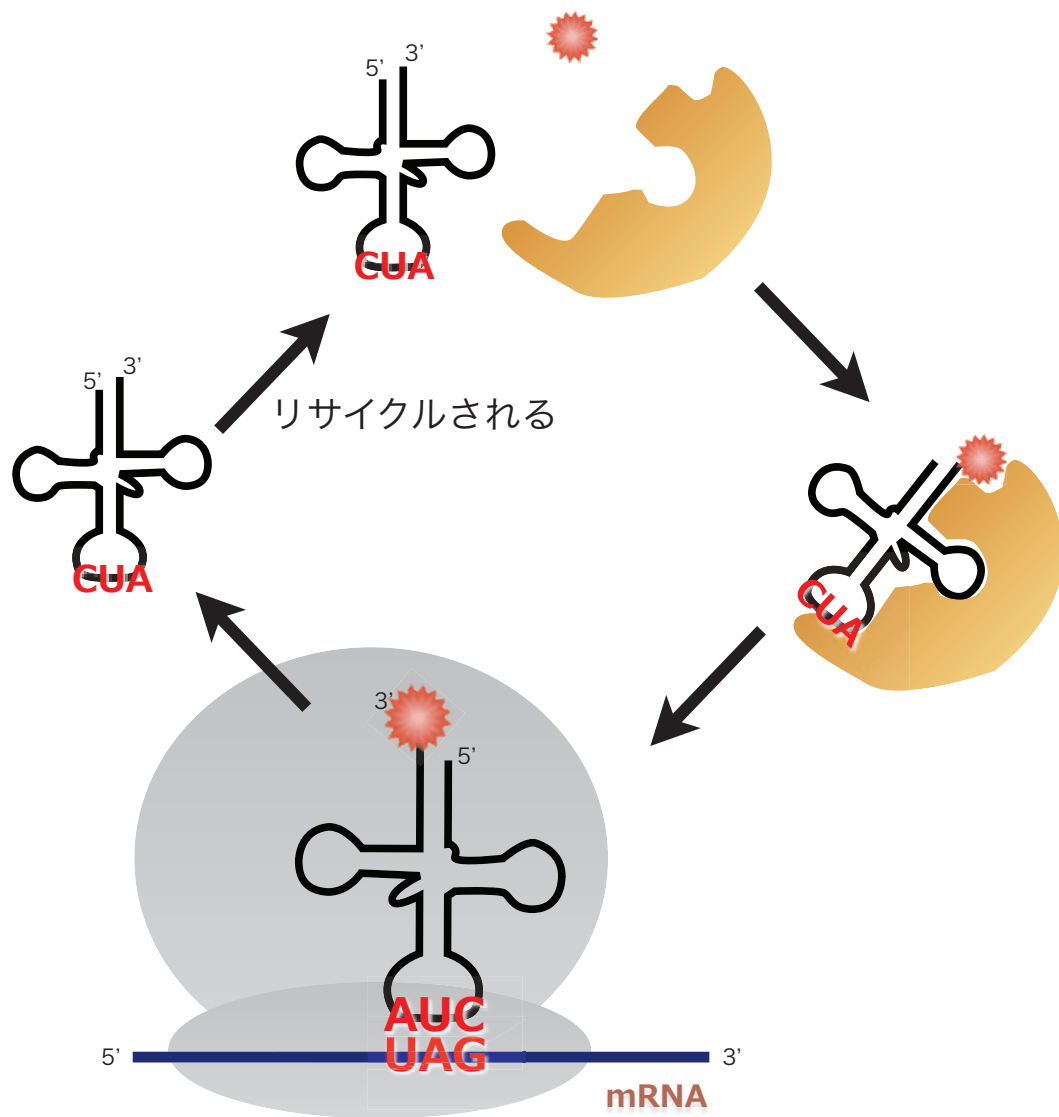


図1-4. 酵素的にアミノアシル化した tRNA を利用した非標準アミノ酸含有タンパク質の合成法

まだチロシンを基質として認識する能力が残っており混在する結果となっていた。そこで、非標準アミノ酸含有タンパク質のみを合成するためには、より大規模に aaRS のアミノ酸結合ポケットを改変し、どの標準アミノ酸も認識せず、特定の非標準アミノ酸のみを認識する TyrRS 変異体を作製する必要がでてきた。

Wang らは古細菌 *Methanocaldococcus jannaschii* 由来 TyrRS が大腸菌のどの tRNA も基質として認識しないことに着目した。そして、*M. jannaschii* 由来 tRNA^{Tyr} にランダム変異を導入し、どの大腸菌由来 aaRS にも受容されないアンバーサプレッサー tRNA^{Tyr} (tRNA^{Tyr}(CUA)) を2段階のポジティブ、ネガティブセレクションによって選別した [1-38]。そして、TyrRS のチロシン結合ポケットの 5ヶ所にランダム変異を導入してセレクションを行った結果、標準アミノ酸をほとんど認識せず、非標準アミノ酸である *O*-methyl-L-tyrosine を特異的に認識する変異体を作製し、大腸菌生細胞中で *O*-methyl-L-tyrosine をタンパク質へ部位特異的に導入できることを報告した [1-39]。彼らはこの aaRS のアミノ酸結合ポケットにランダム変異を加える方法を利用して、現在までに 30 種類以上の aaRS を作製し、様々な非標準アミノ酸をアンバーコドン特異的にタンパク質に導入することに成功している [1-18~25, 40]。さらに、彼らは大腸菌生細胞中で非標準アミノ酸含有タンパク質の発現量を増やすために、アラビノースで誘導可能なプロモーターを非標準アミノ酸を認識する TyrRS 変異体を発現するプラスミドに導入し、細胞内非標準アミノアシル-tRNA_(CUA) の存在比を高めることで非標準アミノ酸含有タンパク質の発現量を増加させた [1-41]。

最近、*Methanosarcina* 属において、メチルアミンメチルトランスフェラーゼ遺伝子内に TAG コドンがあり、この TAG コドンは終止コドンとして使われるのではなく、ピロリシンが導入されていることがわかった [1-42~44]。ピロリシンはリジンの ε アミノ基にピロリン環が結合した構造をしており、一部のメタン生成古細菌でのみ利用されている非標準アミノ酸である。ピロリシン含有タンパク質が合成されるメカニズムを調べると、ピロリシン専用のピロリシル-tRNA 合成酵素 (PylRS) と tRNA^{Pyl}(CUA) が存在し、tRNA^{Pyl}(CUA) は天然でアンバーコドン専用の tRNA として働くことがわかった。そのため、この PylRS のアミノ酸認識部位を改変しさえすれば、ピロリシン

以外の非標準アミノ酸をアンバーコドン特異的に導入できることになる。Chen らはこれを利用して、*Methanosarcina mazei* PylRS のアミノ酸認識部位にランダムに変異を加え、*O*-nitrobenzyl-oxycarbonyl-*N*^ε-L-lysine を特異的に認識できる PylRS を作製した [1-45]。また、Mukai らは *M. mazei* 由来 PylRS がアミノ酸認識部位への変異無しに *N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-L-lysine を基質として tRNA^{Pyl} にチャージでき、その結果アンバーコドン特異的にタンパク質へ導入できることを報告している [1-46]。同様に、Polycarpo らは *Methanosarcina bakeri* 由来 PylRS が変異を加えることなく、*N*-ε-D-prolyl-L-lysine や *N*-ε-cyclopentyloxycarbonyl-L-lysine を基質として認識し、tRNA^{Pyl} をアミノアシル化することを報告した [1-47]。また、Nozawa らは *Desulfitobacterium hafniense* PylRS と tRNA^{Pyl} の結晶構造を解析した結果、PylRS は tRNA^{Pyl} のアンチコドン領域と相互作用していないことを示した [1-48]。これを利用して、Wan らは tRNA^{Pyl} のアンチコドンをアンバーコドンではなく、オーカーコドンを読めるように改変し、TyrRS 変異体 / tRNA^{Tyr} 対と組み合わせることで2種類の非標準アミノ酸をタンパク質に導入することに成功している [1-49]。これら生細胞を利用した非標準アミノ酸含有タンパク質の合成は、非標準アミノ酸を基質とする aaRS と内在性 aaRSs に認識されないアンバーサプレッサー tRNA の作製こそ難しいものの、一度作製できさえすれば、無細胞翻訳系よりも大量の非標準アミノ酸含有タンパク質を合成できる可能性がある。

このようにしてタンパク質へ部位特異的に導入した非標準アミノ酸を利用して、現在までに様々な研究がなされている。Chapman、Schultz らは大腸菌の生育に関わるシャペロン、GroEL 内に *M. jannaschii* 由来 TyrRS 変異体 / アンバーサプレッサー tRNA を利用して、蛍光化アミノ酸 1-(7-hydroxy coumarin-4-yl) ethylglycine を部位特異的に導入した [1-24, 50]。そして、大腸菌細胞中で蛍光標識 GroEL を発現させ、その細胞内動態を観察したところ、通常の条件とストレス条件では異なる細胞内分布を示した [1-48]。また、Hino らはクロスリンカーの一種であるベンゾフェノンを含む非標準アミノ酸、*p*-trifluoromethyl-diazirinyll-L-phenylalanine を癌化に関わるタンパク質 GRB2 へ部位特異的に導入し、発現させた細胞に UV 照射することで光クロスリンク反応を起こ

し、標的タンパク質と相互作用することを確認した [1-51]。このように、蛍光分子や光クロスリンカーが付加された非標準アミノ酸をタンパク質に導入することで、翻訳されたタンパク質に含まれる非標準アミノ酸は細胞外だけでなく、細胞内でも機能を発揮することができる点で優れている。

これらの点を踏まえ、本研究では大腸菌生細胞を利用して N₃-Y 含有タンパク質を大量に発現する方法の開発を目的に、大腸菌内在性 aaRSs と交差反応を起こさない、メタン生成古細菌 *Methanosarcina acetivorans* 由来 TyrRS / tRNA^{Tyr} ペアを選択し、先ず TyrRS の基質特異性の改変を行うこととした。 *M. acetivorans* 由来 TyrRS のチロシン結合ポケット中にある 5 つのアミノ酸残基にランダム変異を加えたライブラリーを作製し、チロシンを含む標準アミノ酸を認識せず、3 位置換チロシンのみを認識する変異体の作製を試みた。そして、作製した変異体を利用して、N₃-Y 含有タンパク質の発現条件の検討を行った。 N₃-Y をタンパク質の部位特異的に導入することにより、以下に示すようなタンパク質の相互作用解析法に利用できると考えている。

① アジド基は天然のタンパク質には存在しない官能基であり、アジド基選択的な有機化学反応がある。この反応を利用すれば、タンパク質に導入したアジド基選択的に、ホスフィン、アルキンを含む化合物をタンパク質の特異的な部位に結合させることができる。

② アリールアジドは光クロスリンカーとして利用可能で、N₃-Y 含有タンパク質と相互作用する分子を共有結合的に捕獲できる。現在までに、アリールアジドを有する非標準アミノ酸として *p*-azido-L-phenylalanine がタンパク質に導入され、光クロスリンカーとして利用されている [1-20]。この 2 種類の非標準アミノ酸を比較すると、N₃-Y はパラ位に水酸基があるので、*p*-azido-L-phenylalanine よりも長波長側の光でクロスリンク反応を起こせる。そのため、N₃-Y は *p*-azido-L-phenylalanine より UV 照射によってタンパク質に与えるダメージが少ない利点がある。

参考文献

- 1-1. International Human Genome Sequencing Consortium. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431(7011)**, 931-945
- 1-2. International Human Genome Sequencing Consortium. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409(6822)**, 860-921
- 1-3. Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20(11)**, 448-455
- 1-4. Crivat, G., and Taraska, J.W. (2012) Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends Biotechnol.* **30(1)**, 8-16
- 1-5. Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods.* **2(12)**, 905-909
- 1-6. Telford, W.G., Hawley, T., Subach, F., Verkhusha, V., and Hawley, R.G. (2012) Flow cytometry of fluorescent proteins. *Methods* **57(3)**, 318-330
- 1-7. Mitra, R.D., Silva, C.M., and Youvan, D.C. (1996) Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* **173(1)**, 13-17
- 1-8. van, Roessel, P., and Brand, A.H. (2002) Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat. Cell Biol.* **4(1)**, 15-20
- 1-9. Day, R.N., Nordeen, S.K., and Wan, Y. (1999) Visualizing protein-protein interactions in the nucleus of the living cell. *Mol. Endocrinol.* **13(4)**, 517-526
- 1-10. Jameson, D.M., and Seifried, S.E. (1999) Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization. *Methods* **19(2)**, 222-233
- 1-11. McFarland, J.M., and Francis, M.B. (2005) Reductive alkylation of proteins using iridium catalyzed transfer hydrogenation. *J. Am. Chem. Soc.* **127(39)**, 13490-13491
- 1-12. Scheck, R.A., and Francis, M.B. (2007) Regioselective labeling of antibodies through N-terminal transamination. *ACS Chem. Biol.* **2(4)**, 247-251
- 1-13. Tanaka, K., Kitadani, M., and Fukase, K. (2011) Target-selective fluorescent "switch-on" protein labeling by 6 π -azaelectrocyclization. *Org. Biomol. Chem.* **9(15)**, 5346-5349
- 1-14. Chilkoti, A., Chen, G., Stayton, P.S. and Hoffman, A.S. (1994) Site-specific conjugation of a temperature-sensitive polymer to a genetically-engineered protein. *Bioconjug. Chem.* **5(6)**, 504-507

- 1-15. Hamman, B.D., Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., Traut, R.R., and Jameson, D.M. (1996) Rotational and conformational dynamics of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12. *Biochemistry* **35**(51), 16672-16679
- 1-16. Allen, M.W., Urbauer, R.J., Zaidi, A., Williams, T.D., Urbauer, J.L., and Johnson, C.K. (2004) Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments. *Anal. Biochem.* **325**(2), 273-284
- 1-17. Bernardes, G.J., Chalker, J.M., Errey, J.C., and Davis, B.G. (2008) Facile conversion of cysteine and alkyl cysteines to dehydroalanine on protein surfaces: versatile and switchable access to functionalized proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **130**(15), 5052-5053
- 1-18. Wang, L., Zhang, Z., Brock, A., and Schultz, P.G. (2003) Addition of the keto functional group to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(1), 56-61
- 1-19. Wang, L., Brock, A., Herberich, B., and Schultz, P.G. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* **292**(5516), 498-500
- 1-20. Chin, J.W., Santoro, S.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L., and Schultz, P.G. (2002) Addition of *p*-Azido-*L*-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **124**(31), 9026-9027
- 1-21. Bose, M., Groff, D., Xie, J., Brustad, E., and Schultz, P.G. (2006) The incorporation of a photoisomerizable amino acid into proteins in *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **128**(2), 388-389
- 1-22. Brustad, E., Bushey, M.L., Lee, J.W., Groff, D., Liu, W., and Schultz, P.G. (2008) A genetically encoded boronate-containing amino acid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**(43), 8220-8223
- 1-23. Chin, J.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L., and Schultz, P.G. (2002) Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(17), 11020-11024
- 1-24. Wang, J., Xie, J., and Schultz, P.G. (2006) A genetically encoded fluorescent amino acid. *J. Am. Chem. Soc.* **128**(27), 8738-8739
- 1-25. Ryu, Y., and Schultz, P.G., (2006) Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Escherichia coli*. *Nat. Methods* **3**(4), 263-265
- 1-26. Hecht, S.M., Alford, B.L., Kuroda, Y., and Kitano, S. (1978) "Chemical aminoacylation" of tRNA's. *J. Biol. Chem.* **253**(13), 4517-4520
- 1-27. Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C., and Schultz, P.G. (1989) A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* **244**(4901), 182-188

- 1-28. Bain, J.D., Diala, E.S., Glabe, C.G., Wacker, D.A., Lyttle, M.H., Dix, T.A., and Chamberlin, A.R. (1991) Site-specific incorporation of nonnatural residues during *in vitro* protein biosynthesis with semi-synthetic aminoacyl-tRNAs. *Biochemistry* **30(22)**, 5411–5421
- 1-29. Sisido, M., Ninomiya, K., Ohtsuki, T., and Hohsaka, T. (2005) Four-base codon/anticodon strategy and non-enzymatic aminoacylation for protein engineering with non-natural amino acids. *Methods* **36(3)**, 270–278
- 1-30. Hohsaka, T., Ashizuka, Y., Murakami, H., and Sisido, M. (1996) Incorporation of nonnatural amino acids into streptavidin through *in vitro* frame-shift suppression. *J. Am. Chem. Soc.* **118(40)**, 9778–9779
- 1-31. Hohsaka, T., Ashizuka, Y., Murakami, H., and Sisido, M. (2001) Five-base codons for incorporation of nonnatural amino acids into proteins. *Nucleic Acids Res.* **29(17)**, 3646–3651
- 1-32. Iijima, I., and Hohsaka, T. (2009) Position-specific incorporation of fluorescent non-natural amino acids into maltose-binding protein for detection of ligand binding by FRET and fluorescence quenching. *ChemBioChem* **10(6)**, 999–1006
- 1-33. Shozen, N., Iijima, I., and Hohsaka, T. (2009) Site-specific incorporation of PEGylated amino acids into proteins using nonnatural amino acid mutagenesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19(17)**, 4909–4911
- 1-34. Kajihara, D., Abe, R., Iijima, I., Komiyama, C., Sisido, M., and Hohsaka, T. (2006) FRET analysis of protein conformational change through position-specific incorporation of fluorescent amino acids. *Nat. Methods* **3(11)**, 923–929
- 1-35. Ohno, S., Yokogawa, T., Fujii, I., Asahara, H., Inokuchi, H., and Nishikawa, K. (1998) Co-expression of yeast amber suppressor tRNA^{Tyr} and tyrosyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*: Possibility to expand the genetic code. *J. Biochem.* **124(6)**, 1065–1068
- 1-36. Ohno, S., Yokogawa, T., and Nishikawa, K. (2001) Changing the amino acid specificity of yeast tyrosyl-tRNA synthetase by genetic engineering. *J. Biochem.* **130(3)**, 417–423
- 1-37. Ohno, S., Matsui, M., Yokogawa, T., Nakamura, M., Hosoya, T., Hiramatsu, T., Suzuki, M., Hayashi, N., and Nishikawa, K. (2007) Site-selective post-translational modification of proteins using an unnatural amino acid, 3-Azidotyrosine. *J. Biochem.* **141(3)**, 335–343
- 1-38. Wang, L., and Schultz, P.G. (2001) A general approach for the generation of orthogonal tRNAs, *Chemistry & Biology* **8(9)**, 883–890
- 1-39. Wang, L., Brock, A., Herberich, B., and Schultz, P.G. (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* **292(5516)**, 498–500

- 1-40. Wang, L., and Schultz, P.G. (2005) Expanding the genetic code. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**(1), 34–66
- 1-41. Young, T.S., Ahmad, I., Yin, J.A., and Schultz, P.G. (2010) An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **395**(2), 361–374
- 1-42. Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J.A., and Chan, M.K. (2002) A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase, *Science* **296**(5572), 1462–1466
- 1-43. Srinivasan, G., James, C.M., Krzycki, J.A. (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* **296**(5572) 1459–1462
- 1-44. Atkins, J.F., and Gesteland, R. (2002) Biochemistry. The 22nd amino acid. *Science* **296**(5572), 1409–1410
- 1-45. Chen, P.R., Groff, D., Guo, J., Ou, W., Cellitti, S., Geierstanger, B.H., Schultz P.G. (2009) A facile system for encoding unnatural amino acids in mammalian cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**(22), 4052–4055
- 1-46. Mukai, T., Kobayashi, T., Hino, N., Yanagisawa, T., Sakamoto, K., and Yokoyama, S. (2008) Adding L-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**(4), 818–822
- 1-47. Polycarpo, C.R., Herring, S., Bérubé, A., Wood, J.L., Söll, D., and Ambrogelly, A. (2006) Pyrrolysine analogues as substrates for pyrrolysyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett.* **580**(28–29), 6695–6700
- 1-48. Nozawa, K., O'Donoghue, P., Gundllapalli, S., Araiso, Y., Ishitani, R., Umehara, T., Söll, D., and Nureki, O. (2009) Pyrrolysyl-tRNA synthetase-tRNA(Pyl) structure reveals the molecular basis of orthogonality. *Nature* **457**(7233), 1163–1167
- 1-49. Wan, W., Huang, Y., Wang, Z., Russell, W.K., Pai, P.J., Russell, D.H., and Liu, W.R. (2010) A facile system for genetic incorporation of two different noncanonical amino acids into one protein in *Escherichia coli*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**(18), 3211–3214
- 1-50. Charbon, G., Wang, J., Brustad, E., Schultz, P.G., Horwich, A.L., Jacobs-Wagner, C., and Chapman, E. (2011) Localization of GroEL determined by *in vivo* incorporation of a fluorescent amino acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**(20), 6067–6070
- 1-51. Hino, N., Oyama, M., Sato, A., Mukai, T., Iraha, F., Hayashi, A., Kozuka-Hata, H., Yamamoto, T., Yokoyama, S., and Sakamoto, K. (2011) Genetic incorporation of a photo-crosslinkable amino acid reveals novel protein complexes with GRB2 in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **406**(2), 343–353

第2章 大腸菌生細胞を利用したアジドチロシン含有タンパク質の発現

II-I. 背景と目的

第1章で紹介したようにタンパク質に新規機能を付加し、その機能を解明するために様々な種類の非標準アミノ酸がタンパク質に導入されてきた。我々はアジド基が天然ではタンパク質中になく官能基であり、①光クロスリンク反応に利用できる点と②アジド基選択的な有機化学反応がある点に着目した。

①光クロスリンク反応

クロスリンク反応は共有結合によって2つの分子を結合する反応である。現在では、アミノ基やカルボキシル基と反応する官能基を持つクロスリンク試薬が市販されており、これをタンパク質溶液に加えることで、複合体を形成する分子同士を共有結合で捕獲することができる。また化合物によっては *in vivo*、*in vitro* の両方で利用可能であり、相互作用分子を複合体状態で捕獲、分析できる点で非常に優れている [2-1~5]。また、UV 照射によってクロスリンク反応を制御できる芳香族アジドを含む試薬や、ビオチンで標識することによりクロスリンク産物の確認を容易にしたクロスリンク試薬などが開発されている [2-3~5]。しかし、通常これらクロスリンク試薬はタンパク質中のリジン残基やシステイン残基と反応するように設計されており、タンパク質のどの部位に結合しているのかを制御できないという問題点があった。そこで、部位特異的にクロスリンクを行うため、Schultz らは *M. jannaschii* 由来 TyrRS 変異体を利用して *p*-Azido-L-phenylalanine をグルタチオン-S-トランスフェラーゼの部位特異的に導入した [2-6]。そしてクロスリンク反応を利用すれば、相互作用の強弱に関わらず、リガンドを捕獲できることを報告した。また、芳香族アジドと同様に光クロスリンク能を有する官能基として、ジアジリンやベンゾフェノンを含む非標準アミノ酸についても様々な研究グループがタンパク質へ部位特異的に導入することに成功している [2-7~12]。Forné らは *p*-benzoyl-*p*-phenylalanine をクロマチンの会合に関わる酵素 ISWI の様々な部

位に導入し、分子内クロスリンクを行い、質量分析により得られた情報を基に構造のモデリングを行っている [2-9]。また、Hino らは GRB2 の様々な部位にクロスリンク能を有する非標準アミノ酸 *p*-trifluoromethyl-diaziriny-L-phenylalanine を導入し、導入部位によって異なるクロスリンク産物が得られることを報告した [2-11]。また、同時に生細胞中で光クロスリンク反応を行い、目的タンパク質と相互作用する分子を捕獲、同定している。

②アジド基選択的な有機化学反応

アジド基は天然にはない官能基であり、常温、水溶媒下でホスフィン誘導体、アルキン誘導体、ジベンジルシクロオクチン誘導体と化学選択的に反応する [2-13~18]。この反応を利用して、アジド基を含む糖誘導体 *N*-azidoacetylmannosamine を細胞培養液に加え、細胞表面の糖鎖中にアジド基を導入し、ビオチン化ホスフィンやビオチン化アルキン、FLAG - ジベンジルシクロオクチンによって標識することができた [2-16,17]。

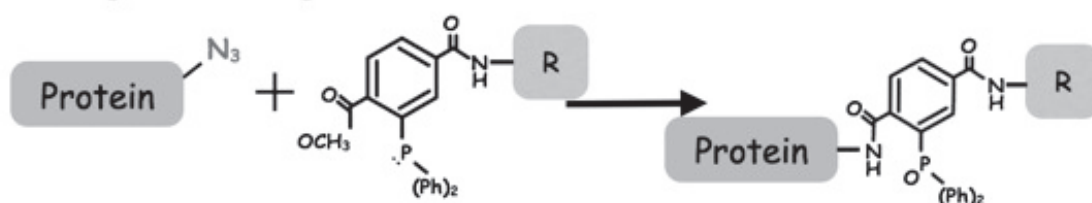
また我々は大腸菌破碎液を用いた無細胞翻訳系を利用して、ラット由来カルモデュリン (CaM) に 3-アジドチロシン (N_3 -Y) を導入できることを報告している [2-18]。さらに、導入したアジド基選択的に Staudinger-Bertozzi Ligation 反応によってビオチンで、Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition 反応によってテトラメチルローダミンで化学的に修飾できることを報告している (図2-1) [2-18,19]。

最近、Iraha らは大腸菌生細胞と真核細胞中で、 N_3 -Y 含有タンパク質を合成する方法を報告した [2-20]。この方法は、大腸菌由来 TyrRS に改変を加えて N_3 -Y を認識できるようにした TyrRS を用いている。この作製した TyrRS 変異体 / アンバーサプレッサー tRNA 対は真核細胞であれば、問題なく N_3 -Y 含有タンパク質の発現に利用可能であるが、大腸菌の合成系ではアンバーサプレッサー tRNA が内在性 TyrRS にも認識されてしまい、チロシンをチャージしてしまう。この問題を解決するために、彼らは大腸菌ゲノム DNA にコードされている TyrRS と tRNA^{Tyr} 遺伝子を *M.*

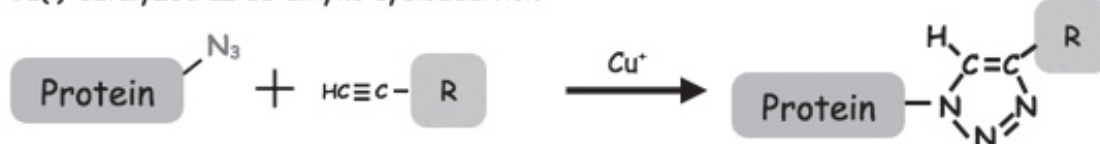
jannaschii 由来 TyrRS/tRNA^{Tyr} 対に置換することで大腸菌でも N₃-Y 含有タンパク質を発現できるように工夫している。

この方法では、N₃-Y を認識する aaRS として大腸菌由来の TyrRS を使用しているが、これ
を大腸菌内在性 TyrRS / tRNA^{Tyr} と交差反応しないことが知られている古細菌 *M. acetivorans* 由来の
TyrRS で作製できれば、より簡単に N₃-Y 含有タンパク質を発現できると考えた。そして、*M.*
acetivorans 由来の TyrRS / tRNA 対にランダムに変異を加え、アンバーコドン特異的に N₃-Y を導入
できる TyrRS 変異体 / アンバーサプレッサー tRNA 対の作製を試みた。

Staudinger-Bertozzi Ligation



Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition



Copper-free Click chemistry

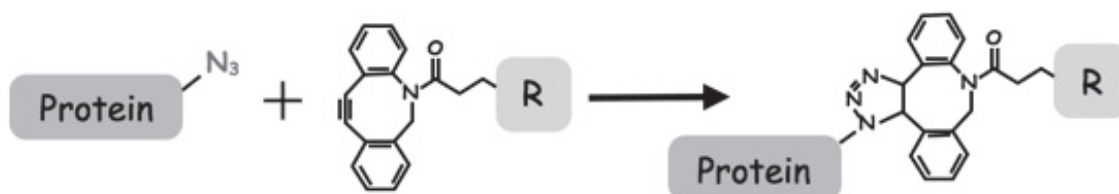


図2-1. アジド基選択的修飾反応

II-II. 材料

遺伝子への変異導入に使用したプライマーの合成は Operon Biotechnologies 社に依頼した。プライマーの配列については表 2-1 にまとめた。プラスミド pSTV29 は宝酒造株式会社、pACYC-Duet は Novagen、pTAC-MAT Tag2 は Sigma Aldrich 社からそれぞれ購入した。各種制限酵素は MBI Fermentas Inc. より購入し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)にはタカラバイオ株式会社 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase を使用した。DNAの染色に使う 6×Ez vision dye は AMRESCO 社製の製品を使用した。ライゲーション反応にはニッポンジーン株式会社製 Ligation Pack を、In-fusion Advantage PCR Cloning Kit はクローンテックの製品を使用した。配列確認には Beckman 社製の DTCS クイックスタートキットを使用した。アンバーサプレッション活性を調べるために使用した β -Galactosidase Enzyme Assay System は Promega 社より購入した。DNA の精製に使用した Ultrafree-MC4 は Millipore 社製の製品を使用した。アジドチロシン導入タンパク質の発現の際に使用した大腸菌株 HMS174 及び HMS174 (DE3) については Novagen 社より購入し、BL21、BL21 (DE3) 株は EMD chemical、MV1184 株は宝酒造株式会社、SHuffle (K12) 株については New England Biolabs より購入した。大腸菌を培養する際に使用した培地は DIFCO 社より購入した Tryptone、Yeast extract を使用した。3-アジドチロシン及び 3-ブロモチロシンは渡辺化学工業株式会社の製品を使用した。また、3-アミノチロシンは Sigma Aldrich 社製の製品を使用した。Dibenzylcyclooctyne-Fluor 568 (DF568) は Click chemistry tools 社製の製品を使用した。その他特に記述しない限り、和光純薬株式会社の特級試薬を使用した。

Name	Primer Sequence (5'-3')
pRP_QC-A	GGA CAT CAG CGC TAG AGG AGT TTA TAC TGG CTT AC
pRP_QC-B	CAG ATAAAA TAT TTT AGA TTT CAG TGC
pRP_iP-A	ACT CGT GGC TGC TAA TAC TAC CGT TTT CCA CAC CGA TTG CAA GTA AGA TAT TTC GCT AAC TGA TTT ATAATT AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA C
pRP_iP-B	CTA GAG AAG AGC ATG CAT AAG CTT ATC CTT AGC GAA AGC TAA GGA TTT TTT TTAACG CCA TGA GCG GCC TCA TTT C
pRP_iP-C	CTT GTAAAA CGA CGG CCA GT
pRP_iP-D	ATC TTA TCG ATG ATA AGC TGT
pRP-A	GGG GAT CCT TCT GTT TAT TGC ATT CA
pRP-B	GGG GAT CCAAAAAA AGG GCA TCAAA
pRP_iP-E	GAT CCG CTA GCC ATA TGT ATA TCT CCT TCT TAA GAC ACG GAT AAA TCG GTG
pRP_iP-F	CGC GGC CGC ACT CGA GTA ATT GCC GAT AAC ATT TGA CGC
tyrT-A	TAG ACC GCG ATG TCC CCG G
tyrT-B	CAG CCG CGC ACT CTA CC
tyrT-C	GAG CCG CGC ACT CTA CC
tyrS-A	GGG AAT TCA TAT GGA CAG ACT TGA GCT TA
tyrS-B	GGG GCT CGA GTT ATA GAA GAA CTT TTC GGA C
tyrS_QC-A	CAG GAA GTT TAA GAA TGC TTT CTG CAA GAT AG
Sel_tyrT-A	GGN TCT ANN CCG CGA NGN CCC CGG TTC
Sel_tyrT-B	GCG CAC TCT NCC NCT GAG TTAAGG C
Sel_tyrT-C	GGG TTC GGA CTT CCA GCT GGG AGC CG
Sel_tyrT-D	TAT ACG AAA TCG GTC TGT TCT TCG TC

表2-1. 第 2 章で使用するプライマー

Sel_tyrS-A	AGA AGC TCC CCG TGC TNN SGT AGG CTA CGA GCC AAG CGG
Sel_tyrS-B	CTT GTT CAG ATA AGC SNN TAC ATC CGC TAG CAG
Sel_tyrS-C	CTG CTA GCG GAT GTA NNS GCT TAT CTG AAC AAG
Sel_tyrS-D	GTA TTC GGC TCC CAG SNN GAA GTC CGA ACC GTA
Sel_tyrS-E	TAC GGT TCG GAC TTC NNS CTG GGA GCC GAA TAC
Sel_tyrS-F	CCA CCT CAA GCA GGG CSN NSN NAA TAG CCT GCA TCA GGG GAT AAA C
Ara-A	GGG GGG ATC CTG AGG TGC ATA ATG TGC CTG TCA AAT GG
Ara-B	GTG TGC CAA AAA ACG GGT ATG GAG AAA CAG TAG
Ara-C	CTA CAG CCC AAT ACG CAA ACC GCC TCT CCC CGC G
Ara-D	CGT ATT GGG CTG TAG AAA CGC AAA AAG GCC ATC CG
Ara-E	CCG TTT TTT GGC ACA CAG GAG ATA TAC ATA TG
Ara-F	GGG GGG ATC CTG AGG TGC ATA ATG TGC CTG TCA AAT GG
Ara-G	CGT ATT GGG CTG TAG AAA CGC AAA AAG GCC ATC CG
Ara-H	CTC AGG ATC CCC CCG AAG GAT CTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG
Ara-I	CTA CAG CCC AAT ACG TGT TTA TTG CAT TCA ACA AGT CGG GCA TG
Tac-A	ACA CAG GAG ATA TAC CAT GG
Tac-B	ATC AGG CTT TGT TAG CAG CCG GAT CC
Tac-C	CTA ACA AAG CCT GAT ACA GAT TAA ATC AG
Tac-D	GTA TAT CTC CTG TGT GAA ATT GTT ATC CG

表2-1. 第2章で使用するプライマー 続き

II-III. 方法

まず、本論文で使用する遺伝子組換え実験の基本操作について記述する。

•コンピテントセルの作製

まず、グリセロールストックされた大腸菌株を LB-寒天培地*²⁻¹ に画線し、37°Cで一晩培養した。得られたコロニーを一個突いて、2 mlのLB-液体培地*²⁻² で一晩プレ培養した。得られたプレ培養液を 100 ml の LB-液体培地で本培養を開始した。OD₆₀₀ が 0.3-0.4 になるまで培養を続け、培養液を 50 ml ファルコン社製チューブに入れて、氷上で 15 分間静置した。その後、培養液は 5,000 rpm、4°Cで 10 分間遠心し、培地成分を除いた。得られた菌体を 4 mlの 1×TSS 溶液*²⁻³ に懸濁し、200 µl ずつ小分けして液体窒素で凍らせ、-80°Cで保存した。

* ²⁻¹ LB-寒天培地(1Lあたり)		* ²⁻² LB-液体培地(1Lあたり)	
Bacto™ Tryptone	10g	Bacto™ Tryptone	10g
Bacto™ yeast extract	5g	Bacto™ yeast extract	5g
NaCl	10g	NaCl	10g
寒天末	17g		

* ²⁻³ 1×TSS(50ml)	
Bacto™ Tryptone	0.5g
Bacto™ yeast extract	0.25g
NaCl	0.5g
20%(w/v) PEG6000	25ml
1M MgCl ₂	2.5ml
DMSO	2.5ml

•大腸菌の形質転換

作製したコンピテントセルを氷上で融解させ、プラスミド溶液を 1 μ l 加えて氷上で 5 分間静置した。そして、それぞれのプラスミドの抗生物質耐性にそった抗生物質を含む LB-寒天培地で 37°C で一晩培養した。

•大腸菌からのプラスミドの抽出 (Mini-Prep.)

形質転換して得られたコロニーを一個突いて、2 ml の適切な抗生物質を含む LB-液体培地で 37°C、一晩培養した。得られた培養液を集菌し、100 μ l の Solution I*²⁻⁴ で懸濁した。その溶液に対して 200 μ l の Solution II*²⁻⁵ を加えて混合し、直ちに 150 μ l の Solution III*²⁻⁶ を加えて素早く混合した。溶液に 150 μ l のフェノールクロロホルム溶液を加えてよく混合した後、15,000 rpm、室温で 10 分間遠心し、得られた上清を新しい 1.5 ml プラスチックチューブに移した。エタノールを 1 ml 加えて混合し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、エタノール沈殿させた。得られた沈殿を 50 μ l の TE buffer*²⁻⁷ で溶解し、50 μ l のマグネシウム沈殿試薬*²⁻⁸ を加え、氷上で 10 分間静置した。そして、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、得られた上清を新しい 1.5 ml プラスチックチューブに移し、200 μ l のエタノールを加えてエタノール沈殿させた。得られた沈殿に 1 ml の 70% エタノールを加え、穏やかに転倒混和させた後、15,000 rpm、4°C で 3 分間遠心し、上清を除いた後、遠心エバポレーターで乾燥させた。乾燥した沈殿を 30 μ l の TE buffer で溶解し、そのうち 1 μ l の DNA 溶液に 4 μ l の Milli-Q 水、1 μ l の 6×Ez vision dye を混ぜ、1 % アガロースゲル*^{2-9,10} 電気泳動 (AGE) で分離、分析した。

* 2-4 Solution I

25mM	Tris-HCl (pH 8.0)
10mM	EDTA-2Na
50mM	グルコース

* 2-5 Solution II

0.2M	NaOH
1%	SDS

* 2-6 Solution III (50ml)

酢酸カリウム	14.721g
氷酢酸	5.57ml
Milli-Q水	up to 50ml

* 2-7 TE buffer

10mM	Tris-HCl(pH 8.0)
1mM	EDTA-2Na

* 2-8 マグネシウム沈殿試薬

2M	NaCl
0.2M	MgCl ₂

* 2-9 1% アガロースゲル(100ml)

1×TAE	100ml
Agarose S	1g

電子レンジで熱して溶解

* 2-10 50×TAE(1L)

Tris-塩基	242g
氷酢酸	57.1ml
EDTA-2Na	18.6g

•DNA の塩基配列の確認

Mini-Prep. で得られたプラスミドのうち、1-2 μl (100fmol) に全量 10 μl となるように Milli-Q 水を加えた。この溶液を 96°C で 3 分間プレヒートした後、シーケンス kit に付属されている Master Mix と合成したシーケンスプライマーを以下の組成*²⁻¹¹ で混合し、PCR を行った。そして、全量の PCR 反応液と 5 μl の反応停止液*²⁻¹²を混ぜた後、60 μl のエタノールを加えてエタノール沈殿させた。200 μl の 70% エタノールで 15,000 rpm、4°C で 4 分間遠心し、上清を除いた。この操作を再度行い、得られた沈殿を遠心エバポレーターで乾燥させた後、35 μl の Sample Loading solution (kit 付属) で溶解し、Beckman CEQ8000 シーケンサーを用いて配列を分析した。

* ²⁻¹¹ シーケンス反応		* ²⁻¹² 反応停止液	
Master Mix	8 μl	3M NaOAc(pH5.2)	2 μl
Primer(2 μM)	2 μl	100mM EDTA-2Na	2 μl
鋳型DNA	100fmol	Glycogen(kit 付属)	1 μl
Milli-Q水	Up to 20 μl		

•遺伝子への部位特異的変異導入

遺伝子への変異導入法として、以下の2種類の方法を利用していく。

1) QuikChange 法

鋳型 DNA に対して変異を導入したプライマーとその相補鎖を合成し、以下の組成*²⁻¹³ の反応液を調製し、PCR 反応*²⁻¹⁴ を行った。そして、得られた PCR 産物を 1 µl の Dpn I で処理した。反応後、10 µl の反応産物で XL1-Blue を形質転換させ、それぞれのプラスミドの抗生物質耐性にそった抗生物質を含む LB-寒天培地で37°Cで一晩培養した。得られたコロニーを爪楊枝でつつき、2 ml の抗生物質を含む LB-液体培地で 37°C、一晩培養した。そして得られた菌体から Mini-Prep. によってプラスミドを単離した。得られたプラスミドはシーケンスによって変異の導入を確認した。

* ²⁻¹³ QuikChange PCR		* ²⁻¹⁴ QuikChange PCR反応条件		
		予備変性ステップ	98°C	2min
		変性ステップ	98°C	10sec
		アニーリングステップ	55°C	5sec
		伸長ステップ	72°C	X min
			X= 1000bpあたり 1min	
		反応終了後	4°C	∞
		サイクル数	変異導入数による	
		1塩基変異	12サイクル	
		3塩基変異	16サイクル	
		欠失又は挿入	18サイクル	

5× PS buffer	10µl
dNTP mixture	4µl
primer F(10µM)	1µl
primer R(10µM)	1µl
template DNA	1µl
Prime Star™ HS DNA polymerase	0.5µl
Milli-Q水	Up to 50µl

2) iPCR (inverse PCR) [2-21]

鋳型 DNA に対して導入したい配列を持つプライマーを設計し、以下の組成* 2-15 の反応液を調製し、iPCR 反応* 2-16 を行った。反応後、5 μ l の反応産物に 1 μ l の 6 \times Ez vision dye を加えて AGE で増幅を確認し、残りの反応液はエタノール処理を行い、回収した沈殿を 10 μ l の水で溶解した。全量の DNA 溶液に 2 μ l の 6 \times Ez vision dye を加えて AGE で分離した。泳動後、滅菌したカミソリで目的のバンドを切り出し、切り取った寒天を 1.5 ml プラスチックチューブに入れ、-80°C で 10 分間凍らせた。凍った寒天を濾過チューブ (Ultrafree-MC4) に入れ、10,000 rpm、4°C で 20 分間遠心した。得られた溶液の 10 分の 1 量の 3M NaCl、10A₂₆₀unit/ml RNA_{mix} 溶液を加え、エタノール沈殿した。その後、得られた沈殿を 1 ml の 70% エタノールを加え、穏やかに転倒混和した後、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を除いた後、沈殿を乾燥させた。得られた沈殿を 20 μ l の水で溶解し、そのうち 5 μ l を以下の組成* 2-17 で 20 μ l の反応液を調製し、kination させた。37°C、30 分間反応後、1 μ l の 300 Unit/ml T4 DNA ligase を加え、23°C でさらに 30 分間反応させることで環状化させた。得られた反応産物で XL1-Blue を形質転換させ、それぞれのプラスミドの抗生物質耐性にそった抗生物質を含む LB-寒天培地で 37°C、一晚培養した。得られたコロニーを爪楊枝でつつき、2 ml の抗生物質を含む LB-液体培地で 37°C、一晚培養した。そして得られた菌体から Mini-Prep. によってプラスミドを単離した。得られたプラスミドはシーケンスによって変異の導入を確認した。

* 2-15iPCR PCR反応液

5× PS buffer	10μl
dNTP mixture	4μl
primer F(10μM)	1μl
primer R(10μM)	1μl
template DNA	1ng
Prime Star™ HS DNA polymerase	0.5μl
Milli-Q水	Up to 50μl

* 2-16iPCR反応条件

予備変性ステップ	98°C	2min
変性ステップ	98°C	10sec
アニーリングステップ	55°C	5sec
伸長ステップ	72°C	X min
	X= 1000bpあたり 1min	
反応終了後	4°C	∞
サイクル数	30サイクル	

* 2-17Kination反応液

50mM	Tris-HCl(pH7.5)
50mM	MgCl ₂
250mM	NaCl
0.5mg/ml	BSA
5mM	ATP
5U	T4 Polynucleotide kinase(5U/μl)

以下に第2章で行う実験方法を示す。この章で作製、使用するプラスミドについては、図2-2. にまとめた。

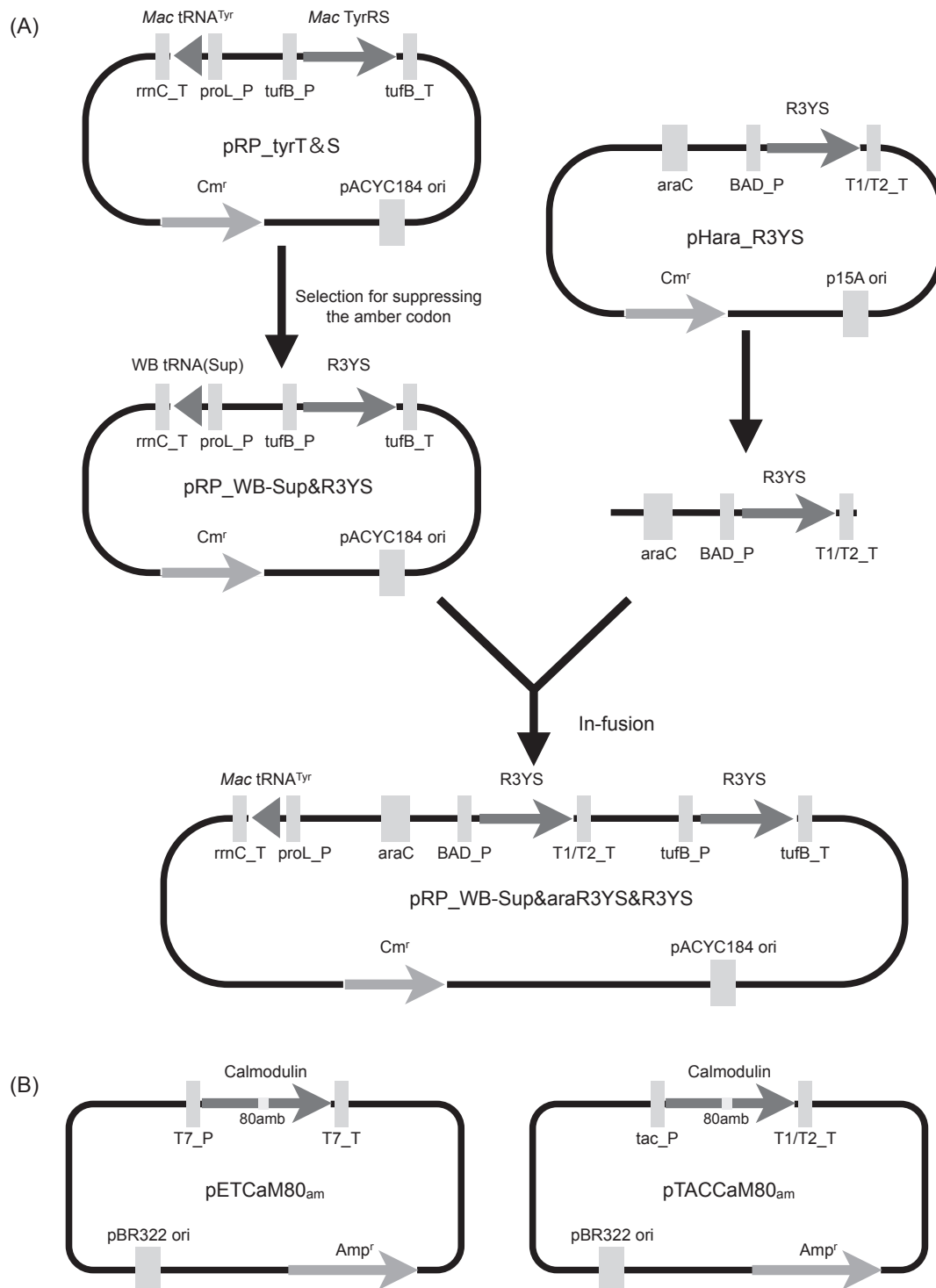


図2-2. 本章で使したプラスミド

(A) 大腸菌細胞中でタンパク質とtRNAを構成的に発現できるプラスミド pRNAPro(pRP)に対して *M. acetivorans* TyrRS遺伝子とtRNA^{Tyr}を導入した。このプラスミドを利用して選別を行った。

(B) 標的タンパク質カルモデュリン遺伝子を含むプラスミド。

II-III-I. *M. acetivorans* 由来 TyrRS / tRNA^{Tyr} 発現ベクターの構築

大腸菌細胞内でタンパク質と tRNA を構成的に発現できるプラスミド pRNAPro (pRP) を構築した。まず、市販されているプラスミド pSTV をプライマー pRP_QC-A とその相補鎖を使って QuikChange 法によって Nhe I 切断部位を除いた。同様に、プライマー pRP_QC-B とその相補鎖を使った QuikChange 法によって Xba I 切断部位を除いた。大腸菌 proL プロモーターと tRNA 遺伝子のマルチクロニングサイトを導入するために、プライマー pRP_iP-A と pRP_iP-B を使って iPCR を行った。結果得られたプラスミド (pTPP) に大腸菌 tufB プロモーター、ターミネーターを導入するために、プライマー pRP_iP-C と pRP_iP-D を使って iPCR を行い、pTPP に Bgl II 切断部位を作製した。作製した Bgl II 切断部位で pTPP を切断し、同様に pRP-A と pRP-B によって PCR で増幅させた大腸菌 tufB プロモーター、ターミネーターも Bgl II で切断した。それぞれの Bgl II 切断産物を混合し、1 µl の T4 DNA ligase を加えて 23°C で 2 時間反応させた。反応後、Ligation 反応液で XL1-Blue を形質転換させ、LB-Cm 寒天培地で一晚培養した。得られたコロニーを数個爪楊枝で突き、それぞれ 2 ml の LB-Cm 液体培地で一晚培養した。得られた培養液からプラスミドを抽出し、シーケンスによって大腸菌 tufB プロモーター、ターミネーターが導入できていることを確認した。この結果得られたプラスミドにプライマー pRP_iP-E と pRP_iP-F による iPCR を行い、タンパク質のマルチクロニングサイトを導入した。

II-III-II. pRNAPro プラスミドへの *M. acetivorans* TyrRS 遺伝子と

tRNA^{Tyr}_(CUA) 遺伝子の導入

M. acetivorans ゲノム DNA から増幅した *M. acetivorans* pre-tRNA^{Tyr} 遺伝子を Xba I と Hind III で切断した。同様に、pRNAPro についても Xba I と Hind III で切断し、*M. acetivorans* pre-tRNA^{Tyr} 遺伝子を組み込んだ。得られたプラスミドはプライマー tyrT-A と tyrT-B による iPCR を行い、pre-

tRNA^{Tyr} 遺伝子内のイントロンを除いた。その結果得られたプラスミドを pRP_tyrT と名付けた。

pRP_tyrT を鋳型として、プライマー tyrT-A と tyrT-C による iPCR を行い、tRNA^{Tyr} 遺伝子のアンチコドン を CUA に改変したプラスミド pRP_tyrTsup を作製した。*M. acetivorans* TyrRS 遺伝子 (NCBI Gene ID:1472707) はプライマー tyrS-A と tyrS-B で増幅し、pRP_tyrT と pRP_tyrTsup の Nde I、Xho I 切断部位に導入した。さらに、プライマー tyrS_QC-A とその相補鎖を利用した QuikChange 法によって、*M. acetivorans* TyrRS 遺伝子内の *Hind* III 切断部位を除いた。結果得られたプラスミドはそれぞれ pRP_tyrT&S と pRP_tyrTsup&S と名付けた (図2-2)。

II-III-III. 大腸菌内在性 aaRSs に認識されないアンバーサプレッサー tRNA^{Tyr} の選別

大腸菌内在性 aaRSs に認識されないアンバーサプレッサー tRNA^{Tyr} をスクリーニングするために、*M. acetivorans* tRNA^{Tyr} 遺伝子にランダムに変異を加えたライブラリーを作製した。このランダムライブラリーはプライマー Sel_tyrT-A と Sel_tyrT-B による iPCR で作製した。選別方法については 図2-3. に示す。大腸菌 CA274 株にプラスミドライブラリーを導入し、34 µg/ml クロラムフェニコール、0.004 % (w/v) X-Gal、0.5 mM IPTG を含む LB (LB-Cm/X-Gal/IPTG) 寒天培地 で一晩培養した。得られた青コロニーを全て 34 µg/ml クロラムフェニコールを含む 100 ml の LB (LB-Cm) 液体培地で培養し、プラスミドを抽出した。得られた変異体ライブラリーに対してプライマー Sel_tyrT-C と Sel_tyrT-D による iPCR を行い、*M. acetivorans* TyrRS 遺伝子の 108 番目にアンバー変異を導入した。アンバー変異を導入した変異体ライブラリーを大腸菌 CA274 株に導入し、LB-Cm/X-Gal/IPTG 寒天培地で 37°C、一晩培養した。そして、得られた白コロニーをそれぞれ 2 ml の LB-Cm 液体培地で培養し、プラスミドを抽出した後、tRNA の配列をシーケンスで確認した。得られたプラスミドは pRP_WB-tRNA^{Sup}&Samb と名付けた。

II-III-IV. 3 位置換チロシナナログを基質として認識できる

M. acetivorans 由来 TyrRS の選別

以下のような手順で TyrRS ライブラリーを作製した。TyrRS 遺伝子を 3 つのブロックに分け、それぞれの断片を PCR によって増幅させた。1 つ目の断片はプライマー Sel_tyrS-A と Sel_tyrS-B を使って、33 位と 71 位にランダムに変異を加えた。2 つ目の断片はプライマー Sel_tyrS-C と Sel_tyrS-D により、71 位と 113 位にランダムな変異を加えた。そして、3 つ目の断片も同様にプライマー Sel_tyrS-E と Sel_tyrS-F を用いて 113 位、162 位と 163 位にそれぞれランダム変異を加えた。3 種類の断片を鋳型として、プライマー Sel_tyrS-A と Sel_tyrS-F によって PCR で遺伝子を増幅させた。増幅した断片を In-fusion Advantage PCR Cloning Kit を使って、プラスミド pRP_WB-tRNA^{Sup}&Samb に導入した。作製した変異体ライブラリーを用いて 3 位置換チロシナナログを認識する TyrRS 変異体の選別を行った。選別の概要は 図2-5. に示す。大腸菌 CA274 株にプラスミドライブラリーを導入し、0.2 mg/ml 3-ブロモチロシン (Br-Y) を含む LB-Cm/X-Gal/IPTG 寒天培地で一晩培養した。そして、得られた青コロニーを全て 100 ml の 34 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB (LB-Cm) 液体培地で培養し、プラスミドを抽出した。次に、青コロニーから抽出した変異体ライブラリーで CA274 株を形質転換し、Br-Y を含まない LB-Cm/X-Gal/IPTG プレートで一晩培養した。全ての白コロニーは 100 ml LB-Cm 液体培地で培養し、プラスミドを抽出したあと、この変異体ライブラリーで再度 CA274 株を形質転換し、0.2 mg/ml Br-Y を含む LB-Cm/X-Gal/IPTG プレートで 37°C、一晩培養した。得られた青コロニーをそれぞれ LB-Cm 培地で培養し、プラスミドを抽出した後、シーケンスによって TyrRS の配列を確認した。得られたプラスミド DNA は pRP_WB-Sup&R3YS と名付けた (図2-2)。

II-III-V. β -Galactosidase enzyme assay による

アンバーサプレッション活性の検定

pRP_WB-Sup&R3YS を含む大腸菌 CA274 株を 34 $\mu\text{g/ml}$ クロラムフェニコール、0.5 mM IPTG とそれぞれのアミノ酸 (ブロモチロシン、アジドチロシン、アミノチロシン、チロシン) を含む 2 ml の LB 液体培地で 37°C、一晚培養した。培養液 1 ml を 15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心し、得られた菌体を 50 μl の sonication buffer*²⁻¹⁸ に懸濁した。超音波によって破碎した後、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心して可溶性画分を抽出した。タンパク質濃度を測定し、5 μg 分を以下の組成*²⁻¹⁹ に従って混合し、 β -Galactosidase Enzyme Assay System によって β -Galactosidase の活性を測定した。

* 2-18 sonication buffer		* 2-19 β -Galactosidase 活性測定	
20mM	Tris-HCl(pH7.6)	2×Assay mixture	50 μl
1mM	MgCl ₂	Milli-Q水	45 μl
200mM	KCl	菌体抽出液	5 μl
5%	グリセロール		
6mM	β -メルカプトエタノール		

II-III-VI. pRP_WB-Sup&R3YS へのアラビノース誘導 R3YS 遺伝子の導入

アラビノースで誘導可能な R3YS 遺伝子を構築するために、我々はまずプラスミド pHara を構築した(図2-2)。まず、市販されているプラスミド pACYC-Duet-1 を Ehe I と Bsu36 I で切断した。araBAD、BAD プロモーター遺伝子を増幅するために大腸菌ゲノム DNA を鋳型として、プライマー Ara-A と Ara-B を使って PCR を行った。得られた増幅断片を Ehe I と Bsu36 I で切断した後、pACYC-Duet に組み込んだ。さらに、得られたプラスミドをプライマー Ara-A と Ara-C で増幅するとともに、プラスミド pET21a(+) からプライマー Ara-D と Ara-E を利用してリボソーム結合部

位、マルチクローニングサイト、T1/T2 ターミネーターを PCR で増幅させ、In-fusion Advantage PCR Cloning Kit によって 2 つの断片をつなげた。

作製したプラスミド pHara を Nde I と Xho I で切断するとともに、pRP_WB-Sup&R3YS についても Nde I と Xho I で切断し、R3YS 遺伝子を精製した。それぞれの Nde I、Xho I 切断産物を混合し、Ligation 反応液* 2-20 を作製し、16°C で 2 時間反応させた。反応産物で XL1-Blue を形質転換させ、LB-Cm プレートで一晩培養した。得られたコロニーを数個爪楊枝で突き、それぞれ 2 ml の LB-Cm 培地で一晩培養した。得られた培養液からプラスミドを抽出し、シーケンスによって R3YS 遺伝子が導入されていることを確認した。このプラスミド pHara_R3YS をプライマー Ara-F と Ara-G による PCR を行い、*araC*, *araBAD* promoter、R3YS 遺伝子と T1/T2 ターミネーターを含む遺伝子を増幅させた。そして、pRP_WB-Sup&R3YS を Ara-H と Ara-I プライマーで増幅させ、それぞれの断片を In-fusion Advantage PCR Cloning Kit でつなげた。結果得られたプラスミドを pRP_WB-Sup&araR3YS&R3YS と名付けた(図2-2)。

* 2-20 Ligation 反応液

10×Ligation buffer	2μl
ベクター側切断産物	沈殿
PCR切断産物	沈殿
2mg/ml BSA溶液	2.5μl
T4 DNA ligase(300U/μl)	0.5μl
Milli-Q水	Up to 20μl

II-III-VII. カルモデュリン発現用ベクターの構築

tac プロモーターをもつプラスミド pTAC をアジドチロシン導入タンパク質発現用ベクターとして使用した (図2-2)。プライマー Tac-A と Tac-B により pETCaM_{wt}、pETCaM80_{am} から野生型 CaM、および変異体 CaM 遺伝子をそれぞれ増幅させた。また、プライマー Tac-C と Tac-D によりプラスミド pTAC を増幅させ、増幅した断片を In-fusion Advantage PCR Cloning Kit でつなげた。その結果得られたプラスミドを pTACCaM_{wt}、pTACCaM80_{am} と名付けた (図2-2)。

II-III-VIII. N₃-Y を部位特異的に導入したカルモデュリンの発現と精製

内在性サプレッサー tRNA を持たない大腸菌株を pRP_WB-Sup&R3YS と pTACCaM80_{am} で形質転換し、50 µg/ml アンピシリン、34 µg/ml クロラムフェニコールを含む LB (LB-amp/Cm) 寒天培地で 37°C、一晚培養した。シングルコロニーを爪楊枝でつつき、2 ml の LB-amp/Cm 液体培地で 37°C、2 時間プレ培養した。プレ培養液は 100 ml の LB-amp/Cm 培地で本培養し、OD₆₀₀ が 0.7 付近に達したとき、培養液を 5,000 rpm、室温で 10 分間遠心し、0.5 mM IPTG、0.2 mg/ml N₃-Y を含む LB-amp/Cm 液体培地に懸濁し、遮光条件下で 37°C で 20 時間培養を続けた。培養後、集菌した菌体を 5 ml の sonication buffer*²⁻¹⁸ に懸濁し、遮光条件下で 30 分間 [(sonication : 20sec, cooling : 40sec) × 30] 超音波破碎した。破碎した溶液を 30,000 ×g、4°C で 20 分間遠心し、可溶性画分を回収した。回収した可溶性画分の 5 倍量となる CaM-Eq buffer*²⁻²¹ を加えた。Bio-RAD 社製 10ml ポリプレップカラムに CaM-Eq buffer で平衡化した 1 ml の Phenyl Sepharose™ CL-4B 樹脂を加え、サンプルをロードした。さらに、5 ml の CaM-W1 buffer*²⁻²² で洗浄後、5 ml の CaM-W2 buffer*²⁻²³ でさらに洗浄した。その後、2 ml の CaM-Elution buffer*²⁻²⁴ で溶出した。CaM を含む溶出液に 4 倍量のアセトンを加えて、-30°C で 1 時間冷やした後、15,000 rpm、-9°C で 15 分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は乾燥後 -30°C で保存した。

* 2-21 CaM-Eq buffer	
50mM	Tris-HCl(pH7.6)
5mM	CaCl ₂
0.1M	NaCl

* 2-22 CaM-W1buffer	
50mM	Tris-HCl(pH7.6)
0.1mM	CaCl ₂

* 2-23 CaM-W2 buffer	
50mM	Tris-HCl(pH7.6)
0.1mM	CaCl ₂
0.5M	NaCl

* 2-24 CaM-Elution buffer	
100mM	Tris-HCl(pH7.6)
1mM	EGTA

II-III-IX. 発現したカルモデュリン変異体のLC-MS分析

アセトン沈殿した CaM を 0.2 mg/ml になるように適当量の Milli-Q 水に溶解し、UPLC-MS による分析を行った。以下の組成で UPLC-A 溶液* 2-25、UPLC-B 溶液* 2-26 を調製し、30 % B 溶液で平衡化した Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) に 5 μl のタンパク質溶液をロードし、流速 0.2 ml/min で 30 % B から 50 % B の範囲で 15 分間直線濃度勾配をかけた。質量分析は XevoQ-TOF mass spectrometer (Waters) で行った。

* 2-25 UPLC-A 溶液	
ギ酸	1ml
Milli-Q水	999ml

* 2-26 UPLC-B 溶液	
ギ酸	1ml
アセトニトリル	999ml

II-III-X. 発現したカルモデュリン変異体のアジド基選択的蛍光修飾

以下に示す組成* 2-27 で全量 20 μ l の蛍光修飾反応液を調製した。反応液は 30°C で 1 時間保温した後、15 % SDS-PAGE で分離した。泳動後 LAS-3000 (富士フィルム) で蛍光イメージを撮影した後、Coomassie brilliant blue (CBB)* 2-35 で染色した。

* 2-27 蛍光修飾	
12.5 mM	Tris-HCl (pH7.6)
10 μ M	DF568
3 μ M	CaM

II-III-XI. カルモデュリン結合ペプチド融合黄色蛍光タンパク質の発現と精製

大腸菌 ER2566 株を pCAL-CBP-YFP で形質転換させ、50 μ g/ml アンピシリンを含む LB (LB-amp) 寒天培地で 37°C、一晚培養した。シングルコロニーを爪楊枝で突き、2 ml の LB-amp 液体培地で 37°C、2 時間プレ培養した。プレ培養液は 100 ml の LB-amp 培地で本培養し、OD₆₀₀ が 0.7 付近に達したとき、終濃度 0.5 mM となるように IPTG を加え、37°C で 20 時間培養を続けた。培養後、集菌した菌体を 10 ml の sonication buffer に懸濁し、遮光下で 30 分間 [(sonication : 20sec, cooling : 40sec) \times 30] 超音波破碎した。破碎した溶液を 30,000 \times g、4°C で 20 分間遠心し、可溶性画分を回収した。回収した可溶性画分を Bio-RAD 社製 10ml ポリプレップカラムに sonication buffer で平衡化した 0.8 ml の Ni-NTA agarose 樹脂にロードした。さらに、2 ml の Ni-Wash buffer* 2-28 で洗浄した後、10 ml の Ni-Wash buffer でさらに洗浄した。その後、2 ml の Ni-Elution buffer* 2-29 で溶出した。発現したタンパク質は SDS-PAGE* 2-31~34 で分離した後、CBB* 2-35 で染色した。発現したタンパク質は Amicon Ultra (MWCO 10,000) で濃縮し、保存用 buffer* 2-30 に置換して -30°C で保存した。

* 2-28 Ni-wash buffer		* 2-29 Ni-Elution buffer	
20mM	Tris-HCl(pH7.6)	20mM	Tris-HCl(pH7.6)
1mM	MgCl ₂	1mM	MgCl ₂
200mM	KCl	200mM	KCl
5%	グリセロール	5%	グリセロール
6mM	β-メルカプトエタノール	6mM	β-メルカプトエタノール
20mM	イミダゾール	250mM	イミダゾール

* 2-30 保存用 buffer		* 2-31 10×SDS PAGE buffer (1L)	
20mM	Tris-HCl(pH7.6)	Tris-塩基	30g
1mM	MgCl ₂	グリシン	144g
40mM	KCl	SDS	10g
50%	グリセロール		
6mM	β-メルカプトエタノール		

* 2-32 SDS PAGE sample bufffer	
0.5M Tris-HCl(pH6.8)	250μl
10% SDS	400μl
β-メルカプトエタノール	100μl
1% BPB	20μl
50% グリセロール	400μl
Milli-Q水	Up to 2ml

* 2-33 12.5% SDS-PAGE (濃縮ゲル)		* 2-34 12.5% SDS-PAGE (分離ゲル)	
0.5M Tris-HCl(pH6.8)	1ml	1.5M Tris-HCl(pH8.8)	2ml
40% アクリルアミド (アクリルアミド：ビス=19：1)	0.4ml	40% アクリルアミド (アクリルアミド：ビス=19：1)	2.5ml
10% SDS	40μl	10% SDS	80μl
Milli-Q水	Up to 4ml	Milli-Q水	Up to 8
40% APS	40μl	40% APS	40μl
TEMED	5μl	TEMED	5μl

* 2-35 Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色

CBB	2.5g
エタノール	250ml
氷酢酸	100ml
Milli-Q水	650ml

II-III-XII. カルモデュリンと CBP-YFP との光クロスリンク反応

以下に示す組成* 2-36で光クロスリンク反応の反応液を調製した。反応液は 37°C で 15 分間保温し、CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP) を使って 30 分間、360 nm の UV を照射した。反応後、12.5 % SDS-PAGE で分離し、CBB* 2-35 で染色した。

* 2-36 光クロスリンク反応組成	
10mM	Tris-HCl(pH7.6)
1mM	CaCl ₂
6μM	CaM
10μM	CBP-YFP
Up to 20μl	Milli-Q水

II-IV. 結果と考察

II-IV-I. 大腸菌内在性 aaRSs に認識されない WB-tRNA^{Sup} のスクリーニング

大腸菌生細胞中で非標準アミノ酸をアンバーコドン特異的に導入するためには、tRNA^{Tyr}_(CUA)が大腸菌内在性の aaRSs の基質となてはいけない。*M. acetivorans* tRNA^{Tyr}_(CUA) が大腸菌生細胞中で大腸菌由来 aaRSs には認識されず、*M. acetivorans* TyrRS にのみ認識されるかどうかを、β-galactosidase 遺伝子内の 125 番目の アスパラギンをコードするコドンがアンバーコドンに変異した大腸菌 CA274 株を利用して確認した。*M. acetivorans* tRNA^{Tyr}_(CUA) が大腸菌内在性 aaRSs に認識され、何らかのアミノ酸をチャージされた場合、β-ガラクトシダーゼ遺伝子内のアンバーコドンはサプレスされ、完全長の β-galactosidase が発現して青コロニーが現れる。実際に *M. acetivorans* tRNA^{Tyr}_(CUA) を含むプラスミド pRP_tyrTsup を大腸菌 CA274 株に導入し、LB-Cm/X-Gal/IPTG plate で一晚培養した結果、得られたコロニーは青色だった。このことから、*M. acetivorans* tRNA^{Tyr}_(CUA) が大腸菌由来のいずれかの aaRS に認識されてアミノアシル化され、アンバーコドンをサプレスしたと思われる。もし、このままの状態では *M. acetivorans* tRNA^{Tyr}_(CUA) を非天然アミノ酸用として使用した場合、この tRNA は何らかの内在性 aaRS によって標準アミノ酸をミスチャージされてしまうことが予想される。そこで、*M. acetivorans* TyrRS にのみ認識される tRNA^{Tyr}_(CUA) (“well-behaved” suppressor tRNA^{Tyr} (WB-tRNA^{Sup})) を作製するために、サプレッション効率に関わると予想される tRNA の 7 ヶ所にランダムに変異を加えたライブラリーを作製した (図2-4.A)。変異箇所は tRNA ループ中の保存されていない部位を選択した。保存されている配列については tRNA の L 字型構造の安定化に必要と考え、変異を導入しなかった [2-22-24]。この tRNA ライブラリーを大腸菌 CA274 株に導入し、2 段階の青白選別を行った (図2-3)。作製した tRNA ライブラリーと *M. acetivorans* TyrRS 遺伝子を含むプラスミドで CA274 株を形質転換させ、LB-Cm/X-Gal/IPTG 寒天培地で一晚培養した。その結果、48 個の青コロニーが LB-Cm/X-Gal/IPTG 寒天培地上に得られた。青コロニーは tRNA^{Tyr}_(CUA) が *M. acetivorans* 由来 TyrRS または内在性の aaRSs のどちらかに

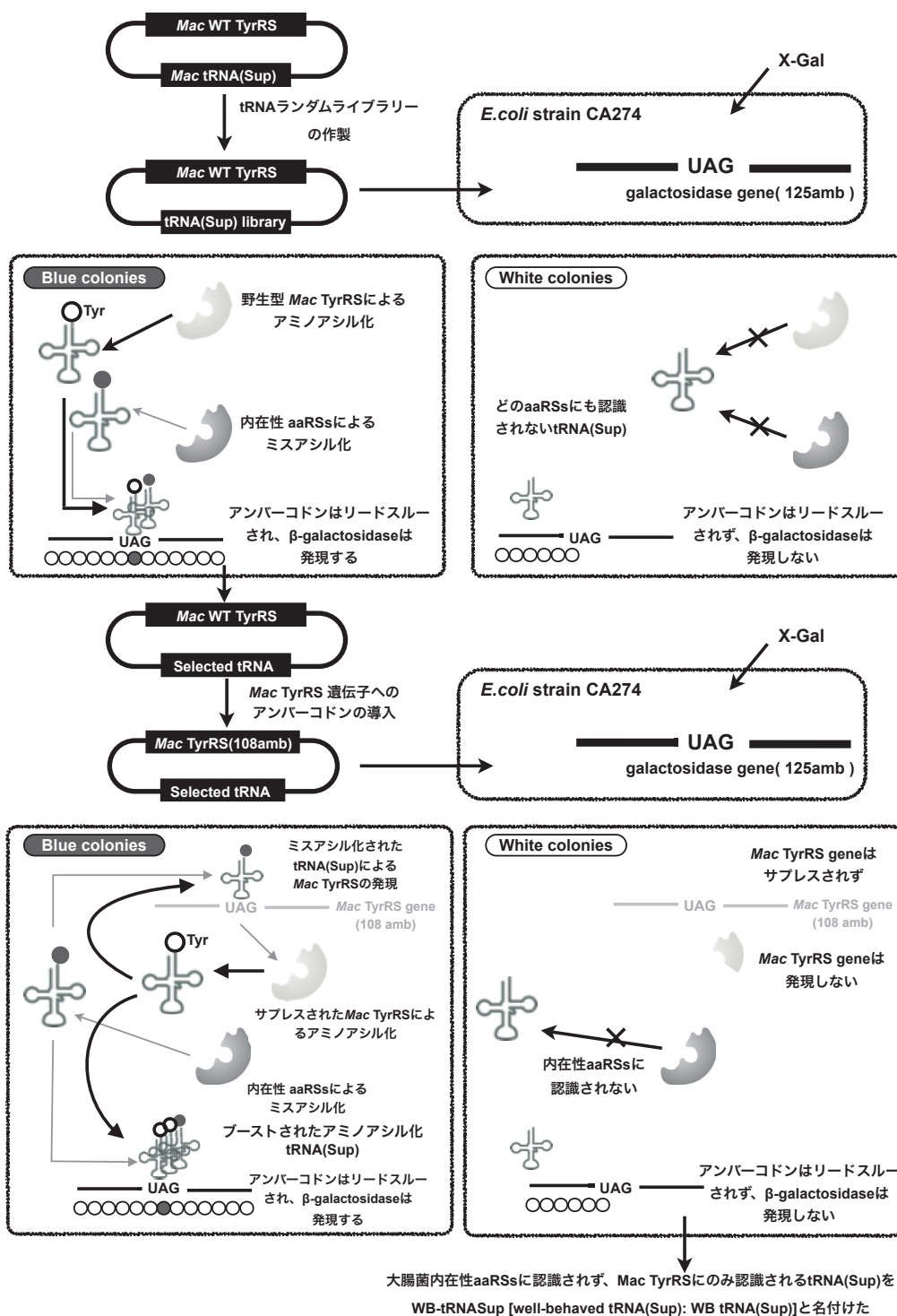


図2-3. 本章で行った大腸菌生細胞中で *M. acetivorans* TyrRS にのみ認識されるアンバーサプレッサー tRNA (WB-tRNA(Sup)) の選別

認識され、アンバーコドンを読みスルーしたことを意味する。大腸菌内在性 aaRSs に認識される tRNA^{Tyr}_(CUA) を除くために、得られた青コロニーからプラスミドを抽出し、プラスミドに含まれる *M. acetivorans* TyrRS 遺伝子の 108 位のチロシンコドンにアンバー変異を加えてネガティブセレクションを行った。この tRNA ライブラリーを大腸菌 CA274 株に導入し、青白選別を行い大腸菌内在性 aaRSs によって少量の tRNA^{Tyr}_(CUA) がアミノアシル化されると、*M. acetivorans* TyrRS のアンバーコドンが読みスルーされ *M. acetivorans* TyrRS が発現する。それにより、tRNA^{Tyr}_(CUA) のアミノアシル化が促進され、β-ガラクトシダーゼの活性が回復し、青コロニーとして現れる (図2-3)。

過去に、我々は酵母由来アンバーサプレッサー tRNA^{Tyr} がわずかに大腸菌内在性リジル-tRNA 合成酵素に認識され、リジンをミスチャージしてしまうことを報告している [2-25]。さらに、酵母アンバーサプレッサー tRNA^{Tyr} のアンチコドンステムを古細菌様に変異させた結果、リジン受容能が減少する代わりにグルタミン受容能が現れることがわかった [2-26]。これらの結果は大腸菌細胞中でアンバーコドン部位には、リジンやグルタミンが導入されるかもしれないことを示している。そこで、*M. acetivorans* TyrRS Y108Q、Y108K 変異体をそれぞれ作製し、これらの TyrRS 変異体がアンバーサプレッサー tRNA^{Tyr} にチロシンをチャージできるかどうか調べるために、大腸菌 CA274 株を利用した青白選別を行った。形質転換させた大腸菌 CA274 株を LB/Cm/X-Gal/IPTG 寒天培地で培養した結果、得られたコロニーは全て青コロニーであった。この結果は *M. acetivorans* TyrRS の 108 位にリジン又はグルタミンが導入されても、*M. acetivorans* TyrRS のアミノアシル化活性は保持されていることを示す。そのため、今回の選別で白コロニーに含まれる tRNA^{Tyr}_(CUA) は、大腸菌内在性 aaRSs に認識されない WB-tRNA^{Sup} と判断できる。この *M. acetivorans* TyrRS の 108 位にアンバーコドンを導入した tRNA ライブラリーで CA274 株を形質転換させた結果、5 個の白コロニーを得ることができた。得られたコロニーからプラスミドを単離し、シーケンスによって配列を決定した結果、得られた tRNA^{Tyr}_(CUA) のうち 3 つは tRNA の構造を

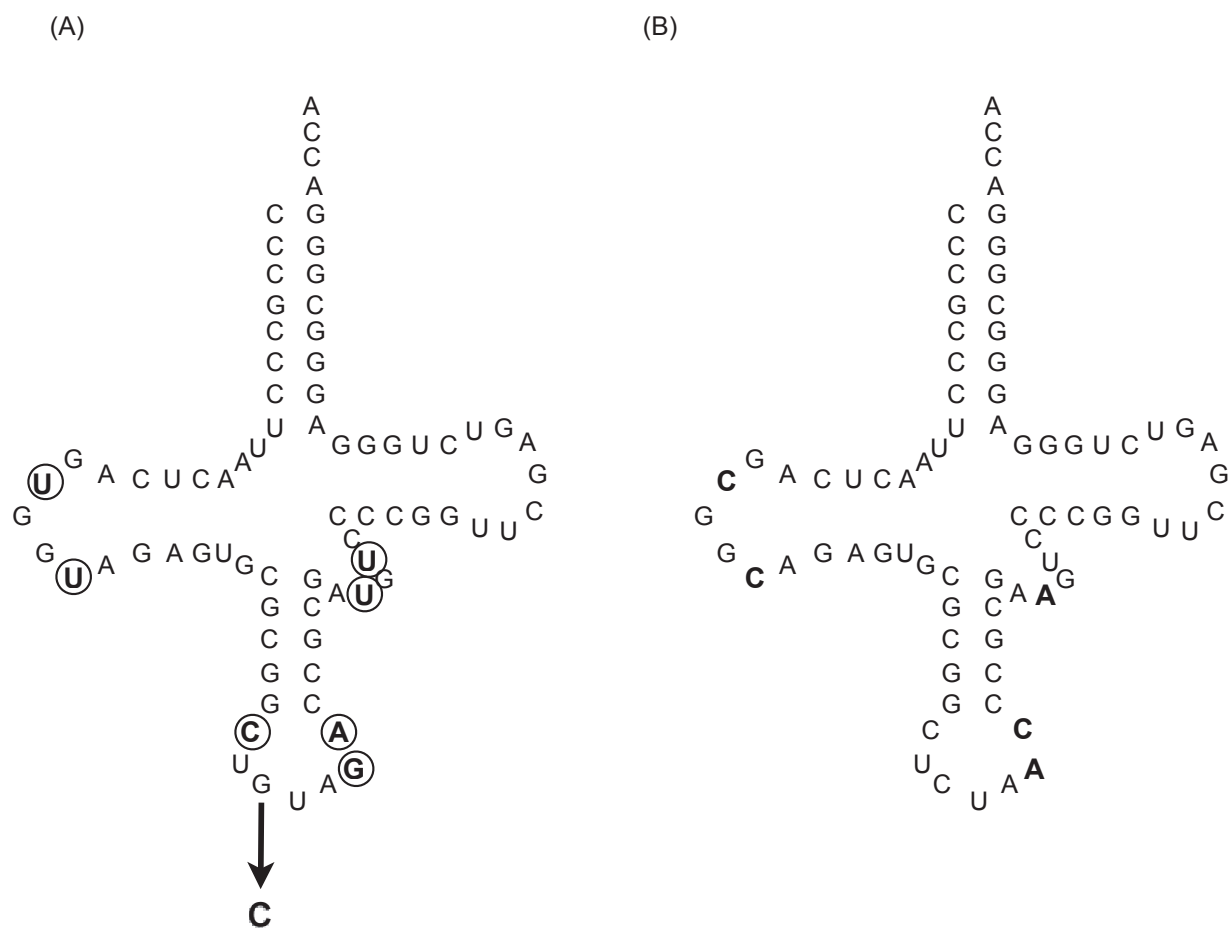


図2-4. 選別前後の tRNA の二次構造

- (A) *M. acetivorans* tRNA^{Tyr} の 7 ヶ所にランダムな変異を導入し、
アンチコドン を GUA から CUA に点変異させた。変異導入箇所は丸で囲った。
- (B) 選別の結果得られた tRNA^{Tyr}_(CUA) (WB-tRNA^{Sup})。

取らない、欠損した配列をしており、残りの2つは同じ配列 (WB-tRNA^{Sup}と命名)であった。今回、*M. acetivorans* tRNA^{Tyr} (CUA) の7ヶ所のランダムな変異を加えたが、得られた WB-tRNA^{Sup} は2ヶ所は元の配列のままで変異が入らず、U17A、U20C、G37A、A38C、U45Aの変異が確認された (図2-4.B 太字部分)。

II-IV-II. 3 位置換チロシンアナログを特異的に認識する

M. acetivorans TyrRS 変異体のスクリーニング

IV -I. で大腸菌内在性 aaRSs には認識されず、*M. acetivorans* TyrRS にのみ認識される WB-tRNA^{Sup} を作製できた。次に *M. acetivorans* TyrRS のチロシン結合ポケットに変異を加え、標準アミノ酸を認識せず、非標準アミノ酸のみを認識する TyrRS 変異体の作製を試みた。過去の古細菌 TyrRS の結晶構造情報を参考にして、*M. acetivorans* TyrRS のチロシン結合ポケットと思われる残基のうち、Y33, H71, Q113, D162, I163 を選択し、ランダムに変異を加えた変異体ライブラリーを作製し、3段階の選別を行った (図2-5) [2-23,27]。このとき、導入したい非標準アミノ酸である N₃-Y は光で壊れてしまうなど扱いが難しいので、セレクションには同じ3位置換チロシンアナログである 3-ブロモチロシン (Br-Y) を使用した。

まず、WB-tRNA^{Sup} 遺伝子と TyrRS ライブラリーを含むプラスミドで大腸菌 CA274 株を形質転換させ、Br-Y を含む LB-Cm/X-Gal/IPTG 寒天培地で一晚培養した。TyrRS 変異体が標準アミノ酸か Br-Y を認識した場合、β-ガラクトシダーゼ遺伝子内のアンバーコドンはサプレスされ、青コロニーが得られる。一方、TyrRS が発現しなかった、またはどのアミノ酸も認識しなかった場合は白コロニーが現れる。今回の選別の結果、41 個の青コロニーが得られた。全ての青コロニーからプラスミドを抽出し、Br-Y を含まない LB-Cm/X-Gal/IPTG 培地で再度選別を行った。この選別では、目的とする基質である Br-Y が含まれていないことから、標準アミノ酸を認識せず、Br-Y を認識する TyrRS 変異体は白コロニーとして現れる。この選別で得られた白コロニーから変異体ラ

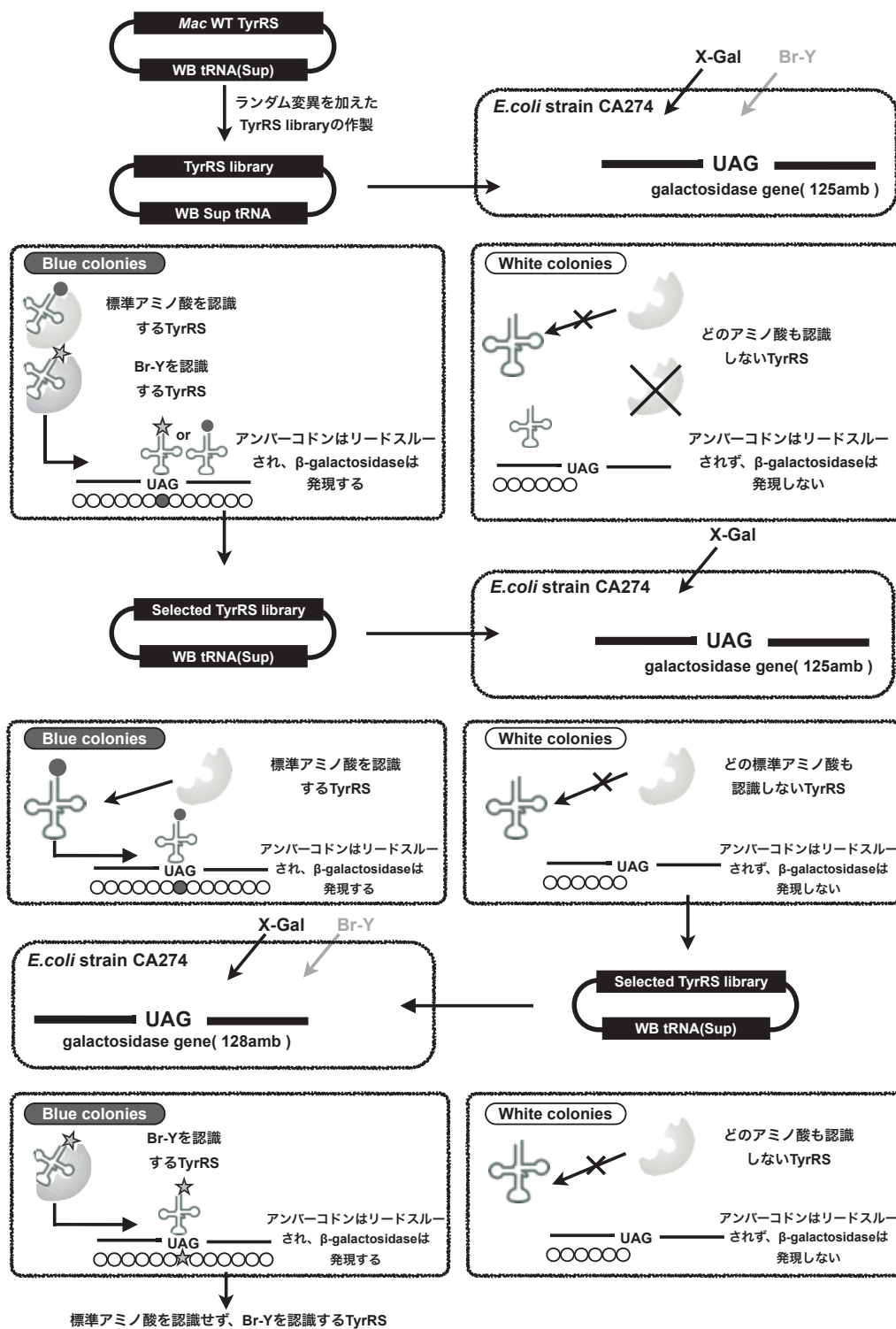


図2-5. 本章で行った 3 位置換チロシンアナログを特異的に認識できる
TyrRS 変異体 (R3YRS) の選別スキーム

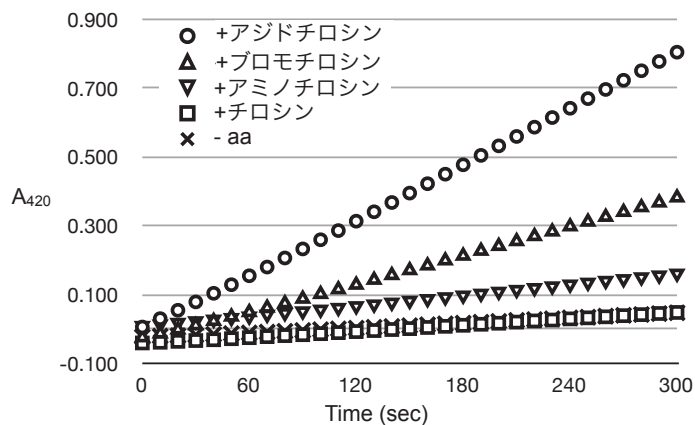
イブラリーを単離し、念のため再度 Br-Y を含む LB-Cm/X-Gal/IPTG 培地で培養し、青コロニーとなることを確認した。得られた 3 個の青コロニーからプラスミドをそれぞれ単離し、シーケンスによって配列を確認した結果、全て同じ Y33A、H71A、Q113I、D162E、I163L の変異が確認された。この結果得られたプラスミドを pRP_WB-Sup&R3YS と名付けた (図2-2)。

II-IV-III. R3YRSの基質認識

得られた *M. acetivorans* TyrRS 変異体 (R3YRS) がどのようなアミノ酸を基質として認識できるのか調べるために、pRP_WB-Sup&R3YS を含む CA274 株を様々なアミノ酸を含む培地で培養し、発現した β -ガラクトシダーゼの活性を測定することで、R3YRS の基質特異性を評価した。pRP_WB-Sup&R3YS で大腸菌 CA274 株を形質転換し、ブロモチロシン、アジドチロシン、アミノチロシン、チロシン存在下で培養した後、 β -ガラクトシダーゼの活性を測定した (図2-6A)。まず、Tyr を加えた培地で培養した場合は、 β -ガラクトシダーゼの活性はほとんど検出されなかった。また、選別に使用したブロモチロシンで β -ガラクトシダーゼの活性が回復していることから、今回得られた R3YRS は予想通りチロシンを含む標準アミノ酸を認識せず、ブロモチロシンを認識できる TyrRS 変異体であることが確認できた。さらに、アジドチロシンを培地に加えた場合、ブロモチロシンよりも高い β -ガラクトシダーゼの活性が得られたことと、アジドチロシンが生体内で還元されて生じるアミノチロシンを培地に加えた場合には β -ガラクトシダーゼの活性がほとんど回復されなかったことから、今回得られた R3YRS 変異体は、還元されたアミノチロシンをほとんど WB-tRNA^{Sup} に結合せず、アジドチロシンを効率よく WB-tRNA^{Sup} に結合できるものと思われる。

また、ヨードチロシンを培地に添加したとき、アジドチロシンを培地に添加した場合と同程度の β -ガラクトシダーゼ活性が得られた (data not shown)。以前、Sakamoto らは *M. jannaschii* TyrRS を改変させ、ヨードチロシンを認識できる TyrRS 変異体 (iodoTyrRS-*mj*) の選別に成功してい

(A)



(B)

<i>M. acetivorans</i>	33	71	113	162	163
野性型 TyrRS	Y	H	Q	D	I
R3YRS	A	A	I	E	L
iodoTyrRS- <i>mj</i>	Y	A	Q	T	S
野性型 TyrRS	Y	H	Q	D	I
<i>M. jannaschii</i>	32	70	109	158	159

(C)

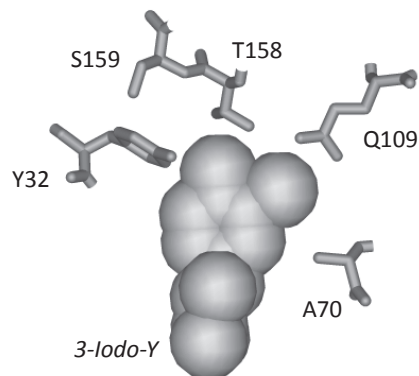


図2-6. R3YRS のアミノ特異性とアミノ酸結合部位周辺のアミノ酸残基

(A) β -galactosidase 酵素活性回復実験によるアンバーサプレッション効率の検定

(B) *M. acetivorans* TyrRS 野生型と R3YRS 変異体、*M. jannaschii* TyrRS 野生型と iodoTyrRS-*mj* のアミノ酸結合ポケット中のアミノ酸配列を比較した結果

(C) iodoTyrRS-*mj* とヨードチロシンの複合体の結晶構造 (PDB ID : 2ZP1)。iodoTyrRS-*mj* のアミノ酸残基はstickで、ヨードチロシンは spacefill で示した。この構造は imol (www.pirx.com/iMol/index.shtml) で作製した。

る [2-28, 29]。その結晶構造情報から、基質認識に関わるアミノ酸残基を図2-6. B に示し、R3YRS と比較したところ、70 位と 158 位に導入された変異が基質であるチロシンの 3 位付近に空間を作りヨード原子が入れるようになっていると共に、158 位の変異がチロシンの認識を減少させている。他にも様々な非標準アミノ酸を認識できる TyrRS 変異体の結晶構造解析が行われているが、多くの TyrRS 変異体では 32 位のチロシン残基に置換がある [2-8, 27]。今回の選別で得られた R3YRS 変異体には、33 位と 71 位がアラニン残基に置換されており、これらの変異が組み合わさることでアミノ酸結合ポケットにブロモ原子、ヨード原子やアジド基などを含む 3 位置換チロシンアナログの導入を可能にしていると考えられる。

II-IV-IV. N₃-Y を部位特異的に導入したカルモデュリンの発現

ここまでの結果から、大腸菌細胞中で 3 位置換チロシンアナログを特異的に認識できる TyrRS 変異体とアンバーサプレッサー tRNA を作製することができた。これらの遺伝子を含むプラスミド pRP_WB-Sup&R3YS とモデルタンパク質カルモデュリンの 80 位にアンバー変異を持つ遺伝子を利用して大腸菌生細胞中で N₃-Y 含有 CaM の発現を試みた。まず、大腸菌 HMS174 (DE3) 株に pRP_WB-Sup&R3YS と pETCaM80_{am} を導入し、発現を試みた。しかし、完全長の CaM を発現できなかった。同様に、pRP_WB-Sup&R3YS と pETCaM80_{am} を BL21 (DE3) 株に導入したが、完全長の CaM を発現できなかった。この原因として、T7 RNA polymerase による転写速度が早すぎるために、アンバーサプレッサー tRNA のアジドチロシル化が間に合わず、翻訳が停止してしまうのではないかと考えた。

そこで、ファージ由来の T7 プロモーターではなく、大腸菌 RNA polymerase が認識できる *tac* プロモーター下に CaM 変異体遺伝子を配したプラスミド pTACCaM80_{am} を作製した (図2-2.B)。HMS174 株に pRP_WB-Sup&R3YS と pTACCaM80_{am} を導入して発現させ、PhenylSepharose™ CL4B で精製した。その結果、完全長の CaM と思われるバンドを溶出画分に得ることができた (図

2-7.A、レーン6)。この結果、100 ml の培養あたり 1.1 mg の完全長 CaM を得ることができた。得られた CaM に N₃-Y が取り込まれているのか確かめるために、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) による分析を行った (図2-7.B, C)。その結果、80 位に N₃-Y が取り込まれた CaM (CaM80N₃-Y, 質量計算値 16,808 Da) が確認され、チロシンやリジンを含む標準アミノ酸が 80 位に取り込まれた際に生じる質量は確認できなかった。しかしながら、発現した CaM の 80 位にアジドチロシンの還元型であるアミノチロシンが取り込まれていると思われる質量 (質量計算値 16781 Da) が確認された。β-ガラクトシダーゼによるアンバーサプレッション活性測定では、R3YRS 変異体はアミノチロシンをほとんど認識しないことから、質量分析で確認された 80 位へのアミノチロシンの取り込みは N₃-Y が導入された CaM が翻訳された後に大腸菌内で N₃-Y がアミノチロシンに還元されたと考えられる。

また、この発現システムを BL21 株に適用し、CaM 変異体を発現した結果、100 ml の培養液あたり 0.5 mg の完全長 CaM が発現できた。しかし、LC-MS による分析結果から N₃-Y は約 30 % しか導入されていなかった (表2-2)。このことから、発現量、N₃-Y の取り込み共に、B 株由来の菌株よりも K 株由来の方が効率的であることが示唆された。

II-IV-V. 発現したカルモデュリンの蛍光修飾

IV-IV. で大腸菌生細胞を利用して、N₃-Y を部位特異的に導入された CaM を発現することができた。この発現した CaM 変異体がアジド基選択的な修飾反応に利用できるか調べるために、Copper-free click chemistry 反応による蛍光標識を試みた。市販されている dibenzylcyclooctyne Fluor568 (DF568) (図2-8.A) を CaM wild-type と CaM 変異体に反応させた。その結果、CaM 変異体にのみ、蛍光を観察することができた (図2-8.B)。

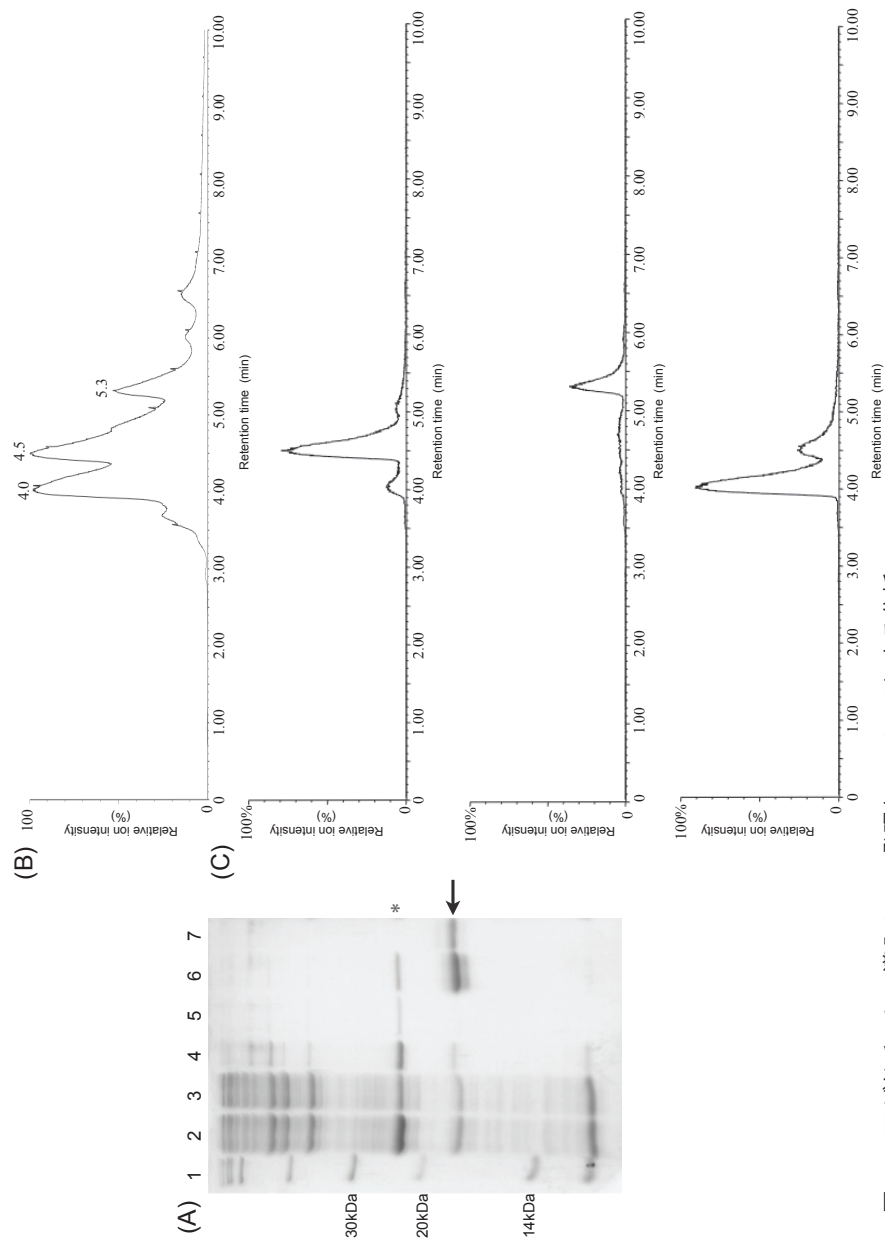


図. 2-7. アジドチロシン導入CaMの発現とUPLC-MSによる分析

(A) 大腸菌で発現したN₃-Y導入カルモデュリンのPhenylSepharose™ CL-4Bによる精製結果。lane 1: タンパクマーカー、lane 2: 細胞破砕液、lane 3: 素通り画分、lane 4: Wash 1 画分、lane 5: Wash2 画分、lane 6: Elution 画分、lane 7: 野生型 CaM。アスタリスクはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを示す。

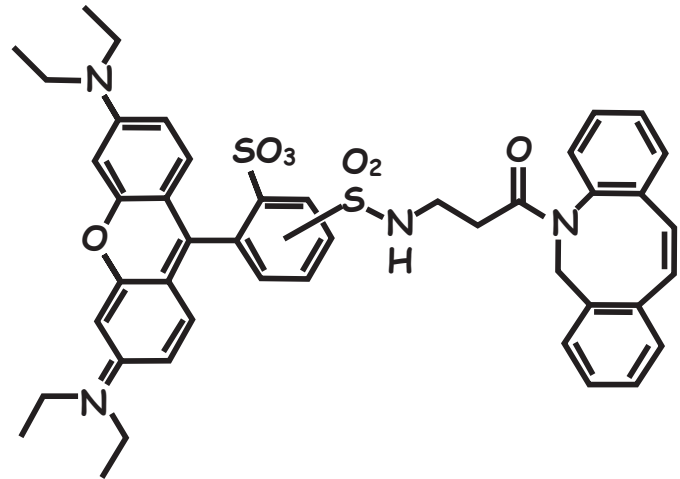
(B) UPLC-MSによるN₃-Y導入CaMの分析結果

(C) 上から順に3-アミノチロシンを80位に含むCaM(計算値:16783Da)のSIC(m/z= 1399.533, 1291.954, 1199.743, 1119.827)、N末端のメチオニンが外れたCaM80N₃-Y (計算値:16809Da)のSIC(1401.700, 1304.200, 1211.114, 1130.440)、N末端がホルミルメチオニンのCaM80N₃-Y (計算値:16968Da)のSIC(m/z= 1414.967, 1306.200, 1212.971, 1132.173)。

表 2-2. タンパク質の発現量とN₃-Y導入効率と発現に用いる大腸菌株の影響

プラスミド	発現に用いた大腸菌株	80位に導入されたN ₃ -Y の割合(%)	CaM 発現量 (mg protein / 100ml culture medium)
pRP_WB-Sup&R3YS	HMS174	43 ± 12	0.93 ± 0.3
	BL21	29 ± 4	0.5 ± 0.15
pRP_WB-Sup&araR3YS&R3YS	HMS174	57 ± 10	2.68 ± 0.15
	MV1184	32 ± 18	1.04 ± 0.5
	SHuffle (K-12)	97 ± 3	1.94 ± 0.29

(A)



(B)

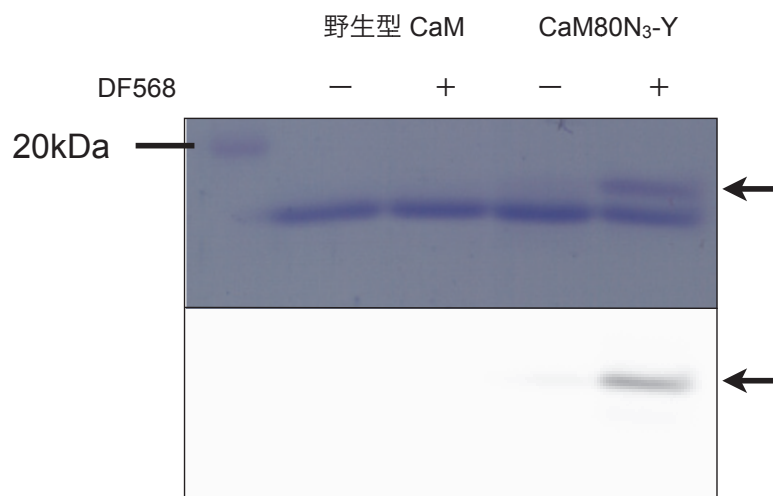


図2-8. アジド基選択的な蛍光修飾

(A) 今回修飾に使用した蛍光試薬 (DF-568)

(B) 野生型 CaM または CaM80N₃-Y を DF-568 と 30℃ 1 時間反応させ、15 % SDS-PAGE によって分離した。泳動後、Las3000で蛍光イメージを確認し(下)、CBB によって染色した(上)。蛍光標識された CaM は矢印で示した。

II-IV-VI. pRP_WB-Sup&R3YS へのアラビノースで誘導可能な R3YS 遺伝子の導入

Wang らはアラビノースによって誘導可能なプロモーターを非標準アミノ酸を認識する aaRS 変異体を発現するためのプラスミドに導入することで、非標準アミノ酸含有タンパク質の発現量を増加させることに成功している [2-30]。我々も一度の培養でより多くの CaM80N₃-Y を発現するために、アラビノースで誘導調節が可能な R3YS 遺伝子を pRP_WB-Sup&R3YS に導入した。得られたプラスミド pRP_WB-Sup&araR3YS&R3YS を大腸菌 HMS174 株に導入し、CaM80N₃-Y の発現を試みた。発現に最適な条件を検討するために、アラビノース濃度を 0-2%、IPTG 濃度については 0.5-2 mM の範囲で検討し、37°C で 20 時間培養した。その結果 IPTG 濃度は完全長 CaM の発現量に影響しなかったが、加えるアラビノースの濃度によって完全長 CaM の発現量には大きな変化があった (図2-9)。検討の結果、0.2 % アラビノース、0.5 mM IPTG で発現誘導した場合に最も多くの完全長 CaM を発現できることが確認できた。ここで、アラビノースを終濃度 0.2 % になるように培地に加えたときよりも、2 % 加えたときに完全長 CaM の発現量が減少した理由を調べるために、各条件で発現したときの菌体量を測定した。その結果、アラビノース濃度が 0.2 % のときよりも 2 % の方が菌体重量が半分程度に減少していることが確認できた。この結果から、過剰量のアラビノースの添加は大腸菌の生育に影響を与え、完全長 CaM の発現量を減少させていると考えられる。この条件検討の結果、100 ml の培養液から平均 2.7 mg の完全長 CaM を発現することができた。しかしながら、発現した CaM を LC-MS で分析した結果、N₃-Y の取り込み効率は 57 % であった (図2-10.A、表2-2)。

発現した 完全長 CaM をCopper-free click chemistry により DF568 と反応させ、LC-MS による分析を行った (図2-10.B)。その結果、図2-10.A で見られた 80 位に N₃-Y が取り込まれた完全長 CaM (CaM80N₃-Y) を含むピークは消失し、6.3 min に新たなピークが現れた。このピークを分析した結果、アジド基選択的に DF568 が修飾された CaM の質量と一致した。この結果から、CaM80N₃-Y さえ合成できれば、ほぼ 100% の効率でタンパク質一分子に一分子の修飾を施すこと

ができることがわかった。そこで、より効率よく CaM80N₃-Y だけを発現するために、発現に用いる菌体の検討を行うことにした。

II-IV-VII. 様々な大腸菌株を利用した CaM80N₃-Y の発現

これまでに示した結果から、我々は大腸菌生細胞を利用して、N₃-Y を部位特異的に導入した CaM を発現することに成功した。しかし、発現した CaM の80位に導入された N₃-Y の多くは、菌体内でアミノチロシンに還元されてしまっている。IV-IV. で我々は大腸菌 B 株よりも K 株由来の菌種を利用して発現した場合にアジド基が還元されにくいことを示した。そのため、K 株由来の様々な菌株で CaM80N₃-Y の発現条件の最適化を行った。

内在性サプレッサー tRNA を持たない K 株由来大腸菌のうち MV1184 株と SHuffle (K12) 株に pRP_WB-Sup&araR3YS&R3YS と pTACCaM80_{am} を導入し、CaM80N₃-Y を発現、精製した。そして、発現した完全長 CaM を LC-MS で分析し、80 位に N₃-Y が導入された効率の平均値を表 2-2 に示した。その結果、SHuffle (K12) 株で発現した場合、発現した完全長 CaM のほとんどが CaM80N₃-Y であることが確認できた (表2-2)。SHuffle (K12) 株がタンパク質の還元に関わる 2 種類の還元酵素 (*trxB*, *gor*) を欠失させており、細胞内が酸化されやすい環境にあることが N₃-Y のアミノチロシンへの還元を抑えたと考えられる。我々は、SHuffle (K12) 株を利用して 100 ml 培養あたり約 2 mg の CaM80N₃-Y を発現できた。

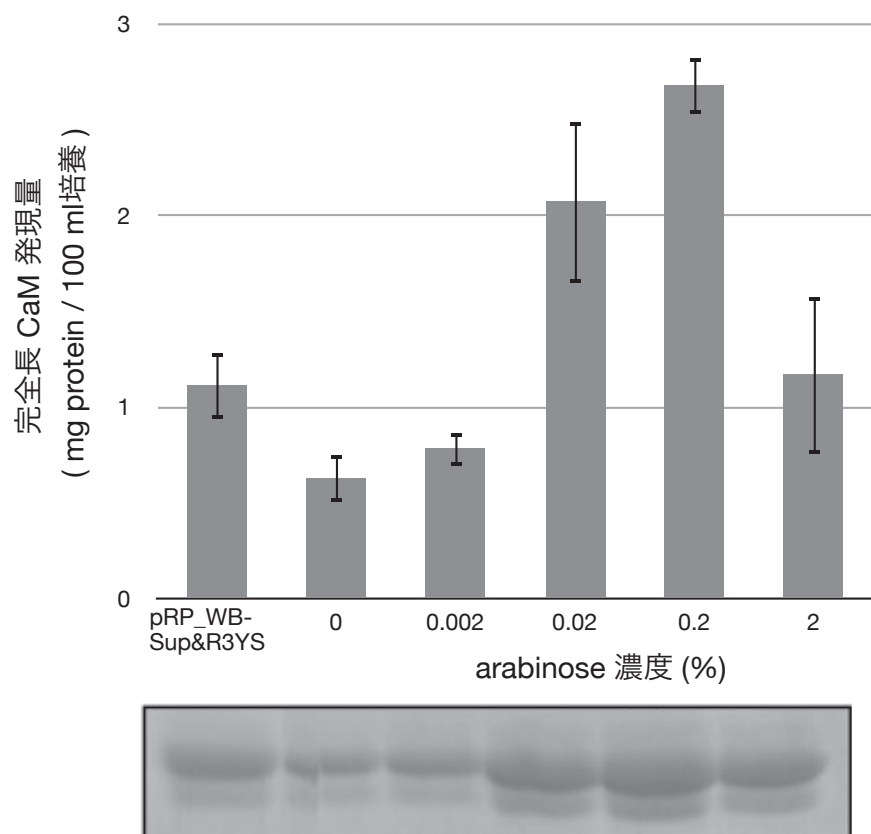


図2-9. N₃-Y 含有タンパク質の発現量にアラビノース濃度が与える影響
アラビノースによる R3YRS の発現誘導が CaM の発現量に与える影響を調べるために、各濃度のアラビノースを加えた培地で N₃-Y 含有 CaM を発現させた。Phenyl Sepharose™ CL-4B による精製後、発現量を測定し、グラフに示した。各条件で発現したときの培養液 1 ml あたりの発現した CaM を泳動した結果を下に示した。

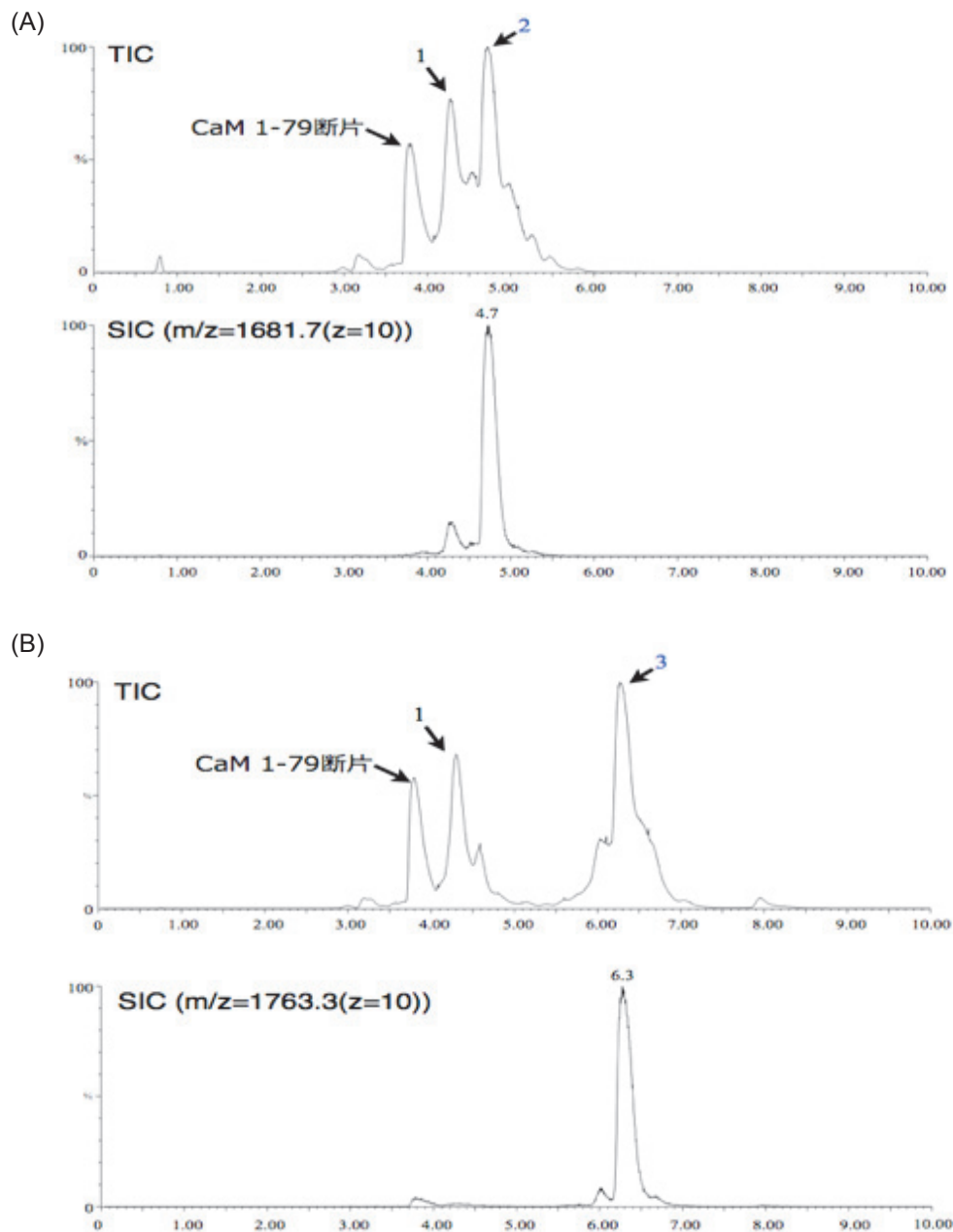


図2-10. pRP_WB-Sup&araR3YS&R3YS を利用して発現した完全長 CaM の蛍光標識と質量分析

(A) pRP_WB-Sup&araR3YS&R3YS を利用して発現した完全長 CaM のUPLC-MSによる分析結果。1 は 80 位にアミノチロシンが含まれる CaM、2 は CaM80N₃-Y の質量と一致したピーク。下はCaM80N₃-Y (計算値: 16809 Da) の SIC (m/z= 1681.7)

(B) 発現した完全長 CaM を DF568 で蛍光標識し、UPLC-MSで分析した結果。1 は 80 位にアミノチロシンが含まれる CaM、3 は 80 位にDF568 が蛍光標識された CaM80N₃-Y の質量と一致したピーク。下は DF568 が結合したCaM80N₃-Y (計算値: 17627 Da) の SIC (m/z= 1763.3)

II-IV-VIII. CaM80N₃-Y と CBP-YFP の光クロスリンク反応

芳香族アジドはタンパク質間相互作用を調べるうえで広く利用されている光クロスリンク剤である。Chin らは *p*-azido-L-phenylalanine が 254 nm の UV 照射で光クロスリンク反応することを報告している [2-6]。N₃-Y は *p*-azido-L-phenylalanine と比較して長波長側の UV を吸収するので、360 nm の UV で光クロスリンク反応が行える。これにより、UV 照射が標的タンパク質の機能に与える影響を抑えることができる。SHuffle (K-12) 株を利用して発現した CaM80N₃-Y とモデルリガンド CBP-YFP を混合し、クロスリンク反応を試みた。野生型 CaM 又は CaM80N₃-Y と CBP-YFP に 360 nm の UV を照射後、反応液を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色によってバンドの確認を行った (図2-11)。その結果、CaM80N₃-Y と CBP-YFP を加えたレーンでは、42 kDa から 79 kDa の間に複数のクロスリンク産物と思われるバンドが確認された (レーン2)。これらは、UV 照射によってアジド基を介して CaM と CBP-YFP が共有結合で架橋されていることが示唆される。対照的に、他のどのレーンにも光クロスリンク産物と思われるバンドは確認できない。Zang らは calcineurin subunit A の CaM 結合ドメインを介して 2 分子の CaM がダイマーを形成することを報告した [2-31]。そのため、複数の CaM80N₃-Y が単一分子の CBP-YFP と結合し、複数のクロスリンク産物のバンドを形成したと考えられる。

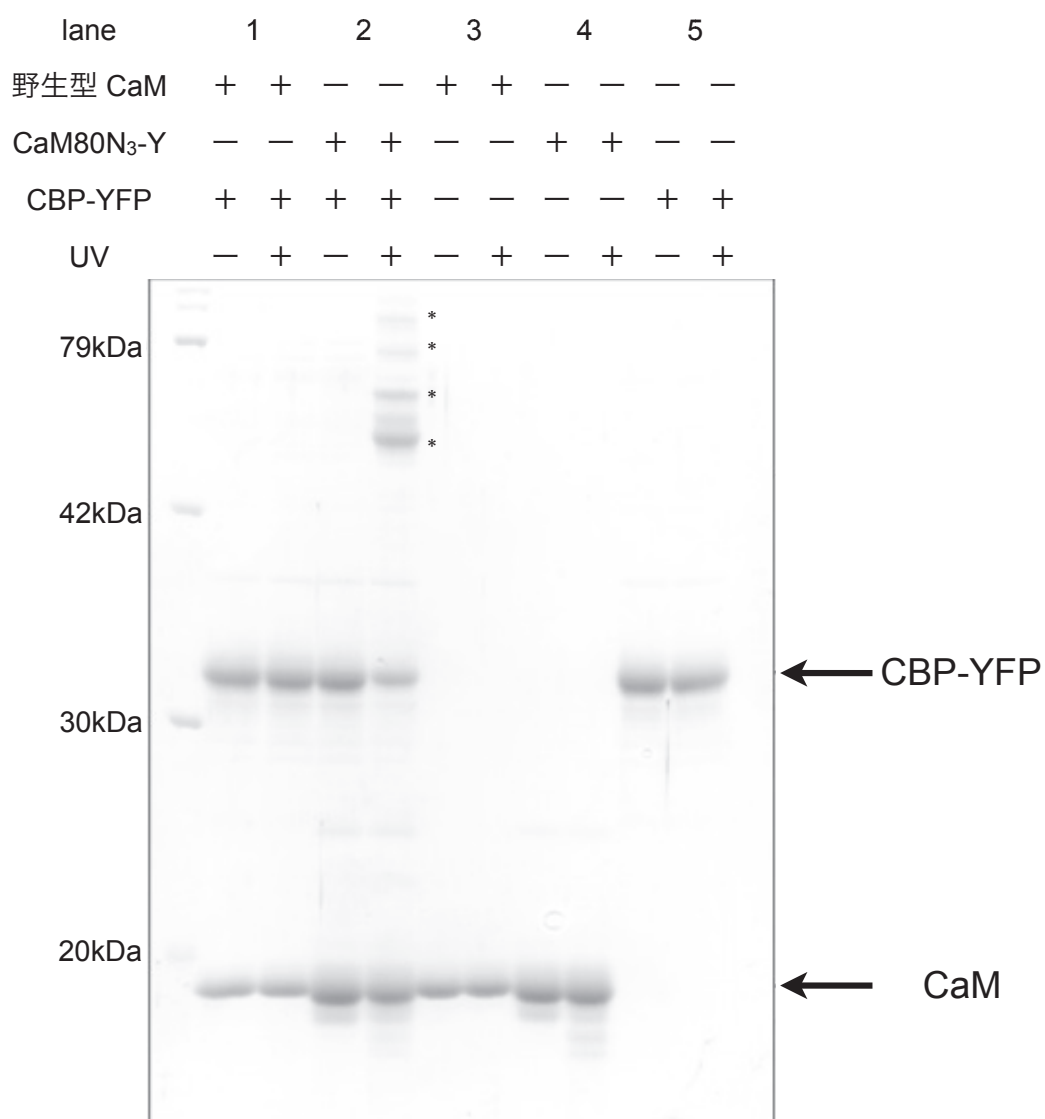


図2-11. 野生型 CaM またはCaM80N₃-YとCBP-YFPのクロスリンク反応
 各反応液を 37℃ でインキュベートした後、反応液をUV照射したものと照射していないものをそれぞれ 12.5% SDS-PAGEで分離し、CBBで分析した。Lane 1 ; 野生型 CaMとCBP-YFP、lane3,4; CaM80N₃-Y とCBP-YFP、lane5,6; 野生型CaM、lane7,8; CaM80N₃-Y、lane9,10; CBP-YFP。クロスリンク産物は*で示した。

まとめとして、我々は pRP_WB-Sup&araR3YS&R3YS と目的タンパク質の任意の部位にアンバー変異を加えた遺伝子を導入した pTAC ベクターを大腸菌 SHuffle (K12) 株に導入することで、簡便で高効率に N₃-Y が導入されたタンパク質を発現できる方法を開発した。そして、発現した 80 位にアジドチロシンを導入したカルモデュリンとカルモデュリン結合ペプチド融合タンパク質との光クロスリンク反応の結果、複合体の形成を確認できた。この結果から、アジドチロシンを導入したタンパク質は蛍光標識によるタンパク質の動態解析だけでなく、光クロスリンク反応によるタンパク質間相互作用の解析にも使用できることを示すことができた。また、現在までに、Ohno らはアジド基を介してビオチン修飾した CaM がモデルリガンド CBP-ECFP との相互作用に影響を与えないことを確認している [2-18]。さらに、Yoshimura らはアジド基を介して CaM をカーボンナノチューブに固定化しても CaM の機能に影響を与えていないことを確認している [2-32]。今回示した方法を利用すれば、大量の N₃-Y 含有タンパク質を調製できるので、この発現システムがプロテオミクス研究において様々な研究に利用されることを期待している。

参考文献

- 2-1. May, J.M. (1989) Selective labeling of the erythrocyte hexose carrier with a maleimide derivative of glucosamine: relationship of an exofacial sulfhydryl to carrier conformation and structure. *Biochemistry* **28**(4), 1718-1725
- 2-2. Cumber, A.J., Forrester, J.A., Foxwell, B.M., Ross, W.C., and Thorpe, P.E. (1985) Preparation of antibody-toxin conjugates. *Methods Enzymol.* **112**, 207-225
- 2-3. Krieg, U.C., Walter, P., and Johnson, A.E. (1986) Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**(22), 8604-8608
- 2-4. Minami, Y., Kawasaki, H., Minami, M., Tanahashi, N., Tanaka, K., and Yahara, I. (2000) A critical role for the proteasome activator PA28 in the Hsp90-dependent protein refolding. *J. Biol. Chem.* **275**(12), 9055-9061
- 2-5. Horney, M.J., Evangelista, C.A., and Rosenzweig, S.A. (2001) Synthesis and characterization of insulin-like growth factor (IGF)-1 photoprobes selective for the IGF-binding proteins (IGFBPs). photoaffinity labeling of the IGF-binding domain on IGFBP-2. *J. Biol. Chem.* **276**(4), 2880-2889
- 2-6. Chin, J.W., Santoro, S.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L., and Schultz, P.G. (2002) Addition of *p*-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **124**(31), 9026-9027
- 2-7. Chin, J.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L., and Schultz, P.G. (2002) Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(17), 11020-11024
- 2-8. Liu, W., Alfonta, L., Mack, A.V., and Schultz, P.G., (2007) Structural basis for the recognition of para-benzoyl-L-phenylalanine by evolved aminoacyl-tRNA synthetases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**(32), 6073-6075
- 2-9. Forné, I., Ludwigsen, J., Imhof, A., Becker, P.B., and Mueller-Planitz, F. (2012) Probing the conformation of the ISWI ATPase domain with genetically encoded photoreactive crosslinkers and mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics*, **11**(4), M111.012088. doi: 10.1074/mcp.M111.012088
- 2-10. Sato, S., Mimasu, S., Sato, A., Hino, N., Sakamoto, K., Umehara, T., and Yokoyama, S. (2011) Crystallographic study of a site-specifically cross-linked protein complex with a genetically incorporated photoreactive amino acid. *Biochemistry*. **50**(2), 250-257

- 2-11. Hino, N., Oyama, M., Sato, A., Mukai, T., Iraha, F., Hayashi, A., Kozuka-Hata, H., Yamamoto, T., Yokoyama, S., and Sakamoto, K. (2011) Genetic incorporation of a photo-crosslinkable amino acid reveals novel protein complexes with GRB2 in mammalian cells. *J Mol Biol.* **406(2)**, 343-353
- 2-12. Yanagisawa, T., Hino, N., Iraha, F., Mukai, T., Sakamoto, K., Yokoyama, S. (2012) Wide-range protein photo-crosslinking achieved by a genetically encoded N(ϵ)-(benzyloxycarbonyl)lysine derivative with a diazirinyl moiety. *Mol. Biosyst.* **8(4)**, 1131-1135
- 2-13. Saxon, E., and Bertozzi, C.R. (2000) Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **287(5460)**, 2007-2010
- 2-14. Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., and Sharpless, K.B. (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41(14)**, 2596-2599
- 2-15. Besanceney-Webler, C., Jiang, H., Zheng, T., Feng, L., Soriano, del, Amo, D., Wang, W., Klivansky, L.M., Marlow, F.L., Liu, Y., and Wu, P. (2011) Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: a comparative study. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50(35)**, 8051-8056
- 2-16. Baskin, J.M., Prescher, J.A., Laughlin, S.T., Agard, N.J., Chang, P.V., Miller, I.A., Lo, A., Codelli, J.A., and Bertozzi, C.R. (2007) Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104(43)**, 16793-16797
- 2-17. Chang, P.V., Prescher, J.A., Sletten, E.M., Baskin, J.M., Miller, I.A., Agard, N.J., Lo, A., and Bertozzi, C.R. (2010) Copper-free click chemistry in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107(5)**, 1821-1826
- 2-18. Ohno, S., Matsui, M., Yokogawa, T., Nakamura, M., Hosoya, T., Hiramatsu, T., Suzuki, M., Hayashi, N., and Nishikawa, K. (2007) Site-selective post-translational modification of proteins using an unnatural amino acid, 3-azidotyrosine. *J. Biochem.* **141(3)**, 335-343
- 2-19. Yokogawa, T., Ohno, S., and Nishikawa, K. (2010) Incorporation of 3-azidotyrosine into proteins through engineering yeast tyrosyl-tRNA synthetase and its application to site-selective protein modification. *Methods Mol. Biol.* **607**, 227-242
- 2-20. Iraha, F., Oki, K., Kobayashi, T., Ohno, S., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Yokoyama, S., and Sakamoto, K. (2010) Functional replacement of the endogenous tyrosyl-tRNA synthetase-tRNA^{Tyr} pair by the archaeal tyrosine pair in *Escherichia coli* for genetic code expansion. *Nucleic Acids Res.* **38(11)**, 3682-3691

- 2-21. Ochman, H., Gerber, A.S., and Hartl, D.L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**(3), 621-623
- 2-22. Kobayashi, T., Nureki, O., Ishitani, R., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Cusack, S., Sakamoto, K., and Yokoyama, S. (2003) Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **10**(6), 425-432
- 2-23. Kuratani, M., Sakai, H., Takahashi, M., Yanagisawa, T., Kobayashi, T., Murayama, K., Chen, L., Liu, Z.J., Wang, B.C., Kuroishi, C., Kuramitsu, S., Terada, T., Bessho, Y., Shirouzu, M., Sekine, S., and Yokoyama, S. (2006) Crystal structures of tyrosyl-tRNA synthetases from archaea. *J. Mol. Biol.* **355**(3), 395–408
- 2-24. Wang, L., and Schultz, P.G. (2001) A general approach for the generation of orthogonal tRNAs. *Chemistry & Biology* **8**(9), 883-890
- 2-25. Fukunaga, J., Yokogawa, T., Ohno, S., and Nishikawa, K. (2006) Misacylation of yeast amber suppressor tRNA(Tyr) by *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase and its effective repression by genetic engineering of the tRNA sequence. *J. Biochem.* **139**(4), 689-696
- 2-26. Fukunaga, J., Ohno, S., Nishikawa, K., and Yokogawa, T. (2006) A base pair at the bottom of the anticodon stem is reciprocally preferred for discrimination of cognate tRNAs by *Escherichia coli* lysyl- and glutaminyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* **34**(10), 3181-3188
- 2-27. Turner, J.M., Graziano, J., Spraggon, G., and Schultz, P.G. (2006) Structural plasticity of an aminoacyl-tRNA synthetase active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**(17), 6483–6488
- 2-28. Sakamoto, K., Murayama, K., Oki, K., Iraha, F., Kato-Murayama, M., Takahashi, M., Ohtake, K., Kobayashi, T., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2009) Genetic encoding of 3-iodo-L-tyrosine in *Escherichia coli* for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography. *Structure* **17**(3), 335–344
- 2-29. Kobayashi, T., Sakamoto, K., Takimura, T., Sekine, R., Kelly, V.P., Kamata, K., Nishimura, S., and Yokoyama, S. (2005) Structural basis of nonnatural amino acid recognition by an engineered aminoacyl-tRNA synthetase for genetic code expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**(5), 1366-1371
- 2-30. Young, T.S., Ahmad, I., Yin, J.A., and Schultz, P.G. (2010) An Enhanced System for Unnatural Amino Acid Mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **395**(2), 361–374
- 2-31. Zhang, Y., Tan, H., Jia, Z., and Chen, G. (2008) Ligand-induced dimer formation of calmodulin. *J. Mol. Recognit.* **21**(4), 267–274

2-32. Yoshimura, S.H., Khan, S., Ohno, S., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Hosoya, T., Maruyama, H., Nakayama, Y. and Takeyasu, K. (2012) Site-specific attachment of a protein to a carbon nanotube end without loss of protein function. *Bioconjug. Chem.* **23**(7), 1488-1493

第3章 3-アジドチロシンを介して部位特異的に

タンパク質を固定化したビーズによる相互作用分子の捕獲

III-I. 背景と目的

第2章では、タンパク質に新規機能を付加することを目的として、アジドチロシン (N_3 -Y) をモデルタンパク質としてのカルモデュリン (CaM) に部位特異的に導入する方法について述べた。その方法として、大腸菌生細胞中で N_3 -Y を特異的に基質として認識できるチロシル-tRNA 合成酵素とそれに対応するアンバーサプレッサー tRNA 遺伝子を選別し、これらの遺伝子を含むプラスミドを大腸菌に導入して、標的タンパク質へアンバーコドン選択的に N_3 -Y を導入した。導入した N_3 -Y の大部分は大腸菌生体内で代謝され、アミノチロシンに変換されていたが、 N_3 -Y 含有 CaM の発現に用いる大腸菌株を検討したところ、SHuffle (K-12) 株を用いた場合、導入されたアジド基はほとんど還元されないことを確認した [3-1]。

上記の結果より、大腸菌生細胞を利用して効率的に N_3 -Y を部位特異的に導入した CaM を発現できるようになった。導入した N_3 -Y は天然のタンパク質にはないアジド基を持ち、光クロスリンカーとして利用可能であると共に、アジド基選択的な化学修飾を施すことができる [3-2~6]。CaM に付加されたこれらの新規機能を利用して、タンパク質間相互作用解析に利用することを考えた。

タンパク質は細胞中で様々な分子と相互作用しており、これらの相互作用分子を同定することは生体システムを理解する上で重要である。タンパク質-生体分子間の相互作用を調べるための代表的な方法として、タンパク質と生体分子が特異的に結合することを利用するアフィニティークロマトグラフィーがある [3-7,8]。この方法は、標的となる生体分子を担体に固定化し、この担体と細胞抽出液のようなタンパク質溶液を反応させ、最適な条件で洗浄後、標的分子と特異的に結合したタンパク質を溶出させる方法である。アフィニティークロマトグラフィーはタンパク質と生体分子の新規相互作用を発見するために利用されるが、担体への非特異的なタンパク質の吸着

に注意する必要がある [3-8]。非特異的なタンパク質のコンタミネーションを防ぐために、Rigaut らはタンデムアフィニティータグ法を提唱した [3-9]。この方法は、標的タンパク質の末端に 2 種類のペプチドタグ導入し、それぞれのペプチドタグを利用してアフィニティークロマトグラフィーを行うことで、非特異的なタンパク質の吸着を抑えている。その他のアプローチとして、Handa らは担体表面をポリグリシジルメタクリレートで覆われた SG ビーズと呼ばれるラテックス製のビーズを開発した [3-10~13]。Shimizu らは、この SG ビーズに対して FK506 を固定化して FK506 結合タンパク質を捕獲したところ、他の担体と比較して非特異的な吸着が少ないことを示した [3-14]。近年、質量分析技術が向上し、アフィニティークロマトグラフィーにより溶出したタンパク質が少量でも同定できるようになっている [3-34]。Marszałł らはアフィニティービーズとしてシリカで覆われた磁性ビーズを選択し、この磁性ビーズに固定化した Heat shock protein 90 α と相互作用するタンパク質を捕獲した [3-15,16]。彼らはこの方法を ”protein fishing” と呼んでいる。Handa らは表面をポリグリシジルメタクリレートで覆われたナノ磁性ビーズ、FG ビーズを開発し、cereblon が thalidomide の最初の標的であることを発見した [3-17,18]。このように、”protein fishing” はタンパク質と生体分子間の相互作用を調べる方法として標準的な方法に成りつつある [3-15~19]。

ここで、Uga らはメトトレキセート (MTX)-アミノ基誘導体を SG ビーズに固定化した結果、既知の MTX 結合タンパク質であるジヒドロ葉酸レダクターゼを単離した [3-20]。しかし、MTX を内在性のカルボキシル基で固定化したところ、DHFR は捕獲されず、代わりにデオキシシチジンキナーゼが捕獲された。このことは、”protein fishing” を行ううえで、標的分子を固定化する向きが重要であることを示唆している。

アフィニティークロマトグラフィーを行ううえで、標的分子としてタンパク質を選択する際には、一般的にリジン残基のアミノ基やシステイン残基のチオール基が担体への固定化には利用される [3-21~28]。しかしながら、タンパク質中には一般的に複数のリジン、またはシステイン残基があるので均一に担体に固定化することは難しい。この問題を解決するために、遺伝子工学的

に改変し、ただ 1 つのシステイン残基をもつタンパク質が利用されるが、システイン残基はタンパク質の機能に重要であることが多く、この方法は最適な方法ではない。

そこで、第 2 章で大腸菌を利用して合成することが可能となったアジドチロシン含有タンパク質を利用すれば、タンパク質を部位特異的に固定化できるのではないかと考えた [3-29]。これまでに、アジド基選択的な反応の 1 つである Staudinger-Bertozzi Ligation 反応を利用してカーボンナノチューブの先端にアジドチロシン含有カルモデュリンをタンパク質の機能を失うことなく、固定化することに成功している [3-30]。また、タンパク質を任意の部位で均一に固定化した FG ビーズを利用した ”protein fishing” によるタンパク質の捕獲を行えば、新たなタンパク質間相互作用が効率的に発見されるかもしれない。本章では、72 位で CaM を固定化した FG ビーズを作製し、このビーズを利用した ”protein fishing” を行うことで、マウス脳細胞抽出液から CaM と相互作用する新たなタンパク質の同定を行った。

III-II. 材料

遺伝子の改変に使用したプライマーの合成は Operon Biotechnologies 社に依頼した。クローニングに使用した XL1-Blue コンピテントセルは Stratagene Corporation 社の製品を使用した。FG-NH₂ ビーズは多摩川精機株式会社より購入した。Dibenzylcyclooctyne-NHS ester は Click chemistry tools 社製のものを使用した。FG ビーズへのタンパク質の固定化量を調べるために使用した BCA™ protein Assay kit は Pierce 社製の製品を利用した。マウス脳細胞抽出液は東京工業大学 林宣宏先生より恵与されたものを使用した。PCR の鋳型として用いる cDNA library は Mouse brain QUICK-CLONE™ cDNA (clontech社) を使用した。組換えタンパク質のクローニングに使用した制限酵素は MBI Fermentas Inc. 社製、ライゲーション反応にはニッポンジーン社製の Ligation Pack を、PCR にはタカラバイオ株式会社製の Prime Star® HS DNA Polymerase をそれぞれ使用した。組換えタンパク質の発現に利用した大腸菌 MV1184 株はタカラバイオ株式会社製、ER2566 株は New England Biolabs Japan 社製をそれぞれ使用した。タンパク質の精製に利用した Ni-NTA agarose は Qiagen 社より購入した。タンパク質の転写に用いたメンブレンは Fluoro Trans® 0.15µm (Pall Corporation) を使用した。メンブレンに転写したタンパク質の染色には Sigma Aldrich 社の Direct Blue 71 を使用した。

III-III. 方法

III-III-I. 部位特異的に N₃-Y を導入したカルモデュリンの調製

CaM 野生型および 80 位に N₃-Y を含む CaM は第 2 章で作製したものを使用した [3-1]。72 位にアンバー変異を持つカルモデュリン発現用プラスミド pTACCaM72_{am} は pTACCaM_{wt} を鋳型として 5'-TGA ATT CCT GAC ATA GAT GGC AAG AAA AAT -3' とその相補鎖をプライマーとして使用し、QuikChange 法によって変異を導入した。作製した pTACCaM72_{am} を用いて 72 位にアジドチロシンを導入した CaM を発現した。アジドチロシン含有タンパク質の発現については、第 2 章に示した方法を用いた [3-1]。

III-III-II. アジド基を介してカルモデュリンを固定化したビーズの作製

N₃-Y を介した CaM を固定化した FG- ビーズの合成スキームは反応機構 3-1 に示した。1.0 mg の FG-NH₂ ビーズを 200 μ l の 0.1 M Na₂HPO₄ に懸濁し、15,000 rpm で 5 分間遠心することで洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、得られた FG-NH₂ ビーズと dibenzylcyclooctyne-NHS ester (DBCO-NHS) を以下の組成*³⁻¹ で 37°C で 1 時間反応させた。得られたビーズ (FG-DBCO ビーズ) を DMSO、PBS でそれぞれ 2 回ずつ洗浄した。この結果得られた FG-DBCO ビーズと 72 位に N₃-Y を導入した CaM (CaM72N₃-Y) を Copper-free click chemistry により以下の組成*³⁻² で 37°C、2 時間反応させ、CaM72N₃-Y を FG-DBCO ビーズに固定化した [3-31]。未反応の CaM を除くために、PBS でビーズを 3 回洗浄した。

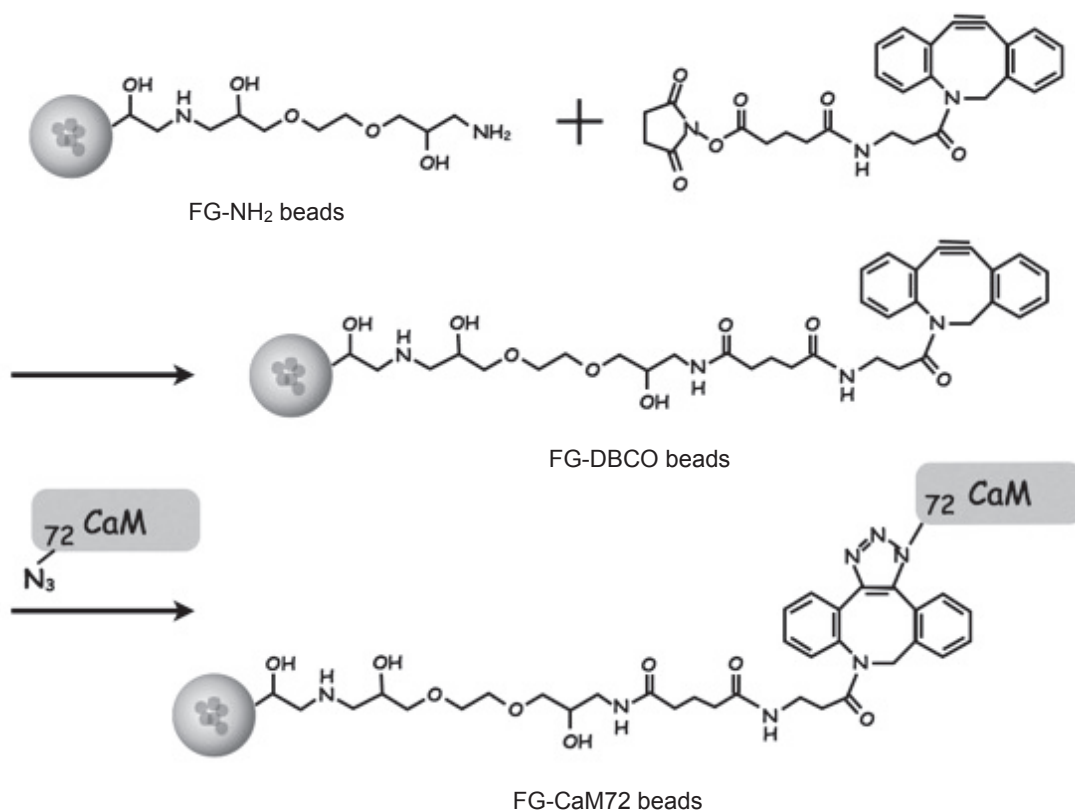
FG ビーズに固定化された CaM 量を調べるために、BCA™ Protein Assay kit を使用した。測定は付属しているプロトコルに従って行った。

* 3-1 FG-DBCOビーズの合成

FG-NH ₂ ビーズ	1mg
DBCO-NHS ester	10mM
Na ₂ HPO ₄	0.1M
Milli-Q水	Up to 100μl

* 3-2FG-CaM72 ビーズの合成

FG-DBCOビーズ	1mg
CaM72N ₃ -Y	150μg
PBS	Up to 100μl



反応機構3-1. アジド基を介してFGビーズにCaMを固定化する反応

アミノ基が提示されたFG ビーズをジベンジルシクロオクチン-NHS esterと反応させ、FG-DBCOビーズを作製する。合成したFG-DBCOビーズとCaM72N₃-Yを反応させ、72位で特異的にCaMが固定化されたFGビーズを作製する。

III-III-III. FG-CaM72 ビーズを用いたカルモデュリンと相互作用するタンパク質の捕獲

マウス脳細胞抽出液は C567/6J マウス、6 ヶ月のメスの脳 251.6 mg を mammalin cell lysis kit (MCL1; Sigma Aldrich Japan) buffer で破碎し、15,000 rpm で 5 分間遠心した上清を使用した。FG-CaM72 ビーズと 0.5 mg のマウス脳細胞抽出液にそれぞれ 150 μ l の CaM-Eq buffer* ³⁻³を加え、37°C で 15 分間保温した。反応後、上清を除いた FG-CaM72 ビーズにマウス脳細胞抽出液を加えて 37°C で 2 時間インキュベートした。磁石で反応液から FG-CaM72 ビーズを集めた後、上清を除いた (flow through)。そして、FG-CaM72 ビーズを CaM-Eq buffer で洗淨 (W1) 後、CaM-W2 buffer * ³⁻⁴で洗淨した (W2)。最後に CaM-W3 buffer * ³⁻⁵で再度洗淨し (W3)、結合したタンパク質は CaM-Elution buffer* ³⁻⁶で溶出させた (Elu)。

* ³⁻³ CaM-Eq buffer		* ³⁻⁴ CaM-W2 buffer	
50mM	Tris-HCl(pH7.6)	50mM	Tris-HCl(pH7.6)
5mM	CaCl ₂	0.1mM	CaCl ₂
0.2M	NaCl	0.5M	NaCl
* ³⁻⁵ CaM-W3 buffer		* ³⁻⁶ CaM-Elution buffer	
50mM	Tris-HCl(pH7.6)	100mM	Tris-HCl(pH7.6)
0.1mM	CaCl ₂	5mM	EGTA

III-III-IV. 溶出したタンパク質の同定

III-III. で溶出したタンパク質を Tris-トリシン SDS-PAGE で分離した。泳動後、タンパク質のバンドをメンブレンに転写するために、以下の操作を行った。泳動したゲルをE.B.C 溶液* 3-7 に 5 分間つけておく。そして、同じく 5 分間 E.B.A 溶液* 3-8、E.B.B 溶液* 3-9 に浸しておいたろ紙それぞれ 2 枚を重ねておき、その上にメタノールに 10 秒、E.B.C 溶液 に 5 分間浸しておいた Fluoro Trans® 0.15 µm メンブレンを重ねた上にゲル、E.B.C 溶液 につけておいたろ紙 2 枚をおいた。そして、64 mA で 90 分間泳動し、タンパク質のバンドをメンブレンに転写した。転写したメンブレンに Direct Blue 71 染色液* 3-10 を 10 分間浸し、浸透した後、Direct Blue 71 洗浄液* 3-11 でメンブレンを洗浄した。

溶出画分に確認されたバンドをカミソリで切り出し、切り出したメンブレンは水で洗浄後、還元用 buffer* 3-12 を加え、56°C で 1 時間保温した。反応後上清を除いた後、水でメンブレンを洗浄後、アルキル化試薬* 3-13 を加え、30°C で 45 分間保温した。その後メンブレンを 2 % アセトニトリルと水で洗浄し、Lys-C 消化用 buffer*3-14中で終濃度 2.5 ng/µl の Lys-C と 37°C で 2 時間反応させた。反応液のうち、1 µl を分取し、4 µl のマトリックス（CHCA； α -cyano-4-hydroxycinnamic acid solution in 33% (v/v) acetonitrile and 0.066% TFA）と混ぜて、そのうち 1 µl を質量分析用のプレートにのせた。サンプルは UltraFlex TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) を使い、リフレクターモードで分析した。得られたシグナルは Mascot Search を使ってマウス由来タンパク質データベースと照合し、タンパク質を同定した。

* 3-7 E.B.C 溶液

12.5mM	Tris-base
0.025%	SDS
10%	Methanol
40mM	6-amino-n-caproic acid

* 3-9 E.B.B 溶液

12.5mM	Tris-base
0.025%	SDS
10%	Methanol

* 3-11 Direct Blue71 洗浄液

40%	Ethanol
10%	酢酸

* 3-13 アルキル化試薬

55mM	ヨードアセトアミド
25mM	重炭酸アンモニウム

* 3-8 E.B.A 溶液

300mM	Tris-base
0.05%	SDS
20%	Methanol

* 3-10 Direct Blue71 染色液

Direct Blue71	0.008%
Ethanol	40%
酢酸	10%
Milli-Q水	Up to 10ml

* 3-12 還元用 buffer

500mM	Tris-HCl(pH6.8)
0.3%	EDTA-2Na
5%	アセトニトリル
10mg/ml	DTT
8M	グアニジン塩酸塩

* 3-14 Lys-C消化用 buffer

20mM	Tris-HCl(pH8.8)
0.0005%	TritonX-45
50%	アセトニトリル

III-III-V. マウス由来タンパク質のクローニングと発現

Mouse brain QUICK-CLONE™ cDNA を鋳型として、以下に示すプライマーを用いて alpha-enolase (NCBI gene ID: 13806, ENOA) の遺伝子を PCR によって増幅させた。alpha-enolase : 5'- GGG GAA TTC ATA TGT CTA TTC TCA GGA TCC ACG CCA GAG -3'、および 5'- GGG GAA TTC TCG AGT TTG GCC AGG GGG TTC CTG AAG GAC C-3'。増幅した ENOA 遺伝子は pETY ベクターの Nde I、Xho I サイトに挿入した [3-32]。その他の遺伝子についても Mouse brain QUICK-CLONE™ cDNA を鋳型として、PCR によって増幅させた。Annexin A5 (NCBI gene ID: 11747, ANXA5) : 5'- GGG GAA TTC ATA TGG CTA CGA GAG GCA CTG TGA CTG ACT TCC CTG -3'、および 5'- GGG GAA TTC TCG AGG TCA TCC TCG CCC CCG CAG AGC AG -3'、glucose-6-phosphate isomerase (NCBI gene ID: 14751, GPI) : 5'- GGG GAA TTC ATA TGG CTG CGC TCA CCC GGA ACC CGC AGT TCC -3'、および 5'- GGG GAA TTC TCG AGT TCT AGT TTG GTG TCC CGC TGT TGG -3'、malate dehydrogenase 1 (NCBI gene ID:17449, MDH1): 5'- GGG GAA TTC ATA TGT CTG AAC CAA TCA GAG TCC TTG TGA CTG C -3'、および 5'- GGG GAA TTC TCG AGC GCA GAG GAG AGA AAC TCA AAA GC -3'、phosphoglycerate kinase 1 (NCBI gene ID: 18655, PGK1): 5'- GGG GAA TTC ATA TGT CGC TTT CCA ACA AGC TGA CTT TGG -3'、及び 5'- GGG GAA TTC TCG AGA ACA TTG CTG AGA GCA TCC ACG CCA GAG -3'。増幅した遺伝子は pTAC ベクターの Nde I、Xho I サイトに挿入した。ENOA は大腸菌 ER2566 株で、その他の遺伝子は MV1184 株を用いて発現させた。各形質転換体からコロニーをつつき、2 ml の LB-amp 液体培地で 37°C、2 時間プレ培養し、プレ培養液は全量を 100 ml の培地に加え、37°C で培養した。濁度が 0.7 に達した時、IPTG を終濃度 0.5 mM になるように加え、さらに 25°C で一晩培養した。得られた菌体を sonication buffer*²⁻¹⁸ に懸濁し、超音波破碎したあと 30,000 ×g、4°C で 10 分間遠心した。得られた上清は sonication buffer*²⁻¹⁸ で平衡化した Ni-NTA agarose にロードした。その後、wash buffer*²⁻²⁸ で洗浄後、elution buffer*²⁻²⁹ で溶出した。得られたタンパク質は電気泳動によって分離し、CBB 染色*²⁻³⁵ によって分析した。そ

の後、溶出画分を Amicon Ultra centrifugal filter devices (MWCO 10,000) (Millipore) によって濃縮し、保存用 buffer*²⁻³⁰ に置換して -30°C で保存した。必要なら Q-Sepharose™ Fast Flow (GE healthcare Japan) による精製も行った。

III-IV. 結果と考察

III-IV-I. 部位特異的にタンパク質を固定化したビーズの作製

FG ビーズを用いて Fishing Assay を行うために、標的タンパク質としてカルモデュリン (CaM) を選択した。CaM はほとんど全ての真核生物に存在しており、生体内で Ca^{2+} の輸送に関わるタンパク質として知られている。CaM は代表的な Ca^{2+} 結合モチーフである EF-hand モチーフを持ち、 Ca^{2+} 結合理型 CaM (Ca^{2+} / CaM) は 2 つの球状ドメインを持つダンベル状構造で疎水性表面に覆われている。その疎水性表面により、多くのタンパク質と相互作用し生体内の様々な反応経路を制御している。今回我々は CaM の 2 つの球状ドメインをつなぐリンカー部分に相当する 72 位にアジドチロシン ($\text{N}_3\text{-Y}$) を導入した (図3-1) [3-33]。この 72 位に $\text{N}_3\text{-Y}$ を導入した CaM (CaM72 $\text{N}_3\text{-Y}$) を FG ビーズに固定化した結果、FG ビーズ 1 mg に対して約 $22 \pm 2 \mu\text{g}$ (1.2nmol) の CaM を固定できていることを確認した。

III-IV-II. カルモデュリン固定化ビーズによる相互作用タンパク質の捕獲

作製した FG-CaM72 ビーズを利用して、マウス脳細胞抽出液に含まれる Ca^{2+} /CaM 結合タンパク質の捕獲を試みた。CaM は脳細胞に多く発現しており、多くの相互作用分子が捕獲できることを期待した。 Ca^{2+} 結合理型の CaM と結合するタンパク質を捕獲するために、FG-CaM72 ビーズとマウス脳細胞抽出液はそれぞれ Ca^{2+} を含む buffer 中でプレインキュベーションした。この遠心して上清を除いたビーズにマウス脳細胞抽出液を加え、 37°C で 2 時間反応後洗浄し、 Ca^{2+} 結合理型 CaM と特異的に結合したタンパク質は EGTA を含む buffer を加えることで溶出させ、Tris-トリシン SDS-PAGE を行った。その結果、複数のバンドを確認できた (図3-2)。また、対象として FG-DBCO ビーズを用いて同様の実験を行った結果、溶出面分には全くバンドが確認できなかった

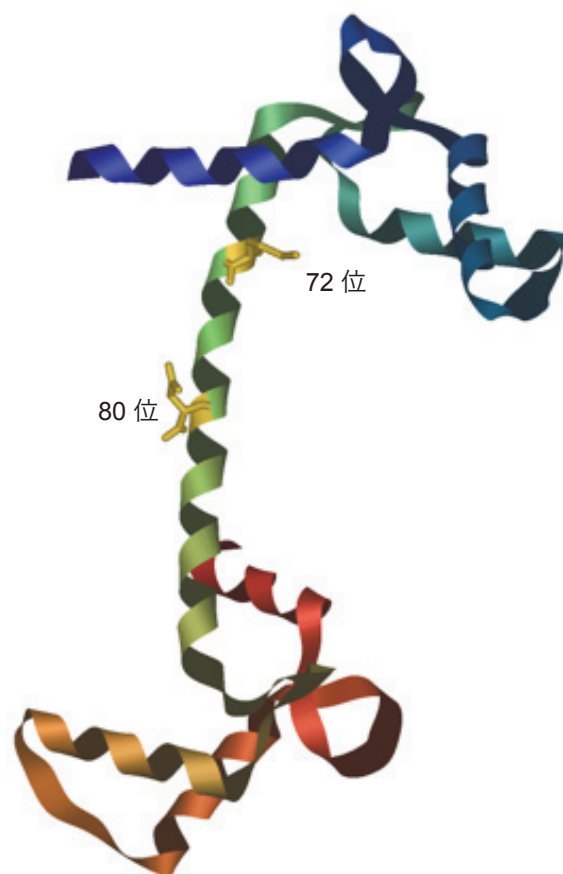


図3-1. Ca^{2+} /CaMの結晶構造 (PDB ID : 3CLN)

FGビーズへの固定化に使用したM72残基と光クロスリンク反応に利用したT80残基をそれぞれCylinderで示した。

(data not shown)。これらの結果から、CaM を固定化した FG ビーズを使って溶出してきたタンパク質は CaM 選択的に結合していると思われる。また、過去に Berggård らは、CaM 配列中の Lys 残基選択的に固定化した樹脂を利用して、マウス脳細胞抽出液に含まれる 140 種類にも及ぶ Ca^{2+} /CaM 結合タンパク質を捕獲している [3-34]。その結果と今回得られた結果を比較したとき、明らかに得られたタンパク質のバンドが少ない。Berggård らの実験では CaM を Lys 残基選択的にランダムに固定化しているため、相互作用するタンパク質を網羅的に捕獲できているものと考えられる。それに対して本研究では固定化部位を一ヶ所に指定しているため、72 位近傍を相互作用部位に含むタンパク質は捕獲できないであろう。様々な部位で CaM を固定化した樹脂を作製すれば、固定化部位によって異なるタンパク質を捕獲できると予想される。

III-IV-III. 質量分析による捕獲したタンパク質の同定

FG-CaM72 ビーズによる Fishing Assay の結果、マウス脳細胞抽出液から複数のタンパク質が捕獲された。これらのタンパク質のバンドを切り出し、MALDI-TOF/MS による分析を行った。その結果、6 種類のタンパク質を同定できた (表3-1)。このうち Phosphoglycerate kinase1 (PGK1) は CaM と相互作用することが知られたタンパク質である。PGK1 はヒトや植物、バクテリアなど多様な生物に存在するタンパク質で、解糖系における ATP 産生に関わる酵素である。Myre らは pull down assay によって PGK1 と CaM が Ca^{2+} イオン依存的に結合することを確認したうえで、CaM が PGK1 の活性を制御していることを報告した [3-35]。

Malate dehydrogenase 1 (MDH1) はクエン酸回路に含まれる酵素を触媒するタンパク質で、 NAD^+ から NADH への還元によりリンゴ酸をオキサロ酢酸に酸化する反応を触媒する [3-36]。

Annexin A5 (ANXA5)、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) は calbindin D28k や secretagoin を固定化した樹脂にも結合したため、コンタミネーションとして報告されている [3-34]。Calbindin D28k や secretagoin は EF-hand モチーフを持ち、CaM のように Ca^{2+} 存在下で疎

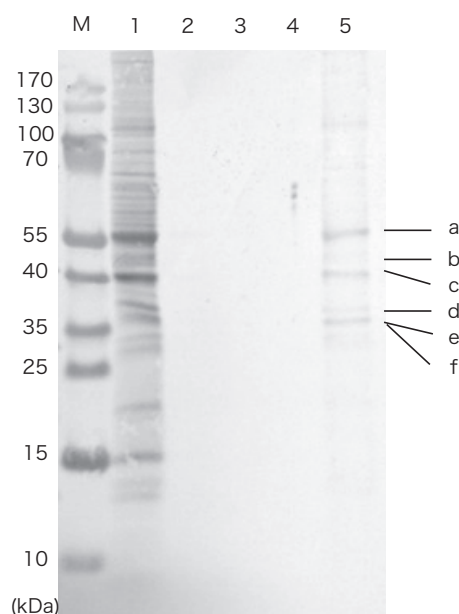


図3-2 マウス脳細胞抽出液に含まれるCa²⁺/CaM結合タンパク質のリガンドフィッシングアッセイ
マウス脳細胞抽出液はFG-CaM72 beadsとインキュベートした。洗浄後、EGTAを含むbufferでCa²⁺/CaM結合タンパク質を溶出させ、トリシン SDS-PAGEで分離した。各レーンの説明は以下に示す。
M; タンパクマーカー、1; flow through、2; W1画分、3; W2画分、4; W3画分、5; Elution画分。今回、質量分析で同定できたタンパク質のバンドはa-fで示した(表3-1)。

表.3-1 今回のFishing Assayで捕獲、同定したタンパク質

図. 3-2のバンド番号	捕獲、同定したタンパク質	分子量	Mascot Score	Expected score
a	Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)	62727	64	0.0063
b	Alpha-enolase (ENOA)	47111	80	0.00017
c	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	44522	64	0.0066
d	Malate dehydrogenase 1 (MDH1)	36488	65	0.0057
e	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD)	35787	61	0.014
f	Annexin A5 (ANXA5)	35730	75	0.00054

太字斜体: 既知のCaM結合タンパク質

水性表面を提示することが知られている。そのため、Berggård らはそれらのタンパク質は CaM 依存的な結合ではなく、疎水性表面によって結合しただけだと判断している。さらに、Berggård らは G3PD は様々なタンパク質に非特異的に吸着するタンパク質だと報告している。それに対して、Singh らは G3PD は Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase ($\text{CaMKII}\beta_{\text{M}}$) によって Ca^{2+} /CaM 依存的に活性を制御されていることを報告した [3-37]。この論文では、 Ca^{2+} /CaM が G3PD の活性に影響を与えることを示している。さらに、G3PD、PGK1、GPI、ENOA は解糖系酵素として知られており、このうち ENOA、GPI についてはこれまで CaM との関係が報告されていない。

これらのタンパク質が CaM と直接相互作用するのかどうか調べるために、Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)、alpha-enolase(ENOA)、Malate dehydrogenase 1(MDH1)、Annexin A5(ANXA5)、Phosphoglycerate kinase1 (PGK1) の 5 種類を大腸菌で発現させて、 N_3 -Y 含有 CaM との光クロスリンク反応を行った。

III-IV-IV. CaM80 N_3 -Y と PGK1 の光クロスリンク反応

今回捕獲したタンパク質のうち、CaM との相互作用が既に報告されている PGK1 を大腸菌で発現し、CaM との光クロスリンク反応を行った。

今回捕獲されたタンパク質は、72 位以外の部位で CaM と相互作用していると考えた。光クロスリンク反応はアジド基と相互作用分子が近接していなければ起こらないため、CaM の結晶構造情報から 72 位とは異なる向きにあると思われる 80 位に N_3 -Y を導入した CaM を調製した (図 3-1) [3-33]。作製した 80 位に N_3 -Y を含む CaM (CaM80 N_3 -Y) と PGK1 を Ca^{2+} 存在下で光クロスリンク反応を行った (図 3-3)。CaM80 N_3 -Y と PGK1 を反応させた場合にのみ複数のクロスリンク産物と思われるバンドを確認した (レーン 4)。対照的に、CaM 野生型を使ったときには UV 照射によってクロスリンク産物が得られなかった (レーン 2)。複数の得られたクロスリンク産物を質量分析で分析した結果、全てのバンドから CaM と PGK1 のものと思われる断片が得られた。これらのクロ

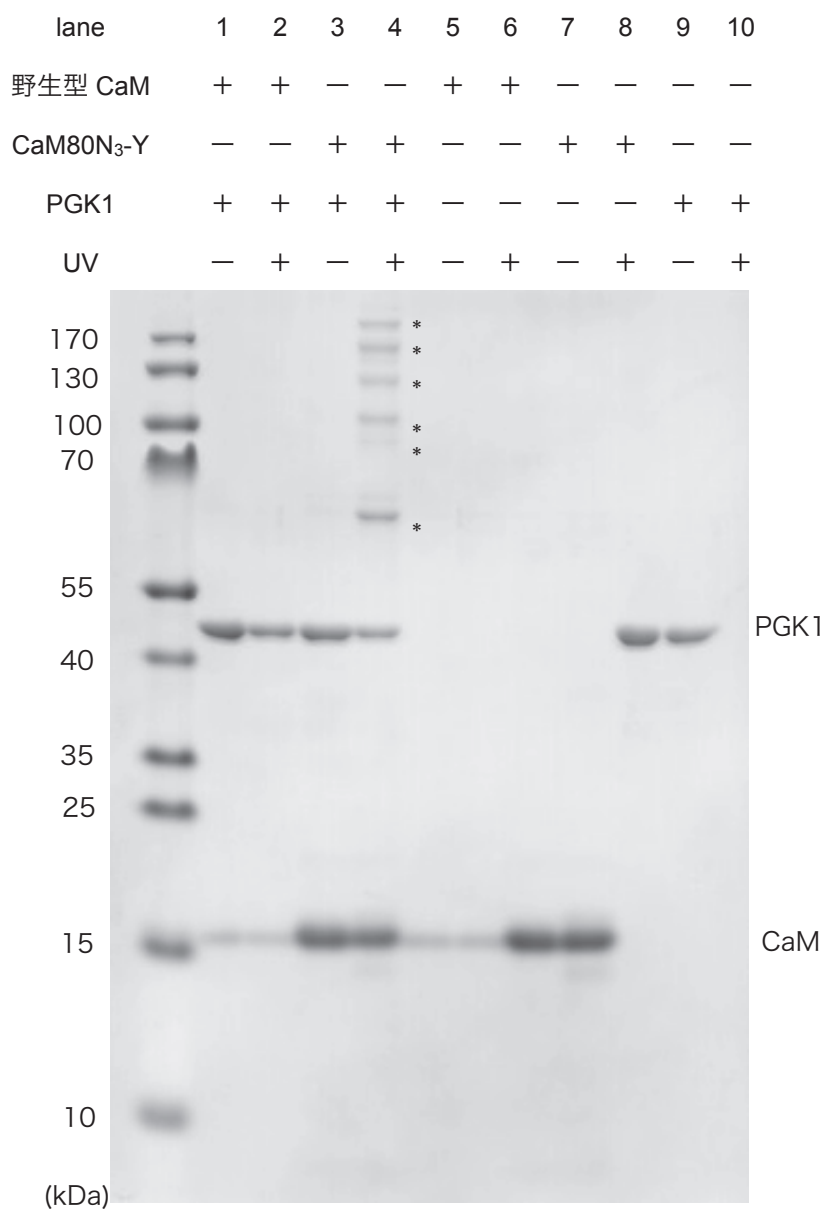


図3-3. CaM80N₃-Y とPGK1の光クロスリンク反応

インキュベート後、反応液をUV照射したものと照射していないものをそれぞれTricine SDS-PAGEで分離し、CBBで染色した。Lane 1,2; CaM野生型とPGK1、lane3,4; CaM80N₃-Y とPGK1、lane5,6; CaM野生型、lane7,8; CaM80N₃-Y、lane9,10; PGK1。クロスリンク産物は*で示した。

スリンク産物のバンドをタンパク質マーカーと比較すると、各クロスリンク産物のバンド間隔は CaM 一分子に相当する。従って、これらのクロスリンク産物のバンドは一分子の PGK1 に対して異なる個数の CaM が結合しているために生じたと思われる。

III-IV-V. 捕獲されたタンパク質と CaM80N₃-Y との光クロスリンク反応 (Ca²⁺ 存在下)

PGK1 と CaM80N₃-Y をクロスリンク反応させた結果、明確なクロスリンク産物が得られた。同様に他の捕獲されたタンパク質、ENOA、GPI、ANXA5、MDH1 とネガティブコントロールとして CaM との相互作用が報告されていない Horseradish peroxidase (HRP) を CaM80N₃-Y と Ca²⁺ 存在下で反応させ、360 nm の UV を照射した (図3-4)。その結果 ANXA5、ENOA、MDH1 で明確なクロスリンク産物を得ることができた。これらのバンドについても、質量分析を行った結果、CaM とそれぞれのタンパク質が含まれていることが確認できた。Berggård らが行った CaM 結合タンパク質の捕獲同定では、secretagoin や calbindin D28k 固定化樹脂にも結合したので、ANXA5 はコンタミネーションだと判断されていた [3-34]。しかし、ANXA5 は secretagoin や calbindin D28k のような疎水性表面を持つタンパク質とも相互作用するが、確かに Ca²⁺ 依存的に CaM と相互作用することがわかった。

また、現在まで CaM との相互作用が報告されていない MDH1、ENOA のクロスリンク産物を確認できた。今回のクロスリンク実験では CaM と GPI の架橋は全く確認できなかった。GPI は ENOA、PGK1 とともに細胞内で解糖系の各反応を触媒するタンパク質として知られている。過去に、CaM と解糖系の関係を示唆する報告がされている [3-38]。今回解糖系に含まれる酵素タンパク質のうち、3 種類が捕獲同定されたことから、CaM が解糖系になんらかの影響を持っているのではないかと考えられる。また、GPI が CaM とクロスリンクしないにも関わらず今回の Fishing Assay で捕獲されたのはこれら解糖系に関わるタンパク質群と CaM がマルチコンプレックスを形成したため「間接的な」相互作用で捕獲されたのかもしれない。

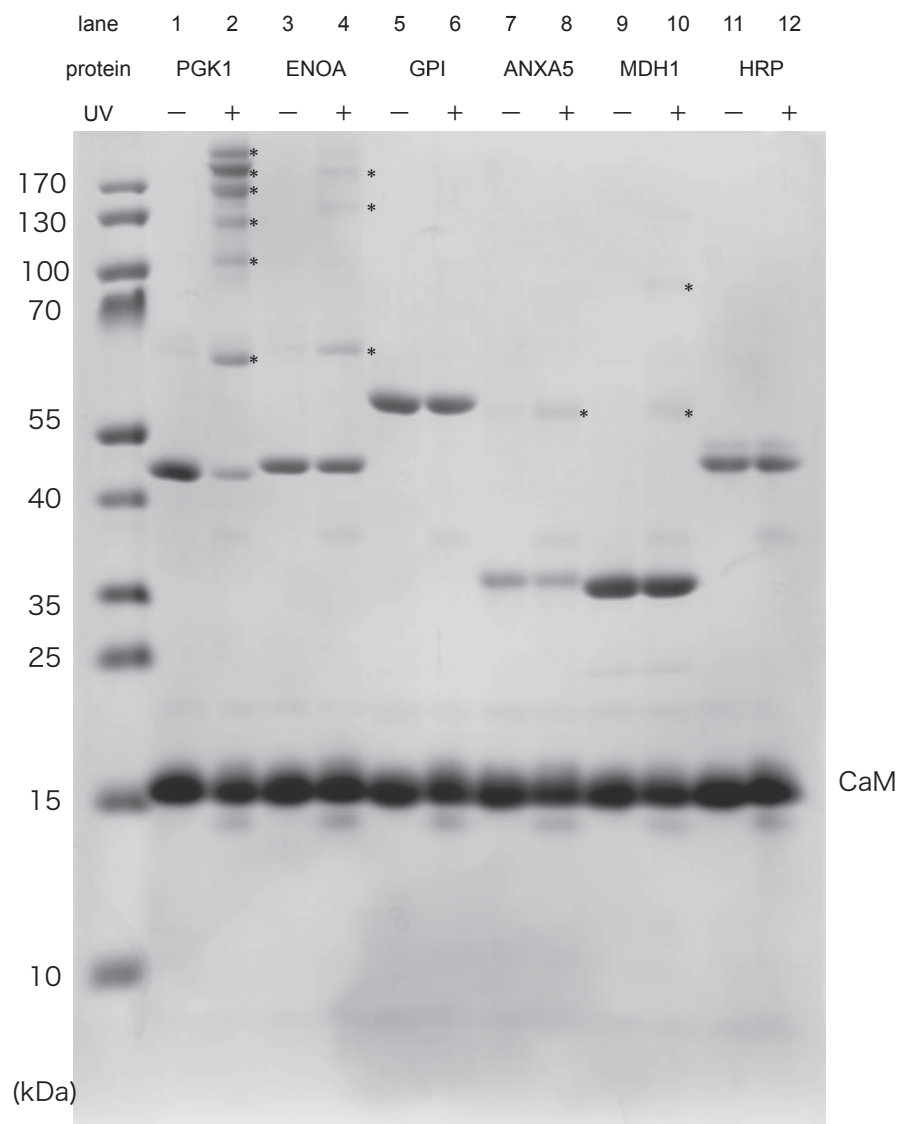


図3-4. 捕獲したタンパク質とCaM80N₃-Y の光クロスリンク反応(Ca²⁺存在下)
 それぞれのタンパク質をCaM80N₃-YとCa²⁺存在下でインキュベートした後、UV照射したものと照射していないものをそれぞれTricine SDS-PAGEで分離し、CBBで染色した。lane 1,2;PGK1とCaM80N₃-Y、lane 3,4 ; ENOA とCaM80N₃-Y、lane5,6 ; GPIとCaM80N₃-Y、lane 7,8; ANXA5、9,10; MDH1とCaM80N₃-Y、lane 11,12; N.C (HRP) とCaM80N₃-Y。クロスリンク産物は*で示した。

III-IV-VI. 捕獲されたタンパク質と CaM80N₃-Y との光クロスリンク反応 (Ca²⁺ 非存在下)

次に、これらのタンパク質と CaM80N₃-Y との光クロスリンク反応を EGTA 存在下で行った (図3-5)。今回の Fishing Assay では Ca²⁺ 存在下で CaM と結合するタンパク質のみを捕獲し、EGTA により Ca²⁺ を除くと溶出するタンパク質を捕獲している。EGTA 存在下で CaM80N₃-Y から Ca²⁺ が除かれた状態でのクロスリンク反応を試みた結果、予想通り GPI、ANXA5、MDH1、およびネガティブコントロールである HRP はクロスリンク産物が検出されなかった。それに対して、ENOA と PGK1 は Ca²⁺ フリーな CaM と強いクロスリンク産物を形成した。しかし、PGK1 のクロスリンク産物のバンドパターンは Ca²⁺ の有無によって異なる。

これらの結果から、FG-CaM72 ビーズを使って CaM と相互作用するタンパク質を捕獲することができた。捕獲されたタンパク質と CaM80N₃-Y との光クロスリンク実験の結果、GPI は CaM と直接の複合体を形成しないことが示唆された。過去に CaM と Huntingtin-associated protein を介して間接的に結合するタンパク質として、Huntingtin が同定されている [3-39]。GPI も Huntingtin の場合と同様にマルチコンプレックスの一部として捕獲されたのか、擬陽性なのかについてはさらなる検討が必要である。また、ENOA、ANXA5、MDH1 についても今回新たに CaM と光クロスリンク産物を形成することは確認できたが、CaM の結合がこれらのタンパク質にどのような影響を与えるのかはわかっていない。

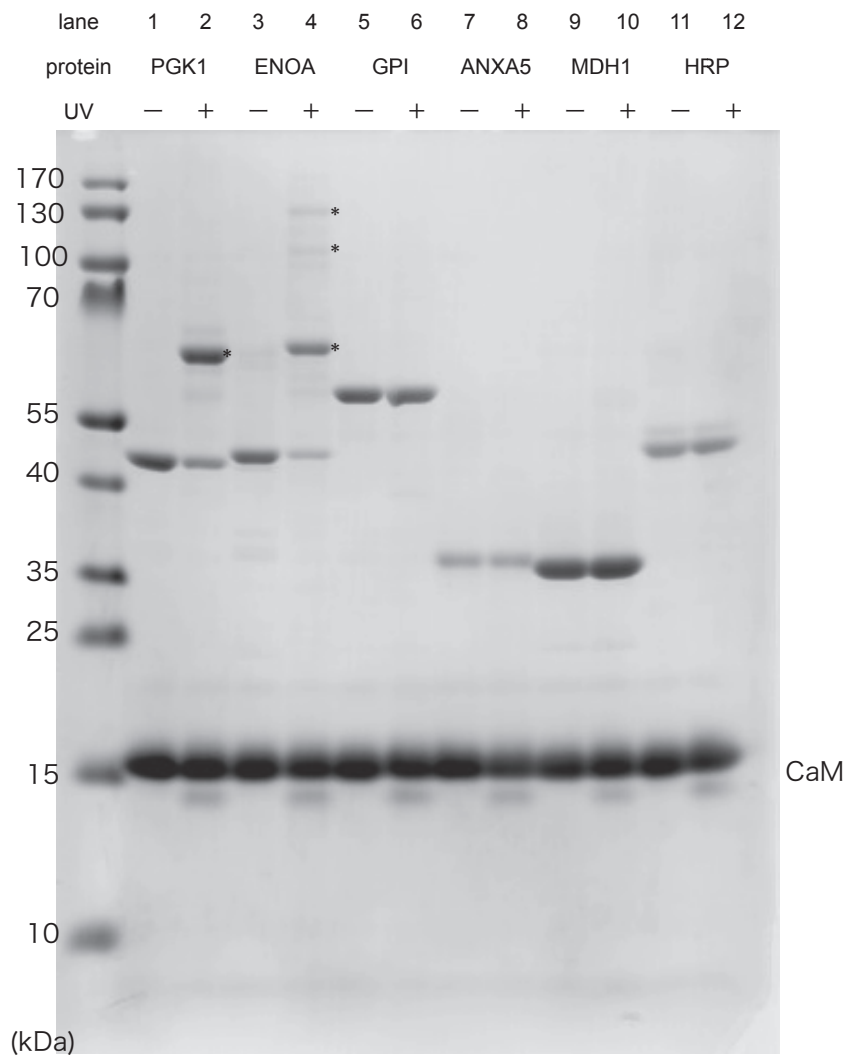


図3-5. 捕獲したタンパク質とCaM80N₃-Yの光クロスリンク反応(Ca²⁺非存在下)

それぞれのタンパク質をCaM80N₃-YとEGTA存在下でインキュベートした後、UV照射したものと照射していないものをそれぞれTricine SDS-PAGEで分離し、CBBで染色した。lane 1,2; GPI とCaM80N₃-Y、lane 3,4 ; ENOA とCaM80N₃-Y lane5,6 ; PGK1 とCaM80N₃-Y、lane 7,8; ANXA5、9,10; MDH1とCaM80N₃-Y、lane 10,11; N.C (HRP) とCaM80N₃-Y。クロスリンク産物は*で示した。

本研究で用いたマウス脳細胞抽出液の調製には市販されている MCL1 buffer を用いたが、マウス脳細胞抽出液の調製条件によって抽出したタンパク質の構造が変化し、CaM との相互作用に影響が出る可能性も考えられるため、MCL1 buffer とは異なる T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) を用いた抽出液でも同様に FG-CaM72 ビーズを使って Fishing Assay を行った。その結果、MCL1 buffer を用いた細胞抽出液の場合と同様なタンパク質が捕獲されていることが確認できた (data not shown)。

また、アジドチロシンさえ導入できれば、CaM だけでなくどのようなタンパク質でも部位特異的に固定化し、相互作用分子を捕獲することは可能である。この方法が新たな相互作用分子の捕獲、同定に利用され、今後のプロテオーム解析に役立つことを期待する。

参考文献

- 3-1. Ikeda-Boku, A., Ohno, S., Hibino, Y., Yokogawa, T., Hayashi, N., and Nishikawa, K. (2013) A simple system for expression of proteins containing 3-azidotyrosine at a pre-determined site in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **153**(3), 317-326
- 3-2. Chin, J.W., Santoro, S.W., Martin, A.B., King, D.S., Wang, L., and Schultz, P.G. (2002) Addition of *p*-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **124**(31), 9026-9027
- 3-3. Huber, T., Naganathan, S., Tian, H., Ye, S., and Sakmar, T.P. (2013) Unnatural amino acid mutagenesis of GPCRs using amber codon suppression and bioorthogonal labeling. *Methods Enzymol.* **520**, 281-305
- 3-4. Naganathan, S., Ye, S., Sakmar, T.P., and Huber, T. (2013) Site-specific epitope tagging of G protein-coupled receptors by bioorthogonal modification of a genetically encoded unnatural amino acid. *Biochemistry* **52**(6), 1028-1036
- 3-5. Deiters, A., Cropp, T.A., Summerer, D., Mukherji, M., and Schultz, P.G. (2004) Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**(23), 5743-5745
- 3-6. Hang, H.C., Yu, C., Pratt, M.R., and Bertozzi, C.R. (2004) Probing glycosyltransferase activities with the Staudinger ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**(1), 6-7
- 3-7. Cuatrecasas, P., Wilchek, M. and Anfinsen, C.B. (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **61**(2), 636-643
- 3-8. Phizicky, E.M., and Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* **59**(1), 94-123
- 3-9. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Séraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**(10), 1030-1032
- 3-10. Inomata, Y., Kawaguchi, H., Hiramoto, M., Wada, T. and Handa, H. (1992) Direct purification of multiple ATF/E4TF3 polypeptides from HeLa cell crude nuclear extracts using DNA affinity latex particles. *Anal. Biochem.* **206**(1), 109-114
- 3-11. Inomata, Y., Wada, T., Handa, H., Fujimoto, K., and Kawaguchi, H. (1994) Preparation of DNA-carrying affinity latex and purification of transcription factors with the latex. *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* **5**(4), 293-302

- 3-12. Hiramoto, M., Shimizu, N., Sugimoto, K., Tang, J., Kawakami, Y., Ito, M., Aizawa, S., Tanaka, H., Makino, I., and Handa, H. (1998) Nuclear targeted suppression of NF-kappa B activity by the novel quinone derivative E3330. *J. Immunol.* **160**(2), 810–819
- 3-13. Han, S., Kawano, M., Ishizu, K., Watanabe, H., Hasegawa, M., Kanesashi, S., Kim, Y., Nakanishi, A., Kataoka, K., and Handa, H. (2004) Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 interacts with 14-3-3 proteins depending on phosphorylation at serine 535. *Virology* **320**(1), 144–155
- 3-14. Shimizu, N., Sugimoto, K., Tang, J., Nishi, T., Sato, I., Hiramoto, M., Aizawa, S., Hatakeyama, M., Ohba, R., Hatori, H., Yoshikawa, T., Suzuki, F., Oomori, A., Tanaka, H., Kawaguchi, H., Watanabe, H. and Handa, H. (2000) High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat. Biotechnol.* **18**(8), 878-881
- 3-15. Marszałł, M.P., Moaddel, R., Kole, S., Gandhari, M., Bernier, M. and Wainer, I.W. (2008) Ligand and protein fishing with heat shock protein 90 coated magnetic beads. *Anal. Chem.* **80**(19), 7571-7575
- 3-16. Moaddel, R., Marszałł, M.P., Bigli, F., Yang, Q., Duan, X., Wainer, I.W., (2007) Automated ligand fishing using human serum albumin-coated magnetic beads. *Anal. Chem.* **79**(14), 5414-5417
- 3-17. Nishio, K., Masaike, Y., Ikeda, M., Narimatsu, H., Gokon, N., Tsubouchi, S., Hatakeyama, M., Sakamoto, S., Hanyu, N., Sandhu, A., Kawaguchi, H., Abe, M. and Handa, H. (2008) Development of novel magnetic nano-carriers for high-performance affinity purification. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **64**(2), 162-169
- 3-18. Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y. and Handa, H. (2010) Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* **327**(5971), 1345-1350
- 3-19. Hatakeyama, M., Mochizuki, Y., Kita, Y., Kishi, H., Nishio, K., Sakamoto, S., Abe, M., and Handa, H. (2009) Characterization of a magnetic carrier encapsulating europium and ferrite nanoparticles for biomolecular recognition and imaging. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**(10), 1364–1367
- 3-20. Uga, H., Kuramori, C., Ohta, A., Tsuboi, Y., Tanaka, H., Hatakeyama, M., Yamaguchi, Y., Takahashi, T., Kizaki, M. and Handa, H. (2006) A New Mechanism of Methotrexate Action Revealed by Target Screening with Affinity Beads. *Mol. Pharmacol.* **70**(5), 1832-1839
- 3-21. Jameson, D.M., and Seifried, S.E. (1999) Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization. *Methods* **19**(2), 222-233
- 3-22. McFarland, J.M., and Francis, M.B. (2005) Reductive alkylation of proteins using iridium catalyzed transfer hydrogenation. *J. Am. Chem. Soc.* **127**(39), 13490-13491

- 3-23. Scheck, R.A., and Francis, M.B. (2007) Regioselective labeling of antibodies through N-terminal transamination. *ACS Chem. Biol.* **2**(4), 247-251
- 3-24. Tanaka, K., Kitadani, M., and Fukase, K. (2011) Target-selective fluorescent "switch-on" protein labeling by 6 π -azaelectrocyclization. *Org. Biomol. Chem.* **9**(15), 5346-5349
- 3-25. Chilkoti, A., Chen, G., Stayton, P.S. and Hoffman, A.S. (1994) Site-specific conjugation of a temperature-sensitive polymer to a genetically-engineered protein. *Bioconjug. Chem.* **5**(6), 504-507
- 3-26. Hamman, B.D., Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., Traut, R.R., and Jameson, D.M. (1996) Rotational and conformational dynamics of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12. *Biochemistry* **35**(51), 16672-16679
- 3-27. Allen, M.W., Urbauer, R.J., Zaidi, A., Williams, T.D., Urbauer, J.L., and Johnson, C.K. (2004) Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments. *Anal. Biochem.* **325**(2), 273-284
- 3-28. Bernardes, G.J., Chalker, J.M., Errey, J.C., and Davis, B.G. (2008) Facile conversion of cysteine and alkyl cysteines to dehydroalanine on protein surfaces: versatile and switchable access to functionalized proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **130**(15), 5052-5053
- 3-29. Ohno, S., Matsui, M., Yokogawa, T., Nakamura, M., Hosoya, T., Hiramatsu, T., Suzuki, M., Hayashi, N. and Nishikawa, K. (2007) Site-selective post-translational modification of proteins using an unnatural amino acid, 3-azidotyrosine. *J. Biochem.* **141**(3), 335-343
- 3-30. Yoshimura, S.H., Khan, S., Ohno, S., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Hosoya, T., Maruyama, H., Nakayama, Y. and Takeyasu, K. (2012) Site-specific attachment of a protein to a carbon nanotube end without loss of protein function. *Bioconjug. Chem.* **23**(7), 1488-1493
- 3-31. Ning, X., Guo, J., Wolfert, M.A. and Boons, G.J. (2008) Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **120**(12), 2285-2287
- 3-32. Nomura, Y., Onda, Y., Ohno, S., Taniguchi, H., Ando, K., Oka, N., Nishikawa, K., and Yokogawa, T. (2012) Purification and comparison of native and recombinant tRNA-guanine transglycosylases from *Methanosarcina acetivorans*. *Protein Expr. Purif.* **88**(1), 13-19
- 3-33. Babu, Y.S., Bugg, C.E., and Cook, W.J. (1988) Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **204**(1), 191-204

- 3-34. Berggård, T., Arrigoni, G., Olsson, O., Fex, M., Linse, S., and James, P. (2006) 140 Mouse Brain Proteins Identified by Ca^{2+} -Calmodulin Affinity Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *J. Proteome. Res.* **5(3)**, 669-687
- 3-35. Myre, M.A., and O'Day, D.H. (2004) Calmodulin binds to and inhibits the activity of phosphoglycerate kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1693(3)**, 177–183
- 3-36. Minárik, P., Tomášková, N., Kollárová, M., and Antalík, M. (2002) Malate dehydrogenases--structure and function. *Gen. Physiol. Biophys.* **21(3)**, 257-265
- 3-37. Singh, P., Salih, M., Leddy, J.J., Tuana, B.S. (2004) The muscle-specific calmodulin-dependent protein kinase assembles with the glycolytic enzyme complex at the sarcoplasmic reticulum and modulates the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Ca^{2+} /calmodulin-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **279(34)**, 35176-35182
- 3-38. Beitner, R. (1993) Control of glycolytic enzymes through binding to cell structures and by glucose 1,6-bisphosphate under different conditions. The role of Ca^{2+} and calmodulin. *Int. J. Biochem.* **25(3)**, 297–305
- 3-39. Bao, J., Sharp, A.H., Wagster, M.V., Becher, M., Schilling, G., Ross C.A., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (1996) Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93(10)**, 5037-5042

第4章 総括

本研究では、アジドチロシンを部位特異的に導入したタンパク質を大量に調製するために、大腸菌生細胞を利用する方法の開発を目的とした。基質としてアジドチロシンを特異的に認識できるチロシル-tRNA 合成酵素 (TyrRS) とそれに対応するアンバーサプレッサー tRNA を作製し、生細胞中でアンバーコドン特異的にアジドチロシンを導入したタンパク質を発現させた。また、作製したアジドチロシン含有タンパク質の利用法として、アジド基を介してタンパク質を固定化したビーズを作製し、その相互作用分子の捕獲を試みたところ、現在までに報告されている相互作用分子の他に、3 種類の新規相互作用分子を捕獲できた。今後、この技術がタンパク質の機能、構造を調べるために利用されることが予想されるが、現在までの研究成果を踏まえて、現状の課題を示す。

チロシル-tRNA 合成酵素のアミノ酸特異性の改変

非標準アミノ酸であるアジドチロシンを基質として認識できる TyrRS 変異体を作製するために、結晶構造が解析されている *M. jannaschii* TyrRS の情報を参考にして、*M. acetivorans* TyrRS のアミノ酸結合部位と思われる 5 ヶ所をランダムに変異させ、天然の基質であるチロシンを認識せず、アジドチロシンを認識できる R3YRS 変異体を作製した [4-1,2]。しかし、*M. jannaschii* TyrRS と *M. acetivorans* TyrRS のアミノ酸配列の配列相同性は 54% であり、大まかなチロシン結合ポケットのアミノ酸残基の配置などは類似しているかもしれないが、細部での違いがあると思われる。今後タンパク質の機能拡張のために新たな非標準アミノ酸の導入を行うために TyrRS 変異体を作製しようとした場合、*M. jannaschii* TyrRS と *M. acetivorans* TyrRS の構造の違いが、変異部位の選定に影響することが考えられる。*M. acetivorans* TyrRS の結晶構造が解析できれば、詳細なチロシン結合ポケットの構造情報が得られるため、目的の非標準アミノ酸に即した変異が導入できるだろう。

また、本研究で作製した R3YRS 変異体は β -ガラクトシダーゼ酵素活性回復実験の結果から、アジドチロシンのみならず、3-ブロモチロシンや3-ヨードチロシンも基質として利用できることがわかっている (第2章 図2-6.A)。つまり、培地に添加する非標準アミノ酸を変更するだけで、ブロモ原子やヨード原子を部位特異的に導入したタンパク質も合成できると思われる。ブロモ原子やヨード原子は X 線を散乱させる特性を有し、多波長異常分散法や短波長異常分散法による結晶構造解析に利用できる [4-3,4]。一般的な異常分散シグナルを測定するためにはセレノメチオニンを導入する方法が使われている。セレノメチオニンはメチオニンの代わりに培地中に加えてメチオニン要求株を培養することで、本来メチオニンが入るべき部位にセレノメチオニンが導入されたタンパク質を簡便に作製可能である。しかし、目的タンパク質にメチオニンが少ない場合には、結晶化はできても構造解析が困難となる [4-4]。それに対して、ブロモチロシンやヨードチロシンをタンパク質に導入する方法を利用すれば、任意の部位にブロモ原子やヨード原子を導入できるため、今後のタンパク質の構造解析に役立つであろう。

アジドチロシン含有タンパク質の発現

作製したアジドチロシンを特異的に認識できる R3YRS とアンバーサプレッサー tRNA を構成的に発現できるプラスミドを大腸菌に導入することでアジドチロシン含有タンパク質を発現した。この際、標的タンパク質カルモデュリンの遺伝子を T7 プロモーター下に配した場合には完全長のカルモデュリンを発現できず、大腸菌内在性 RNA polymerase が認識する *tac* プロモーター下にカルモデュリン遺伝子を配したプラスミドを使用したとき、アジドチロシンを部位特異的に導入したカルモデュリンを発現できた。

それに対して、現在までに報告されている *M. jannaschii* 由来非天然アミノアシル-tRNA 合成酵素やピロリシル-tRNA 合成酵素を用いた非標準アミノ酸含有タンパク質の発現では、標的タンパク質遺伝子を T7 プロモーター下に配したプラスミドで非標準アミノ酸を含む標的タンパク質を調製する方法も報告されている [4-4~6]。もし、T7 RNA polymerase を利用してアジドチロシン

含有タンパク質の発現ができれば、現在よりもさらに大量のアジドチロシン含有タンパク質を発現できるはずである。アジドチロシン含有タンパク質の発現量を増加させるために、第2章では細胞内の TyrRS 変異体濃度を高めることで、アジドチロシンをより効率的にアンバーサプレッサー tRNA にチャージさせることを試み、完全長 カルモデュリンの発現量を3倍に増加させることができた [4-7]。さらなる発現量の増加のためには、TyrRS だけでなく、アンバーサプレッサー tRNA の細胞内濃度を増加させる必要があると考えられる。

これ以外の方法として、最近 Ohtake らは大腸菌ゲノム DNA にコードされた7種類の必須遺伝子の終止コドンを TAG から別の終止コドンに変異させ、アンバーサプレッサー tRNA 存在下で培養することで、翻訳終結因子 RF1 をノックアウトできることを発見した [4-8,9]。RF1 を欠損させることができれば、アンバーコドンをセンスコドンとして利用できるため、アジドチロシン含有タンパク質の発現量の増加に寄与できると考えられる。

現在までにアジド基を持つ非標準アミノ酸をタンパク質に導入し、アジド基選択的な修飾反応によりポリエチレングリコール (PEG) や蛍光物質などの有用物質がタンパク質の部位特異的に修飾されてきた [4-10~12]。PEG は生体内でタンパク質を分解から保護する効果があり、ドラッグデリバリーシステムへの利用が期待されている [4-13]。また、部位特異的に蛍光標識されたタンパク質は Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) や Fluorescence resonance energy transfer (FRET) を利用した分子内、または分子間相互作用解析に利用されている [4-14,15]。今後アジド基を部位特異的に導入したタンパク質に対して様々な修飾が施され、プロテオミクス研究に広く活用されていくことを期待する。

参考文献

- 4-1. Kobayashi, T., Nureki, O., Ishitani, R., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Cusack, S., Sakamoto, K., and Yokoyama, S. (2003) Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **10(6)**, 425-432
- 4-2. Kuratani, M., Sakai, H., Takahashi, M., Yanagisawa, T., Kobayashi, T., Murayama, K., Chen, L., Liu, Z.J., Wang, B.C., Kuroishi, C., Kuramitsu, S., Terada, T., Bessho, Y., Shirouzu, M., Sekine, S., and Yokoyama, S. (2006) Crystal structures of tyrosyl-tRNA synthetases from archaea. *J. Mol. Biol.* **355(3)**, 395–408
- 4-3. Xie, J., Wang, L., Wu, N., Brock, A., Spraggon, G., and Schultz, P.G. (2004) The site-specific incorporation of *p*-iodo-L-phenylalanine into proteins for structure determination. *Nat. Biotechnol.* **22(10)**, 1297-1301
- 4-4. Sakamoto, K., Murayama, K., Oki, K., Iraha, F., Kato-Murayama, M., Takahashi, M., Ohtake, K., Kobayashi, T., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2009) Genetic encoding of 3-iodo-L-tyrosine in *Escherichia coli* for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography. *Structure* **17(3)**, 335-344
- 4-5. Kim, C.H., Kang, M., Kim, H.J., Chatterjee, A., and Schultz, P.G. (2012) Site-specific incorporation of ϵ -N-crotonyllysine into histones. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51(29)**, 7246-7249
- 4-6. Neumann, H., Hancock, S.M., Buning, R., Routh, A., Chapman, L., Somers, J., Owen-Hughes, T., van, Noort, J., Rhodes, D., and Chin, J.W. (2009) A method for genetically installing site-specific acetylation in recombinant histones defines the effects of H3 K56 acetylation. *Mol. Cell.* **36(1)**, 153-163
- 4-7. Young, T.S., Ahmad, I., Yin, J.A., Schultz, P.G. (2010) An Enhanced System for Unnatural Amino Acid Mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **395(2)**, 361–374
- 4-8. Mukai, T., Hayashi, A., Iraha, F., Sato, A., Ohtake, K., Yokoyama, S., and Sakamoto, K. (2010) Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code. *Nucleic Acids Res.* **38(22)**, 8188-8195
- 4-9. Ohtake, K., Sato, A., Mukai, T., Hino, N., Yokoyama, S., and Sakamoto, K. (2012) Efficient decoding of the UAG triplet as a full-fledged sense codon enhances the growth of the *prfA*-lacking strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **194(10)**, 2606-2613

- 4-10. Yanagisawa, T., Ishii, R., Fukunaga, R., Kobayashi, T., Sakamoto, K., and Yokoyama, S. (2008) Multistep engineering of pyrrolysyl-tRNA synthetase to genetically encode N(epsilon)-(o-azidobenzoyloxycarbonyl) lysine for site-specific protein modification. *Chem. Biol.* **15**(11), 1187-1197
- 4-11. Deiters, A., Cropp, T.A., Summerer, D., Mukherji, M., and Schultz, P.G. (2004) Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**(23), 5743-5745
- 4-12. Ohno, S., Matsui, M., Yokogawa, T., Nakamura, M., Hosoya, T., Hiramatsu, T., Suzuki, M., Hayashi, N., and Nishikawa, K. (2007) Site-selective post-translational modification of proteins using an unnatural amino acid, 3-azidotyrosine. *J. Biochem.* **141**(3), 335-343
- 4-13. Caliceti, P., Chinol, M., Roldo, M., Veronese, F.M., Semenzato, A., Salmaso, S., and Paganelli, G. (2002) Poly(ethylene glycol)-avidin bioconjugates: suitable candidates for tumor pretargeting. *J. Control Release*, **83**(1), 97-108
- 4-14. Fekner, T., Li, X., Lee, M.M., Chan, M.K. (2009) A pyrrolysine analogue for protein click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**(9), 1633-1635
- 4-15. Yamaguchi, A., and Hohsaka, T. (2012) Synthesis of Novel BRET/FRET Protein Probes Containing Light-Emitting Proteins and Fluorescent Nonnatural Amino Acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 576-583

発表論文

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

Akiyoshi Ikeda-Boku, Satoshi Ohno, Yuuka Hibino, Takashi Yokogawa, Nobuhiro Hayashi,
Kazuya Nishikawa

J. Biochem., **153(3)**, 317-326.

(第2章に全文記載、第4章に一部記載)

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

Akiyoshi Ikeda-Boku, Keisuke Kondo, Satoshi Ohno, Erika Yoshida, Takashi Yokogawa,
Nobuhiro Hayashi, Kazuya Nishikawa

J. Biochem., 2013, in press

(第3章に全文記載、第4章に一部記載)

謝辞

岐阜大学工学部 西川一八教授には、私が研究室に配属されてから6年以上に渡りご指導を頂き、研究の楽しさと厳しさを教えていただきました。また、退官間際まで研究や発表について助言をいただき、誠にありがとうございました。

岐阜大学工学部 横川隆志教授には、研究の方向性など、研究者としての考え方や卒業までの指導など、本研究を進めていくうえでたくさんの指導と助言を頂きました。この場を借りて深く感謝いたします。

岐阜大学工学部 大野敏助教には、研究室に配属されてから6年間にわたり、研究課題の提案をしていただきました。また、様々な他研究室との共同研究を通して研究者としての視野を広げていただきました。心より感謝いたします。

研究室に配属された際、大平敦史氏、岡崎朗氏、越野正也氏、永井智之氏を含め、多くの先輩方には研究の指導をしていただくと共に、公私ともに助言をいただきましたことを感謝いたします。また、近藤啓祐氏、平山寛之氏、吉田恵理香氏には本研究の協力をいただきました。そして、安藤八重氏、伊藤美穂氏を含む研究室に配属された皆様には指導をする難しさや楽しさを教えていただきました。

岐阜大学工学部生命工学科卒業生 伊藤克佳氏、川迫圭輔氏、小松崎真司氏、芝田直幸氏、孫政完氏、坂野慎哉氏、森田健祐氏には同期として多くの時間を共にし、皆様のおかげで充実した大学生活を送ることができました。

最後に、私がこれまで研究するにあたり博士課程への進学を理解し、経済的な援助と精神的な支えとなってくれた家族 朴健英、高正枝、奈美、由美、克哉、瞬、そして有紀に感謝いたします。

