

蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の新規構造機能解析法の開発

研究者 芳坂 貴弘

北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科

概要

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

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

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

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

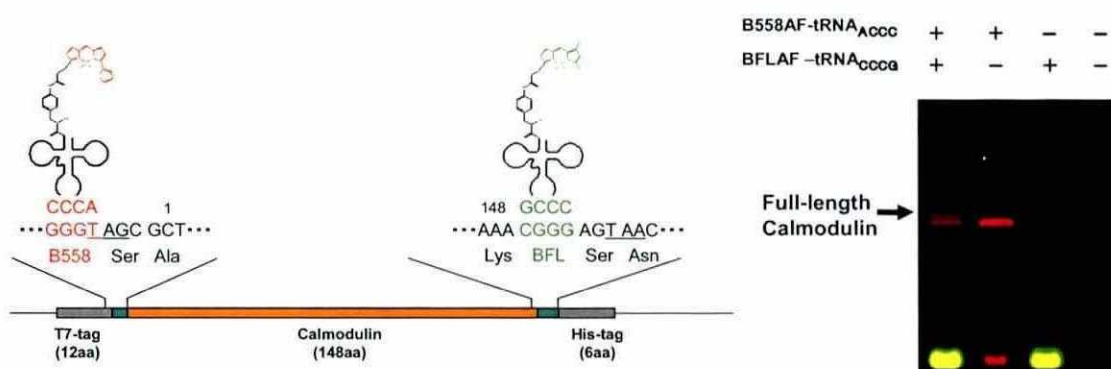


図 1 FRET のドナー・アクセプターを導入したカルモジュリンの合成

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

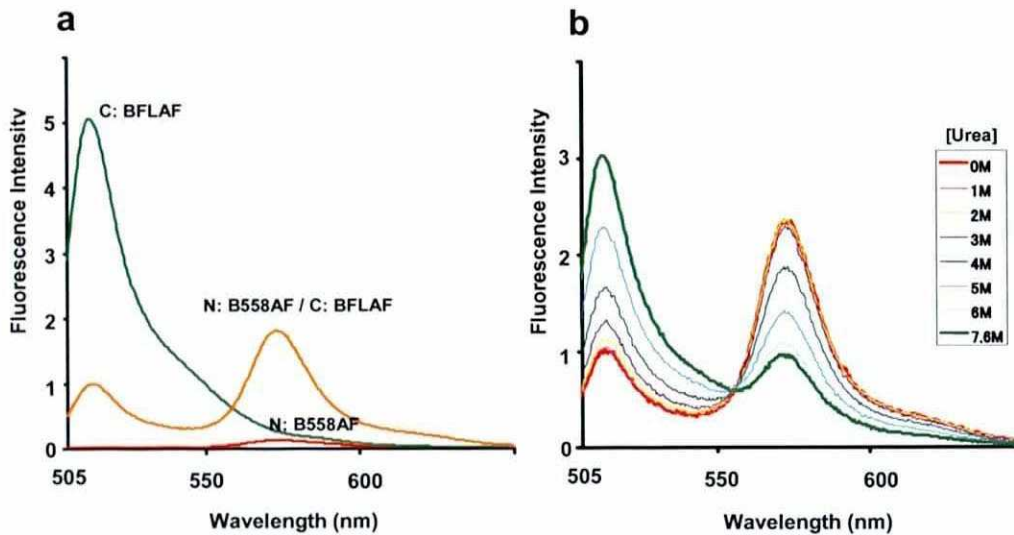


図2 N 末端・C 末端領域二重蛍光標識カルモジュリンにおける FRET

(a) 励起波長 490nm による一重および二重蛍光標識カルモジュリンの蛍光スペクトル

(b) 尿素添加による二重蛍光標識カルモジュリンの蛍光スペクトル変化

2. タンパク質間相互作用に伴う立体構造変化の FRET による検出

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

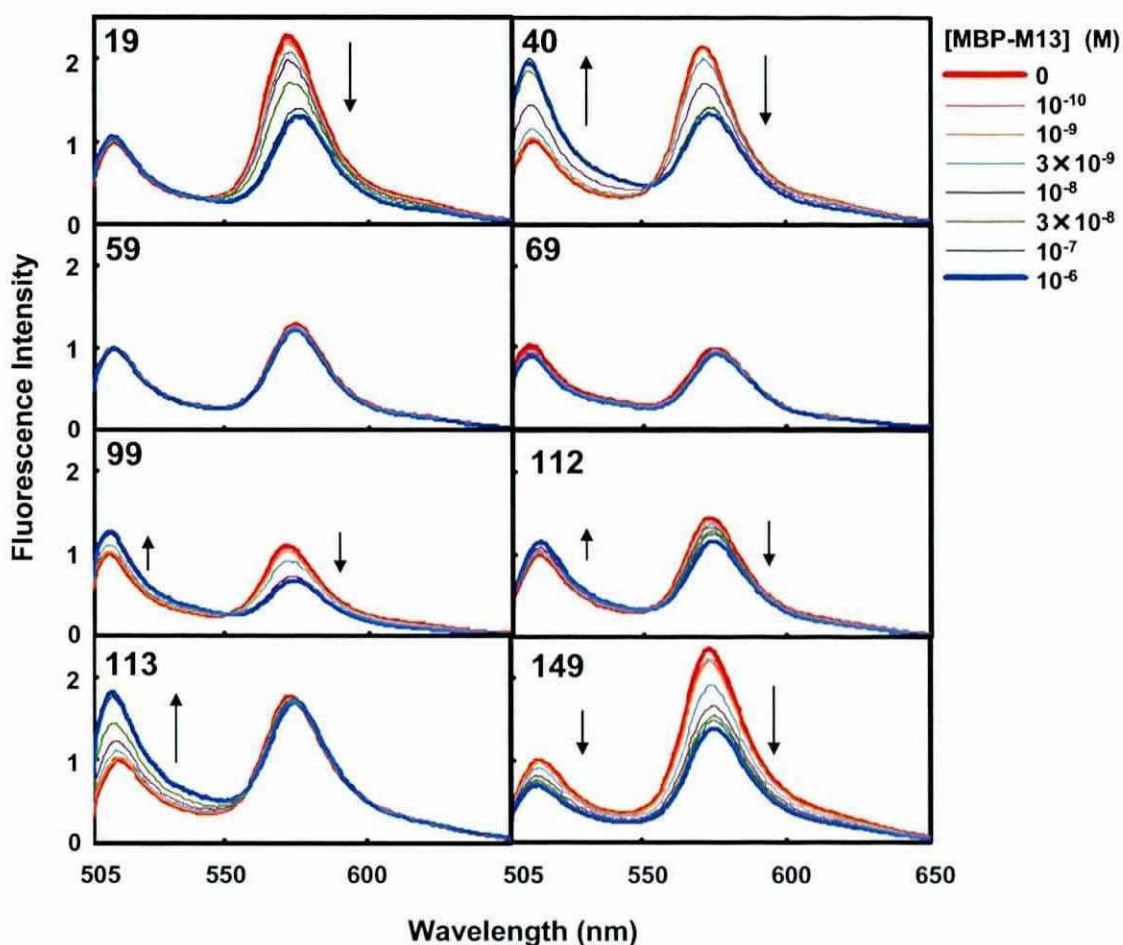


図3 N末端部分と種々の部位を二重蛍光標識したカルモジュリンにおけるM13ペプチドの結合に伴う蛍光スペクトル変化

また、40位に導入するアクセプターとしてBODIPY576AFおよび非蛍光性のNBDAFを用いた場合も、BODIPY558AFと同様のFRETを観測することができた。ただし、その変化の大きさはドナー・アクセプターの組み合わせに基づく Förster distance (R_0)に依存しており、予想される距離変化に近い R_0 を持つNBDAFを用いた場合が、最も大きなFRET変化を示すことが確認された。

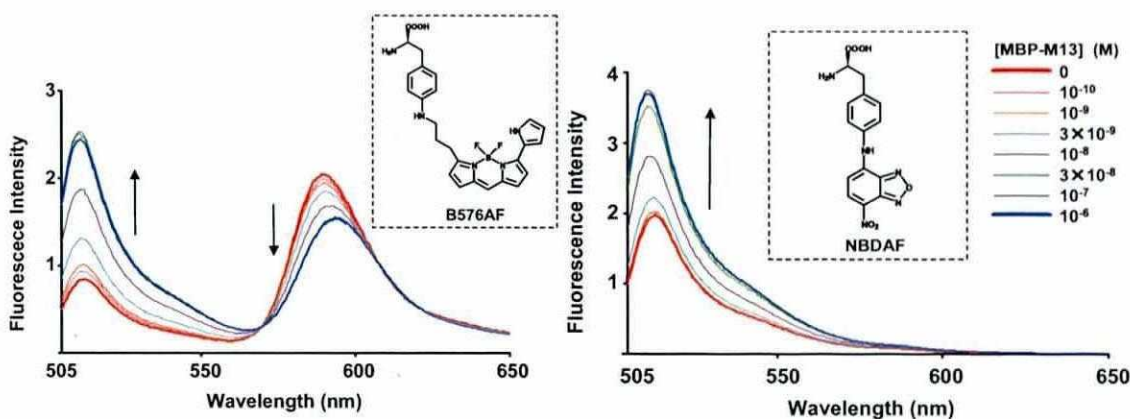


図4 種々のアクセプターを用いたN末端-40二重蛍光標識カルモジュリンのFRET

3. 蛍光標識アミノ酸導入のための関連技術の開発

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

また、開始コドン特異的に蛍光標識アミノ酸を導入する手法にも着目し、それを用いた FRET についても検討を行なった。

4. 今後の展開

カルモジュリンをモデルタンパク質として用いることで、二重蛍光標識タンパク質の合成および FRET 測定の手法を確立し、実際に尿素変性やペプチドの結合に伴う立体構造の変化を FRET により検出できることを実証した。この二重蛍光標識カルモジュリンは、カルモジュリン結合タンパク質とのタンパク質間相互作用を検出するためのタンパク質プローブとして利用することが可能である。同様の原理により、本手法は単に立体構造変化を解析するだけでなく、立体構造変化を伴う様々なタンパク質の機能解析ツールとして広く利用できるようになると予想される。そのためには今後、実施例の蓄積とともに、タンパク質合成の効率化や試薬のキット化などを進めていく必要があるだろう。

本研究に関連した研究業績

1. Daisuke Kajihara, Takahiro Hohsaka, Masahiko Sisido, Synthesis and Sequence Optimization of GFP Mutants Containing Aromatic Nonnatural Amino Acids at the Tyr66 Position. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2005, 18, 273-278.
2. Hikaru Taira, Masaharu Fukushima, Takahiro Hohsaka, Masahiko Sisido, Four-Base Codon-Mediated Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Proteins in a Eukaryotic Cell-Free Translation System. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 99, 473-476.
3. Takahiro Hohsaka, Norihito Muranaka, Chie Komiyama, Kinue Matsui, Satomi Takaura, Ryoji Abe, Hiroshi Murakami, Masahiko Sisido, Position-Specific Incorporation of Dansylated Non-natural Amino Acids into Streptavidin by using a Four-Base Codon. *FEBS Lett.*, 2004, 560, 173-177.
4. Takahiro Hohsaka, Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Proteins through Extension of the Genetic Code. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2004, 77, 1041-1049.
5. 芳坂貴弘、DDS 研究のためのタンパク質工学技術～遺伝暗号の拡張による非天然型アミノ酸のタンパク質への導入～. *Bio* ベンチャー、2004、11-12、69-71.
6. 芳坂貴弘、遺伝暗号を拡張して新しいタンパク質をつくる. *現代化学*、2004、4、24-29.

特許

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