

修飾化タンパク質の新規合成技術の開発

JSTイノベーションプラザ石川 平成15年度採択課題

「拡張遺伝暗号により修飾化アミノ酸を部位特異的に導入したタンパク質の発現技術の開発」



代表研究者

北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科
助教授 芳坂 貴弘

タンパク質は生体内ではリン酸化などの修飾を受けるものが多く、それらはガンなどの病気に関わっていることが明らかになりつつある。本研究では、これまで得ることが難しかったそのような修飾化タンパク質を容易に得るための手法を開発し、修飾化タンパク質に関する基礎および応用研究を支援する事業化を目指した。

研究内容、研究成果

生物はDNAの遺伝情報に従ってアミノ酸を連結させることでタンパク質を合成しているが、その際DNAの配列を3文字ずつ区切って1つのアミノ酸に翻訳している。代表研究者らはこの区切りを4文字に拡張して非天然アミノ酸に翻訳させることで、タンパク質の狙った位置に非天然アミノ酸を導入する技術を開発してきた。本研究ではこの技術を応用して、あらかじめリン酸化などの修飾を受けたアミノ酸を拡張遺伝暗号によりタンパク質へ導入することで、修飾化タンパク質を自由自在に合成する新規技術の開発を行なった(図1)。

まず、生体内の修飾において特に重要な3種類のリン酸化アミノ酸、4種類の修飾化リジンをターゲットとした(図2)。これらの修飾化アミノ酸誘導体を化学合成し、4文字の遺伝暗号用のトランスファーRNA(tRNA)への連結させた。一方、タンパク質の修飾化アミノ酸を導入したい位置の遺伝暗号を4文字に置き換えた遺伝子を作製し、これらが大腸菌由来の無細胞翻訳系に加えることで、修飾化アミノ酸を導入したタンパク質の合成を行なった。分析の結果、いずれの修飾化アミノ酸もタンパク質へ導入可能であることが確認された。また、照射によって修飾化タンパク質を生成させることが可能な、光脱離性保護修飾化アミノ酸の開発にも成功した。

続いて、これらの実験室レベルでの成果を事業化レベルへの移行させることを目指して、各工程の改善、効率化を行なった。まず、修飾化アミノ酸誘導体の化学合成法の効率化を検討し、合成収率を向上させた。また、使用するトランスファーRNAの配列を改変して、修飾化アミノ酸をより効率良く導入できるトランスファーRNAの開発にも成功した。

さらに、本技術を用いて合成した修飾化タンパク質を、実際のタンパク質解析に利用することを検討した。例として、細胞内のシグナル伝達経路において機能するShcと呼ばれるペプチド部分にリン酸化チロシンを導入しておき、その結合相手となるGrb2 SH2ドメインと呼ばれるタンパク質との結合を調べた。その結果、特異的な結合反応が観測され、本技術の有用性を実証することができた。

今後の展開、将来の展望

今後の展開として、本技術に基づいて修飾化タンパク質を合成するための試薬キット(図3)、あるいはユーザーから遺伝子を預かって修飾化タンパク質を合成する受託合成サービス、による事業化を予定している。これらの製品・サービスを大学などの研究機関や製薬企業に提供することで、修飾化タンパク質が関係する病気の原因の解明や、その診断薬・治療薬の開発を支援する。

ただし実際の事業化に際しては、各種修飾化アミノ酸誘導体の合成効率の向上や、様々なタンパク質に対して適用できるかについての実証試験などを引き続き進める必要がある。

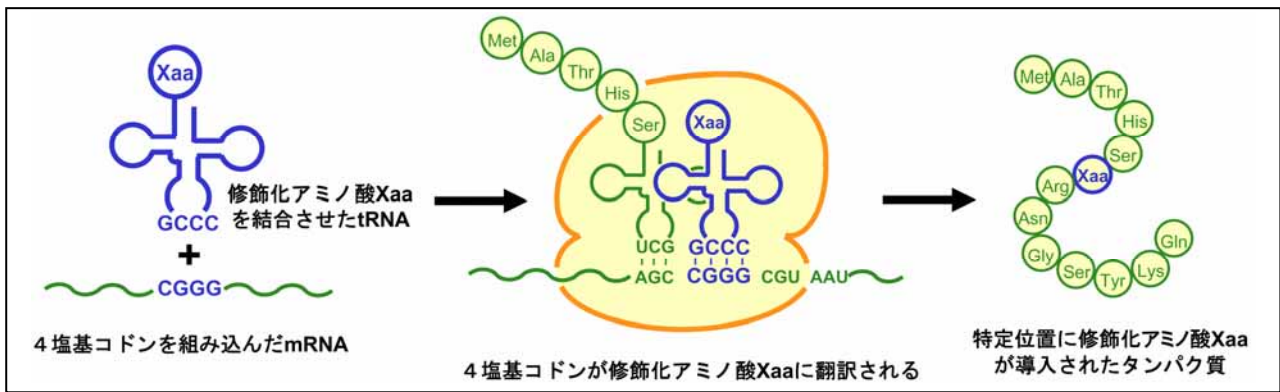


図1 拡張遺伝暗号による修飾化アミノ酸のタンパク質への導入技術

目的のタンパク質をコードする遺伝子の中に4文字の遺伝暗号（4塩基コドン）CGGGを組み込み、その4文字の遺伝暗号を認識できるトランスファーRNA（tRNA）に修飾化アミノ酸Xaaを結合させておく。これを無細胞翻訳系へ加えると、4塩基コドンが修飾化アミノ酸に翻訳されて、特定位置に修飾化アミノ酸が導入されたタンパク質が合成される。

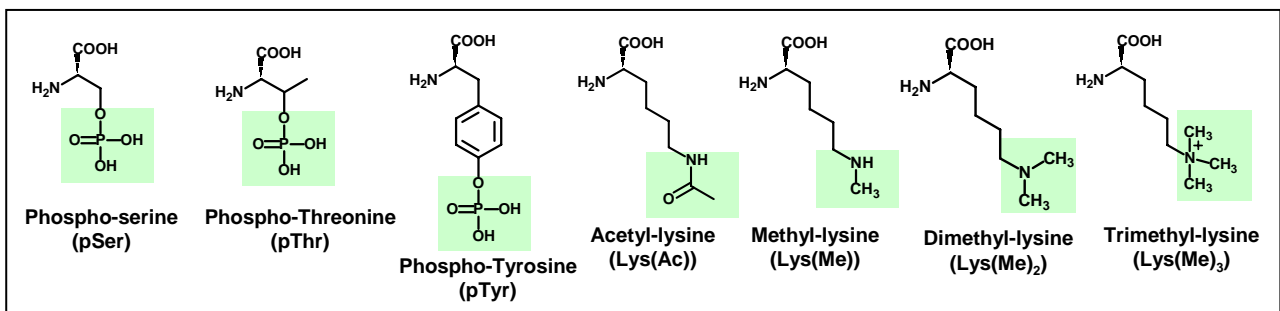


図2 修飾化アミノ酸の化学構造

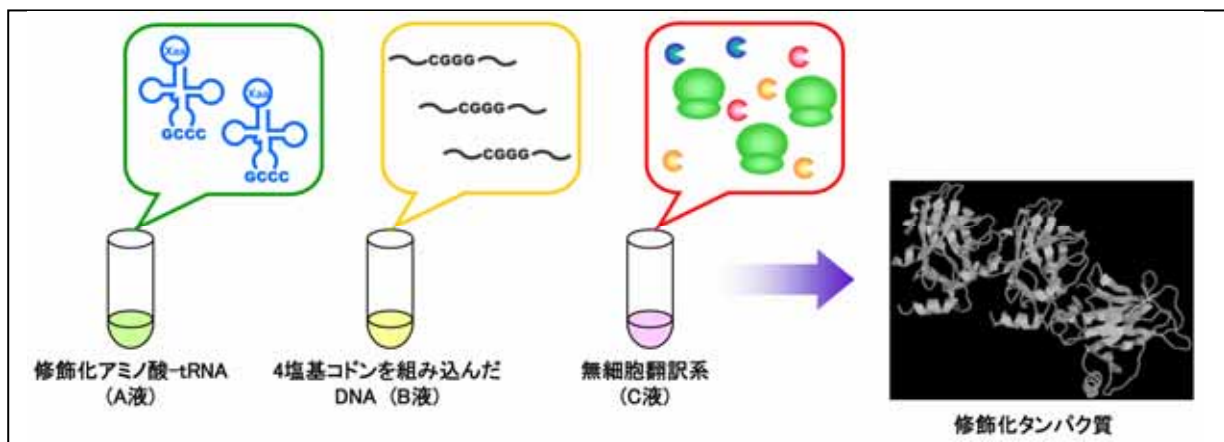


図3 修飾化タンパク質合成キットの商品化イメージ

研究体制

- ◆ **代表研究者**
北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 助教授 芳坂貴弘
- ◆ **研究者**
阿部 亮二・白神 かおり・高木 広明（(株)プロテイン・エクスプレス）
村中 宣仁・平 良光（科学技術振興機構）
- ◆ **共同研究機関**
北陸先端科学技術大学院大学、(株)プロテイン・エクスプレス、科学技術振興機構

研究期間

平成16年3月 ~ 平成18年9月