

論文内容の要旨

論文題目 動物細胞の遺伝暗号拡張による非天然型アミノ酸のタンパク質への導入と
シグナル伝達研究への応用

Incorporation of unnatural amino acids into proteins by expanded genetic codes in mammalian cells
for providing new strategies for the research
on signal transductions

氏名 樋野 展正

タンパク質に天然にはない新たな置換基を導入することで、プローブ分子や、新規機能分子として働かせることができる。反応性の高いアミノ基やチオール基をターゲットとするタンパク質の化学修飾は広く行われ、蛍光基やクロスリンカーを導入することにより、タンパク質の挙動や、相互作用の解析が可能になっている。しかし、これらの官能基はタンパク質中に複数箇所存在することが多く、望みの部位を特異的に修飾することは困難である。そこで近年、生物の持つ翻訳システムを改変し、遺伝暗号を拡張することによって、天然にはない置換基を側鎖にもつ非天然型アミノ酸を、生きた細胞内で、タンパク質中に部位特異的に導入する手法が開発されている。この手法は、まず大腸菌細胞を用いて達成され、その後、動物細胞、酵母細胞でも可能になっている。動物細胞内に、非天然型アミノ酸を特異的に認識する *Escherichia coli* 由来のチロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) を、*Bacillus stearothermophilus* 由来のアンバー・サプレッサー tRNA とともに発現させた時、このアミノ酸はアンバー・コドンに対応してタンパク質に導入される。*E. coli* TyrRS はこのサプレッサー tRNA のみをアミノアシル化し、逆に、この tRNA は内在性のアミノアシル tRNA 合成酵素に認識されない。このように、この原核生物由来の TyrRS と tRNA は動物細胞の翻訳システムと「直交性」を保っており、非天然型アミノ酸がアンバー・コドン以外の位置に取り込まれないことを保証している。動物細胞内において、任意の部位に非天然型アミノ酸を有するタンパク質を発現させることで、より生理的な条件下におけるタンパク質の挙

動の解析が可能になると考えられる。

本研究では、この技術を利用した細胞内シグナル伝達研究のための新たな手法を開発した。第一章では、動物細胞内で Src チロシンキナーゼの自己リン酸化部位に 3-ヨードチロシン (I-Y) を導入し、このアミノ酸が実際にリン酸化されることを示し、また、リン酸化された I-Y が特定のチロシンフォスファターゼに対する耐性を持つことを示した。このことは、細胞内の特定のシグナル経路を選択的に制御できる可能性を示唆している。また、第二章では、動物細胞内で Grb2 タンパク質の SH2 ドメインに光クロスリンク能を持つパラベンゾイルフェニルアラニン (pBpa) を導入し、細胞に 365 nm の光を照射することにより、共発現させた EGF 受容体とリン酸化依存的にクロスリンクさせることに成功した。また、細胞に発現する内在性タンパク質とも効率よくクロスリンクがかかることを示した。この手法により、細胞内で生じているタンパク質複合体を安定化し、また、それらを特異的に検出することが可能になることから、既存の手法では確認されなかったタンパク質間相互作用を同定できると考えられる。

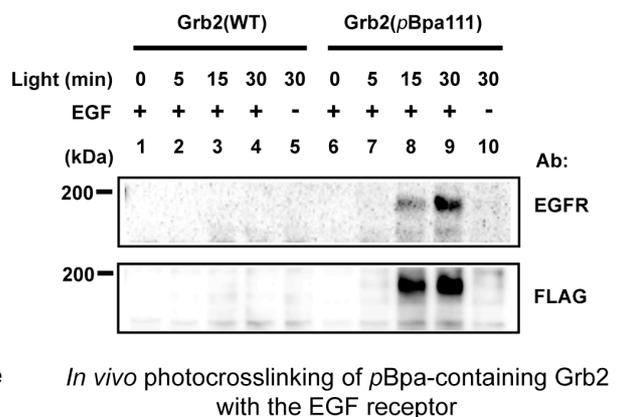
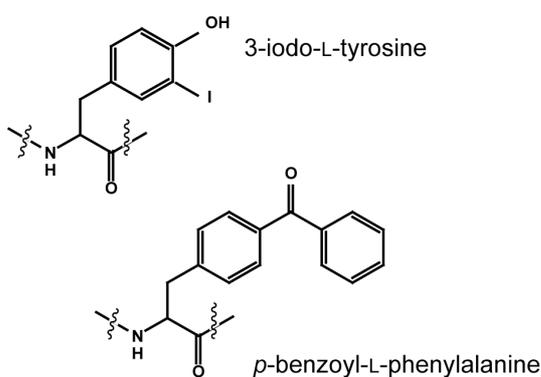
第一章 動物細胞内における 3-ヨードチロシンのリン酸化とその制御

動物細胞内において、タンパク質のチロシン残基のリン酸化状態は、チロシンキナーゼとチロシンフォスファターゼによって可逆的に制御されている。3-ヨードチロシン(I-Y)は、チロシンの 3 位にかさ高いヨード原子を有しており、キナーゼやフォスファターゼの認識に影響を与える可能性が大きい。そこで、細胞内に 3-ヨードチロシンを導入したタンパク質を発現させ、そのリン酸化、脱リン酸化について調べた。

ヒト Src チロシンキナーゼの自己リン酸化部位である 419 番目のコドンアンバー・コドンとし、この遺伝子を I-Y 特異的 *E. coli* TyrRS 変異体と *Bacillus stearothermophilus* 由来のアンバーサプレッサー-tRNA の遺伝子とともに CHO 細胞中に発現させた。培地中に I-Y を添加した時、I-Y が導入された Src が発現することが確認された。さらにこの時、導入された I-Y がリン酸化されていることが明らかとなった。

次に、リン酸化された I-Y (pI-Y) が、チロシンフォスファターゼである CD45 もしくは PTP1B によって脱リン酸化されるかどうかを調べた。基質としてリン酸化チロシン (pY) もしくは pI-Y を導入した合成ペプチドを用いた時、これらの酵素は、pI-Y に対し、pY を、優位に脱リン酸化することが示された。また、pI-Y を含む Src を用いた場合には、ある程度の脱リン酸化が確認されたが、pY を含む Src に比べてかなり弱いものであった。しかしながら、細胞内で pI-Y を含む Src がすみやかに脱リン酸化されることが確認され、細胞内に発現する何らかのフォスファターゼにより脱リン酸化されることが示唆された。PTP1B

は、pI-Y を認識する際にヨード原子と衝突することが予想される位置に、かさ高いイソロイシン残基を持つ。また、細胞内にはこの部位がアラニンなどの小さな残基に置き換わっているフォスファターゼが存在する。これは、pI-Y のチロシンフォスファターゼに対する感受性が、基質認識領域中に存在するひとつの残基のバリエーションによって決定される可能性を示唆している。これらのことから、pI-Y は CD45, PTP1B を含むある種のフォスファターゼに特異的に耐性を示す可能性があり、特定のシグナル経路の制御に利用できると思われる。



第二章 動物細胞内における、光クロスリンク能を持つ非天然型アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入と、*in vivo* 光クロスリンク法の開発

パラベンゾイルフェニルアラニン (*pBpa*) は光クロスリンク能を持つベンゾフェノン骨格をその側鎖として有する非天然型アミノ酸である。酵母細胞において、*pBpa* を特異的に認識する *E. coli* 由来 TyrRS 変異体が開発され、動物細胞内において *pBpa* がタンパク質に導入できる可能性が示唆された。そこで、シグナル伝達に関わるアダプタータンパク質である Grb2 の SH2 ドメインに *pBpa* を導入し、リン酸化タンパク質とのクロスリンク形成について調べた。まず、*pBpa* の導入部位として、Grb2 とペプチドリガンドとの複合体構造に基づいて、リガンド結合部位近傍に存在する、111 番目のロイシン残基を選択した。対応するコドンアンバー・コドンに置換し、FLAG タグ配列を付加した *grb2* 遺伝子と、*E. coli* 由来の *pBpa* 特異的 TyrRS 変異体、*B. stearothermophilus* 由来のアンバーサプレッサー-tRNA の遺伝子を CHO 細胞内に導入し、培地中には *pBpa* を添加した。Grb2 変異体の発現は、*pBpa* 添加時のみ確認されたことから、Grb2 遺伝子の 111 番目のコドンに対応して、*pBpa* が導入されたことが示された。この変異体を以下 Grb2(*pBpa*111)と表記する。

EGF 受容体は、EGF 刺激により自己リン酸化し、Grb2 の SH2 ドメインと結合すること

が知られている。EGF 受容体と Grb2(pBpa111)を CHO 細胞内に共発現させた時、両者は EGF 刺激に依存して相互作用することが免疫沈降法によって示された。さらに、EGF で刺激したこれらの細胞に、氷冷下で直接 365 nm の光を最長 30 分間照射した場合、次のような結果が得られた (図)。1. Grb2(pBpa111)発現細胞にのみ、光の照射時間に依存して増加する産物が確認された。2. EGF 刺激をしていない細胞に光を照射した場合には、このような産物は確認されなかった。3. この産物は、抗 EGF 受容体抗体、抗 FLAG 抗体の両者によって検出された。4. この産物は、EGF 受容体と Grb2 の分子量を足し合わせたのと同じ、200 kDa 程度の分子量を有していた。以上のことから、この産物は、EGF 受容体と Grb2 のクロスリンク複合体であると結論された。

次に、SH2 ドメイン中の異なる部位に pBpa を導入した場合の EGF 受容体とのクロスリンク形成について調べた。EGF 受容体とのクロスリンクは複数箇所で行われたが、リガンドに近接し、さらにリガンド側を向いている残基を pBpa に置換した時、最も効率よくクロスリンクが起こり、Grb2 内部を向く残基や、リガンドから離れた位置に存在する残基を pBpa に置換した場合には、クロスリンクは見られなかった。このように、クロスリンクの効率は、pBpa 導入部位からリガンドまでの距離、または導入された pBpa の側鎖の向きに依存することが示された。

最後に、Grb2(pBpa111)と、CHO 細胞に発現する内在性タンパク質とのクロスリンク形成について調べた。この結果、光照射に依存して、Grb2 に結合することが知られる ErbB2 をはじめとする、数多くのクロスリンク複合体が生じていることが確認された。

この *in vivo* 光クロスリンク法は、相互作用するタンパク質どうしを細胞内でクロスリンクさせることから、不安定なタンパク質複合体を安定に単離することができる。また、細胞を破碎した後に生じるような、本来の相互作用を反映しない複合体と区別することができる。このことは、動物細胞内におけるタンパク質間相互作用を調べる上で非常に有用であり、今後様々な相互作用の同定に応用できると考えられる。