

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-319064

(P2007-319064A)

(43) 公開日 平成19年12月13日(2007.12.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 4
<b>C O 7 K 14/36 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/36	4 H O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2006-151962 (P2006-151962)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構
(22) 出願日	平成18年5月31日 (2006.5.31)	(71) 出願人	304024430 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
		(71) 出願人	304024430 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 石川県能美市旭台一丁目1番地
		(71) 出願人	500546994 株式会社プロテイン・エクスプレス 千葉県銚子市中央町2番地の11
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾化アミノ酸を部位特異的に導入したタンパク質を発現させる方法

(57) 【要約】

【課題】プロモヒドロキシクマリン誘導体等の光脱離性保護基で保護したリン酸化アミノ酸等の修飾化アミノ酸をタンパク質の指定した位置へ導入する方法、該導入に用いるtRNAの提供。

【解決手段】光照射により脱離可能なプロモクマリンを有する保護基を付加した修飾化アミノ酸を含むアミノアシルtRNA。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

光照射により脱離可能なプロモクマリンを有する保護基を付加した修飾化アミノ酸を含むアミノアシル化 tRNA。

## 【請求項 2】

修飾化アミノ酸の修飾が翻訳後修飾により生じるものである、請求項 1 記載のアミノアシル化 tRNA。

## 【請求項 3】

修飾化アミノ酸がリン酸化アミノ酸またはメチル化アミノ酸である、請求項 1 記載のアミノアシル化 tRNA。

10

## 【請求項 4】

修飾化アミノ酸がリン酸化チロシン、リン酸化セリン、リン酸化スレオニンおよびメチル化リジンからなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のアミノアシル化 tRNA。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の保護基付加修飾化アミノ酸でアミノアシル化された tRNA を用いて、該アミノ酸をタンパク質の特定部位へ導入することを含む保護基付加修飾化タンパク質を合成する方法。

## 【請求項 6】

保護基付加修飾化アミノ酸のタンパク質への導入が、4 塩基コドン法、終止コドン法および人工コドン法よりなる群から選択される方法により行われる、請求項 5 記載の保護基付加修飾化タンパク質を合成する方法。

20

## 【請求項 7】

請求項 5 または 6 に記載の方法により合成された保護基付加修飾化タンパク質。

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の保護基付加修飾化アミノ酸でアミノアシル化された tRNA を用いて、該アミノ酸をタンパク質の特定部位へ導入し、その後光照射により保護基を脱離させることを含む、修飾化タンパク質を合成する方法。

## 【請求項 9】

保護基付加修飾化アミノ酸のタンパク質への導入が、4 塩基コドン法、終止コドン法および人工コドン法よりなる群から選択される方法により行われる、請求項 8 記載の修飾化タンパク質を合成する方法。

30

## 【請求項 10】

請求項 8 または 9 に記載の方法により合成された修飾化タンパク質。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、光照射により脱離可能なプロモヒドロキシクマリン誘導体の保護基を付加した、リン酸化アミノ酸等の修飾化アミノ酸をタンパク質の生合成過程でタンパク質に導入し修飾化タンパク質を製造する方法に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

リン酸化アミノ酸などの翻訳後修飾によって生じるアミノ酸を含む修飾化タンパク質を得るためには、生体試料からの抽出、化学合成、あるいは生合成したタンパク質を酵素により修飾することが行われていた。しかし、生体試料中には微量しか修飾化タンパク質が存在せず、また単一の修飾化タンパク質のみを精製することは困難であった。また、化学合成では単一の修飾化タンパク質の合成が可能ではあるが、合成できるタンパク質の分子量には限界があり、分子量が約 1 万以上の修飾化タンパク質を合成することは困難であった。さらに、生合成したタンパク質を酵素により修飾する方法では、利用できる酵素が限

50

られているために、任意の指定した部位を修飾することは困難であった。

【0003】

一方、終止コドンを用いた非天然アミノ酸導入法を利用して、リン酸化アミノ酸などの修飾化アミノ酸をタンパク質の指定した部位へ導入する技術が既に開発されている（非特許文献1参照）。しかし、この場合、脱リン酸化酵素などによってリン酸基が容易に脱離してしまい、リン酸化タンパク質が取得できなくなるという問題があった。また、光脱離性保護基としてニトロベンジル基で保護されたリン酸化アミノ酸を導入する手法も報告されているが（非特許文献2参照）、ニトロベンジル基を用いた場合の光脱保護には長時間の光照射が必要であり、迅速なリン酸化タンパク質の取得は困難であった。最近、ニトロベンジル基の代わりにプロモヒドロキシクマリン誘導体を光脱離性保護基として付加したリン酸化アミノ酸を含むペプチドが合成されている（非特許文献3参照）が、化学合成法によるために高分子量のタンパク質を合成することはできなかった。

10

【0004】

【非特許文献1】Structurally Modified Firefly Luciferase. Effects of Amino Acid Substitution at Position 286, Arslan, T.; Mamaev, S. V.; Mamaeva, N. V.; Hecht, S. M., J. Am. Chem. Soc., 119, 10877-10887 (1997).

【非特許文献2】Caged Phosphoproteins, Rothman, D. M.; Petersson, E. J.; Vazquez, M. E.; Brandt, G. S.; Dougherty, D. A.; Imperiali, B., J. Am. Chem. Soc., 127, 846-847 (2005).

【非特許文献3】ケージドリン酸化ペプチドプローブを用いた生細胞内PI3キナーゼの光活性化、程煥、築地真也、川上隆史、長棟輝行、古田寿昭、第28回日本分子生物学会年会予稿集p304、発表番号3P-1209、2005年12月9日。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、プロモヒドロキシクマリン誘導体等の光脱離性保護基で保護したリン酸化アミノ酸等の修飾化アミノ酸をタンパク質の指定した位置へ導入する方法および該導入に用いるtRNAの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、光照射によって速やかに脱離する光脱離性保護基であるプロモヒドロキシクマリン誘導体をリン酸化アミノ酸のリン酸基の保護基として付加した、それをtRNAにアミノアシル化した後に4塩基コドン法等の人工コドン法により、タンパク質へ導入することにより、タンパク質の分子量の大小にかかわらず、指定した任意の部位へリン酸化アミノ酸を導入することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

30

【0007】

本発明の保護基が付加された修飾化アミノ酸を導入したタンパク質は、保護基が付加されていることで、脱リン酸化酵素などによるリン酸基の脱離は生じず、またプロモヒドロキシクマリン誘導体を保護基として用いることで、迅速な光脱保護が可能になる。

【0008】

40

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 光照射により脱離可能なプロモクマリンを有する保護基を付加した修飾化アミノ酸を含むアミノアシル化tRNA。

[2] 修飾化アミノ酸の修飾が翻訳後修飾により生じるものである、[1]のアミノアシル化tRNA。

[3] 修飾化アミノ酸がリン酸化アミノ酸またはメチル化アミノ酸である、[1]のアミノアシル化tRNA。

[4] 修飾化アミノ酸がリン酸化チロシン、リン酸化セリン、リン酸化スレオニンおよびメチル化リジンからなる群から選択される、[1]~[3]のいずれかのアミノアシル化tRNA。

50

[5] [1]~[4]のいずれかの保護基付加修飾化アミノ酸でアミノアシル化されたtRNAを用いて、該アミノ酸をタンパク質の特定部位へ導入することを含む保護基付加修飾化タンパク質を合成する方法。

[6] 保護基付加修飾化アミノ酸のタンパク質への導入が、4塩基コドン法、終止コドン法および人工コドン法よりなる群から選択される方法により行われる、[5]の保護基付加修飾化タンパク質を合成する方法。

[7] [5]または[6]の方法により合成された保護基付加修飾化タンパク質。

[8] [1]~[4]のいずれかの保護基付加修飾化アミノ酸でアミノアシル化されたtRNAを用いて、該アミノ酸をタンパク質の特定部位へ導入し、その後光照射により保護基を脱離させることを含む、修飾化タンパク質を合成する方法。

10

[9] 保護基付加修飾化アミノ酸のタンパク質への導入が、4塩基コドン法、終止コドン法および人工コドン法よりなる群から選択される方法により行われる、[8]の修飾化タンパク質を合成する方法。

[10] [8]または[9]の方法により合成された修飾化タンパク質。

#### 【発明の効果】

##### 【0009】

本発明の方法により、作製される保護基が付加された修飾化アミノ酸を導入したタンパク質は、保護基が付加されていることで、脱リン酸化酵素などによるリン酸基の脱離は生じず、またプロモヒドロキシクマリン誘導体を保護基として用いることで、迅速な光脱保護が可能になる。本発明の方法を利用することにより、修飾化タンパク質の機能解析研究や、それに対する診断薬や治療薬の開発等が可能になる。例えば、ガン抑制因子であるp53タンパク質は、生体内においてリン酸化などの修飾を受けてその機能が複雑に制御されているが、本技術によりそのような修飾化タンパク質を合成することは、その機能の解明や特定の修飾状態にあるp53タンパク質の機能を制御してガンを抑制する薬剤の開発等に有効である。さらに、プロモヒドロキシクマリン誘導体は紫外線励起または赤外線二光子励起によって、光照射部分のみで脱保護が可能であるために、細胞または生体組織のうち、光照射部分でのみ修飾化タンパク質を生成させて、その部分での修飾化タンパク質の機能を観察することにも有用である。

20

##### 【0010】

また、本発明は、リン酸化だけに限定されず他の修飾化アミノ酸にも応用可能であり、短時間の光照射により指定した部位へ修飾化アミノ酸を導入したタンパク質を得ることができる。他の修飾化アミノ酸として、メチル化アミノ酸、グリコシル化アミノ酸、リボシル化アミノ酸等が挙げられる。

30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0011】

本発明の短時間の光照射によって脱離可能な保護基（光脱離性保護基または光分解性保護基）として、プロモクマリンを有する誘導体が挙げられ、プロモクマリンを有する誘導体としてプロモヒドロキシクマリン誘導体が挙げられる。プロモヒドロキシクマリン誘導体としては、Bmc (6-Bromo-7-methoxycoumarin-4-ylmethyl)、Bhc (6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl) (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.96(4), 1193(1999))等がある。

40

##### 【0012】

導入しようとする修飾化アミノ酸を前記プロモヒドロキシクマリン誘導体で保護し、ケージド化合物とする。修飾化アミノ酸としては、限定されないが、天然状態において、翻訳後の修飾により生じる修飾化アミノ酸であり、リン酸化アミノ酸、メチル化アミノ酸、グリコシル化アミノ酸、リボシル化アミノ酸が挙げられる。アミノ酸の種類も限定されないが、チロシン、セリン、スレオニンおよびリジンが好ましく、特にリン酸化チロシン、リン酸化セリン、リン酸化スレオニンおよびメチル化リジンが好適に用いられる。本発明で用いるリン酸化アミノ酸は、市販のものを用いてもよいし、アミノ酸の側鎖をリン酸化し得る化学試薬を用いて製造することもできる。

##### 【0013】

50

修飾化アミノ酸のプロモクマリンを有する誘導体の付加による保護は、修飾アミノ酸の種類により、適宜公知の方法を適用して行うことができる。例えば、プロモクマリンを有する誘導体をジアゾ化し（Bhc-diazo等）、リン酸基等とエステル結合により結合させればよい。Bhc-diazoは、和光純薬工業から入手することができる。

#### 【0014】

本発明の保護基を付加した修飾化アミノ酸（保護基付加修飾化アミノ酸）を、タンパク質に導入するためには、tRNAにアミノ酸を結合させ、アミノアシル化tRNAを作成する。アミノアシル化tRNAを作製するためには、アミノ酸にtRNAと結合させるために必要な特定の基を結合させておく必要がある。例えば、アミノ酸のカルボキシル基にジヌクレオチド（pdCpA）を結合させておけば、3'末端のCAジヌクレオチドを欠落させたtRNA（tRNA(-CA)）と結合させ、人工アミノアシル化tRNAを作製することができる。例えば、アミノ酸の

10

アミノ基をBoc基で、側鎖官能基をBocもしくはOtBocで保護し、Boc-アミノ酸をシアノメチルエステル化した後、pdCpAと反応させるか、縮合剤カルボニルイミダゾール（CDI）を用いてBocアミノ酸とpdCpAを反応させる方法により、アミノアシルpdCpAを作製することができる。tRNA(-CA)との連結はT4 RNAリガーゼを用いればよい。tRNAとしては、例えば、酵母フェニルアラニン用tRNAの有する塩基配列を有するtRNAを用いることができる。人工アミノアシル化tRNAの作製は、W02004/009709国際公開パンフレット等の記載に従って行うことができる。該tRNAは、酵母由来のフェニルアラニンに対応したtRNAのアンチコドンを変更することにより得ることができる。

#### 【0015】

本発明の保護基を付加した修飾化アミノ酸の導入は、自然界ではアミノ酸が割り当てられていないコドンに保護基を付加した修飾化アミノ酸を割り当てコドンを拡張する方法である4塩基コドン法、終止コドン法、人工コドン法のいずれの方法も用いることができる。この中でも4塩基コドン法が好ましい。4塩基コドン法は、Hohsaka T., et al., J. Am. Chem. Soc., 118, 9778-9779, 1996およびHohsaka T., et al., J. Am. Chem. Soc., 121, 34-40, 1999の記載に従って実施することができる。また、終止コドン法は、Science, 244, p.182, 1989およびJ. Am. Chem. Soc., 111, p.8013, 1989、人工塩基コドン法は、Hirao, I., et al., Nature Biotech., 20, 177-182, 2002の記載に従って行うことができる。

20

#### 【0016】

4塩基コドン法においては、DNAまたはmRNAの、保護基を付加した修飾化アミノ酸を導入したい部位に4塩基コドンを組み込み、tRNAのアンチコドン部位を対応する4塩基に置換し、さらに保護基を付加した修飾化アミノ酸を結合させておく。これらを用いてタンパク質合成を行うと、4塩基コドンに置換した部分ではリボソームの中で4塩基のコドン・アンチコドンペアが形成され、tRNAに結合させた保護基を付加した修飾化アミノ酸は伸長中のペプチド鎖に組み込まれる。一方、その他の部分は通常通り3塩基ずつ翻訳されるので、最終的に得られるタンパク質には4塩基コドンで指定した部分にのみ保護基を付加した修飾化アミノ酸が導入されていることになる。なお、4塩基コドン法においては、4つの連続した塩基からなるコドンだけでなく、5以上の連続した塩基からなるコドンも用いることができる。例えば、5、6または7つの連続した塩基からなるコドンが挙げられる。5以上の連続した塩基からなるコドンを用いる場合、tRNAのアンチコドン部位を対応する5以上の塩基に置換すればよい。本明細書において、4塩基コドンという場合、4つの連続した塩基からなるコドンを5以上の連続した塩基からなるコドンに変更したのものも含む。

30

40

#### 【0017】

本発明のtRNAを用いたタンパク質への保護基を付加した修飾化アミノ酸の導入は、保護基を付加した修飾化アミノ酸を導入しようとするタンパク質をコードするDNAの導入部位に相当するコドン位置に上記のコドンに対応する配列を導入したDNAと保護基を付加した修飾化アミノ酸を結合させた本発明のアミノアシル化tRNA、すなわち保護基付加修飾化アミノ酸とtRNAの連結体を用いて細胞内または無細胞翻訳系でタンパク質を合成することにより行うことができる。得られるタンパク質を保護基付加修飾化タンパク質、またはケー

50

ジドタンパク質ということがある。

【0018】

本発明の保護基を付加した修飾化アミノ酸のタンパク質への導入法においては、生細胞を用いた合成系および無細胞タンパク質合成系を利用することができるが、無細胞タンパク質合成系を利用することが好ましい。

【0019】

生細胞によるタンパク質合成系により保護基を付加した修飾化アミノ酸を導入したタンパク質を得るには、アミノアシル化tRNA及びmRNAを細胞内へマイクロインジェクションにより注入する方法が知られており (Science, 268, p.439, 1995)、この手法により生細胞に本発明のタンパク質を発現させることができる。

10

【0020】

無細胞翻訳系による合成は、発現させようとする遺伝子を含む発現ベクターを宿主細胞に導入することなく、in vitroで必要な試薬と混合し遺伝子が発現させることにより行うことができる (Spirin, A.S. et al, (1988) "A continuous cell-free translation system capable of production polypeptides in high yield" Science 242, 1162; Kim, D.M., et al., (1996) "A highly efficient cell-free protein synthesis system from E. coli" Eur. J. Biochem. 239, 881-886)。無細胞タンパク質合成系は、mRNAの有する遺伝情報を読み取ってリボソーム上でタンパク質を合成する無細胞翻訳系のみをさす場合もあるし、DNAをテンプレートとしてRNAを合成する無細胞転写系と前記無細胞翻訳系の両方を包含するものをさす場合もある。無細胞翻訳系においては、生物抽出液が用いられる。生物抽出液とは、それが大腸菌抽出液の場合は、リボソーム、20種類のアミノアシルtRNA合成酵素、メチオニル-tRNAトランスフォルミラーゼ、3種類の翻訳開始因子 (translation initiation factor; IF1、IF2、IF3)、3種類の翻訳伸長因子 (translation elongation factor; EF-G、EF-Tu、EF-Ts)、3種類の翻訳終結因子 (translation termination factor; RF1、RF2、RF3)、リボソームリサイクリング因子 (RRF)、RNAポリメラーゼ等のタンパク質合成に必要な成分を含む生物の抽出液をいう。ここに挙げた以外のタンパク質を効率的な翻訳のために添加してもよく、当業者ならばより効率的な添加のために如何なるタンパク質を添加すればよいか決定できる。生物抽出液は、大腸菌由来のもの、コムギ胚芽由来のもの、ウサギ網状赤血球由来のもの、動物細胞や昆虫細胞由来のものいずれを用いてもよい。生物抽出液はフレンチプレスによる破碎またはグラスビーズを用いた破碎等によって得ることができる。大腸菌由来微生物抽出液としてはS30エクストラクトがあり、例えばPrattらの方法により得ることができる (Pratt, Transcription and Translation - a practical approach, Henes, B. D. and Higgins, S. J. ed., IRL Press, Oxford., 179-209 [1984])。S30エクストラクトは、リボソーム、20種類のアミノアシルtRNA合成酵素、メチオニル-tRNAトランスフォルミラーゼ、3種類の翻訳開始因子 (translation initiation factor; IF1、IF2、IF3)、3種類の翻訳伸長因子 (translation elongation factor; EF-G、EF-Tu、EF-Ts)、3種類の翻訳終結因子 (translation termination factor; RF1、RF2、RF3)、リボソームリサイクリング因子 (RRF) 等を含む。無細胞タンパク質合成系は、上記生物抽出液の他、ATP再生系、プロモーターおよび発現させようとするタンパク質をコードする核酸を含むプラスミドまたは発現させようとするタンパク質をコードするmRNA、tRNA、RNAポリメラーゼ、RNAアーゼ阻害剤、ATP、GTP、CTP、UTP、緩衝剤、アミノ酸、塩類、抗菌剤等を含んでいてもよく、それぞれの濃度は適宜決定すればよい。

20

30

40

【0021】

ATP再生系は限定されず、公知のリン酸ドナーおよびキナーゼの組合せを用いることができる。この組合せとして例えば、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) -ピルビン酸キナーゼ (PK) の組合せ、クレアチンリン酸 (CP) -クレアチンキナーゼ (CK) の組合せ、アセチルリン酸 (AP) -アセテートキナーゼ (AK) の組合せ等が挙げられ、これらの組合せでATP再生系を無細胞タンパク質合成系に加えればよい。

【0022】

50

無細胞タンパク質合成系には製造しようとするタンパク質をコードするmRNAも必要である。該mRNAは無細胞タンパク質合成系に核酸を転写する系、すなわち該タンパク質をコードするmRNAを産生する系を包含させてもよい。この場合は、DNAを添加する。また、別途mRNAを転写等により合成し、得られたmRNAを本発明の無細胞タンパク質合成系に含ませてもよい。mRNAの産生は、適当なプロモーターおよび該プロモーターの下流に位置する製造しようとするタンパク質をコードするDNAを含むプラスミドならびに該プロモーターに作用するRNAポリメラーゼにより達成できる。ここで、用いるプラスミドは限定されず、公知のものが用いられ、公知の遺伝子工学的手法により、適当なプロモーターやリボソーム結合部位等を導入して用いることができる。当業者ならば、本発明で用いるプラスミドを適宜選択し、また自ら設計して構築することができる。プロモーターは無細胞タンパク質合成系で用いる生物が有する内在性のプロモーターを用いてもよいし、外来性のプロモーターを用いてもよい。プロモーターとしては、上記Trcプロモーター、T7プロモーターやTlacプロモーターが効率の面で優れており好適に用いられる。

10

20

30

40

50

#### 【0023】

市販の無細胞発現キットを用いてタンパク質を発現させることができる。このようなキットとして例えば、Rapid Translation System (RTS) (Roche)やExpressway In Vitro Protein Synthesis System (Invitrogen)等がある。この際、用いる発現ベクターは限定されないが、それぞれの無細胞翻訳系に適したベクターがあるのでそれを使用すればよい。前者のキット用発現ベクターとして、pIVEX2.2bNdeが挙げられ、後者のキット用発現ベクターとして、pEXP1やpEXP2が挙げられる。

#### 【0024】

本発明の方法により、本発明の保護基を付加した修飾化アミノ酸でアミノアシル化されたtRNAを用いることにより、タンパク質の任意の位置に保護基を付加した修飾化アミノ酸を導入することができる。

#### 【0025】

プロモクマリンを有する保護基は、紫外光をわずかの時間照射することにより、例えば365nmの波長の光を0.5秒～数分間照射することにより、容易に脱離することができる。図3に光照射による保護基の脱離機構を示す。

#### 【実施例】

#### 【0026】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 【0027】

Bmc-pTyr-pdCpAの合成(図4)

リン酸化チロシン(pTyr、シグマ社製)のDMSO溶液(91.2 $\mu$ mol)に、Bmc-diazo 42 $\mu$ molを加え、室温で46時間反応させた。HPLCにより反応の進行を確認した後、メタノール2mL、水2mLを加えた。攪拌し、15000rpmで5分間遠心し、上清を回収し、遠心濃縮機により溶媒を除去した。逆相HPLC(カラム：ウォーターズ社製XterraC18 4.6mm $\times$ 20mm、溶離液：0.38%ギ酸とメタノールのリニアグラジエント(0~100%/10min)、流速：1.5mL/min、検出：260nmの吸光度)により目的物を含むフラクションを回収し、遠心濃縮機により溶媒を除去しBmc-pTyrを得た。

#### 【0028】

Bmc-pTyr 1.1 $\mu$ molに対して0.1M NaHCO<sub>3</sub>/dioxane = 1 : 1 を150 $\mu$ L加え、氷冷下で攪拌しながらdi-t-butyl dicarbonate ((Boc)<sub>2</sub>O)のdioxane溶液(5.5 $\mu$ mol)を加え、室温で1時間反応させた。HPLCにより反応の進行を確認した後、HPLCにより目的物を含むフラクションを回収し、遠心濃縮機により溶媒を除去してBoc-(Bmc-pTyr)を得た。

#### 【0029】

Boc-(Bmc-pTyr) 0.58 $\mu$ molに対してアセトニトリル60 $\mu$ L、トリエチルアミン487 $\mu$ Lを加え、氷冷下で攪拌しながらクロロアセトニトリル184 $\mu$ Lを滴下し、そのままの状態でも20時間反応させた。酢酸エチルを用いて抽出し、5%硫酸水素カリウムで3回洗浄した後、

遠心濃縮機により溶媒を除去した。HPLCにより目的物を含むフラクションを回収し、遠心濃縮機により溶媒を除去してBoc-(Bmc-pTyr)のシアノメチルエステル体 (Boc-(Bmc-pTyr)-OCH<sub>2</sub>CN) を得た。

#### 【0030】

pdCpAのDMF溶液 (0.65 μmol) に対してBoc-(Bmc-pTyr)-OCH<sub>2</sub>CN 0.24 μmolを加え、室温で12時間反応させた。HPLCにより反応の進行を確認した後、反応液にジエチルエーテル 1 mL加えた。攪拌し、15000rpmで5分間遠心し、上清を取り除いた。沈殿にアセトニトリル 20 μLを加えて溶解させ、ジエチルエーテル 1 mLを加え、攪拌し、15000rpmで5分間遠心後、上清を取り除いた。沈殿に再びアセトニトリル 20 μLを加えて溶解させ、ジエチルエーテル 1 mLを加え、攪拌し、15000rpmで5分間遠心後、上清を取り除いた。減圧乾燥した後、氷冷しながらトリフルオロ酢酸 200 μLを加え、軽く攪拌して溶解させ、10分間氷上に置いた。トリフルオロ酢酸を減圧除去し、ジエチルエーテル 1.4 mLを加えて攪拌後、遠心し上清を取り除いた。ジエチルエーテルによる洗浄をさらに2回行なった。減圧乾燥した後、HPLCにより目的物を含むフラクションを回収し、遠心濃縮機により溶媒を除去した。一部を取って0.1M NaOHにより加水分解を行ない、遊離したpdCpAの量をHPLCにより定量し、回収したBmc-pTyr-pdCpAの濃度を決定した。2.2mMとなるようにDMSOに溶解させた。

10

#### 【0031】

Bmc-pTyr-tRNAの合成 (図5)

5 × Ligation Buffer (275mM Hepes-Na pH7.5, 75mM MgCl<sub>2</sub>, 16.5mM DTT, 5 mM ATP) 4 μL、200 μM tRNA(-CA) (配列番号1) 2.5 μL、Bmc-pTyr-pdCpAのDMSO溶液 2 μL、0.1% BSA 0.4 μL、T4 RNA Ligase (25 units/μL) 1.2 μL、水 9.9 μLを混合し、4 で2時間反応させた。3 M AcOK pH4.5を10 μL、水70 μLを加え、等量のフェノール/クロロホルム=1/1 (0.3M AcOK pH4.5で飽和させたもの)を加え攪拌し、遠心した。上層を回収し、等量のクロロホルムを加え、攪拌、遠心した。上層を回収し、エタノール300 μLを加え、軽く混合し、-20 で1時間置いた。15000rpm 30min 4 で遠心した後、上清を除き、-20 で保存してある70%エタノール200 μLを加え、15000rpm 4 で5秒遠心した。上清を除き、減圧乾燥した。1 mM 酢酸カリウムpH4.5 2 μLに溶解させた。

20

#### 【0032】

ストレプトアビジンへの導入

反応液 (10 μL) に、55 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 210 mM グルタミン酸カリウム, 6.9 mM 酢酸アンモニウム, 1.7 mM ジチオスレイトール, 1.2 mM ATP, 0.28 mM GTP, 26 mM ホスホエノールピルビン酸, 1 mM スペルミジン, 1.9 % ポリエチレングリコール-8000, 35 μg/mL 葉酸, 12 mM 酢酸マグネシウム, 0.1 mM 20種類のアミノ酸、ストレプトアビジン mRNA (N末端領域にCGGGが挿入されたもの (配列番号2)) 8 μg/μLを1 μL、大腸菌抽出液 (Promega社製) を2 μL、Bmc-pTyr-tRNA溶液を1 μL混合した。37 で1時間翻訳反応を行なった。翻訳反応液 1 μLに、水 9 μLと2 × サンプルバッファー 10 μLを加え、95 5分間加熱した。このうちの5 μLを15% SDS-PAGEに流し、終了後、抗T7tag抗体 (Novagen社製) を用いたウエスタンブロット分析を行なった (図6)。Bmc-pTyr-tRNAを加えて翻訳反応を行なった場合、ウエスタンブロット分析において野生型ストレプトアビジンと同じ位置にバンドが見られることから、Bmc-pTyrがストレプトアビジンへ導入されたことが確認された。

30

40

#### 【0033】

Bmc-pTyrを導入したストレプトアビジンにおけるBmc基の光脱離

Bmc-pTyrを導入したストレプトアビジンを含む翻訳反応液 1 μLにUVクロスリンカー (UVP社製) を用いて光照射 (365nm、3分間) した後、水 9 μLと2 × サンプルバッファー 10 μLを加え、95 5分間加熱した。このうちの5 μLを15% SDS-PAGEに流し、終了後、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロット分析を行なった (図7)。光照射を行なった場合は明確なバンドが確認された。一方、光照射を行わなかった場合はバンドが見られなかった。これは光照射により導入されたBmc-pTyrのBmc基が脱離してpTyr残基が生成したために、抗リン酸化抗体と結合できるようになったためであると言える。

50



## 【産業上の利用可能性】

【0034】

修飾化タンパク質は、細胞の成長や分化に大きく関与しており、その異常は病気の原因となる場合もある。そのために、修飾化タンパク質は基礎及び応用の両面から活発に研究されている。本発明は、そのような研究に必要な修飾化タンパク質を提供する。これにより、病気の原因の解明や、修飾化タンパク質に作用する医薬品開発を可能にする。

## 【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】光脱離性保護基を付加した修飾化アミノ酸の構造を示す図である(1)。

【図2】光脱離性保護基を付加した修飾化アミノ酸の構造を示す図である(2)。

【図3】照射による保護基(Bmc基)の脱離反応を示す図である。

【図4】Bmc-pTyr-pdCpAの合成経路を示す図である。

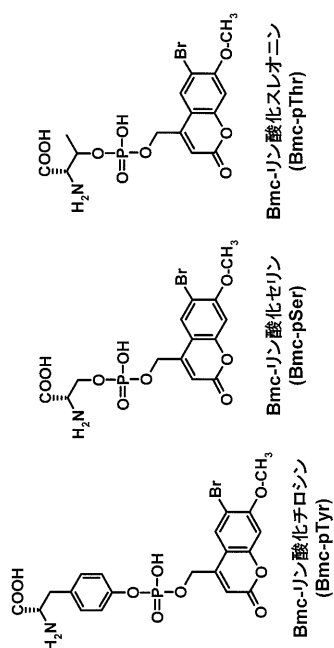
【図5】Bmc-pTyr-tRNAの合成経路を示す図である。

【図6】Bmc-pTyrを導入したストレプトアビジンの合成を示す図である。

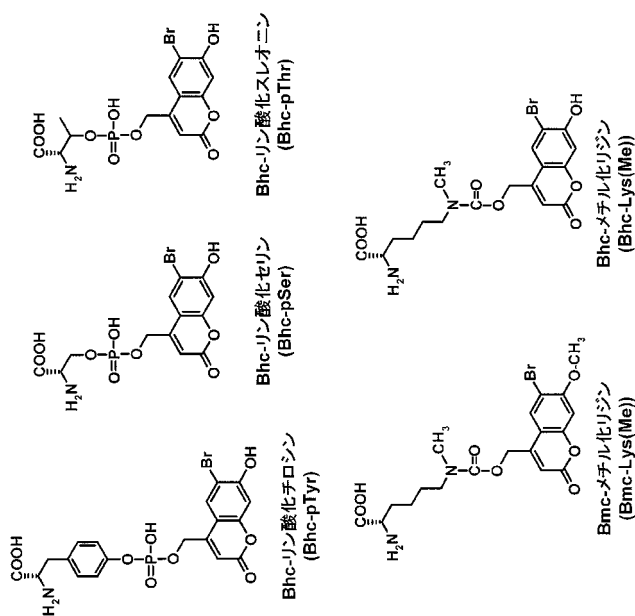
【図7】Bmc-pTyrを導入したストレプトアビジンにおけるBmc基の光脱離を示す図である。

10

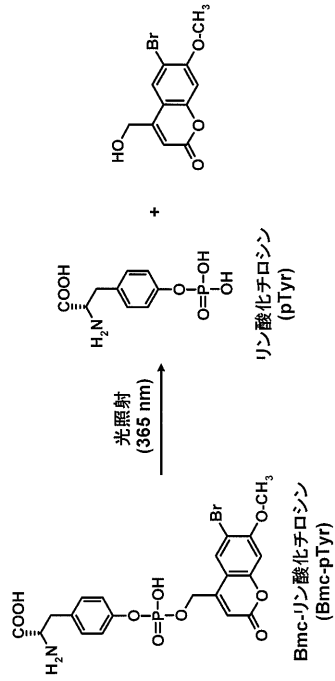
【図1】



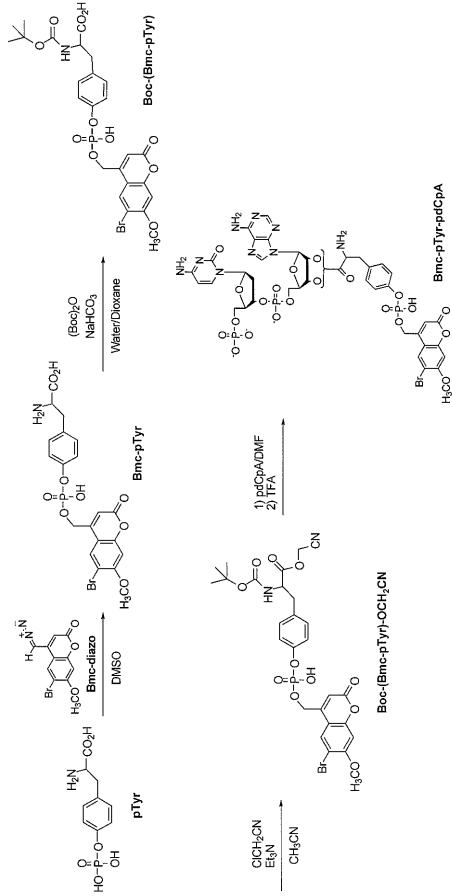
【図2】



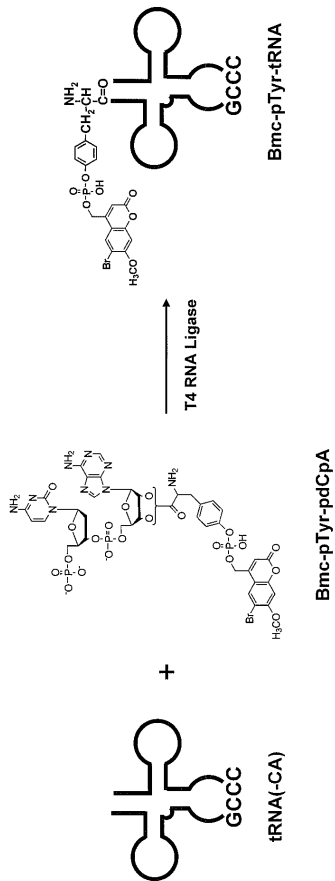
【 図 3 】



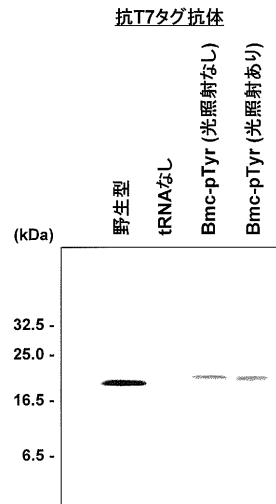
【 図 4 】



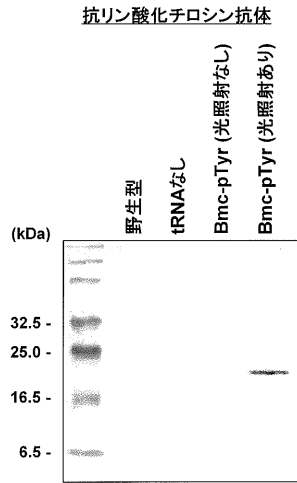
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

[2007319064000001.app](#)

---

フロントページの続き

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 芳坂 貴弘

石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人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内

(72)発明者 村中 宣仁

石川県能美市旭台2-13 独立行政法人科学技術振興機構 研究成果活用プラザ石川内

(72)発明者 白神 かおり

千葉県銚子市中央町2-11 株式会社プロテイン・エクスプレス内

(72)発明者 高木 広明

千葉県銚子市中央町2-11 株式会社プロテイン・エクスプレス内

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA11 CA12

4B064 AG01 CA50 CD12 CD20 CD21 DA20

4H045 AA10 AA20 BA10 BA51 CA11 EA60 FA74