

平成 30 年 7 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0190

研究課題名（和文）進化分子工学を用いた細胞内蛍光増幅反応系の構築（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）In-cell signal amplification system developed by evolutionally molecular engineering(Fostering Joint International Research)

研究代表者

鵜澤 尊規 (UZAWA, Takanori)

国立研究開発法人理化学研究所・創発物性科学研究センター・専任研究員

研究者番号：60554376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：生きた個々の細胞内において数コピーしか存在しない mRNA のある時点での位置と量を正確に測定するために『光をトリガーとした蛍光増幅反応系の構築』という基課題から発展し、生体内におけるタンパク質の任意の位置への蛍光色素の導入することを目指した。大腸菌の耐性遺伝子を利用したスクリーニング法およびケンブリッジ大学で修得した beads display 法を用いて、非天然アミノ酸をタンパク質に導入できるアミノアシル tRNA 合成酵素の選出系を立ち上げた。これらの系が機能することを既報の非天然アミノ酸を用いて確認したうえで、蛍光色素を導入できるアミノアシル tRNA 合成酵素の選出を行った。

研究成果の概要（英文）：As an extension from my primary subject that aimed to develop an in-cell signal amplification system using light as a trigger, I aimed to establish a system to introduce a fluorescence amino acid into a protein. First I established systems to screen aminoacyl-tRNA synthetases using E.coli and beads display that was acquired at University of Cambridge. Next, I confirmed that the system works using an unnatural amino acid that have been reported before. Then, using these systems, I obtained candidate mutants that would charge a fluorescent amino acid.

研究分野：進化分子工学

キーワード：非天然アミノ酸 アミノアシル tRNA 合成酵素

1. 研究開始当初の背景

細胞システムの根幹である遺伝子発現の制御を理解するためには、生きた個々の細胞内において数コピーしか存在しない mRNA のある時点での位置と量を正確に測定する必要がある。そこで基課題では、2013 年に J. Am. Chem. Soc. 誌に報告した蛍光増幅反応を改良した「光をトリガーとした蛍光増幅反応系の構築」のために、蛍光分子に結合する RNA を進化分子工学的に選出してから細胞内で利用することを目指した。しかし、この系では、生体内で任意の RNA に蛍光分子を取り込ませることができないことため、蛍光分子と RNA の二分子を用いなければならないという問題が残った。さらに、RNA は生体内で安定に存在できないことから、生体高分子の観察という観点において、系を改良する余地があった。

2. 研究の目的

基課題から発展させ、生体内におけるタンパク質の任意の位置に蛍光色素を導入できる系の構築を進めることを本研究の目的とした。生体における非天然アミノ酸の導入方法としては、大腸菌や古細菌のアミノアシル tRNA 合成酵素のアミノ酸認識部位の変異体を用いる方法が挙げられる。これまでに使われているアミノアシル tRNA 合成酵素は 2 種類であり、メタン生成古細菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*) のチロシル tRNA 合成酵素 (*Mj* TyrRS) と、同じくメタン生成古細菌 (*Methanosarcina mazei*) のピロリシル tRNA 合成酵素 (*Mb* PyIRS) がある。これらのアミノ酸認識部位に変異を入れることで、非天然アミノ酸を tRNA に結合させることが可能となり、大腸菌内で任意のタンパク質の中へ非天然アミノ酸を導入できる。

これまでに、遺伝子コードを改変して非天然アミノ酸を導入するという手法は、主に米

国 Scripps 研究所の Prof. Schultz と理化学研究所の横山上席研究員により進められてきた。しかしながら、タンパク質に導入できる蛍光色素は非常に少なく、かつ比較的小さな蛍光色素 (つまり励起が低波長側) に限られている。

より汎用性の高い、長波長で励起できるような比較的大きな電子系を持つ蛍光色素を導入できれば、生体内での観察に使えるようになると考えられる。そこで、蛍光色素として 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD) および 4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimide (DMN) に注目し、これらを tRNA に結合できるアミノアシル tRNA 合成酵素の変異体を探すことを目的とした。

3. 研究の方法

汎用性の高い長波長で励起できるような比較的大きな電子系を持つ蛍光色素を導入するために、アミノ酸認識ポケットの大きい PyIRS の改変を先ず目指した。蛍光色素としては、ピロリシンのピロリン環と構造が比較的似ている NBD を対象とし、NBD と Lys を結合させた NBD-Lys を tRNA に結合できる PyIRS の変異体の選出を試みた。

PyIRS の結晶構造から、ピロリシン結合部位周辺の 8 つのアミノ酸に対応する PyIRS のコドンランダム化することで、様々なアミノ酸の組み合わせの tRNA 合成酵素のライブラリープラスミドをまず作成する。次に、このプラスミドを大腸菌にトランスフォームする際に、クロラムフェニコール耐性遺伝子に TAG 変異を入れた遺伝子も同時に導入する。これにより、NBD-Lys を tRNA に結合させることが可能な PyIRS 変異体をもつ大腸菌内では、TAG コドンに NBD-Lys が入りクロラムフェニコール耐性遺伝子が大腸菌内で作られるためクロラムフェニコール存在下でも生き残る一方で、TAG コドンに NBD-Lys が入れるこ

とのできない tRNA 合成酵素の変異体をもつ大腸菌は死滅することが期待される。

非天然アミノ酸によっては、大腸菌の膜を透過できず、アミノアシル tRNA 合成酵素の変異体が得られないことも考えられることから、別法として磁気ビーズと FACS を用いた手法も用いる。この方法では、エマルジョン PCR によりライブラリープラスミドを磁気ビーズ上で増幅・固定し、さらにエマルジョン中で蛍光タンパク質を転写および翻訳し、磁気ビーズ上に固定化された蛍光タンパク質を利用して、FACS で選別するというものである。蛍光タンパク質中に非天然アミノ酸が導入された時のみ、蛍光を発するようにすることで、活性のあるアミノアシル tRNA 合成酵素の変異体が選別できる。

以上の2つの方法を用いて、NBD や DMN をタンパク質中に導入できるアミノアシル tRNA 合成酵素の選出を試みた。

4. 研究成果

まず、NBD-Lys をチャージできる PyIRS 変異体の選出を試みた。大腸菌を用いた系で、候補配列が複数得られたものの、これらの PyIRS 変異体は不溶性であり単離することは難しかった。また、これらの変異体は大腸菌内で NBD-Lys を tRNA にチャージしタンパク質に導入できるという確証が得られなかった。

非天然アミノ酸の導入効率は、一般に PyIRS の変異体よりも *Mj* TyrRS の変異体の方が高いと言われていることから、次に *Mj* TyrRS の変異体について調べた。まず、大腸菌を用いた系が正しく機能しているかどうかを検討するために、既報のあるアジドフェニルアラニン (AzPhe) をチャージできる *Mj* TyrRS の変異体の選出を試みた。その結果、既報の *Mj* TyrRS の変異体では、AzPhe が導入されるべきところにグルタミンが導入される確率が少なからずあったが、今回選出され

た *Mj* TyrRS の変異体は AzPhe に対する特異性が高く、グルタミンは導入されなかった。特異性が高い *Mj* TyrRS の変異体が取得できたことから、現在この結果を投稿準備中である。

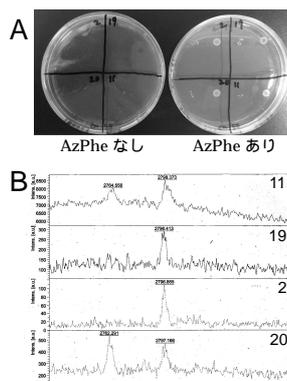


図1 (A) *Mj* TyrRS の変異体 (2,19,20,11) を発現する4種類の大腸菌は、AzPheを含む寒天培地上で生育できることから、これらの変異体がAzPheをCm耐性遺伝子に導入していることが示唆された。(B)19と2では、AzPheを含むペプチド由来するピークのみが観測された。一方で、既報の20では、これ以外にQ由来するピークも観測された。

大腸菌を用いた変異体選出系に問題がないことが確認できたことから、次にDMNをAlaに修飾したDMN-Alaをチャージできる *Mj* TyrRS の変異体の探索を行った。候補となる配列は得られたものの、いずれもDMN-Alaをチャージしていることを、DMN-Ala有り無しで寒天培地を使った実験からは確認できなかった。そこで、このスクリーニングで得られた *Mj* TyrRS の変異体集団を、さらに磁気ビーズと FACS を使った方法を用いてスクリーニングすることにした。その結果、無細胞翻訳系で合成される蛍光タンパク質の分布がDMN-Alaありなしで差がみられることが分かった。

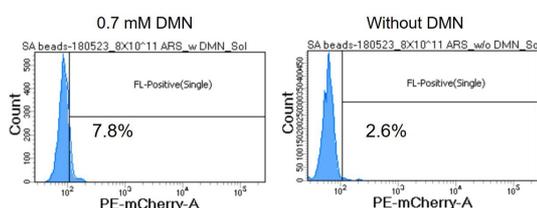


図2 磁気ビーズと FACS を用いたスクリーニング系では、DMNの有り無しでビーズに固定化される蛍光タンパク質の分布に差が見られた。

このことから、これら蛍光強度が高い磁気ビーズを FACS で回収し、提示されている *Mj* TyrRS の配列を調べることで、DMN-Ala をタンパク質に導入できるアミノアシル tRNA 合成酵素が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鵜澤 尊規 (Takanori UZAWA)
国立研究開発法人 理化学研究所・創発物
性科学研究センター・専任研究員
研究者番号：60554376

(2)研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]
Prof. Florian Hollfelder
Department of Biochemistry
University of Cambridge (UK)

[その他の研究協力者]