

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20350075

研究課題名（和文）人工遺伝暗号表を利用するタンパク質の機能デザイン

研究課題名（英文）Designing novel functions of proteins by using an artificial genetic code dictionary

## 研究代表者

横川 隆志 (YOKOGAWA TAKASHI)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：90242304

研究成果の概要（和文）：タンパク質合成系に内在する tRNA の数を制限すると、遺伝暗号表の中に『空きコドン』が生じる。『空きコドン』を解読する非天然アミノアシル tRNA を作製すると、人工的な遺伝暗号表が作成できる。今回、大腸菌から 21 種類の tRNA を固相化プローブ法で精製し、最小 tRNA セットを作成した。また最小 tRNA セットとコドンを最小化した化学合成 Yellow fluorescent Protein 遺伝子を用いて、実際にタンパク質を合成することができた。このことは、非天然アミノ酸が複数種類導入されたタンパク質を効率的に調製できる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：Restriction of the number of endogenous tRNAs in protein synthesis system causes “empty codons” in the genetic code dictionary. If we can create a tRNA that reads “an empty codon” and accepts an unnatural amino acid, it means that we develop an artificial genetic code dictionary. Here, I purified 21 tRNAs from *Escherichia coli*, and made a minimal tRNA set by remixing an individual tRNA. Actually, yellow fluorescent protein could be synthesized in PURE system with a minimal tRNA set and a chemically synthesized gene having minimal codons. It indicates that proteins having several unnatural amino acids can be effectively synthesized in the future.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：バイオテクノロジー

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：タンパク質合成系、PURE システム、tRNA、固相化プローブ法、遺伝暗号表、非天然アミノ酸、Click chemistry

## 1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質生産の新たな手法として *in vitro* タンパク質合成系が利用されている。ほとんどの *in vitro* タンパク質合成系が、細胞を破碎した抽出液をそのまま用いるのに対し、筆者を含むグループは人工的な PURE

システムの構築に成功した【Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa and T. Ueda [Cell-free protein synthesis reconstituted with purified components] *Nat. biotechnol.* **19**, 746-750 (2001)】。PURE システムとは、タ

ンパク質合成系に必要なタンパク質性因子をすべて精製し、試験管内で再構築したものである。

PURE システムには、

(i) 核酸やタンパク質の分解酵素を含まないために再現性の高いタンパク質合成が行えること

(ii) 系内の各々のタンパク質にはヒスチジンタグが融合されているために、発現産物以外のタンパク質を Ni-アフィニティクロマトグラフィーで容易に除くことができること

(iii) 系内のタンパク質成分や濃度がわかっているために、発現させたいタンパク質にあわせて系を改変することが比較的容易であること、  
など多くの長所が存在する。

しかし現在の PURE システムには tRNA が未分画であるという課題が残されている。遺伝暗号表は tRNA が規定しているため、未分画の tRNA を用いている限り *in vitro* タンパク質合成系は遺伝暗号表に束縛される。ところが、すべての tRNA を個々に入手することができると、タンパク質合成系内の tRNA の構成を自由に操作することができるために遺伝暗号表を人為的に改変することが可能となる。例えばロイシンは6個もコドンを用いているが、いくつかのアイソアクセプター tRNA を除去すると、複数のコドンを『空きコドン』（どのアミノ酸にも対応しないコドン）にすることができる。『空きコドン』を非天然アミノ酸に割り当てれば『人工遺伝暗号表』が作成できる。この『人工遺伝暗号表』を用いれば、複数の非天然アミノ酸を含むタンパク質を効率よく生産できるはずである。

また筆者を含むグループは、チロシンアナログ1つに限れば、ストップコドンの1つであるアンバーコドン (UAG) を利用してタンパク質の指定した部位にアジドチロシンを導入し、そのアジド基を標的に、蛍光発色団やポリエチレングルコールなどで翻訳後修飾する方法を確立している【S. Ohno, M. Matsui, T. Yokogawa, M. Nakamura, T. Hosoya, T. Hiramatsu, M. Suzuki, N. Hayashi and K. Nishikawa [Site-selective post-translational modification of proteins using an unnatural amino acid, 3-azidotyrosine] *J. Biochem.* **141**, 335-343 (2007)】。

したがって『人工遺伝暗号表』を用いて、複数の非天然アミノ酸をタンパク質内に上手に配置し、さらに翻訳後修飾することも可能となれば、どのタンパク質の、どの部位に、どんな機能を付加するか、あらかじめ設計してタンパク質を生産することができる。このことを筆者は『タンパク質の機能をデザインできる』と言うことにしたい。

## 2. 研究の目的

本研究での目的は【1. 研究開始当初の背景】を踏まえ、本研究の目的を3点にまとめる。

(1) 大腸菌のすべての tRNA を単離精製することで人為的に遺伝暗号表を改変できる環境を整える。

(2) 大腸菌の『人工遺伝暗号表』を作成することで、複数の非天然アミノ酸を組み込んだタンパク質を効率的に合成する。

(3) 組み込んだ非天然アミノ酸経路で機能を付加することで『タンパク質の機能デザイン』を可能とする。

上記の目的を果たすためには、以下の5項目を満たす必要がある。

① 大腸菌のすべての tRNA を効率的に単離精製する方法論を確立すること

② 精製された tRNA を効果的に配合し、あるアイソアクセプター tRNA を加えなければタンパク質合成が起こらないような tRNA に依存したタンパク質合成系を構築すること

③ 大腸菌のどのアミノアシル tRNA 合成酵素にも認識されず、かつ非天然アミノ酸を運搬できる tRNA を複数のコドン用、複数のアミノ酸用に創製すること

④ 非天然アミノ酸を活性化することができるアミノアシル tRNA 合成酵素を複数創製すること

⑤ 組み込まれた非天然アミノ酸ごとに選択的な修飾反応を確立すること。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸菌からの効率的な tRNA を単離精製法の確立と最小 tRNA セットの作成

大腸菌内には 48 種類もの tRNA 分子が存在している。個々の tRNA の化学的性質は似通っているため、従来から行われているカラムクロマトグラフィーによる方法では、単一の tRNA を単離精製することは困難であった。筆者を含むグループは、哺乳類細胞に微量に含まれるミトコンドリアの tRNA を効率的な精製法として『固相化プローブ法』を開発した【K. Wakita, Y. Watanabe, T. Yokogawa, Y. Kumazawa, S. Nakamura, T. Ueda, K. Watanabe and K. Nishikawa [Higher-order structure of bovine mitochondrial tRNA<sup>Phe</sup> lacking the 'conserved' GG and T psi CG sequences as inferred by enzymatic and chemical probing] *Nucleic Acids Res.* **22**, 347-353 (1994)】。固相化プローブ法は、標的の tRNA に相補的なビオチン化オリゴ DNA プローブを化学合成し、アビジン樹脂と結合させた DNA 固定化樹脂 (固相化プローブ) を作製し、未分画の tRNA と hybridization させることによって標的の tRNA とその他の

tRNA とを分離し、樹脂を洗浄した後、熱を加えることによって樹脂から標的の tRNA を回収する方法である。この方法は熱的に不安定なミトコンドリアの tRNA を熱安定性の高い細胞質の tRNA から分離するには、非常に有用な方法であったが、細胞質の tRNA を単離しようとするとその熱安定性のために固相化プローブとの hybridization 効率が低く、結果として、標的の tRNA の回収率が低いという問題点があった。そこで、tRNA だけを熱的に不安定にし、DNA-tRNA ハイブリッドの熱安定性には影響を与えない添加剤を検討したところ、『かさ高い』一価のカチオンである、テトラメチルアンモニウムイオン (TMA<sup>+</sup>) または、テトラエチルアンモニウムイオン (TEA<sup>+</sup>) を高濃度 (0.9 M) で加えることが非常に有効であることがわかった。しかし大腸菌から個々の tRNA を単離しようすると、未分画 tRNA 内のそれぞれの tRNA の存在量はまちまちで、存在量の少ない tRNA ほど純度や回収率が低くなる傾向が見られた。そこで、個々の tRNA について大腸菌内で構成的に tRNA を発現するように、proL プロモーター下に、tRNA 遺伝子を配置した tRNA の発現ベクターを計 41 種類 (すべての tRNA は 48 種類だが、アンチコドンが共通しているものを除くと 40 種類となる) 作製して、RNA 分解酵素欠損株である大腸菌 Q13 株に導入し、培養した菌体から未分画 tRNA を得たところ、一種類の tRNA が過剰発現している様子が観察されたので、その tRNA を固相化プローブ法により単離することにした。代表的な例として tRNA<sup>Ser</sup>(GGA) [SerW] を単離した結果を図 1 に示す。これをメチオニン以外のアミノ酸に対しては、一種類のアイソアクセプター tRNA を単離し、またメチオニン tRNA については、開始用と伸長用の tRNA が存在するので二種類、計 21 種類の tRNA を単離することができた (図 2)。この 21 種類の tRNA を最小 tRNA セットと呼ぶことにする。



図 1 固相化プローブ法による SerW の精製

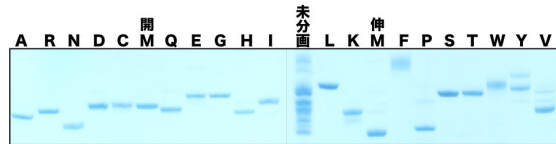


図 2 最小 tRNA セットの作成

(2) 最小 tRNA セットで翻訳できる Yellow Fluorescent Protein (YFP) 遺伝子の作製と PURE システムによるタンパク質合成

最小 tRNA セットで解読できるコドンだけで構成された遺伝子として YFP の遺伝子を人工合成して T7 プロモーター下に配置した発現ベクターを作製した。この遺伝子の中にはコドン 3 文字目が A のコドン (NNA) はストップコドン (TAA) を除いて、全く使われていない。また 4 コドン、6 コドンのアミノ酸については、NNT または NNC を用いて構成されている。

次に、人工合成した YFP 遺伝子から PURE システムを用いて、タンパク質合成を行った。この際、tRNA として未分画 tRNA を加えたものと、最小 tRNA セットを加えたものでタンパク質の合成に差が見られるか調べた。また、すべてのコドンを含む GFPuv 遺伝子をコントロールにした。

(3) ピロリシル tRNA 合成酵素 (PylRS) のアミノ酸特異性の解析

筆者は既に *Methanosarcina acetivorans* (Mac) PylRS と tRNA<sup>Pyl</sup> の発現ベクターを構築済みなので PylRS と tRNA<sup>Pyl</sup> を大腸菌に過剰発現させ、PylRS はカラムクロマトグラフィーで、tRNA<sup>Pyl</sup> は固相化プローブ法で精製した。PylRS の活性を調べるためには、基質であるピロリシン (Pyl: 図 3) が必要であるが、Pyl は不斉炭素を複数含むアミノ酸であるため化学合成が困難である。そこで市販のリシンアナログである

*N*-ε-Carbobenzoxy-L-lysine (Z-Lys: 図 3)

と *N*-ε-Allyloxycarbonyl-L-lysine

(Alloc-Lys: 図 3) を使い、酸性条件のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いて、そのリシンアナログが PylRS の基質となるか調べた。酸性条件では、tRNA に結合したアミノ酸は、加水分解することなく泳動されるので、分子量が大きくなるとともにアミノ酸の α アミノ基がプロトン化して + 電荷を帯びるために、アミノアシル tRNA はアミノ酸が結合していない tRNA (デアシル tRNA) に比べて移動度が遅くなる。泳動条件を検討したところ、泳動用の緩衝液としてグルタミン酸溶液 (Tris 塩基で pH 5.1 に調整したもの) を用いるとアミノアシル tRNA とデアシル tRNA がよく分離されることを見いだした。

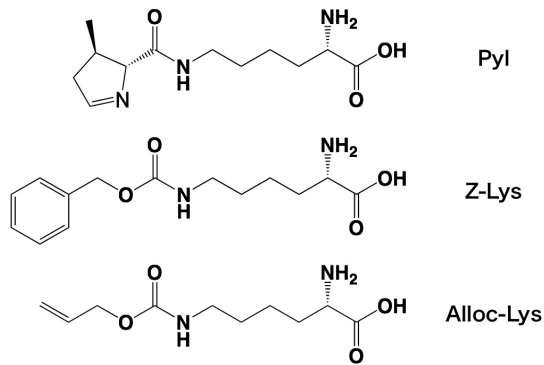


図3 ピロリシンと実験に用いた  
リシンアナログ

(4)『空きコドン NNA』を解読できる tRNA の創製に向けた古細菌、およびピフィズス菌の AUA コドン特異的 tRNA<sup>Ile</sup> のアンチコドン1文字目の解析

今回作製した最小 tRNA セットを用いたタンパク質合成が可能となると NNA コドンはほとんどが空きコドンとなる。NNA コドンを非天然アミノ酸用のコドンとして用いることができれば理想的だが、Crick の wobble rule のために tRNA が、コドン3文字目の A と G を読みわけることは難しいとされている。ただし遺伝暗号表では AUA コドンという例外が存在し、生物は AUA コドン (Ile) と AUG コドン (Met) を読みわけている。例えば、ほとんどすべてのバクテリアは一見 tRNA<sup>Met</sup> のように見えるアンチコドンが CAT (AUG コドンに対応する) の tRNA<sup>Ile</sup> 遺伝子が存在し、アンチコドン1文字目が転写後修飾されるまでは Met を受容し、リジン合成酵素 (TilS) によってアンチコドン1文字目の C がリジン (C の2位のケト基がリジンに置き換えられている修飾塩基 k<sup>2</sup>C と表記される) に修飾されると Ile を受容するようになり、かつ AUA コドンを認識するように変換される。このメカニズムにより AUA コドンと AUG コドンの読みわけを確実なものにしている。しかしバクテリアの中には、ごくまれに TilS 遺伝子を持たない種が存在する。ピフィズス菌 *Bifidobacterium adolescentis* (*Bad*) がその一例である。そこで、*Bad* より 固相化プローブ法を用いて AUA コドン特異的 tRNA<sup>Ile</sup> を単離し、アンチコドン1文字目の修飾を調べた。

また、ゲノム情報から、いずれの古細菌にも TilS 遺伝子が存在せず、古細菌がどのように AUA コドンと AUG コドンを読みわけているかが不明であったので、筆者を含むグループは、古細菌より、固相化プローブ法を用いて AUA コドン特異的 tRNA<sup>Ile</sup> を単離し、アンチコドン1文字目の修飾を同定した。ここで調べたヌクレオチドを他の tRNA

のアンチコドン1文字目に導入できれば、空きコドンを上手に利用することが可能となる。

#### 4. 研究成果

(1) tRNA の熱安定性に与えるテトラアルキルアンモニウム塩の効果

固相化プローブ法において、固相化プローブと tRNA の hybridization 際に、Na<sup>+</sup> のかわりに、TMA<sup>+</sup> や TEA<sup>+</sup> を添加すると、hybridization 効率が大幅に上昇することを見いだした。大腸菌の開始 tRNA<sup>Met</sup> の熱融解曲線を調べると、共存する塩が Na<sup>+</sup> の時に比べ、TMA<sup>+</sup> の場合に約 10°C、TEA<sup>+</sup> の場合に約 30°C、熱融解温度が下がっていた。これは、鎖中のリン酸に配位している一価のカチオンの影響で、tRNA の構造が不安定化したためであると考えられる。特に tRNA の高次構造を形成している部分ではリン酸が込み入っているために、適切な高次構造を破壊して不安定化していると考えられた。一方、DNA-RNA hybrid では規則的にリン酸が並んでいるために、不安定化されにくいと考えられる。TMA<sup>+</sup> よりも TEA<sup>+</sup> を用いた場合に、tRNA がより不安定化されたのは、TEA<sup>+</sup> の『かさ高さ』のために二重らせん構造も不安定化されるためであると考えられる。固相化プローブ法を用いて標的の tRNA を回収した場合、回収率は、TEA<sup>+</sup> [hybridization 温度 (HT):35°C] の場合で Na<sup>+</sup> [HT:65°C] の約3倍、TMA<sup>+</sup> [HT:65°C] の場合で Na<sup>+</sup> [HT:65°C] の約2倍であった。得られた tRNA の純度は、いずれも高いものの、微量な不純物の混入量が TEA<sup>+</sup>、TMA<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> の順で多くなっていた。これは tRNA を不安定化させたために、hybridization の特異性が若干悪くなったためであると考えられる。そこで標的 tRNA の存在量が多い場合には TEA<sup>+</sup> [HT:35°C] を、存在量が少ない場合は、TMA<sup>+</sup> [HT:65°C] を用いるプロトコルを提案する。今回、大腸菌の tRNA を得るために、個々の tRNA を過剰発現していることから、TEA<sup>+</sup> [HT:35°C] を用いるプロトコルを採用し、効率的に個々の tRNA を得る手法を確立した【項目①\_確立】。

(2) 最小 tRNA セットを用いたタンパク質合成系の構築

PURE システム (大阪大学・大学院工学研究科・松浦准教授より恵与された) に添加されている未分画 tRNA のかわりに最小 tRNA セットを用いてコントロールの GFPuv 遺伝子と最小 tRNA セットで翻訳できる合成 YFP 遺伝子からタンパク質を合成した。その結果、GFPuv は未分画 tRNA を用いた場合にしか合成できないが、YFP は最小 tRNA セットを用いて合成すること

ができた (図4)。この結果、遺伝暗号表には多くの『空きコドン』が生じていると考えられる。残念ながら、最小 tRNA セットを用いた場合のタンパク質の合成効率が、悪いのは、得られた tRNA の中に活性が不十分のものが混入したためであると考えられる。現在、その原因を調査中であるが、人工遺伝暗号表の可能性は示せたと考えられる【項目②\_\_ほぼ確立】。

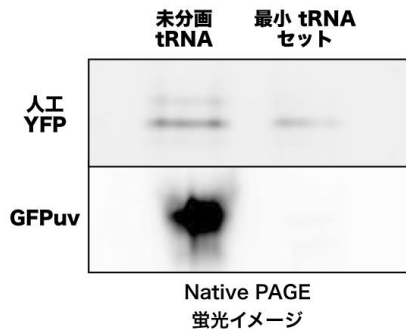


図4 最小 tRNA セットを用いたタンパク質合成

### (3) PylRS のアミノ酸特異性

酸性 PAGE により、PylRS の触媒回転数は著しく低いものの Alloc-Lys が PylRS の基質となることが示された (図5)。すなわち PylRS はアミノ酸をそれほど厳密に識別していないことが示された。また、tRNA<sup>Pyl</sup> は大腸菌内で、どのアミノアシル tRNA 合成酵素にも認識されないこと、PylRS は tRNA<sup>Pyl</sup> のアンチコドンを確認しないことが示されているので、複数のコドンに対応させることが可能である【項目④\_\_ほぼ確立】。さらに Alloc-Lys と非常に構造が類似している N-ε-Propargyloxycarbonyl-L-lysine を基質として用いれば、エチニル基をタンパク質に導入できそうである。エチニル基は Click chemistry に用いられる有用な官能基であるので、翻訳後に化学修飾も行える【項目⑤\_\_可能性を示す】。PylRS の触媒回転数が低い問題は *in vitro* タンパク質合成系の利点を生かして、多量の PylRS を添加することで克服可能である。

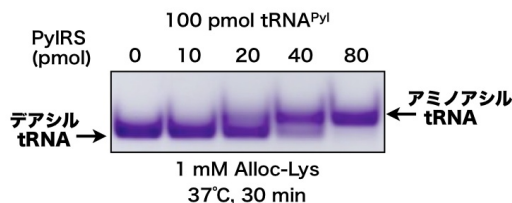


図5 PylRS のアミノアシル化反応

### (4) 古細菌や *Bad* における AUA 特異的 tRNA<sup>Ile</sup> のアンチコドン1文字目の解析

古細菌の AUA 特異的 tRNA<sup>Ile</sup> のアンチコドン1文字目には、C の2位のケト基がア

グマチンに置き換えられている修飾塩基 (アグマチジン: agm<sup>2</sup>C と表記) が見いだされた。またその修飾酵素であるアグマチジン合成酵素 (TiaS) が同定された。agm<sup>2</sup>C のコドン認識メカニズムは k<sup>2</sup>C のメカニズムと酷似しているが、TiaS は TilS と大きく異なっている。したがって古細菌は、進化の過程で全く独立に、同じ認識メカニズムを見いだしたと考えられる。一方、*Bad* の AUA 特異的 tRNA<sup>Ile</sup> のアンチコドン1文字目は、これまでの分析の途中経過では、意外なことに未修飾の U である可能性が高い。これは Crick の wobble rule に反しているため、さらに詳細な解析を必要としている。今後、AUG コドンの認識をどのように排除しているかが明らかになれば、『空きコドン (NNA)』を特異的に解読できる tRNA の創製に大きく役立つものと期待される【項目③\_\_可能性を示す】。

### 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6件) 以下、主要なもの

① Iraha, F., Oki, K., Kobayashi, T., Ohno, S., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Yokoyama, S., Sakamoto, K., [Functional replacement of the endogenous tyrosyl-tRNA synthetase-tRNA<sup>Tyr</sup> pair by the archaeal tyrosine pair in *Escherichia coli* for genetic code expansion.], *Nucleic Acids Res.*, 査読有, Vol.38, No.11, 2010, 3682-3691

② Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T., Suzuki, T., [Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea.], *Nat. Chem. Biol.*, 査読有, Vol.6, No.4, 2010, 277-282

③ Yokogawa, T., Kitamura, Y., Nakamura, D., Ohno, S., Nishikawa, K., [Optimization of the hybridization-based method for purification of thermostable tRNAs in the presence of tetraalkylammonium salts.], *Nucleic Acids Res.*, 査読有, Vol.38, No.6, 2010, e89

[学会発表] (計13件) 以下、主要なもの

① 横川 隆志, *Methanosarcina acetivorans* における AUA コドン解読機構、23回 Archaea 研究会、2010年7月9日、名古屋

② 横川 隆志, Preparation of an ochre suppressor tRNA recognizing exclusively

UAA codon by using the molecular surgery technique.、核酸化学シンポジウム、2009年9月28日、高山

③ 横川 隆志、*Methanosarcina acetivorans* PylRS を利用した部位特異的リシンアナログ導入タンパク質の合成、22回 Archaea 研究会、2009年7月11日、札幌

④ 横川 隆志、*Methanosarcina acetivorans* ピロリシルtRNA合成酵素を利用したタンパク質の部位特異的修飾の試み、第10回 RNA ミーティング、2008年7月23日、札幌

[図書] (計1件)

① Yokogawa, T., Ohno, S., Nishikawa, K., [Incorporation of 3-Azidotyrosine into Proteins Through Engineering Yeast Tyrosyl-tRNA Synthetase and Its Application to Site-Selective Protein Modification.], Humana Press, *Methods Mol. Biol.* (Cell-Free Protein Production), Vol.607, 2010, 227-242

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 特に記載すべき事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横川 隆志 (YOKOGAWA TAKASHI)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：90242304

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

大野 敏 (OHNO SATOSHI)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：10345796