

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05624

研究課題名（和文）カイコの遺伝暗号拡張による新奇構造タンパク質生産基盤の構築

研究課題名（英文）Production of novel structural proteins based on the genetic code expansion of silkworms

研究代表者

寺本 英敏 (Teramoto, Hidetoshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長補佐

研究者番号：60391562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：カイコ（*B. mori*）のフィブロインは強度と生体適合性に優れ、手術用縫合糸などの医療材料として利用されている。我々は、古細菌由来ピロリシルtRNA合成酵素（PyIRS）/tRNAPylペアを用いる汎用的な遺伝暗号拡張手法のカイコへの適用を試みた。M. mazei PyIRSとtRNAPylをそれぞれ発現する2種類の遺伝子組換えカイコを作出し、それらを交配した交雑種を得た。交雑種の5齢幼虫に人工アミノ酸（リジン誘導体）を経口投与したところ、人工アミノ酸が導入されたフィブロインが生産された。この結果は、PyIRS/tRNAPylペアを用いる遺伝暗号拡張がカイコにも適用可能であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコのような多細胞動物における遺伝暗号拡張の報告例は限定的であり、産業応用を目指した研究は研究代表者らの先行研究のみしか見当たらない。産業動物であると同時にモデル生物でもあるカイコで遺伝暗号拡張に成功した本成果は独自性が高く、基礎研究の成果が産業応用に直結するという点で社会的インパクトが大きい。本研究の成果は、シルクに留まらず、人工アミノ酸を組み込んだ多様な構造タンパク質の創製に容易に水平展開できる。ひいては、人々の健康増進や循環型社会の構築に貢献する材料の創製を通して、Society5.0やSDGsの目標達成に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：Silk fibroin produced by the domesticated silkworm (*B. mori*) has excellent strength and biocompatibility and is used as a medical material such as surgical sutures. We attempted to apply the versatile genetic code expansion method using the archaeal pyrrolysyl-tRNA synthetase (PyIRS)/tRNAPyl pair to the silkworm. Two types of transgenic silkworm lines respectively expressing *M. mazei* PyIRS and tRNAPyl were generated and crossed with each other to produce a hybrid line. When synthetic amino acids (lysine derivatives) were orally administered to fifth instar larvae of the hybrids, silk fibroin incorporated with the synthetic amino acids was produced. These results indicate that genetic code expansion using the PyIRS/tRNAPyl pair is applicable to silkworms.

研究分野：生体高分子化学、応用昆虫学

キーワード：遺伝暗号拡張 カイコ 構造タンパク質 ピロリシル-tRNA合成酵素 人工アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

シルクやコラーゲン、エラスチンに代表される構造タンパク質は、生体安全性、生分解性、高強度、高弾性、軽量性、等の特徴から、機能性繊維や医用材料としての活用が注目されている。例えば米国では、シルク繊維を基盤とする医療材料 (SERI® Surgical Scaffold) が FDA の認可を受け臨床応用されている (その後 2021 年に販売中止)。また近年、人体に接触するウェアラブル機器や生体埋込型電子デバイス開発に構造タンパク質を利用する研究報告が増えている。

構造タンパク質の生産ホストとしては、バクテリアや酵母が多く用いられている。しかしこれら微生物は、高分子量かつ類似のアミノ酸配列が高度に反復する構造タンパク質を大量に合成することに必ずしも適しているわけではない。一方で、高分子量で高度な反復配列をもつシルクタンパク質の大量合成に特化した絹糸腺 (けんしせん) という器官をもつカイコ (*B. mori*) は、長年にわたってシルク生産に利用されてきた産業動物であり、かつ、全ゲノム情報や遺伝子組換え技術が整っているモデル生物としての側面をあわせもっており、構造タンパク質生産ホストとして微生物とは異なる魅力がある。

塩基配列 (コドン) とアミノ酸との対応関係を規定する遺伝暗号の正確性は、アミノアシル-tRNA 合成酵素 (ARS) が特定のアミノ酸と tRNA とを正しく結合させる能力によって担保されている。近年、天然アミノ酸とは異なる構造をもつ人工アミノ酸を認識するよう改変した ARS と、特定のコドン (多くの場合終止コドン) に対応する tRNA とを同時に発現させることで、人工アミノ酸をタンパク質中の特定の位置に導入できるようになった。このような手法は「遺伝暗号拡張 (genetic code expansion)」と呼ばれている。中でも、古細菌由来のピロリシル-tRNA 合成酵素 (PylRS) とその基質 tRNA^{Pyl} のペアを用いる遺伝暗号拡張は、100 種類以上もの多様な人工アミノ酸の導入実績がある汎用性の高い手法である [文献 3]。

タンパク質の機能や物性は、その一次構造 (アミノ酸配列) に大きく依存する。ところが、タンパク質の生合成に利用されるアミノ酸は 20 種類に限られており、その制限の下で得られるタンパク質が常に満足できる機能や物性を発現できるとは限らない。上述した遺伝暗号拡張は、20 種類というアミノ酸の制限を取り払い、多様な性質をもつ人工アミノ酸をタンパク質中に組み込むことのできる画期的な手法である。

現在、遺伝暗号拡張はタンパク質の機能解析や創薬研究に主に用いられている。今後は、機能性繊維や医用材料としての利用研究が進む構造タンパク質への応用に発展すると予想される。そこで本研究では、「遺伝暗号拡張は画期的な構造タンパク質の創製を可能にするか?」という問いに対してカイコを実験材料として取り組む。カイコの絹糸腺は数日間で一匹あたり数百 mg ものシルクタンパク質を合成する並外れた能力をもち、多様な構造タンパク質を大量生産するバイオリクターとしての役割が期待されている。したがって、カイコは上記の問いに答えるための理想的な生物と言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「PylRS/tRNA^{Pyl} ペアを用いる遺伝暗号拡張をカイコで成功させ、新奇な機能をもつ構造タンパク質をカイコで生産する技術基盤を構築すること」である。カイコのような多細胞動物における遺伝暗号拡張の報告例は限定的であり、産業応用を目指した研究は研究代表者らの先行研究のみしか見当たらない。産業動物であると同時にモデル生物でもあるカイコで遺伝暗号拡張に挑戦する本研究は独自性が高く、基礎研究の成果が産業応用に直結するという点で社会的インパクトが大きい。本研究の成果は、シルクに留まらず、人工アミノ酸を組み込んだ多様な構造タンパク質の創製に容易に水平展開できる。ひいては、人々の健康増進や循環型社会の構築に貢献する材料の創製を通して、Society5.0 や SDGs の目標達成に寄与する。

3. 研究の方法

メタン生成古細菌 (*Methanosarcina mazei*) 由来の PylRS では多様な人工アミノ酸を認識する様々な変異体が知られている。特に Y306A/Y384F 変異体は、リジン (Lys) の誘導体を中心とする多種類の人工アミノ酸を同時に認識することが知られている。そこで、シルクタンパク質 (フィブロイン) プロモータの作用により PylRS (Y306A/Y384F) 変異体を絹糸腺で組織特異的に発現する遺伝子組換え (TG) カイコを作出する。また、U6 プロモータの作用により tRNA^{Pyl} を全身で発現する TG カイコを別途作出した。これら 2 種類の TG カイコを交配することで、PylRS 変異体/tRNA^{Pyl} ペアを絹糸腺で発現する TG カイコ交雑種を作出した。作出した交雑種に 2 種類の人工アミノ酸 (Lys 誘導体) *N*^ε-carbobenzyloxy-lysine (Z-Lys) および trans-cyclooctene-lysine (TCO-Lys) を投与し、それらのシルクタンパク質 (フィブロイン) への導入有無を質量分析および蛍光ラベル化法により解析した。

4. 研究成果

本研究の概要を図 1 に示す。PylRS 変異体と tRNA^{Pyl} をそれぞれ発現する 2 種類の TG カイコを作出し、それぞれ H16 および H20 と名付けた。これらを交配し、H16 × H20 の F₁ 交雑種を作

出した。本交雑種の 5 齢幼虫に 2 種類の Lys 誘導体 (Z-Lys、TCO-Lys) をそれぞれ投与し、繭層を回収した。フィブロイン中への Lys 誘導体の取り込み有無は、質量分析およびクリックケミストリーによる蛍光ラベル化法によって解析した。

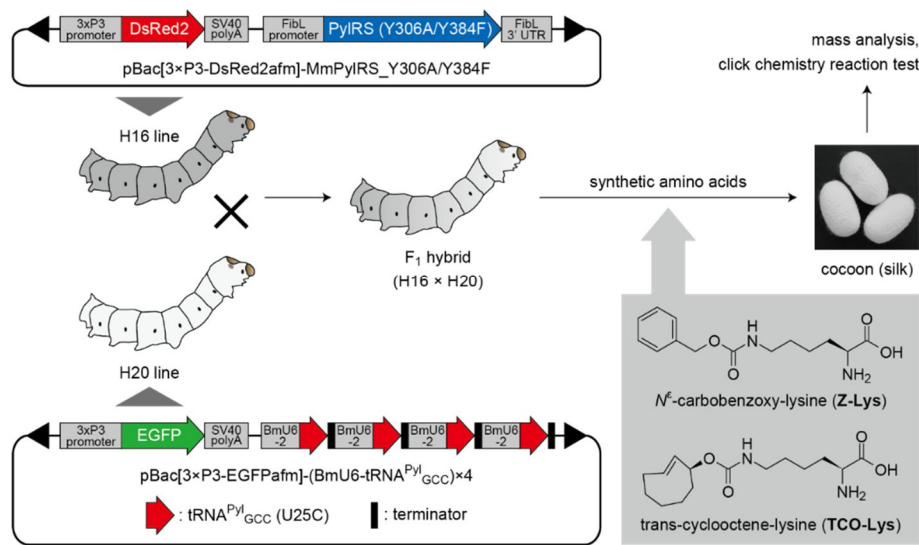


図 1 . 本研究の概要

これまでに報告されている様々な PylRS 変異体の中で、*M. mazei* PylRS の Y306A/Y384F 変異体 (AF 変異体) を本研究で選択したのは、この変異体がクリックケミストリーに適合する TCO-Lys (図 1) を含む幅広い基質認識能を示すからである。フィブロイン L 鎖 (FibL) プロモータによる発現制御下にある PylRS 変異遺伝子を含む *piggyBac* トランスポゾンプラスミドを用いて、絹フィブロインの合成器官である後絹糸腺で PylRS 変異体 (Y306A/Y384F) を発現する TG カイコを作成し、H16 系統と命名した (図 1)。カイコの U6 プロモータ、アンチコドンがグリシン (Gly) に対応する GCC に変更した U25C 変異を持つ tRNA^{Pyl} 遺伝子およびターミネーターからなる 4 つの連続した発現カセットを含む *piggyBac* プラスミドを用いて *M. mazei* tRNA^{Pyl} を全身で発現する TG カイコを作成し、H20 系統と命名した (図 1)。

H16 系統は野生型 (WT) よりも明らかに薄い繭を作ることに気づいた。H16 系統の繭は、平均して野生型系統のものよりも 42% 軽かった。精練によって繭層からコーティングタンパク質のセリシンを除去したところ、H16 の繭層に含まれるフィブロインの量は WT よりも 60% 少なかったが、セリシンの量には差がなかった。それにもかかわらず、H16 の 5 齢幼虫の成長は正常であった。*M. mazei* PylRS の N 末端ドメインは不溶性が高く、細胞内で全長 PylRS を凝集させることが報告されている。我々は、後部絹糸腺細胞内で過剰発現させた *M. mazei* PylRS 変異体の凝集が、細胞のタンパク質合成活性に悪影響を与えたのではないかと推測した。一方、H20 によるフィブロインの生産は、WT と有意な差は見られなかった。

H16 と H20 の成虫同士を交配し、F₁ 交雑種である H16 × H20 を作出した (図 1)。この交雑種の 5 齢幼虫に異なる量の Z-Lys を含む飼料を与え、繭層を回収した。交雑幼虫の成長は Z-Lys の添加には影響されなかった。一方、フィブロイン生産量は Z-Lys 添加によりわずかに減少した。統計的に有意な減少は、Z-Lys の 1.00 wt% 添加でのみ観察された。実際、4 つの Gly 残基を含む FibL のトリプシン消化物の質量分析から、Gly の Z-Lys への部分的置換が示唆された。Gly (モノアイソトピック質量: 75.03 Da) と Z-Lys (モノアイソトピック質量: 280.14 Da) の質量差に相当する親ピークから +205 Da の位置に、弱いながらも明瞭なピークが、Z-Lys を飼料に添加した場合のみ認められた (図 2)。この観察結果は、PylRS/tRNA^{Pyl} ペアが後部絹糸腺で活性を持つことを強く示唆するものであった。飼料への Z-Lys 添加量の違いが +205 Da のピークとその親ピークとの強度の比に及ぼす影響は、統計的な有意差は見られなかった。

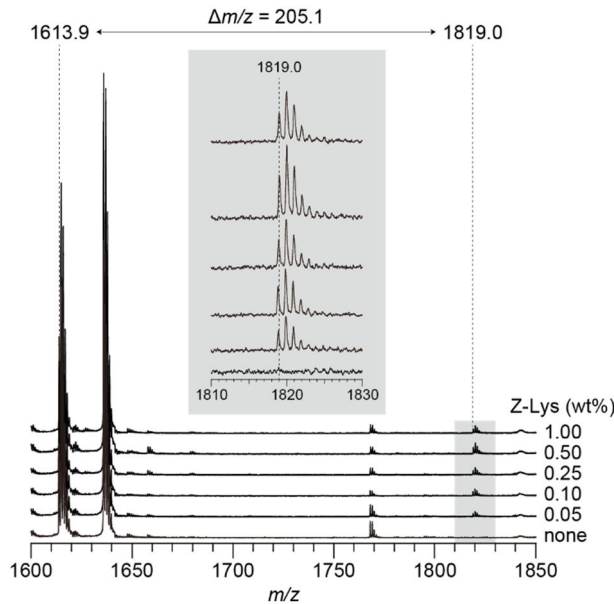


図2 . トリプシン消化による FibL のペプチドフラグメント GVGNGNDATGLVANAQR ($[M + H]^+ = 1613.8$)の代表的な MALDI-TOF-MS スペクトル

次に、クリックケミストリー用のトランス-シクロオクテン基を持つ別の Lys 誘導体である TCO-Lys を、H16×H20 の 5 齢幼虫に投与した (図1)。交雑幼虫の成長は TCO-Lys の添加によって影響を受けなかった。一方、フィブロイン生産量は飼料中の TCO-Lys の増加とともに劇的に減少した (図3 A)。フィブロイン生産量の減少は、Z-Lys よりも TCO-Lys の方がより顕著であった。我々は、フィブロイン生産の減少は後部絹糸腺細胞で合成される全タンパク質への TCO-Lys の取り込みによるものと推測した。

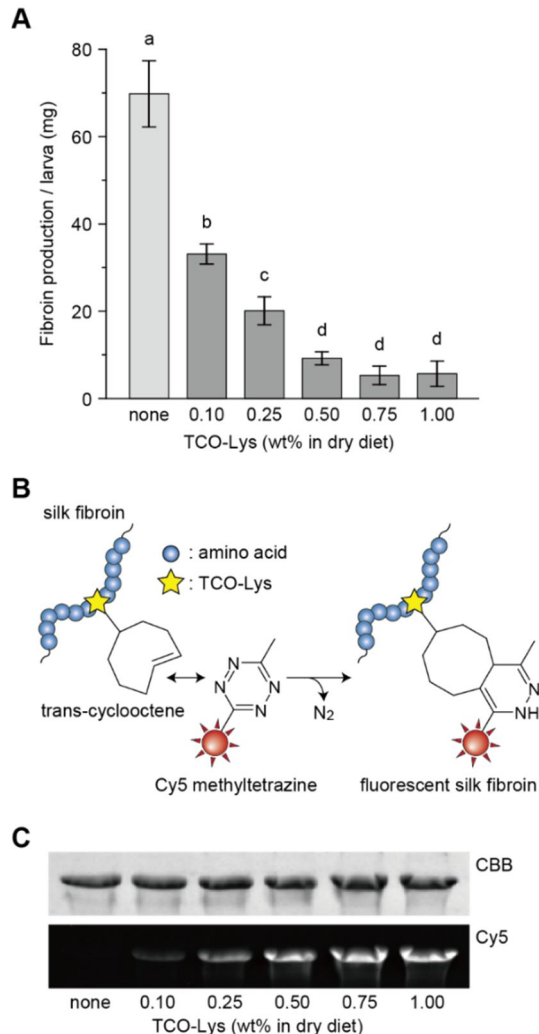


図3 . フィブロインへの TCO-Lys の導入とクリックケミストリーによる修飾

- (A) 異なる量の TCO-Lys を含む飼料を与えた H16×H20 が生産したフィブロインの重量。繭層の一部を 8 M 尿素で精練し、フィブロイン量を推定した。3 回の独立した実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を表す (n=3)。統計的有意性は Tukey HSD 検定で解析した。異なる文字は、*p* 値が 0.05 未満の統計的有意性を表す。
- (B) 絹フィブロインに取り込まれた TCO-Lys のトランス-シクロオクテン基に対するクリックケミストリー反応 (IEDDA) の反応スキーム
- (C) IEDDA による Cy5 蛍光色素での選択的標識によるフィブロイン中の TCO-Lys の検出。異なる量の TCO-Lys を含む飼料を与えた H16×H20 繭層の尿素精練によって得られたフィブロインを Cy5 メチルテトラジンと反応させた。FibH を SDS-PAGE で分離し、ゲル上の蛍光を検出した (Cy5 で示したパネル)。同じゲルを CBB で染色した (CBB で示したパネル)。

まず、Z-Lys の検出で示したように、質量分析によってフィブロイン中への TCO-Lys の取り込みを直接検出しようとした。しかし、Gly から TCO-Lys への置換に対応するペプチドピークは、おそらくその取り込み効率が低いためか、はっきりと検出されなかった。そこで、フィブロインへの TCO-Lys の取り込みを、蛍光標識による IEDDA 反応で間接的に検出することにした (図 3 B)。異なる量の TCO-Lys を含む飼料を与えた H16×H20 が生産する繭層を尿素精練した小片を 8 M 臭化リチウム (LiBr) に溶解し、Cy5 メチルテトラジンと混合し、IEDDA による選択的標識のために室温で一晩インキュベートした。フィブロイン H 鎖 (FibH) を電気泳動で分離し、ゲル上の Cy5 蛍光色素からの蛍光を検出した (図 3 C)。TCO-Lys を添加していないコントロールサンプルの FibH バンドは蛍光シグナルを示さなかったが、TCO-Lys を添加して得られたサンプルは FibH バンドに蛍光を示した。蛍光シグナル強度は飼料中の TCO-Lys 量が増加するにつれて増加した。これらの観察結果から、TCO-Lys がフィブロインに導入されたことが明らかになった。また、元系統である H16 と H20 のどちらか一方だけでは、フィブロインへの TCO-Lys の導入が起こらないことを蛍光標識実験で確認した。これら 2 つの系統の交雑種で合成された FibH だけが蛍光を発生し、後部絹糸腺細胞中の PyIRS/tRNA^{PyI} ペアの存在が組み込みに重要であることが確認された。

結論として、我々は PyIRS/tRNA^{PyI} ペアを用いた最も汎用性の高い遺伝暗号拡張システムが、数千年前からシルク生産の重要な産業動物であるカイコによるタンパク質生産に適合することを実証することに成功した。遺伝暗号拡張は、従来のバイオテクノロジーと組み合わせることでカイコによる工業的に有用なタンパク質の大量生産をさらに後押しする可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 寺本英敏、小島 桂
2. 発表標題 Genetic code expansion of silkworm to incorporate transcyclooctene-lysine in silk fibroin via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA pair
3. 学会等名 The 7th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小島 桂 (Kojima Katsura) (40370655)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------