

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05270

研究課題名（和文）転写・内在tRNAハイブリッド無細胞翻訳系を用いたアミノ酸入れ替え遺伝暗号の構築

研究課題名（英文）Construction of Ser/Leu-swapped cell-free translation system using natural/in vitro transcribed-hybrid tRNA set

研究代表者

藤野 公茂 (Fujino, Tomoshige)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：00772378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸菌から抽出した天然のtRNAと、試験管内転写反応により合成した人工tRNAを組み合わせることでハイブリッドtRNAを構築し、これを用いて、SerとLeuを交換した遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系の簡便な調製法を開発した。この翻訳系で使用されるSer/Leu交換遺伝子は、普遍遺伝暗号を持つ通常の生物では不活性となるため、バイオハザードリスクの無い遺伝子の設計が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された、Ser/Leu交換遺伝暗号を持つ再構成無細胞翻訳系は、遺伝子の漏洩に由来するバイオハザードリスクの無いタンパク質合成系として、今後の利用が期待される。さらに、近年Ser/Leu交換遺伝暗号を実際の生物で構築する試みが世界的に行われており、本研究の成果は、生物への実装に先駆けたモデル系として、今後の研究に重要な知見を提供すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed a hybrid tRNA set by combining natural tRNAs extracted from E. coli cells with in vitro-transcribed artificial tRNAs. Using this tRNA set, we simplified the construction method of a cell-free translation system with a Ser/Leu-swapped genetic code. Genes designed for this Ser/Leu-swapped genetic code produce non-functional products in translation systems with the standard genetic code, which is common to most organisms. Therefore, even if these genes were to leak into the environment, they would have no potential biohazard risk.

研究分野：生化学

キーワード：無細胞翻訳系 tRNA 遺伝暗号 バイオハザード

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組み換え生物から危険な遺伝子が環境中に漏洩するのを防止することは、バイオテクノロジー研究の重要なテーマである。この課題に対し、2020年に申請者は、Ser/Leu 交換遺伝暗号の構築を提案した(図1)(引用1)。この遺伝暗号を持つ翻訳系では、アンチコドンを交換したキメラ tRNA^{Ser}(GAG)、tRNA^{Leu}(GGA)を使用することで、予め Ser と Leu のコドンを交換して配置した遺伝子を鋳型に、本来の正しいアミノ酸配列を持ったタンパク質を翻訳合成する。この遺伝子は、通常の生物の持つ普遍遺伝暗号の元では Ser と Leu の位置が反転したままになり不活性となるため、万が一環境中への漏洩が起きてもバイオハザードリスクを低減した遺伝子の設計となる。しかし、2020年の報告ではこのコンセプトを実証することに成功したものの、その際に構築した翻訳系では、調製の手間が非常に大きい点、タンパク質の収量が低い点が問題となり、実用的なタンパク質合成法としての利用は困難だった。

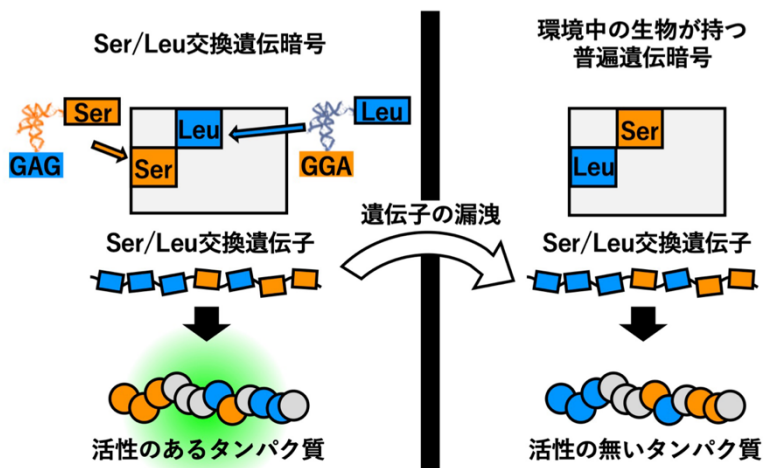


図1. Ser/Leu交換遺伝暗号による漏洩してもリスクの低い遺伝子の設計

2. 研究の目的

その原因として、2020年の報告では、全ての tRNA を試験管内転写反応で調製していたことが考えられる。試験管内転写 tRNA は塩基修飾を持たないため、一部の tRNA では活性が下がり、タンパク質合成量が低くなる原因であると考えられる。さらに、20種類のアミノ酸と翻訳開始に対応するため、最低21種の tRNA を試験管内で調製する必要があり、非常に大きな手間がかかっていた。

そこで本研究では、試験管内転写での調製が必須のキメラ tRNA 以外は、大腸菌から抽出した内在 tRNA を用いて作製した転写・内在ハイブリッド tRNA を使用し、Ser/Leu 交換遺伝暗号に基づく翻訳系を構築する手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 転写・内在ハイブリッド tRNA の構築：大腸菌の tRNA 抽出物から内在の tRNA^{Ser}、tRNA^{Leu} を除去するため、ゲル電気泳動を行った後に、ゲルのバンドに対応する部分を切り出して抽出することで、tRNA^{Ser}、tRNA^{Leu}、tRNA^{Tyr} を含まない tRNA 混合物を得ることを試みた。ここに、試験管内転写反応により作製したキメラ tRNA^{Ser}(GAG)、tRNA^{Leu}(GGA)、通常 tRNA^{Tyr} を添加し、Ser/Leu 交換可能な転写・内在ハイブリッド tRNA を構築した。

(2) ハイブリッド tRNA を用いた Ser/Leu 交換遺伝暗号の構築：ハイブリッド tRNA を用いて、再構成無細胞翻訳系を調製し、目的の通り Ser/Leu 交換遺伝暗号が構築されているか検証を行った。具体的には、まずモデルペプチドとして Ser または Leu コドンをもつ短い配列を設計し、翻訳合成を試みた。さらに、モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質(GFP)の配列を用いて、Ser/Leu 交換遺伝子からの翻訳合成を試みた。

(3) Ser/Leu 交換遺伝暗号で使用可能なコドンの拡張：ハイブリッド tRNA では、大部分のコドンに対応する内在 tRNA が存在しているため、先行研究の系では61個中35個であった使用可能なコドンが理論上53個まで拡張されている。これを検証するため、レアコドンを除く47個のコドンを含む GFP 遺伝子についても設計しタンパク質合成を試みた。

(4) ハイブリッド tRNA による Ser/Leu 交換翻訳の正確性の評価：Ser/Leu 交換遺伝暗号を用いて合成されたモデルペプチド、モデルタンパク質について、液体クロマトグラフィ質量分析(LC-MS/MS)を用いて、導入されたアミノ酸の詳細な解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 転写・内在ハイブリッド tRNA の構築： Ser/Leu の交換導入を担うキメラ tRNA^{Ser}(GAG)、tRNA^{Leu}(GGA) を添加する前に、大腸菌の tRNA 抽出物から内在の tRNA^{Ser}、tRNA^{Leu} を予め除去しておくことが必要になる。大腸菌の tRNA は、大雑把に長い tRNA (tRNA^{Ser}、tRNA^{Leu}、tRNA^{Tyr} を含む) と短い tRNA (それ以外) の 2 グループに分けられる。これを利用し、ゲル電気泳動を行った後に、ゲルを切り出して抽出することで、tRNA^{Ser}、tRNA^{Leu}、tRNA^{Tyr} を含まない tRNA 混合物を得ることを試み、これに成功した (図 2)。さらに、キメラ tRNA^{Ser}(GAG)、tRNA^{Leu}(GGA)、通常 tRNA^{Tyr} を試験管内転写反応により作製し、上記 tRNA 混合物に添加することで、Ser/Leu 交換可能な転写・内在ハイブリッド tRNA を構築した。従来では、Ser/Leu 交換遺伝暗号の構築には、21 個の tRNA を試験管内転写反応により個別に調製する必要があり、大きな手間がかかっていたのに対し、上記の方法を用いることで、調製が必要な tRNA を僅か 4 個に削減することに成功した。

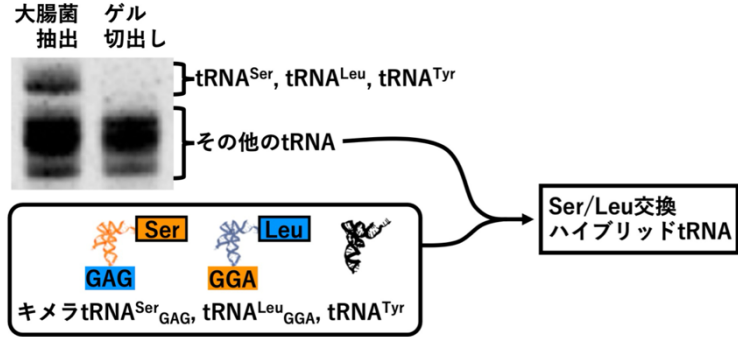


図2. Ser/Leu交換ハイブリッドtRNAの構築

(2) ハイブリッド tRNA を用いた Ser/Leu 交換遺伝暗号の構築： 作製したハイブリッド tRNA を再構成無細胞翻訳系に添加し、Ser/Leu 交換遺伝暗号を構築した。実際に、Ser と Leu の交換導入ができるかどうかを調べるため、途中に Ser または Leu に対応するコドンを持った mRNA1 を用意し、通常の tRNA とハイブリッド tRNA のそれぞれで、モデルペプチド 1 の翻訳合成を行った。これを質量分析 (MALDI-TOF-MS) で解析すると、ハイブリッド tRNA を用いた場合に導入されるアミノ酸が確かに交換されていることが明らかになった (図 3)。

mRNA 1: AUG UAC UAC UAC NNN GAC GAC CGU GAC stop
 モデルペプチド 1: (Met) (Tyr) (Tyr) (Tyr) (Xaa) (Asp) (Asp) (Arg) (Asp)

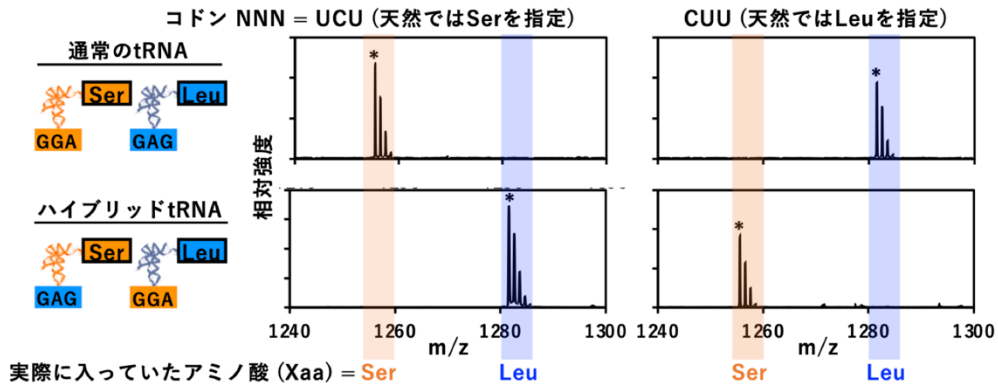


図3. モデルペプチドにおけるSer/Leu交換の評価

続いて、モデルタンパク質として、緑色蛍光タンパク質 (sfGFP) の遺伝子についても用意し、Ser/Leu 交換遺伝暗号による翻訳を試みた。その結果、ハイブリッド tRNA を用いた Ser/Leu 交換翻訳系では、通常の tRNA によって調製された普遍遺伝暗号を持つ翻訳系にほぼ匹敵する、高い合成活性が得られることが分かった。これは、従来の試験管内転写 tRNA のみからなる系の約 3.5 倍に当たり、Ser/Leu 交換翻訳系の翻訳活性を大幅に改善することに成功した (図 4)。

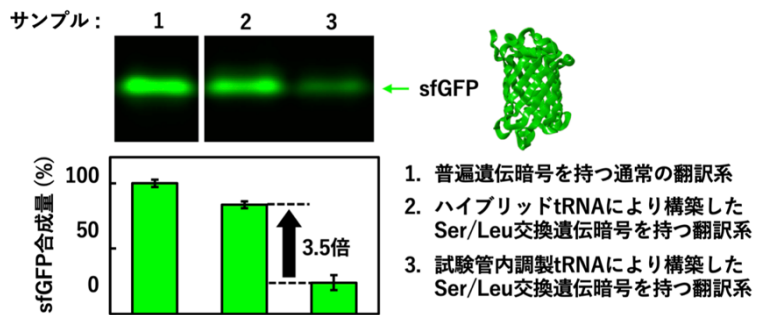


図4. Ser/Leu交換ハイブリッドtRNAによるタンパク質合成活性の測定

(3) Ser/Leu 交換遺伝暗号で使用可能なコドンの拡張：ハイブリッド tRNA では、大部分の tRNA を大腸菌に由来する天然 tRNA としているため、試験管内転写 tRNA のみからなる従来の系では 35 個のセンスコドンしか使用できないのに対し、使用可能なコドンの数が理論上 53 個まで拡張されていると考えられる (図 5)。これを検証するため、53 個のコドンのうち、翻訳活性を下げる要因になり得るレアコドンを除いた 47 個のコドンを含む sfGFP 遺伝子を用意した。なお、(2) の実験で用いた GFP 遺伝子では、従来の系でも翻訳できるよう 22 個のコドンのみが使われており、こちらの遺伝子とタンパク質合成量を比較した。その結果、どちらの遺伝子からも同程度の sfGFP 合成量が得られたことから、ハイブリッド tRNA では、少なくとも 47 個のコドンを効率的に利用可能であることが明らかになった。

	U	C	A	G	
U	Phe	Leu	Tyr stop	Cys stop Trp	U C A G A G G
C	Ser	Pro	His Gln	Arg	U C A G A G G
A	Ile Met	Thr	Asn Lys	Arg	U C A G A G G
G	Val	Ala	Asp Glu	Gly	U C A G A G G

本研究のSer/Leu交換遺伝暗号 (53個のセンスコドンが読める)

	U	C	A	G	
U	Phe	Leu	Tyr stop	Cys stop Trp	U C A G A G G
C	Ser	Pro	His Gln	Arg	U C A G A G G
A	Ile Met	Thr	Asn Lys	Arg	U C A G A G G
G	Val	Ala	Asp Glu	Gly	U C A G A G G

先行研究のSer/Leu交換遺伝暗号 (35個のセンスコドンが読める)

図5. ハイブリッドtRNAと従来の試験管内転写tRNAを用いて構築した遺伝暗号表の比較

(4) ハイブリッド tRNA による Ser/Leu 交換翻訳の正確性の評価：モデルペプチドおよびモデルタンパク質での Ser/Leu 交換導入の正確性について詳細に検証するため、翻訳産物を液体クロマトグラフィ質量分析 (LC-MS/MS) により解析した。この解析では、Ser または Leu コドンが翻訳される際に、Ser/Leu 交換が失敗した産物、Ser/Leu 以外のアミノ酸が誤導入された産物、フレームシフトによって生じた産物、を網羅的に探索することができる。代表的な結果として、モデルペプチドの UCU コドンでは、Leu への交換がほぼ完璧に進行したが、CUU コドンでは、僅かながら約 1.5%の産物で Ser へ交換されずに Leu が導入された産物も見られた (図 6)。

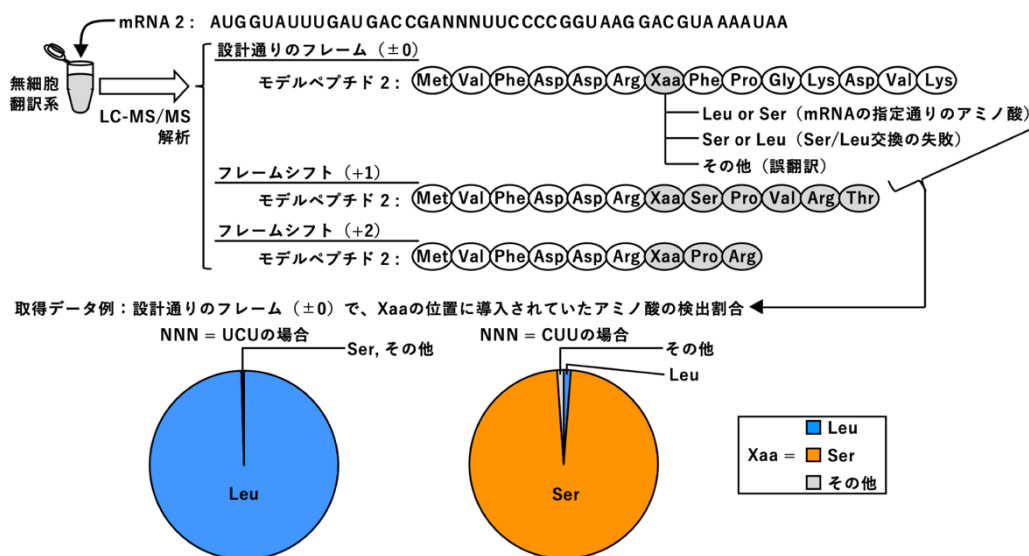


図6. LC-MS/MS解析を用いたSer/Leu交換翻訳の正確性の評価

(5) 本成果の意義について：本研究で開発された、Ser/Leu 交換遺伝暗号を持つ再構成無細胞翻訳系は、遺伝子漏洩に伴うバイオハザードリスクの低減されたタンパク質合成系として、今後の利用が期待される。また、申請者らの 2020 年の報告以降、Ser/Leu 交換遺伝暗号を実際の生物で構築する研究が世界的に進められており (引用 2, 3, 4)、実際に一部のコドンが改変された遺伝暗号を持つ大腸菌では、菌体間またはウイルスとの間での遺伝子の移動が防げられることが報告されている。本研究の結果は、Ser/Leu 交換遺伝暗号の、生物への実装に先駆けた無細胞のモデル系として、今後の研究に重要な知見を提供すると考えられる。

申請者は、本成果について『Ser/Leu-swapped cell-free translation system constructed with natural/in vitro transcribed-hybrid tRNA set』のタイトルで論文投稿し、2024 年 5 月 16 日付 Nature Communications にオンライン掲載された (引用 5)。また、本研究の副次的な成果として、本研究の実施に当たり作製した無細胞翻訳系を使用し、3 件の成果について論文が掲載された (引用 6, 7, 8)

<引用文献>

1. Fujino T. et al., An Amino Acid-Swapped Genetic Code. *ACS Synthetic Biology*, **2020**, 9(10), 2703-2713
2. Nyerges, A. et al. A swapped genetic code prevents viral infections and gene transfer. *Nature*, **2023**, 615, 720-727
3. Robertson, W. E. et al. Sense codon reassignment enables viral resistance and encoded polymer synthesis. *Science*, **2021**, 372, 1057-1062
4. Zürcher, J. F. et al. Refactored genetic codes enable bidirectional genetic isolation. *Science*, **2022**, 378, 516-523.
5. Fujino T. et al., Ser/Leu-swapped cell-free translation system constructed with natural/in vitro transcribed-hybrid tRNA set. *Nature Communications*, **2024**, 15.
6. Yamano K. et al., Optineurin provides a mitophagy contact site for TBK1 activation. *EMBO Journal*, **2024**, 43(5), 754-779.
7. Kondo T. et al., Monobodies with potent neutralizing activity against SARS-CoV-2 Delta and other variants of concern. *LIFE SCIENCE ALLIANCE*, **2022**, 5(6).
8. Kondo T. et al., Construction of a Highly Diverse mRNA Library for in vitro Selection of Monobodies. *Bio-protocol*, **2021**, 11(16).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kondo, T.; Matsuoka, K.; Umemoto, S.; Fujino, T.; Hayashi, G.; Iwatani, Y.*; Murakami, H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Monobodies with potent neutralizing activity against SARS-CoV-2 Delta and other variants of concern	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kondo Taishi, Eguchi Minori, Tsuzuki Nariaki, Murata Naoya, Fujino Tomoshige, Hayashi Gosuke, Murakami Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Construction of a Highly Diverse mRNA Library for in vitro Selection of Monobodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tomoshige Fujino, Ryogo Sonoda, Taito Higashinagata, Emi Mishiro-Sato, Keiko Kano, Hiroshi Murakami	4. 巻 4
2. 論文標題 Ser/Leu-swapped cell-free translation system constructed with natural/in vitro transcribed-hybrid tRNA set	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-48056-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shun Umemoto, Taishi Kondo, Tomoshige Fujino, Gosuke Hayashi, Hiroshi Murakami	4. 巻 51
2. 論文標題 Large-scale analysis of mRNA sequences localized near the start and amber codons and their impact on the diversity of mRNA display libraries	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7465-7479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤野公茂, 鷺見大河, 村上 裕
2. 発表標題 WYP-rich大環状ペプチドライブラリの構築
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤野 公茂, 鷺見 大河, 村上 裕
2. 発表標題 WYP-rich 大環状ペプチドライブラリによる効率的なペプチド選択
3. 学会等名 第53回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 園田 凌吾, 藤野 公茂, 村上 裕
2. 発表標題 転写・抽出tRNAを用いた高効率Ser/Leu交換翻訳系の開発
3. 学会等名 第12回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤野 公茂, 園田 凌吾, 鷺見 大河, 村上 裕
2. 発表標題 Tyr, Trp, Pro-rich環状ペプチドライブラリの構築とSARS-CoV2に対する環状ペプチドの選択
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤野公茂, 戸崎将弘, 村上裕
2. 発表標題 アミノ酸交換遺伝暗号の構築
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤野公茂, 園田凌吾, 村上裕
2. 発表標題 天然・転写tRNAによるSer/Leu交換遺伝暗号の翻訳高効率化
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅本駿, 近藤太志, 藤野公茂, 林剛介, 村上裕
2. 発表標題 mRNA提示法における人工抗体モノボディ・大環状ペプチドライブラリの多様性最大化
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅本駿, 近藤太志, 藤野公茂, 林剛介, 村上裕
2. 発表標題 mRNA提示法においてmRNA配列がライブラリ多様性に及ぼす影響の大規模解析
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤野 公茂, 園田 凌吾, 村上 裕
2. 発表標題 天然・転写ハイブリッドtRNAによるSer/Leu交換翻訳系の高収率化
3. 学会等名 第54回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅本駿, 近藤太志, 藤野公茂, 林剛介, 村上裕
2. 発表標題 mRNA提示法のライブラリ多様性に対してmRNA配列が与える影響の大規模解析
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鷺見大河, 藤野公茂, 村上裕
2. 発表標題 WYP-richとNNKライブラリ由来の大環状ペプチドの親和性評価
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東長田泰斗, 藤野 公茂, 村上 裕
2. 発表標題 大腸菌を用いた大環状ペプチド簡便大量合成法の開発
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤野 公茂, 園田 凌吾, 村上 裕
2. 発表標題 天然・転写ハイブリッドtRNAによるSer/Leu交換翻訳の高効率化
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅野晃矢, 近藤太志, 梅本駿, 藤野公茂, 林剛介, 村上裕
2. 発表標題 1分子ペプチドアミノ酸配列決定法の開発を目指したN末端Gly・Phe結合人工抗体の創製
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中千尋, 田川寛, 山本智勇, 片山佳樹, 藤野公茂, 林剛介, 森健, 村上裕
2. 発表標題 ヒト・マウス抗体に結合する人工抗体の創製
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾瑠星, Jing-Jing Jiang, 藤野公茂, 林剛介, 村上正晃, 村上裕
2. 発表標題 微小炎症関連タンパク質に対する人工抗体の創製
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅本駿, 近藤太志, 藤野公茂, 林剛介, 村上裕
2. 発表標題 Large-scale Analysis of the Effect of mRNA Sequences on the diversity of mRNA display libraries
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅本駿, 近藤太志, 藤野公茂, 林剛介, 村上裕
2. 発表標題 mRNA提示法における人工抗体・環状ペプチドライブラリの多様性の最大化
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤野公茂, 舟根守, 村田直哉, 吉井達之, 林剛介, 築地真也, 村上裕
2. 発表標題 光制御を目指した抗アゾベンゼン人工抗体の創製
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 近藤 太志, 梅本 駿, 藤野 公茂, 林 剛介, 村上 裕 (他96名)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 601
3. 書名 創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------