

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710231

研究課題名(和文) 遺伝暗号拡張による生体内でのピオシチンのタンパク質導入

研究課題名(英文) Incorporation of biocitin into a protein by expanding the genetic code

研究代表者

榎原 琢哉 (Umehara, Takuya)

東京理科大学・基礎工学部・助教

研究者番号：00415548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリジル-tRNA合成酵素(PyIRS)/ピロリジンtRNAペアは様々な生物種のアミノアシル-tRNA合成酵素やtRNAと直交性をもつことから、タンパク質中に非天然アミノ酸を導入するシステムの親分子として注目されている。そこで本研究では大腸菌内でピオチン化リジンをタンパク質に導入し、ピオチン標識したタンパク質を生産するシステムの構築を目指した。飽和変異を導入したPyIRSライブラリのin vivo選択やドッキングモデルによるPyIRS変異体を用いた解析を行った結果、システムの構築にはPyIRSの大規模な改変が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Since pyrrolysyl-tRNA synthetase (PyIRS)/pyrrolysine tRNA (tRNA(Pyl)) pair is orthogonal to aminoacyl-tRNA synthetase/tRNA pairs in various organisms, PyIRS/tRNA(Pyl) pair has been used as one of the parental molecules to cotranslationally incorporate an unnatural amino acid into a protein. In this project, I tried to develop the system to produce a biotinylated protein in *E. coli* by using PyIRS/tRNA(Pyl) pair and biotinyl-L-lysine (biocitin). Although several challenges of in vivo selection to PyIRS libraries with saturated mutations, many PyIRS mutants recognizing natural amino acid were isolated as higher background. In addition to the selection, I constructed the PyIRS mutant based on the docking model of PyIRS and biocitin, which however showed the activity with very little. These results suggest that large modification of the active site in PyIRS is required to obtain PyIRS mutant that can charge biocitin onto tRNA(Pyl).

研究分野：合成生物学

キーワード：非天然アミノ酸 タンパク質翻訳 tRNA ピロリジン

1. 研究開始当初の背景

近年のトランスクリプトーム解析からタンパク質をコードしない RNA (非コード RNA) が多く存在していることが明らかにされ注目を集めている。それらの多くはタンパク質との相互作用により機能を発揮していると考えられる。一方、ゲノム解析では核酸結合に特徴的な配列をもつ機能未知タンパク質が数多く推定されており、非コード RNA とそれに相互作用するタンパク質の対応関係を明らかにできれば、生体の制御メカニズムの理解に繋がると考えられる。そこで、*in vivo* でビオチン標識されたタンパク質を任意に生産できれば、ストレプトアビジンをを用いた迅速で特異的な精製過程を経ることで、RNA 結合性タンパク質とそれに相互作用する RNA の同定・解析が容易になると考えた。

生体内のタンパク質は基本的に 20 種類の天然アミノ酸で合成されるが、近年、タンパク質に非天然アミノ酸を導入し、機能を拡張する研究が盛んに行われている。主な手法はアミノ酸の指定されていないアンバー終止コドン(UAG)を利用し、タンパク質翻訳の過程で非天然アミノ酸を導入するものである。UAG の位置を変えることで導入部位を自在に設定できる。*in vitro* よりも *in vivo* の方が大量の非天然アミノ酸を含むタンパク質を得られるが、宿主のアミノアシル-tRNA 合成酵素(aaRS)や tRNA と交差反応しない外来 aaRS や tRNA を使う必要がある。研究代表者は近年、この手法を応用して、大腸菌内でタンパク質の部位特異的に非天然アミノ酸を導入する研究を行い、リン酸化セリンやアセチルリジンを導入するシステムの構築に成功した(*Science* 2011: 333, 1151-4; *FEBS Lett.* 2012, 586, 729-33)。そこで、これまでの研究で得た技術を生かしてビオチニルリジン(ビオシチン)を大腸菌内でタンパク質の特異的部位に導入するシステムを構築しようと考えた。

現在のタンパク質へのビオチン標識は主に *in vitro* で行われ、均一性、煩雑な操作、収量に関する問題がある。また *in vivo* での標識も可能だが、その部位には制限があるため、複合体の形成に影響を及ぼす可能性がある。一方、本システムは任意の位置にビオチン標識が可能のため、生体内の分子間相互作用を解析する強力なツールになると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では部位特異的にビオチン標識したタンパク質を生細胞内で生産するシステムを構築する。具体的にはピロリジン tRNA (tRNA^{Py1}) とピロリジル-tRNA 合成酵素(Py1RS)変異体を用い、アンバー終止コドンにビオシチンを割り当てることによって *in vivo* のタンパク質翻訳反応でビオチン標識

したタンパク質を生産するシステムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

ビオシチンを認識する Py1RS 変異体(ピロシチル-tRNA 合成酵素:BioLysRS)を創製するために、Py1RS のアミノ酸認識部位に飽和変異を導入した Py1RS ライブラリプラスミドを作製した。作成したライブラリを大腸菌に導入し、*in vivo* セレクションを行うことで、BioLysRS の濃縮を試みた。セレクション後にシングルコロニーを得て、個別に BioLysRS の活性を調べた。

柳沢達男博士の協力により Py1RS とビオシチンのドッキングモデル作成した。このモデルを基にした Py1RS 変異体を作製し、ビオシチンに対する活性を *in vitro* で調べた。更にモデルを基にした新規 Py1RS ライブラリを構築し、*in vivo* セレクションを行った。

4. 研究成果

(1) Py1RS ライブラリのセレクション

Py1RS ライブラリの効率的なセレクションを行うために大腸菌 ompC タンパク質を用いたバイオニングによるセレクションシステムを構築した。このシステムは ompC タンパク質の 180 番目にアンバー終止コドンを導入し、大腸菌表面に提示されたビオシチンをストレプトアビジン磁気ビーズで大腸菌ごと捕捉するものである。フェニルアラニンを認識する Py1RS 変異体と ompC システムを大腸菌内で共発現させるとシステム由来の ompC が大腸菌膜上に提示されたことから、このシステムは期待通り機能していることが示唆された。構築した ompC システムによって選択された大腸菌を培養して増幅し、得られたコロニーからライブラリプラスミドを精製した。そのライブラリを再び ompC システムと一緒に大腸菌に導入した。同様のセレクションを 3 から 5 サイクル行った後、ビオシチンを含む LB プレートと含まない LB プレートに大腸菌を塗布した。LB プレート上のコロニー数を比較したがこの条件では差が見られず、BioLysRS の濃縮は見られなかった。そこで、培地を M9 最小培地に変更し、同様のセレクションを行ったが、この条件でも BioLysRS の濃縮は見られなかった。

次に、クロラムフェニコール耐性遺伝子(CAT)と Barnase による 2 段階のセレクションシステムに切り替え、LB 培地でのセレクションを 5 サイクル行った。最後のサイクルで得られたコロニー、44 個を個別に選別した。すべてのクローンで天然アミノ酸を認識する Py1RS 変異体が見られていた。この結果から最初にデザインした Py1RS ライブラリの変異導入箇所は適切ではなかった

と判断し、PylRS とピオシチンのドッキングモデルを利用し、PylRS 変異体や新たなライブラリをデザインすることにした。

(2) ドッキングモデルに基づく BioLysRS の創製

PylRS とピオシチンのドッキングモデルに基づいた PylRS 変異体 (PylRS-GGGG) を作製し、*in vitro* でピオシチンを tRNA^{Pyl} に結合できるかを調べたが、期待通りの活性を確認することはできなかった。そこで、この PylRS 変異体の変異導入箇所に飽和変異を導入した新規の PylRS ライブラリを構築し、(1)と同様に ompC システムを用いたバイオパニングと CAT/Barnase によるセクションを行った。更に ompC システムと CAT/Barnase を組み合わせたセクションも行ったが、いずれの手法を用いても目的の変異体を得るまでには至らなかった。ピオシチンと PylRS のドッキングモデルでは PylRS-GGGG にすることでピオシチンがアミノ酸結合ポケットに入るものかなり窮屈な状態であった。また、ピオシチンが PylRS のアミノ酸結合ポケットに入るための通り道がかなり狭いようにも見えた。このことから BioLysRS の創製には大規模な改変を考慮した PylRS ライブラリの構築とセクションが必要であると考えられる。

本研究では ompC システムの構築に成功し、PylRS ライブラリの作成においても新たな指針を得ることができた。今回得られた知見を足がかりに、今後も BioLysRS の創製にチャレンジしていきたい。

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 7 件)

- ① Eri Kurihara, Sayuri Uchida, Takuva Umehara and Koji Tamura “Development of a Functionally Minimized Mutant of the R3C Ligase Ribozyme Offers Insight into the Plausibility of the RNA World Hypothesis.” *Biology*, 査読有, Vol. 3, No. 3, 2014, pp. 452-465, DOI: 10.3390/biology3030452
- ② Reina Komatsu, Risa Sawada, Takuva Umehara and Koji Tamura “Proline might have been the first amino acid in the primitive genetic code.” *Journal of Molecular Evolution*, 査読有, Vol. 78, No. 6, 2014, pp. 310-312, DOI: 10.1007/s00239-014-9629-9
- ③ Jae-Hyeong Ko, Yane-Shih Wang, Akiyoshi Nakamura, Li-Tao Guo, Dieter Söll and Takuva Umehara “Pyrrolysyl-tRNA synthetase variants reveal ancestral

aminoacylation function.” *FEBS Letters*, 査読有, Vol. 587, No. 19, 2013, pp. 3243-3248, DOI: 10.1016/j.febslet.2013.08.018

- ④ Kokoro Hamachi, Hikari Hayashi, Miyuki Shimamura, Yuiha Yamaji, Ai Kaneko, Aruma Fujisawa, Takuva Umehara and Koji Tamura “Glycols modulate terminator stem stability and ligand-dependency of a glycine riboswitch.” *Biosystems*, 査読有, Vol. 113, No. 2, 2013, pp. 59-65, DOI: 10.1016/j.biosystems.2013.05.004
- ⑤ Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Yuko Tokunaga, Akemi Suzuki, Leiyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuva Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi and Michinori Kohara “Self-Enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis.” *PLoS Pathogens*, 査読有, Vol. 8, No. 8, 2012, e1002860, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002860
- ⑥ Takuva Umehara, Takahiro Kitagawa, Yu Nakazawa, Hinako Yoshino, Ryohei Nemoto and Koji Tamura “RNA tetraplex as a primordial peptide synthesis scaffold.” *BioSystems*, 査読有, Vol. 109, No. 2, 2012, pp. 145-150, DOI: 10.1016/j.biosystems.2012.03.003
- ⑦ Takuva Umehara, Jihyo Kim, Sangsik Lee, Li-Tao Guo, Dieter Söll and Hee-Sung Park “N-acetyl lysyl-tRNA synthetases evolved by a CcdB-based selection possess N-acetyl lysine specificity *in vitro* and *in vivo*.” *FEBS Letters*, 査読有, Vol. 586, No. 6, 2012, pp. 729-733, DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.029

[学会発表] (計 8 件)

- ① 大森千里、榎原琢哉、田村浩二
tRNA 結合タンパク質 (Trbp) に結合する RNA アプタマーの取得
第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜
- ② 富岡慎忠、榎原琢哉、田村浩二
グアニン四重鎖を足場としたアミノアシルミニヘリックスによるペプチド結合生成
第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜
- ③ 藤沢有磨、土岐梨彩子、榎原琢哉、田村浩二

Nanoarchaeum equitans 由来グリシル
tRNA 合成酵素の原始型の探索
第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年
11 月 25 日 パシフィコ横浜

- ④ 那須元太郎、榎原琢哉、田村浩二、上田
淳

新規アミノアシル化法を用いた *in
vitro* 非天然タンパク質創製法の最適
化

第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12
月 5 日 神戸ポートアイランド

- ⑤ 金子明弘、山本太郎、榎原琢哉、田村浩
二

Nanoarchaeum equitans 由来 MetRS の
tRNA 結合機構の解明

第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12
月 4 日 神戸ポートアイランド

- ⑥ 榎原琢哉、田村浩二

アセチルリジル-tRNA 合成酵素の機能
解析

東京理科大学総合研究機構・RNA 科学総
合研究センター公開シンポジウム「RNA
world への階段」2013 年 7 月 17 日 東
京理科大学・葛飾キャンパス

- ⑦ 堀越達也、榎原琢哉、田村浩二

Nanoarchaeum equitans TyrRS による
tRNA^{Tyr} のアミノアシル化機構の解析

第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月
16 日 マリンメッセ福岡

- ⑧ 榎原琢哉、田村浩二、Dieter Söll

大腸菌遺伝暗号拡張によるリン酸化セ
リン導入タンパク質の生産

東京理科大学総合研究機構・RNA 科学総
合研究センター公開シンポジウム「RNA
科学の現状と将来」2012 年 6 月 18 日 東
京理科大学・野田キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎原 琢哉 (UMEHARA, Takuya)

東京理科大学・基礎工学部・生物工学科・
助教

研究者番号：00415548

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 協力研究者

柳沢 達男 (YANAGISAWA, Tatsuo)