

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710232

研究課題名(和文)センス・コドン・リ・アサイメント

研究課題名(英文)Sense Codon Reassignment

研究代表者

向井 崇人(Mukai, Takahito)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：40612114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：現在の生物種においても遺伝暗号が進化するか、実験的に検証した。ゲノム改変技術やタンパク質合成系の操作方法を確立し、大腸菌に約40カ所の変異を導入した。わずかこれだけの変異によって、ホモアルギニンをAGGコドンに割り当てられた。6つの必須遺伝子は11カ所のAGGコドンを保持したままであるから、ホモアルギニンとアルギニンには大きな互換性がある。以前の研究では、TAG終止コドンを10カ所の変異によって、非天然型アミノ酸に指定している。従って、遺伝暗号はやはり、今なおフレキシブルであると一般化できた。

研究成果の概要(英文)：The flexibility of the standard genetic code in a modern organism *Escherichia coli* was experimentally evaluated. In this study, methods for the extensive engineering of the genome and codon-decoding factors were newly established. *E. coli* cells with only few dozens of genetic modifications accepted the reassignment of AGG to homoarginine. Since six essential genes containing eleven AGG codons were functionally expressed, it was indicated that homoarginine and arginine were largely compatible. I have previously demonstrated that *E. coli* cells with ten mutations accepted the reassignment of a stop codon TAG. Thus, the genetic code is still flexible, probably because the proteome is intrinsically more tolerant to the altered assignment than believed.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者の論文により、遺伝暗号を人為的に書き換えられることが示された。一般的な生物種である大腸菌を用い、終止コドンの1つ UAG コドンを、完全なるセンスコドンに再指定した。ゲノム中全ての TAG コドンを同義置換する必要はなく、わずか7個の必須遺伝子だけを改変したため、残りの300遺伝子に関しては、C末端に余分なペプチド配列が付加する。研究代表者は、遺伝暗号には可変性があると訴えたが、反論もあった。UAG コドンは使用頻度が最も少ないコドンであり、タンパク質配列の末端に位置するため、プロテオームへの影響が少なく、例外的ケースであるというものであった。

2. 研究の目的

(1) 近代的生物種における遺伝暗号の可変性を一般化するためには、終止コドンではなく、センスコドンの意味を書き換えればよい。しかし、3つの技術的課題があった。1つ目は、大腸菌のレアコドンであっても、数千回の使用頻度があるため、ゲノム改変は困難を極める。2つ目は、そもそも、ゲノム中で同義置換を蓄積させていく優れた方法の欠如である。報告されている方法は突然変異率が桁違いに高く、まともなゲノムを維持できない。3つ目は、コドンを翻訳する tRNA 遺伝子の改変や操作である。オリジナルな tRNA は除去・改変され、新しい tRNA が別のアミノ酸を導入する。しかし、UAG コドンのサプレッサー tRNA とは異なり、センスコドンのサプレッサー tRNA はほとんど研究が進んでいない。

3. 研究の方法

(1) 本研究において、以下の3ステップで研究を行った。必要となる同義置換を可能な限り減らすため、AGG のみに、アルギニンに酷似したアミノ酸を割り当てる。

突然変異修復系を維持するゲノム改変技術・同義置換蓄積法の開発

AGG/AGA コドンの縮退を解き、AGG のみを再指定する。(AGG は最も使用頻度が少ない。)

AGG にアルギニン類似体であるホモアルギニンを割り当てる。

4. 研究成果

(1) まず、ゲノム改変技術の開発を行った。Court らの方法 (Sawitzke *et al.*, 2011) を改良し、大腸菌 BL21(DE3) 株とプラスミドシステムを用い、オリゴ DNA を利用した遺伝子組み換え法を完成させた。BL21(DE3) 株が、K-12 株に比べて従順であることを見出した (自己修復を試みない)。また、BL21(DE3) 株において安定なプラスミドベクターを開発し、組み換えを促進する Beta タンパク質の誘導大量発現系を構築した。遺伝子組み換えの成功率が飛躍的に高まったため、特定のコ

ドンが置換された変異株は、コロニーPCR によって容易に単離できた。

(2) 新しいゲノム改変法によって、まずゲノム中の 35% の TAG コドンを同義置換した。突然変異の蓄積はわずか9つであり、しかもなら毒性を示さなかった。この時点で UAG コドンを認識する翻訳終結因子 RF1 をノックアウトし、Blank(DE3) 株を樹立した。従って、今後の派生株は全て UAG が意味を持たない。ちなみに、Blank(DE3) 株は様々な非天然型アミノ酸を UAG に割り当てられるため、研究・産業に革命をもたらし得る。同様に、必須遺伝子における、27カ所の AGG コドンと7カ所の AGA コドンを同義置換した。全ての必須遺伝子から AGG/AGA を除去したわけではなく、AGG を保持する必須遺伝子が6つ、AGA を保持する必須遺伝子は65個残っている。6つの AGG 必須遺伝子に関しては、AGG を除去した上で、プラスミド上にクローニングした。

(3) 次に、アルギニンの tRNA を操作し、AGA コドンと AGG コドンを翻訳する tRNA を分離した。一般的に、AGA を翻訳する tRNA は AGG も強く翻訳する。しかし T4 フェージの tRNA は AGG の翻訳が苦手であり、更に発現量を限界値まで下げることで、AGA/AGG 両方の翻訳を担えなくなった。そこに AGG のみを翻訳する外来 tRNA を発現させれば、AGG コドンの意味を上書きできる。温度感受性のプラスミド上に元の tRNA を載せておくことで、必須遺伝子の操作が簡単かつ切れ味よく行えた。

(4) AGG にホモアルギニンを導入するシステムを開発した。すでに研究室において、TAG にホモアルギニンを導入するシステムがあったので (小林隆嗣 2009) これを実用レベルまで効率化し、HarRS (R61K, H63Y, S193R, N203T, L305H, L309W, N346D, C348S, L367M, Y384F, K429M, K431M, D433G, and G444E) を完成させた。更に AGG コドンに対応させた。強い正電荷の非天然型アミノ酸導入系は非常に珍しく、またメタン古細菌のピロリジン導入系は AGG コドンに应用できないと信じられているため、技術的観点からみて大幅な進歩である。従って、図1のように、T4 フェージの tRNA が AGA のみを、AGG にはホモアルギニンを強制的に割り当てる。

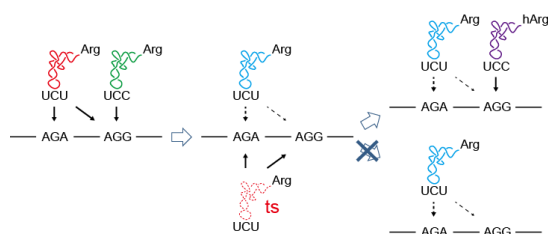


図1 AGA と AGG の読み分け (ts は温度感受性の意味、Arg はアルギニン、hArg はホモアルギニンを意味する。)

(5) AGG 翻訳能の温度感受性を相補させる実験系を組んだ。必須遺伝子から AGG を除去するため、ゲノムから 27 カ所、プラスミド上で 11 カ所改変した大腸菌を用いた。この大腸菌は制限温度下で、AGA だけなら増殖可能なレベルに翻訳できるが、AGG を翻訳するアルギニン tRNA を必要とする。アルギニンの代わりに、AGG をホモアルギニンとして翻訳したところ、驚くべきことに、割合良く増殖することが分かった(図2)。ホモアルギニンを与えない場合にも少し増殖するが、細胞内のホモアルギニンを含む、何らかのアミノ酸のミスチャージであろう。従って、この大腸菌は、AGG = ホモアルギニン割り当てに依存して、よく増殖するようになる。この結果は、従来報告されていたようなミス・インコーポレーションやミス・センス・サプレッションとは異なり、新しい割り当てがむしろ好ましい影響を及ぼしている。

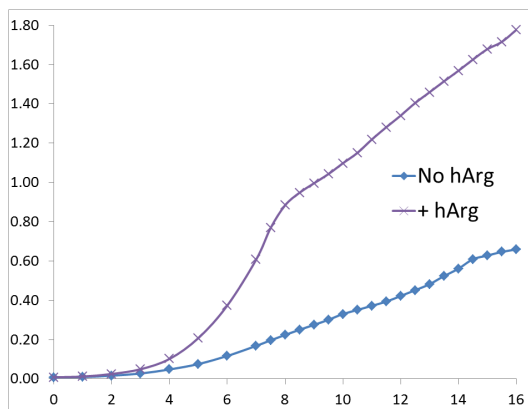


図2 AGG をホモアルギニンに再指定した大腸菌の増殖曲線(培養液の濁度 OD600 と培養時間 (h) の関係)

(6) AGG コドンの位置における、アルギニンとホモアルギニンの互換性を評価した。(5)においては、6つの必須遺伝子がプラスミド上にクローニングされ、11カ所のAGGコドンが除去されていたため、AGGが翻訳されなくても、全ての必須遺伝子の発現は期待できる。今回は、この6つの必須遺伝子を改変しないままに据え置いた。全く予想外な事に、AGGをホモアルギニンとして翻訳する事で、これらの必須遺伝子を十分に機能させることができた。つまり、ホモアルギニンを与えた場合には良く増殖し、ホモアルギニンを与えない場合や、ホモアルギニンアナログのL-NIL(HarRSの基質)を与えた場合には、全く増殖しなかった(図3)。従って、これら11カ所のAGGコドンの位置は、アルギニンとホモアルギニンのどちらでもよいという事になる。

(7) ホモアルギニン置換で機能を維持した必須遺伝子には、RNase P や RF2 など、十分なタンパク質分子数が必要とされるものも

多く、僅かに残存する AGG = アルギニンの翻訳活性では、これほどの増殖能を説明できない。ホモアルギニンとアルギニンの高い互換性と考えるべきである。これらの必須遺伝子の立体構造におけるアルギニン残基の役割を調べると、活性中心からフォールディング、複合体形成面と、広く使われていた。従って、一般的にホモアルギニンとアルギニンは良く似ているようだ。

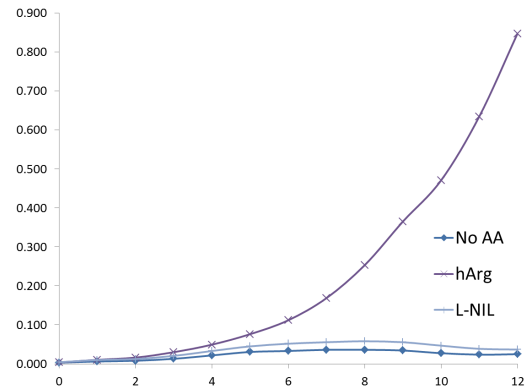


図3 AGG をホモアルギニンに再指定した大腸菌の増殖曲線(培養液の濁度 OD600 と培養時間 (h) の関係、hArg はホモアルギニン、L-NIL はホモアルギニンアナログ、No AA はどちらの amino acid も添加なしを意味する。)

(8) 最後に、AGG = ホモアルギニン割り当てを有する大腸菌の、株化を行った。これまでの細胞集団は、プラスミド上から T4 フェージの tRNA^{Arg} を発現していた。しかし、継代を重ねるにつれ、プラスミドコピー数の増えた集団が発生し、ホモアルギニン依存性を徐々に失った。プラスミドコピー数の制御は非常に厳密な仕組みで行われているため、突然変異率の高い状況では、仕組みを維持できなかったのだろう。そこで、T4 フェージの tRNA^{Arg} の発現系を、ゲノムにノックインして、さらに AGG をホモアルギニンに割り当てた。予想通りに、強いホモアルギニン依存性を示した。

(9) 本研究をまとめると、UAG コドンが意味を持たず、AGG コドンにホモアルギニンを割り当てた、人工の遺伝暗号を有する大腸菌株を樹立した。従って、終止コドンもセンスコドンも、新しいアミノ酸を追加するために利用できる。遺伝暗号が今なお進化の途上であることが示され、標準アミノ酸が 20 種類である必然性は、もはや確固たるものではなくなった。また、原始的な遺伝暗号においては、類似したアミノ酸が両義的に割り当てられていたと考えられている。従って、アルギニンからホモアルギニンへの人為的進化を詳しく調べることで、標準遺伝暗号が確立した進化的パスウェイの解明を、実験的に検証していくことが可能になった。

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)

該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

向井 崇人 (MUKAI, Takahito)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエ
ンス技術基盤研究センター・基礎科学特別
研究員

研究者番号：40612114