

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 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：24710256

研究課題名(和文)人工塩基対システムにより遺伝暗号を拡張したタンパク質合成系の開発

研究課題名(英文)Development of a translation system using expanded genetic alphabets through unnatural base pairs

研究代表者

木本 路子(Kimoto, Michiko)

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・上級研究員

研究者番号：20415144

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)：本研究課題では、翻訳システムにおける疎水性の人工塩基を含む新たなコドン-アンチコドンの相互作用の検証をとおして、翻訳系にも人工塩基対システムを拡張し、人工塩基対をDNA中に組み込むことで遺伝暗号を拡張した人工タンパク質の合成系の開発をめざす。
具体的には、疎水性人工塩基を組みこんだmRNAやtRNA調製法の確立、無細胞タンパク質合成系を利用したペプチド合成の検証をおこない、今後のさらなる人工塩基拡張タンパク質合成系の開発に重要となる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：For the expansion of the genetic alphabet of DNA, we studied several codon-anticodon interactions in a cell-free translation system involving hydrophobic unnatural bases. For this project, we mainly worked on to establish efficient transcription systems and their template DNA preparation methods which allow incorporation of hydrophobic unnatural bases at desired positions into DNA and RNA. The results found from this project would open up further development on a translation system involving unnatural base pairs orthogonal to natural base pairs.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：人工塩基対 翻訳 転写 複製 tRNA mRNA T7 RNA ポリメラーゼ 無細胞タンパク質合成系

1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループでは、人工的に作り出した第三番目の塩基対(人工塩基対)を DNA 中に組み込み、遺伝情報を拡張する技術開発を行っている。複製・転写・翻訳で機能する人工塩基対の研究は、既存の遺伝子組換え技術の枠組みを超えたバイオテクノロジーを創出するだけでなく、2 種類の天然型塩基対を基本とする地球上の生物システムへの理解を深めることのもつながら、海外でも大変注目されている研究分野の一つである。申請者らのグループは、既に、転写と翻訳で機能する水素結合性の人工塩基対 s-y を開発した(Hirao et al. Nat. Biotechnol. 2002)。しかし、s-y 塩基対は複製での選択性が低く、転写・翻訳に用いる鋳型 DNA を複製により増幅することができず、人工アミノ酸導入にむけた実用的なタンパク質合成系とは言えなかった。

その後、申請者らは、複製と転写で機能する疎水性の人工塩基対 Ds-Pa (Hirao et al. Nat. Methods 2006)や PCR でも高効率・高選択性で機能する Ds-Px (Kimoto et al. Nucleic Acids Res. 2009)を開発した。特に Ds-Px 塩基対の PCR での選択性は実用化レベルに達し、PCR 100 サイクルで 10^{28} 倍に増幅された DNA 中でも、97%以上の Ds-Px 塩基対が保持された (Yamashige et al. Nucleic Acids Res. 2009)。また、人工塩基対を用いた転写では、鋳型 DNA 中の Ds および Pa に対して相補的に、様々な修飾 Pa 誘導体や Ds 塩基類似体をそれぞれ位置選択的に RNA へ導入することができるようになった。

疎水性人工塩基対が複製と転写で機能することは、申請者のグループが 2006 年に世界に先駆けて明らかにした以外に、海外グループからも 2010 年に報告された。しかし、翻訳において疎水性申請者らは、疎水性人工塩基対に隣接する天然型塩基対によって隣接塩基の違いが二本鎖形成能に及ぼす影響を調べた結果、隣接する天然型塩基によっては自己相補的な Ds-Ds 塩基対が二本鎖中で G-C 塩基対に匹敵する熱安定性を示すことを明らかにした。以上の背景から、複製と転写で機能する疎水性の人工塩基対を翻訳系にも拡張して、疎水性の人工塩基対をコドン-アンチコドン相互作用に組み込んだタンパク質合成系を開発することは、大変意義があることであり、本申請課題とした。

2. 研究の目的

生物の翻訳システムを利用して、人工アミノ酸を部位特異的にタンパク質中に導入することが可能になれば、試験管内や細胞内で、新しい機能を付加したタンパク質を作り出すことができる。本研究課題の申請時における当初の研究目的は、翻訳過程における疎水性人工塩基を含む新たなコドン-アンチコ

ドンの相互作用を網羅的に解析・検証することで、翻訳系にも人工塩基対システムを拡張し、人工塩基対を DNA 中に組み込むことで遺伝暗号を拡張した人工タンパク質合成系を開発すること、である。

3. 研究の方法

当初の研究計画として、以下、(1)(2)のステップを繰り返すことで、人工アミノ酸の部位特異導入に向けた、人工塩基対によるタンパク質合成システムを構築し、最適化する方針とした。

(1) 疎水性人工塩基を組み込んだ mRNA の調製 - 各種 mRNA、tRNA を組み込んだ mRNA、tRNA の調製、転写による人工塩基を組み込んだ各種 mRNA の調製、tRNA のアミノアシル化

(2) タンパク質合成系での疎水性人工塩基を含むコドン-アンチコドン相互作用の解析 - 各種無細胞タンパク質合成機を利用したペプチド合成、GFP などのレポータータンパク質の合成

本研究期間では、(1)の 、 、また(2)の に重点をおいて、研究を進めた。

4. 研究成果

平成 24 年度は、疎水性人工塩基を組み込んだ mRNA と tRNA を用いた無細胞タンパク質合成系において、FLAG タグを含むペプチドの合成により、人工塩基を組み込んだコドン-アンチコドンが機能するかどうかを簡便に解析する系の確立に取り組んだ。具体的には、これまでの報告例をもとに、本研究に適すると思われる配列 3 種を選定し、天然型塩基のみからなる mRNA または鋳型 DNA を用いて、S35 または 14C 標識アミノ酸存在下でペプチド合成を行い、もっとも効率よく合成される配列とその翻訳条件を決定した。次に、疎水性人工塩基対 Ds-Ds を組み込んだコドン-アンチコドンの組み合わせに焦点を絞り、人工塩基 Ds を組み込んだ各種 mRNA・tRNA をデザインし、mRNA と tRNA の鋳型 DNA の調製を終え、T7 転写により、Ds を特定の位置に組み込んだ各種 mRNA の調製をおこなった。この Ds を組み込んだ mRNA を用いて、ペプチド合成を行った結果、人工塩基を組み込んだ tRNA の非存在下では、ペプチド合成は検出されないことを再現性よく確認でき、人工塩基を組み込んだ tRNA を添加した場合でのペプチド合成の可否を簡便に検出できる系を確立した。また、本研究では、T7 転写による RNA 調製において、疎水性人工塩基の取り込み選択性と効率が非常に重要となるため、長鎖 RNA のための鋳型 DNA 調製法、さらには疎水性人工塩基に対して高い選択性を有する T7 RNA ポ

リメラーゼ変異体の探索にも着手した。

平成25年度は、無細胞タンパク質合成系の中でも、特定の tRNA とアミノ酸だけを加えて、ペプチド合成を検証可能な系を有する研究室との共同研究をスタートさせた。天然型塩基のみからなるコドンやアンチコドンとの認識も検証可能となったため、昨年度構築した配列を用いず、疎水性人工塩基対 Ds-Ds および Ds-Pa 誘導体を混む込んだコドン-アンチコドンの組み合わせを、共同研究先の知見をもとにして、よりよい形で新たにデザイン・調製する計画に変更した。申請者の研究室では、転写による Pa の RNA 中への取り込み選択性については詳細を検討していたが、Ds については隣接塩基の違いによる取り込み効率、選択性についてはこれまで調べてなかった。また、鋳型の調製においても、詳細なレベルでの PCR の選択性と効率を調べていなかった。翻訳での選択性を正確に評価するためにも、RNA 中への Ds の取り込み選択性、また、さまざまな塩基配列下での人工塩基の複製での選択性は、必須であり、現在これらの実験に集中して、研究を進めている。最終年度中に、ペプチド合成、そしてタンパク質合成の検証まで進めることができなかったが、本研究は今後も継続し、tRNA, mRNA の大量調製、ペプチド合成の検証を共同研究先と進めていく予定である。また、米国の研究室との共同研究で同定した、人工塩基の取り込みに有望と思われる T7RNA ポリメラーゼの変異体においても、転写における疎水性人工塩基の取り込み効率について、本研究課題を通して得られた知見をもとにして、さらに検証を進める予定である。また、鋳型調製に必要な人工塩基対を含む PCR の精度改良は、人工塩基対の複製の機構にも深くかかわっており、in vitro や in vivo での人工塩基対が関与可能なさまざまな合成生物学の分野での基礎研究・応用研究につなげていきたい。

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6件)

1. M. Kimoto, Y. Hikida, I. Hirao. Site-specific functional labeling of nucleic acids by in vitro replication and transcription using unnatural base pair systems. *Israel. J. Chem.* 査読有、53, 2013, 450-468. 10.1002/ijch.20130013.

2. M. Kimoto, R. Yamashige, K. Matsunaga, S. Yokohama, I. Hirao. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat. Biotechnol.* 査読有、31, 2013, 453-457. 10.1038/nbt.2556.

3. Hirao I, Kimoto M, Yamashige R. Natural versus artificial creation of base pairs in DNA: origin of nucleobases from the perspectives of unnatural base pair studies. *Acc. Chem. Res.* 査読有、45, 2012, 2055-65/ 10.1021/ar200257x.

4. Ishizuka T, Kimoto M, Sato A, Hirao I. Site-specific functionalization of RNA molecules by an unnatural base pair transcription system via click chemistry. *Chem. Commun.* 査読有、48, 2012, 10835-7. 10.1039/c2cc36293g.

5. Hirao I, Kimoto M. Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 査読有、88, 2012, 345-67. 10.2183/pjab.88.345.

6. Kimoto M, Yamashige R, Yokoyama S, Hirao I. PCR amplification and transcription for site-specific labeling of large RNA molecules by a two-unnatural-base-pair system. *J. Nucleic Acids.* 査読有、2012, 230943. 10.1155/2012/230943.

[学会発表](計12件)

1. Michiko Kimoto, Ichiro, Hirao. Thermal stability of hydrophobic unnatural base pairs in duplexes. XVIth SCNAC, 2014年6月8日~13日(発表予定), チェコ・チェスキークルムノフ

2. Michiko Kimoto, Ichiro Hirao. Variation of Genetic Alphabets of Nucleobases. International Astrobiology workshop 2013, 2013年11月28日~30日、相模原・JAXA

3. 木本路子、「複製可能な人工塩基対を組み込んだDNAを創る」、「細胞を創る」研究会6.0、2013年11月14日~15日、慶応技術大学鶴岡タウンキャンパス

4. Michiko Kimoto, Ken-ichiro Matsunaga, Rie Yamashige, Ichiro Hirao. High-affinity DNA aptamer selection by a genetic alphabet expansion PCR system. 第51回日本生物物理学会年会シンポジウム。2013年10月28日~30日、国立京都国際会館

5. Michiko Kimoto, Ken-ichiro Matsunaga, Rie Yamashige, Ichiro hirao. Expanding the Genetic Alphabet for Generating High-affinity DNA Aptamer. OTS Annual Meeting 2013, 2013年10月6日~8日、イ

タリア・ナポリ

6. Michiko Kimoto. Site-specific functional labeling of RNA molecules by using unnatural base pair systems. The 65th Fujihara Seminar International Symposium on Synthetic Biology of Unnatural Base Pairs and Amino Acids. 2013年10月1日～4日、北海道・苫小牧

7. Michiko Kimoto, Rie Yamashige, Ichiro Hirao. Site-specific labeling of RNA by a replication-transcription system using a genetic alphabet expansion with two unnatural base pairs. 3rd International Conference on Nucleic Acid-Protein Chemistry and Structural Biology. 2013年9月13～15日、米国・アトランタ

8. Michiko Kimoto, Rie Yamashige, Ken-ichiro Matsunaga, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Hirao. Creation of DNA aptamers using libraries with five different bases by an unnatural base pair system. 第39回国際核酸化学シンポジウム、2012年11月13日～15日、名古屋大学豊田講堂

9. Rie Yamashige, Michiko Kimoto, Yusuke Takezawa, Akira Sato, Tsuneo Mitsui, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Hirao. The third base pair 'Ds-Px' in PCR amplification. XX IRT-20th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2012年8月5日～9日、カナダ、モントリオール

10. 石塚匠、木本路子、佐藤旭、横山茂之、平尾一郎. 人工塩基対システムおよびクリック反応による機能性 RNA の部位特異的修飾. 第14回日本RNA学会年会、2012年7月18日～20日、東北大学百周年記念会館

11. Takumi Ishizuka, Michiko Kimoto, Akira Sato, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Hirao. Site-specific labeling of RNA molecules by an unnatural base pair transcription system coupled with click chemistry. Fluorescent Biomolecules and their Building Blocks - Design and Applications, 2012年7月5日～8日、スウェーデン ヨーテボリ

12. Michiko Kimoto, Yasushi Hikida, Shuang Liu, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Hirao. Site-specific fluorescent probing of RNA molecules by an unnatural base pair system and its applications. Fluorescent Biomolecules and their Building Blocks - Design and Applications, 2012年7月5日～8日、スウェーデン ヨーテボリ

〔図書〕(計 1 件)

Michiko Kimoto, Ichiro, Hirao. Creation of Unnatural Base Pair Systems Toward New DNA/RNA Biotechnologies. Springer-Verlag, Chemical Biology of Nucleic Acids -Fundamentals and Clinical Applications- RNA Technologies, 2014, 131-148.

ホームページ等

<http://protein.gsc.riken.jp/hirao/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

木本 路子 (KIMOTO, Michiko)
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・上級研究員
研究者番号 : 20415144