

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291035

研究課題名(和文) 遺伝暗号改変による翻訳後修飾タンパク質の革新的生産技術開発

研究課題名(英文) Novel protein-synthesis technology achieving the installation of posttranslational modifications and other chemical modifications through genetic code expansion

研究代表者

坂本 健作 (SAKAMOTO, KENSAKU)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・グループディレクター

研究者番号：50240685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝暗号の改変によって、翻訳後修飾等の化学修飾を望みの部位に導入したタンパク質を均一かつ大量に生産する技術の開発を行った。共同研究を通じて、開発された技術が他の研究者の研究にも有用であることを示すことも研究目標の1つである。非天然型アミノ酸のタンパク質への導入効率を高めるために、RF-1を除去し、ゲノムの大規模改変を施した大腸菌ホスト株の開発に成功し、ニトロチロシン、アセチルリジンなどの翻訳後修飾をタンパク質に自由に導入することを可能にした。農研機構との共同研究によって、シルクに非天然型アミノ酸を組み込むために、カイコの遺伝暗号の改変にも取り組み、アジド基含有シルクの高い生産性を実現した。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel protein-synthesis technology that allows the incorporation of posttranslational modifications and other chemical modifications into protein at desired sites. It was one of the primary target of this study to collaborate with scientists in other fields and demonstrate the usefulness of the developed technology. To increase the productivity of proteins containing non-natural amino acids, release factor I was eliminated from E. coli host cells, accompanied by a large-scale genomic modification, and this engineering greatly facilitated the incorporation of nitrotyrosine, acetyllysine and other posttranslational modifications. Through the collaboration with NARO, an agriculture-related institute, the genetic code of silkworms was modified in a way that led to a great increase of the yield of silk with azido groups, useful for industrial purposes.

研究分野：合成生物学

キーワード：拡張遺伝暗号 非天然型アミノ酸 アミノアシルtRNA合成酵素 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

生物学的機能の制御や変調において、タンパク質の翻訳後修飾が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。ストレス等によって引き起こされるタンパク質のチロシン・ニトロ化は、移植や疾病における生体反応を理解する上で重要なファクターである。生体内でのタンパク質の翻訳後修飾には3つの特徴(部位特異性、多重性、多様性)があり、これらの特徴を再現して修飾タンパク質を均一・大量に調製する技術の開発が求められていた。

2. 研究の目的

遺伝暗号システムの改変によって、翻訳後修飾などの化学修飾を望みの部位に導入したタンパク質を、均一かつ大量に生産する技術の開発を目的とした。開発された技術を他の研究者に提供することも意図している。

3. 研究の方法

研究目的を達成するため、2つのアプローチを行う。

(1) tRNA に修飾アミノ酸を結合するアミノアシル tRNA 合成酵素変異体の開発である。チロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) の改変によって、ニトロチロシンを tRNA に結合させ、タンパク質に導入できる TyrRS 変異体などを開発する。

(2) 修飾アミノ酸などの非天然型アミノ酸を効率よくタンパク質などに導入するために適した大腸菌宿主株を作製する。すでに RF-1 をノックアウトした大腸菌株の作製に成功していたので、この研究の方向性をさらに追求して実用性の高い大腸菌宿主の開発を行う。

4. 研究成果

(1) 修飾アミノ酸導入のためのアミノアシル tRNA 合成酵素変異体の開発

古細菌由来のチロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) を改変して、ニトロチロシンを tRNA に結合させる変異体を開発した。この変異体 (nYRS) を用いて、大腸菌で発現されるリコンビナント・タンパク質に効率良くニトロチロシンを導入できることを確認した。これまでに他の研究グループから報告されている nYRS 変異体と導入効率を比較する実験を行って、ニトロチロシンを導入したタンパク質の生産量が 10 倍以上に改善されることが示された。従来の変異体の効率では実用的なタンパク質生産に利用することは事実上難しく、本研究で初めてニトロチロシン化タンパク質を効率良く生産できるようになった。タンパク質のチロシン・ニトロ化は生体のストレス応答に係っており、ニトロ化部位もタンパク質上の複数個所に及ぶことがある。修飾アミノ酸の導入に優れた大腸菌株 (RFzero) を用い

ることで、1つのタンパク質分子中の3か所まで同時にニトロチロシンを導入できることがわかった。nYRS-RFzero システムは、ストレス応答の分子メカニズムの解明に貢献すると考えている。

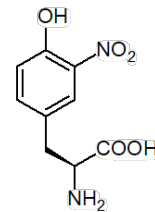


図1. ニトロチロシンの化学構造

ピロリシル tRNA 合成酵素 (PylRS) に多数の変異を導入して (R61K, H63Y, S193R, N203T, L305H, L309W, N346D, C348S, L367M, Y384F, K429M, K431M, D433G, G444E) ホモアルギニンを認識する変異体を作製することに成功した。この実験では、AGG コドンをホモアルギニンに割り当てることで、UAG コドンにはこれとは異なる非天然型アミノ酸を割り当てることを可能にした。

(2) 修飾アミノ酸の効率的導入のための大腸菌宿主株の開発

すでに大腸菌 RFzero 株の開発を報告していたが、翻訳後修飾アミノ酸や化学修飾アミノ酸を導入したタンパク質の大量生産にさらに適した大腸菌株の開発を行った。ニトロチロシンなどの修飾アミノ酸を遺伝的にコード化するために UAG コドンを利用するが、UAG コドンに対する修飾アミノ酸の導入効率を高めるためには、UAG コドンを読み取ってタンパク質合成を終了に導く生体内因子 RF-1 を不活化する必要がある。研究代表者は既に RF-1 欠損大腸菌 (RFzero 株) の作製に成功していたが、さらにタンパク質生産に適した大腸菌株にするべく、ゲノム中の UAG コドンの置換により RF-1 除去が大腸菌の増殖に与える致死的な効果を抑えるための研究開発を進めた。RFzero 株では、ゲノム中に 300 個程度存在する UAG コドンのうち、必須遺伝子の翻訳終結に使われている 7 個の UAG コドンを他の終止コドンに改変することで RF-1 の除去を可能にしていた。RFzero 株の増殖活性の向上を図り、様々な非天然型アミノ酸の導入を促進するために、さらに多くの UAG コドンを改変した大腸菌株 B-95.delA の作製を行った。最終的に 300 個の UAG コドンのうち、95 個の UAG コドンを他の終止コドンに改変することで、低温における増殖速度を高め、合成培地での増殖を可能にして、翻訳後修飾アミノ酸を組み込んだタンパク質の生産系として優れた大腸菌株を作り出すことができた。実際に、トロンピンに硫酸チロシンを組み込んだ組換えタンパク質が、従来法にくらべて高い純度

と生産量を持って生合成できることを示して、B-95.deIA株の実用性を示した。

1つのタンパク質に2種類の非天然型アミノ酸を導入することで、酵素(トランスグルタミナーゼ、TG)の自動活性化機構と耐熱化を同時に実現することに成功した。既に、RFzero株等の開発によって、1種類の非天然型アミノ酸であれば、UAGコドンを用いてタンパク質中の何か所でも導入することが可能になっていた。もう1種類の終止コドン(UAAまたはUGA)を利用することで、2種類目の非天然型アミノ酸を導入する試みは既に複数報告されているが、UGAコドンを利用する場合には非天然型アミノ酸の導入効率が低くタンパク質の大量生産が望めない。UAAコドンを利用する場合にはUAGコドンとの読みわけが困難であり、2種類のアミノ酸が互いのコドンに混入する問題が避けられない。そこで、2つの非天然型アミノ酸を導入する為に重複したセンス・コドンを利用した。アミノ酸2つめの非天然型アミノ酸を導入する為には、AGGコドンを翻訳するtRNA分子種の発現を特定条件下で抑制できるようなRF-1欠損株(B-95.deIA株の誘導体)を作製していた。AGGコドンはアルギニンの6つのコドンの1つある。対応するtRNA分子種の発現を強く抑制すると同時に、AGGコドンを非天然型アミノ酸に翻訳するtRNAを一過的に発現させて、2種類目の非天然アミノ酸の導入を実現した。

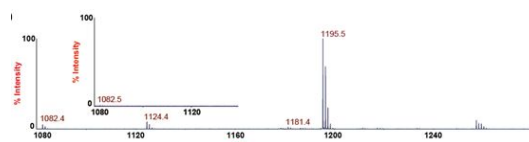


図2. AGGコドンへホモアルギニンが導入されたタンパク質の質量分析結果(ペプチド消化後)

寺本英敏博士(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)と共にカイコの絹タンパク質へアジド基を持った非天然型アミノ酸を効率よく導入するための技術開発を行った。カイコ由来のフェニルアラニン tRNA 合成酵素(PheRS)のアミノ酸結合部位に改変によってアジドフェニルアラニンの導入を目指した。報告されているヒト PheRS の結晶構造情報を元に、これまでに報告されている PheRS 変異体の結果を解析し、鎖 432 位のサチユレーション・ミュータジェネシスを実施した。アジドフェニルアラニンの導入レベルを調べるために、大腸菌のタンパク質にこの非天然型アミノ酸がランダムに導入された場合に生じる増殖阻害の程度を指標とセクションを進め、効率よくアジドフェニルアラニンを導入する変異体 PheRS(A432)及び PheRS(V432)を得て、トランスジェニック・カイコを作製してシルクへの導入を確認した。

変異体 PheRS のアミノ酸結合部位の構造モデルを作製することで、効率的な非天然型アミノ酸の導入のメカニズムを推測した。本研究成果は、平成 29 年度 3 月に論文で公表され(ACS Synthetic Biology 誌) 理研と農研機構との共同プレスリリースを行っただけでなく、30 年 4 月には米国の普及誌 New Scientists に取り上げられた。非天然型アミノ酸の導入技術開発が、一般的な応用に役立つことを示す成果である。



図3. 基質アジドフェニルアラニンと認識に関わる BmPheRS の2つの残基の位置関係を示す(分子モデル)

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)

H Teramoto, Y Amano, F Iraha, K Kojima, T Ito, K Sakamoto, Genetic Code Expansion of the Silkworm Bombyx mori to Functionalize Silk Fiber, 査読有、ACS Synthetic Biology 誌, 2018 年、7 巻、801-806 頁

Yamaguchi A, Matsuda T, Ohtake K, Yanagisawa T, Yokoyama S, Fujiwara Y, Watanabe T, Hohsaka T, Sakamoto K, Incorporation of a doubly functionalized synthetic amino acid into proteins for creating chemical and light-induced conjugates, 査読有、Bioconjugate Chemistry 誌, 2015 年、27 巻、198-206 頁

Wakamori M, Fujii Y, Suka N, Shirouzu M, Sakamoto K, Umehara T, Yokoyama S, Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation, 査読有、Scientific Reports 誌, 2015 年、5 巻、17204 頁
Ohtake K, Yamaguchi A, Mukai T, Kashimura H, Hirano N, Haruki M, Kohashi S, Yamagishi K, Murayama K, Tomabechi Y, Itagaki T, Akasaka R, Kawazoe M, Takemoto C, Shirouzu M, Yokoyama S, Sakamoto K, Protein stabilization utilizing a redefined codon, 査読有、Scientific Reports 誌, 2015 年、

5 卷、
9762 頁.

Mukai T, Hoshi H, Ohtake K, Takahashi M, Yamaguchi A, Hayashi A, Yokoyama S, Sakamoto K, Highly reproductive *Escherichia coli* cells with no specific assignment to the UAG codon, 査読有、Scientific Reports誌、2015年、5巻、9699 頁

Mukai, T., Yamaguchi, A., Ohtake, K., Takahashi, M., Hayashi, A., Iraha, F., Kira, S., Yanagisawa, T., Yokoyama, S., Hoshi, H., Kobayashi, T., Sakamoto, K., Reassignment of a rare sense codon to a non-canonical amino acid in *Escherichia coli*, 査読有、Nucleic. Acids Research 誌, 2015 年、43 巻、8111-8122 頁

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：トランスジェニックカイコ、および該カイコを用いた非天然アミノ酸含有タンパク質の製造方法

発明者：坂本健作、木村史枝、山口芳美、寺本英敏

権利者：理化学研究所、農研機構

種類：特許

番号：特願 2017-079294

出願年月日：2017 年 4 月 12 日

国内外の別：国内

名称：抗アセチル化ヒストン H4 抗体

発明者：梅原崇史、若森昌聡、蓑田亜希子、坂本健作、松田貴意、横山茂之

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2015-169223

出願年月日：2015 年 8 月 28 日

国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法、及びその利用

発明者：向井崇人、坂本健作、林明子、横山茂之

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：JP5858543

取得年月日：2016 年 12 月 25 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂本 健作 (SAKAMOTO, Kensaku)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・グループディレクター

研究者番号：50240685

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()