

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20710177
 研究課題名（和文）
 遺伝暗号の拡張を用いたエステル結合を含むポリマーの合成法の開発
 研究課題名（英文）
 Development of a method for the synthesis of polymers containing ester bond(s) by genetic code expansion
 研究代表者
 小林 隆嗣 (KOBAYASHI TAKATSUGU)
 独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・特別研究員
 研究者番号：90446518

研究成果の概要（和文）：エステル結合を含むポリマーを遺伝情報に基づいて合成できれば、規則正しいポリエステルの合成が可能となる。本研究では、リボソームにおけるエステル結合の導入を実現するために、アミノアシル tRNA 合成酵素のひとつを改変した。その結果、効率よくエステル結合の構成要素となる α -ヒドロキシ酸を認識する酵素が得られた。それらを用いることで、エステル結合を形成させるのに必要な α -ヒドロキシ酸が2つ連続して導入できる試験管内の系を確立することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Highly homogenous polyester can be synthesized by genetic-information-based synthesis of polypeptide-like polymers. In this study, an aminoacyl-tRNA synthetase was altered for the incorporation of ester bond into the polymers synthesized on ribosome. As a result, the mutant enzymes, which efficiently recognize the building block of the ester bonds, were found. By using these enzymes, the in vitro translation system that synthesizes polymers containing two serially polymerized α -hydroxyacids, was successfully established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子化学・生物分子化学

キーワード：遺伝暗号, 非天然型アミノ酸, 翻訳, tRNA, アミノアシル tRNA 合成酵素, タンパク質工学, ポリエステル, 高分子化学

1. 研究開始当初の背景

近年、高分子をデザインすることで、医薬・工学などに役立つ分子を開発する研究が重要視されている。医学的には、薬剤そのものや、薬剤運搬・開発のためのデバイスとして、工学的には、高性能のナノデバイスを作り出すうえで新しいポリマーは重要な技術基盤となる。また、均一なポリマーは、その高分子の特性の分析に必要である。これらの目的においては、長さ、構成要素およびその配列が均一なポリマーの容易な作製法が望まれる。

通常の溶液中での重合反応では、反応の進行や順序を制御するのが困難であるのに対し、生体内では均一かつ巨大なポリマーが遺伝情報に基づいて効率よく合成される。例えばタンパク質は、その分子の構成が遺伝情報に従って正確に規定される。しかし、リボソームで合成されるタンパク質の構成要素は、例外を除き遺伝暗号表に規定される 20 種類のアミノ酸に限定されるために、応用面での大きな制約となっていた。特に、プロリンを除けば全てが α -アミノ酸であり、主鎖構造はペプチド（アミド）結合でしか形成されず、人工的な改変・利用という点では重大な構造的制限があった。

2. 研究の目的

20 種類以外のアミノ酸、もしくはアミノ酸以外の構成要素を非センスコドンに対応する tRNA へと結合させ、遺伝情報に基づいてリボソーム上で重合させることで、その制約を乗り越えることができる（遺伝暗号の拡張）。そこで本研究では、遺伝暗号の拡張をアミノ酸以外にまで広げ、リボソームによる重合反応の際にエステル結合を形成することのできる α -ヒドロキシ酸をタンパク質へ

導入することで、新しい材料の基盤を開発することを目的とした。

以下に具体的な段階目標を示した。

(1) PyIRS によって認識されうる α -ヒドロキシ酸の多様性を増やし、また tRNA への結合の効率性を改良することにより、様々な α -ヒドロキシ酸をポリエステル合成に応用するための基盤を確立することを第一目標とした。そのためには、PyIRS の基質特異性を、タンパク質工学の手法によって改変し、目的の α -ヒドロキシ酸を効率よく認識できるようにする。本研究では、翻訳後に化学修飾が可能であるアジド基をもった α -ヒドロキシ酸認識型 PyIRS 変異体を作製し、合成されるポリエステルの化学的特性をさらに広げることを目指した。

(2) tRNA^{Py1} は終止コドンに対応するため、同じコドンに競合する翻訳終結因子の影響で、 α -ヒドロキシ酸の導入効率が低かった。そこで、tRNA^{Py1} のアンチコドンを変更し、結合している α -ヒドロキシ酸を任意のセンスコドンと対応させることで導入効率を上げることを目標とした。この際使用する翻訳系としては、コドン使用を操作できる試験管内翻訳系や大腸菌栄養要求性株を候補とした。

(3) (2) によるコドン拡張により、 α -ヒドロキシ酸を構成要素の主体とするポリマー、すなわちエステル結合を含むポリペプチドやポリエステルの合成を試みることを目標とした。(1) で作製される PyIRS 変異体を応用し、アジド基を導入することで、化学修飾可能なポリマーを作製することも視野に入れた。

3. 研究の方法

まず, Py1RS・tRNA^{Py1}の対を利用した α -ヒドロキシ酸 (HA) 導入のための遺伝暗号の拡張について概略を述べる (図 1). 野生型 Py1RS は特定の HA (Boc-Lys HA, 図 2) を認識し, tRNA^{Py1} へと効率よく結合させる. Py1RS は大腸菌内の tRNA を認識することはない. 一方 tRNA^{Py1} は終止コドンのひとつである UAG コドンに対応するアンチコドンをもつ特殊な tRNA であり, 大腸菌内の aaRS によってアミノ酸を付加されない. このため, Py1RS と tRNA^{Py1} の発現系を大腸菌に導入することにより, 図 1 のように細胞内で, 外から加えた HA より, HA-tRNA^{Py1} が特異的に生成し, 通常の翻訳系と同様にリボソームへと運ばれ, UAG コドンに対応して HA がポリペプチド鎖内に取り込まれることになる.

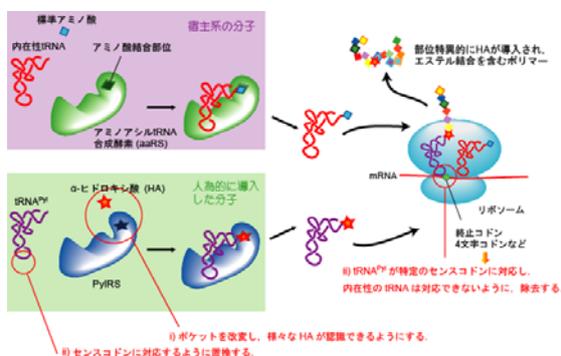


図 1 α -ヒドロキシ酸の遺伝暗号の翻訳を用いた導入

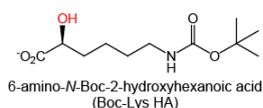
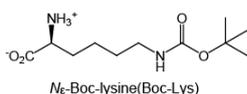
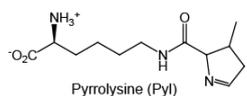


図 2 野生型 Py1RS によって認識される化合物

次に個別の方法について示した.

(1) まず, 野生型 Py1RS が α -ヒドロキシ酸

を効率よく認識する機構を明らかとする. そのためには, 構造情報をもとにした変異導入による α -ヒドロキシ酸の認識の変化やモデリングによる解析を通じた, 立体構造的な解析を行った. また, α -ヒドロキシ酸以外にも, α 位がアミノ基ではない種々の誘導体に対するアシル化活性を調べるという生化学的なアプローチにより, Py1RS の基質主鎖部分の認識機構の解析を行った.

(2) 目的(1)を達成するために, HA 認識に関わる主鎖側を認識する Py1RS の残基を, アミノ酸よりも HA をより好むように改変することにより, より生産性の高い HA 導入のための Py1RS 変異体を得ることを試みた. α -ヒドロキシ基認識部位周辺をランダムに置換するのみならず, 酵素全体にわたってランダムな置換を導入した変異体ライブラリを作製し, α -アミノ酸よりも HA に対してより高い活性を持つ Py1RS 変異体を得る. 大腸菌においては, HA の導入効率をレポーター遺伝子の発現で見ることが可能であるため, 合成効率の評価は容易である. 変異を導入すべき遺伝子としては, 野生型酵素のもののみならず, スクリーニングで得られたフェニルアラニンを特異的に認識する酵素も用いた.

(3) 試験管内翻訳系において, 人為的に使用コドンを減らすことができるか, またそのコドンに tRNA^{Py1} を対応させることができるかどうかを検討した. 野生型 tRNA^{Py1} と UAG コドンの対応には, 本来のコドンの相手である翻訳終結因子が競合する. そのため, 競合しないコドンへの HA の導入は, 複数の HA をリボソームで合成されるポリマーへと導入するうえで必須である. 試験管内翻訳系においては, 特定のアミノ酸を系から除き, さらにそのアミノ酸を基質とする aaRS を阻害する

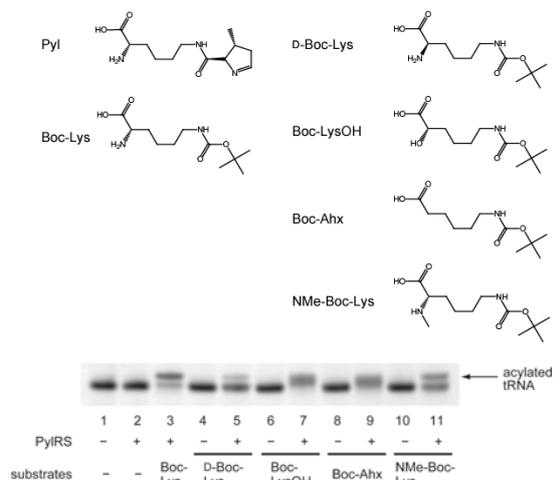
物質を共存させることで、特定コドンに何も対応しない「空白」を作ることができる。その空白コドンに対応するように tRNA^{Py1} のアンチコドンを変更したときに、tRNA^{Py1} 変異体が他の aaRS によって認識されないことを確認した。センスコドンとしては、フェニルアラニンに対応するコドンである UUC コドンを用いた。したがって、大腸菌試験管内翻訳系よりフェニルアラニンを除き、PheAMS (PheRS 阻害剤) を添加することで、空白のコドンを作った。さらに、そこに Py1RS と tRNA^{Py1} を添加し、フェニルアラニンコドンを遺伝子合成により除いた DHFR 遺伝子の 5' 側に UUC コドンに対応する塩基配列を並べていった。3' 側には FLAG タグを付加し、5' 側の連続する UUC コドンが Py1RS によって α -ヒドロキシ酸へ翻訳できているかを抗 FLAG 抗体により全長産物が検出できるかどうかで確認することができる。

4. 研究成果

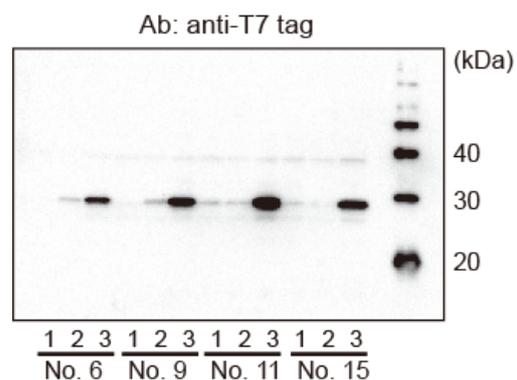
研究成果について、方法と対応して以下の通り示す。

(1) 野生型 Py1RS が α -ヒドロキシ酸のみならず、D-アミノ酸、 N_{α} -メチルアミノ酸、あるいは α 位の官能基が失われたカルボン酸のような、様々な構造をもった主鎖を認識することが明らかとなった (図)。このようなアミノアシル tRNA の報告はこれまでになかった。抗生物質や免疫抑制剤など、様々な生理活性を有する非リボソーム合成ペプチドの中には、これらの特殊な主鎖構造をもつペプチドが数多く含まれる。本研究で明らかとなった、Py1RS の幅広い基質認識は、生理活性ペプチドの設計図を遺伝子にコードして、規則正しく大量に合成させることができる可能性をもつ。また、 N_{α} 部分がメチル基以外に拡張できるならば、主鎖部分に特徴的な化

学特性を持たせることも可能になるであろう。



(2) 大腸菌内での Py1RS-tRNA^{Py1} による UAG コドンのサプレッションをもとにしたスクリーニングによって、300, 302, 346, 384 をランダムに置換した変異体のライブラリの中から、 α -ヒドロキシ酸を認識し、そのアミノ酸アナログは認識しない4つの変異体を得た (図)。いずれも 384 番の残基はチロシンからトリプトファンへと置換されていた。少ない残基置換によって、生命の共通ルールの



1. no NAA
2. +Boc-Lys (1 mM)
3. +Boc-OH (1 mM)

根幹をなす、「タンパク質の構成要素はアミノ酸である」という常識が覆される結果であり、生命の起源や進化を考える上で興味深い結果と言える。

(3) 試験管内翻訳系において、得られた変異体を利用して、本来のフェニルアラニンコドンである UUC コドンに対して、 α -ヒドロキシ酸を導入する実験を行った。その結果、通常のアンバーサプレッションもしくは、UUC コドン1つが孤立して存在する場合は、十分なサプレッションが観察された (図 1)。

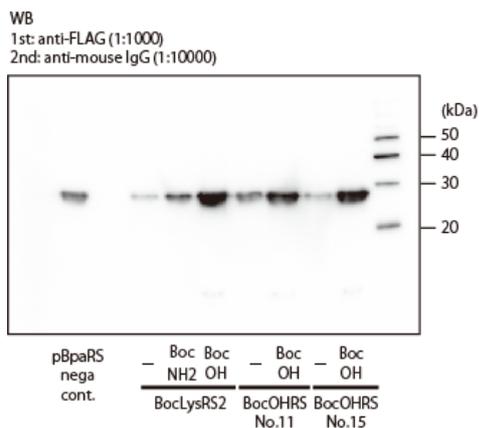


図 1

しかし、UUC コドンが 2 連続となるように配置すると、2 つのコドンをも α -ヒドロキシ酸に置き換えることができた。しかし、その効率は予想より低下した (図 2)。さらに UUC コドンを連続 10 個並べた場合のサプレッションを調べたが、全く検出できなかった。

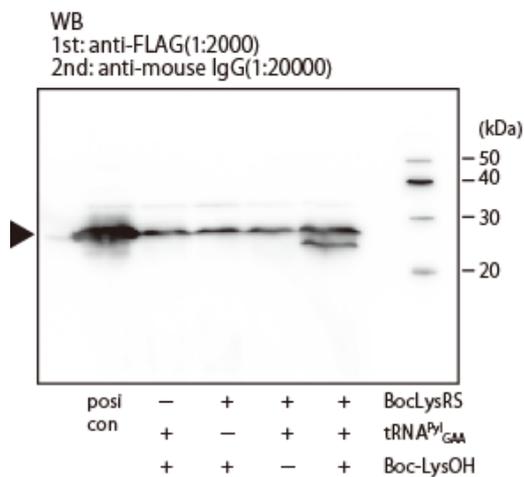


図 2

以上の結果は、他に報告されているリボソームによるエステル結合の合成の結果

(Ohta et al. *Chem. Biol.* 14, 1315-1322 (2007)) と異なっていた。そこで、当該論文と同様に多量の tRNA にプレチャージ法によって α -ヒドロキシ酸を結合させ、試験管内翻訳系へ導入したが、期待していたサプレッション効率には至らなかった。その理由として、tRNA^{Py1} の独特な構造が、大腸菌リボソームによる翻訳では問題となると考えられる。単独のコドンのサプレッションにおいては、リボソームの A, P, E サイトのうち、tRNA^{Py1} によっていずれかひとつが占有される。その時は翻訳複合体に大きな影響は与えない (図 1 参照)。しかし、連続したコドンに対して α -ヒドロキシ酸-tRNA^{Py1} によるサプレッションを期待する場合には、複数のサイトに同時に tRNA^{Py1} が入ることになる。70S リボソームの構造 (Selmer M. et al. *Science* 313, 1935-1942 (2006)) において、A site tRNA の U16 と P site tRNA の U47 が相互作用する。また、E site tRNA は、D ループ上の C17, G19 はそれぞれ 23S rRNA の 2180-81 と U2113 と相互作用している。これらの D ループ・バリアブルループ上の塩基は、tRNA^{Py1} では G19 を除いて通常の tRNA とは異なっている。つまり、C16, 17 にあたる塩基が tRNA^{Py1} にはなく、D ループは伸びた構造をとっている。また、U47 にあたる塩基の突出もない。このことで、連続した tRNA^{Py1} のリボソームへの結合が起こると、通常とは異なる相互作用をとらざるを得ず、翻訳が停止してしまうか、著しく速度が落ちるといふ結果になると考えられる。また、エステル結合の形成についても、化学的な性質上、アミド結合より遅くなるのは不可避である。

以上から、ポリエステル合成を目指す場合にはリボソームの大規模な改変が必要となるであろう。

しかし、連続しない複数のコドンへの α -

ヒドロキシ酸の導入については、まだ検討の余地があると考えられる。また、大腸菌リボソーム自体を改変することで、サプレッション効率を高めることができるかもしれない。

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1件)

小林隆嗣，柳沢達男，坂本健作，横山茂之，
Journal of Molecular Biology, 査読有, Vol.
385, 2009, 1352-1360

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：エステル結合を含む非天然タンパク質の製造方法

発明者：横山茂之，柳沢達男，向井崇人，小林隆嗣

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2008/071221

出願年月日：2008年11月21日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 隆嗣 (KOBAYASHI TAKATSUGU)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・特別研究員

研究者番号：90446518