

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K12741

研究課題名(和文)新遺伝暗号の創成

研究課題名(英文)Creating neo-genetic code

研究代表者

村上 裕 (MURAKAMI, Hiroshi)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10361669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、新遺伝暗号をもつ試験管内翻訳系を構築し、新遺伝暗号に基づいた蛋白質生合成が可能であることを示した。例えば、新遺伝暗号で設計したストレプトアビジン、新遺伝暗号を持つ翻訳系で発現した時のみビオチン結合活性を示し、普遍遺伝暗号では、全くビオチン結合活性は示さなかった。この時、両方の翻訳系においてタンパク質発現が確認されていることから、本遺伝子は新遺伝暗号でのみ正しいアミノ酸配列で発現していると考えられる。今回作成した新遺伝暗号を持つ試験管内翻訳系は、将来、遺伝子の拡散が心配される蛋白質の安全な発現を可能にすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A translation system employing a neo-genetic code could be a safe and useful tool, because it has a genetic code orthogonal to that of organisms on earth. Here, we developed a cell-free in vitro translation system employing a neo-genetic code. We designed a streptavidin gene based on the neo-genetic code, and expressed it in a translation system employing either a neo-genetic code or the universal genetic code. The protein produced in the translation system employing a neo-genetic code showed biotin binding activity, whereas that produced in the translation system employing the universal genetic code showed no activity. This result indicates that the former protein had the correct amino acid sequence of streptavidin, whereas the latter had a meaningless amino acid sequence, although both proteins were produced from the same gene. The new translation system could be used for safe expression of proteins whose genes are harmful to natural environments and life.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：遺伝暗号 翻訳 tRNA

1. 研究開始当初の背景

2010年にアメリカのDr. J. Craig Venterらにより、化学合成したゲノムをもつ細菌が報告された(*Science* 2010)。彼等は、約 10^6 塩基対からなる *Mycoplasma mycoides* のゲノムを細分化して化学合成し、酵母を用いて張り合わせながらゲノムを作製し、これを近縁の *Mycoplasma capricolum* に移し替えることで、化学合成したゲノムをもつ生物を作製した。彼等の研究は、化学合成ゲノムを持つ生物が作製できることを実証した点で高く評価できるものである。しかし、一方では、作製された生物は基本的に元のゲノムを基にした(所々に人工的な変化を加えているが)ものであり、通常の生物と何ら変わるものではないという見方がある。

我々は、以前に tRNA^{Leu} のアンチコドンループを tRNA^{Ala} と同じものに置き換えることで Ala のコドンに Leu を指定し、tRNA^{Ala} についての基礎研究を行った(Murakami, H. et al., *Nature Structural & Molecular Biology* 2009, 16, 353-8.; 責任著者)。これは Leu の大腸菌アミノアシル tRNA 合成酵素が、対応する tRNA のアンチコドンループを認識しないことを利用した研究である。また Leu 以外に Ser、Ala について、大腸菌アミノアシル tRNA 合成酵素が、対応する tRNA のアンチコドンループを認識しないことが知られている。そのため我々は、2010年のDr. J. Craig Venterらの報告を読んだ際に、もしゲノムの Ser、Leu、Ala のコドンを完全に入れ替え、これに合わせた新遺伝暗号を tRNA のアンチコドンループを入れ替えて作製すれば、地球上の生物とは遺伝子交換を行わない、新たな生命体が生まれると考えた。そこで、新遺伝暗号をもつ無細胞翻訳系の構築を目指し、研究計画・方法で示した予備実験を進めていた。本研究課題は、このような背景の中、将来における新しい生命の構

築に向けた第一歩として、新遺伝暗号を提案するものである。また開発される無細胞翻訳系は、遺伝子の拡散が懸念される蛋白質の安全な生合成に応用できると考えられる。

本研究内容に近いものとしては、Dr. George M. Churchらによる、大腸菌ゲノム中の314個のTAG終止コドンをすべてTAA終止コドンに置き換えた研究がある(*Science* 2011)。彼等は、TAG終止に関わるRF1遺伝子を、この大腸菌のゲノムから除くことにより、TAGコドンを空白にしたり、TAGコドンに非蛋白質性アミノ酸を指定することができるとしている。しかし、この遺伝暗号に基づく遺伝子は、生物がTAGコドンを読む抑制tRNAを獲得するだけで簡単に翻訳が可能になるため、既存の生物と直交する遺伝子にはならない。本提案による新遺伝暗号に基づく遺伝子は、Ser、Leu、Alaのコドンが置き換わっており、通常の生物では全く意味をなさない。そのため既存の生物と直交する遺伝子になると考えられる。将来は、この概念により人工生命が作製され、様々な応用が生まれると考えている。また、本課題で得られる無細胞翻訳系は、遺伝子拡散が懸念される蛋白質の安全な生合成に利用できる。例えば、P3、P4のような封じ込めが必要なウイルスや多剤耐性菌が持つ遺伝子を新遺伝暗号でコードし直すことで、通常レベルの研究設備で創薬標的蛋白質を生合成可能になると考えられる。

2. 研究の目的

新遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系の構築を行う。新遺伝暗号をもつ生物は、地球上の生物とは遺伝子交換を行わない安全な人工生命体になると考えられる。本研究課題では、新遺伝暗号をもつ無細胞翻訳系を構築し、新遺伝暗号に基づいた蛋白質生合成が

可能であることを示す。さらに数種類の新遺伝暗号を用いて蛋白質合成を試みることで、新遺伝暗号の設計指針を得る。また新遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系は、遺伝子の拡散が心配される蛋白質の安全な発現を可能にする。本研究課題の遂行により、新遺伝暗号について多くの知見を得ると共に、遺伝子の取り扱いに注意を要する蛋白質を安全に合成できる無細胞翻訳系の構築が達成される。

3. 研究の方法

新遺伝暗号をもつ無細胞翻訳系を構築し、これを用いた蛋白質合成について検証する。まず、翻訳に必要な tRNA の配列を持つ鋳型 DNA を設計して、化学合成したオリゴヌクレオチドを組み合わせて、PCR により調製した。これを鋳型として転写 tRNA 群を T7 RNA ポリメラーゼによる試験管内転写反応で作製し精製した。次に、大腸菌の再構成無細胞翻訳系から tRNA を除いたものを調製し、これに上記の転写 tRNA 群を加えた。さらに、普遍遺伝暗号に基づいて設計したストレプトアビジン遺伝子を加えて翻訳を 37°C で行った。翻訳後に翻訳反応液をニトロセルロース紙上にスポットして、牛血清アルブミンによりブロッキングを行った後に、ビオチン標識ペルオキシダーゼを加えてインキュベーションした。ニトロセルロース紙を洗浄後に、固定化されたペルオキシダーゼの固定化量を、化学発光を利用した検出法によって定量した。また別の実験で、翻訳の際に¹⁴C]-Asp を翻訳系に加えて、翻訳反応を行った。翻訳後に翻訳反応液を、ドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) と、その後のラジオアイソトープの検出により分析した。検出されたバンドの強度から、タンパク質の翻訳量を算出した。

また同様の方法で、転写 tRNA 群の中の tRNA^{Leu} と tRNA^{Ser} のアンチコドンループを入れ替えた tRNA 群を調製した。これを、Leu と Ser を入れ替えた新遺伝暗号(S↔L)に基づいて設計したストレプトアビジン遺伝子とともに翻訳をした。ストレプトアビジンの活性や、翻訳されたタンパク質量の定量は、普遍遺伝暗号の際と同様に行った。さらに、Leu と Ser と Ala を入れ替えた(S↔L↔A)についても、同様に転写 tRNA 群を作成して、新遺伝暗号(S↔L↔A)に基づいて設計したストレプトアビジン遺伝子とともに翻訳をした。

さらに直交性を確認のため、普遍遺伝暗号、新遺伝暗号(S↔L)、新遺伝暗号(S↔L↔A)について、tRNA 群(普遍遺伝暗号)、tRNA 群(S↔L)、tRNA 群(S↔L↔A)と、ストレプトアビジン遺伝子(普遍遺伝暗号)、ストレプトアビジン遺伝子(S↔L)、ストレプトアビジン遺伝子(S↔L↔A)のすべての組み合わせにおいて翻訳反応を行った。

また別に、tRNA 群(普遍遺伝暗号)、tRNA 群(S↔L)と、緑色蛍光タンパク質 GFPuv(普遍遺伝暗号)、緑色蛍光タンパク質 GFPuv(S↔L)の組み合わせにおいて翻訳反応を行った。翻訳液は、50 mM Tris-HCl pH8.0 で 5 倍に希釈したのちに、395 nm の励起光を当てて蛍光スペクトルをとった。

4. 研究成果

tRNA の調製には、天然の tRNA から一つ一つの tRNA を個別に取り出し、これを再構成する方法と、T7 RNA ポリメラーゼを用いた試験管内転写反応によって転写した tRNA を調製する方法の 2 種類が考えられる。ただし、天然の tRNA から一つ一つの tRNA を個別に純粋に取り出すことは難しく、ここでは T7 RNA ポリメラーゼを用いた試験管内転写反応によって転写した

tRNA を調製することにした。ただし、試験管内転写 tRNA には天然の tRNA に存在する種々の修飾がないために、これを再構成した時に、翻訳系が働くかどうかは不明である。そこでまず、大腸菌の tRNA の配列を基に、必要な tRNA をすべて転写反応によって作成して翻訳系を再構成し、普遍遺伝暗号に基づいて設計したストレプトアビジン遺伝子を翻訳した。翻訳後に翻訳反応液ニトロセルロース紙上にスポットした。ストレプトアビジンはビタミンの一種であるピオチンと強く結合することが知られている。そこで、得られたストレプトアビジンの活性を、ピオチンで標識したペルオキシダーゼのニトロセルロース紙上への固定化として検出した。化学発光性を持つペルオキシダーゼ基質によりペルオキシダーゼを検出した結果、確かにピオチンに結合する活性なストレプトアビジンの生合成が確認できた(図1)。これにより、転写 tRNA 群を用いても活性なタンパク質が翻訳できることが分かった。

次に tRNA^{Leu} と tRNA^{Ser} のアンチコドンループを入れ替えた、キメラ tRNA である tRNA^{LaS} と tRNA^{Sal} を T7 RNA ポリメラーゼを用いた試験管内転写反応によって調製した。Leu と Ser の大腸菌アミノアシル tRNA 合成酵素は、対応する tRNA のアンチコドンループを認識しない。そのため tRNA^{LaS} は、LeuRS によるアミノアシル化反応により Leu が結合し、Leu-tRNA^{LaS} となるが、これは Ser のアンチコドンループを持つため Ser のコドンを読む。同様に、tRNA^{Sal} は、SerRS によるアミノアシル化反応により Ser が結合し、Ser-tRNA^{Sal} となるが、これは Leu のアンチコドンループを持つため Leu のコドンを読む。これらを tRNA^{Leu} と tRNA^{Ser} の代わりに使用することで、新遺伝暗号では Ser のコドンが Leu を、Leu のコドンが Ser を指定するようになる

はずである。そこで、この tRNA 群(S↔L)を加えた翻訳系において、新遺伝暗号(S↔L)に基づいて設計したストレプトアビジン遺伝子(S↔L)を翻訳して前述した Dot-Blot によりピオチン結合活性を検出した。その結果、tRNA 群(S↔L)と、ストレプトアビジン遺伝子(S↔L)の組み合わせにおいて活性なストレプトアビジンが、生成していることが分かった(図1)。

次に Ala の大腸菌アミノアシル tRNA 合成酵素が、対応する tRNA のアンチコドンループを認識しないことが知られているため、新遺伝暗号(S↔L↔A)の開発も試みた。tRNA^{Leu} に tRNA^{Ser} のアンチコドンループを入れた tRNA^{LaS} に加えて、tRNA^{Ser} に tRNA^{Ala} のアンチコドンループを入れた tRNA^{SaA}、tRNA^{Ala} に tRNA^{Ser} のアンチコドンループを入れた tRNA^{AaS} を調製し、これを、tRNA^{Leu}、tRNA^{Ser}、tRNA^{Ala} の代わりに使用した翻訳系を作成した。この tRNA 群(S↔L↔A)を加えた翻訳系において、新遺伝暗号(S↔L↔A)に基づいて設計したストレプトアビジン遺伝子(S↔L↔A)を翻訳して前述した Dot-Blot によりピオチン結合活性を検出した。その結果、(S↔L)の組み合わせと同様に、tRNA 群(S↔L↔A)と、ストレプトアビジン遺伝子(S↔L↔A)の組み合わせにおいても活性なストレプトアビジンが、生成していることが分かった(図1)。

さらにこれら翻訳系の直交性を確認するために、普遍遺伝暗号、新遺伝暗号(S↔L)、新遺伝暗号(S↔L↔A)について、tRNA 群(普遍遺伝暗号)、tRNA 群(S↔L)、tRNA 群(S↔L↔A)と、ストレプトアビジン遺伝子(普遍遺伝暗号)、ストレプトアビジン遺伝子(S↔L)、ストレプトアビジン遺伝子(S↔L↔A)のすべての組み合わせにおいて翻訳反応を行った。その結果、すべての対応しない遺伝暗号の組み合わせではストレプトアビジンの活性は検出されず、これら

遺伝暗号の直交性は厳密に保たれていることが分かった。また、これらすべての翻訳反応において何らかのタンパク質の翻訳があることから、すべての対応しない遺伝暗号の組み合わせでは、Ser や Leu や Ala がすべて置き換わった意味のないタンパク質が発現しているものと考えられる。

さらにストレプトアビジンだけでなく緑色蛍光タンパク質においても同様に、(S↔L)遺伝暗号を用いて蛍光性のタンパク質が生成することが確認できた。

本成果の概念により、将来は人工生命が作製され、様々な応用が生まれると考えている。また、本課題で得られた新遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系は、遺伝子拡散が懸念される蛋白質の安全な生合成に利用されるようになると考えられる。

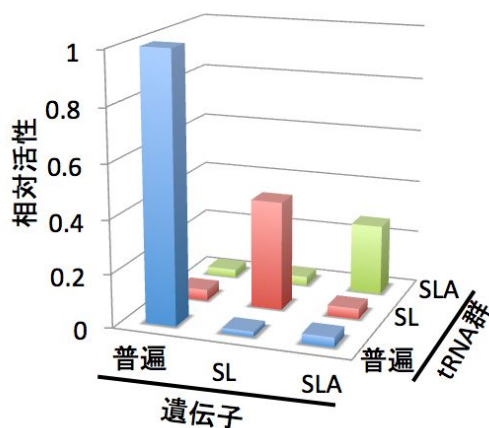


図1 普遍遺伝暗号、新遺伝暗号(S↔L)、新遺伝暗号(S↔L↔A)に基づくストレプトアビジンの翻訳と活性。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：タンパク質を製造するための翻訳系、及びタンパク質の製造方法

発明者：村上裕、石沢堯大

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：特願 2015-191730

出願年月日：2015 年 9 月 30 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 裕 (MURAKAMI, Hiroshi)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10361669