

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19309

研究課題名（和文）遺伝暗号における正確さの向上と低下がもたらす進化上のトレードオフの理解と活用

研究課題名（英文）Evolutionary tradeoff between increase and decrease in translation fidelity

研究代表者

木賀 大介（Daisuke, Kiga）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：30376587

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、コドンとアミノ酸の対応の正確さを改変したタンパク質合成系を試験管内に構築し、その合成系に基づく人工進化結果を計算機実験で一般化することである。タンパク質合成の正確さが低いことが、(A)アミノ酸置換の結果として活性が低くなった分子も合成してしまうという、想像にたやすい欠点だけでなく、(B)進化が局所解に囚われてしまうリスクを低減することで進化過程を効率化できる、という意外な利点を併せ持つ、ことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直感的に感じられる、遺伝子発現ステップのうちのタンパク質合成におけるエラーは生物にとっての負の側面しかない、という視点が誤りである、ということを示した学術的意義は大きい。社会的意義としても、いろいろ試した際に間違いが次のチャレンジの向上につながる、という視点は興味深い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we engineered in vitro genetic code to decrease accuracy of codon-amino acid correspondence. Using the engineered code, our in silico evolution showed the following points. Although the code produce molecules with weak activity due to amino acid replacements, the code can circumvent a risk to be trapped at local optima in evolution.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 遺伝暗号 タンパク質進化

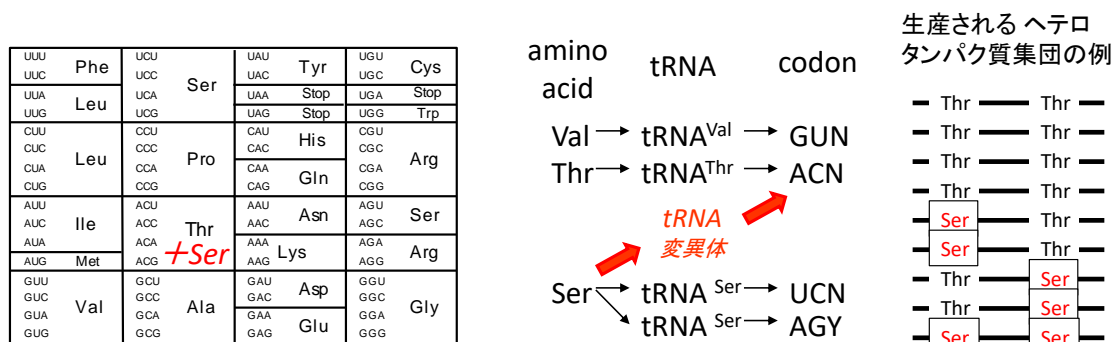
1. 研究開始当初の背景

「生命の基本単位である DNA・RNA・タンパク質は、遺伝情報が指定する特定の配列を持つように正確に重合されることで固有の機能を発揮している」ことは、現在の地球生命についての一般的な描像である。しかしこの描像は、実は、酵素への校正ドメインの付加などそれぞれの合成系の進化の結果であることがわかっている。例えば、mRNA の塩基配列にしたがってアミノ酸を重合させる際には、コドンが指定するアミノ酸以外に、約 1 万分の 1 の確率で誤ったアミノ酸を重合させてしまっている。多くのタンパク質の長さが 1000 アミノ酸以下であることから、ほとんどのポリペプチド鎖は遺伝子が指定するアミノ酸配列を持っていることになる。生命の共通祖先にいたる進化の過程において、この正確さを達成するために、tRNA に対応したアミノ酸を結合させる酵素が類似したアミノ酸を結合させてしまわないように、この酵素に校正ドメインを追加させるような変化が生じてきたことが判明している。

代表者はこれまでに、遺伝暗号に含まれるアミノ酸の数を現在の 20 から減らすなど、生命の初期進化の時点での遺伝暗号系の再現と、これを活用したタンパク質の進化過程の再現を行ってきた(PNAS 2002, Nucleic Acids Res 2012 featured article)。

そして、生命の初期進化における遺伝暗号系の特性として、タンパク質合成の正確さが低くなることが、(1)アミノ酸置換の結果として活性が低くなった分子も合成してしまうという、想像にたやすい欠点だけでなく、(2)進化が局所解に囚われてしまうリスクを逃減することで進化過程を効率化できる、という意外な利点を併せ持つことを代表者は着想した。一見高く見えるタンパク質合成の正確さは DNA 合成の正確さに比べれば極めて低く、これは、あえて低いまま留められているのかもしれない。この利点を支持する予備的な実験結果に基づいて本研究を開始した。

本研究における人工進化で活用される、下図に示す正確性の低いタンパク質合成系(移動平均暗号)はすでに一例を構築済みであり、特許を出願していた。



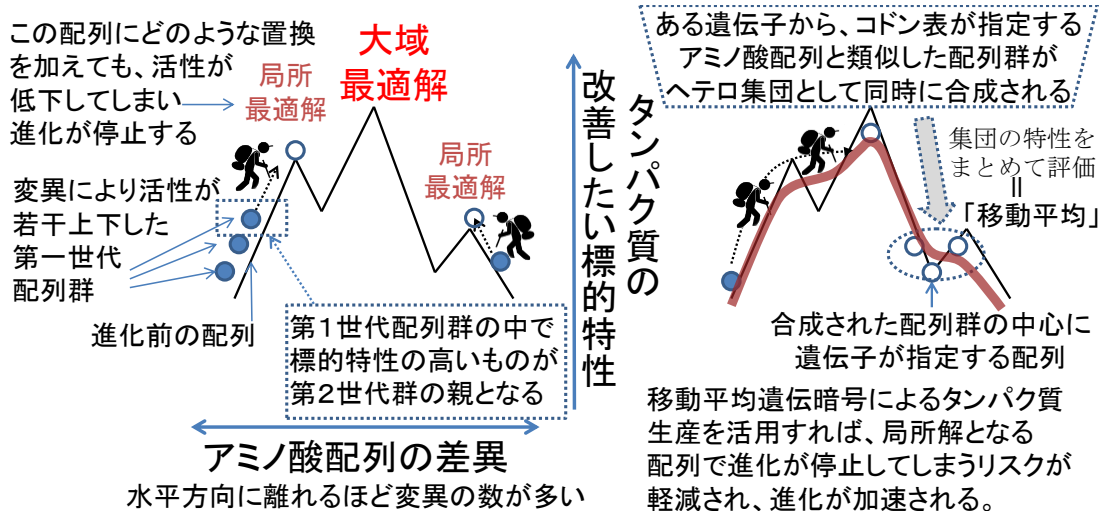
トレオニンのコドンにセリンも指定される「移動平均」遺伝暗号表とその産物

2. 研究の目的

本研究の目的は、コドンとアミノ酸の対応関係の正確さを改変したタンパク質合成系を試験管内に構築し、これを活用した実験結果を計算機実験で一般化することにより、以下の 2 点を追及することにある。(1)生命がなぜ、遺伝物質 DNA と機能物質タンパク質の、2 種類の高分子の相互作用を活用するに至ったか、という根源的な問いへの新たな仮説の検証。(2)タンパク質人工進化の効率化を達成する独創的な基盤技術の創出。

3. 研究の方法

本研究でのタンパク質の人工進化は、変異を導入した遺伝子に対して、上図の移動平均暗号表に基づくタンパク質合成反応とその産物の評価によって行う。多数並列された個々の区画が、それぞれ固有の一種の配列の DNA を含む様式で準備される。ホモな配列からなる DNA 分子集団から合成されるタンパク質は、本研究では、指定したコドンに対応する残基に確率的に変異が導入されたヘテロな集団となる。このヘテロな集団としての活性を評価した人工進化の過程を計算機実験により解析することで、生命の進化の普遍原理を解明する。



4. 研究成果

まず、移動平均暗号表の構築手法の汎用性を示すために、これまでの、トレオニンコドンにセリンを混入させる移動平均暗号表に加え、新たに、トリプトファンコドンにアラニンを入混入させる移動平均暗号表を構築した。コード配列中にトリプトファンコドンをもつ GFP 遺伝子に対する翻訳実験により確認したところ、2.5 μM の tRNA 変異体の添加によってアラニンを混入させた移動平均暗号表によるタンパク質合成では、混入のない普遍暗号による合成に比べて約半分まで GFP の蛍光が低下した（下図青棒）。

トレオニンとセリンの構造の差異がメチル基一個ぶんと小さな差異であることに対して、トリプトファンとアラニンの構造の差は大きい。セリンではなくアラニンも任意のコドンに混入させることができたことは、移動平均暗号の今後の活用の幅を広げた、という大きな意義がある。

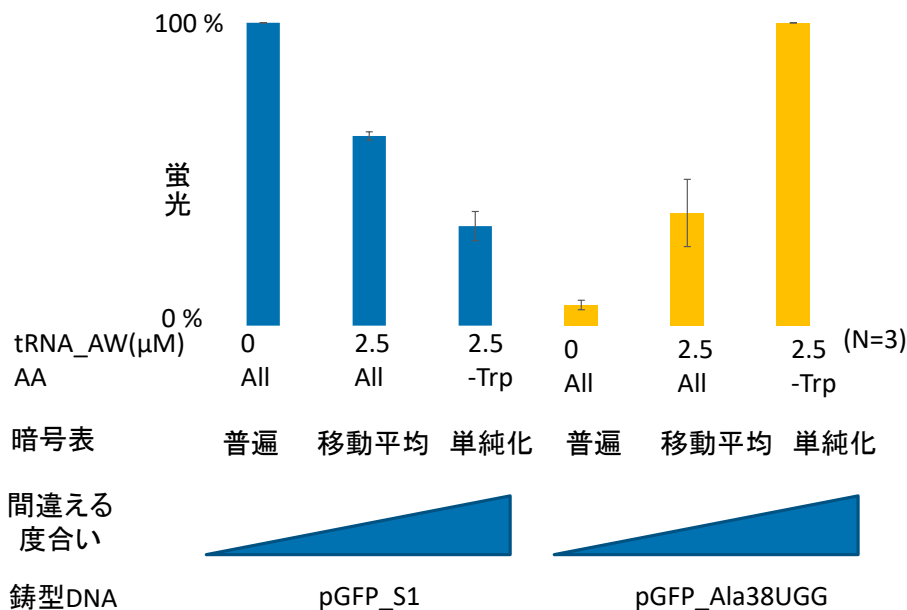


図 新たに構築した移動平均暗号表による翻訳産物の構築、および、これと単純化暗号との比較

さらに、移動平均暗号表と、これまで代表者が構築してきた単純化暗号表の比較を行った。前者では、tRNA 変異体の添加を行い新たなアミノ酸を任意のコドンに混入させることに対して、後者では、tRNA 変異体の添加に加え、対象となるコドンのアミノ酸を無細胞翻訳系から除去している。このため、対象となるコドンは、新たなアミノ酸の挿入のみを行う。本研究で両者を比較したところ、予想通り、移動平均暗号による翻訳産物は、普遍暗号と単純化暗号それぞれによる産物の活性の中間の値を示した（上図青棒）。

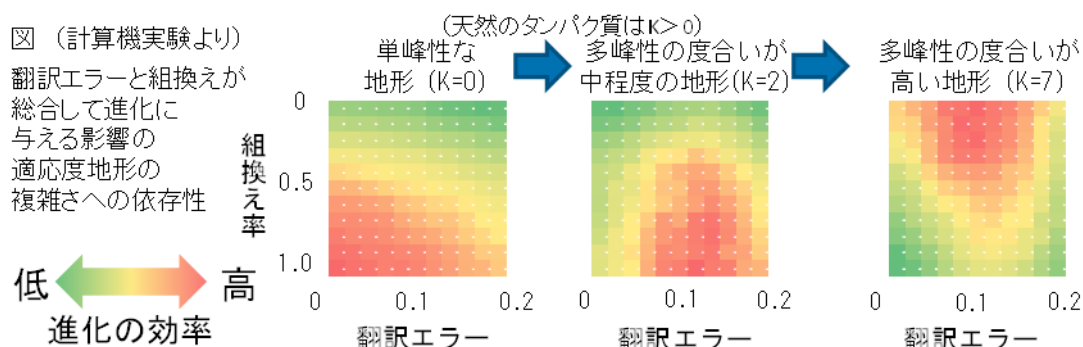
移動平均暗号表を活用した人工進化では、配列空間上の適応度地形の平滑化の概念により、アミノ酸の混入による活性向上も、予期されている。実際に活性向上が生じることを確認するために、本来アラニンに翻訳されるべき残基のコドンを、普遍暗号ではトリプトファンを指定する UGG に置換した遺伝子の翻訳を行うことで確認した（上図黄色棒）。これまでの実験で観られたように (Kawahara-Kobayashi et al., Kiga NAR 2012)、普遍暗号では翻訳産物は活性を持たず、単純化暗号では活性が見られた。移動平均暗号では、想定通り、これらの中間の活性を示した。

この結果は、移動平均暗号が、普遍暗号と単純化暗号の中間の性質を持つことを明確に示している。

試験管内実験による人工進化に対応する計算機進化実験として、遺伝情報からのエラーのない高分子合成を経た進化による活性上昇よりも、移動平均暗号の使用に相当するエラー有の際の進化における活性上昇の方が速いことを、タンパク質の配列に依存した活性発揮を模した、多峰性地形を示すNK-Landscape 上での進化シミュレーションによって、代表者は示してきた。

本研究は、改良した計算機進化実験により、機能性分子を生産する翻訳時のエラーが進化を加速する、という上述の方策と、一般的に進化を加速する原理として知られる遺伝子の組換えという方策を、同時に適用することの効果の詳細に探索した。もしも、組換えによる効果に比べ、翻訳エラーによる効果が小さい場合は、実際の進化において翻訳エラーが及ぼす意義はあまりない、ということになる。

まず、残基間相互作用が無く単峰性な適応度地形となる $K=0$ の場合（下図）、想定通り、組換えによる進化の効率化がある一方、移動平均による翻訳エラーではこの効果が生じなかった。続いて、多峰性の地形の例として、 $K=7$ について計算機実験を行ったところ、翻訳エラーによる進化の効率化が見られた一方、組換えが無い方が進化が効率化する、という、意外な結果となった。この場合、配列中の各残基がそれぞれ、配列中の半数近くに相当する残基と相互作用する、という、強すぎる残基間相互作用の数によって、成立していた部分解が、組換えによって破壊されてしまったことに起因した可能性がある。そこで、相互作用の数を $K=2$ へと適度に減らした結果、翻訳エラーと組換えの同時適用によって、進化がさらに効率化することを示すことができた（下図中、 $K=2$ ）。



実際のタンパク質においても、配列空間における適応度地形の複雑さは、タンパク質の活性に重要な立体構造形成において、いくつかの残基が局所的に相互作用しているか、に起因していると考えられている。今後、エラーと組換え率を変化させた試験管内の実験の結果から、この相互作用の数に相当するパラメタ K を見積もることが可能になるかもしれない。

最後に、本研究が示した翻訳エラーによる進化の効率化は、遺伝物質と機能物質が分離しており、機能物質の生産時には遺伝物質の複製よりも高いエラー率を与える際に、示されることに注目する。もし、遺伝物質と機能物質が同じ合成メカニズムによって生産される場合には、このような効率化は示されることはない。生命システムが遺伝物質としての核酸と、機能物質としてのタンパク質を併用するようになった理由の一つがこの点にあるかもしれないことを、本研究は示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 木賀大介	4. 巻 93
2. 論文標題 遺伝暗号改変を活用した人工進化からみるmagic20の意味	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imada Takashi, Moriya Koji, Uchiyama Masahiko, Inukai Naoto, Hitotsuyanagi Mitsuhiro, Masuda Akiko, Suzuki Takehiro, Ayukawa Shotaro, Tagawa Yo-ichi, Dohmae Naoshi, Kohara Michinori, Yamamura Masayuki, Kiga Daisuke	4. 巻 7
2. 論文標題 A Highly Bioactive Lys-Deficient IFN Leads to a Site-Specific Di-PEGylated IFN with Equivalent Bioactivity to That of Unmodified IFN- 2b	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2537 ~ 2546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.8b00188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Dharmatti Roopa, Miyatake Hideyuki, Zhang Chen, Ren Xueli, Yumoto Akiko, Kiga Daisuke, Yamamura Masayuki, Ito Yoshihiro	4. 巻 149
2. 論文標題 Escherichia coli expression, purification, and refolding of human folate receptor (hFR) and (hFR)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 17 ~ 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2018.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ayukawa Shotaro, Enomoto Toshihiko, Kiga Daisuke	4. 巻 .
2. 論文標題 RNA World	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Astrobiology (ed : Yamagishi, Akihiko, Kakegawa, Takeshi, Usui, Tomohiro) ISBN 978-981-13-3639-3内	6. 最初と最後の頁 77 ~ 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-13-3639-3_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 アミノ酸の種類や忠実度を变化させた遺伝暗号を活用した人工進化で可能になること
2. 発表標題 木賀 大介
3. 学会等名 日本生化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ありえた・ありえる細胞たちをつくる
2. 発表標題 木賀 大介
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 組換えと翻訳エラーの併用が進化の局所解トラップを緩和することの計算機実験による検証
2. 発表標題 満富 健太、木賀 大介
3. 学会等名 生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎本 利彦、木賀 大介
2. 発表標題 意図的に翻訳エラーを増大させることによる進化の加速
3. 学会等名 蛋白質科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本 利彦、 木賀 大介
2. 発表標題 遺伝暗号の改変による調節可能な翻訳エラーが適応度地形の局所解へのトラップを回避する
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本 利彦、 木賀 大介
2. 発表標題 適切な翻訳エラーは進化が局所解で止まってしまうようにする
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 種々の遺伝暗号それぞれが発揮できるより広い機能性生体高分子の進化戦略
2. 発表標題 木賀 大介
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 Transition from low fidelity gene expression to high fidelity
3. 学会等名 Puzzles and Solutions in Astrobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本 利彦, 鮎川 翔太郎, 木賀 大介
2. 発表標題 1コドンに2種類のアミノ酸が割り当てられる遺伝暗号表の構築と特性
3. 学会等名 生化学会関東支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 Biological containment through engineering of genetic code
3. 学会等名 生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihiko Enomoto and *Daisuke Kiga
2. 発表標題 Programmable misincorporation of amino acids increases probability of protein evolution
3. 学会等名 27th tRNA conferance (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 Directed Evolution under genetic codes with reduced-size alphabet
3. 学会等名 First Asian Synthetic Biology Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木賀大介 赤沼哲史
2. 発表標題 ワークショップ「現在の生命に普遍的な4塩基20アミノ酸の制約から外れた進化を探る」オーガナイズ
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 限定されたアミノ酸セットからなる『単純化遺伝暗号』による人工進化
3. 学会等名 アストロバイオロジーセンター・サテライト研究シンポジウム「深海底から宇宙へ、過去から未来へ、分子から社会へ」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 Novel Directed Evolution Using Engineered Genetic Code
3. 学会等名 5th Core-to-Core International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

NHK 高校 生物基礎 第1回 「生物の特徴」出演 (2018-2022年度)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	満富 健太 (Mitsutomi Kenta)		
研究協力者	榎本 利彦 (Enomoto Toshihiko)		
研究協力者	河合 美紀 (Kawai Miki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関