

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007-2008
 課題番号： 19550161
 研究課題名 (和文) Ochre サプレッサー tRNA の調製とその遺伝暗号拡張への利用
 研究課題名 (英文) Preparation of ochre suppressor tRNA and its use for expansion of the genetic code
 研究代表者
 西川 一八 (NISHIKAWA KAZUYA)
 岐阜大学・工学部・教授
 60109262

研究成果の概要： 遺伝暗号表の拡張を目指して、UAA (Ochre) コドンに対応できるサプレッサー tRNA を調製し、生体外タンパク質合成系において Ochre コドン選択的に非天然アミノ酸をタンパク質に導入する方法を開発した。分子整形技術により調製した tRNA (ΨΨA) は期待通りの Ochre サプレッサーとして機能したが、意外にも対照の tRNA (UΨA) も同様の挙動を示した。この結果は「ウォブル説」の再吟味も含め、さらなる検討の必要性を示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：バイオテクノロジー、核酸・蛋白質・糖化学、生体認識・機能化学、遺伝暗号、サプレッサー

1. 研究開始当初の背景

生物は地球上に存在する何百種類ものアミノ酸のうち、僅か 20 種類しかタンパク質の素材として利用していない。最近の遺伝子操作技術の進歩により様々なタンパク質の性質を改変することも可能になってきたが、

それも遺伝暗号表に規定された 20 種類の天然型 L-アミノ酸の組み合わせの範囲内に限定されている。もしもタンパク質の素材となるアミノ酸の選択肢を拡大すること、すなわち遺伝暗号表を拡張することができるなら、天然にない機能や物性を持つ新規タンパク

質の創製につながることになる。

我々は tRNA のアミノ酸受容特異性決定の分子機構に関する研究の過程でアミノアシル化反応を特別な条件下に行うと異常なアミノ酸受容が促進されることを発見した。また、酵母チロシル-tRNA 合成酵素のアミノ酸基質特異性の遺伝子工学的改変に成功し、さらに大腸菌のタンパク質合成関連の因子や酵素類を純化し再調合することで安定な生体外タンパク質合成系を構築することにも成功した。それらを利用することで、非天然アミノ酸であるチロシアナログを UAG (Amber) 終止コドン特異的にタンパク質に組込む技術を確認してきた。

Amber 終止コドンを翻訳するには、通常は Amber サプレッサー tRNA(CUA) が用いられるが、遺伝暗号をさらに拡張し、より多様なアミノ酸の導入を可能とするには新規アミノ酸用の新たなコドンを開発することが望まれている。

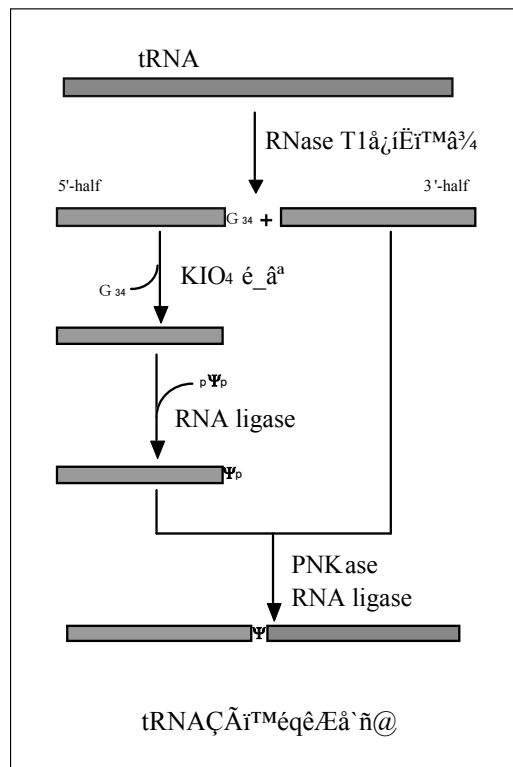
2. 研究の目的

tRNA^{Tyr} のアンチコドン 1 字目の G を U に改変した tRNA(UUA) が作成できれば、それは原理的には UAA (Ochre) コドンを翻訳するはずであるが、アンチコドン 1 文字目の U はウォブル塩基対を形成して UAA のみならず UAG (Amber) コドンも翻訳してしまうためコドン認識に曖昧さが生じてしまう。

この問題に対処するため、筆者は酵母のイソロイシン minor tRNA (AUA 特異的で AUG とは対合しない) に着目した。この tRNA はアンチコドンに ΨAΨ (Ψは修飾塩基プソイドウリジン) を持つことが知られている。すなわち、アンチコドン 1 文字目の Ψは A とは対合するが G とはしないのである。従って tRNA^{Tyr} のアンチコドンの 1 文字目の G を Ψ に改変したサプレッサー tRNA を調製できればこの tRNA が UAA (Ochre) 終止コドンに特異的な tRNA となるはずである。本研究では筆者が長年培ってきた RNA の分子整形技術を利用することで、このような修飾塩基 Ψ をアンチコドン 1 文字目に持つような tRNA 変異体を作成し、それが期待通りに Ochre サプレッサーとして機能するかを検討した。

3. 研究の方法

H19~20 年度の 2 年間に次のような目標を設定した。(1) 酵母 tRNA^{Tyr} を出発原料としてそのアンチコドン GΨA を分子整形技術により ΨΨA に改変して、UAA (Ochre) 終止コドンに対応できるサプレッサー tRNA を人工的に調製する。また、その対照としてアンチコドンを UΨA に改変した tRNA も作成する。酵母 tRNA^{Tyr} のアンチコドン 1 文字目の G34 を分子整形技術により Ψ34 や U34 に改変するには基本的には下図に示すような手順で行なった。



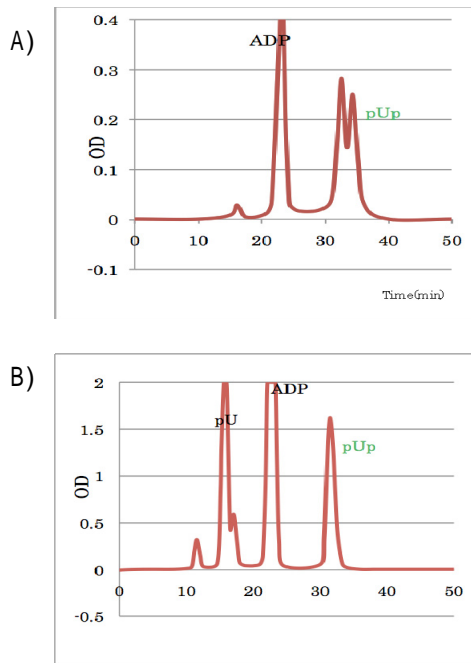
(2) これら 3 種の tRNA を用い、大腸菌から調製した生体外タンパク質合成系中で oligo(UAN)₁₁ (N=U,C,A,G) を鋳型とするポリペプチド合成反応を行って作成した tRNA が実際に Ochre サプレッサーとして機能できるかを検討する。

4. 研究成果

(1) RNA ligase の基質 pNp 調製法の検討

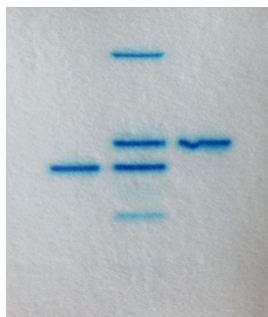
RNA ligase 反応の特性から、プソイドウリジン (Ψ) は pΨp (プソイドウリジン 5',3'-二リン酸) の形で加えることになるが、現在は市販されていないので自前で調製することになる。基本的には Ψp (プソイドウリジン 3'-モノリン酸) をポリヌクレオチドキナーゼ (PNKase) により 5'-リン酸化すればよい

[Np + ATP → pNp + ADP] が、下図 A)のように未反応の ATP が product である pNp (この図では pUp) のピークに被さり、純度が劣化するので以下の方法を考案した。すなわち、反応液中にウリジン Uoh とウリジンキナーゼ (UKase) を添加することで [Uoh + ATP → pU + ADP] により未反応の ATP を消費し尽くして ATP の混入しないこと pUp を得ることができた (下図 B)。pΨp も同様の方法で合成した。



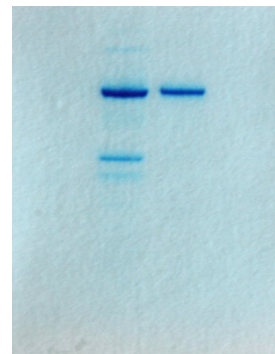
(2) RNA の分子整形法による tRNA^{Tyr}(ΨΨA) および tRNA^{Tyr}(UΨA) の調製

前ページの図「tRNA の分子整形法」に示した手順に従って、出発原料である酵母 tRNA^{Tyr} のアンチコドン GΨA 中の G34 位で RNaseT1 により限定分解し、5'-half 断片と 3'-half 断片を得た。



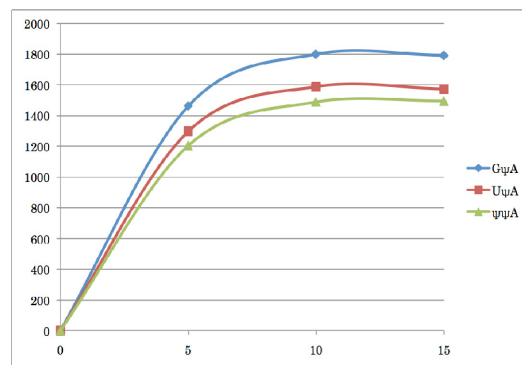
上図中央は酵素反応後の混合物、左は精製後の 5'-half 断片、右は精製後の 3'-half 断片。5'-half の 3'-末端 G を KIO₄ 処理により脱離し

た後、RNA ligase により pΨp または pUp を付加した。それぞれの 5'-half 断片 (末端に pΨp または pUp を持つ) と 3'-half 断片をアニーリングした後、PNKase および RNA ligase 処理して両断片を再結合し、アンチコドン 1 字目に変異を持つ tRNA^{Tyr}(ΨΨA) および tRNA^{Tyr}(UΨA) を得た。下図左に再結合して調製した tRNA^{Tyr}(UΨA) を、右にサイズマーカーとして野生型の tRNA^{Tyr}(GΨA) を示す。左レーン下方のバンドは未反応の 5'-および 3'-half 断片である。tRNA^{Tyr}(ΨΨA) も全く同様にして調製された。



(3) tRNA^{Tyr}(ΨΨA) および tRNA^{Tyr}(UΨA) のアミノ酸受容活性

分子整形法により調製した 2 種のアンチコドン変異体および野生型 酵母 tRNA^{Tyr} のアミノ酸受容能を [¹⁴C]-tyrosine の酸不溶性画分への取り込み活性により測定した。その典型的な反応タイムコースを下図に示す。図の縦軸は tRNA 1A₂₆₀unit 当りの [¹⁴C]-tyrosine 受容活性 (pmol/A₂₆₀unit)、横軸は反応時間 (min) である。

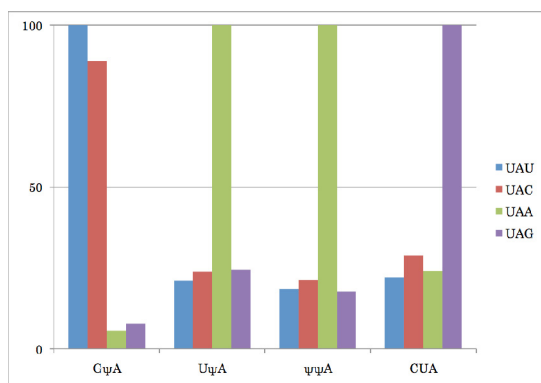


野生型 tRNA^{Tyr}(GΨA)、tRNA^{Tyr}(UΨA) および tRNA^{Tyr}(ΨΨA) の tyrosine 受容能はそれぞれ 1,800 pmol/A₂₆₀unit、1,600 pmol/A₂₆₀unit および 1,450 pmol/A₂₆₀unit であり、分子整形法により調製された 2 種のアンチコドン変

異体も十分に tyrosine 受容能を保持していることがわかる。

(4) 生体外タンパク質合成系におけるポリペプチド合成

大腸菌由来の生体外タンパク質合成系を用いて oligo(UAN)₁₁ (N=U,C,A,G) を鋳型とし、上記 3 種の tRNA および比較のために Amber サプレッサー tRNA^{Tyr} (CUA) を加えた 4 種の tRNA によるポリペプチド合成反応を行った。因みに oligo(UAA)₁₁ が Ochre コドンに、oligo(UAG)₁₁ が Amber コドンに、oligo(UAU)₁₁ と oligo(UAC)₁₁ は tyrosine コドンに対応している。4 種の tRNA × 4 種の鋳型 = 16 通りの反応の結果をまとめたものを下図に示す。縦軸は最下欄に示すそれぞれのアンチコドンを持つ 4 種の tRNA が 4 種の鋳型(青色は oligo(UAU)₁₁、赤色は oligo(UAC)₁₁、緑色は oligo(UAA)₁₁、紫色は oligo(UAG)₁₁) に対応して合成したオリゴペプチドの相対量である。



一見して、野生型 tRNA^{Tyr} (GψA) (図の最左列) が UAU および UAC コドン (すなわち正規の tyrosine コドン) に対応してポリペプチドを合成したことがわかる。Amber サプレッサーである tRNA^{Tyr} (CUA) (図の最右列) は確かに UAG (amber) コドンにのみ対応している。本研究で新たに合成した tRNA^{Tyr} (ψψA) は期待通り UAA (ochre) コドンにのみ対応し、UAG コドンには対応しないので正真正銘の Ochre サプレッサーを創成できたといえる。ところが、対照として作成した tRNA^{Tyr} (UψA) もほとんど同じ合成パターンを示し、UAG コドンには対応しないことがわかった。すなわち、アンチコドン 1 字目の U はウォブルせずにコドン 3 字目の A とのみ対合していることになる。

(5) まとめ

分子整形術により調製した tRNA^{Tyr} (ψψA) は期待通りの Ochre サプレッサーとして機能することがわかったが、意外にも対照として作成した tRNA^{Tyr} (UψA) も同様の挙動を示した。この結果は、アンチコドン 1 字目の U はウォブルしてコドン 3 字目の A および G と対合するという「ウォブル説」の再吟味も含め、さらに詳細な検討を必要とすることを示唆している。

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 3 件)

(1) S. Ohno, M. Matsui, T. Yokogawa, M. Nakamura, T. Hosoya, T. Hiramatsu, M. Suzuki, N. Hayashi, and K. Nishikawa
Site-selective post-translational modification of proteins using an unnatural amino acid, 3-azidotyrosine. *J. Biochem.*, 141, 335-343, 2007
査読有

(2) M. Tsunoda, Y. Kusakabe, N. Tanaka, S. Ohno, M. Nakamura, T. Senda, T. Moriguchi, N. Asai, M. Sekine, T. Yokogawa, K. Nishikawa, and K. T. Nakamura
Structural basis for recognition of cognate tRNA by tyrosyl-tRNA synthetase from three kingdoms.
Nucleic Acids Res., 35, 4289-4300, 2007
査読有

(3) H. Shimizu, S.-i. Yokobori, T. Ohkuri, T. Yokogawa, K. Nishikawa and A. Yamagishi
Extremely thermophilic translation system in the common ancestor commonote: ancestral mutants of glycyl-tRNA synthetase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*.
J. Mol. Biol., 369, 1060-1069, 2007
査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 一八 (NISHIKAWA KAZUYA)
岐阜大学・工学部・教授
60109262

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし