

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2008

課題番号：19680016

研究課題名（和文） 遺伝暗号表の起源への実験的アプローチ

研究課題名（英文） Experimental approach towards origins of genetic codes

研究代表者

木賀 大介 (KIGA DAISUKE)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授

30376587

研究成果の概要：

本研究の目的は、遺伝暗号表の起源と進化可能性について、構成的アプローチによる翻訳システムの改変によって 20 種類よりも少ないアミノ酸のみを含む「単純化遺伝暗号表」を構築し、さらに、タンパク質人工進化の実験によって追求することにある。本研究によって実際に種々の単純化遺伝暗号を構築し、アミノ酸の種類が限定されても、野生型以上の活性をもつ蛍光タンパク質などの変異体が創出できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：タンパク質、進化、合成生物学、無細胞翻訳系、細胞機能の再構成

1. 研究開始当初の背景

生命は、分子を用いて様々な演算を行なっている。その中で最も重要な演算の一つが、4種類のヌクレオチドによって DNA、RNA の配列に記された遺伝情報を、20種類のアミノ酸が構成するタンパク質のアミノ酸配列情報

に変換する、翻訳反応である。この翻訳過程に用いられる遺伝暗号表は、基本的に全ての生物に共通している。では、なぜ生命は現在の 20 種類のアミノ酸を採用したのだろうか？単純なかたちから複雑なかたちへと変化する生命進化の本質を考慮すれば、遺伝暗

号の成立時から 20 というアミノ酸の種類が定まっていたとは考えにくい。そもそも、遺伝暗号表の起源は一つなのだろうか？

遺伝暗号表の起源と進化の仮説については、この最適化の過程がある時点で停止したという Crick による偶然凍結説から (1)、相田・伏見の説 (2) などの、様々な物理化学的指標もしくはタンパク質の進化を加速するという観点で最適化がなされているという諸説が唱えられている。また、動物ミトコンドリアなどに見られる、遺伝暗号上での 20 種類のアミノ酸の配置が若干変更された事例の発見とその過程を説明する大沢らの仮説も発表されているが (3)、これらは 20 種類のアミノ酸が構成する遺伝暗号表の間の違いを説明するものであり、代表者の疑問には答えはくれない。

20 種類のアミノ酸それぞれには、そのアミノ酸と tRNA とを結合させる専用のアミノアシル tRNA 合成酵素が基本的に存在する。換言すれば、アミノ酸は専用の酵素を持つことが、20 種類に採用されるために重要な条件である。そこで、この酵素のアミノ酸配列を基準にした進化系統樹や立体構造の比較から、遺伝暗号表の進化を考察することも行なわれている。さらに興味深いことに、一部のバクテリアにはグルタミン専用の酵素が存在せずに、複雑な修飾反応によって tRNA にグルタミンを連結させることで 20 種類のアミノ酸を確保している。同様に、一部の古細菌ではアスパラギンやシステイン専用の酵素が存在しない種も発見されている。このような酵素の欠落、もしくは、タンパク質のアミノ酸配列の種間比較から (4)、アミノ酸数の少なかった遺伝暗号表にアミノ酸が加わってきた、という議論がなされている。

これまででも、遺伝暗号表の改変を伴わずに、アミノ酸の種類を減らしたタンパク質の特性が研究されてはきたが (5)、これらの研究で得られた”タンパク質”の活性は天然に比べて極めて低いものであった。しかし、この結果からは、少ない種類のアミノ酸では性能の低いタンパク質しか得られない、と結論づけることはできない。なぜならば、天然のタンパク質が淘汰・増幅・変異を繰り返してダーウィン進化の過程を経た産物であることに對し、これまでの研究では、特定のコドンのみを使用するようにデザインされたライブラリからタンパク質を単離したのみで、再度の変異導入を要する人工進化を行っていないからである。それは、普遍遺伝暗号を使用する限りは、遺伝子に変異を導入することで実験系から除去したはずのアミノ酸を指定するコドンへの塩基置換が生じてしまうという、既存の実験手法の限界に由来する。本研究により、特定のアミノ酸群のみを含んだ、新規な遺伝暗号システムを構築すること

によって初めて、少ないアミノ酸の種類だけで構築されたタンパク質の真の特性が議論できるようになる。

(1)F. Crick, *J. Mol. Bio* 38(1968)367-79.(2)T. Aita, *J Mol Evol.* 50(2000):313-23. (3)T. Jukes & S. Osawa. *J Mol Evol.* 1997 Jul;45(1):1-3. (4)K. Jordan et al. *Nature* 433(2005), 633-8. (5)N. Doi et al., *N. Protein Eng. Des. Sel.*, 18(2005), 279-84; S. Akanuma et al., *PNAS*, 99(2002),13549-53.

2. 研究の目的

本研究の目的は、現在の生命の根幹をなす遺伝暗号表の起源と進化可能性を、構成的アプローチによる遺伝暗号翻訳システムの改変、および、試験管内進化の実験によって追求することにある。

本研究では、生命の初期進化の過程でありえた、20 種類よりも少ないアミノ酸のみを含む原始遺伝暗号表群を構成的アプローチによる構築実験で再現し、分子計算としての翻訳過程の本質について考察する。

3. 研究の方法

天然のタンパク質合成系に含まれるアミノ酸には、それぞれのアミノ酸に対して専用の酵素が存在していて、それぞれの酵素が対応するアミノ酸と tRNA 群とを結びつける。そして、tRNA と結合したアミノ酸は、たとえそれが本来結合されるべき tRNA でなくても、その tRNA のアンチコドンに對してタンパク質合成に用いられる。遺伝暗号表からアミノ酸を除去することは、そのアミノ酸自体か、そのアミノ酸に對する酵素、もしくは tRNA をタンパク質合成系から除去することで達成できる。これらのうち、アミノ酸の除去は、無細胞タンパク質合成反応の使用によって、容易に達成できる。なぜなら、無細胞タンパク質合成反応に使用される細胞抽出液は、細胞の破碎、遠心後に、透析によって細胞由来の小分子のほとんどが除去されるためである。合成に使用されるアミノ酸は、別途添加するので、このステップで特定のアミノ酸を加えなければ、そのアミノ酸の除去は達成される。しかし、単なる因子の除去のみでは、除去されるアミノ酸に對するコドンでタンパク質合成が停止してしまう。この問題を回避するために、本研究では“サプレッサー”tRNA を使用する。天然に存在する、ナンセンスサプレッサー tRNA は、停止コドン(対応する tRNA が本来は存在しないため、タンパク質合成の停止を指示する)に對するアンチコドンを持つ。この tRNA はアンチコドンの変異によっても酵素によってアミノ酸を結合されるので、停止コドンに對してそのアミノ酸がペプチド鎖に挿入される

ことで、ナンセンスサプレッションが可能になっている。本研究でも同様に、除去したアミノ酸に対応したコドンを持ち、除去したアミノ酸とは別のアミノ酸用の酵素によってアミノ酸を結合される人工tRNAを調製する。

4. 研究成果

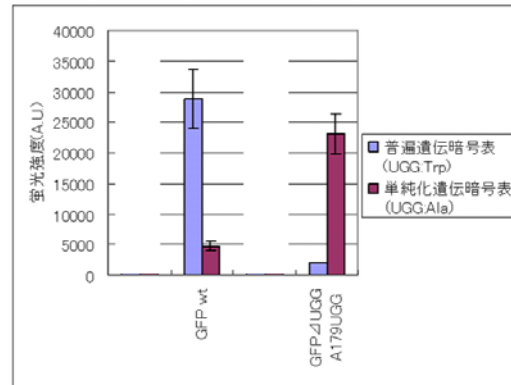
トリプトファン、アスパラギン酸、アスパラギンについて、いずれか一つを含まない種々の単純化遺伝暗号表を作成できた。これまでに作成した単純化遺伝暗号表とあわせ、下図に示されるコドンについてアミノ酸の除去が達成された。

本手法で遺伝暗号表から除去できたアミノ酸一覧

UUU UUC	Phe	UCU UCC	Ser	UAU UAC	Tyr	UGU UGC	Cys
UUA UUG	Leu	UCA UCG		UAA UAG	Stop	UGA UGG	Stop
CUU CUC CUA CUG	Leu	CCU CCC CCA CCG	Pro	GAU CAC CAA CAG	His Gln	CGU CGC CGA CGG	Arg
AUU AUC AUA AUG	Ile Met	ACU ACC ACA ACG	Phe	AAU AAC AAA AAG	Asu Cys	AGU AGC AGA AGG	Ser Arg
GUU GUC GUA GUG	Val	GCU GCC GCA GCG	Ala	GAU GAC GAA GAG	Asp Glu	GGU GGC GGA GGG	Gly

さらに、単純化遺伝暗号で翻訳された場合には活性を持つにもかかわらず、普遍遺伝暗号で翻訳された場合には活性を持たない遺伝子を創出することができた。タンパク質としては、本手法で作成された、活性に重要なトリプトファンを置換されることでトリプトファンを含まないにもかかわらず、他の残基の変異によって蛍光活性を持つ緑色蛍光タンパク質変異体を使用した。このタンパク質の遺伝子について、タンパク質内部のアラニン残基を、普遍遺伝暗号においてアラニンを指定するGCAでコードしたものと、普遍遺伝暗号ではトリプトファンをコードしてしまうUGGでコードしたものの2種類の遺伝子を用意した。その結果、前者の遺伝子からは、普遍遺伝暗号表と単純化遺伝暗号表どちらを使用しても、活性を持ったタンパク質が合成されたため、単純化遺伝暗号表も正確なタンパク質合成を行うことが可能であるといえる。そして、後者の遺伝子からは、普遍遺伝暗号表を使用して合成されたタンパク質に活性が無い一方、単純化遺伝暗号を使用するのみ、活性を持つタンパク質を合成することができた。

単純化遺伝暗号で翻訳した場合のみ活性を持つ遺伝子を作れる



本研究により、アミノ酸を19個のみ持つ遺伝暗号とタンパク質が成立し、この単純化遺伝暗号専用の遺伝子を作成できたことは、現在の生命の普遍遺伝暗号への収束が、生命にありえた可能性の一つであり、他の可能性があったことを示唆する。そしてこの収束の原因として、遺伝子の水平伝播を活用するために多種生物と同一の遺伝暗号を持つことの進化的利点が考えられる。今後、単純化遺伝暗号を活用して20種類未満のアミノ酸セットで構成されかつ現存のタンパク質と同等の活性を持つタンパク質を創出し、組み合わせて人工生体高分子システムを作成することにより、この可能性について検証することができる。

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 1件)

① Daisuke KIGA, Masayuki

YAMAMURA. "Programming Cells" New

Generation Computing, 26 (2008), p347-364
査読有

〔学会発表〕(計 8件)

① 木賀大介 (口頭発表)

遺伝暗号や遺伝子ネットワークにありえたかたち

2008年12月21日 第1回アストロバイオロジーワークショップ (湘南国際村・横須賀市)

② "単純化" 遺伝暗号表を用いたタンパク質の進化分子工学

小林晃大、内山正彦、木賀大介

平成20年12月12日 第31回日本分子生物学界年会・第81回日本生化学会大会 合同

大会（神戸国際会議場）

③木賀大介（口頭発表）

なぜ普遍遺伝暗号表には 20 種類のアミノ酸か？つくることで考えてみる

2008 年 10 月 17 日 細胞を創る」研究会 1.0
（大阪大学吹田キャンパス）

④19 種類以下のアミノ酸のみを含む改変遺伝暗号表を使用したタンパク質の人工進化
内山正彦，小林晃大，木賀大介

2008 年 6 月 11 日 第 8 回日本タンパク質科学
会年会（タワーホール船堀・東京都）

⑤木賀大介（口頭発表）

細胞ウェアの物質的・生物学的側面

2008 年 4 月 21 日 第 21 回 回路とシステム
軽井沢ワークショップ（招待講演）（軽井
沢プリンスホテル）

⑥木賀大介（口頭発表）

2008 年 3 月 18 日 第 35 回知能システム科学
シンポジウム（特別講演）（東京工業大学大
岡山キャンパス）

⑦「「ありえた生命」から生命を知る合成生
物学」小林晃大 内山正彦 浅見俊 木賀大介
（口頭発表）

2008 年 3 月 18 日 生命の起原および進化学
会第 33 回学術講演会

「これまでの進化史にありえた遺伝暗号表」
を試験管内に再現する（東京薬科大学）

⑧小林晃大，内山正彦，浅見俊，木賀大介
（口頭発表）

2007 年 12 月 12 日 第 30 回日本分子生物学会
年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会
ワークショップ

遺伝暗号表の起源を知るために- 翻訳系に
おける合成生物学（パシフィコ横浜）

〔図書〕（計 5 件）

①「生物学への構成的アプローチ—人工遺
伝子回路の構築」木賀大介，生体の科学 59
巻 5 号 特集 現代医学・生物学の仮説・学
説 2008（2008.10）P. 382-383

②「生物」はどこまでの可能性を持つか：生
体高分子を人工的に組み合わせることによ
る考察，木賀大介，極限環境微生物学会誌
巻：7 号：1 頁：38-39（2008 年）

③「合成生物学とバイオナノプロセス」バイ
オナノプロセス—溶液中でナノ構造を作る
ウェット・ナノテクノロジーの薦め—，木賀
大介，p329-338，2008 年 3 月

④「構成的生物学で探る『ありえた生命』の
可能性」木賀大介，Bioテクノロジージャー
ナル 2007 年 7-8 月号 p391

⑤「「ありえた生物」から生命を探る 合成
生物学」木賀大介，日経サイエンス 2007 年
7 月号 p56-64

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

① 名称：単量体型ストレプトアビジン変異
体及びその製造法

発明者：木賀大介 内山正彦

権利者：東京工業大学

出願年月日：2008 年 9 月 8 日

種類：特許

番号：特許公開 2010-063373

国内外の別：国内

②名称：機能性非天然型タンパク質の製造法、
及び当該タンパク質の部位特異的修飾・固定
化法

発明者：木賀大介 内山正彦

権利者：東京工業大学

出願年月日：2007 年 3 月 6 日

種類：特許

番号：特許公開 2007-267733

国内外の別：国内

③名称：Process for Producing functional
non-naturally occurring proteins, and
method for site-specific modification and
immobilization of the proteins

発明者：Daisuke KIGA, Masahiko Uchiyama

権利者：Tokyo Institute of Technology,
Celagix Res Ltd.

出願年月日：2007/03/03

種類：特許

番号：米国出願番号 12/073, 23

国内外の別：国外

〔その他〕アウトリーチ

サイエンスカフェ「句会；科学を旅して、俳
句をつくろう」ゲストスピーカー

2007 年 5 月 4 日 日本科学未来館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木賀 大介 (KIGA DAISUKE)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・
准教授 30376587

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し