

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32686
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2018～2019
課題番号：18H06055・19K21181
研究課題名（和文）立体構造タグを用いたtRNA分子群の操作法の開発

研究課題名（英文）Rational design of aptamer-tagged tRNAs

研究代表者

向井 崇人（MUKAI, Takahito）

立教大学・理学部・助教

研究者番号：40612114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：アミノ酸を運搬するtRNA分子と、他の分子に結合するRNAアプタマーを、両者の機能を維持したまま融合することに成功した。allo-tRNA骨格上に様々なヘアピン型RNAアプタマーを移植し、結合タンパク質と実際に結合することを確認した。新規tRNA種によって4種類のアミノ酸（セリン、アラニン、チロシン、ヒスチジン）が運搬された。結合タンパク質の過剰発現により、tRNAを翻訳系から隔離する事もできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝暗号システムのダイナミックな改変や制御を行うための基盤的技術を発明した。アミノ酸を運搬するtRNA分子の改変自由度が飛躍的に向上し、将来的には様々な人工のアミノ酸や核酸塩基を用いたタンパク質工学やRNA工学の実現が期待される。無細胞タンパク質合成系の性能向上にも役立つ。更に、細胞内のtRNA分子集団の機能をON/OFF制御できるため、細胞内における2つの遺伝暗号システムの切り替えが実現しうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, tRNA variants tagged with a small hairpin RNA aptamer were developed without compromising the translation activities of the tRNAs and the target binding activities of the aptamers. A novel group of tRNAs (allo-tRNAs) was used as tRNA chassis. The allo-tRNA variants transferred at least four kinds of amino acids (serine, alanine, tyrosine, and histidine) into the ribosome in *E. coli*. Upon overexpression of the target proteins for transplanted aptamers, the allo-tRNA variants were sequestered from the translation apparatus of the cell. Aptamer-tagged tRNAs may be useful for radical and dynamic manipulation of the genetic code.

研究分野：合成生物学

キーワード：tRNA アプタマー 遺伝暗号

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムとセントラルドグマの合成生物学の急速な発展により、新しい細胞システムのデザインと開発が現実味を帯びてきた。しかしながら、タンパク質や巨大な RNA 分子とは異なり、tRNA 分子群を細胞内で操作する術が存在しない。tRNA は最大 100 塩基程度の小さな RNA であり、タンパク質合成系に適合するよう規格化された立体構造を有する。

(2) 研究代表者らの研究により、新規 2 次構造を有する tRNA グループである「allo-tRNA」が発見された。(9+3) allo-tRNA グループはセレノシステイン tRNA と同様の tRNA エルボー構造と長い V-アームを有する。長い V-アームはセリル tRNA 合成酵素 (SerRS) によって認識されるが、(9+3) allo-tRNA 骨格上では SerRS に対する立体障害が起きやすく、セリンが付加しにくい (9+3) allo-tRNA 変異体の単離に成功していた。

2. 研究の目的

(1) SerRS に認識されない allo-tRNA フレームを開発する。アラニル tRNA 合成酵素 (AlaRS) の認識要素を導入した場合に高活性なアラニン tRNA として機能すれば、有用なフレームであると判定する。

(2) 開発した allo-tRNA フレームの V-アーム先端に様々なヘアピン型アプタマーを移植し、tRNA としての機能とアプタマーとしての機能を維持する融合型 RNA の設計法と応用法を確立する。

3. 研究の方法

(1) allo-tRNA の設計とクローニングを行った。tRNA は pRSF プラスミド上のアラビノース誘導型プロモーター下流にクローニングした。9 種類の (9+3) allo-tRNA をアンバーサプレッサー変異体に改変し、アクセプターステムの先端を SerRS 又は AlaRS 用に最適化した変異体 (S 型と A 型) を作製した。更に、V-アームの根本にフリップアウトした塩基を 1-2 塩基挿入した変異体を 79 種類作製した。SerRS に対する親和性を失った変異体に対し、アミノ酸アイデンティティを置換した変異体や、ヘアピン RNA を融合した変異体も作製した。

(2) 大腸菌のレポーターシステムを用いて allo-tRNA 変異体の活性を評価した。大腸菌はアンバーサプレッサーを持たない DH10B 株を用い、4 種類のレポーター遺伝子は内部にアンバー変異を有し、どのアミノ酸に翻訳されてもアンピシリン耐性を付与するもの、Ser/Ala/Gly のみ許容又は His のみ許容してクロラムフェニコール耐性を付与するもの、Tyr のみ許容して sfGFP 蛍光を発するものを用いた。RNA アプタマー結合タンパク質の遺伝子は、pGEX プラスミドの tac プロモーター下流にクローニングした。いずれの場合も形質転換した大腸菌の培養液を固体培地上にスポットし、抗生物質耐性あるいは蛍光を観察した。

4. 研究成果

(1) 申請時の予備実験において、S002 変異体が大腸菌 SerRS に認識されにくいことを見出したので、S002 変異体よりも Ser 導入活性が低く、かつ A 型変異体が Ala を導入できる allo-tRNA 骨格を探索した。結果、有用な 3 種類の骨格 (S005, S072, S073) (図 1) を見出した。

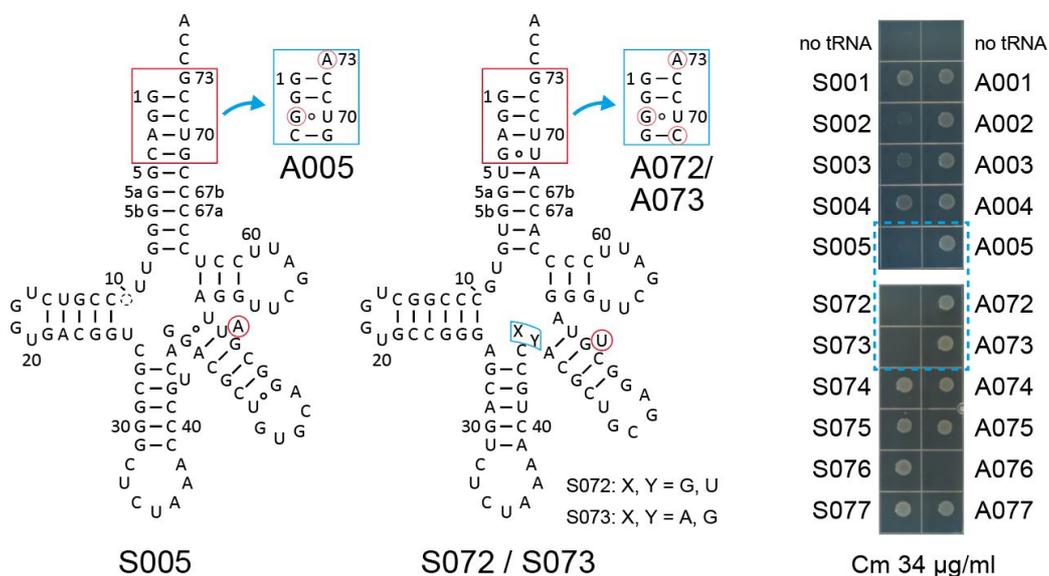


図 1 S 型に Ser が付加せず、かつ A 型に Ala が付加する allo-tRNA 骨格 3 種類

(2) S072 変異体に古細菌型チロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) の認識要素を導入した Y 型変異体を作製した。Y072 変異体 (図 2) は大腸菌のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) には認識されず、古細菌 *Ca. Methanomethylophilus alvus* の TyrRS によって Tyr が付加された。

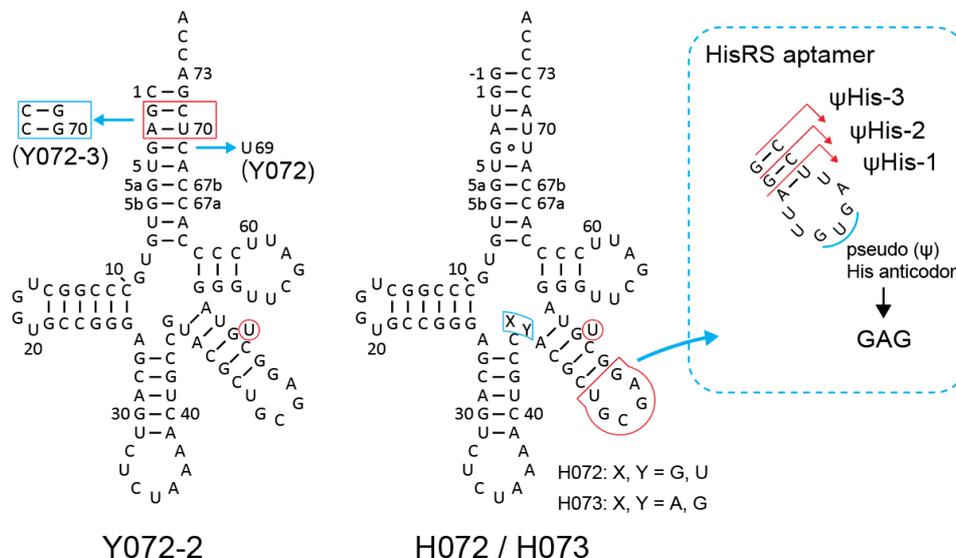


図 2 人工のチロシン tRNA とヒスチジン tRNA (アンバーサプレッサー型)

(3) S072・S073 変異体にヒスチジル tRNA 合成酵素 (HisRS) の認識要素である G-1:C73 を導入した H 型変異体 (図 2) を作製した。しかしながら His の導入は観察されなかった。そこで V-アームの先端に tRNA^{His} のアンチコドンループを移植した。GUG アンチコドンループは HisRS に対するアプタマーとして機能し、GAG に変異させると結合しないことが知られている。驚くべきことに、GUG アンチコドンループを移植した H072・H073 変異体は His を導入した。対照的に GAG アンチコドンループの場合は全く導入されなかった。従って、V-アームが本物のアンチコドンアームのように擬態し、HisRS を活性化した可能性がある。詳しいメカニズムの検証は今後の課題である。

(4) allo-tRNA とヘアピン型アプタマーの融合 RNA を作製し機能を検証した。A005 変異体はセレノシステイン tRNA と同様の tRNA エルボー構造を有するため、SelA や PSTK 等のセレノシステイン翻訳系タンパク質因子の過剰発現により物理的に隔離することができる (図 3)。同様に、A005 変異体の V-アーム先端に MS2 ヘアピンや SECIS_{tdhF} 配列を移植し、それぞれ MS2 coat protein や SelB を過剰発現させた場合に、アンバーサプレッサーとしての機能を阻害できるか調べた。いずれの RNA アプタマーと結合タンパク質の組み合わせにおいても、アンバーサプレッション効率の顕著な減少が観察された。異なる組み合わせの場合は全く影響がなかった。アプタマー毎に最適なアダプター長が異なるようで、MS2 ヘアピンを 1 塩基対のアダプターで連結した MS2-1 変異体が最も効率的に隔離された。AlaRS との結合が妨害されたと考えられる。

(5) まとめとして、本研究では細胞内で操作可能な tRNA の基本設計を発見した。様々な種類のアミノ酸への対応、より効率的な物理的隔離法の開発、多種多様な RNA アプタマーの同時使用、新規 aaRS の人工設計、等が今後の課題である。特に、アンチコドン配列認識に依存しない aaRS が開発できれば、人工塩基を含むコドンの利用に役立つだろう。

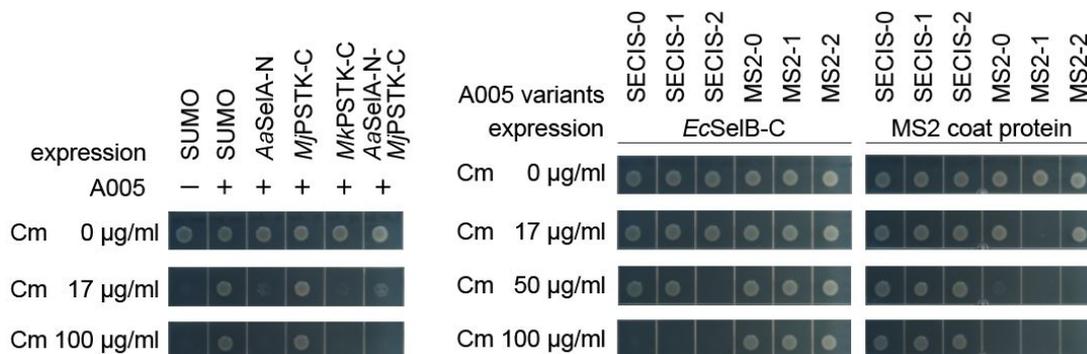


図 3 RNA アプタマーと結合タンパク質による allo-tRNA のタンパク質合成系からの隔離

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----