

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650155

研究課題名(和文)単純化遺伝暗号を併用する細胞の構築

研究課題名(英文)An engineered cell with a simplified genetic code

研究代表者

木賀 大介 (Kiga, Daisuke)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30376587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：なぜ生命は現在の20種類のアミノ酸セットを採用したのだろうか？単純なカタチから複雑なカタチへと変化する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。この疑問に答えるために、本研究ではこれまでの研究を拡張し、複数種類のアミノ酸を同時に除去した単純化遺伝暗号を構築した。さらに、細胞内で動作する単純化遺伝暗号の構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：Why does life use 20 canonical amino acids? Considering general evolutionary principle where a simple form develops into a complex form, the universal 20 amino acids are not likely to be defined from the establishment of the first genetic code. In this study, we developed multiple amino acid-excluded genetic codes by extension of our previous work. We also tried construction of a simplified code in a living cell.

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：合成生物学 遺伝暗号 リボソーム tRNA 直交性

1. 研究開始当初の背景

生命の最重要な演算である翻訳過程に用いられる遺伝暗号は、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 種類のアミノ酸セット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。この疑問に答えるために、申請者はすでに、19 種類以下のアミノ酸のみで成立する「単純化」遺伝暗号表を試験管内に構築していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝暗号に焦点をあてた構成的アプローチによって、「生命を構成するために 20 種類のアミノ酸全てが必要か」、という疑問を追求するために、単純化遺伝暗号のバリエーションを拡大することにある。さらに、単純化遺伝暗号を併用する細胞を構築することも試みることにした。

3. 研究の方法

単純化遺伝暗号の構築は、大腸菌 S30 無細胞タンパク質合成系に、試験管内転写で得られた tRNA 変異体を加えることで行った。

ゲノム上の野生型 tRNA (Trp) 遺伝子を失ってもプラスミド上の tRNA (Trp) 変異体によって生育する大腸菌ライブラリの作成のために、野生型 tRNA (Trp) 遺伝子を持つ温度感受性複製起点を持つプラスミドを構築した。また、この温度感受性プラスミドに変異を導入し、UGA サプレッサー tRNA (Trp) 発現プラスミドを構築した。また、別の複製起点を持つプラスミドの上に、UGA 変異を持つクロラムフェニコール遺伝子を持つレポーター遺伝子を構築した。

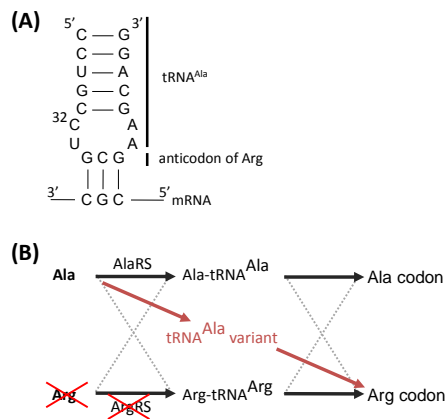
4. 研究成果

本研究では、なぜ生命は現在の 20 種類のアミノ酸セットを採用したのだろうか、という問いに対応して、追加の tRNA 変異体構築を基盤とする、種々の単純化遺伝暗号の作成に成功した。

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

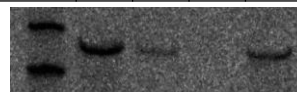
本研究で構築した新たな単純化遺伝暗号の一例

まず、単純化遺伝暗号の作成に複数種類の tRNA 変異体が同時に使用可能であることを検証するために、アルギニンコドンのアラニンコドンへの置換による単純化を行った。tRNA アラニンのアンチコドンそれぞれ GCG, UCG, UCU に置換した 3 種類の tRNA 変異体をそれぞれ用意し、これら及び ArgRS 阻害剤を、アルギニンを含まない大腸菌 S30 無細胞タンパク質合成系に添加することで、アルギニンを含まない単純化遺伝暗号が構成された。



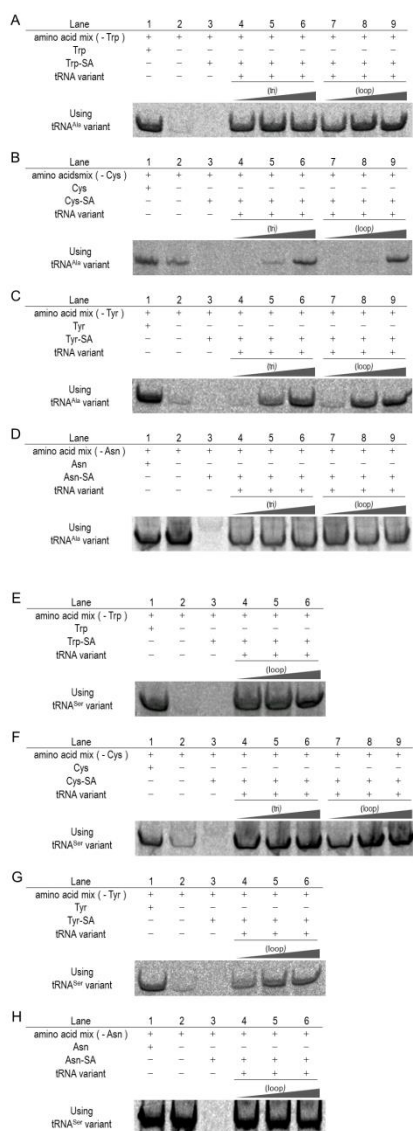
単純化遺伝暗号を構築するための(a)tRNA 変異体の構造と(b)反応の概念図

Lane No,	1	2	3	4
amino acid mix (-Arg)	+	+	+	+
Arg	+	-	-	-
Arg-SA (1μM)	-	-	+	+
tRNA variants	-	-	-	+



複数種の tRNA 変異体の添加によるアルギニン含まない単純化遺伝暗号の構築

引き続き、複数種類のアミノ酸が同時に遺伝暗号から除去できることを検証した。そのために、トリプトファン、システイン、チロシン、アスパラギンのそれぞれをアラニンもしくはシステインに置換した種々の 19 種類アミノ酸単純化遺伝暗号表を作成した。その構築については、アンチコドン 3 塩基の置換及びアンチコドンループ 7 塩基の置換を試みた。その結果、全ての場合で、単純化遺伝暗号の構築に成功した。



さらに引き続き、トリプトファン、システイン、チロシン、アスパラギン酸の全てのコードンが同時にセリンに置換されている 16 種類アミノ酸単純化遺伝暗号を構築した。

Lane	1	2	3	4
amino acid mix (- Trp, - Cys, - Tyr, - Asn)	+	+	+	+
Trp, Cys, Tyr, Asn	+	-	-	-
Trp-SA, Cys-SA, Tyr-SA, Asn-SA	-	-	+	+
tRNA variants	-	-	-	+



また、単純化遺伝暗号表の動作を検証する種々のレポータータンパク質の開発にも成功した。

さらに本研究では、既に試験管内で構築した、本来トリプトファンを指定する UGG コドンがアラニンに指定することで 19 種類のアミノ酸のみが記されている「単純化」遺伝暗

号を、細胞内に構築することを試みた。そのための第一段階として、ゲノム上の tRNA(Trp)を失い、温度感受性プラスミド上の野生型 tRNA(Trp)によって生育する大腸菌の作成が必要となる。tRNA(Trp)発現プラスミドの UGA に対応したサプレッサー変異によって、UGA 変異を持つクロラムフェニコール遺伝子に依存した大腸菌の生育が確認できたため、野生型 tRNA(Trp)プラスミドからの発現も推定された。続いてゲノム上の tRNA(Trp)の削除を相同組換えによって試みたが、達成することができなかった。

単純化遺伝暗号には、特定のアミノ酸が含まれない活性型タンパク質を、これまでよりも効率よく得るためのツールとしての役割が期待されている。進化分子工学実験におけるランダム変異導入の結果、普遍遺伝暗号による翻訳によって、除きたいアミノ酸がタンパク質変異体ライブラリー中に出現してしまうことがある。このような場合、変異・増幅・選択の繰り返しからなる進化分子工学を効率よく行えない。一方、単純化遺伝暗号を用いれば、特定のアミノ酸が含まれないままタンパク質配列にランダム変異を簡便に導入することが可能である。その結果、特定のタンパク質の機能と活性を保ったままタンパク質に使用されているアミノ酸の種類が減少した変異体を進化学により得ることが、これまでよりも簡便になると考えられる。

単純化遺伝暗号を用いた進化学は、理学的な研究以外にも、産業用タンパク質の高機能化もしくは高活性化のために有用である。例えば、特定のアミノ酸が除かれた単純化タンパク質は、抗酸化能や抗アルカリ能といった耐性が獲得されていることが期待される。また、リジンが 1 か所しかないタンパク質など、修飾部位が限定されたタンパク質変異体も重要である。このようなタンパク質変異体は、単純化暗号表を用いた進化学によって、そのアミノ酸を持たないタンパク質変異体を創出した後に、修飾部位となるアミノ酸残基を部位特異的変異によって容易にデザインできるであろう。このような高機能化タンパク質変異体のメリットは、同一アミノ酸配列を普遍遺伝暗号から合成可能である人工遺伝子を使用することで、通常の大腸菌などすでに産業面での使用が確立されている培養系を適用した生産が可能にあることにある。

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 4 件) 全て査読有

1.Kazuaki Amikura, Yoko Sakai, Shun Asami, and *Daisuke Kiga, "Multiple

Amino Acid-Excluded Genetic Codes for Protein Engineering Using Multiple Sets of tRNA Variants” **ACS Synth. Biol.**, 3(3):140–144 (2014)
10.1021/sb400144h

2. Kazuaki Amikura, and* Daisuke Kiga, “Reassignment of codons from Arg to Ala by multiple tRNA^{Ala} variants”. **Viva Origino**, 41(1-4): 20-23 (2013)
<http://www.origin-life.gr.jp/4103/4103020/4103020.pdf>

3. Kazuaki Amikura, *Daisuke Kiga. “The number of amino acids in a genetic code.” **RSC Advances** 3, 12512-12517 (2013)
10.1039/C3RA40609A

4. Akio Kawahara-Kobayashi, Akiko Masuda, Yuhei Araiso, Yoko Sakai, Atsushi Kohda, Masahiko Uchiyama, Shun Asami, Takayoshi Matsuda, Ryuichiro Ishitani, Naoshi Dohmae, Shigeyuki Yokoyama, Takanori Kigawa, Osamu Nureki, *Daisuke Kiga, “Simplification of the genetic code: restricted diversity of genetically encoded amino acids”, **Nucleic Acids Research**, 40(20):10576-84 (2012)
featured article (top5% in the journal)

[学会発表] (計 8 件)

1. Daisuke Kiga, 19 and 21 amino acid genetic codes, Gordon Research Conference, 2014年01月13日, Galveston (TX)

2. 木賀大介, アミノ酸を19種類未満しかコードしない「単純化遺伝暗号表」の構築, 分子生物学会, 2013年12月04日, 神戸

3. Daisuke Kiga, Simplification of genetic codes and its application in protein engineering, 9th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 2013年10月08日~2013年10月08日, 箱根

4. Daisuke Kiga, Genetic codes with less than 20 amino acids, The 65th Fujihara Seminar: International Symposium on Synthetic Biology of Unnatural Base Pairs and Amino Acids, 2013年10月02日, 苫小牧

5. Daisuke Kiga Simplification of the genetic code, Synthetic Biology 6.0, 2013年06月09日~2013年09月11日, London

6. Daisuke Kiga, Keynote: Synthetic experiment of life and evolution of genome, Earth-Life Science Institute 1st International Symposium, 2013年03月28

日, Tokyo tech.

7. 網蔵和晃 木賀大介, 原始タンパク質を創造するための単純化遺伝暗号表, 生命の起原および進化学会第38回学術講演, 2013年03月14日, 九州大学

8. Daisuke Kiga, Simplification of the genetic code: construction of a 19-amino acid genetic code, COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES on Synthetic Biology, 2012年11月27日, Suzhou, China

[図書] (計 2 件)

1. アミノ酸の種類がなぜ20種類なのか? 網蔵和晃, 木賀大介 高分子印刷中

2. RNAワールド 鮎川翔太郎, 木賀大介 「アストロバイオロジー」内 山岸明彦編 発行元 化学同人, 東京, ISBN 978-4-7598-1504-7, 332(107-117), 2013年

[その他]

TV Bros 2013年8月3日号 わらしべ MAD Scientist

日経産業新聞 2012年10月12日 進化分子工学の研究進む

ニュートン 2012年9月26日発売号 “太古の遺伝暗号表”を実験で再現

読売新聞 2012年9月7日 少ないアミノ酸でタンパク質合成

日経新聞 2012年7月29日 地球外生命はいるか

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

研究者番号: 30376587

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

研究協力者 小林晃大、網蔵和晃

東京工業大学 大学院生