

博士論文

試験管内転写 tRNA による
蛋白質合成系の構築

日比 敬太

博士論文

試験管内転写 tRNA による
蛋白質合成系の構築

2020 年 9 月

日比 敬太

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
メディカル情報生命専攻 分子医科学分野
指導教官: 富田 野乃

目次

1 序章	1
1.1 tRNA のエンジニアリングと遺伝暗号改変	1
1.2 遺伝暗号改変と無細胞系の利用	3
1.3 試験管内転写 tRNA による tRNA 再構成	5
1.4 本研究の目的	6
2 方法	7
2.1 実験材料と試料調製	7
2.1.1 実験材料	7
2.1.2 本研究で用いたプラスミド	9
2.1.3 tRNA 調製のための鋳型 DNA 作製	9
2.1.4 M1 RNA の精製	10
2.1.5 C5 Protein の精製	11
2.1.6 試験管内で転写した tRNA の調製	14
2.1.7 PURE system 反応液に用いた鋳型 DNA の調製	15
2.1.8 tRNA 修飾酵素をコードするプラスミドの作製	15
2.1.9 TrmD、TsaB、TsaC、TsaD、TsaE の調製	16
2.1.10 MnmE、GidA、GlyA、MnmA の調製	16
2.1.11 IscS、MnmC の調製	17
2.1.12 TusA、TusB、TusC、TusD、TusE の調製	18
2.1.13 PURE system を用いる実験のためのリボソーム調製	21
2.2 生化学実験と無細胞タンパク質合成系 PURE system を用いた実験の方法	22
2.2.1 放射性同位体標識されたアミノ酸を用いたアミノアシル化解析	22
2.2.2 Acid PAGE によるアミノアシル化解析	22
2.2.3 PURE system を用いたペプチド合成反応	23
2.2.4 PURE system を用いたタンパク質合成反応	23
2.2.5 PURE system によって合成された DHFR の活性測定	24
2.2.6 PURE system によって合成された sfGFP の活性測定	25
2.2.7 GlyA の活性測定	25
2.2.8 MnmE の活性測定	26
2.2.9 N ⁶ -スレオニルカルバモイルアデノシン(t ⁶ A)の tRNA ^{Ile} _{GAU} への導入	26
2.2.10 1-メチルグアノシン(m ¹ G)の tRNA ^{Pro} _{GGG} への導入	26
2.2.11 5-メチルアミノメチルウリジン(mnm ⁵ U)の tRNA ^{Glu} _{UUC} への導入	27
2.2.12 2-チオウリジン(s ² U)の tRNA ^{Glu} _{UUC} への導入	28
2.2.13 tRNA ^{Pro} _{GGG} へ導入した m ¹ G の HPLC による確認	28

2.2.14 修飾を導入した tRNA の Km, kcat 測定	29
3 結果	30
3.1 試験管内転写 tRNA による蛋白質合成系の構築	30
3.1.1 使用する tRNA の選択	30
3.1.2 iVTtRNA の合成と精製	33
3.1.3 iVTtRNA へのアミノアシルレーションの評価	35
3.1.4 Glu(CUC)、Ile(GAU)のアミノアシルレーション評価	38
3.1.5 PUREsystem 中での iVTtRNA によるタンパク質合成	40
3.1.6 タンパク質合成の iVTtRNA 依存性	43
3.1.7 タンパク質合成の tRNA 濃度依存性	45
3.1.8 DHFR、sfGFP の活性測定	47
3.1.9 Wobble 塩基対合を用いない sfGFP の合成と活性測定	49
3.2 試験管内転写 tRNA による遺伝暗号改変型蛋白質合成系の構築	51
3.2.1 遺伝暗号改変に使用する tRNA の選択	51
3.2.2 UCG、AGC コドンへの Ala 再割り当て	52
3.2.3 改変された遺伝暗号に基づくタンパク質合成	54
3.3 被修飾試験管内転写 tRNA による蛋白質合成系への展開	56
3.3.1 修飾を導入する tRNA の選択	56
3.3.2 t ⁶ A の Ile(GAU)への導入	58
3.3.3 m ¹ G の Pro(GGG)への導入	58
3.3.4 mnm ⁵ U の Glu(UUC)への導入	61
3.3.5 被修飾試験管内転写 tRNA によるタンパク質合成	63
3.3.6 s ² U の Glu(UUC)への導入	66
4 考察	68
4.1 本研究のまとめ	68
4.2 iVTtRNA によるタンパク質合成について	68
4.3 iVTtRNA による遺伝暗号改変について	70
4.4 被修飾 tRNA によるタンパク質合成について	71
4.5 原始生命モデルとしての tRNA 再構成	72
補遺	73
5 参考文献	85
6 謝辞	90

1 序章

1.1 tRNA のエンジニアリングと遺伝暗号改変

転移 RNA (tRNA)はリボソームにタンパク質の構成単位であるアミノ酸を運搬するとともに、遺伝暗号 (コドン)を解読して mRNA の塩基配列をアミノ酸へと変換するアダプター分子である。この2つの側面から、tRNA は構造、機能といった理学的側面、遺伝暗号改変を通じた遺伝暗号の拡張という工学的側面の両面から盛んに研究されてきた。特に、近年、遺伝暗号の拡張による非天然アミノ酸導入系の構築が、*in vitro*、*in vivo* の双方において、タンパク質工学への応用を指向して盛んに行われている^{[1][2][3]}。また、創薬研究への応用も期待されている^[4]。

こういった系の構築では、通常のアミノ酸を全て使いながら非天然アミノ酸を導入することを実現しなければならない。そこで、これまでの主な研究ではタンパク質合成で対応する tRNA がなく、アミノ酸を指定しないコドンである終止コドン、中でも Amber (UAG)コドンに対応する tRNA (アンバーサプレッサー tRNA)を既存の tRNA の改変により調製し、新たに系中に加えることで、非天然アミノ酸の導入が試みられてきた。一方で、アンバーサプレッサー tRNA の利用ではその直交性が課題であり、tRNA 側は内在性のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS)に認識されず、かつ、非天然アミノ酸をアミノアシル化するために用いる aaRS は内在性の tRNA を認識しないことが求められる。一つの手法として、化学的に非天然アミノ酸を結合した tRNA を *in vitro* の系に加える、または、細胞中にインジェクションによって加えることで導入する手法がある^{[5][6]}。しかし、これらの系では tRNA が使い捨てであるために効率に課題があり、内在性のものと直交する aaRS とアンバーサプレッサー tRNA のペアが探索されてきた。その結果、大腸菌などの細菌由来の系においては古細菌 *Methanocaldococcus janaschii* 由来の TyrRS-tRNA_{CUA} ペアが^[7]、真核細胞の系では大腸菌 LeuRS- tRNA_{CUA} ペアまたは TyrRS- tRNA_{CUA} ペアが^[8]、双方の系に利用できるものとしてメタン菌 (*Methanosarcina barkeri* など)の PylRS- tRNA_{CUA} ペアが見出されてきた^[8]。これらのペアの利用と、分子進化手法を駆使することで、数百種類の非天然アミノ酸を導入する手法が確立されてきた。一方で、利用するコドンは Amber コドンのみであるため、一度にタンパク質中に導入できる非天然アミノ酸は 1 種類だけであった。そこで、一度に複数種類の非天然アミノ酸をタンパク質に導入することを目指して、4 塩基コドンの利用が行われてきた。この手法では、アンチコドンを 4 塩基にした tRNA と改変されたリボソームを用いて非天然アミノ酸をタンパク質中に導入する^{[9][10]}。

このどちらの手法においても、その効率の低さが遺伝暗号改変系の更なる応用に向けた課題であった。特に、この効率の低さの一つの要因として、Amber コドンの利用では新しく系に加えた tRNA が翻訳反応の終結因子である RF-1 と競合してしまうこと、4 塩基コドンの利用では多くの場合、大腸菌ではレアコドンである CGG コドンなどを基にした 4 塩基コドンを利用するものの、内在性 tRNA と競合してしまうことが挙げられる。これらを解消するために、RF-1 を欠失させ、Amber コドンが全て他の終止コドンに置き換わった大腸菌株が構築されたが、その場合にも内在性の tRNA によって Amber コドンが誤読されてしまうなどの技術的な課題点が存在する^{[11][12]}。また、4 塩基コドンの利用では、現在の技術では *in vivo*、*in vitro* どちらで利用するかに関わらず、リボソームは細胞内で合成、組み立てられなければならないので、大きく改変することが難しいという技術的な障壁が存在する。そのため、内在性因子との競合を抑えつつ、遺伝暗号を改変できるような系の構築が望まれている。

1.2 遺伝暗号改変と無細胞系の利用

遺伝暗号改変を通じた非天然アミノ酸導入系の構築において、無細胞タンパク質合成系は大きな役割を果たしてきた。その理由の一つは、非天然アミノ酸を細胞に取り込ませる必要がなく簡便に系の構築が可能であるということである。さらに、より大きな理由として、無細胞タンパク質合成系は因子の濃度を比較的自由に変更することができるなど制御性に優れることが挙げられる。例えば、個別に調製した各因子を再構成した無細胞タンパク質合成系である PURE system を用いて、系から RF-1 を取り除くことで高効率な Amber コドンのデコーディングが達成されている^[13]。また、無細胞タンパク質合成系の利用は、特に、非天然アミノ酸を簡便に望みの tRNA に結合させることのできるフレキシザイム技術の開発後に盛んになっている^{[3][14]}。フレキシザイム技術は改変 aaRS-tRNA ペアを用いる系とは異なり、結合させる非天然アミノ酸の種類、tRNA 種を問わない。その反面、tRNA の選択性がないため系外で tRNA にアミノ酸を結合させる必要があり、無細胞タンパク質合成系が利用される。フレキシザイムと無細胞タンパク質合成系を組み合わせることで、非天然アミノ酸を含んだペプチドによるドラッグディスカバリーなどの大きな進展がなされてきた^[15]。

その一方で、無細胞タンパク質合成系においても、非天然アミノ酸を割り当てることができるコドンの数には大きな制限があり、一つのタンパク質に複数の非天然アミノ酸が導入できる系は技術的に困難を極める。これは、系に含まれている細胞由来の tRNA がセンスコドンを読み取ってしまうために、生体内でアミノ酸が割り当てられている 61 種類のコドンを利用できないことが大きな理由である。だが、普遍遺伝暗号においては複数のコドンが一つのアミノ酸を指定する縮重がおこっており、天然に含まれる 20 種類のアミノ酸を利用する上では多くのコドンは必須ではない。そのため、細胞抽出液系において系から tRNA を 1 種類取り除き、そこに非天然アミノ酸をチャージした tRNA を加えることでセンスコドンに非天然アミノ酸を割り当てることが試みられ、成功している^[16]。また、*in vivo* の研究においても、大腸菌ゲノム中に含まれる通常は Ser を指定する UCG、UCA コドンに他の Ser コドンに置き換え、さらに Ser(CGA)、Ser(UGA) の tRNA をコードする遺伝子を欠失させた大腸菌株が合成生物学的手法と遺伝子合成手法を駆使して作製されており、この株では *in vivo* でありながら、センスコドンへの非天然アミノ酸の割り当てに成功している^[17]。

しかし、これらの sense codon suppression では、遺伝暗号改変に利用するコドンを読み取る tRNA に対応したプローブを利用して都度 tRNA を取り除かなくてはならなかったり、tRNA の種類ごとにプローブの設計、検討を行う必要があった

りするため、煩雑である。また、*in vivo* の場合は、全ゲノムを合成し、大腸菌ゲノムと置き換える必要があるため、非常に煩雑な手順を踏むことになる。

そこで、センスコドンを含んだ遺伝暗号の書き換えを自由に行うことが可能であり、かつその手順が簡便である系の構築が求められてきた。このような系を構築することができれば、既存のフレキシザイムを用いた創薬基盤技術のさらなる発展が見込めるほか、いくつもの分子でラベル可能になることにより、FRET 技術などと組み合わせたタンパク質間相互作用の観察、分子進化技術と組み合わせることによる新しい有用タンパク質の創出が簡便に行えるようになると期待される。

1.3 試験管内転写 tRNA による tRNA 再構成

簡便に遺伝暗号を書き換えることができ、複数の非天然アミノ酸を導入できる系の構築を指向して、近年、tRNA を完全に排した無細胞タンパク質合成系を足場に、そこに試験管内転写によって調製した tRNA を加えることでタンパク質合成系を構築することが試みられてきた。

Cui らの構築した系では、3 種類の大腸菌から個別精製してきた native tRNA と 48 種類の試験管内で調製した tRNA によって GFP を合成することができる^[18]。また、岩根らの構築した系では、試験管内で調製した tRNA のみによって非天然アミノ酸を含んだペプチドを合成することができる^[19]。このような系を構築する最大の障壁として、修飾塩基の存在が挙げられる。生体内の tRNA は効率が良く正確なデコーディングやアミノアシレーションのために、化学修飾を受けた塩基をその内部に持ち、それが機能に大きく資している^[20]。一方、試験管内で調製した tRNA は修飾塩基を一切持たないため、機能的に不完全であると考えられる。特に、大腸菌においては Ile、Glu、Lys に対応する tRNA は効率よく aaRS によって認識されるために修飾塩基を必要とし、修飾塩基がない転写 tRNA の場合は十分にアミノアシレーションが起こらない^{[21]-[23]}。Cui らの系では、一部のコドンを利用せず、かつ活性の検出できなかった tRNA を大腸菌から個別に精製してくることで、この課題を克服している。また、岩根らの系においては、活性の低い Ile、Glu、Lys に対応する tRNA を他の tRNA 種の 30 当量添加することで克服している。

しかし、これまでに試験管内転写によって調製された tRNA のみによって機能を持ったタンパク質を合成可能な系が構築された例はいまだなく、真に自由な遺伝暗号改変のプラットフォーム作製のためにこの系の実現が望まれている。

1.4 本研究の目的

このような背景から、本研究では試験管内転写 tRNA のみによって機能を持ったタンパク質が合成可能な系の構築を目指した。個々の因子が個別に調製され、それを再構成した PURE system を、系を構築する足場となる無細胞タンパク質合成系として用いた。修飾塩基がないと機能しない tRNA を無理に用いるのではなく、修飾塩基がなくとも機能する tRNA 種を選択し、一部のコドンのみを利用してタンパク質合成を行うプロトタイプとなる系を構築することとした。また、試験管内転写 tRNA のみによってタンパク質が合成可能な系を構築できたため、遺伝暗号の改変によってアミノ酸を指定するコドンボックスを移動させることを試み、簡便に遺伝暗号が改変できることの実証を行った。また、試験管内転写 tRNA に最小限の修飾塩基を導入することでタンパク質合成効率の向上を試みた。

試験管内転写tRNAセット (iVTtRNA)

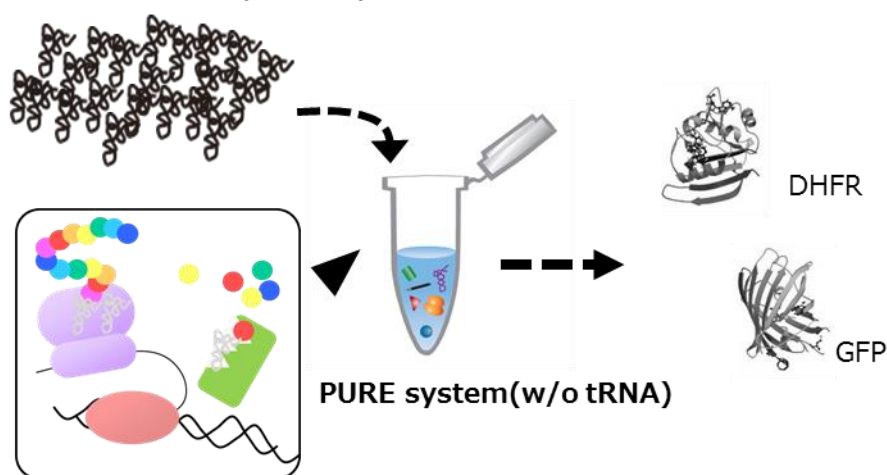


図 1-1 本研究で構築した系の概略

2 方法

2.1 実験材料と試料調製

2.1.1 実験材料

tRNA 転写に用いたリボヌクレオチドはアデノシン-5'-三リン酸二ナトリウム水和物 (ATP, 01072-11), グアノシン-5'-三リン酸二ナトリウム (GTP, 17450-61)をナカライテスク社から、シチジン-5'-三リン酸 二ナトリウム塩 (CTP, C1506), ウリジン-5'-三リン酸 三ナトリウム塩 二水和物 (UTP, 94370)をシグマアルドリッチ社からそれぞれ購入した。購入した各リボヌクレオチドは Milli-Q (M.Q.)で溶解した後、1M 水酸化ナトリウムによって、pH 6.0-8.1 に対応した pH 試験紙 (Whatman, 2629 990)を参照しながら、pH 7.6 に調整した 100 mM 溶液として調製した。

再構成型無細胞蛋白質合成系 PURE system はジーンフロンティア社から供与していただいたものを用いた。その際、Buffer である Solution I に tRNA が添加されていないもの、tRNA とアミノ酸が添加されていないものを供与していただいた。また、大腸菌由来 tRNA 混合物 (E.coli tRNA)および、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS)について、それぞれ Solution I, Solution II に含有されるのと同じものを個別に供与していただいた。aaRS は供与していただいたものを、Buffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM DTT, 30%(v/v) glycerol)で希釈して、1 μ M に調整したものを -70°C で保存して用いた。本研究では、PURE system として、PUREflex[®] 2.0 (ジーンフロンティア, PF201-0.25)を用いた。

各実験で用いた放射性同位体標識されたアミノ酸は American Radioactive Chemicals 社、Amersham 社、日本アイソトープ協会 (JRIA)、Perkin Elmer 社のいずれかから購入した (表 2-1)。L-システインは、放射性同位体標識されたシスチンを購入し、50 mM DTT 存在下で 37°C 15 分間還元することで調製した。調整した L-システインは -30°C で保存して用いた。

表 2-1. 本研究で用いた放射性同位体標識アミノ酸

アミノ酸	Label	販売元	Product No.
Phe	L-[¹⁴ C(U)]-	Perkin Elmer	NEC284E050UC
Leu	L-[¹⁴ C(U)]-	Amersham	CFB67
Ile	L-[¹⁴ C(U)]-	Perkin Elmer	NEC278E050UC
Met	L-[³⁵ S]-	Perkin Elmer	NEG009A001MC
Val	L-[¹⁴ C(U)]-	Perkin Elmer	NEC291E050UC
Ser	L-[¹⁴ C(U)]-	Amersham	CFB72
Pro	L-[¹⁴ C(U)]-	American Radioactive Chemicals	ARC 0654A
Thr	L-[¹⁴ C(U)]-	American Radioactive Chemicals	ARC 0677
Ala	L-[¹⁴ C(U)]-	Amersham	CFB62
Tyr	L-[¹⁴ C(U)]-	American Radioactive Chemicals	ARC 0655
His	L-[¹⁴ C(U)]-	Amersham	CFB140
Gln	L-[¹⁴ C(U)]-	American Radioactive Chemicals	ARC 196
Asn	L-[¹⁴ C(U)]-	American Radioactive Chemicals	ARC1244
Lys	L-[¹⁴ C(U)]-	American Radioactive Chemicals	ARC 0673
Asp	L-[¹⁴ C(U)]-	Amersham	CFB64
Glu	L-[¹⁴ C(U)]-	JRIA	MC156
Cystine(Cys)	L-[1,2,1',2'- ¹⁴ C]-	Perkin Elmer	NEC854010UC
Trp	L-[¹⁴ C(U)]-	JRIA	MC402
Arg	L-[¹⁴ C(U)]-	Perkin Elmer	NEC267E050UC
Gly	L-[¹⁴ C(U)]-	American Radioactive Chemicals	ARC 0292

2.1.2 本研究で用いたプラスミド

tRNA 調製に用いたプラスミドは岐阜大学の西川 一八 教授から提供いただいた pGEMEX プラスミドを用いた。このプラスミドは pGEMEX-1 の *Xba*I と *Bam*HI 制限酵素認識サイトの間各 tRNA 配列がそれぞれ挿入されたものである。一部の tRNA は提供されたプラスミドを基に、Site-directed mutagenesis 法によってアンチコドン部位を改変したものをを用いた。また、tRNA 成熟酵素である C5 Protein が pET21a(+)*Nde*I と *Xho*I サイトの間に、M1 RNA が pGEMEX-1 の *Xba*I と *Bam*HI サイト間に挿入されたプラスミドに関しても同様にご提供いただいた。今回構築されたプラスミドでは、C5 Protein は C 末端に 6*His-tag を有した状態で発現する。

また、tRNA 調製に用いた T7 RNA ポリメラーゼ (T7RNAP) は本研究室の先行研究で用いられていたもので SNAP タグが付加される前のものを先行研究と同じ手法で精製し用いた^[24]。使用したプラスミドは pQE30 中に T7RNAP 遺伝子が挿入されており、N 末端に 6*His-tag を有する状態で T7RNAP が発現する。

PURE system でのタンパク質合成実験で利用した、モデルタンパク質である大腸菌ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) をコードしたプラスミドは、研究室に所蔵されていた pURE-1 ベクターに各モデルタンパク質が挿入されているものをを用いた。また、super-folder Green Fluorescent Protein (sfGFP) をコードしたプラスミドは、pIDTSMART ベクターに遺伝子配列が挿入されたものを Integrated DNA Technologies Inc. から、または pUC 由来ベクターに挿入されたものをユーロフィンジェノミクス社から購入して用いた。

2.1.3 tRNA 調製のための鋳型 DNA 作製

転写反応の鋳型 DNA は Taq Polymerase (New England Biolabs (NEB), M0267E) による PCR 反応 (5 mL スケール) によって合成を行った。PCR 反応は NEB 社推奨の 3 ステップサイクル (アニーリング温度 55°C) プロトコルに従い行った。その際、T7RNAP を用いた run-off transcription では 3' 端に余分な塩基が付加されることが知られているため、tRNA 転写用の鋳型鎖増幅ではアンチセンス鎖末端に導入することで 3' 端での塩基付加を抑制することが知られている 2'-OMe 修飾が 3' 端から 2 塩基目に導入された reverse primer を用いた^[25]。PCR に用いた各プライマーはすべてユーロフィンジェノミクス社から購入し、その配列は表 S1 に、鋳型とプライマーの組み合わせは表 S2 に示した。

PCR 産物は以下の手順に従い精製した。PCR 反応後溶液に 1 当量の TE 飽和フェノ

ール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)混合溶液を加え混合し、遠心(13000Xg, 25°C, 10 min)を行った後、上層を回収した。この操作をもう一度繰り返した。回収した上層に0.1当量の3M KOAc (pH 5.2)を混合し、混合液全体の2.5当量の100% エタノールを加え4°Cで30分静置した。その後、遠心(13000Xg, 4°C, 15 min)によってPCR産物を沈殿させた。上清を除去し、沈殿に70% エタノール5 mLを加え再度遠心(13000Xg, 4°C, 15 min)を行った。上清を除去した後、風乾によって沈殿を乾燥させ、PCR反応スケールの1/20当量のM.Q.を加え沈殿を溶解させた。最終精製物を12% PAGEによって確認した後、260 nmの吸光度から濃度を見積もり、-30°Cで保存した。

2.1.4 M1 RNAの精製

tRNA成熟酵素であるRNase Pの酵素活性部位を持ちリボザイムであるM1 RNAの転写と精製は以下の手順で行った。40 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 20 mM MgCl₂, 1.5 mM Spermidine, 5 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM UTP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 30 nM T7RNAP, 0.2 U/mL inorganic pyrophosphatase (PPiase), 20 ug 鋳型DNAを含んだ20 mLの反応溶液を2 mLずつ分注し、37°Cで3時間転写反応を行った。反応液を一つにまとめ、2 mLのKOAc (pH 5.2)を混合し、さらに水飽和フェノール20 mLを加えてよく混合した。サンプルを遠心(14200Xg, 4°C, 15 min)によって分離し、上層を回収した。回収した上層に、クロロホルム・イソアミルアルコール(10:1)混合液を20 mL加えて混合し、遠心(14200Xg, 4°C, 10 min)によって分離した。上層を回収し、ÅKTA purifier (GE Healthcare)によって精製した。事前にBinding and Wash Buffer (20 mM HEPES-KOH(pH 7.6), 200 mM KCl)で平衡化しておいた2本直列に連結したHiTrap Q HP 5 mL column (GE Healthcare, 17115401)にサンプルを添加し、カラムを3 Column Volume (CV)のBinding and Wash Bufferで洗浄を行った後、Elution Buffer (20 mM HEPES-KOH(pH 7.6), 1000 mM KCl)に対するリニアグラジエント(0-100%, 6CV)によって溶出した。溶出画分は2 mL毎に分画し、M1 RNAが含まれる画分をUREA-PAGEによって確認し回収した。回収した画分に1/10当量の3M KOAC (pH 5.2)を加えて混合し、そこにイソプロパノールを回収画分と当量加え混合し、-30°Cで16時間以上静置した。その後、遠心(14200Xg, 4°C, 20 min)によってM1 RNAを沈殿させた。上清を取り除き、M1RNAを500 µL M.Q.に溶解し1.5 mLチューブに移した後、1/10当量の3M KOAC (pH 5.2)を加えて混合し、そこにイソプロパノールを500 µL加え混合し、-30°Cで16時間以上静置した。遠心(20400Xg, 4°C, 20 min)によってM1 RNAを沈殿させ、上清を取り除いた後、70% エタノールを500 µL加え、遠心(20400Xg, 4°C, 10 min)した。上清を取り除き、

沈殿を風乾によって乾燥させた後、200 μ L M.Q.に溶解した。最終精製物を UREA-PAGE によって確認し (図 2-1)、260 nm の吸光度から濃度を見積もり、DNA LoBind Tube (Eppendorf, 0030 108.035)に分注し、液体窒素で凍結後、 -70°C で保存した。

2.1.5 C5 Protein の精製

精製は、Fukunaga らの方法を基に改良を加えて行った^[26]。pET21a C5 Protein プラスミドを形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリンを含んだ Luria-Bertani 培地 (LB 培地)中で $\text{OD}_{600} = 0.4-0.6$ となるまで 37°C で培養した。その後、各 1L の培養液に対して IPTG を終濃度が 0.1 mM となるように加えて大量発現誘導を行った。さらに 37°C で 3 時間、培養を行った後、集菌し液体窒素で凍結後 -70°C で保存した。

菌体を 40 mL の Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5 mM EDTA, 1M NaCl, 10%(v/v) glycerol)で再懸濁し、超音波ホモジナイザーによって 40W の出力で発振時間が合計 300 秒になるように発振を 2 秒ずつ、8 秒間隔で行い、破碎した。不溶物を遠心 (14400 \times g, 4°C , 45 min)によって除去し、上清を回収した。上清に 50%飽和になるように硫酸アンモニウム粉末を加え、 4°C でよく溶解させた後、遠心 (12000 \times g, 4°C , 30 min)を行って沈殿を除去し、上清を回収した。さらに、上清に 80%飽和になるように硫酸アンモニウム粉末を加え、 4°C でよく溶解させた後、遠心 (12000 \times g, 4°C , 30 min)を行い、上清を除去し、沈殿を 3 mL の Buffer A (50 mM NaOAc (pH 6.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 7 mM 2-ME)に溶解した。溶液を 14kDa Cut Off 透析チューブ (Spectrum Laboratories, Inc., 132680) に入れ、Buffer A に対して 4°C で 16 時間以上透析を行った。透析中に沈殿が生ずるので、溶液全体を懸濁した後、遠心 (10000 \times g, 4°C , 10 min)を行って沈殿を回収した。さらに、500 μ L Buffer A を加えて沈殿を洗浄した後、遠心 (10000 \times g, 4°C , 10 min)を行って沈殿を回収した。この洗浄操作を再度繰り返し、沈殿に 20 mL の Buffer B (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 100 mM NH_4Cl , 6 M UREA, 10 mM DTT)を加えよく懸濁を行い、3.5 kDa Cut Off 透析チューブ (Spectrum Laboratories, Inc., 132724)に入れ、Buffer B に対して 4°C で 16 時間以上透析を行った。透析後の溶液を回収し、0.45 μm Milliplex-HV filter (Merck Millipore, SLHV033RS)に通じた後、ÄKTA purifier によって精製した。事前に 10 mM DTT の代わりに 7 mM 2-ME を含む Buffer B で平衡化した HiTrap SP HP 5 mL column (GE Healthcare, 17115101)にサンプルを添加し、カラムを 8CV の 10% Buffer C (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 2000 mM NH_4Cl , 6 M UREA, 7 mM 2-ME)で洗浄を行った後、10-14.5% Buffer C のリニアグラジエント (2CV)、

14.5% Buffer C (2CV)、14.5-100% Buffer C のリニアグラジエント (2CV)によって溶出した。溶出画分は1 mL 毎に分画し、C5 Protein を含む画分を SDS-PAGE によって確認し、回収した。回収した画分を 3.5 kDa Cut Off 透析チューブに入れ、Buffer D (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 800 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 2 M UREA, 7 mM 2-ME)に対して 4°C で 16 時間以上透析を行った。その後、UREA を含まない Buffer D (Buffer D-2)に透析外液を交換して更に 4°C で 3 時間透析を行い、Amicon Ultra 3kDa (Merck Millipore, UFC800324)によって濃縮を行った。濃縮したサンプルは 3.5 kDa Cut Off 透析チューブに入れ、50%(v/v) glycerol を含んだ Buffer D-2 に対して 4°C で 16 時間以上透析を行った。精製したサンプルは SDS-PAGE で確認し (図 2-1)、ブラッドフォード法によって濃度を決定し、Protein LoBind Tube (Eppendorf, 0030 108.116)に分注し、-30°C で保存した。凍結を起こすと、融解時に凝集を引き起こすため、-70°C での保存は行わなかった。

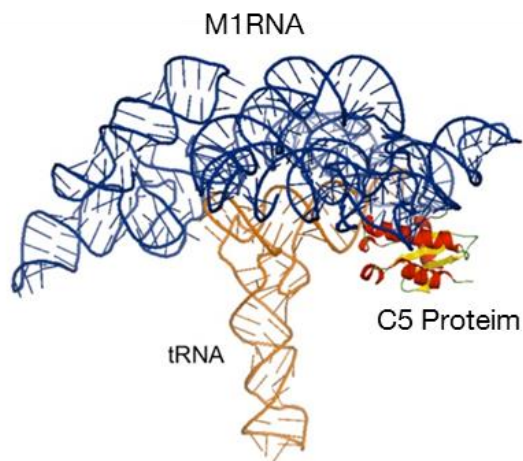
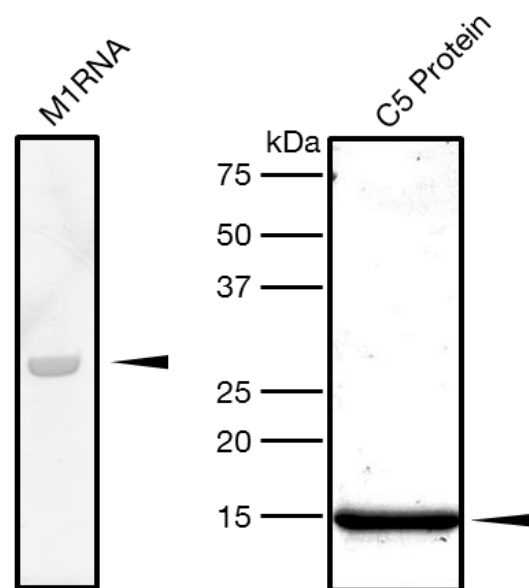
A**B**

図 2-1 RNasePの調製

A: RNasePのtRNA結合状態での結晶構造(*Thermotoga maritima*) (PDB 3Q1Qより一部改変)。

B: 精製後のM1 RNA (0.01 A₂₆₀ unit)、C5 Protein (7 μg)。目的物のバンドを▲で示した。

2.1.6 試験管内で転写した tRNA の調製

T7RNAP を用いた転写反応では、効率よく正確に転写を起こすために T7 プロモーター直下の転写開始点のセンス鎖がグアニン(G)となるよう設計することが一般的である。一方で、tRNA の中には G ではない塩基を 5'端に持つものもいる。それらに対応し、また、tRNA の 5'端を生体内と同じモノリン酸で統一するため、本研究では tRNA を 5'端に余分な配列を有した状態で転写し、tRNA の 5'端を認識し余分な配列を切断する酵素である RNase P を用いてプロセッシングすることで調製した。なお、5'端の余分な配列は pGEMEX-1 由来の配列(GGGAGACCAACAACGGUUUCCCUAGA)である。

試験管内転写 tRNA の調製は以下の手順で行った。40 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 20 mM MgCl₂, 1.5 mM Spermidine, 5 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM UTP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 30 nM T7RNAP, 0.2 U/mL inorganic pyrophosphatase (PPiase), 20 µg 鋳型 DNA を含んだ 20 mL の反応溶液を 2 mL ずつ分注し、37°C で 3 時間転写反応を行った。各反応チューブに 150 µM に調整した RNase P の RNA 成分である M1 RNA を 1/1000 当量加え (終濃度 150 nM)、その後 RNase P のタンパク質成分である C5 Protein を終濃度が 150 nM になるように加えて 37°C で 1 時間プロセッシングを行った。反応液を一つにまとめ、2 mL の KOAc (pH 5.2)を混合し、さらに水飽和フェノール 20 mL を加えてよく混合した。サンプルを遠心 (14200×g, 4°C, 15 min) によって分離し、上層を回収した。回収した上層に、クロロホルム・イソアミルアルコール (10:1)混合液を 20 mL 加えて混合し、遠心 (14200×g, 4°C, 10 min)によって分離した。上層を回収し、ÄKTA purifier によって精製した。事前に Binding and Wash Buffer で平衡化しておいた 2 本直列に連結した HiTrap Q HP 5 mL column にサンプルを添加し、カラムを 3 CV の Binding and Wash Buffer で洗浄を行った。その後、Step1: 0-55% Elution Buffer のリニアグラジエント(3CV)、Step2: 55-70% Elution Buffer のリニアグラジエント(6CV)、Step3: 100% Elution Buffer (2CV)によって溶出した。溶出画分は Step1 を 7 mL、Step2 を 3 mL 毎に分画し、成熟 tRNA が含まれる画分を UREA-PAGE によって確認し回収した。回収した画分に 1/10 当量の 3M KOAc (pH 5.2)を加えて混合し、そこにイソプロパノールを回収画分と当量加え混合し、-30°C で 16 時間以上静置した。その後、遠心 (14200×g, 4°C, 20 min)によって tRNA を沈殿させた。上清を取り除き、tRNA を 500 µL M.Q.に溶解し 1.5 mL チューブに移した後、1/10 当量の 3M KOAc (pH 5.2)を加えて混合し、そこにイソプロパノールを 500 µL 加え混合し、-30°C で 16 時間以上静置した。遠心 (20400×g, 4°C, 20 min) によって tRNA を沈殿させ、上清を取り除いた後、70% エタノールを 500 µL 加え、遠心 (20400×g, 4°C, 10 min)した。上清を取り除き、沈殿を風乾によって乾燥させ

た後、200 μ L M.Q.に溶解した。最終精製物を UREA-PAGE によって確認した後、DNA LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、 -70°C で保存した。

2.1.7 PURE system 反応液に用いた鋳型 DNA の調製

PURE system でのタンパク質合成反応に用いる鋳型 DNA は各プラスミドの T7 promoter、T7 terminator に対応したプライマーを用いた PCR 反応によって調製した。PCR には、KOD-plus ver.2 (東洋紡, KOD-211)を用い、メーカーで推奨されている 3 ステップサイクルの反応条件に準拠して反応させた(アニーリング温度 55°C)。

また、ペプチド合成に用いる鋳型 DNA は、オープンリーディングフレーム (ORF)を含んだプライマーを用いて、遺伝子が挿入されていない pURE-1 を鋳型として、Taq Polymerase によって合成を行った。PCR 反応は NEB 社推奨の 3 ステップサイクル(アニーリング温度 55°C)プロトコルに従い行った。

プライマー、鋳型とプライマーの組み合わせは表 S1、表 S2 に示した。

PCR 産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 28104)によって、メーカーのプロトコルに従い精製した。ただし、溶出には M.Q.を用いた。260 nm の吸光度から濃度を見積もり、 -30°C で保存した。

2.1.8 tRNA 修飾酵素をコードするプラスミドの作製

本研究で用いた tRNA 修飾導入に関連する酵素である、MnmC、MnmE、GidA、GlyA、IscS、MnmA、TusA、TusB、TusC、TusD、TusE、TrmD、TsaB、TsaC、TsaD、TsaE の発現および精製に用いたプラスミドは以下のように調製した。研究室に所蔵されている大腸菌 A19 株ゲノムを鋳型に、各遺伝子 ORF を対象に KOD-plus ver.2 (東洋紡, KOD-211)を用い、メーカーで推奨されている 3 ステップサイクル PCR によって目的遺伝子を増幅した(アニーリング温度 $T_m - 5^{\circ}\text{C}$)。ただし、MnmA のみメーカーで推奨されている 2 ステップサイクル PCR によって目的遺伝子を増幅した。

PCR 増幅に用いたプライマーは開始コドンから始まるアニーリング配列の 5'側に GAACAGATTGGTGGT を、終始コドンを含むアニーリング配列の 5'側に TTAGCAGCCGGATCC を付加したものをを用いた。MnmC、TsaC に関しては ORF が GTG から始まるため、この GTG が ATG となるようにプライマーを設計し用いた。増幅された遺伝子は、pET15b の thrombin target site の代わりに SUMO タグが BamHI 制限酵素サイトとの間に挿入された pSUMO ベクターの SUMO タグ末端および BamHI 下流に対応した配列を 15 塩基ずつ有する。pSUMO ベクター中に挿入されたタンパク質は N 末端に 6*His-tag、SUMO タグが付加された状態で発現する。TrmD、TsaB のみ

N 末端に 6*His-tag のみを持つようにプライマーを設計し、調製した。

PCR 産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 28104)によって、メーカーのプロトコルに従い精製した。ただし、溶出には M.Q.を用いた。260 nm の吸光度から濃度を見積もり、 -30°C で保存した。

増幅した各遺伝子は、PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (タカラバイオ, R045A) による PCR 反応で直鎖 DNA として調製した pSUMO ベクターに Gibson Assembly^[27]によって挿入した。

2.1.9 TrmD、TsaB、TsaC、TsaD、TsaE の調製

TrmD、TsaB、TsaC、TsaD、TsaE の各タンパク質は、当研究室 2018 年度卒業生である杉浦 直樹によって精製されたものを用いた (図 2-2)。

2.1.10 MnmE、GidA、GlyA、MnmA の調製

MnmE、GidA、GlyA、MnmA の精製は、以下のように行った。pSUMO MnmE、pSUMO GidA、pSUMO GlyA、pSUMO MnmA の各プラスミドを形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株を $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリンを含んだ LB 培地中で $\text{OD}_{600} = 0.6-1.0$ となるまで 37°C で培養した。その後、各 1L の培養液に対して IPTG を終濃度が $0.1\ \text{mM}$ (MnmA のみ終濃度 $0.3\ \text{mM}$)となるように加えて大量発現誘導した。さらに、 37°C で 3 時間、培養を行った後、集菌し液体窒素で凍結後 -70°C で保存した。

菌体を 40 mL の Lysis Buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1M NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 7 mM 2-ME, 10%(v/v) glycerol)で再懸濁し、超音波ホモジナイザーによって 40W の出力で発振時間が合計 250 秒になるように発振を 2 秒ずつ、8 秒間隔で行い、破碎した。破碎した菌体をスクリーキャップ 50 mL チューブ (labcon, 3181-345-008)に移し、遠心 ($19000\times g$, 4°C , 30 min)し不溶物を沈殿させた。上清を回収し、 $0.45\ \mu\text{m}$ Milliplex-HV filter に通じた後、Lysis Buffer であらかじめ平衡化した cComplete™ His-Tag Purification Resin (Roche, 05893801001) 5 mL と混合しローテーターで 4°C で 1 時間回転攪拌を行った。混合液をエコノパックカラム (BIO-RAD, 7321010)に移し、溶液を通過させた。さらに、Lysis Buffer 20 mL を 5 回通じて洗浄を行った後、目的タンパク質を Elution (X) Buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 400 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 7 mM 2-ME, X mM Imidazole, 10%(v/v) glycerol)によって溶出した。溶出は、Elution (50) Buffer 10 mL、Elution (100) Buffer 5 mL、Elution (200) Buffer 5 mL、Elution (400) Buffer 15 mL を順に樹脂に通じることで

行い、5 mL 毎に分画した。SDS-PAGE によって目的タンパク質が含まれる画分を決定し、その画分を 14kDa Cut Off 透析チューブに入れ、そこに研究室に所蔵されている SUMO プロテアーゼである Ulp1 を回収画分容積の 1/1000 量加えて、Cleavage+ Buffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 500 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 7 mM 2-ME, 10%(v/v) glycerol)に対して 16 時間以上透析を行った。

透析後の溶液を回収し、SDS-PAGE によって SUMO タグの切断を確認した後、Cleavage+ Buffer であらかじめ平衡化した cOmplete™ His-Tag Purification Resin 5 mL と混合しローターで 4°C で 1 時間回転攪拌を行った。混合液をエコノパックカラムに移し、溶液を通過させた。目的タンパク質は SUMO タグの切断により、SUMO タグの N 末端側に付加されている 6*His-tag を失うため、多くの場合この通過分に含まれるが、念のため Cleavage+ Buffer 30 mL を通じて洗浄を行った後、Elution (400) Buffer 15 mL を通じた。SDS-PAGE によって目的タンパク質が含まれる画分を決定し、Amicon Ultra 10kDa (Merck Millipore, UFC901024)によって濃縮を行った。濃縮後の溶液を、14kDa Cut Off 透析チューブに入れ、30% (v/v) glycerol が添加された Cleavage+ Buffer に対して 16 時間以上透析を行った。精製したサンプルは SDS-PAGE で確認し (図 2-2)、ブラッドフォード法によって濃度を決定し、Protein LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、-70°C で保存した。

MnmE のみ、Lysis Buffer、Elution (X) Buffer、Cleavage+ Buffer に glycerol が含まれないものを用いた。

2.1.11 IscS、MnmC の調製

IscS、MnmC の精製は、以下のように行った。pSUMO IscS、pSUMO MnmC の各プラスミドを形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株を 100 µg/mL アンピシリンを含んだ LB 培地中で OD₆₀₀ = 0.6-1.0 となるまで 37°C で培養した。その後、各 1L の培養液に対して IPTG を終濃度が IscS は 0.3 mM、MnmC は 0.1 mM となるように加えて大量発現誘導した。さらに、37°C で 3 時間、培養を行った後、集菌し液体窒素で凍結後-70°C で保存した。

菌体を 40 mL の Lysis Buffer で再懸濁し、超音波ホモジナイザーによって 40W の出力で発振時間が合計 250 秒になるように発振を 2 秒ずつ、8 秒間隔で行い、破碎した。破碎した菌体をスクリュウキャップ 50 mL チューブに移し、遠心 (19000×g, 4°C, 30 min)し不溶物を沈殿させた。上清を回収し、0.45 µm Millieux-HV filter に通じた後、Lysis Buffer であらかじめ平衡化した cOmplete™ His-Tag Purification Resin

5 mL と混合しローターで 4°C で 1 時間回転攪拌を行った。混合液をエコノパックカラムに移し、溶液を通過させた。さらに、Lysis Buffer 20 mL を 5 回通じて洗浄を行った後、目的タンパク質を Elution (X) Buffer によって溶出した。溶出は、Elution (50) Buffer 10 mL、Elution (100) Buffer 5 mL、Elution (200) Buffer 5 mL、Elution (400) Buffer 15 mL を順に樹脂に通じることで行い、5 mL 毎に分画した。SDS-PAGE によって目的タンパク質が含まれる画分を決定し、その画分を 14kDa Cut Off 透析チューブに入れ、そこに研究室に所蔵されている SUMO プロテアーゼである Ulp1 を回収画分容積の 1/500 量加えて、Cleavage+ Buffer に対して 3 時間、透析外液を KCl 濃度 300 mM にした Cleavage+ Buffer に換えて 3 時間、外液を KCl 濃度 100 mM にした Cleavage+ Buffer に換えて 12 時間以上透析を行った。

IscS、MnmC は SUMO タグ切断後も、樹脂に非特異的に吸着することが観察されたため、タグ切断後は ÄKTA *purifier* によって精製した。事前に IEX Buffer A (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 7 mM 2-ME) で平衡化した HiTrap Q HP 5 mL column にサンプルを添加し、カラムを 5CV の IEX Buffer A で洗浄を行った後、0-11% IEX Buffer B (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 1000 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 7 mM 2-ME) のリニアグラジエント (3CV, 2.5 mL 毎に分画)、11-22% IEX Buffer B のリニアグラジエント (5CV, 2 mL 毎に分画)、22% IEX Buffer B (2CV, 2 mL 毎に分画)、22-44% IEX Buffer B のリニアグラジエント (3CV, 3 mL 毎に分画) によって溶出した。SDS-PAGE によって目的タンパク質が含まれる画分を決定し、回収して 14 kDa Cut Off 透析チューブに入れ Cleavage+ Buffer に対して 3 時間透析を行った。その後、IscS は Amicon Ultra 10kDa、MnmC は Amicon Ultra 30kDa (Merck Millipore, UFC903024) によって濃縮を行った。濃縮した画分を 14 kDa Cut Off 透析チューブに入れ、30% (v/v) glycerol が添加された Cleavage+ Buffer に対して 16 時間以上透析を行った。精製したサンプルは SDS-PAGE で確認し (図 2-2)、ブラッドフォード法によって濃度を決定し、Protein LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、-70°C で保存した。

2.1.12 TusA、TusB、TusC、TusD、TusE の調製

TusA、TusB、TusC、TusD、TusE の精製は、以下のように行った。pSUMO TusA、pSUMO TusB、pSUMO TusC、pSUMO TusD、pSUMO TusE の各プラスミドを形質転換した大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を 100 µg/mL アンピシリンを含んだ LB 培地中で OD₆₀₀ = 0.4-0.6 となるまで 37°C で培養した。その後、各 1L の培養液に対して IPTG を終濃度が TusA、TusE は 0.3 mM、TusB、TusC、TusD は 1 mM となるように加えて大量発現誘導した。さらに、37°C で 3 時間、培養を行った後、集菌し液体窒

素で凍結後 -70°C で保存した。

TusA、TusEのカラム精製は、MnmEと同様の手法で行った。ただし、Lysis Buffer、Elution (X) Bufferには glycerol が含まれないものを用い、Cleavage+ Bufferの代わりに Cleavage Buffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 7 mM 2-ME, 10%(v/v) glycerol)を用い、全ての透析で 3 kDa Cut Off 透析チューブを用いた。また、SUMO タグ切断後のカラム精製の後、Amicon Ultra 50kDa (Merck Millipore, UFC505024)によって限外ろ過を行い、ろ液を回収し、30% (v/v) glycerol が添加された Cleavage Buffer に対して 16 時間以上透析を行った。精製したサンプルは SDS-PAGE で確認し (図 2-2)、ブラッドフォード法によって濃度を決定し、Protein LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、 -70°C で保存した。

TusB、TusC、TusDのカラム精製も、TusAと同様の手法で行った。ただし、TusB、TusDの精製では、Lysis Bufferとして Buffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 1M NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10%(v/v) glycerol, 4M UREA)、Elution (X) Bufferとして Buffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 400 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, X mM Imidazole, 10%(v/v) glycerol, 4M UREA)を代わりに用いた。また、Cleavage Bufferとして Buffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10%(v/v) glycerol, 1M UREA)を用いた。1回目のカラム精製後、回収したサンプルを Cleavage Buffer で 3 時間透析した後に、Ulp1 を回収画分容積の 1/1000 量加えて、さらに Cleavage Buffer に対して 16 時間以上透析を行った。SUMO タグ切断後のカラム精製の後、Amicon Ultra 50kDa (Merck Millipore, UFC505024)によって限外ろ過を行い、ろ液を回収し、30% (v/v) glycerol が添加された Cleavage Buffer に対して 3 時間透析を行い、さらに透析外液を UREA 濃度が 0.5M UREA になった Cleavage Buffer に変更して 16 時間以上透析を行い、さらに、UREA を含まない Cleavage Buffer に対して 3 時間透析を行った。精製したサンプルは SDS-PAGE で確認し (図 2-2)、ブラッドフォード法によって濃度を決定し、Protein LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、 -70°C で保存した。

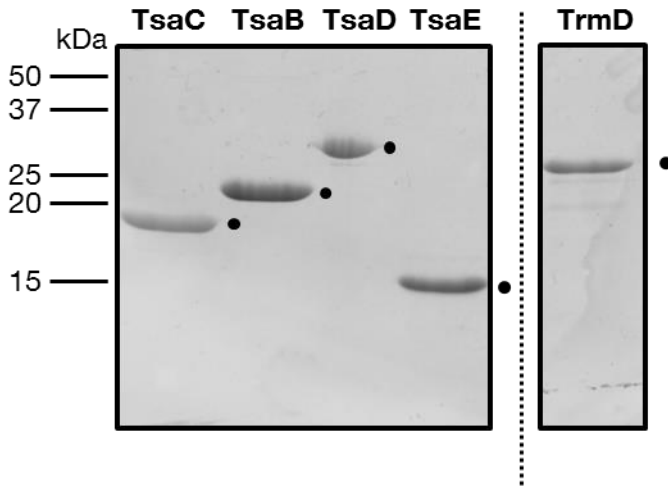
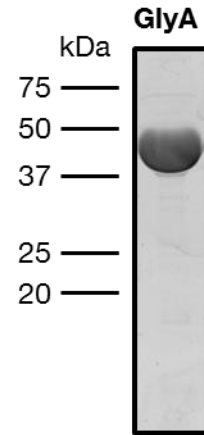
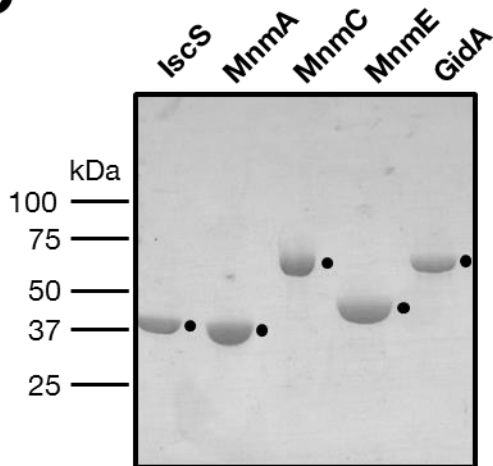
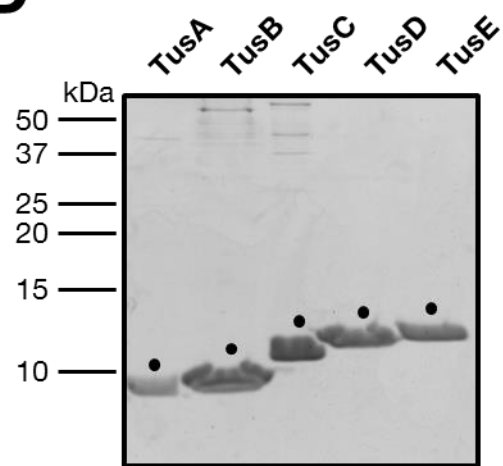
A**B****C****D**

図 2-2 tRNA修飾酵素の調製

A: 精製後のTsaC、TsaB、TsaD、TsaE、TrmD。各々7.5 μ gのタンパク質を泳動した。目的物のバンドを●で示した。

B: 精製後のGlyA (7.5 μ g)。目的物のバンドを●で示した。

C: 精製後のIscS、MnmA、MnmC、MnmE、GidA。各々7.5 μ gのタンパク質を泳動した。目的物のバンドを●で示した。

D: 精製後のTusA、TusB、TusC、TusD、TusE。各々4 μ gのタンパク質を泳動した。目的物のバンドを●で示した。

2.1.13 PURE system を用いる実験のためのリボソーム調製

本研究で用いたリボソームは全てジーンフロンティア社から供与していただいたものを用いた。しかし、供与された Ribosome は製造ロットによって tRNA が僅かに混入しているものがあった。そのため、tRNA が混入したロットに対しては、以下の方法で精製を行い、tRNA を取り除いた。

リボソーム溶液に、10 mg/mL Puromycin (InvivoGen, 58-58-2)を 20 分の 1 当量加え、さらに Peptidyl-tRNA hydrolase (ジーンフロンティア社から供与)を 100 分の 1 当量加えて、保存用 Buffer によって Mg 濃度を 5 mM に調整し、37°C で 30 分間静置した。その後、30% (w/v) sucrose を含んだ Buffer の上にリボソーム溶液を乗せ、Type45Ti ローターを用いて超遠心機 (BECKMAN 社)で 36000 rpm 4°C で 16 時間超遠心を行い、リボソームを沈殿させた。上清を捨て、沈殿をジーンフロンティア社が Solution III に用いている Buffer に溶解した後、脱塩、精製用プレパックディスクポータブルカラムによって精製しリボソーム溶液を調製した。濃度は $1 A_{260} \text{ unit} = 24 \text{ pmol}$ として吸光度から計算し決定した^[28]。リボソーム溶液濃度を Buffer によって Solution III として供されているものと揃え、DNA LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、-70°C で保存した。

2.2 生化学実験と無細胞タンパク質合成系 PURE system を用いた実験の方法

2.2.1 放射性同位体標識されたアミノ酸を用いたアミノアシルレーション解析

木賀らの方法に従い^[29]、本研究で用いた各 tRNA のアミノアシルレーションを特に明記しない場合は以下のように測定した。Buffer (100 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 40 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4 mM ATP, 1 Unit/μL Recombinant RNase Inhibitor (RRI) (TaKaRa, 2313A))に対して、2 A₂₆₀ unit/mL tRNA、20 μM L-[¹⁴C]-アミノ酸、50 nM aaRS となるように各因子を加えた反応溶液を用意し、37°C で 30 分間反応を行った。対照として 40 A₂₆₀ unit/mL E.coli tRNA を用いた。なお、アスパラギンのアミノアシルレーションを測定する場合は、68 μM L-[¹⁴C]-Asparagine となるように加えた。また、メチオニンのアミノアシルレーションを測定する場合は、アミノ酸として 0.6 μM L-[³⁵S]-Methionine、3.4 μM L-Methionine の混合物を用いた。システインの場合は、アミノ酸の保存溶液に由来する DTT の系中への持ち込みにより 5 mM DTT の条件で反応を行った。

反応後、8 μL を事前に 10% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) で平衡化した Whatman 25 mm GF/C filter disk (GE Healthcare, 1822-025) にスポットし、Vacuum filtration manifold (Merck Millipore, model 1225) にセットした。その後、5 mL 10% TCA を 2 回通過させ洗浄を行い、さらに、5 mL 100% エタノールを通過させ洗浄した。各フィルターを風乾させ、20 mL ポリエチレンバイアル (パーキンエルマー, 6008117) に入れ、Ultima Gold (パーキンエルマー, 6013329) を 5 mL 加えた。バイアルを溫和に 10 分間振とうし、液体シンチレーションカウンターによって Count per minute (CPM) を測定した。

定量にあたっては、段階希釈した放射性同位体標識されたアミノ酸をフィルターにスポットしたものの CPM から検量線を作り、そこから、検出されたアミノ酸量を見積もった。

2.2.2 Acid-PAGE によるアミノアシルレーション解析

グルタミン酸のアミノアシルレーションを検出するために行った、Acid-PAGE による解析は Walker らの方法に従い^[26]、以下のように行った。

アミノアシルレーション反応を 2.2.1 と同じ手順で 48 μM L-[¹⁴C]-Glutamic acid を用いて 10 μL 反応系で行った。反応後、2.5 μL 3M KOAc (pH 5.2) と 12.5 μL M.Q. を反応液に加え、さらに水飽和フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) 25 μL を加えてよく混合した。サンプルを遠心 (14200×g, 4°C, 15 min)

によって分離し、上層を 20 μ L 回収した。回収したサンプルに Loading Buffer (7M UREA, 0.05% BPB, 0.1 M NaOAc (pH 5.0))を 20 μ L 加え、サンプル全量を 10% Acid-gel (10% Acrylamide/bis mixed solution (19:1), 8M UREA, 0.1 M NaOAc (pH 5.0))にロードし、4°C で 110 CV, 120 min 泳動を行った。泳動後、ゲルを平衡化 Buffer (40% (v/v) methanol, 10% (v/v) CH₃COOH, 3% (v/v) glycerol)に浸し 30 分間浸とうした。平衡化 Buffer を交換してこの操作をさらに 2 回行った。その後、ゲルをろ紙とラップで挟み、RapiDry ゲルドライヤー (ATTO)で 80°C、6 時間以上乾燥させた。乾燥させたゲルをカセットに入れ、イメージングプレート (IP シート)に 3 日間露光させた。その際、カセットはモレキュラシーブスパック 3A (Wako, 131-13531)が入った袋に入れておいた。IP シートを BAS-5000 (富士フイルム)によってスキャンし、グルタミン酸の受容を検出した。

2.2.3 PURE system を用いたペプチド合成反応

PURE system を用いたペプチド合成反応は以下の条件で行った。20 nM ペプチドをコードした直鎖 DNA、0.63 mM L-Phe、0.63 mM L-Leu、0.63 mM L-Ile、0.63 mM L-Met、30 μ M L-[¹⁴C]-Ala または L-[¹⁴C]-Ala 及び、tRNA が存在するように、tRNA、アミノ酸が添加されていない Solution I を用いて PURE system 反応液を調製した。tRNA は 10 A₂₆₀ unit/mL tRNA^{Phe}_{GAA}、10 A₂₆₀ unit/mL tRNA^{Leu}_{CAG}、20 A₂₆₀ unit/mL tRNA^{Ile}_{GAU}、10 A₂₆₀ unit/mL tRNA^{Ala} を用いた。反応液を 10 μ L の反応容量で調製し、37°C で 90 分間転写、翻訳反応を行った。反応後、1 mg/mL RNaseA を 1 μ L 反応液に加え、37°C で 30 分間静置した。反応液を全量、ろ紙である Whatman 3MM CHR paper (GE Healthcare, 3030-700)にスポットし、ビーカーに入れた充分量の 10% TCA に投入し、30 分間振とうした。さらに、10% TCA を取り替え 30 分間振とうした後、100% エタノールに取り替え 10 分間振とうした。各ろ紙を風乾させ、20 mL ポリエチレンバイアルに入れ、Ultima Gold を 5 mL 加えた。バイアルを温和に 10 分間振とうし、液体シンチレーションカウンターによって CPM を測定した。CPM からペプチドに取り込まれた放射性同位体標識されたアミノ酸量を計算した。

2.2.4 PURE system を用いたタンパク質合成反応

PURE system を用いたタンパク質合成反応は以下の条件で行った。5 nM タンパク質をコードした直鎖 DNA、放射性同位体標識されたアミノ酸、tRNA が存在するように、tRNA が添加されていない Solution I を用いて PURE system 反応液を調製した。放射性同位体標識されたアミノ酸は、タンパク質を ³⁵S によって標識する場合は L-

[³⁵S]-Met を反応液 10 μL 当たり 0.2 μL 加え、¹⁴C で標識する場合は標識したいアミノ酸に対応した L-[¹⁴C]-アミノ酸を 10 μL 当たり 1 μL 加え用いた。各実験で用いた tRNA 濃度は表 S4 に示した。明記しない場合、30°C で 12 時間、転写、翻訳反応を行った。反応後の溶液を SDS-PAGE で泳動し、泳動後のゲルを Buffer (10% (v/v) methanol, 10% (v/v) CH₃COOH) に浸し 30 分間浸とうした。その後、ゲルをろ紙とラップで挟み、RapiDry ゲルドライヤーで 80°C、2 時間乾燥させた。乾燥させたゲルをカセットに入れ、IP シートに ³⁵S によって標識した場合は 3 時間-16 時間、¹⁴C によって標識した場合は 3 日間露光させた。IP シートを BAS-5000 によってスキャンし、合成産物への放射性同位体標識アミノ酸の取り込みを検出した。定量は MultiGauge (富士フイルム) を用いて行った。段階希釈した放射性同位体標識アミノ酸をろ紙にスポットし乾燥させ、ラップで包んだものを IP シートにゲルと同時に露光させることで検量線を作成して定量した。

2.2.5 PURE system によって合成された DHFR の活性測定

PURE system で合成された DHFR の活性測定は Maini らの方法に従い、以下のように行った^[10]。2 mL チューブ (Watson, 132-620C) に 2X Reaction Buffer (100 mM MES-NaOH (pH 7.0), 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 200 mM NaCl, 50 mM エタノールアミン, 20 mM 2-ME, 0.2 mM EDTA・Na) を 1 mL、M.Q. を 0.96 mL 入れ、37°C で 15 分間静置した。サンプルを光路長 1 cm の UV ディスポーザブルキュベットに入れ、さらに 100 mM NaOH に溶解した 10 mM ジヒドロ葉酸 (Sigma-Aldrich, D7006) を 20 μL 加え (終濃度 100 μM)、合成された DHFR を含む PURE system 反応液を 10 μL 加えた。攪拌子を入れ、キュベットを 37°C に設定したセルホルダに攪拌 (700 rpm) しながら 10 分間静置した。その後、キュベットに 20 mM NADPH を 20 μL 加え (終濃度 200 μM)、分光光度計 (日本分光, V-550) によって 340 nm の吸光度を 5 秒毎に 10 分間測定し、DHFR による DHF の還元と共役して NADPH が NADP⁺ へと変化し 340 nm の吸光が消失することを観察した。

時間に比例して吸光度が減少している範囲の傾きと、段階希釈した NADPH の吸光度から 1 分あたりに消費される NADPH 量を算出し、DHFR の活性を算出した。DHFR の活性は、Baccanari らの定義^[31]に基づき、1 mL の反応系において 1 分間に 1 μmol の DHF を還元する (1 μmol の NADPH を消費することと同値) ために必要な DHFR 量として 1 活性単位 (Unit) を決定した。Unit は μmol/min/mL の次元を持つ単位量である。

2.2.6 PURE system によって合成された sfGFP の活性測定

PURE system で合成された sfGFP の活性測定は以下のように行った。放射性同位体標識アミノ酸を含まない PURE system 反応液を 2.2.4 と同じ手順で MicroAmp Fast Reaction Tubes (Applied Biosystems, 4358293) に調製し、StepOne Real-time PCR system (Applied Biosystems) で 30°C または 37°C で 12 時間、転写、翻訳反応を行った。合成された sfGFP の活性は 3 分間ごとに FAM の蛍光測定モードによって測定し評価した。

2.2.7 GlyA の活性測定

テトラヒドロ葉酸 (THF) を、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 ($\text{CH}_2\text{-THF}$) へと変換する酵素である GlyA の活性測定は以下のように行った。

最終産物である $\text{CH}_2\text{-THF}$ は安定性が低く、自発的に THF へと戻ってしまい検出が困難であるため、メチレン基供与の基質である L-Ser が GlyA による反応後に Gly となることから、Gly を GlyRS によって $\text{tRNA}^{\text{Gly}}_{\text{GCC}}$ へとアミノアシルレーションさせることで検出した。2.2.1 のアミノアシルレーション解析の反応条件を以下のように改変した。因子濃度を 10 A_{260} unit/mL $\text{tRNA}^{\text{Gly}}_{\text{GCC}}$ または $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{CAG}}$ 、30 μM L- $[^{14}\text{C}]\text{-Ser}$ へと変更し、さらに 400 μM THF (Sigma-Aldrich, T3125)、10 μM GlyA、10 μM ピリドキサール-5'-リン酸 (P5P) が含まれるように反応溶液を調製した。tRNA は試験管内転写したものをを用いた。反応は 20 μL 系で 37°C、30 分間行った。反応液を全量、ろ紙にスポットし、ビーカーに入れた充分量の 10% TCA に投入し、30 分間振とうした。さらに、10% TCA を取り替え 30 分間振とうした後、100% エタノールに取り替え 10 分間振とうした。ろ紙を風乾させ、20 mL ポリエチレンバイアルに入れ、Ultima Gold を 5 mL 加えた。バイアルを温和に 10 分間振とうし、液体シンチレーションカウンターによって CPM を測定した。CPM からアミノアシルレーションによって tRNA に付加された Gly 量を計算した。計算にあたっては、L- $[^{14}\text{C}]\text{-Ser}$ 中の全ての ^{14}C 原子の比放射能が同一であると仮定し、反応後に Gly となったときの放射活性が 2/3 になると考えて計算した。

2.2.8 MnmE の活性測定

GTPase である MnmE の活性は以下のように測定した。反応溶液 (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 50 mM KCl, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM GTP, 1.5 μM MnmE) を 37°C, 0, 1, 5, 10 分間反応させた。生じた遊離リン酸を BIOMOL Green (Enzo Life Sciences, BML-AK111) によって定量し、活性を評価した。

2.2.9 N⁶-スレオニルカルバモイルアデノシン (t⁶A) の tRNA^{Ile}_{GAU} への導入

修飾塩基である t⁶A の tRNA^{Ile}_{GAU} への導入は当研究室で確立された手法に従い、試験管内転写によって調製した tRNA^{Ile}_{GAU} を用いて以下のように行った。反応溶液 (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 300 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 μM CaCl₂, 50 mM NaHCO₃, 1 mM ATP, 1 mM L-Thr, 5 μM TsaC, 5 μM TsaB, 5 μM TsaD, 5 μM TsaE, 4 A₂₆₀ unit/mL tRNA^{Ile}_{GAU}) を 37°C で 2 時間反応させた。反応溶液に 1/10 当量の KOAc (pH 5.2) を混合し、さらに 1 当量の水飽和フェノールを加えてよく混合した。サンプルを遠心 (14200Xg, 4°C, 15 min) によって分離し、上層を回収した。回収した上層に、クロロホルム・イソアミルアルコール (10:1) 混合液を反応溶液に対して 1 当量加えて混合し、遠心 (14200Xg, 4°C, 10 min) によって分離した。上層を回収し、回収量の 1/10 当量の 3M KOAc (pH 5.2) を加えて混合し、そこにイソプロパノールを 1 当量加え混合し、-30°C で 16 時間以上静置した。遠心 (20400Xg, 4°C, 20 min) によって tRNA を沈殿させ、上清を取り除いた後、70% エタノールを 500 μL 加え、遠心 (20400Xg, 4°C, 10 min) した。上清を取り除き、沈殿を風乾によって乾燥させた後、反応溶液の 1/30 当量の M.Q. に溶解した。最終精製物を UREA-PAGE によって確認した後、DNA LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、-70°C で保存した。

2.2.10 1-メチルグアノシン (m¹G) の tRNA^{Pro}_{GGG} への導入

修飾塩基である m¹G の tRNA^{Pro}_{GGG} への導入は当研究室で確立された手法に従い、試験管内転写によって調製した tRNA^{Pro}_{GGG} を用いて以下のように行った。反応溶液 (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 200 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 36.4 μM S-アデノシルメチオニン (SAM), 1.5 μM TrmD, 10 A₂₆₀ unit/mL tRNA^{Pro}_{GGG}) を 37°C で 2 時間反応させた。反応溶液に 1/10 当量の KOAc (pH 5.2) を混合し、さらに 1 当量の水飽和フェノールを加えてよく混合した。サンプルを遠心 (14200Xg, 4°C, 15 min) によって分離し、上層を回収した。回収した上層に、クロロホルム・イソアミルアルコール

(10:1)混合液を反応溶液に対して 1 当量加えて混合し、遠心 (14200Xg, 4°C, 10 min)によって分離した。上層を回収し、回収量の 1/10 当量の 3M KOAc (pH 5.2)を加えて混合し、そこにイソプロパノールを 1 当量加え混合し、-30°C で 16 時間以上静置した。遠心 (20400Xg, 4°C, 20 min)によって tRNA を沈殿させ、上清を取り除いた後、70% エタノールを 500 μ L 加え、遠心 (20400Xg, 4°C, 10 min)した。上清を取り除き、沈殿を風乾によって乾燥させた後、反応溶液の 1/30 当量の M.Q.に溶解した。最終精製物を UREA-PAGE によって確認した後、DNA LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、-70°C で保存した。放射性同位体標識された SAM を用いる場合は、S-[methyl-¹⁴C]-ラベルされたものを用いた (パーキンエルマー, NEC363)。

2.2.11 5-メチルアミノメチルウリジン (mnm⁵U) の tRNA^{Glu}_{UUC}への導入

修飾塩基である mnm⁵U の tRNA^{Glu}_{UUC} への導入は試験管内転写によって調製した tRNA^{Glu}_{UUC} を用いて以下のように行った。

反応溶液 (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 150 mM KCl, 12.5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 500 μ M FAD, 1 mM THF, 4 mM GTP, 2.5 mM NADH, 0.2 mM P5P, 1 mM L-Ser, 1 mM Gly, 36.4 μ M SAM, 0.1 Unit/ μ L RRI, 10 μ M GlyA, 3 μ M GidA, 3 μ M MnmE, 2.5 μ M MnmC, 6 A₂₆₀ unit/mL tRNA^{Glu}_{UUC}) を 37°C で 4 時間反応させた。反応溶液に 1/10 当量の KOAc (pH 5.2)を混合し、さらに 1 当量の水飽和フェノールを加えてよく混合した。サンプルを遠心 (14200Xg, 4°C, 15 min)によって分離し、上層を回収した。回収した上層に、クロロホルム・イソアミルアルコール (10:1)混合液を反応溶液に対して 1 当量加えて混合し、遠心 (14200Xg, 4°C, 10 min)によって分離した。上層を回収し、回収量の 1/10 当量の 3M KOAc (pH 5.2)を加えて混合し、そこにイソプロパノールを 1 当量加え混合し、-30°C で 16 時間以上静置した。遠心 (20400Xg, 4°C, 20 min)によって tRNA を沈殿させ、上清を取り除いた後、70% エタノールを 500 μ L 加え、遠心 (20400Xg, 4°C, 10 min)した。上清を取り除き、沈殿を風乾によって乾燥させた後、M.Q.に溶解した。溶解した tRNA を用いて再度反応溶液を調製し、37°C で 4 時間反応させた。反応溶液に 1/10 当量の KOAc (pH 5.2)を混合し、さらに 1 当量の水飽和フェノールを加えてよく混合した。サンプルを遠心 (14200Xg, 4°C, 15 min)によって分離し、上層を回収した。回収した上層に、クロロホルム・イソアミルアルコール (10:1)混合液を反応溶液に対して 1 当量加えて混合し、遠心 (14200Xg, 4°C, 10 min)によって分離した。上層を回収し、MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare, 27532501)によって脱塩を行った。その後、回収量の 1/10 当量の 3M KOAc (pH 5.2)を加えて混合し、そこにイソプロパノールを 1 当量加え混合し、-30°C で 16 時間以上静置した。遠心 (20400Xg, 4°C, 20 min)によって tRNA

を沈殿させ、上清を取り除いた後、70% エタノールを 500 μ L 加え、遠心 (20400 \times g, 4°C, 10 min)した。上清を取り除き、沈殿を風乾によって乾燥させた後、反応溶液の 1/25 当量の M.Q.に溶解した。最終精製物を UREA-PAGE によって確認した後、DNA LoBind Tube に分注し、液体窒素で凍結後、-70°C で保存した。

2.2.12 2-チオウリジン (s^2U) の tRNA^{Glu}_{UUC} への導入

修飾塩基である s^2U の tRNA^{Glu}_{UUC} への導入は池内らの方法に従い^[32]、試験管内転写によって調製した tRNA^{Glu}_{UUC} を用いて以下のように行った。

反応溶液 (50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 50 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 0.3 mM L-Cys, 0.2 Unit/mL PPIase, 0.1 Unit/ μ L RRI, 2 mM ATP, 20 μ M P5P, 2 μ M MnmA, 0.5 μ M IscS, 1.5 μ M TusA, TusB, TusC, TusD, TusE, 10 A₂₆₀ unit/mL tRNA^{Glu}_{UUC}, 1/20 量の L-[³⁵S]-Met と L-[³⁵S]-Cys 混合物 (American Radioactive Chemicals, ARS0110)) を 37°C で 2 時間反応させた。反応溶液に 1/10 当量の KOAc (pH 5.2)を混合し、さらに 1 当量の水飽和フェノールを加えてよく混合した。サンプルを遠心 (14200 \times g, 4°C, 15 min)によって分離し、上層を回収した。回収した上層 20 μ L をろ紙にスポットし、ビーカーに入れた充分量の 10% TCA に投入し、30 分間振とうした。さらに、10% TCA を取り替え 30 分間振とうした後、100% エタノールに取り替え 10 分間振とうした。各ろ紙を風乾させ、20 mL ポリエチレンバイアルに入れ、Ultima Gold を 5 mL 加えた。バイアルを温和に 10 分間振とうし、液体シンチレーションカウンターによって CPM を測定した。CPM から tRNA に取り込まれた放射性同位体標識された L-[³⁵S]-Cys を計算し、修飾塩基の導入を評価した。

2.2.13 tRNA^{Pro}_{GGG} へ導入した m^1G の HPLC による確認

tRNA^{Pro}_{GGG} へ導入した m^1G は以下の方法によって HPLC で確認を行った。

反応溶液 (20 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0.4 mUnit/ μ L Phosphodiesterase (Sigma Aldrich, P9041), 2.5 mUnit/ μ L Alkaline Phosphatase (TaKaRa, 2120A), 0.4 mg/mL RNaseA (Thermo Fisher Scientific, EN0531), 10 A₂₆₀ unit/ml m^1G -tRNA^{Pro}_{GGG}) を 37°C で 16 時間反応させ、分解を行った。その後、HPLC で分析した。溶媒は Solvent A (5 mM Ammonium acetate(pH 5.3))と Solvent B (5 mM Ammonium acetate(pH 5.3), 60% (v/v) Acetonitrile) を使用し、流速 1 ml/min で C18 逆相カラムを用いて、多段階のグラジエント [1-35% B (0-35 min), 35 99% B (35-40 min), 99% B (40-50 min)]によって 254 nm の吸光度を追跡し、解析を行った。

2.2.14 修飾を導入した tRNA の K_m , k_{cat} 測定

修飾を導入した tRNA としていない tRNA の見かけの K_m および k_{cat} を 2.2.1 と同様の方法によって測定した。

ただし、アミノ酸の濃度を Ile は 20 μM , Pro は 37 μM , Glu は 48 μM としてそれぞれ用い、サンプル中の tRNA 濃度は 1 A_{260} unit を 1600 pmol として計算し、3.2, 6.4, 12.8, 16 μM に変更した。また、反応時間も Ile は $t^6\text{A}$ 修飾を導入した tRNA を用いる場合は 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 min とし、導入していない tRNA の場合は 0, 2, 5, 10, 15, 30 min とした。Pro は修飾の導入に関わらず反応時間を 0, 0.5, 1, 2 min とし、Glu も修飾の導入に関わらず反応時間を 0, 2, 5, 10, 15, 30 min とした。アミノ酸取り込み量と時間が線形に比例している範囲について線形近似を行い、各 tRNA 濃度におけるアミノアシルレーション速度 V pmol/min を決定した。 V を tRNA 濃度に対してプロットし、Kaleida Graph (Synergy Software, version 3.6.)を用いてミカエリス・メンテン式にフィッティングすることで見かけの K_m , V_{max} を算出した。

3 結果

3.1 試験管内転写 tRNA による蛋白質合成系の構築

3.1.1 使用する tRNA の選択

大腸菌は 61 種類のセンスコドンを読み解くために開始メチオニンに対応する tRNA を含めて、41 種類のアンチコドンを持った tRNA セットをゲノムに有している(図 3-1A)^[33]。生体内では、tRNA はさまざまに化学修飾を受けた修飾塩基をその分子内に持つことが知られているが、これら tRNA の多くはアンチコドン部位の塩基に化学修飾を受けており^[34]、翻訳効率の向上や正確性を担保していると考えられている^[35]。一方で、試験管内で転写され調製された tRNA は通常、その分子内に修飾塩基を一切持たない。そのような tRNA であっても、多くの tRNA ではアミノアシル化は起こることが知られている^{[21]-[23],[36]-[51]}。しかし、Ile(GAU)、Glu(UUC)、Glu(CUC)では修飾塩基を持たない転写 tRNA ではアミノアシル化の効率の指標である特異性定数 (k_{cat}/K_m)が 100 分の 1 以下になることが報告されている^{[21][22]}。また、Lys(UUU)では V_{max}/K_m が 140 分の 1 になることが報告されている^[23]。さらに、Ile(CAU)では Lysidine 修飾がアンチコドン 1 塩基目の C に入ることによって、本来対応する AUG コドンを読み解かなくなり、AUU コドンを読み解くようになるというコドン認識の編集が修飾塩基によって起こることが示されている^[52]。このような修飾塩基が機能に大きく寄与している tRNA の存在が試験管内転写 tRNA によるタンパク質合成系を構築する際の技術的な障壁となっており、先行研究においては、一部の tRNA を大腸菌から精製する必要が生じていた^[18]。

本研究では、試験管内転写 tRNA (iVtRNA)のみで機能を持ったタンパク質を合成できる系を構築するため、41 種類全ての tRNA を使い全てのコドンを読み解ける系を直接目指すのではなく、修飾塩基を持たなくとも機能する tRNA によって一部のコドンのみを利用するプロトタイプとなる系の構築を行うこととした。アンチコドンに修飾塩基を持つ tRNA は aaRS によるアミノアシル化が起こっても、コドンのデコーディング効率や正確性に問題を生じる可能性があったため、それら tRNA の利用は出来る限り避けることとした。そこで、本研究で使用する tRNA として、アンチコドンに修飾塩基を持たない tRNA を 1 アミノ酸につき 1 種類と開始メチオニンについて合計 21 種類選択した(図 3-1B)。しかし、コドン 2 文字目が A のコドンに対応する tRNA は Gln(CUG)を除いて全ての tRNA 種がアンチコドンに修飾塩基を持つ^[34]。一方で、Tyr(GUA)ではアンチコドンに Queuosine (Q)修飾が入っていない転写 tRNA で特異性定数が 3 分の

2 程度に保持されることから^[40]、コドン 2 文字目が A のコドンに対応する tRNA の中でアンチコドンに Q 修飾を持つものは、修飾が入る前の塩基である G をアンチコドンの塩基として採用することにした。Lys(UUU)、Glu(UUC)に関しては、5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン (mnm⁵s²U) という生存に必須な修飾酵素が関連する修飾塩基を持ち、また、修飾の入っていない転写 tRNA においてアミノアシル化効率が大きく減少することが分かっている^{[22][23]}。一方で、Lys(UUU)のアンチコドンを CUU に改変した改変体ではアミノアシル化効率が修飾塩基を持たない Lys(UUU)と比べて回復すること^[37]、また、同じ真正細菌である放線菌 *Streptomyces griseus* が Glu(CUC)を持つことから^[34]、Lys、Glu の tRNA はアンチコドン 1 文字目を C に改変したものをを用いることとした。

A

		SECOND									
		U		C		A		G			
FIRST	U	Phe	Phe(GAA)	Ser	Ser(GGA)	Tyr	Tyr(GUA) Q	Cys	Cys(GCA)	U	C
		Leu	Leu(UAA) cmnm⁵U		Ser(UGA) cmo⁵U	Stop		Stop		A	
			Leu(CAA) Cm		Ser(CGA)	Trp	Trp(CCA)	G			
	C	Leu	Leu(GAG)	Pro	Pro(GGG)	His	His(GUG) Q	Arg	Arg(ACG)	U	C
			Leu(UAG) cmo⁵U		Pro(UGG) cmo⁵U	Gln	Gln(UUG) cmnm⁵s²U		Arg(CCG)	A	
			Leu(CAG)		Pro(CGG)	Gln(CUG)	G				
	A	Ile	Ile(GAU)	Thr	Thr(GGU)	Asn	Asn(GUU) Q	Ser	Ser(GCU)	U	C
			Ile(CAU) k²C		Thr(UGU) cmo⁵U	Lys	Lys(UUU) mnm⁵s²U		Arg(UCU) mnm⁵U	A	
		Met	mMet(CAU) ac⁴C		fMet(CAU)		Thr(CGU)	Arg(CCU)	G		
	G	Val	Val(GAC)	Ala	Ala(GGC)	Asp	Asp(GUC) Q	Gly	Gly(GCC)	U	C
			Val(UAC) cmo⁵U		Ala(UGC) cmo⁵U	Glu	Glu(UUC) mnm⁵s²U		Gly(UCC) mnm⁵U	A	
									Gly(CCC)	G	

B

		SECOND									
		U		C		A		G			
FIRST	U	Phe	Phe(GAA)	Ser	Ser(GGA)	Tyr	Tyr(GUA)	Cys	Cys(GCA)	U	C
						Stop		Stop		A	
							Trp	Trp(CCA)	G		
	C	Leu		Pro	Pro(GGG)	His	His(GUG)			U	C
						Gln	Gln(CUG)	Arg	Arg(CCG)	A	
									G		
	A	Ile	Ile(GAU)	Thr	Thr(GGU)	Asn	Asn(GUU)			U	C
									A		
		Met	mMet(CAU) fMet(CAU)			Lys	Lys(CUU)			G	
	G	Val	Val(GAC)	Ala	Ala(GGC)	Asp	Asp(GUC)	Gly	Gly(GCC)	U	C
										A	
						Glu	Glu(CUC)			G	

図 3-1 再構成に用いるtRNAの選択

A: コドン表。各遺伝暗号に対応するアミノ酸(左)、大腸菌内で対応するtRNAのアンチコドン(右)を示した。アンチコドン1文字目に修飾塩基を持つtRNAは、持つ修飾の略号を下に示した(赤字)。

B: 本研究で用いたtRNAのアンチコドン(右)と対応する遺伝暗号(左)。選択したtRNAのうち、本来アンチコドンに修飾塩基を持つものは、修飾のない塩基を用いたものを青字、アンチコドン配列を変更したものを赤字で示した。

3.1.2 iVTtRNA の合成と精製

まず、選択した tRNA を個別に試験管内で転写、プロセッシングし、陰イオン交換カラムによって精製することで iVTtRNA を調製した。ほとんどの tRNA 種で、5'端に余分な leader 配列を持った tRNA 前駆体は、RNaseP によってプロセッシングした段階で完全に leader 配列が切断され、成熟 tRNA となったが、一部の tRNA ではプロセッシングされずに前駆体が残った (図 3-2)。しかし、陰イオン交換カラムで精製を行うことで、成熟 tRNA のみを個別に精製することに成功した (図 3-2)。

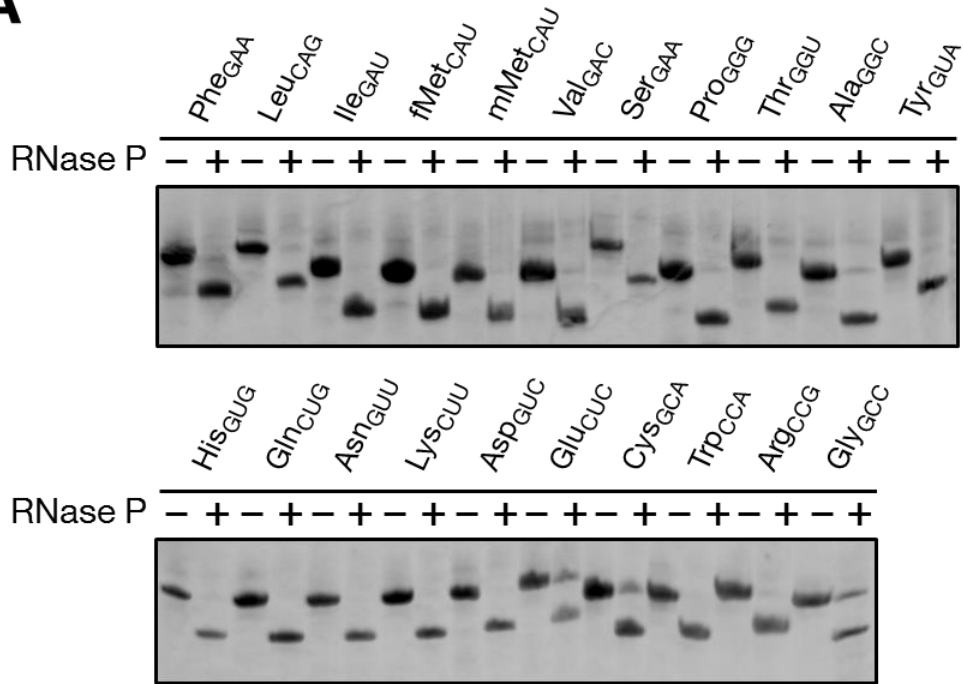
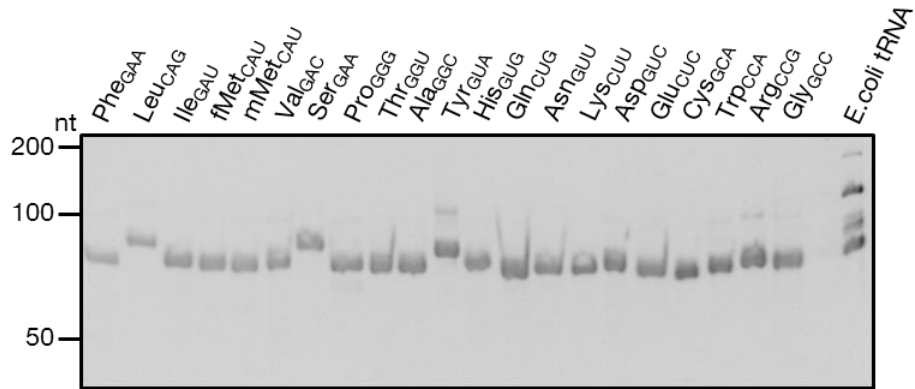
A**B**

図 3-2 iVTtRNAの調製

A: RNasePによる5'leader配列切断

B: 精製後のiVTtRNA。各tRNAを0.01 A₂₆₀ unit泳動し精製度を確認した。開始メチオニンtRNAはfMet、伸長メチオニンtRNAはmMetと表記した。

3.1.3 iVTtRNA へのアミノアシルレーションの評価

試験管内で転写され修飾塩基を持たない tRNA が対応する aaRS によってアミノアシル化され得ることは先行研究から知られていたが、対応しない aaRS によってアミノアシル化されてしまうミスアミノアシル化が起こらないかどうかはあまり調べられていなかった。そこで、まず、今回調製した iVTtRNA のアミノアシルレーション効率と正確性に関して、PURE system 系中を模倣した高 Mg^{2+} 条件下で網羅的に評価した。今回使用する 21 種類の各 iVTtRNA とアミノ酸の組み合わせにおいて、iVTtRNA へのアミノ酸の取り込みを観察した。今回の評価では、アミノ酸に対応した aaRS のみを用い、aaRS が誤ったアミノ酸を付加するミスアミノアシルレーションに関しては評価しなかった。tRNA を添加しないサンプルの見かけのアミノ酸取り込み量をバックグラウンドとして、各サンプルの取り込み量から差し引き、各アミノ酸の各 tRNA への取り込みをプロットした(図 S1A-T)。さらに、その結果から各アミノ酸の各 tRNA に対する 1 A_{260} unit 当たりの受容能 (Acceptance) をヒートマップとしてプロットした (図 3-3)。

その結果、修飾塩基を一切持たない iVTtRNA であっても対応する aaRS のみによってアミノアシル化され、ミスアミノアシル化は観察されなかった。アンチコドンに修飾塩基を持っている Tyr(GUA)、His(GUG)、Asn(GUU)、Asp(GUC)、Lys(CUU) に関しても問題なくアミノアシルレーションが起こっていることが観察された。特に、Lys(CUU) は大腸菌が通常有しないアンチコドンを持つ tRNA だが、アミノアシルレーションが正しく起こり、ミスアミノアシルレーションは起こらないことが示された。一方で、同様にアンチコドンを改変した Glu(CUC) は、ミスアミノアシルレーションは起こらなかったがアミノアシルレーションも通常の条件では検出可能なレベルでは観察されなかった。そこで、Glu(CUC) を 20 倍入れた条件でアミノアシルレーションを観察したところ、Glu の取り込みが観察された。そこから計算される Glu(CUC) の Acceptance は $7.5 \text{ pmol}/A_{260} \text{ unit}$ となり、非常に低い値となった。また、Ile(GAU) については $66 \text{ pmol}/A_{260} \text{ unit}$ となり、他の tRNA 種の Acceptance と比較して 1-2 割の値にとどまった。

Ile(GAU)、Glu(CUC) のアミノアシルレーション効率が低いことは先行研究における特異性定数の減少から予想されたが、実際の Acceptance 測定値では 10 倍程度の開きがあった。Ile(GAU) は t^6A を、Glu(CUC) はアンチコドン 1 文字目の修飾塩基 (当時は修飾塩基が正しく同定されていなかった) を、対応する aaRS に認識される各 tRNA の特徴的な要素としての tRNA アイデンティティとして持つが^[53]、その寄与度が異なることが考えられる。

また、今回の条件では、アミノアシル化された tRNA は急速にデアシル化が進行する(図 S2)。そのため、今回の測定で観察された Acceptance は各 iVTtRNA に関して、ア

ミノアシル化とデアシル化が起こる反応系中での平衡点を観測していると考えられる。したがって、今実験の結果は、PURE system でのタンパク質合成反応の際に系中にどれだけアミノアシル tRNA が蓄積しているのかの指標となると予想された。

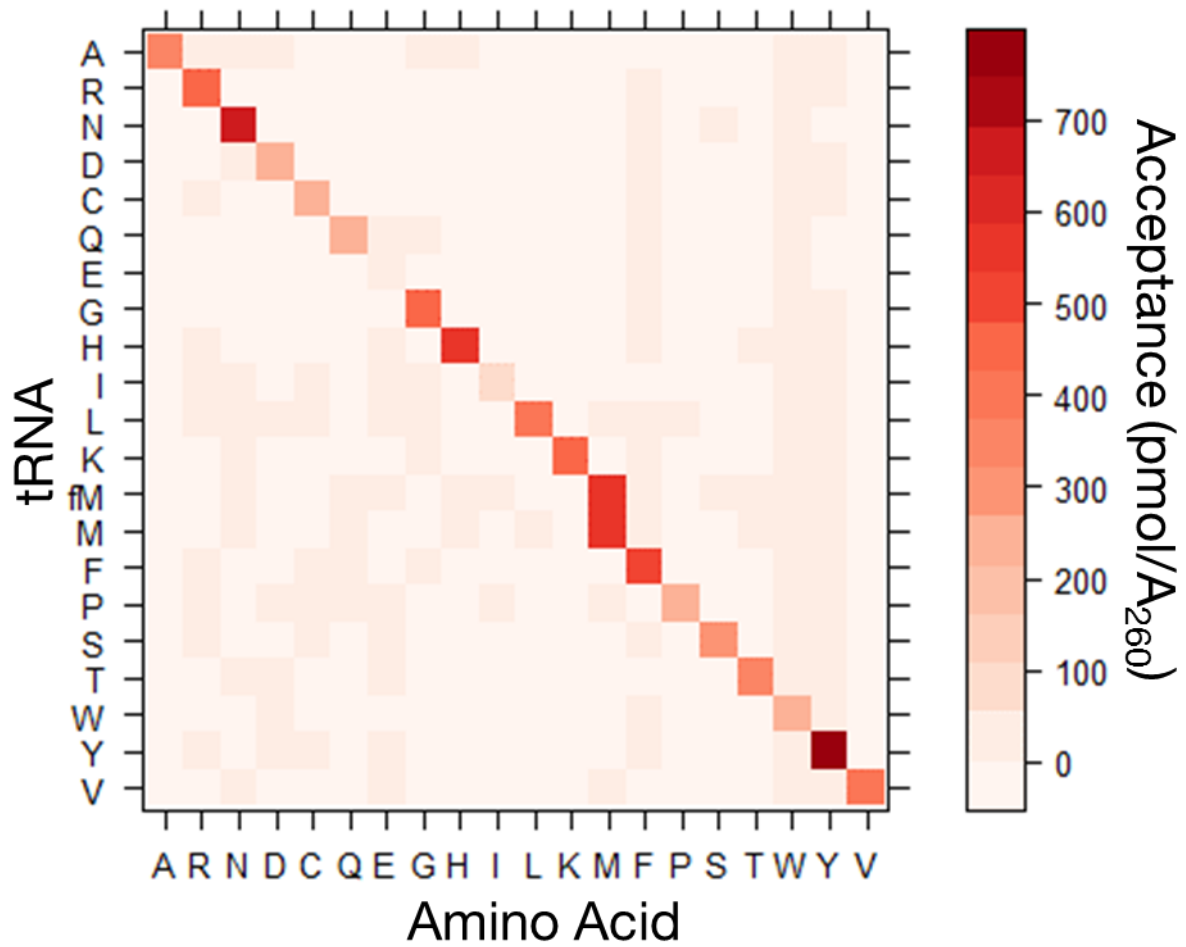


図 3-3 iVTtRNAのアミノ酸受容能解析

各アミノ酸を1文字略号で示し、各tRNAはコドン表で対応するアミノ酸の1文字略号で示した。ただし、開始メチオニンに対するtRNAはfMと表記して示した。

3.1.4 Glu(CUC)、Ile(GAU)のアミノアシル化評価

Glu(CUC)、Ile(GAU)のアミノアシル化効率が高かったため、アミノアシル化が本で行われているかをさらに解析を行った。Glu(CUC)に関しては、様々な tRNA 濃度における Glu のアミノアシル化を Acid-PAGE によって解析した (図 3-4A)。また、Glu、Ile について IleRS、GluRS 濃度を 3.1.3 での条件の 30 倍である 1.5 μ M にしてアミノアシル化を行った (図 3-4B, C)。

その結果、Acid-PAGE による解析では Glu(CUC)濃度に依存して Glu の取り込みが観察された。また、1.5 μ M aaRS の条件では Glu(CUC)による Glu、Ile(GAU)による Ile の顕著な取り込みが観察された。これらの結果から、Glu(CUC)、Ile(GAU)は効率が非常に低いものの、実際に正しくアミノアシル化されていることが示された。

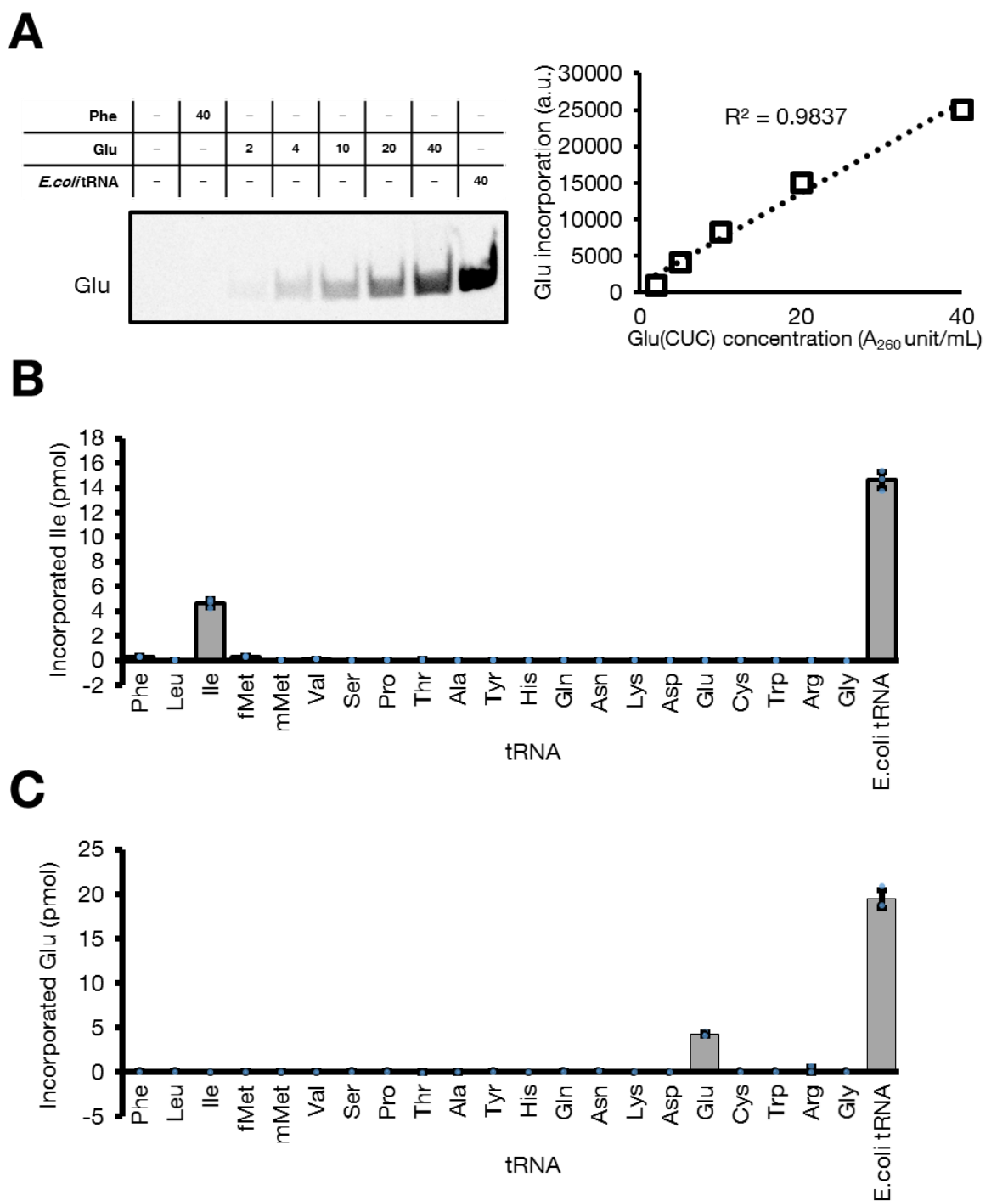


図 3-4 Glu(CUC)、Ile(GAU)のアミノアシル化評価

A: Acid-PAGEによるGlu(CUC)のアミノアシル化評価。バンドパターン(左)とバンド強度(右)を示す。

B: 1.5 μ M IleRS存在下でのIleアミノアシル化評価。エラーバーは標準偏差 ($n = 3$)を示し、青点は各実験での測定値を示す。

C: 1.5 μ M GluRS存在下でのGluアミノアシル化評価。エラーバーは標準偏差 ($n = 3$)を示し、青点は各実験での測定値を示す。

3.1.5 PURE system 中での iVTtRNA によるタンパク質合成

今回調製した iVTtRNA が正しいアミノ酸のみを受容することが分かったため、実際にこれらの tRNA でタンパク質合成を行えるかどうかを PURE system において評価した。各コドンをも iVTtRNA が解読可能なコドンに変更した DHFR、sfGFP をコードした直鎖 DNA を PURE system における転写、翻訳の鋳型として用いた。DHFR、sfGFP のコドンは、鋳型中の塩基が GC リッチになり過ぎないようにするため、一部のコドンは Wobble 塩基対合によってデコーディングされるように設計した(図 3-5A)。各 iVTtRNA 種が A₂₆₀ unit でみて等量ずつ含まれる混合物を終濃度 60 A₂₆₀ unit/mL で用いた。また、対照として E.coli tRNA 混合物を終濃度 40 A₂₆₀ unit/mL で用いた。PURE system 中で DHFR、sfGFP を 30°C または 37°C で 12 時間、転写、翻訳させた。翻訳産物は L-[³⁵S]-Met によってラベルし、SDS-PAGE によって展開、オートラジオグラフィーによって検出した。

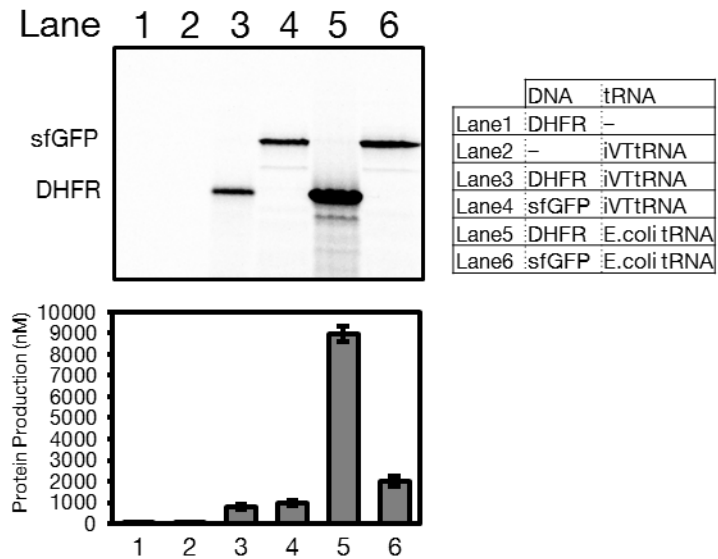
その結果、30°C、37°C どちらの条件においても、DHFR、sfGFP 両方について E.coli tRNA による翻訳産物と同じ位置に iVTtRNA による翻訳産物が検出され、iVTtRNA によって正しくタンパク質合成が起こっていることが示唆された(図 3-5B, C)。また、30°C、37°C でのタンパク質合成量を比較したところ、E.coli tRNA では 37°C での合成量の方が有意に多かったのに対し、iVTtRNA では 30°C の条件で有意にタンパク質合成量が多かった(図 3-6)。そのため、今後の実験では、タンパク質合成条件を 30°C 12 時間に固定することにした。

今回の実験からは原因を決定できないが、iVTtRNA を使ったタンパク質合成で 30°C の条件において合成量が多かったのは、iVTtRNA による翻訳反応は遅く、転写反応により多くのエネルギー(ATP, GTP)が消費されてしまうこと、一部の iVTtRNA が修飾塩基を欠くため 37°C では構造安定性が低くアミノアシル化やデコーディングが上手くいかないことなどが考えられる。

A

1st	2nd				3rd
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser		Cys	U
			Tyr		C
			Stop	Stop	A
			Stop	Trp	G
C		Pro			U
			His		C
					A
	Leu		Gln	Arg	G
A	Ile	Thr			U
			Asn		C
					A
	Met		Lys		G
G	Val	Ala		Gly	U
			Asp		C
					A
			Glu		G

B



C

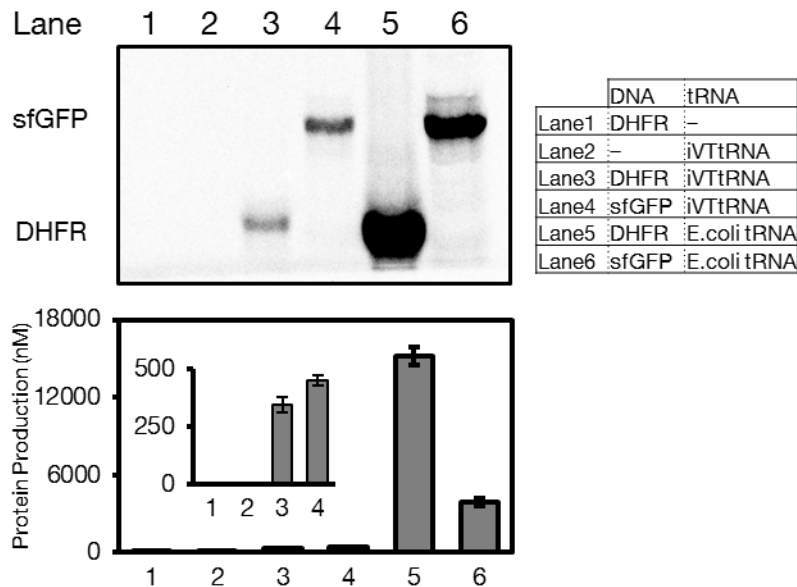


図 3-5 iVTtRNAによるタンパク質合成

A: DHFR, sfGFP合成に利用するコドン。一部のコドンはWobble塩基対合(青)によってデコーディングされる。

B: iVTtRNAによる30°C, 12時間タンパク質合成パターン。SDS-PAGEのバンドパターン(上)、DHFR、sfGFP全長の合成量(下)を示す。エラーバーは標準偏差 (n = 3)を示す。

C: iVTtRNAによる37°C, 4時間タンパク質合成パターン。SDS-PAGEのバンドパターン(上)、DHFR、sfGFP全長の合成量(下)を示す。エラーバーは標準偏差 (n = 3)を示す。

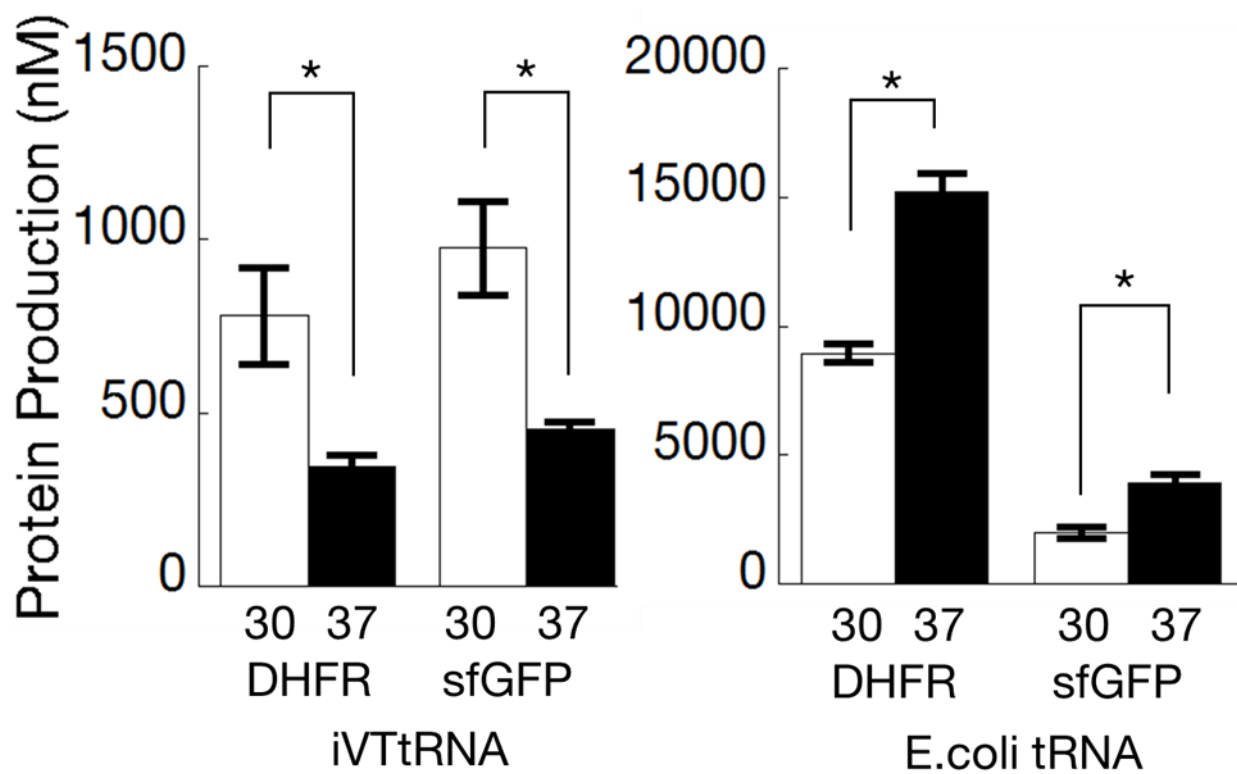


図 3-6 タンパク質合成条件と合成量の比較

図 3-5で示した合成量を比較した。*: $p < 0.05$.

3.1.6 タンパク質合成の iVTtRNA 依存性

PURE system における実験から、iVTtRNA によってタンパク質全長が合成されたことが示唆された。しかし、その合成が各 iVTtRNA 種に依存しているかは不明であった。そこで、各 iVTtRNA への依存性を、DHFR をモデルタンパク質として PURE system でのタンパク質合成実験によって評価した (図 S3)。1 種類を添加しなかった iVTtRNA 混合物と全種類が添加されたものを用いた場合のタンパク質合成量を比較し、そのバンド強度の比を DHFR Production (%) として、各 iVTtRNA への依存性を評価した (図 3-7)。合成されたタンパク質は添加しなかった iVTtRNA に対応したアミノ酸で標識した。ただし、Tyr、Asn、Trp、Gly に関しては、対応するアミノ酸の代わりに L-[³⁵S]-Met によって標識した。

その結果、各 iVTtRNA に対して DHFR 合成の依存性が観察された。Met では、fMet(CAU)、mMet(CAU)の双方に対して依存性があった。これは、fMet(CAU)は MetRS によってアミノアシル化が行われた後、メチオニル tRNA ホルミルトランスフェラーゼによってチャージされた Met がホルミル化されると EF-Tu に対する解離定数が非常に大きくなる^[54]、ためであると考えられる。また、Gln、Asn、Gly では DHFR Production (%)が 50%以上となり、比較的依存性が低かった。Asn、Gly では対応するアミノ酸ではなく L-[³⁵S]-Met によって DHFR を標識したため、対応する tRNA が存在しないコドンが他の tRNA によって誤読された産物を評価し、Suppression を過小評価している可能性がある。一方で、系中にわずかに混入した大腸菌由来の tRNA はタンパク質合成を部分的に助けている可能性も否定できず、Gln など DHFR 中に含まれる数の少ないアミノ酸種については影響している可能性がある (表 S6)。しかし、どの iVTtRNA においても、添加すれば DHFR 合成量が増加したことから iVTtRNA は翻訳反応に参加して機能を果たしていると考えられる。

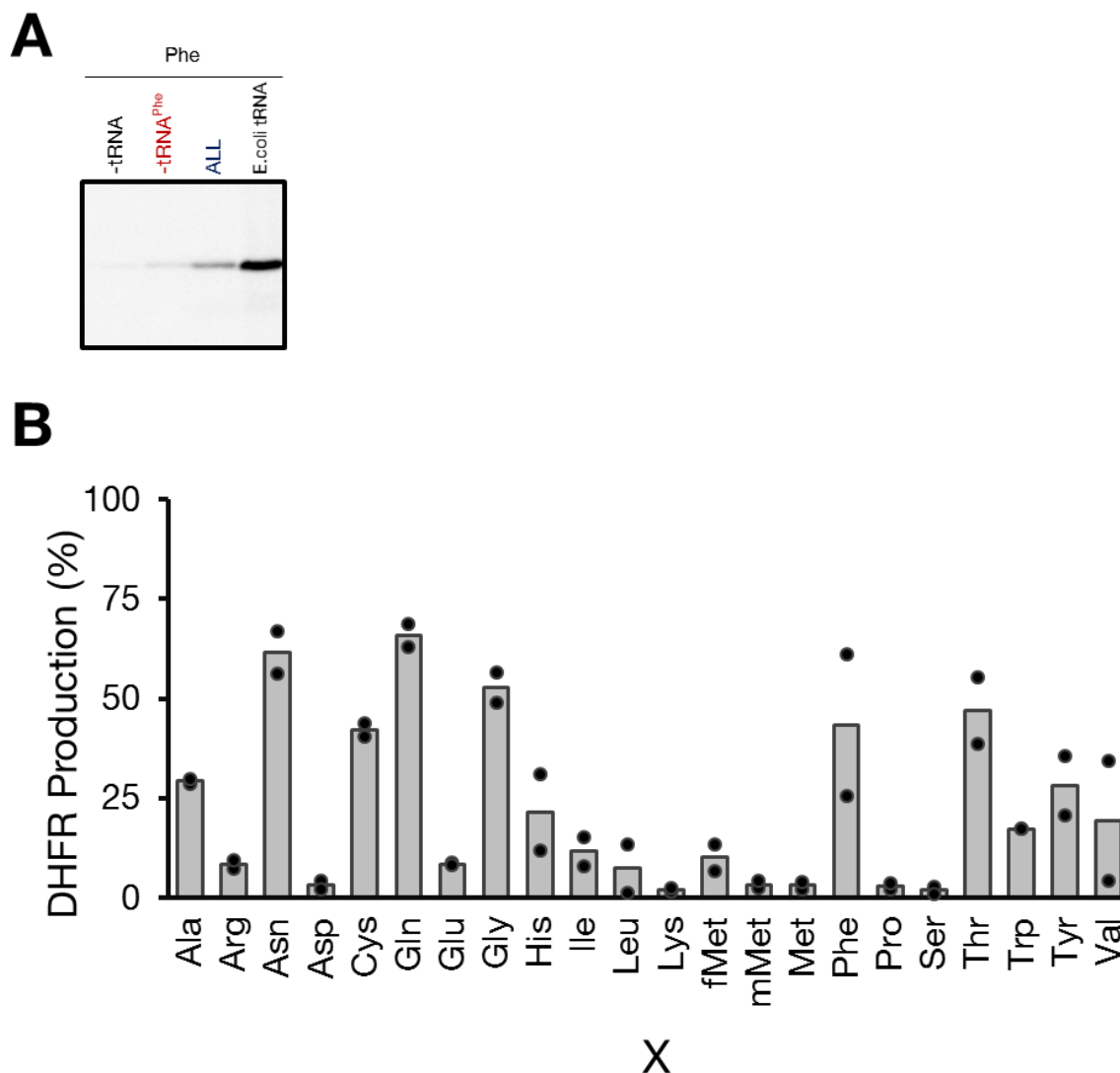


図 3-7 タンパク質合成のiVTtRNAへの依存性

A: 依存性確認のバンドパターン例(Phe)。

B: タンパク質合成のiVTtRNAへの依存性。Xは取り除いたtRNA種を表す。MetはfMet、mMetの2つのtRNAを取り除いたことを示す。中実黒丸は各実験の測定値を表す。

3.1.7 タンパク質合成の tRNA 濃度依存性

次に、タンパク質合成効率の E.coli tRNA、iVTtRNA 濃度への依存性を比較した。L-[³⁵S]-Met で標識した DHFR 合成量を指標に、E.coli tRNA、iVTtRNA 濃度をさまざまに変化させたときの变化を評価した。その結果、E.coli tRNA では 40-60 A₂₆₀ unit/mL で合成量が最大となったのに対し、iVTtRNA では濃度依存的な合成量増加が観察された (図 3-8A)。これは、iVTtRNA の活性が低く、タンパク質合成の限定要因となっていることを示していると考えられた。そこで、最も活性の低い iVTtRNA を過剰に加えることで合成量の向上が図れると考え、アミノアシルーションにおける Acceptance が低いものから 3 つ Ile(GAU)、Pro(GGG)、Glu(CUC)のうち、1 種類だけを 20 A₂₆₀/mL iVTtRNA 混合物に過剰に加えた条件で DHFR 合成を行った。その結果、Ile(GAU)を過剰に加えた条件でのみ、合成量が 2 倍程度に増加した(図 3-8B)。一方で、Ile(GAU)を過剰に加えた条件では完全長でない翻訳産物のバンドが認められた(図 3-8B)。このことから、1 種類の iVTtRNA を過剰に加えると他の活性が低い iVTtRNA が欠乏し、翻訳の中途終結や停滞を引き起こしていることが予想された。

そこで、Ile(GAU)、Pro(GGG)、Glu(CUC)、Asn(GUU)混合物(IPEN-tRNA)を 20 A₂₆₀/mL iVTtRNA 混合物に過剰に加えた条件で DHFR 合成を行った。その結果、IPEN-tRNA 添加量依存的に DHFR 合成量が大きく増加し、IPEN-tRNA を終濃度 40 A₂₆₀/mL になるように添加した条件 (iVTtRNA_{opt})で DHFR 合成量が最大となった (図 3-8C)。また、この場合では完全長でない翻訳産物のバンドは認められなかった。このことから、アミノアシルーション効率の低い tRNA を過剰に加えて、効率を底上げすることでタンパク質合成効率を向上可能だと示された。また、今回構築した iVTtRNA による系ではアミノアシルーション効率が限定要因となっていることが示唆された。

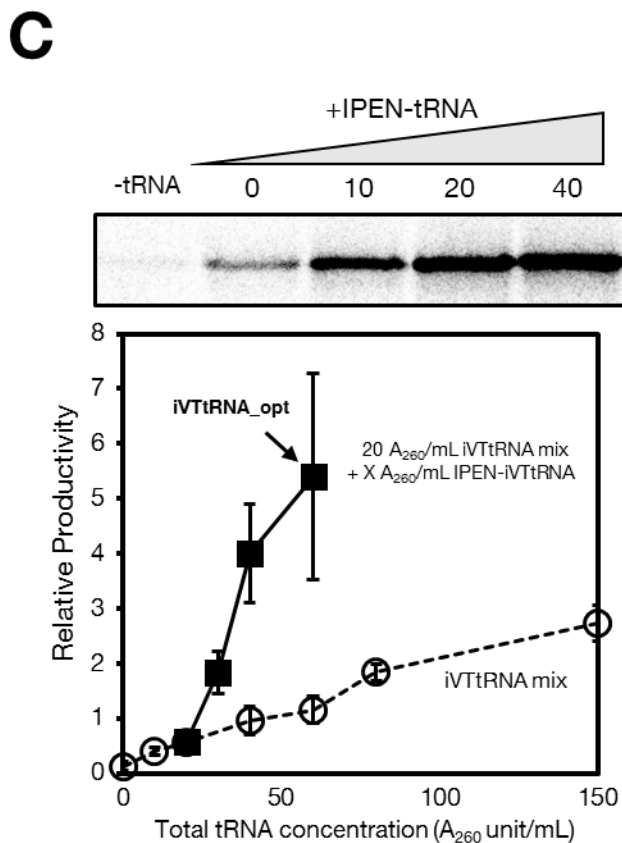
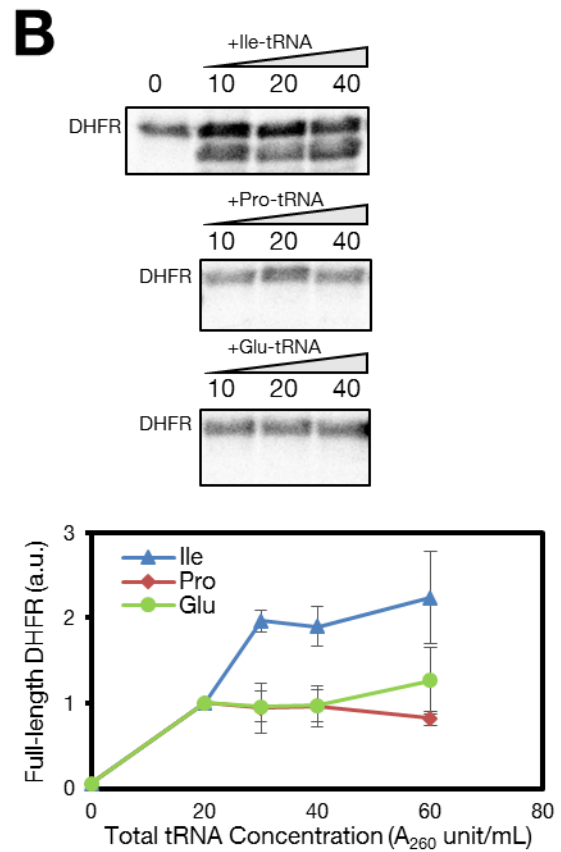
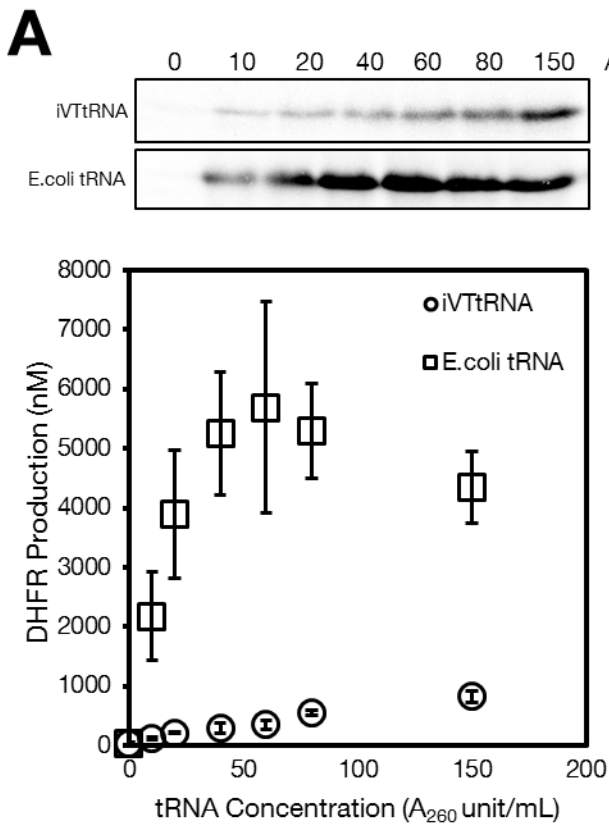


図 3-8 タンパク質合成の tRNA 濃度依存性

A: DHFR合成のtRNA濃度依存性。バンドパターン(上)及び、定量値(下)を示す。エラーバーは標準偏差(n=3)を表す。

B: DHFR合成のIle(GAU), Pro(GGG), Glu(CUC)への依存性。バンドパターン(上)及び、定量値(下)を示す。エラーバーは標準偏差(n=3)を表す。定量値は各tRNA種が等量含まれた20 A₂₆₀ unit/mL iVTtRNAに各iVTtRNAを加えていったときの合成量を加える前の合成量に対する比で表した。

C: DHFR合成のIPEN-tRNA依存性。各tRNA種が等量含まれた20 A₂₆₀ unit/mL iVTtRNAにIle(GAU), Pro(GGG), Glu(CUC), Asn(GUU)を等量ずつ含むIPEN-tRNAを規定量加えた。バンドパターン(上)、定量値(下)を示す。定量値は各tRNA種が等量含まれた40 A₂₆₀ unit/mL iVTtRNAによる合成量に対する比で示した。エラーバーは標準偏差(n=3)を表す。

3.1.8 DHFR、sfGFP の活性測定

iVTtRNA によってタンパク質全長が合成可能であることが示唆されたが、正確に翻訳が行われているかは断定できない。そこで、合成されたタンパク質の活性を測定した。sfGFP の活性を測定したところ、iVTtRNA によって合成された sfGFP の蛍光が観察できた (図 3-9A)。さらに、合成された DHFR の活性測定から翻訳の正確性を評価した。その結果、iVTtRNA によって合成された DHFR の活性が確認できた (図 3-9B)。また、DHFR 分子あたりの比活性を観察された活性と合成量から算出したところ、各 iVTtRNA 種が等量ずつ含まれた条件では、E.coli tRNA によって合成された DHFR の比活性の半分程度であった。また、IPEN-tRNA を過剰に添加した条件では、その添加量に従い比活性が向上していった (図 3-9C)。また、iVTtRNA_opt の条件で比活性を E.coli tRNA を用いた条件と比較したところ、ほぼ同等の比活性であった (図 3-9D)。このことから、少なくとも iVTtRNA_opt の条件では、E.coli tRNA と同等の正確性で翻訳が行われていることが示された。また、どの条件においても iVTtRNA によって合成された DHFR の活性が観察できたことから、酵素活性を保持できる程度の正確性で翻訳が行われていることが示された。各 iVTtRNA 種が等量ずつ含まれた条件で比活性が低かったのは、本来対応しない tRNA がコドンを誤読している可能性や、翻訳速度が遅く、DHFR のフォールディングに異常を起こしている可能性がある。

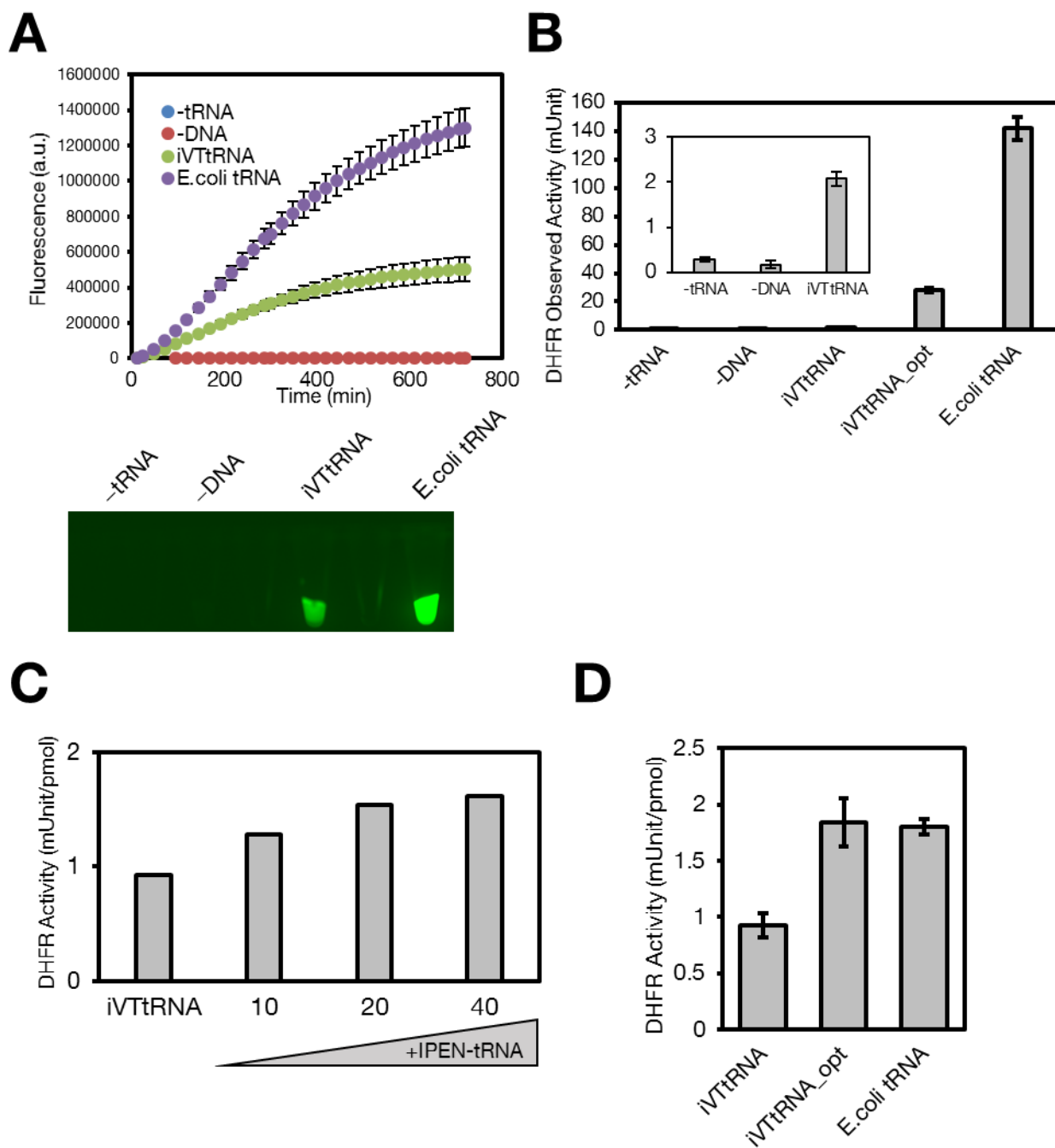


図 3-9 iVTtRNAによって合成されたタンパク質の活性測定

A: sfGFPの蛍光活性測定。合成反応中のタイムコース(上)、合成開始から12時間後の蛍光観察結果(下)を示す。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

B: DHFRの活性測定。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

C: IPEN-tRNAの添加とDHFR比活性の変化。各tRNA種が等量含まれた20 A₂₆₀ unit/mL iVTtRNAにIPEN-tRNAを表示した量(A₂₆₀ unit/mL)加えた。

D: DHFRの比活性。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

3.1.9 Wobble 塩基対合を用いない sfGFP の合成と活性測定

iVTtRNA によって機能を持ったタンパク質合成を行えることが DHFR の活性測定によって示された。しかし、DHFR 合成では一部のコドンが Wobble 塩基対合によってデコーディングされていた。そこで、Wobble 塩基対合を用いなくてもタンパク質合成が行えるかを、sfGFP をモデルタンパク質として検証した。各コドンを iVTtRNA のアンチコドンに対応するコドンに変更した sfGFP をコードした直鎖 DNA を PURE system における転写、翻訳の鋳型として用いた。sfGFP のコドンは、各 iVTtRNA のアンチコドンに相補的なコドンのみを含むように設計した(図 3-10A)。各 iVTtRNA 種が A_{260} unit でみて等量ずつ含まれる混合物を終濃度 $60 A_{260}$ unit/mL で用いて 30°C で 12 時間、転写、翻訳反応を PURE system 内で行った。また、対照として E.coli tRNA 混合物を終濃度 $40 A_{260}$ unit/mL で用いた。翻訳産物は L- $[^{35}\text{S}]$ -Met によってラベルし、SDS-PAGE によって展開、オートラジオグラフィーによって検出した。また、合成された sfGFP の蛍光も測定した。

その結果、sfGFP 全長が合成され、また、蛍光も観察された(図 3-10B, C, D)。また、1 pmol 当たりの蛍光値は E.coli tRNA の場合と比較して 9 割程度であった(図 3-10E)。これは、DHFR では 5 割程度だったことと比較すると、比活性がより E.coli tRNA で合成した場合に近いと考えられる。これは、Wobble 塩基対合によってデコーディングされないコドンは修飾塩基を持たない iVTtRNA によって誤読されにくいことが考えられる。一方、sfGFP はフォールディングの頑強性を向上し、蛍光団形成速度が向上した変異体であり^[55]、また、蛍光団のみが活性に必要であるため、NADPH、DHF を認識し還元反応を触媒する DHFR と比較してミスフォールディングや翻訳の誤りが影響しにくい可能性も否定できない。タンパク質合成における正確性は更に検証を行う必要があると考えられる。

A

1st	2nd				3rd
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
			Stop	Stop	C
			Stop	Trp	A
					G
C		Pro	His		U
					C
	Leu		Gln	Arg	A
					G
A	Ile	Thr	Asn		U
					C
	Met		Lys		A
					G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
					C
			Glu		A
					G

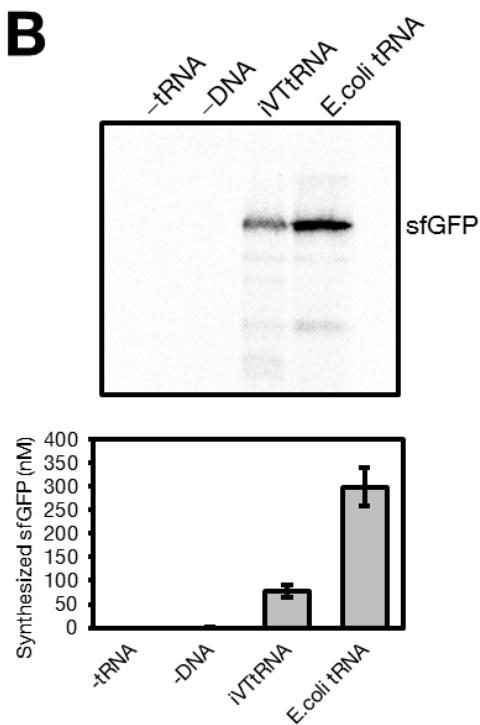
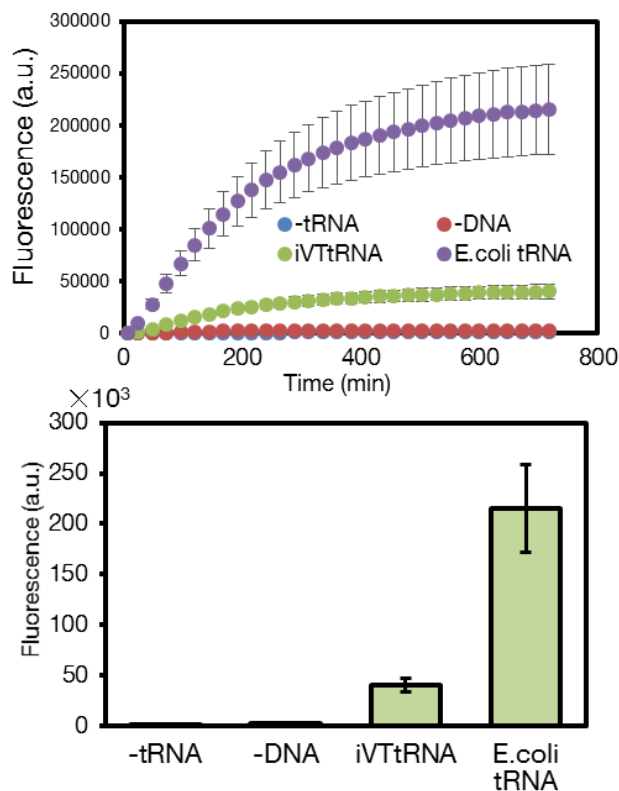
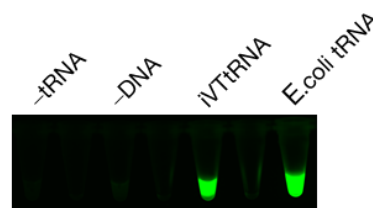
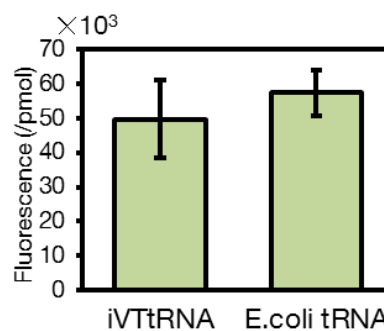
B**C****D****E**

図 3-10 sfGFPの合成

A: sfGFP合成に利用するコドン。全てのコドンがiVTtRNAのアンチコドンに相補的である。

B: sfGFPの合成。バンドパターン(上)、定量値(下)を示す。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

C: sfGFPの蛍光活性測定。合成反応中のタイムコース(上)、合成開始から12時間後の蛍光値(下)を示す。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

D: sfGFPの蛍光観察結果。

E: sfGFPの比活性。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

3.2 試験管内転写 tRNA による遺伝暗号改変型蛋白質合成系の構築

これまでの実験で、iVTtRNA によって機能を持ったタンパク質が合成可能であることが分かった。今回構築した系は、試験管内で調製した tRNA のみを利用しているため、tRNA を改変することで簡単に遺伝暗号を改変することができる。そこで、本研究においても、拡張性を実証するため、センスコドンへのアミノ酸の再割り当てを行うことにした。これまでに、*in vitro*, *in vivo* においてセンスコドンに対応した tRNA を取り除き、そこに非天然アミノ酸を割り当てる研究が行われてきた^{[16][17]}。しかし、これまでに特定の天然アミノ酸を指定するコドンを通常は他のアミノ酸を指定するコドンに移動する例はなかった。そこで、本研究では天然アミノ酸を指定するコドンを移動することにした。

3.2.1 遺伝暗号改変に使用する tRNA の選択

改変した tRNA を用いる場合、aaRS の認識に関する直交性が問題となる。その中で、tRNA^{Ala} はアクセプターステムに存在する G2:U71 の Wobble 塩基対が AlaRS の認識する最も決定的な特徴であり、AlaRS はアンチコドンを識別しない^[50]。また、tRNA^{Ser} は比較的 variable loop が長く、その配列を tRNA アイデンティティとして持つ^[49]。そこで、アンチコドン以外に特徴的な要素を持つ tRNA^{Ala}、tRNA^{Ser} の間であれば直交性の問題を回避しつつ、センスコドンの再割り当てができると考えた。今研究では、tRNA^{Ala} の改変を通じて、Ala を通常 Ser を指定するコドンに割り当てることを試みた。具体的には、Ala(GGC)のアンチコドンを CGA、GCU へと改変し、通常は Ser を指定する UCG、AGC コドンを Ala へと再割り当てすることにした (図 3-11A)。

3.2.2 UCG、AGC コドンへの Ala 再割り当て

Ala(GGC)のアンチコドンを変更し、Ala(CGA)、Ala(GCU)とした iVTtRNA を個別に調製した (図 3-11B)。まず、今回調製した改変体が計画通りに、Ser に対応するコドンを持ちながら Ala のみがアミノアシル化されるかどうかを検証した。その結果、Ala(CGA)、Ala(GCU)は Ala のみを受容し、Ser は受容しないことが観察された (図 3-11C)。正しく Ala を受容することが示されたので、次に、正しくデコーディングを行えるかを検証した。UCG または AGC コドンを含むテストペプチドの合成反応を PURE system 中で行い、UCG、AGC に対応して Ala と Ser どちらのアミノ酸がペプチド鎖中に取り込まれるかを観察した。その結果、E.coli tRNA を用いた場合は、通常の遺伝暗号に従い、UCG、AGC コドンに対応して Ser が取り込まれたのに対して、Ala(CGA) または Ala(GCU)を含んだ iVttRNA を利用した場合は Ala が取り込まれた (図 3-11D)。このことから、ペプチドレベルではあるが、計画通りに UCG、AGC コドンを Ala へと再割り当てできたことが示された。

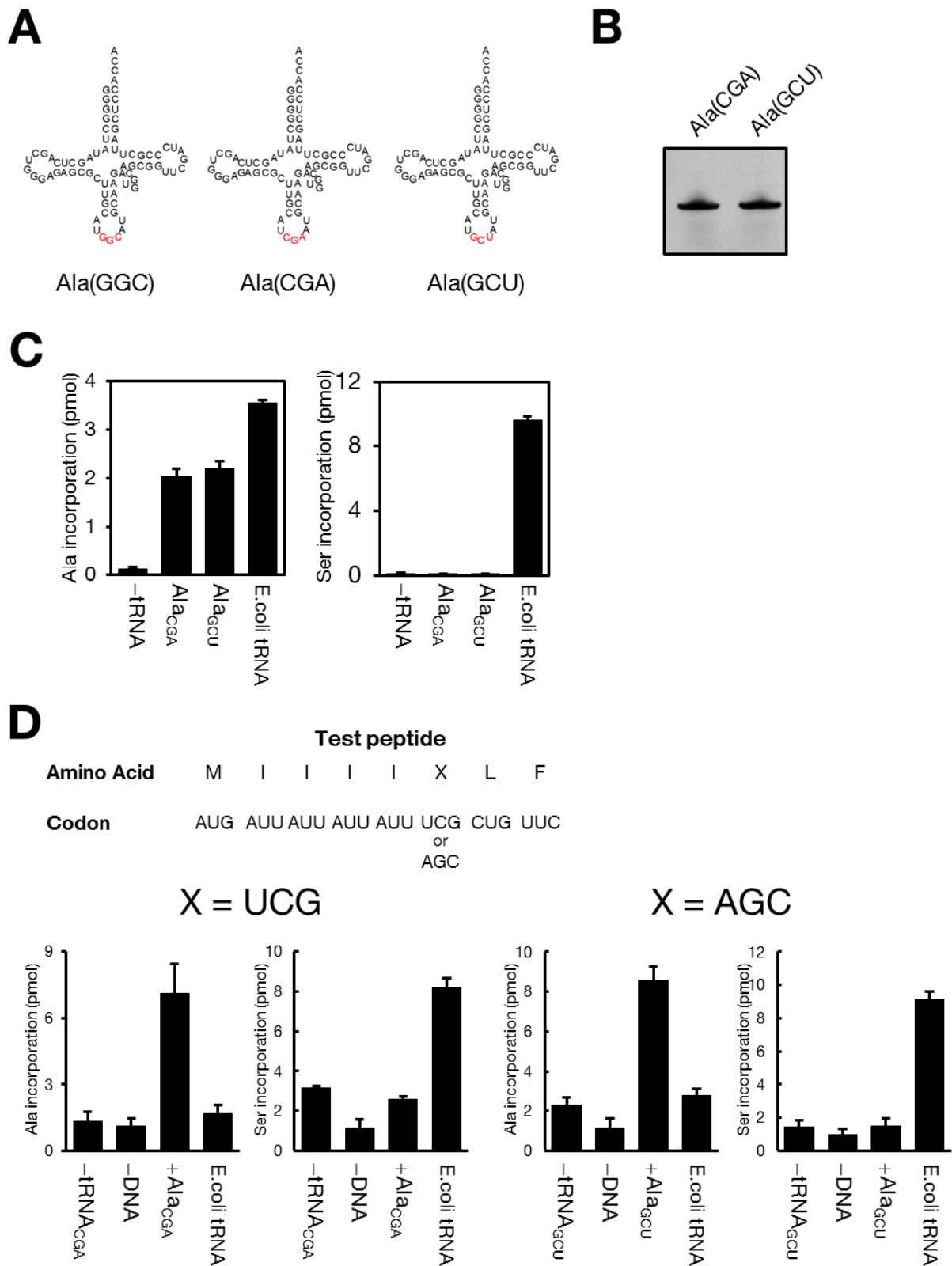


図 3-11 UCG、AGCコドンへのAla再割り当て

A: 変更したAla(CGA)、Ala(GCU)の二次構造。アンチコドンのみをAla(GGC)から変更した(赤字)。

B: Ala(CGA)、Ala(GCU)の調製。0.01 A₂₆₀ unitを解析した。

C: Ala(CGA)、Ala(GCU)のアミノアシル化特性解析。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

D: Ala(CGA)、Ala(GCU)によるペプチド合成。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

3.2.3 改変された遺伝暗号に基づくタンパク質合成

ペプチドレベルでコドンの再割り当てが可能だと示されたため、タンパク質合成レベルでコドンの再割り当てができるかどうかを検証した。3.1.5 で用いた DHFR において、Ala を指定するコドン全て UCG に変更したもの(DHFRmt)を転写、翻訳の鋳型として用いた (図 3-12A)。Ala に対応する tRNA として Ala(CGA)を含む iVTtRNA_opt の条件を基にした iVTtRNA 混合物と、対照として E.coli tRNA を添加した PURE system を用いて DHFR 合成を行った。翻訳産物は L-[³⁵S]-Met によってラベルし、SDS-PAGE によって展開、オートラジオグラフィーによって検出した。

その結果、iVTtRNA、E.coli tRNA のどちらの場合でも DHFR 全長と考えられるバンドが検出された (図 3-12B)。一方で、DHFR の活性を測定したところ、iVTtRNA を用いた場合のみ活性が確認された (図 3-12C, D)。このことは、E.coli tRNA の場合では通常の遺伝暗号に従って UCG コドンに対応して Ser が取り込まれて機能を持たないポリペプチドが合成された一方で、iVTtRNA の場合では、改変された遺伝暗号に従って UCG コドンに対応して Ala が取り込まれて正しいアミノ酸配列の DHFR が合成されたことを示している。また、比活性は遺伝暗号を改変しない場合と比較して同等であった (図 3-9D, 3-12D)。今回用いた Ala(CGA)はデコーディングの正確性において問題がなかったと考えられる。このことから、今回構築した iVTtRNA を用いたタンパク質合成系では、改変した tRNA を用いることで簡便に遺伝暗号改変が可能であることが示された。

A

		SECOND				THIRD
		U	C	A	G	
FIRST	U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
			Ala	Stop	Trp	A
		Pro	His			G
		Leu		Gln	Arg	C
	C					U
	A	Ile	Thr	Asn		C
	G	Met		Lys		A
		Val	Ala	Asp		G
				Glu	Gly	C
						A
						G

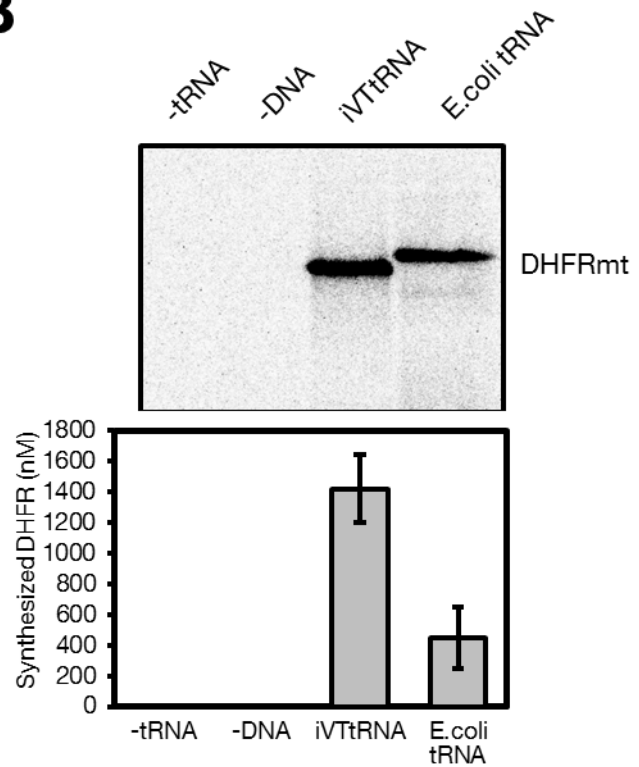
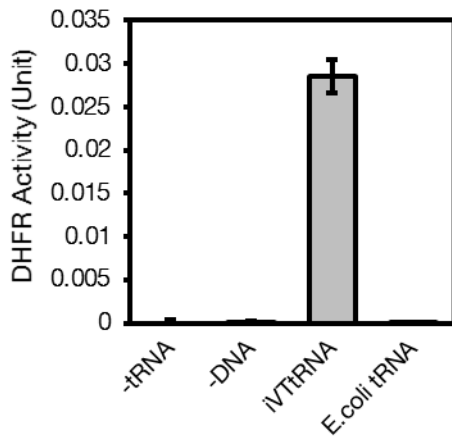
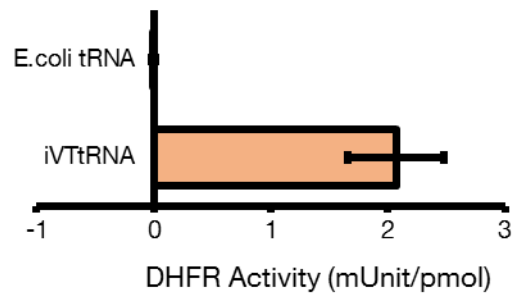
B**C****D**

図 3-12 改変遺伝暗号によるタンパク質合成

- A: 改変した遺伝暗号。改変前のAlaコドンを灰字、改変後のAlaコドンを赤字で示す。
- B: DHFRmtの合成。バンドパターン(上)、定量値(下)を示す。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。
- C: DHFRmtの活性測定。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。
- D: DHFRmtの比活性。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

3.3 被修飾試験管内転写 tRNA による蛋白質合成系への展開

これまでに、修飾塩基を一切持たない iVTtRNA によって機能を持ったタンパク質が合成可能なことを示した。しかし、タンパク質合成効率は E.coli tRNA と比較して 1 割程度にとどまる。一方で、IPEN-tRNA を過剰に添加することで合成量を 5 倍程度にすることが可能であった。だが、特定の tRNA を過剰に必要とすることは、非天然アミノ酸をチャージした tRNA を用いるなどの応用面においてボトルネックとなる可能性が高い。これは、直交性を担保するために非天然アミノ酸を利用する場合は異生物種の tRNA、aaRS (系内でアミノ酸をチャージする場合)を用いることが多く、EF-Tu などへの親和性が低いために、効率よく非天然アミノ酸をタンパク質に導入するために異生物種の tRNA を過剰に加えるためである。つまり、異生物種の tRNA を大量に加えることで、IPEN-tRNA の比率が相対的に減少し、タンパク質収量の減少を招く可能性がある。そこで、tRNA 量の節約を図るために、最小限の修飾塩基を導入して iVTtRNA の活性向上を図ることにした。

3.3.1 修飾を導入する tRNA の選択

修飾塩基を導入する tRNA として、アミノアシル化効率の低い方から 3 種類 Ile(GAU)、Pro(GGG)、Glu(UUC)を選択した (図 3-13)。Glu に対応する tRNA は改変前の UUC をアンチコドンに持った Glu(UUC)を新しく調製して、修飾導入に用いることとした。導入する修飾塩基としては、大腸菌の生存に必須な酵素が関連しているものを選択した^{[56][57][58]}。アミノアシル化効率向上に寄与することが知られている^[59]、N⁶-スレオニルカルバモイルアデノシン (t⁶A)を Ile(GAU)に導入することにした。また、Pro(GGG)には 1-メチルグアノシン (m¹G)を導入することにした。Glu(UUC)には本来生体内で持っている修飾塩基 5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン (mnm⁵s²U)の前駆体である 5-メチルアミノメチルウリジン (mnm⁵U)を導入することにした。導入に際しては、必要な酵素を個別に調製し修飾塩基導入系を再構成することで導入した。単独で活性を確認できる MnmE、GlyA に関しては活性を確認後に用いた (図 S4)。

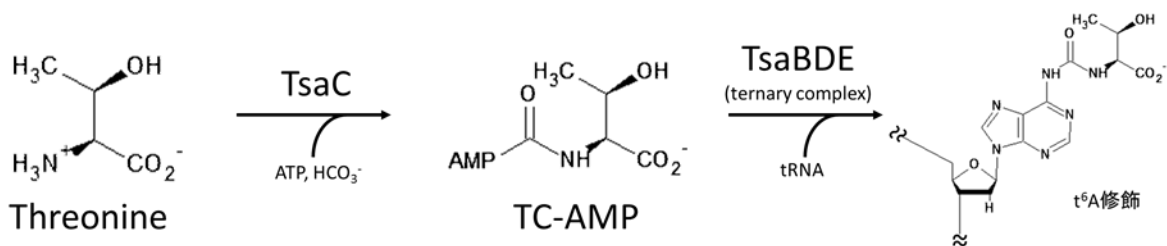
3.3.2 t⁶A の Ile(GAU)への導入

t⁶A の修飾導入は、TsaC によって ATP と L-Thr、HCO₃⁻ からスレオニルカルバモイルアデノシン (TC-AMP) が合成され、それをヘテロ三量体である TsaB、TsaD、TsaE がアデニンの 6 位にあるアミノ基に付加することで導入される (図 3-14A)。そこで、これら酵素を使用して修飾反応を行い、¹⁴C で標識された L-Thr を用いて導入を評価したところ、4 割程度の Ile(GAU)へ t⁶A が導入された (図 3-14B)。また、¹⁴C で標識されていない L-Thr を用いて t⁶A を導入した Ile(GAU)を用いて、アミノアシル化効率を測定したところ、Acceptance が修飾を導入していない Ile(GAU)と比べ 8 倍程度になった (図 3-14C)。また、速度論的解析では先行研究と同様に t⁶A を導入することでアミノアシル化速度が大きく向上した^[59] (図 3-14D)。見かけの Km は 18 倍程度小さくなり、見かけの Vmax は 5.8 倍程度向上した。このことから、t⁶A 修飾はアミノアシル化効率に大きく寄与しており、修飾導入によって効率が大きく改善したと考えられる。

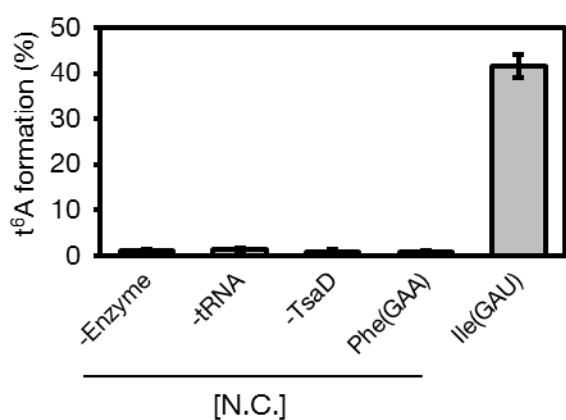
3.3.3 m¹G の Pro(GGG)への導入

m¹G の修飾導入は、TrmD によって SAM を基質にメチル基がグアニンの 1 位にある窒素原子に付加され、元々結合している水素原子と置換する形で導入される (図 3-15A)。そこで、これら酵素を使用して修飾反応を行い、¹⁴C で標識された SAM を用いて導入を評価したところ、5 割程度の Pro(GGG)へ m¹G が導入された (図 3-15B)。さらに、¹⁴C で標識されていない SAM を用いて m¹G を導入した Pro(GGG)を用いて、HPLC によって確認を行った (図 3-15C)。また、アミノアシル化効率を測定したところ、Acceptance が修飾を導入していない Pro(GGG)と比べ 1.4 倍程度になった (図 3-15D)。また、速度論的解析では m¹G を導入することでアミノアシル化速度が t⁶A 修飾の場合ほどではないが向上した (図 3-15E)。見かけの Km は 5 倍程度小さくなり、見かけの Vmax は 1.4 倍程度向上した。

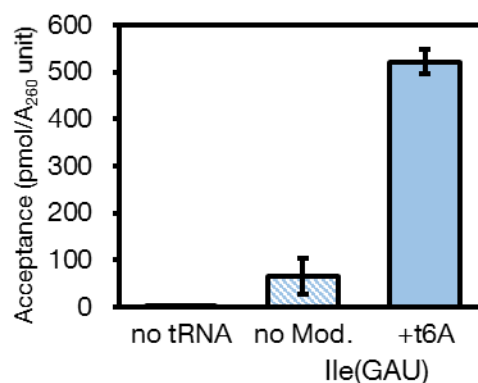
A



B



C



D

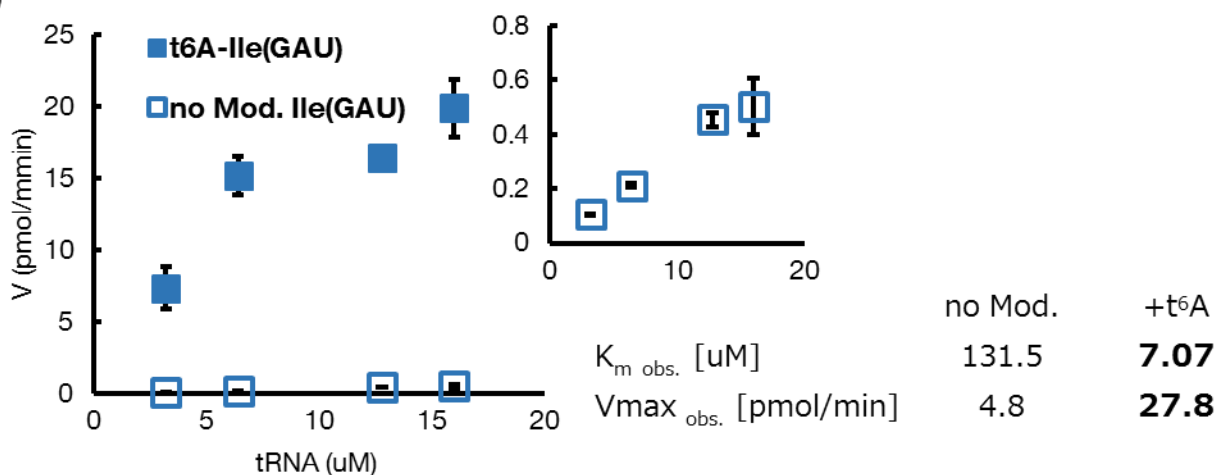


図 3-14 Ile(GAU)へのt⁶A導入

A: t⁶A導入スキーム

B: t⁶A導入評価。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

C: t⁶A導入Ile(GAU)のアミノアシル化効率。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

D: t⁶A導入Ile(GAU)のアミノアシル化速度の濃度依存性。ミカエリス・メンテン式へのフィッティングによって算出されたKm, Vmaxを併記してある。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

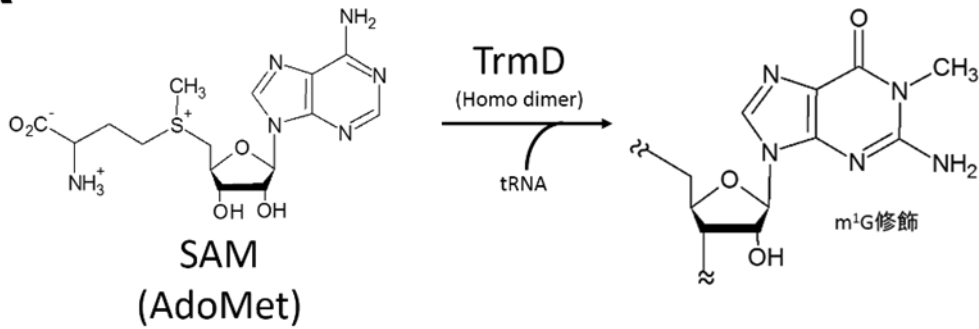
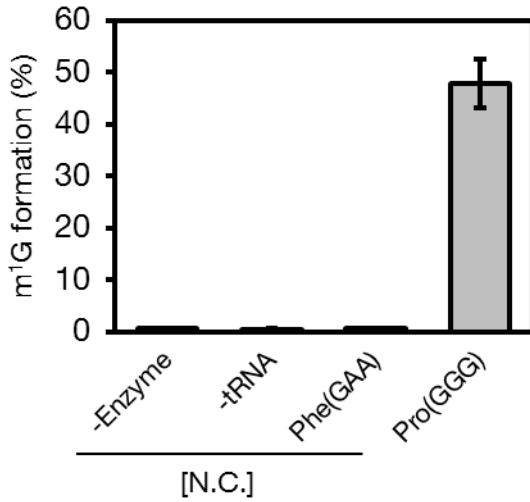
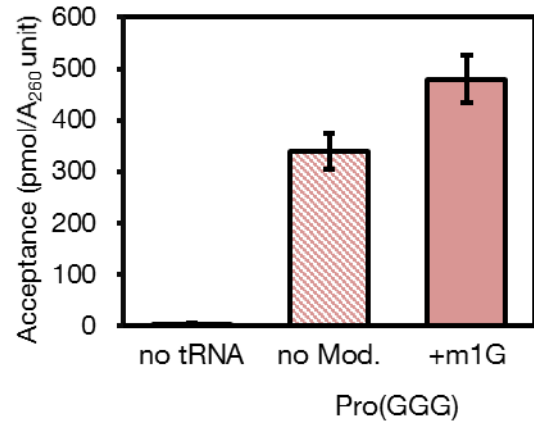
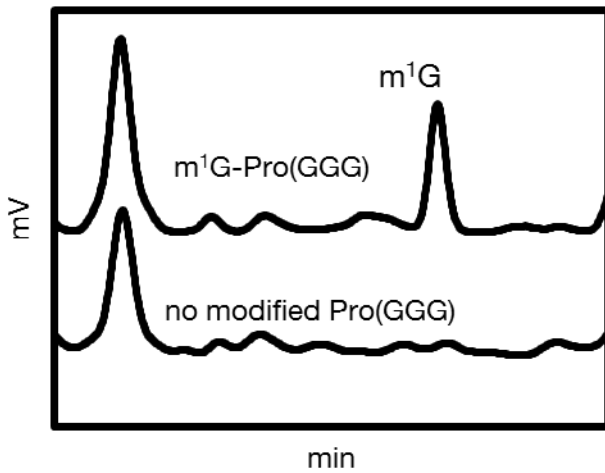
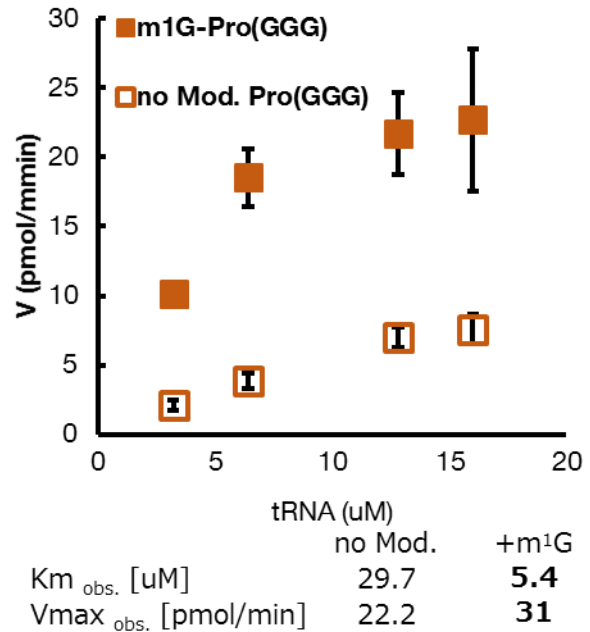
A**B****D****C****E**

図 3-15 Pro(GGG)へのm¹G導入

A: m¹G導入スキーム。

B: m¹G導入評価。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

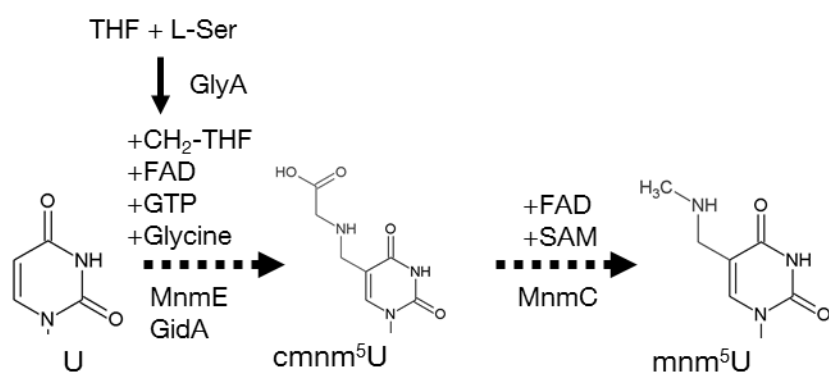
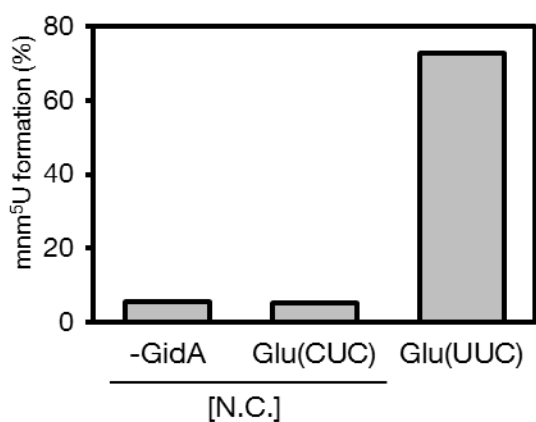
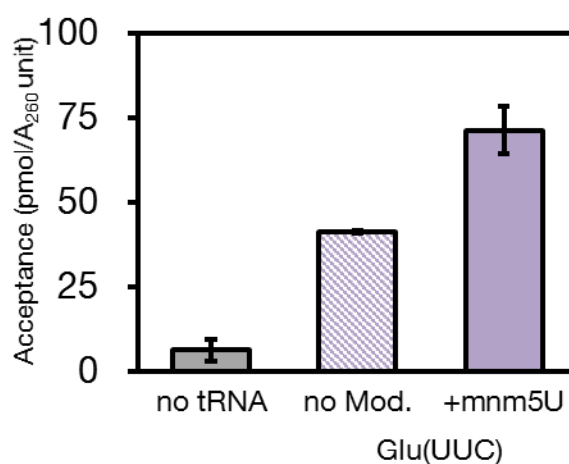
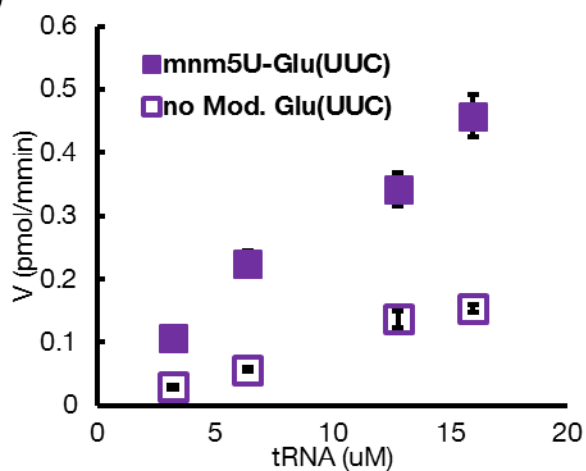
C: HPLCによるm¹Gの解析。比較のためm¹G導入サンプルと非導入サンプルでベースラインをずらしている。

D: m¹G導入Pro(GGG)のアミノアシル化効率。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

E: m¹G導入Pro(GGG)のアミノアシル化速度の濃度依存性。ミカエリス・メンテン式へのフィッティングによって算出されたKm, Vmaxを併記してある。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

3.3.4 mnm⁵U の Glu(UUC)への導入

mnm⁵U の修飾導入は、利用する基質の違いによって 2 つの経路が提案されている^[60]。今回は、そのうちの片方の経路を導入に利用することにした (図 3-16A)。また、先行研究では CH₂-THF を試薬として購入して用いていたが、CH₂-THF は不安定な分子であることから、本研究における導入では GlyA によって THF から *de novo* に合成することにした。そこで、CH₂-THF を供給する GlyA、修飾を導入する MnmE、GidA、MnmC を使用して修飾反応を行い、¹⁴C で標識された SAM を用いて導入を評価したところ、7 割程度の Glu(UUC)へ mnm⁵U が導入された (図 3-16B)。さらに、¹⁴C で標識されていない SAM を用いて mnm⁵U を導入した Glu(UUC)を用いて、アミノアシル化効率を測定したところ、Acceptance が修飾を導入していない Glu(UUC)と比べ 1.7 倍程度になった (図 3-16C)。また、速度論的解析では mnm⁵U を導入することでアミノアシル化速度が向上した (図 3-16D)。今回測定した範囲内では、修飾を導入していない Glu(UUC)のアミノアシル化速度が濃度依存的に線形に増加したため Km, Vmax を決定することができなかったが、各測定点で mnm⁵U を導入した Glu(UUC)で 3 倍程度 V が大きかったため確かにアミノアシル化効率が向上していると考えられる。一方で、修飾を導入した場合の Km が m¹G、t⁶A と比較して大きかった。先行研究において生体から精製した Glu(UUC)の GluRS への Km は修飾を持たない Glu(UUC)と比較して 50 倍程度小さい^[22]。今回の結果にその知見を当てはめると、修飾を持たない Glu(UUC)では Km が 2 mM と推算されるが、それほど高濃度に tRNA を必要とする反応は考えにくい。そのため修飾導入によって更に aaRS との親和性が向上する余地があり得ると考えられる。

A**B****C****D**

	no Mod.	+mnm ⁵ U
Km _{obs.} [uM]	n.d.	44.4
Vmax _{obs.} [pmol/min]	n.d.	1.93

図 3-16 Glu(UUC)へのmnm⁵U導入

A: mnm⁵U導入スキーム

B: mnm⁵U導入評価。

C: mnm⁵U導入Glu(UUC)のアミノアシル化効率。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

D: mnm⁵U導入Glu(UUC)のアミノアシル化速度の濃度依存性。ミカエリス・メンテン式へのフィッティングによって算出されたKm, Vmaxを併記してある。n.d.; not determined. エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

3.3.5 被修飾試験管内転写 tRNA によるタンパク質合成

今回調製した t⁶A を導入した Ile(GAU) (t⁶A-Ile(GAU))、m¹G を導入した Pro(GGG)(m¹G-Pro(GGG))、mnm⁵U を導入した Glu(UUC)(mnm⁵U-Glu(UUC))を用いてタンパク質合成を行った (図 3-17A)。3.1.5 で用いたのと同じ DHFR を用いて、修飾を導入した tRNA を含む iVTtRNA または E.coli tRNA を添加した PURE system を用いて転写、翻訳反応を行った。その際、各 iVTtRNA 種が A₂₆₀ unit でみて等量ずつ含まれる混合物を終濃度 60 A₂₆₀ unit/mL で用いた。また、対照として E.coli tRNA 混合物を終濃度 40 A₂₆₀ unit/mL で用いた。翻訳産物は L-[³⁵S]-Met によってラベルし、SDS-PAGE によって展開、オートラジオグラフィーによって検出した。その結果、t⁶A- Ile(GAU)、m¹G- Pro(GGG)、mnm⁵U- Glu(UUC)全てを含んだ場合は、どの tRNA にも修飾を導入しなかった場合と比較して 7.7 倍程度タンパク質合成量が多かった (図 3-17B Lane5, 12)。また、Ile(GAU)のみに修飾を導入した場合は 3.4 倍程度に合成量が増加した。しかし、t⁶A が導入された Ile(GAU)を用いない場合は、他の tRNA に修飾を導入しても合成量は増加しなかった (図 3-17B Lane6, 7,8,11)。一方で、t⁶A- Ile(GAU)を含む場合は、mnm⁵U- Glu(UUC)を用いると合成量が 2.2 倍程度に向上した (図 3-17B Lane6, 10,12)。また、合成された DHFR の比活性を測定したところ、t⁶A- Ile(GAU)を用いた場合に比活性が向上し、E.coli tRNA と同等になった (図 3-17C, D)。

これらの結果から、Ile(GAU)の活性が iVTtRNA を用いたタンパク質合成における限定要因であり、t⁶A を導入したことによる活性向上によってタンパク質合成効率が向上したと考えられる。また、t⁶A- Ile(GAU)を使用した場合に mnm⁵U- Glu(UUC)を用いると合成量が増加したことから、t⁶A を導入した後は限定要因が Glu(UUC)の活性になったことが示唆された。このことは、t⁶A- Ile(GAU)を使用した場合に DHFR 下部にバンドが出現し、mnm⁵U- Glu(UUC)を用いるとこのバンドが消失すること、DHFR は C 末端に Glu を比較的多く持つアミノ酸配列を持つことから裏付けられる。このことから、今回構築した iVTtRNA を用いた系では最も活性が低い tRNA 種がタンパク質合成効率を規定する限定要因であると考えられる。

また、修飾を入れていない tRNA 種類を過剰に添加した場合はそれほど合成量が増加していなかったのに対して、t⁶A- Ile(GAU)を入れた場合は大きく合成量が増加した。この理由として、種類のみを過剰に添加した場合、t⁶A- Ile(GAU)を入れた場合でアミノアシル tRNA 量の向上という点では同じであるが、アミノアシル tRNA とデアシル tRNA の比率が異なることが考えられる。つまり、tRNA 種類を過剰に添加した場合はデアシル tRNA の総量も増加し、翻訳において EF-Tu との相互作用などにおいて競合阻害的に働いたために合成効率がそれほど変化しなかった可能性がある。そ

うであれば、修飾の導入によってデアシル tRNA の比率を抑えることは、合成効率における有用な戦略であると予想される。一方で、構造解析から t⁶A は Lys(UUU)において A₃₈ と n-n スタッキングによって相互作用してコドン解読を助けていることが示唆されており^[61]、修飾塩基導入によってデコーディング効率が向上して収量増加に貢献した可能性も否定できない。今回の実験からは m¹G にタンパク質合成量を向上させる働きは観察されなかった。これは m¹G が *in vitro* で機能を持たないのではなく、Pro(GGG)が限定要因となる条件が今回の条件では存在しなかったためと考えられる。m¹G は G₃₇ の mRNA への結合を防ぎ、フレームシフトを抑制するという報告があり^[62]、コドン解読効率にはあまり寄与しない可能性がある。系に EF-P を導入し、Pro が連続するような配列を持ったタンパク質を用いるとフレームシフト抑制の効果が観察できる可能性がある。

さらに、修飾塩基導入によってタンパク質合成量が 7.7 倍程度に向上したが、合成効率は E.coli tRNA よりも依然として低い。また、Pro(GGG)に修飾塩基を導入しても合成量がほとんど増加しなかったことから、限定要因は依然として Glu(UUC)にある、または、Ile、Pro、Glu に対応する tRNA 以外に移動したと考えられる。今後、合成効率の更なる向上を図るためにはこの点について検証する必要がある。

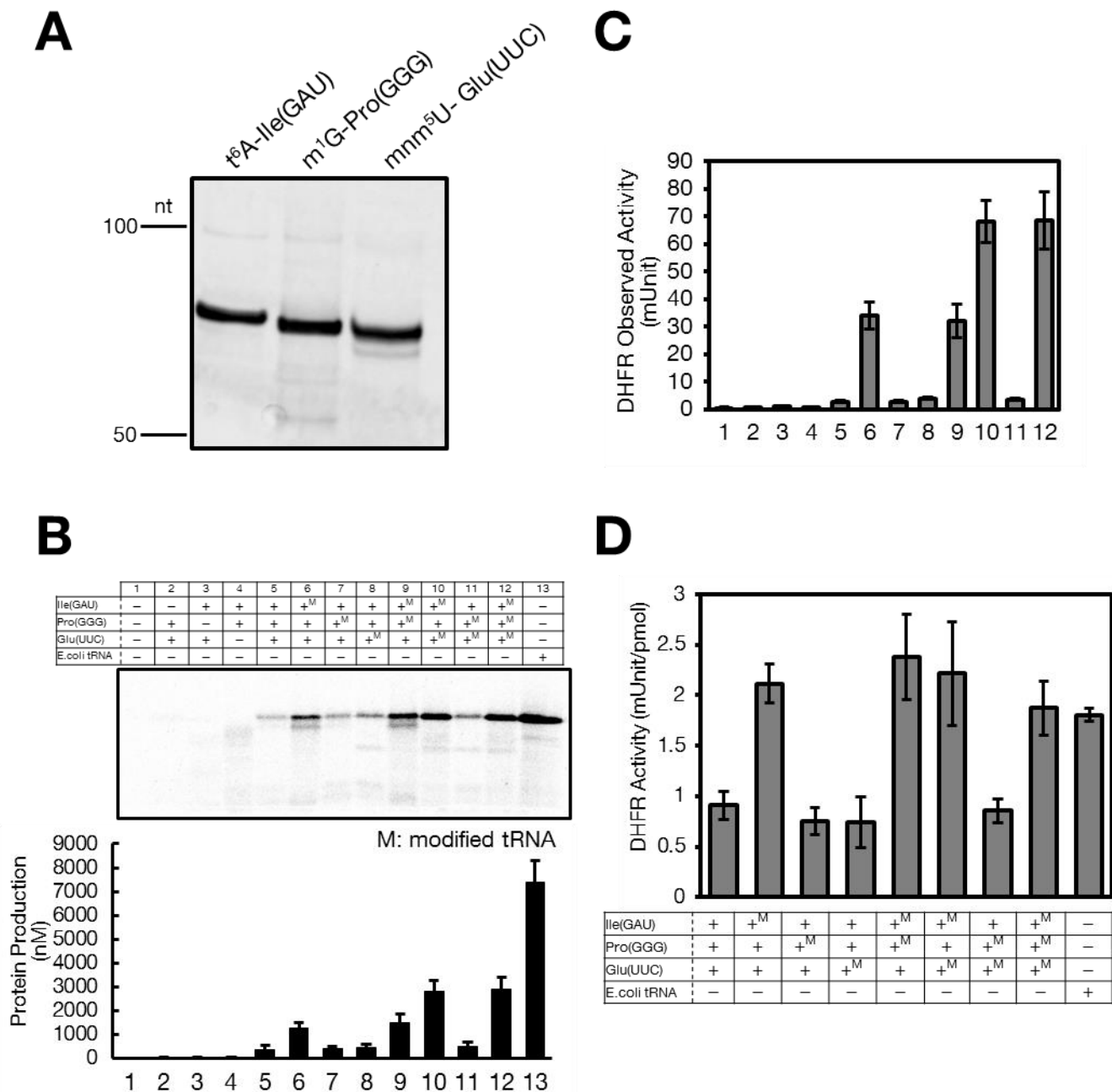


図 3-17 被修飾tRNAによるタンパク質合成

A: 調製した被修飾iVTtRNA。0.01 A₂₆₀ unitを解析した。

B: 被修飾iVTtRNAによるタンパク質合成。上添字のMは被修飾tRNAを用いたことを表す。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

C: 被修飾iVTtRNAによって合成されたDHFRの活性評価。各コラム番号はBのレーン番号に対応する。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

D: 被修飾iVTtRNAによって合成されたDHFRの比活性評価。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

3.3.6 s^2U の Glu(UUC)への導入

Glu(UUC)の更なる活性向上を指向し、Glu(UUC)が本来持っている修飾塩基である5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン (mnm^5s^2U)の残りの修飾である s^2U の導入を行った。 s^2U の導入には7つの酵素が関連し、 mnm^5U とは完全に独立した経路で導入される^[32] (図 3-18A)。7つの酵素を用いて修飾反応を行い、 ^{35}S で標識した L-Cys を用いて修飾の入っていない Glu(UUC)への導入を評価したところ、 s^2U を Glu(UUC)に導入できた (図 3-18B)。しかし、翻訳反応に用いるためには、さらに導入効率を最適化していく必要がある。

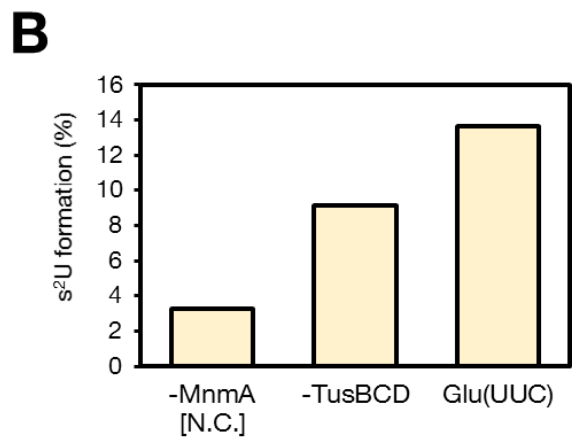
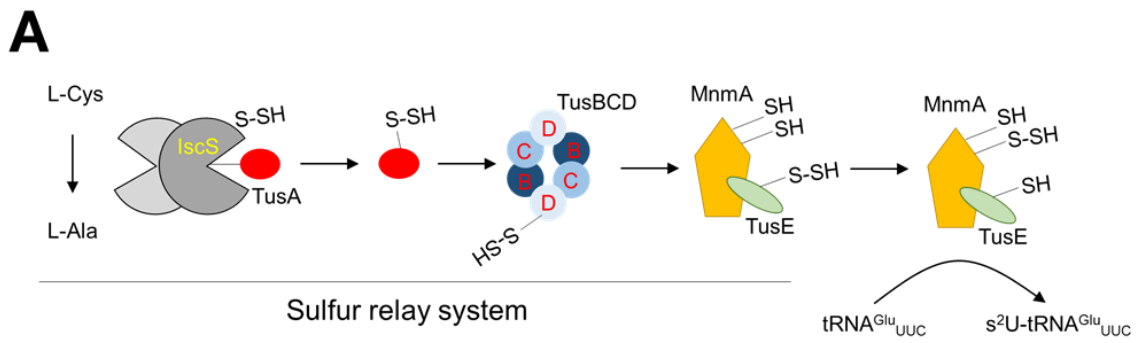


図 3-18 Glu(UUC)へのs²U導入

A: s²U導入スキーム

B: s²U導入評価。

4 考察

4.1 本研究のまとめ

本研究を通じて、iVTtRNA のみによって機能を持ったタンパク質を合成可能な系を構築することに成功した。また、各 iVTtRNA 種の濃度比を調製することで、合成量を増加させ、DHFR 比活性を向上できることが示された。

また、Ala(GCU)、Ala(CGA)を用いて、Ala コドンを通常は Ser を指定するコドンに移動させる遺伝暗号改変実験によって、今回構築した系は改変 tRNA を用いることで簡単に遺伝暗号を改変可能だと示された。

さらに、修飾塩基を一部の iVTtRNA に導入した実験では、3 種類の tRNA に修飾塩基を導入することで、タンパク質の収量を大きく向上できることに成功した。このことから、最小限の修飾塩基を導入した iVTtRNA を用いることは今後、系をより発展させていく上で有望な戦略であることが示された。

4.2 iVTtRNA によるタンパク質合成について

iVTtRNA のアミノアシルレーション実験では、iVTtRNA の種類によって効率に差はあるものの、正しくアミノアシルレーションが起こることが示された。一方で、アミノアシルレーション効率の低い tRNA を過剰に加えることで、タンパク質合成量が増加したことから、アミノアシルレーション効率がタンパク質合成効率を規定する限定要因の一つであると考えられる。よって、今後はこの効率を向上させていくことが系全体の収量を向上させる上で重要になってくると思われる。アミノアシルレーション効率を向上させる最も直感的な方法は、本研究でも行ったように修飾塩基を tRNA に導入し、aaRS との親和性を向上させることである。一方で、非天然アミノ酸をチャージする aaRS と tRNA は通常親和性が低いため、aaRS の認識能向上を分子進化手法によって行うことが多い。今回構築した系においても、より修飾塩基のない iVTtRNA と相互作用しやすくアミノアシルレーション効率の高い aaRS をリボソームディスプレイ法^[63]などの利用によって取得することも一つの方法として存在する。特に、これまでは aaRS の分子進化はそれほど上手く行っていなかったが、自動化された流路を用いる Phage-Assisted Continuous Evolution 法によって PyrRS の特異性定数を 45 倍に向上した例が知られており^[64]、このような自動化と組み合わせることで、iVTtRNA に特化した aaRS 群から成る無細胞タンパク質合成系への展開が可能だと期待される。

タンパク質合成実験において、iVTtRNA を用いた場合は 37°C よりも 30°C においてタンパク質合効率が良いことが観察された。このことは、iVTtRNA を用いた翻訳反応は遅く、転写などにエネルギーが使われてしまうために結果的に翻訳反応に振り向けられるエネルギーが不足することを示唆していると考えられる。また、iVTtRNA が高濃度に存在する条件においても、最大の合成量は E.coli tRNA よりも少なかった。このことから、iVTtRNA はデコーディング効率が低く、十分な量のアミノアシル tRNA が存在しても tRNA がリボソームの A-site に結合してコドンを読解するまでに時間がかかるために、この過程がタンパク質合成の律速段階になってしまっている可能性が考えられる。もしくは、アミノアシル tRNA が充分量存在しても、デアシル tRNA との比率は変化しないために、デアシル tRNA が競合阻害的に働きタンパク質合成速度を低下させていることが考えられる。前者はデコーディングを補助するアンチコドンループの修飾塩基の導入によって、後者は aaRS の濃度比率を iVTtRNA に合わせて検討することで改善することが期待される。

また、タンパク質合成実験では iVTtRNA のうち、Ile、Pro、Glu、Asn に対応する tRNA を過剰に加えることで、合成量だけでなく比活性も向上することが示された。今回は機能を持ったタンパク質が効率よく合成可能であるというコンセプトの証明を第一義的な目標としたため、この点について詳細な解析は行っていない。しかし、各条件における翻訳の忠実度は合成産物の質に直結する問題であるため、より洗練された系へと発展させるためには解析を行っていく必要がある。一方で、比活性が大腸菌と同等になる条件も存在した。このことから、今後より多くのコドンを利用する、すなわち、多くの tRNA を利用する系へと発展させていく際にはこの条件にしたがって検討を行い、比活性が新しく加える tRNA によって減少する場合は、正確なデコーディングを補助するような修飾塩基を導入することで克服するようなスキームが考えられる。

さらに、本研究では大腸菌と同じ塩基配列を持った tRNA を用いていたが、この配列を変化させることも考えられる。実際、アンバーサプレッサー-tRNA を用いた分子進化では、tRNA 側の配列を進化させることでアミノアシルレーション効率が 3 倍になった例が存在する^[65]。細胞の生存にとらわれないという無細胞系の利点を活かして、aaRS、tRNA の分子進化を駆使し、異生物種の tRNA、aaRS、EF-Tu を系中に加えるなどを行うことでより工学的な応用に特化した系に発展することが期待される。

4.3 iVTtRNA による遺伝暗号改変について

Ala(GCU)、Ala(CGA)を用いた遺伝暗号の改変実験では、Ala を通常用いられる GCN コドンボックスから移動し、Ser を指定する AGC、UCG コドンへと移動することができた。このことから、内在性の tRNA が存在しないという利点を活かして、簡便に遺伝暗号を改変可能であることが示された。

Ala(CGA)を用いたタンパク質合成実験での DHFR 比活性と iVTtRNA_opt の条件で合成された DHFR の比活性はほとんど同じであった。このことから、今回の条件においては Ala(CGA)が他のコドンを誤読する頻度が他の tRNA と比較して特別に多いわけではないと思われるが、一方で今回用いなかったコドンを誤読しないかは確認していない。そのため、アンチコドンループのうちアンチコドンのみが改変された Ala(CGA)のデコーディング正確性が低い可能性は否めない。今後、利用するコドンを増やしていくに当たって、デコーディング正確性の低さが問題となる場合が考えられる。その場合は、アンチコドン周辺の構造安定性に寄与すると考えられる、アンチコドンループの配列ごと Ser-tRNA のものと入れ換えることで克服できる可能性がある。

今回の実験では、aaRS による認識の問題から、Ala と Ser の間で遺伝暗号の移動を行った。しかし、現在広範に信じられている偶然凍結説によれば、アミノ酸と遺伝暗号の間に絶対的なつながりは存在しない^[66]。したがって、aaRS の改変によるアンチコドン認識の変化などと組み合わせることで、原理的には全てのセンスコドンを自由に改変可能だと考えられる。将来的には、非天然アミノ酸をセンスコドンに割り当てるために異生物種の改変 aaRS、tRNA を利用する場合、非天然アミノ酸をチャージする効率が高く、かつ大腸菌の aaRS と直交性を持つ tRNA をアンチコドンの配列に捉われず自由に作製し、割り当てられるセンスコドンが元々指定するアミノ酸を、デコーディングする tRNA の改変によって移動するといった新しい非天然アミノ酸導入戦略が可能になっていくと考えられる。さらに、*in vitro* の系であるということを活かし、人工核酸を利用した遺伝暗号拡張^[67]と組み合わせると、より多くの非天然アミノ酸を自由に利用できるアセットを提供する基盤となり得ると期待される。

4.4 被修飾 tRNA によるタンパク質合成について

本研究では、Ile(GAU)に t⁶A、Pro(GGG)に m¹G、Glu(UUC)に mnm⁵U の修飾塩基を導入することで、タンパク質合成量を 7.7 倍に向上できた。アミノアシル化効率が低い3つの tRNA に修飾を導入することでタンパク質合成効率が改善したことから、アミノアシル化の過程がタンパク質合成効率の限定要因であることが裏付けられる。一方で、Ile(GAU)、Pro(GGG)、Glu(UUC)に修飾塩基を導入した場合の合成量の増加比率は、IPEN-tRNA を過剰に添加した場合よりも多かった。このことは、修飾塩基を導入した場合にはデアシル tRNA の総量が減少するために EF-Tu などとの相互作用に対する競合阻害的な作用が弱まった、または、今回導入した修飾塩基は全てアンチコドンループに存在するため、デコーディングの効率にも寄与していることを反映していると考えられる。

今回は 21 種類の tRNA のうち 3 種類のみ各 tRNA に特徴的な修飾塩基を導入した。一方で、修飾塩基の中には、シュドウリジン、ジヒドロウリジンに代表されるように各 tRNA に遍く存在するものもある。これらの修飾塩基を iVTtRNA に導入することで、タンパク質合成効率の底上げが実現する可能性がある。特に、一部の修飾酵素は tRNA に正しい構造を取らせるシャペロン様の働きをしていることが報告されており^[68]、これらの修飾酵素で iVTtRNA を処理することで誤った構造をとったまま系に添加されている iVTtRNA の構造が正され、全体の活性が向上することが期待される。

3 種類に修飾塩基を導入した条件においても、タンパク質合成量は E.coli tRNA よりも低かった。一方で、Ile(GAU)に t⁶A を導入するだけでタンパク質合成量が 3.4 倍に向上したこと、3 種類に修飾塩基を導入した場合のタンパク質合成量が E.coli tRNA を用いた場合のおよそ半分にまで迫っていることから、E.coli tRNA との効率における差異は少なく、比較的少ない修飾塩基の導入によって同等のタンパク質合成活性が実現することが期待される。特に、環境の変化がない RNA 分解酵素も存在しない無細胞タンパク質合成系では翻訳における正確性、効率を担保するために必要な修飾塩基は少ないことが予想される。

DHFR の活性測定では、Ile(GAU)に t⁶A を導入するだけで比活性が E.coli tRNA によって合成された DHFR と同等になった。このことから、Ile(GAU)のコドン解読の正確性が低く、対応しないコドンを誤読していたが修飾の導入によって正確性が向上した可能性、修飾塩基がないとアミノアシル tRNA Ile(GAU)量が少なく、デコーディングが起これないため他の対応しない tRNA によって Ile のコドン(AUC)が誤って解

読されてしまっていたが、修飾の導入によってアミノアシル tRNA Ile(GAU)量が増加し、デコーディングがスムーズに起こるようになったために翻訳の正確性が向上した可能性が考えられる。修飾塩基を導入していない IPEN-tRNA においても比活性の向上が見られたことから、後者の理由によって正確性が向上したと考えられる。

今回構築した iVTtRNA によるタンパク質合成系は、修飾反応を能動的に行わなければ各 tRNA は修飾塩基を一切持たない。そのため、一つの tRNA に修飾塩基を導入し、その翻訳特性を観察することで、実際の翻訳反応中に修飾塩基が果たしている役割を簡単に観察できることが期待される。ミトコンドリア脳筋症など修飾塩基が疾患の原因となっているものがあり^[69]、この系を用いて疾患の分子基盤を解明することができれば、創薬など他分野へも貢献することが期待される。

4.5 原始生命モデルとしての tRNA 再構成

合成生物学における一つの大きな目標として、再構成研究を通じて原始生命（細胞）をモデル化することがある。現在の細胞は多くの修飾塩基を tRNA に有し、それを導入する酵素も多岐にわたる。一方、原始生命がそのような複雑なシステムを有していたとは考えにくい。また、今回構築した系によって修飾塩基を一切持たない tRNA によって機能を持ったタンパク質が合成可能だと示された。また、3 種類の修飾塩基のみでタンパク質合成効率が向上することも示した。このことから、今回構築した系を通じた再構成的アプローチによる研究によって、原始生命の模倣である人工細胞が自己増殖するために求められる効率、正確性を担保するために最低限必要な修飾塩基を決定できると考えられる。そして、修飾塩基の起源や元来の機能について有用な知見をもたらすことが期待される。

補遺

表 S1 本研究で用いたプライマー

No.	Sequence	Notation
1	CCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AG	
2	TGG TGC CCG GAC TCG GAA	2'-OMe modification at socond base
3	TGG TGC GAG GGG GGG GA	2'-OMe modification at socond base
4	TGG TAG GCC TGA GTG GAC TTG	2'-OMe modification at socond base
5	TGG TTG CGG GGG CCG GA	2'-OMe modification at socond base
6	TGG TGG CTA CGA CGG GAT TCG	2'-OMe modification at socond base
7	TGG TGC GTC CGA GTG GAC TCG	2'-OMe modification at socond base
8	TGG CGG TGA GGG GGG GAT TCG	2'-OMe modification at socond base
9	TGG TCG GCA CGA GAG GAT TT	2'-OMe modification at socond base
10	TGG TGC TGA TAC CCA GAG TCG	2'-OMe modification at socond base
11	TGG TGG AGC TAA GCG GGA TCG	2'-OMe modification at socond base
12	TGG TGG TGG GGG AAG GAT TCG	2'-OMe modification at socond base
13	TGG GGT GGC TAA TGG GAT TCG	2'-OMe modification at socond base
14	TGG CTG GGG TAC GAG GAT TCG	2'-OMe modification at socond base
15	TGG CTC CTC TGA CTG GAC TCG	2'-OMe modification at socond base
16	TGG TGG GTC GTG CAG GAT T	2'-OMe modification at socond base
17	TGG CGG AAC GGA CGG GAC TCG	2'-OMe modification at socond base
18	TGG CGT CCC CTA GGG GAT TCG	2'-OMe modification at socond base
19	TGG AGG CGC GTT CCG GAG TCG	2'-OMe modification at socond base
20	TGG CAG GGG CGG AGA GAC TCG	2'-OMe modification at socond base
21	TGG CGC GCC CGA CAG GAT TCG	2'-OMe modification at socond base
22	TGG AGC GGG AAA CGA GAC	2'-OMe modification at socond base
23	AGG TGA AAC TGA CCG ATA	
24	AAGTTGGGTAACGCCAGG	
25	GTGTGGAATTGTGAGCG	
26	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	
27	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
28	CCGCGTAATACGACTCACTATAG	
29	GATCCCTAGAACAGCGAGATGATGATGATCATATGATATCTCCTTCTTAAAGTT	
30	GATCCCTAGAACAGCGCTGATGATGATGATCATATGATATCTCCTTCTTAAAGTT	
31	GAACAGATTGGTGGTATGAAACACTACTCCATACAACCTGCC	
32	TTAGCAGCCGGATCCTTACCCCGCCTTAACCGCTTTAC	
33	GAACAGATTGGTGGTATGAGCGATAATGACACTATCG	
34	TTAGCAGCCGGATCCTTACTTACCAATACAGAAGCTGGAG	
35	GAACAGATTGGTGGTATGTTTTATCCGGATCCTTTTGACG	
36	TTAGCAGCCGGATCCTTATGCGCTACGACGCAGC	
37	GAACAGATTGGTGGTATGTTAAAGCGTGAAATGAAC	
38	TTAGCAGCCGGATCCTTATGCGTAAACCGGG	
39	GAACAGATTGGTGGTATGAAATTACCGATTTATCTCGAC	
40	TTAGCAGCCGGATCCTTAAATGATGAGCCCATTCG	
41	GAACAGATTGGTGGTATGTCTGAAACCGCAAAAAAGTAATCGTCGG	
42	TTAGCAGCCGGATCCTCAGACCGGCAGCGGCAG	
43	GAACAGATTGGTGGTATGACCGATCCTTTTCC	
44	TTAGCAGCCGGATCCTCAACCGCCTTACGAATC	
45	GAACAGATTGGTGGTATGCTGCACACATTACATCGC	
46	TTAGCAGCCGGATCCTCACCAGGCCATCTGGCTG	
47	GAACAGATTGGTGGTATGAAACGAAATTGCG	
48	TTAGCAGCCGGATCCTCAAACCTCAAAATAACATCG	
49	GAACAGATTGGTGGTATGCGTTTTGCCATCGTG	
50	TTAGCAGCCGGATCCTCAGAACTGTACCACCTGTGTC	
51	GAACAGATTGGTGGTATGCTGATCTTGAAGGTAAAG	
52	TTAAATACATTTTACCGTTTTGGCTTAAATACATTTTACCGTTTTGGC	
53	CATCACAGCAGCGGCATGTGGATTGGCATAATTAGCCTG	
54	TTAGCAGCCGGATCCTCATTCTTTGCCCGGAAG	
55	GAACAGATTGGTGGTATGAATAATAACCTGCAAAGAGACGC	
56	TTAGCAGCCGGATCCTTACCCCTGTGAAACAGTTC	
57	GAACAGATTGGTGGTATGCGTGTACTGGGTATTG	
58	TTAGCAGCCGGATCCTTACGCAGCCGGTAAC	
59	GAACAGATTGGTGGTATGATGAATCGAGTAATCCGC	
60	TTAGCAGCCGGATCCTTAAACCGCTAAACGCG	
61	CATCACAGCAGCGGCATGTGGATTGGCATAATTAG	
62	TTAGCAGCCGGATCCTTACGCCATCCCATCATG	

表 S2 本研究で用いた DNA 鋳型とプライマーの組み合わせ

Name	Template	Forward Primer	Reverse Primer
Phe	pGEMEX-1 Phe	1	2
Leu	pGEMEX-1 Leu	1	3
Ile	pGEMEX-1 Ile	1	4
fMet	pGEMEX-1 fMet	1	5
mMet	pGEMEX-1 mMet	1	6
Val	pGEMEX-1 Val	1	7
Ser	pGEMEX-1 Ser	1	8
Pro	pGEMEX-1 Pro	1	9
Thr	pGEMEX-1 Thr	1	10
Ala	pGEMEX-1 Ala	1	11
Tyr	pGEMEX-1 Tyr	1	12
His	pGEMEX-1 His	1	13
Gln	pGEMEX-1 Gln	1	14
Asn	pGEMEX-1 Asn	1	15
Lys	pGEMEX-1 Lys	1	16
Asp	pGEMEX-1 Asp	1	17
Glu(CUC)	pGEMEX-1 Glu(CUC)	1	18
Glu(UUC)	pGEMEX-1 Glu(UUC)	1	18
Cys	pGEMEX-1 Cys	1	19
Trp	pGEMEX-1 Trp	1	20
Arg	pGEMEX-1 Arg	1	21
Gly	pGEMEX-1 Gly	1	22
Ala(CGA)	pGEMEX-1 Ala(CGA)	1	11
Ala(GCU)	pGEMEX-1 Ala(GCU)	1	11
M1 RNA	pGEMEX-1 M1 RNA	1	23
DHFR	pURE-1 DHFR	24	25
sfGFP	pEX-sfGFP	26	27
DHFRmt	pURE-1 DHFRmt	24	25
sfGFP w/o wobble	pIDTSMART sfGFP	26	27
Test peptide (X =UCG)	pURE-1	28	29
Test peptide (X =AGC)	pURE-1	28	30
MnmC	大腸菌 A19株ゲノム	31	32
MnmE	大腸菌 A19株ゲノム	33	34
GidA	大腸菌 A19株ゲノム	35	36
GlyA	大腸菌 A19株ゲノム	37	38
IscS	大腸菌 A19株ゲノム	39	40
MnmA	大腸菌 A19株ゲノム	41	42
TusA	大腸菌 A19株ゲノム	43	44
TusB	大腸菌 A19株ゲノム	45	46
TusC	大腸菌 A19株ゲノム	47	48
TusD	大腸菌 A19株ゲノム	49	50
TusE	大腸菌 A19株ゲノム	51	52
TsaB	大腸菌 A19株ゲノム	53	54
TsaC	大腸菌 A19株ゲノム	55	56
TsaD	大腸菌 A19株ゲノム	57	58
TsaE	大腸菌 A19株ゲノム	59	60
TrmD	大腸菌 A19株ゲノム	61	62

表 S3 本研究で用いた tRNA 配列

Abbreviation	Anticodon	in vitro transcribed tRNA sequence (DNA)
Phe	GAA	GCCCCGATAGCTCAGTCGGTAGAGCAGGGGATTGAAAATCCCCGTGCTTGGTTCGATTCCGAGTCCGGGCACCA
Leu	CAG	GCGAAGGTGGCGGAATTGGTAGACGCCTAGCTTACAGGTGTTAGTGTCTTACGGACGTGGGGGTTCAAGTCCCCCCTCGCACCA
Ile	GAU	AGGCTTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTGGTGGTTCAAGTCCAACCTCAGGCCTACCA
fMet	CAU	CGCGGGGTGGAGCAGCCTGGTAGCTCTCGTGGGCTCAAAACCGAAGATCGTCCGGTTCAAATCCGGCCCCGCAACCA
mMet	CAU	GGCTACGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACATCACTCATAATGATGGGGTCACAGGTTTCAATCCCGCTCGTAGCCACCA
Val	GAC	GGTCCGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACCTTGCATGGTGGGGTGGTGGTTCGAGTCCACTCGGACGCACCA
Ser	GGA	GGTAGGTTGCCGAGTGGCTGAAGGAGCACGCTGAAAGGTGTATACGGCAACGATTCGGGGGTTGAAATCCCCCCTCACCGCCA
Pro	GGG	CGGCACGTAGCGCAGCCTGGTAGCGCACCTCATGGGGTGTGGGGGTCGGAGGTTCAAAATCTCGTGGCCGACCA
Thr	GGU	GCTGATATGGCTCAGTTGGTAGAGCGCACCTTGGTAAGGGTGAGGTCCCGAGTTCGACTCTGGGTATCAGCACCA
Ala	GGC	GGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCTTGCATGGCATGCAAGAGGTGAGCGGTTTCGATCCCGCTTAGCTCCACCA
Tyr	GUA	GGTGGGTTCCCGAGCGGCCAAAGGAGACAGACTGTAATTCGCGTACAGACTTCGAAGGTTTCAATCCCTCCCGCACCA
His	GUG	GGTGGCTATAGCTCAGTTGGTAGAGCCCTGGATTGTGATTCCAGTTGTCGTTGGTTCGAAATCCCATAGCCACCCCA
Gln	CUG	TGGGATATCGCCAAGCGGTAAGGCACCGGATTCTGATTCGGCATTCGAGGTTCCGAAATCTCGTACCCAGCCCA
Asn	GUU	TCCTCTGATAGTTCAGTCGGTAGAACCGGCGACTGTAATCCGATGTCAGTGGTTCGAGTCCAGTCCAGAGGACCA
Lys	CUU	GGGTCGTTAGCTCAGTTGGTAGAGCAGTTGACTCTTAATCAATGGTCCGAGGTTTCAATCCCTGCACGACCCACCA
Asp	GUC	GGAGCGGATAGTTCAGTTGGTAGAGCACGACTGTAATTCGCTGTCACGAGGGGTCGGGGTTCGAGTCCCGTCCCGCCCA
Glu	CUC	GTCCCTTCGCTCAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTACGGCGGTAACAGGGGTTTCAATCCCTAGGGGACGCCA
Cys	GCA	GGCGGTTAACAAAGCGGTTATGTAGCGGATTGCAAAATCCGCTAGTCCGGTTCGAAATCCCGAACCGCTCCA
Trp	CCA	AGGGGCTAGTTCAAATGGTAGAGCACCGGCTCCAAACCGGGTGTGGAGTTGAGTCTCCGCCCTGCCA
Arg	CCG	GCGCCCTAGCTCAGCTGGTAGAGCGCTGCCCTCCGGAGGAGAGGTTTCAGGTTTCAATCTGTGGGGCGGCCA
Gly	GCC	GCGGAAATAGCTCAGTTGGTAGAGCACGACTGTAATTCGCAAGGTCGGGGTTCGAGTTCGAAATCCCTGCTCCCGCTCCA
Ala(CGA)	CGA	GGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCTTGCATGCAATGCAAGAGGTGAGCGGTTTCGATCCCGCTTAGCTCCACCA
Ala(GCU)	GCU	GGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCTTGCATGCAATGCAAGAGGTGAGCGGTTTCGATCCCGCTTAGCTCCACCA
Glu	UUC	GTCCCTTCGCTCAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTACGGCGGTAACAGGGGTTTCAATCCCTAGGGGACGCCA

表 S4 PURE system でのタンパク質合成用遺伝子配列

Protein	Sequence
DHFR	ATGATTTCTCTGATTGCTGCTCTGGCTGTTGACCGGGTATTGGTATGGAGAACGCTA TGCCTTGGAACTGCCTGCTGACCTGGCTTGGTTAAGCGGAACACTCTGAACAAG CCTGTTATTATGGGTCGGCACACTTGGAGTCTATTGGTCCGGCTCTGCCTGGTCGG AAGAACAATATTCTGTCTTCTCAGCCTGGTACTGACGACCGGGTTACTTGGGTTAAGT CTGTTGACGAGGCTATTGCTGCTTGTGGTGACGTTCTCAGATTATGGTTATTGGTGG TGGTCCGGTTTACGAGCAGTTTCTGCCTAAGGCTCAGAAGCTGTACCTGACTACAT TGACGCTGAGGTTGAGGGTGACACTCAGTTTCTGACTACGAGCCTGACGACTGGG AGTCTGTTTTTCTGAGTTTACAGCAGCTGACGCTCAGAATCTCACTCTTACTGTTTT GAGATTCTGGAGCGGCGGTAA
sfGFP	ATGTCTAAGGGTGAGGAGCTGTTTACTGGTGTGTTCTTCTGTTGAGCTGGACG GTGACGTTAACGGTCACAAGTTTTCTGTTCCGGGTGAGGGTGAGGGTGACGCTACTA ACGGTAAGCTGACTCTGAAGTTTATTTGACTACTGGTAAGCTGCCTGTTCTTGGCC TACTCTGGTTACTACTCTGACTTACGGTGTTCAGTGTTTTTCTCGGTACCCGTACCC ATGAAGCGGCACGACTTTTTAAGTCTGCTATGCCTGAGGGTTACGTTACGAGGCGG ACTATTTCTTTTAAAGGACGACGCTACTTACAAGACTCGGGCTGAGGTTAAGTTTGAAG GTGACACTCTGGTTAACCGGATTGAGCTGAAGGGTATTGACTTTAAGGAGGACGGTA ACATTTCTGGGTACAAGCTGGAGTACAACCTTAACTCTCACAACTTTTCAATTAATCTG TGACAAGCAGAAGAACGGTATTAAGGCTAACTTAAGATTCCGGCACAACTTGAAGGA CGGTTCTGTTAGCTGGCTGACCACTACCAGCAGAACACTCCTATTGGTGGAGCGTCT CTGTTCTGCTGCTGACAACCACTACCTGTCTACTCAGTCTGTTCTGTCTAAGGACC CTAACGAGAAGCGGGACACATGGTTCTGCTGGAGTTTGTACTGCTGCTGGTATTA CTCACGGTATGGACGAGCTGTACAAGGGTCTCACACCACCACCACCACTAA
sfGFP w/o wobble	ATGTCCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGCTGCTCCCATCCTGGTCCGAGCTG ACGGCGACGTCAACGGCCACAAGTTTCTCCGTCGGGGGCGAGGGCGAGGGCGACG CCACC AACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGT CCCCTGGCCACCCTGGTCAACCACCTGACCTACGGGCTCCAGTGTCTTCCCGG TACCCGACCAACATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAGGGCT ACGTCCAGGAGCGGACCATCTCCTTCAAGGACGACGGCACCTACAAGACCCGGG CCGAGGTCAAGTTCCGAGGGCGACACCCTGGTCAACCGGATCGAGCTGAAGGGCAT CGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGCCACAAGCTGGAGTACAACCTTCAAC TCCCACAACGTCTACATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACT TCAAGATCCGGCACAACTGTCGAGGACGGCTCCGTCAGCTGGCCGACCACTACCA GCAGAACACCCCATCGGGACGGCCCGCTCTGCTGCCGACAACCACTACCT GTCCACCAAGTCCGCTCTGTCGAAGGACCCCAACGAGAAGCGGGACCACTGGTCT CTGCTGGAGTTCTGTCACCGCCCGGGCATCACCCACGGCATGGACGAGCTGTACA AGGGCTCCCACCACCACCACCACCACTAA
DHFRmt	ATGATTTCTCTGATTTCTGCTGCTGCTGGTTGACCGGGTATTGGTATGGAGAACCTGA TGCCTTGGAACTGCCTTGGACCTGCTGGTTTAAAGCGGAACACTCTGAACAAG CCTGTTATTATGGGTCGGCACACTTGGAGTCTATTGGTCCGGCTCTGCCTGGTCCG AAGAACAATATTCTGTCTTCTCAGCCTGGTACTGACGACCGGGTTACTTGGGTTAAGT CTGTTGACGAGGCTATTGCTGCTTGTGGTGACGTTCTCAGATTATGGTTATTGGTGG TGGTCCGGTTTACGAGCAGTTTCTGCCTAAGTCCGAGAAGCTGTACCTGACTCACAT TGACTCGGAGGTTGAGGGTGACACTCAGTTTCTGACTACGAGCCTGACGACTGGG AGTCTGTTTTTCTGAGTTTACGACTCGGACTCGCAGAATCTCACTCTTACTGTTTT GAGATTCTGGAGCGGCGGTAA

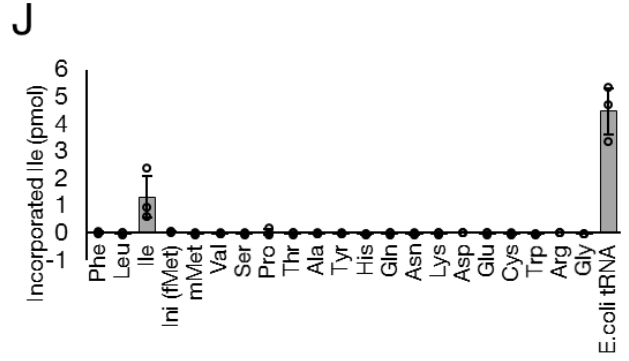
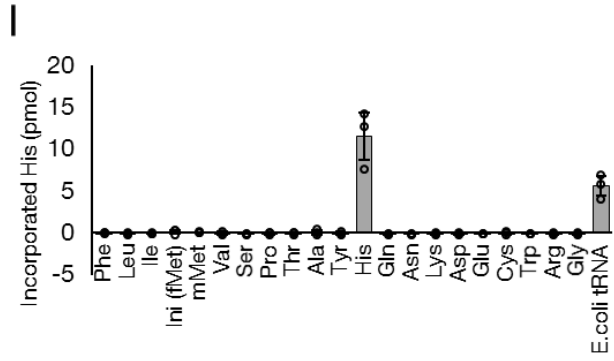
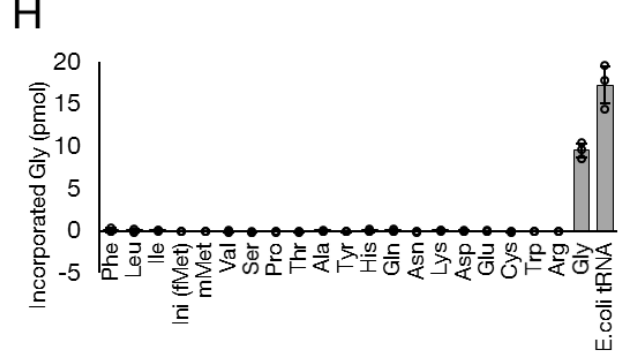
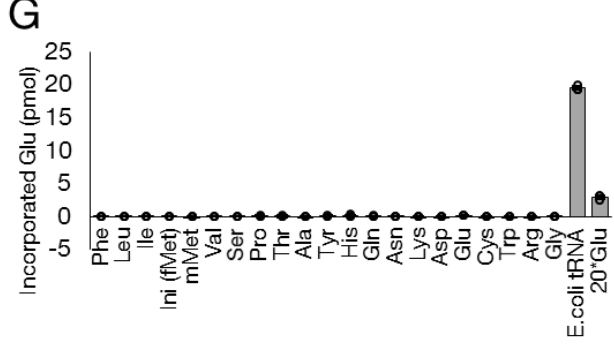
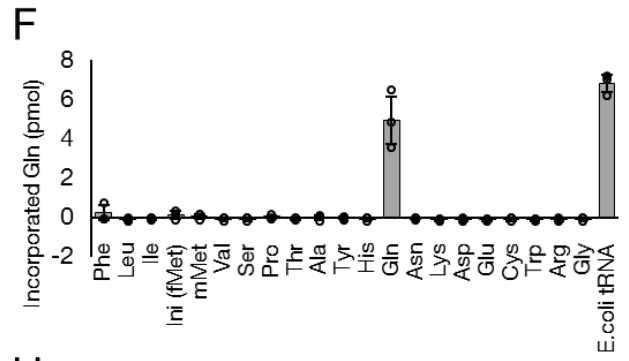
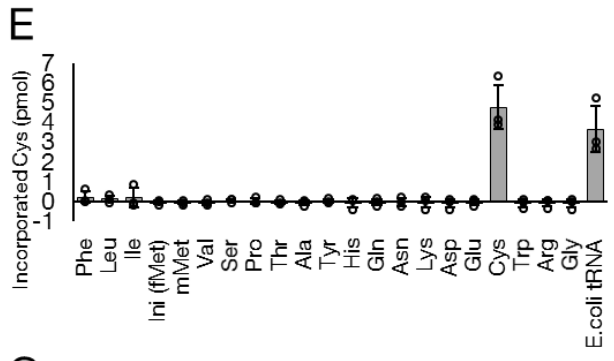
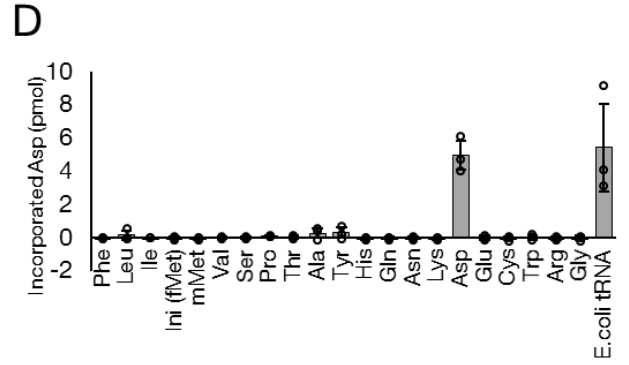
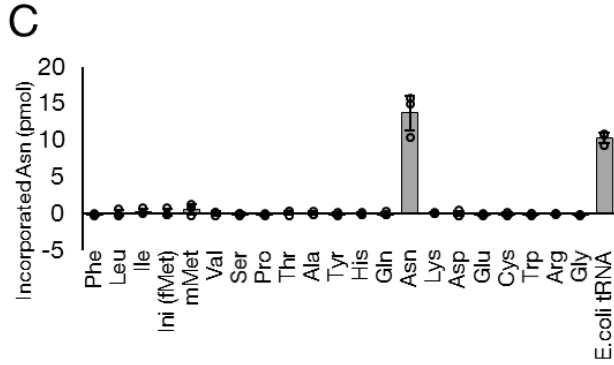
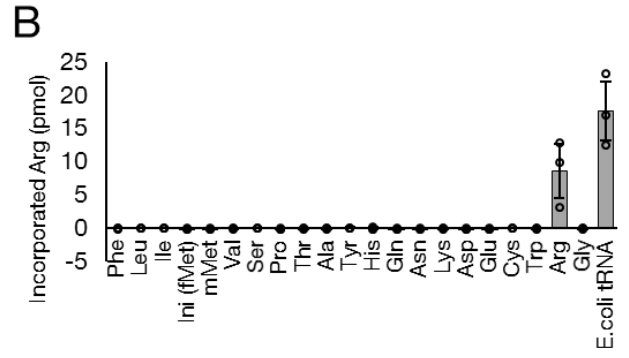
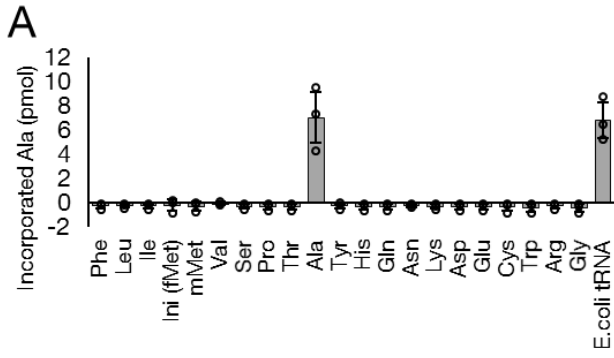
表 S5 本研究で用いた iVTtRNA 濃度

iVTtRNA	Anticodon	iVTtRNA	iVTtRNA_opt	図3-7	図3-8 A		図3-8 B	図3-8 C, 図3-9 C
					Concentration of iVTtRNA (A ₂₆₀ unit/mL)			
Phe	GAA	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Leu	CAG	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Ile	GAU	2.86	11	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48, 10.5, 20.5, 40.5	0.95, 3.45, 6, or 11
Ini(fMet)	CAU	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
mMet	CAU	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Val	GAC	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Ser	GGA	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Pro	GGG	2.86	11	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48, 10.5, 20.5, 40.5	0.95, 3.45, 6, or 11
Thr	GGU	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Ala	GGC	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Tyr	GUA	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
His	GUG	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Gln	CUG	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Asn	GUU	2.86	11	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95, 3.45, 6, or 11
Lys	CUU	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Asp	GUC	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Glu	CUC	2.86	11	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48, 10.5, 20.5, 40.5	0.95, 3.45, 6, or 11
Cys	GCA	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Trp	CCA	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Arg	CCG	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Gly	GCC	2.86	0.95	3 or 0	0.48, 0.95, 1.9, 2.86, 3.81, or 7.14		0.48	0.95
Total		60	60	60	10, 20, 40, 60, 80, 150			20, 30, 40, 60

iVTtRNA	Anticodon	図3-11 D 図3-12 図3-17		
		Concentration of iVTtRNA (A ₂₆₀ unit/mL)		
Phe	GAA	10	0.95	2.86
Leu	CAG	10	0.95	2.86
Ile	GAU	20	9.75	2.86 or 0
Ini(fMet)	CAU	10	0.95	2.86
mMet	CAU	0	0.95	2.86
Val	GAC	0	0.95	2.86
Ser	GGA	0	0.95	2.86
Pro	GGG	0	9.75	2.86 or 0
Thr	GGU	0	0.95	2.86
Ala	GGC	0	0.95	2.86
Tyr	GUA	0	0.95	2.86
His	GUG	0	0.95	2.86
Gln	CUG	0	0.95	2.86
Asn	GUU	0	9.75	2.86
Lys	CUU	0	0.95	2.86
Asp	GUC	0	0.95	2.86
Glu	CUC	0	9.75	0
Cys	GCA	0	0.95	2.86
Trp	CCA	0	0.95	2.86
Arg	CCG	0	0.95	2.86
Gly	GCC	0	0.95	2.86
Ala variant1	CGA	10 or 0	5	0
Ala variant2	GCU	10 or 0	0	0
t ⁶ A-Ile	GAU	0	0	0 or 2.86
m1G-Pro	GGG	0	0	0 or 2.86
mn ⁵ U-Glu	UUC	0	0	0 or 2.86
Glu	UUC	0	0	2.86 or 0
Total		60 or 50	60	60

表 S6 本研究で用いた各タンパク質の普遍遺伝暗号に基づくアミノ酸含量

	DHFR	DHFRmt	sfGFP
Ala	13	0	8
Arg	9	9	8
Asn	6	6	13
Asp	13	13	18
Cys	2	2	2
Gln	4	4	7
Glu	12	12	16
Gly	10	10	23
His	5	5	16
Ile	12	12	11
Leu	11	11	20
Lys	6	6	20
Met	5	5	5
Phe	6	6	12
Pro	10	10	10
Ser	9	22	11
Thr	6	6	18
Trp	5	5	1
Tyr	4	4	9
Val	11	11	18
Total	159	159	246



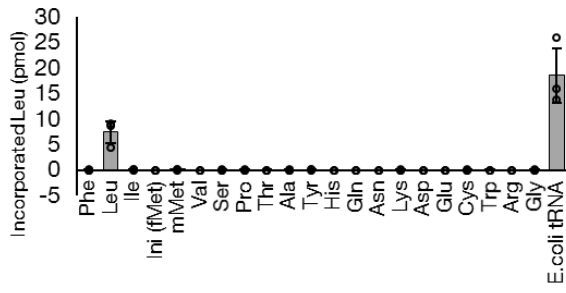
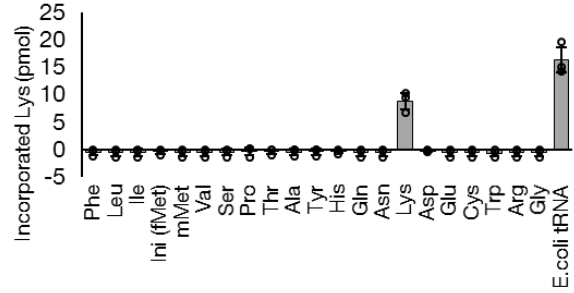
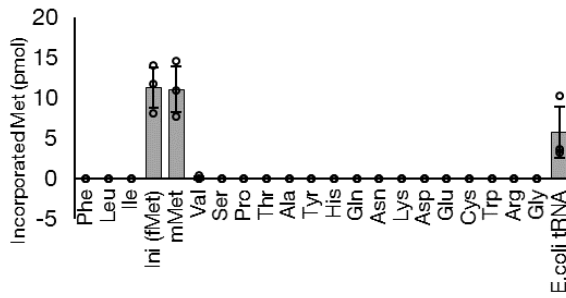
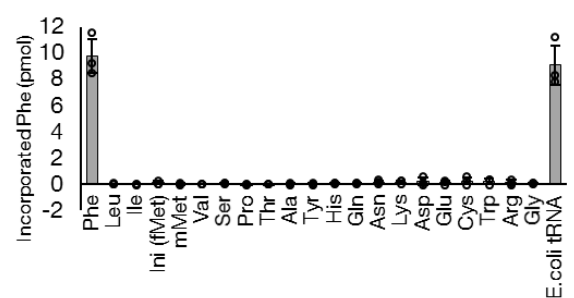
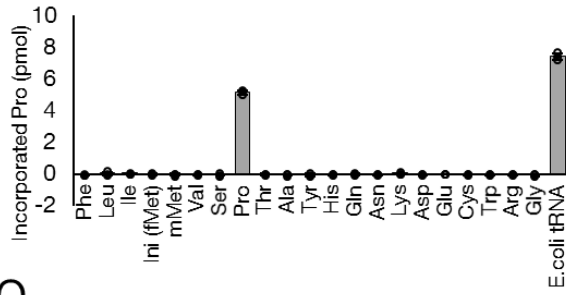
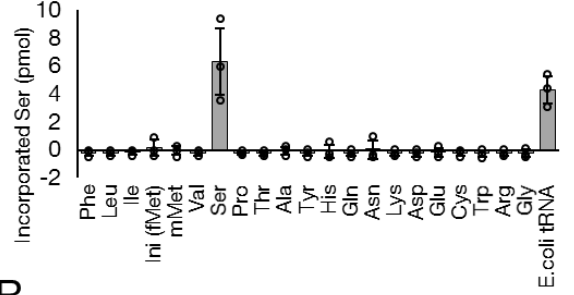
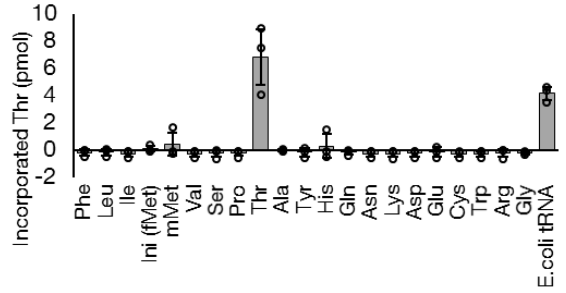
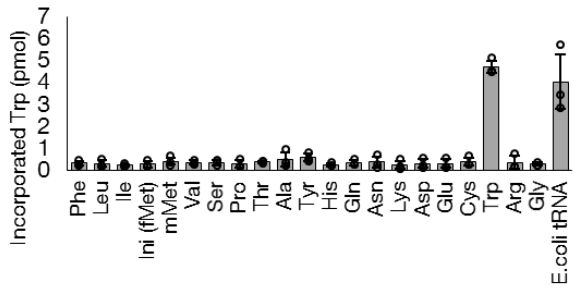
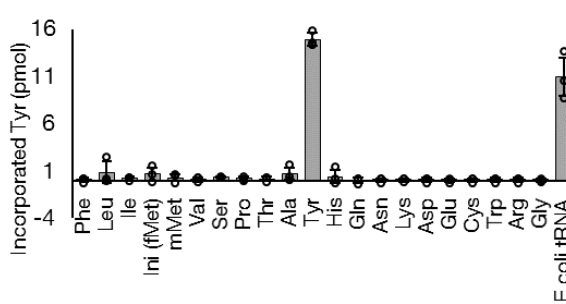
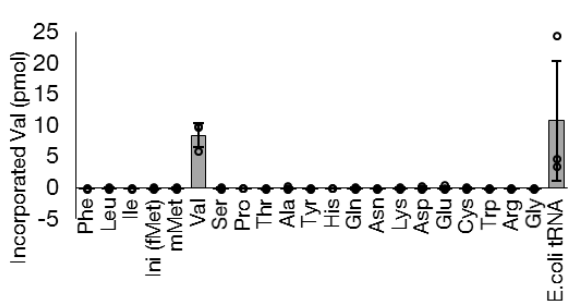
K**L****M****N****O****P****Q****R****S****T**

図 S1 iVTtRNA のアミノアシル化特性解析

(A) Ala, (B) Arg, (C) Asn, (D) Asp, (E) Cys, (F) Gln, (G) Glu, (H) Gly, (I) His, (J) Ile, (K) Leu, (L) Lys, (M) Met, (N) Phe, (O) Pro, (P) Ser, (Q) Thr, (R) Trp, (S) Tyr, (T) Val の取り込みを各 iVTtRNA に対してプロットした。エラーバーは標準偏差(n=3)を示す。

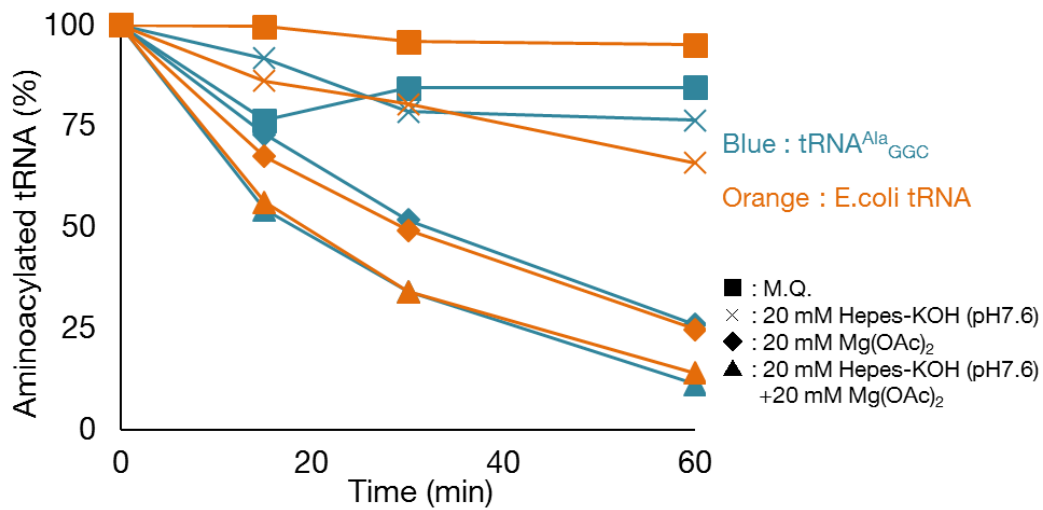
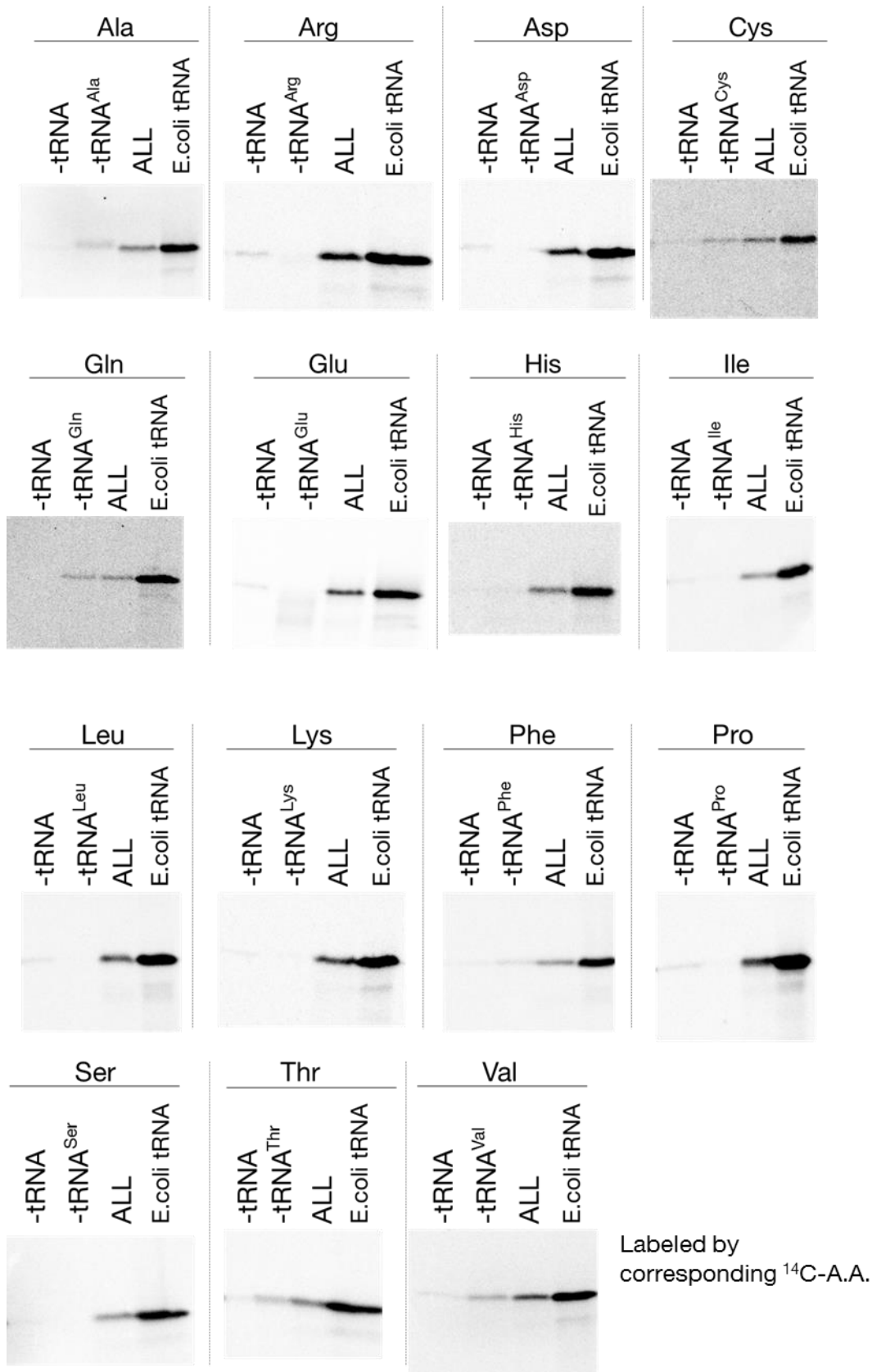


図 S2 高濃度Mg²⁺存在下でのデアシル化測定

アミノアシル化したtRNAをフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿によって回収し、その後、各Bufferに溶解して37°Cで規定時間静置してアミノアシルtRNAの残存率を評価した。



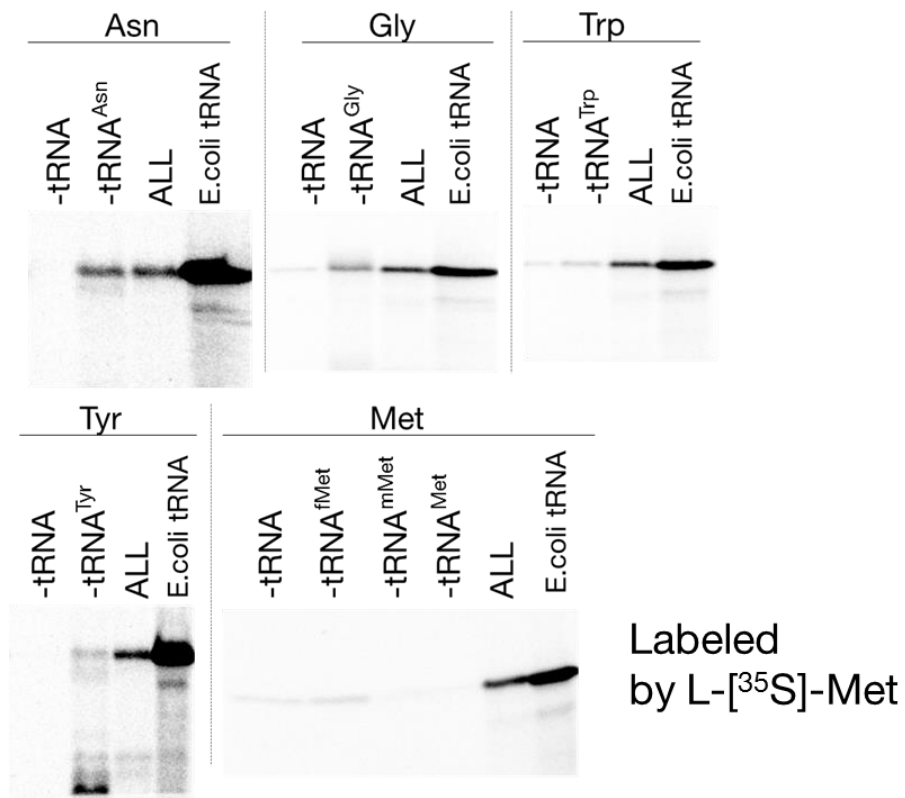
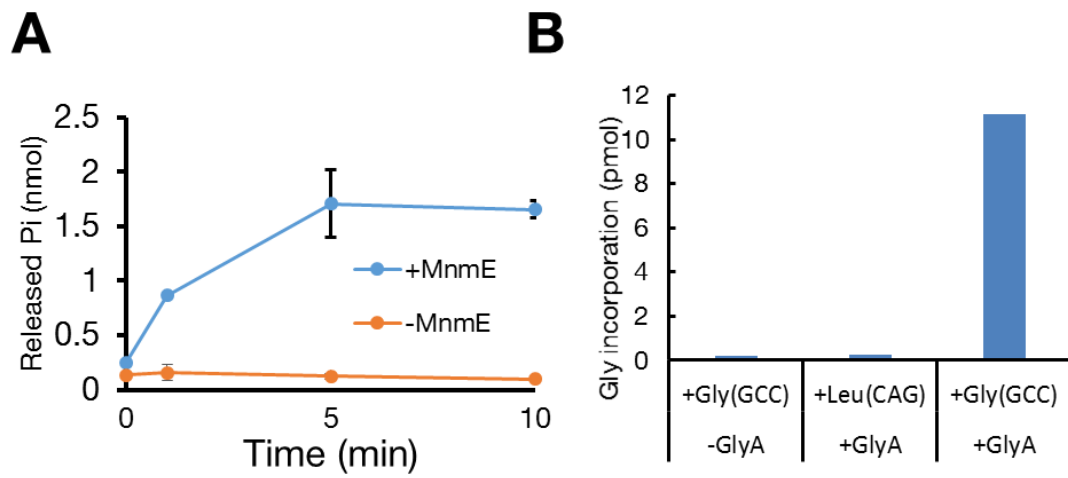


図 S3 タンパク質合成のiVTtRNAへの依存性
各iVTtRNA依存性確認のバンドパターンを示した。



☒ S4 MnME、GlyA活性測定

A: MnMEのGTPase活性測定。エラーバーは標準偏差を表す (n=3)。

B: GlyAの活性測定。GlyAが触媒する反応によって生じたGlyのアミノアシル化を測定した。

5 参考文献

1. Chin JW. 2017. Expanding and reprogramming the genetic code. *Nature*. 550(7674):53-60.
2. Reynolds NM, Vargas-Rodriguez O, Söll D, Crnković A. 2017. The central role of tRNA in genetic code expansion. *Biochim Biophys Acta*. 1861(11 Pt B): 3001–3008.
3. Tajima K, Katoh T, Suga H. 2018. Genetic code expansion via integration of redundant amino acid assignment by finely tuning tRNA pools. *Curr Opin Chem Biol*. 46:212-218.
4. Krall N, da Cruz FP, Boutureira O, Bernardes GJ. 2016. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. *Nat Chem*. 8(2):103-13.
5. Cornish VW, Mendel D, Schultz PG. 1995. Probing Protein Structure and Function with an Expanded Genetic Code. *Angew. Chem. Int. Ed.* 34(6):621-633
6. Dougherty DA, Van Arnem EB. 2014. In vivo incorporation of non-canonical amino acids by using the chemical aminoacylation strategy: a broadly applicable mechanistic tool. *ChemBiochem*. 15(12):1710-20.
7. Wang L, Brock A, Herberich B, Schultz PG. 2001. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science*. 292(5516):498-500.
8. Chin JW. 2014. Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals. *Annu Rev Biochem*. 83:379-408.
9. Krall N, da Cruz FP, Boutureira O, Bernardes GJ. 2016. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. *Nat Chem*. 8(2):103-13.
10. Maini R, Dedkova LM, Paul R, Madathil MM, Chowdhury SR, Chen S, Hecht SM. 2015. Ribosome-Mediated Incorporation of Dipeptides and Dipeptide Analogues into Proteins in Vitro. *J Am Chem Soc*. 137(35):11206-9.
11. Lajoie MJ, Rovner AJ, Goodman DB, Aerni HR, Haimovich AD, Kuznetsov G, Mercer JA, Wang HH, Carr PA, Mosberg JA, Rohland N, Schultz PG, Jacobson JM, Rinehart J, Church GM, Isaacs FJ. 2013. Genomically recoded organisms expand biological functions. *Science*. 342(6156):357-60.
12. Wang K, Neumann H, Peak-Chew SY, Chin JW. 2007. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol*. 25(7):770-7.
13. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. 2001. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol*. 19(8):751-5.
14. Murakami H, Ohta A, Ashigai H, Suga H. 2006. A highly flexible tRNA acylation method for non-natural polypeptide synthesis. *Nat Methods*. 3(5):357-9.

15. Passioura T, Suga H. 2017. A RaPID way to discover nonstandard macrocyclic peptide modulators of drug targets. *Chem Commun (Camb)*. 3(12):1931-1940.
16. Cui Z, Mureev S, Polinkovsky ME, Tnimov Z, Guo Z, Durek T, Jones A, Alexandrov K. 2017. Combining Sense and Nonsense Codon Reassignment for Site-Selective Protein Modification with Unnatural Amino Acids. *ACS Synth Biol*. 6(3):535-544.
17. Fredens J, Wang K, de la Torre D, Funke LFH, Robertson WE, Christova Y, Chia T, Schmied WH, Dunkelmann DL, Beránek V, Uttamapinant C, Llamazares AG, Elliott TS, Chin JW. 2019. Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature*. 569(7757):514-518.
18. Cui Z, Stein V, Tnimov Z, Mureev S, Alexandrov K. 2015. Semisynthetic tRNA complement mediates in vitro protein synthesis. *J Am Chem Soc*. 137(13):4404-13.
19. Iwane Y, Hitomi A, Murakami H, Katoh T, Goto Y, Suga H. 2016. Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes. *Nat Chem*. 8(4):317-25.
20. Agris PF. 2004. Decoding the genome: a modified view. *Nucleic Acids Res*. 32(1): 223-238.
21. Nureki O, Niimi T, Muramatsu T, Kanno H, Kohno T, Florentz C, Giegé R, Yokoyama S. 1994. Molecular recognition of the identity-determinant set of isoleucine transfer RNA from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 236(3):710-24.
22. Sylvers LA, Rogers KC, Shimizu M, Ohtsuka E, Söll D. 1993. A 2-thiouridine derivative in tRNA^{Glu} is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*. 32(15):3836-41.
23. Tamura K, Himeno H, Asahara H, Hasegawa T, Shimizu M. 1992. In vitro study of *E. coli* tRNA(Arg) and tRNA(Lys) identity elements. *Nucleic Acids Res*. 20(9):2335-9.
24. Masubuchi T, Endo M, Iizuka R, Iguchi A, Yoon DH, Sekiguchi T, Qi H, Iinuma R, Miyazono Y, Shoji S, Funatsu T, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T, Tadakuma H. 2018. Construction of integrated gene logic-chip. *Nat Nanotechnol*. 13(10):933-940.
25. Kao C, Zheng M, Rüdiger S. 1999. A simple and efficient method to reduce nontemplated nucleotide addition at the 3 terminus of RNAs transcribed by T7 RNA polymerase. *RNA*. 5(9):1268-72.
26. Fukunaga J, Gouda M, Umeda K, Ohno S, Yokogawa T, Nishikawa K. 2006. Use of RNase P for efficient preparation of yeast tRNA^{Tyr} transcript and its mutants. *J Biochem*. 139(1):123-7.
27. Gibson DG. 2011. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol*. 498:349-61.
28. G. Spedding 編. 1990. Ribosomes and Protein Synthesis: A Practical Approach. オックスフォード大学出版局.
29. Kiga D, Sakamoto K, Kodama K, Kigawa T, Matsuda T, Yabuki T, Shirouzu M, Harada

- Y, Nakayama H, Takio K, Hasegawa Y, Endo Y, Hirao I, Yokoyama S. 2002. An engineered *Escherichia coli* tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(15):9715-20.
30. Walker SE, Fredrick K. 2008. Preparation and evaluation of acylated tRNAs. *Methods*. 44(2):81-6.
31. Baccanari D, Phillips A, Smith S, Sinski D, Burchall J. 1975. Purification and properties of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. *Biochemistry*. 14(24):5267-73.
32. Ikeuchi Y, Shigi N, Kato J, Nishimura A, Suzuki T. 2006. Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. *Mol Cell*. 21(1):97-108.
33. GtRNADB. <http://gtRNADB.ucsc.edu/> (2019年12月4日閲覧)
34. Modomics. <http://modomics.genesilico.pl/> (2019年12月4日閲覧)
35. Shepherd J, Ibba M. 2015. Bacterial transfer RNAs. *FEMS Microbiol Rev*. 39(3):280-300.
36. Asahara H, Himeno H, Tamura K, Hasegawa T, Watanabe K, Shimizu M. 1993. Recognition nucleotides of *Escherichia coli* tRNA(Leu) and its elements facilitating discrimination from tRNA^{Ser} and tRNA^{Tyr}. *J Mol Biol*. 231(2):219-29.
37. Fukunaga J, Ohno S, Nishikawa K, Yokogawa T. 2006. A base pair at the bottom of the anticodon stem is reciprocally preferred for discrimination of cognate tRNAs by *Escherichia coli* lysyl- and glutaminyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res*. 34(10):3181-8.
38. Hasegawa T, Himeno H, Ishikura H, Shimizu M. 1989. Discriminator base of tRNA(Asp) is involved in amino acid acceptor activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 163(3):1534-8.
39. Himeno H, Hasegawa T, Asahara H, Tamura K, Shimizu M. 1991. Identity determinants of *E. coli* tryptophan tRNA. *Nucleic Acids Res*. 19(23):6379-82.
40. Himeno H, Hasegawa T, Ueda T, Watanabe K, Shimizu M. 1990. Conversion of aminoacylation specificity from tRNA^{Tyr} to tRNA^{Ser} in vitro. *Nucleic Acids Res*. 18(23):6815-9.
41. Himeno H, Hasegawa T, Ueda T, Watanabe K, Miura K, Shimizu M. 1989. Role of the extra G-C pair at the end of the acceptor stem of tRNA^{His} in aminoacylation. *Nucleic Acids Res*. 17(19):7855-63.
42. Jahn M, Rogers MJ, Söll D. 1991. Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA^{Gln} are major recognition elements for *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Nature*. 352(6332):258-60.
43. Komatsoulis GA, Abelson J. 1993. Recognition of tRNA^{Cys} by *Escherichia coli*

- cysteinyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*. 32(29):7435-44.
44. Liu H, Musier-Forsyth K. 1994. Escherichia coli proline tRNA synthetase is sensitive to changes in the core region of tRNA(Pro). *Biochemistry*. 33(42):12708-14.
 45. Peterson ET, Uhlenbeck OC. 1992. Determination of recognition nucleotides for Escherichia coli phenylalanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*. 31(42):10380-9.
 46. Samuelsson T, Borén T, Johansen TI, Lustig F. 1988. Properties of a transfer RNA lacking modified nucleosides. *J Biol Chem*. 263(27):13692-9.
 47. Schulman LH, Abelson J. 1988. Recent excitement in understanding transfer RNA identity. *Science*. 240(4859):1591-2.
 48. Schulman LH, Pelka H. 1990. An anticodon change switches the identity of E. coli tRNA(mMet) from methionine to threonine. *Nucleic Acids Res*. 18(2):285-9.
 49. Shimizu M, Asahara H, Tamura K, Hasegawa T, Himeno H. 1992. The role of anticodon bases and the discriminator nucleotide in the recognition of some E. coli tRNAs by their aminoacyl-tRNA synthetases. *J Mol Evol*. 35(5):436-43.
 50. Tamura K, Asahara H, Himeno H, Hasegawa T, Shimizu M. 1991. Identity elements of Escherichia coli tRNA(Ala). *J Mol Recognit*. 4(4):129-32.
 51. Tardif KD, Horowitz J. 2002. Transfer RNA determinants for translational editing by Escherichia coli valyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res*. 30(11):2538-45.
 52. Ikeuchi Y, Soma A, Ote T, Kato J, Sekine Y, Suzuki T. 2005. Molecular mechanism of lysidine synthesis that determines tRNA identity and codon recognition. *Mol Cell*. 19(2):235-46.
 53. Giegé R, Sissler M, Florentz C. 1998. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res*. 26(22):5017-35.
 54. Louie A, Jurnak F. 1985. Kinetic studies of Escherichia coli elongation factor Tu-guanosine 5'-triphosphate-aminoacyl-tRNA complexes. *Biochemistry*. 24(23):6433-9.
 55. Pédelacq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 24(1):79-88.
 56. Arigoni F, Talabot F, Peitsch M, Edgerton MD, Meldrum E, Allet E, Fish R, Jamotte T, Curchod ML, Loferer H. 1998. A genome-based approach for the identification of essential bacterial genes. *Nat Biotechnol*. 16(9):851-6.
 57. Persson BC, Bylund GO, Berg DE, Wikstrom PM. 1995. Functional analysis of the ffh-trmD region of the Escherichia coli chromosome by using reverse genetics. *J Bacteriol*. 177(19):5554-60.
 58. Freiberg C, Wieland B, Spaltmann F, Ehlert K, Brotz H, Labischinski H. 2001. Identification of novel essential Escherichia coli genes conserved among pathogenic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 3(3):483-9.

59. Thiaville PC, El Yacoubi B, Köhrer C, Thiaville JJ, Deutsch C, Iwata-Reuyl D, Bacusmo JM, Armengaud J, Bessho Y, Wetzel C, Cao X, Limbach PA, RajBhandary UL, de Crécy-Lagard V. 2015. Essentiality of threonylcarbamoyladenine (t(6)A), a universal tRNA modification, in bacteria. *Mol Microbiol.* 98(6):1199-221.
60. Moukadiri I, Prado S, Piera J, Velázquez-Campoy A, Björk GR, Armengod ME. 2009. Evolutionarily conserved proteins MnmE and GidA catalyze the formation of two methyluridine derivatives at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res.* 37(21):7177-93
61. Murphy FV 4th, Ramakrishnan V, Malkiewicz A, Agris PF. 2004. The role of modifications in codon discrimination by tRNA(Lys)UUU. *Nat Struct Mol Biol.* 11(12):1186-91.
62. Björk GR, Wikström PM, Byström AS. 1989. Prevention of translational frameshifting by the modified nucleoside 1-methylguanosine. *Science.* 26;244(4907):986-9.
63. Fujii S, Matsuura T, Sunami T, Kazuta Y, Yomo T. 2013. In vitro evolution of α -hemolysin using a liposome display. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(42):16796-801.
64. Bryson DI, Fan C, Guo LT, Miller C, Söll D, Liu DR. 2017. Continuous directed evolution of aminoacyl-tRNA synthetases. *Nat Chem Biol.* 13(12):1253-1260.
65. Maranhao AC, Ellington AD. 2017. Evolving Orthogonal Suppressor tRNAs To Incorporate Modified Amino Acids. *ACS Synth Biol.* 6(1):108-119.
66. Crick FH. 1968. The origin of the genetic code. *J Mol Biol.* 38(3):367-79.
67. Zhang Y, Ptacin JL, Fischer EC, Aerni HR, Caffaro CE, San Jose K, Feldman AW, Turner CR, Romesberg FE. 2017. A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information. *Nature.* 551(7682):644-647.
68. Keffer-Wilkes LC, Veerareddygar GR, Kothe U. 2016. RNA modification enzyme TruB is a tRNA chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(50):14306-14311.
69. Asano K, Suzuki T, Saito A, Wei FY, Ikeuchi Y, Numata T, Tanaka R, Yamane Y, Yamamoto T, Goto T, Kishita Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, Tomizawa K, Sakaguchi Y, Suzuki T. 2018. Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease. *Nucleic Acids Res.* 46(4):1565-1583.

6 謝辞

本研究でお世話になったすべての方に厚く御礼申し上げます。

上田 卓也教授には、学部 4 年生からの 5 年間、指導教員として大変お世話になりました。直接指導頂く機会は少なかったですが、能動的に考えて研究を推進していく姿勢を学ばせて頂きました。願わくば、最後まで指導して頂きたかったですが、運命がそれを許しませんでした。最後の一年間、曲がりなりにも自力で研究を進められたのはひとえに教授のおかげです、ありがとうございました。

富田 野乃准教授には最後の一年間の指導教官を引き受けて頂きました。研究に対して真摯な姿勢は研究者としてあるべき姿を学生に示してくれており、学ぶところが多かったです。

清水 義宏先生には学術論文の責任著者として大変お世話になりました。拙い自分の成果をまとめるのは大変だったと思います。本当にありがとうございました。

多田隈 尚史博士には学部 4 年生のときに指導して頂きました。昼夜問わず研究に没頭する姿勢や、拙い学部生であった自分がどれだけ初歩的な質問をしても懇切丁寧に教えてくれたことはとても励みになっただけでなく、自分が後輩に見せるべき姿として日々意識するロールモデルとなるものでした。

網藏 和晃博士には修士課程から博士 2 年にかけて指導して頂きました。常に楽観的で前向きな姿勢は、ともすれば失敗続きで落ち込んでしまう研究においてめげずに続けられる大きな助けとなるものでした。

藤島 皓介博士には博士論文には載っていませんが、異なるテーマの共同研究でお世話になりました。近い研究を行っている人が身近からいなくなってしまった最後の一年間、同じ興味を持った仲間として、指導して頂く先生として大きな心の支えになりました。4-5 項は氏に対する感謝を含意した考察になっています。

拙い自分が曲がりなりにも指導に携わらせて頂いた、福嶋 瑞穂さん、山西 祐くん、杉浦直樹くんにも感謝いたします。自分の稚拙な指導に辛抱してくれてありがとう。福嶋さんは初めて指導した後輩でした、稚拙さが一番出たと思いますが最後まで付き合ってくれてありがとう。山西くんは一年間だけでしたが、自分と違うタイプで指導していて楽しかったです。杉浦くんは 2 年間丸々指導した唯一の後輩でした。杉浦くんの研究を曲がりなりにもこの論文で結実させられたのは自分の誇りです。他の 2 人の研究を結実させられなかったのは自分の不甲斐なさによるものです。ごめんなさい。

同期の青山 遼くんは、タメ口で話し、話される人がどんどん減っていく博士課程において、貴重な同期として話し相手や相談相手になってもらいました。ありがとう。

最後に、27 歳にもなって就職もしない自分の意思を尊重し、見守ってくれた妹、母、父に感謝を申し上げます。