

論文題目 試験管内転写 tRNA による蛋白質合成系の構築

氏名 日比 敬太

1. 研究背景・目的

転移 RNA (tRNA) はタンパク質合成に必須な核酸分子であり、構造、機能といった理学的側面、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。中でも、試験管内で合成した tRNA を利用した無細胞タンパク質合成系の構築は、タンパク質工学への応用を指向して盛んに行われてきた。しかし、既存の手法では新しく加えた tRNA が内在性の因子と競合してしまうため、tRNA を介した無細胞タンパク質合成系のエンジニアリングには限界があった。そこで、近年では、tRNA を排した系に試験管内で合成した tRNA を加えてタンパク質合成系を再構成することで、遺伝暗号の拡張に関して制限のない系を構築しようと試みられている。これまでに、試験管内で転写させた tRNA 群と大腸菌から精製してきた tRNA を組み合わせることで、タンパク質合成系を構築することに成功している(Cui. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (2015))。さらに、試験管内で合成した tRNA のみからなる翻訳系において短鎖ペプチド合成や遺伝暗号表の一部書き換えに成功している(Iwane *et al.*, *Nature Chem.* (2016))。これらのような試験管内で合成した tRNA を用いる系には、より簡便な遺伝暗号拡張のプラットフォームの実

現という工学的な利点が期待されている。だが、これまでの研究では試験管内で合成した tRNA だけからなる系において機能を持ったタンパク質を合成した例はなかった。

本研究では試験管内転写 tRNA(iVTtRNA)だけで機能を持ったタンパク質が合成できる系の構築を行った。試験管内で調製した tRNA は塩基修飾を有していないため、アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)との相互作用に重要な塩基に細胞内では修飾を有する一部の tRNA が機能しないことが問題であった。そこで、本研究では、修飾を持たなくてもアミノ酸が

付加される tRNA を各アミノ酸、開始メチオニンにつき 1 種類選択し試験管内で再構成した tRNA セットを用い、それら tRNA が解読可能なコドンのみを用いる単純化された遺伝暗号に基づくタンパク質合成系を構築し評価した(図 1)。従来の研究では、iVTtRNA のみで数百アミノ酸からなるタンパク質を活性を持った状態で合成可能かは定かではなかった。

本研究では、試験管内で調製した tRNA を用いて活性を持つタンパク質が合成可能な系を構築すると共に、その翻訳効率を評価した。また、最小限の修飾塩基を導入することによる翻訳活性の変化を定量的に評価した。

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

図 1 選択した tRNA に基づく単純化遺伝暗号表

2. 結果

2-1. iVTtRNA のアミノアシルーション特性解析

試験管内で転写反応により合成された tRNA は修飾塩基を一切持たない。修飾塩基を欠いた tRNA がアミノアシルーションされることはすでに知られていた一方、誤ったアミノ酸を付加されるミスアミノアシルーションが起らないかは不明であった。そこで、今回調製した iVTtRNA に正しくアミノ酸が付加されることを検証するため、各 tRNA、¹⁴C でラベルされたアミノ酸 (Met のみ ³⁵S) とそれに対応した aaRS を用いて、tRNA のアミノアシルーション効率を液体シンチレーションカウンターによって定量し、各 tRNA のアミノ酸受容能を網羅的に調べた(図 2)。その結果、修飾塩基を一切欠くにもかかわらず、iVTtRNA は正しいアミノ酸のみを受容し、ミスアミノアシルーションは少なくとも検出可能なレベルでは起らないことが示された。

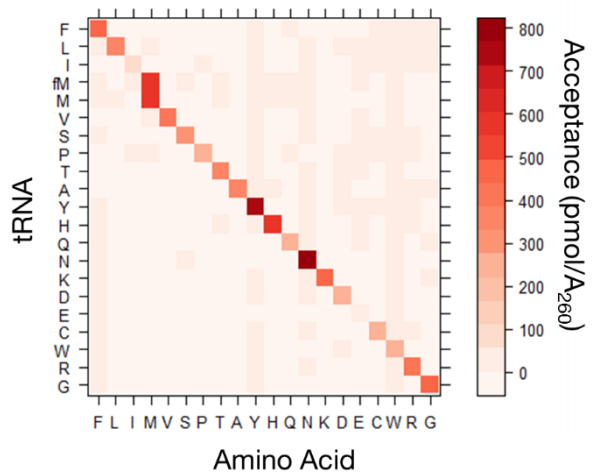


図 2 iVTtRNA のアミノアシルーション特性
各 tRNA は対応するアミノ酸の 1 文字略号で示しており、fM は開始メチオニンを表す

2-2. iVTtRNA によるタンパク質合成

試験管内で調製され、修飾塩基を一切持たない tRNA のみによってタンパク質合成を行えるかどうかを調べるため、各 tRNA 種が等量ずつ含まれた iVTtRNA または大腸菌由来の tRNA (*E.coli* tRNA) 存在下で、PURE system frex ver.2 に、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) または緑色蛍光タンパク質 (sfGFP) をコードする、各アミノ酸を指定するコドンを図 1 で選択したものに置換した DNA を用いて、30℃で、12 時間、転写、翻訳させ合成産物を SDS-PAGE によって確認した (図 3A)。その結果、合成効率は低いものの iVTtRNA のみで所望のタンパク質の全長が合成されたと考えられた。DHFR の活性を測定したところ、*E.coli* tRNA では 1.80 Unit/pmol、iVTtRNA によって合成された DHFR は 0.93 Unit/pmol の活性を持っていた(図 3B)。また、tRNA 総濃度が同一で Ile, Pro, Asn, Glu-tRNA が他の tRNA 種の 11 倍含まれる DHFR 合成量が最大となる条件(iVTtRNA_opt) では、iVTtRNA によって合成された DHFR の活性が 1.84 Unit/pmol となり、*E.coli* tRNA とほぼ同等となっ

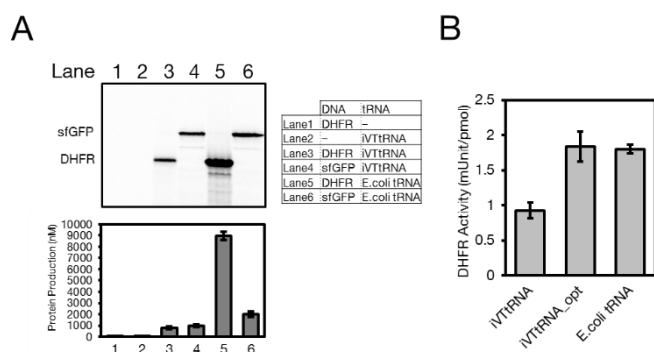


図 3 iVTtRNA によるタンパク質合成
(A) iVTtRNA による合成産物の検出と定量
(B) 合成された DHFR の比活性

た。以上より、iVTtRNA のみで機能を持ったタンパク質が合成可能であること、さらにその比活性が特定の tRNA を過剰量添加することで向上することが示された。

2-3. 被修飾 tRNA によるタンパク質合成系への展開

iVTtRNA のみ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一方で、効率よい翻訳のためには特定の tRNA 種の過剰な添加が必要であった。しかし、特定の tRNA を大量に必要とすることは、より多くの遺伝暗号すなわち tRNA を用いる系や非天然アミノ酸を用いる系などの構築において隘路となることが考えられる。そこで、過剰量の添加が必要であった tRNA のうちアミノアシル化効率の悪い Ile, Pro, Glu-tRNA 上に効率を向上させる最小限の修飾塩基を再構成し、これら tRNA の分子あたりの機能向上を図った。すでに再構成手法の確立している N⁶-threonylcarbamoyladenine(t⁶A)、1-methylguanosine(m¹G)を Ile, Pro-tRNA にそれぞれ再構成した(杉浦直樹 修士論文)。また、Glu-tRNA_{UUC} には本来の修飾塩基である 5-methylaminomethyl-2-thiouridine の前駆体である 5-methylaminomethyluridine(mnm⁵U)の再構成系を構築し、導入を行った(図 4A)。その結果、73%の効率で mnm⁵U が導入され、Glu の受容性は 2 倍程度に向上した(図 4BC)。

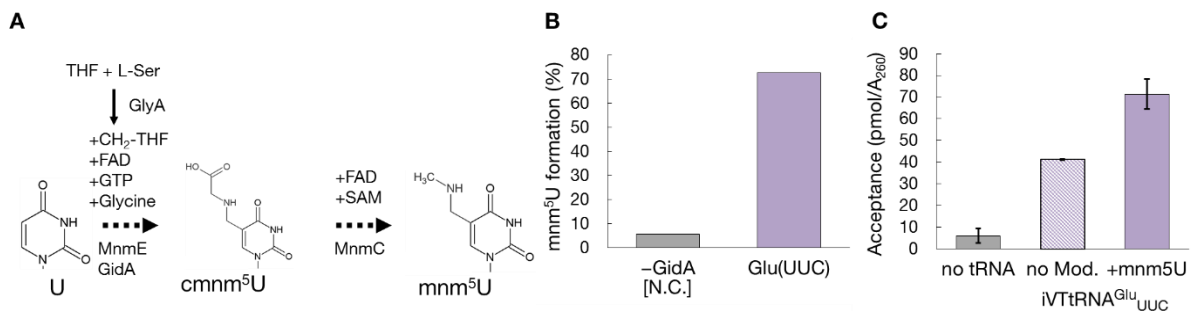


図 4 mnm⁵U の Glu-tRNA_{UUC} への導入

(A) mnm⁵U の導入スキーム (B) mnm⁵U 導入効率(¹⁴C ラベルされたメチル基の導入量により検出)
(C) mnm⁵U 導入 Glu-tRNA_{UUC} のアミノアシル化効率

2-4. 被修飾 tRNA によるタンパク質合成

修飾塩基を導入した被修飾 tRNA によってタンパク質合成効率が向上するかどうかを DHFR をモデルタンパク質として検証を行った。PURE system frex ver.2 中で DHFR をコードした DNA を 30℃で、12 時間、転写、翻訳させ合成産物を SDS-PAGE によって確認した。その結果、Ile, Pro, Glu-tRNA に修飾塩基を導入した場合は修飾を持たない iVTtRNA のみの場合と比較して、約 6.6 倍の合成量の増加が見られた(図 5)。また、Ile-tRNA に t⁶A が導入されなければ他の tRNA に修飾を導入しても合成量は向上しないことが観察された。これは、修飾を持たない Ile-tRNA が系全体のボトルネックとなっていたことを示唆する。

3.考察・展望

本研究では、試験管内で転写した tRNA のみによって機能を持つタンパク質を合成できる系の構築に初めて成功した。また、修飾塩基を持たない tRNA であってもアミノアシルレーションにおける正確性が高度に担保されていること、特定の tRNA 種の過剰な添加が合成される DHFR の比活性向上に寄与することを示した。その高い正確性からミスアミノアシルレーションが各 tRNA 種を等量ずつ加えた条件での低い比活性の原因であるとは考えにくく、また、翻訳速度がタンパク質のフォールディングに影響しうること(Sander et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2014))、競合の少ない条件においては誤ったコドンの解釈が起きやすいことが報告されている(E. B. Kramer and P. J. Farabaugh, *RNA*(2007))。本研究でも、修飾を持たずアミノアシルレーション効率の低い tRNA があるために、翻訳の停滞やコドンの誤読が誘発されていると考えられる。特定の tRNA 種を過剰に添加することで DHFR 比活性が修飾塩基を持つ *E.coli* tRNA を用いて合成した場合と同等になることから、系に含まれると期待されるアミノアシル tRNA 量を増加させることで翻訳の停滞やコドンの誤読が解消されていると予想される。この知見は、今後試験管内で転写した tRNA のみによって遺伝暗号表全体を利用しタンパク質合成を行う系へと拡張していく際に条件設定の一つの指標となることが期待される。

また、本研究では修飾塩基を1つずつ3つの tRNA に導入することで、タンパク質合成量を6.6倍に増加させられることも示した。依然、*E.coli* tRNA を用いた条件での合成量とは3倍程度の差があるが、高々3種類の修飾塩基を導入するのみで合成効率が大きく向上したことから、生体内とは異なり翻訳反応に条件が最適化され、環境変化もない無細胞タンパク質合成系では比較的少ない数の修飾塩基によって *E.coli* tRNA と同等の合成効率を達成できる可能性がある。 t^6A を Ile-tRNA に導入して初めて mnm^5U を Glu-tRNA に導入することによる合成量の増加が見えたことから、系の合成効率を規定するのは最も効率の悪い一つの tRNA であると考えられる。今後は本来の修飾塩基である mnm^5s^2U を Glu-tRNA に導入し、その効果や翻訳特性について検証したい。

本研究において構築された系はより自由に遺伝暗号を拡張し、多種類の非天然アミノ酸をタンパク質に導入できる系への展開が期待される。さらに、系に含まれる tRNA が一切の修飾塩基を欠くことから、翻訳反応中における修飾塩基の機能解析に有用であると考えられる。

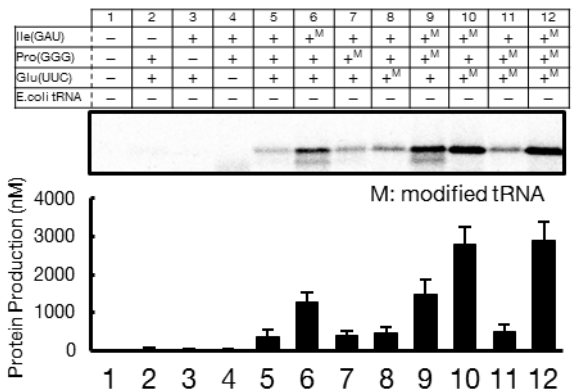


図 5 被修飾 tRNA を用いたタンパク質合成

添字の M は修飾が導入された tRNA を用いたことを表す