

博士論文

非標準アミノ酸への置換・標準アミノ酸の
コドン交換を行った新遺伝暗号の構築

藤野 公茂

目次

第 1 章 研究全体の背景	...2
第 2 章 アミノ酸入れ替え遺伝暗号の構築	...19
第 3 章 D 体アミノ酸の翻訳系への適合性の検証	...57
第 4 章 β -アミノ酸の翻訳系への適合性の検証	...95
第 5 章 Flexizyme の最小基質の探索と、新しいアシル化効率測定法の確立	...120
第 6 章 研究全体の結論	...140
第 7 章 展望	...145
第 8 章 参考文献	...156

第 1 章

研究全体の背景

1.1. 自然界の改変遺伝暗号

生物が通常使用している遺伝暗号は、生物の3つのドメイン（真正細菌・古細菌・真核生物）の全てに広く保存されているため、標準遺伝暗号と呼ばれている。しかし、現在では、標準遺伝暗号と一部が異なり、アミノ酸が再割り当てされた例も多く知られている（図1）^{1,2}。用いられるアミノ酸も、標準アミノ酸だけでなく、非標準アミノ酸が再割り当てされる例もあり、多様である。標準アミノ酸の再割り当ての例としては、*Candida cylindracea*, *Pacysolen tannophilus* 等の一部の酵母において、Leu (CTG) コドンに Ser または Ala が導入されることが知られている³⁻⁶。また、通常はアミノ酸が対応しない終止コドンに、様々な標準アミノ酸(Cys, Trp, Gly, Leu, Gln, Tyr, Glu)が導入される例も、真正細菌、真核生物で多数の報告がある。一方、非標準アミノ酸が再割り当てされる例として、真正細菌、古細菌、真核生物の一部で、pyrrolysine (Ply) または selenocysteine (Sec) を含む遺伝暗号が使用されている。このように、遺伝暗号は必ずしも一意ではなく、標準アミノ酸または非標準アミノ酸が再割り当てされた特殊な遺伝暗号が多く存在している。

1.2. 人為的な標準アミノ酸の再割り当てによる遺伝暗号改変

近年、遺伝暗号を人為的に改変することで、アミノ酸を再割り当てした遺伝暗号を構築する研究が進められている。通常の遺伝暗号においては、各 tRNA に対してアミノアシル tRNA 合成酵素が正確にアミノ酸を結合すること、翻訳反応時アミノアシル tRNA がコドンを解読してアミノ酸導入が適切に行われること、の2点によって、アミノ酸とコドンの対応関係が保たれる。よって、アミノ酸の再割り当てを実現するためには、これらのステップに介入し、この対応関係を変化させる必要がある。

まずは、標準アミノ酸の再割り当てを行う場合について説明する。この場合、必要となるのは、特定の tRNA ボディ配列に、他の tRNA のアンチコドン配列を移植した、キメラ tRNA の存在である（図2左）。アミノアシル tRNA 合成酵素の tRNA の認識部位は、必ずしもアンチコドンの3塩基全てに及んでいない場合が多い⁷。よって、アンチコドンの一部を変更することで、通常とは異なるコドンへアミノ酸を割り当てることが可能である。特に、大腸菌では、Ser, Leu, Ala に対応するアミノアシル tRNA 合成酵素の、tRNA 認識にアンチコドンを全く必要としないため⁸⁻¹¹、アンチコドンを自由に変更して、遺伝暗号のどこへでもこれらのアミノ酸を割り当てることが、原理的には可能である。具体的に説明すれば（図2右）、キメラ tRNA^{Leu}_{GGA} のアミノアシル化反応では、tRNA のボディ配列に従って反応が進行するため、LeuRS によって Leu が結合される。一方、翻訳反応では、アンチコドンに従って翻訳が行われるため、アンチコドン GGA に対応する Ser コドン UUY に Leu が導入されることになる。このようなキメラ tRNA の使用は、実際に、上述（1.1.参照）の酵母 *Candida cylindracea*

や *Pachysolen tannophilus* の例でも確認されている。これらの細胞内では、アンチコドンが CAG へと変異したキメラ tRNA^{Ser}_{CAG} やキメラ tRNA^{Ala}_{CAG} の存在が確認されており、Leu コドン CUG に、Ser または Ala を割り当てた翻訳が可能になっている³⁻⁶。

キメラ tRNA を利用して人為的に標準アミノ酸の入れ替えを行った研究としては、遺伝暗号の簡素化を目的として、Trp コドンに Ala を導入するように改変を行なった例や¹²、プロテオーム全体に確率的に変異導入を行うことを目的に、様々なコドンに Ser を導入するよう改変を行なった例が報告されている¹³。また、tRNA の機能や翻訳反応について解析する基礎研究においても、キメラ tRNA を使用した例がある¹⁴⁻¹⁶。本論文では、このようなキメラ tRNA を 2 つまたは 3 つのペアにして、相互にボディとアンチコドンを交換することによって、アミノ酸入れ替え遺伝暗号の構築を行った。アミノ酸入れ替え遺伝暗号では、コドン表内の Ser と Leu、または Ser, Leu, Ala が相互に交換されており、この遺伝暗号でコードされたタンパク質は標準遺伝暗号で翻訳されても機能せず、標準遺伝暗号でコードされたタンパク質はこの遺伝暗号で翻訳されても機能しない、いわゆる直交性を持つことが期待される。このような新規の遺伝暗号を構築することの目的は、遺伝子組み換え生物の持つ危険な遺伝子の、外部環境への漏洩を防ぐ、新たな戦略を確立することにある。この戦略と既存の組み換え遺伝子漏洩防止策との比較については、第 2 章において詳細に説明したい (2.1.参照)。本論文では、アミノ酸入れ替え遺伝暗号による遺伝子漏洩防止の概念実証として、再構成無細胞翻訳系を用いてアミノ酸入れ替え遺伝暗号を構築し、標準遺伝暗号との直交性が成立するのか検証することを、第 1 のテーマとした。

1.3. 人為的な非標準アミノ酸の再割り当てによる遺伝暗号改変

続いて、非標準アミノ酸の再割り当てを行う場合について説明する。この場合、標準遺伝暗号の再割り当てよりも複雑な仕組みが必要になる。具体的には、以下の 3 つのステップについて考えなければならない：(1) 非標準アミノ酸によるアミノアシル tRNA の合成、(2) 非標準アミノ酸の遺伝暗号への割り当て、(3) 非標準アミノ酸のリボソームによるペプチドへの導入、の 3 つである (図 3)。以下では、これらの各ステップについて、順に説明する。

1.3.1. ステップ(1) 非標準アミノ酸によるアミノアシル tRNA 合成

非標準アミノ酸を翻訳系で利用する場合、まず考えなければならないステップは、アミノアシル tRNA 合成である (図 3 上段)。通常の生物においては、アミノアシル化を触媒する酵素であるアミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)が、標準アミノ酸 20 種類に対応するものしか存在しない。よって、非標準アミノ酸の場合、何らかの方法によってアミノアシル tRNA の調製を行わなければならない。具体的には、非標準アミノ

酸のアミノアシル化法として、以下の方法が使われている。

まず、最も単純な方法は、既存の内在性 **ARS** の機能をそのまま利用する方法である。天然アミノ酸に類似した構造の非標準アミノ酸では、内在性の **ARS** に誤認識させアシル化を行うことができる^{17,18}。また、天然の **ARS** によって合成された標準アミノ酸を結合した **tRNA** を化学反応によって変換することで、非標準アミノ酸を結合した **tRNA** を調製する方法も用いられてきた^{19,20}。しかし、これらの方法でアミノアシル化が可能なのは、内在性の **ARS** に間違えて認識される、一部の限られたアミノ酸か、標準アミノ酸から、アミノアシル化後に **tRNA** 上で化学的に変換可能な一部のアミノ酸に限定されるという問題がある。そこで、上述の **ARS** の誤認識を利用したアミノアシル化法の改良法として、**ARS** に変異を導入することで、天然の **ARS** では利用できなかった非標準アミノ酸を許容できるように改変する方法が開発された。これにより、天然の 20 種類のアミノ酸とは直交性のある、様々なアミノ酸・**ARS** ペアが構築され、翻訳反応に利用できるようになった²¹⁻²⁴。このような **ARS** を用いる方法の優れた点として、酵素反応を利用しているために、*in vivo* への適用が可能であるという点が挙げられる。しかし、一方で、この方法でアミノアシル化が可能なアミノ酸は、**ARS** の改変元として利用されている **TyrRS**, **PlyRS** の基質となる **Tyr**, **Ply** の誘導体に限定されており、構造的に多様なアミノ酸の導入は、この方法を用いても難しいという問題がある。

これら **ARS** を用いる方法に対して、用いるアミノ酸の種類を限定されないアミノアシル化法として開発されたのが、1984 年に **Hecht** らによって発表された、化学合成と酵素反応を合わせたアミノアシル **tRNA** 合成法である (図 4A)²⁵。この方法では、**tRNA** の末端に相当する塩基にアミノ酸を結合したものを化学合成する。さらに、**tRNA** の残りの部分を、試験管内転写によって合成し、**T4-ligase** を用いてこれらを結合することで、アミノアシル **tRNA** を得る。この方法は、全てのアミノ酸に適用可能であるという長所があり、現在も、様々な研究で利用されている²⁶⁻³⁴。その一方で、化学合成の手順が煩雑だという欠点もあった。そこで、2006 年に **Murakmi** らは、**Flexizyme** と呼ばれる人工リボザイムを用いて、様々なアミノ酸を **tRNA** にアミノアシル化する方法を開発した (図 4B)³⁵⁻³⁷。この方法では、簡便に化学合成可能なアミノ酸の活性化体と、試験管内転写によって同じく簡便に調製可能な **Flexizyme** を用いることで、ほとんど全てのアミノ酸を **tRNA** に対してアミノアシル化することが可能である (詳細は 1.3.2.参照)。このような、アミノ酸の種類を限定されないアミノアシル化法には、アミノ酸特異性が無いため、*in vivo* での利用は困難であるものの、*in vitro* の系において、非標準アミノ酸のアミノアシル化は、これらの方法によって、ほぼ解決されたと言える。

1.3.2. Flexizyme を用いたアミノアシル化法の詳細

ここで、前述した (1.3.1.参照) Flexizyme の触媒するアミノアシル化法の詳細について解説する (図 4B)。この方法では、簡便に化学合成可能なアミノ酸活性化体に、Flexizyme と呼ばれる人工進化によって得られたリボザイムと tRNA を添加する簡単な操作によって、様々な tRNA とアミノ酸の組み合わせでアミノアシル化を行うことができる^{35,36,38-42}。Flexizyme は様々な tRNA を、基質として広く許容できるという特徴を持つが、この理由は、Flexizyme の RNA 基質認識に主に関わるのが、全ての tRNA に共通して保存されている、3'末端の 3 塩基(C74, C75, A76)のみだということにある。Flexizyme の元になったリボザイムである Fx3 と、tRNA アナログである基質 RNA を融合し、X 線結晶構造解析を用いることで解析した結果では、基質 RNA 側の C74, C75 に相当する塩基と、Fx3 側の 3'末端付近の 2 塩基のグアノシンが、ワトソン・クリック塩基対を形成していることが明らかになっている³⁷。

さらに、Flexizyme はアミノ酸についても、様々なものを広く基質として利用できるという特長を持つ。その理由として、Flexizyme のアミノ酸基質認識を主に担うのが、全てのアミノ酸活性化体に共通している芳香環であるということがある。現在頻繁に利用されている 2 種類の Flexizyme (eFx, dFx)のうち、eFx は、L-Phe の活性化体 L-phenylalanine cyanomethyl ester (L-Phe-CME)を用いたアミノアシル化反応を、効率的に行うよう最適化することで得られた経緯から、アミノ酸の側鎖の芳香環を認識する。そのため、側鎖に芳香環を持っているアミノ酸であれば、標準アミノ酸(L-Phe, L-Trp, L-Tyr)^{35,43,44}、非標準アミノ酸 (D 体アミノ酸 : D-Phe, D-Trp, D-Tyr⁴⁵⁻⁴⁷、N-アルキルアミノ酸 : N-methyl-Phe, N-acyl-Phe, N-phenyl-Gly⁴⁸⁻⁵⁰) によらず基質とすることが可能である。さらに Murakami らは、活性化のために使っていた CME 部位を p-chlorobenzyl thioester (CBT)に置き換えることで、eFx による基質認識を側鎖の芳香環ではなく、活性化基に担わせることが可能であることを明らかにした。CBT 活性化を使用することで、eFx の基質として利用可能なアミノ酸の種類は、芳香族アミノ酸のみに限られず大きく広がったものの、一方で、アミノ酸 CBT 活性化体は反応性が高すぎるため、tRNA 上の 2 カ所に反応してしまう等の、副産物の生成が問題となった。この問題を解決するため、活性化基を CBT から反応性の低い 3,5-dinitrobenzyl ester (DBE)に置き換え、さらに Flexizyme の配列についても、アミノ酸 DBE 体を用いたアミノアシル化に最適化を行い、新たな Flexizyme (dFx)が開発された³⁵。dFx で利用可能な基質アミノ酸は、芳香族アミノ酸に限られず、様々な標準アミノ酸(L-Ala, L-Ser, L-Arg)^{35,43,44,51,52}、非標準アミノ酸 (D 体アミノ酸 : D-Ala, D-Ser, D-Arg^{45-47,53}、N-アルキルアミノ酸 : N-acyl-Lys, N-methyl-Ala, N-alkyl-Gly⁴⁸⁻⁵⁰、β-アミノ酸 : L-β-homolle (L-βhille), L-β-homoPhg (L-βhPhg), L-β-homoGlu (L-βhGlu)^{54,55}) を利用す

ることができ、非常にアミノ酸の許容性が高い。

現在では、大部分のアミノ酸について、アミノ酸 DBE 体を基質とし、dFx による触媒でアミノアシル化を行い、芳香族アミノ酸については、アミノ酸 CME 体を基質とし、eFx による触媒でアミノアシル化を行う。また、一部の反応性の低いアミノ酸に限り、アミノ酸 CBT 体と eFx の組み合わせを用いる、という使い分けにより、ほとんど全てのアミノ酸を基質としたアミノアシル tRNA 調製が可能になっている。

1.3.3. ステップ(2) 非標準アミノ酸の遺伝暗号への割り当て

上述のように *in vitro* の系では、現在ほぼ自由なアミノアシル tRNA の調製が可能となっており、これを前提とすると、次に考えなければならないステップは、遺伝暗号表の特定のコドンへの非標準アミノ酸の割り当てとなる (図 3 中段)。通常の遺伝暗号では、64 個のコドンの全てにアミノ酸または翻訳終結の役割が割り振られているので、非標準アミノ酸を対応させるコドンを用意するには特別な工夫が必要となる。これについては、1989 年に、Schultz らのグループと Chamberlin らのグループによって、ほぼ同時にアンバーサプレッション法と呼ばれる手法が開発された (図 5A)^{30,56}。これは、終止コドンであるアンバーコドンに対応する tRNA に非標準アミノ酸をアミノアシル化することで、翻訳系中でアンバーコドンに非標準アミノ酸を割り当てる方法である。この方法は、標準の 20 種のアミノ酸に非標準アミノ酸が 1 つ加わるため、"遺伝暗号の拡張"と呼ばれている^{26,30,57,58}。さらに、その後、アンチコドンに 4 塩基または 5 塩基のコドンを持った tRNA を利用し、アンバーコドンやレアコドンを読み超えることで非標準アミノ酸を割り当てる、フレームシフトサプレッションと呼ばれる方法も開発された^{59,60}。しかし、これらの方法では、非標準アミノ酸の導入反応と、翻訳終結反応 (アンバーサプレッション法の場合) や天然アミノ酸の導入反応 (フレームシフトサプレッション法の場合) とが、競合してしまうため、非標準アミノ酸の導入効率が低くなるという問題があった。さらに、非標準アミノ酸を割り当て可能な終止コドンとレアコドンの数には限りがあるため、非標準アミノ酸の種類を増やせないという問題もあった。

そこで、続いて開発されたのが、"遺伝暗号のリプログラミング"と呼ばれる方法である (図 5B)^{57,61}。遺伝暗号のリプログラミングとは、遺伝暗号表から特定のアミノ酸を除いてしまい、そこに新たに非標準アミノ酸を再割り当てするという方法である。この方法の完成には、再構成無細胞翻訳系の開発が重要な役割を果たした。2001 年に清水らは、大腸菌の翻訳に関わる因子を 1 つずつ別個に精製し、これらを混合することで、翻訳系を再構成することに成功した⁶²。この系では、特定の翻訳因子、例えば終結因子や一部の ARS を除いて系を構築することで、遺伝暗号表中にアミノ酸が割り振られていない空コドンを作ることができる。ここに非標準アミノ酸を対応させ

ることで、遺伝暗号のリプログラミングが完了する。この系では、非標準アミノ酸の導入と競合する要素が完全に排除されているため、非標準アミノ酸の導入効率が、競合により低下してしまうことも防ぐことが可能になった。さらに、この技術により、非標準アミノ酸の割り当てが可能なコドンの数についての制限が無くなった。さらに、2016年には、全ての tRNA を試験管内転写により準備して翻訳系を再構成することで、コドンボックスを分割し、元は 1 種のアミノ酸に対応していたコドンボックスを、複数のアミノ酸に割り当てる技術についても開発された⁶³。これにより、非標準アミノ酸を割り当てられるコドンの数はさらに増加し、標準アミノ酸を除去することなく、非標準アミノ酸を追加することも可能になった。

1.3.4. ステップ(3) 非標準アミノ酸のリボソームによるペプチドへの導入

ここまで説明してきたように、現在では、様々な非標準アミノ酸に適用可能なアミノアシル tRNA 合成技術と、これを遺伝暗号表に割り当てる技術が確立されている。特に *in vitro* の実験に限って言えば、既にかなり自由度の高い遺伝暗号の改変が可能になっている。

しかし、これで全ての非標準アミノ酸が翻訳系で利用可能になった訳ではない。最終的には、それぞれの非標準アミノ酸が、リボソームへの輸送と、リボソームの触媒するペプチド転位反応に、基質として適合しているかという点が、翻訳適合性を決めるポイントとなる (図 3 下段)。現在までに、様々なアミノ酸について翻訳反応で利用可能であるかが検証されているが^{30,35,56,60,64-73}、一方で、非標準アミノ酸の構造についても、側鎖や主鎖骨格の異なる膨大な種類が考え得るため、翻訳反応への適合性が未解明のアミノ酸も、未だ数多く残されている。これについては、アミノ酸毎に異なるため、1 つずつ翻訳導入を検証することで明らかにしていくことが必要である。

1.4. 非標準アミノ酸の再割り当てを利用した様々な応用研究

以上のように、非標準アミノ酸の再割り当てに必要な、様々な技術がこれまでに開発されており、今日では、これを用いた様々な応用研究が展開されている。こうした応用研究は、主に次の 4 つの方向性に分類することができる (図 6)。1 つ目は、無細胞翻訳系を用いて非標準アミノ酸を導入する研究である^{30,56,59,60,64-66,74-77}。例えば、Acetyl-Lys 等の修飾アミノ酸を部位特異的に導入し、翻訳後修飾タンパク質を直接合成することで、その機能を解析する研究がある。また、蛍光標識されたアミノ酸を導入することで、FRET を用いてタンパク質の構造変化を検出する研究も行われている。2 つ目の方向性は、非標準アミノ酸を含むタンパク質合成を、*in vivo* つまり細胞内で行なうものである^{41,67,78-82}。例えば、光架橋可能なアミノ酸である *p*-benzoyl-Phe をタンパク質に導入することで、細胞内でそのタンパク質と相互作用する相手分子を、

共有結合により固定化し、網羅的に解析する研究が報告されている。3つ目の方向性は、非タンパク質アミノ酸を利用して、遺伝子組換え生物(GMO)が、研究室や工場などの封じ込められた環境から漏えいすることを防ぐための、"Genetic firewall"を構築するという研究である^{83,84}。具体的には、必須のタンパク質の配列中に終止コドンを導入しておき、ここに非標準アミノ酸を割り当てる。これにより、非標準アミノ酸の存在する研究室または工場の培養条件でのみ、必須タンパク質が合成されるためGMOが生育し、一方、外部環境では死に至る仕組みを作ることができる。4つ目の方向性は、非標準アミノ酸を含む多種多様なペプチドを合成し、進化分子工学的手法によって、薬剤候補を始めとした新規機能性ペプチドを取得する研究である⁸⁵⁻¹⁰²。機能性ペプチドへ非標準アミノ酸を導入する目的として、最もよく見られるのが、特殊な官能基を利用したペプチドの大環状化により、加水分解耐性の向上を期待する、また、ペプチドの構造に適度な制約を与えるというものである⁸⁵⁻¹⁰⁰。また、標的分子と相互作用することが予め分かっている構造を側鎖に持つ非標準アミノ酸を導入することで、標的結合性のペプチドを得られる可能性を高めたり、強く結合する分子が得られることを期待したりする戦略も用いられる^{88,98,101}。さらに、*N*-メチルアミノ酸(図7)を用いることで、ペプチド主鎖の一部をメチル化し、細胞膜透過性や加水分解酵素への耐性の向上を狙う方法もある^{85,89,92,95-97}。

上記のような様々な戦略に基づいて、実際に、非標準アミノ酸を導入した大環状のペプチドライブラリから、標的結合性のペプチドを開発する研究では、1桁 nM オーダーの解離定数 K_D を持つペプチドも多く報告されている^{85,87-91,93,96,97}。ここでは、私自身が関わった研究を例に挙げ、説明したい。2013年、非標準アミノ酸(CIAc-Phe, *N*-methyl Phe, *N*-methyl His, *D*-Tyr, Cle)を含む大環状ペプチドライブラリから、血管内皮細胞増殖因子受容体 II (VEGFR II) に対して結合するペプチドの選択を行なった。その結果、VEGFRファミリーの中から、VEGFR II に特異的に結合し、2 nM 程度の K_D を持つペプチドの獲得に成功した。さらに、このペプチドは、培養細胞を用いたモデル実験により、VEGFR II の機能を阻害することで、血管新生を阻害できることが示唆されている⁸⁹。

1.5. 新たなペプチド構成要素として注目される D 体アミノ酸、 β -アミノ酸

本論文では、ペプチドの構成要素として新たなアミノ酸を追加することで、ライブラリからの新規機能性ペプチド取得研究の応用可能性をさらに高めることを考えた。この観点から有望な非標準アミノ酸として着目したのが、D 体アミノ酸と β -アミノ酸である(図7)。標準アミノ酸が全て L 体の α -アミノ酸であるのに対し、D 体アミノ酸は、主鎖を形成する α -炭素を不斉点とした鏡像異性体である。 β -アミノ酸は、主鎖の炭素数が α -アミノ酸よりも 1 つ多いアミノ酸である。前述の *N*-メチルアミノ酸を

含め、これらのアミノ酸は、非天然型の構造を主鎖に持つ非標準アミノ酸に分類することができる。以下では、非天然型の主鎖骨格を持つ D 体アミノ酸や β -アミノ酸が、ペプチドライブラリの構成要素として利用できるようになった場合、どのような利点があるかについて述べる。

まず、前述の N-メチルアミノ酸と同様に、ペプチドの加水分解酵素に対する耐性の向上が期待できる。ペプチドライブラリからの機能性ペプチド取得研究において、ペプチドの加水分解を防ぐことは、非常に重要な問題である。標準アミノ酸を用いる系では、選択によって得られたペプチドを、培養細胞を用いた *in vivo* 実験に利用したり、薬剤として生体内に投与したりする際に、生物の内在性の加水分解酵素によってペプチドが分解されてしまうという問題が発生する。ここに、主鎖骨格に特殊な構造を持つ D 体アミノ酸や β -アミノ酸をペプチドへ導入することで、内在性の加水分解酵素に認識されにくくなるため、分解耐性が獲得されると考えられる。実際、化学合成ペプチドを用いて分解耐性について検証した先行研究では、合成ペプチドに様々な種類のペプチド加水分解酵素を作用させた結果、天然アミノ酸のみからなるペプチドでは分解が進行する条件でも、D 体アミノ酸や β -アミノ酸から成るペプチドでは、ほとんど分解が進行しなかったことが報告されている^{33,103-107}。特に、 β -アミノ酸については、ペプチドを構成するアミノ酸が全て β -アミノ酸でなくとも、 α -アミノ酸と交互に配置することでペプチドの分解耐性が獲得されることが分かっている。D 体アミノ酸や β -アミノ酸を翻訳系によりペプチドへ導入することで、生体内で長時間安定に存在し、機能を保持できるペプチドがライブラリとして用意できるようになる。これにより、機能性ペプチドライブラリの応用可能性はさらに大きく広がると期待される。

また、D 体アミノ酸や β -アミノ酸が導入されたペプチドでは、通常のペプチドと異なる構造を形成できることが報告されている。例えばヘリックス構造では、通常の α -アミノ酸の作るヘリックス構造が 3.6 残基で 1 回転するのに対し、 β^3 -アミノ酸では 3 残基で 1 回転、 β^3 -アミノ酸、 β^2 -アミノ酸の混合鎖では 2.7 残基で 1 回転となることが知られている¹⁰⁸。D 体アミノ酸であれば、通常のペプチドの鏡像に当たる立体構造となる。このような通常と異なる特殊な構造が、ペプチドの機能性に対してどのような影響を与えるのかは未知であるが、一般的に進化分子工学においては、創出する分子の構造的な多様性が高いほど、より目的とする機能の高い分子が得られやすくなると考えられるため、様々な構造を生み出せることはメリットとなり得る。これらのアミノ酸の導入によって、特殊な構造のペプチドが得られるようになれば、D 体アミノ酸、 β -アミノ酸を含むペプチドライブラリの新たな利点となる可能性がある。

1.6. D 体アミノ酸、 β -アミノ酸の翻訳系への適合性の検証

以上のように、主鎖骨格が特殊な D 体アミノ酸、 β -アミノ酸をペプチドライブラリに導入するメリットは非常に大きいため、これらのアミノ酸の翻訳系への適合性について研究することは非常に意義深い。これまでに、D 体アミノ酸、 β -アミノ酸のペプチドへの翻訳導入については、検証した研究例がいくつか報告されている^{27-34,70,109}。その結果については、基本的に、各章で詳しく解説するが (D 体: 3.1.1.参照、 β : 4.1.1.参照)、ここで結論だけを述べれば、先行研究の検証内容は以下の点で不十分であった。検証に用いられたアミノ酸の側鎖が少ない点と、複数の先行研究で結果に一致しない部分があった点である。そこで本論文の第 2、第 3 のテーマとして、D 体アミノ酸、 β -アミノ酸の翻訳系への適合性の検証を行なうこととした。その際、D 体アミノ酸で 19 種類、 β -アミノ酸で 16 種類の側鎖を持つアミノ酸を用意し、翻訳系への適合性を網羅的に検証できるように研究を計画した。この内容については、3 章 (D 体アミノ酸) および 4 章 (β -アミノ酸) で説明する。

1.7. tRNA のアミノアシル化効率測定法の確立

ここまで述べてきたような非標準アミノ酸の導入実験においては、非標準アミノ酸を輸送する tRNA のアミノアシル化効率が重要になる。これは、非標準アミノアシル tRNA を系外で調製する系では、アミノアシル tRNA の初期濃度が導入量に影響するためである。そのため、tRNA のアミノアシル化効率を評価し、これを最大化することが必要になる。しかし、従来のアミノアシル化効率測定法では、一部のアミノ酸について、正確なアミノアシル化効率測定が困難であるという問題があった^{35,46,51,54,110,111}。そこで、より広範なアミノ酸に適用可能な、新規のアミノアシル化効率測定法を確立することを、本論文の第 4 のテーマとして研究を行なった。この内容については、5 章で説明する。

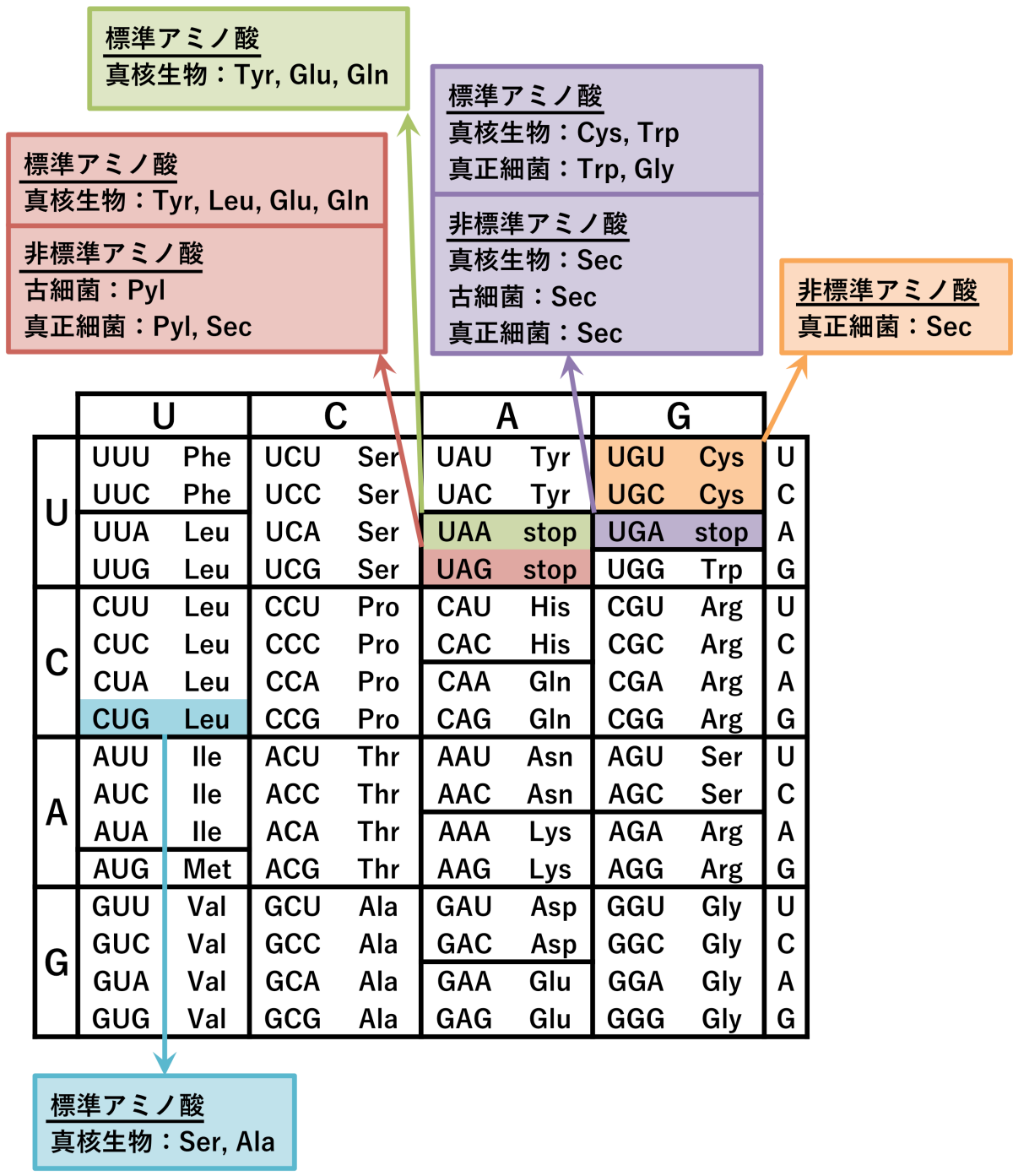


図1 自然界での遺伝暗号改変。

通常の生物の核ゲノムの翻訳における遺伝暗号改変を図にまとめた。図に示した3ドメイン（真核生物、古細菌、真正細菌）は、そのうちの一部の生物において、改変が報告されていることを表す。なお、この図は、参考文献1,2を元に作成した。

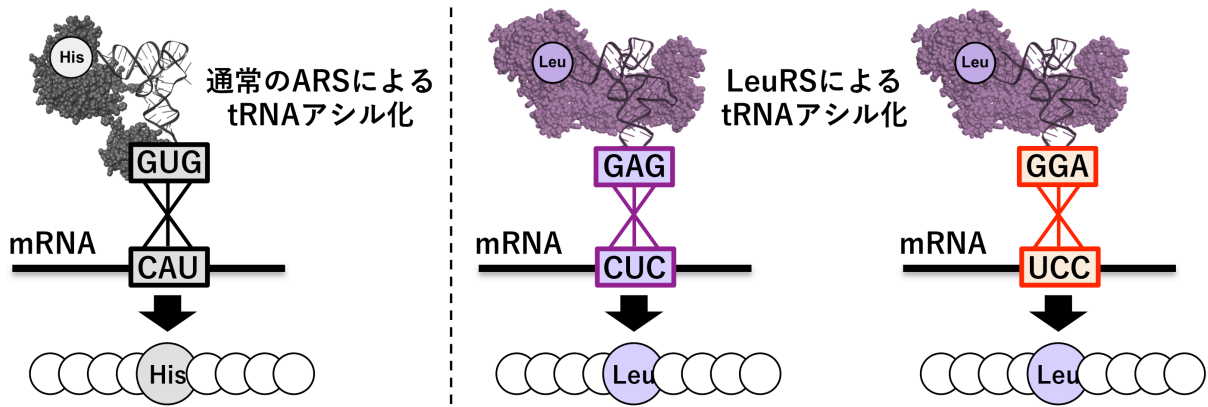


図2 キメラ tRNA による標準アミノ酸の再割り当て。

通常のアミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)では、アンチコドンも認識部位に含まれる。一方、一部のARS、特に LeuRS, SerRS, AlaRS ではアンチコドンが認識されないため、アンチコドンを他の tRNA から移植することにより、通常と異なるアミノ酸をコドンに再割り当てできる。

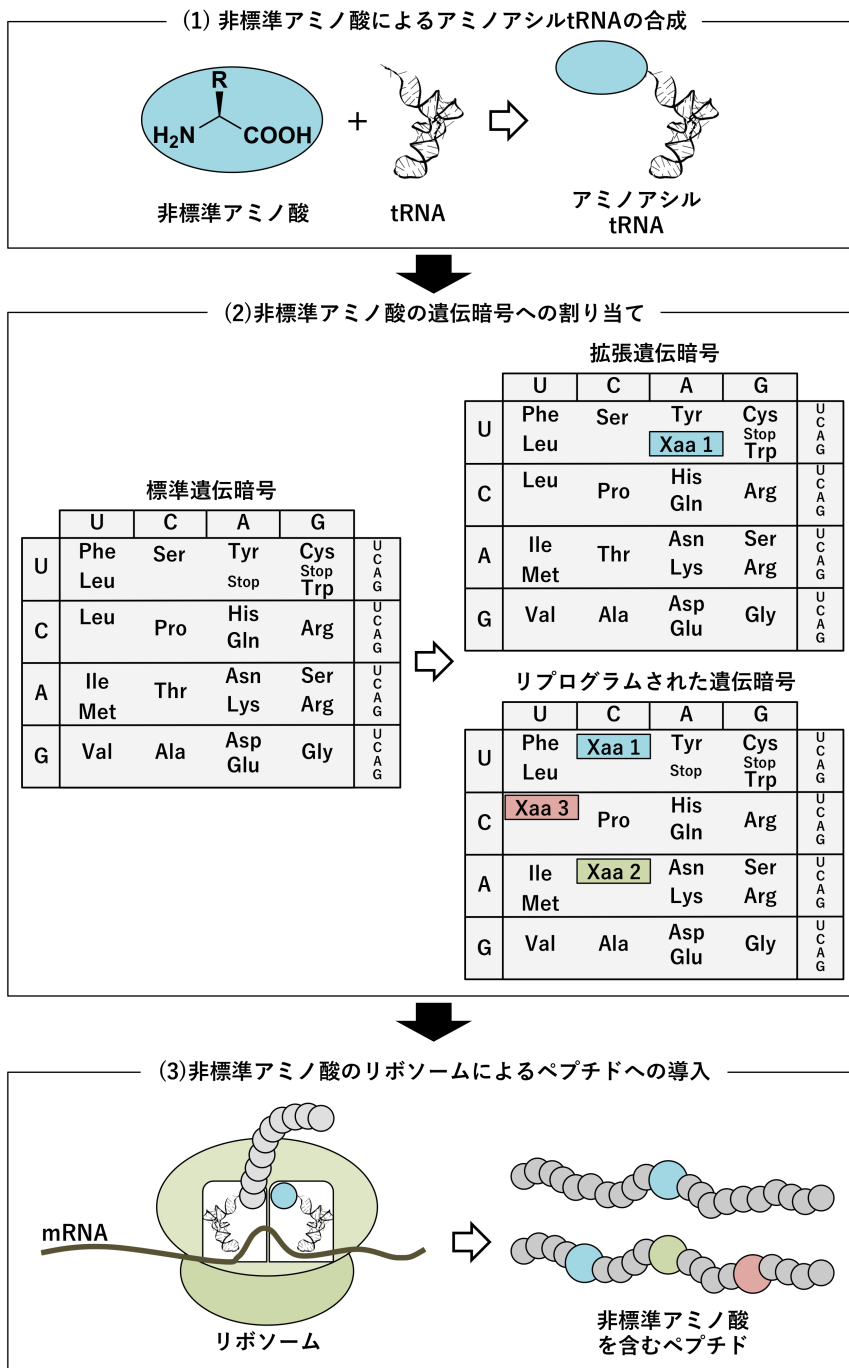


図3 人為的な非標準アミノ酸の再割り当てに至るまでの3つのステップ。

1つ目は、非標準アミノ酸によるアミノアシル tRNA の合成である。非標準アミノ酸は、内在性のアミノアシル tRNA 合成酵素によってアミノアシル化できないため、非標準アミノ酸と tRNA から、アミノアシル tRNA を調製する必要がある。2つ目は、非標準アミノ酸の遺伝暗号への割り当てである。非標準アミノ酸に対応するコドンを用意するため、遺伝暗号の拡張や遺伝暗号のリプログラミングが利用される。3つ目は、非標準アミノ酸のリボソームによるペプチドへの導入である。リボソームでは、標準アミノ酸以外にも基質として受け入れ可能なアミノ酸が知られているが、全ての非標準アミノ酸を許容できる訳ではない。この点については、翻訳系で使用したい非標準アミノ酸毎に導入可能か検証する必要がある。

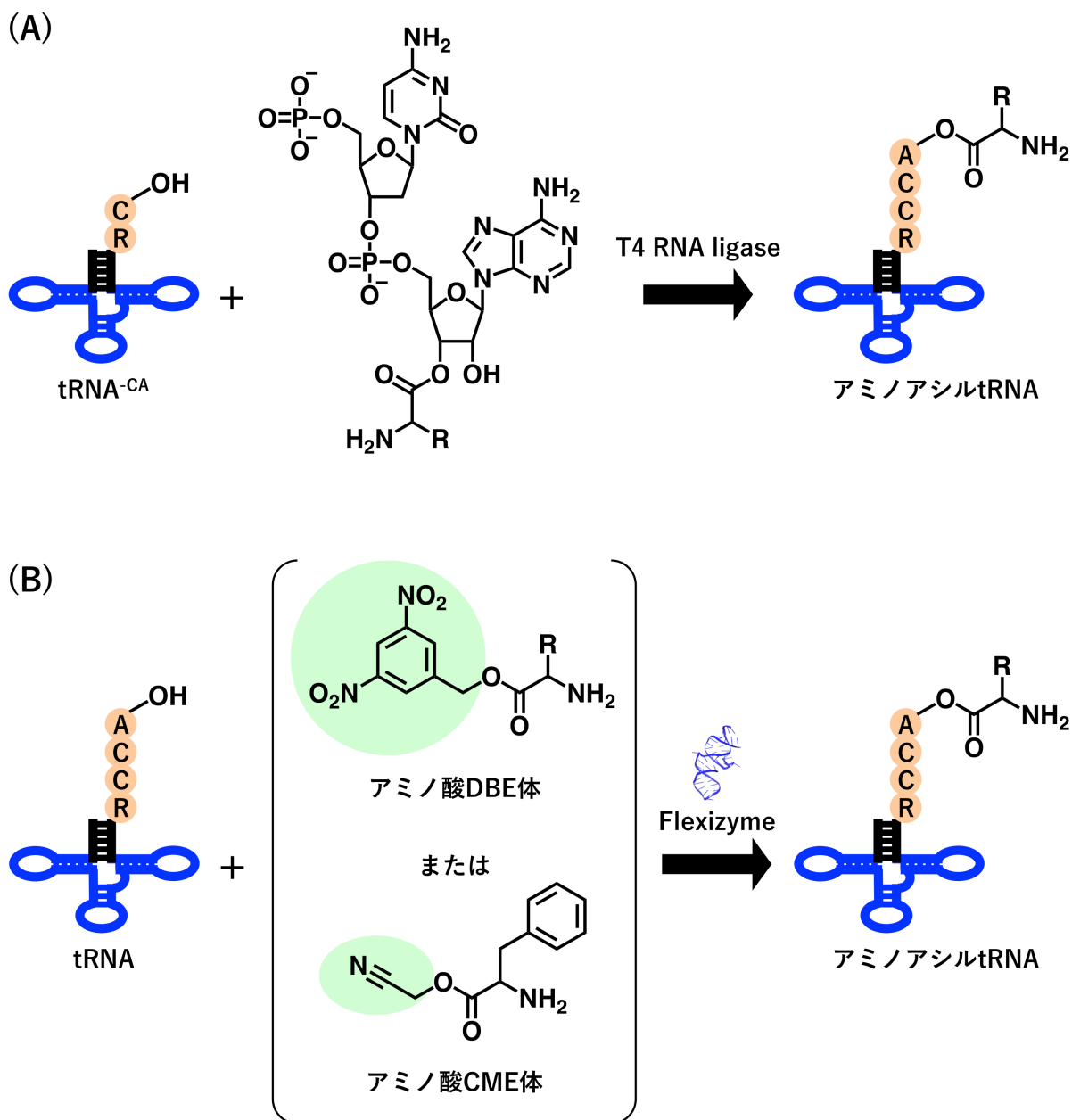


図4 用いるアミノ酸の種類を限定されないアミノアシル tRNA 合成。

(A) 化学合成と酵素反応を合わせたアミノアシル tRNA 合成法。末端の 2 塩基 CA を欠いた tRNA ($\text{tRNA}^{-\text{CA}}$) については、試験管内転写により作製する。CA の 2 塩基にアミノ酸を結合したもの (pdCpA-アミノ酸) については、化学合成により作製する。これらを T4 RNA ligase によりライゲーションしてアミノアシル tRNA を得る。(B) Flexizyme を用いたアミノアシル化法。簡便に化学合成が可能なアミノ酸活性化体 (cyano methyl ester (CME) 体または dinitro benzyl ester (DBE) 体) と、試験管内転写によって作製した tRNA、Flexizyme を混合することで、アミノアシル tRNA を得る。

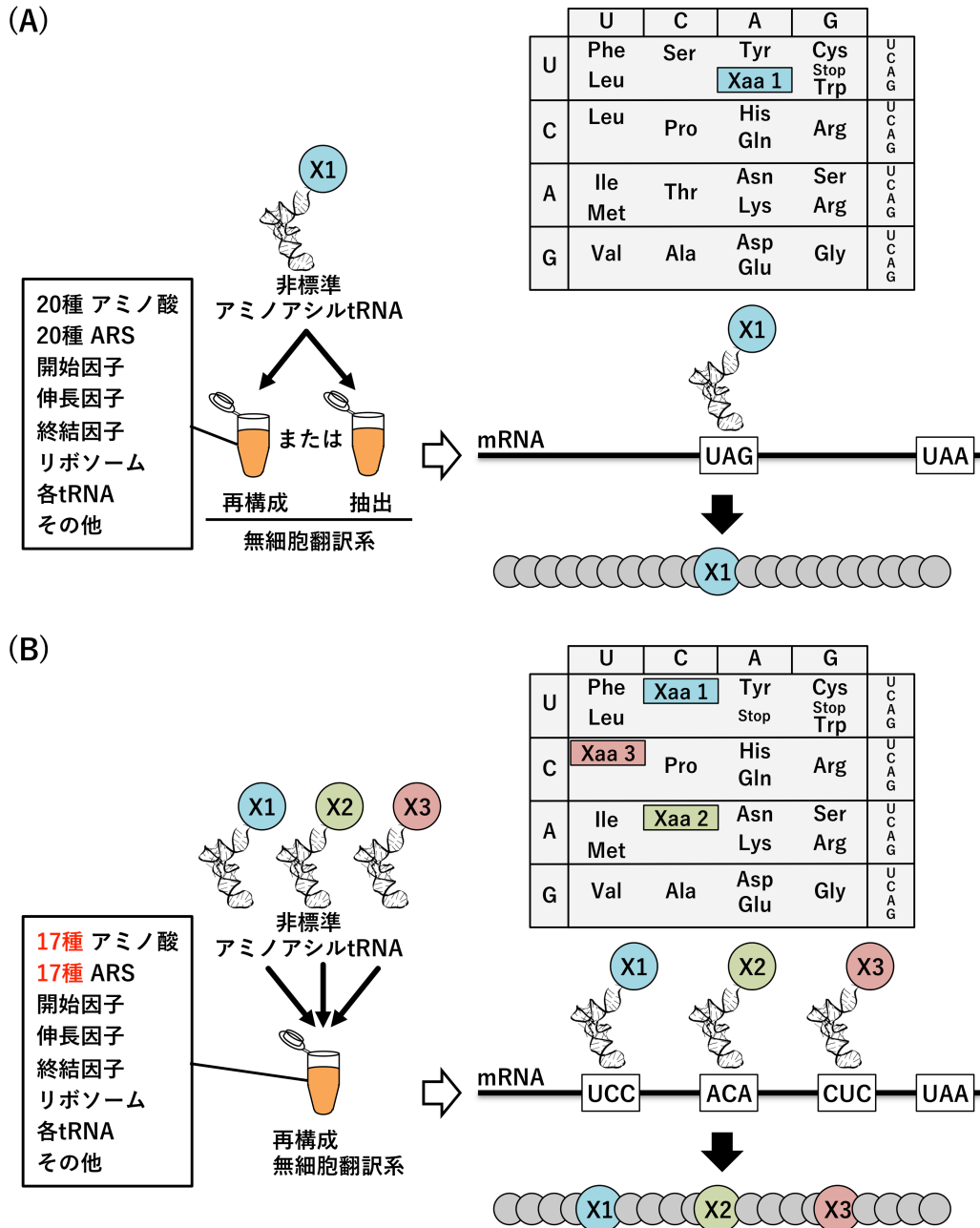


図5 非標準アミノ酸を遺伝暗号へ割り当てる方法。

(A) 遺伝暗号の拡張。非標準アミノ酸(X1)を用いて、終止コドン(図ではUAGコドン)に対応するtRNAにアミノアシル化する。これを、再構成無細胞翻訳系または抽出無細胞翻訳系に添加して翻訳を行うと、非標準アミノ酸がUAGコドンに対応してペプチドへ導入される。本来の遺伝暗号に、新たな1種類の非標準アミノ酸が加わるので、“遺伝暗号の拡張”と呼ばれる。(B) 遺伝暗号のリプログラミング。非標準アミノ酸(X1, X2, X3)を用いて、センスコドン(図ではUCC, ACA, CUCコドン)に対応するtRNAにアミノアシル化する。これを、Ser, His, Leuに対応するアミノアシルtRNA合成酵素を含まない再構成無細胞翻訳系に添加して翻訳を行うと、非標準アミノ酸がUCC, ACA, CUCコドンに対応してペプチドへ導入される。本来の遺伝暗号から、3種類の標準アミノ酸が3種類の非標準アミノ酸に置き換わるので、“遺伝暗号のリプログラミング”と呼ばれる。

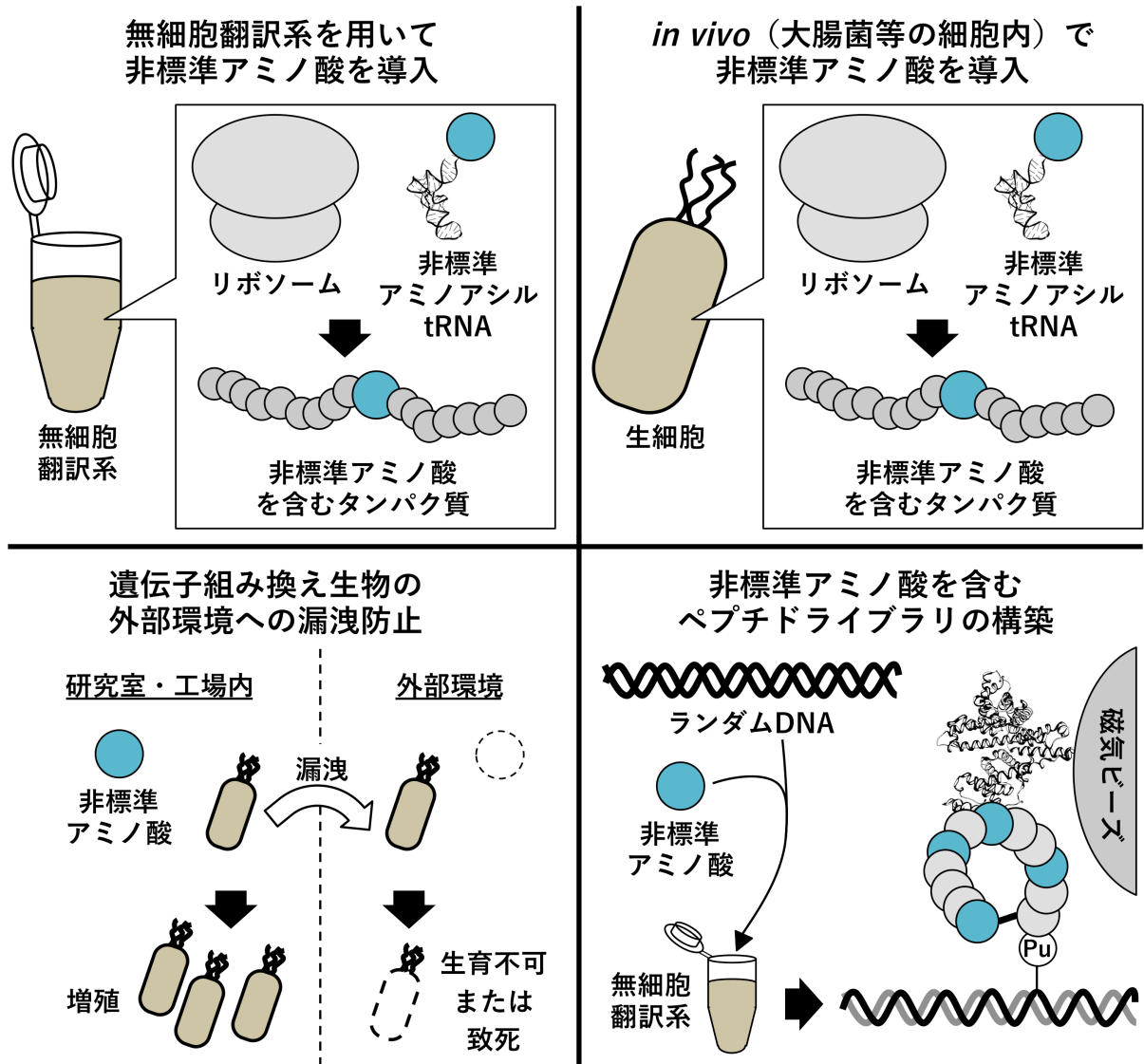


図6 非標準アミノ酸の再割り当てを利用した応用研究。

非標準アミノ酸の再割り当てを利用した応用研究を4つの方向性に分けて図に示した。1つ目：無細胞翻訳系を用いて非標準アミノ酸をタンパク質に導入する研究（左上）。2つ目：非標準アミノ酸を含むタンパク質合成を *in vivo* で行う研究（右上）。3つ目：非標準アミノ酸が生育に必須の遺伝子組換え生物を作製し、封じ込め環境からの漏洩を防ぐ研究（左下）。4つ目：非標準アミノ酸を含むペプチドライブラリから新規機能性ペプチドを取得する研究（右下）。

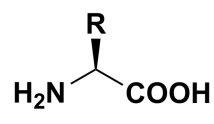
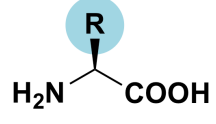
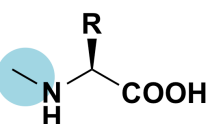
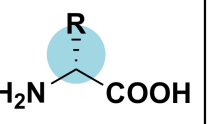
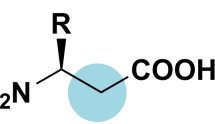
標準アミノ酸	非標準アミノ酸			
	側鎖が特殊なアミノ酸	主鎖が特殊なアミノ酸		
		N-メチルアミノ酸	D体アミノ酸	β -アミノ酸
				

図7 本論文で扱うアミノ酸。

タンパク質を構成する 20 種類の標準アミノ酸に対して、それ以外のアミノ酸は、全て非標準アミノ酸である。非標準アミノ酸は、その特殊な構造が、側鎖にあるものと、主鎖にあるものに大別できる。本研究で扱う非標準アミノ酸は特に後者の、主鎖に特殊な構造を持つ非標準アミノ酸である。

第 2 章

アミノ酸入れ替え遺伝暗号の構築

2.1. 導入

2.1.1. 危険な遺伝子の漏洩を防ぐ戦略

遺伝子組み換え生物(**Genetic modified organisms: GMO**)から、環境中へ危険な遺伝子が漏洩するのを防ぐことは、バイオテクノロジー研究における最も重要な課題の1つである¹¹²⁻¹¹⁶。これまでも、多くの研究グループが、従属栄養性¹¹⁷⁻¹¹⁹や自死スイッチ¹²⁰⁻¹²²を利用した生物学的封じ込めを用いて、「**GMO**から遺伝子の漏えいを防ぐための防壁」を開発したことを報告している。これらの手法では、**GMO**に、特定の非天然の分子が無いと生きられない仕組みを組み込むことで、**GMO**が環境中で生育するのを防ぐ。しかし、これらの既存の手法は、**GMO**の個体の漏えいを防ぐ目的のものであるため、**GMO**から危険な遺伝子が環境中に漏洩するのを防ぐ効果は持たない(図8A)。具体的に説明すると、環境中に漏洩した**GMO**が、個体としては死滅したとしても、その時点で、**GMO**の持つ遺伝子は環境に放出されてしまっており、遺伝子の水平伝播によって環境中の生物に取り込まれ、拡散する可能性がある¹²³⁻¹²⁵。既存の生物学的封じ込めのうち、遺伝子の漏洩に対しても効果を持つものとしては、近年開発された、拡張遺伝暗号を利用した方法が挙げられる^{83,84,126,127}。この方法では、生育に必須の遺伝子の配列中に**UAG**コドンを導入し、ここに非天然アミノ酸を割り当てることで、途中で**UAG**コドンを含む遺伝子から全長タンパク質を発現する。仮に、この遺伝子が環境中の生物に取り込まれても、短いタンパク質しか得られないため、遺伝子漏洩を防ぐ手段として成立している。しかし、この方法を用いても、漏洩を防げるのは**UAG**コドンを含む遺伝子に限定されており、現段階で、全ての遺伝子に対して漏えいを防止できる仕組みは確立されていない。

そこで本研究では、標準遺伝暗号と直交性を持つアミノ酸入れ替え遺伝暗号を構築することで、「**GMO**から全ての遺伝子の漏えいを防ぐための防壁」とする、新たな戦略を提案する(図8B)。アミノ酸入れ替え遺伝暗号では、標準遺伝暗号の一部のアミノ酸が相互に入れ替えられている。アミノ酸入れ替え遺伝暗号に基づいてコードした遺伝子では、一部のアミノ酸でコドンが入れ替えて配置されており、これが翻訳の際に再度入れ替えられることにより、結果的に機能性のタンパク質が発現する。万が一、アミノ酸入れ替え遺伝暗号に基づいてコードした遺伝子が環境中に漏洩しても、通常の生物の持つ翻訳系では、翻訳時のアミノ酸の入れ替えが起こらないため、たくさんのアミノ酸置換を含む不活性なタンパク質が合成されると考えられる。同様に、通常の遺伝子がアミノ酸入れ替え遺伝暗号により翻訳されても、やはり多くのアミノ酸置換が起こるため、不活性なタンパク質となる。以上の原理によって、アミノ酸入れ替え遺伝暗号は、標準遺伝暗号と直交性を持ち、全ての遺伝子に対して漏洩を防ぐ防壁として機能することになる。

2.1.2. アミノ酸入れ替え遺伝暗号の構築方法

アミノ酸入れ替え遺伝暗号と標準遺伝暗号の直交性について、実験的に証明するため、本研究では、無細胞翻訳系を用いて、次の2種類のアミノ酸入れ替え遺伝暗号の構築を行った：**Ser, Leu** が入れ替えられた **SL** 遺伝暗号と、**Ser, Leu, Ala** が相互に入れ替えられた **SLA** 遺伝暗号である (図 9)。将来、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を *in vivo* で構築することを視野に入れて、翻訳反応時にアミノ酸が入れ替えられる仕組みとして、前述の (1.2.参照)、**tRNA** のアンチコドンを入れ替える方法を用いた。一方、化学反応と酵素反応を併用したアミノアシル **tRNA** 合成や²⁵、**Flexizyme**³⁵ を使用した、遺伝暗号のリプログラミングなどの、*in vitro* 研究でのみ利用可能な方法については、使用しなかった。

大腸菌の **Ser, Leu, Ala** に対応するアミノアシル **tRNA** 合成酵素では、**tRNA** の認識領域にアンチコドンを含まないため自由にアンチコドンを変更できる⁸⁻¹¹。本研究では、**tRNA^{Ser, Leu, Ala}** のボディをそのままに、アンチコドンを相互に交換したキメラ **tRNA** を作製することで、翻訳反応時のアミノ酸入れ替えを行うこととした。これまでも、人為的にキメラ **tRNA** を作製すること、**Arg** コドンまたは **Ser** コドンを **Leu** によって上書きした生物を作製する、という構想が提案されている^{128,129}。また、前述の通り、自然界においても、同様の仕組みで遺伝暗号の改変が生じていることが知られている³⁻⁶。ただし、既存の提案および自然界で報告されているアミノ酸の再割り当ては、一方向的なものであり、アミノ酸が相互に入れ替えられたものではない。また、特定のアミノ酸を指定するコドンの全体が再割り当てされるのではなく、上記の例であれば、**Leu** コドン **CUH, UUR** や、**Arg** コドン **CGN** は、標準遺伝暗号の指定を保ったまま残されている。そのため、再割り当てされた **Arg** コドン **AGR** や **Leu** コドン **CUG** を持たない **mRNA** では、標準遺伝暗号でも、新規の遺伝暗号でも、同じアミノ酸配列を持ったタンパク質として翻訳される。これに対して、本研究の **SL** 遺伝暗号や **SLA** 遺伝暗号では、アミノ酸の再割り当ては両方向であり、相互に入れ替えられた形となるという特徴がある。また、**Ser, Leu, Ala** を指定するコドンの全ては相互に入れ替えられているため、これらのアミノ酸を含まない遺伝子を除き、ほぼ全てのタンパク質でアミノ酸の入れ替えが起こると考えられる。

さらに本研究では、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持つ生物を開発するための手法として、「2段階コドン置換法」を提案する。この方法では、まず標準遺伝暗号から「コドン集約遺伝暗号」へと変換を行い、さらにアミノ酸入れ替え遺伝暗号への変換を行うことで、1つのコドンに2種類のアミノ酸が割り振られているという、生物にとって致命的な状況を経ることなく、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持った生物を作製することが可能になると考えられる。

2.2. 材料と方法

2.2.1. RNaseP の調製

C5 protein の発現と精製：まず、大腸菌 JM109 の抽出ゲノムから、C5.F29 (5'-GCTTGCCATA TGGTTAAGCT CGCATTTC-3')と C5.R32 (5'-GCAACGCTCG AGGGACCCGC GAGCCAGGCGAC-3')のプライマーセットを使用し、PCR により C5 タンパク質遺伝子を増幅した。増幅した DNA を、NdeI と XhoI で制限酵素処理した後、同様に NdeI と XhoI で制限酵素処理した pET21a(+)ベクターに、クローニングした。得られたプラスミドを、大腸菌 BL21 (DE3) LysS 株に形質転換し、100 µg/mL ampicillin、20 µg/mL chloramphenicol、2% glucose を加えた LB プレートに塗布した。得られたコロニーを突いて、100 µg/mL ampicillin、20 µg/mL chloramphenicol、5% glucose を加えた LB 3 mL に植菌し、37°C で一晩培養した。得られた培養液を、100 µg/mL ampicillin、20 µg/mL chloramphenicol、5% glucose を加えた LB 300 mL に添加し、37°C で培養した。濁度 $A_{600} = 0.7$ になった時点で、終濃度 0.5 mM で IPTG を添加し、25°C で一晩培養することで、タンパク質の発現を誘導した。その後、菌体を遠心により集菌し、得られた沈殿を、溶菌 buffer (20 mM HEPES-K pH 7.8, 10 mM imidazole pH 7.8, 300 mM KOAc, 0.2 mM DTT, 1 mM PMSF)に再懸濁し、超音波により破碎した。硫酸沈殿を行い、得られたペレットを buffer A (20 mM HEPES-K pH 7.8, 300 mM KOAc, 0.2 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 1 M NH₄Cl, 0.25% Tween20)に再懸濁した。続いて、遠心分離とフィルタによる濾過を行なった液を次のクロマトグラフィ精製へ用いた。アフィニティクロマトグラフィ精製には、NGC chromatography system (Bio-Rad)に接続した、IMAC カラム (BioRad, CA, USA)を用いた。まず、buffer A でカラムを平衡化し、上述の濾液をカラムへ打ち込んだ。続いて、カラムを buffer A、buffer B (20 mM HEPES-K pH 7.8, 10 mM imidazole pH 7.8, 300 mM KOAc, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DTT)で洗浄し、最後に、buffer C (20 mM HEPES-K pH 7.8, 300 mM AcOK, 10 mM MgCl₂, 250 mM imidazole, 0.2 mM DTT)でタンパク質の溶出を行なった。溶出液に終濃度 20%で glycerol を添加し、-80°C で保存した。タンパク質濃度は、アミノ酸組成から計算したモル吸光係数を用いて、吸収 A_{280} によって決定した。

M1RNA の調製：まず、大腸菌 JM109 の抽出ゲノムから、T7M1-RNA.F37 (5'-TAATACGACT CACTATAGAA GCTGACCAGA CAGTCGC-3')と M1RNA.R22 (5'-AGGTGAAACT GACCGATAAG CC-3')のプライマーセットを使用し、PCR により M1RNA 遺伝子を増幅した。増幅した DNA を、NdeI と XhoI で制限酵素処理した後、同様に EcoRV で制限酵素処理した pCR4 ベクターに、クローニングした。得られたプラスミドから、pGEM-Tseq.F20 (5'-GGAAACAGCT ATGACCATGA-3')と M1RNA.R22 (5'-AGGTGAAACT GACCGATAAG CC-3')のプライマーセットを使用

し、2 ラウンドの PCR により M1RNA 遺伝子を増幅した。1st PCR の条件は以下の通り：1x PfSH buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM MgSO₄], 0.2 mM each dNTP, 0.5 μM each 両プライマー, 0.2 ng/μL pCR4-M1, 2 nM Pfu-S DNA polymerase¹³⁰。1st PCR サイクルは以下のように：[95°C 20 秒, 55°C 20 秒, 72°C 30 秒] x12 サイクル。2nd PCR (1600 μL)の条件は以下の通り：1x PfSH buffer, 0.2 mM each dNTP, 0.5 μM each 両プライマー, 1st PCR 産物 4 μL, 2 nM Pfu-S DNA polymerase。2nd PCR サイクルは以下のように：[95°C 20 秒, 55°C 20 秒, 72°C 30 秒] x12 サイクル。得られた DNA は、次の転写反応液に直接添加した。M1 RNA (8000 μL) の転写反応の条件は以下の通り：1x T7 buffer [40 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM spermidine, 0.01% Triton X-100], 10 mM DTT, 30 mM MgCl₂, 5 mM each NTP, 2nd PCR 産物 1600 μL, 0.3 μM T7RNA polymerase。この溶液を、37°C で5時間インキュベーションした後、転写産物を、phenol/chloroform 抽出と2回の isopropanol 沈殿により精製した。

RNase P の再構成：まず、1x T7 buffer, 10 mM DTT, 120 mM NH₄Cl, 20 μM M1-RNA を含む溶液(8 μL)を調製し、95°C で5分インキュベーションした後、25°C に冷却した。ここに、0.3 M MgCl₂ 0.32 μL, 130 μM C5 protein 1.2 μL を添加することで、RNase P を再構成した。この後、RNase P による自己切断を避けるため、得られた RNase P 溶液は、直ちに tRNA 転写反応液に添加した。

2.2.2. T7-tRNA セットの調製

各 T7-tRNA の調製：T7-tRNA の鋳型 DNA は、表 1 に示すオリゴヌクレオチド（塩基配列については表 2 を参照）の Extension 反応、続いて、表 1 に示すプライマーを使用した 2 ラウンドの PCR（塩基配列については表 2 を参照）によって調製した。Extension 反応(20 μL)の条件は以下の通り：1x PfSH buffer, 0.2 mM each dNTP, 1 μM each 両プライマー, 2 nM Pfu-S DNA polymerase。Extension 反応のサイクルは以下のように：95°C 1 分の後、[50°C 1 分, 72°C 1 分] x5 サイクル。1st PCR 反応(100 μL) の条件は以下の通り：1x PfSH buffer, 0.2 mM each dNTP, 2% DMSO, 1 μM each 両プライマー, Extension 産物 2.5 μL, 2 nM Pfu-S DNA polymerase。1st PCR サイクルは以下のように：[95°C 20 秒, 50°C 20 秒, 72°C 30 秒] x5 サイクル。2nd PCR 反応(200 μL) の条件は以下の通り：1x PfSH buffer, 0.2 mM each dNTP, 2% DMSO, 1 μM each 両プライマー, 1st PCR 産物 10 μL, 2 nM Pfu-S DNA polymerase。2nd PCR サイクルは以下のように：[95°C 20 秒, 50°C 20 秒, 72°C 30 秒] x12 サイクル。得られた DNA は、次の転写反応液に直接添加した。T7-tRNA (2000 μL)の転写反応の条件は以下の通り（ただし、tRNA^{Trp}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Pro}を除く）：1x T7 buffer, 10 mM DTT, 22.5 mM MgCl₂, 5 mM GMP, 3.75 mM each NTP, 2nd PCR 産物 200 μL, 0.12 μM T7RNA

polymerase。この溶液を、37°Cで一晩インキュベーションした後、0.005 U/ μ L DNaseI, 2 mM MnCl₂を添加し、37°Cで2時間インキュベーションした。得られた産物は、phenol/chloroform抽出と2回のisopropanol沈殿により精製した。精製したT7-tRNAは、超純水に溶解し、NanoDrop分光光度計ND-1000を使用して濃度を決定した。tRNA^{Trp}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Pro} (2000 μ L)の転写反応の条件は以下の通り：1x T7 buffer, 10 mM DTT, 22.5 mM MgCl₂, 5 mM GMP, 3.75 mM each NTP, 2nd PCR産物 200 μ L, 0.12 μ M T7RNA polymerase, RNase P (tRNA^{Gln}, tRNA^{Pro}の場合は0.4 μ M RNase P、tRNA^{Trp}の場合は0.8 μ M RNase Pとした)。反応温度、時間、DNaseI処理、tRNAの精製、濃度決定の手順は、上述の他のtRNAの場合と同様に行った。得られたtRNAの配列については、表1に示した。

tRNAセットの調製：21種のT7-tRNAを(tRNA^{Ala}_{GGC}, tRNA^{Arg}_{GCG}, tRNA^{Asn}_{GUU}, tRNA^{Asp}_{GUC}, tRNA^{Cys}_{GCA}, tRNA^{Glu}_{CUC}, tRNA^{Gly}_{GCC}, tRNA^{His}_{GUG}, tRNA^{Ile}_{GAU}, tRNA^{Leu}_{GAG}, tRNA^{Lys}_{CUU}, tRNAⁱⁿⁱ_{CAU}, tRNA^{Met}_{CAU}, tRNA^{Phe}_{GAA}, tRNA^{Ser}_{GGA}, tRNA^{Thr}_{GGU}, tRNA^{Tyr}_{GUA}, tRNA^{Val}_{GAC}, tRNA^{Gln}_{CUG}, tRNA^{Pro}_{GGG}, tRNA^{Trp}_{CCA})を組み合わせ、mini-Std T7-tRNAセットを調製した。SL T7-tRNAセットの調製では、mini-Std T7-tRNAセットのうち、tRNA^{Leu}_{GAG}, tRNA^{Ser}_{GGA}に代えて、tRNA^{Leu}_{GGA}, tRNA^{Ser}_{GAG}を使用した。SLA T7-tRNAセットの調製では、mini-Std T7-tRNAセットのうち、tRNA^{Leu}_{GAG}, tRNA^{Ser}_{GGA}, tRNA^{Ala}_{GGC}に代えて、tRNA^{Leu}_{GGA}, tRNA^{Ser}_{GGC}, tRNA^{Ala}_{GAG}を使用した。この時、各tRNAの濃度は25 μ Mとした。得られたtRNA溶液は、翻訳反応に使用する直前に、95°Cで5分インキュベーションした後、25°Cに冷却することでリフォールディングを行い、その後1時間以内に翻訳反応に使用した。

2.2.3. mRNAの調製

モデルペプチドをコードするmRNAの調製：モデルペプチドの鋳型DNAは、T7esD6MYYY.F55とY3xDDRD_nnnXaa.R44の2本のオリゴヌクレオチド（塩基配列については表2を参照）のExtension反応、続いて、T7ex5.F22とDRDu-aaAS.R20を使用したPCR（塩基配列については表2を参照）によって調製した。Extension反応(20 μ L)の条件については、T7-tRNAの調製時と同様である。PCR反応(200 μ L)の条件は以下の通り：1x PfSH buffer, 0.2 mM each dNTP, 2% DMSO, 1 μ M each 両プライマー, Extension産物 1 μ L, 2 nM Pfu-S DNA polymerase。PCRサイクルは以下のように：[95°C 20秒, 50°C 20秒, 72°C 30秒] x12サイクル。得られたDNAは、次の転写反応液に直接添加した。mRNA (1000 μ L)の転写反応の条件は以下の通り：1x T7 buffer, 10 mM DTT, 25 mM MgCl₂, 5 mM GMP, 5 mM each NTP, PCR産物 200 μ L, 0.12 μ M T7RNA polymerase。この溶液を、37°Cで一晩インキュベーションした後、phenol/chloroform抽出と2回のethanol沈殿により精製した。精製したmRNAは、

超純水に溶解し、NanoDrop 分光光度計 ND-1000 を使用して濃度を決定した。

モデルタンパク質(GFP, Streptavidin)をコードする mRNA の調製: GFP の鋳型 DNA は、T7Aex.F24 と GFPuv.R30 を使用した PCR (塩基配列については表 2 を参照) によって調製した。PCR 反応 (1000 μ L) の条件は以下の通り: 1x PfSH buffer, 0.2 mM each dNTP, 2% DMSO, 0.375 μ M each 両プライマー, 合成遺伝子 (Genscript (Piscataway, USA), Integrated DNA Technologies Inc (Coralville, USA) から購入。配列は、図 10B を参照; GFP_mini-Std, GFP_SL, GFP_SLA), 2 nM Pfu-S DNA polymerase。PCR サイクルは以下のよう: [95°C 20 秒, 50°C 20 秒, 72°C 1 分] x12 サイクル。得られた産物は、phenol/chloroform 抽出と 2 回の isopropanol 沈殿により精製し、10 mM Tris-AcOH pH7.8 (100 μ L) に溶解した。続く mRNA (1000 μ L) の転写反応の条件は以下の通り: 1x T7 buffer, 10 mM DTT, 30 mM MgCl₂, 5 mM each NTP, 精製 PCR 産物 100 μ L, 0.12 μ M T7RNA polymerase。この溶液を、37°C で一晩インキュベーションした。精製、濃度決定の手順は、上述の tRNA の場合と同様に行った。Streptavidin については、基本的に上記の手順と同様に行った。ただし、鋳型 DNA の増幅には、GFPuv.R30 に代えて、遺伝子に対応したプライマー (StvWT.R20, StvSL.R20, StvSLA.R20) を用いた。また、遺伝子の配列については、図 10A に示した。

2.2.4. 再構成無細胞翻訳系を用いた解析

翻訳反応: 調製にあたり、creatine kinase, creatine phosphate, 大腸菌抽出 tRNA については、Roche Diagnostics (Tokyo, Japan) から購入した。翻訳系の組成については、再構成無細胞翻訳系を利用した過去の文献で用いられたものとほぼ同じである^{40,49,62,63,131-133}。ただし、例外的に変更した点として、アミノアシル tRNA 合成酵素と伸長因子 EF-Tu の濃度については、T7-tRNA へのアミノ酸のアシル化と、リボソームへの輸送の効率化を目的として、従来よりも上昇させた。具体的な、各因子の濃度については以下の通り: 50 mM Hepes-K (pH 7.6), 100 mM potassium acetate, 17.6 mM magnesium acetate, 2 mM spermidine, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 2 mM GTP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 20 mM creatine phosphate, 1.5 μ M AlaRS, 0.06 μ M ArgRS, 0.76 μ M AsnRS, 0.26 μ M AspRS, 0.04 μ M CysRS, 0.12 μ M GlnRS, 2.8 μ M GluRS, 0.18 μ M GlyRS, 0.04 μ M HisRS, 2.8 μ M IleRS, 0.08 μ M LeuRS, 0.22 μ M LysRS, 0.06 μ M MetRS, 1.4 μ M PheRS, 0.32 μ M ProRS, 0.08 μ M SerRS, 0.18 μ M ThrRS, 0.06 μ M TrpRS, 0.04 μ M TyrRS, 0.04 μ M ValRS, 0.6 μ M methionyl-tRNA formyltransferase, 0.5 μ M ribosome recycling factor, 4 μ g/mL creatine kinase, 0.1 μ M adenosine kinase, 0.1 μ M inorganic pyrophosphatase, 0.1 μ M nucleoside-diphosphate kinase, 2.7 μ M initiation factor 1, 0.4 μ M initiation factor 2, 1.5 μ M initiation factor 3, 0.25 μ M release

factor 2, 0.17 μ M release factor 3, 0.26 μ M elongation factor G, 70 μ M elongation factor Tu/elongation factor Ts, 0.1 μ M peptidyl-tRNA hydrolase, 1.2 μ M ribosome, 0.5 mM each amino acid (ただし Asp を除く), 50 μ M [14 C]Asp (モデルペプチドのオートラジオグラフィによる検出およびモデルタンパク質の翻訳に使用) または cold Asp (モデルペプチドの質量分析に使用), 10 μ M each T7-tRNA または 1.5 mg/mL 大腸菌抽出 tRNA, 2 μ M mRNA。翻訳反応は、37°C で 3 時間インキュベートすることで行った。

翻訳産物の解析：モデルペプチドの解析にあたっては、[14 C]Asp を添加して翻訳を行い、tricine SDS-PAGE の後、オートラジオグラフィ(Pharos FX imager, BioRad)による検出を行なった。また、[14 C]Asp の代わりに cold Asp を使用して翻訳を行い、MALDI-TOF-MS (AXIMA confidence, Shimadzu) により解析した。モデルタンパク質の解析にあたっては、[14 C]Asp を添加して翻訳を行い、glycine SDS-PAGE の後、オートラジオグラフィによる検出を行なった。さらに、native PAGE の後、オートラジオグラフィと、蛍光検出 ($\lambda_{\text{ex}} = 473$ nm、LPB フィルタ; Typhoon FLA 9000、GE Healthcare) による解析も行なった。なお、Streptavidin の解析では、Atto 488-biotin (Sigma-Aldrich) を、翻訳産物に添加することで、活性な Streptavidin 分子のみを蛍光標識した。続いて、過剰な Atto488-biotin を、M280 streptavidin 磁気ビーズ (Thermo Fisher) により除去した後、native PAGE へ進んだ。

2.3. 結果・考察

2.3.1. アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持った無細胞翻訳系の構築

アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持った翻訳系の構築のため、T7RNA polymerase によって転写した tRNA (T7-tRNA) を利用して再構成した、無細胞翻訳系を調製した (表 1)^{62,63,131}。全てのアミノ酸を利用可能な翻訳系の構築のためには、21 種類の T7-tRNA から成る tRNA セットが必要になる。本研究では、次のような 3 種類の tRNA セットを用意した (図 9) : 20 種の各標準アミノ酸と fMet に対応する 21 種類の T7-tRNA から成る「mini-Std tRNA セット」、mini-Std tRNA セットのうち tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu} を 2 つのキメラ tRNA^{Ser}_{GAG}, tRNA^{Leu}_{GGA} に置き換えた「SL tRNA セット」、mini-Std tRNA セットのうち tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Ala} を 3 つのキメラ tRNA^{Ser}_{GGC}, tRNA^{Leu}_{GGA}, tRNA^{Ala}_{GAG} に置き換えた「SLA tRNA セット」。キメラ tRNA の設計にあたっては、アンチコドンループ全体を交換した。これは、アンチコドンループのうちアンチコドン以外の部分の塩基が、翻訳の正確性に寄与するという報告があるためである^{14,15}。さらに、アミノアシル化効率を上げるために、一部の配列の改変を行なっている (表 1)。また、T7-tRNA のみでの翻訳反応の効率を高めるため、再構成無細胞翻訳系の一部の翻訳因子については、濃度を最適化し (図 11)、従来の翻訳系よりも高い濃度で添加することとした。具体的には、活性の特に低い一部の T7-tRNA に対応するため¹³⁴⁻¹³⁶、アミノアシル tRNA 合成酵素の濃度を上げることでアミノアシル化を促進し、また、伸長因子 EF-Tu/Ts の濃度を上げることで、アミノアシル tRNA のリボソームへの輸送を促進した。

2.3.2. T7-tRNA から成る無細胞翻訳系でのモデルペプチド合成

T7-tRNA から成る無細胞翻訳系において、遺伝暗号に従った翻訳反応が正しく進行するかを調べるため、次の配列の mRNA からモデルペプチドの翻訳合成を試みた : MYYY-X-DDRD; X には 20 種類の標準アミノ酸に対応する各コドンが配置されている (図 12A)。このモデルペプチドの配列では、X よりも下流に 3 残基の Asp が配置されており、^{[14C]Asp} を用いて翻訳反応を行うことによって、tricine SDS-PAGE とオートラジオグラフィにより全長ペプチドのみを検出することができる。まずは、大腸菌抽出 tRNA (Natural tRNA) または mini-Std tRNA セットを加えた無細胞翻訳系を調製し、モデルペプチド合成を行なった結果、得られたペプチドのバンド位置は両方の翻訳系で一致した (図 12B, C)。さらに、翻訳産物の MALDI-TOF-MS による解析も行い、全てのモデルペプチドで、設計通りのアミノ酸が X の位置に導入されていることが分かった (図 12B, C, F, G, 表 3)。ただし、MS スペクトルから、mini-Std tRNA セットを用いて翻訳したペプチドでは、一部で N 末端の fMet が欠落しており、tricine

SDS-PAGE で見られた僅かに泳動度の大きいサブバンドがこれに当たると考えられる (図 12C)。このような副産物が生じた原因として、mini-Std tRNA セットに含まれる tRNAⁱⁿⁱ または tRNA^{Tyr} が塩基修飾を受けていないため、fMet と Tyr の間のペプチド結合形成に問題が生じ、低頻度ながらペプチド形成せずにトランスロケーション反応が進行してしまった可能性が考えられる。

続いて、SL tRNA セットと SLA tRNA セットを加えた無細胞翻訳系を調製し、モデルペプチド合成を行なった。その結果、アミノ酸が入れ替わったペプチドが設計通り合成され、入れ替え前のペプチドは全く検出されなかった (図 12D, E, 表 3)。以上の結果から、T7-tRNA を用いた翻訳系において、標準遺伝暗号とアミノ酸入れ替え遺伝暗号のどちらの場合でも、遺伝暗号に従った正確な翻訳反応が進行していることが明らかになった。

2.3.3. アミノ酸入れ替え遺伝暗号の標準遺伝暗号に対する直交性

アミノ酸入れ替え遺伝暗号の標準遺伝暗号に対する直交性について実験的に示すために、本研究では、モデルタンパク質として、Streptavidin と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて、翻訳を行なった。両モデルタンパク質の遺伝子の乗った mRNA として、mini-Std 遺伝暗号 (標準遺伝暗号と mini-Std 遺伝暗号の両方に対応)、SL 遺伝暗号、SLA 遺伝暗号に基づいてコードした 3 種類を用意した (図 10A, B)。翻訳系としては、Natural tRNA、mini-Std tRNA セット、SL tRNA セット、SLA tRNA セットのそれぞれを加えた、4 種類の再構成無細胞翻訳系を調製した。3 種類の mRNA と 4 種類の翻訳系で、合計 12 通りの組み合わせでモデルタンパク質の合成を行い、得られた翻訳産物の解析を行った。

まず、glycine SDS-PAGE の後に、オートラジオグラフィによる検出を行った結果、mRNA と翻訳系の遺伝暗号が一致する組み合わせの場合に、一定の泳動度の翻訳産物のバンドが得られた (図 13 レーン 1, 4, 8, 12; Streptavidin については A、GFP については B)。一方、mRNA と翻訳系の遺伝暗号が異なる組み合わせの場合は、上記の一致した場合とは異なるそれぞれの位置にバンドが得られた。Streptavidin には 14 個の Ser 残基、8 個の Leu 残基、25 個の Ala 残基が、GFP には 12 個の Ser 残基、19 個の Leu 残基、9 個の Ala 残基が含まれているため、これら残基の相互の置換により、翻訳産物のバンドの泳動度が変化したと考えられる。なお、アミノ酸置換によって、分子量が増えた場合に移動度が増加しており (分子量が減少した場合には移動度が減少しており)、一見すると、分子量の増加に従い泳動度の小さくなる glycine SDS-PAGE の原理と一致していない。しかし、Leu の疎水性側鎖は SDS と相互作用しやすいことが知られており¹³⁷、SDS の負電荷が蓄積することで、泳動度が増加したものと考えられる (図 10C)。

Ser, Leu, Ala は、使用頻度が高いアミノ酸であり（大腸菌 MDS42 株の全ゲノムにおいては、**Ser** : 5.7% (20 アミノ酸中 7 番目に多い)、**Leu** : 10.8% (同 1 番目)、**Ala** : 9.6% (同 2 番目))、構造の特徴の異なるアミノ酸であるため、これらのアミノ酸が置換されることでタンパク質は機能を失うと考えられる。これを検証するため、続いては、翻訳産物を **native PAGE** した後、蛍光撮影装置により分析することで、モデルタンパク質の活性測定を行った。**GFP** の場合は、蛍光撮影により、フルオロフォアの形成活性を直接的に評価できるため、翻訳産物をそのまま解析に用いた。一方、**Streptavidin** の場合は、翻訳産物に蛍光標識 **biotin** を添加し、未反応の蛍光標識 **biotin** を除いた後、解析に用いた。

その結果、**mRNA** と翻訳系の遺伝暗号が一致する組み合わせの場合には、活性のあるタンパク質が合成されたことが分かった (図 13 レーン 13, 16, 20, 24; **Streptavidin** については A、**GFP** については B)。一方、**mRNA** と翻訳系の遺伝暗号が異なる組み合わせの場合には、活性が得られなかったことから、本研究で用意した標準遺伝暗号、**SL** 遺伝暗号、**SLA** 遺伝暗号は、相互に直交性を持っていることが明らかになった。特に、2 種類のアミノ酸入れ替え遺伝暗号と標準遺伝暗号の間に直交性が成立していることは (図 13 レーン 14, 15; **Streptavidin** については A、**GFP** については B)、非常に重要であり、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を用いることで、遺伝子の漏洩を防ぐ新しい戦略が確立できることを意味している。本研究では、**Streptavidin** と **GFP** を用いて実験を行っているが、この結果は、これら 2 種類のモデルタンパク質に限らず、大部分のタンパク質に広く適用できると考えられる。その根拠として、ここでは、大腸菌 MDS42 株の全タンパク質 3547 種類を例に取り、各タンパク質の配列における **Ser, Leu, Ala** の占める割合を計算することで、これらのアミノ酸の置換が、各タンパク質に与える影響について予測を試みた。まず、**SL** 遺伝暗号の使用を考えて、**Streptavidin** の配列における **Ser, Leu** の占める割合を計算すると、13.2%であり、この値は、全タンパク質 3547 種類中 2885 番目の高さである。また、**GFP** においては 12.4%と、3547 種類中 3110 番目であり、どちらも **Ser, Leu** の割合が比較的低いタンパク質であると言える (図 14A)。アミノ酸の置換がタンパク質の機能にどの程度影響を与えるか、については不明な部分が多いものの、これら 2 種類のモデルタンパク質よりも、**Ser, Leu** の割合が高い多くのタンパク質では、これらのアミノ酸置換により機能が失われる可能性が高いと考えられる。全タンパク質 3547 種類の中央値を計算すると、**Ser, Leu** の占める割合は 16.2%であるが、ここに **Ala** も加えることで、タンパク質に占める割合の中央値は 25.9%まで上昇する (図 14B)。よって、**SLA** 遺伝暗号を使用することで、アミノ酸置換により機能を消失するタンパク質の種類数は、さらに増加すると考えられる。

2.3.4. アミノ酸入れ替え遺伝暗号による翻訳が、タンパク質の立体構造形成と活性に与える影響

続いて、上述の蛍光検出を行った **native PAGE** のゲルを用いて、オートラジオグラフィにより、活性を持つ立体構造を形成したタンパク質の定量を行った（図 13 レーン 25, 28, 32, 36; **Streptavidin** については A、**GFP** については B）。その結果、蛍光検出のバンドの位置に重なって、オートラジオグラフィでもバンドが得られたことから、これが、活性を持つ立体構造を形成したタンパク質のバンドと判断した。一方、ウェルや、ゲル上部にも産物が検出されており、これは、立体構造形成が正しく進行していないために、凝集したタンパク質であると考えられる。**mRNA** と翻訳系の遺伝暗号が一致する組み合わせの場合にのみ、活性を持つ立体構造を形成したタンパク質のバンドは検出された。一方、一致しない組み合わせの場合にはバンドが見られなかったことから、**Ser, Leu, Ala** の置換が発生した翻訳産物では、活性を持つ立体構造を形成できなかったものと考えられる。本研究で構築した **T7-tRNA** のみから成る翻訳系と、アミノ酸入れ替え遺伝暗号の使用が、タンパク質の立体構造形成にどのような影響を与えるかを調べるため、**mRNA** と翻訳系の遺伝暗号が一致する 4 つの組み合わせにおいて、合成された翻訳産物の総量に対する、活性を持つ立体構造を形成したタンパク質の割合を計算した（図 15A）。まず、**Natural tRNA** と **mini-Std tRNA** を比較すると、合成された翻訳産物の総量は、**Streptavidin** では 1/2 程度、**GFP** では 1/4 程度まで減少したものの、そこに占める活性を持つ立体構造を形成したタンパク質の割合は両 **tRNA** を用いた系で同程度だった。このことから、**tRNA** の塩基修飾は、**Streptavidin** と **GFP** の立体構造形成の進行率に、影響を与えないことが分かった。さらに、**mini-Std, SL, SLA tRNA** セットについて比較した結果、合成された翻訳産物の総量は系毎に異なったものの、活性を持つ立体構造を形成したタンパク質の割合は全ての翻訳系で同程度だった。このことは、翻訳に使用される遺伝暗号の種類が、モデルタンパク質の立体構造形成に影響を与えなかったことを示す。系毎に翻訳合成量が異なっていたのは、翻訳系の持つ遺伝暗号の違いによるものではなく、各 **mRNA** においてコドンの置換によって配列が異なり、**mRNA** の構造安定性が変化したために翻訳の効率に差が生じた可能性が考えられる。ただし、本研究で用いた 2 種類のモデルタンパク質での結果は、必ずしも全てのタンパク質の立体構造形成に適用できるとは言えない。よって、将来的に、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を生物の全ゲノムに適用するに当たっては、同義コドンへの置換が、翻訳反応と共役したタンパク質の立体構造形成の効率を低下させ、タンパク質が活性を持つ立体構造を形成できなくなる可能性を考慮し^{138,139}、立体構造形成を促進するような適切なコドンの選択が求められる場合があると考えられる。

続いて、本研究で構築した 4 種類の遺伝暗号が、タンパク質の活性にどのような影

響を与えるかを調べるため、活性を持つ立体構造を形成したタンパク質の合成量に対する、蛍光分析で得られた相対強度の比率を計算した (図 15B)。その結果、4 種類の遺伝暗号を持つ翻訳系の全てで、同程度の値となることが分かった。このことから、mini-Std, SL, SLA tRNA セットを用いて再構成した翻訳系により合成した Streptavidin と GFP でも、合成量当たりの活性が低下することはなく、Natural tRNA を用いて合成したものと同等の活性を持つことが明らかになった。

2.3.5. アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持つ生物を開発するための「2 段階コドン置換法」の提案

本研究では、キメラ tRNA を添加した再構成無細胞翻訳系を使用することで、2 種類のアミノ酸遺伝暗号を構築し、標準遺伝暗号との直交性を実験的に示した。アミノ酸入れ替え遺伝暗号を生物に適用することができれば、その生物の持つ遺伝子のほとんどに対して、環境中の生物へ漏洩するのを防ぐことができる。ここでは、アミノ酸入れ替え遺伝暗号として、最も単純な SL 遺伝暗号を持つ大腸菌を作製する方法について考える。遺伝暗号の改変には、ゲノム全体に渡るコドンの置換が必要になるため、大規模なゲノム改変技術が必要になる。現在までに、大腸菌のゲノムを大規模に改変する方法としては、ゲノム全体をいくつかのブロックに分け、内在のゲノム DNA と、外部にて構築した合成ゲノム DNA を逐次置換していく方法が開発されている¹⁴⁰⁻¹⁴²。しかし、この方法では、ブロックを一部置換した段階で、ゲノム中の Ser, Leu コドンが、Ser と Leu の両方の意味で使われている状況が発生してしまうため、適切にタンパク質合成ができず、大腸菌は死に至ると考えられる。大腸菌よりもゲノムサイズの小さい *Mycoplasma mycoides* では、化学合成 DNA を用いて構築したゲノム全体を、生細胞の内在ゲノム DNA と置き換える技術が確立されているが^{143,144}、同様の技術が大腸菌で実施した成功例は報告されていない。さらに、仮に大腸菌でゲノム DNA 全体の置換が可能であったとしても、置換された直後の状態では、ゲノム DNA は SL 遺伝暗号に基づいてコードされているが、翻訳系は標準遺伝暗号に従っている状況となるため、やはり大腸菌は死に至ると考えられる。

そこで、本研究で提案するのが、標準遺伝暗号に基づいてコードされた大腸菌ゲノムを、SL コドン集約遺伝暗号を経て、SL 遺伝暗号へと変換する「2 段階コドン置換法」である (図 16)。SL コドン集約遺伝暗号に基づいてコードされたゲノムでは、全ての Leu (CTN) コドン (大腸菌 MDS42 株では 3547 の CDS 中に 92515 コドンが含まれる)、Ser (TCN) コドン (同 37515 コドンが含まれる) が、それぞれ Leu (TTR) コドン、Ser (AGY) コドンに置換されている。標準遺伝暗号から SL コドン集約遺伝暗号への変換は、全て同義コドンへの置換であるため、既存技術である合成ゲノム DNA への逐次置換法を用いても、コドンが Ser と Leu の両方に指定されてしまう致

死的な状況は発生しない。続いて、 $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{BGA}}$ と $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{BAG}}$ のアンチコドンループを交換することで、キメラ tRNA とする変異導入を行う。この際、これら 2 種類の tRNA は、SL コドン集約遺伝暗号において全く使用されていない Leu (CTN) コドン、Ser (TCN) コドンに対応するものであるから、この変異導入は、大腸菌の生育に影響しないと考えられる。その後、先ほど集約した Leu (TTR) コドン、Ser (AGY) コドンを、全て Leu (TCN) コドン、Ser (CTN) コドンへと置換する。この時点では、キメラ tRNA の導入によって、CTN コドンは Ser に、TCN コドンは Leu に指定されているため、この大規模なゲノム改変も全て同義コドンへの置換となる。よって、合成ゲノム DNA への逐次置換法を用いることで、大腸菌を致命的な状況にすることなく、改変を行うことが可能であると考えられる。最後に、 $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{GCU}}$ 、 $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{YAA}}$ を欠失させることで、SL 遺伝暗号に基づいてコードされた大腸菌ゲノムへの変換が完了する。この際、空コドンとなった TTR コドンと SGY コドンは、非標準アミノ酸を割り当てるなど、さらなる応用に利用することも可能である。

近年、細菌ゲノムの大規模な改変を行って、空コドンを生成し、ここに非標準アミノ酸を割り当てる研究が大きく進展している^{2,83,84,145-148}。特に、2019 年、Chin らのグループは、大腸菌ゲノム中の全ての Ser (TCR) コドンを、同義コドンである Ser (AGY) コドンに置換することで、61 コドンの遺伝暗号を持つ大腸菌の作製に成功したことを報告した。これは、本研究で提案した「2 段階コドン置換法」の第一段階である SL コドン集約遺伝暗号への変換に類似するものであり、「2 段階コドン置換法」を用いることで、SL 遺伝暗号に基づいてコードされたゲノムを持つ大腸菌株の作製を実現できる可能性を示している。アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持つ生物は、科学と工学のどちらの観点でも非常に興味深いものであり、SL 遺伝暗号を持つ大腸菌株の作製は、今後の重要な研究テーマになると考えられる。

2.4. 結論

アミノ酸入れ替え遺伝暗号としては、**Ser** と **Leu** が入れ替えられた **SL** 遺伝暗号、**Ser, Leu, Ala** が入れ替えられた **SLA** 遺伝暗号を設計した。アミノ酸の入れ替えに当たっては、**tRNA** ボディとアンチコドンを相互に交換したキメラ **tRNA** のペア (**SL tRNA** セット、**SLA tRNA** セット) を作製することで、アミノ酸が交換されるように再割り当てした。本研究では、再構成無細胞翻訳系を用いて、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持った翻訳系を用意し解析を行った。まず、モデルペプチドの翻訳を行なった結果、質量分析により、設計通りアミノ酸が入れ替えられたペプチドが得られたことが分かった。そこで、続いては、アミノ酸入れ替え遺伝暗号に基づいて配列設計したモデルタンパク質の **mRNA** を用意し、翻訳を試みた。その結果、**mRNA** と翻訳系の設計に使用した遺伝暗号が一致している場合のみ、活性のある翻訳産物が得られることが分かった。この遺伝子は、通常の翻訳系では活性のある産物に翻訳されず、また、通常の遺伝子がアミノ酸入れ替え翻訳系で活性のある産物に翻訳されることも無かった。この結果は、アミノ酸入れ替え遺伝暗号と、標準遺伝暗号の間に、直交性が確立できていることを示している。よって、この遺伝暗号を用いることで、外部環境への漏洩リスクの無い遺伝子の設計が可能になると考えられる。本論文では、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持った大腸菌を作製するための戦略として、「2 段階コドン置換法」の提案も行なった。この方法であれば、既存の大規模ゲノム改変技術を用いても、特定のコードンに 2 種類のアミノ酸が割り当てられるような致命的な状況を回避することができる。アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持った生物の作製は、生物学の基礎研究として、また、バイオハザードの危険の無い組み替え生物の開発という工学的な側面の両方から、今後の重要なテーマになると考えられる。なお、この結果は、以下のタイトルで発表済みである。: **An Amino Acid-Swapped Genetic Code.**¹⁴⁹

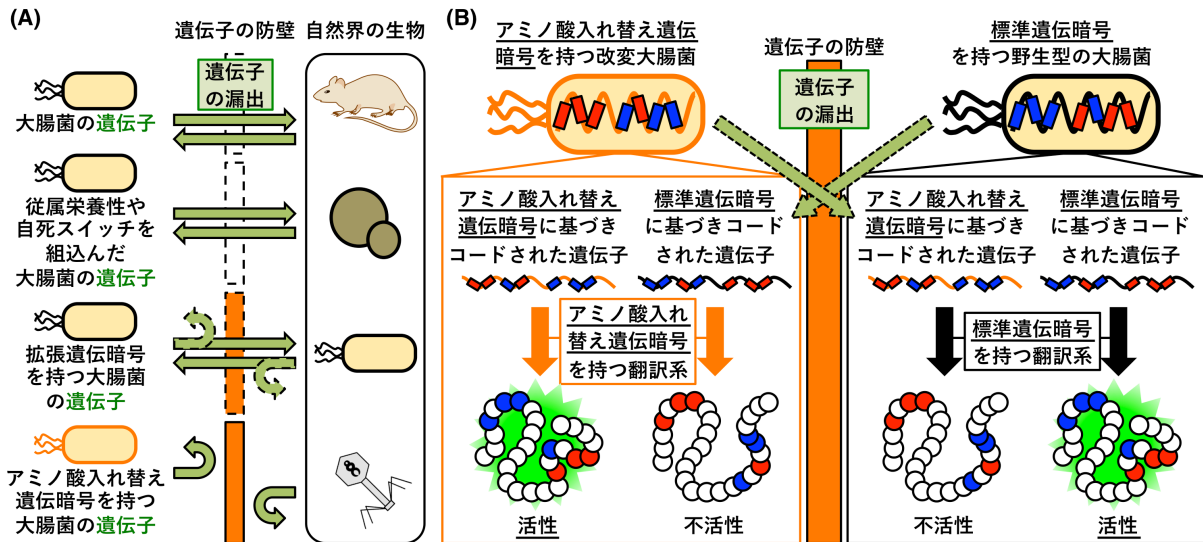


図 8 先行研究および本研究の手法の遺伝子漏洩防止効果の比較と、アミノ酸入れ替え遺伝暗号の概念図。

(A) 既存の方法と、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を用いた大腸菌を考えた場合の、遺伝子漏洩を防止する効果の比較。栄養要求性または自死スイッチを用いる方法、拡張遺伝暗号を用いる方法、アミノ酸入れ替え遺伝暗号を用いる方法で遺伝子の漏洩を防止する効果が異なる。(B) アミノ酸入れ替え遺伝暗号の概念図。アミノ酸入れ替え遺伝暗号を持つ改変大腸菌では、ゲノムにコードされた遺伝子の一部のコドンが入れ替えられた、アミノ酸入れ替え遺伝子を持つ。このアミノ酸入れ替え大腸菌の翻訳系では、コドンとアミノ酸の対応が再度入れ替えられるため、アミノ酸入れ替え遺伝子から機能性タンパク質を発現できる。一方、遺伝子の漏洩が発生した場合、通常の生物においては、アミノ酸入れ替え遺伝子は不活性なタンパク質に翻訳される。これは、標準遺伝暗号を持つ大腸菌では、翻訳時に再度の入れ替えが起らないため、翻訳産物に、多数のアミノ酸変異が発生してしまうためである。同様に、標準遺伝暗号に基づきコードされた遺伝子が漏洩した場合、アミノ酸入れ替え大腸菌では、アミノ酸入れ替え翻訳をしてしまうため、やはり不活性なタンパク質に翻訳される。

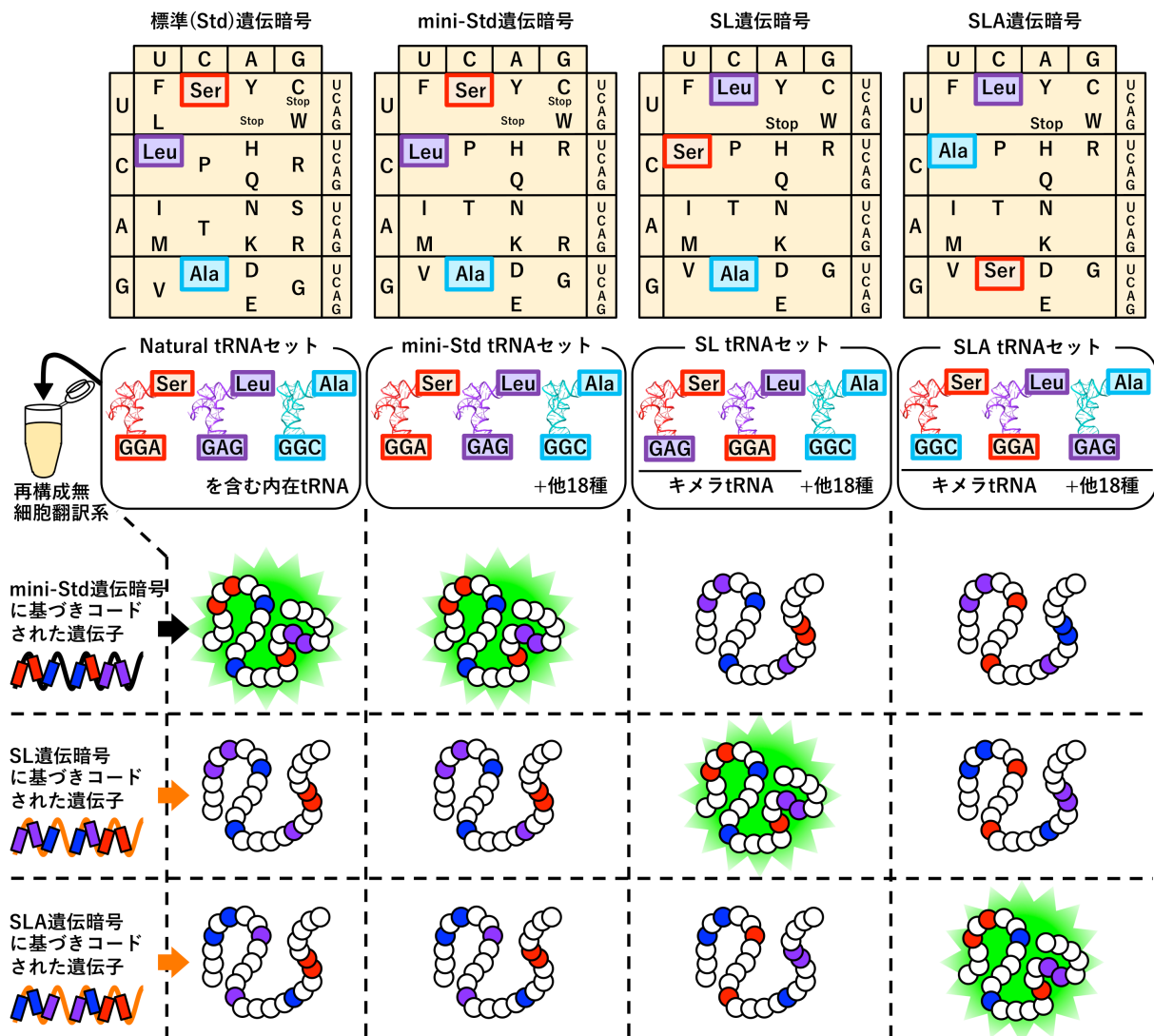


図9 標準(Std)、mini-Std、SL、SLA 遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系を用いて、mini-Std、SL、SLA 遺伝暗号に基づきコードされた遺伝子を翻訳する場合の概念図。

mini-Std 遺伝暗号は、標準(Std)遺伝暗号と基本的に同じであるが、各アミノ酸につき、一部のコドンしか使用していない。SL 遺伝暗号と SLA 遺伝暗号では、それぞれ Ser コドン/Leu コドン、または、Ser コドン/Leu コドン/Ala コドンが、相互に入れ替わっている。図に示す 4 種類の tRNA セットを用意し、これを翻訳反応液に加えることで、各遺伝暗号を持つ 4 種類の無細胞翻訳系を構築する：大腸菌から抽出した内在 tRNA (Natural tRNA セット) を加えた Std 遺伝暗号、T7RNA ポリメラーゼによって転写した 21 種の tRNA (mini-Std tRNA セット) を加えた mini-Std 遺伝暗号、mini-Std tRNA セットのうち、 $tRNA^{Ser}_{GGA}$ と $tRNA^{Leu}_{GAG}$ の 2 種類を、 $tRNA^{Ser}_{GAG}$ と $tRNA^{Leu}_{GGA}$ との 2 種類のキメラ tRNA で置き換えた、SL tRNA セットを用いて構築した SL 遺伝暗号、mini-Std tRNA セットのうち、 $tRNA^{Ser}_{GGA}$ と $tRNA^{Leu}_{GAG}$ と $tRNA^{Ala}_{GGC}$ の 3 種類を、 $tRNA^{Ser}_{GGC}$ と $tRNA^{Leu}_{GGA}$ と $tRNA^{Ala}_{GAG}$ の 3 種類のキメラ tRNA で置き換えた、SLA tRNA セットを用いて構築した SLA 遺伝暗号。さらに、mini-Std、SL、SLA 遺伝暗号の 3 種に基づきコードされたモデルタンパク質の遺伝子を設計し、4 種類の無細胞翻訳系を用い

てモデルタンパク質の合成を行う。得られるタンパク質が機能を持つのは、遺伝子と tRNA セットの遺伝暗号が一致する組み合わせの場合のみであると考えられる。

A Streptavidin

mini-Std	CTAGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGATCCCTC	60
SL	CTAGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGATCCCCT	60
SLA	CTAGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGATCCTGC	60
mini-Std	TAAGGACTCCAAGGCTCAGGTTTCCGCTGCCGAGGCTGGCATTACCGGCACCTGGTATAA	120
SL	TAAGGACTCAAGGCCAGGTTCTTGCCGCTGAGGCTGGTATTACTGGCACCTGGTACAA	120
SLA	CAAGGATGCTAAGCTTCAGGTTGCCCTTCTTGAGCTCGGCATTACTGGCACCTGGTACAA	120
mini-Std	CCAGCTTGGCTCCACCTTTATGTACCCGCTGGCGCTGATGGTGCTCTTACTGGCACCTA	180
SL	CCAGTCTGGCCTCACTTTTCATCGTCACTGCTGGTGCCGATGGCGCTTCTACCGGTACCTA	180
SLA	CCAGTCTGGTGCCACCTTCATCGTCACTCTTGGTGCTTGATGGCTCTCTACCGGCACCTA	180
mini-Std	TGAGCTGCCGTTGGCAATGCTGAGTCCCGTTATGTTCTCACTGGTCGCTATGACTCCGC	240
SL	TGAGCTTGCCGTTGGCAATGCTGAGCTCCGCTATGTCGCCACCGGTCGTTATGACTCCGC	240
SLA	TGAGGCCCTTGTTGGCAATCTGAGGCTCGCTATGTCGCCACTGGTCGTTATGACTCCGC	240
mini-Std	TCCTGCTACTGACGGTCTGGTACTGCTCTTGGTTGGACCGTTGCCTGGAAGAACAATTA	300
SL	TCCTGCTACTGACGGTCTGGCACTGCTCTGGCTGGACTGTCGCTTGAAGAACAATA	300
SLA	TCCCCTCACTGATGGTCTGGTACCCTTTCGGCTGGACTGTCCTCTGAAGAACAATA	300
mini-Std	TCGTAACGCCCATTCGCCACCACTTGGTCTGGTCAGTATGTTGGTGGTGCTGAGGCTCG	360
SL	CCGCAATGCCCATCTTGCCACCACTTGGCTGGTCAGTACGTTGGTGGTGCTGAGGCCCG	360
SLA	CCGCAATCTGCATGCCCTTACCACTTGGCTGGTCAGTACGTTGGCGGTCTTGAGCTCCG	360
mini-Std	TATCAATACTCAGTGGCTTCTCACCTCCGGCACTACCGAGGCTAACGCCTGGAAGTCTAC	420
SL	TATCAACACCCAGTGGTCCCTCCACTCTCGGCACCACTGAGGCCAATGCCTGGAAGCTCAC	420
SLA	TATCAACTCAGTGGTCCCTCCACTGCTGGTACTACTGAGCTCAATCTCTGGAAGCTAC	420
mini-Std	CCTTGTTGGTCACGACACTTTCACCTAAGGTCAAGCCCTCCGCCGCTCTATCGATGCTGC	480
SL	TTCCGTTGGTCACGACACTTTACCAAGGTCAAGCCTCTTGCTGCCCTCATGATGCTGC	480
SLA	CTCCGTTGGTCACGACACTTTACCAAGGTCAAGCCTGCCCTTCTCGCCATTGACTCTCT	480
mini-Std	TAAGAAGGCTGGCGTCAATAACGGTAACCCCTTGATGCCGTCCAGCAGTAACTATGT	538
SL	CAAGAAGGCTGGCGTCAACAATGGCAATCCCCTGATGCCGTCCAGCAGTAACTATGT	538
SLA	CAAGAAGCTTGGCGTTAACAATGGCAATCCCCTGACTGCTGTCAGCAGTAACTATGT	538

B GFP

mini-Std	GGCGTAATACGACTCACTATAGGATTAACCTTTAACAAGGAGAAAAACATGAATTCTAAGG	60
SL	GGCGTAATACGACTCACTATAGGATTAACCTTTAACAAGGAGAAAAACATGAATCTTAAGG	60
SLA	GGCGTAATACGACTCACTATAGGATTAACCTTTAACAAGGAGAAAAACATGAATGCTAAGG	60
mini-Std	GTGAGGAGCTTTTCACTGGTGTGTTTCTATCCTTGTGAGCTTGATGGTGATGTTAACG	120
SL	GTGAGGAGCTTTTCACTGGTGTGTTTCTATCCTTGTGAGCTTGATGGTGATGTTAACG	120
SLA	GTGAGGAGCTTTTCACTGGTGTGTTTCTATCCTTGTGAGCTTGATGGTGATGTTAACG	120
mini-Std	GTCATAAGTTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAGGGTGATGCTACTTACGGTAAGCTTACTC	180
SL	GTCATAAGTTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAGGGTGATGCTACTTACGGTAAGCTTACTT	180
SLA	GTCATAAGTTCTCTGTTTCTGGTGAGGGTGAGGGTGATCTTACTTACGGTAAGCTTACTT	180
mini-Std	TTAAGTTCATCTGTACTACTGGTAAGCTTCTGTTCTCTTGGCCTACTCTTGTACTACTT	240
SL	CTAAGTTCATCTGTACTACTGGTAAGCTTCTGTTCTCTTGGCCTACTCTTGTACTACTT	240
SLA	CTAAGTTCATCTGTACTACTGGTAAGCTTCTGTTCTCTTGGCCTACTCTTGTACTACTT	240
mini-Std	TCTCTTACGGTGTTCAGTGTTCCTCGTTACCCTGATCATATGAAGCGTCATGATTTCT	300
SL	TCCTTACGGTGTTCAGTGTTCCTCGTTACCCTGATCATATGAAGCGTCATGATTTCT	300
SLA	TCGCTTACGGTGTTCAGTGTTCCTCGTTACCCTGATCATATGAAGCGTCATGATTTCT	300
mini-Std	TCAAGTCTGCTATGCCTGAGGGTTACGTTTACGAGCGTACTATCTCTTTCAAGGATGATG	360
SL	TCAAGCTTCTGCTATGCCTGAGGGTTACGTTTACGAGCGTACTATCTCTTTCAAGGATGATG	360
SLA	TCAAGGCTCTTATGCCTGAGGGTTACGTTTACGAGCGTACTATCTCTTTCAAGGATGATG	360
mini-Std	GTAACTACAAGACTCGTGCTGAGGTTAAGTTCGAGGGTGATACTCTTGTTAACCGTATCG	420
SL	GTAACTACAAGACTCGTGCTGAGGTTAAGTTCGAGGGTGATACTCTTGTTAACCGTATCG	420
SLA	GTAACTACAAGACTCGTCTTGAGGTTAAGTTCGAGGGTGATACTCTTGTTAACCGTATCG	420
mini-Std	AGCTTAAGGGTATCGATTTCAAGGAGGATGGTAACATCCTTGGTCATAAGCTTGAGTACA	480
SL	AGTCTAAGGGTATCGATTTCAAGGAGGATGGTAACATCTCTGGTCATAAGCTTGAGTACA	480
SLA	AGTCTAAGGGTATCGATTTCAAGGAGGATGGTAACATCTCTGGTCATAAGCTTGAGTACA	480
mini-Std	ACTACAACCTTCATAACGTTTACATCACTGCTGATAAGCAGAAGAACGGTATCAAGGCTA	540
SL	ACTACAACCTTCATAACGTTTACATCACTGCTGATAAGCAGAAGAACGGTATCAAGGCTA	540
SLA	ACTACAACGCTTCATAACGTTTACATCACTCTTGATAAGCAGAAGAACGGTATCAAGCTTA	540
mini-Std	ACTTCAAGATCCGTCATAACATCGAGGATGGTCTGTTTCTGTTTCTGCTGATCATTACCAGC	600
SL	ACTTCAAGATCCGTCATAACATCGAGGATGGTCTGTTTCTGTTTCTGCTGATCATTACCAGC	600
SLA	ACTTCAAGATCCGTCATAACATCGAGGATGGTCTGTTTCTGTTTCTGCTGATCATTACCAGC	600
mini-Std	AGAACACTCCTATCGGTGATGGTCTGTTTCTTCTCTGATAACCATTAACCTTTCTACTC	660
SL	AGAACACTCCTATCGGTGATGGTCTGTTTCTTCTCTGATAACCATTAACCTTTCTACTC	660
SLA	AGAACACTCCTATCGGTGATGGTCTGTTTCTTCTCTGATAACCATTAACCTTTCTACTC	660
mini-Std	AGTCTGCTCTTTCTAAGGATCCTAACGAGAAGCGTGATCATATGGTCTTCTTGAGTTCCG	720
SL	AGCTTGCTCTCTTTAAGGATCCTAACGAGAAGCGTGATCATATGGTCTTCTTGAGTTCCG	720
SLA	AGGCTCTTTCTGCTAAGGATCCTAACGAGAAGCGTGATCATATGGTCTTCTTGAGTTCCG	720
mini-Std	TTACTGCTGCTGGTATCACTCATGGTATGGATGAGCTTACAAGTAAGCATACTGGATTC	780
SL	TTACTGCTGCTGGTATCACTCATGGTATGGATGAGTCCACAAGTAAGCATACTGGATTC	780
SLA	TTACTCTTCTGGTATCACTCATGGTATGGATGAGTCCACAAGTAAGCATACTGGATTC	780
mini-Std	TTAGTCA	787
SL	TTAGTCA	787
SLA	TTAGTCA	787

(C)

Streptavidin

tRNAセット		Natural または mini-Std			SL			SLA		
遺伝子		mini-Std	SL	SLA	mini-Std	SL	SLA	mini-Std	SL	SLA
残基数	Ser	14	8	8	8	14	25	25	25	14
	Leu	8	14	25	14	8	8	14	8	8
	Ala	25	25	14	25	25	14	8	14	25
分子量 (Da)		16622	16778	17240	16778	16622	16798	17050	16798	16622
mini-Std遺伝子との分子量の差 (Da)		0	+156	+618	+156	0	+176	+428	+176	0

GFP

tRNAセット		Natural または mini-Std			SL			SLA		
遺伝子		mini-Std	SL	SLA	mini-Std	SL	SLA	mini-Std	SL	SLA
残基数	Ser	12	19	19	19	12	9	9	9	12
	Leu	19	12	9	12	19	19	12	19	19
	Ala	9	9	12	9	9	12	19	12	9
分子量 (Da)		26910	26728	26602	26728	26910	26862	26568	26862	26910
mini-Std遺伝子との分子量の差 (Da)		0	-182	-308	-182	0	-48	-342	-48	0

図 10 本研究で用いたモデルタンパク質。

mini-Std、SL、SLA 遺伝暗号の、3 種の遺伝暗号に基づき設計された Streptavidin (A)、GFP (B) の配列を示す。T7 プロモータ配列は、黄色にハイライトした。開始コドンと終結コドンは、青色にハイライトした。アミノ酸の入れ替えを行った箇所は、緑色にハイライトした。(C) 各 tRNA セットと、各遺伝暗号で設計した mRNA から作られる、9 種類の各組み合わせで翻訳を行った場合に合成される翻訳産物の、Ser、Leu、Ala の残基数と、分子量の計算値。

初期の無細胞翻訳系の濃度を1とした場合の、アミノアシルtRNA合成酵素とEF-Tu/Tsの濃度

グループ1	AlaRS	1	3.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	ArgRS	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	ValRS	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	AspRS	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	CysRS	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
グループ2	GlnRS	1	1	6	1	1	6	1	1	1	1	1	1
	GluRS	1	1	6	1	1	1	6	1	1	1	6	6
	HisRS	1	1	6	1	1	1	1	6	1	1	1	1
	IleRS	1	1	3.5	1	1	1	1	1	3.5	1	3.5	3.5
	TyrRS	1	1	6	1	1	1	1	1	1	6	1	1
グループ3	LeuRS	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1
	LysRS	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1
	MetRS	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1
	PheRS	1	1	1	3.5	1	1	1	1	1	1	1	1
	TrpRS	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1
グループ4	SerRS	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1
	ThrRS	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1
	AsnRS	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1
	GlyRS	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1
	ProRS	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1
	EF-Tu/Ts	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3.5
	レーン	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

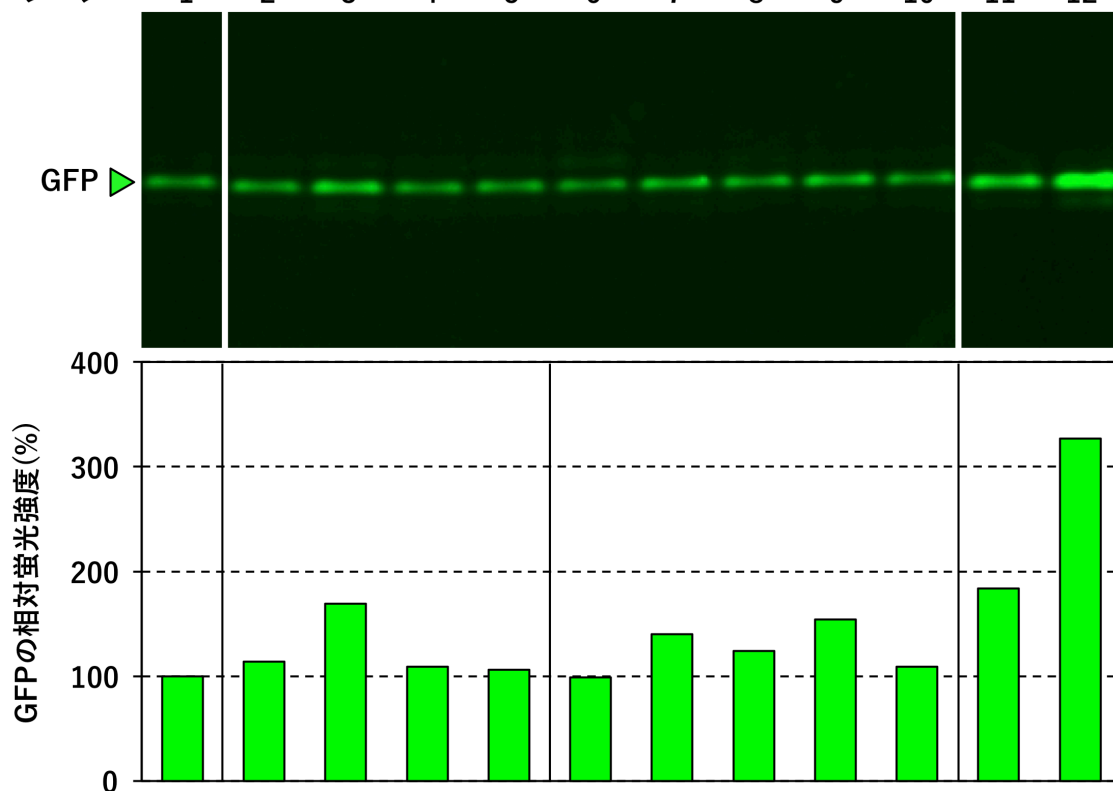
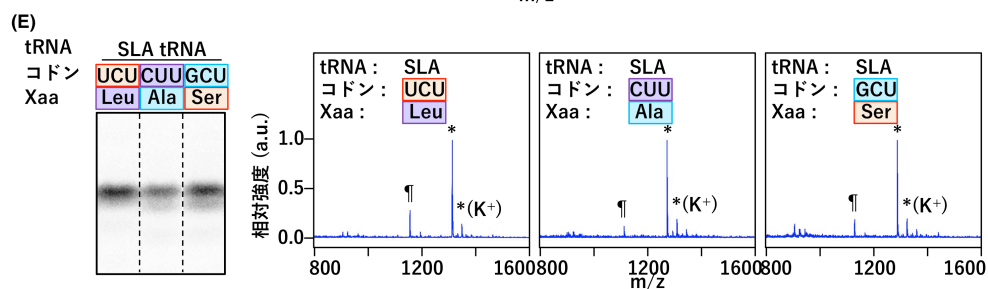
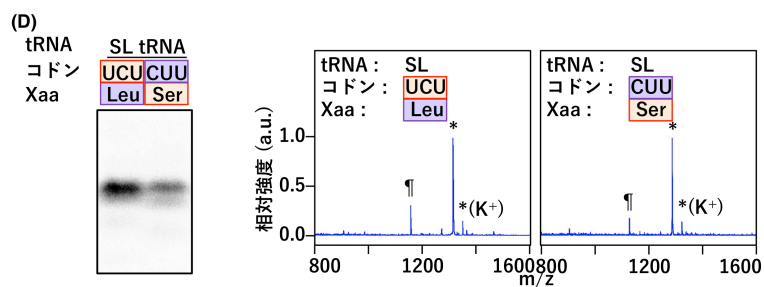
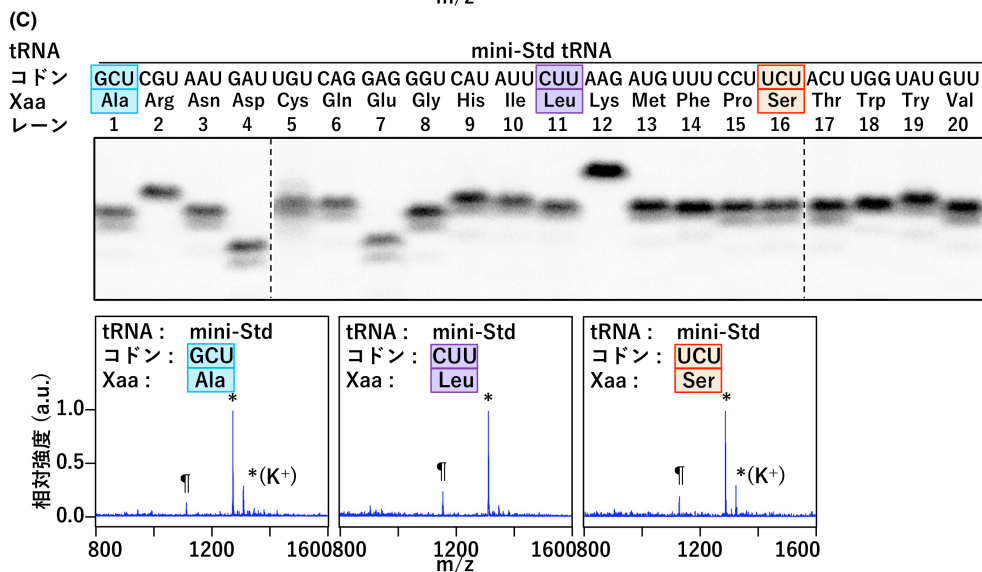
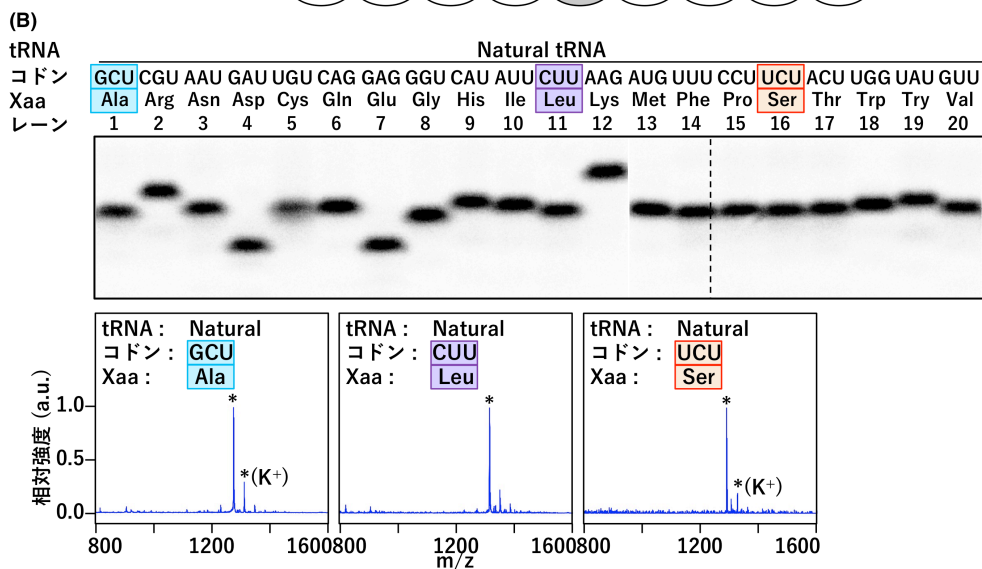


図 11 T7-tRNA を使用した再構成無細胞翻訳系の、アミノアシル tRNA 合成酵素と EF-Tu 濃度の最適化。

各翻訳反応液のアミノアシル tRNA 合成酵素と EF-Tu/Ts 濃度は、ゲルの上部の表に示した（最適化開始時の翻訳系に比べて、濃度を 6 倍または 3.5 倍に上げたものについては、オレンジ色で示した）。用

いた遺伝子は、mini-Std 遺伝暗号に基づいてコードされた GFP であり、活性のある GFP の翻訳合成量を native PAGE により解析した。GFP 合成量は、最適化開始時の翻訳系（レーン 1）での合成量を 1 とした相対値で示した。結果について：まず、アミノアシル tRNA 合成酵素の濃度が、GFP の翻訳合成量に与える影響について調べた。20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素を 4 つのグループに分け（グループ 1: AlaRS, ArgRS, ValRS, AspRS, CysRS、グループ 2: GlnRS, GluRS, HisRS, IleRS, TyrRS、グループ 3: LeuRS, LysRS, MetRS, PheRS, TrpRS、グループ 4: SerRS, ThrRS, AsnRS, GlyRS, ProRS）、各グループのアミノアシル tRNA 合成酵素の濃度を 6 倍（ただし、AlaRS, IleRS, PheRS については添加する溶液量が多くなり過ぎるため、3.5 倍とした）に上昇させた翻訳系を構築した。この 4 種の翻訳系における GFP の合成量を比較すると、グループ 2 の濃度を上昇させた場合に、翻訳合成量が 1.7 倍に増加した（レーン 3）。そこで、グループ 2 に含まれる各アミノアシル tRNA 合成酵素の濃度を 1 種ずつ上昇させた翻訳系の GFP 合成量を測定すると、GluRS または IleRS の濃度を上げた場合に、合成量の上昇が見られた（レーン 7 : 1.4 倍へ上昇、レーン 9 : 1.5 倍へ上昇）。さらに、GluRS と IleRS の濃度を共に上昇させた翻訳系では、合成量が 1.8 倍へ上昇した（レーン 11）。これは、グループ 2 のアミノアシル tRNA 合成酵素濃度を全て上昇させた場合の上昇（レーン 4 : 1.7 倍へ上昇）と同程度であったことから、GluRS と IleRS の 2 種類の濃度を上げることで充分であると判断した。最後に、EF-Tu/Ts 濃度が GFP の合成量に与える影響を調べた。GluRS と IleRS の濃度を共に上昇させた翻訳系において、さらに EF-Tu/Ts 濃度を 3.5 倍に上昇させることで、GFP 合成量はさらに 1.8 倍に増加した（レーン 12）。結局、アミノアシル tRNA 合成酵素と EF-Tu/Ts 濃度の最適化の全体で、GFP 翻訳合成量は 3.3 倍に増加した。

(A) mRNA: 5' UTR AUG UAC UAC UAC NNN GAC GAC CGU GAC 3' UTR
 ペプチド: (fMet) (Tyr) (Tyr) (Tyr) (Xaa) (Asp) (Asp) (Arg) (Asp)



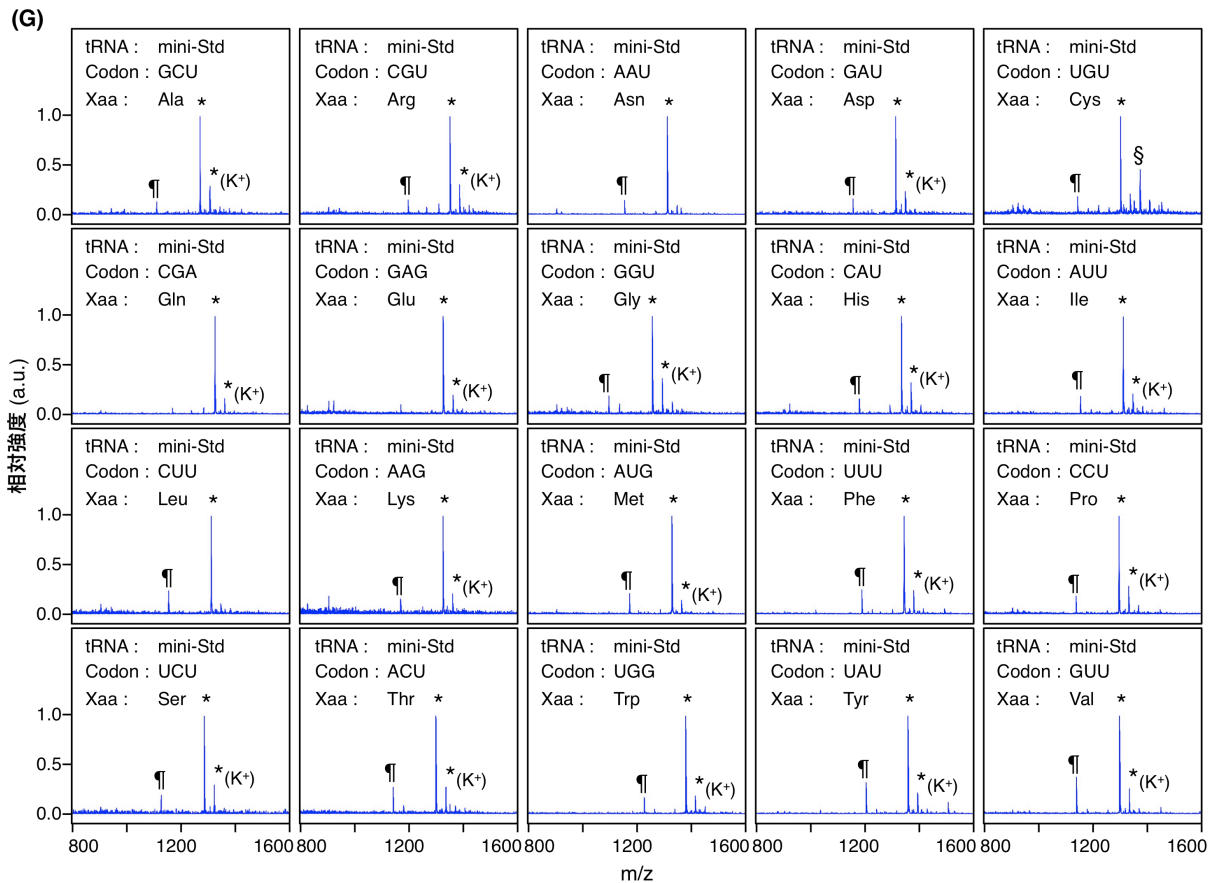
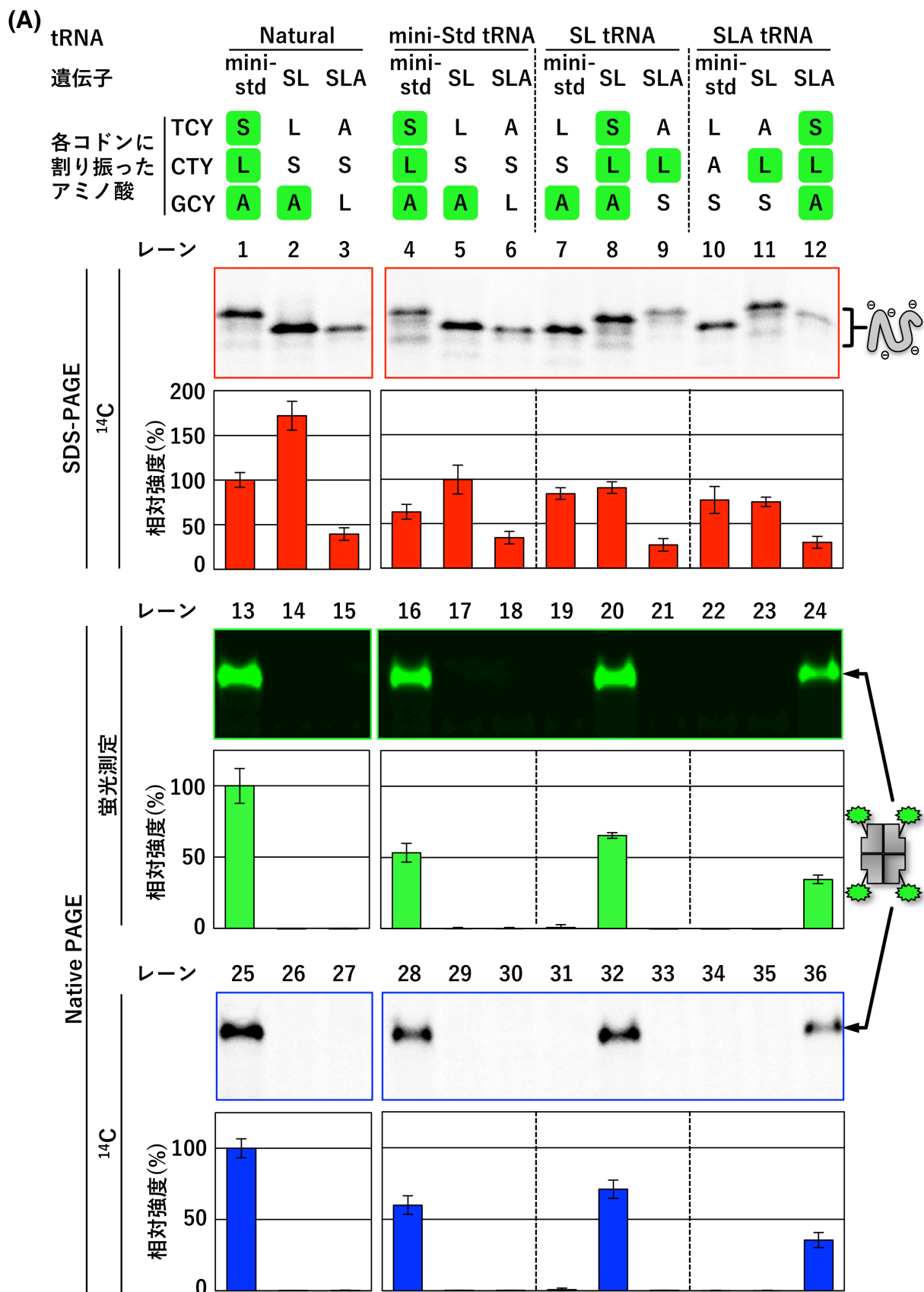


図 12 Natural tRNA または T7-tRNA を添加した無細胞翻訳系により合成したモデルペプチドの、tricine SDS-PAGE および MALDI-TOF-MS 解析。

(A) 本研究で使用したモデルペプチドとこれをコードする mRNA の配列。NNN は 20 個のコドン、Xaa はこれに対応する 20 個の標準アミノ酸を示す。無細胞翻訳系により合成したモデルペプチドの、tricine SDS-PAGE および MALDI-TOF-MS 解析：Natural tRNA を用いた結果を(B)、mini-Std tRNA を用いた結果を(C)、SL tRNA を用いた結果を(D)、SLA tRNA を用いた結果を(E)、に示した。ただし、(B)、(C)の MALDI-TOF-MS の結果のうち、Ser, Leu, Ala 以外のものは、それぞれ、Natural tRNA セットを用いたものを(F)、mini-Std tRNA セットを用いたものを(G)に示した。tricine SDS-PAGE 解析にあたっては、 $[^{14}\text{C}]\text{Asp}$ を翻訳反応液に加えることで、合成ペプチドが放射性標識され、オートラジオグラフィによる検出が可能になる。MALDI-TOF-MS のピークラベルは次の通り：設計通りのアミノ酸が Xaa の位置に導入された全長ペプチド (*), 全長ペプチドの Cys 残基に β -メルカプトエタノールが付加したもの (§)、短いペプチド 1 (fMet が欠落したもの：Tyr-Tyr-Tyr-Xaa-Asp-Asp-Arg-Asp) (¶)、短いペプチド 2 (Xaa より下流が欠落したもの：fMet-Tyr-Tyr-Tyr-Xaa) (†)。質量の理論値と実測値は表 3 に示す。



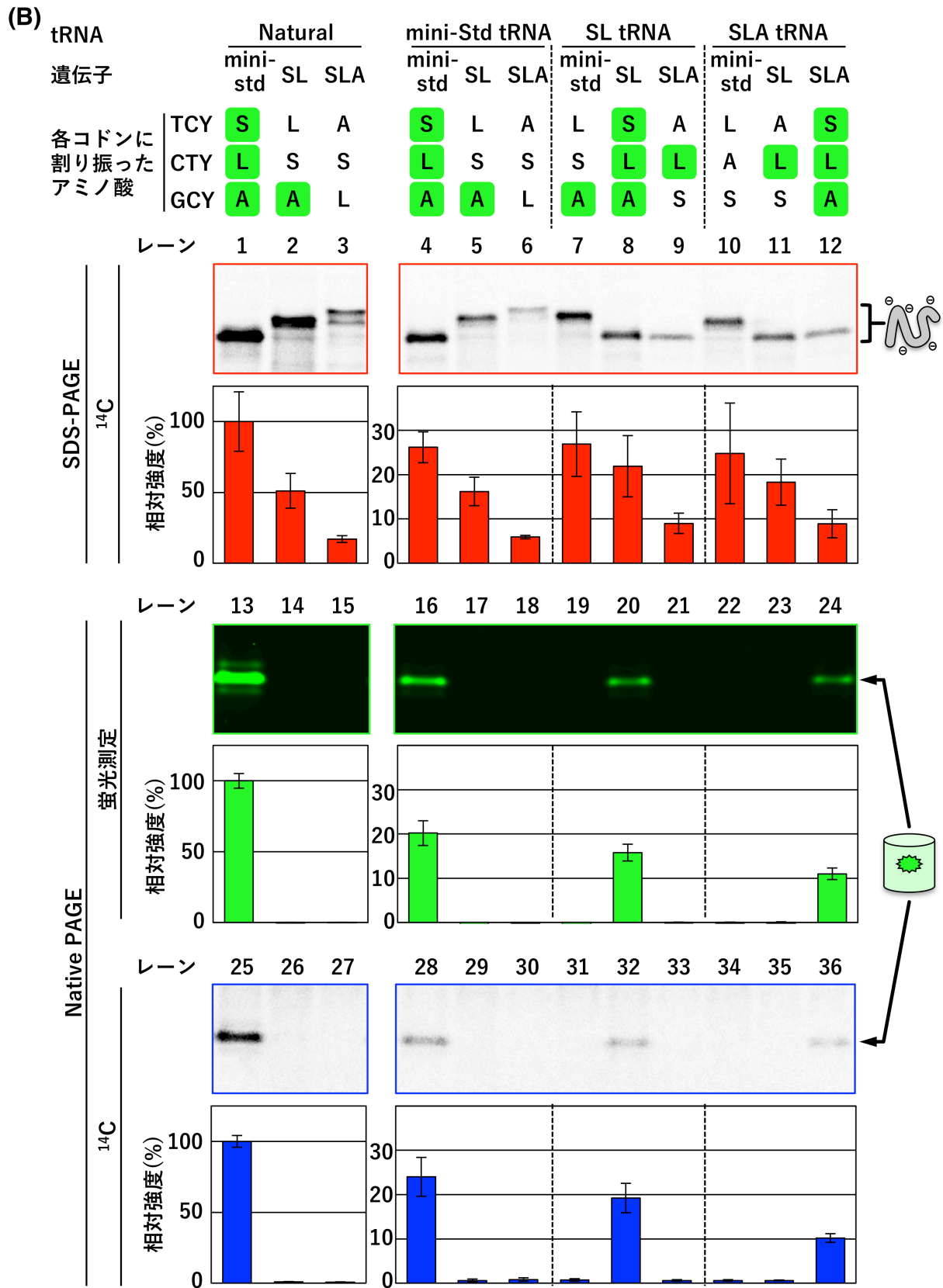


図 13 2 種類のモデルペプチド翻訳合成による、標準遺伝暗号とアミノ酸入れ替え遺伝暗号の直交性の評価。

(A) mini-Std, SL, SLA 遺伝暗号に基づきコードされた Streptavidin 遺伝子を、Natural tRNA、mini-Std tRNA セット、SL tRNA セット、SLA tRNA セットの 4 種の tRNA をそれぞれ持った無細胞翻訳系により翻訳した産物の解析。上段は、翻訳産物の解析にあたり、glycine SDS-PAGE の後に、 $[^{14}\text{C}]\text{Asp}$ で標識された合成タンパク質をオートラジオグラフィにより検出したものを示す。中段は、翻訳産物の解析にあたり、native PAGE の後に、合成タンパク質を蛍光イメージングにより検出したものを示す。なお Streptavidin の解析にあたっては、蛍光標識 biotin を翻訳液に加えることにより Streptavidin の可視化を行なった。下段は、native PAGE 後に蛍光観察したゲルを用い、オートラジオグラフィにより計測したものを示す。測定したバンド強度は、Natural tRNA を用いて、mini-Std 遺伝子を翻訳した場合の強度を 1 とした相対値で表し、ゲルの下にグラフとして示した。エラーバーは、3 回実験を行なった標準偏差を表す。**(B)** mini-Std, SL, SLA 遺伝暗号に基づきコードされた GFP 遺伝子を、Natural tRNA セット、mini-Std tRNA セット、SL tRNA セット、SLA tRNA セットの 4 種の tRNA をそれぞれ持った無細胞翻訳系により翻訳した産物の解析。解析は、上記の Streptavidin の場合と基本的には同じであるが、蛍光標識 biotin の添加は行わなかった。

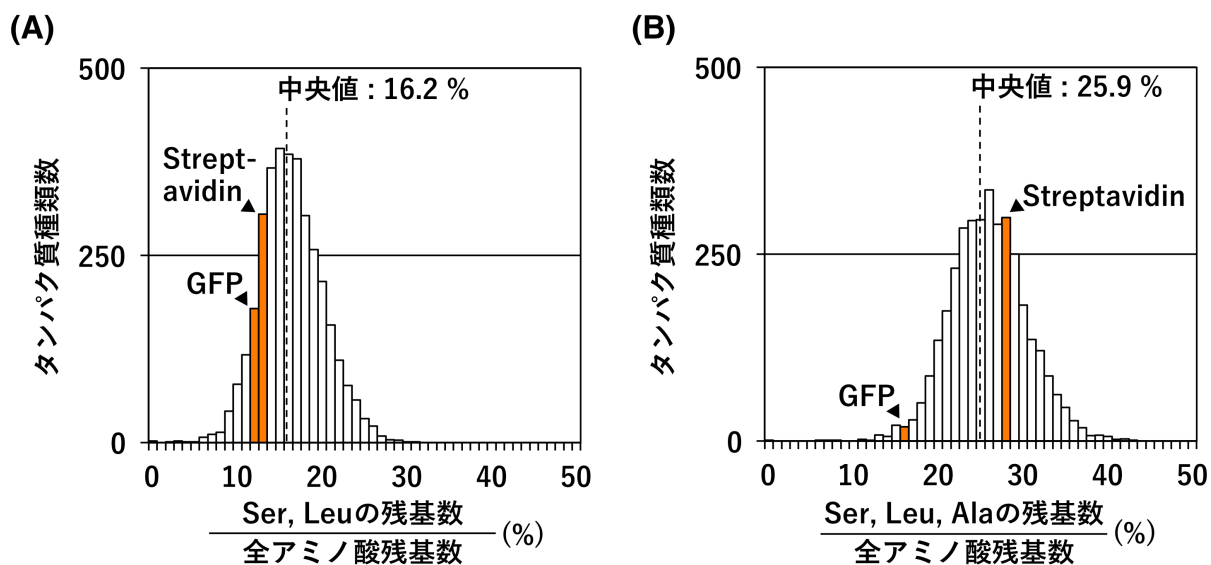


図 14 *E. coli* MDS42 ゲノムにコードされた 3547 個の各 CDS のアミノ酸配列に占める、Ser と Leu の割合(A)、または、Ser と Leu と Ala の割合(B)。 *E. coli* MDS42 ゲノムにコードされた 3547 個の各 CDS のアミノ酸配列を調べ、ここから、Ser と Leu の割合(A)、または、Ser と Leu と Ala の割合(B) を算出し、グラフに示した。モデルタンパク質についても同様に割合を計算し、グラフ内のこれらが含まれるバーをオレンジで表した。

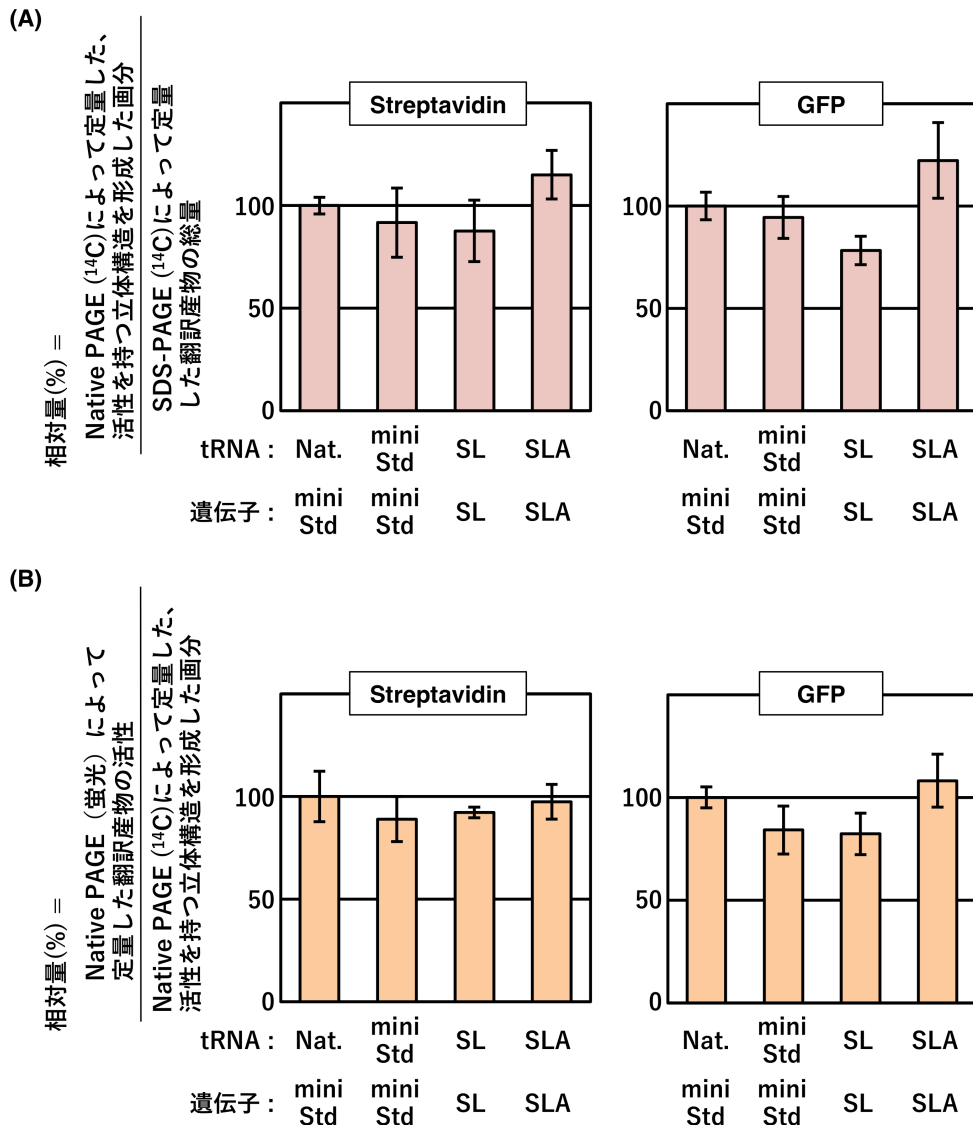


図 15 tRNA と遺伝子の設計に用いた遺伝暗号が一致している場合に合成されたタンパク質の、活性を持つ立体構造を形成する効率と蛍光活性。

(A) glycine SDS-PAGE 後のオートラジオグラフィにより測定した合成モデルタンパク質の総量に対する、native PAGE 後のオートラジオグラフィにより測定した、活性を持つ立体構造を形成したタンパク質の量の割合。割合の計算は、tRNA と遺伝子の設計に用いた遺伝暗号が一致する各条件で、無細胞翻訳系により合成したタンパク質を用いて行なった。(B) native PAGE により展開したゲルの、蛍光イメージングにより測定した蛍光強度と、オートラジオグラフィにより測定した、活性を持つ立体構造を形成したタンパク質の相対量の比較。エラーバーは、3 回測定の標準偏差を示す。

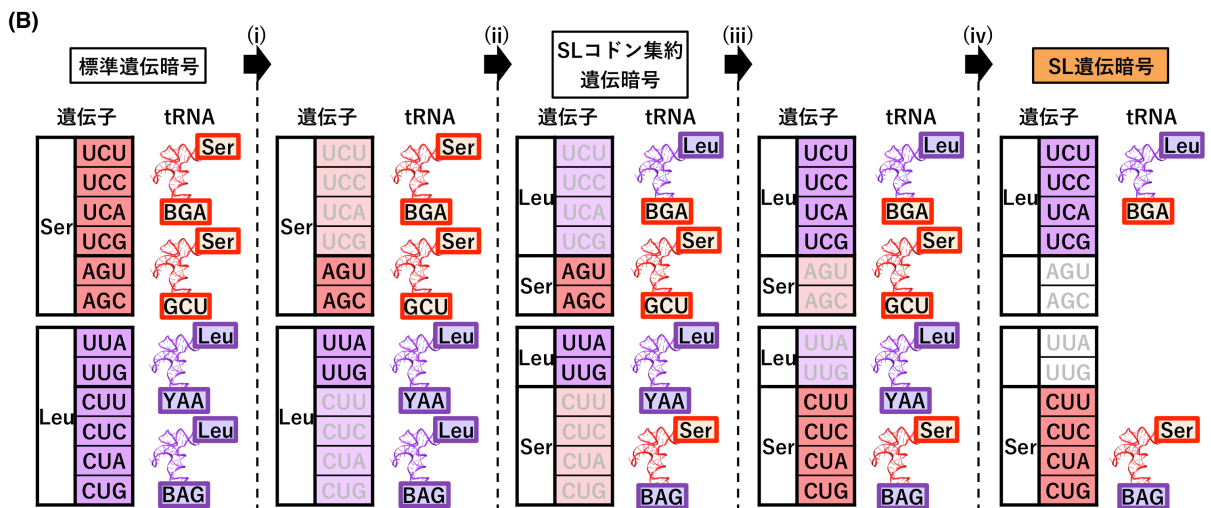
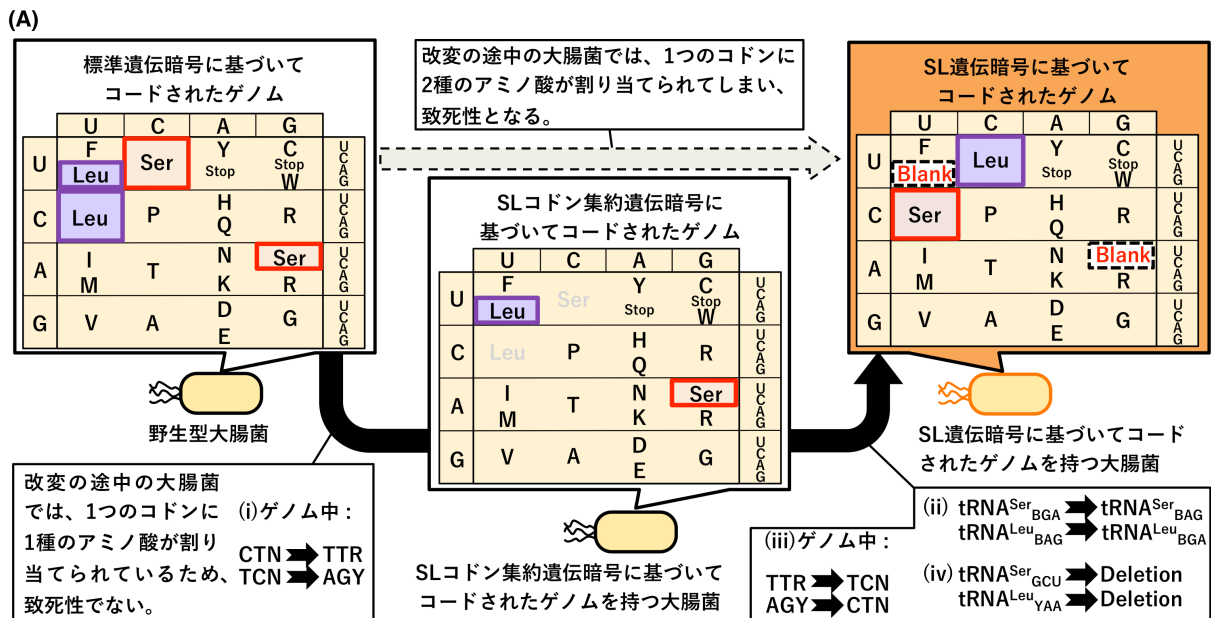


図 16 2段階コドン置換法による、SL 遺伝暗号を持った大腸菌の創製戦略。

(A) 2段階コドン置換法の流れと各段階の遺伝暗号。2段階コドン置換法では、大腸菌ゲノムを、まず SL コドン集約遺伝暗号でのコードに変換し、さらに、SL 遺伝暗号でのコードに変換する。まず、(i) では、Leu (CTN)コドンと Ser (TCN)コドンを、Leu (TTR)コドンと Ser (AGY)コドンにそれぞれ置換する。次に(ii)では、tRNA^{Ser}_{BGA} と tRNA^{Leu}_{BAG} のアンチコドンを交換する。この際、SL コドン集約遺伝暗号でコードした大腸菌ゲノムは、Leu (CTN)コドンと Ser (TCN)コドンを含まないため、大腸菌の生育に悪影響は生じないと考えられる。続いて、(iii)では、Leu (TTR)コドンと Ser (AGY)コドンを、Leu (TCN)コドンと Ser (CTN)コドンに置換する。これにより、Leu コドンと Ser コドンの反転が起こる。最後に、(iv)では、Leu (TTR)コドンと Ser (AGY)コドンに対応する tRNA をゲノムから欠損させる。この際、ゲノムには、これらのコドンが含まれないため、大腸菌の生育に悪影響は生じないと考えられる。以上の流れにより、SL 遺伝暗号への変換は完了する。もし、SL コドン集約遺伝暗号を経ずに直接 SL 遺伝暗号への変換を行おうとすると、コドンに Leu と Ser が両方指定されている状況が必ず生じてしまうため、大腸菌は致死となる。(B) 2段階コドン置換法の各段階における、Ser, Leu のコドンの対応関係

と、アダプター分子として働く tRNA の設計。赤色で示した tRNA は、ボディの配列が tRNA^{Ser} のものである。紫色で示した tRNA は、ボディの配列が tRNA^{Leu} のものである。薄色の背景色で示したコドンは、対応する tRNA は存在するものの、コドン自体は全ゲノム中で 1 度も使用されていない。白抜き背景で示したコドンは、対応する tRNA も存在せず、コドン自体も全ゲノム中で 1 度も使用されていない空コドンである。

表 1 第 2 章において T7-tRNA の塩基配列と、その鋳型 DNA を作製するためのプライマーセット

名称	アンチコドン	塩基数	塩基配列 (5' to 3')	Extension用プライマー		1st PCR用プライマー		2nd PCR用プライマー	
				Fw. primers	Rv. primers	Fw. primers	Rv. primers	Fw. primers	Rv. primers
tRNA ^{Ala}	GGC	76	GGGGC UAUAG CUCAG CUGGG AGAGC GCUUG CAUUG CAUGC AAGAG GUCAG CGGUU CGAUC CCGUU UAGCU CCACC A	Ala2 (GGC)-5.F49	Ala2 (GGC)at.R43	T7ex5.R22	Ala2 (GGC)-3.R38	T7ex5.R22	Ala2 (GGC)-3.R20
tRNA ^{Ala} _{His}	GAG	76	GGGGC UAUAG CUCAG CUGGG AGAGC GCUUG CUUGA GGUGC AAGAG GUCAG CGGUU CGAUC CCGUU UAGCU CCACC A	Ala1 (UGC)-5.F49	nAla1L (UGC->GAG)at.R43	T7ex5.R22	Ala1 (UGC)-3.R38	T7ex5.R22	Ala1 (UGC)-3.R20
tRNA ^{Arg}	GCG	77	GCAUC CGUAG CUCAG CUGGA UAGAG UACUC GGUCG CGAAC CGAGC GGUCG GAGGU UCGAA UCCUC CCGGA UGCAC CA	Arg2 (ACG->GCG)-5.F50	Arg2 (ACG->GCG)at.R43	T7ex5.R22	Arg2 (ACG->GCG)-3.R38	T7ex5.R22	Arg2 (ACG->GCG)-3.R20
tRNA ^{Asn}	GUU	76	GCUCU UGUAG UUCAG UCGGU AGAAC GCGCG ACUGU UAAUC CGAUU GUCAC UGUUU CGAGU CCAGU CAGAG GCGCC A	Asn 1G72C (GTT)-5.F49	Asn 1G72C (GTT)at.R43	T7ex5.R22	Asn 1G72C (GTT)-3.R38	T7ex5.R22	Asn 1G72C (GTT)-3.R20
tRNA ^{Asp}	GUC	77	GGAGC GGUAG UUCAG UCGGU UAGAA UACCU GCUCU UCACG CAGGG GUCUG CCGGU UCGAG UCCCG UCCGU UCCGC CA	Asp (GTC)-5.F50	Asp (GTC)at.R43	T7ex5.R22	Asp (GTC)-3.R38	T7ex5.R22	Asp (GTC)-3.R20
tRNA ^{Cys}	GCA	74	GGCGC GUUAA CAAAG CGGUU AUGUA GCGGA UUGCA AAUCC GUUUA GUCAG GGGUU CGAAU GGAAC GCGCC UCCA	Cys (GCA)-5.F48	Cys (GCA)at.R43	T7ex5.R22	Cys (GCA)-3.R37	T7ex5.R22	Cys (GCA)-3.R20
tRNA ^{Glu}	CUC	76	GUCCC CUUCG UCUAG AGGCC CAGGA CACCG CCUCU UCACG GCGGU AACAG GGGUU CGAAU CCCCU AGGGG AGGCC A	Glu (TTC->CTC)-5.F50	Glu (TTC->CTC)at.R43	T7ex5.R22	Glu (TTC->CTC)-3.R37	T7ex5.R22	Glu (TTC->CTC)-3.R20
tRNA ^{Gly}	GCC	76	GCGGG AAUAG CUCAG UUGGU AGAGC AGAC CUUGC CAAGC UCGGG GUUCG GAGUU CGAGU UCGUU UUCCC GCUC C A	Gly3 (GCC)-5.F49	Gly3 (GCC)at.R43	T7ex5.R22	Gly3 (GCC)-3.R38	T7ex5.R22	Gly3 (GCC)-3.R20
tRNA ^{His}	GUG	77	GGUGG CUUUA GCUCA GUUGG UAGAG CCGUG GAUUG UGAUU CCAGU UGUCG UGGGU UCGAA UCCCA UUAGC CACCC CA	His (GTG)-5.F50	His (GTG)at.R43	T7ex5.R22	His (GTG)-3.R38	T7ex5.R22	His (GTG)-3.R20
tRNA ^{Ile}	GAU	77	GGGCU UGUAG CUCAG GUGGU UAGAG CGCAC CCCUG AUAGC GGUGA GGUCG GUGGU UCAAG UCCAC UCAGG CCCAC CA	Ile (GAT) 1G72C-5.F50	Ile 1G72C (GAT)at.R43	T7ex5.R22	Ile 1G72C(GAT)-3.R38	T7ex5.R22	Ile 1G72C(GAT)-3.R20
tRNA ^{Leu}	GAG	87	GCCGA GGUGG UGGAA UUGGU AGACA CGCUA CCUUG AGGUG GUAGU GCCCA AUAGG GCUUA CGGGU UCAAG UCCCG UCCUC GUAC CA	Leu2 (GAG)-5.F50	Leu2 (GAG)at.R43	T7ex5.R22	Leu2 (GAG)-3.R48	T7ex5.R22	Leu2 (GAG)-3.R20
tRNA ^{Leu} _{GAA}	GGA	87	GCCGA GGUGG UGGAA UUGGU AGACA CGCUA CCUUG GAAAG GUAGU GCCCA AUAGG GCUUA CGGGU UCAAG UCCCG UCCUC GUAC CA	Leu2 (GAG)-5.F50	nLeu2S (GAG->GGA)at.R43	T7ex5.R22	Leu2 (GAG)-3.R48	T7ex5.R22	Leu2 (GAG)-3.R20
tRNA ^{Lys}	CUU	76	GGGUC GUUAG CUCAG UUGGU ACAGC ACUGU ACUCU UAUUC AAUUG GUCCG AGUUU CGAAU CCUCG ACGAC CCACC A	Lys (TTT->CTT)-5.F49	Lys (TTT->CTT)at.R43	T7ex5.R22	Lys (TTT->CTT)-3.R38	T7ex5.R22	Lys (TTT->CTT)-3.R20
tRNA ^{fMet}	CAU	77	GGCGG GGUGG AGCAC CCUGU UAGAG CGUCG GGCUC AUAGC CCGAA GAUCG UCGUU UCAAA UCCGG CCCC GCAAC CA	fMet 1G (CAT)-5.F50	fMet 1G (CAT)at.R43	T7ex5.R22	fMet 1G (CAT)-3.R38	T7ex5.R22	fMet 1G (CAT)-3.R20
tRNA ^{Met}	CAU	76	GGCUA CGUAG CUCAG UUGGU UAGAG CACAU CACUC AUAAU GAUUG GGUCA CUUGU UCGAA UCCCG UGUUA GCCAC CA	Met (CAT)-5.F50	Met (CAT)at.R43	T7ex5.R22	Met (CAT)-3.R38	T7ex5.R22	Met (CAT)-3.R20
tRNA ^{Phe}	GAA	76	GCCCC GAUAG CUCAG UCGGU AGAGC AGGGG ACUGA AAUUC CCCGU GUCCU UGUUU CGAUU CCGAG UCCGG GCACC A	Phe 32C (GAA)-5.F49	Phe 32C (GAA)at.R43	T7ex5.R22	Phe 32C (GAA)-3.R38	T7ex5.R22	Phe 32C (GAA)-3.R20
tRNA ^{Ser} _{GAG}	GAG	90	GGAGA GAUGC CGGAG CGGCU GAACG GACCG GUUUG AGGUA CCGCA GUAGG GGCAA CUUUA CCGGG GGUUC AAUUC CCCC CUCU CGCCA	Ser2 (CGA)-5.F50	nSer2L (CGA->GAG)at.R43	T7ex5.R22	Ser2 (CGA)-3.R51	T7ex5.R22	Ser2 (CGA)-3.R20
tRNA ^{Ser} _{GCC}	GGC	90	GGAGA GAUGC CGGAG CGGCU GAACG GACCG GUUUG GCAUA CCGCA GUAGG GGCAA CUUUA CCGGG GGUUC AAUUC CCCC CUCU CGCCA	Ser2 (CGA)-5.F50	nSer2A (CGA->GGC)at.R43	T7ex5.R22	Ser2 (CGA)-3.R51	T7ex5.R22	Ser2 (CGA)-3.R20
tRNA ^{Ser}	GGA	88	GGUGA GGUGU CCGAG UGGCU GAAAG AGCAC GCCUG GAAAG UGUGU AUAGC GCAAC GAUAC GGGGG UUCGA AUCCC CCCC CACCG CCA	Ser5 (GGA)-5.F50	Ser5 (GGA)at.R43	T7ex5.R22	Ser5 (GGA)-3.R49	T7ex5.R22	Ser5 (GGA)-3.R20
tRNA ^{Thr}	GGU	76	GCUGA UAUAG CUCAG UUGGU AGAGC GCACC CUUUG UAAGG GUGAG GUCCG CAGUU CGAAU CUGCC UAUCA GCACC A	Thr3 (GGT)-5.F49	Thr3 (GGT)at.R43	T7ex5.R22	Thr3 (GGT)-3.R38	T7ex5.R22	Thr3 (GGT)-3.R20
tRNA ^{Tyr}	GUA	85	GGUGG GGUUC CCGAG CGGCC AAAGG GAGCA GACUG UAAAU CUGCC GUCAC AGACU UCGAA GGUUC GAAUC CUUCC CCCAC CACCA	Tyr (GTA)-5.F50	Tyr (GTA)at.R43	T7ex5.R22	Tyr (GTA)-3.R46	T7ex5.R22	Tyr (GTA)-3.R20
tRNA ^{Val}	GAC	77	GCGUC CGUAG CUCAG UUGGU UAGAG CACCA CCUUG ACAUG GUUGG GUUCG GUGGU UCGAG UCCAC UCGGA CGCAC CA	Val2 (GAC)-5.F50	Val2 (GAC)at.R43	T7ex5.R22	Val2 (GAC)-3.R38	T7ex5.R22	Val2 (GAC)-3.R20
tRNA ^{Gln}	CUG	75	UGGGG UAUCG CCAAG CGGUA AGGCA CCGA UUCUG AUUCC GGCAU UCGA GGUUC GAAUC UCGU ACCCC AGCCA	Gln2 (CTG)-5.F49	Gln2 (CTG)at.R43	T7pro-leader.F36	Gln2 (CTG)-3.R38	T7ex5.R22	Gln2 (CTG)-3.R20
tRNA ^{Pro}	GGG	77	CGGCA CGUAG CGCAG CCUGG UAGCG CACCG UCAUG GGGUG UCGGG GUUCG GAGGU UCAAA UCCUC UCGUG CCGAC CA	Pro1 (GGG)-5.F50	Pro1-2 (GGG)at.R43	T7pro-leader.F36	Pro1 (GGG)-3.R38	T7ex5.R22	Pro1 (GGG)-3.R20
tRNA ^{Trp}	CCA	76	AGGGG CGUAG UUCA A UUGGU AGAGC ACCGG UCUC AAAC CGGGU GUUGG GAGUU CGAGU CUCUC CGCC CUGCC A	Trp (CCA) -5I.F49	Trp (CCA)at.R43	T7pro-leader.F36	Trp (CCA)-3.R38	T7ex5.R22	Trp (CCA)-3.R20

表2 第2章において使用したプライマー

プライマー名	塩基配列 (5' to 3')	
T7-tRNAのExtension反応に用いたForward primer	fMet 1G (CAT)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGGCGGGTGGAGCAGCCTGGTAGCTCGTCGGG
	Ala2 (GGC)-5.F49	GTAATACGACTCACTATAGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCTTGC
	Arg2 (ACG->GCG)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGCATCCGTAGCTCAGCTGGATAGAGTACTCGG
	Asn 1G72C (GTT)-5.F49	GTAATACGACTCACTATAGCCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGA
	Asp (GTC)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGC
	Cys (GCA)-5.F48	GTAATACGACTCACTATAGGCGCGTTAACAAAGCGGTTATGTAGCGGA
	Gln2 (CTG)-5I.F49	GGAACGCGCGACTCTAATTGGGGTATCGCCAAGCGGTAAGGCACCGGA
	Glu (TTC->CTC)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCC
	Gly3 (GCC)-5.F49	GTAATACGACTCACTATAGCGGGAATAGCTCAGTTGGTAGAGCACGACC
	His (GTG)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGGTGGCTATAGCTCAGTTGGTAGAGCCCTGGA
	Ile (GAT) 1G72C-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGGGCTTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGACCC
	Leu2 (GAG)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGCCGAGGTGGTGAATTGGTAGACACGCTACC
	Lys (TTT->CTT)-5.F49	GTAATACGACTCACTATAGGGTCGTAGCTCAGTTGGTAGAGCAGTTGA
	Met (CAT)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGGCTACGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACATCA
	Phe 32C (GAA)-5.F49	GTAATACGACTCACTATAGCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCAGGGGA
	Pro2 (GGG)-5I.F50	GGAACGCGCGACTCTAATCGGCACGTAGCGCAGCCTGGTAGCGCACCGTC
	Ser5 (GGA)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGGTGAGGTGCCGAGTGGCTGAAGGAGCACGC
	Thr3 (GGT)-5.F49	GTAATACGACTCACTATAGCTGATATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCACCC
	Trp (CCA)-5I.F49	GGAACGCGCGACTCTAATAGGGCGTAGTTCAATTGGTAGAGCACCGGT
	Tyr (GTA)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGGTGGGGTCCGAGCGGCCAAAGGGAGCAGA
Val2 (GAC)-5.F50	GTAATACGACTCACTATAGCGTCGGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACC	
Ala1 (UGC)-5.F49	GTAATACGACTCACTATAGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGC	
T7-tRNAのExtension反応に用いたReverse primer	fMet 1G (CAT)at.R43	GAACCGACGATCTTCGGGTTATGAGCCCGACGAGCTACCAGGC
	Ala2 (GGC)at.R43	GAACCGCTGACCTCTTGCATGCCATGCAAGCGCTCTCCAGCT
	Arg2 (ACG->GCG)at.R43	GAACCTCCGACCGCTCGGTTCCGAGCCGAGTACTCTATCCAGC
	Asn 1G72C (GTT)at.R43	GAACCAGTGACATACGGATTAACAGTCCGCCGTTCTACCGACT
	Asp (GTC)at.R43	GAACCCGCGACCCCTGCGTGACAGGCAGGTATTCTAACCGAC
	Cys (GCA)at.R43	CGAACCCGACTAGACGGATTTGCAATCCGCTACATAACCGCTT
	Gln2 (CTG)at.R43	GAACCTCGGAATGCCGGAATCAGAATCCGGTGCCTTACCGCTT
	Glu (TTC->CTC)at.R43	CGAACCCCTGTTACCGCGTGAGAGGGCGGTGCTCCTGGGCCTC
	Gly3 (GCC)at.R43	GAACTCGGACCCCGACCTTGGCAAGTCTGTGCTTACCAACT
	His (GTG)at.R43	GAACCCACGACAACTGGAATCACAATCCAGGGCTTACCAACT
	Ile 1G72C (GAT)at.R43	GAACCACCGACCTACCCTTATCAGGGGTGCGCTTAACCACC
	Leu2 (GAG)at.R43	GCCCTATTGGGCACTACCACCTCAAGGTAGCGTGTCTACCAAT
	Lys (TTT->CTT)at.R43	GAACCTGCGACCAATTGATTAAGAGTCAACTGCTTACCAACT
	Met (CAT)at.R43	GAACCTGTGACCCCATCATTATGAGTGATGTGCTTAAACCAAC
	Phe 32C (GAA)at.R43	GAACCAAGGACACGGGGATTTTCAGTCCCTGCTTACCGACT
	Pro2 (GGG)at.R43	GAACCTCCGACCCCGACACCCCATGACGGTGCCTTACCGGC
	Ser5 (GGA)at.R43	ACGTTGCCGTATACACACTTCCAGGCGTGCTCCTTACGCCAC
	Thr3 (GGT)at.R43	GAACCTGCGACCTACCCTTACCAAGGGTGCCTTACCAACT
	Trp (CCA)at.R43	GAACCTCCAACACCCGGTTTTGGAGACCGGTGCTTACCAATT
	Tyr (GTA)at.R43	GAAGTCTGTGACGGCAGATTACAGTCTGCTCCCTTTGGCCGC
Val2 (GAC)at.R43	GAACCACCGACCCACCATGTCAAGGTGGTGTCTAACCAC	
nLeu2S (GAG->GGA)at.R43	GCCCTATTGGGCACTACCTTTCAGGGGTAGCGTGTCTACCAAT	
nSer2L (CGA->GAG)at.R43	AGTTGCCCTACTCCGGTACCTCAAACCCGGTCCGTTACGCCG	
nAla2L (GGC->GAG)at.R43	GAACCGCTGACCTCTTGACACCTCAAAGCAAGCGCTCTCCAGCT	
nSer2A (CGA->GGC)at.R43	AGTTGCCCTACTCCGGTATGCCATACCGGTCCGTTACGCCG	

表 2 (続き)

T7-tRNAの1st PCR反応に用いたForward primer	fMet 1G (CAT)-3.R38	TGGTTGCGGGGGCCGGATTTGAACCGACGATCTTCGGG
	Ala2 (GGC)-3.R38	TGGTGGAGCTAAGCGGGATCGAACCGCTGACCTCTTGC
	Arg2 (ACG->GCG)-3.R38	TGGTGCATCCGGGAGGATTCGAACCTCCGACCGCTCGG
	Asn 1G72C (GTT)-3.R38	TGGCGCCTCTGACTGGACTCGAACCTGACATACGGA
	Asp (GTC)-3.R38	TGGCGGAACGGACGGACTCGAACCCGACCCCTGC
	Cys (GCA)-3.R37	TGGAGGCGGTTCCGGAGTCGAACCGACTAGACGGA
	Gln2 (CTG)-3.R38	TGGCTGGGGTACGAGGATTCGAACCTCGGAATGCCGGA
	Glu (TTC->CTC)-3.R37	TGGCGTCCCTAGGGGATTCGAACCCCTGTTACCGCC
	Gly3 (GCC)-3.R38	TGGAGCGGGAAACGAGACTCGAACTCGCGACCCCGACC
	His (GTG)-3.R38	TGGGGTGGCTAATGGGATTCGAACCCACGACAACCTGGA
	Ile 1G72C(GAT)-3.R38	TGGTGGGCCTGAGTGGACTTGAACCACCGACCTCACCC
	Leu2 (GAG)-3.R48	TGGTACCGAGGACGGGACTTGAACCCGTAAGCCCTATTGGGCACTACC
	Lys (TTT->CTT)-3.R38	TGGTGGGTCGTGCAGGATTCGAACCTGCGACCAATTGA
	Met (CAT)-3.R38	TGGTGGCTACGACGGGATTCGAACCTGTGACCCCATCA
	Phe 32C (GAA)-3.R38	TGGTGCCCGACTCGGAATCGAACCAAGGACACGGGGA
	Pro2 (GGG)-3.R38	TGGTCGGCACGAGAGGATTTGAACCTCCGACCCCGAC
	Ser2 (CGA)-3.R51	TGGCGGAGAGAGGGGGATTTGAACCCCGGTAGAGTTGCCCTACTCCGGT
	Ser5 (GGA)-3.R49	TGGCGGTGAGGGGGGGATTCGAACCCCGATACGTTGCCGTATACACAC
	Thr3 (GGT)-3.R38	TGGTGTGATAGGCAGATTCGAACCTGCCGACCTCACCC
	Trp (CCA)-3.R38	TGGCAGGGGCGGAGAGACTCGAACTCCCAACCCCGGT
	Tyr (GTA)-3.R46	TGGTGGTGGGGGAAGGATTCGAACCTCGAAGTCTGTGACGGCAGA
	Val2 (GAC)-3.R38	TGGTGCCTCCGAGTGGACTCGAACCCGACCCCAACC
	nAla2L (GGC->GAG)atUUAA.R43	GAACCGCTGACCTTTGCTTCTCAAGCAAGCGCTCTCCAGCT
	nAla1L (UGC->GAG)at.R43	GAACCGCAGACCTCTGCACCTCAAGCAGGCGCTCTCCAGCT
	Ala1 (UGC)-3.R38	TGGTGGAGCTATGCGGGATCGAACCCGACGACCTCTCTGC
	nSer2A (CGA->GGC)at.R43 UUAU	AGTTGCCCTACTCCGGTATGCCAAACCGGTCCGTTACGCCG
nSer5A (GGA->GGC)at.R43	ACGTTGCCGTATACACACATGCCATGCGTGCTCCTTCAGCCAC	
T7-tRNAの1st PCR反応に用いたReverse primer	fMet 1G (CAT)-3.R20	TGGTTGCGGGGGCCGGATTT
	Ala2 (GGC)-3.R20	TGGTGGAGCTAAGCGGGATC
	Arg2 (ACG->GCG)-3.R20	TGGTGCATCCGGGAGGATTC
	Asn 1G72C (GTT)-3.R20	TGGCGCCTCTGACTGGACTC
	Asp (GTC)-3.R20	TGGCGGAACGGACGGGACTC
	Cys (GCA)-3.R20	TGGAGGCGGTTCCGGAGTC
	Gln2 (CTG)-3.R20	TGGCTGGGGTACGAGGATTC
	Glu (TTC->CTC)-3.R20	TGGCGTCCCTAGGGGATTC
	Gly3 (GCC)-3.R20	TGGAGCGGGAAACGAGACTC
	His (GTG)-3.R20	TGGGGTGGCTAATGGGATTC
	Ile 1G72C(GAT)-3.R20	TGGTGGGCCTGAGTGGACTT
	Leu2 (GAG)-3.R20	TGGTACCGAGGACGGGACTT
	Lys (TTT->CTT)-3.R20	TGGTGGGTCGTGCAGGATTC
	Met (CAT)-3.R20	TGGTGGCTACGACGGGATTC
	Phe 32C (GAA)-3.R20	TGGTGCCCGACTCGGAATC
	Pro2 (GGG)-3.R20	TGGTCGGCACGAGAGGATTT
	Ser2 (CGA)-3.R20	TGGCGGAGAGAGGGGGATTT
	Ser5 (GGA)-3.R20	TGGCGGTGAGGGGGGGATTC
	Thr3 (GGT)-3.R20	TGGTGTGATAGGCAGATTC
	Trp (CCA)-3.R20	TGGCAGGGGCGGAGAGACTC
Tyr (GTA)-3.R20	TGGTGGTGGGGGAAGGATTC	
Val2 (GAC)-3.R20	TGGTGCCTCCGAGTGGACTC	
Ala1 (AGC)-3.R20	TGGTGGAGCTATGCGGGATC	

表 2 (続き)

モデルペプチドの鑄型DNAのPCR反応に用いたReverse primer	Y3xDDRD_gcuAla.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C AGC GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_cguArg.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C ACG GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_aauAsn.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C ATT GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_gauAsp.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C ATC GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_uuCys.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C ACA GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_cagGln.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C CTG GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_gagGlu.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C CTC GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_gguGly.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C ACC GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_cauHis.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C ATG GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_auulle.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C AAT GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_cuuLeu.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C AAG GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_aagLys.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C CTT GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_augMet.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C CAT GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_uuuPhe.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C AAA GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_ccuPro.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C AGG GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_uuSer.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C AGA GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_acuThr.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C AGT GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
	Y3xDDRD_uuGTrp.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C CCA GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT
Y3xDDRD_uuuTyr.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C ATA GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT	
Y3xDDRD_guuVal.R44	CGAAG CTTAG TCACG GTCGT C AAC GTAGT AGTAC ATGTT TTTCT	
その他のプライマー	T7Aex.F24	GGCGTAATACGACTCACTATAGGA
	GFPuv.R30	TGACTAAGAATCCAGTATGCTTACTTGTAG
	T7g10.F26	CTAGTAATACGACTCACTATAGGGTT
	StvWT.R20	ACATAGTTACTGCTGGACGG
	StvSL.R20	ACATAGTTACTGCTGAACGG
	StvSLA.R20	ACATAGTTACTGCTGGACAA
	T7ex5.F22	GGCGTAATACG ACTCACTATAG
	T7esD6MYYY.F55	TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAAGGAGAAAAACATGTACTACTAC
	DRDuaaAS.R20	TGCTGGCACTGATTCGAAGC

表3 第2章においてモデルペプチドの質量の理論値と実測値^a

tRNA セット	コドン	Xaa	全長ペプチド (*)		β-メルカプトエタノールの付加 (§)		短いペプチド 1 (¶)		短いペプチド 2 (†)	
			fMet-Tyr-Tyr-Tyr-Xaa-Asp-Arg-Asp		fMet-Tyr-Tyr-Tyr-Xaa-Asp-Arg-Asp		fMet-Tyr-Tyr-Tyr-Xaa		Tyr-Tyr-Tyr-Xaa-Asp-Arg-Asp	
			質量の理論値	質量の実測値	質量の理論値	質量の実測値	質量の理論値	質量の実測値	質量の理論値	質量の実測値
Natural	GCU	Ala	1239.45	1239.34						
Natural	CGU	Arg	1324.52	1324.42			823.34	823.38		
Natural	AAU	Asn	1282.46	1282.48						
Natural	GAU	Asp	1283.44	1283.63						
Natural	UGU	Cys	1271.42	1271.26	1347.43	1347.32	808.2 (+K)	808.06		
Natural	CAG	Gln	1296.47	1296.48						
Natural	GAG	Glu	1297.46	1297.54						
Natural	GGU	Gly	1225.44	1225.66						
Natural	CAU	His	1305.47	1305.63						
Natural	AUU	Ile	1281.50	1281.81						
Natural	CUU	Leu	1281.50	1281.31						
Natural	AAG	Lys	1296.51	1296.29						
Natural	AUG	Met	1299.46	1299.36						
Natural	UUU	Phe	1315.48	1315.37			852.26 (+K)	852.34		
Natural	CCU	Pro	1265.47	1265.51						
Natural	UCU	Ser	1255.45	1255.69						
Natural	ACU	Thr	1269.46	1270.22						
Natural	UGG	Trp	1354.49	1354.53						
Natural	UAU	Tyr	1331.48	1331.60						
Natural	GUU	Val	1267.48	1267.67						
mini-Std	GCU	Ala	1239.45	1239.34					1080.42	1080.26
mini-Std	CGU	Arg	1324.52	1324.56					1165.49	1166.46
mini-Std	AAU	Asn	1282.46	1282.54					1123.43	1123.51
mini-Std	GAU	Asp	1283.44	1283.66					1124.41	1124.55
mini-Std	UGU	Cys	1271.42	1271.72	1347.43	1347.71			1112.39	1112.65
mini-Std	CAG	Gln	1296.47	1296.26						
mini-Std	GAG	Glu	1297.46	1297.44						
mini-Std	GGU	Gly	1225.44	1225.47					1066.41	1066.42
mini-Std	CAU	His	1305.47	1305.69					1146.44	1146.63
mini-Std	AUU	Ile	1281.50	1281.41					1122.47	1122.41
mini-Std	CUU	Leu	1281.50	1281.47					1122.47	1122.41
mini-Std	AAG	Lys	1296.51	1296.51					1137.48	1137.46
mini-Std	AUG	Met	1299.46	1299.62					1140.43	1140.63
mini-Std	UUU	Phe	1315.48	1315.74					1156.45	1156.70
mini-Std	CCU	Pro	1265.47	1265.17					1106.44	1106.21
mini-Std	UCU	Ser	1255.45	1255.20					1096.42	1096.19
mini-Std	ACU	Thr	1269.46	1269.31					1110.43	1110.28
mini-Std	UGG	Trp	1354.49	1354.31					1195.46	1195.27
mini-Std	UAU	Tyr	1331.48	1331.34					1172.45	1172.40
mini-Std	GUU	Val	1267.48	1267.35					1108.45	1108.32
SL	UCU	Leu	1281.50	1281.44					1122.47	1122.46
SL	CUU	Ser	1255.45	1255.52					1096.42	1096.47
ASL	GCU	Ser	1255.45	1255.48					1096.42	1096.45
ASL	UCU	Leu	1281.50	1281.69					1122.47	1122.60
ASL	CUU	Ala	1239.45	1239.65					1080.42	1080.58

^a ピークラベルは次の通り：設計通りのアミノ酸が Xaa の位置に導入された全長ペプチド (*), 全長ペプチドの Cys 残基に β-メルカプトエタノールが付加したもの (§)、短いペプチド 1 (fMet が欠落したもの) : Tyr-Tyr-Tyr-Xaa-Asp-Arg-Asp (¶)、短いペプチド 2 (Xaa より下流が欠落したもの) : fMet-Tyr-Tyr-Tyr-Xaa (†)

第 3 章

D 体アミノ酸の翻訳系への適合性の検証

3.1. 導入

3.1.1. D 体アミノ酸の翻訳適合性に関する先行研究

まず、翻訳開始に D 体アミノ酸を用いる研究が、後藤らによって報告されている。この研究では、*N*-formyl-D 体アミノ酸または *N*-acyl-D 体アミノ酸を結合した tRNAⁱⁿⁱ を調製し、MetRS を含まない再構成無細胞翻訳系内に添加することで、これらのアミノ酸がペプチドに導入されることを発見した^{47,50}。この結果は、非標準アミノアシル tRNA を調製した上で、導入したいアミノ酸の導入と競合する要素となる、内在性アミノ酸の導入を排除した条件が用意できたならば、リボソームは、D 体アミノ酸を翻訳開始に受け入れるということを示している。続いて、翻訳伸長反応に D 体アミノ酸を利用することを試みた研究について述べる (表 4)。最初の報告は、Calendar と Berg によるもので、抽出の無細胞翻訳系を利用することで、D-Tyr をポリペプチド中に翻訳導入可能であることを報告した¹⁰⁹。彼らは、大腸菌の TyrRS が D-Tyr を基質として誤って利用し、tRNA にアシル化する活性を利用し、D-Tyr-tRNA^{Tyr} の調製を行なった。ただし、大腸菌の抽出翻訳系中には、D-Tyr, D-Phe, D-Asp, D-Trp-tRNA を選択的に分解する D-Tyr-tRNA-deacylase が存在しており、D-Tyr が誤ってペプチドへ導入されることを防いでいる^{109,150}。そこで、D-Tyr-tRNA^{Tyr} の分解を避けるため、彼らは、D-Tyr-tRNA deacylase 活性の低い、枯草菌の抽出無細胞翻訳系(S-100)に、大腸菌のリボソームを加えた系を用いた。D-[¹⁴C]Tyr-tRNA^{Tyr}、または、コントロールとして L-[¹⁴C]Tyr-tRNA^{Tyr} を系に添加し、poly-UA の mRNA からペプチドの翻訳を試みた。合成されたペプチドをトリクロロ酢酸で沈殿させ、放射活性を測定した結果、ペプチド中に含まれる D-[¹⁴C]Tyr の量は、コントロールとして L-[¹⁴C]Tyr を用いた場合の 17% となった。導入された Tyr が D 体であったことは、ペプチドを化学的に加水分解した後、D 体または L 体アミノ酸特異的な酸化酵素によって処理することで確認されている。確かに、彼らの報告は、D-Tyr が翻訳伸長反応に適合していることを示しているが、得られたペプチドが、全て poly(D-[¹⁴C]Tyr-L-Ile)とは限らない点というについては、注意が必要である。枯草菌の抽出無細胞翻訳系には、放射性ラベルされていない L-Tyr が残存していた可能性が高く、例えば、poly(D-[¹⁴C]Tyr-L-Ile-L-Tyr-L-Ile)のように、ペプチド中の D-[¹⁴C]Tyr の存在割合は低かった可能性が十分に考えられる。

その後、前述の (1.3.1.参照)、化学合成と酵素反応を利用したアミノアシル化法が開発されると、様々な D-アミノアシル tRNA の合成が可能になったため、D 体アミノ酸の翻訳導入に関する研究がさらに進められた。しかし、大腸菌やウサギ網状赤血球由来の無細胞翻訳系を用いて、アンバーサプレッション法により、D-Ala, D-Phe のペプチドへの 1 残基導入を試みた研究では、いずれも、D 体アミノ酸が導入されたという証拠を得られなかった^{29,30,151}。

一方、Dedkova らが、大腸菌の無細胞翻訳系を用いて行った研究では、dihydrofolate reductase (DHFR)中の特定の 1 残基として、D-Met または D-Phe を導入し、それぞれ標準アミノ酸を用いた場合の 5%と 3%の収量でタンパク質が得られたことを報告した。さらに、変異を導入したリボソームを用いることで、収量はそれぞれ 23%と 12%まで改善することについても報告している^{27,28}。

さらに、再構成無細胞翻訳系が開発されると、前述の遺伝暗号のリプログラミングを利用した、D 体アミノ酸導入の研究結果についても報告された。再構成無細胞翻訳系を用いることの利点は、前述の D-Tyr-tRNA deacylase の含まれない系を構築できることである。同様に、D 体アミノ酸の導入と競合する可能性のある L 体アミノ酸の導入を、特定のアミノ酸と対応する ARS を系に添加しないことによって、排除することも可能である。Tan らは、再構成無細胞翻訳系を用いて、fMet-Xaa-[³H]Glu の配列を持つトリペプチド中の、Xaa の位置(Val コドン GUU)に、D-Ala または D-Phe を導入することを試みた³¹。しかし、D-Ala の導入を試みた結果、実際に得られたペプチドには、L-Ala が導入されていた。この原因として、アミノアシル化に利用した D-Ala に L-Ala が混入していたか、D-Ala-tRNA の調製中に一部ラセミ化が進行した可能性が考えられる。また、D-Phe の導入されたペプチドについては、検出することができなかった。

3.1.2. 本研究の目的

以上のように、D 体アミノ酸の翻訳伸長反応への適合性について、先行研究で明らかにされた内容は全く不十分だった (表 4)。特に問題なのは、研究対象となったアミノ酸が D-Ala, D-Phe, D-Met, D-Tyr のみと少なかった点と、複数の研究で扱われた D-Phe については結果が矛盾していた点である。この原因として、1 点目に、各実験に使用された翻訳系が異なっており、D 体アミノ酸の翻訳導入と競合する様々な要素が含まれていたこと、2 点目に、D 体アミノ酸の導入されたことを検証する手段として、酵素活性などの間接的な方法が多く使われていたこと、が考えられる。

そこで、本論文の第 2 のテーマとして、D 体アミノ酸と競合する要素を排除した適切な翻訳系を用いることで、D 体アミノ酸の翻訳適合性について正確な検証を行うこととした (図 17)。具体的には、終結因子と一部の ARS を除いた再構成無細胞翻訳系を用いることで、D 体アミノ酸の導入との競合の原因となる要素を排除した。さらに、Flexizyme を用いたアミノアシル化法の簡便さを利用し、標準アミノ酸のうち鏡像異性体を持たない Gly を除き、19 種類のアミノ酸の D 体を用意し、翻訳適合性について包括的に調べることとした。また、従来試みられていなかった、ペプチドへの複数残基の D 体アミノ酸の導入についても、検証を行った。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 材料

本実験で使用したプライマーは、Operon 社または FASMAC 社から購入した。SPE column は日京テクノス社から購入した。D 体アミノ酸は、渡辺化学またはペプチド研究所から購入し、アミノ酸の活性化体の合成は、村上らが行なった。その他の試薬はナカライ社から購入した。また、Taq DNA polymerase、T7 RNA polymerase、および翻訳に必要な因子を含む溶液である HsolA、HsolB は本研究室において作製したものをを用いた。溶液の組成を以下に示す。

- 10x PCR buffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100
- 5 mM each dNTP: 5 mM dATP, 5 mM dTTP, 5 mM dGTP, 5 mM dCTP
- 10x T7 buffer: 400 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM spermidine, 0.1% (v/v) Triton X-100
- 2x RNA Loading buffer: 25 mM EDTA (pH 8.0), 95% (v/v) formamide, BPB
- 0.5x TBE: 44.5 mM Tris-borate, 2 mM EDTA (pH 8.0)
- 2x MuPaC reaction solution: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 0.5 mM dNTPs, 0.02% BSA, 0.2 U/μL T5 exonuclease, 0.01 U/μL Klenow fragment exo (-), 2 U/μL T4 DNA Ligase
- HsolA: 18.4 mM ATP, 18.4 mM GTP, 9.18 mM CTP, 9.18 mM UTP, 184 mM creatine phosphate, 460 mM HEPES-K (pH 7.6), 918 mM AcOK, 110 mM Mg(OAc)₂, 18.4 mM spermidine, 9.18 mM DTT, 0.918 mM 10-formyl-5,6,7,8 tetrahydrofolic acid, 13.8 mM *E. coli* tRNA mix
- HsolB (4ARS): 1.27 μM AspRS, 1.08 μM LysRS, 0.294 μM MetRS, 0.196 μM TyrRS, 5.88 μM methionyl-tRNA formyltransferases, 26.5 μM initiation factor 1, 3.92 μM initiation factor 2, 14.7 μM initiation factor 3, 2.55 μM elongation factor G, 98 μM elongation factor Tu/Ts, 2.45 μM release factor 2, 1.67 μM release factor 3, 4.9 μM ribosome recycling factor, 0.98 μM nucleoside-diphosphate kinase, 0.98 μM inorganic pyrophosphatase, 0.98 μM T7 RNA polymerase, 39.2 μM creatine kinase, 29.4 μM myokinase, 11.8 μM ribosome

3.2.2. Flexizyme の調製

まず、dFx の鋳型 DNA を作製について説明する。超純水を 80 μL、10x PCR buffer を 10 μL、200 mM MgCl₂ を 1 μL、5 mM each dNTP を 5 μL、211 μM Fx-5'.F36 を 0.47 μL、183 μM dFx.R46 を 0.55 μL、Taq DNA polymerase を 4 μL 混合した。この伸長反応液を、95°C で 1 分間加熱の後、『50°C で 1 分間、72°C で 1 分間』のサイ

クルを5回繰り返した。続いて、超純水を 3200 μL 、10x PCR buffer を 400 μL 、200 mM MgCl_2 を 40 μL 、5 mM each dNTP を 200 μL 、146 μM T7ex5.F22 を 27.4 μL 、176 μM dFx.R19 を 22.7 μL 、伸長反応液を 20 μL 、Taq DNA polymerase を 160 μL 混合した。この PCR 反応液を、95°C で 3 分加熱の後、『95°C で 40 秒間、50°C で 40 秒間、72°C で 40 秒間』のサイクルを 12 回繰り返した。次に、PCR 反応液に対して、phenol/chloroform 処理を行った。回収した上層に対して、3 M NaCl を溶液の 0.1 倍量、ethanol を 2 倍量加え、よく攪拌した後、13000 rpm で 15 分間遠心して、上清を除いた。その後、再度 13000 rpm で 5 分間遠心して、上清を除いた。さらに、70% ethanol, 0.1 M NaCl を 50 μL 加え、13000 rpm で 5 分間遠心して、上清を除いた。得られた沈殿を風乾した後、400 μL の 50 mM KCl に溶解させた。eFx の鋳型 DNA を作製する際には、dFx.R46 と dFx.R19 に代えて eFx.R45 と eFx.R18 をそれぞれ用いた。

超純水を 1380 μL 、10x T7 buffer を 400 μL 、100 mM DTT を 400 μL 、250 mM MgCl_2 を 480 μL 、2 N KOH を 60 μL 、25 mM each NTP を 800 μL 、6 μM T7 RNA polymerase を 80 μL 、上記の鋳型 DNA 溶液を 400 μL 混合し、37°C で 8 時間静置した。その後、DNase I を 40 μL 、100 mM MnCl_2 を 80 μL 加えて混合し、37°C で 30 分静置した。続いて、転写反応液に対して、0.5 M EDTA (pH 8.0) を溶液の 0.075 倍量、3 M NaCl を 0.1 倍量、2-propanol を等量加え、よく攪拌した後、13000 rpm で 5 分間遠心して、上清を除いた。その後、再度 13000 rpm で 5 分間遠心して、上清を除き、400 μL の超純水に溶解させた。次に、粗精製した転写産物に対して、等量の 2x RNA Loading buffer を加え、95°C で 3 分間加熱し、その全量を用いて、12%変性 PAGE (6 M Urea) を行った。泳動 buffer は 0.5x TBE とし、300 V で 120 分間電気泳動した。その後、TLC プレート上で UV 照射により転写産物のバンドを確認して、バンド部分のゲルを切り出し、50 mL 遠沈管内にて細かく砕いた。次に、0.3 M NaCl を 15 mL 加えて 2 時間震盪した後、上清 12.5 mL を 0.45 μm のフィルタで濾過した。濾過した上清に対して、ethanol を溶液の 2 倍量加え、よく攪拌した後、13000 rpm で 15 分間遠心して、上清を除いた。その後、70% ethanol を 10 mL 加え、再度 13000 rpm で 5 分間遠心して、上清を除いた。得られた沈殿を風乾し、200 μL の超純水に溶解させた。精製した Flexizyme は UV_{260} により濃度を決定し、超純水を用いて 250 μM に希釈した (1 OD = 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、Flexizyme の分子量 : 1.4×10^4)。

3.2.3. tRNA^{EnAsn} の調製

以下で用いたプライマー配列は、表 5 に示した。超純水を 80 μL 、10x PCR buffer を 10 μL 、200 mM MgCl_2 を 1 μL 、5 mM each dNTP を 5 μL 、20 μM EnAsn5'.F49 を 5 μL 、20 μM EnAsnGGA.R43 (tRNA^{EnAsn}_{GGA} 作製の場合) を 5 μL 、Taq DNA

polymerase を 2 μL 混合した。この伸長反応液を、95°C で 1 分間加熱の後、『50°C で 1 分間、72°C で 1 分間』のサイクルを 5 回繰り返した。続いて、超純水を 160 μL 、10x PCR buffer を 20 μL 、200 mM MgCl_2 を 2 μL 、5 mM each dNTP を 10 μL 、100 μM T7ex5.F22 を 1 μL 、100 μM EnAsn3'.R38 を 1 μL 、伸長反応液を 10 μL 、Taq DNA polymerase を 4 μL 混合した。この 1st PCR 反応液を、95°C で 3 分間加熱の後、『95°C で 40 秒間、50°C で 40 秒間、72°C で 40 秒間』のサイクルを 12 回繰り返した。さらに、超純水を 160 μL 、10x PCR buffer を 20 μL 、200 mM MgCl_2 を 2 μL 、5 mM each dNTP を 10 μL 、146 μM T7ex5.F22 を 1.37 μL 、178 μM EnAsn3.R20 を 1.13 μL 、1st PCR 反応液を 1 μL 、Taq DNA polymerase を 8 μL 混合した。この 2nd PCR 反応液を、95°C で 3 分間加熱の後、『95°C で 40 秒間、50°C で 40 秒間、72°C で 40 秒間』のサイクルを 12 回繰り返した。

超純水を 250 μL 、10x T7 buffer を 100 μL 、100 mM DTT を 100 μL 、250 mM MgCl_2 を 90 μL 、2 N KOH を 11.25 μL 、25 mM each NTP を 150 μL 、100 mM GMP を 50 μL 、6 μM T7 RNA polymerase を 50 μL 、鋳型 DNA の PCR 反応液を 200 μL 混合した。この転写反応液を、37°C で 8 時間静置した後、DNase I を 5 μL 、100 mM MnCl_2 を 20 μL 加えて混合し、37°C で 1 時間静置した。続いて、転写反応液に対して、0.5 M EDTA (pH 8.0) を溶液の 0.05 倍量、3 M NaCl を 0.1 倍量、2-propanol を等量加え、よく攪拌した後、13000 rpm で 5 分間遠心して上清を除き、100 μL の超純水に溶解させた。次に、粗精製した転写産物に対して、等量の 2x RNA Loading buffer を加え、95°C で 3 分間加熱し、その全量を用いて、8%変性 PAGE (6 M Urea) を行った。泳動 buffer は 0.5x TBE とし、300 V で 90 分間電気泳動した。その後、TLC プレート上で UV 照射により転写産物のバンドを確認して、バンド部分のゲルを切り出し、50 mL 遠沈管内にて細かく砕いた。次に、0.3 M NaCl を 5 mL 加えて 2 時間震盪した後、上清 12.5 mL を 0.45 μm のフィルタで濾過した。濾過した上清に対して、ethanol を溶液の 2 倍量加え、よく攪拌した後、13000 rpm で 15 分間遠心して、上清を除いた。その後、70% ethanol を 5 mL 加え、再度 13000 rpm で 5 分間遠心して、上清を除いた。得られた沈殿を風乾し、50 μL の超純水に溶解させた。精製した $\text{tRNA}^{\text{EnAsn}}_{\text{GGA}}$ は UV_{260} により濃度を決定し、超純水を用いて 250 μM に希釈した (1 OD = 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、 $\text{tRNA}^{\text{EnAsn}}_{\text{GGA}}$ の分子量: 2.44×10^4)。 $\text{tRNA}^{\text{EnAsn}}_{\text{GAG}}$ 、 $\text{tRNA}^{\text{EnAsn}}_{\text{GUG}}$ 、 $\text{tRNA}^{\text{EnAsn}}_{\text{GGU}}$ の調製は、上記の $\text{tRNA}^{\text{EnAsn}}_{\text{GGA}}$ の調製手順と、以下の点を除き同様に行なった、EnAsnGGA.R43 の代わりに、EnAsnGAG.R43、EnAsnGUG.R43、EnAsnGGU.R43 を用いた。

3.2.4. Microhelix RNA^{EnAsn} (MhRNA^{EnAsn})の調製

超純水を 88 μL 、10x T7 buffer を 10 μL 、198 μM GGCGT7.F17 を 1.01 μL 、215 μM

EnAsn-micro.R43 を 0.93 μL 混合した。この鋳型 DNA 溶液を、95°C で 3 分間加熱した後、室温で 5 分間置いた。続いて、超純水を 378 μL 、10x T7 buffer を 100 μL 、100 mM DTT を 100 μL 、250 mM MgCl_2 を 90 μL 、2 N KOH を 11.25 μL 、25 mM each NTP を 150 μL 、100 mM GMP を 50 μL 、6 μM T7 RNA polymerase を 20 μL 、鋳型 DNA 溶液を 100 μL 、RNase inhibitor を 1 μL 混合した。この転写反応液を、37°C で 8 時間静置した。その後、DNase I を 2.5 μL 、100 mM MnCl_2 を 10 μL 加えて混合し、37°C で 30 分間静置した。次に、転写反応液に対して、0.5 M EDTA (pH 8.0) を溶液の 0.05 倍量、3 M NaCl を 0.1 倍量、2-propanol を等量加えて攪拌した後、室温で 10 分間置いた。そして、13000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除いた後、50 μL の超純水に溶解させた。続いて、粗精製した転写産物に対して、等量の 2x RNA Loading buffer を加え、95°C で 3 分間加熱し、その全量を用いて、20%変性 PAGE (6 M Urea) を行った。泳動 buffer は 0.5x TBE とし、300 V で 120 分間電気泳動した。その後、TLC プレート上で UV 照射により転写産物のバンドを確認して、バンド部分のゲルを切り出し、50 mL 遠沈管内にて細かく砕いた。次に、0.3 M NaCl を 5 mL 加えて 2 時間震盪した後、上清を 0.45 μm のフィルタで濾過した。濾過した上清に対して、ethanol を溶液の 2 倍量加え、よく攪拌した後、13000 rpm で 15 分間遠心して、上清を除いた。その後、70% ethanol を 5 mL 加え、再度 13000 rpm で 5 分間遠心して、上清を除いた。得られた沈殿を風乾し、50 μL の超純水に溶解させた。精製した MhRNA^{EnAsn} は UV₂₆₀ により濃度を決定し、超純水を用いて 250 μM に希釈した (1 OD = 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、MhRNA^{EnAsn} の分子量 : 1.67×10^3)。

3.2.5. アミノ酸基質の調製

アミノ酸 CBT 体の合成 : 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (103 mg, 0.50 mmol) を 0.6 mL の ethyl acetate に溶かした。N-Boc-アミノ酸(0.50 mmol)、1-hydroxybenzotriazole (67 mg, 0.50 mmol)、4-chlorobenzyl mercaptan (95 mg, 0.60 mmol) を 1.2 mL の 1,4-dioxane に溶かした。これらを混合して得られた反応液を、室温で 12 時間攪拌し、アミノ酸のチオエステル化反応の進行を TLC で追跡した。沈殿を濾過により除いた後、濾液を遠心エバポレータで減圧した。diethyl ether (9 mL) を添加し、分液漏斗へ移した。0.1 M NaOH (5 mL) を添加し、分液操作により有機層を回収し、この操作を 3 回繰り返した。さらに、飽和食塩水(5 mL) を用いて同様の分液操作を行った。回収した有機層に、 MgSO_4 固体を加えて乾燥を行なった後、沈殿を濾過によって除いた後、濾液を遠心エバポレータで減圧した。Boc 基の脱保護のため、2 mL の 4 M 塩化水素酢酸エチル溶液を加え、室温で 30 分置いた後に、遠心エバポレータで減圧した。さらに、HCl を除くため、diethyl ether (3 mL) を添加し、遠心エバポレータで減圧して乾燥させる過程を、3 回繰り返して行なった。最後に、真空中ポンプで減圧し、完全

に乾燥させた。

アミノ酸 CME 体の合成：0.2 mL の chloroacetonitrile、0.2 mL の *N,N*-dimethylformamide、triethylamine (56 mg, 0.55 mmol)、*N*-Boc-アミノ酸(0.50 mmol)を混合した。この反応液を、室温で 12 時間攪拌し、アミノ酸シアノメチルエステル化反応の進行を TLC で追跡した。また、反応中は pH を測定し、triethylamine を加えることで、塩基性に保った。反応終了後、diethyl ether (10 mL)を添加し、分液漏斗へ移した。0.1 M HCl (5 mL)を添加し、分液操作により有機層を回収し、この操作を 3 回繰り返した。さらに、飽和 NaHCO₃ 水溶液(5 mL)を用いて 3 回、飽和食塩水(5 mL)を用いて 1 回、同様の分液操作を行った。回収した有機層に、MgSO₄ 固体を加えて乾燥を行なった後、沈殿を濾過によって除いた後、濾液を遠心エバポレータで減圧した。Boc 基の脱保護は、CBT 体と同様の手順で行なった。

アミノ酸 DBE 体の合成：0.2 mL の *N,N*-dimethylformamide に、*N*-Boc-アミノ酸(0.50 mmol)、3,5-Dinitrobenzyl chloride (119 mg, 0.55 mmol)、triethylamine (56 mg, 0.55 mmol)を混合した。これらを混合して得られた反応液を、室温で 12 時間攪拌し、アミノ酸のジニトロベンジルエステル化反応の進行を TLC で追跡した。反応終了後、diethyl ether (10 mL)を添加し、分液漏斗へ移した。0.1 M HCl (5 mL)を添加し、分液操作により有機層を回収し、この操作を 3 回繰り返した。さらに、飽和 NaHCO₃ 水溶液(5 mL)を用いて 3 回、飽和食塩水(5 mL)を用いて 1 回、同様の分液操作を行った。回収した有機層に、MgSO₄ 固体を加えて乾燥を行なった後、沈殿を濾過によって除いた後、濾液を遠心エバポレータで減圧した。Boc 基の脱保護は、CBT 体と同様の手順で行なった。

3.2.6. D 体アミノ酸を用いたアミノアシル化効率の測定

アミノ酸活性化体として DBE を用いる場合、Flexizyme は dFx を使った。アミノ酸活性化体として CME または CBT を用いる場合、Flexizyme は eFx を使った。超純水を 1.5 μ L、1 M HEPES-K (pH 7.5)を 0.5 μ L、250 μ M Flexizyme を 0.5 μ L、250 μ M MhRNA^{EnAsn} を 0.5 μ L 混合し、95°C で 2 分間加熱した。さらに、室温で 5 分間置いた後、3 M MgCl₂ を 1 μ L 加えて、アシル化 pre-mix 溶液とした。このアシル化 pre-mix 溶液に対して、それぞれ 25 mM のアミノ酸活性化体の DMSO 溶液または DMSO を 1 μ L 加えて、氷上で静置した。各アミノ酸について、静置した時間は表 6 に示した。その後、5 μ L のアミノアシル化反応液に対して、10 μ L の 2x Loading buffer for Acid PAGE を加え、そのうちの 3 μ L を 18%変性 acid-PAGE (6 M Urea) により解析した。泳動 buffer は 100 mM AcONa (pH 5.0) とし、150 V で 110 分間電気泳動した。ゲルを、0.5x TBE 中で 10 分震盪の後、EtBr 染色液中で 10 分間震盪し、さらに超純水中で 3 分間震盪した。染色したゲルを PharoS-FX (BioRad 社) で撮影し、バンドの強

度を Image lab (BioRad 社) で定量した。

3.2.7. アミノアシル tRNA の調製

アミノ酸活性化体として DBE を用いる場合、Flexizyme は dFx を使った。アミノ酸活性化体として CME または CBT を用いる場合、Flexizyme は eFx を使った。超純水を 1.5 μL 、1 M HEPES-K (pH 7.5) を 0.5 μL 、250 μM Flexizyme を 0.5 μL 、250 μM tRNA を 0.5 μL 混合し、95°C で 2 分間加熱した。さらに、室温で 5 分間置いた後、3 M MgCl_2 を 1 μL 加えて、アシル化 pre-mix 溶液とした。このアシル化 pre-mix 溶液に対して、それぞれ 25 mM のアミノ酸活性化体の DMSO 溶液を 1 μL 加えて、氷上で静置した。各アミノ酸について、静置した時間は表 6 に示した。その後、5 μL のアミノアシル化反応液に対し、0.3 M AcONa (pH 5.0) を 20 μL 、ethanol を 50 μL 加え、よく攪拌した後、13000 rpm で 10 分間遠心して、上清を除いた。次に、70% ethanol 0.1 M AcONa を 50 μL 加え、13000 rpm で 10 分間遠心して上清を除く、という操作を 2 回行った。さらに、70% ethanol 5 mM AcONa を 50 μL 加え、13000 rpm で 5 分間遠心して上清を除き、得られた沈殿を風乾した後、0.5 μL の 10 mM AcONa (pH 5.0) に溶解させた。

3.2.8. モデルペプチドの鋳型 DNA の調製

以下で用いたプライマー配列は、表 7 に示した。モデルペプチドの名称と配列は、表 8 に示した。超純水を 83 μL 、10x PCR buffer を 10 μL 、200 mM MgCl_2 を 1 μL 、5 mM each dNTP を 5 μL 、100 μM T7proSD6MKK.F49 を 1 μL 、100 μM SD6MKKK(UCC)flag.R42 (鋳型 D1 作製の場合) を 1 μL 、Taq DNA polymerase を 2 μL 混合し、95°C で 1 分間加熱の後、『50°C で 1 分間、72°C で 1 分間』のサイクルを 5 回繰り返した。さらに、超純水を 166 μL 、10x PCR buffer を 20 μL 、200 mM MgCl_2 を 2 μL 、5 mM each dNTP を 10 μL 、200 μM T7ex5.F22 を 0.5 μL 、200 μM flaguua.R33 を 0.5 μL 、伸長反応液を 2 μL 、Taq DNA polymerase を 2 μL 混合し、95°C で 3 分間加熱の後、『95°C で 40 秒間、50°C で 40 秒間、72°C で 40 秒間』のサイクルを 12 回繰り返した。続いて、200 μL の PCR 反応液に対して、phenol/chloroform 処理を行った。回収した上層に対して、3 M NaCl を溶液の 0.1 倍量、ethanol を 2 倍量加え、よく攪拌した後、13000 rpm で 15 分間遠心して、上清を除いた。次に、70% ethanol を 50 μL 加え、13000 rpm で 5 分間遠心して上清を除き、再度 70% ethanol を 50 μL 加え、13000 rpm で 5 分間遠心して、上清を除いた。得られた沈殿を風乾した後、10 μL の超純水に溶解させた。ただし、mRNA R2 の鋳型 DNA の作製に当たっては、T7SD6MKK.F49 に代えて T7eSD6M.F46 を用いた。

3.2.9. アミノ酸のペプチドへの導入効率の測定

翻訳反応：超純水を 0.56 μL 、5 mM KYM mix (5 mM each Lysine, Tyrosine, Methionine) を 0.2 μL 、465 μM [^{14}C]Asp を 0.22 μL 、mRNA の鋳型 DNA を 0.2 μL 、250 μM アミノアシル tRNA を 0.4 μL 、HsolA を 0.22 μL 、HsolB (4 ARS) を 0.2 μL 混合し、37°C で 60 分間静置した。

tricine SDS-PAGE とオートラジオグラフィ：2 μL の翻訳反応液に等量の 2x tricine SDS-PAGE Loading buffer を加え、95°C で 5 分間加熱し、その全量を用いて、tricine SDS-PAGE を行った。分離ゲルの組成は、15% acrylamide, 1 M Tris-HCl (pH 8.45), 0.1% SDS, 10.4% glycerol である。陰極側泳動バッファーは 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M Tricine-HCl, 0.1% SDS (pH 8.1)、陽極側泳動バッファーは 0.2 M Tris-HCl (pH 8.9) とし、40 mA で 40 分間電気泳動した。その後、ゲルを 80°C で 30 分間乾燥し、RI プレートに一晩転写した。転写したプレートは、Pharos-FX (BioRad 社) で撮影し、バンドの強度を Image lab (BioRad 社) で定量した。

ペプチドの質量分析：翻訳反応には通常の Asp を用いた。まず、solid phase extraction column (SPE column) に elution 溶液を 15 μL 加えて遠心した後、wash 溶液を 15 μL 加えて遠心した。次に、翻訳反応液を 2 μL 加えて遠心した後、wash 溶液を 15 μL 加えて遠心するという操作を 2 回行った。さらに、matrix 溶液を 1.5 μL 加えて、SPE column をシリンジの先に付け、ターゲットプレート上に押し出した。MALDI-TOF-MS (Autoflex®, BRUKER) を用いて質量分析を行った。較正は、substance P (1,348.66 Da)、bombesin (1,620.88 Da)、ACTH clip 1-17 (2,094.46 Da)、somatostatin 28 (3,149.61 Da) を用いて行った。質量分析に用いた溶液の組成を以下に示す。

- elution 溶液：80%アセトニトリル、0.5%酢酸
- wash 溶液：4%アセトニトリル、0.5%酢酸
- matrix 溶液：80%アセトニトリル、0.5%酢酸、飽和 α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸(CHCA)

3.3. 結果・考察

本研究で用いるアミノ酸として、前述の通り、標準アミノ酸のうち、鏡像異性体を持たない Gly を除いた 19 種類の L 体アミノ酸(L-Ala, L-Leu, L-Met, L-Pro, L-Ser, L-Thr, L-Cys, L-Asn, L-Gln, L-Asp, L-Glu, L-Arg, L-Lys, L-His, L-Val, L-Ile, L-Phe, L-Tyr, L-Trp) と、これに対応する 19 種類の D 体アミノ酸を用意した(D-Ala, D-Leu, D-Met, D-Pro, D-Ser, D-Thr, D-Cys, D-Asn, D-Gln, D-Asp, D-Glu, D-Arg, D-Lys, D-His, D-Val, D-Ile, D-Phe, D-Tyr, D-Trp)。Flexizyme の触媒するアミノアシル化反応に使用するため、これらのアミノ酸を用いて、予め化学合成により活性化体を準備した。各アミノ酸に適した活性化体として、芳香環を持つ Phe, Tyr, Trp についてはシアノメチルエステル体(aa-CME)、 β 位で分岐を持つ Val, Ile についてはクロロベンジルチオエステル体(aa-CBT)、それ以外のアミノ酸についてはジニトロベンジルエステル体(aa-DBE)を選択した。

3.3.1. D 体アミノ酸の Flexizyme によるアミノアシル化

我々は、D 体アミノ酸を結合したアミノアシル tRNA の調製を行なうため、Flexizyme を用いたアミノアシル化法を利用した。使用する Flexizyme は、DBE 体を用いる場合には dFx を、CBT 体または CME 体を用いる場合には eFx とした。本研究で、D 体アミノ酸を導入するために使用する tRNA は、20 種類の ARS のどれにも認識されないよう改変された tRNA^{EnAsn}_{GGA} であり¹⁵²、翻訳系内で ARS に誤ってアミノアシル化されて、D 体アミノ酸に混じって導入されることがないように設計した。まず、実際に tRNA に対してアミノアシル化を行う前に、MhRNA^{EnAsn} を用いた、アシル化反応の効率測定を行なった。なお、第 5 章で述べる、4 塩基 RNA 基質を用いたアミノアシル化効率測定法は、この研究当時は開発されていなかった。各 L 体および D 体アミノ酸を用いて、Flexizyme により MhRNA をアミノアシル化し、その産物を酸性条件の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した (図 18)。その結果、用いた全てのアミノ酸でアミノアシル化が進行したが、そのアシル化効率はアミノ酸によって異なっており、15%–70%と開きがあった。なお、アシル化効率は対応する L 体と D 体アミノ酸で同程度であったが、これは、アミノ酸の側鎖の構造によって、Flexizyme との親和性や、活性化体の反応性が異なるためであると考えられる。

3.3.2. D-Ala のペプチドへの翻訳導入の試み

まずは、D 体アミノ酸の中で、最も構造が単純な D-Ala の、モデルペプチド P1: fMKKK-X-FLAG (FLAG: DYKDDDDK)への翻訳導入を試みた (図 19A)。Flexizyme を用いて調製した D-Ala-tRNA^{EnAsn}_{GGA} を、大腸菌由来の再構成無細胞翻訳系に添加した。本研究で用いた再構成無細胞翻訳系に含まれる ARS は、Met, Tyr, Asp, Lys に対応す

るもののみであり、SerRS は含まれないため、本来 Ser に対応する UCC コドンは空コドンとなっている。そのため、リボソームが D-Ala をペプチド中へ導入を触媒する活性を持てば、モデルペプチド P1 中の X の位置に D-Ala が導入された全長ペプチドが合成されることになる。合成されたモデルペプチド P1 の検出のため、翻訳系に添加するアミノ酸のうち、Asp のみは ^{14}C によって放射性ラベルされた [^{14}C]Asp を使用した。モデルペプチド P1 の配列では、D-Ala が割り当てられる X のコドンよりも下流側にのみ Asp のコドンが含まれるため、X に D-Ala が導入された全長のペプチド P1 のみが、 [^{14}C]Asp 放射性ラベルされることになる。この産物を tricine SDS-PAGE によって展開した後に、オートラジオグラフィで観測することで、D-Ala を含むペプチド P1 のみを検出、定量することができる。

実際に翻訳産物の解析を行ったところ、tricine SDS-PAGE によって、D-Ala を含むペプチド P1 のバンドが検出された (図 19B)。このバンド強度を定量し、同様の実験を L-Ala を用いて行なった場合のペプチド P1 の収量を 100% として表すと、相対収量 86% で D-Ala を含むペプチド P1 が得られたことが分かった。さらに、興味深いことに、L-Ala を用いた場合と比べると、D-Ala を用いた場合には、tricine SDS-PAGE のバンドが上にシフトした位置に現れた。これは、変性条件下である tricine SDS-PAGE においても、モデルペプチド P1 がある程度の立体構造を保持しており、X の位置に導入される Ala が L 体であるか D 体であるかによって、この構造が影響を受け、泳動度に変化を生じたものと考えられる。このバンドシフトによって、D-Ala を用いた場合に得られた翻訳産物は、少なくとも、L-Ala が誤って導入された産物ではない、ということが分かった。さらに、我々は、合成されたモデルペプチド P1 の MALDI-TOF-MS による解析も行い、X の位置に導入されたアミノ酸が、指定された通り Ala であるかを検証した (図 19C)。その結果、得られた主たるピークの質量実測値は、X の位置に Ala が導入された場合のモデルペプチド P1 の質量の計算値とほぼ一致した。以上、tricine SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS の 2 つの結果を合わせて判断すれば、翻訳系において、D-Ala が導入されたペプチド P1 が、L-Ala を用いた場合と近い収率で得られた、ということが分かる。

3.3.3. 様々な D 体アミノ酸のペプチドへの翻訳導入の試み

D-Ala のモデルペプチド P1 への翻訳導入に成功した結果を受けて、我々は、D-Ala を含む 19 種類全ての D 体アミノ酸を用いた、翻訳反応への適合性の評価へと進んだ。19 種類の D 体アミノ酸と、コントロールとして用意したこれに対応する 19 種類の L 体アミノ酸を用いて、アミノアシル tRNA を調製し、D-Ala で行なった実験と同様の手法で、モデルペプチド P1 への翻訳導入が可能であるか検証した (図 19B)。まず、コントロールである L 体アミノ酸を用いた場合には、tricine SDS-PAGE による解析

において、翻訳されたモデルペプチド P1 に対応する濃い 1 本のバンドが検出された。なお、Cys を用いた場合のみ、バンドが複数本に分かれたが、これは、Cys がチオール基を持つため、無細胞翻訳系内に存在する β -mercaptoethanol 等、他のチオール基を持つ化合物と結合した産物であると考えられる。また、L 体アミノ酸毎に、ペプチド P1 の収量は異なっていたが、これは、アミノアシル tRNA の合成効率と、翻訳系中の加水分解に対する安定性の違いによって生じていると考えられる。続いて、D 体アミノ酸を用いた場合には、tricine SDS-PAGE による解析で、15 種類の D 体アミノ酸(D-Ala, D-Leu, D-Met, D-Ser, D-Thr, D-Cys, D-Asn, D-Gln, D-Arg, D-Lys, D-His, D-Val, D-Ile, D-Phe, D-Tyr)について、対応する L 体アミノ酸と比べて、上にシフトした位置にバンドが得られた。得られたバンドの強度は、L-Ala を用いて行なった場合のペプチド P1 の収量を 100%として表した。D-Trp でもバンドは得られたものの、L-Trp を用いた場合のバンドよりも下にシフトしていた。このシフトによって、Trp を含むこれら 16 種類の D 体アミノ酸を用いて得られた翻訳産物は、少なくとも、対応する L 体アミノ酸が誤って導入されたペプチドではない、ということが示された。一方、残り 3 種類の D 体アミノ酸(D-Asp, D-Glu, D-Pro)では、全くバンドが見られなかった。

続いて、設計通りの D 体アミノ酸がペプチドに導入されたことを確認するため、MALDI-TOF-MS による解析を行なった結果、12 種類の D 体アミノ酸(D-Ala, D-Ser, D-Cys, D-Met, D-Thr, D-His, D-Phe, D-Tyr, D-Asn, D-Gln, D-Val, D-Leu)では、全長のペプチド P1 の質量に相当するピークが、唯一のピークとして得られた (図 19C)。残りの D 体アミノ酸のうち、2 種類(D-Arg, D-Trp)については、全長のペプチド P1 の質量に相当するピークが一部検出されたものの、D 体アミノ酸を含む短いペプチド(D-Arg-FLAG, D-Trp-FLAG)に相当するピークも同時に検出された。一方、それ以外の 5 種類の D 体アミノ酸(D-Lys, D-Asp, D-Glu, D-Ile, D-Pro)では、副産物も含めて同定可能なピークは得られなかった。なお、D-Arg, D-Trp で見られた短いペプチドは、次のような過程を経て合成されたものと考えられる。翻訳反応が D 体アミノ酸の前まで進行し、D-Arg/Trp-tRNA がリボソームのペプチド結合転移反応の反応中心 (Peptidyl Transferase Center: PTC) のアミノアシル tRNA 結合サイト (A-site) に運ばれる。A-site において D-Arg/Trp の反応性が低いためペプチド転移反応が進まず、既に合成されていたペプチジル tRNA (fMKKK-tRNA) がペプチジル tRNA 結合サイト (P-site) から脱落してしまう^{153,154}。これは、D 体アミノ酸のペプチド転位反応の効率が低いために、ペプチジル tRNA の脱離の方が早く進行してしまうためと考えられる。通常は、これで翻訳反応は止まってしまうはずだが、D-Arg/Trp-tRNA が P-site へ移動するトランスロケーション反応が進行し、その後、下流の FLAG 部分の翻訳合成が引き続き行われることで、短いペプチド D-Arg/Trp-FLAG が合成されることが考えられる。

3.3.4. 翻訳系への適合性に基づく D 体アミノ酸のグループ分け

ここまで、tricine SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS の 2 つの手法を用いることで、D 体アミノ酸の翻訳系によるペプチドへの導入について解析してきた。その結果に基づき、本研究で用いた 19 種類の D 体アミノ酸を、3 つのグループに分類した。分類の基準として、1 点目に、tricine SDS-PAGE での、D 体アミノ酸を含むペプチド P1 の収量を用いた。なお、収量は、L-Ala を用いて行なった場合のペプチド P1 の収量を 100%とした相対量で表した。基準の 2 点目は、MS において、D 体アミノ酸が正しく導入された全長のペプチド P1 が確認できたか否かとした。

グループ 1 は、ペプチド P1 の相対収量が 40%以上の高い導入効率を示し、MS で全長のペプチド P1 の合成が確認できた 8 種類の D 体アミノ酸 (D-Ala, D-Ser, D-Cys, D-Met, D-Thr, D-His, D-Phe, D-Tyr) とした。これらは翻訳伸長反応に高い適合性を持つ D 体アミノ酸と言える。これらの中でも特に、4 種類の D 体アミノ酸(D-Ala, D-Ser, D-Cys, D-His)については、その導入効率が、対応する L 体に匹敵するほど高かった。グループ 1 に含まれる D 体アミノ酸の特徴として、嵩高くないアルキル鎖、または嵩高くない芳香環を側鎖に持つことが挙げられる。続いて、グループ 2 は、ペプチド P1 の相対収量が 40%未満と導入効率は高くないが、MS で全長のペプチド P1 の合成が確認できた 4 種類の D 体アミノ酸 (D-Asn, D-Gln, D-Val, D-Leu) とした。これらは翻訳伸長反応に利用可能であるものの、その適合性は中程度にとどまる D 体アミノ酸である。グループ 2 に含まれる D 体アミノ酸の特徴として、電荷を持たない親水性の側鎖や、アルキル鎖を側鎖に持つことが挙げられる。ここまでの、本研究において、翻訳伸長反応に適合したと判断した D 体アミノ酸である。なお、これまでにペプチドへの導入が一度でも報告された D 体アミノ酸 (D-Ala, D-Met, D-Phe, D-Tyr) は、全てグループ 1 に含まれた。一方、他 8 種類の D 体アミノ酸 (D-Ser, D-Cys, D-Thr, D-His, D-Asn, D-Gln, D-Val, D-Leu)については、翻訳伸長反応に適合した D 体アミノ酸として、本研究で初めて見出されたものである。

最後に、グループ 3 は、MS で全長のペプチド P1 が検出されなかった、または全長のペプチド P1 と同時に短いペプチドが検出された、計 7 種類の D 体アミノ酸 (D-Arg, D-Lys, D-Asp, D-Glu, D-Ile, D-Trp, D-Pro) とした。これらは翻訳伸長反応に適合しない、または適合性が非常に低い D 体アミノ酸である。グループ 3 に含まれるのは、嵩高いアルキル鎖または芳香環を側鎖に持つ D 体アミノ酸、電荷を持つ D 体アミノ酸、2 級アミンを含む D-Pro であった。

以上のグループ分けの結果から、D 体アミノ酸の側鎖の構造と、その翻訳導入効率との間には、明らかな関係性があることが分かる。このような関係性が生じる原因として、第一に考えなければならないのは、D 体アミノ酸の側鎖の構造によって、アミノアシル tRNA の合成効率と、加水分解に対する安定性が、異なるという点である。

ただし、アミノアシル化効率は、前述のように、対応する D 体アミノ酸と L 体アミノ酸とで、同程度であるにも関わらず (図 18)、翻訳導入効率については、対応する D 体と L 体で同程度とはなっていない。このことは、さらなる別の要因が、翻訳導入効率に影響を与えていることを示している。そこで、次の 2 点の可能性について考えた。1 点目は、D 体アミノ酸毎に、アミノアシル tRNA と伸長因子 Tu (EF-Tu) の親和性が異なる可能性である。生体内の翻訳系における標準の L 体アミノ酸の場合、アミノアシル tRNA と EF-Tu の親和性は、全てのアミノ酸で同程度である。しかし、これはアミノ酸毎に適切な tRNA にアシル化されているためであって、実際に、特定の 14 種類の tRNA に様々なアミノ酸を結合した研究では、アミノ酸毎に、アミノアシル tRNA の EF-Tu との親和性に差が生じることが報告されている^{155,156}。D 体アミノ酸の場合にも同様の性質があると考え、様々な D 体アミノ酸を tRNA^{EnAsn}_{GGA} に結合して使用した本実験系では、D 体アミノアシル tRNA 毎に、EF-Tu との親和性が異なり、リボソームへの輸送されやすさに差が生じる可能性が考えられる。2 点目は、リボソーム PTC への、アミノアシル tRNA の親和性、または、ペプチド転位反応の活性が、D 体アミノ酸毎に異なる可能性である。この可能性を考える根拠として、ピューロマイシンのアミノ酸構造部分を D 体アミノ酸型に改変した誘導体を使用した、翻訳阻害実験がある。この実験では、D 体アミノ酸の側鎖の構造によって、その翻訳阻害能 (IC₅₀) が異なるという研究結果が報告されている^{157,158}。ピューロマイシン誘導体は、EF-Tu の輸送無しにリボソームに取り込まれ、翻訳阻害能を発揮することから、この差を生じる原因は EF-Tu との親和性ではなく、リボソームとの親和性またはペプチド転位反応の活性が、D 体アミノ酸毎に異なることが示唆されている。さらに、興味深いことに、N-メチルアミノ酸の翻訳適合性を調べた先行研究⁴⁹、さらに、第 4 章で述べる、β-アミノ酸の翻訳適合性を調べた研究⁵⁴においても、D 体アミノ酸で見られた。アミノ酸側鎖の構造とペプチドへの翻訳導入効率の関係性と類似ものが見出されている。

3.3.5. D 体アミノ酸の導入効率が上流の配列に依存しないかの検証

ここまでの D 体アミノ酸の翻訳伸長反応への適合性についての解析は、全て同じ配列のモデルペプチド P1 を翻訳合成することによって行ってきた。しかし、モデルペプチド P1 には、D 体アミノ酸の上流に正電荷を持つアミノ酸である Lys が 3 残基連続しており、下流の D 体アミノ酸の導入に影響を与えている可能性がある。これを検証するため、モデルペプチド P1 に加えて、fM-YYY-X-FLAG の配列を持つモデルペプチド P2 を用意し、3 種類の D 体アミノ酸(D-Ser, D-Leu, D-Glu)を用いて、ペプチド P2 への導入効率の測定を行なった (図 20)。その結果、モデルペプチド P1 と P2 で、ペプチドの収量は異なったものの、3 種類の D 体アミノ酸の相対的な収量は、モデル

ペプチドに依らないことが分かった。この結果は、D 体アミノ酸の上流の配列は、D 体アミノ酸の導入効率にあまり影響しないことを示している。つまり、今回モデルペプチド P1 を用いて明らかにした D 体アミノ酸の導入効率は、他の配列のペプチドへの導入においても適応できる一般性を持った結果であると考えられる。

3.3.6. L-Ser または D-Ser を含むペプチドの合成の経時測定

1 残基の D 体アミノ酸のペプチド P1 への導入の結果、D 体アミノ酸の中には、グループ 1 のように、ペプチド収量に関して、L 体アミノ酸に匹敵するものが存在することが分かった。ただし、ここまでの解析は、反応時間を 1 時間と定めたエンドポイントでの測定によるものだったため、次は、経時測定により、ペプチド合成速度の観点から、D 体アミノ酸と L 体アミノ酸の比較を行なった。用いるアミノ酸としては、グループ 1 から、D 体の導入効率がほぼ L 体と同程度で、ペプチド P1 の絶対収量も高い Ser を選択した。D-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} と L-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} を調製し、それぞれ別個の再構成無細胞翻訳系に加えて、ペプチド P1 の翻訳合成量の経時変化を計測した。その結果、L-Ser を含むペプチドと、D-Ser を含むペプチド P1 の翻訳合成量の経時的な変化は、概ね一致していることが分かった (図 21)。前述のように、L 体アミノ酸と D 体アミノ酸では、アミノアシル tRNA の、EF-Tu またはリボソーム A-site への親和性が異なる可能性があるため、tRNA 濃度を、従来の 50 μ M から下げ、25 μ M または 6 μ M とすることで、L 体と D 体アミノ酸で、ペプチド合成速度に違いが現れるのではないかと考えた。しかし、アミノアシル tRNA 濃度が低濃度(25 μ M, 6 μ M) の場合でも、50 μ M の場合と同様に、ペプチド P1 の翻訳合成量の経時的な変化は、L 体と D 体アミノ酸で概ね一致した。以上の結果から、グループ 1 に属する D 体アミノ酸は、これを含むペプチド合成速度の点でも、L 体アミノ酸に匹敵することが明らかになった。

3.3.7. L-Ser と D-Ser の導入を競合させた条件でのペプチド合成の経時測定

翻訳反応における L 体と D 体アミノ酸の違いについて、さらに詳細に解析するため、次に、L 体と D 体アミノ酸の翻訳導入が競合する条件での、それぞれのアミノ酸を含むペプチド合成速度の比較を行なった (図 22A)。これまでと同様に Ser を代表として用い、競合状態を作り出すために、再構成無細胞翻訳液に、L-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} と D-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} とを等量ずつ加えた。翻訳反応が進行すれば、L-Ser を含むペプチド P1 と D-Ser を含むペプチド P1 の両方が、翻訳反応液中に生成することになるが、これを tricine SDS-PAGE により解析することで、移動度の異なる別々のバンドとして分離、定量することができる。

まずは、翻訳反応液中の L-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} と D-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} をそれぞれ 25

μM とする条件で解析を行った結果、L-Ser を含むペプチド P1 に対する D-Ser を含むペプチド P1 の合成の相対量は 0.37 (図 22B) 程度となった。L-Ser と D-Ser 単独での経時測定では、D-Ser を含むペプチド P1 の相対量は 0.85 (図 21) 程度まで上昇していたことと比較して、競合条件にすることで、合成量の大幅な低下が見られた。また、D-Ser を含むペプチド P1 の合成は、単独での経時測定では、反応開始と同時に速やかに始まり、L-Ser を用いた場合と変わらなかったのに対し、競合条件では、L-Ser を含むペプチド P1 の合成が進行した後に遅れて始まることが分かった。このことから、単独では、ペプチド合成速度の点において、L 体と差が無い D 体アミノ酸を用いても、L 体と D 体アミノ酸の翻訳導入が競合する状況では、L 体アミノ酸の導入が優先的に進行することが明らかになった。

この結果は、L-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} に比べて、D-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} の方が伸長因子 EF-Tu またはリボソームの A-site に対する親和性が低いという仮説で説明できる。今回用いた翻訳反応液中の EF-Tu 濃度は 10 μM 、リボソームは 1.2 μM であるのに対し、加えた両アミノアシル tRNA の濃度は各 25 μM と高い。よって、EF-Tu またはリボソーム A-site に対する親和性がより高い L-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} によって、EF-Tu またはリボソーム A-site が独占されてしまい、D-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} が結合できなくなったと考えられる。この仮説を検証するため、Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} 濃度をそれぞれ 6 μM と低くした条件で同様の実験を行った。その結果、L-Ser を含むペプチド P1 に対する D-Ser を含むペプチド P1 の合成の相対量は 0.60 程度まで上昇した (図 22B)。また、D-Ser を含むペプチド P1 の合成開始が、25 μM の条件では 10 分頃であったのに対し、5 分頃に早まっており、これは、L-Ser が短時間で枯渇したためと考えられる。この結果は、両アミノアシル tRNA 濃度を下げたことにより、EF-Tu またはリボソーム A-site が、L-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} により独占されなくなり、D-Ser-tRNA^{EnAsn}_{GGA} が結合できるようになったと説明でき、前述の仮説を支持している。

3.3.8. 2 残基の D 体アミノ酸のペプチドへの翻訳導入の試み

さらに我々は、D 体アミノ酸のペプチドへの 2 残基連続導入が可能であるかの検証を行った。対象とする D 体アミノ酸として、グループ 1 から、いずれも導入効率の高かった Ala と Phe を選択し、L 体と D 体の両方を用い、mRNA R3 のコードするモデルペプチド P3 の翻訳を試みた (図 23A)。その結果、まず、L 体アミノ酸(L-Ala, L-Phe) を用いた場合には、tricine SDS-PAGE 解析により、翻訳産物のバンドは、濃い一本のバンドとして検出された (図 23B)。さらに、MS 解析により、得られた翻訳産物は、2 残基の L-Ala または L-Phe が、設計通り導入された全長のモデルペプチド P3 であることが確認された (図 23C)。一方、D 体アミノ酸(D-Ala, D-Phe)を用いた場合には、tricine SDS-PAGE 解析においては、非常に薄いながらバンドが見られたもの

の(図 23B)、MS 解析では、2 残基の D 体アミノ酸を含む全長のペプチド P3 のピークは見られず、代わりに、D 体アミノ酸を 1 残基のみ含む副産物のペプチドのピークが検出された(図 23C)。また、D-Phe の 2 連続導入では、D-Phe-FLAG の配列を持つ、短い副産物のペプチドも検出された。これらの結果は、ペプチド中に 1 残基導入する場合の効率が高い D 体アミノ酸を用いても、連続的な導入はできないということを示している。この原因として、D 体アミノ酸がリボソーム P-site, A-site の両方にある場合に、ペプチド転位反応に関わる官能基(A-site のアミノ酸のアミノ基、P-site のアミノ酸のカルボニル基)の配向が L 体アミノ酸の場合と異なり、反応性が低下する可能性が考えられる。特に D 体アミノ酸が A-site にある場合については、本研究の内容を発表した後に、結晶構造解析や構造モデルを用いた考察が行われており、この詳細については後に解説する(3.3.9.参照)。同様に D 体アミノ酸が P-site にある場合にも反応性の低下が起きると考えると、連続導入の際には P-site, A-site 共に D 体アミノ酸が占める状況が起きるため、反応性が極端に低下し、合成が進行しなかった可能性が考えられる。質量分析で検出された副産物のペプチドの生成過程については次のように説明が可能である。2 残基目の D 体アミノ酸の導入の反応性が低いため、ペプチド転移反応を経ずにトランスロケーションが進んでしまう現象であるリボソームホッピング¹⁵⁹、または、ペプチジル tRNA の脱落^{153,154}が起きたと考えられる。リボソームホッピングが起きた場合、D 体アミノ酸を 1 残基のみ含むペプチドが得られる。また、ペプチジル tRNA の脱落后に、下流のペプチド合成反応がそのまま進行してしまった場合、D-Phe-FLAG の配列を持つ、短いペプチドが合成される。

以上の結果から、我々は、D 体アミノ酸から D 体アミノ酸へのペプチド転位反応の効率が低いと考え、2 残基の D 体アミノ酸の間に L 体アミノ酸(L-Tyr)を挿入することで、D 体アミノ酸 2 残基のペプチドへの導入効率が改善するのではないかと予想した。そこで、我々は、2 残基の D 体アミノ酸の間に、1-3 残基の L 体アミノ酸(L-Tyr)を配置した、モデルペプチド P4-P6 を設計し(図 23A)、翻訳反応による合成を試みた。まず、間に 1 残基の L-Tyr を挿入した、モデルペプチド P4 の翻訳を行い、tricine SDS-PAGE により解析した結果、L 体アミノ酸(L-Ala, L-Phe)を用いた場合には、濃い 1 本のバンドが見られたのに対し、D 体アミノ酸(D-Ala, D-Phe)を用いた場合には、バンドは得られなかった(図 23B)。さらに、MS 解析でも、2 残基の D 体アミノ酸を含む全長ペプチド P4 のピークは見られなかった(図 23C)。D-Phe を用いた場合の MS 解析では、D 体アミノ酸を 1 残基のみ含む副産物のペプチドのピークが検出されており、これは P3 の翻訳と同様に、リボソームのホッピングによって生じたものと考えられる。以上より、2 残基の D 体アミノ酸の間に、1 残基の L 体アミノ酸(L-Tyr)を配置したペプチドの設計をしても、D 体アミノ酸 2 残基のペプチドへの導入はできないことが明らかになった。

一方、2 残基の D 体アミノ酸の間に配置する L 体アミノ酸(L-Tyr)が、2, 3 残基と増えたモデルペプチド P5, P6 の翻訳においては、L 体アミノ酸と D 体アミノ酸のどちらを用いた場合でも、tricine SDS-PAGE で、1 本のバンドが検出された。MS 解析では、どちらの D 体アミノ酸を用いた場合でも、モデルペプチド P5, P6 に相当する質量のピークが検出された。これらの結果から、間に 2 残基以上の L-Tyr を挿入することで、2 残基の D 体アミノ酸(D-Ala, D-Phe)のペプチドへの翻訳導入が可能になることが分かった。ただし、D-Phe の場合には、2 残基の L-Tyr の挿入で導入は確認されたものの、高い導入効率を得るためには、3 残基の挿入が必要であり、D 体アミノ酸毎に、間に挿入する必要のある L 体アミノ酸の数に違いが見られた。また、一部の条件では、2 残基目の D 体アミノ酸の導入が起こらず、ペプチジル tRNA の脱落によって生成したと思われる、短い副産物 (fMKKK-D-Ala-YYY, fMKKK-D-Phe-YY, fMKKK-D-Phe-YYY)も見られた。

以上の結果をまとめると、2 残基の D 体アミノ酸の翻訳導入効率を回復させるためには、間に 1 残基の L 体アミノ酸を挿入するだけでは不十分であり、D 体アミノ酸の種類により、2 または 3 残基以上の L 体アミノ酸が必要だということが明らかになった。この回復のメカニズムは、次のように説明が可能である。前述のように、D 体アミノ酸の 2 連続導入では、リボソームの A-site, P-site の両方にある D 体アミノ酸が、ペプチド転移反応に関わる官能基の位置や配向に影響し、反応効率を下げている可能性が考えられる。2 残基の D 体アミノ酸の間に L 体アミノ酸を挿入した設計で、2 残基目の D 体アミノ酸の導入を行う状況では、P-site には L 体アミノ酸が存在するものの、ペプチジル tRNA に含まれる D 体アミノ酸が、ペプチジル tRNA の構造や配向に影響を与えることで、転位反応の障害になる可能性が考えられる。ただし、この影響は、ペプチジル tRNA に含まれる 1 残基目の D 体アミノ酸が上流へ移動するほど小さくなると考えられるため、挿入される L 体アミノ酸の残基数が 2, 3 と増えるに従い、導入効率が回復すると説明できる。

なお、我々の結果は、Calendar と Berg の先行研究と、一見すると矛盾している。彼らは、poly(D-[¹⁴C]Tyr-L-Ile)の翻訳合成を行なったと報告しているが、我々の結果では、D 体アミノ酸と L 体アミノ酸が交互になった配列の翻訳はできない。これについては、前述のように (3.1.1.参照)、彼らの系において、得られたペプチドが、全て poly(D-[¹⁴C]Tyr-L-Ile)とは限らず、抽出無細胞翻訳系からの混入により L-Tyr が残存していたために、例えば poly(D-[¹⁴C]Tyr-L-Ile-L-Tyr-L-Ile)のような配列の翻訳産物であった可能性が考えられる。このような配列ならば、2 残基の D-Tyr 間に 3 残基の L 体アミノ酸が挿入された配置であり、我々の結果に照らしても、翻訳合成できる可能性が高く、結果に矛盾は生じない。

上記のような、1 残基の導入では効率の高かった非標準アミノ酸でも、2 連続導入

はできず、間に標準アミノ酸を導入することで、回復するという性質は、第4章で述べる、 β -アミノ酸の翻訳系で、ほぼ同じ結果が見られている点で非常に興味深い。

3.3.9. D 体アミノ酸のペプチド結合形成反応がリボソーム内で阻害される分子メカニズムに関する考察

我々の D 体アミノ酸の導入に関する論文の発表後に、D 体アミノ酸の結合したアミノアシル tRNA が、リボソームの活性中心において、どのような立体的な配置を取るのか、それがどのように活性に影響するのか、ということについて、X 線結晶構造解析によって得られた構造データや、これを元に構築された構造モデルを用いた研究が行われている。これらの内容を説明するために、本論文では、リボソーム PTC の A-site に L-Phe または D-Phe が存在する場合の立体構造モデル (図 24) を作成した。

リボソーム PTC の構造と、ペプチド結合形成反応の活性について考える上で、重要と考えられるのが、A-site のアミノ基の窒素原子と、P-site の A76 の 2'OH の (図 24 の図中の距離 d) である。距離 d の重要性については、以下の、2004 年の Weinger らの報告が根拠となっている¹⁶⁰。彼らは、アミノアシル tRNA の A76 の 2'OH が、アミノアシル tRNA の P-site での機能に必須であることを発表した。彼らは、A76 の 2'OH をデオキシ型またはフルオロデオキシ型とした場合に、アミノアシル tRNA はペプチド転移のアクセプターとして正常に機能し、P-site へのトランスロケーションまでは進行するが、ドナーとしてはほぼ活性を持たないことを明らかにした。A76 の 2'OH の、翻訳反応における機能は、完全には解明されていないが、A-site のアミノ酸のアミノ基と水素結合可能な距離にあることが指摘されており、アミノ基の配向の調節やアミノ基のプロトンを受け取るアクセプターとして働く可能性が考えられている。よって、距離 d が遠くなることで、ペプチド結合形成反応の活性が低下する可能性が高いと考えられる。

上記の知見を念頭に置いて、近年に発表された 2 つの研究成果について説明する。2017 年、Lehmann らは、リボソームの A-site に L-Ala-tRNA がある場合と、D-Ala-tRNA がある場合とで、活性中心の構造モデルを作製した¹⁶¹。L-Ala-tRNA がある場合では、L-Ala の側鎖が、A2451 と C2452 の間隙である "side-chain cavity" に向いており、L-Ala のアミノ基と P-site tRNA の A76 の 2'OH の間の距離 d は非常に近いことが示唆された。一方、D-Ala がある場合では、側鎖が side-chain cavity に向いておらず、アミノ基と A76 の 2'OH との距離 d も離れていると予想された。彼らは、側鎖の小さい D 体アミノ酸であれば、側鎖が side-chain cavity に入らなくても立体障害を生じないため、結合の回転によってアミノ基の位置を変化させ、距離 d を適切に調整することができ、翻訳反応の効率は下がらないと考察した。一方、側鎖が大きい場合には、側鎖が side-chain cavity に入らざるを得ず、距離 d を適切に調整できないため、翻訳反応

の効率が下がると考えた。では、実際に、D 体アミノ酸の大きな側鎖は **side-chain cavity** に入っているのか、という点については、2019 年に Melnikov らが、X 線結晶構造解析による検証の結果を報告している¹⁶²。彼らは、L-Tyr-tRNA アナログである puromycine、または、D-Phe-tRNA アナログである D-Phe-ACCA が A-site にある状態で解析を行い、PTC でのアミノ酸の位置と配向について、比較を行なった。その結果は、Lehmann らの考察に合致し、A-site にあるアミノ酸の側鎖の芳香環については、概ね L-Tyr と D-Phe で位置が重なっており、アミノ基の向く方向だけが大きく異なっていたというものであった。その結果、A76 の 2'OH と A-site のアミノ酸との距離 d は、L 体アミノ酸の場合は 2.5\AA と近いのに対し、D 体アミノ酸の場合は 3.5\AA と遠くなってしまふことが分かった。これによりアミノ基とカルボニル基の間でのペプチド形成反応の効率が低下する可能性が考えられる。さらに、彼らは構造モデルを作成し、分子内の結合の回転によって、D 体アミノ酸のアミノ基を L 体アミノ酸の場合と同じ位置に持ってくるのが可能であるかを調べた。その結果、D-Phe の側鎖の芳香環が、リボソームの 23S rRNA の U2506 と立体障害を起こしてしまうため、このような配向は取りにくいことが予想された。

上記の内容理解の補助として、我々は、A-site に L-Phe-tRNA が入っている場合の立体構造図 (図 24A) を、PDB の結晶構造解析データ(4V5D)から作成した。Lehmann らの主張の通り、L-Phe の側鎖は、A2451, C2452 の作る **side-chain cavity** に入っていることが確認された (図 24A 上段)。さらに、距離 d を測定すると 3.00\AA となり、水素結合可能なほど近い距離にあることが分かった (図 24A 下段)。さらに、このデータを元に、A-site に D-Phe-tRNA が入っている場合の、簡易的な立体構造モデル (図 24B) も作成した。作成にあたっては、上述の Melnikov らの結果に基づき、A-site の D-Phe の側鎖を L-Phe の場合と重ね、 α 炭素のキラリティのみを変更した。D-Phe の側鎖は、L-Phe と重なるように作成したため、**side-chain cavity** に入っている (図 24B 上段)。さらに、距離 d を測定すると 4.95\AA となり、水素結合を形成できないほど離れていた (図 24B 下段)。Melnikov らのモデルよりも距離が離れているのは、我々の簡易モデルでは特に構造最適化等の計算を行なっていないためと思われる。

上で説明したリボソーム PTC のモデルが、本研究の生化学的な実験の結果に当てはめることができるのか考察を行なった。まず、上述の内容は、D-Phe が A-site にある場合を考えるものであったが、我々の実験では、D-Phe の 1 残基のペプチドへの導入効率は非常に高いという結果が得られていることから、この点では一見すると矛盾している。しかし、D-Phe よりも側鎖の大きい D-Trp、側鎖に β 位での分岐を持つ D-Val, D-Ile、環状化により立体的な制約の大きい D-Pro を用いた場合に、1 残基での導入すら観測できないという結果が得られており、PTC において構造変化によってアミノ基の適切な位置の調整が困難な D 体アミノ酸で、ペプチド結合形成の反応性が低下する

と考えると、上記のモデルに合致していると考えられる。また、今後さらなる構造モデルを用いた研究が進められれば、D体アミノ酸の連続導入の効率が顕著に低下する現象についても、説明できるようになると期待される。具体的には、P-site のペプチジル tRNA に D-Phe が含まれる場合に、P-site 側の tRNA にも構造変化が生じ、A76 の 2'OH の位置が変化することで、上記モデルで重要になっている距離 d がさらに遠くになってしまう可能性が考えられる。

3.4. 結論

鏡像異性体を持たない Gly を除く 19 種類の標準アミノ酸に対応する、19 種類の D 体アミノ酸を用いて、遺伝暗号のリプログラミングにより、モデルペプチドへの導入を試みた。まず、1 残基の D 体アミノ酸のペプチドへの導入を行なった。得られた翻訳産物は、**tricine SDS-PAGE** による導入効率の測定と、**MALDI-TOF-MS** による D 体アミノ酸の同定の、2 種類の手法を用いて解析した。その結果、ペプチドへの導入が可能な 12 種類の D 体アミノ酸(D-Ala, D-Ser, D-Cys, D-Met, D-Thr, D-His, D-Phe, D-Tyr) を特定することができ、これをグループ 1 とした。導入効率は低いものの、MS でペプチドが検出できた 4 種類の D 体アミノ酸(D-Asn, D-Gln, D-Val, D-Leu)については、これをグループ 2 とした。一方で、MS でペプチドが検出できなかった 7 種類の D 体アミノ酸 (D-Arg, D-Lys, D-Asp, D-Glu, D-Ile, D-Trp, D-Pro)をグループ 3 とした。さらに、2 残基の D 体アミノ酸のペプチドへの導入についても検証を行ったが、その結果 D 体アミノ酸のペプチドへの 2 残基連続での導入は非常に効率が悪いことが明らかになった。しかし、D 体アミノ酸の間に、2 または 3 残基の L 体アミノ酸を挿入した配列にすることで、2 残基の D 体アミノ酸の導入効率は回復することも明らかにした。

なお、この結果は、以下のタイトルで発表済みである。: **Reevaluation of the D-Amino Acid Compatibility with the Elongation Event in Translation.**⁴⁶

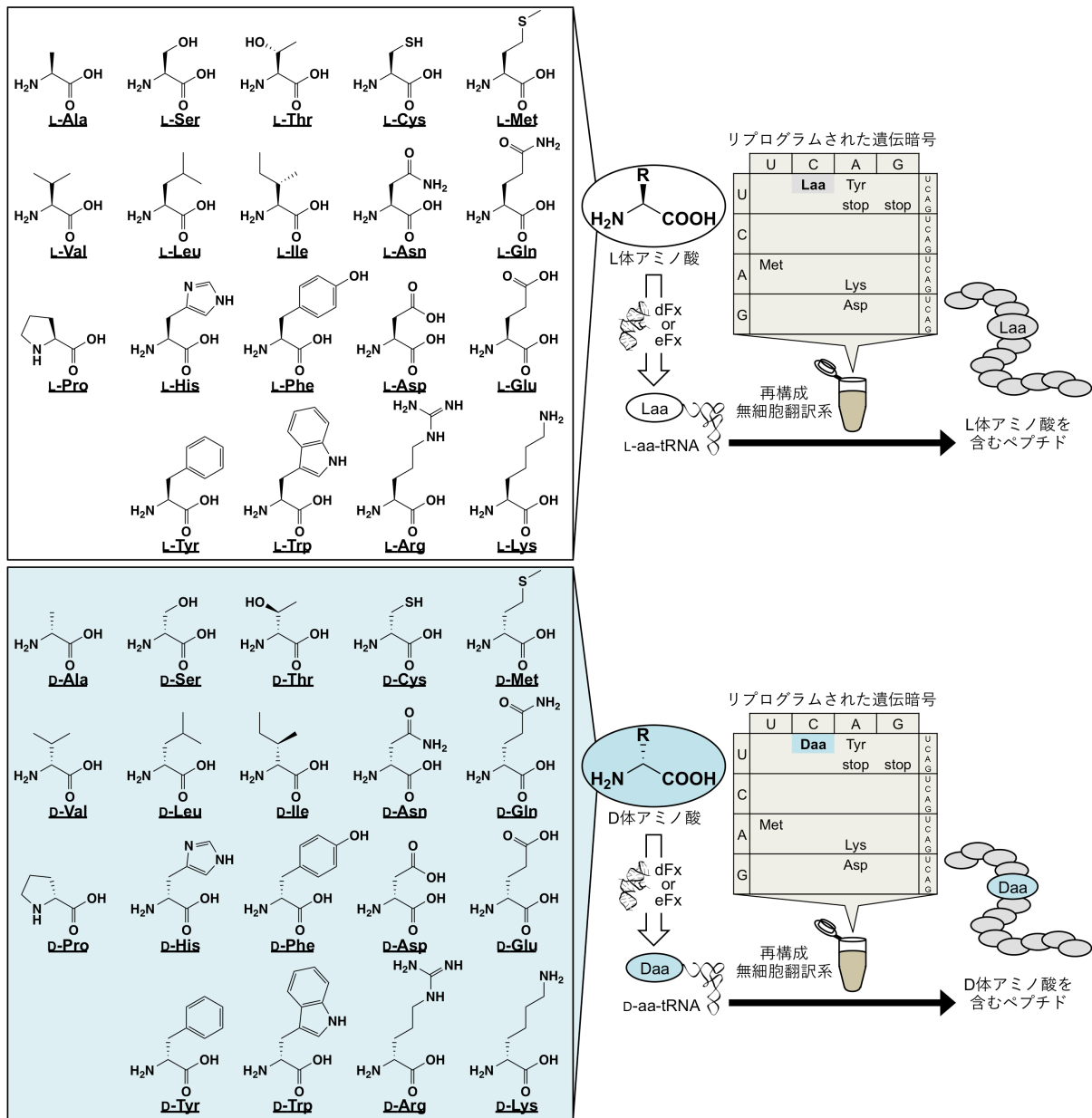


図 17 D 体アミノ酸の翻訳系への適合性を検証する実験系。

Gly を除く 19 種類の標準 L 体アミノ酸と、これに対応する 19 種類の D 体アミノ酸を、Flexizyme (dFx または eFx) を用いたアシル化法により $tRNA^{EnAsn}_{GGA}$ に結合した。調製したアミノアシル tRNA を、再構成無細胞翻訳系に加え、モデルペプチドの翻訳を行った。この翻訳系には、アミノ酸とアミノアシル tRNA 合成酵素を、Met, Lys, Asp, Tyr の 4 ペアしか加えていないため、本来 Ser に対応する UCC コドンは空コドンとなっている。添加したアミノアシル tRNA に結合した L 体または D 体アミノ酸は、空コドンに割り当てられ、翻訳反応が進行する。この時、リボソームは、必ずしも全ての D 体アミノ酸を受け入れられない。使用した D 体アミノ酸が許容されれば全長の翻訳産物が得られるが、受け入れられなければ、短いペプチドしか得られない。よって、この産物を解析することで、各 D 体アミノ酸の翻訳伸長反応への適合性を評価することができる。なお、L 体アミノ酸についても、同様に解析を行い、コントロールとした。

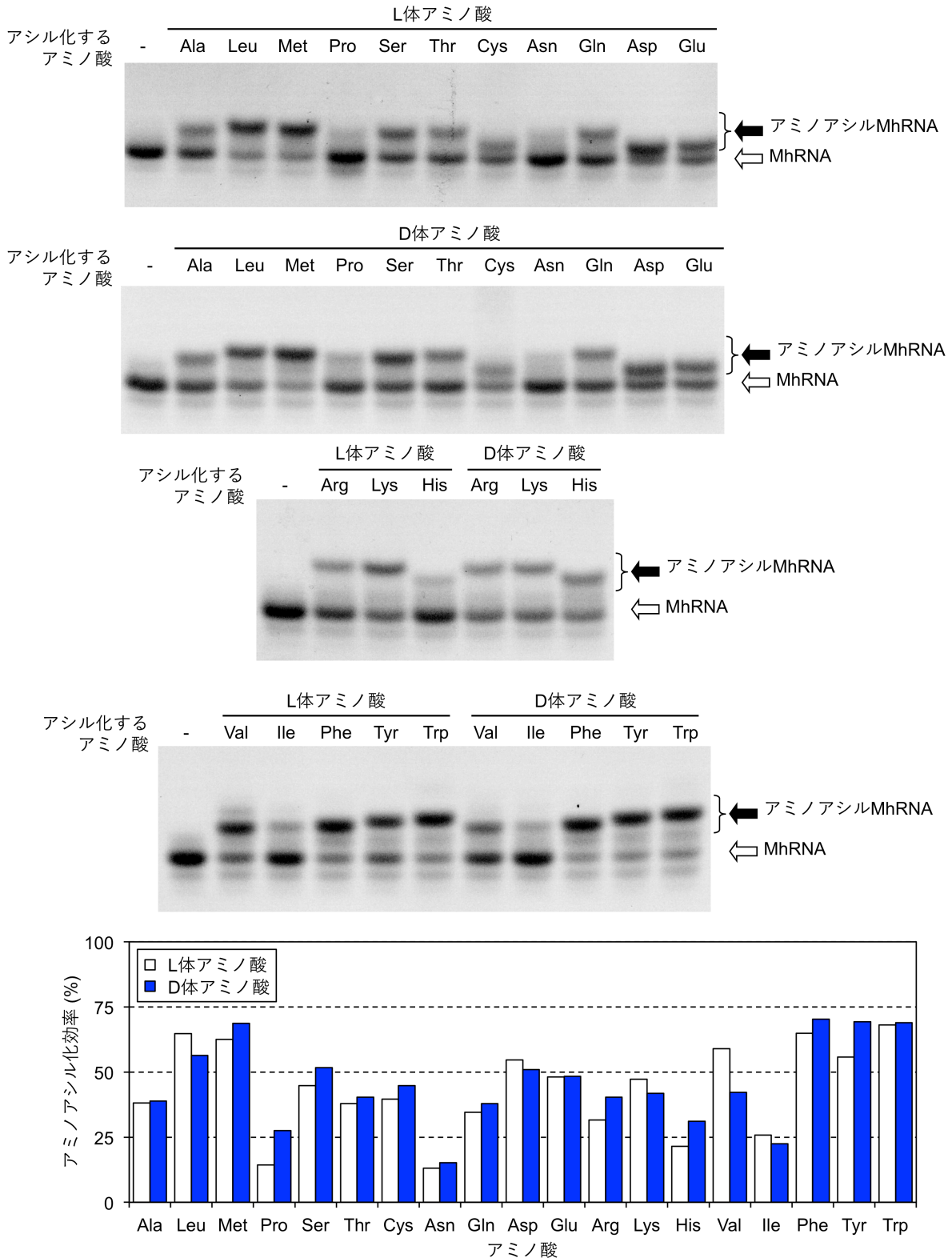


図 18 Microhelix (MhRNA)法を利用した、D 体および L 体アミノ酸のアミノアシル化効率の測定。Flexizyme を用いて、19 種類の D 体アミノ酸および対応する L 体アミノ酸による、MhRNA のアミノアシル化を行った。これを酸性条件の変性電気泳動により解析した。アミノアシル化効率は、アミノアシル MhRNA のバンド強度 (I とする) と、未反応の MhRNA のバンド強度 (II とする) から、 $(I) / (I + II)$ で求められる。アシル化反応の条件は表 6 に示した。

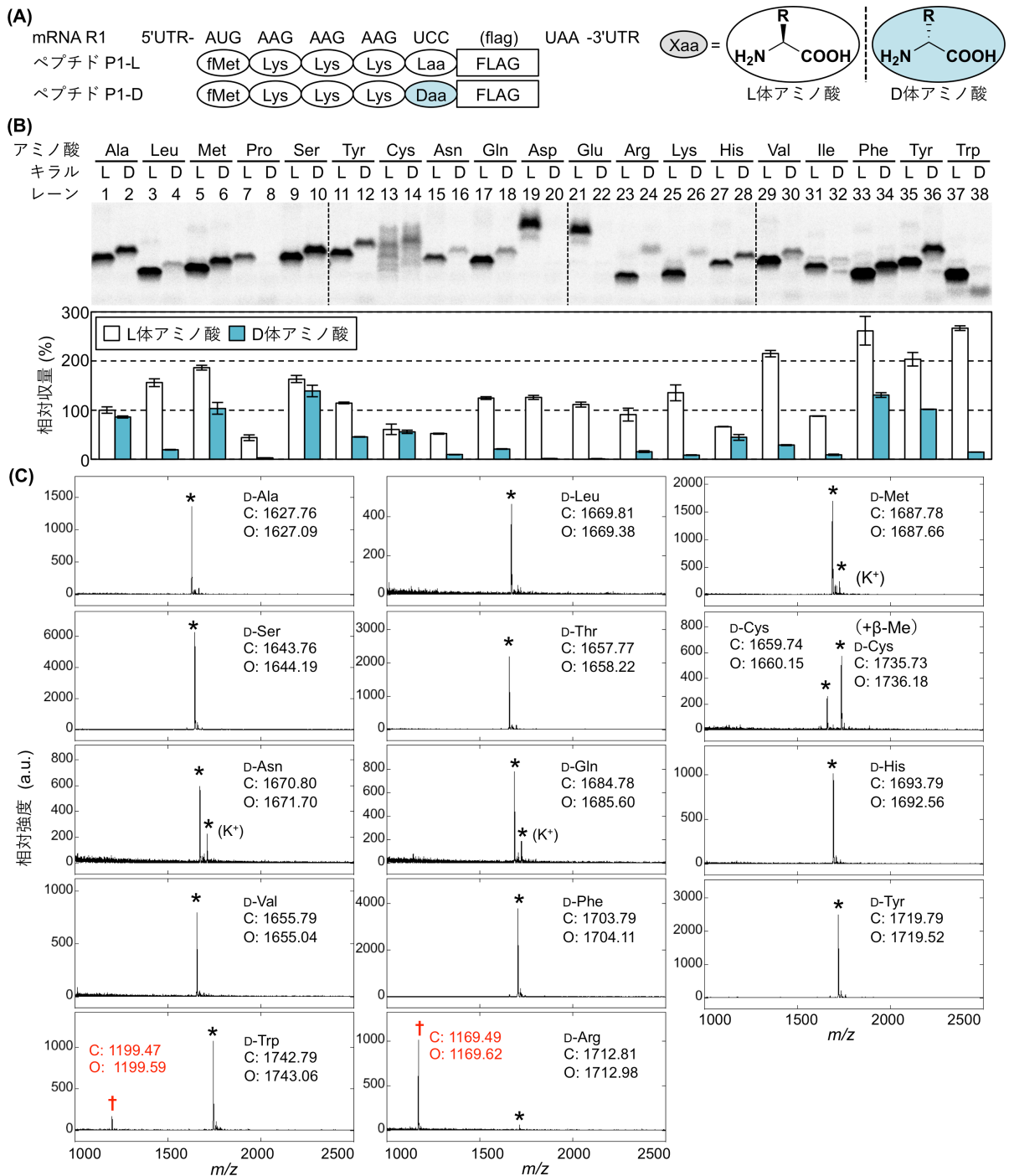


図 19 19 種類の D 体アミノ酸および対応する L 体アミノ酸のペプチドへの翻訳導入。

(A) mRNA R1 の塩基配列と、対応するモデルペプチド P1 のアミノ酸配列。UCC コドンが空コドンになっており、そこに L 体または D 体アミノ酸が割り当てられて翻訳される。FLAG は FLAG-tag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)を表している。**(B)** 各 L 体または D 体アミノ酸を用いた場合の、翻訳産物の tricine SDS-PAGE による解析。FLAG 配列中に含まれる¹⁴C]Asp を、オートラジオグラフィで検出した。各アミノ酸を含むペプチドの収量を、バンド強度を測定することで定量し、L-Ala-tRNA^{EnAsn}_{GGA}を用いた場合の収量を 100%とした割合でグラフに示した。エラーバーは、測定を 3 回繰り返した標準偏差を示す。**(C)** 各 D 体アミノ酸を用いた場合のペプチド P1 の MALDI-TOF-MS

による解析。プロトン付加体の質量電荷比(m/z)の理論値と実測値を記した。ピークのラベルは次の通り：正しく 1 残基の D 体アミノ酸が導入されたペプチドを(*)、ペプチジル tRNA の乖離で生じた Xaa-FLAG の配列を持つ短いペプチドを(†)で表した。

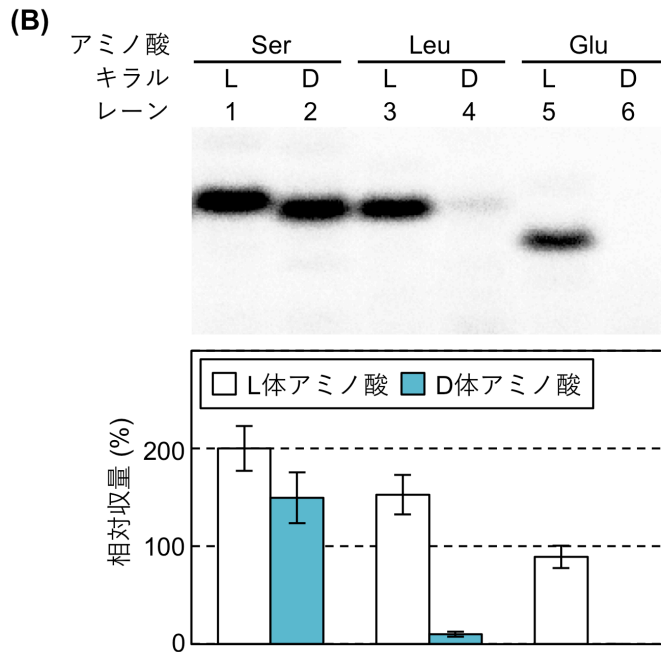
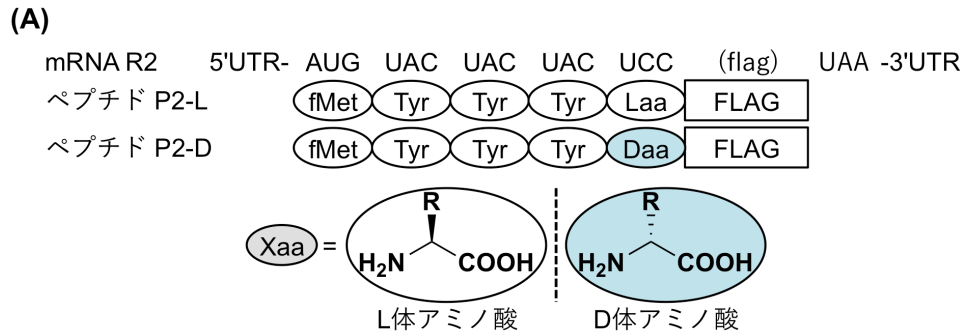


図 20 モデルペプチドの上流の配列が D 体アミノ酸のペプチドへの導入効率に与える影響。

(A) mRNA R2 の塩基配列と、対応するモデルペプチド P2 のアミノ酸配列。UCC コドンが空コドンになっており、そこに L 体または D 体アミノ酸が割り当てられて翻訳される。(B) 各 L 体または D 体アミノ酸を用いた場合の、翻訳産物の tricine SDS-PAGE による解析。FLAG 配列中に含まれる¹⁴C]Asp を、オートラジオグラフィで検出した。各アミノ酸を含むペプチドの収量を、バンド強度を測定することで定量し、L-Ala-tRNA^{EnAsn}_{GGA} を用いた場合のペプチド収量を 100%とした割合でグラフに示した。エラーバーは、測定を 3 回繰り返した標準偏差を示す。

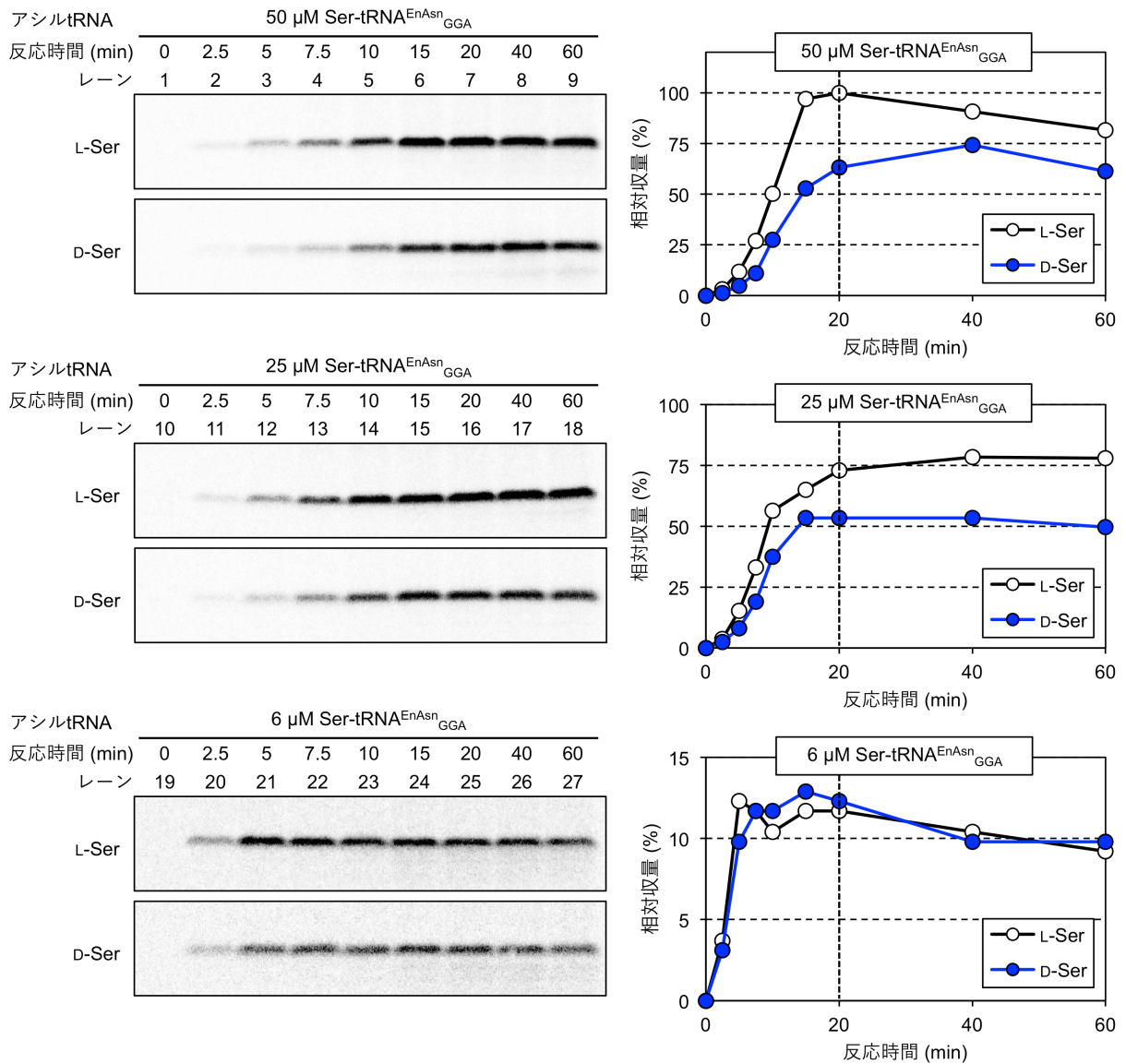


図 21 L-Ser または D-Ser を用いた場合の、モデルペプチド P1 の翻訳合成の経時的な解析。

翻訳反応液中の L-Ser-tRNA または D-Ser-tRNA の濃度は、50 μM (上段)、25 μM (中段)、6 μM (下段) となるように調製した。翻訳産物は、tricine SDS-PAGE によって解析した。FLAG 配列中に含まれる [¹⁴C]Asp を、オートラジオグラフィで検出した。ペプチドの収量を、バンド強度を測定することで定量し、50 μM L-Ser-tRNA 存在下での、20 分後のペプチド収量を 100% として、反応時間に対してプロットした。

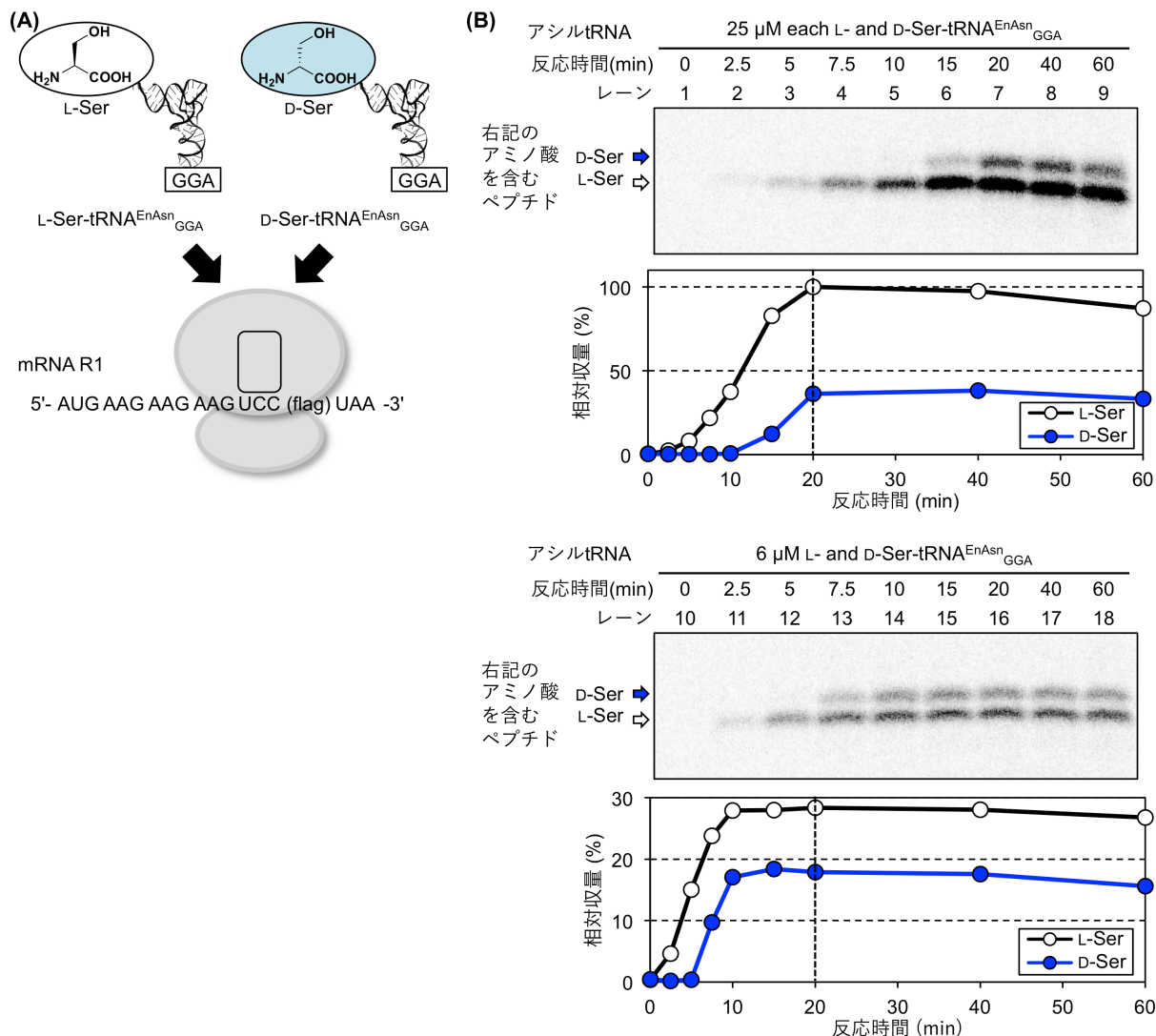


図 22 D-Ser と L-Ser の競合条件での、モデルペプチド P1 の翻訳合成の経時的な解析。

(A) D-Ser と L-Ser の競合条件で翻訳を行う実験系。D-Ser-tRNA^{EnAsn_{GGA}} と L-Ser-tRNA^{EnAsn_{GGA}} の両方を翻訳系に添加することで、UCC の空コドンに、D-Ser と L-Ser の両方が割り当てられている。**(B)** D-Ser と L-Ser の競合条件での翻訳産物の tricine SDS-PAGE による解析。翻訳反応液中の L-Ser-tRNA と D-Ser-tRNA の濃度は、25 μM each (上段)、6 μM each (下段) となるように調製した。翻訳産物は、tricine SDS-PAGE によって解析した。FLAG 配列中に含まれる [¹⁴C]Asp を、オートラジオグラフィで検出した。ペプチドの収量を、バンド強度を測定することで定量し、25 μM each D-Ser-tRNA, L-Ser-tRNA 存在下での、20 分後の L-Ser を含むペプチド収量を 100% として、反応時間に対してプロットした。

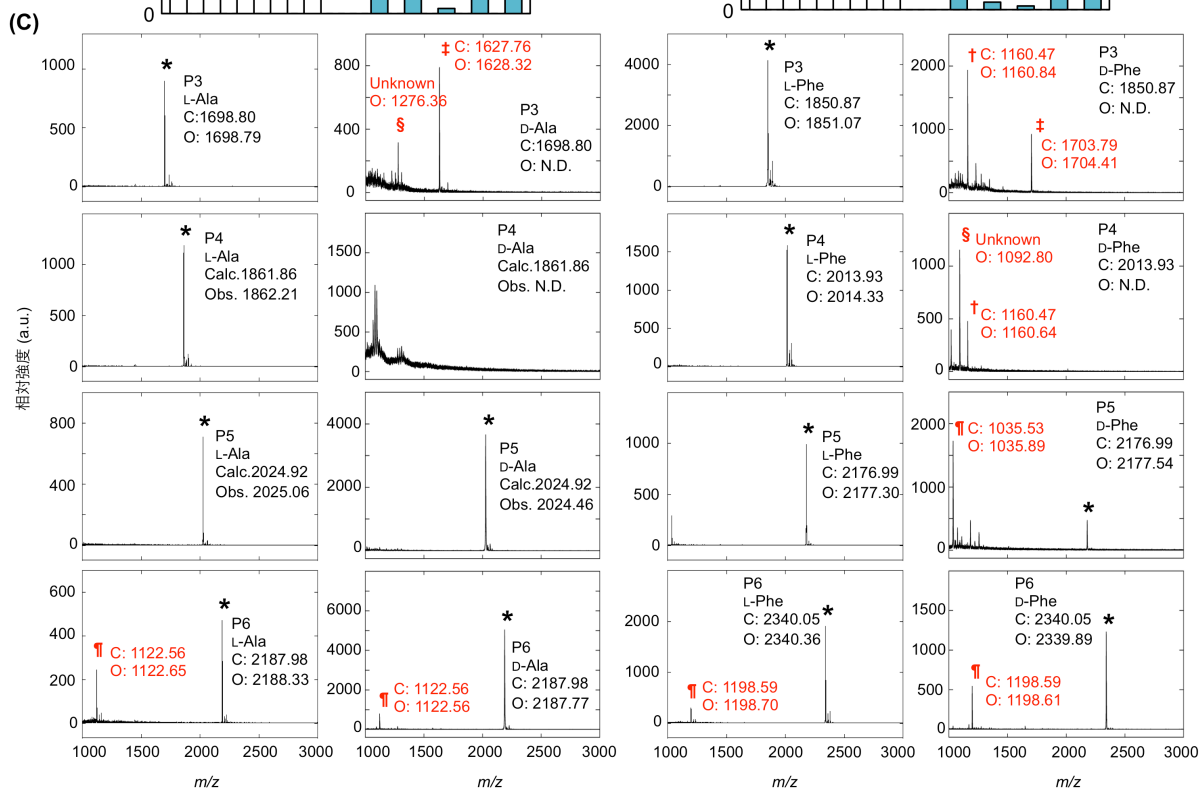
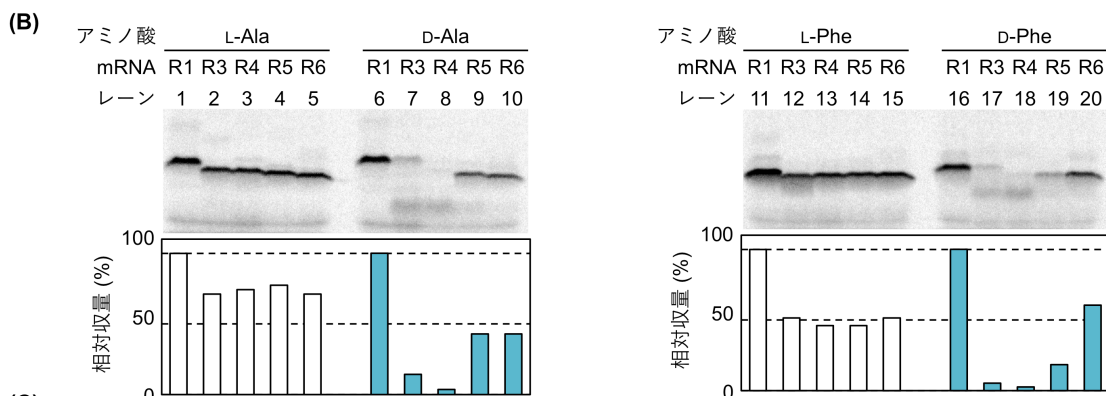
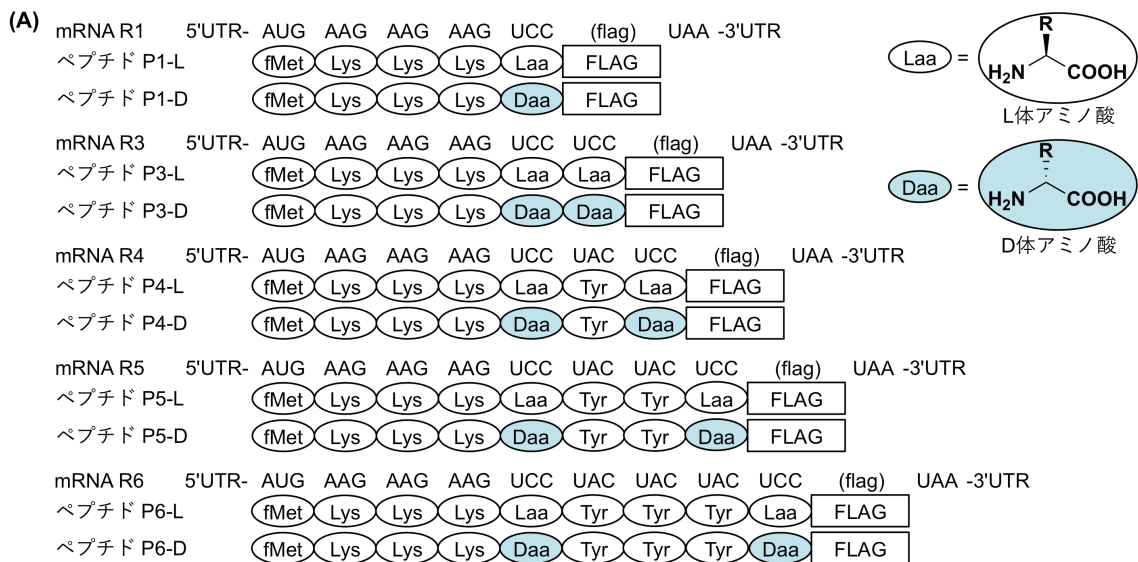


図 23 2 残基の D 体アミノ酸のペプチドへの導入。

(A) mRNA R1, R3–R6 の塩基配列と、対応するモデルペプチド P1, P3–P6 のアミノ酸配列。UCC コドンが空コドンになっており、そこに L 体または D 体アミノ酸が割り当てられて翻訳される。**(B)** 各 L 体または D 体アミノ酸を用いた場合の、翻訳産物の **tricine SDS-PAGE** による解析。**FLAG** 配列中に含まれる [¹⁴C]Asp を、オートラジオグラフィで検出した。各アミノ酸を含むペプチドの収量を、バンド強度を測定することで定量し、アミノ酸毎に、mRNA R1 を利用した場合の翻訳産物の収量を 100% とした割合でグラフに示した。**(C)** 各 D 体アミノ酸を含むモデルペプチド P1, P3–P6 の **MALDI-TOF-MS** による解析。プロトン付加体の質量電荷比(m/z)の理論値と実測値を記した。ピークのラベルは次の通り：正しく 1 残基の D 体アミノ酸が導入されたペプチドを(*)、ペプチジル tRNA の乖離で生じた Xaa-FLAG の配列を持つ短いペプチドを(†)、2 残基分の空コドンに対して 1 残基のみが導入されたペプチドを(‡)、ペプチジル tRNA の乖離で生じた fMKKK-Xaa-YY または fMKKK-Xaa-YYY の配列を持つ短いペプチドを(¶)、同定不能の副産物を(§)で表した。

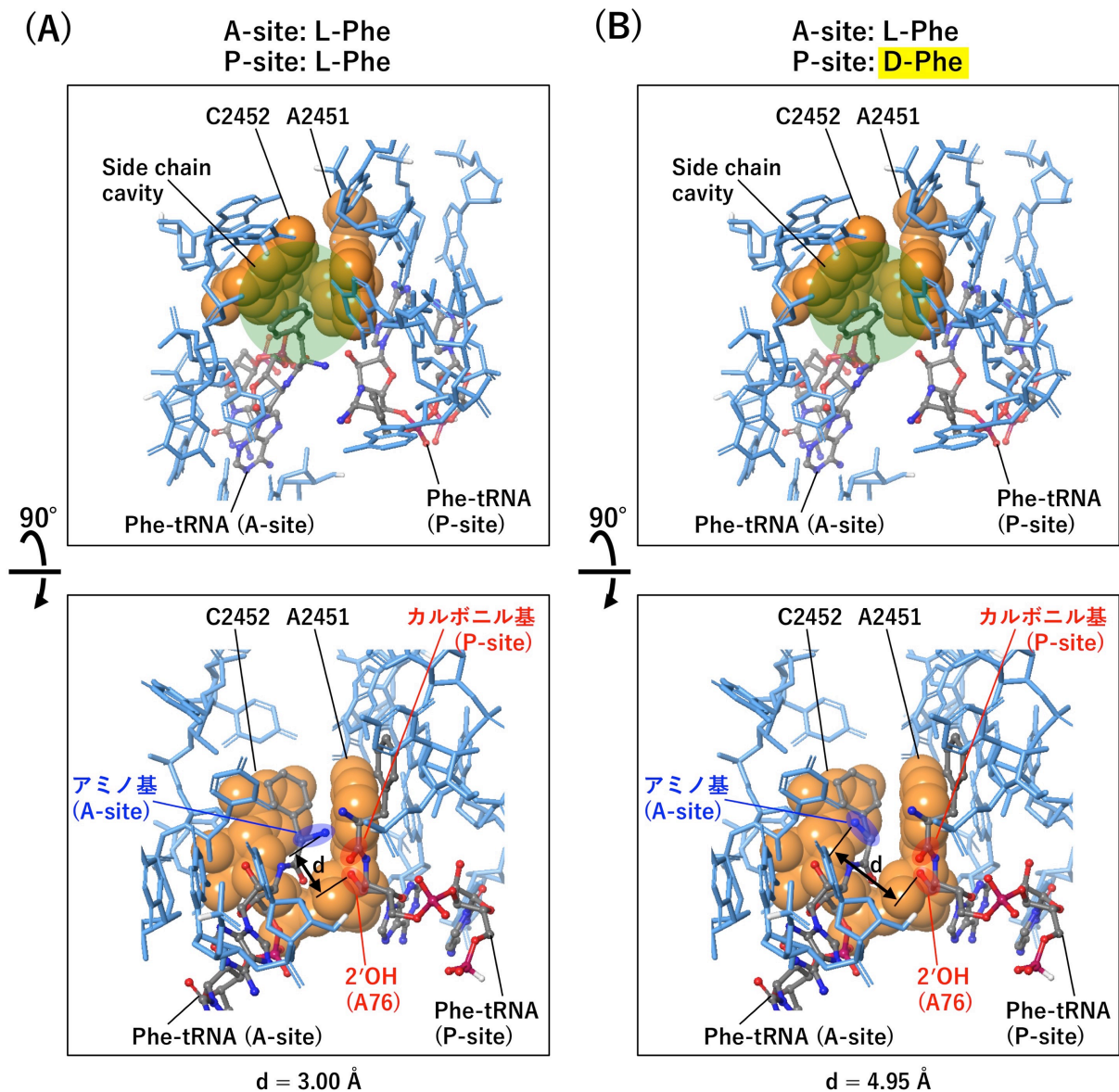


図 24 リボソーム A-site に L-Phe または D-Phe がある場合の立体構造モデル。

このモデルは、Lehmann ら¹⁶¹、Melnikov ら¹⁶²の構造計算、X線結晶構造解析の報告を元に、PDBの4V5DのX線結晶構造データからA-siteのPheのアミノ基を中心に半径約12Åの範囲を切り出して作製した。2枚のパネルは、同じ構造を、90°回転し、上部方向（上段図）と正面方向（下段図）から見たものを示している。rRNAのうちside-chain cavityを形成するA2451, C2452の2塩基をオレンジ色で、それ以外のrRNAを水色で示した。Phe-tRNAについては、炭素原子を灰色で、酸素原子を赤色で、窒素原子を青色で示した。距離dについては、A-siteのアミノ基の窒素原子と、P-siteのA76の2'OHの酸素原子との距離を測定した。(A) リボソーム PTCのA-siteにL-Phe-tRNA、P-siteにL-Phe-tRNAがある場合の立体構造。(B) リボソーム PTCのA-siteにD-Phe-tRNA、P-siteにL-Phe-tRNAがある場合の立体構造モデル。(A)の構造から、A-siteのL-Pheのα炭素のキラリティのみを変更し、D-Pheとした。その後、特に構造の最適化等の処理は行っていない。

表4 D体アミノ酸の翻訳系への適合性を検証した先行研究の結果まとめ。

D体アミノ酸の翻訳系への適合性に関する全ての先行研究について、使用された無細胞翻訳系、アミノアシル化法、および、各D体アミノ酸の導入結果を表にまとめた。

発表年	著者	無細胞翻訳系	アシル化法	D-Tyr	D-Phe	D-Ala	D-Met
1967年	CalendarとBerg	抽出（枯草菌、大腸菌）	アミノアシルtRNA合成酵素	標準アミノ酸の17%	-	-	-
1989年	Norenら	抽出（大腸菌）	chemo-enzymatic	-	導入確認できず	-	-
1991年	Bainら	抽出（ウサギ網状赤血球）	chemo-enzymatic	-	導入確認できず	-	-
1992年	Ellmanら	抽出（大腸菌）	chemo-enzymatic	-	-	導入確認できず	-
2003, 2006年	2報ともDedkovaら	抽出（大腸菌）	chemo-enzymatic	-	標準アミノ酸の3%	-	標準アミノ酸の5%
2005年	Tanら	再構成（大腸菌）	chemo-enzymatic	-	L-Glnが誤って導入	L-Alaが誤って導入	-

表5 第3,4,5章において、tRNA、MhRNA、Flexizymeの調製のために用いたプライマーの塩基配列。

プライマー名称	プライマー配列 (5'→3')
Fx-5'.F36	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAAGATTTCCGC
dFx.R46	ACCTAACGCCATGTACCCTTTTCGGGGATGCGGAAATCTTTCGATCC
T7ex5.F22	GGCGTAATACGACTCACTATAG
dFx.R19	ACCTAACGCCATGTACCCT
eFx.R45	ACCTAACGCTAATCCCCTTTTCGGGGCCGCGGAAATCTTTCGATCC
eFx.R18	ACCTAACGCTAATCCCCT
EnAsn5'.F49	GTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGA
EnAsnGGA.R43	GAACCAGTGACATACGGATTTCCAGTCCGCCGTTCTACCGACT
EnAsnGAG.R43	GAACCAGTGACATACGGAACCTCAATCCGCCGTTCTACCGACT
EnAsnGUG.R43	GAACCAGTGACATACGGATTCACAATCCGCCGTTCTACCGACT
EnAsnGGU.R43	GAACCAGTGACATACGGATTACCAATCCGCCGTTCTACCGACT
EnAsn3'.R38	TGGCGGCTCTGACTGGACTCGAACCCAGTGACATACGGA
EnAsn3.R20	TGGCGGCTCTGACTGGACTC
GGCGT7.F17	GGCGTAATACGACTCAC
EnAsn-micro.R43	TGGCGGCTCTGCGAACAGAGCCTATAGTGAGTCGTATTACGCC

表 6 Flexizyme によるアミノアシル化の反応条件。

本研究で、Flexizyme によるアミノアシル化を行う際の反応条件を、活性化体の種類、使用した Flexizyme、反応時間について表にまとめた。

アミノ酸名称	活性化体	フレキシザイム	反応時間(h)	アミノ酸名称	活性化体	フレキシザイム	反応時間(h)
L- Ala	DBE	dFx	2	D- Ala	DBE	dFx	2
L- Leu	DBE	dFx	2	D- Leu	DBE	dFx	6
L- Met	DBE	dFx	2	D- Met	DBE	dFx	6
L- Pro	DBE	dFx	2	D- Pro	DBE	dFx	2
L- Ser	DBE	dFx	6	D- Ser	DBE	dFx	6
L- Thr	DBE	dFx	6	D- Thr	DBE	dFx	24
L- Cys	DBE	dFx	6	D- Cys	DBE	dFx	6
L- Asn	DBE	dFx	2	D- Asn	DBE	dFx	6
L- Gln	DBE	dFx	2	D- Gln	DBE	dFx	6
L- Asp	DBE	dFx	6	D- Asp	DBE	dFx	2
L- Glu	DBE	dFx	2	D- Glu	DBE	dFx	2
L- Arg	DBE	dFx	6	D- Arg	DBE	dFx	2
L- Lys	DBE	dFx	2	D- Lys	DBE	dFx	6
L- His	DBE	dFx	6	D- His	DBE	dFx	6
L- Val	CBT	eFx	6	D- Val	CBT	eFx	24
L- Ile	CBT	eFx	6	D- Ile	CBT	eFx	24
L- Phe	CME	eFx	2	D- Phe	CME	eFx	2
L- Tyr	CME	eFx	2	D- Tyr	CME	eFx	2
L- Trp	CME	eFx	2	D- Trp	CME	eFx	3
				β hGly	DBE	dFx	22
				L- β hAla	DBE	dFx	22
				L- β hLeu	DBE	dFx	22
				L- β hIle	DBE	dFx	22
				L- β hGln	DBE	dFx	22
				L- β hPro	DBE	dFx	22
				L- β hPhe	DBE	dFx	22
				L- β hTrp	DBE	dFx	22
				L- β hPhg	DBE	dFx	22
				L- β hMet	DBE	dFx	22
				L- β hAsn	DBE	dFx	22
				L- β hLys	DBE	dFx	22
				L- β hGlu	DBE	dFx	22
				D- β hAla	DBE	dFx	22
				D- β hLeu	DBE	dFx	22
				D- β hPhg	DBE	dFx	22

表 7 第 3,4,5 章において、モデルペプチドの調製のために用いたプライマーの塩基配列。

プライマー名称	プライマー配列 (5' →3')
T7eSD6M.F46	TAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAACAAGGAGAAAAACATG
SD6MKKK(UCC)flag.R42	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGACTTCTTTCATGTTTTCTC
T7ex5.F22	GGCGTAATACGACTCACTATAG
Flaguaa.R33	CGAAGCTTACTTGTCTCGTCGTCCTTGTAGTC
SD6MKKK(UCC)(UUC)flag.R45	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGGACTTCTTTCATGTTTTCTC
SD6MKKK(UCC)Y(UUC)flag.R48	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGTAGGACTTCTTTCATGTTTTCTC
SD6MKKK(UCC)YY(UUC)flag.R51	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGTAGTAGGACTTCTTTCATGTTTTCTC
SD6MKKK(UCC)YYY(UUC)flag.R54	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGTAGTAGTAGGACTTCTTTCATGTTTTCTC
SD6MYYY(UCC)flag.R42	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGTAGTAGTACATGTTTTCTC
RV9	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGTCTTCTTTCATGTTTTCTC
RV10	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGTCTTCTTTCATGTTTTCTC
SD6MKYY(UCC)flag.R42	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGTAGTACTTTCATGTTTTCTC
SD6MYKY(UCC)flag.R42	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGTACTTGTACATGTTTTCTC
SD6MKKK(LYYHYYS)flag.R60	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGTAGTAGTGGTAGTAGGCTTCTTTCATGTTTTCTC
SD6MKKK(HYYLYYT)flag.R60	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGGGTAGTAGAGGTAGTAGTCTTCTTTCATGTTTTCTC
SD6MKKK(SYYTYYL)flag.R60	GTCGTCGTCCTTGTAGTCGAGGTAGTAGGTAGTAGGACTTCTTTCATGTTTTCTC

表 8 第 3,4,5 章で用いたモデルペプチドと、これを作製するために使用したプライマー。

P1-P13 の 13 種類のモデルペプチドについて、アミノ酸配列、鋳型 DNA の塩基配列、これを作製するために使用したプライマーの名称を表にまとめた。

ペプチド	ペプチド配列	Xaaのコードン	mRNA	鋳型DNA
P1	fMKKK-X-FLAG	Ser	R1	D1
P2	fMYYY-X-FLAG	Ser	R2	D2
P3	fMKKK-XX-FLAG	Ser	R3	D3
P4	fMKKK-X-Y-X-FLAG	Ser	R4	D4
P5	fMKKK-X-YY-X-FLAG	Ser	R5	D5
P6	fMKKK-X-YYY-X-FLAG	Ser	R6	D6
P7	fMKKK-X-FLAG	Thr	R7	D7
P8	fMKKK-X-FLAG	His	R8	D8
P9	fMYKY-X-FLAG	Ser	R9	D9
P10	fMKYY-X-FLAG	Ser	R10	D10
P11	fMKKK-X1-YY-X2-YY-X3-FLAG	His, Leu, Thr	R11	D11
P12	fMKKK-X1-YY-X2-YY-X3-FLAG	Leu, His, Ser	R12	D12
P13	fMKKK-X1-YY-X2-YY-X3-FLAG	Ser, Thr, Leu	R13	D13

鋳型DNA	exF	exR	pF	pR	鋳型DNA配列 (5' to 3')
D1	T7SD6M.F49	SD6MKKK(UCC)flag.R42	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGAAGAAGAAGTCCGACTACAAGGA CGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D2	T7eSD6M.F46	SD6MYYY(UCC)flag.R42	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGTACTACTACTCCGACTACAAGGAC GACGACGACAAGTAAGCTTCG
D3	T7SD6M.F49	SD6MKKK(UCC)(UUC)flag.R45	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGAAGAAGAAGTCCCTCCGACTACAAG GACGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D4	T7SD6M.F49	SD6MKKK(UCC)Y(UUC)flag.R48	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGAAGAAGAAGTCCCTACTCCGACTAC AAGGACGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D5	T7SD6M.F49	SD6MKKK(UCC)YY(UUC)flag.R51	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGAAGAAGAAGTCCCTACTACTCCGAC TACAAGGACGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D6	T7SD6M.F49	SD6MKKK(UCC)YYY(UUC)flag.R54	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGAAGAAGAAGTCCCTACTACTACTCC GACTACAAGGACGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D7	T7SD6M.F49	RV9.R42	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGAAGAAGAAGCCGACTACAAGGA CGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D8	T7eSD6M.F46	RV10.R42	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGAAGAAGAAGCAGCAGACTACAAGGA CGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D9	T7eSD6M.F46	SD6MYKY(UCC)flag.R42	T7ex5.F23	Flaguaa.R34	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGTACAAGTACTCCGACTACAAGGAC GACGACGACAAGTAAGCTTCG
D10	T7SD6M.F49	SD6MKYY(UCC)flag.R42	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAA GGAGAAAAACATGAAGTACTACTCCGACTACAAGGAC GACGACGACAAGTAAGCTTCG
D11	T7SD6M.F49	SD6MKKK(LYYHYYS)flag.R60	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTTAAATAAGGAG AAAAACATGAAGAAGAAGCTCTACTACCTACTACT CCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D12	T7SD6M.F49	SD6MKKK(HYLYYYT)flag.R60	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTTAAATAAGGAG AAAAACATGAAGAAGAAGCAGCAGTACTACTACTACA CCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTAAGCTTCG
D13	T7SD6M.F49	SD6MKKK(SYYTYYL)flag.R60	T7ex5.F22	Flaguaa.R33	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTTAAATAAGGAG AAAAACATGAAGAAGAAGTCCCTACTACCTACTACTACC TCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTAAGCTTCG