

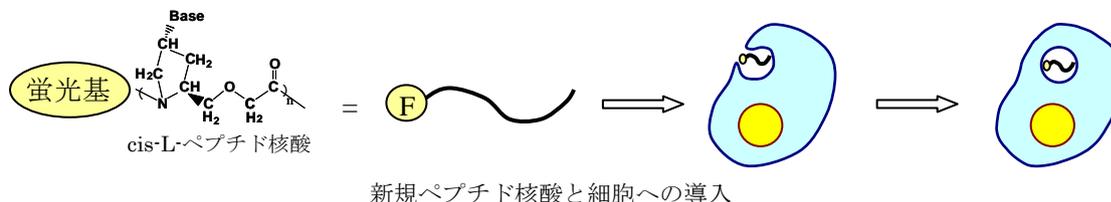
平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

| | | | | | | | |
|---|--------------------|--|----------------------------------|------------------------------------|--------|--------|--------|
| ふりがな（ローマ字） | | SISIDO MASAHIKO | | | | | |
| ①研究代表者名氏 | | 宍戸 昌彦 | | ②所属研究機関・部局・職 岡山大学・大学院自然科学研究科・教授 | | | |
| ③研究課題名 | 和文 | 蛋白質生合成系の有機化学的拡張と合成生命体の創成 | | | | | |
| | 英文 | Synthetic Expansion of the Protein Biosynthesizing System towards Creation of Synthetic Microorganisms | | | | | |
| ④研究経費 | | 平成15年度 | 平成16年度 | 平成17年度 | 平成18年度 | 平成19年度 | 総合計 |
| 17年度以降は内約額 金額単位：千円 | | 24,500 | 13,800 | 13,800 | 13,800 | 13,800 | 79,700 |
| ⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） | | | | | | | |
| 氏名 | 所属研究機関・部局・職 | 現在の専門 | 役割分担（研究実施計画に対する分担事項） | | | | |
| 宍戸 昌彦 | 岡山大学・大学院自然科学研究科・教授 | 化学生物学 | 有機化学的な蛋白質生合成系の拡張 | | | | |
| 大槻 高史 | 岡山大学・工学部・講師 | 分子生物学 | 生物化学的な蛋白質生合成系の拡張と細胞内導入 | | | | |
| 瀧 真清 | 岡山大学・工学部・助手 | 生物有機化学 | 人工機能非天然アミノ酸の合成とそれらを導入した蛋白質の細胞内発現 | | | | |
| ⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。） | | | | | | | |
| <p>本研究は蛋白質生合成系を構成する分子群、すなわちアミノ酸、核酸、酵素などを有機化学的に拡張し、人工機能を持つ蛋白質を作製することを目的とする。さらにこの拡張生合成系を生きた細胞に導入し、人工機能を発現する「合成生命体」を作成することを最終目標とする。この目的を達成するため、(1)天然の核酸より強く、かつ配列特異的に結合する人工核酸の作製、(2)人工核酸を用いて転移RNA(tRNA)を確実に識別し、特定の tRNA に特定の非天然アミノ酸を担持させる方法（アミノアシル化法）の確立、(3)蛋白質合成に関与するいろいろな分子群の非天然アミノ酸導入に向けた最適化、さらに(4)これらの拡張系を生きた細胞に導入して合成生命体を作製する。</p> <p>具体的には以下の4項目について研究をすすめ、それらを総合して人工機能合成生命体につなげる。</p> <p>(1) 天然の核酸よりも強く、かつ配列特異的に相補対形成するペプチド核酸の作製 新規ペプチド核酸を合成し DNA や RNA との二本鎖形成能を調べる。またそれらの細胞導入を検討する。</p> <p>(2) ペプチド核酸を tRNA 識別分子とした tRNA 特異的アミノアシル化 tRNA に相補的なペプチド核酸にアミノ酸活性エステルを結合させた分子を用いて、特定の tRNA をアミノアシル化する。多種類の tRNA 共存下で特定の tRNA だけにアミノアシル化を行う手法を確立する。</p> <p>(3) 蛋白質生合成系の非天然アミノ酸導入に向けた最適化 蛋白質の生合成に関与する tRNA や EF-Tu などの分子群を、非天然アミノ酸の導入に向けて最適化する。また翻訳効率のよい4塩基コドンの使用法を見出す。</p> <p>(4) 拡張蛋白質生合成系を導入し、機能拡張した生細胞「合成生命体」の作製 非天然アミノ酸の導入に最適化された拡張生化学系を生きた細胞に導入し、細胞中で非天然変異蛋白質を作製する。取り込む人工機能としては、蛍光性や光応答性を予定している。</p> | | | | | | | |

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

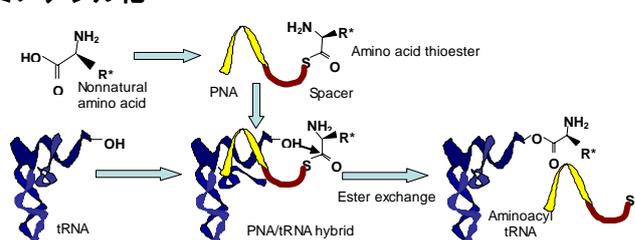
(1) 天然の核酸よりも強く、かつ配列特異的に相補対形成するペプチド核酸の作製

ピロリジン環を含み主鎖にエーテル結合を持つ新規ペプチド核酸が合成された。ピロリジン環には4種類の立体異性体が存在するがそれらすべてを合成した結果、cis-L体はDNAと強く結合し、trans-L体はRNAとよく結合することが明らかになった (*Biopolymers, Peptide Sci.* 印刷中)。これらのペプチド核酸に細胞導入ペプチドを結合すると、エンドサイトーシス機構で細胞中に導入されることも明らかになった。



(2) ペプチド核酸を tRNA 識別分子とした tRNA 特異的アミノアシル化

tRNA の3'末端領域に相補的な Nielsen 型ペプチド核酸を作成し、そのN末端にスペーサーを介してアミノ酸チオエステルを結合させた。これを大腸菌蛋白質合成系に導入すると、ペプチド核酸に相補的な配列をもつ tRNA だけにアミノアシル化が起こることがわかった。これにより、細胞中で特定の tRNA だけに種々の非天然アミノ酸を担持させる可能性が開けた。 (*J. Am. Chem. Soc.*, 2004)



ペプチド核酸を介した tRNA 特異的アミノアシル化

一方、単離精製された tRNA を簡便にアミノアシル化する手法も開発された。tRNA と N 保護アミノ酸活性エステルとをカチオン性ミセル中で混合し超音波照射すると、実用上十分な選択性と収率でアミノアシル化が起こった。この方法はきわめて簡単で高収率であり、実用性が高い。

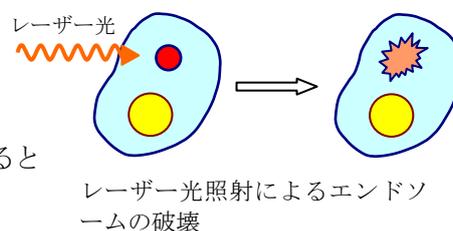
(3) 蛋白質生成に関与する分子群の非天然アミノ酸導入に向けた最適化

種々の非天然アミノ酸の蛋白質導入効率を最適化するため、蛋白質生成に関与する tRNA、翻訳伸長因子 EF-Tu などの分子群、および4塩基コドンの前の配列の影響などについて検討した。まず (a) 非天然アミノ酸を担持する tRNA の最適化を行った。非天然アミノ酸だけを効率よく運ぶためには、天然のアミノ酸ではまったくアミノアシル化を受けないが、何らかの方法で非天然アミノ酸でアミノアシル化されるとそれを効率よくリボソームに運ぶことが要求される。この直交化条件を満たす tRNA を種々探索した結果、ウシミトコンドリア由来の tRNA が極めて高効率でかつ高い直交性を示すことが明らかになった。(b) アミノアシル化 tRNA をリボソームに運ぶのは EF-Tu である。この酵素は天然のアミノ酸を担持した tRNA ならどれでも効率よくリボソームに運ぶ。しかしある種のかさ高い非天然アミノ酸でアミノアシル化された tRNA に対しては効率が極端に低下していることが明らかになった。現在広い範囲の非天然アミノ酸を高効率でリボソームに運ぶ変異体を作製中である。(c) 一方、かさ高い非天然アミノ酸 (aa*) がリボソーム中まで無事に運び込まれても、それが Pro や Leu などの直後である場合、翻訳効率は極端に低下することも明らかになった。すなわち Pro-aa* のような配列は避けるべきであることが分かった。このように非天然アミノ酸の導入効率向上につながるいくつかの重要な知見が得られた。

(4) 拡張蛋白質合成系を導入した生細胞、「合成生命体」の作製

生きている細胞中で非天然アミノ酸変異蛋白質を作製するためには、上述のアミノ酸活性エステル-ペプチド核酸複合体あるいはすでにアミノアシル化した直交化 tRNA を細胞に導入する必要がある。現在細胞導入に広く用いられているカチオン性脂質やカチオン性高分子を用いた場合、細胞内でエンドソーム (小胞) を形成し、細胞質まですばやく移行させることができない。そこで (a) エンドソーム中に

(二光子) 光吸収色素を共存させ、レーザー光照射によってエンドソームを局所的に加熱して破壊する方法、(b) 超音波照射によってエンドソームを破壊する方法、(c) 膜分解作用をもつペプチドをエンドソームへ導入して破壊する方法、などを試みている。これによって非天然アミノ酸を担持したペプチド核酸などを迅速に細胞質に導入し、細胞内で非天然アミノ酸導入蛋白質を発現させることが可能になると期待される。



⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

(1) 酵素を使わない tRNA 特異的非天然アミノアシル化 (*J. Am. Chem. Soc.*, 2004)

非天然アミノ酸による tRNA 特異的非天然アミノアシル化については Scripps 研究所の Schultz らや東京大学の横山らが改変アミノアシル化酵素を用いて成功している。しかし彼らの方法は現存の生物系から出発しているため、それらからかけ離れた構造の側鎖をもつ非天然アミノ酸には適用困難と予想される。本研究では純粋に有機化学的方法で tRNA 特異的なアミノアシル化が可能であることを示した。この方法は広い範囲のアミノ酸や tRNA に使用できる拡張性を持っており、蛍光性アミノ酸、光スイッチアミノ酸、電子の授受に関与するアミノ酸など、多種多様の非天然アミノ酸を含む蛋白質の細胞内発現への突破口を開いた点が重要である。

(2) ミセルを用いた簡便なアミノアシル化

単離された tRNA の試験管内アミノアシル化については, Hecht らが高収率で適用範囲が広い化学的アミノアシル化法を提案している。しかしこの方法はかなり高度の有機合成技術を必要とし、一般の生化学者には困難な過程を含んでいた。今回われわれが提案したミセル法はきわめて簡単な方法であり、誰でも特別な技術や設備なしに実行できるものである。この方法により、非天然アミノ酸導入蛋白質が広い範囲の研究者に実用的に使用され、薬物探索などに応用されることが期待される。

(3) 直交化 tRNA の発見

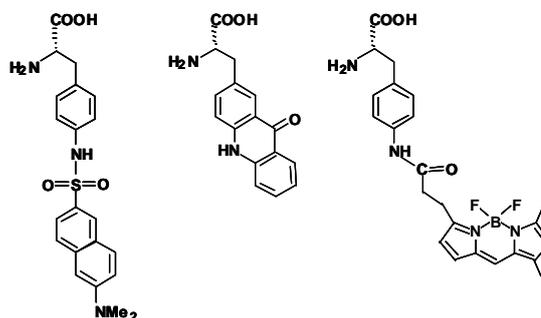
非天然アミノ酸導入にわれわれが今まで用いてきた酵母フェニルアラニン tRNA は、大腸菌中でアルギニンと思われる天然アミノ酸で部分的にアミノアシル化されることが分かった。すなわち非天然アミノ酸の導入位置にアルギニンも入っていた可能性がある。そこで大腸菌中で、天然のアミノ酸によるアミノアシル化をまったく受けない直交化 tRNA を探索したところ、ウシミトコンドリア由来の tRNA がその条件を満たすことが分かった。またこの tRNA の翻訳効率は酵母 tRNA よりも高いので収率の向上も期待できる。

(4) 非天然アミノ酸担持 tRNA と EF-Tu との相互作用

非天然アミノ酸を担持したアミノアシル tRNA と EF-Tu との相互作用については、いままでまったく実験結果がなかった。今回の研究によりいくつかのかさ高い非天然アミノ酸について、そのアミノアシル化 tRNA と EF-Tu とは弱いながらも相互作用していることが分かった。しかし、一部の非天然アミノ酸については極端に相互作用が弱いものがあり、そのことがそれらのアミノ酸が蛋白質に導入できない原因であることが分かった。(3)、(4)の結果は非天然変異蛋白質の純度や収率を上げることに繋がっており、重要な結果である。

(5) 種々の蛍光性非天然アミノ酸の開発と蛋白質導入(*Bioorg. Med. Chem.* 2005)

比較的サイズが小さく、かつ細胞からの背景蛍光が少ない長波長部で励起できるいくつかの蛍光性非天然アミノ酸が合成され、それらの蛋白質導入効率が調べられた。その結果右図に示したようなアミノ酸が蛋白質導入効率もよく、かつ高い蛍光量子収率をもつことが明らかになった。これらの結果は、非天然アミノ酸変異蛋白質を蛍光プロテオーム解析のツールとして用いるときに重要になるものである。



(6) 細胞導入

核酸、蛋白質、あるいは種々の薬物を無侵襲的に細胞導入することは、生化学の多くの分野で現在熱い競争になっている。今回光エネルギーや超音波エネルギーを用いた細胞導入を採用することにより、この分野の発展にも重要な貢献ができると確信している。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (掲載が確定しているものを含む。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

I.学術誌等

- (1) K. Ninomiya, T. Kurita, T. Hohsaka, and M. Sisido, Facile aminoacylation of pdCpA dinucleotide with a nonnatural amino acid in cationic micelle, *Chem. Commun.*, 2242-2243 (2003).
- (2) H. Murakami, T. Hohsaka, and M. Sisido, "Random Insertion and Deletion Mutagenesis" in "Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols" Ed. F.H. Arnold and G. Georgiou, Humana Press, Totowa, NJ, Chapter 8, pp.54-64 (2003).
- (3) 宍戸昌彦, "生化学システムの拡張と非天然アミノ酸のタンパク質への導入", 生物工学会誌, 81(9), 386-391 (2003).
- (4) 二宮啓子, 宍戸昌彦, "酵素を使わないtRNAのアミノアシル化—非天然アミノ酸の蛋白質導入への第1ステップ—", 酵素工学ニュース, 50, 12-19 (2003).
- (5) H. Sasaki, K. Ikeda, M. Suzuki, K. Ninomiya, M. Sisido, Incorporation of Anthraquinonyl Group into λ -Cro Repressor Protein for Strand- and Position-Specific Photocleavage of Double-Stranded DNA, *Biopolymers, Peptide Science*, 76(1), 21-26 (2004).
- (6) T. Hohsaka, N. Muranaka, C. Komiyama, K. Matsui, S. Takaura, R. Abe, H. Murakami, and M. Sisido, Position-Specific Incorporation of Dansylated Nonnatural Amino Acids into Streptavidin by using a four-base codon, *FEBS Lett.*, 560, 173-177 (2004).
- (7) M. Kitamatsu, M. Shigeyasu, T. Okada, and M. Sisido, Oxy-peptide nucleic acid with a pyrrolidine ring that is configurationally optimized for hybridization with DNA, *Chem. Comm.*, 1208-1209 (2004).
- (8) K. Yamanaka, H. Nakata, T. Hohsaka, and M. Sisido, Efficient Synthesis of Nonnatural Mutants in *E.coli in vitro* Protein synthesizing System, *J. Biosci. Bioeng.*, 97(6), 395-399 (2004).
- (9) K. Ninomiya, T. Minohata, M. Nishimura and M. Sisido, *In Situ* Chemical Aminoacylation with Amino Acid Thioesters Linked to a Peptide Nucleic Acid, *J. Am. Chem. Soc.*, 126(49), 15984-15989. (2004).
- (10) H. Hamada, N. Kameshima, A. Szymańska, K. Wegner, L. Łankiewicz, H. Shinohara, M. Taki and M. Sisido, Position-Specific Incorporation of a Highly Photodurable and Blue-Laser Excitable Fluorescent Amino Acid into Proteins for Fluorescence Sensing, *Bioorg. Med. Chem.*, in press (2005).
- (11) M. Kitamatsu, M. Shigeyasu, M. Saitoh and M. Sisido, Configurational Preference of Pyrrolidine-Based Oxy-Peptide Nucleic Acids as Hybridization Counterparts with DNA and RNA, *Biopolymers, Peptide Science*, in press (2005).
- (12) H. Taira, M. Fukushima, T. Hohsaka, and M. Sisido, Four-Base Codon-Mediated Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Proteins in a Eukaryotic Cell-Free Translation System, *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2005).
- (13) M. Sisido, Point-to-Point Electron Transfer and Energy Transfer on a Protein --- A new tool for the analysis of 3-dimensional structure of a protein---, in "Fusion of Nanotechnology and Organic Semiconductors", Proceedings of the 4th Chitose International Forum on Photonics Science & Technology, O. Karthaus, C. Adachi, H. Sasabe, Eds., pp.75-78 (2004).
- (14) M. Sisido, Synthetic Expansion of the Central Dogma: Chemical Aminoacylation, 4-Base Codons and Nonnatural Mutagenesis in "Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics", Proceedings of the Eighteenth American Peptide Symposium, M. Chorev and T. K. Sawyer, Eds. American Peptide Society, pp.294-300 (2004).
- (15) M. Sisido, K. Ninomiya, T. Ohtsuki, T. Hohsaka, Four-base codon/anticodon strategy and non-enzymatic aminoacylation for protein engineering with nonnatural amino acids, *METHOD*, 2005, in press.
- (16) M. Sisido, "Synthetic Expansion of the Central Dogma", in "Chemical Biology", eds by S. Schreiber, T. Kapoor, G. Wess, Wiley-VCH, to be published in Nov. 2005.

II. 国際会議等

- (1) M. Sisido, tRNA-Selective aminoacylation with nonnatural amino acids -- A key step towards synthetic microorganism --The 3rd Peptide Engineering Meeting 7/17-18, 2003, Boston, USA (Invited lecture)
- (2) M. Sisido, Synthetic Expansion of the Central Dogma---Peptide Nucleic Acids, Chemical Aminoacylation, 4-Base codons, and Nonnatural Mutagenesis, The 18th American Peptide Symposium, July 20-23, 2003, Boston, USA (Plenary lecture)
- (3) M. Sisido, Point-to-Point Electron Transfer and Energy Transfer on a Protein--- A new tool for the analysis of 3-dimensional structure of a protein---, The 4th Chitose International Forum (CIF4) on Photonics Science & Technology, December 3-4, 2003, Chitose, Japan (Invited lecture)
- (4) M. Sisido, Synthetic Expansion of the Central Dogma—Chemical Aminoacylation and 4-Base Codon/Anticodon Pairs--, Mini-Symposium on Current Topics in Chemical Biology, May 8, 2004, Copenhagen, Denmark (Invited lecture).
- (5) T. Hohsaka and M. Sisido, Synthetic Expansion of the Central Dogma, Joint symposium of Chemical Biology COE sponsored by Okayama University and 4th Europe-Japan Bioorganic Conference (Mar., 16, Okayama, Japan) (Invited lecture).