

蛋白質合成系の有機化学的拡張と合成生命体の創成 Chemical Expansion of the Central Dogma towards Synthetic Microorganisms

宍戸 昌彦 (Sisido, Masahiko)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授



研究の概要

アミノ酸から蛋白質に至る過程、すなわち tRNA のアミノアシル化、アミノアシル tRNA のリボソームへの運び込み、リボソーム内のコドン/アンチコドン対合に関与する分子群を拡張、もしくは代替物による置き換えを行ない、非天然アミノ酸含有蛋白質を作製した。さらにこれらを哺乳類細胞内で行わせて、細胞内で人工蛋白質を発現させた。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：非天然アミノ酸、4塩基コドン、アミノアシル化、非天然変異蛋白質

1. 研究開始当初の背景・動機

大腸菌蛋白質合成系を抽出した混合物中で、非天然アミノ酸を含む蛋白質合成ができていた。これを生きた細胞中で行うために、蛋白質合成過程に関与する分子群の改変あるいは代替物による置換を計画した。

2. 研究の目的

アミノ酸を蛋白質に導入する種々の段階、すなわちアミノアシル化、EF-Tu との結合、コドン/アンチコドンの対合、などを細胞内でも可能になるように拡張し、非天然アミノ酸を受け付けるようにする。

3. 研究の方法

(1)非天然アミノ酸を受け付ける直交tRNAを作製し、哺乳類合成系で他のtRNAとは独立に機能することを確認する (DNAシーケンサー購入)

(2)非天然アミノ酸を結合したペプチド核酸を合成し、それとtRNAとを結合させることによってアミノアシル化を行う (液体クロマトグラフ購入)

(3)細胞中で直交tRNAを発現させ、そこに蛍光性非天然アミノ酸を担持したペプチド核酸を導入することによって、非天然アミノ酸導入蛋白質を作製 (蛍光分光光度計購入)

4. 研究の主な成果

(1)種々の非天然アミノ酸の作製とそれらを含む蛋白質の細胞外合成

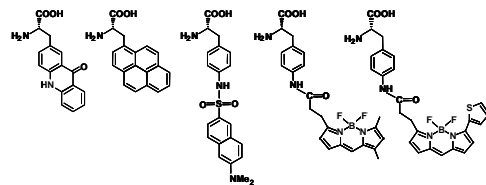


図1. 本研究で導入された蛍光性非天然アミノ酸の例

種々の蛍光性非天然アミノ酸 (図1) を蛋白質導入のために使える直交tRNAを探し、3種類の新規tRNAを発見した。また非天然アミノ酸担持tRNAを効率よく結合する変異EF-Tuを作製した。

(2)酵素を使わないtRNA特異的アミノアシル化

特定のtRNAだけと結合するペプチド核酸を用い、それに非天然アミノ酸を担持させることによって、細胞外合成系中での特定tRNAのアミノアシル化に成功した。

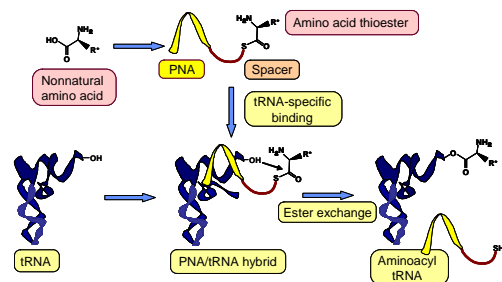


図2. ペプチド核酸を介したtRNA特異的アミノアシル化

(3) 細胞内非天然アミノ酸含有蛋白質作製

非天然アミノ酸を蛋白質に導入するための直交 tRNA と拡張 EF-Tu などの分子群、またコドン/アンチコドンの探索を細胞外蛋白質合成系を用いて行った。また細胞内で非天然アミノ酸のために使用できるコドンとして UAG や UAGG などを見出した。そこでペプチド核酸法によるアミノアシル化をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞中で行った (図 3)。

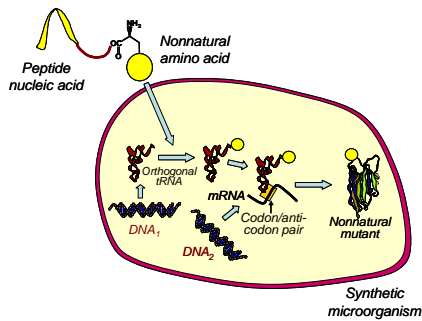


図 3. ペプチド核酸を介したアミノアシル化による細胞内非天然変異蛋白質作製 (合成生命体への糸口)

その結果、非天然アミノ酸含有蛋白質の発現が検出された。これは細胞内でも、人工的な蛋白質合成系が機能していることを示し、合成生命体への糸口となったことを示している。

(4) 非天然アミノ酸含有蛋白質やペプチドの薬剤探索への応用

本研究で、種々の蛍光性アミノ酸が合成され、それらを蛋白質やペプチドに導入できることが示された。それらの蛍光標識ペプチドからの薬剤探索への応用が始まっている。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

人工合成物を用いて蛋白質合成の経路の一部を代替させることができた。その結果、天然の 20 種類を超えた多くの種類の非天然アミノ酸の蛋白質への導入が可能になった。さらにそれらを生きた細胞中で機能させることができることも示され、合成生命体への確かな一歩が始まった。

これらの手法を用いて、ペプチドや蛋白質の混合物から特定の機能をもつ薬剤候補化合物を見出すことが可能であり、その先行研究がすでに開始されている。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- (1) Y. Doi, T. Ohtsuki, Y. Shimizu, T. Ueda, and **M. Sisido**, EF-Tu Mutants Expand Amino Acid Tolerance of Protein Biosynthesis System, *J. Am. Chem. Soc.*, 129(46), 14458-14462 (2007).
- (2) D. Kajihara, R. Abe, I. Iijima, C. Komiyama, **M. Sisido**, and T. Hohsaka, FRET analysis of protein conformational change through position-specific incorporation of fluorescent amino acids. *Nature Methods*, 3, 923-929 (2006).
- (3) T. Ohtsuki, T. Manabe and **M. Sisido**, Incorporation of multiple kinds of nonnatural amino acids into a protein by tRNAs with nonstandard structures, *FEBS Lett.*, 579, 6769-6774 (2005).
- (4) N. Hishimoto, K. Ninomiya, T. Endo and **M. Sisido**, Simple and quick chemical aminoacylation of tRNA in cationic micellar solution under ultrasonic agitation, *Chem. Commun.* 2005(34), 4321-4323 (2005).
- (5) 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, 15984-15989 (2004).
- (6) **M. Sisido**, "Synthetic Expansion of the Central Dogma", in "Chemical Biology", Chapter 5.2, ed. by S. Schreiber, T. Kapoor, G. Wess, Chapter 5.1, pp. 271-295, WILEY-VCH, Weinheim (2007).

ホームページ等

<http://www.biotech.okayama-u.ac.jp/labs/sisido/sisido1.html>