

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成30年度

受付番号 201860058

氏名 橋本 靖司

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：La Jolla (CA), Jupiter (FL)（国名：米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

人工核酸を利用した遺伝暗号拡張による新規タンパク質発現系の開発

3. 派遣期間：平成31年2月1日 ～ 令和3年1月31日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： The Scripps Research Institute

部局名： Department of Chemistry, Department of Immunology and Microbiology

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式10－別紙1～4に記入の上、併せて提出すること。

成果 1：人工塩基対による遺伝暗号拡張可能性の検証

背景

遺伝子は 2 対の DNA 塩基対 (A-T, G-C) で構成され、4 種類の文字 (genetic alphabet) により遺伝情報が記述されている。その遺伝情報は、3 つの連続した塩基配列 (コドン) に対して 1 つのアミノ酸が割り当てられることを規定した遺伝暗号 (genetic code) に基づいて翻訳される。64 (= 4³) 個存在するコドンのうち、3 つは翻訳終結を意味する終始コドンとしての役割を持ち、残る 61 個のコドンはアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) によりアミノ酸が結合された tRNA によって認識され、リボソームにてタンパク質が合成される。細胞は 20 種類のアミノ酸 (天然アミノ酸) で構成されたタンパク質を利用して細胞システムを維持しているが、天然のタンパク質に対して非天然アミノ酸を導入することができれば、タンパク質の機能を顕著に向上させたり、新しい機能を付与させることができる。すなわち、非天然アミノ酸を導入できるように遺伝暗号を改変・拡張することで、翻訳系を利用した高機能タンパク質の作製が可能となり、この技術は新薬開発等に応用できる。最も利用されている遺伝暗号拡張方法として、終止コドンに対して非天然アミノ酸を割り当てる方法がある。例えば、古細菌の *Methanosarcina mazei* 由来の pyrrolysine をコードする tRNA と ARS (それぞれ Mz tRNA と PylRS) を大腸菌で発現させることで、アンバーコドンに対して非天然アミノ酸を割り当てることができる (amber suppression、図 1、本研究では翻訳後のバイオコンジュゲーションが可能な *N*⁶-(2-azidoethoxy)-carbonyl-L-lysine (AzK) を導入)。しかし上記の遺伝暗号拡張法には、元々の翻訳終結反応や天然アミノ酸導入反応と競合してしまうために、タンパク質の発現量が乏しかったり、非天然アミノ酸が正しく導入されたタンパク質の割合が少ないといった課題が存在していた。

先行研究

この問題を解決するための方策として、genetic code を記述する genetic alphabet を追加する研究が行われてきた (図 2)。私が所属した Romesberg 研究室では第 3 の塩基対、そして、5、6 番目の genetic alphabet として dNaM-dTPT3 塩基対 (unnatural base pair; UBP、以下 NaM 塩基を X、TPT3 塩基を Y で表す) が開発された (図 3)。この UBP のトリリン酸体 (dXTP および dYTP) は、細胞膜上に珪藻由来のヌクレオチドトランスポーターを発現させることで大腸菌に取り込ませることができた。さらに UBP を含むプラスミドは、大腸菌の複製系によって UBP を維持したまま複製された。以上から genetic alphabet 追加可能性が証明された。次に UBP を含むコドン (unnatural codon) を用いた遺伝暗号拡張について検証がなされた。その結果、デオキシリボヌクレオチドだけでなくリボヌクレオチド (XTP および YTP) も大腸菌に取り込ませることで、UBP を含む mRNA と tRNA が転写され、さらに大腸菌の翻訳系を利用して unnatural codon に対して非天然アミノ酸を割り当てることができることもわかった (図 4)。

目的

UBP による遺伝暗号拡張可能性が明らかになった一方で、先行研究では 2 種類の unnatural codon (AXC と GXC) が翻訳可能であることしか示されていなかった。そこで本研究では unnatural codon の翻訳可能性を網羅的に解析することにした。

方法

概要を図 5 に示す。まず、調べたい unnatural codon を含む GFP 遺伝子と、それに対応する unnatural anticodon を有する Mz tRNA 遺伝子を含むプラスミドを構築した。次にこのプラスミドを、ヌクレオチドトランスポーターと PylRS を発現している大腸菌に導入した。培地に unnatural codon の複製・転写に必要な dXTP, dYTP, XTP, YTP を加えた状態で GFP 発現を誘導し、大腸菌内における GFP 蛍光量を、非天然アミノ酸である AzK が存在する条件としない条件それぞれにおいて計測した。さらに GFP タンパク質を精製し、AzK に対してクリック反応を利用して TAMRA をバイオコンジュゲーションした。AzK が正しく導入された GFP は TAMRA コンジュゲーションによって分子量が増加することを利用して、クリック反応後の GFP タンパク質をウェスタンブロッティングにより検出し、各 unnatural codon の翻訳効率を定量化した。

結果 1：翻訳可能な unnatural codon のスクリーニング

全ての unnatural codon に対して、GFP の発現、精製、クリック反応、ウェスタンブロッティングの工程を行うのは大変な労力であり現実的ではない。そこでまず我々は UBP の位置を指標として 1st position codon, 2nd position codon, 3rd position codon に場合分けをした。さらに翻訳が hetero pair (mRNA が X に対して tRNA が Y またはその逆) だけでなく、homo pair (X に対して X、Y

に対して Y) で起こる可能性も検証した。1st position codon については、GFP の発現が見られなかったため、ここで検証を終了した(図 6 上段)。2nd position codon については過去の報告通り、hetero pair による翻訳可能性が示唆された(図 6 中段)。3rd position codon においては 2nd position codon のような hetero pair による GFP 発現が見られなかった。しかし驚いたことに、unnatural codon と unnatural anticodon の両方に X を含む homo pair の場合に、GFP 発現が見られた(図 6 下段)。以上の実験から、2nd position の hetero pair codon そして 3rd position の homo pair codon を翻訳可能な unnatural codon の候補として選出し、それらについて網羅的な GFP 発現実験および TAMRA コンジュゲーションを行った(図 7)。その結果、13 個の 2nd position codon 候補のうち、報告済みの 2 つのコドンを含む 9 個のコドンにおいて、分子量変化に伴う GFP タンパク質のバンドシフトが検出された。さらに 3rd position codon についても、1 つを除く 11 個のコドンについてバンドシフトが検出された。以上から多くの unnatural codon が翻訳され得ることが示唆された。

結果 2 : 高効率に非天然アミノ酸を導入できる unnatural codon の同定

上記の実験では bulk population の大腸菌から GFP を発現させた。この実験条件では、unshifted band の原因が翻訳反応の不具合によるものなのか、もしくは unnatural codon から UBP が失われたことによるものなのか区別できなかった。そこで以降の実験では、UBP が維持されている大腸菌をクローニングしたのち GFP 発現を誘導した。結果 1 のスクリーニングで有望と判断した 11 個の unnatural codon について実験を行った結果、ほとんどの場合で amber suppression で発現する GFP と同程度の発現量が検出された(図 8)。さらにウェスタンブロッティングの結果、9 個について GFP バンドが完全にシフトしていた。以上から少なくとも 9 個の unnatural codon に対して高効率に非天然アミノ酸が導入されていることが示された。

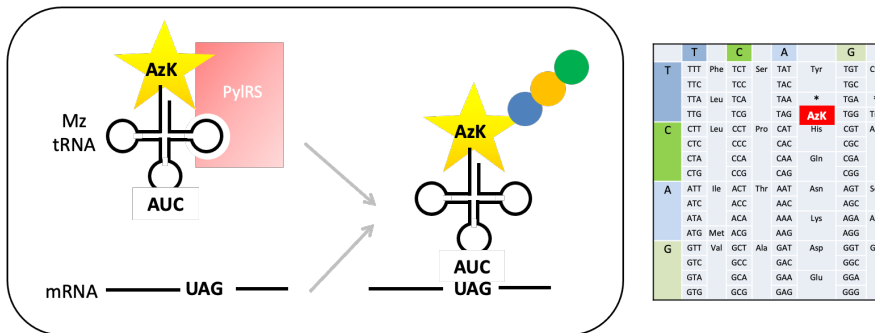
結果 3 : unnatural codon は互いにオーソゴナルである

AXC, GXT, AGX の 3 つの unnatural codon についてオーソゴナリティを確認した。例えば AXC コドンを含む GFP 遺伝子に対し、AXC に対応する GYT unnatural anticodon を持つ Mz tRNA とは別に、AXC に対応しない AYC, XCT unnatural anticodon を持つ Mz tRNA を持つプラスミドを導入した大腸菌も作製し GFP 発現を誘導した。その結果、対応する unnatural anticodon の場合には高い GFP 発現量が検出されたのに対して、対応していない unnatural anticodon の場合には GFP 発現が検出されなかった(図 9)。以上から 3 つの unnatural codon が互いにオーソゴナルあることがわかった。

結果 4 : unnatural codon は同一遺伝子内で使用可能である

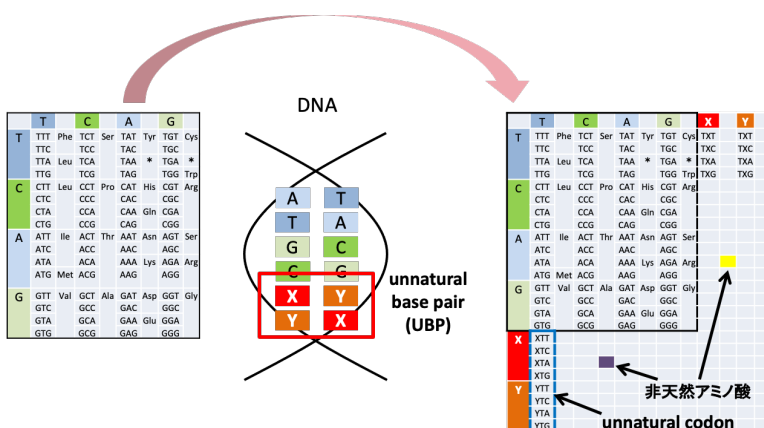
最後に同一遺伝子内で 3 つの unnatural codon に同時にアミノ酸を導入できるか試みた(図 10)。そのために GFP 遺伝子内に 3 つ、3 つの tRNA に 1 つずつ、計 6 個の UBP を含むプラスミドを構築した。その際、AGX コドンに対して AzK が、AXC コドンに対して *p*-azido-phenylalanine (*p*AzF) が割り当てられるように設計した。それ以外に効率よく非天然アミノ酸を導入できる tRNA と ARS のペアが知られていなかったため、大腸菌由来の Ser tRNA のアンチコドンに unnatural anticodon に置換することで、GXT コドンに対しては天然アミノ酸である Ser が割り当てられるようにした。発現した GFP は精製し質量分析により解析した。その結果、96% の GFP が AzK, *p*AzF, Ser の全てを含んでいた。不純物としては *p*AzF を含まない GFP が微量検出されたが、代わりに Ile が導入されていることから、これは X の複製ミス (AXC→ATC) によるものであり翻訳の問題ではないと予想された。Ser を含まない GFP も検出されたが、こちらはバックグラウンドレベルの検出量だった。以上から 3 つの unnatural codon を同一遺伝子内で同時に使用できることが証明された。

本研究は世界で初めて、67 個のコドンを使用する合成生物を報告したものであり、本成果は Nature Chemical Biology 誌に掲載された(論文名: New Codons for Efficient Production of Unnatural Proteins in a Semisynthetic Organism)。



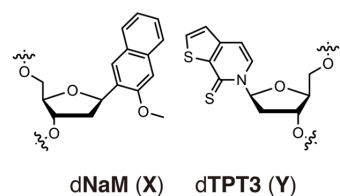
(図 1) amber suppression による genetic code の上書き

古細菌由来の Mz tRNA と PylRS を大腸菌に発現させることで、アンバーコドン (UAG) に対して非天然アミノ酸である AzK を割り当てることができる (左図)。これは既存の genetic code に対して上書きするような形で genetic code を改変したことになる (右図)。

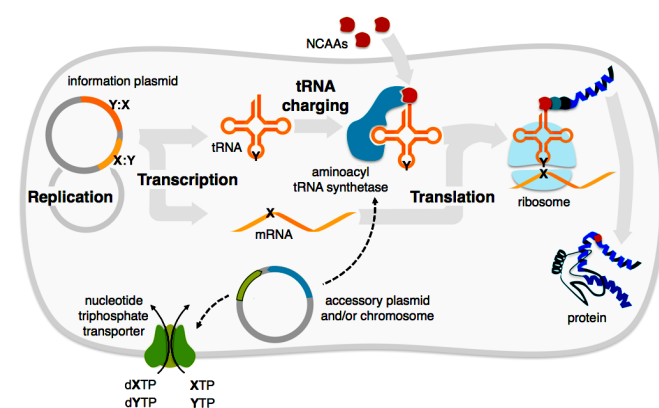


(図 2) genetic alphabet を追加することにより genetic code を拡張する

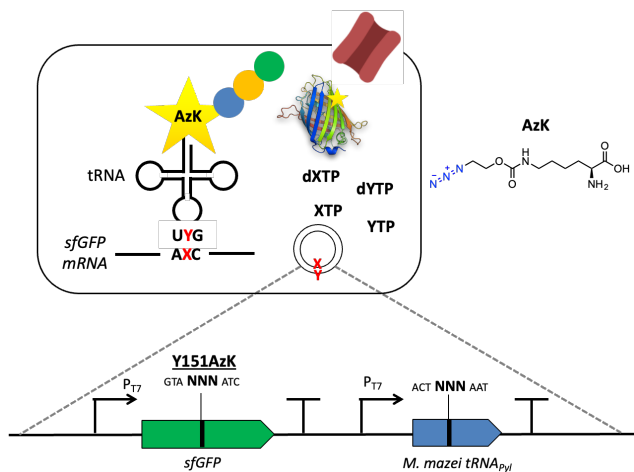
既存の 4 つの genetic alphabet (ATGC) に対して、unnatural base pair (UBP) である X, Y を加えることができれば、既存の genetic code を拡張し、UBP を含む空きのコドン (unnatural codon) に対して非天然アミノ酸を割り当てることができる。



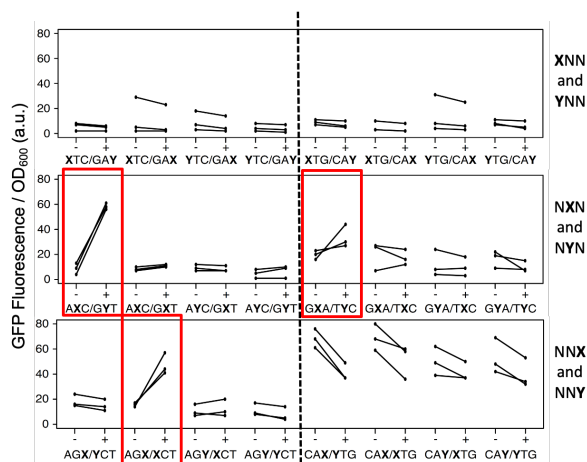
(図 3) UBPs の構造式



(図 4) unnatural codon 翻訳系の模式図

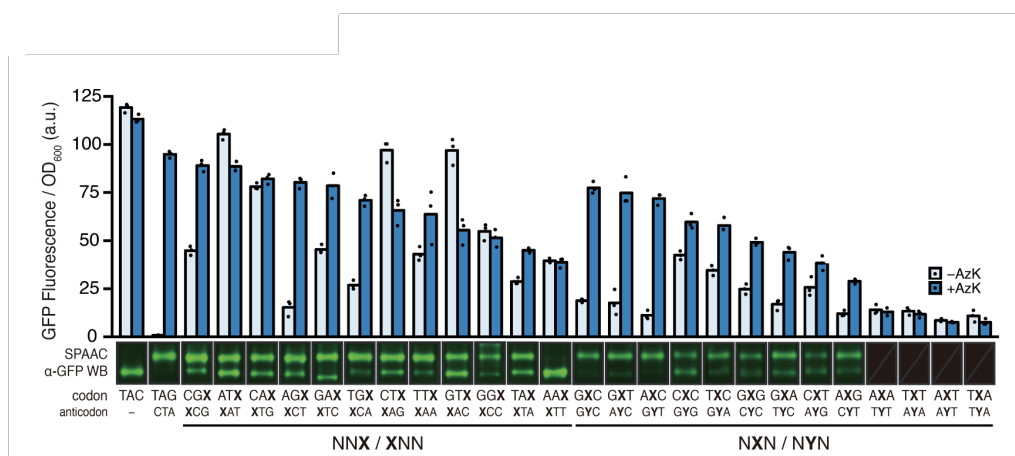


(図 5) 実験方法の概要



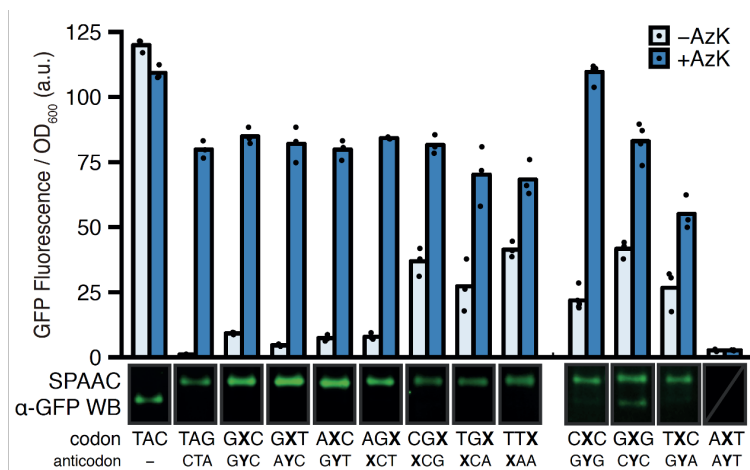
(図 6) UBP の位置による unnatural codon の翻訳能の違い

NNN/NNN はそれぞれ unnatural codon/ unnatural codon の配列を示す。左側のプロットは AzK 非存在下、右側のプロットは AzK 存在下における GFP 蛍光量を示す。赤枠で示したコドンにおいて、AzK 非存在下で GFP が発現していないのに対し AzK 存在下で発現していることから、これらのカテゴリに含まれる unnatural codon の翻訳は可能であることが示唆された。



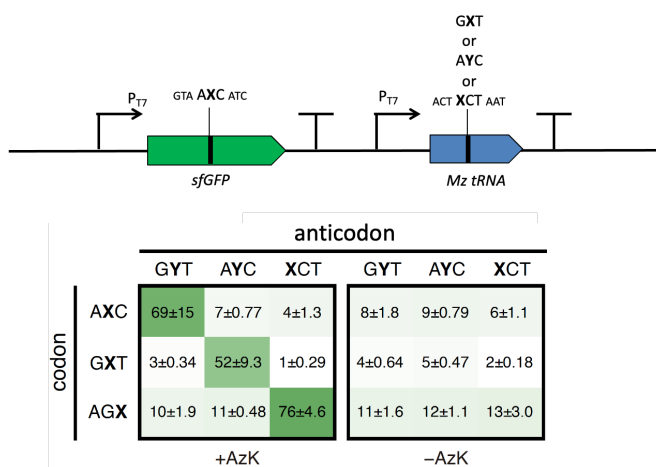
(図 7) 2nd position codon および 3rd position codon の翻訳可能性解析

棒グラフは大腸菌内における GFP 発現量を示す。棒グラフの下にはウェスタンブロッティングの結果を示す。unnatural codon が翻訳可能であれば GFP タンパク質に AzK が導入されているので、TAMRA コンジュゲーションにより分子量が増加しバンドシフトとして検出される。



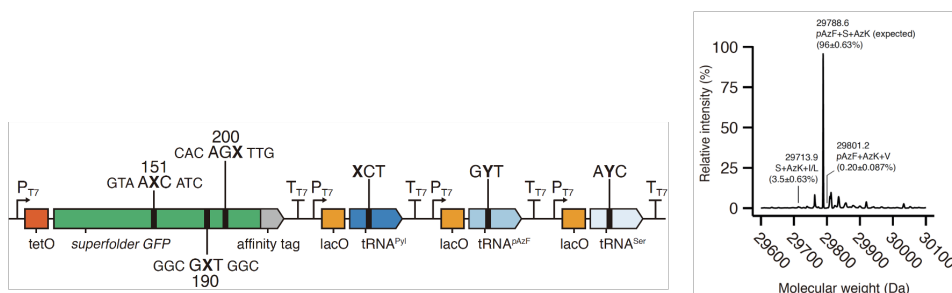
(図8) 高効率に非天然アミノ酸を導入できる unnatural codon の同定

GXG, AXT を除く 9 個の unnatural codon から発現する GFP において、コンジュゲーション後 GFP バンドが完全にシフトしており、AzK が高効率に導入されていることが明らかとなった。



(図9) unnatural codon は互いにオーソゴナルである

AzK 非存在下で GFP 発現が見られないことから、unnatural codon は天然の tRNA/ARS ペアに対してオーソゴナルな関係であることがわかった。さらに AzK 存在下で、対応する unnatural codon と unnatural anticodon をコードしている条件でのみ GFP 発現が見られることから、3 つの unnatural codon 同士もオーソゴナルな関係であることがわかった。



(図10) unnatural codon は同一遺伝子内で使用可能である

左の模式図に示す遺伝子を含むプラスミドを導入し GFP 発現を誘導した。GFP は精製し質量分析によりアミノ酸構成を解析した。

成果 2：適応進化を利用した人工塩基順応型大腸菌の作製

目的

成果 1 によって新たな unnatural codon が同定された一方、非天然アミノ酸導入効率が低い unnatural codon や、非天然アミノ酸導入が全く検出できない unnatural codon が存在する、という課題も見つかった。大腸菌は自然界の長い歴史の中で、天然塩基に適応するように進化してきたと考えられる。そこで我々は、大腸菌を実験室内で短期間に、人工塩基に再適応させるためのシステムを構築することを目指した。

方法

野生型 β -ラクタマーゼ遺伝子内のセリンコドンと大腸菌セリン tRNA 遺伝子のアンチコドンを、それぞれ unnatural codon と unnatural anticodon に置換したものを作製した(図 11)。70 番目のセリンは β -ラクタマーゼが酵素活性を示すために必須の残基であることから、もし培地からの人工塩基のトリリン酸体の取り込みや人工塩基の複製や転写、unnatural codon の翻訳等に問題があった場合、活性のある β -ラクタマーゼが発現せず、大腸菌がカルベニシリン感受性になると考えた。つまり我々は、カルベニシリンによる選択圧によって、人工塩基に適応した大腸菌が選択されることを期待した。

結果 1：大腸菌 RNA ポリメラーゼによる人工 β -ラクタマーゼの発現

まず成果 1 の GFP 発現の場合と同じように、 β -ラクタマーゼ遺伝子とセリン tRNA 遺伝子を T7 プロモーター下流に配置したプラスミドを作製し、大腸菌に導入した。その結果、XTP/YTP を培地に加えることでカルベニシリン存在下でも大腸菌の生育を確認できたため、活性のある β -ラクタマーゼが発現していることが示唆された(図 12A)。さらに我々は T7 プロモーターを大腸菌プロモーターに置換したプラスミドで同様の実験を行い、 β -ラクタマーゼの発現させることに成功した(図 12B)。なおこの結果は、大腸菌 RNA ポリメラーゼのようなマルチサブユニットの転写酵素により UBP が転写されることを示した世界初の成果である。大腸菌 RNA ポリメラーゼはその転写量やタイミングが大腸菌内のシステムによって正確にコントロールされていることから、それらを利用することで今後より精緻な UBP 転写システムの構築が期待される。

結果 2：大腸菌の生育は XTP と YTP それぞれのリボヌクレオチドに依存する

大腸菌生育の人工塩基依存性をより詳細に調べるために、片方の人工リボヌクレオチド濃度を固定した上で、もう片方を様々な濃度で培地に加えた条件で大腸菌生育をモニターした。YTP 濃度を $30\ \mu\text{M}$ で固定した際、XTP 濃度が $100\ \mu\text{M}$ 以上では正常に生育したが、 $50\ \mu\text{M}$ では生育に問題が出始め、 $25\ \mu\text{M}$ 以下では生育しなくなった(図 13A)。また、XTP 濃度を $200\ \mu\text{M}$ で固定した場合には、YTP 濃度が $7.5\ \mu\text{M}$ 以上では正常に生育したが、 $4\ \mu\text{M}$ 付近から問題が生じ、 $1.8\ \mu\text{M}$ 以下では生育しなくなった(図 13B)。以上から、unnatural codon にコードされた β -ラクタマーゼによって、大腸菌の生育が XTP にも YTP にも依存していることが明らかになった。

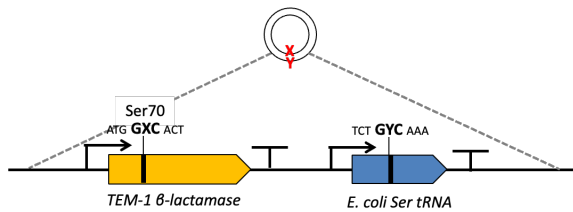
結果 3：機能のあるヌクレオチドランスポーターのセレクション

unnatural codon にコードされた β -ラクタマーゼの大腸菌適応進化実験への応用可能性を調べるために大腸菌セレクション実験を設計した(図 14A)。まず人工ヌクレオチドを取り込む機能のある大腸菌 (SSO) と、ランスポーター遺伝子中に終止コドンを導入されていることで取り込み機能のない大腸菌 (SSO Δ) を準備した。これら 2 種類の株を様々な割合で混合し、unnatural codon にコードされた β -ラクタマーゼを導入した。この大腸菌集団に対してカルベニシリン処理することにより、人工ヌクレオチドを取り込めない SSO Δ は増えることができず、SSO のみが生き残ることを期待した。SSO Δ のランスポーター遺伝子にのみ制限酵素サイトを挿入しているため、大腸菌集団の中で SSO が選択されたことは、制限酵素処理後でも全長の DNA バンドが検出されることにより確認できるようにした。

以上の仮説に基づいて、dXTP として dNaMTP を、dYTP として dTPT3TP を用いてセレクション実験を行った(図 14B)。その結果 SSO:SSO Δ =1:99 までは SSO を回収できた一方、最初の SSO の数が最も少ない SSO:SSO Δ =1:999 の条件では SSO を回収してくることができなかった。この結果について、我々は unnatural codon にコードされた β -ラクタマーゼの転写量が少ないことが原因であると考えた。そこで次に、第 2 世代 UBP として見出され転写活性が dNaM よりも高いことが分かっている dCNMO を dX として用いて同様の実験を行った (dY としては dTPT3 をそのまま用いた)。その結果、SSO:SSO Δ =1:999 の条件でも SSO をセレクションしてくることに成功した(図 14C)。このセレ

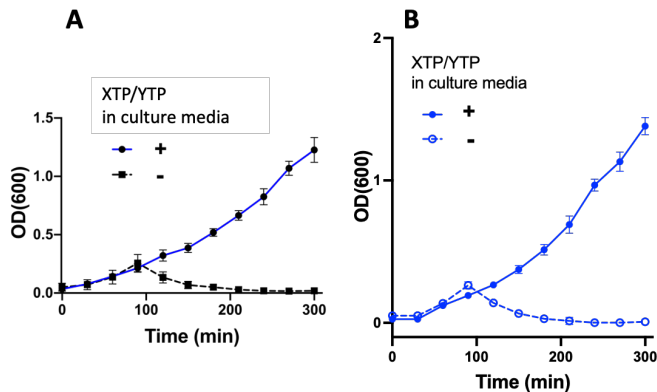
クシヨシ実験の成功を受けて、今後はトランスポーター遺伝子ライブラリを導入して上記の実験を行い、ヌクレオチド取り込み効率の良いトランスポーターの作製を目指す。さらに次の目標として、同様のセレクションを行って人工塩基に適応した DNAP、RNAP、リボソームを同定することで、利用可能な unnatural codon を増やし、今まで作製することのできなかった新機能タンパク質を作製するためのプラットフォームとして利用することを目指している。

後半の成果は Journal of the American Chemical Society 誌に掲載され、さらに Spotlight 記事としても取り上げられた（論文名：Efforts toward Further Integration of an Unnatural Base Pair into the Biology of a Semisynthetic Organism）。



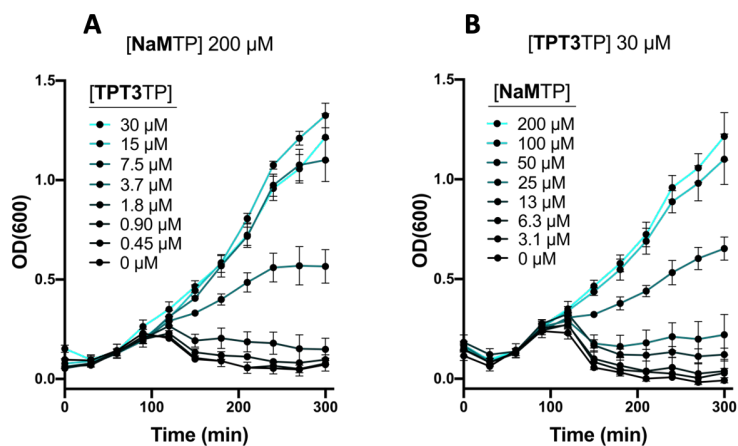
(図 11) unnatural codon にコードされた β -ラクタマーゼ

β -ラクタマーゼ遺伝子の 70 番目のセリンコドンに GXC に、大腸菌セリン tRNA 遺伝子のアンチコドンに GYC に置換した。もし人工塩基の取り込みに問題があれば、大腸菌は活性のある β -ラクタマーゼを発現することができず、カルベニシリン感受性になる。



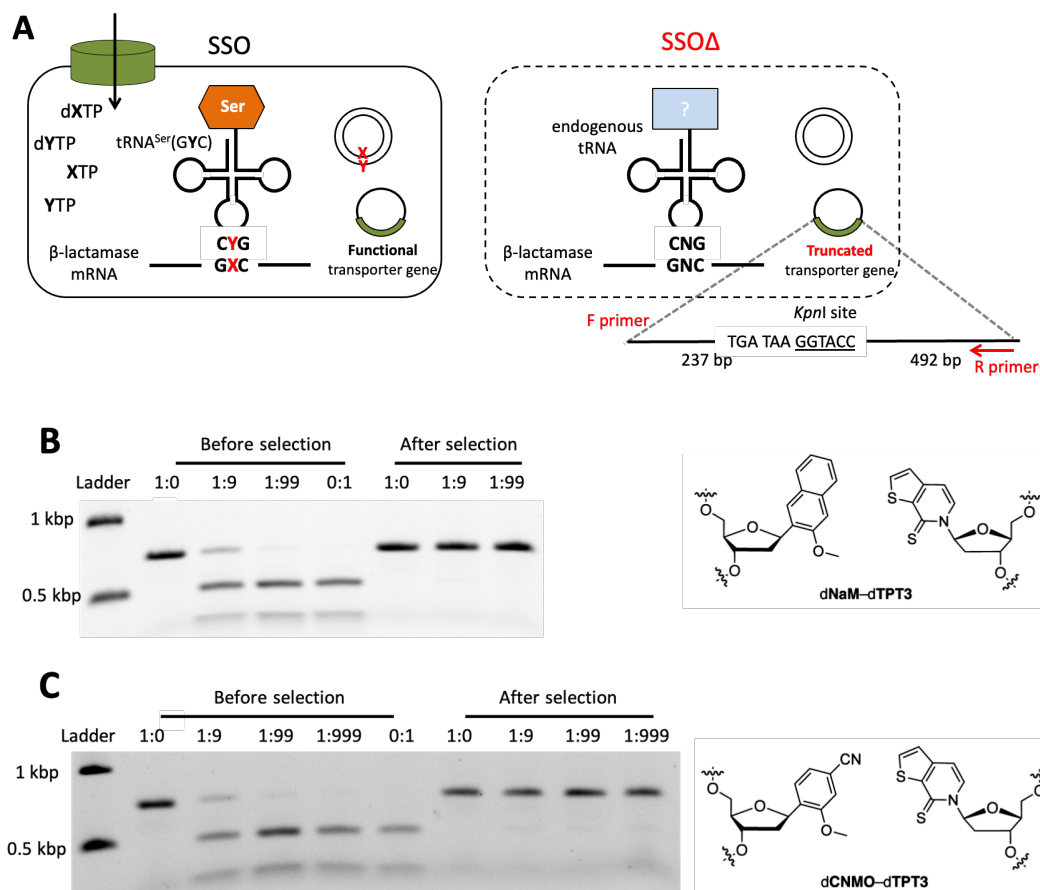
(図 12) 人工 β -ラクタマーゼの発現

リボヌクレオチド存在下または非存在下での OD600 のタイムコースプロット。培養開始後 60 分に人工リボヌクレオチドを添加し、さらに 30 分後にカルベニシリンを添加した。(A)では T7 RNA ポリメラーゼによって、(B)では大腸菌 RNA ポリメラーゼによって、unnatural codon にコードされた β -ラクタマーゼ遺伝子、および unnatural anticodon を持つ大腸菌セリン tRNA 遺伝子が転写されている。



(図 13) 大腸菌の生育は培地に加えたリボヌクレオチドの濃度に依存する

一連の XTP 濃度(A)および YTP 濃度(B)に対する OD600 のタイムコースプロット。培養開始後 60 分に図中に示した濃度の人工リボヌクレオチドを添加し、さらに 30 分後にカルベニシリンを添加した。



(図 14) 人工 β -ラクタマーゼを利用した機能性トランスポーター発現大腸菌のセレクション

(A) SSO および SSO Δ の主要構成要素と、トランスポーター遺伝子の切断箇所を示した図。SSO 株はトランスポーターで人工ヌクレオチドを取り込むことによって、unnatural codon GXC に対して tRNA^{Ser}(GYC) によってセリンが割り当てられ、カルベニシリンに対して抵抗性を示す。一方、SSO Δ 株は人工ヌクレオチドを取り込むことができないため、内在する天然の tRNA によってセリン以外のアミノ酸が割り当てられてしまい、カルベニシリン感受性となる。図中に示したプライマーによる PCR 増幅および KpnI 消化後、SSO の存在は全長 729bp のアンプリコンとして検出される一方、SSO Δ の存在は断片化されたアンプリコン (237 + 492bp) として検出される。

(B, C) PCR 増幅したトランスポーター遺伝子の DNA バンド。SSO の選択は、729bp の完全長のアンプリコンとして検出された。選択前の SSO:SSO Δ の比率を各レーンの上に示した。

(B) 大腸菌混合液に対して **dNaM** にコードされた β -ラクタマーゼ遺伝子を形質転換し、カルベニシリンで選択した。なお、1:999 の混合液からは大腸菌が回収できなかったため、解析をしていない。

(C) 大腸菌混合液に対して **dCNMO** にコードされた β -ラクタマーゼ遺伝子を形質転換し、カルベニシリンで選択した。