

Ser/Leu 交換遺伝暗号による高効率な無細胞タンパク質合成



藤野 公茂

ペプチドリーム株式会社

(元名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻)

1. Ser/Leu 交換遺伝暗号の提案

近年、標準遺伝暗号と直交性を持つ新規遺伝暗号の構築により、遺伝子組換え生物と自然環境中の生物の間での、遺伝子水平移動に伴うリスクを低減させる戦略が注目されている。研究初期の新規遺伝暗号としては、空コドンや非天然アミノ酸を含むものが考案された^{1, 2)}。しかし、空コドンでは、組換え生物から通常生物への遺伝子の漏洩は防げず、非天然アミノ酸を利用する方法では、タンパク質毎に設計が必要で汎用性に欠ける等の

問題があった。

これに対し我々は、Ser と Leu の位置を入れ換えた『Ser/Leu 交換遺伝暗号』の構築を提案した(図1)³⁾。この遺伝暗号でSer/Leu 交換の鍵となるのは、アンチコドンを相互に交換されたキメラ tRNA^{Leu_{GGA}}, tRNA^{Ser_{GAG}}である。Ser, Leu に対応するアミノアシル tRNA 合成酵素は、アンチコドン を認識しないため、キメラ tRNA に対してボディの配列に従いアミノ酸を結合する。よって、このキメラ tRNA を用いて、Ser/Leu コドンの位置を

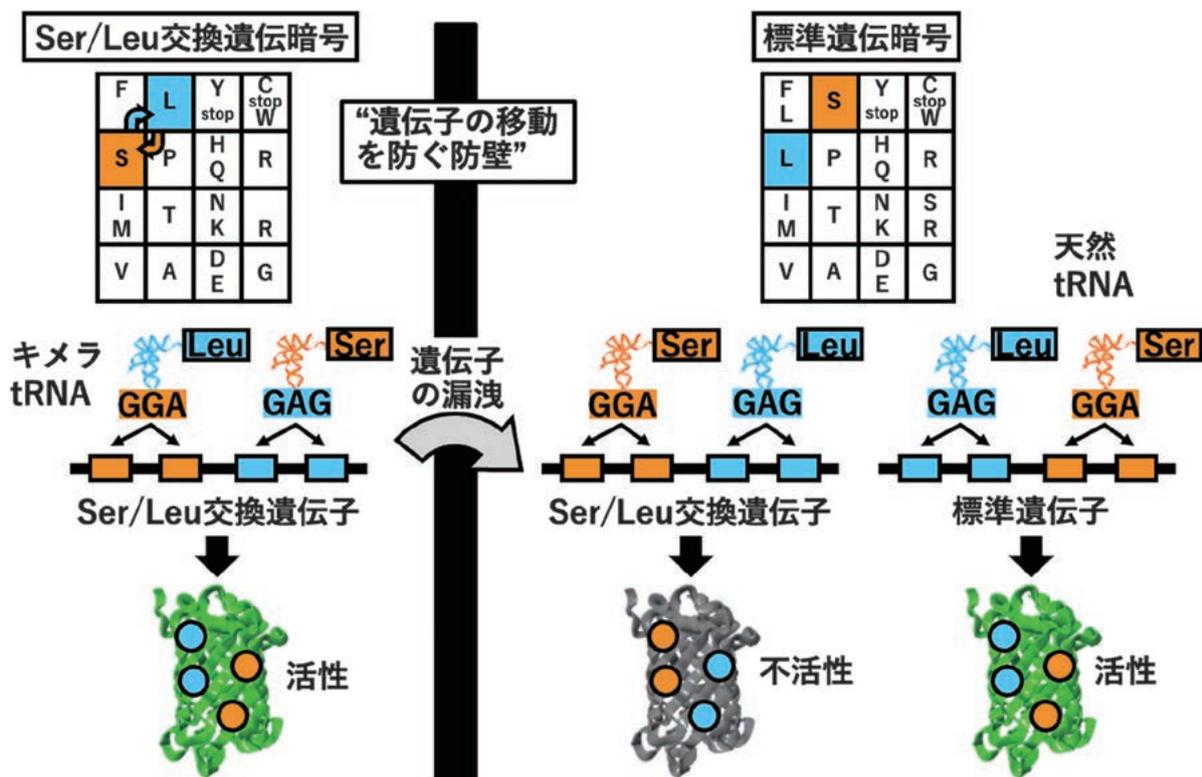


図1 Ser/Leu 交換遺伝暗号により遺伝子の移動を実質的に防止する仕組み。

交換した遺伝子を翻訳することで、結果的に正しい配列を持った活性なタンパク質が得られると予想される。この Ser/Leu 交換遺伝子は、仮に自然界に漏洩しても、標準遺伝暗号に従い Ser/Leu の位置が交換されたまま翻訳されて不活性になると考えられる。よって、遺伝子漏洩による実質的なリスクは低減されることになる。なお、標準遺伝暗号が Ser/Leu 交換遺伝暗号で翻訳された際も、同様に不活性となるため、遺伝子の移動は双方向に防がれると期待される。本研究では、生物を用いた実験に先行するモデルとして、無細胞翻訳系を用いて Ser/Leu 交換遺伝暗号を構築することで、上記のコンセプトを実証することを目的とした。

2. 天然・転写ハイブリッド tRNA の調製

キメラ tRNA は生合成できないため、試験管内転写反応による調製が必須となる。一方、その他の tRNA は、大腸菌から抽出した活性の高い天然 tRNA を用いることが望ましい。実際、我々は以

前に、系に必要な21種類の tRNA 全てを試験管内転写反応で調製し翻訳系構築を試みた結果、タンパク質合成量が非常に低くなってしまったことを明らかにした³⁾。しかし、天然 tRNA とキメラ tRNA を併せて使うためには、天然 tRNA 中の tRNA^{Ser}、tRNA^{Leu} を予め除去することが求められる。そこで、大腸菌 tRNA のうち tRNA^{Ser}、tRNA^{Leu}、tRNA^{Tyr} のみが85~93塩基と例外的に長いことを利用して (図2左)、変性電気泳動により tRNA を分離した後 (図2右)、バンド II 部分のゲルを切り出して tRNA を抽出した。ここに試験管内転写反応で調製したキメラ tRNA^{Ser}_{GAG}、tRNA^{Leu}_{GGA}、tRNA^{Tyr}、tRNA^{Phe} を添加し、天然・転写ハイブリッド tRNA を調製した (tRNA^{Phe} 添加必要性については、誌面の都合で未掲載のため文献参照)⁴⁾。

3. モデルペプチドを用いた Ser/Leu 交換翻訳の検証

ハイブリッド tRNA を用いて再構成無細胞翻訳

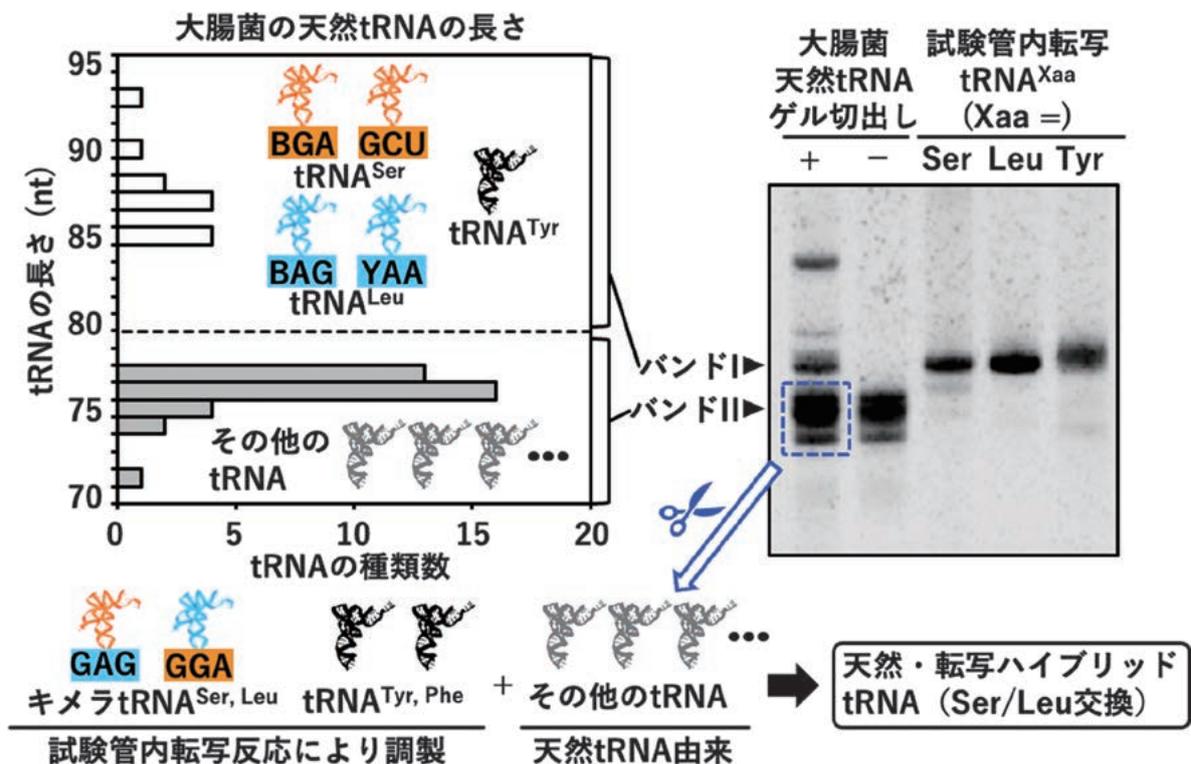


図2 天然・転写ハイブリッド tRNA の調製。

グラフ (左) は、大腸菌の全天然 tRNA の長さの分布を示す。変性電気泳動 (右) を用いて、tRNA^{Ser}、tRNA^{Leu} を含まないバンド II を切り出し、キメラ tRNA^{Ser}_{GAG}、tRNA^{Leu}_{GGA} を添加することで、天然・転写ハイブリッド tRNA を調製した。

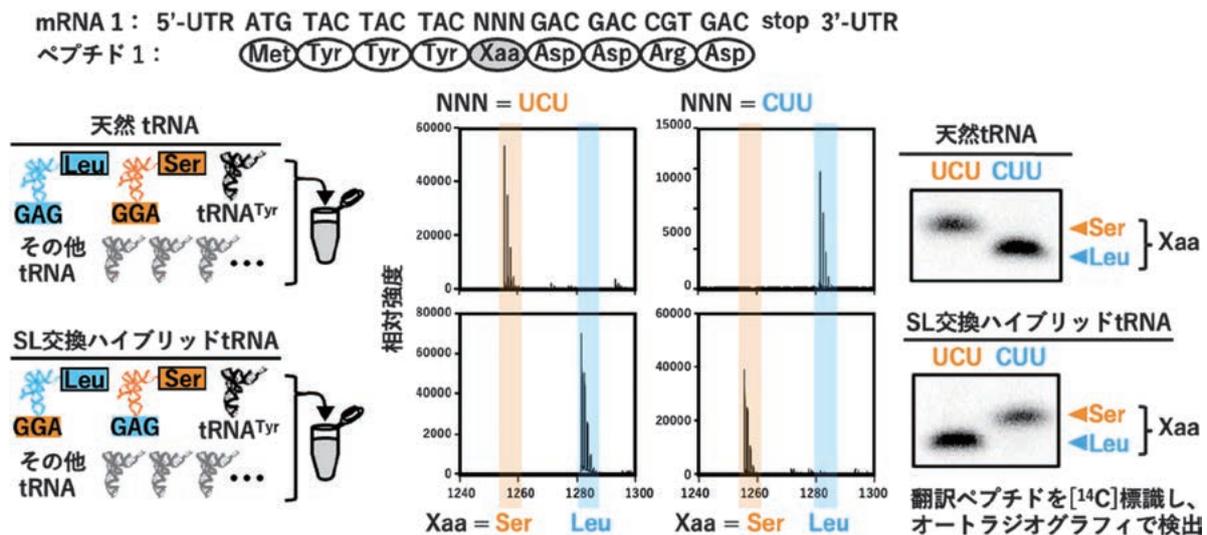


図3 天然・転写ハイブリッド tRNA による、モデルペプチドの Ser/Leu 交換翻訳合成。
 モデルペプチド1を、天然 tRNA 及びハイブリッド tRNA により翻訳した後、MALDI-TOF-MS (中央) と tricine SDS-PAGE (右、オートラジオグラフィ検出) により解析した。

系を構築し、まずは、モデルペプチド1を用いて、Ser/Leu 交換翻訳の検証を行った(図3)。合成されたペプチドをMALDI-TOF-MSにより解析した結果、天然 tRNA を用いた場合、UCU コドンに Ser, CUU コドンに Leu の導入が確認された。一方、ハイブリッド tRNA では、UCU に Leu, CUU に Ser と対応が反転した。翻訳ペプチドを¹⁴C 標識し、tricine SDS-PAGE により解析した結果でも、天然 tRNA とハイブリッド tRNA でバンド位置が反転していることから、Ser/Leu 交換翻訳の進行が確認された。

4. モデルタンパク質を用いた Ser/Leu 交換翻訳の検証

続いて、Ser 10個 /Leu 20個を含むモデルタンパク質 sfGFP を用いて、Ser/Leu 交換翻訳の検証を行った。Native-PAGE による解析の結果(図4左)、tRNA と遺伝子の組み合わせが一致する条件でのみ(レーン1:天然 tRNA と標準遺伝子、レーン4:ハイブリッド tRNA と Ser/Leu 交換遺伝子)、活性のある sfGFP が得られた。Ser/Leu 交換翻訳の sfGFP 合成量は、天然 tRNA を用いた場合に匹敵し、本系がタンパク質合成系として十分に機能することを示した。一方、tRNA と遺

伝子の組み合わせが一致しない条件(レーン2, 3)では sfGFP の蛍光は見られなかった。ただし、同一のゲルを用いてオートラジオグラフィ解析すると¹⁴C 標識された翻訳産物が検出されたことから(図4中央レーン2, 3)、翻訳反応自体は進行していることが分かった。この時、バンドが上にシフトしており、フォールディングの異常または凝集を起こし不活性になっていることが示唆された。同一サンプルの SDS-PAGE 解析では全条件で単一のバンドが得られたことから(図4右)、単一の産物のフォールディング状態の違いまたは凝集により、Native-PAGE で複数のバンドが現れたと言える。類似の結果が、モデルタンパク質 Streptavidin と β -galactosidase でも得られた。以上より、Ser/Leu 交換遺伝暗号と標準遺伝暗号の間では、互いに専用の遺伝子を用いた場合しか機能性タンパク質を合成できず、遺伝子が双方向に移動できない直交性が成立することが示された。

5. Ser/Leu 交換翻訳導入の正確性の検証

最後に、Ser/Leu 交換翻訳導入の正確性について詳細な解析を行った。モデルペプチド2を翻訳合成し、LC-MS/MS を用いた解析により、Xaa の位置に導入されたアミノ酸の組成を調べた(図

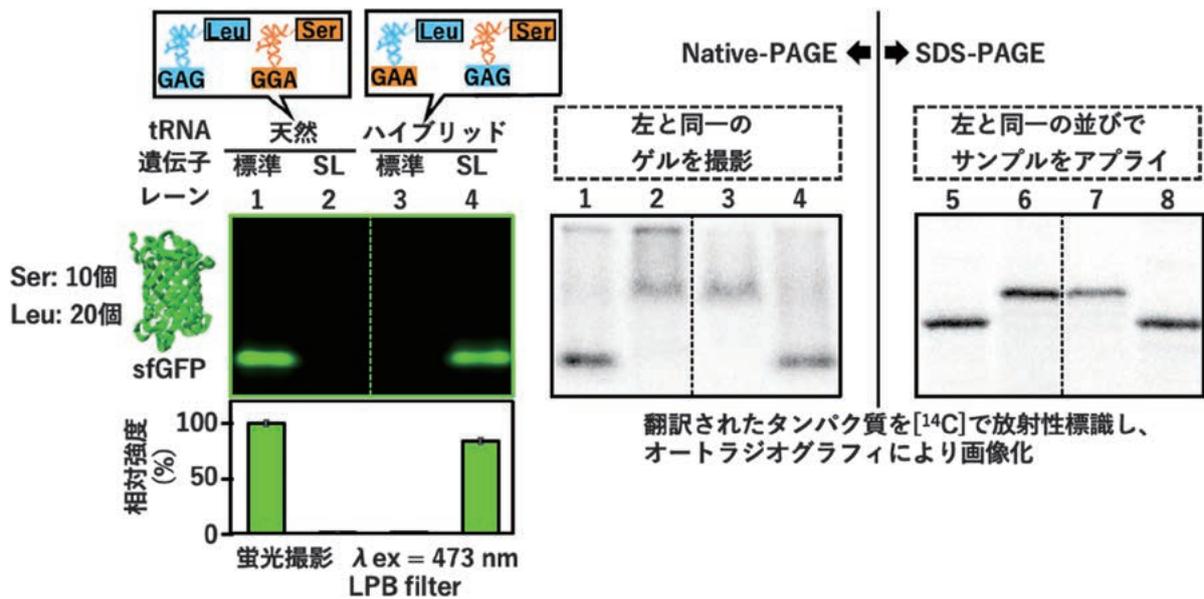


図4 天然・転写ハイブリッド tRNA による, sfGFP の Ser/Leu 交換翻訳合成。sfGFP を翻訳合成した後, Native-PAGE (左: 蛍光撮影, 中央: オートラジオグラフィ) と SDS-PAGE (右: オートラジオグラフィ) により解析した。

mRNA 2: AUG GUA UUU GAU GAC CGA NNN UUC CCC GGU AAG GAC GUA AAA
 ペプチド 2: (Met) (Val) (Phe) (Asp) (Asp) (Arg) (Xaa) (Phe) (Pro) (Gly) (Lys) (Asp) (Val) (Lys)

NNN = CUU CUC UCU UCC

tRNA: 天然 SL 天然 SL 天然 SL 天然 SL

Xaa	CUU		CUC		UCU		UCC	
	天然	SL	天然	SL	天然	SL	天然	SL
Leu	99.8	1.23	99.8	0.84	0.02	99.6	0.02	99.7
Ser	0.12	97.7	0.03	98.1	97.5	0.34	98.5	0.17
Phe	0.04	0.03	0.07	0.03	0.01	0.04	0.01	0.04
Thr	0.09	1.07	0.10	1.01	2.49	0.06	1.44	0.10

図5 LC-MS/MS を用いた, 天然・転写ハイブリッド tRNA による Ser/Leu 交換の正確性の評価。モデルペプチド2を翻訳合成した後, LC-MS/MS により Xaa の位置に導入されたアミノ酸の種類を解析した。各条件でのアミノ酸の比率を, 表中の数字 (%) とパネルのグレースケールで示した。

5)。その結果, CUU, CUC コドンの場合, 天然 tRNA では標準遺伝暗号に従って Leu が高い割合で導入されたが, ハイブリッド tRNA では Ser へ交換された産物に加え, 1% 程度の Leu の導入が見られた。これは, ハイブリッド tRNA に内在 tRNA^{Leu} が僅かに残存したか, キメラ tRNA^{Leu}_{GGA} による誤読の可能性が考えられる。一方, UCU, UCC コドンでは, Ser/Leu 間の交換失敗はほぼ見られなかった。また, Ser が導入されるべき 4 条件の全てで (CUU, CUC コドンをハイブリッ

ド tRNA で読む場合, UCU, UCC コドンを天然 tRNA で読む場合), Thr と僅かに Phe による誤読が見られた。この原因として, 用いた無細胞翻訳系の Ser-tRNA 合成酵素の活性の不足により Ser の導入効率が低下し, 誤読を誘発した可能性が考えられる。以上のように, Ser/Leu 交換翻訳導入は, 基本的に正確性が高いものの, 目的以外の産物も僅かに生じていることが明らかになった。これは, 今後キメラ tRNA の配列と翻訳系の組成の最適化により解消できると考えられる。

6. まとめと展望

本研究では、天然・試験管内転写ハイブリッド tRNA を作製し、Ser/Leu 交換遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系を構築した。モデルペプチドの実験では、Ser と Leu が高効率で交換可能であることが示された。モデルタンパク質の実験では、Ser/Leu 交換遺伝子から活性タンパク質の合成に成功し、sfGFP の場合の合成量は、標準遺伝子と天然 tRNA の組み合わせに匹敵するほど高かった。また、Ser/Leu 交換遺伝子は、天然 tRNA では活性な産物へと翻訳されず、自然界へ漏洩時のリスクが低いことが示唆された。逆も同様に成立することから、Ser/Leu 交換遺伝暗号の使用は、標準遺伝暗号との間で遺伝子の移動を双方向に防ぐ“防壁”として機能すると言える。

本研究で開発した Ser/Leu 交換遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系は、遺伝子漏洩に起因するバイオハザードリスクの低い安全なタンパク質合成系として、今後の利用が期待される。また、我々の2020年の報告以降³⁾、Ser/Leu 交換遺伝暗号を実際の生物で作製しようと試みる研究が世界的に進められている⁵⁻⁷⁾。本成果は、Ser/Leu 交換遺伝暗号を生物へと実装する研究に先駆けた無細胞モデル系として、今後の研究に重要な知見を提供することが期待される。

謝辞

この度は、執筆の機会を戴き、ありがとうございました。図3、4の¹⁴C 標識実験は、名古屋大学アイソトープ総合センターで行いました。同センターのスタッフの皆さまのサポートに深く感謝いたします。本稿の内容の一部は、2024年5月16日付 Nature Communications 誌にて報告しております⁴⁾。

参考文献

- 1) Mandell, D. J.; Lajoie, M. J.; Mee, M. T.; Takeuchi, R.; Kuznetsov, G.; Norville, J. E.; Gregg, C. J.; Stoddard, B. L.; Church, G. M. Biocontainment of genetically modified organisms by synthetic protein design. *Nature* **2015**, *518* (7537), 55–60. DOI: 10.1038/nature14121.
- 2) Rovner, A. J.; Haimovich, A. D.; Katz, S. R.; Li, Z.; Grome, M. W.; Gassaway, B. M.; Amiram, M.; Patel, J. R.; Gallagher, R. R.; Rinehart, J.; et al. Recoded organisms engineered to depend on synthetic amino acids. *Nature* **2015**, *518* (7537), 89–93. DOI: 10.1038/nature14095.
- 3) Fujino, T.; Tozaki, M.; Murakami, H. An Amino Acid-Swapped Genetic Code. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9* (10), 2703–2713. DOI: 10.1021/acssynbio.0c00196.
- 4) Fujino, T.; Sonoda, R.; Higashinagata, T.; Mishiro-Sato, E.; Kano, K.; Murakami, H. Ser/Leu-swapped cell-free translation system constructed with natural/in vitro transcribed-hybrid tRNA set. *Nat. Commun.* **2024**, *15* (1), 4143. DOI: 10.1038/s41467-024-48056-z.
- 5) Nyerges, A.; Vinke, S.; Flynn, R.; Owen, S. V.; Rand, E. A.; Budnik, B.; Keen, E.; Narasimhan, K.; Marchand, J. A.; Baas-Thomas, M.; et al. A swapped genetic code prevents viral infections and gene transfer. *Nature* **2023**, *615* (7953), 720–727. DOI: 10.1038/s41586-023-05824-z.
- 6) Zürcher, J. F.; Robertson, W. E.; Kappes, T.; Petris, G.; Elliott, T. S.; Salmond, G. P. C.; Chin, J. W. Refactored genetic codes enable bidirectional genetic isolation. *Science* **2022**, *378* (6619), 516–523. DOI: 10.1126/science.add8943.
- 7) Robertson, W. E.; Funke, L. F. H.; de la Torre, D.; Fredens, J.; Elliott, T. S.; Spinck, M.; Christova, Y.; Cervettini, D.; Böge, F. L.; Liu, K. C.; et al. Sense codon reassignment enables viral resistance and encoded polymer synthesis. *Science* **2021**, *372* (6546), 1057–1062. DOI: 10.1126/science.abg3029.