

氏名（本籍） 大 野 敏 （岐阜県）

学位の種類 博士（工学）

学位記号番号 甲 第 157 号

学位授与年月日 平成13年 9月12日

専 攻 物質工学専攻

学位論文題目 酵母サプレッサー-tRNA^{Tyr}とチロシル-tRNA合成酵素変異体を用いた
大腸菌遺伝暗合の拡張

(Expanding the Genetic Code of Escherichia coli by the
use of tRNA^{Tyr} and tyrosyl-tRNA synthetase mutant)

学位論文審査委員 (主査) 教授 西 川 一 八

(副査) 教授 長 澤 透 教授 吉 田 敏

講師 横 川 隆 志

論文内容の要旨

生物の生命活動を維持するために不可欠なタンパク質は、その多様で柔軟性に富む機能の面から医薬品や環境に優しい高分子ポリマーとしての利用が期待されている。これらタンパク質は、生体内では遺伝暗号表 (Genetic Code) に規定されたわずか 20 種類のアミノ酸を材料に合成されているが、もしもこの 20 種類以外のアミノ酸（これらを非天然型アミノ酸と呼ぶ）をタンパク質に導入することができれば、天然には存在しない機能を持つタンパク質を得ることができ、タンパク質の新しい利用法が開けるものと考えられる。本論文では、非天然型アミノ酸をタンパク質に導入するための方法論を開発するという立場から、1) 大腸菌のタンパク質合成系において系全体を破綻させることなく稼働し得る、新しい非天然型アミノ酸導入用の tRNA とそれにアミノ酸を結合させるアミノアシル-tRNA 合成酵素の組合せを検討し、2) 既存のアミノアシル-tRNA 合成酵素に遺伝子工学的操作を加えることで非天然型アミノ酸を基質として認識できるように改変する試みについて述べている。すなわち、本研究は視点を変えるなら、タンパク質の生合成過程で生物が通常は使用できないアミノ酸を利用できる様に改変する「遺伝暗号表の拡張」に関する研究をまとめたものである。

第 1 章では、生体におけるタンパク質生合成の分子機構と非天然型アミノ酸のタンパク質への組み込みに関するこれまでの研究について概観し、本研究の背景を明らかにすると共に、本研究を行うことの意義について述べている。

第 2 章では、非天然型アミノ酸を導入するためにまず必要となる専用の tRNA とそれにアミノ酸を結合させるアミノアシル-tRNA 合成酵素の最適の組合せを検討した結果について述べている。このような場合に最も重要なことは、新たに加えた tRNA と

酵素の組み合わせが既存のタンパク質合成系自体に干渉しないことであるが、本研究では大腸菌と酵母のチロシン用 tRNA はその構造の特徴が 2 箇所において大きく異なることに注目し、酵母チロシン用の tRNA とアミノアシル-tRNA 合成酵素の組合せを大腸菌のタンパク質合成系に投入する系を選択している。大腸菌の各種突然変異株を駆使した検定の結果、上記 tRNA と酵素の組合せは大腸菌タンパク質合成系に悪影響を与えることなく、実際にアンバーコドンで新たなアミノ酸を規定する遺伝暗号として利用し得ることを明らかにしている。この結果は、もしも遺伝子工学的に酵母チロシル-tRNA 合成酵素の基質特異性を改変できれば、アンバーコドンに非天然型アミノ酸を導入することが可能であることを示している。

第 3 章では、上記の結果を踏まえ、酵母チロシル-tRNA 合成酵素に遺伝子工学的操作を加えることでチロシン類縁体を基質として認識できるように改変する試みについて述べている。まず、結晶構造が既知の *Bacillus stearothermophilus* チロシル-tRNA 合成酵素の構造を参考にアミノ酸配列を比較検討し、酵母チロシル-tRNA 合成酵素の基質 (アミノ酸) 結合部位を推測している。その上でチロシンのベンゼン環や 4 位の OH 基の結合に関与していると思われるアミノ酸残基に変異を導入した酵素変異体を各種調製し、そのアミノ酸認識能の変化を検討している。その結果、本来の基質である L-Tyrosine の識別能が悪くなると共に、野生型酵母チロシル-tRNA 合成酵素では基質になり得なかった 3-Iodo-L-tyrosine 等チロシンの 3 位に官能基を持つチロシン類縁体を効率よく tRNA に結合させる酵素変異体を取得することに成功している。

第 4 章では、以上の結果について総括すると共に、本研究で開発された反応系を利用して新規機能性タンパク質を創成する上で克服すべき問題点の指摘や新しい方法論についての提案を行っている。

従来、生体のタンパク質合成系は 38 億年に及ぶ生命進化の過程で 20 種類のアミノ酸だけを用いるように遺伝暗号表が進化してきており、新たに非天然型アミノ酸を 21 番目として受け入れる余地はないと考えられてきた。しかし、本研究において大腸菌の通常のタンパク質合成を破綻させることなく新たなアミノ酸を導入する tRNA とアミノアシル-tRNA 合成酵素の組合せを見だし、また非天然型アミノ酸を基質として認識できるアミノアシル-tRNA 合成酵素の作製に成功したことは、「遺伝暗号表の拡張」が原理的には可能であることを示すと共に、この結果を応用・発展させれば大腸菌の生体外・生体内タンパク質合成系を利用した非天然型アミノ酸部位特異的導入システムの構築が十分に可能であると期待させる。

論文審査結果の要旨

この論文は、生物が通常のタンパク質生合成過程では使用できないアミノ酸 (非天然型アミノ酸) を用いたタンパク質合成を可能にするための方法論を開発するという立場から、新しい非天然型アミノ酸導入用の tRNA とそれにアミノ酸を結合させるアミノアシル-tRNA 合成酵素の組合せを検討し、さらに既存のアミノアシル-tRNA 合成酵素に遺伝子工学的操作を加えることで非天然型アミノ酸を基質として認識できるよ

うに改変する試みについて述べたものであり、新規機能性タンパク質を創成するための系を構築する上で有用性が認められる。この論文は以下に詳しく示すように重要な研究結果を含んでいる。特に、酵母チロシル-tRNA 合成酵素に遺伝子工学的変異を導入することで通常は基質にならないチロシン類縁体を効率よく tRNA に結合させる酵素変異体の作成に成功したことは高く評価される。したがって、審査の結果、この論文を学位論文に値するものと判定した。

- (1) 酵母チロシル-tRNA 合成酵素の遺伝子をクローニングして大腸菌菌体内で効率よく大量発現させる系を確立し、またその発現酵素は酵母より精製した天然型酵素と同等のアミノアシル化活性を持つことを示した。
- (2) クローニングした酵母チロシル-tRNA 合成酵素遺伝子の塩基配列を決定し、既報の配列 (RajBhandary ら) と比較して 1027 番目のヌクレオチドが A から G に変異したものであることを明らかにした。
- (3) 上記酵母チロシル-tRNA 合成酵素の遺伝子と酵母アンバーサプレッサー tRNA 遺伝子が大腸菌菌体内で共発現させる系を開発し、両者が共発現した時にのみアンバーコドン特異的にチロシンの取り込みが起きること、すなわち酵母チロシル-tRNA 合成酵素と酵母アンバーサプレッサー tRNA の組み合わせは大腸菌のタンパク質合成系全体を破綻させることなく稼働し得る、新しい非天然型アミノ酸導入用の tRNA と酵素の組合せになり得ることを示した。
- (4) 酵母チロシル-tRNA 合成酵素に遺伝子工学的操作を加えることでチロシン類縁体を基質として認識できるように改変することに成功した。すなわち、まず結晶構造が既知の *Bacillus stearothermophilus* チロシル-tRNA 合成酵素の構造を参考にアミノ酸配列を比較検討し、酵母チロシル-tRNA 合成酵素の基質 (アミノ酸) 結合部位を推測した。その上でチロシンのベンゼン環や 4 位の OH 基の結合に関与していると推定されるアミノ酸残基の位置に変異を導入した一連の酵素変異体を調製し、そのアミノ酸認識能の変化を検討した。その結果、本来の基質である L-Tyrosine の識別能が悪くなると共に、野生型の酵母チロシル-tRNA 合成酵素では基質になり得ない 3-Iodo-L-tyrosine 等チロシンの 3 位に官能基を持つ一連のチロシン類縁体を効率よく tRNA に結合させる酵素変異体を取得することに成功した。アミノアシル-tRNA 合成酵素でこれほど顕著に基質特異性を改変することができたのは、これが初めての例である。

最終試験結果の要旨

(1) 公表論文

この論文の主要部分は 2 編の審査付き論文として既に公表済みであり、その内 1 編は 1999 年度の日本生化学会 JB 論文賞を受賞している。この論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

(2) 修得単位

指定された単位を修得していることを確認した。

(3) 審査

公聴会までに、指導教官ならびに審査委員の審問に対して十分な回答がなされた。

公聴会を開催し学位審査委員会で審議の結果、申請者は最終試験に合格と判定した。