



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

大腸菌タンパク質合成系における酵母アンバーサプレッサー-tRNATyrのミスアミノアシル化に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 福永, 淳一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2985

氏名（本籍）	福永淳一（愛知県）
学位の種類	博士（工学）
学位授与番号	甲第 288 号
学位授与日付	平成 18 年 3 月 25 日
専攻	物質工学専攻
学位論文題目	大腸菌タンパク質合成系における酵母アンバーサプレッサー-tRNA ^{Tyr} のミスアミノアシル化に関する研究 (Studies on yeast amber suppressor tRNA ^{Tyr} with respect to mis-aminoacylation in <i>E. coli</i> protein-synthesizing system)
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 北出 幸夫 助教授 横川 隆 志

論文内容の要旨

近年、生物が通常利用している 20 種類の L- α -アミノ酸以外のアミノ酸（非天然アミノ酸）を導入することで、天然にない新たな機能を持つタンパク質を創製する試みがなされ始めた。この際、例えば大腸菌のタンパク質合成系に新たに非天然アミノ酸専用の tRNA を持ち込む必要があるが、目的アミノ酸の導入が特異的に起きるためにはこの tRNA が「大腸菌内在性のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) によってアミノアシル化されない」ことが条件となる。申請者の所属する研究室では、酵母 tRNA^{Tyr} が大腸菌チロシル tRNA 合成酵素の基質となれないことから、この tRNA を前述の条件を満たす候補として利用する可能性を探ってきた。しかし、これまでの研究から酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr}（以降 tRNA^{Tyr}(CUA)と記す）は大腸菌内在性のいずれかの aaRS によって僅かに誤認識されることが判明した。本研究では、この問題に対処すべく、酵母 tRNA^{Tyr}(CUA) をミスアミノアシル化する aaRS を特定して誤認識のメカニズムを探るとともに、それを抑制する手だてを開発することを目的とした。

まず最初に、クローン化した遺伝子から発現・精製した 20 種類の大腸菌 aaRS を使い、EF-Tu との複合体形成を利用したゲルシフトスクリーニングによってその aaRS を検索したところ、それが大腸菌リジル tRNA 合成酵素 (LysRS) であることが特定された。aaRS は tRNA の識別に際して tRNA の塩基配列すべてを均等に認識しているのではなく、ある特定の塩基や部位 (identity element) を重点的に認識している。そこで、酵母 tRNA^{Tyr}(CUA) に変異を導入することにより大腸菌 LysRS による誤認識を効果的に抑制する可能性を模索した。既知の大腸菌 LysRS の認識部位や酵母 tRNA^{Tyr} と大腸菌 tRNA^{Lys} の配列の相同部位などを考慮し、acceptor stem や anticodon arm の塩基を改変した一連の変異体を作製した。変異体は *in vitro* 転写反応と RNase P によるプロセッシングによって調製し、そのアミノ酸受容能を測定した。その結果、これらの変異体中で最もミスアミノアシル化が抑制されたのは、anticodon stem 内の 3 つの A-U

対を G-C 対に置換した変異体であり、チロシン受容能は全く低下せず、リジン受容能がほぼ完全に消失していた。しかしながら、この変異の導入によって、ごく僅かにではあるが新たにグルタミンニル tRNA 合成酵素 (GlnRS) によってミスアミノシル化されるようになることが判明した。

次に GlnRS と LysRS による誤認識の関係について検討した。酵母 tRNA^{Tyr} (CUA) の anticodon stem 内の 3 つの A-U 対のうち 1 つないし 2 つを G-C 対に置換した変異体を作製し、そのアミノ酸受容能を測定したところ、最も影響が大きいのは A31-U39 の G-C 対への変異であることがわかった。この塩基対が G-C 対に変わると、リジン受容能が顕著に低下し、逆にグルタミン受容能が上昇する傾向にあった。このようにリジンとグルタミンの取り込みには一方が低くなるともう一方が高くなるといった、"シーソー" のような関係が見られた。このことは、両酵素による tRNA の認識に anticodon stem の寄与が大きいことを示唆するものと考えられる。

大腸菌のタンパク質合成系において、この tRNA^{Tyr} (CUA) の anticodon stem への変異導入が、ミスアミノアシル化の抑制に効果があるのかを調べた。in vitro と in vivo のどちらの実験においても、変異を導入していない酵母 tRNA^{Tyr} (CUA) はミスアミノアシル化によるサプレッションが見られたが、LysRS による誤認識を抑制した anticodon stem 変異体ではそれが見られなかった。このことから anticodon stem の変異に起因する GlnRS によるミスアミノアシル化は、LysRS によるものと比べるとその程度が微弱であるため、タンパク質合成への実質的な影響はほとんどないと思われる。この変異を導入した tRNA を非天然アミノ酸の運び手に用いれば、目的とする非天然アミノ酸の部位特異的導入の確実性が増すものと期待される。さらに、本研究で tRNA^{Tyr} (CUA) のミスアミノアシル化要因の一つとして anticodon stem の配列の関与が明らかにされたことを踏まえて、今後 tRNA^{Tyr} (CUA) の anticodon stem 配列のさらなる最適化を進めれば、大腸菌内在性の全ての aaRS から完全に「独立した =“orthogonal”な」酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr} を創出することも可能であると考えられる。

論文審査結果の要旨

この論文は、大腸菌タンパク質合成系における酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr} のミスアミノアシル化に関して述べたものであり、生物が通常はタンパク質合成に利用していないアミノ酸（非天然アミノ酸）を部位特異的にタンパク質中に導入することで天然にない新規機能を持つようなタンパク質を創製しようとする一連の研究に資するところが大きいと認められる。この論文は以下の (1)~(4) に詳しく示すように重要な研究結果を含んでいる。特に大腸菌内在性のアミノアシル tRNA 合成酵素のうち酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr} のミスアミノアシル化に深く関与している酵素を特定したこと、および酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr} のアンチコドンステムの塩基配列を一部改変することによりそのミスアミノアシル化をほぼ完全に抑制できることを示したことは高く評価される。従って、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) 酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr} が大腸菌タンパク質合成系においてミスアミ

ノアシル化されるのは、大腸菌に内在する 20 種のアミノアシル tRNA 合成酵素のうちリジル tRNA 合成酵素によることを初めて突き止めた。

(2) 酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr} のアンチコドンシステムの塩基配列の一部を遺伝子工学的に改変することによりそのミスアミノアシル化をほぼ完全に抑制することに成功し、大腸菌タンパク質合成系において酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr}/TyrRS のペアーを非天然アミノ酸専用の “運び手” として利用する上での重大な障害を取り除いた。

(3) 酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr} のアンチコドンシステムの塩基配列に依存してリジン及びグルタミンによるミスアミノアシル化のレベルが逆相関的に変化することを発見し、大腸菌リジル tRNA 合成酵素およびグルタミニル tRNA 合成酵素による基質 tRNA の識別にはアンチコドンシステム内の、最もアンチコドンループに近い塩基対 (31 位-39 位) が深く関わっていることに初めて言及した。この部位は従来の tRNA-酵素間相互作用に関する研究ではほとんど注目されていなかった部分であり、今後の “tRNA identity” 研究に新しい局面を切り開く可能性がある。

(4) 上記 (2) で最もミスアミノアシル化されにくいことがわかった酵母アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr} 変異体を用いて実際に *in vitro* および *in vivo* のタンパク質合成実験を行い、ミスアミノアシル化によるサプレッションが十分に抑制されていることを実証した。

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あるいは受理済みである。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。