

Journal Club (No. 343)**非天然アミノ酸をタンパク質への導入する技術とその使い道**

遺伝暗号は、4 種類の塩基が 3 つ並んだ組み合わせによってできる 64 種の「triplet codon」で構成されており、すべてのタンパク質を構成する 20 種のアミノ酸の配列を規定している。「果たして、この進化的に獲得されたアミノ酸の数 20 は理想的な数なのであろうか？」という疑問に対する回答は我々は持ち合わせていないが、更なるアミノ酸(非天然アミノ酸:unnatural [nonnatural] amino acids)の導入(incorporation)によって、タンパク質の機能や、それを持つ生物の能力を拡張させることは、どうやらできそうである。現在のアミノ酸 20 種に落ち着いている事に関して様々な議論がされているが、実際には多くのタンパク質はその機能を発揮するために、翻訳後修飾、補酵素など付加的な要素を伴っている。ちなみに一部の古細菌(*Methanosarcina*, *Methanococcus*)などでは、ある終始コドンが 20 種以外のアミノ酸(Selenocysteine, Pyrrolysine)をコードし、タンパク合成にそれら非タンパクアミノ酸を取り込むシステムを獲得している。

今までに、アミノ酸アナログを添加することによってタンパク質に取り込ませたり、*in vitro system* において化学的に非タンパクアミノ酸を結合させた tRNA を用いて、それを取り込んだタンパク質を合成させた例や、遺伝情報に基づいて、21 番目のアミノ酸が取り込まれてタンパク質が合成される系を持つ大腸菌が作成された例などがある。

近年、「quadruplet codon」や「quintuplet codon」といったコドンを拡張させることによってアミノ酸を取り込ませたり、取り込ませたアミノ酸によってタンパク質に新たな機能を付加できることなどが報告されている。今回は、そういった最近の研究成果を総合的に紹介し、その技術から何が見えてくるのかを考える。

主な紹介文献(要旨は次ページ):

1. Hiroyuki Hamada, Naoko Kameshima, Aneta Szymanska, Katarzyna Wegner, Leszek Lankiewicz, Hiroaki Shinohara, Masami Taki, and Masahiko Sisido. *Dept. of Bioscience and Biotechnology, Okayama Univ.*
Position-specific incorporation of a highly photodurable and blue-laser excitable fluorescent amino acid into proteins for fluorescence sensing.
Bioorg. Med. Chem. **13**, 3379-3384 (2005)
 2. Takatsugu Kobayashi, Kensaku Sakamoto, Tetsuo Takimura, Ryo Sekine, Kelly Vincent, Kenji Kamata, Susumu Nishimura and Shigeyuki Yokoyama. *Dept. of Biophysics and Biochemistry, Univ. Tokyo; RIKEN GSC*
Structural basis of nonnatural amino acid recognition by an engineered aminoacyl-tRNA synthetase for genetic code expansion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **102**, 1366-1371 (2005)
 3. Ichiro Hirao, Yoko Harada, Michiko Kimoto, Tsuneo Mitsui, Tsuyoshi Fujiwara and Shigeyuki Yokoyama
Dept. of Biophysics and Biochemistry, Univ. Tokyo; RIKEN GSC.
A two-unnatural-base-pair system toward the expansion of the genetic code.
J. Am. Chem. Soc. **126**, 13298-13305 (2004)
- まとまった話は・・・
4. Lei Wang and Peter G. Schultz
Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute.
Expanding the Genetic Code.
Angew. Chem. Int. Ed. **44**, 34-66 (2005)
 5. Tamara L. Hendrickson, Valerie de Crecy-Lagard, and Paul Schimmel
Johns Hopkins Univ., and The Scripps Research Institute.
Incorporation of nonnatural amino acids into protein.
Annu. Rev. Biochem. **73**, 147-176 (2004)

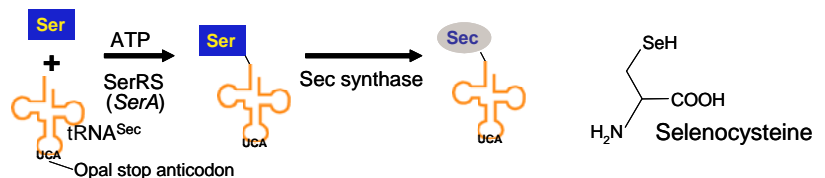
○要旨

1. 一つの蛍光アミノ酸を 4 塩基コドンをもちいる方法によって、タンパクの特定の場所に導入することができた。その変異タンパクを充分量が得られるほど、高い導入効率であった。Acridonyl 基は、青色レーザーの波長によって、高い蛍光を発する官能基であり、通常生物アッセイに使われる蛍光グループと比べても高い光耐性をもっている。蛍光の強度は分子がいる環境の極性の小さな変化に敏感である。Streptavidin の特定の位置に非天然アミノ酸を取り込ませると、そのタンパク(Streptavidin)はビオチンに対する蛍光センサーとして働きうる。高い導入(取り込み)効率と、高い光耐性、青色レーザーでの励起、環境の変化への高い応答性などから、Acridonylalanine があらゆる抗体、受容体、酵素などの特定の位置に導入できれば、低分子のセンサーとして有用である。
2. 真核細胞における遺伝コードは、大腸菌由来の Tyrosine tRNA synthase を改良することによって、拡張された。つまり、Y37V、Q195C の変異 (37V195C) は、Tyrosine よりも 3-iodo-L-Tyrosine に対して特異性を示した。この報文では、我々は、この 37V195C の触媒ドメインを 2.0 Å の解像度で、3-iodo-L-Tyrosine 及び Tyrosine が結合した構造を解析した。Val37 の γメチル基と Cys195 の硫黄原子が、3-iodo-L-Tyrosine のヨウ素原子と van der Waals 結合をしていた。Val37 と Cys195 の側鎖は、疎水性コアを形成している周りのアミノ酸残基によって、強固に固定されていた。Aminoacylation 反応において、3-iodo-L-Tyrosine を選択における 2 つの変異アミノ酸残基の役割は異なっている。また、L-tyrosyladenylate アナログを用いた構造も解析した。その結果、3-iodo-L-Tyrosine と Tyrosine の側鎖の位置が非常に似通っていた。従って、3-iodo-L-Tyrosine を選択的に基質にするように、37V195C は最適化されていた。
3. タンパク質にアミノ酸アナログを位置特異的に導入するために、非天然塩基ペアを遺伝コードの拡張へ応用し、新たな転写・翻訳システムを開発した。以前にデザインされた s (2-amino-6-(2-thienyl)purine) と y (pyridine-2-one) との塩基対を、位置特異的に鋳型中の s に対応して yTP が T4 RNA Polymerase によって取り込まれるのに用いた。位置特異的に sTP が RNA に取り込まれるように、今回新たな非天然塩基として、z (imidazolin-2-one) を開発した。これは優先的に s と対合する点で、y より優れている。s-y と s-z の塩基対は、y を含む mRNA と s を含む tRNA を効率よく合成することができ、その s-y の塩基対を含むコドン-アンチコドンの相互作用によって、遺伝コードを拡張できた。これらの非天然塩基対は、複製や転写のメカニズムを理解するための有益な情報を与えてくれる。

21 番目 (Selenocysteine)、22 番目 (Pyrrolysine) のアミノ酸のタンパク質への導入する能力は、すでに生物が自然に獲得している。

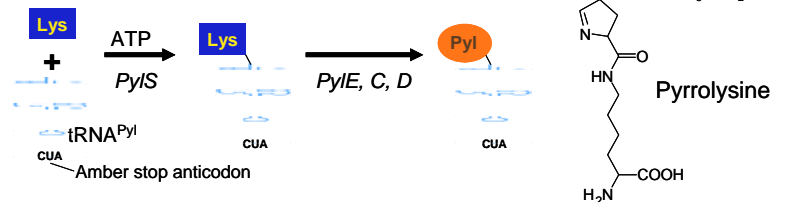
本日の話題の「非天然アミノ酸」は、これらのアミノ酸ではなく、人工的にタンパク質に意図的に機能を持たせることが目的のアミノ酸を指す。

21st : Selenocysteine, in various organisms, from Archea to mammals.



A. Bock, et al. Mol. Microbiol. 5, 515-520 (1991)

22nd : Pyrrolysine, by *Methanosarcina barkeri*



G. Srinivasan, et al. Science 296, 1459-1462 (2002)

B. Hao, et al. Science 296, 1463-1466 (2002)