

アンバーサプレッサー tRNA を利用する非タンパク性（非天然型）アミノ酸の部位特異的導入

大阪大学産業科学研究所 谷澤克行

遺伝子への部位特異的変異導入技術の確立により、タンパク質中の任意の部位のアミノ酸残基をそれ以外の19種類のアミノ酸残基に置換することが容易にできるようになった。こうして得られた人為的変異型酵素タンパク質の触媒機能や物理化学的性質を解析することにより、タンパク質の構造と機能の相関を系統的に研究する、いわゆるタンパク質工学がここ数年の間に大きく展開されてきた。しかし、これまでの部位特異的変異導入法では、新しく導入する残基がタンパク質を構成する20種類のアミノ酸に限られており、非タンパク性のアミノ酸（たとえばオルニチン、ホモセリン、ノルロイシン、D型アミノ酸など）に置換することは原理的に不可能であった。また、NMRによりタンパク質の構造を解析する際のプローブとするため、同位元素で標識したアミノ酸で置換する場合などにも、同じアミノ酸をコードする他の部位のすべてをも同時に置換することになり、特定部位の残基のみを標識することはできない。このような非天然型アミノ酸残基を特定の部位に自由に導入できれば、局所的な水素結合の数や距離、側鎖のねじれ角、静電的相互作用など、タンパク質の構造と機能の相関について、より詳細な解析を進めることができよう。

カリフォルニア大学（バークレー校）の Shultz とそのグループは、最近、独創的アイデアに基づき非タンパク性アミノ酸を部位特異的にタンパク質に導入する一般的な方法を開発した。¹⁾ 彼らの方法の概要は、①対象とするタンパク質中の標的部位（非天然型アミノ酸に置換する部位）に対応する遺伝子部位に、従来の部位特異的変異導入法を用いてアンバーコドン (TAG) を導入する。②アンバーコドンをサプレッサー転移 RNA (amber suppressor tRNA [$tRNA_{CUA}^{Phe}$]) を調製し、これに化学的な方法で非天然型アミノ酸を結合させる。このアミノアシル-tRNA は、一般のアミノアシル-tRNA 合成酵素の基質とならない（加水分解されない）。③上記の遺伝子から mRNA を合成し、非天然型アミノアシル-tRNA とともに *in vitro* タンパク合成系により変異タンパク質を合成する、というものである。

生化学の教科書にも書かれているように、遺伝暗号の64種類のコドンのうち61種類はセンスコドンであり、これらはタンパク質を構成する20種類のアミノ酸に配分されている。ある tRNA が特定のアミノ酸を結合すると、センスコドンはそのアミノ酸のペプチド鎖への取り込みを指定する。一方、残りの3種のナンセンスコドン UGA, UAG, UAA はペプチド鎖合成の終結シグナルとして機能する。ところが、色々な生物のタンパク合成系において従来ナンセンスコドンとされていた暗号を、センスコドンとして利用する例が最近相次いで見いだされてきた。²⁾ しかも、グルタミンやトリプトファンのようなタンパク性アミノ酸がナンセンスコドンにおいて低効率で誤読されるだけでなく、セレノシステインやホスホセリンなどこれまでタンパク質中に存在することが知られていた修飾アミノ酸もオパールコドン TGA によりコードされていることが明らかにされた。mRNA 中のナンセンスコドン UGA はこれらの修飾アミノ酸を結合した tRNA (サプレッサー tRNA) に読み取られて直接ペプチド鎖に取り込まれる。Schulz らの方法の特徴は、このようなナンセンスコドンをサプレッサー tRNA を利用するところにある。サプレッサー tRNA は通常20種類のアミノ酸のどのコドンにも対応しないので、非天然型アミノ酸を結合させてやれば、ナンセンスコドンを読み取り、タンパク質の特定部位に非天然型アミノ酸を導入できるというわけである。

彼らは非天然型アミノ酸を部位特異的に導入するためのモデルタンパクとして大腸菌の β -ラクタマーゼを選び、活性中心近傍に存在し触媒作用に重要な役割を持つことが予想されている Phe-66 を標的部位とした。まず酵母のアンバー変異株より調製したサプレッサー $tRNA_{CUA}^{Phe}$ を種々のフェニルアラニン類似アミノ酸により化学的にアミノアシル化した。次いで、 β -ラクタマーゼ遺伝子の Phe-66 位コドンを TAG に変異させたプラスミドを鋳型として、*in vitro* 転写翻訳系によりタンパク合成を行った。数種の非天然型アミノ酸によるアミノアシル $tRNA_{CUA}^{Phe}$ のうち、*p*-F-Phe, *p*-NO₂-Phe, および homoPhe をもつ $tRNA_{CUA}^{Phe}$ がアンバーコドンをサプレッサーし、これらのアミノ酸アナログを Phe-66 位に有する β -ラクタマーゼが合成された。変異型酵素の合成量は数 μ g/ml と少量であったが、均一に精製し反応速度論のパラメーターを求めるには十分な量であった。

変異型酵素の合成収率など、この方法にはまだまだ改善すべき点は数多く残されている³⁾ が、これからのタンパク質工学において画期的な方法となると思われる。

1) Noren, C. J. *et al.*: *Science*, **244**, 182 (1989).

2) Engelberg-Kulka, H. Schoulaker-Schwartz, R.: *TIBS*, **13**, 419 (1988).

3) Anthony-Cahill, S. J. *et al.*: *TIBS*, **14**, 400 (1989).