



Four-base codon-mediated saturation mutagenesis in a cell-free translation system

4塩基コドンを用いた無細胞翻訳系における飽和変異法の開発

(JBB, Vol.105, No.3, 211-215, 2008)

渡邊 貴嘉・村中 宣仁・芳坂 貴弘*

タンパク質のアミノ酸変異は、タンパク質の機能解析や機能向上などに幅広く利用されている。その際、1ヶ所のアミノ酸を他の19種類のアミノ酸に変異させる飽和変異がしばしば行われる。しかし、1つの変異体の作製には1つの変異遺伝子が必要となるため、そのような多数のアミノ酸変異タンパク質を作製することは、非常に時間と労力がかかる作業となっていた。

その一方で著者らは、通常の3塩基からなるコドンを拡張した4塩基コドンに対して非天然アミノ酸を導入する手法を開発してきた。具体的には、アンチコドンを4塩基に置換したtRNAに、非天然アミノ酸を化学的アミノアシル化法により結合させて、遺伝子中に組み込んだ4塩基コドンを無細胞翻訳系内で読み取らせるものである。この手法により、光機能アミノ酸や蛍光標識アミノ酸、ビオチン標識アミノ酸などを、タンパク質の指定した部位に導入することができ、タンパク質の光機能化や立体構造のFRETによる解析などに応用されている。

この4塩基コドン法の特徴は、遺伝暗号に関係なくさまざまなアミノ酸を1種類のコドンに対して導入することが可能になる点である。著者らはこの点に注目し、この手法が天然アミノ酸の飽和変異にも有用であると考えた。すなわち、20種類の天然アミノ酸を4塩基コドン用tRNAに結合させておくことで、1種類の4塩基コドン変異遺伝子から、19種類の1アミノ酸変異タンパク質(+1種類の天然型タンパク質)を作製することが可能になる(図1)。

実際に、20種類のアミノ酸すべてについて4塩基コドン用tRNAに結合させて、大腸菌無細胞翻訳系においてストレプトアビジンのTyr83部位への導入を検討した。その結果、アミノ酸の種類によって導入効率が異なるものの、いずれもタンパク質へ導入することが可能であった。さらに、いくつかのアミノ酸残基についてすべての1アミノ酸変異体を作製し、ビオチン結合活性を評価したところ、結合活性が保持されるもの、消失するものなどの同定に利用できることが確認された。

この変異法を用いれば、非常に効率よく1アミノ酸変異タンパク質を作製でき、たとえば100個のアミノ酸からなるタンパク質の場合、100種類の4塩基コドン変異遺伝子を準備すれば、約2000種類のすべての1アミノ酸変異タンパク質を作製することが可能になる。また、複数の4塩基コドンあるいはアンバー終止コドンを用いることで2重変異体の作製も可能になり、この場合は1種類の2重変異遺伝子から約400種類の2アミノ酸変異タンパク質が作製可能である。そのためには実験操作の自動化なども必要となるが、このような飽和変異法を用いることで、従来のアミノ酸変異や、ランダム変異ライブラリーからのセレクションでは見落とされていた有用な変異体が得られる可能性も高まるだろう。

なお、非天然アミノ酸導入用も含め、4塩基コドン用およびアンバーコドン用tRNAは、著者らの研究成果を技術移転した企業 (www.proteinexpress.co.jp) を通じて入手可能である。ご興味のある方には是非ご活用頂きたい。

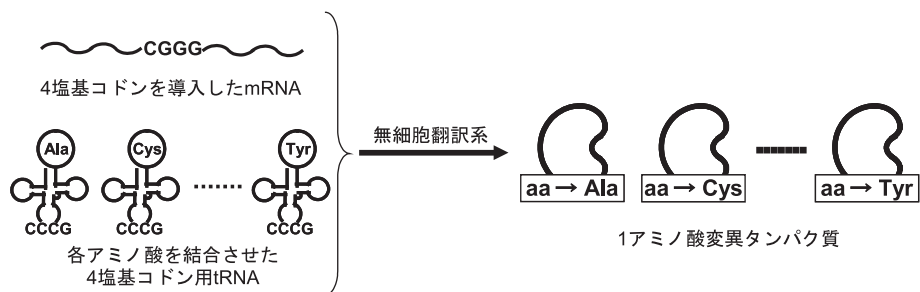


図1. 4塩基コドンを用いた無細胞翻訳系における飽和変異法

* 著者紹介 北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科(教授) E-mail: hohsaka@jaist.ac.jp