

人工的な遺伝・細胞情報処理システムをめざして

プロジェクト総括責任者

横山茂之

1. 研究の背景

生物は、非常に複雑で多様な情報を、核酸やタンパク質などの生体分子を使って処理する高度なシステムと考えることができる。遺伝情報は、核酸の塩基配列として記録されており、転写、翻訳などの分子システムによって処理され、発現した遺伝子産物によって細胞機能を発揮する。他方、細胞の増殖や分化を制御する細胞情報は、細胞間および細胞内でのシグナル伝達の分子システムにより処理され、細胞の形態と機能、そして、遺伝情報の発現を制御する。これらの遺伝情報と細胞情報の総合的処理システムが、生命を司っている。そこには、情報自体と、それを処理するシステムとが、分子によって自立的に構成されているという特徴がある。それらの分子を、ここでは、「情報分子」と呼ぶ。

遺伝情報を保持する分子は核酸（主に DNA）であるが、最終的には、遺伝子産物（主にタンパク質）という形で実体化される。核酸の情報は、塩基配列としてコードされている。その情報の伝達は、核酸→核酸という流れと、核酸→タンパク質という流れとに大別される。その両者において、情報処理の分子システムは、核酸・核酸、核酸・タンパク質、タンパク質・タンパク質などの分子間での相互作用に基づいて稼働する。まず、核酸→核酸という処理においては、「特異的な塩基対」という原理によって情報が伝達される。すなわち、DNA→DNA（複製、修復、組換え等）、DNA→RNA（転写等）、RNA→DNA（逆転写）、RNA→RNA（スプライシング、エディティング等）のいずれにおいても、塩基間での排他的ペアリングに関するワトソン・クリックのルール（G・C と A・T/U）が主要原理である。その分子メカニズムは、第一に、核酸の二重らせん構造の形成と安定性に基づき、第二に、タンパク質・酵素による核酸の塩基（配列）および高次構造の認識・識別に基づいている。生物は、これらのメカニズムを全て可能にするように、4種類の塩基を非常に巧みに選択し、この主要原理を成立させることに成功している。

このような研究を基礎として、天然型の4種類の塩基以外に、新たな塩基（天然型、非天然型）を加え、合計6種類の（あるいはさらに多種類の）塩基を用いて「排他的な塩基対形成」のルールを成立させることができれば、天然のシステムのほぼ完全な解明が達成されたことを意味すると同時に、人工塩基対を利用する革新的な遺伝情報分子システムの構築に道を開き、エンジニアリングとしての意義は極めて大きい。そのような試みとしては、S. Benner ら、E. T. Kool ら、P. Schultz らによって先駆的な研究がなされた。しかし、それらの人工塩基は、複製と転写の最も基本的な酵素反応プロセスに限ってでさえ、基質としては、不完全な特異性（天然塩基

とのミスペアリング) と低い反応効率など、深刻な問題を多く抱えており、真に特異的な人工塩基対の実現にはほど遠い。近年の構造生物学の急速な発展により、これらの核酸・核酸、核酸・タンパク質などの分子間相互作用の実体が次々と明らかにされつつある。これらの研究成果を活用すれば、「人工塩基対」は可能になるであろうか。さらに、生物の遺伝情報の中に人工的塩基対を導入すること、すなわち、細胞の DNA に特異的な人工的塩基対を組み込み、複製、転写などのプロセスで機能させ、遺伝的に保持することには多くの困難がある。例えば、人工塩基対を細胞中に保持するためには、細胞がそれらを保持することの意義（生存への必然性・有利性）を与えることによって、天然型塩基によって置換され、消失していくことを防がなければならない。このような技術については全く未解決である。

遺伝情報の処理の後半は、翻訳である。mRNA の遺伝情報は、コドン単位として、対応するアミノ酸へと翻訳されるが、その対応は、「遺伝暗号」のルールにしたがう。遺伝暗号表を成立させているのは、tRNA のアンチコドンによるコドンの認識と、その tRNA に対応するアミノ酸を結合（チャージ）させるアミノアシル tRNA 合成酵素による tRNA およびアミノ酸の両方に対する認識である。コドン・アンチコドン認識は、基本的には、塩基対のルールに依存する [コドン 3 字目の認識には 1 対複数の対応が許され (wobbling) , その制御にはヌクレオシドの転写後修飾が重要な役割を果たす] 。上述の人工塩基対が可能になれば、それを翻訳における RNA ・ RNA 認識に適用して、コドンの種類を、現在の 64 ($=4^3$) から、一気に増やすことが可能になる [一種類の人工塩基対を加えると最大 216 ($=6^3$) コドンまで増やせる] 。アミノアシル tRNA 合成酵素による tRNA の識別においては、特定のヌクレオチド残基が酵素によって認識され、アイデンティティー決定因子と呼ばれる。現在では、ほとんどの tRNA について、主要なアイデンティティー決定因子が解明されている。最近、20 種類の酵素のほぼ全てについて、立体構造が決定され、その半数近くは、tRNA との複合体の立体構造も明らかとなっている。それに基づいて、主要なアイデンティティー決定因子を置換し、それに対応するように酵素側をエンジニアリングする試みも可能になってきたが、助走段階であり、特異性を完全に切り替えるには、未だほど遠い。

アミノアシル tRNA 合成酵素によるアミノ酸の認識についても、立体構造レベルでの研究が進行中で、アミノ酸活性化のステップ、および、誤って活性化されたアミノ酸を排除する校正のステップについての巧妙な仕組みが明らかになりつつある。アミノアシル tRNA 合成酵素のエンジニアリングによって、生物の選択した 20 種類のアミノ酸に加えて、様々な非天然型アミノ酸に対応する酵素を創製する試みも始まっているが、やはり、特異性のメカニズムは巧妙・精緻で、完全な変換は未だ困難な情勢である。現在までに、非天然型アミノ酸を導入する tRNA として、ナンセンス・サプレッサー tRNA、フレームシフト・サプレッサー tRNA などが検討され、有望となっている。ここで、上述の人工塩基を遺伝的に保持することが可能になれば、

それに対応する新規特異性のアミノアシル tRNA 合成酵素を創出することによって、大規模に拡張された人工コドンに人工アミノ酸を帰属する「人工遺伝暗号表」の構築が可能になる。ここで、アミノアシル tRNA 合成酵素を用いず、有機化学反応によるヌクレオチドとアミノ酸の結合を中核とする「ケミカル・アシレーション」によってアミノアシル tRNA を調製し、無細胞のタンパク質合成で用いる研究成果は報告されている。このような部分的な導入にとどまらず、細胞あるいは無細胞の遺伝情報システムにおいて、人工塩基を遺伝子に保持し、転写によって mRNA や tRNA に組み込み、その人工 tRNA を人工アミノアシル tRNA 合成酵素によって人工アミノ酸と結合させ、人工コドンを翻訳することができれば、それこそ、真の「人工遺伝暗号」である。そのような人工遺伝情報分子システムの構築は、天然のシステムの動作原理をほぼ完全に解明できた証明であると同時に、プロテイン・エンジニアリングの技術としても革新的な意義がある。

他方、細胞情報分子システムについての研究は、近年の進展がめざましい。細胞の働きは、様々な外部情報を処理することによって、制御されている。例えば、多細胞真核生物の増殖・分化の制御には、細胞間での情報交換（コミュニケーション）が必須である。上皮成長因子（EGF）、サイトカインなどの成長因子、増殖因子、分化誘導因子の情報（シグナル）の場合は、細胞表面のリセプターの細胞外ドメインに結合することによってリセプターの多量体化を引き起こし、細胞内のドメインを活性化すると考えられている（構造的な実体については未だ不明な点も多い）。この細胞内で情報は、リセプターの細胞内ドメイン（あるいは、それに結合したタンパク質）のもつチロシンキナーゼが活性化し、リセプター自身あるいはアダプター・タンパク質（Shc など）に働き、特定のモチーフ（数残基のアミノ酸配列）の中のチロシン残基をリン酸化する。チロシンがリン酸化されたモチーフは、それを認識する機能ドメイン（SH2、PTB）に結合し、そのドメインを持つタンパク質（アダプター分子、イノシトール・リン脂質の分解あるいはリン酸化を行う酵素など）を、細胞質から細胞質膜へとリクルートする。Grb2 などのアダプター・タンパク質は、さらに、SH3 などの機能ドメインによって、モチーフ（Pro-rich 配列など）を認識・結合して、それをもつタンパク質を細胞質から細胞質膜へとリクルートする。例えば、低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras の活性化因子（グアニン・ヌクレオチド交換因子）である Sos は、Pro-rich 配列を使って Grb2 に結合し、また、別の機能ドメイン（PH）により、イノシトール・リン脂質と結合することによって、細胞質膜に移行する。そして、Sos は、そのヌクレオチド交換ドメインを用いて、細胞質膜に局在している Ras から GDP を遊離させて GTP に交換することによって活性化する。この GTP 結合型 Ras は、多くの細胞内情報伝達経路のスイッチの役割をになっている。第一に、セリン・スレオニン・キナーゼである Raf を細胞質膜にリクルートして、活性化する（二量体化が関係するといわれている）。Raf は、MEK→ERK1, 2 (MAP キナーゼ) に始まるセリン・スレオニン・キナーゼのリン酸化のカスケードをトリ

ガーすることによって、例えば、転写制御因子のリン酸化が引き起こし、新たな遺伝子の転写が誘導する。この他に、Ras は、イノシトール・リン脂質のリン酸化酵素（PI3 キナーゼ）や、他の低分子量 GTP 結合タンパク質の活性化因子を活性化するスイッチとしても働き、細胞骨格、細胞形態の変化も引き起こす。

これらの情報伝達・処理システムの主要原理は、機能ドメイン、多量体化（二量体化）、リン酸化（タンパク質のチロシン残基およびセリン／スレオニン残基、イノシトール・リン脂質）、アミノ酸配列モチーフ、特異的結合ドメイン、マルチ・ドメイン・タンパク質、細胞質膜へのリクルート、GTP 結合タンパク質という分子スイッチ、リン酸化カスケード、などである。上述の EGF から MAP キナーゼ・カスケードへのシグナリングに限らず、多様な細胞情報伝達システムの複雑なメカニズムの中で、これらの主要原理が繰り返して用いられている。このような情報伝達システムに関与する細胞情報分子についても、近年、構造生物学の研究成果が蓄積してきた。多くの機能ドメインについて、立体構造が解明され、ドメイン・ドメイン相互作用、ドメイン・リガンド相互作用が、原子分解能で研究されるようになった。

そこで、すでに述べた遺伝情報分子システムの場合のように、細胞情報分子システムに対しても、非天然型アミノ酸などの人工的な要素を導入することによって、システムの動作原理を解明、検証するとともに、新たな人工的情報処理システムを構築する研究が、現実に行うことが可能になりつつある。例えば、機能ドメインによる他の機能ドメイン、アミノ酸配列モチーフ、リン酸化などの修飾アミノ酸残基、リガンドなどの認識・結合の構造基盤の理解に基づき、細胞情報分子の改変や新規設計を試みる基盤が整いつつある。例えば、チロシンキナーゼによるチロシン・リン酸化の基質となるアミノ酸配列モチーフは、ひとつの有力なターゲットとなりうる。チロシンキナーゼと基質ペプチドとの複合体の立体構造が報告されている。このモチーフに非天然型アミノ酸（チロシン・アナログなど）を導入することによって、チロシンキナーゼとの反応性がどのように変化するかは、検討に値する。さらに、チロシンキナーゼの基質となる場合、リン酸化されたモチーフに対する結合ドメイン（SH2 ドメインなど）の結合は、非天然型アミノ酸の導入によって大きく影響を受けるはずである。SH2 ドメインなどとリン酸化ペプチドとの複合体の立体構造は、既にいくつも報告されている。その立体構造に基づいて、アミノ酸残基の置換を設計し、天然型ではなく、非天然型アミノ酸を含むリン酸化モチーフに対して特異的に結合するという新規の特異性を生み出すことは可能であろうか。そのような改変体タンパク質の遺伝子を細胞で発現させ、望む情報伝達経路を特異的に駆動したり、遮断したりできれば、非常に入り組んだ複雑な細胞情報分子ネットワークを解き明かすための有力な武器となるであろう。さらに、細胞内で、上述の人工遺伝情報分子システムを稼働させ、人工アミノ酸を特定位置に有するタンパク質を発現することができれば、天然型アミノ酸の配列を変更することでは不可能な大きな質的変換をもたらすことも可能となるであろう。

他方、核酸（DNA および RNA）を、本来の遺伝情報分子システムのみでなく、細胞情報分子システムにおいて活用すること、すなわち、細胞情報分子のタンパク質、リガンド等との特異的な相互作用を行う核酸分子を創出して、システムに組み込むことによって、システムの解析と人為的制御に役立てることも考えられる。そこで、人工塩基の有用性も大いに期待できる。また、細胞情報分子システムを活用して、人工的な情報を処理するシステム（細胞型分子コンピュータ）を開発することも考えられる。しかし、このような人工的な細胞情報分子システムの構築については、実際には、極めて限られた断片的、予備的な研究が試みられているのみであり、本格的な取り組みは無い。

以上のように、情報分子システムの研究は、今や、原子レベルの分解能に到達し、ラショナルな分子設計への環境が急速に整いつつある。それと同時に、ランダムな分子プールを構築し、*in vitro* および *in vivo* で、セレクションおよびスクリーニングを行うことによって、新機能をもつ核酸やタンパク質をえる手法（進化分子工学）が確立してきた。したがって、遺伝情報分子、細胞情報分子のエンジニアリングにより、人工的な情報処理を行うことは、非常に興味深いのみでなく、現実的な研究課題とすることが可能になってきたのである。その際に、天然型の塩基やアミノ酸に加えて、非天然型の塩基、アミノ酸、さらには、より広範囲の分子を導入することにより、従来とは大きく異なる革新的なエンジニアリングを展開できると期待される。さらに、遺伝情報と細胞情報の両面を総合して、システムとして構築し、総合的に人工的情報処理を行わせることには、基礎および応用の観点で、ともに大きな意義があると考えられる。

2. 研究のねらい

(1) 基本方針

人工的な遺伝情報分子および細胞情報分子の総合的なシステムを構築するために、(1) 有機化学による新規の非天然型情報分子の合成、(2) 構造生物学に基づくラショナルな分子設計とエンジニアリング、(3) 進化分子工学（ランダムプールからのセレクション、スクリーニング）による新規の分子認識特異性を有する情報分子の創製、(4) 遺伝情報および細胞情報を組み合わせるシステムの設計、を行う。まず、その要素となる情報分子の開発から開始する。順次、それらを組み合わせたシステムを構築していき、最終的には、遺伝情報と細胞情報の総合的な分子システムを完成させる。

(2) 遺伝情報分子の研究

非天然型塩基対の開発：天然型ワトソン・クリック塩基対と排他的な特異性を有する非天然型塩基対を創製し、DNA に組み込み、DNA ポリメラーゼにより複製し、RNA ポリメラーゼにより転写する。非天然型塩基対を細胞の遺伝子に保持させる仕組み

(選択圧)を工夫する。非天然型塩基を活用して、新規な機能性核酸を作る。

非天然型コドンの非天然型アミノ酸への翻訳：非天然型アンチコドン（非天然型塩基を含むなど）をもつ tRNA と、非天然型アミノ酸の両方に特異的なアミノアシル tRNA 合成酵素を創製する。そのような非天然型酵素と非天然型 tRNA とを、細胞系や無細胞系において発現させ、さらに、その非天然型アンチコドンと相補的な非天然型コドンを含む mRNA を転写により供給して、非天然型アミノ酸を位置指定的に取り込んだタンパク質へと翻訳する。

遺伝情報分子による細胞情報分子の直接制御：細胞情報分子システムに関与するタンパク質に特異的に結合する RNA アプタマーを創製する。ここで、非天然型塩基の利用も考える。それらの RNA により、情報伝達ネットワークを制御する。

(3) 細胞情報分子の研究

細胞情報分子の情報処理機構の解明：真核生物の細胞膜リセプターと、その下流の細胞情報伝達システムをターゲットに選び、情報処理機構を解析する。特に、上皮成長因子 (EGF) とそのリセプター (ErbB receptor family) (細胞外ドメイン) の結合による活性化、EGF リセプターの細胞内チロシンキナーゼ・ドメインによる自己リン酸化、リン酸化部位へのアダプタータンパク質の結合、下流の Ras タンパク質の制御などに焦点をあてる。

非天然型細胞情報分子の創製：その情報処理システムを制御する非天然型情報分子を創製する。例えば、EGF リセプターのチロシンキナーゼによる自己リン酸化部位のチロシンを非天然型アミノ酸に置換し、他方、アダプタータンパク質をその非天然型アミノ酸に対応するように改変することを試みる。遺伝情報分子の研究によって得られる人工遺伝暗号システムに基づいて、細胞情報処理に関わるタンパク質に非天然型アミノ酸を位置指定的に組み込むことにより、新規の機能を発揮させる。

3. 研究成果の概要

(1) 新規人工核酸塩基/塩基対の開発

現在報告されている DNA や RNA の合成酵素の構造解析やこれまでの非天然型核酸塩基の研究からの知見をもとにして、種々の新規核酸塩基対をデザインした。まず、既存の塩基対 (A:T, G:C) とは異なる様式で水素結合を形成するように新たな塩基対をデザインし、そのヌクレオシドやヌクレオチドを合成し、デザインした塩基対の一方を鋳型 DNA 中に組み込み、もう片方をヌクレオチド 5'-三リン酸として、DNA 合成酵素による取り込みを調べた。デザインした塩基の中で合成酵素によって DNA 中に取り込まれるものもあったが、既存の塩基との間違っただけの塩基対を形成するような取り込みも認められ、水素結合の様式だけでは非天然型塩基間で選択的に塩基対をつくらせて取り込ませることは難しいことがわかった。他方、疎水性による塩基対の検討により、自分自身との塩基対形成など特異性に多くの問題があることもは

つきりした。そこで、新規塩基の設計として、水素結合による特異性に加えて、かさ高い置換基を導入し、既存の塩基を立体障害によって排除するとよいことが判明した。新たにデザインした新規塩基対（それぞれの塩基を x と y で標記する）のヌクレオチド誘導体を合成し、 x を鋳型 DNA 中に組み込み、 y を 5'-三リン酸誘導体 (ryTP) とし、大腸菌由来の DNA 合成酵素 : Klenow フラグメントを用いて、取り込み実験を行った。その結果、 y は、高い選択性で鋳型上の x に相当する位置に取り込まれた。また、この x を組み込んだ鋳型 DNA を用いて T7 フェージの RNA 合成酵素による RNA 中への y の選択的な取り込みにも成功した。さらに、 x より取り込み効率と特異性を高めた新塩基 s を開発し、 y との塩基対が優れていることを確認することができた。

(2) 非天然型塩基を細胞（大腸菌）に保持する手法

新規塩基対 ($x/s \cdot y$) を細胞内に保持する実験系に取り組んだ。そのための手法のひとつとして、細胞に必須の機能を担う RNA に新塩基対を埋め込み、一方が天然型塩基に変異してミスマッチになることを検出して選択圧をかける仕組みを構築した。(a) 大腸菌に毒性を示す酵素類の活性を阻害する RNA (アプタマー) を菌体内で発現させて毒素に対する耐性を菌体に獲得させる、(b) 菌体内の特定の遺伝子がアンバー変異等によりサプレッサー tRNA の共存下でのみ生育が可能となる、の2つの方法を検討した。大腸菌の毒素としてコリシン E3 や E5、植物由来の毒素であるペポシンなどを選び、これらの活性を阻害する RNA アプタマーを、ランダムな配列の RNA プールからのセレクションにより得た。コリシン E3 とペポシンに対するそれぞれのアプタマーは、それらの活性も阻害することがわかった。他方、大腸菌のアンバー・サプレッサー tRNA のステム部分の塩基対をランダムに変異させたプールから、塩基対形成が活性に必須で、 x/s と y の塩基対を組み込むのに適した部位を発見した。これらの系は、非天然型ヌクレオチドの細胞内への取込み、DNA ポリメラーゼによる複製、RNA ポリメラーゼによる転写などのプロセスを改良するために、*in vivo* セレクションを行うために用いることができる。

(3) 非天然型アミノ酸を取り込んだタンパク質の *in vitro* 合成系の開発

人工遺伝情報システムのひとつとして、新規核酸塩基対 ($s \cdot y$) を組み込んだ *in vitro* でのタンパク質合成系を確立した。mRNA の特定部位のコドンに y を持つものを、 s をもつ相補鎖から転写反応により作成する。酵母チロシン tRNA のアンチコドンに s をもつものを、RNA のライゲーションにより作成した。さらにこの tRNA の 3 末端には、非天然型アミノ酸 (3-クロロチロシン) を西川らによって開発された酵母のチロシル tRNA 合成酵素変異体によって結合させた。これらの諸ファクターを用いて大腸菌より調整した *in vitro* のタンパク質合成系で非天然型アミノ酸を取り込んだ Ras タンパク質を合成した。質量分析により、特に、クロロチロシンが特定

部位に組み込まれていることが確認された。この s · y 塩基対の転写における効率と特異性が高いことにより、翻訳反応にカップルして、転写反応によって mRNA を供給することにより、極めて優れたタンパク質合成系となった。

(4) アミノアシル tRNA 合成酵素のエンジニアリング

アミノアシル tRNA 合成酵素のエンジニアリングにより、tRNA およびアミノ酸に対する特異性を変換する研究を行った。tRNA 側では、アルギニル tRNA 合成酵素 (ArgRS) のアンチコドン認識の改変を行った。サブプレッサー tRNA を認識するように変化した変異型 ArgRS を、ランダムに変異を導入したプールの中から、大腸菌のアンバーサプレッションを指標として単離した。この変異型 ArgRS は、野生型アルギニル tRNA のアイデンティティー決定因子 (アンチコドン 2 字目のシチジン) の代わりに、サブプレッサー tRNA のアンチコドン 1 字目のシチジンを認識するように変化していた。さらに、チロシン tRNA とその合成酵素が、細菌と真核生物とでクロスリアクションしないことを利用して、大腸菌のチロシル tRNA 合成酵素とチロシン tRNA に由来するアンバーサプレッサー tRNA を、植物 (小麦胚芽) 無細胞タンパク質合成系および動物培養細胞で用いることにした。他方、アミノ酸については、細菌型チロシル tRNA 合成酵素のアミノ酸認識結合部位の立体構造に基づいて、系統的に変異体を作成した。その中から、天然型チロシンより、非天然型の 3-ヨードチロシンをよく認識する変異体を得ることに成功した。小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、Ras タンパク質の特定部位のアンバーコドンに対応して、3-ヨードチロシンを高い効率で導入できることを確認した。

(5) 細胞情報伝達経路の RNA による制御

細胞情報システムを制御する人工的な因子の開発の一つの方法論として、RNA を直接に用いて、真核細胞における情報伝達の特定経路を選択的に制御することをめざした。まず、細胞情報分子研究グループにおいて中心的な研究対象としている経路に関与する Ras の標的タンパク質、Raf-1 をターゲットとして、Ras · Raf-1 相互作用を特異的に阻害する新規 RNA 分子 (アプタマー) を創製することにした。Raf-1 の Ras 結合ドメイン (Raf-1 RBD) に結合するアプタマーを単離し、そのうち結合能および阻害能が一番強かった 2 種について、Ras と Raf-1 RBD の相互作用を阻害することを確認した。アプタマーは、Raf-1 が Ras 依存的に活性化する *in vitro* 系 (Sf9 細胞由来の Ras を含む膜画分と HEK293 細胞由来の Raf-1 全長を含む細胞質画分を混合する系) において、その活性化を阻害することも確認された。このようにして、遺伝情報分子を用いて、細胞情報分子を制御する仕組みを開発することができた。

(6) ErbB receptor family の機能構造の解析

ErbB-1~ErbB-4 を細胞に発現して、機能解析を行う系を構築した。細胞外領域 (ド

メイン I~IV) に関するキメラを系統的に作成し、リガンドとの結合、特異性を解析した。ErbB-1 の特異的リガンドである EGF は、ErbB-1 のドメイン I およびドメイン III に結合するが、その寄与は、ドメイン IIIの方がずっと大きい。他方 ErbB-4 の特異的リガンドである neuregulin (NRG) は、主として ErbB-4 のドメイン I に結合し、ドメイン III の寄与は極めて小さい。ErbB-1 の細胞外領域と EGF との複合体の結晶化に成功し、3.3 オングストローム分解能の回折データが得られた。現在、構造解析を進めている。

(7) リン酸化部位へのチロシン・アナログ導入の効果

3-ヨードチロシンを始めとして、いろいろなチロシン・アナログを化学合成し、それを含むペプチド、リン酸化チロシンを含むペプチドなどを合成した。ErbB-1 細胞内領域のチロシンキナーゼによってリン酸化を受けるかどうかを検討した。従来の報告に反して、ErbB-1 のチロシンキナーゼは、自分自身のリン酸化配列や他の基質のリン酸化部位のペプチドをよくリン酸化できることを発見した。他方、Shc, Grb2, ZAP70 などの SH2 ドメインを調製し、それらとの相互作用を解析して、チロシン・アナログの導入による効果を調べた。この中で、3-ヨードチロシンは、リン酸化されていても、ヨウ素原子の高さのため、天然型の SH2 ドメインには結合することができない。ここで、Grb2 の SH2 ドメインに立体構造に基づいて設計した変異を導入することにより、ひとつの変異体で、天然型のリン酸化チロシンをもつペプチドより、非天然型のリン酸化3-ヨードチロシンをもつペプチドを好んで結合することがわかった。このようにして、非天然型アミノ酸をもつタンパク質に特異的な細胞情報分子の開発に成功した。

(8) 動物培養細胞でのタンパク質へのチロシン・アナログの導入

(4) に記した3-ヨードチロシンを好む大腸菌チロシル tRNA 合成酵素の変異体と、細菌型チロシン tRNA のアンバーサプレッサーを、動物細胞に組み込んだ。tRNA が RNA ポリメラーゼ III によって転写されるためにはその構造に内部プロモータ配列を持つ必要がある。大腸菌チロシン tRNA にそのような配列を移植したところ、アミノ酸受容活性が著しく低下したので、他の細菌の tRNA を検索して、RNA ポリメラーゼ III によって効率よく転写され、細胞質へと輸送されるものを見いだした。これを利用して、培地に3-ヨードチロシンを加えたときにアンバーサプレッションを起こすことに成功した。

4. 結論および展望

遺伝情報分子システムについては、第一の到達目標であった新規非天然型塩基対による特異的転写反応に世界で始めて成功した。さらに、アミノ酸特異性を変換したアミノアシル tRNA 合成酵素などを創製することにも成功した。これらの要素を総

合的に組み合わせて、無細胞系においては、人工的な遺伝情報分子システムの構築に成功した。細胞系への非天然型塩基対の組み込みは、改良へのシステム構築を行った。細胞情報分子システムについても、チロシンキナーゼ・シグナル伝達系について、作用機構の解明を進め、新たな知見をえる一方、立体構造の解析も進めた。非天然型アミノ酸を中心として、チロシンリン酸化とタンパク質・タンパク質相互作用のシステムの新規情報分子の開発に成功、また、アンバーサプレッションについては、動物培養細胞に組み込むことに成功した。

以上のように、総合的なシステム構築に必要な要素となる情報分子の創出技術については、目標をほとんど達成することができ、これらの非天然型の遺伝情報分子と細胞情報分子を活用するシステムも無細胞系および細胞系として稼働させることができた。今後は、さらに統合的で、実用的なシステム構築と、そのための要素の改良を行うことができる（そのための仕組みも用意してある）。これにより、生物における情報分子の作用機構の解明を果たすとともに、生体内でのタンパク質機能を解析する全く新しいプロテイン・エンジニアリングを開拓できる。他方、そのような非天然型情報分子の開発を困難にしている要因を知ったことにより、生物のもつ情報処理システムの巧妙さ、精緻さに関する理解も進むと期待される。