

横川 隆志

Takashi YOKOGAWA

所属 Affiliation

岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科・教授
(創薬科学専攻・生命分子科学研究領域)

岐阜大学大学院工学研究科・教授 (生命工学専攻)

United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University; Professor (Field of Biological Molecular Sciences, Medicinal Sciences Division)
Graduate School of Engineering, Gifu University; Professor (Chemistry and Biomolecular Science)

<p>専門 Research Area</p>	<p>遺伝子工学、タンパク質工学、RNA 工学 Genetic engineering, protein engineering, RNA engineering</p>
<p>研究課題 代表的な研究</p>	<p>① 非天然アミノ酸を部位特異的に導入した超タンパク質合成に関する研究 非天然アミノ酸をタンパク質の部位特異的に導入するためには、タンパク質合成系に人為的に導入した tRNA 変異体とアミノアシル tRNA 合成酵素変異体が、内在性の tRNA やアミノアシル tRNA 合成酵素と干渉しないことが必要である。酵母やメタン生成アーキアのチロシン tRNA とチロシル tRNA 合成酵素が、大腸菌に導入されても、内在性のタンパク質合成系と干渉しないことが確認されている。そこで、酵母やメタン生成アーキアのチロシル tRNA 合成酵素を遺伝子工学的に改変し、野生型のチロシル tRNA 合成酵素が認識できない 3-アジドチロシンを認識させることに成功している。また、非天然アミノ酸を部位特異的に導入するために、通常はストップコドンである UAG コドン (アンバーコドン) を解読できる人工的なアンバーサプレッサーチロシン tRNA の効率的な調製法を開発している。また、両者を組み合わせて、実際にタンパク質中の特異的部位に非天然アミノ酸である 3-アジドチロシンを導入することに成功している。アジド基は、天然の高分子には含まれない官能基であるため、導入されたアジド基を標的として化学修飾することでタンパク質に新奇の価値を付加できる。実際に、タンパク質の活性を落とすことなくビオチンや蛍光残基で修飾すること、タンパク質の構造変化を解析すること、タンパク質間相互作用を解析すること、などに成功している。非天然アミノ酸が導入されたタンパク質の調製技術については特許を取得した独自の技術であるため、多くの共同研究に貢献すると考えられる。</p> <p>② tRNA に存在する修飾ヌクレオシドの構造機能相関に関する研究 遺伝子の塩基配列がタンパク質のアミノ酸配列に変換される過程において、tRNA は重要な働きをしている。tRNA の特徴の一つに tRNA 中に多くの修飾ヌクレオシドが含まれることが挙げられる。修飾ヌクレオシドはコドン認識の正確性や立体構造の安定性を高め、tRNA の機能をファインチューニングすると考えられている。そこで、修飾ヌクレオシドの構造を解析し、修飾の有無により tRNA の機能がどのように変化するか解析している。まず、テトラアルキルアンモニウム塩を添加すると tRNA とオリゴ DNA のハイブリダイゼーション効率が高まることを見いだして、独自の tRNA の精製法を確立している。その効率的な tRNA 精製法を活用して、微量にしか含まれない tRNA を精製し、その中に含まれる修飾ヌクレオシドを解析することに成功している。具体例をいくつか示すと、ウシミトコンドリアのメチオニン tRNA からは新規の修飾ヌクレオシド 5-ホルミルシチジンを発見し、ミトコンドリアの変則暗号 (AUA = イソロイシンではなくメチオニン) の解読に関わっていることを示している。また、アーキアのイソロイシン tRNA からは新規の修飾ヌクレオシド、アグマチジンを発見し、AUA コドンの解読に必須であることを見いだしている。現在は、アーキアの tRNA に特異的に見いだされるアーケオシンの生合成機構の解明に取り組んでいる。</p> <p>③ アーキアのタンパク質合成系に関する研究 アーキアは核を持たず原核生物に分類されるが、タンパク質合成系を構成する因子の特徴は、バクテリアよりも真核生物に類似している。また、構成遺伝子数を見る限り、複雑な真核生物のタンパク質合成系を単純化した系に思われる。しかし、現在培養できる多くのアーキアは、超好熱性であったり、好塩性であったり、好酸性であったり、極限環境に成育するものばかりであるため、培養して、タンパク質合成系を解析することが困難であった。現在、大腸菌と同程度の温度で成育できるアーキアをいくつか選択して、培養を試みている。このうち、メタン生成アーキア、<i>Methanosarcina acetivorans</i> については、リトルスケールの培養が可能となったので、その無細胞タンパク質合成系の調製や、遺伝子工学の確立に取り組んでいる。他のアーキアについても研究対象を広げながら、アーキアのタンパク質発現系を構築させることに取り組んでいる。</p>

① **Study on the synthesis of super proteins carrying unnatural amino acids inserted site-specifically**

For site-specific insertion of unnatural amino acids into proteins, mutant tRNAs and mutant aminoacyl-tRNA synthetases—artificially introduced into the protein synthesis system—should not interfere with endogenous tRNAs or aminoacyl-tRNA synthetases. It was previously confirmed that tyrosine-tRNA and tyrosyl-tRNA synthetase from yeasts and methane-producing archaea can be introduced into *Escherichia coli* without interfering with the endogenous protein synthesis system. We have successfully created genetically modified tyrosyl-tRNA synthetase, which, unlike its wild-type counterpart, can recognize 3-azidotyrosine from yeasts and methane-producing archaea. In order to introduce unnatural amino acids in a site-specific manner, we also developed an efficient method for the preparation of an artificial amber suppressor tyrosine-tRNA, which can recognize amber (UAG) codons that usually serve as stop codons. Furthermore, by combining both, we have already succeeded in the site-specific introduction of 3-azidotyrosine, an unnatural amino acid, into proteins. Because the azide group is not a constituent functional group of natural polymers, chemical modification of introduced azide groups will add novel value to proteins. We have already achieved the following: modification with biotin or fluorescence residues without affecting the activities of the original protein; analysis of structural changes; and analysis of protein-protein interaction. Our preparation method for proteins carrying unnatural amino acids is a patented technology and will contribute to a number of collaborative studies.

② **Study of the structure-function relationship of modified nucleosides present in tRNAs**

tRNAs play an important role in the conversion of the base sequences of genes into amino acid sequences of the corresponding proteins. One of characteristics of tRNA is the high content of modified nucleosides. Modified nucleosides appear to enhance the accuracy of codon recognition and the stability of 3D structure, thereby contributing to the fine-tuning of tRNA function. Against this background, we have been analyzing structures of modified nucleosides, and consequent changes in tRNA function. First, we found that addition of tetraalkylammonium salt increases the tRNA-oligo DNA hybridization efficiency and we utilized this to establish a unique tRNA purification method. This efficient tRNA purification method successfully enabled purification of specific tRNAs and analysis of modified nucleosides that are contained within. For example, we discovered a modified nucleoside 5-formylcytidine in bovine mitochondrial methionine-tRNA and showed its involvement in the recognition of a non-universal genetic code (AUA for methionine instead of isoleucine) in mitochondria. We also discovered a novel modified nucleoside, agmatidine, in archaeal isoleucine-tRNA and found that it is essential in the recognition of the AUA codon. We are currently studying the mechanism involved in biosynthesis of archaeosine, an archaeal tRNA-specific modified nucleoside.

③ **Study on the archaeal protein synthesis system**

Archaea, lacking a nucleus, are classified as prokaryotes, but the characteristics of constituent factors of the protein synthesis system are more similar to those of eukaryotic cells than those of bacteria. Furthermore, by taking into consideration the number of constituent genes, the archaeal system has the appearance of a simplified system of the complex protein synthesis system in eukaryotic cells. However, all archaea are currently culturable only under extreme conditions (hyperthermophilic, halophilic, or acidophilic), and this has been an obstacle to investigating the protein synthesis system. We have selected several archaea that might grow at the temperature similar to that used for *E. coli* culture. Among them, *Methanosarcina acetivorans*, a methane-producing archaeon, is now culturable at the liter-scale. We are currently trying to establish a cell-free protein synthesis system and genetic engineering of this organism, and will study other archaea to establish the archaeal protein expression system.

<p>研究業績 (過去 5 年)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tahara, N. Tachibana, I., Takeo, K., Yamashita, S., Shimada, A., Hashimoto, M., Ohno, S., Yokogawa, T., Nakagawa, T., Suzuki, F., Ebihara, A. Boosting Auto-Induction of Recombinant Proteins in <i>Escherichia coli</i> with Glucose and Lactose Additives. <i>Protein Peptide Lett</i> 28, 1180–1190 (2021). (IF:1.89, CS:3.1) 査読あり 2. Shimojo, N., Yagami, A., Ohno, F., Tsurumi, Y., Nakamura, M., Suzuki, K., Kuwabara, K., Futamura, K., Ohno, S., Yokogawa, T., Horiguchi, T., Matsunaga, K. Fish collagen as a potential indicator of severe allergic reactions among patients with fish allergies. <i>Clin Exp Allergy</i> (2021) doi:10.1111/cea.14028. (IF:5.018, CS:8.3) 査読あり 3. Hibi, K., Amikura, K., Sugiura, N., Masuda, K., Ohno, S., Yokogawa, T., Ueda, T., Shimizu, Y. Reconstituted cell-free protein synthesis using <i>in vitro</i> transcribed tRNAs. <i>Commun. Biol.</i>, 3, 350, (2020). (IF:4.049, CS:4.00) 査読あり 4. Arakawa, S., Kamizaki, K., Kuwana, Y., Kataoka, N., Naoe, C., Takemoto, C., Yokogawa, T., Hori, H. Application of solid-phase DNA probe method with cleavage by deoxyribozyme for analysis of long non-coding RNAs. <i>J. Biochem.</i>, 168, 273–283, (2020). (IF:2.476, CS:4.70) 査読あり 5. Yokogawa, T., Nomura, Y., Yasuda, A., Ogino, H., Hiura, K., Nakada, S., Oka, N., Ando, K., Kawamura, T., Hirata, A., Hori, H., Ohno, S. Identification of a radical SAM enzyme involved in the synthesis of archaeosine. <i>Nat. Chem. Biol.</i>, 15, 1148–1155, (2019). (IF:10.510, CS:9.33) 査読あり 6. Hieno, A., Naznin, H. A., Inaba-Hasegawa, K., Yokogawa, T., Hayami, N., Nomoto, M., Tada, Y., Yokogawa, T., Higuchi-Takeuchi, M., Hanada, K., Matsui, M., Ikeda, Y., Hojo, Y., Hirayama, T., Kusunoki, K., Koyama, H., Mitsuda, N., Yamamoto, Y. Transcriptome Analysis and Identification of a Transcriptional Regulatory Network in the Response to H₂O₂. <i>Plant Physiol.</i>, 180, 1629–1646, (2019). (IF:6.420, CS:6.37) 査読あり 7. Akther, J., Nabi A, H, M, N., Ohno, S., Yokogawa, T., Nakagawa, T., Suzuki, F., Ebihara, A. Establishing a novel assay system for measuring renin concentration using cost effective recombinant ovine angiotensinogen. <i>Heliyon</i>, 5, e01409, (2019). (IF:1.650, CS:1.66) 査読あり
<p>外部資金 (過去 5 年)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 平成 29 年度 越山科学技術振興財団 研究助成「都市ガス生産を指向したメタン菌の遺伝子工学技術の構築」 2. 平成 30 年度 科学研究費補助金 挑戦的研究(萌芽) 分担「DNA ザイム、固相化 DNA プローブ、質量分析を併用した長鎖 RNA 分析法の開発」 3. 令和元年度 科学研究費補助金 基盤研究(C)「常温で生育するメタン生成アーキアを活用した難合成タンパク質産生系の開発」 4. 令和 2 年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 分担「複合 tRNA 修飾酵素の各サブユニットの役割と基質 tRNA 認識機構の解明」 5. 令和 3 年度 東海国立大学機構大学横断研究推進プロジェクト 分担「バイオメタネーションの高効率化を目指した <i>Methanosarcina</i> 属メタン生成古細菌の機能強化」
<p>特許</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>特許名：非天然蛋白質の製造方法、固定化方法及びキット</u> 出願人：国立大学法人岐阜大学 発明者：西川一八、鈴木正昭、横川隆志、細谷孝充、大野敏 番号等：特願 2003–5747 (2003 年 3 月 4 日 出願) 番号等：特願 2003–5747 (2003 年 3 月 4 日 出願) 特許第 3896460 号 (2007 年 1 月 5 日 登録) 2. <u>特許名：部位特異的にタンパク質にチロシナナログを導入する方法</u> 出願人：国立大学法人岐阜大学 発明者：西川一八、横川隆志、大野敏 番号等：特願 2007–521381 (2006 年 6 月 14 日 出願) PCT/JP2006/312370 特許第 4654449 号 (2011 年 1 月 7 日 登録) 3. <u>特許名：N 末端アミノ酸が標識されたタンパク質の効率的な合成方法</u> 出願人：バイオコマース株式会社 発明者：金森崇、西川一八、横川隆志、大野敏 番号等：特願 2007–545346 (2006 年 11 月 16 日 出願) PCT/JP2006/323378 特許第 5049136 号 (2012 年 7 月 27 日 登録)

	<p>4. 特許名：タンパク質のN末を酵素的に修飾する方法 出願人：国立大学法人岐阜大学 発明者：西川一八、横川隆志、大野敏 番号等：特願 2007—546539（2006年11月22日 出願） PCT/JP2006/323879 特許第 5061351 号（2012年8月17日 登録）</p>
<p>略歴</p>	<p>昭和 62 年 3 月 東京大学工学部工業化学科 卒業 昭和 62 年 4 月 東京大学大学院工学系研究科合成化学専攻修士課程 入学 平成元年 3 月 同 上 修了 平成元年 4 月 東京工業大学大学院総合理工学研究科生命化学専攻博士課程 入学 平成 4 年 3 月 同 上 修了 平成 4 年 4 月 東京工業大学助手（生命理工学部）（この間、現職のまま平成 6 年 7 月 から平成 7 年 11 月までドイツ連邦共和国バイロイト大学で特別研究員） 平成 7 年 12 月 岐阜大学講師（工学部） 平成 15 年 4 月 岐阜大学助教授（工学部） 平成 19 年 4 月 岐阜大学准教授（工学部） 平成 25 年 4 月 岐阜大学教授（工学部） 平成 28 年 5 月 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科・教授を兼務</p>