

令和元年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01820

研究課題名(和文) - 1リボソーマルフレームシフトによる細胞内タンパク質の輸送・局在制御

研究課題名(英文) Induction of -1 ribosomal frameshifting by a small molecule and its application to protein transport and localization

研究代表者

村田 亜沙子 (Murata, Asako)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：50557121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「合成小分子で誘導される-1リボソーマルフレームシフト(-1PRF)により、細胞内でのタンパク質の輸送・局在を可逆的にコントロールする」ことである。本研究では、-1PRF誘導シグナルであるmRNA上の二次構造形成を合成小分子により誘起することで、細胞内で人為的に-1PRFを誘導することに成功した。本研究で開発したシステムは、合成小分子を用いるタンパク質発現の新たなツールを提供するとともに、-1PRFを介したシグナルペプチドの翻訳制御および標的タンパク質の輸送・局在への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の輸送や局在を規定するシグナルペプチドは、任意のタンパク質を特定の細胞小器官へ局在させることに利用されている。シグナルペプチドの付加は、タンパク質の遺伝子配列にシグナルペプチドをコードする塩基配列を付加する、という遺伝子工学の手法により行われる。そのため、発現後のタンパク質へのシグナルペプチドの付加もしくは除去は、既存の遺伝子工学手法では実現出来ない。本研究は、合成小分子で誘導される-1フレームシフトを利用することで、標的タンパク質に翻訳の段階でシグナルペプチドを付加する方法を提供する。

研究成果の概要(英文)：This research aims to develop a tool to control protein transport and localization by utilizing the ligand-inducible -1 ribosomal frameshifting (-1PRF). -1PRF is a recoding mechanism to make alternative proteins from a single mRNA transcript. -1PRF is stimulated by cis-acting signals in mRNA, a slippery sequence and a downstream pseudoknot. In this study we engineered the frameshifting pseudoknot to respond to our designed small molecule naphthyridine carbamate tetramer (NCTn). We demonstrate that NCTn can stabilize the pseudoknot structure in mRNA and activate -1PRF, thereby induce synthesis of a protein from an alternative reading frame in cells. The ligand-inducible -1PRF system developed in this study provides a new tool for de novo production of a fusion protein by small synthetic molecules, and therefore can be applied to cellular transport and localization of target proteins in cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

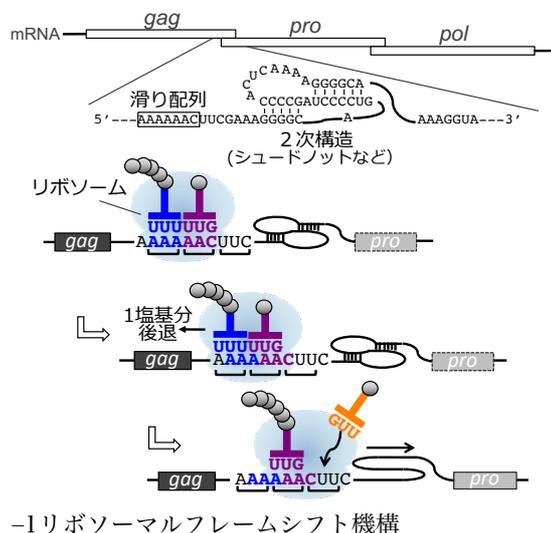
キーワード：RNA高次構造 合成小分子 -1リボソーマルフレームシフト 翻訳制御 バイオテクノロジー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の輸送や局在を規定するシグナルペプチドは、任意のタンパク質を特定の細胞小器官へ局在させることに利用され、細胞内のタンパク質機能の研究に不可欠なツールとなっている。タンパク質へのシグナルペプチドの付加は、遺伝子工学的手法、即ち、タンパク質の遺伝子配列に、シグナルペプチドをコードする塩基配列を付加することにより実現されてきた。タンパク質のアミノ酸配列は、発現ベクター上にコードされた遺伝子配列に規定されるため、一旦発現したタンパク質へのシグナルペプチドの付加もしくは除去は、既存の遺伝子工学手法では実現出来ない。そこで申請者は、多くの RNA ウィルスが持っている翻訳機構である「-1 リボソームフレームシフト (-1 Ribosomal frameshifting: -1PRF)」を、細胞内でのシグナルペプチドの付加に利用することを着想した。

通常、リボソームは mRNA を走査しながらタンパク質を合成する。しかし、mRNA 上に 7 塩基の滑り配列と 2 次構造 (ヘアピンやシュードノット) が存在すると、リボソームが 2 次構造部分で一時停止し、マイナス 1 塩基分移動した後に翻訳を再開する。これにより、停止前とは異なる読み枠のタンパク質がひと続きのタンパク質として合成される (右図)。-1PRF はウィルスが持つ翻訳機構であるが、「シグナルペプチドの付加・脱離を細胞内でコントロールする極めて有用なツールになる」と申請者は考えた。-1PRF の鍵となるのは、mRNA 上に形成される 2 次構造である。本研究は、この 2 次構造を合成小分子により誘起することで、-1PRF の人為的な制御を実現する。これにより、シグナルペプチドの付加・脱離、そしてタンパク質の輸送や局在を、細胞内で自在に操る技術基盤の確立が視野に入る。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「合成小分子で誘導される-1PRF により、細胞内でのタンパク質の輸送・局在を可逆的にコントロールする」ことである。タンパク質の輸送・局在は、シグナルペプチドによって規定される。本研究では、標的タンパク質へのシグナルペプチドの付加を、合成小分子による-1PRF、それに伴うシグナルペプチドの翻訳オン・オフにより制御し、細胞内におけるタンパク質の輸送や局在を自在に操ることを目指した。

### 3. 研究の方法

申請者らの研究室で開発された合成分子 NCTn (Naphthyridine Carbamate Tetramer) は、グアニンと水素結合を形成することにより、グアニンミスマッチを含む CGG/CGG 配列に結合することが分かっている (図 1 a)。申請者らはこの性質を利用し、CGG 配列を含む 2 本の RNA 鎖を NCTn で接着させることにより、シュードノット構造を誘起させることに成功している (Matsumoto, S. *et al. Bioorg Med Chem Lett.* 2017, 27,3391-3394.)。この報告では、-1PRF を誘導するシュードノットとして知られる Mouse mammary tumor virus のシュードノット (VPK) 配列に、NCTn の結合モチーフである CGG/CGG 配列を導入した変異体 M1-VPK RNA を作製した (図 1 b)。M1-VPK RNA と NCTn との複合体を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したところ、M1-VPK RNA 由来のバンドとは異なる、より泳動度の早いバンドの出現が観察され (図 1 c)、NCTn の結合によりシュードノット構造が誘起されることが示唆された。

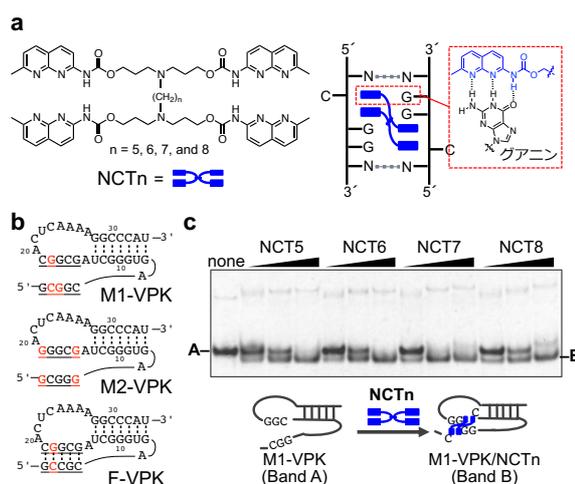


図1. (a) NCTnの化学構造および結合様式. (b) VPK 変異体と (c) M1-VPK と NCTn の複合体形成.

上記の研究結果をふまえ、本研究では図 2 に示したレポーター系を構築し、*In vitro* 翻訳反応および細胞内における NCTn の-1PRF への効果を評価することとした。また、NCTn により誘導される-1PRF を、標的タンパク質へのシグナルペプチドの付加に応用することとした。レポーター mRNA は、ORF A、ORF B、および、それらの間に挿入された滑り配列 (AAAAAAC)

と VPK 変異体配列からなる。VPK 変異体は、先に示した M1-VPK の他に、同じく CGG/CGG 配列を有する M2-VPK、そして NCTn の有無に関わらずシュードノット構造を形成する F-VPK をデザインした。レポーター mRNA は滑り配列の直後に終止コドン UAA を含み、NCTn の非存在下ではタンパク質 A のみが翻訳される。しかし、NCTn の結合に伴いシュードノット構造が形成されると、-1PRF が誘導され、下流のタンパク質 B との融合タンパク質 AB が合成される。タンパク質 A とタンパク質 AB の存在比あるいは活性比を算出することにより、NCTn の -1PRF への影響を調べることにした。

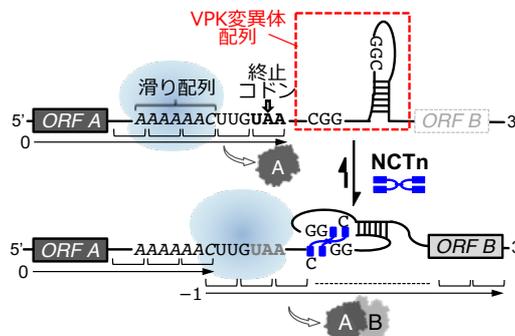


図2. レポーター mRNA のデザインと NCTn による -1PRF の誘導

#### 4. 研究成果

##### (1) *In vitro* 翻訳反応による評価

NCTn の結合により形成されたシュードノット構造が、-1PRF を誘導するかを *In vitro* 翻訳反応、および、反応産物のウエスタンブロットにより評価した。Renilla luciferase (Rluc) と truncated firefly luciferase (trFluc) 遺伝子の間に滑り配列、VPK 変異体 (M1, M2, F-VPK) を導入した mRNA を作製し、Rabbit Reticulocyte lysate (RRL) 中で *In vitro* 翻訳反応を行った。反応産物を SDS-PAGE および抗 Rluc 抗体を用いたウエスタンブロットにより分析したところ、M1-, M2-VPK 配列を導入した mRNA を鋳型として用いた際に、NCTn 濃度依存的な、フレームシフト産物 (FS) の増加が観察された (図 3 a)。一方、F-VPK 配列を導入した mRNA を用いた場合には、そのような現象は見られなかったことから、NCTn の M1-, M2-VPK への結合が -1PRF を誘導したことが示唆された。

また、NCTn 添加により誘導された FS 産物の詳細を調べるために、VPK 変異体配列の下流に読み枠の異なる 3 種類のエピトープタグ配列 (HA, FLAG, PA) を導入し、NCTn 添加で生成した翻訳産物の同定を行った。その結果、NCTn により生成する FS 産物は、読み枠が (-1 フレーム) 由来であることが確認された (図 3 b)。

##### (2) NCTn による -1PRF 効率を最大化する配列の探索

(1) の結果より、NCTn の M1, M2-VPK への結合が -1PRF を誘導し、FS 産物の合成を増加させることが示唆された。しかし、フレームシフト効率が ~20% 程度と比較的低く、効率の向上が望まれた。フレームシフト効率はシュードノットの塩基配列や熱的安定性、形状などに依存すると考えられている。そこで、VPK よりも高効率で -1PRF を誘導することが知られている Infectious bronchitis virus (IBV) のシュードノット、および Simian retrovirus-1 (SRV-1) のシュードノットに CGG/CGG 配列を導入した変異体を作製した。これらの変異体について、NCTn との複合体形成をポリアクリルアミドゲル電気泳動により検証したが、何らかの複合体は形成するものの、シュードノットと考えられる 2 次構造の形成は観察されなかった。

##### (3) NCTn による細胞内 -1PRF 誘導

*In vitro* 翻訳反応で確認された NCTn による -1PRF 誘導が細胞内でも起こるかどうかを検証するために、図 4 a に示した Dual luciferase レポータープラスミドを作製した。VPK 変異体として、M1-, M2-, F-VPK の他、M2-VPK の CGG/CGG 配列を AAA/AAA 配列に置き換えた A-VPK も作製した。A-VPK は、NCTn の結合サイトを持たないネガティブコントロールである。作製したプラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションにより導入し、NCTn の非存在下・存在下で 24 時間培養した。Rluc, Fluc それぞれの活性を測定し、その活性比 (Fluc/Rluc) を算出することにより、NCTn の -1PRF への影響を検証した (図 4 a, NCT8 のデータのみ示す)。M1-あるいは M2-VPK 配列を含むプラスミドを導入した細胞では、NCTn の濃度上昇に伴い Fluc/Rluc 比が増加した。一方、F-VPK 配列を含むプラスミドを導入した細胞では、そのような NCTn 濃度依存的な Fluc/Rluc 比の変化は見られなかった。また、NCTn の非存在下で M1-,

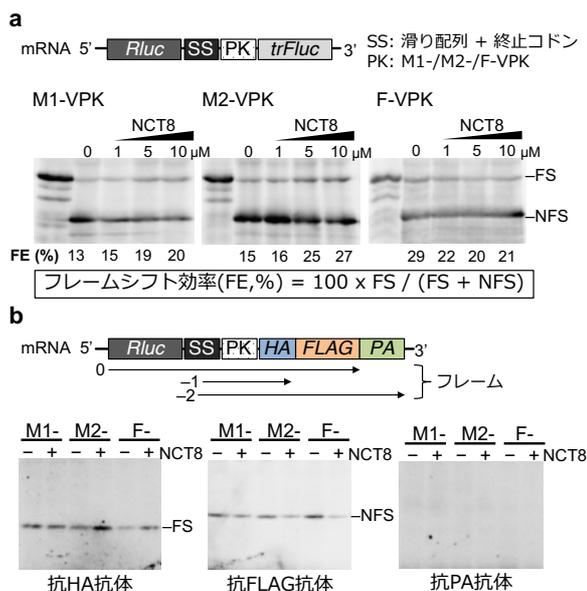


図3. *in vitro* 翻訳反応における -1PRF への NCTn 添加の影響 ~ 反応産物のウエスタンブロットによる解析

M2-VPK よりも高い Fluc/Rluc 比が得られたことから、F-VPK 配列は NCTn の有無に関わらず シュードノットを形成し-1PRF を誘導することが示唆された。A-VPK 配列を含むプラスミドを導入した細胞では、Fluc/Rluc 比は M1-, M2-VPK の場合と比較して低く、また NCTn の濃度上昇に伴う Fluc/Rluc 比の増加は無視できるほど小さいものであった。以上の結果から、M1-, M2-VPK 配列を導入した細胞で見られた Fluc/Rluc 比を増加させる NCTn の効果は、シュードノット形成配列 (CGG/CGG 配列) への作用に依存することが示唆された。

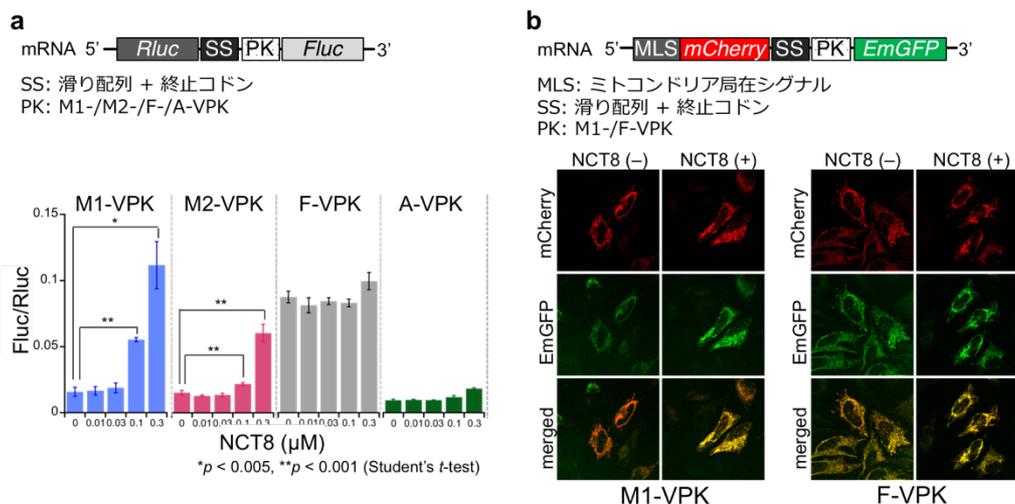


図4. (a) Dual luciferaseレポーター, (b) Dual fluorescent proteinレポーターを用いた NCTnの-1PRFに対する効果の検証

同様に、レポータータンパク質として mCherry および EmGFP を用いた Dual fluorescent protein レポータープラスミドを作製し、NCTn の-1PRF に対する効果を検証した (図 4 b)。M1-VPK 配列を含むプラスミドを導入した細胞では、NCTn の添加に伴い EmGFP 蛍光強度の上昇が見られたのに対し、F-VPK の場合は NCTn の有無に関わらず EmGFP の発現が確認され、またその蛍光強度も NCTn 添加により変化しなかった。

現在のところ、NCTn による-1PRF 誘導を利用した、標的タンパク質へのシグナルペプチドの付加および細胞内輸送・局在コントロールは実現できていない。EmGFP 配列と細胞膜移行シグナルである K-Ras の CaaX モチーフの間に VPK 変異体配列を導入したプラスミドを作製し、NCTn 添加により EmGFP が細胞膜へ移行するかを評価した。その結果、NCTn 添加による EmGFP の細胞内局在変化は明確には観察されなかった。これは、-1PRF の効率が低いことが理由であると考えられ、RNA 配列の最適化と検出感度の向上が期待される。しかしながら、本研究の結果は、NCTn が CGG/CGG 配列に結合することにより RNA にシュードノット構造を誘起できること、またそのシュードノット構造が細胞内で-1PRF を誘導することを示唆しており、合成小分子を利用したタンパク質発現のツールを提供するものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Matsumoto, S.; Caliskan, N.; Rodnina, M. V.; Murata, A.; Nakatani, K., Small synthetic molecule-stabilized RNA pseudoknot as an activator for -1 ribosomal frameshifting., *Nucl. Acids Res.* **2018**, *46*, 8079-8089., DOI: 10.1093/nar/gky689. (査読有)
- ② Matsumoto, S.; Iida, K.; Murata, A.; Denawa M.; Hagiwara, M.; Nakatani, K., Synthetic ligand promotes gene expression by affecting GC sequence in promoter., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3391-3394., DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.06.006. (査読有)
- ③ Li, J.; Matsumoto, J.; Bai, L.-P.; Murata, A.; Dohno, C.; Nakatani, K., A Ligand that Targets CUG Trinucleotide Repeats., *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14881-14889., DOI: 10.1002/chem.201602741. (査読有)
- ④ Fukuzumi, T.; Murata, A.; Aikawa, H.; Harada, Y.; Nakatani, K., Exploratory Study on the RNA-Binding Structural Motifs by Library Screening Targeting pre-miRNA-29a., *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16859-16867., DOI: 10.1002/chem.201502913. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Murata, A.; Matsumoto, S.; Caliskan, N.; Rodnina, M. V.; Nakatani, K., Synthetic small molecule-stabilized RNA pseudoknot as an activator for -1 ribosomal frameshifting., International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC) 2018 (Kyoto)
- ② 松本咲, 村田亜沙子, 中谷和彦, Ligand-inducible -1 ribosomal frameshifting in the cells, 日本化学会第 96 春季年会, 2016.3.24-27 (京都)
- ③ 村田亜沙子, 松本咲, 洪昌峰, 中谷和彦, 小分子による-1 リボソームフレームシフト誘起

とタンパク質の輸送・局在制御への応用, 第 38 回分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会  
合同大会, 2015.12.1-4 (神戸)

- ④ Matsumoto, S.; Murata, A.; Hong, C.; Nakatani, K., Regulation of gene expression by  
ligand-inducible -1 ribosomal frameshifting., RNA2015, The Annual Meeting of the RNA Society,  
2015.5.26-31 (Wisconsin, USA)

## 6. 研究組織

研究代表者

村田 亜沙子 (MURATA, Asako)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号 : 50557121

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。