

令和元年6月22日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19200

研究課題名(和文)人工リボスイッチによる真核細胞内タンパク質発現の精密制御

研究課題名(英文)A new genetic tool for translational regulation in mammalian cells

研究代表者

佐藤 慎一 (SATO, SHINICHI)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：70534478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究目的は、動物細胞内のタンパク質翻訳を厳密に制御可能な研究ツールを開発することであった。本研究では、IRES構造のリボソームの認識に必須な構造を分割し、再構成することで機能する人工リボスイッチの創製を行った。本研究では、タンパク質の発現誘導ができる「ON」スイッチおよびタンパク質発現抑制ができる「OFF」スイッチを設計し、それぞれが有効に機能することが確認できた。また申請時に提案した設計したONスイッチとOFFスイッチを組み合わせることで、タンパク質の発現誘導と抑制を同時に制御できるDualスイッチとして機能させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞のタンパク質発現を自在に操ることができる技術は、細胞機能の理解や人為的制御に有効な手段となり得る。近年、様々な人工リボスイッチが開発され、その成果が学術雑誌に報告されているが、その多くは単純な翻訳制御システムを持つ原核細胞のタンパク質発現を制御するものである。従って、研究ツールとしての応用範囲は限定的であった。本研究では、複雑なタンパク質発現システムを持つ真核細胞で機能する高性能リボスイッチの開発に成功した。その学術的意義は高い。また、本研究成果は、RNA構造体を分割する大胆かつ斬新な核酸設計を行っており、今後の核酸設計に新たな指針を与えるなど、基礎研究においても大きなインパクトを生む。

研究成果の概要(英文)：Riboswitch is a naturally occurring sensor that is directly involved in regulating its own activity, in response to the concentrations of its specific ligand. In this project, we designed a new split-RNA system that permits gene expression control in mammalian cells. The split RNA consists of two pieces of RNA segments, which are practically dissected internal ribosome entry site (IRES), and the RNA serves as a translational ON/OFF regulator as it reassembles or disassembles the IRES segments in cells. One piece of the IRES segments can be transfected as a switch lever for regulating translation of gene of interests, followed by the other IRES segment. We have successfully observed the fact that the expression of luciferase proteins, used as reporter genes, was induced by the split-IRES-based riboswitch in mammalian cells.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：リボスイッチ RNA 核酸 タンパク質翻訳制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は、核酸・タンパク質・脂質・糖鎖・代謝産物などの生体分子の時空間的な発現量を絶妙に調整することで恒常性を保っている。それら生体分子の時空間的な濃度変化を人為的に制御することができれば、複雑な生命現象を解明する上で大きな知見を得ることができる。様々な生体分子の中でも、取り分けタンパク質は細胞機能を司る重要な生体分子であることから、これまでもタンパク質の発現を人為的に制御する方法は複雑な生命現象を明らかにするために多用されてきた。例えば、タンパク質発現系を利用した一過性のタンパク質発現誘導や、siRNAによる遺伝子ノックダウンすることによるタンパク質発現抑制などは、タンパク質の細胞内機能を明らかにする技術として一般的な細胞生物学的手法として広く利用されている。しかしながら、生細胞内でタンパク質の動的・空間的な制御機構の大部分は未だ謎に包まれている。その一因は、生細胞内でのタンパク質機能発現を厳密に制御し、その詳細を解析するためのツールが少ないなど技術面の難しさにある。誰もが簡便かつ合目的に利用可能な研究ツールの開発が課題だ。申請者はこれまでに、機能性 RNA の特長を生かした種々の研究ツール開発を行ってきた。例えば、RNA アプタマーとペプチドから構成される高機能リセプターの開発 (J. Am. Chem. Soc. 2002, J. Am. Chem. Soc. 2007) や RNA アプタマーと蛍光プローブを用いた内在性 RNA イメージング法の開発 (Chem. Commun. 2011, Angew. Chem. Int. Ed. 2015), RNA quadruplex 構造と小分子化合物による生細胞内タンパク質発現制御ツール開発 (J. Am. Chem. Soc. 2016) などである。これらはどれも機能を持つ RNA を利用した細胞生物学研究ツールの設計・開発研究だ。天然にもリボザイムやリボスイッチなど優れた機能を有する RNA が存在している。申請者は、これら機能性 RNA を土台として新たな RNA ツールを設計すれば、生命現象を自在に制御できる優れた研究ツールの開発へと繋がると考えた。そこで申請者は、高い機能を付加できる RNA の性質に着目し、タンパク質の発現量を時空間的に人為的かつ厳密に制御可能なリボスイッチを設計・利用するという本研究提案を着想するに至った。

2. 研究の目的

細胞の恒常性は、核酸・タンパク質・脂質・糖鎖・代謝産物などの生体分子が互いに連携・機能することで維持されている。細胞機能の理解を深めるためには、これら生体分子の時空間的な発現量を系統立てて研究することが重要だ。本研究では、細胞機能を担う主役生体分子の一つであるタンパク質の精密な発現制御を可能とする生物学研究ツールの開発を目的とする。

真核細胞内でタンパク質の発現を人工的に誘導することは、細胞生物学において一般的に行われており、これまでも数多くの細胞機能の解明に役立ってきた。最も有名な方法は、テトラサイクリンによりタンパク質発現誘導・抑制する Tet ON/OFF システムであろう。しかし、複数のタンパク質を同一細胞に発現させる場合、個々のタンパク質の発現量を厳密に制御することは困難である。本研究では、申請者が考案したスプリット型 IRES リボスイッチ (split-IRES リボスイッチ) を用いて、この難題の解決を試みた。本方法では、リボスイッチの RNA ユニットを小分子化合物 IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) で発現誘導可能なショート RNA 発現ベクターにより細胞に発現誘導することで、同一 mRNA 上から複数のタンパク質の発現量を含めた制御が可能であり、これまでに利用されてきたタンパク質発現システムと一線を画する。タンパク質の発現誘導は、IPTG の培地への添加で素早く行うことができる、細胞生物学者が利用しやすい実用的な方法である。

3. 研究の方法

目的を早期に達成するために、段階的に研究を進めた。

- 第一段階 Split-IRESリボスイッチの設計とタンパク質発現制御能を評価する。
- 第二段階 Split-IRESリボスイッチの利用により細胞機能を制御する。

第一段階: In vitro および In cell のレポーター遺伝子発現実験により研究コンセプトの有効性を評価する。予備実験結果の詳細に関しては研究計画の欄に記載する。

第二段階: split-IRES リボスイッチにより動物細胞内におけるタンパク質発現量を精密に制御する。細胞内タンパク質の増減を自由にコントロールするために、タンパク質翻訳 ON・OFF の両方の機能を持つ Dual リボスイッチを設計・利用する。

4. 研究成果

第一段階：Split-IRES リボスイッチの設計とタンパク質発現制御能の評価

同一 mRNA 上から複数のタンパク質発現を制御可能とするリボスイッチを設計し、その機能をレポーター遺伝子発現実験により評価した。設計したリボスイッチは、内部リボソーム進入部位(IRES)を分割-再構成することで機能する(図1)。IRES 構造は X 線結晶構造解析から構造の揺らぎが予想されており、分割 IRES を再構成するためのステム構造の配置が許容されると予想した(図1b)。In vitro 翻訳システムを用いたタンパク質発現実験の結果、これまでの人工リボスイッチで大きな問題であった「タンパク質発現の漏れ」はほとんど観察され

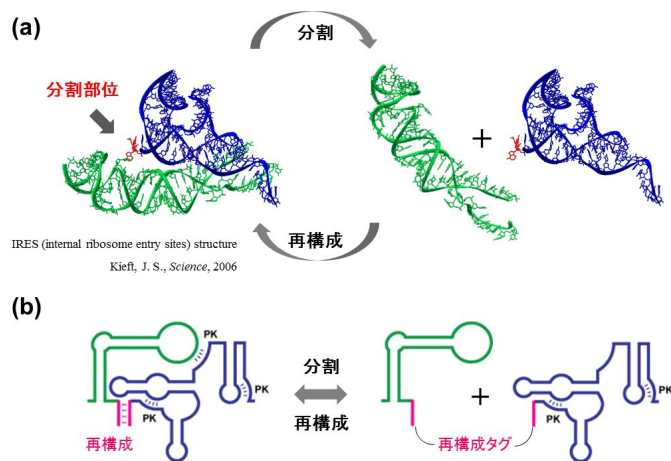


図1. スプリット型 IRES リボスイッチの設計

- (a) IRES の X 線結晶構造 (左) と分割後の構造 (右)
- (b) 分割の模式図 . それぞれに再構成のためのタグ(桃)を配置している。PK はシュードノット構造を示す。

ず、IRES 再構成によりタンパク質翻訳の ON/OFF の切り替えが 300 倍以上を示す高いスイッチ性能を実現できることが分かった。次に、In vitro 翻訳システムで評価したスプリット型リボスイッチを、哺乳動物細胞内でタンパク質発現モジュールとして利用できるかを評価した。IRES 前ユニットは、shRNA 発現ベクター (pSuper) により発現させた。タンパク質発現の有無はホタルルシフェラーゼタンパク質 (FLuc) をレポーター遺伝子として利用することで追跡した。その結果、shRNA 発現ベクター (pSuper) による IRES 前ユニットを共発現した場合、IRES 後ユニットに続く FLuc タンパク質の発現の誘導が確認された。この結果は、本研究コンセプトの信頼性を強く示唆する。

第二段階：split-IRES リボスイッチによる動物細胞内におけるタンパク質発現の精密制御

本研究では、split-IRES リボスイッチにより細胞内におけるタンパク質発現量の人工的制御を目指した。本申請では、細胞内タンパク質の増減を自由にコントロールするためには、タンパク質の発現誘導ができる「ON」スイッチだけでなく、タンパク質発現抑制ができる「OFF」スイッチを設計を目的としていた。OFF スイッチの場合、分割部位に Stem-loop 構造を配置し、その Stem-loop 構造に対して相補鎖を形成するオリゴ RNA を加えることで、2つのユニットが直線的に分割され、タンパク質翻訳を OFF にすることに成功した。実際、このコンセプトを基に設計した OFF スイッチは、In vitro 翻訳システムによる評価で、相補鎖オリゴ RNA を加えることでタンパク質翻訳を約 90%抑制した。また、申請書に記載していた ON スイッチと OFF

スイッチを組み合わせるによりタンパク質の発現誘導と抑制を同時に制御できる Dual スイッチの設計に成功した。In vitro 翻訳システムでの評価で Dual スイッチは、同一 mRNA 上から 2 種類のレポータータンパク質 (FLuc とレニーラルシフェラーゼ) を個別に発現誘導・抑制することが可能とした。

今後、本研究では、split-IRES リボスイッチを利用して動物細胞内で Dual スイッチを機能させ、生物時計に関係する転写因子群のタンパク質翻訳の精密制御を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Yatsuzuka K., **Sato S.**, Pe K. B., Katsuda Y., Takashima I., Watanabe M., and Uesugi M., Live-cell imaging of multiple endogenous mRNAs permits the direct observation of RNA granule dynamics., *Chem. Commun.*, **54**, 7151-7154, 2018 (査読有)
2. Mao D., Chung X. K. W., Andoh T., Qin Y., **Sato S.**, Takemoto Y., Akamatsu W., Okano Hideyuki., and Uesugi M., Chemical decontamination of iPS cell-derived neural cell mixtures., *Chem. Commun.*, **54**, 1355-1358, 2018 (査読有)
3. Takashima I., Kusamori K., Hakariya H., Takashima M., Vu T. H., Mizukami Y., Noda N., Takayama Y., Katsuda Y., **Sato S.**, Takakura Yoshinobu., Nishikawa M. and Uesugi M., Multifunctionalization of Cells with a Self-Assembling Molecule to Enhance Cell Engraftment., *ACS Chem. Biol.*, **14**, 775-783, 2019 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 勝田 陽介・佐藤 慎一・嘉村 匠人・北村 裕介・萩原 正規・井原 敏博
RNA 高次構造構築による新規遺伝子発現制御法の開発
日本化学会第 99 春季年会 2019 (2019)
2. 勝田 陽介・嘉村 匠人・北村 裕介・萩原 正規・佐藤 慎一・井原 敏博
G-quadruplex を利用した RNA fraction 検出法の開発
日本分析化学会第 67 年会 (2019)
3. 勝田 陽介・嘉村 匠人・北村 裕介・萩原 正規・佐藤 慎一・井原 敏博
RNA G-quadruplex 形成を利用した新規遺伝子発現抑制技術の開発
第 12 回バイオ関連化学シンポジウム (2018)
4. 嘉村 匠人・勝田 陽介・北村 裕介・萩原 正規・佐藤 慎一・井原 敏博
RNA 高次構造の形成誘導を利用した 遺伝子機能解析技術の開発
第 36 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (2018)
5. 井上 舞美・勝田 陽介・北村 裕介・上杉 志成・萩原 正規・佐藤 慎一・井原 敏博
小分子を用いた RNA 四重鎖構造の網羅的探索
第 36 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (2018)
6. 嘉村 匠人・勝田 陽介・北村 裕介・萩原 正規・佐藤 慎一・井原 敏博
外的因子による RNA 高次構造の形成誘導および遺伝子発現制御
第 30 回生体機能関連化学若手の会サマースクール (2018)
7. 井上 舞美・勝田 陽介・北村 裕介・上杉 志成・萩原 正規・佐藤 慎一・井原 敏博
小分子を用いたタンパク質翻訳反応制御機能を有する RNA 高次構造の網羅的探索
第 30 回生体機能関連化学若手の会サマースクール (2018))
8. 嘉村 匠人・勝田 陽介・北村 裕介・萩原 正規・佐藤 慎一・井原 敏博
RNA を標的とした新規機能解析技術の開発
化学関連支部合同九州大会 (2018)
9. 井上 舞美・勝田 陽介・北村 裕介・上杉 志成・萩原 正規・佐藤 慎一・井原 敏博
小分子を用いた RNA 四重鎖構造の網羅的探索
化学関連支部合同九州大会 (2018)
10. 勝田 陽介・佐藤 慎一・井上 舞美・嘉村 匠人・北村 裕介・・萩原 正規上杉 志成・井原 敏博
がん関連遺伝子を対象とした 細胞内 RNA G-quadruplex の網羅的探索
日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会(2018)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

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。