

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380056

研究課題名（和文） 機能性 RNA の効率的製造法の開発

研究課題名（英文） Toward efficient production of artificial RNAs with biological activities

研究代表者

菊池 洋 (Kikuchi Yo)

豊橋技術科学大学・工学部・教授

研究者番号：40273320

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現が関連する難病の治療薬として人工的な小分子 RNA などが期待されている。しかし、現在の RNA 合成法は、手間やコストがかかり、創薬という点で問題がある。本研究は、意図したとおりの配列をもつ人工 RNA を微生物により生産させることを目指し、圧倒的な低コストでの高機能 RNA 医薬の製造法を開発しようとするものである。本研究では、自然界で自身の RNA や DNA を培地に放出する性質をもつ海洋性光合成細菌、*Rhodovulum sulfidophilum* を操作し、**機能をもつ人工 RNA アプタマーをこの菌の培地中に生産させることに世界で初めて成功した。**

研究成果の概要（英文）：RNAs have emerged as major players in current biology. Natural micro RNAs and artificial small interfering RNAs (siRNAs), double-stranded RNAs (dsRNAs) or ribozymes function as regulators of gene expressions. In addition, an RNA aptamer, which is experimentally selected from randomized RNA pools, is a biologically functional molecule of specific binding ability to a target molecule. These RNAs are potential candidates for RNA therapeutics. In this context, efficient methods for preparation of homogeneous RNA molecules are highly required. At present, such RNAs have been prepared by *in vitro* transcription or chemical synthesis. However, they are costly and labour intensive and not suitable for preparation especially in large quantities. For large scale production of RNAs, *in vivo* production using microorganisms is thought to be the most suitable method. In this study, a new method for *in vivo* production of artificial RNAs using the marine phototrophic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* has been proposed. By this method, the product RNA is produced not only inside the cells but also in the culture medium, because this organism produces extracellular nucleic acids in nature. This is the first demonstration of extracellular production of a functional artificial RNA *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,200,000	0	6,200,000
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	14,800,000	2,580,000	17,380,000

研究分野：生化学、分子生物学、微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：RNA アプタマー、菌体外核酸、核酸ドラッグ、機能性 RNA、光合成細菌、発酵生産

1. 研究開始当初の背景

近年、RNA の研究が大いに発展している。特に、最初、線虫において発見された RNA interference (RNAi) 効果 (2006 年度ノーベル医学生理学賞) は、ある種の RNA により遺伝子発現が抑えられるというものであり、類似のシステムが高等生物にもあることがわかってきた。このシステムを利用して遺伝子発現を効果的に抑えることができる 21 塩基対ほどの二重鎖 RNA (siRNA) がウイルス病の克服や癌治療の特効薬として、大いに期待されている。一方、siRNA のみならず、RNA アプタマーのような標的に直接結合する RNA も医薬として期待されていた (現在、一部実用化されている)。いずれも RNA 自体が医薬になるということである。しかし、創薬という点から RNA は大きな問題を抱えている。RNA 合成コストが非常に高額になる点である。本研究開始当初、この問題は全く手つかずであった。

2. 研究の目的

こうした状況下、我々は、細胞外に自身の核酸を放出する細菌を知り、この菌を夢の新薬製造に利用することを考えた。この菌は海洋性光合成細菌、*Rhodovulum sulfidophilum* で、細胞外に DNA や RNA を放出している。本研究は、まずこの菌が生産する RNA の解析を行い、次に菌の遺伝子操作法を開発し、最終的に任意の**機能性 RNA を簡便に、かつ圧倒的低コストで製造する方法を開発**しようとするものであった。

3. 研究の方法

(1) *R. sulfidophilum* の培養

R. sulfidophilum DSM1374 または、*R. sulfidophilum* DSM2351 を用いた。培地は、次ページ雑誌論文⑧に示すものを用い、25°C で、嫌気明培養または、好気暗培養を行った。

(2) 菌体外 RNA の調製

培養後、菌体を遠心分離で除き、上清にエタノールを加え、核酸を沈殿させた。沈殿を 1% SDS に溶解し、0.05mg/ml proteinase K で 37°C、60 分処理し、タンパク質を除いた。フェノール処理、エタノール沈殿し、さらに RNase-free DNase I 処理で DNA を除き、再びフェノール処理、エタノール沈殿を行い精製した。

(3) 天然の菌体外 RNA のクローニング

精製した天然の菌体外 RNA の解析のため、RNA を逆転写し DNA に変換後クローニングし配列解析を行った。すなわち RNA の両端

に配列既知の合成 DNA や RNA を連結し、そこをプライマー結合部位として、逆転写、さらに PCR を行いプラスミドに連結し、増幅、塩基配列解析を行った。

(4) 菌体外 RNA 中の修飾塩基の解析

菌体内 RNA と菌体外 RNA の違いを詳細に調べるため、両 RNA に含まれる修飾塩基についても解析した。RNase T2 で分解した両 RNA を放射能でポストラベルし、得られたヌクレオチドを二次元 TLC により解析した。

(5) 培地中に RNase がほとんど生産されていないことの証明

何点かの一定培養時間における培養液上清を合成 tRNA 基質と混ぜ、保温し、基質の分解があるか否かをゲル電気泳動で解析した。

(6) ストレプトアビジン RNA アプタマー生産用プラスミドの構築と transformation

ストレプトアビジンに結合する能力をもつ RNA アプタマーの配列は、この配列をもつオリゴ DNA のアセンブリーで合成した。アプタマー配列の両側には、転写後自動的に切断するように自己切断能力をもつハンマーヘッドリボザイム配列を連結した。さらに上流に *R. sulfidophilum* の光合成関連遺伝子 *puf* のプロモーターまたは我々が本研究で単離したリボソーム RNA (*rrn*) プロモーターを、下流には *puf* ターミネーターを連結し、本菌のプラスミドとして知られている pCF1010 に挿入した。本菌へのプラスミドの導入 (transformation) は、始め、大腸菌 S17-1 株との共培養法しか知られていなかったが、我々は普通のヒートショックによる transformation 法を開発し、現在では主にその方法で行っている。

(7) 培地中のストレプトアビジン RNA アプタマー生産量の定量

ストレプトアビジン RNA アプタマーに特異的なプライマーをもちい、定量的 RT-PCR により行った。*In vitro* 転写により得られる既知量のアプタマーを標準とした。

(8) *R. sulfidophilum* により生産されたストレプトアビジン RNA アプタマーの機能解析

菌の培養により生産されたアプタマーが機能をもつことを証明するために培地から RNA を精製後、ゲルリターデーション法により機能を確認した。放射能ラベルした供試 RNA とストレプトアビジンをビオチン存在下または非存在下で混合し、未変性ゲル中で電気泳動を行い、オートラジオグラムを行った。*In vitro* 転写により得られた機能が十分に知られているアプタマーを標準とし RNA の

泳動距離等を標準と比較した。

(9) その他

その他の方法、Northern blotting、Southern blotting、プラスミド精製法など一般の分子生物学、生化学的手法については、下記「発表論文（雑誌論文）」を参照されたい。

4. 研究成果

(1) 細胞外核酸の解析

はじめに、海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* が細胞外に生産するRNAの解析を行った。図1は、*R. sulfidophilum*の細胞の集合体（フロック）の蛍光顕微鏡写真である。核酸を染めたものであるが、細胞外に染まっている核酸が見える。このフロックにDNAやRNAを分解する酵素を作用させるとフロックが壊れることから、核酸がフロックの維持に関与していることが明らかになった（以下雑誌論文②）。一方、培地の栄養条件を良くすると（酵母エキス等を培地に加えると）、培地中に溶けた状態の細胞外核酸が得られることも明らかになった（雑誌論文②）。これら細胞外のRNAを調製し、それらを逆転写酵素でDNAに変換し、クローニングにより塩基配列解析を行った。また、RNAの直接分析により修飾塩基などの解析も行った。菌体外RNAは、主に転移RNA（tRNA）とリボソームRNA（rRNA）であり、特に興味深いことにtRNAは、matureな5'末端から3'-CCAをも含む成熟tRNAであった（以下雑誌論文⑥、⑧）。このことは、本菌が菌体外に強いRNA分解酵素を有せず、RNAの菌体外生産に適していることを意味していた。さらに我々は、実際にリボヌクレアーゼ活性を測定しほとんどないことを確かめた（雑誌論文①）。

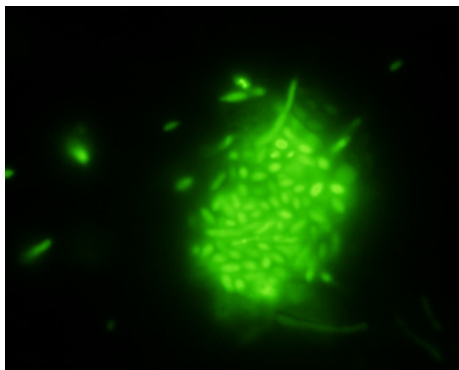


図1. *Rhodovulum sulfidophilum*

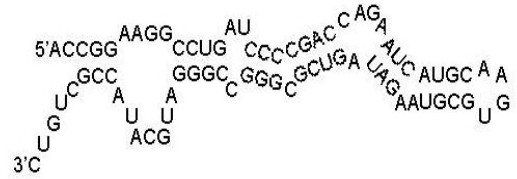


図2. 生産されたストレプトアビジンアプタマー

(2) *R. sulfidophilum*による外来性RNAの生産

前項は、本菌が自然に生産しているRNAの解析で、本研究で初めてその構造が明らかにされたものではあるが、この段階では、外来性RNA（本菌が通常保持しない遺伝子の転写産物）が生産できるか否かは不明であった。本研究では、さらに、本菌由来の光合成に関与する転写プロモーター（*puf*プロモーター）をもつプラスミドを入手し、そのプロモーターの下流に、任意の配列を挿入し、このプラスミドを大腸菌との共培養の手法で *R. sulfidophilum*の細胞に導入した。任意の配列としては、二つの例を行った。一つは、大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子（*lac z*）、もう一つは、完全な人工RNAであるストレプトアビジン結合能をもつRNAアプタマーの配列である（雑誌論文①）。これらのプラスミドは *R. sulfidophilum*の細胞に導入され、これら外来性RNAのいずれも細胞外へ生産されていることが、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）の手法で明らかになった。図2にこのアプタマーの塩基配列と二次構造を示す。導入されたアプタマー生産プラスミドでは、ストレプトアビジンRNAアプタマー配列が二つの自己切断ハンマーヘッドリボザイム配列にはさまれる形になっており、プロモーターからの転写後、自己切断により、まったくランキング配列を持たない、図2に示すそのままの配列が培地中に出てくるよう設計された。

(3) 強いプロモーターの開発と生産されたストレプトアビジンRNAアプタマーの機能確認

前項で述べたようにRT-PCR法により、目的生産物の確認を行ったが、本研究では、さらに強いプロモーターであるリボソームRNA（*rm*）プロモーターを本菌から取り出し利用し、ストレプトアビジンアプタマーの実際の生産量を *puf*プロモーターの場合の20倍にすることに成功した（雑誌論文①）。さらに、現在では、生成されるRNAの末端構造を安定化に寄与する形にするなどして、生産量を最初の実験値よりも140倍とすることに成功しており、現在さらに改良を試みている。

以上のように収率が上がったことによ

て、実際にRNAを精製、さらに放射能でRNAのポストラベルが可能となり、生産されたRNAアプタマーの結合機能の解析ができるようになった。その結果、この微生物により生産されたストレプトアビジンRNAアプタマーは、*in vitro* (T7 RNAポリメラーゼ) で合成されたものとまったく遜色ない機能をもっていることが示された(雑誌論文①)。ここに至り、**意図した機能を持つ人工RNAを微生物の培養で、その培地中に生産させた世界で初めての例となる研究成果が得られた**(雑誌論文①)。

現在のところ、改良されたとは言え、まだ培地中への生産量は1L培地当たりサブマイクログラムレベルで産業的には十分と難しいため、さらなる改良研究が必要である。しかし、この方向の研究は、以下に示すように特許申請も済ませており、当該研究者らが世界のトップを独走し、他の追随を許していない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Suzuki, H., Ando, T., Umekage, S., Tanaka, T., and Kikuchi, Y.: Extracellular production of an RNA aptamer by ribonuclease-free marine bacteria harboring engineered plasmids: a proposal for industrial RNA drug production. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 786-793 (2010) 査読有
- ② Suzuki, H., Daimon, M., Awano, T., Umekage, S., Tanaka, T., and Kikuchi, Y.: Characterization of extracellular DNA production and flocculation of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Applied Microbiol. Biotech.* **84**, 349-356 (2009) 査読有
- ③ Umekage, S. and Kikuchi, Y.: *In vivo* circular RNA production using a constitutive promoter for high-level expression. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **108**, 354-356 (2009) 査読有
- ④ Umekage, S. and Kikuchi, Y.: *In vitro* and *in vivo* production and purification of circular RNA aptamer. *Journal of Biotechnology* **139**, 265-272 (2009) 査読有
- ⑤ Suwa, S., Nagai, Y., Fujimoto, A., Kikuchi, Y., and Tanaka, T.: Analysis on substrate specificity of *Escherichia coli* ribonuclease P using shape variants of pre-tRNA. *J. Biochem.* **145**(2), 151-160 (2009) 査読有
- ⑥ Suzuki, H., Umekage, S., Tanaka, T., and Kikuchi, Y.: Extracellular tRNAs of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* are not aminoacylated. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**(2), 425-427 (2009) 査読有
- ⑦ Umekage, S. and Kikuchi, Y.: Production of circular streptavidin RNA aptamer *in vivo*. *Nucleic Acids Symposium Series No. 51*, 391-392 (2007) 査読無
- ⑧ Ando, T., Suzuki, H., Nishimura, S., Tanaka, T., Hiraishi, A., and Kikuchi, Y.: Characterization of extracellular RNAs produced by the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Biochem.* **139**(4), 805-811 (2006) 査読有

[学会発表] (計 36 件)

- ① 藤田能亘、鈴木宏道、梅影 創、田中照通、菊池 洋：海洋性光合成細菌を用いた機能性 RNA の効率的発酵生産—生成物の末端構造の違いによる生産性への影響、第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.12 横浜
- ② 鈴木宏道、大門正英、梅影 創、田中照通、菊池 洋：海洋性光合成細菌を用いた機能性 RNA の効率的発酵生産—*rrn* プロモーターによる大量生産、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.24、神戸
- ③ 藤田能亘、鈴木宏道、梅影 創、田中照通、菊池 洋、海洋性光合成細菌を用いた機能性 RNA の効率的発酵生産—生成 RNA の安定化法、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009.03.28、福岡
- ④ 梅影 創、菊池 洋、tRNA スキャホールド法を用いた環状型 RNA の発酵生産、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008.12.12、神戸
- ⑤ 鈴木宏道、栗野智幸、大門正英、梅影 創、田中照通、菊池 洋、海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* が生産する菌体外 DNA の挙動と解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008.12.10、神戸
- ⑥ S. Umekage and Y. Kikuchi, Production and purification of circular RNA aptamer *in vitro* and in *Escherichia coli*, 20th FAOBMB Taipei Conference-Frontier in Life Sciences, 2008.10.24, Taipei, Taiwan
- ⑦ 鈴木宏道、安藤智朗、梅影 創、田中照通、平石 明、菊池 洋、機能性 RNA の

発酵生産、第 10 回日本 RNA 学会年会、
2008.07.23、札幌

- ⑧ Hiromichi Suzuki, So Umekage, Terumichi Tanaka, Akira Hiraishi and Yo Kikuchi : Extracellular tRNAs of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*: structural analyses, 22nd tRNA workshop, 2007.11.03, Uppsala, Sweden

[図書] (計 2 冊、以下他 3 編)

- ① 菊池 洋 編、講談社サイエンティフィック、ノーベル賞の生命科学入門 RNA が拓く新世界、2009、総ページ数 180
- ② Yo Kikuchi and Elena Y. Rykova (Eds), Springer-Verlag Heidelberg, Extracellular Nucleic Acids (a volume of Nucleic Acids and Molecular Biology), in press 総ページ数 300 (2010 予定)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ①名称 : RNA製造方法

発明者 : 菊池洋、田中照通、梅影創、鈴木宏道

権利者 : 豊橋技術科学大学・(株) 三菱化学メディエンス

種類 : 国内特許出願

番号 : 特願 2007-295188 号

出願年月日 : 2007.11.14

国内外の別 : 国内

- ②名称 : RNA 製造方法及びプロモーター
発明者 : 菊池洋、田中照通、梅影創、鈴木宏道

権利者 : 豊橋技術科学大学・(株) 三菱化学メディエンス

種類 : 国際特許出願

番号 : PCT/JP2008/070749 号

出願年月日 : 2008.11.27

国内外の別 : 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

新聞記事等

「海洋微生物で機能性 RNA を発酵生産する手法」(鈴木宏道、菊池洋)、日経 BTJ ジャー

ナル、No.032、2008.8月号、6 ページ

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 洋 (KIKUCHI YO)

豊橋技術大学・工学部・教授

研究者番号 : 40273320

(2)研究分担者

田中 照通 (TANAKA TERUMICHI)

豊橋技術大学・工学部・准教授

研究者番号 : 30273337

梅影 創 (UMEKAGE SO)

豊橋技術大学・工学部・助教

研究者番号 : 30419436

(3)連携研究者

()

研究者番号 :