

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05686

研究課題名(和文) 超安定G-quadruplexを利用した光駆動型疑似スプライシングシステムの開発

研究課題名(英文) Development of light-mediated splicing system using hyper stable G-quadruplex

研究代表者

小笠原 慎治 (Ogasawara, Shinzi)

信州大学・学術研究院理学系・助教

研究者番号：50462669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物では選択的RNAスプライシングという現象によって1本のRNAから複数種のタンパク質が生産される。これにより限られた数のRNAから多様なタンパク質が産まれる。この現象と同様のことをDNAレベルで人工的に光照射で引き起こす新しい遺伝子工学技術の開発を目指し研究をおこなった。デモンストレーションとして、1本の環状DNAに2種類の蛍光タンパク質の遺伝情報を乗せ、光を照射した時だけ2種類の蛍光タンパク質を生産することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1本のDNAから光照射で転写されるRNAの領域を切り替える新しい遺伝子工学技術を開発した。これは擬似的な選択的RNAスプライシングを光で操作したとも言える。選択的RNAスプライシングは真核生物の細胞では常におこっており、特に発生過程で正しく体を形成していく際に重要だと考えられている。本技術は発生途中の任意の過程で任意の細胞で人為的に選択的RNAスプライシングを引き起こすことができ、その機能的意味の解明に役立つと考えられる。それによって蓄積した知見は人工臓器作製などへ活かすことができる。

研究成果の概要(英文)：Splicing variant produced from a mRNA precursor is providing various protein. In this theme, we developed the new technology that can reversibly switch the transcription region by light illumination. To demonstrate capability of our method, we controlled transcription region of plasmid harboring two genes of fluorescence proteins.

研究分野：分子生物学

キーワード：G-quadruplex スプライシング 光操作

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物は選択的スプライシングにより1つの遺伝子からエクソン構成を変化させた複数種の mRNA (スプライシングバリエーション) を作り、タンパク質の多様性を生み出している。特に、胚の発生過程ではスプライシングバリエーションが時空間的に作り分けられていることが以前から分かっている。しかし、その機能的役割はほとんど分かっていない。試験管内で選択的スプライシングを再現することは難しく、ましてや発生途中の胚でそれをおこなう手法は存在しないからである。スプライシングバリエーションの時空間的作り分けを人工的に再現することはできないだろうか？ それができれば、スプライシングバリエーションの時空間的作り分けが担う機能的役割の解明に繋がるばかりか、有用なバイオテクノロジーになるだろう。ここ数年、光遺伝学が目覚ましく発展している。脳内の狙った1個の神経細胞の活動を任意のタイミングで操作できるように、光刺激はこれまでにない高い時空間分解能で細胞内現象を操ることを可能にする。このため、スプライシングバリエーション生成の時空間的制御には光刺激を用いるのが最適である。申請者はこれまで、*cis-trans* 光異性化する核酸塩基「フォトクロミック塩基」を用いた光遺伝学的手法を開発しており、最近、光応答性超安定 G-quadruplex を使った転写の可逆的光制御に成功した。本課題では、これを光駆動型疑似スプライシングシステムへ拡張する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光応答性超安定 G-quadruplex を使い RNA ポリメラーゼが転写する範囲を光照射で切り替え、スプライシングバリエーションを選択的に生成させる光駆動型疑似スプライシングシステムを開発することである。

3. 研究の方法

初めに、2つの遺伝子の発現を切り替える単純な光駆動型疑似スプライシングシステムを構築する。2種類の蛍光タンパク質の遺伝子を光応答性超安定 G-quadruplex を介して連結し、CMV プロモーターを持つプラスミド (pCS2 など) へ挿入する。この単純な光駆動型疑似スプライシングシステムでは、超安定 G-quadruplex を形成させた場合、1種類の蛍光タンパク質のみが発現する。一方、光照射で超安定 G-quadruplex をほどこいた場合は2種類の蛍光タンパク質が発現し、2色の蛍光を発する。作製したプラスミドを無細胞タンパク質発現系に添加し、もしくは培養細胞にトランスフェクションし、光照射により転写される領域がスイッチされるかを蛍光の色から判断する。次に、3種類の蛍光タンパク質の遺伝子を用いて3遺伝子系の光駆動型疑似スプライシングシステムを構築し本技術の拡張性を実証する。

4. 研究成果

pCS2 に mCerulean (青色蛍光タンパク質) および mScarlet (赤色蛍光タンパク質) をタンデムに組み込んだ pCS2-mCerulean-mScarlet を作製した。次に、pCS2-mCerulean-mScarlet を制限酵素で処理し mCerulean と mScarlet の間を切断した。化学合成した光応答性超安定 G-quadruplex の両端を同制限酵素で処理し開裂済みの pCS2-mCerulean-mScarlet とライゲーションすることで光応答性超安定 G-quadruplex を mCerulean と mScarlet の間に導入した。このスキームによって得られた光応答性超安定 G-quadruplex 含有プラスミドは非常に微量であった。本課題では最終的に2つの光応答性超安定 G-quadruplex をプラスミドに導入するため、もう一度同じスキームを繰り返す必要があり、この方法では十分量の光応答性超安定 G-quadruplex 含有プラスミドを得ることは難しいと判断した。そこで、PCR を利用した導入法

の検討をおこなった。光応答性超安定 G-quadruplex を含むプライマーで PCR をおこない、PCR 産物をライゲーションすることで光応答性超安定 G-quadruplex 含有 pCS2-mCerulean-mScarlet を作製した。PCR 法では十分な量のプラスミドを得ることができた。作製したプラスミドを無細胞タンパク質発現系へ添加し、光駆動型擬似スプライシングシステムの動作確認をおこなった。光照射しなかったサンプルからは mCerulean の蛍光のみが観察され mScarlet の蛍光は観られなかった。一方、460 nm の光を照射したサンプルからは mCerulean の蛍光と mScarlet の蛍光が観察された。これは、光駆動型擬似スプライシングシステムが動作したことを示唆する結果である。次に HEK293T 細胞へ光駆動型擬似スプライシングシステムをトランスフェクションし細胞内での性能評価をおこなった。光照射しなかった細胞からは mCerulean の蛍光のみが観察され mScarlet の蛍光は観られなかった。一方、460 nm の光を照射した細胞からは mCerulean の蛍光と mScarlet の蛍光が観察された。以上のように、細胞内でも動作する光駆動型擬似スプライシングシステムを構築することができた。ただし、光照射していないサンプルの蛍光強度は光照射したサンプルと比べ非常に微弱であった。転写産物の量においても光照射していないサンプルの方が少なかったが、それが蛍光強度の差に直結するほどの差ではなかった。このことから、光照射しない場合では翻訳がほとんど起こっていないことが分かった。その原因は、光照射しない場合において生産される mRNA は終始コドンが欠如したノンストップ mRNA であるためだと考えられる。また、転写産物の量が少なかった原因もノンストップ mRNA であるため、分解が促進されたと考えられる。本システムの機構上、光照射しない場合に転写される mRNA がノンストップ mRNA になってしまうのは現時点では避けられない。この問題を解決することが今後の課題である。

続いて 3 遺伝子系の光駆動型擬似スプライシングシステムの構築をおこなった。これには上記の制限酵素法と PCR 法を併用した。得られたプラスミドは非常に微量であり、無細胞タンパク質発現系で動作確認を試みたが、蛍光は全く観察されなかった。化学合成した人工核酸を効率良くプラスミドに導入する新しい方法を開発する必要がある。

以上のように、光駆動型擬似スプライシングシステムの構築に成功した。転写する領域を光でスイッチするという目的は達成できた。しかし、光照射しない場合において転写される mRNA がノンストップ mRNA であるため翻訳が効率的に起こらないという改善点が明瞭になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------