

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15701

研究課題名(和文) RNA-RNPのワンポット共進化による生体直交性ペアの創製と翻訳制御への応用

研究課題名(英文) Development of bioorthogonal RNA-RNA-binding protein pairs via molecular co-evolution and application for translational control

研究代表者

福永 圭佑 (FUKUNAGA, KEISUKE)

沖縄科学技術大学院大学・核酸化学・工学ユニット・ポストドクトラルスカラー

研究者番号：80639279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ライブラリー vs. ライブラリーの試験管内セクションを行う新しい進化分子工学の手法：PD-SELEX法を開発することに成功した。1.1 x 10⁷ の多様性のRNAライブラリーと4.0 x 10⁷ 多様性のファージディスプレイL7Ae (LS)スキャフォールドライブラリーを用い、6ラウンドのセクションを行った。次世代シーケンシングで配列の濃縮が起きていることを確認し、RNA-RNA結合タンパク質ペアを決定するための再セクション実験を行った。最終的に約7 pMの解離定数を示し、4000倍以上の結合選択性を示す直交性RNA-RNA結合タンパク質ペアを2つ同定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

核酸-タンパク質(ペプチド)間相互作用を解析、または結合選択性を改変するための基盤技術としてPD-SELEX法が活用できる。また、セクションで得られた直交性RNA-RNA結合タンパク質ペア(CS1 RNA-LS4 protein & CS2 RNA-LS12 protein)は、任意のRNAとタンパク質を繋ぐアダプター分子としての利用が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：A novel library-vs-library in vitro selection method (PD-SELEX: Phage Display coupled with Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) has been developed. Starting with pools of 1.1 x 10⁷ unique RNA sequences and 4.0 x 10⁷ unique phage-displayed L7Ae-Scaffold (LS) proteins, six rounds of selection were carried out. The selected RNAs and LS proteins were analyzed by high-throughput sequencing. Further deconvolution of the enriched RNA and LS protein sequences revealed two orthogonal RNA-RBP pairs that exhibit 7 pM KD value and >4000-fold selectivity.

研究分野：生体分子工学

キーワード：PD-SELEX RNAアプタマー RNA結合タンパク質 進化分子工学 共進化

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現を人工制御するための仕組みは、物質生産をはじめとして疾患治療を見据えた細胞リプログラミングなど幅広い分野での技術的基盤となっている (*Curr. Opin. Biotechnol.* **53**, 1 (2018); *Nat. Rev. MCB* **19**, 507 (2018))。例えば、RNA 構造の一種であるキンクターンモチーフを mRNA の 5' 非翻訳領域 (UTR)、あるいは開始コドン直下に配置することで、RNA 結合タンパク質の一種である L7Ae を翻訳抑制因子として利用可能なことが見出された (*Nat. Chem. Biol.* **6**, 71 (2010))。この RNA-RNA 結合タンパク質 (RBP) ペアが哺乳動物細胞において人工遺伝子回路を構築するためのスイッチとして広く利用されている (*Nature* **487**, **123**, (2012); *Nat. Methods* **11**, 1154 (2014); *Nat. Biotechnol.* **33**, 839 (2015) etc.)。しかしながら、古細菌由来である L7Ae は原核生物及び真核生物に存在するキンクターンモチーフ RNA にも結合し、また、真核生物の L7Ae ホモログ (eukaryotic 15.5 kD protein) もキンクターンモチーフに結合することが知られている (*RNA* **16**, 79 (2010))。L7Ae とキンクターンモチーフ RNA がそれぞれ細胞内のシステムと競合する (生体直交性が無い) ため、新奇 RNA-RBP ペアの開発が期待されている。

2. 研究の目的

哺乳動物細胞内において機能する新奇 RNA-RBP ペアを創製するのが本研究の目的である。このため、(1) RNA-タンパク質間の結合選択性を改変する新規手法の開発を行い、(2) 哺乳動物細胞で機能することが分かっている既存の RNA-RBP ペア (Kt RNA-L7Ae) の結合選択性の改変を行う。具体的には、ファージディスプレイ RBP ライブラリー及び RNA ライブラリーを試験管内で混和し、相互作用する RNA-RBP ペアのみを選択・増幅する系 (共進化分子工学の手法) を開発し、新奇 RNA-RBP ペアの取得を行う。

3. 研究の方法

標的分子に結合するタンパク質・ペプチドをセレクションする手法であるファージディスプレイ (PD) 法と核酸をセレクションする手法である Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法を組み合わせ、二種類のライブラリーの混合物の中から RNA-RBP 複合体を作ることができるペアを試験管内で選択、共進化させる手法を開発する (図 1)。

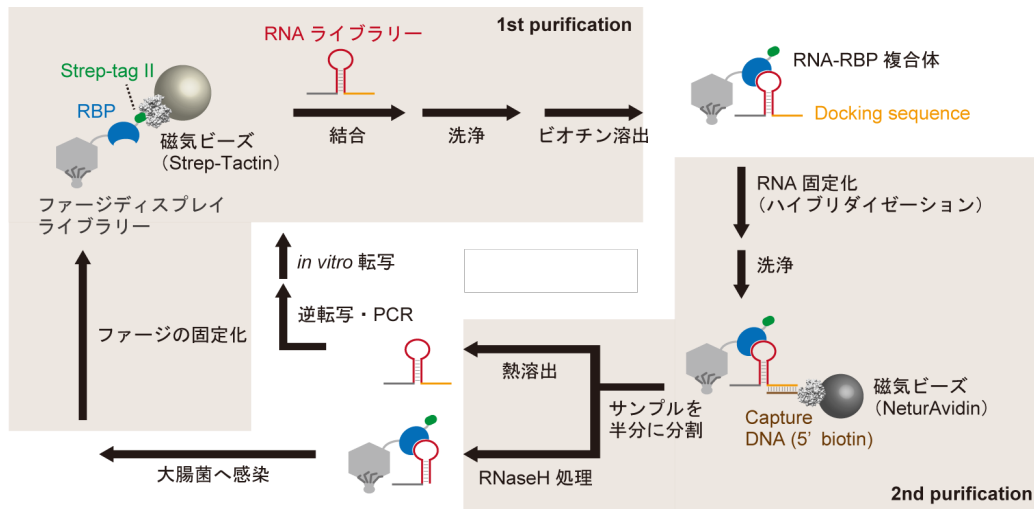


図 1. PD-SELEX 法の概略図

二段階のアフィニティーセレクションにより複合体の選択を行う。まず、バクテリオファージ T7 に提示させた RBP の C 末端側に融合したペプチドタグ (Strep-tag II) を利用して、Strep-Tactin 磁気ビーズ上に PD-RBP ライブラリーを固定化する。固定化した RBP に対して RNA ライブラリーのセレクションを行う (図 1, 1st purification)。次に、RNA ライブラリーの 3' 側 (Docking sequence) に対して相補的な配列の DNA を固定化した磁気ビーズを用いて RNA を捕捉し、RNA と複合体を作っている PD ライブラリーのセレクションを行う (図 1, 2nd purification)。熱溶出または RNase H 処理によって回収した RNA ライブラリー、PD ライブラリーはそれぞれ RT-PCR-in vitro 転写、または大腸菌感染により増幅する。一連の操作 (ラウンド) を複数回行うことで RNA-RBP 複合体の濃縮を行う。最終的にライブラリーの High-throughput シーケンシングを行うことで、配列の濃縮を確認する。

4. 研究成果

(1) Mock ライブラリーからの Kt RNA-L7Ae 複合体のセレクション

超好熱性古細菌 *A. fulgidus* 由来のリボソームタンパク質 L7Ae とそれに結合するキンクターンモチーフ RNA (Box C/D Kt) を PD-SELEX 法のモデル系として採用した。L7Ae とその結合モチーフ RNA は、齊藤博英教授 (京都大学 CiRA) らが初めて動物細胞で翻訳制御スイッチとして使い (*Nat. Chem. Biol.* **6**, 71 (2010))、現在までに合成生物学研究で広く利用されている (*Curr. Opin. Biotechnol.* **63**, 99 (2020))。

Box C/D 由来の Kink-turn RNA と、L7Ae に対する結合活性を失った変異体 dKt RNA (*ACS Synth. Biol.* **1**, 83 (2012)) を *in vitro* 転写で調製した。また、L7Ae を提示する T7 フェージ、及び L7Ae の RNA 結合面に位置するアミノ酸 8 残基に変異導入した dL7Ae (E34K, K37E, R41E, I88G, E89G, V90G, P91G, C92S) を提示する T7 フェージを作出した。この 4 種類の組み合わせ (2 RNAs × 2 proteins) の中では、Kt RNA-L7Ae が複合体形成可能なペアである。PD-SELEX セレクション (図 1) により正しいペアが選択されるか試験した。ポジティブコントロールである Kt RNA またはファージディスプレイ L7Ae が少量 (1 or 5%) 含まれる模擬ライブラリーを作製し (図 2 a)、1 ラウンドのみのセレクションを行った。Box C/D Kt RNA は dKt RNA よりも 5 塩基短くなるように設計したため、RT-PCR 後のサンプルを電気泳動で分離することで濃縮された RNA の由来を判定した (図 2 b)。セレクション後に短い DNA 断片がライブラリーの 50%以上を占めており、Box C/D Kt が選択されていることを確認した。同様に、選択されたファージディスプレイ RBP の評価を電気泳動で行った (図 2 c)。L7Ae 遺伝子内に *Hae* III 認識サイト、dL7Ae 遺伝子内に *Bam* HI 認識サイトを導入しておいたため、PCR で L7Ae/dL7Ae 遺伝子の増幅を行った後、制限酵素処理で遺伝子の由来を判定した。セレクション後に、*Hae* III (H) で切断される L7Ae 由来の DNA がライブラリーの過半数を占めており、PD-SELEX による RNA-RBP 複合体のセレクション系が機能していることが明らかとなった。

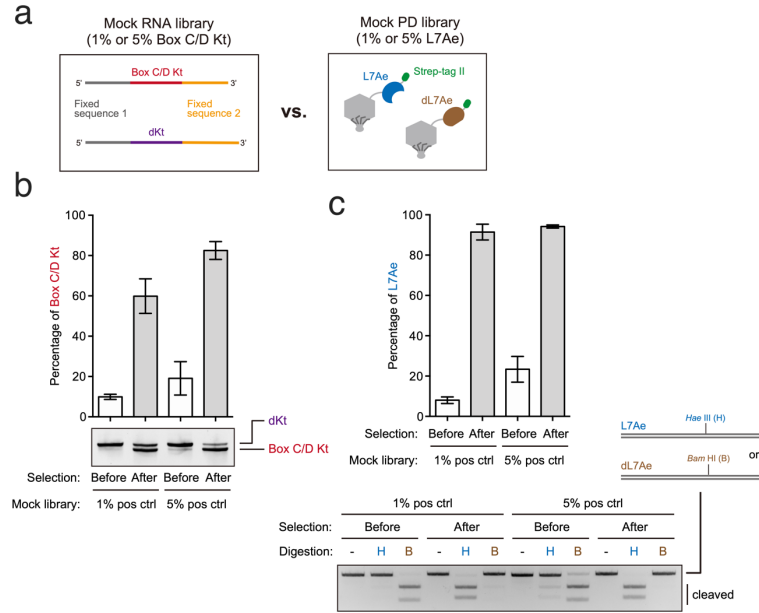


図 2. (a) Mock ライブラリーの作製、(b) RNA ライブラリーの評価、(c) フェージディスプレイ RBP の評価

(2) RNA ライブラリー vs. PD ライブラリー *in vitro* セレクション

ステムループ構造のループ部分 20 塩基をランダム化した全長 76 塩基の RNA ライブラリーをまずデザインした (図 3, 左)。 $4^{20} = \text{約 } 1.1 \times 10^{12}$ のライブラリーサイズであり、*in vitro* では配列空間全てをカバーすることができる。また、共結晶構造 (RNA 19, 1703 (2013), PDB ID: 4BW0) を参考に、L7Ae の RNA 結合面に位置するアミノ酸 8 残基を NNK コドンでランダム化 (E34X, K37X, E40X, I88X, E89X, V90X, P91X, C92X; X = 20 amino acids) した PD ライブラリーを構築した (図 3, 右)。プラークアッセイの結果、PD ライブラリーの多様性 (ライブラリーサイズ) は約 4.0×10^8 であった。



図 3. RNA ライブラリー(左)、ファージディスプレイ RBP ライブラリー(右)のデザイン

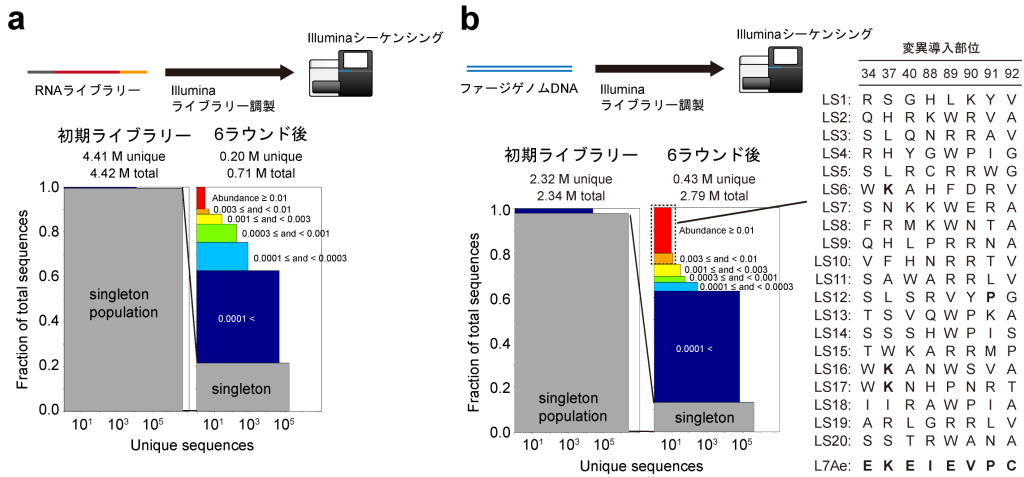


図4. High-throughput sequencingによるセレクションの評価。(a) RNAライブラリー、(b) PDライブラリーのセレクション前後での配列の濃縮を示している。

6ラウンドの試験管内共進化実験 (RNAライブラリー vs. PDライブラリー セレクション) を行い、Illuminaシーケンシングでセレクションの評価を行った。6ラウンド後のRNAライブラリーを解析したところ配列の濃縮が観察された (図4a)。PDライブラリーにおいても同様に配列の濃縮が見られ (図4b)、上位クローン (LS_x, x=1-20) の89残基目ではArg/Trp、90残基目ではArgの出現頻度が高いことが分かった。スキヤフォールドとして用いた親タンパク質L7Aeと比較した場合、明瞭な配列相関性は見られなかった。

(3) 再セレクションによるRNA-タンパク質ペアの決定

次に、どのRNAとタンパク質が結合するペアなのかを決定するため、セレクションされたタンパク質上位クローン20種類 (LS_x, x=1-20) をリコンビナントタンパク質として個別に調製した。また、6ラウンド後のRNA上位配列を含む第二世代RNAライブラリーをオリゴDNAプールから*in vitro*転写で調製し、個々のリコンビナントLS_xタンパク質に対して1ラウンドのセレクションを行った (従来のSELEX実験に相当; 図5)。頻出する2つのコンセンサス配列、CS1: UUGUGASGC (S=G or C) (図5a)、CS2: UCCAUGACGC (図5b) に着目し、統計的に解析を行った。その結果、配列1を持つRNAとLS4タンパク質のペアと配列2を持つRNAとLS12タンパク質のペアはそれぞれ特異的に結合するRNA-RBPペアである可能性が高いことが明らかとなった。NUPACKを用いてRNAの二次構造予測を行ったところCS1は対称的な形の内部ループ構造、CS2は典型的なキンクターン構造の形成に関与していることが示唆された。

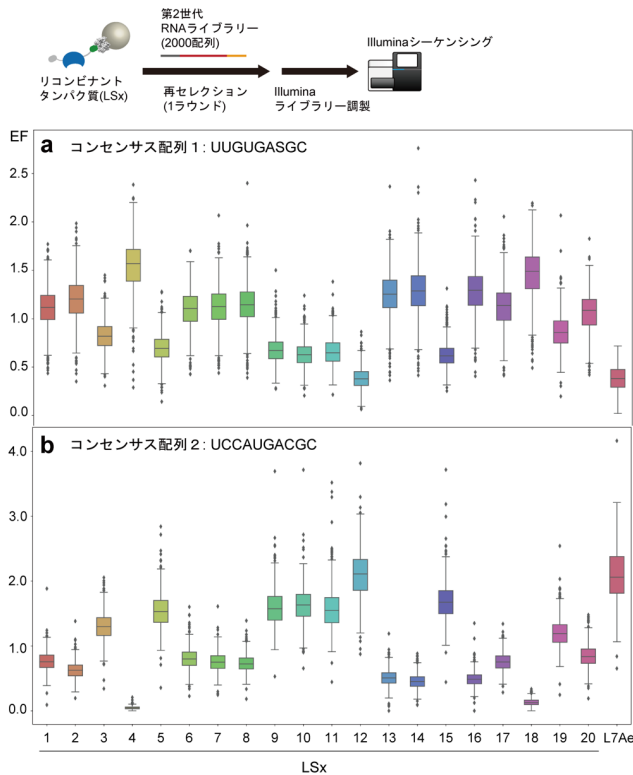


図5. 個別のリコンビナントタンパク質に対する第2世代RNAライブラリーのセレクション。

(4) 結合解析

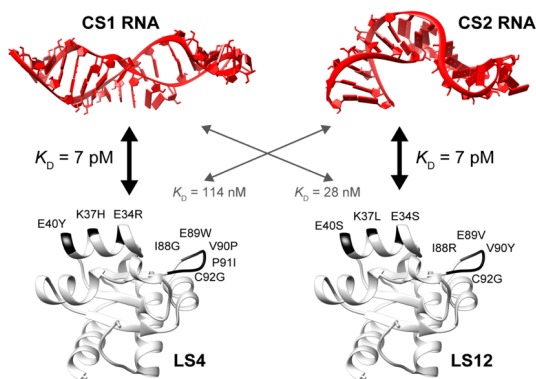
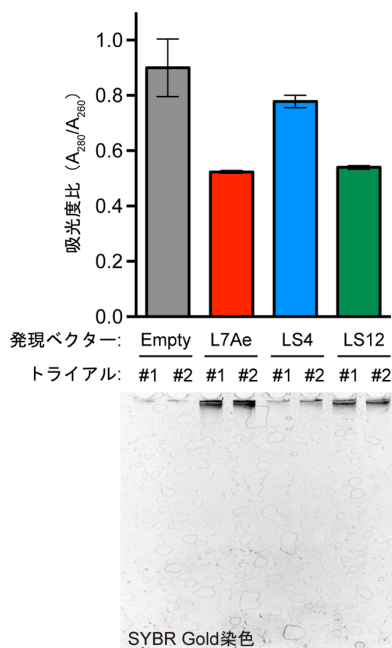


図6. 共進化実験によって得られた直交性 RNA-RBP ペア。RNA の三次元構造予測は RNAComposer による。

これらを含む最小化構造の RNA を合成し、表面プラズモン共鳴法 (SPR) による結合解析を行ったところ CS1 RNA-LS4 ペア、CS2 RNA-LS12 ペアはそれぞれ 7 pM (25 °C) と傑出した解離定数を示した (図6)。一方、CS1 RNA-LS12、CS2 RNA-LS4 の組み合わせではそれぞれ 28 nM、114 nM の解離定数 (25 °C) であり、本来の RNA-RBP ペアよりも 4000 倍以上結合力が弱いことが明らかとなった。つまり、これら 2 組は特異的に結合する RNA-RBP ペアであることが明らかとなった。

(5) LS4 の生体直交性



古細菌由来 L7Ae を大腸菌や哺乳動物細胞で過剰発現させると増殖異常や細胞死などのある種の細胞毒性を示すことが知られている (*mBio* 8, e00730 (2017); *Nat. Chem. Biol.* 14, 1043 (2018); *ACS Synth. Biol.* 9, 169 (2020))。L7Ae は様々なキクタンモチーフ RNA に対して広範に結合活性を持つと考えられており (*RNA* 13, 200 (2007))、細胞内 RNA にも結合活性があると推定される。大腸菌で L7Ae を発現させてアフィニティー精製すると内在性 RNA がコンタミネーションすることが示唆されており (*J. Mol. Biol.* 381, 431 (2008))、実際に筆者の実験でも観察された (図7)。一方で、LS4 を大腸菌で発現・精製した場合、核酸成分の共精製は大幅に抑えられていた (図7)。SPR を用いた結合実験でも、LS4 は Box C/D Kt に対して K_D 値 599 nM、CS2 に対して K_D 値 114 nM とキクタンモチーフ RNA に対する結合親和性が減弱していることが分かっており、実験的に示す必要があるものの、哺乳動物細胞においても生体直交性が向上している可能性がある。

図7. 核酸成分の共精製。大腸菌で発現させた His-tag 融合タンパク質を RNase/DNase 非存在下でアフィニティー精製した。上のグラフはタンパク質の精製度を示す。下は変性 PAGE でサンプルを分離し、核酸成分を SYBR Gold で染色した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Keisuke Fukunaga and Yohei Yokobayashi	4. 巻 50
2. 論文標題 Directed evolution of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library in vitro selection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 601-616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kamila Mustafina, Keisuke Fukunaga, and Yohei Yokobayashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Design of Mammalian ON-Riboswitches Based on Tandemly Fused Aptamer and Ribozyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.9b00371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 福永 圭佑、横林 洋平
2. 発表標題 ライブラリー vs. ライブラリーの共進化実験を通じた直交性RNA-RNA結合タンパク質ペアの探索
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会（2021）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福永 圭佑、横林 洋平
2. 発表標題 ライブラリー vs. ライブラリーの共進化実験を通じた直交性RNA-RNA結合タンパク質ペアの探索
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kamila Mustafina, Keisuke Fukunaga, and Yohei Yokobayashi
2. 発表標題 Design of Mammalian ON-riboswitches Based on Tandemly Fused Aptamer and Ribozyme
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福永 圭佑, 横林 洋平
2. 発表標題 Directed evolution of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library in vitro selection
3. 学会等名 FIBER 日本核酸化学会若手フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福永 圭佑, 横林 洋平
2. 発表標題 PD-SELEX法を用いたRNA-RBPのin vitro共進化
3. 学会等名 生命の起原および進化学会・夏の学校2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福永 圭佑, 横林 洋平
2. 発表標題 ライブラリー vs. ライブラリーの試験管内選択を通じた直交性RNA-RBPペアの発見
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福永 圭佑, 横林 洋平
2. 発表標題 PD-SELEX法を用いた直交性RNA-RBPペアの発見
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福永 圭佑, 横林 洋平
2. 発表標題 Directed evolution of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library in vitro selection
3. 学会等名 RNA Frontier Meeting 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kamila Mustafina, Keisuke Fukunaga, and Yohei Yokobayashi
2. 発表標題 Design of Mammalian ON-riboswitches Based on Tandemly Fused Aptamer and Ribozyme
3. 学会等名 Virtual International Mammalian Synthetic Biology Workshop (mSBW) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Fukunaga and Yohei Yokobayashi
2. 発表標題 Directed evolution of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library in vitro selection
3. 学会等名 ISNAC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Fukunaga and Yohei Yokobayashi
2. 発表標題 Directed evolution of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library in vitro selection
3. 学会等名 ICBS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 福永 圭佑	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本化学会 生体機能関連化学部会 ニュースレター 36	5. 総ページ数 5
3. 書名 PD-SELEX法を用いた直交性RNA-RBPペアの指向性進化	

1. 著者名 福永 圭佑	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本化学会 バイオテクノロジー部会 ニュースレター 25	5. 総ページ数 2
3. 書名 若手研究者からのメッセージ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<ul style="list-style-type: none"> 第15回バイオ関連化学シンポジウム 部会講演賞 受賞 FIBER日本核酸化学会若手フォーラム 核酸化学若手講演賞 受賞

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
---------	---------