

平成 21 年 3 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006 年度～2009 年度

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 (Yo Kikuchi)

豊橋技術科学大学・工学部・教授

研究者番号：40273320

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. 研究計画の概要

海洋性光合成細菌、*Rhodovulum sulfidophilum* は、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る。

2. 研究の進捗状況

(1) 研究を開始した 2006 年度には、計画どおり *Rhodovulum sulfidophilum* の菌体外 RNA を解析し、それらが転移 RNA (tRNA) そのものおよびリボソーム RNA (rRNA) の断片であることを初めて明らかにした。特に tRNA のほとんどは全く分解されていない成熟 tRNA そのもので、この菌における RNA 分解酵素の生産はほとんど見られず、この菌が機能性 RNA 生産に適していることが期待された。

(2) 2007 年度には、本菌を用いる異種 RNA 生産のための遺伝子操作法を確立した。プラスミド上に光合成に関与する *puf* プロモーターを持たせ、まずその下流に大腸菌の *lac z* 遺伝子を導入し、本菌により *lac z* mRNA が生産されていることを確認した。また、完全な人工遺伝子であるストレプトアビジン RNA アプタマー配列も導入し、この機能性 RNA を菌体外に生産できることが明らかになった。

(3) 2008 年度には、生産される RNA の収量を上げるために、強いプロモーターの開発を試み、本菌の rRNA オペロンの *rrn* プロモーターを単離し *puf* プロモーターの代わりに導入した。 β -ガラクトシダーゼをレポーターと

した定量的測定で、*rrn* プロモーターは、*puf* プロモーターの 100 倍のプロモーター活性をもつことが明らかになった。

さらに、本菌の微生物生理学的な研究も進め、本菌のフロック (菌の凝集体) 形成と菌体外核酸の生成が深く関与していることを明らかにした。まず、細胞外核酸はフロック中の細胞間をつなぐ物質として機能していることがわかり、フロック形成を抑えると培地中の核酸収量が大きくなることが期待できた。また、フロック形成はクォーラムセンシングで制御されていることも発見した。これらの発見から、クォーラムセンシングを阻害することにより、期待通り培地中の核酸量が上がることを確認した。今後の収量増加に利用できるものと期待される。

3. 現在までの達成度

* 当初の計画以上に進展している

理由：当初、本菌をもちいた遺伝子操作法の開発に時間がかかる可能性も考えられたが、問題なく進行し、現時点では新規遺伝子導入法自体は完成している。また、2009 年度に計画していた新規プロモーターの開発も 2008 年度に強いプロモーターが得られ、計画を上回っている。さらに、何といたっても特許出願 (国内、国外とも) を 2008 年度までに行っていることにより、「計画以上に進展している」と判断した。

4. 今後の研究の推進方策

上記のように、計画以上に進展しているが、現時点では、培地中に異種 RNA の生産が確認できるという段階で、大量生産のためには、さらに応用研究が必要である。まず一つ目は、

プロセス工学的な、生産物の効率的な単離・精製法の確立を目指したい。現在のところ固相化プローブ法などを計画している。二つ目として、本菌の生理学的研究を進めて、菌体外核酸の生産機構を明らかにすることも高収率を得るために必要と考えられる。このためには地道な遺伝学的な研究（菌体外核酸生産関連遺伝子などの同定など）を進める予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 8 件)

- ① 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
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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 30 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 RNA の安定化法、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009.03.28、福岡
- ② 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

- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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

[図書] (計 1 件)

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 の新世界、2009、印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ①RNA 製造方法、菊池洋、田中照通、梅影創、鈴木宏道、豊橋技術科学大学・(株) 三菱化学メディエンス、特願 2007-295188 号、2007.11.14、国内
- ②RNA 製造方法及びプロモーター、菊池洋、田中照通、梅影創、鈴木宏道、豊橋技術科学大学・(株) 三菱化学メディエンス、PCT/JP2008/070749号、2008.11.27、国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

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