

平成 29 年 4 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25708027

研究課題名(和文) 分子応答性RNAプロセッシングシステムの開発と人工シュードリボスイッチへの応用

研究課題名(英文) Development of a molecule-responsive RNA processing system and its application to an artificial pseudo-riboswitch

研究代表者

小川 敦司(Ogawa, Atsushi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：30442940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の細胞抽出液中における未成熟tRNAの末端プロセッシングおよび分解速度を調査した後、その結果に基づいて、標的分子に応答して成熟化する未成熟tRNAプローブを設計し、新規分子応答性遺伝子発現システム『シュードリボスイッチ』の開発につなげた。本システムは、任意分子に対して合理的に構築可能であるだけでなく、その機構上の利点から、既存の人工システムよりも高いスイッチング効率を発揮できる。また、分子応答性を核酸に拡張し、高感度・高選択性の核酸検出バイオセンサーを開発した。さらに、非天然アミノ酸導入用tRNAプローブ骨格の合理的最適化や、発現ON時の翻訳を促進させるmRNA非翻訳領域の同定を行った。

研究成果の概要(英文)：We investigated the end processing and degradation of premature tRNAs in a eukaryotic cell extract, which led to the development of a novel type of molecule-responsive gene regulation system called "pseudo-riboswitch" that harnesses the maturation of a premature tRNA probe for a target molecule. This system has the advantage not only in being able to be rationally constructed to respond to an arbitrary molecule but also in generally exhibiting higher switching efficiency than previously reported artificial gene regulation systems, by virtue of its unique mechanism. In addition, we modified this pseudo-riboswitch system to develop biosensors for detecting nucleic acids with high sensitivity and specificity. Moreover, we rationally optimized a tRNA probe framework for introducing a non-natural amino acid into a protein. We also identified an untranslated region of mRNA that enhances translation in the ON state.

研究分野：生体関連化学

キーワード：リボスイッチ プロセッシング tRNA

1. 研究開始当初の背景

「外部環境(分子・光・pHなど)にตอบสนองして遺伝子発現をスイッチングするシステム」は、合成生物学、代謝工学、システム生物学、生物分析学、医学など多方面に応用できる。中でも、分子には有機化学的手法によって光応答性やpH応答性を導入できるため、『分子応答性遺伝子発現制御システム』の汎用性は極めて高いと考えられる。この種のシステムを任意の分子に対して人工的に構築する場合、生物が元来有するシステムを参考にすることが望ましく、cis作用型の分子応答性遺伝子発現制御システムである『リボスイッチ』が第一候補として挙げられる。リボスイッチは、主に原核生物 mRNA の非翻訳領域上に存在するノンコーディング RNA あり、制御分子(天然では代謝産物)と結合する「アプタマー部位」および遺伝子発現をコントロールする「発現制御部位」から成っている。制御分子がアプタマー部位に結合すると、発現制御部位の構造変化が起こり、下流(or上流)の遺伝子発現(転写 or 翻訳)を制御する仕組みである。

天然のリボスイッチは、代謝産物にตอบสนองするものに限られるが、任意の分子に結合する人工アプタマーは in vitro selection 法によって獲得できるので、その人工アプタマーを使って、人工リボスイッチを構築する試みが、近年盛んに行われている。とりわけ、“転写制御”より単純な“翻訳制御”の人工リボスイッチが多く、例えば、原核生物の翻訳系では、mRNA の5'非翻訳領域(5'UTR)にアプタマーとともにランダム塩基を挿入し、セレクションを行うことによって、幾つかの翻訳制御人工リボスイッチが得られている。しかしながら、天然のリボスイッチ同様、セレクションで獲得された人工リボスイッチは、アプタマー部位と発現制御部位が部分的に重なっているために、別の分子に対するリボスイッチを合理的に設計するための基盤としては使えず、汎用性に欠ける。一方、本研究代表者は、世界に先駆けて、「アプタマー基盤人工リボスイッチの完全な合理的設計法」を報告した。本方法を用いれば、アプタマーの配列情報だけで、そのターゲット分子にตอบสนองするリボスイッチを容易に構築することが可能である。本方法は、真核生物の翻訳系用に開発したが、原核生物の翻訳系にも利用可能で、非常に汎用性の高い方法である。しかし、アプタマー部位と発現制御部位が重ならない設計となっているため、分子結合時の配列組換え部分が多く、スイッチング効率が損失されるという問題点がある。

アプタマー部位と発現制御部位を重ねることなく、スイッチング効率の損失を防ぐためには、“RNAの切断”を利用する方法が有効である。これは、一般的に翻訳よりも切断のスイッチングの方が配列の組換えが少なく済むからである。例えば、分子にตอบสนองして

自分自身を切断するRNA『アプタザイム』は、アプタマー部位と切断部位がわずか5塩基(対)のモジュレーターでつながっているだけであるが、極めて高いスイッチング効率を示す。実際に、本研究代表者らは、このアプタザイムを原核 mRNA の5'UTR に組み込み、世界で初めて、原核系「アプタザイム基盤人工リボスイッチ」を構築した。また、本研究代表者らは、アプタザイム導入 amber suppressor tRNA および amber 変異導入レポーター遺伝子で構成される原核系人工 tRNA リボスイッチや、アプタザイムを真核 mRNA の5'UTR に組み込んだ真核系人工リボスイッチを開発してきた。しかしながら、アプタザイムはマグネシウムイオン感受性が高く、少しのマグネシウムイオン濃度変化で切断速度が大きく変わってしまうデメリットがあった。

2. 研究の目的

本研究代表者は、アプタマー基盤およびアプタザイム基盤リボスイッチ双方のデメリットを解消するために、前述した「アプタザイム導入 tRNA リボスイッチ」からヒントを得て、「内在性の tRNA プロセシング機構を利用することで、アプタザイムを用いることなく分子応答性 RNA 切断を引き起こす」というアイデアを考案し、それを実装した『シュードリボスイッチ』の開発を計画した。本シュードリボスイッチは、分子にตอบสนองして RNA 構造が変化し、その結果、プロセシング(自己切断)が促進あるいは阻害されて、遺伝子発現が制御される仕組みである(内在性タンパク質を利用することから“シュード”と名付けた)。

すなわち、本研究の目的は、新しい概念(tRNA プロセシング機構の利用)を導入することによって既存の『分子応答性遺伝子発現制御システム』のデメリットを克服した、新規システム『シュードリボスイッチ』を開発することである。

3. 研究の方法

(1) tRNA の末端プロセシング調査

本研究代表者らは、本研究開始以前に、真核生物であるコムギの胚芽抽出液(WGE)中で非常に効率よく働く amber suppressor tRNA(天然アミノ酸転移用)を人工進化によって獲得しおり、本研究では、この tRNA を基盤に、WGE 中における tRNA の末端プロセシング効率を調査した。具体的には、この tRNA を骨格として、数種類の末端未成熟 tRNA を調製し、それらの amber suppression 効率やプロセシング速度を解析した。

(2) 『シュードリボスイッチ』の開発

WGE 中における tRNA の末端プロセシングおよび分解を利用した『シュードリボスイッチ』

チ』を設計し、WGE 中での機能を評価した。具体的には、in vitro selection 法によって獲得された aptamer 配列を、amber suppressor tRNA (天然アミノ酸転移用) の 3' trailer 部分に挿入し、当該配列がターゲット分子と結合した時にのみ 3' プロセッシングが誘導されるように最適化した。なお、3' プロセッシングが起こらなければ、未成熟 tRNA は分解を受ける仕組みになっている。この aptamer 含有 tRNA プローブと amber 変異導入レポーター遺伝子を組み合わせることで、『シュードリボスイッチ』の開発を試みた。

(3) 『シュードリボスイッチ』を利用した核酸検出バイオセンサーの開発

シュードリボスイッチの分子応答性を核酸に拡張した核酸応答型シュードリボスイッチを設計し、WGE 中での機能を評価した。具体的には、分子応答性シュードリボスイッチの開発研究で得られた知見に基づき、amber suppressor tRNA (天然アミノ酸転移用) の 3' trailer 部分に標的核酸の相補鎖を導入し、RNase H および amber 変異レポーター遺伝子と組み合わせることで、高感度の核酸検出バイオセンサーの作製を試みた。

(4) 非天然アミノ酸導入用 tRNA の開発

シュードリボスイッチの tRNA プローブ骨格機能を拡張させるために、非天然アミノ酸導入用の amber suppressor tRNA を設計し、WGE 中での機能を評価した。具体的には、非天然アミノ酸として p-acetyl-Phe (AcPhe) を選択し、amber コドンに対応するように変異させた大腸菌由来の tRNA 群を用いて、当該非天然アミノ酸の導入効率を網羅的に調査した。

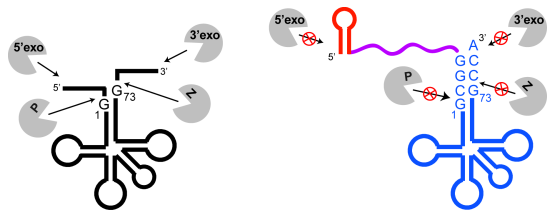
(5) 高い翻訳促進効果を発揮する非翻訳領域の探索

遺伝子発現スイッチにおいて、発現 ON 時の翻訳効率は十分に高い必要があるため、WGE 中での翻訳を促進する mRNA 非翻訳領域の探索を行った。具体的には、一部の天然 RNA ウイルスの 3' UTR に存在する cap 非依存性翻訳促進配列 (3' cap-independent translational enhancer: 3' CITE) を十数種類に渡って調査した。

4. 研究成果

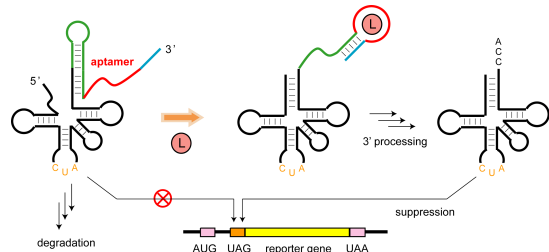
(1) tRNA の末端プロセッシング調査

WGE 中においては、CCA 付加反応を含めた 3' プロセッシングが迅速に進行するのに対して、5' プロセッシングは非常に低活性であることが判明した。また、成熟 tRNA が高い安定性を示すにも関わらず、未成熟 tRNA は比較的速い速度で分解を受けることが示された。さらに、これらの解析結果に基づいて、RNA の保護配列を合理的に設計し、WGE 中での分解を防ぐことに成功した。(雑誌論文)



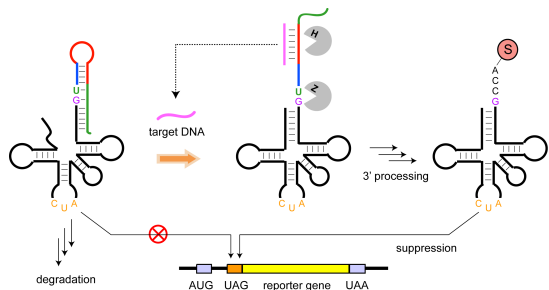
(2) 『シュードリボスイッチ』の開発

医薬品として用いられるテオフィリン分子に結合する aptamer を amber suppressor tRNA の 3' trailer 部分に挿入し、周辺配列を最適化することで、テオフィリン分子応答『シュードリボスイッチ』の構築に成功した。また、本シュードリボスイッチは、aptamer 領域が機構的に独立しているため、当該領域を別の分子を認識する aptamer と交換するだけで、分子応答性を変換できた。中でも、テトラサイクリン分子に応答するシュードリボスイッチは、100 μM の分子濃度に対して S/N 比が約 80 と、人工の遺伝子発現スイッチシステムとしては極めて高いスイッチング効率を示した。また、応答下限濃度は、100 nM (約 50 ppb) であった。(雑誌論文)



(3) 『シュードリボスイッチ』を利用した核酸検出バイオセンサーの開発

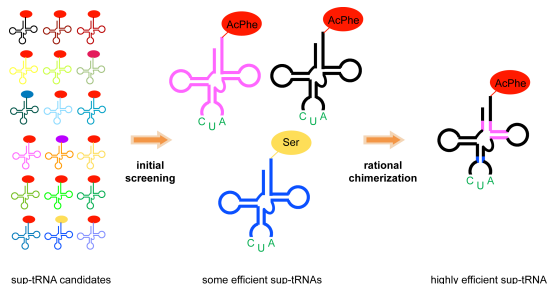
HIV-1 の感染に関わることが知られているヒト CC chemokine receptor 5 (CCR5) 遺伝子配列の一部を標的 DNA として tRNA プローブを設計し、検出能力を評価したところ、検出下限は 1.7 fmol (250 pM) であり、核酸増幅を必要としない類似の核酸検出バイオセンサーよりも高感度であった。また、標的の 1 塩基多型 (SNPs) の識別にも成功した。さらに、CCR5 遺伝子の別領域を標的とした場合も同様に検出可能であり、本バイオセンサーの汎用性の高さも確認できた。(雑誌論文)



(4) 非天然アミノ酸導入用 tRNA の開発

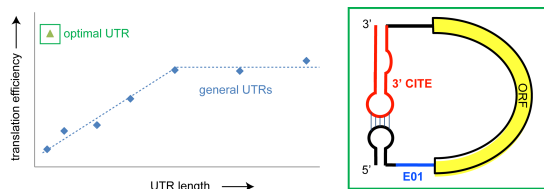
大腸菌由来 tRNA の網羅的調査の結果、2 種類の tRNA が、WGE 中で比較的効率よく AcPhe

をタンパク質中に導入できることが示された。また、これら 2 種の tRNA に対して、本研究代表者らの過去の研究結果に基づき合理的に改変を加えたところ、当該非天然アミノ酸の導入効率が、天然アミノ酸用の amber suppressor tRNA による suppression 効率を超える程度にまで飛躍的に上昇した。(雑誌論文)



(5) 高い翻訳促進効果を発揮する非翻訳領域の探索

十数種類の代表的な 3' CITE について調査したところ、UTR 長が短い(約 150 mer)にも関わらず、2 種類の 3' CITE が、特に高い翻訳促進機能を示した。また、このうち 1 種を別の翻訳促進配列 (E01) と組み合わせたところ、促進効率が大幅(約 2 倍)に向上した(雑誌論文)



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 5 件)

Atsushi Ogawa,* Junichiro Tabuchi, Yasunori Doi, Masashi Takamatsu, "Biofunction-assisted DNA detection through RNase H-enhanced 3' processing of a premature tRNA probe in a wheat germ extract", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016, 26, 3658-3661. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.05.091

Atsushi Ogawa,* Yuki Namba, Mai Gakumasaw, "Rational optimization of amber suppressor tRNAs toward efficient incorporation of a non-natural amino acid into protein in a eukaryotic wheat germ extract", *Org. Biomol. Chem.* 2016, 14, 2671-2678. (査読有) DOI: C50B02533H

Atsushi Ogawa* and Junichiro Tabuchi, "Biofunction-assisted aptasensors based on ligand-dependent 3' processing of a suppressor tRNA in a wheat germ extract", *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 6681-6685.

(査読有) DOI: C50B00794A

Atsushi Ogawa* and Yasunori Doi, "Investigation of end processing and degradation of premature tRNAs and their application to stabilization of in vitro transcripts in wheat germ extract", *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 1008-1012. (査読有) DOI: C40B02221A

Atsushi Ogawa,* Junichiro Tabuchi, Yasunori Doi, "Identification of short untranslated regions that sufficiently enhance translation in high-quality wheat germ extract", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 3724-3727. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.07.004

[学会発表](計 23 件)

小川 敦司, "省エネ型真核リボスイッチの設計", 新世代の生物有機化学研究会 2016, 2016 年 6 月 11 日, 愛媛大学(愛媛県・松山市)

田淵 潤一郎, 小川 敦司, "コムギ胚芽抽出液中における tRNA 末端 processing を利用した aptamer 基盤センサー (aptasensor) の開発", *BMB* 2015, 2015 年 12 月 1 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Junichiro Tabuchi, Atsushi Ogawa, "Biofunction-assisted aptasensors based on ligand-dependent 3' processing of a suppressor tRNA in a wheat germ extract", *PIM* 2015, 2015/9/25, Ehime University (Ehime, Matsuyama)

小川 敦司, "RNA プロセッシングを利用したシュードリボスイッチの開発", 新世代の生物有機化学研究会 2015, 2015 年 6 月 27 日, 東京大学(東京都・文京区)

田淵 潤一郎, 土居 靖典, 小川 敦司, "コムギ胚芽抽出液中で高い翻訳促進効果を発揮する短い非翻訳領域", 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 2014 年 9 月 11 日, 岡山大学(岡山県・岡山市)

Junichiro Tabuchi, Yasunori Doi, Atsushi Ogawa, "Identification of short untranslated regions that sufficiently enhance translation in wheat germ extract", *PIM* 2014, 2014/9/17, Ehime University (Ehime, Matsuyama)

小川 敦司, "分子応答性 RNA プロセッシングシステムの開発", 新世代の生物有機化学研究会 2014, 2014 年 6 月 21 日, 東京大学(東京都・目黒区)

小川 敦司, "小麦胚芽無細胞翻訳システムを利用した真核系人工リボスイッチの開発", 第 1 回合成生物学研究部会セミナー, 2014 年 3 月 3 日, 愛媛大学(愛媛県・松山市)

Yasunori Doi, Atsushi Ogawa, "t-Riboregulator: Regulation of Nonsense Suppression by Modulating 3' Processing of Suppressor tRNA", CBI Annual Meeting 2013,

2013/10/29, Tower Hall Funabori (Tokyo, Edogawa)

Yasunori Doi, Atsushi Ogawa,
“ Assessment and Applications of tRNA processing in Wheat Germ Extract by Using a Nonsense Suppression System ”, PIM 2013, 2013/9/18, Ehime University (Ehime, Matsuyama)

〔図書〕(計 1件)

Atsushi Ogawa, "Engineering of Ribosomal Shunt-Modulating Eukaryotic ON Riboswitches by Using a Cell-Free Translation System" (Chapter 6 in "Riboswitches as Targets and Tools"), Methods Enzymol. 2015, 550, 109-128.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小川 敦司 (OGAWA ATSUSHI)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
准教授

研究者番号 : 30442940