

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350964

研究課題名(和文) 複数遺伝子の同時・並列転写制御によるヒト細胞内での遺伝子発現ネットワークの構築

研究課題名(英文) Regulation of multiple genes expression for constructing artificial gene expression network in human cells

研究代表者

遠藤 玉樹 (ENDO, Tamaki)

甲南大学・先端生命工学研究所・准教授

研究者番号：90550236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、RNAの構造変化の前後における熱安定性変化を考慮することで、標的の化合物に応答してTatタンパク質由来のペプチド(Tatペプチド)との結合親和性を向上させるRNAを合理的に設計することに成功した。この成果は、転写活性化因子であるTatタンパク質の相互作用を利用した細胞内での転写反応制御システムに活用できると期待される。

さらに本研究課題では、転写反応の制御と併用するために、RNAの構造変化を利用した翻訳反応の制御システムの構築を検討した。mRNA上での二次構造と四重鎖構造との競合的な平衡が遺伝子の発現に影響することを見出し、翻訳反応の制御システムへの研究展開の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：RNA switches, which change their conformation in response to binding of their target ligand and subsequently interact with Tat-peptide, were rationally designed by considering stabilities of RNA conformations before and after the ligand binding. Tat-peptide is derived from trans activator of transcription (Tat) protein, which activates transcription upon binding to its target RNA. Thus, the RNA switches would be functional units for constructing transcription regulation system in response to a specific target molecule. In addition, possibility of the RNA switch for translation regulation was investigated. Translation efficiency of a reporter mRNA depended on whether its 5' untranslated region is forming G-quadruplex or maturely exclusive hairpin. Translation regulation would be possible by controlling the equilibrium between the G-quadruplex and hairpin structures that would applicable for multistep gene regulation together with the transcription regulation system as mentioned above.

研究分野：生体分子機能工学

キーワード：遺伝子発現制御 転写反応 RNA アプタマー 構造変化 リボスイッチ 翻訳反応 四重鎖構造

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現を人為的に制御することで、その遺伝子がコードするタンパク質の機能を解析したり、細胞の機能を制御したりすることができる。特に、ヒト細胞を中心とした哺乳動物細胞での遺伝子発現制御システムは、基礎研究から医療応用に至るまで幅広い研究分野での利用が可能である。その制御システムに求められる特性として、発現量を定量的に制御できる。多種類の遺伝子を同時に制御できる。OFF ON OFF のスイッチングを行える（可逆的制御が可能）。OFF 状態と ON 状態での遺伝子発現量の差が大きい。などが挙げられる。特に、増殖・分化・成熟などを含めた細胞機能制御への応用を目指した場合には、複数遺伝子の発現タイミングや発現量バランスを定量的にコントロールすることが重要である。

哺乳動物細胞内での汎用的な遺伝子発現制御システムとしては、Tet-ON/OFF システムや Three-hybrid システムが開発されている。これらのシステムは、1つの遺伝子を制御するために少なくとも制御因子（タンパク質）と被制御因子（プロモーターとなる DNA 配列）の組み合わせが必要となる。そのため、システム構築に参与する因子が多く、複数遺伝子の発現制御には適していない。また、細胞内で直交的に機能する制御因子と被制御因子の組み合わせの数も限られる。一方で、RNA による分子認識を利用した遺伝子発現制御システムが開発され始めている。具体的には、リボスイッチやアロステリックリボザイムといった機能性 RNA を利用したシステムであり、RNA と標的化合物との相互作用に伴う RNA 構造変化が遺伝子発現制御の起点となる。そのため、1つの機能性 RNA を1つの遺伝子に対応させることで、多種類の遺伝子発現制御に適用しやすいと考えられる。

研究代表者はこれまで、遺伝子発現の第一ステップである転写反応に着目し、特定の低分子化合物を用いて簡便に転写反応を制御するシステムの構築に取り組んできた。このシステムでは、転写反応を調節するために RNA 結合性の転写トランス活性化因子である Tat タンパク質を必要としているが、テオフィリンに反応する制御因子としての機能は Tat タンパク質が結合する RNA 側に存在する。そのため、様々な標的分子に反応して Tat タンパク質と結合する RNA を設計・構築することにより、同じ Tat タンパク質で複数遺伝子の転写反応を同時かつ並列に制御できると考えられる（図1）。さらに研究代表者は、mRNA 上に形成される安定な核酸構造が、翻訳反応を阻害することでタンパク質の発現量を低減させることを見出している。このことは、特定の分子に反応した核酸の構造変化、もしくは高次構造の安定化を利用して翻訳反応の制御システムを構築できる可能性を示している。つまり、上述の転写反応の制御と組み合わせることで、より緻密かつ多

段階での遺伝子発現の制御技術を構築できる可能性がある。

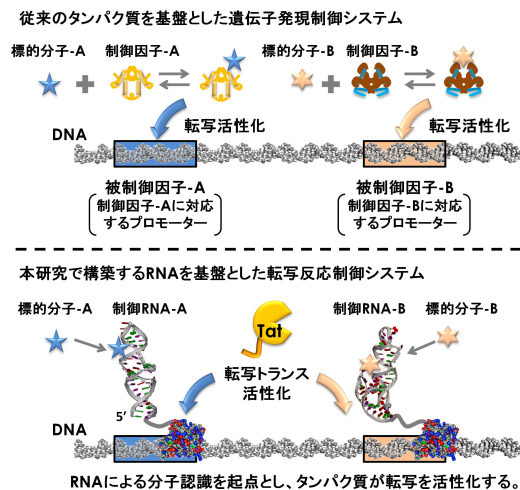


図1. RNA の構造変化と Tat タンパク質の相互作用を基盤とした転写反応の制御システム

2. 研究の目的

本研究では、ヒト細胞内において複数遺伝子の転写活性化を、同時かつ並列に制御できる人工システムを構築する。RNA の構造変化を起点とした転写制御、翻訳制御システムを構築し、複数遺伝子の発現ネットワークを細胞内で人工的に再構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 転写制御を可能にする RNA の合理設計

転写反応の制御システムを構築するために、特定の標的化合物（低分子化合物）に応答して Tat タンパク質由来のペプチド（Tat ペプチド）とのアロステリックな相互作用を示す RNA を構築する。そのために、既存の低分子化合物（薬剤、抗生物質、代謝産物等の低分子化合物）に結合する RNA アプタマーと、Tat ペプチドが結合する TAR-RNA を併せ持つ RNA を設計する。設計した RNA は、標的化合物と結合することで構造が変化する RNA スイッチとして機能し、Tat ペプチドとのアロステリックな相互作用を示すと考えられる。このような RNA スイッチの合理的な設計には、研究代表者のこれまでの研究成果で得られている配列設計指針を活用し、様々な標的化合物に応答する RNA スイッチの獲得を目指す。さらに、獲得した RNA スイッチを用いて、転写反応の制御による細胞内での遺伝子発現制御が可能であるか否かを検討する。

(2) アプタマーの配列改変による機能制御

本研究で構築する遺伝子発現の制御システムでは、RNA アプタマーに対する標的化合物の結合に伴う RNA の構造変化が、転写

反応の活性化を起こす Tat タンパク質のアロステリックな相互作用を引き起こす。そのため、RNA アプタマーの標的化合物に対する親和性を向上させることで、より低濃度の標的化合物で遺伝子の発現を制御できるようになると考えられる。そこで、特定の標的化合物に結合する既存のアプタマーの配列を改変し、その結合親和性を人為的に調節することを試みる。標的化合物との結合状態における構造が得られている RNA アプタマーを対象に、その二次構造、および高次構造から分子間相互作用に影響を及ぼすと考えられる領域に配列の変異を加える。変異を加えた RNA アプタマーと標的化合物との結合を物理化学的に評価し、RNA アプタマーと標的化合物との結合親和性を合理的に調節可能にするための RNA の配列設計指針を得る。

(3) 翻訳反応制御を可能にする RNA 構造の検討

転写活性化因子である Tat タンパク質による転写反応制御に合わせて、mRNA 上に形成される安定な RNA 高次構造を利用した翻訳反応の制御システムを構築することを試みる。本研究では、三重鎖構造、四重鎖構造といった特徴的な高次構造を mRNA 上に形成させ、翻訳反応を抑制することが可能であるか否かを細胞内外で評価する。

4. 研究成果

(1) 種々の標的分子にตอบสนองする RNA スイッチの合理設計と細胞内での転写反応制御

研究代表者のこれまでの研究成果、および過去の知見から、TAR-RNA のループ領域 (図 2a) の構造的な自由度が抑制されることで、TAR-RNA と Tat ペプチドとの結合親和性が減少することが予想された。そこで、TAR-RNA のループ領域に、1.テオフィリン、2.テトラサイクリン、3.ネオマイシン、4.アデニン、5.グアニン、6. S-アデノシルメチオニン (SAM)、7.チアミンピロリン酸 (TPP) と特異的に結合する RNA アプタマーを挿入した RNA を設計した (図 2b)、これら 7 種類の RNA と Tat ペプチドとの相互作用を、それぞれの低分子化合物の存在下、非存在下と比較した。その結果、どの RNA においても、標的となる低分子化合物の存在下において Tat-ペプチドとの結合親和性が減少することが示された (雑誌論文)。つまり、TAR-RNA のループ領域に別のアプタマーを挿入するという設計が、標的化合物にตอบสนองして Tat タンパク質の相互作用と転写反応を抑制する汎用的な遺伝子発現の OFF スイッチに活用できると考えられる。

本研究では、遺伝子発現の ON スイッチを構築する事を目的に、標的化合物に応じて Tat ペプチドとの結合親和性を増大させる RNA の合理的な設計も試みた。研究代表者はこれまでに、部分的にランダムな配列を有する RNA スイッチのライブラリから、ネオ

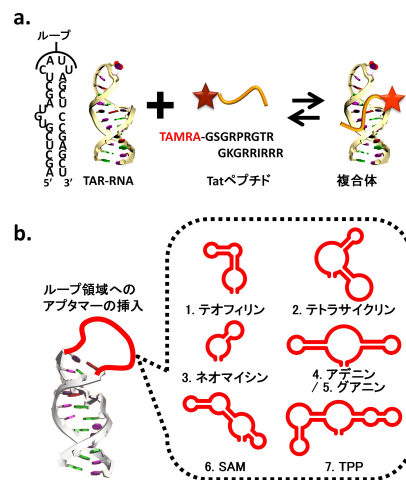


図 2. 標的化合物にตอบสนองして Tat ペプチドとの結合親和性を減少させる RNA の基本設計

マイシンにตอบสนองして Tat ペプチドとの結合親和性を増大させる RNA を獲得することに成功している。本研究では、これらの RNA 二次構造を予想し、ネオマイシンの結合前後で想定される RNA 構造の安定化エネルギーの差 ($\Delta\Delta G^\circ$) の値を精査した。その結果、獲得された RNA スイッチが示す $\Delta\Delta G^\circ$ の値は、5.6–12.2 kcal mol⁻¹ であった。このことは、ネオマイシン以外の化合物を標的とした場合にも、予測される構造変化の前後における $\Delta\Delta G^\circ$ の値を 5.6–12.2 kcal mol⁻¹ となるように設計することで、標的化合物にตอบสนองして Tat ペプチドのアロステリックな相互作用を効率良く引き起こすことができる可能性を示している。そこで、アデニン、SAM、TPP を標的とした RNA スイッチを、 $\Delta\Delta G^\circ$ の値を参照して合理的に設計した。その結果、どの RNA においても標的化合物にตอบสนองして Tat ペプチドとの親和性が上昇した。また、 $\Delta\Delta G^\circ$ の値を任意に調節することにより、標的化合物の濃度に対する Tat ペプチドの相互作用を調節できることも示された (雑誌論文)。本研究成果は、RNA スイッチに含まれるアプタマーユニットと標的化合物との相互作用エネルギーが、RNA の構造変化を引き起

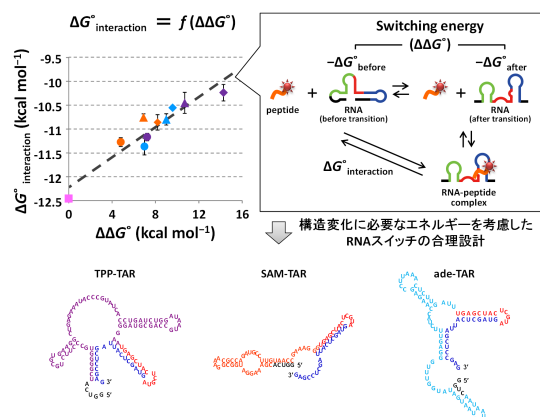
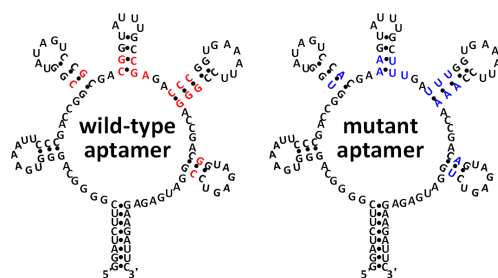


図 3. RNA の構造変化にともなうエネルギー変化 ($\Delta\Delta G^\circ$) を考慮した RNA スイッチの合理設計

こすエネルギーとして利用されていることを示している(図3)。つまり、それぞれのエネルギー値のバランスを考慮することで、Tat タンパク質の相互作用を介して転写反応を活性化する遺伝子発現のONスイッチを合理的に設計できる可能性がある。実際、テオフィリンを標的化合物としたRNAスイッチを用いて遺伝子発現の活性化を試みたところ、テオフィリンに応答してタンパク質発現量を上昇させることにも成功した(論文未発表)。

(2) 配列改変に伴うアプタマー機能への影響の解析

RNAスイッチの合理的な設計に適用することを念頭に、天然の代謝産物であるフラビンモノヌクレオチド(FMN)に結合するRNAアプタマーを対象に、アプタマーとFMNとの結合親和性に影響を与え得るRNAの構造要因を検証した。本研究では、FMNアプタマーがFMNと結合するために必要なRNA高次構造の形成要因を、一本鎖領域間での相互作用と、二重鎖領域中のWatson-Crick塩基対に区別した。そして、それぞれの領域の塩基配列および塩基対の安定性が、FMNアプタマーとFMNとの結合親和性に与える影響を速度論的および熱力学的に評価した。その結果、FMNアプタマーの二次構造が示す二重鎖領域の熱安定性が高くなると、FMNとの解離速度定数が低くなることで相対的にFMNとの結合親和性が高くなることを見出された(図4)(雑誌論文)。また、一本鎖領域間の相互作用では、特定の非標準的な相互作用がFMNアプタマーの高次構造を安定化することでFMNとの結合親和性を高める事が示唆された(雑誌論文)。特に、二重鎖領域の安定性とFMNとの結合親和性との間に系統的な相関がみられた。このことから、FMNアプタマーのように複雑な高次構造を形成して標的化合物と結合するアプタマーの場合には、その二次構造を形成するス



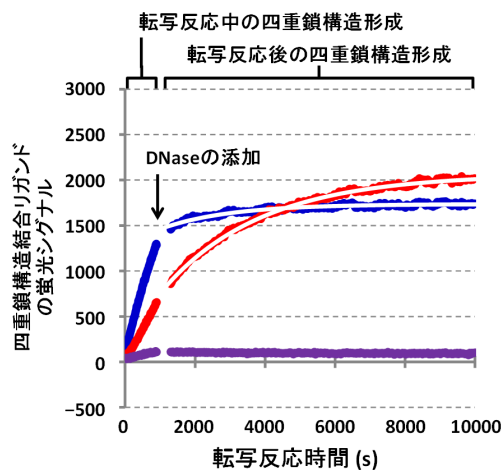
	wild-type aptamer	mutant aptamer
結合速度定数 ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	1.50 ± 0.14	1.52 ± 0.05
解離速度定数 ($10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	37.9 ± 1.35	3.30 ± 0.27
解離定数 (10^{-8} M)	25.2	2.17

図4. FMNアプタマーの二次構造中のステム領域によるリガンド結合速度定数への影響

テム領域の安定性を調節することで、アプタマーと標的化合物との結合親和性を合理的に制御できる可能性が考えられる。

(3) RNA高次構造による翻訳反応の抑制効果の検討

本研究では、細胞内における緻密かつ多段階での遺伝子発現の制御システムを構築するために、転写反応の制御システムと併用して翻訳反応の制御システムを構築することも検討した。研究代表者らはこれまでに、mRNA上に形成された四重鎖構造が翻訳反応を抑制することを示している。つまり、mRNA上での四重鎖構造の形成を人為的に調節することにより、細胞内での翻訳反応制御に活用できる可能性がある。本研究では、転写の進行に伴うRNAの構造形成(co-transcriptional folding)を利用することで、新生RNA上での四重鎖構造の形成速度を調節可能であるかどうかを検討した。四重鎖構造を形成し得るRNA配列の前後に、安定な二次構造を形成する配列を挿入し、転写反応に伴う四重鎖構造の形成をリアルタイムでモニタリングした。その結果、四重鎖構造を形成するRNA配列の5'側に二次構造の形成配列が存在していた場合、転写反応中の四重鎖構造の形成が抑制されることが示された(図5)(雑誌論文)。この結果は、四重鎖構造を形成するRNA配列の5'側にアプタマーの配列を導入し、標的化合物との相互作用によるアプタマー構造の安定化を利



HpQd-1: 5'-AGGGAGGGGCGGGAGUGGGCUA**CCCCG**-3'

四重鎖構造形成配列の3'側に二次構造形成配列を挿入

HpQd-2: 5'-**CGCCCA**AAGGGAGGGGCGGGAGUGGGC-3'

四重鎖構造形成配列の5'側に二次構造形成配列を挿入

mutQd: 5'-AGAGAGAGCGGGAGUGAGCUAC**CCCG**-3'

四重鎖構造形成配列に変異を導入(コントロール配列)

転写反応後の四重鎖構造への遷移速度定数

	HpQd-1	HpQd-2
k_{tr} (10^{-4} s^{-1})	5.21 \pm 0.70	3.51 \pm 0.06

図5. 転写反応中の安定な二次構造形成による四重鎖構造の形成阻害

用して四重鎖構造の形成速度を調節することで、翻訳反応の効率を制御できる可能性を示している。実際、アプタマーを挿入した RNA 配列での検証は行っていないものの、四重鎖構造と競合する RNA 二次構造を安定化する転写 RNA (tRNA) が、転写反応中の四重鎖構造の形成を抑制し、その結果として遺伝子の発現量を増大させることを細胞外の実験系で確認した(雑誌論文)。

本研究では、四重鎖構造とは別に、mRNA 上に形成される三重鎖構造による翻訳反応の制御システムの構築も行った。RNA の二次構造領域に対して配列特異的に結合するペプチド核酸(PNA)を国際共同研究にて設計・合成し、mRNA の 5'非翻訳領域に三重鎖構造を形成させた。その結果、安定な三重鎖構造が形成されることで遺伝子の発現が抑制されることを細胞内外で確認した(図 6)(雑誌論文)。この研究成果は、低分子化合物に加え、配列特異性を持たせた人工核酸を用いて、細胞内の翻訳反応制御が可能であることを示している。つまり、低分子化合物を用いた転写反応の制御システムと組み合わせることにより、OFF ON OFF のスイッチングを行える遺伝子発現の制御システムへの応用が期待される。

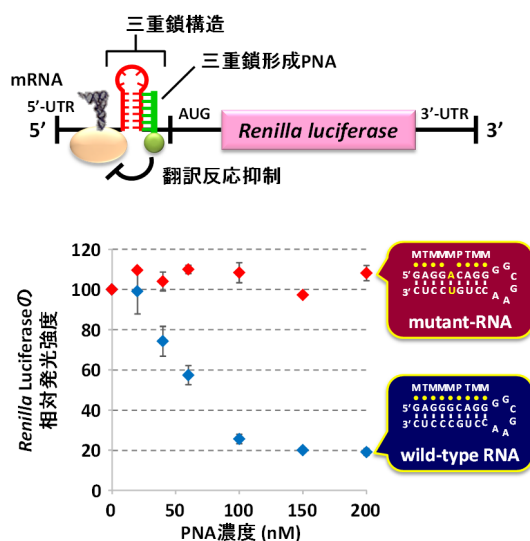


図 6. PNA による mRNA 上での三重鎖構造の形成を介した翻訳反応の抑制

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10件)

A. B. Rode, T. Endoh, and N. Sugimoto
tRNA shifts the G-quadruplex-hairpin conformational equilibrium in RNA towards the hairpin conformer
Angew. Chem. Int. Ed., **55**, 14315-14319 (2016) (査読有)
DOI: 10.1002/anie.201605431

T. Endoh, A. B. Rode, S. Takahashi, Y. Kataoka, M. Kuwahara, and N. Sugimoto
Real-time monitoring of G-quadruplex formation during transcription
Anal. Chem., **88**, 1984-1989 (2016) (査読有)
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04396

T. Endoh, D. Hnedzko, E. Rozners, and N. Sugimoto
Nucleobase-modified PNA suppresses translation by forming a triple helix with a hairpin structure in mRNA in vitro and in cells
Angew. Chem. Int. Ed., **55**, 899-903 (2016) (査読有)
DOI: 10.1002/anie.201505938

T. Endoh and N. Sugimoto
Rational design and tuning of functional RNA switch to control an allosteric intermolecular interaction
Anal. Chem., **87**, 7628-7635 (2015) (査読有)
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00765

A. B. Rode, T. Endoh, and N. Sugimoto
Tuning riboswitch-mediated gene regulation by rational control of aptamer ligand binding properties
Angew. Chem. Int. Ed., **54**, 905-909 (2015) (査読有)
DOI: 10.1002/anie.201407385

A. B. Rode, T. Endoh, and N. Sugimoto
Key tertiary interactions in FMN riboswitch aptamers required for ligand binding
Bull. Chem. Soc. Jpn., **88**, 946-948 (2015) (査読有)
DOI: 10.1246/bcsj.20150063

T. Endoh and N. Sugimoto
Aptamer-based universal fluorometric sensors based on allosteric modulation of RNA-peptide Interactions
ChemMedChem, **9**, 2045-2048 (2014) (査読有)
DOI: 10.1002/cmdc.201402151

[学会発表](計17件)

T. Endoh
RNA conformational dynamics that encodes new dimensional codes in central dogma
日本化学会第97回春季年会(2017) 慶応義塾大学日吉キャンパス(神奈川) 2017年3月16日~3月19日

T. Endoh, N. Sugimoto
Hairpin-G-quadruplex conformational transition affects gene expression in cells
第43回国際核酸化学シンポジウム

(ISNAC2016) 熊本大学 工学部百周年記念館 (熊本) 2016 年 9 月 27 日 ~ 29 日

T. Endoh, A. Rode, S. Takahashi, Y. Kataoka, M. Kuwahara, N. Sugimoto
Co-transcriptional G-quadruplex formation affected by mutually exclusive hairpin ANNA 2016 (Advances in Noncanonical Nucleic Acids)、National Institute of Chemistry, Ljubljana (Slovenia)、2016 年 5 月 18 日 ~ 20 日

T. Endoh, A. Rode, S. Takahashi, Y. Kataoka, M. Kuwahara, N. Sugimoto
Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (18): Quantitative analyses of molecular environment effects on G-quadruplex formation during transcription
日本化学会第 96 春季年会 (2016) 同志社大学京田辺キャンパス (京都) 2016 年 3 月 24 日 ~ 27 日

T. Endoh and N. Sugimoto
Mechanical insight into translation procedure of G-quadruplex forming mRNA
第 42 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2015)、イーグレひめじ あいめっせホール (姫路) 2015 年 9 月 23 ~ 25 日

T. Endoh, E. Rozners, D. Hnedzko, N. Sugimoto
Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (10): Translation Suppression Mediated by Triplex Formed by 2-Aminopyridine-modified PNA and Hairpin RNA
日本化学会第 95 春季年会 (2015) 日本大学船橋キャンパス (千葉) 2015 年 3 月 26 日 ~ 29 日

遠藤 玉樹、杉本 直己
RNA - ペプチド間のアロステリック相互作用を利用した小分子検出のためのユニバーサルバイオセンサーの構築
第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学津島キャンパス (岡山) 2014 年 9 月 11 日 ~ 13 日

〔その他〕
ホームページ等
甲南大学先端生命工学研究所
<http://www.konan-fiber.jp/index.php>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 玉樹 (ENDOH, Tamaki)

甲南大学・先端生命工学研究所・准教授

研究者番号 : 90550236