

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04178

研究課題名(和文) 環状RNAを用いたタンパク質合成法

研究課題名(英文) Protein synthesis using circular RNA

研究代表者

阿部 洋 (Abe, Hiroshi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：80415067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：連続した読み枠を含む環状RNAを鋳型にした翻訳反応系においては、リボソームが何度も回転しながら翻訳反応を行う結果、反復配列をもつタンパク質・ペプチド産物が生成する。タンパク質合成法における新たな方法論として、この環状RNAを用いたタンパク質合成法の開発を行った。環状RNAを鋳型にした大腸菌無細胞翻訳系の最適化を行った。哺乳動物翻訳系における効率的な機能性タンパク質発現法の開発を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、タンパク質を材料にした医薬品や生体材料の開発が進められている。連続的な読み枠を含む環状RNAを鋳型にしたタンパク質合成反応を用いると、反復配列からなる長鎖タンパク質・ペプチドを簡便に調製できる。機能性タンパク質には反復配列を含むものが多く存在するため、これらの調製法として、本研究成果を用いることが出来る。

研究成果の概要(英文)：Protein having a repetitive sequence is generated in a translation reaction on circular RNA template which contains a continuous open reading frame, because the ribosome performs translation rotating many times on the RNA. Optimization of the reaction condition in a E. coli cell-free translation system was performed. Development of efficient functional protein expression method in mammalian translation systems were carried out.

研究分野：核酸化学

キーワード：翻訳反応 RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は RNA 分子をナノサイズで構造設計することで機能創出する研究に取り組んできた。RNA の環状構造に興味をもち、さらなる機能を模索する過程で、RNA のトポロジーが規定するタンパク質合成の反応場として着目した。すなわち、「リボソームが触媒するタンパク質合成系で、もし終止コドンを除いた環状化 RNA が翻訳鋳型として用いられたらどうなるであろうか?」と考えた。リボソームが一度結合し、タンパク質合成を開始すると終わりが無い。そのため原理的には永久にタンパク質合成が続くことになる。結果として長鎖のタンパク質が合成される。さらに、翻訳システムの分子メカニズムからタンパク質合成の効率を以下のように考察した。通常の直鎖型(終わりのある)RNA 鋳型の翻訳反応は、開始段階(リボソーム複合体の形成) 伸長段階(タンパク合成) 終止段階(リボソームの解離)の3つに大別される。反応全体で開始段階が最も時間のかかる律速段階である。一方、環状 RNA を鋳型とする翻訳反応では、律速となる開始段階は最初の開始段階のみとなり、それ以降のタンパク合成は直鎖状 RNA 鋳型よりも効率よく進行することが予想された。そのため本分子メカニズムは革新的な高効率タンパク質合成法となりえると考えた。実験的に検証した結果、連続的な読み枠を含む環状 RNA を鋳型にした翻訳反応が高効率で進行するという仮説が、原核生物および真核生物翻訳系の両方で成り立つことを見出した(図1, 図2)。

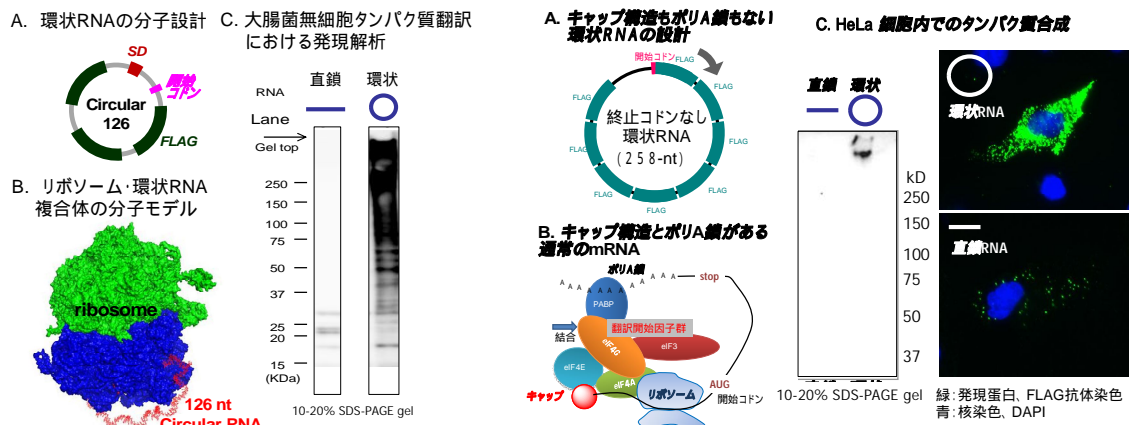


図1. 大腸菌無細胞翻訳系における回転式翻訳反応

図2. 真核生物(ヒト)の翻訳系における回転式翻訳反応

2. 研究の目的

連続した読み枠を含む環状 RNA を鋳型にした翻訳反応系においては、リボソームが何度も回転しながら翻訳を行う結果、反復配列をもつペプチド産物が生成する。近年、タンパク質を材料にした医薬品や生体材料の開発が進められている。タンパク質合成法における新たな方法論として、この環状 RNA を用いたタンパク質合成法を利用しようと考えた。すなわち、環状 RNA を大腸菌等の微生物を利用したタンパク質発現法、および、細胞内における効率的な機能性タンパク質発現法として用いることを目指した。

3. 研究の方法

- (1) 大腸菌再構成型無細胞翻訳系における回転式翻訳反応の高効率化
 - (a) 環状 RNA を鋳型にした翻訳反応を大腸菌再構成型無細胞翻訳系 (PURE system) に行い、ウェスタン解析を行うと、反応産物は種々の長さをもつ長鎖ペプチドの混合物であることが分かった。閉じた反応系では基質の枯渇等の原因で永久に反応が進行するわけではないが、ラダー状のバンドが観察されることから、環状 RNA からのリボソームの乖離が競合して起き、その効率が低下したものと考えた。その要因として翻訳系に含まれる解放因子 (RF1, RF2, RF3) とリボソームリサイクル因子 (RRF) を推定し、これらを除去することでリボソームの乖離反応を抑制し反応産物の長鎖化や高効率化ができると考えた。解放因子やリボソームリサイクル因子を除いた反応液を調製し(理化学研究所 清水 義弘 博士による提供)、これら因子の回転式翻訳反応への影響を調査した。
 - (b) 環状 RNA の翻訳効率改善を目指し、RNA 中のリン酸骨格をチオ化することで分解抵抗性を付与し、翻訳効率の上昇を目指した。T7 RNA ポリメラーゼを用いた試験管内転写反応に 1-チオ NTP を添加し、チオリン酸化 RNA を作成した。直鎖型 RNA を用いての翻訳活性評価を行った。
- (2) 大腸菌培養系におけるペプチド反復配列の合成

タンパク質の生合成法として広く用いられている大腸菌培養系によりリピートタンパク質を合成できれば、コスト面でも優れた方法となりうる。そこで、テトラヒメナのグループ I イントロン配列によるスプライシング反応により菌体内で RNA 転写体が環化反応を引き起こし、

翻訳鋳型となる環状 RNA を発生する系を作成し、目的とするタンデム型リピートペプチド合成系を作成した。目的配列をコードするプラスミド DNA により大腸菌を形質転換し、目的 RNA の転写開始を誘導し、目的リピートペプチドが合成されるかどうかをウェスタン解析により検証した。

(3) 哺乳動物無細胞翻訳系における回転式翻訳反応によるタンパク質合成法

(a) まず、環状 RNA を用いた回転式翻訳現象を利用し、真核系における効率的な単量体タンパク質合成法の確立を試みた。自己切断型ペプチド 2A のコード配列を含む環状 RNA を設計合成し、この環状 RNA をウサギ網状赤血球翻訳液中で翻訳し、ウェスタンプロット法により解析した。(b) 次に、真核系における長鎖タンパク質の効率的合成法の確立を目的として IRES 配列を導入した環状 RNA を設計・合成し、翻訳反応を評価した。転写 RNA から、スプライシング機構を経て環状 RNA が生ずる系を作成した。これにより回転式翻訳機構により緑色蛍光タンパク質 (GFP) がタンデムに連なって生ずると期待した。作成したプラスミド DNA をヒト由来培養細胞である HEK293T へ導入し、蛍光顕微鏡観察により目的とする GFP 由来の蛍光を観察した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌再構成型無細胞翻訳系における回転式翻訳反応の高効率化

(a) 2 つの異なる配列を有する環状 RNA を設計・合成した(図 3)。これら RNA 分子は、シャイン・ダルガノ (SD) 配列と開始コドンを含み、停止コドンを持たず、かつ 3 の倍数の塩基数を有する。終結因子を除去した様々な系にそれぞれの環状 RNA を当量加え、37 °C で反応させた後、反応のウェスタンプロット解析を行った。環状 RNA Spider-FLAG*2 を用いた場合、RRF を除いた系において翻訳効率の上昇を観測した。通常の RRF を含む系と比較して、翻訳反応の生成物量は約 27 倍に増加した。また、環状 RNA Spider-FLAG を用いた場合においては、終結に与える全ての因子 (RF1, RF2, RF3, RRF) を除いた系において最も高い翻訳効率が観測された。通常の、これらを含む系と比較すると、約 7.6 倍に生成物量が増加した。環の大きさや配列の違いにより最適な系は異なるものの、翻訳反応の終結に与える因子を除去することで、環状 RNA の翻訳効率を大きく向上させられることを確かめた。

(b) チオリン酸基を導入した直鎖型 RNA では、非チオ化天然型 RNA と比較し翻訳活性が向上することを確認した(Nucleic Acids Res. 1991, 19, 547-552)。そのメカニズム解析を行った。

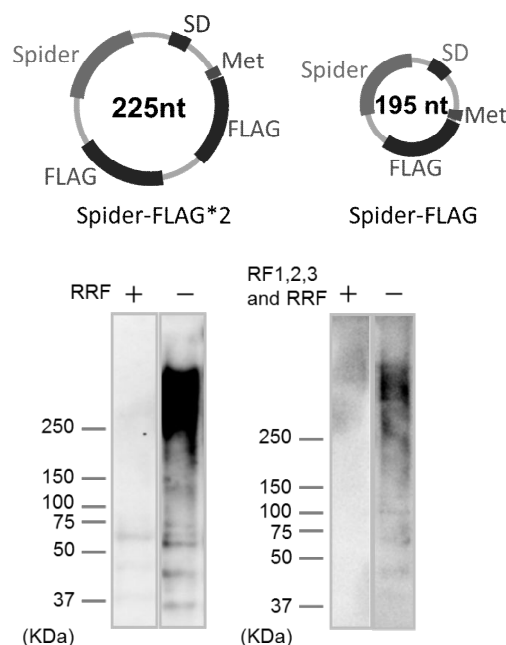


図 3. 大腸菌無細胞翻訳系における回転式翻訳反応に与える構成因子の影響

(2) 大腸菌培養系におけるペプチド反復配列の合成

まず初めに試験管内で構築した環状 RNA 発生システムが機能し転写 RNA の環化反応が進行することを確認した(図 4)。ついで本系をタンパク質発現システムに導入し、そのもので大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し培養した。菌体の溶解液をウェスタン解析することで、目的とする長鎖ペプチド合成を確認できた(図 4)。ここで、目的物の発現量増加を目指し、菌体内における環状 RNA 発生に有利に作用すると推測される培養条件を試みた。すなわち、培養時の培地の液性を pH 8.4 に上げ、またスプライシング反応に作用するマグネシウムイオン濃度を増加させた(10 mM)。しかしながら、これらの条件では目的生成物の増加は見られなかった。

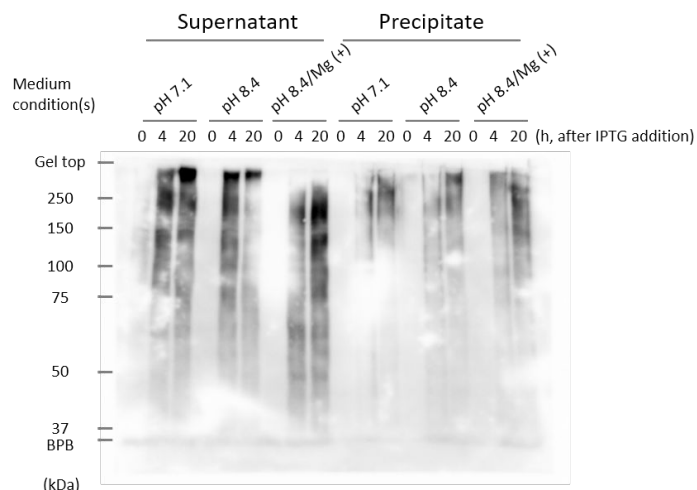


図 4. 大腸菌を用いたペプチド反復配列合成

(3) 哺乳動物無細胞翻訳系における回転式翻訳反応によるタンパク質合成法

(a) 目的とする単量体翻訳物の増加がほとんど観察できなかったものの、長鎖産物がほぼ消失したことから、2A 配列の導入により目的とする単量体生成反応が進行している可能性が示唆された。(b) 目的とする GFP タンデムリピート生成系における蛍光増強現象は確認されなかった。IRES 配列の改変により環状 RNA からの翻訳反応開始の非効率化が起きてしまったことが一因であると推測するが、加えて、GFP タンデムリピートが蛍光性を保持しているかどうかとも試験管内で合成して確認する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

阿部 奈保子、阿部 洋、環状 RNA を用いたローリングサークル型翻訳反応、生物物理 57 (1), 005-010 (2017) [査読有り]
DOI: 10.2142/biophys.57.005

〔学会発表〕(計 8 件)

児玉 亜有実、阿部 奈保子、友池 史明、伊藤 嘉浩、松本 健、吉田 稔、清水 義宏、亀田 倫史、阿部 洋、合成環状 RNA からのタンパク質発現、第 39 回分子生物学会、2016 年
阿部 奈保子、児玉 亜有実、清水 沙彩、友池 史明、木村 康明、伊藤 嘉浩、阿部 洋、環状 RNA を鋳型にしたローリングサークル翻訳反応、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年
阿部 奈保子、児玉 亜有実、清水 沙彩、友池 史明、木村 康明、伊藤 嘉浩、阿部 洋、ヒト細胞における環状 RNA のローリングサークル型翻訳反応、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017 年
清水 沙彩、児玉 亜有実、阿部 奈保子、友池 史明、木村 康明、阿部 洋、真核生物における環状 RNA を用いた終わりのない回転式翻訳現象、第 20 回日本 RNA 学会年会、2018 年
阿部 奈保子、清水 沙彩、児玉 亜有実、友池 史明、木村 康明、阿部 洋、真核生物における環状 RNA を用いた終わりのない回転式翻訳現象、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018 年
Naoko Abe, Hiroshi Abe, Circular RNA for protein translation, FNA Perth 2018, 2018 年
Naoko Abe, Hiroshi Abe, Nano-structured RNA for drug discovery, FNA Perth 2018, 2018 年 (招待講演)
中本 航介、阿部 奈保子、阿部 洋、ケミカルライゲーション法による環状 RNA の構築とその翻訳評価、日本化学会第 99 回、2018 年

〔図書〕(計 1 件)

Naoko Abe, Ayumi Kodama, Hiroshi Abe, Humana Press, "Preparation of Circular RNA In Vitro." Methods in Molecular Biology 1724, chapter 15, pp 181-192, 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://biochemistry.chem.nagoya-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：