

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06157

研究課題名(和文)細胞内mRNA翻訳プログラミングツールの開発

研究課題名(英文)Development of mRNA translational programming tools

研究代表者

八木 祐介(Yagi, Yusuke)

九州大学・農学研究院・学術共同研究者

研究者番号：60612421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR、TALENに代表されるゲノム編集技術の登場により任意の細胞内DNA分子を直接操作する技術が大きく進展した。一方、RNA分子の操作、改変技術はアンチセンス技術以外ない。PPR(pentatricopeptide repeat)は、配列特異性をデザイン可能なRNA結合タンパク質である。本研究では、それらに機能性ドメインを組み込むことで、最終蛋白質翻訳量を特異的かつ精密に制御できるツールの開発を行い、内在遺伝子のタンパク質発現量を変化させることができるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトには約40兆個の細胞がそれぞれ役割を持ち集合することで生命が支えられている。それら細胞の振る舞いを決定付けるようなプログラムは、ゲノム上に書かれているが、個々の役割を決定づける情報としてゲノムからRNA、タンパク質が合成される。本研究は、設計図であるゲノムを変えることなく、RNAを変えることで細胞を自由に操作する方法である。この実現により、新しい創薬としての医療応用、新しい品種改良方法といった農業利用の可能性はある。

研究成果の概要(英文)：The technology to directly manipulate arbitrary intracellular DNA molecules has made great progress with the advent of genome editing technologies such as CRISPR and TALEN. On the other hand, there are no technology that manipulate or modify cellular RNA molecules except the antisense technology.

PPR (pentatricopeptide repeat) is a RNA binding protein that can be designed for the sequence specificity. In this study, I developed a technology that can control the expression level of endogenous protein specifically and precisely by fusing translation related domain to designed PPR protein.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：RNA PPR 翻訳制御 ノックダウン ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

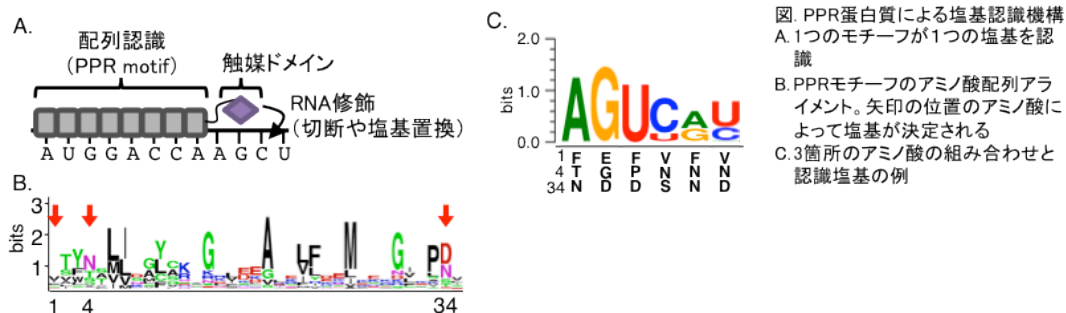
1. 研究開始当初の背景

CRISPR、TALEN に代表されるゲノム編集技術の登場により狙った DNA 分子の自在な操作技術 (切断、転写制御、イメージングなど) が誕生している。これまで、特定の遺伝子を発現制御するためには人工転写因子 (Lac など) を導入し、操作したい遺伝子にその結合配列を挿入しておく必要があったが、上記のように標的 DNA 配列に結合する分子の作製が可能になったことで、内在遺伝子の発現を直接制御することができるようになった。一方、多様な機能性を持つ RNA 分子 (翻訳制御、ncRNA, RNA virus など) の操作技術については、DNA 操作技術レベルに及ばないのが現状である。

シーケンシング技術の発展により、様々な生物種のゲノム配列と発現 RNA の情報が明らかになった。特に網羅的なトランスクリプトーム解析により、多様なスプライシングフォームや、機能未知 non-coding RNA が見つかり、複雑な RNA ネットワークの存在が示唆されている。既存の RNA 操作技術は、RNAi や ASO のような相補鎖核酸技術が一般的に利用されている。これらは設計は簡便であるが目的 RNA への効果が限定されている (例えば RNA 分解)。一方、蛋白質基盤の分子として 8 塩基を認識できる PUF repeat があるが、結合配列の選択自由度がほとんどない。核酸性のものと比べて蛋白質性の分子は、機能付加が比較的容易であるため、結合配列の選択自由度の高い蛋白質モジュールの登場が期待されていた。

申請者らはこれまでの研究で PPR (pentatricopeptide repeat) という配列特異的な RNA 結合蛋白質を解析、改良を行ってきた。PPR 蛋白質は、植物に 500 個以上存在する RNA 結合蛋白質ファミリーである。植物葉緑体やミトコンドリアでは多様な RNA 制御 (RNA 切断、RNA 編集、安定性制御など) が存在し、各 PPR 蛋白質が遺伝子特異的に RNA へ結合することで各イベントを制御している。PPR 蛋白質は、35 個のアミノ酸からなる PPR モチーフがタンデムに 10 数個リピートした構造をとっている (下図 A)。申請者らの研究によって、「PPR モチーフと塩基は 1 対 1 対応であること (下図 A)」、「モチーフ内の 3 箇所のアミノ酸の組み合わせによって塩基を決定していること (下図 B, C)」を明らかにした (Yagi et al., PLoS One 2013)。

この塩基認識ルールの発見により、目的の RNA 配列に合わせて PPR モチーフを連結することで、任意の配列特異性を持つ RNA 結合蛋白質のデザイン及び作成が可能になった。そこで、任意の RNA 配列を数種類設定し、それらに特異的に結合するカスタム PPR 蛋白質 (18-21 塩基認識) を作成した。それらを動物培養細胞内 (HEK293T) に発現させ、RNA 免疫沈降実験を行った結果、実際に標的 RNA と結合することが確かめられた。このように現在、細胞内 RNA を自由に標的できる蛋白質性分子構築の基盤が確立されつつある状況であるため、さらに多様な機能を持ったカスタム PPR を開発し、それらを複合的に利用した研究ができると考え、本研究の着想に至った。



2. 研究の目的

本研究では、標的 mRNA の翻訳を増加もしくは減少といった RNA 操作ができる分子の創出を目的とする。これらを達成するため、開発する分子は、標的 RNA 配列との結合を担う「PPR モジュール」と標的 RNA の制御を行う「エフェクターモジュール」から構成される。標的は、翻訳制御によりガン化抑制が期待される Cyclin B (翻訳増強) や、hTERT (翻訳阻害) を設定した。各遺伝子に対応したカスタム PPR を細胞に導入し、標的の発現レベル変動及び、表現型を解析することでツールの評価を行う。

3. 研究の方法

① 標的配列特異性を持つ PPR タンパク質の作製

PPR モチーフの 1, 4, ii (34) のアミノ酸の組み合わせによってどの塩基と特異的に結合するか決まっている。それらの組み合わせのうち、各塩基と結合可能かつ最も天然 PPR モチーフに出現する組み合わせを選択した。そのアミノ酸配列を含む PPR モチーフ配列をデザインし、標的配列に沿うように並べた。一方でそのような PPR タンパク質遺伝子配列は、リピート配列であるため遺伝子の構築が難しい。ゲノム(もしくは転写物)配列のなかから 1 箇所の配列を指定するためには、最低でも 17 塩基必要であるため、PPR モチーフを 17 個以上連結させる必要がある。そこで、1 or 2 個の PPR モチーフの配列を含むプラスミド DNA を準備し、10 個連結することで 10~20 個の PPR モチーフが指定した順番で連結する cloning システムを構築した。作製した PPR 遺伝子は大腸菌発現プラスミドに載せ替え、ルシフェラーゼ及びヒスチジン融合タンパク質として大腸菌で発現、精製した。ビオチン標識した標的 RNA 配列を含む合成 RNA をストレプトアビジンコーティングプレートに結合させ、そこへ精製タンパク質を加え洗浄後、結合している PPR タンパク質量をルシフェラーゼの発光により計測した。また特定の非標的 RNA 配列を準備し、その結合も同様に測定し、RNA 結合能力を評価した。標的配列は、Cyclin B の 5' UTR から 4 箇所 (CB1, 2, 3, 4)、3' UTR から 2 箇所 (CB5, 6)、また hTERT は ORF 内から 2 箇所 (TER1, 2) 選定した。

② 各種エフェクタードメインとの連結

これまでの研究から、PPR タンパク質と真核型翻訳開始因子 (eIF) を融合した分子を用いることで、翻訳開始を制御できることが示された。それらは、5' UTR で翻訳開始を制御している複合体の構成因子である。本研究では、さらに 3' UTR において翻訳開始を制御している Poly A binding protein (PABP) の RNA 結合部位を除いた領域も利用することにした。翻訳抑制の方法は、RNase を融合することでノックダウン可能な分子の開発を進めた。バクテリア RNase, や植物オルガネラで PPR と共に機能している RNase, といったヌクレアーゼドメイン RNase domain を利用していたためそれらを用いることとした。

③ 翻訳増強の検証

PPR 発現プラスミドを HEK293T へトランスフェクションし、24 時間後、タンパク質を抽出し、Cyclin B 特異抗体を用いてウエスタンブロッティングすることで、Cyclin B タンパク質発現量の解析を行った。

④ ノックダウンの検証

PPR 発現プラスミドを HEK293T へトランスフェクションし、24 時間後、RNA を抽出し逆転写した。ノックダウン効率の評価は、hTERT もしくは beta-actin を増幅する Primer でリアルタイム PCR によってそれぞれの RNA 量測定し、hTERT RNA/b-actin RNA を算出し比較した。

4. 研究成果

① 標的配列特異性を持つ PPR タンパク質の作製

これまでに報告のあるデザイン PPR タンパク質では、様々な方法で特定した PPR コンセンサスモチーフ配列を用いて構築されている (Coquille et al., Nature Commun. 2014)。7~14 個の PPR モチーフが連結されているものが報告されており、標的 RNA 配列との結合親和性 (Kd) $10^{-7} \sim 10^{-9}$ である。コンセンサス配列にすることで可溶性が増し大量のタンパク質を調製することができるため結晶構造解析にも成功している。しかしながら、天然に存在する PPR モチーフ配列は保存性が低く、TALE repeat のような DNA 結合リピートタンパク質のような高いモチーフ配列保存性がない。またコンセンサス配列よりも各モチーフに多様性をもたらすことで、リピートタンパク質の機能が向上する例も報告されている。そこで、本研究では各モチーフのアミノ酸配列を変更することでリピート性を低減した PPR を作製した。標的配列をもとに 1 8 モチーフ連結した PPR タンパク質を大腸菌を用いてタンパク質発現、精製を行った。結合実験は、ビオチン修飾した合成 RNA とストレプトアビジンプレートを用いた方法、及びゲルシフトアッセイにより行った (図 2)。結果、cyclin B 標的では、CB1, 2 は、結合力が低かった ($K_d=10^{-7}$) が、CB3, 4, 5, 6 では高かった ($K_d=10^{-9}$)。TER1, 2 を比較すると、TER2 のほうが標的との結合力が強かった。これらの結果から、CB1, 2, を除く PPR について解析を進めることとした。

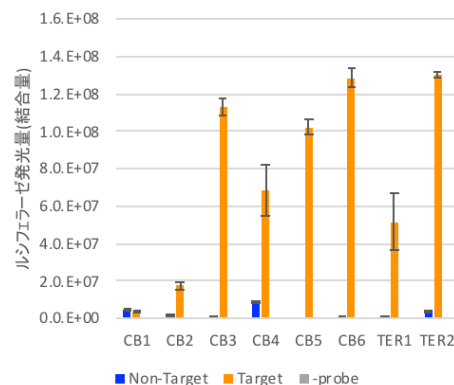
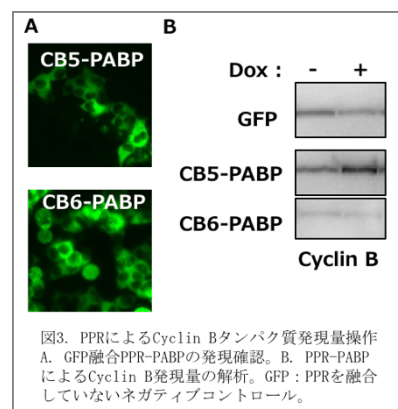


図 2. デザイン PPR タンパク質の RNA 結合解析
ルシフェラーゼ融合 PPR タンパク質とビオチン RNA との結合をルミノメーターを用いて解析した。

② Cyclin B 発現増強の検証実験

5' UTR に標的する CB3, 4 は、eIF4G と GFP, CB5, 6 については PABP と GFP を融合したタンパク質遺伝子をクローニングし、HEK293T に piggy-back システムを利用してゲノムに挿入した。また本タンパク質は Dox により発現を誘導することができる。細胞をクローン化し PPR 蛋白質の発現を Dox 添加後 24 時間の細胞をサンプリングし確認した。蛍光顕微鏡を用いた GFP の発現を調べたところ全てで細胞質に発現していることが確認できた。一方で CB5 と CB6 を比較すると、CB6 が多少凝集している傾向が見られた(図 3)。Dox 誘導なし、ありの細胞からタンパク質を抽出し、Cyclin B 特異抗体を用いて Western blotting により Cyclin B の発現量変化を解析した。結果、CB5 に PABP を融合した細胞において 1.5 倍程度のタンパク質量増加が認められた。



③ ノックダウンツールの開発

これまでの研究開発から、RNA 分解酵素などのノックダウンモジュールについてレポーターアッセイを用いて探索を行い、2 種類の同定 (RD11, RD14) に成功した。そこで、それらのモジュールと PPR を用いて、ヒト細胞内に存在する内在遺伝子のノックダウンが可能かどうか検証を進めた。標的 RNA としてヒトテロメラーゼ hTERT を選択した。RNase 融合 hTERT 標的 PPR 発現コンストラクトを作成し、HEK293T 細胞へノックインした。細胞作成後、リアルタイム PCR により、hTERT mRNA 量の変化を解析した結果、30%程度のノックダウン効率が認められた。一方で、非特異的な RNA 分解も検出された。これは、Nuclease 部位の非特異的な RNA 結合により非特異的に RNA が分解されている可能性がある。そこで、使用している RNase の結晶構造より基質認識に関与していると考えられる位置を特定し変異体を作製し、解析を行った。しかしながら、分解能を有しかつ非特異的な RNA 分解を防ぐ変異部位を見つけることができなかった。今後は標的配列の選定方法などを工夫することでオフターゲットを減らすことを検討する。

本研究では、配列特異的な RNA 結合タンパク質を利用することで細胞内において内在 RNA の機能を制御することができることを示した。このような開発をさらに進めることで、より精密かつ複雑にセントラルドグマを制御することができるようになり、細胞に関わる医療、農業、化学分野での産業において応用利用することで可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

T. Kobayashi, Y. Yagi, T. Nakamura “Comprehensive Prediction of Target RNA Editing Sites for PLS-Class PPR Proteins in *Arabidopsis thaliana*” *Plant and Cell Physiology*, 60, 862-874, 2019、<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy251>. 査読あり

T. Imai, Y. Yagi, T. Nakamura “Recent Progress Toward RNA Manipulation with Engineered Pentatricopeptide Repeat Proteins” *Applied RNA Bioscience* 151-160, 2018, 978-981-10-8372-3_10、査読なし

T. Kobayashi, Y. Yagi, T. Nakamura, Development of Genome Engineering Tools from Plant-Specific PPR Proteins Using Animal Cultured Cells., *Methods Mol Biol.*, 1469, 147-155, 2016, 10.1007/978-1-4939-4931-1_11, 査読なし

[学会発表] (計 3 件)

- ① 八木祐介、中村崇裕「PPR蛋白質を利用したRNA操作技術の開発」, 日本分子生物学会, 2017年
- ② 八木祐介、中村崇裕「PPR蛋白質を利用したRNA操作技術の開発」, 日本RNA学会, 2017年
- ③ 八木祐介、中村崇裕「PPR蛋白質を利用したRNA操作ツールの開発」, 日本分子生物学会 (招

待講演), 2016 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学農学部植物分子機能学ホームページ

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/plantmb/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 中村 崇裕

ローマ字氏名 : Nakamura Takahiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。