

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K05846

研究課題名(和文) 省エネ型真核リボスイッチの合理的構築

研究課題名(英文) Rational construction of eukaryotic riboswitches requiring less energy for their conformational changes

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物翻訳系で機能する3種の省エネ型リボスイッチ(分子応答性遺伝子発現制御RNA)を合理的に構築した。1つ目は「3' cap非依存翻訳促進配列(3' CITE)媒介翻訳」を正に制御するONリボスイッチ、2つ目は「内部リボソーム進入部位(IRES)媒介翻訳」を負に制御するOFFリボスイッチ、3つ目は「通常の翻訳機構」を負に制御するOFFリボスイッチである。何れのリボスイッチも分子応答制御時に「鎖置換」を必要としないため、エネルギーロスが少なく、高い制御効率を発揮できる。また、リボスイッチの一部(アプタマー)を交換するだけで分子特異性を変更できるため、ユーザー定義の分子に応答させることが可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した省エネ型リボスイッチは、分子応答制御時に「鎖置換」を伴わないため、エネルギーロスが少なく、高い制御効率を発揮する。また、分子特異性の変更も容易であることから、任意の分子の濃度に応じて任意のタンパク質の生産量を広範囲にコントロールすることが可能となる。このような人工の分子応答性遺伝子発現制御システムは、合成生物学を含む幅広い学問領域において、基盤技術としての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We rationally constructed three types of energy-saving, eukaryotic riboswitches (ligand-responsive regulatory RNAs) that function in eukaryotic translation systems. The first one upregulates translation mediated by a 3' cap-independent translation element (3' CITE) in response to its specific ligand. The second one ligand-dependently downregulates translation mediated by an internal ribosome entry site (IRES). The last one ligand-responsively downregulates canonical translation. Because all of them require no major hybridization switches for gene regulation, they require less energy for their conformational changes, thus showing higher switching efficiencies. In addition, their ligand-specificity can easily be changed just by replacing a part of them (specifically, the aptamer domain) to obtain a riboswitch responsive to a user-defined ligand.

研究分野：生体関連化学

キーワード：リボスイッチ 発現制御 合成生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工遺伝子回路や人工代謝経路の構築にあたり、『特定の分子が存在する時のみ、特定の遺伝子の発現が抑制あるいは促進されるシステム』は必要不可欠である。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事が望ましいが、複雑かつ統一性の無いシステムでは汎用性を欠いてしまう。そこで本研究代表者が注目したのが、2002年に天然の原核生物で発見されたノンコーディング RNA 『リボスイッチ』である。リボスイッチは、mRNA の非翻訳領域に存在する「cis 作用型の分子応答性遺伝子発現制御システム」であり、単純かつ統一性のある制御機構を有している。制御分子を認識する「アプタマー」および遺伝子発現を司る「発現プラットフォーム」で構成されており、制御分子とアプタマーの結合が発現プラットフォームの構造変化を引き起こすことにより、下流 (or 上流) 遺伝子の発現が制御 (促進 or 抑制) される。

天然のリボスイッチは内在性の代謝産物に応答するものに限られるが、任意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、人工アプタマーを“上手く” mRNA に導入することで、当該アプタマーの認識分子に応答する人工リボスイッチを構築可能である。真核生物の翻訳系は原核生物のものとは異なるため、天然では殆ど同定されていない「真核翻訳系で機能するリボスイッチ (真核リボスイッチ)」の人工構築は困難であるものの、非典型的な翻訳機構などを利用することで真核リボスイッチを作製する試みも行われてきた。例えば、本研究代表者は、発現プラットフォームとして内部リボソーム進入部位 (IRES) を選択し、IRES 媒介翻訳を制御する真核リボスイッチ (「IRES 基盤リボスイッチ」) の人工構築に成功した。さらに、アプタマーの配列情報だけで IRES 基盤リボスイッチが構築できるように、世界初のリボスイッチ完全合理設計法を導出した。しかし、当該 IRES 基盤リボスイッチは、スイッチング時の鎖置換による構造変化が広範囲に渡るため、エネルギーロスが大きくなるという欠点があった。

2. 研究の目的

本研究では、上記 IRES 基盤リボスイッチの欠点を解消した真核リボスイッチを開発することを目指した。具体的には、上記 IRES 基盤リボスイッチを含む一般的なリボスイッチが発現制御時 (構造変化時) に使用する「鎖置換」を必要としない、つまり、構造変化のためのエネルギーが軽減された「“省エネ型” 真核リボスイッチ」の合理的構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 3' cap 非依存翻訳促進配列 (3' CITE) 基盤 “省エネ型” 真核 ON リボスイッチの開発

初めに、真核生物の無細胞翻訳系 (小麦胚芽抽出液: WGE) を用いて、オオムギ黄萎ウイルスの 3' CITE 媒介翻訳機構を詳細に調査し、その機構用に mRNA を最適化した。次に、「鎖置換」を使用せずに発現を制御できるように、人工アプタマーの挿入位置および挿入方法を決定した。最後に、モデルアプタマーを使用して、その認識分子依存的に遺伝子発現を促進する真核 ON リボスイッチの作製を試みた。

(2) 内部リボソーム進入部位 (IRES) 基盤 “省エネ型” 真核 OFF リボスイッチの開発

チャバネアオカメムシ腸管ウイルスの遺伝子間 IRES を発現プラットフォームとして選択し、その構造情報に基づいて、「鎖置換」を使用せずに発現を制御できるように、人工アプタマーの挿入位置・方法を決定した。その後、実際にモデルアプタマーを挿入し、その認識分子依存的に WGE 中の遺伝子発現が効率的に抑制される (OFF になる) ように周辺配列を最適化した。

(3) 通常翻訳機構基盤 “省エネ型” 真核 OFF リボスイッチの開発

真核 mRNA の 5' 非翻訳領域上の様々な位置に、「鎖置換」を使用せずに発現を制御できるようにモデルアプタマーを挿入し、その認識分子依存的に WGE 中の遺伝子発現が効率よく阻害される挿入位置を決定した。また、挿入するアプタマーに補助的な高次構造を付加することで、スイッチング効率の向上を試みた。

(4) RNA 末端保護配列の探索

リボスイッチの機能を十分に引き出すには、その安定性を高める必要があるため、WGE 中における RNA 分解を防ぐための末端保護配列の探索を行った。5' 末端からの分解を防ぐ配列は既に同定済みであったため、RNA の 3' 末端にランダム塩基を挿入して *in vitro* selection を行うことで、3' 末端保護配列の獲得を試みた。

(5) 高い翻訳促進効果を発揮する内部リボソーム進入部位 (IRES) の同定

上述した IRES 基盤リボスイッチおよび RNA 末端保護配列を有効活用するために、WGE 中で高い翻訳効率を示す IRES の同定を試みた。具体的には、チャバネアオカメムシ腸管ウイルスやワタオウサギパピローマウイルスの遺伝子間 IRES の開始コドンを変更することで、IRES 媒介翻訳効率の向上を目指した。

4. 研究成果

(1) 3' cap 非依存翻訳促進配列 (3' CITE) 基盤 “省エネ型” 真核 ON リボスイッチの開発

モデルとしてテオフィリン結合アプタマーを用いて合理的に構築した ON リボスイッチの発現制御効率(テオフィリン応答性)は、既存のテオフィリン応答性 IRES 基盤 ON リボスイッチに比して、特に低濃度テオフィリン領域で高くなった。また、当該リボスイッチは、スイッチング時に「鎖置換」を伴わないため、テオフィリン結合アプタマーを別分子結合アプタマーに変えるだけで、スイッチング効率を損なうことなく、分子特異性を変更することができた。これらの成果について論文発表および数回の学会発表を行った。

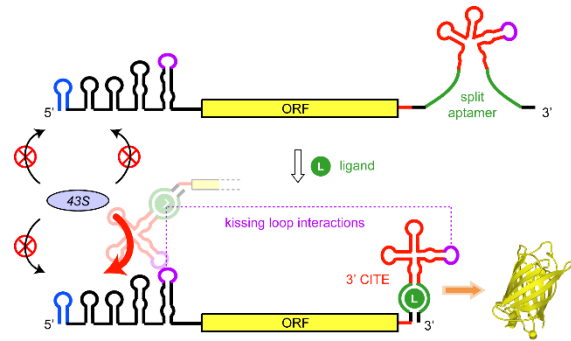


図1 .3' CITE 基盤 ON リボスイッチの概念図

(2) 内部リボソーム進入部位 (IRES) 基盤 “省エネ型” 真核 OFF リボスイッチの開発

テオフィリン結合アプタマーを用いて合理的に構築した OFF リボスイッチの発現制御効率(テオフィリン応答性)は、既存のテオフィリン応答性 IRES 基盤 OFF リボスイッチ(スイッチング時に鎖置換による大きな構造変化を伴うもの)に比して、約 2.5 倍高くなった。また、当該リボスイッチは、上述の 3' CITE 基盤リボスイッチと同様、スイッチング時に「鎖置換」を伴わないため、テオフィリン結合アプタマーを別分子結合アプタマーに変えるだけで、スイッチング効率を損なうことなく、分子特異性を変更することができた。これらの成果について論文発表および数回の学会発表を行った。

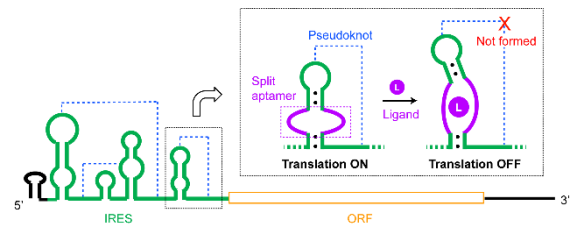


図2 .IRES 基盤 OFF リボスイッチの概念図

(3) 通常翻訳機構基盤 “省エネ型” 真核 OFF リボスイッチの開発

この種の真核 OFF リボスイッチは、制御分子とアプタマーの複合体がリボソームの障害物として働く機構であるため、テオフィリンのような小分子に結合するアプタマーを使用する場合、複数個を挿入する必要があるとされてきたが、挿入位置の最適化や補助的高次構造の付加によって、単一のテオフィリンアプタマーのみを有する真核 OFF リボスイッチの合理的構築に成功した。発現制御効率は、上記 IRES 基盤 OFF リボスイッチに比して低いが、IRES のような長い RNA を必要としないため構築が容易であるメリットがある。なお、上記 2 種のリボスイッチ同様、アプタマー部位を変更するだけで分子特異性を変更可能であった。これらの成果について論文発表および数回の学会発表を行った。

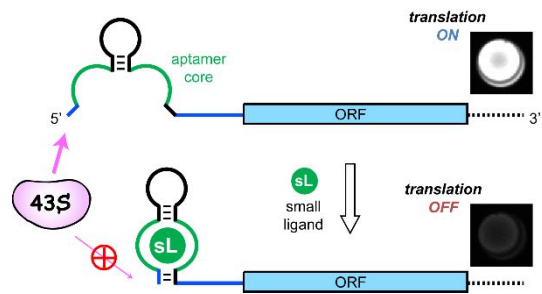


図3 .通常翻訳機構基盤 OFF リボスイッチの概念図

(4) RNA 末端保護配列の探索

In vitro selection の結果、高い RNA 保護機能を示す配列が幾つか得られた。実際、保護配列を持たない RNA は WGE 中で 1 時間以内に迅速に分解したが、*in vitro* selection で獲得した「3'末端保護配列」を有する RNA は 24 時間以上安定に存在した。また、当該保護配列を mRNA に付加したところ、その安定性の向上によって翻訳効率が約 5 倍程度上昇した。これらの成果について論文発表および数回の学会発表を行った。

(5) 高い翻訳促進効果を発揮する内部リボソーム進入部位(IRES)の同定

ワタオウサギパピローマウイルスの遺伝子間 IRES の開始コドンを変化した結果、野生型より 3~4 倍高い翻訳効率を示すものを見出した。驚くべきことに、この翻訳効率は、最良の翻訳促進配列を有する真核 mRNA の通常翻訳効率よりも高かった。当該 IRES は上記 RNA 保護配列と同時使用が可能であるため、リボスイッチ性能の向上の他、WGE を用いたタンパク質大量合成のための利用が期待される。これらの成果について論文発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsushi Ogawa, Yuta Murashige, Hajime Takahashi	4. 巻 28
2. 論文標題 Canonical translation-modulating OFF-riboswitches with a single aptamer binding to a small molecule that function in a higher eukaryotic cell-free expression system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2353-2357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2018.06.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi Ogawa, Hiroki Masuoka, Tsubasa Ota	4. 巻 6
2. 論文標題 Artificial OFF-Riboswitches That Downregulate Internal Ribosome Entry without Hybridization Switches in a Eukaryotic Cell-Free Translation System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1656-1662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.7b00124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi Ogawa, Yuta Murashige, Junichiro Tabuchi, Taiki Omatsu	4. 巻 13
2. 論文標題 Ligand-responsive upregulation of 3' CITE-mediated translation in a wheat germ cell-free expression system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular BioSystems	6. 最初と最後の頁 314-319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C6MB00748A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi Ogawa, Akane Kutsuna, Masashi Takamatsu, Tatsuya Okuzono	4. 巻 29
2. 論文標題 In vitro selection of a 3' terminal short protector that stabilizes transcripts to improve the translation efficiency in a wheat germ extract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2141-2144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2019.06.058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Ogawa, Masashi Takamatsu	4. 巻 29
2. 論文標題 Mutation of the start codon to enhance Cripavirus internal ribosome entry site-mediated translation in a wheat germ extract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.126729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Akane Kutsuna, Tatsuya Okuzono, Masashi Takamatsu, Atsushi Ogawa
2. 発表標題 In vitro selection of a 3' protector that stabilizes mRNA to increase the translation efficiency in a wheat germ cell-free expression system
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Masuoka, Tsubasa Ota, Atsushi Ogawa
2. 発表標題 Artificial OFF-riboswitches that downregulate internal ribosome entry without hybridization switches in a wheat germ extract
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 忽那 茜、奥園 達也、高松 将史、小川 敦司
2. 発表標題 コムギ無細胞系におけるmRNA安定化および翻訳効率上昇を指向した3'末端保護配列のin vitro selection
3. 学会等名 第13回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 升岡 宏紀、太田 翼、高橋 萌、小川 敦司
2. 発表標題 省工ネ型・IRES基盤真核系人工OFFリボスイッチの開発
3. 学会等名 第13回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 升岡 宏紀、太田 翼、高橋 萌、小川 敦司
2. 発表標題 鎖置換反応を必要としないIRES基盤真核系人工OFFリボスイッチの開発
3. 学会等名 2018年日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 忽那 茜、奥園 達也、高松 将史、小川 敦司
2. 発表標題 小麦無細胞系におけるRNA3'末端保護配列のin vitro selection
3. 学会等名 2018年日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Ogawa
2. 発表標題 Rational design of artificial riboswitches that function in a eukaryotic expression system
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuta Murashige, Junichiro Tabuchi, Taiki Omatsu, Atsushi Ogawa
2. 発表標題 Ligand-responsive upregulation of 3' CITE-mediated translation in wheat germ extract
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村重 裕太、田淵 潤一郎、大松 大希、小川 敦司
2. 発表標題 鎖置換を利用しない真核系人工ONリボスイッチの合理設計
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会9.0
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yuta Murashige, Junichiro Tabuchi, Taiki Omatsu, Atsushi Ogawa
2. 発表標題 Facile design of artificial riboswitches that ligand-dose dependently upregulate translation without hybridization switches in a wheat germ extract
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama International Symposium 2016, (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小川 敦司
2. 発表標題 省エネ型真核リボスイッチの設計
3. 学会等名 新世代の生物有機化学研究会2016
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Seiji Masuda, Shingo Izawa, Atsushi Ogawa他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 286
3. 書名 Applied RNA Bioscience	

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学 小川研究室 http://www.pros.ehime-u.ac.jp/ogawa/

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----