

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14513

研究課題名（和文）オリゴDNAを用いたタンパク質発現を促進させる新手法の開発

研究課題名（英文）Novel method for promoting protein expression by using oligo DNA

研究代表者

渡邊 貴嘉（Watanabe, Takayoshi）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・講師

研究者番号：70554020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、mRNAの高次構造領域に相補的なオリゴDNAをハイブリダイズさせることでmRNAの局所的な高次構造を解消させ、タンパク質の翻訳を促進させる新手法の開発を行った。

タンパク質発現mRNAに相補的なオリゴDNAをハイブリダイズさせて無細胞翻訳系でタンパク質を発現させたところ、特定のmRNA領域にオリゴDNAをハイブリダイズさせた場合においてタンパク質発現量の向上が確認された。また、このオリゴDNAを用いた翻訳促進のメカニズムを解明し、さらにバイオ医薬品などの有用タンパク質の高効率発現にも適用可能な技術であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的にmRNAに相補的なオリゴを作用させるとタンパク質の翻訳が抑制されると考えられているが、本研究ではこの常識を覆し、偶然発見したmRNAの高次構造の解消によるタンパク質の翻訳促進効果に着目して、汎用的なタンパク質の発現促進技術に利用した点に学術的な意義を有する。

本手法を用いることによって、mRNAの高次構造が原因で発現効率の低かったタンパク質を高効率で発現させることが可能となり、基礎研究の発展のみならず、将来的にはバイオ医薬品生産の高効率化など産業面でも大きく貢献でき、社会的に大きな波及効果が得られると期待される。

研究成果の概要（英文）： In this study, a novel method for enhancing protein translation by hybridizing oligo DNA complementary to mRNA in order to eliminate the high-order structure of mRNA was developed.

Oligo DNA complementary to protein-encoded mRNA was designed and hybridized to mRNA, and the resulting mRNA/oligo DNA complex was added to a cell-free translation system to express protein. As a result, the efficiency of protein expression was promoted by using oligo DNA-hybridized mRNA in particular sites. And the mechanism of promotion of translation using oligo DNA was elucidated. Furthermore, it was demonstrated that this method can be applied to highly efficient expression of useful proteins such as biopharmaceuticals.

研究分野：化学生物学

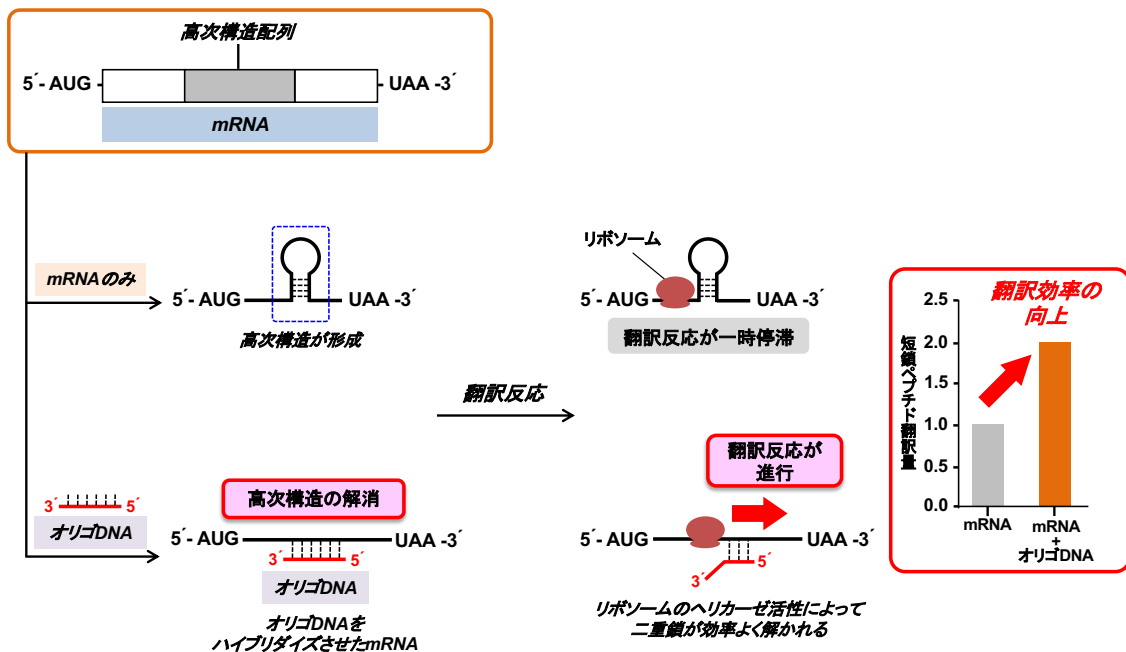
キーワード：タンパク質 オリゴDNA RNAの高次構造 翻訳促進 バイオ医薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の発現効率を高めることはバイオ医薬品の生産などにおいて強く求められている技術であるが、一般的かつ幅広く適用可能な技術は未だ存在しない。この原因の一つとして、mRNA の高次構造がタンパク質の翻訳効率を低下させていることが挙げられる。これは mRNA の高次構造の手前でリボソームが一時的に停滞し、翻訳効率が低下するためと考えられている (*Nucleic Acids Res.* **42**, 4813-4822 (2014))。実際に、mRNA の高次構造が原因で発現効率の低いバイオ医薬品が報告されていることから (*J. Biotechnol.* **150**, 31-36 (2010))、そのような mRNA の高次構造を解消することができれば、タンパク質の翻訳効率を向上させることが可能になると期待される。

本研究を申請する前に、研究代表者は別の目的の研究過程で、短鎖ペプチドをコードした mRNA に相補的なオリゴ DNA をハイブリダイズさせて無細胞翻訳系で翻訳したところ、オリゴ DNA をハイブリダイズさせない場合と比較して発現量が約 2 倍に向上する現象を偶然発見した(図 1)。通常 mRNA に相補的なオリゴ DNA を作用させると遺伝子発現が抑制されるが、研究代表者が発見した現象は遺伝子発現の促進であり、従来とは正反対の結果であった。生成したペプチドの質量分析の結果、mRNA のみでは主に途中で翻訳が停止したペプチド断片が得られ、オリゴ DNA をハイブリダイズさせた場合は主に完全長ペプチドが得られることが分かった。この結果について研究代表者は、たまたまオリゴ DNA が mRNA に存在した高次構造にハイブリダイズしたことでその高次構造が解消され、さらにリボソームのヘリカーゼ活性 (*Cell* **120**, 49-58 (2005)) によって mRNA/オリゴ DNA 二重鎖が解かれて翻訳が継続したためではないかと推測した(図 1)。もし、この現象が一般的に起こるのであれば、オリゴ DNA を mRNA の高次構造を形成している部分にハイブリダイズさせることで、タンパク質の翻訳反応を促進できる可能性があるかと着想した。



### 2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では mRNA の高次構造領域に相補的なオリゴ DNA をハイブリダイズさせることで mRNA の局所的な高次構造を解消させ、タンパク質の翻訳効率を促進させる新手法の開発を目的として研究を進めた。

そのためにまず、本当にオリゴ DNA を用いて mRNA の高次構造を解消させることが翻訳効率の促進に寄与するか検証した。具体的には、高次構造を形成することが知られている配列を挿入したモデル mRNA にオリゴ DNA をハイブリダイズさせ翻訳させることで、オリゴ DNA の翻訳促進効果とその作用位置を明らかにすることを目指した。

続いて、実際のタンパク質の mRNA にオリゴ DNA をハイブリダイズさせ翻訳することで、本手法がタンパク質の発現促進に適用できるか検証した。さらに、このオリゴ DNA を用いたタンパク質翻訳促進のメカニズムの解明およびバイオ医薬品などの有用タンパク質の高効率発現に向けた本手法の適用可能性を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) オリゴ DNA を用いた mRNA の高次構造解消と翻訳促進効果の検証

オリゴ DNA を用いて mRNA の高次構造を解消させることが翻訳効率の促進に寄与していることを調べるため、まずは高次構造を形成することが知られている配列を挿入したモデル mRNA を *in vitro* 転写反応により作製した。そして、mRNA 中の高次構造領域に相補的な塩基配列を持つオリゴ DNA をハイブリダイズさせ、無細胞翻訳系に添加し翻訳反応を行った。この際、アンバーサプ

レクション法を用いて N 末端領域に蛍光標識アミノ酸を導入することで、翻訳産物の発現量を蛍光強度で定量できるようにした。翻訳産物を SDS-PAGE で分離後、ゲルの蛍光イメージを取得することで発現量を定量した。さらに、翻訳産物を精製し質量分析を行うことで、翻訳促進効果の作用部位の特定を行った。

#### (2) オリゴ DNA を用いたタンパク質の翻訳効率の向上

上記のオリゴ DNA を用いた翻訳促進技術を、実際にタンパク質の翻訳促進に適用することを進めた。まず、モデルタンパク質として、タンパク質の発現と構造形成を簡単に評価できる緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用い、オリゴ DNA をハイブリダイズさせる適切な部位を網羅的に探索するために、GFP mRNA に相補的な 50 塩基程度からなるオリゴ DNA をハイブリダイズさせ無細胞翻訳系で GFP を発現させた。発現させた GFP は SDS-PAGE で分離後にゲルの蛍光イメージを取得することで、構造形成 (フォールディング) した GFP 発現量を評価するとともに、GFP の C 末端に付加した His-tag に対するウェスタンブロットを行うことで翻訳された全 GFP 量 (蛍光性・非蛍光性ともに) を定量した。次に、リボソームのヘリカーゼ活性によって mRNA/オリゴ DNA 二重鎖が解かれていることを検証するために、オリゴ DNA の一部をヘリカーゼ活性を受けにくい人工核酸に置換したキメラオリゴを化学合成し、GFP mRNA にハイブリダイズさせ翻訳反応を行った。また、オリゴ DNA の代わりにオリゴ RNA を用いて同様の評価を行ったり、市販されている様々な無細胞翻訳系を用いることで本手法の適用範囲を検証した。

さらに、GFP 以外のインターフェロン  $\alpha 8$  やストレプトアビジンを用いて同様の実験を行うことで、タンパク質発現における本手法の汎用性を検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) オリゴ DNA を用いた mRNA の高次構造解消と翻訳促進効果の検証

まず、高次構造を形成することが報告されている 5 種類の RNA 塩基配列を挿入したモデル mRNA にオリゴ DNA をハイブリダイズさせ無細胞翻訳系に添加することで、翻訳反応を行った。この際、N 末端領域に蛍光標識アミノ酸を導入し翻訳産物の発現量を蛍光強度で定量したところ、新たに作製した mRNA の翻訳においては予想される翻訳促進効果が見られなかった。そこで、研究代表者の先行研究で使用した mRNA の高次構造領域以外の塩基配列に変異を導入した mRNA 変異体を複数作製し、高次構造領域にオリゴ DNA をハイブリダイズさせ同様に評価したところ、高次構造領域の塩基配列が他の塩基配列と相互作用することで翻訳効率が低下し、オリゴ DNA をハイブリダイズさせることで翻訳効率が向上することが確認された。さらに、翻訳産物を質量分析で解析したところ、mRNA のみでは途中で翻訳反応が停止した断片ペプチドが主に得られ、オリゴ DNA をハイブリダイズさせることで完全長の翻訳産物が主に得られることが確認された。これらの結果から、オリゴ DNA を作用させて mRNA 中の高次構造を解消することで、翻訳反応が促進されることを実証した。

#### (2) オリゴ DNA を用いたタンパク質の翻訳効率の向上

次に、タンパク質をコードする mRNA にオリゴ DNA をハイブリダイズさせ翻訳させることで、タンパク質の発現促進が可能かどうかを検証した。まず、タンパク質の発現と構造形成を簡単に評価できる緑色蛍光タンパク質 (GFP) をモデルタンパク質として用い、GFP mRNA の様々な領域に相補的な 50 塩基程度からなる 14 種類のオリゴ DNA をそれぞれハイブリダイズさせた。オリゴ DNA のハイブリダイズの有無を HPLC で確認したところ、いずれの mRNA/オリゴ DNA 複合体においても mRNA のみと比べて HPLC 保持時間が遅れることが確認できたことから、mRNA にオリゴ DNA がハイブリダイズしたと判断した。そして、オリゴ DNA をハイブリダイズさせた mRNA を無細胞翻訳系に加えて GFP を発現させ、SDS-PAGE ゲルの蛍光イメージおよびウェスタンブロットでバンド強度を定量したところ、特定の mRNA 領域にオリゴ DNA をハイブリダイズさせることで GFP 蛍光強度の増大が確認された。また、翻訳された蛍光性・非蛍光性を含む全 GFP 量をウェスタンブロットで定量したところ、オリゴ DNA のハイブリダイズによる GFP の構造形成への影響はほとんど無く、GFP 発現量そのものが向上したと考えられた (図 2)。

続いて、リボソームのヘリカーゼ活性によって mRNA/オリゴ DNA 二重鎖が解かれていることを検証するために、オリゴ DNA の一部をヘリカーゼ活性を受けにくい人工核酸に置換したキメラオリゴを GFP mRNA の特定領域にハイブリダイズさせ発現したところ、キメラオリゴをハイブリダイズさせた場合は GFP 発現量の低下が確認されたことから、リボソームのヘリカーゼ活性によって mRNA/オリゴ DNA 二重鎖が解離し翻訳反応が継続することによってタンパク質発現が促進されていることを明らかにした。また、オリゴ DNA の代わりにオリゴ RNA を用いて同様の実験を行ったところ翻訳促進がほぼ見られなかったことから、mRNA にオリゴ DNA をハイブリダイズさせることがタンパク質発現促進に重要であることが示された。さらに、市販されている様々な無細胞翻訳系に対して本手法が適用可能か検証したところ、特定の無細胞翻訳系において高い翻訳促進効果が確認された。

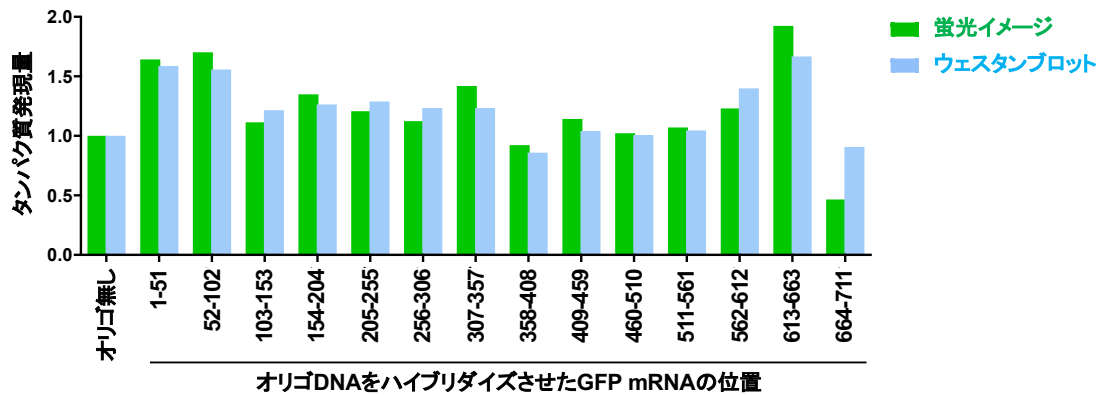
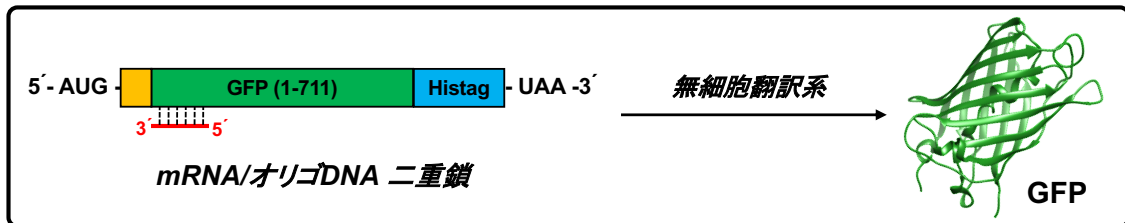


図2. オリゴDNAをハイブリダイズさせたGFP mRNAの翻訳

最後に、GFP以外のタンパク質でもオリゴDNAによる翻訳促進が見られるかどうかの検証を行った。まず、先行研究において発現効率が高くないことが確認されているもののバイオ医薬品としての有用性が期待されているインターフェロン $\alpha 8$  (IFN $\alpha 8$ )の発現に適用した。その際、IFN $\alpha 8$ の検出を容易にするために、アンバーサプレッション法による非天然アミノ酸導入技術を用いてIFN $\alpha 8$ のN末端領域に蛍光標識アミノ酸を導入しIFN $\alpha 8$ の発現量を定量したところ、GFP同様に特定のmRNA領域にオリゴDNAをハイブリダイズさせることでIFN $\alpha 8$ の発現量が3倍以上向上することが確認された。一方で、無細胞翻訳系で発現効率が高いことが分かっているストレプトアビジンに対しても本手法を適用したところ、GFPやIFN $\alpha 8$ のようなオリゴDNAによる翻訳促進は確認されなかった。これらの結果から、タンパク質発現mRNAの一部は高次構造を取っていることで翻訳が抑制されているが、オリゴDNAをハイブリダイズさせることで高次構造が解消され、翻訳が促進されたと推測している。

今後、オリゴDNAを用いた本手法は、発現効率の低い様々なタンパク質の発現効率を向上させる手法として有用になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊貴嘉・芳坂貴弘
2. 発表標題 mRNAの高次構造制御によるタンパク質の翻訳促進
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊貴嘉・芳坂貴弘
2. 発表標題 オリゴDNAを用いたタンパク質発現を促進させる新手法
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊貴嘉・森下昌輝・芳坂貴弘
2. 発表標題 オリゴDNAのハイブリダイゼーションによるmRNAの翻訳効率の向上
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊貴嘉・森下昌輝・芳坂貴弘
2. 発表標題 オリゴDNAのハイブリダイゼーションによるmRNAの翻訳効率の向上とバイオ医薬への応用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝るみ・渡邊貴嘉・芳坂貴弘
2. 発表標題 光架橋性非天然アミノ酸の導入によるタンパク質の分子間および分子内光架橋
3. 学会等名 第12回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Rumi Shiba, Takayoshi Watanabe, Takahiro Hohsaka
2. 発表標題 Inter- and intramolecular photocrosslink of proteins through incorporation of nonnatural amino acids
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芝るみ・渡邊貴嘉・芳坂貴弘
2. 発表標題 光クロスリンクアミノ酸の部位特異的導入によるタンパク質の分子間および分子内光クロスリンク
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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