

令和元年5月27日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19202

研究課題名(和文) ケージドアミノアシルtRNAによる初期胚における翻訳の時空間的制御

研究課題名(英文) Photo-triggered translation using caged aminoacyl-tRNA in early embryos

研究代表者

大槻 高史(Ohtsuki, Takashi)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学研究科・教授

研究者番号：80321735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：筆者らは最近、翻訳の光トリガーとなるケージドaa-tRNAという化合物を作り、これを用いて翻訳を光制御する方法を開発した。これまでは本手法による翻訳の光制御をin vitro及び培養細胞内で示しただけであったため、本研究では、本手法を哺乳動物の初期発生の研究に応用しようと考えた。動物の発生過程には、必要なタイミングで局所的に発現するタンパク質が多数関わっていると考えられる。その役割を解明するためには、そのタンパク質の発現を時空間的に制御する方法が有効である。本研究では、ケージドaa-tRNAを用いて、マウス胚細胞内における蛍光タンパク質およびPGC-1 タンパク質の光依存的な合成に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行ったことは、特定のタンパク質の合成(発現)を時空間的に制御する方法の開発である。マウス胚において、効率よく特異的な発現をさせるためには、まだ改善を要することが分かったが、胚を含めて動物個体や三次元的な細胞集合体に適用可能になれば、“時間的”翻訳制御と“空間的”翻訳制御の双方の側面を生かして、様々なタンパク質の役割の解明が可能になる。また、光による時空間的タンパク質発現制御を通じて、初期発生事象の研究および人為的コントロールも可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Light is one of the most easily manipulated external factors for spatiotemporally controlling biological events, such as protein biosynthesis. We synthesized a (7-diethylaminocoumarin-4-yl)methoxycarbonyl (DEACM)-caged aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs) for photocontrolling protein biosynthesis. Upon irradiation at 400-430 nm, DEACM-aa-tRNA was rapidly converted into active aa-tRNA. Translation was photoinduced when DEACM-aa-tRNAs carrying a CUA anticodon were used together with mRNAs harboring a UAG amber codon. Protein synthesis was phototriggered not only in an in vitro translation system, but also in mammalian cells. We tried to apply this strategy to photo-trigger synthesis of a fluorescent protein and PGC-1 α in a mouse embryonic cell.

研究分野：生体分子工学

キーワード：ケージドアミノアシルtRNA 翻訳 光制御 発生

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

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究活動で、筆者らは翻訳系に関する技術開発に取り組んできた。特に、遺伝暗号の拡張に基づく非天然アミノ酸の導入 (Hirao & Ohtsuki *et al.* Nat. Biotech. 2002; Doi & Ohtsuki *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2007; Ohtsuka *et al.*, Anal. Biochem. 2011) やケージド aa-tRNA の開発に基づく翻訳系の光制御 (Akahoshi *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014) などに取り組んできた。翻訳の光制御に関しては、光を当てた場所・時間特異的に、目的のタンパク質の合成を誘導することが可能になった (Ohtsuki *et al.*, Nat. Commun. 2016)。現在、この翻訳の光誘導法は *in vitro* および培養細胞内で実証されたのみである。しかしながら、平面培養した細胞を相手にする場合、本技術の“時間特異的”翻訳の側面しか利用できない。一方、本技術を動物個体や三次元的な細胞集合体に適用した場合、“時間的”翻訳制御だけでなく“空間的”翻訳制御の側面も生かせる。ただし、大きな個体を相手にした場合、生体内部の細胞内へのケージド aa-tRNA の導入が容易ではないため本技術適用の実現性が低い。そこで、本研究では、小さな動物個体である、哺乳動物の初期胚を対象にすることにした。

2. 研究の目的

筆者らは最近、ケージドアミノアシル tRNA (ケージド aa-tRNA) という光応答性の化合物を創り、これを用いて翻訳を光で制御する方法を開発した (図1)。ただし、これまでは、本手法による翻訳の光制御が可能であることを *in vitro* および培養細胞内で示しただけで、実際に生命科学の課題解決に応用した例はまだない。

そこで本研究では、ケージド aa-tRNA による翻訳の光制御法を実際に生命科学研究に役立てるための挑戦として、哺乳動物の初期発生研究への本手法の応用に取り組んだ。

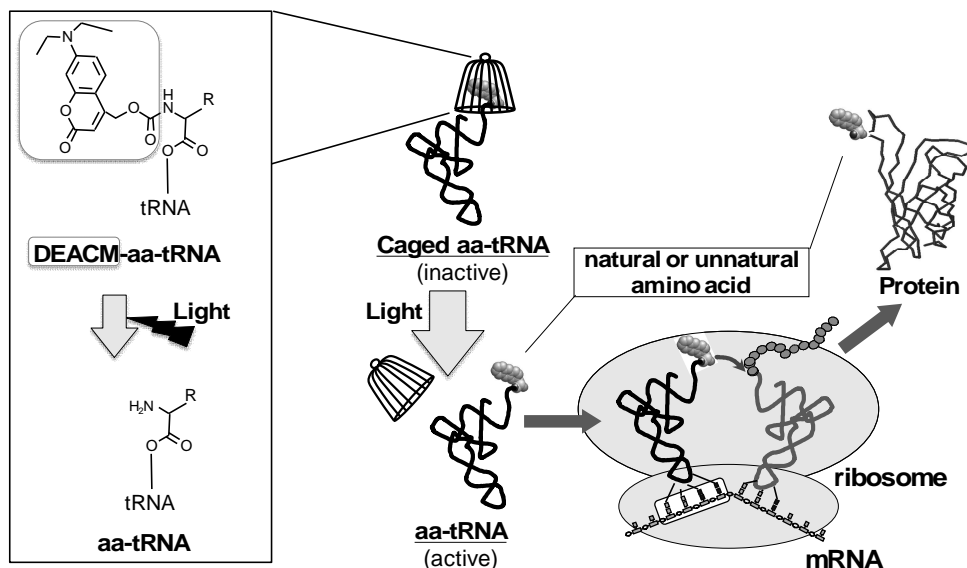


図1 . ケージドaa-tRNAの構造(左)、および、翻訳の光制御の機構(右)
ケージドaa-tRNAは4塩基アンチコドンまたはamberアンチコドンを持ち、光照射により活性化し、mRNA上の対応するコドン(4塩基コドンまたはamberコドン)を、自身が運んできたアミノ酸により翻訳する。ケージドaa-tRNAのアミノ酸部分は合成時に様々な天然/非天然アミノ酸に変更可能である。ケージドaa-tRNAを光で活性化しなければ、4塩基またはamberコドンの位置で翻訳が止まり、目的タンパク質は合成されない。

動物の発生過程には、必要なタイミングで局所的に合成されるタンパク質が多数関わっている。しかしながら、局所的に合成されるタンパク質の種類と役割については未解明なものも多い。その役割を解明するためには、局所的翻訳を人工的に再現したり、天然と異なる位置で局所的翻訳を起こしたりする方法が有効だと考えられる。そこで、本研究では、上記の「ケージド aa-tRNA を用いた、光による翻訳の時空間的制御」技術により、初期発生過程において「局

所的に合成されるタンパク質」の役割を調べる方法を確立することを目指す。このとき、まず始めに初期胚への本技術の適用可能範囲を調べるために、1細胞期、2細胞期、4細胞期、8細胞期などの各時期の胚に対して、本技術の適用（蛍光タンパク質発現の光制御）を試みた。さらには、実際に初期発生事象に関わると考えられるタンパク質の例として、ミトコンドリアの新生および生合成を促進する（そして、発生能に影響すると考えられる）PGC-1 α タンパク質の発現制御を目指した。

3. 研究の方法

(1) 赤色蛍光タンパク質の発現ベクターおよび mRNA の初期胚細胞への導入

1細胞期から8細胞期の胚に対して、マイクロインジェクション法やリポフェクション法などにより、赤色蛍光タンパク質(DsRed, mOrange)の発現ベクターまたは mRNA の導入を行った。導入後の赤色蛍光タンパク質の発現を観測することにより「各時期の胚に対する導入」および「各手法による導入」の効率を調べた。これにより、以降で用いる胚細胞内への核酸導入法として適した方法を見定めた。

(2) ケージド aa-tRNA による胚の細胞内における翻訳の誘導

131 位(蛍光活性に影響ない部位)に amber コドンを含む mOrange などの蛍光蛋白質の mRNA をコードするベクターを作製し、そのベクターからの転写により mRNA の合成を行った。amber アンチコドンをもつケージド aa-tRNA は、転写合成した tRNA (3'端の CA を欠いたもの)と化学合成したケージド aa-pdCpA とを酵素的に連結することによって合成した。その後、胚細胞内への導入をマイクロインジェクション法により行った。その後、1細胞を狙って光照射し、部位特異的に mOrange が合成されるかどうかを調べた。

(3) マウス初期胚における PGC-1 α の光依存的合成

老化した卵母細胞中のミトコンドリア数の減少は発生中の致死率の上昇を導き、女性の不妊原因の1つとなっている。これに対し、卵成熟過程から受精後の初期胚の時期にかけて、ミトコンドリア数を人為的に増加させることができれば、本問題の解決につながると考えられる。このような問題への対処につながるような基礎として、amber コドンをもつ PGC-1 α mRNA とケージド aa-tRNA を用いてミトコンドリア新生を促進するタンパク質である PGC-1 α を光照射に応じて発現させることを試みた。

4. 研究成果

(1) 赤色蛍光タンパク質の発現ベクターおよび mRNA の初期胚細胞への導入

胚細胞内でケージドアミノアシル tRNA による翻訳の光制御を行うため、まずは翻訳を可視化するための蛍光タンパク質(DsRed および mOrange2)の発現ベクターを入手し、それらの mRNA を作製した。mRNA はキャップ構造とポリ A を含むものを調製した。マウス胚に発現ベクターをマイクロインジェクションにより導入したところ、1細胞期においては転写・翻訳を観測することは難しかった。これは1細胞の後期から2細胞期にかけて新しい胚性の転写が始まるため転写効率が低いせいだと考えられる。そこで、mRNA を導入したところ、1細胞期において DsRed および mOrange2 の双方とも発現を確認することができた。このときリポフェクション法では2~4細胞期の初期胚へのケージド aa-tRNA の細胞内導入が可能であった、細胞のダメージが大きく mOrange2 の発現量は少なかったが、マイクロインジェクション法でははっきりと発現が確

認できた。

(2) ケージド aa-tRNA による胚の細胞内における翻訳の誘導

アンバーコドンをもつ mOrange2 mRNA、および、アンバーアンチコドンをもつ DEACM ケージド aa-tRNA を合成し、PAGE により目的鎖長を持つことを確認し、DEACM ケージド aa-tRNA については DEACM 基にもとづく吸収スペクトルにより合成物を確認した。この mRNA とアンバーアンチコドンをもつケージド aa-tRNA をマウス受精卵や 2 細胞期胚などにマイクロインジェクションにより導入し、照射時の mOrange2 の合成を観察した。照射しないときもわずかに mOrange2 の発現が見られた点は改善を要するが、照射時の方が mOrange2 の合成がより強く見られた。

用いているケージド aa-tRNA はケージ（保護）が外れると細胞内でセリル化される仕組みなので、照射により特異的にするためには、(1) ケージ部分を含めた 3' 側の構造が不完全なものを合成・調製時に除ききる、あるいは(2) 直交的な tRNA を用いることが今後必要である。

(3) マウス初期胚における PGC-1 α の光依存的合成

PGC-1 の cDNA を入手して転写合成により mRNA の作製を行った。アンバーコドンを含む変異体 mRNA も作製した。mRNA には CAP および poly A を付加した。この mRNA をウサギ網状赤血球由来 in vitro 翻訳系に加えて反応を行ったところ、野生型の PGC-1 ですら非常に合成効率が低く、効率改善も困難であった。したがってマウス受精卵内での翻訳も困難である。そこで現在、同様に受精卵や初期胚のミトコンドリア数の上昇を導く他のタンパク質に切り替えて（現在、その cDNA の選定を終え、入手手配中）光依存的な合成を試みようとしている。

今後の研究により、動物の初期胚に対する本技術の利用法の確立と、事例として初期発生におけるミトコンドリア数上昇に関わるタンパク質の局所的発現とその役割解明を引き続き目指したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Wakai T., Fissore R.A.

Constitutive IP3R1-mediated Ca²⁺ release reduces Ca²⁺ store content and stimulates mitochondrial metabolism in mouse GV oocytes.

Journal of Cell Science, 査読有, 132 (2019) DOI: 10.1242/jcs.225441.

Shiraga K., Soe T. H., Matsumoto S., Watanabe K., Ohtsuki T.

Red and near-infrared light-directed cytosolic delivery of two different RNAs using photosensitive RNA carriers.

Bioconjugate Chemistry, 査読有, 29, 3174-79 (2018) DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00487

渡邊 和則、大槻 高史

創薬を支える光技術

月刊光アライアンス (6 月号) 査読無, pp.1-4 (2018)

Kim H., Kitamatsu M., Ohtsuki T.

Enhanced intracellular peptide delivery by multivalent cell-penetrating peptide with bioreducible linkage.

Bioorg. Med. Chem. Lett., 査読有, 28, 378-381 (2018) DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.12.035

Bui T.M.T., Nguyen K.X., Karata A., Ferre P., Tran M.T., Wakai T., Funahashi H.

Presence of vascular endothelial growth factor during the first half of IVM improves the meiotic and developmental competence of porcine oocytes from small follicles.

Reproduction, Fertility and Development. 査読有, 29, 1902-9 (2017) DOI: 10.1071/RD16321

[図書] (計1件)

Wakai T., Mehregan A., Fissore R.A., Fertilization and the Signaling of Egg Activation. Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). 2: 368-375. 2018

[学会発表](計5件)

野村瑠莉、月向はるな、舟橋弘晃、若井拓哉、「着床前マウス胚におけるミトコンドリア分裂因子 Drp1 の役割」第18回日本ミトコンドリア学会、久留米、2018年12月7日

大槻高史、白神 かおり、渡邊 和則、「光依存的な RNA 導入法による2種類の RNA の時間差導入」第91回日本生化学会大会、京都、2018年9月24~26日

三好 祐一、山本 怜見、門野 真保、北松 瑞生、渡邊 和則、大槻 高史、「光に応答し細胞質内に侵入する機能性光増感剤ペプチドの設計」第91回日本生化学会大会、京都、2018年9月24~26日

大槻高史・神崎重人・西村紗恵・国広芳朗・渡邊和則、ケージドアミノアシル tRNA を用いたタンパク質合成の光誘導、第11回バイオ関連化学シンポジウム、東京、2017年9月7~9日

若井拓哉、卵母細胞における小胞体 Ca²⁺ の制御とその役割、第35回日本受精着床学会(招待講演)2017年7月20~21日

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/ohtsuki/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：若井 拓哉

ローマ字氏名： Takuya Wakai

所属研究機関名：岡山大学

部局名：環境生命科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60557768