

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14357

研究課題名（和文）真核系における環状RNA翻訳反応の機構解析

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms of circular RNA translation in eukaryotic systems

研究代表者

阿部 奈保子（Abe, Naoko）

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：70772119

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：1. 環状RNA翻訳反応の塩基配列依存性を明らかにした。2. 2つの非翻訳領域間で塩基対を形成することで形成した擬環状構造が、直鎖状mRNAの翻訳効率を向上させた。3. 環状RNAの化学的連結法による合成法を検討し、生ずる非天然連結部位を含むRNAが翻訳されうることを明らかにした。4. ホスホロチオエート修飾を5'非翻訳領域に限定的に導入したmRNAが大腸菌無細胞翻訳系において大きく翻訳活性を向上させた。これによりmRNAの翻訳活性向上には位置特異的な化学修飾導入が有効な手法であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来起こりにくいと考えられてきた環状RNAの翻訳反応が起こりうること、塩基配列が翻訳効率に与える影響について検証し明らかにした。mRNAを医薬品として用いるに際しその安定性向上や翻訳能向上が必要であり、そのための方法論を多角的に検証した。その結果、今後の核酸医薬品の開発に役立つ知見を得た。

研究成果の概要（英文）：1. Sequence dependence of the circular RNA translation was revealed. 2. It was shown that the translation efficiency of linear mRNA having a pseudocyclic structure was improved. 3. A synthetic method of chemically linking circular RNA was examined, and it was shown that mRNA containing unnatural linkage could be translated. 4. The mRNA in which the phosphorothioate modification was introduced in the 5'untranslated region in a limited manner greatly improved the translation activity in the E. coli cell-free translation system. This indicates that the introduction of position-specific chemical modification is an effective method for improving the translational activity of RNA.

研究分野：核酸化学

キーワード：環状RNA 翻訳反応

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、内部リボソーム進入部位 (IRES) を特段導入していない合成人工環状 RNA が、ヒト培養細胞中やウサギ網状赤血球翻訳液中で翻訳されうることを見出した (図 1,2) (N. Abe *et al.*, *Sci. Rep.* 2015, 5, 16435)。これらの環状 RNA は連続的な読み枠を持つため、一たん環上で反応が開始されるとリボソームが環状 RNA 上を複数回まわりながらペプチド鎖を合成する(ローリングサークル型反応)(図 1)。その結果、反復配列からなる長鎖のペプチド生成物が生じる(図 2)。真核生物の翻訳系で働く mRNA は一般的にモノシストロン性であり、その翻訳開始は 5' 末端依存的である。加えて、真核生物のリボソームは環状 RNA に結合しないことが報告されている(*Nature* 1979, 280, 82)。研究代表者の最近の発見は、従来の学術的知見に相反するといえた。2010 年代になり、内因性の環状 RNA が従来考えられてきたより多量に細胞内に存在することが明らかになってきた。これら内因性環状 RNA の機能には未だ不明な点が多い。環状 RNA の翻訳反応の機構について調べるとともに、これら内因性環状 RNA の翻訳可能性についても検討したいと考えた。

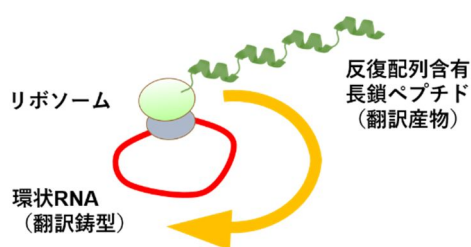


図 1. 環状 RNA を鋳型にした連続的(ローリングサークル型)翻訳反応の模式図

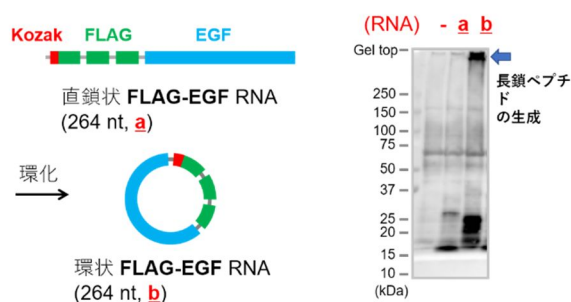


図 2. 環状 RNA のウサギ網状赤血球溶解液中の翻訳反応

### 2. 研究の目的

これまで実施した研究の中で、真核細胞内で翻訳されることを確認した配列は数種類のみであった。実験結果から、RNA 配列がその翻訳能に大きく影響することが分かっていたが、主たる要因が明らかでなかった。そのため、異なる配列を持つ環状 RNA を設計・合成し、その翻訳反応を比較・検討したいと考えた。環状 RNA を合成する際には酵素リガーゼを用いた連結反応についても配列依存性が確認されており、収率よく合成できないことも多かった。そのため、多くの環状 RNA を設計・合成しその翻訳活性を調べるために、環状 RNA の効率的合成法についても検討が必要と考え、効率的な環状 RNA 合成方法の確立も目的とした。

### 3. 研究の方法

環状 RNA は、主に RNA 配列をコードする鋳型 DNA から T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写した RNA を、酵素 T4 RNA リガーゼ 2 を用い、短鎖鋳型 DNA 上で連結することで合成した。ホスホチオエート修飾 RNA は T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応液に 1-thio-NTP を添加することで得た。RNA の翻訳活性評価には、主にウサギ網状赤血球溶解液、ヒト由来培養細胞(HeLa)系、大腸菌再構成型無細胞翻訳液(PURE system)を用いた。翻訳反応の評価はウェスタンブロット法、蛍光顕微鏡観察により実施した。

### 4. 研究成果

環状 RNA 翻訳反応の塩基配列依存性について調べた。我々が真核細胞翻訳系で翻訳されることを見出した、264 塩基からなる環状 RNA の配列 (Sci. Rep. 2015)を一部置換し、その影響を無細胞翻訳系(ウサギ網状赤血球溶解液)を用いて調べた。その結果、FLAG コード配列を除去すると翻訳量が減少することが分かった。FLAG コード配列部分の低 GC 含有率が環状 RNA の高次構造形成を軽減し、翻訳反応の開始または伸長に正の寄与をするものと推測した。さらに環状 RNA の高次構造形成が翻訳反応に与える影響を知るため、コドンと同義置換し GC 塩基含有量を低下させた。その結果、GC 含有量を低減させた環状 RNA の翻訳量は返って減少することが分かった。多くの場合、GC 含有量を低減することは低使用頻度のコドンへの置換につながったため、直鎖状 RNA の翻訳反応で知られているのと同様に、これが環状 RNA の翻訳反応に大きく影響したのと考えている。

真核生物の直鎖状 mRNA は 5'末端にキャップ構造、3'末端側にアデニンが連続したポリ A 鎖という特殊な構造を持つ。キャップに結合する翻訳開始因子である eIF4E に eIF4G が結合し、ポリ A 鎖に結合するタンパク質である PABP が eIF4G と相互作用する。この mRNA の環状複合体形成は、mRNA の安定化やリボソームのリサイクル促進による翻訳反応効率化に寄与する

ことが知られている。そこで、この環状構造形成を2次元的に模倣することでRNAの翻訳効率を上昇させられないかと考えた。2つのUTR間で塩基対を形成しうる mRNA, ds\_Rluc を設計・合成し、2つのコントロール配列 ss\_Rluc, cap-polyA\_Rluc ととも真核生物無細胞翻訳系(ウサギ 網状赤血球溶解液)にてこれらを翻訳し、ルシフェラーゼアッセイ法によりその効率を比較した。その結果、ss\_Rluc に比較し、ds\_Rluc からはおよそ3倍の翻訳産物が生じた。加えて、ds\_Rluc は、5'キャップ構造及びポリ A 鎖を持つ cap-polyA\_Rluc とほぼ同等の翻訳効率を示した。続いて ds\_Rluc, および ss\_Rluc の翻訳液中での安定性を評価した結果、安定性は同程度であり両者に差はなかった。これらの実験結果から、UTR 間で塩基対を形成することで環状構造を取りうる ds\_Rluc の遺伝子発現効率が上昇したこと、およびその効率上昇は RNA の安定性向上に起因しないことが分かった。期待したとおり、mRNA が環状構造を取ることでリボソームのリサイクリングが促進された可能性が示唆された。本研究結果は学術雑誌 *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 1-9(2019)に発表した。

環状 RNA の化学的連結法による合成法を検討し、生ずる非天然連結部位を含む RNA が翻訳されうることを明らかにした。一般にリガーゼ酵素を用いて直鎖状 RNA の両端を連結し環状 RNA を作成する。リガーゼは高価で、また一定の温度以上の反応条件を設定することは難しい。そのため、より実用的な合成法として、末端にリン酸基とアミノ基を有する RNA 断片から、P-N 結合を介した化学的連結反応による環状 RNA の化学合成を試みた。その結果、P-N 結合を有する環状 RNA においてもローリングサークル型翻訳反応が進行することを確認した。本研究結果を学術雑誌 *Chem Commun*, 56, 6217-6220 (2020) に発表した。

次に、ホスホロチオエート(PS)修飾を導入することで環状 RNA の翻訳効率を増加させられないかと考えた。最初に、PS 修飾を導入した直鎖状 RNA を作成し、直鎖状 RNA の翻訳反応に正の効果を与えるかどうかを検証した。大腸菌無細胞翻訳系を用いてこれら PS 修飾 mRNA の翻訳活性を評価した結果、PS 修飾は(1) オープンリーディングフレーム(ORF)に導入すると翻訳反応を阻害すること、(2) 5' 非翻訳領域 (UTR)に導入すると翻訳反応の開始反応を促進すること、が明らかになった。本知見をもとに、直鎖状 mRNA の 5'UTR のみに PS 修飾を導入した RNA を、2本の RNA 鎖をリガーゼで連結することで作成し、その翻訳活性を未修飾のものと比較した結果、部分的 PS 修飾 mRNA は未修飾 mRNA に比較し約 2 2 倍の翻訳反応産物を与えた。本結果から、RNA の翻訳活性向上のために、位置特異的な化学修飾導入が有効な手法であることが分かった。本研究結果を学術雑誌 *Angewandte Chemie* 59, 17403-17407 (2020) に発表した。現在、この知見を活かし、より翻訳活性の高い環状 RNA の開発を行っている。

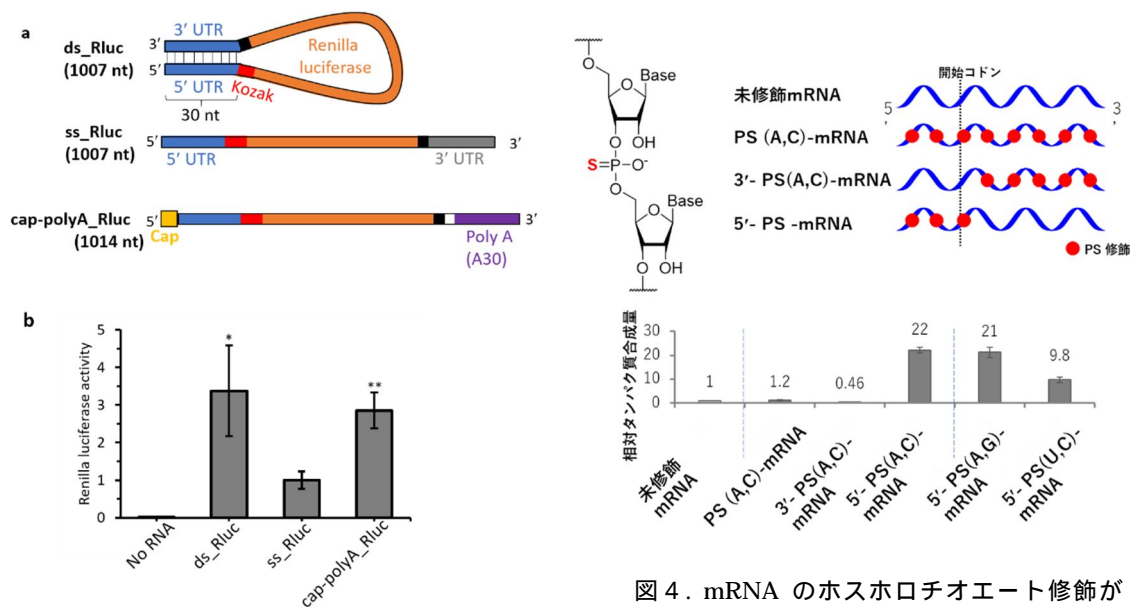


図3. 疑似環状 RNA 形成がウサギ網状赤血球溶解液中の翻訳反応を促進した。

図4. mRNA のホスホロチオエート修飾が PURE システム中の mRNA 翻訳反応の開始を促進した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhaoma Shu, Azumi Ota, Yukiya Takayama, Yuri Katsurada, Kosuke Kusamori, Naoko Abe, Kosuke Nakamoto, Fumiaki Tomoike, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Makiya Nishikawa, Yasuaki Kimura and Hiroshi Abe	4. 巻 68
2. 論文標題 Intracellular delivery of Antisense DNA and siRNA with amino groups masked with disulfide units	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletins	6. 最初と最後の頁 129-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00811	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 該当する
1. 著者名 Kosuke Nakamoto, Naoko Abe, Genichiro Tsuji, Yasuaki Kimura, Fumiaki Tomoike, Yoshihiro Shimizu and Hiroshi Abe	4. 巻 56
2. 論文標題 Chemically synthesized circular RNAs with phosphoramidate linkages enable rolling circle translation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6217-6220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC02140G	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 該当する
1. 著者名 Daisuke Kawaguchi, Ayumi Kodama, Naoko Abe, Kei Takebuchi, Fumitaka Hashiya, Fumiaki Tomoike, Kosuke Nakamoto, Yasuaki Kimura, Yoshihiro Shimizu, and Hiroshi Abe	4. 巻 59
2. 論文標題 Phosphorothioate Modification of mRNA Accelerates the Rate of Translation Initiation to Provide More Efficient Protein Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 17403-17407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202007111	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 該当する
1. 著者名 Yasuaki Kimura, Zhaoma Shu, Mika Ito, Naoko Abe, Kosuke Nakamoto, Fumiaki Tomoike, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito and Hiroshi Abe	4. 巻 56
2. 論文標題 Intracellular Build-up RNAi with Single-Strand Circular RNAs as siRNA Precursors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 466-469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CC04872C	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 該当する

1. 著者名 Daisuke Kawaguchi, Saaya Shimizu, Naoko Abe, Fumitaka Hashiya, Fumiaki Tomoike, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe	4. 巻 39
2. 論文標題 Translational control by secondary-structure formation in mRNA in a eukaryotic system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 195-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1671593	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 Zhaoma Shu, Azumi Ota, Yukiya Takayama, Yuri Katsurada, Kosuke Kusamori, Naoko Abe, Kosuke Nakamoto, Fumiaki Tomoike, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Makiya Nishikawa, Yasuaki Kimura and Hiroshi Abe	4. 巻 68
2. 論文標題 Intracellular delivery of Antisense DNA and siRNA with amino groups masked with disulfide units	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletins	6. 最初と最後の頁 129-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuaki Kimura, Zhaoma Shu, Mika Ito, Naoko Abe, Kosuke Nakamoto, Fumiaki Tomoike, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito and Hiroshi Abe	4. 巻 56
2. 論文標題 Intracellular Build-up RNAi with Single-Strand Circular RNAs as siRNA Precursors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 466-469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cc04872c	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 Akihiro Imaeda, Fumiaki Tomoike, Mayu Hayakawa, Kosuke Nakamoto, Yasuaki Kimura, Naoko Abe, Hiroshi Abe	4. 巻 38
2. 論文標題 N6-methyl adenosine in siRNA evades immune response without reducing RNAi activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 972-979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1641205	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 Zhaoma Shu, Iku Tanaka, Azumi Ota, Daichi Fushihara, Naoko Abe, Saki Kawaguchi, Kosuke Nakamoto, Fumiaki Tomoike, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe	4. 巻 58
2. 論文標題 Disulfide unit conjugation enables ultrafast cytosolic internalization of antisense DNA and siRNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6611-6615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201900993	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川口大輔、児玉亜有実、阿部奈保子、竹淵慧、橋谷文貴、友池史明、中本航介、木村康明、清水義宏、阿部洋
2. 発表標題 翻訳反応サイクルを加速する人工mRNAの開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口大輔、児玉亜有実、阿部奈保子、竹淵慧、橋谷文貴、友池史明、中本航介、木村康明、清水義宏、阿部洋
2. 発表標題 化学修飾核酸の合成と核酸医薬への応用
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部奈保子、川口大輔、児玉亜有実、橋谷文貴、木村康明、清水義宏、阿部洋
2. 発表標題 RNAのホスホロチオエート修飾による翻訳反応の促進
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口 大輔、清水 沙彩、阿部 奈保子、友池 史明、木村 康明、阿部 洋
2. 発表標題 二次構造形成によるmRNAの翻訳反応制御
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 大輔、清水 沙彩、阿部 奈保子、友池 史明、木村 康明、阿部 洋
2. 発表標題 二次構造形成によるmRNAの翻訳反応制御
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Abe, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Circular RNA for protein translation
3. 学会等名 FNA Perth 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 阿部奈保子、阿部洋	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 5 (389-393)
3. 書名 核酸科学ハンドブック、第III部、6. 環状核酸	

1. 著者名 川口大輔、阿部奈保子、阿部洋	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 7 (24-29)
3. 書名 化学 第75巻第10号 解説 翻訳反応サイクルを加速するmRNA分子	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------