

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20750145  
 研究課題名 (和文) 非リボスイッチ型・分子応答性タンパク質発現バイオセンサーの開発

研究課題名 (英文) Development of a molecule-dependent protein expression system that is different from natural riboswitches and its application to biosensors

研究代表者

小川 敦司 (OGAWA ATSUSHI)

愛媛大学・上級研究員センター・上級研究員

研究者番号：30442940

研究成果の概要 (和文)：特定の分子が存在する時のみ、その濃度に応じてタンパク質が発現する仕組みを2つ作った。1つは原核細胞の翻訳システム中で働くもので、もう1つは真核細胞の翻訳システム中で働くものである。これらの分子応答性タンパク質発現システムは、生体システムを利用しているため、生体内外におけるバイオセンサーとして期待できる。また、簡単な調整によって、ターゲット分子を変換することができるため、汎用性も高い。

研究成果の概要 (英文)：Two novel gene regulation systems that are controlled by specific molecules have been constructed. One works in a prokaryotic translation system and the other does in a eukaryotic one. These systems are biological ones and target molecules can be changed with simple adjustments, so that they are expected to be used as versatile biosensors both in vitro and in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：生体機能関連化学

#### 1. 研究開始当初の背景

生体内外に存在する様々な分子 (イオン・有機小分子・タンパク質など) を検出することは、我々や地球の健康状態を知るために非常に重要である。さらに、その濃度に応じて有用な手段を講じることができれば、医療・環境保全などの面において大きな貢献が期待できる。この『有用な手段』を『検出分子

に対して有効なタンパク質の発現』と捉えると、「検出分子に応答してタンパク質を発現させる技術」はその強力なツールとなる。

一方、分子応答性タンパク質発現システムは元来生物が有しており、近年発見された『リボスイッチ』はその代表例である。ただし、天然のリボスイッチは、特定の代謝産物に応答するシステムしか持ち合わせていな

いため、様々なターゲット分子に対応させるためには、人工的にリボスイッチをデザイン・構築する技術が必要となる。この目的を達成するべく、国内外において人工リボスイッチの研究が精力的に行われているが、これまでに開発された一般的な『アプタマーを用いた人工リボスイッチ』は、アプタマー部位とレギュレーション部位が重複しており、そのデザイン方法において一般性・汎用性が欠けていた。このため、通常のリボスイッチとは異なる、「非リボスイッチ型の分子応答性タンパク質発現システム」の構築が必要不可欠であると判断し、本研究課題の着想に至った。

## 2. 研究の目的

これまでに報告されている、アプタマーを用いた「リボスイッチ型分子応答性タンパク質発現システム」とは異なる、アプタザイム基盤の「非リボスイッチ型分子応答性タンパク質発現システム」を開発することを目的とする。究極的には、真核細胞内に存在する「悪性分子」に反応して「それを不活性化させるタンパク質」を発現させるようなシステムの構築を長期目標としているが、本研究課題期間内（2年）においては、その基礎となる「特定分子に反応してレポータータンパク質を発現するバイオセンサーシステム」の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 原核細胞系非リボスイッチバイオセンサーの開発

- ①レポーター遺伝子ルシフェラーゼのセンスコドンの1つを終止コドンの1つであるアンバーコドンに置き換えたものを作成する。
- ②分子応答性自己切断型リボザイムである「アプタザイム」をアンバーコドン対応サブプレッサーtRNA(Ser)の5'末端もしくは3'末端に連結させたものを作成する。
- ③①および②で調製した鋳型DNAを大腸菌系翻訳システム中で、転写・翻訳する。この際、ターゲット分子を様々な濃度で加えておく。
- ④レポータータンパク質の発現を測定し、ターゲット分子濃度依存性を調べる。
- ⑤①～④を繰り返しながら、配列を論理的に最適化する。

(2) 真核細胞系非リボスイッチバイオセンサーの開発

- ①レポータータンパク質であるルシフェラーゼの遺伝子上流に真核細胞（コムギ胚芽）翻訳システム用のエンハンサー配列E01を導入し、さらにその上流に分子依存性の自己切断型アプタザイム配列を導入して、ターゲット分子存在下(ON state)でのみE01の5'側

で切断が起こるような mRNA を設計・調製する。

②次に、ターゲット分子非存在下(OFF state)におけるルシフェラーゼ発現効率が低くなるように、mRNAの5'末端配列を最適化する。また、アプタザイム配列内に偽遺伝子を導入することで、OFF stateでの発現をさらに低下させる。

③①・②で設計した mRNA をコムギ胚芽の抽出液中で翻訳する。この際、ターゲット分子を様々な濃度で加えておく。

④レポータータンパク質の発現を測定し、ターゲット分子濃度依存性を調べる。

⑤①～④を繰り返しながら、配列を論理的に最適化する。

## 4. 研究成果

(1) 原核細胞系非リボスイッチバイオセンサーの開発

アプタザイム・サブプレッサーtRNA連結体を用いることによって、「非リボスイッチ型の分子応答性タンパク質発現システム」を原核細胞系で構築することに成功した。具体的には、レポーター遺伝子ルシフェラーゼのSer60コドンアンバーコドンに置き換えたものと、分子応答性アプタザイムをサブプレッサーtRNA(Ser)の5'末端に連結させたものを作成し、大腸菌系の翻訳システムと組み合わせた。標的分子が存在しないと、ルシフェラーゼの翻訳はアンバーコドン部位で終了するが、標的分子が存在すると、アプタザイムが切断されてサブプレッサーtRNAが活性化し、アンバーコドンがサブプレッションされるため、全長のルシフェラーゼが発現する、という仕組みである(図1)。

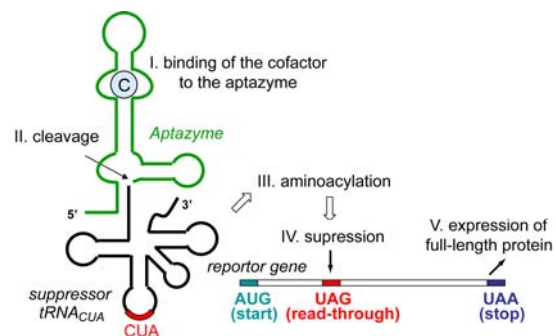


図1：アプタザイム-サブプレッサーtRNA連結体およびアンバーコドン導入遺伝子を用いた原核細胞系分子応答性タンパク質発現システム

実際に、テオフィリン依存性のアプタザイムを用いた例では、高い分子応答性を示した(図2)。この分子応答性タンパク質翻訳システムは、天然に存在しない全く新しい遺伝子発現制御技術であり、通常のリボスイッチ型タンパク質翻訳システムと比しても、応答性は遜色ない。また、アプタザイムを標的分子に合わせて分子進化法で獲得することが

可能であることから、あらゆる分子に対してシステムを構築することができ、一般性も極めて高い。本技術は、生体外および原核細胞内の新しい分子検出法として期待される。また、本技術はリボスイッチの代替としても使用可能であるため、合成生物学や生体システムを用いた論理回路への応用が期待される。

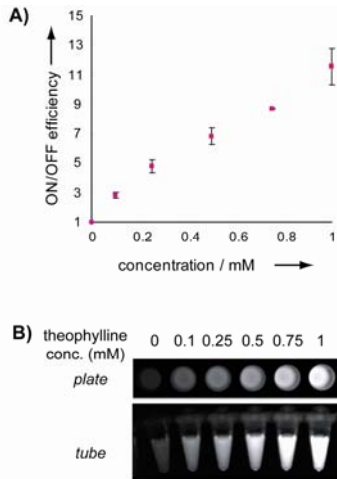


図2：テオフィリン依存性アプタザイムを用いた例  
(A) テオフィリン濃度に依存したタンパク質発現効率 (ON/OFF)  
(B) テオフィリン濃度に依存したルシフェラーゼ発現

## (2) 真核細胞系非リボスイッチバイオセンサーの開発

『アプタザイム』および『ターゲット非存在下での翻訳効率を低下させる配列』を mRNA 上流に組み込むことにより、真核細胞系で働く「非リボスイッチ型の分子応答性タンパク質発現システム」を構築することに成功した。本システムのメカニズムは図3に示した通りで、ターゲット非存在下では、mRNA の5'末端の GGG 2本鎖および5'非翻訳領域に導入された疑似遺伝子によって翻訳が抑制さ

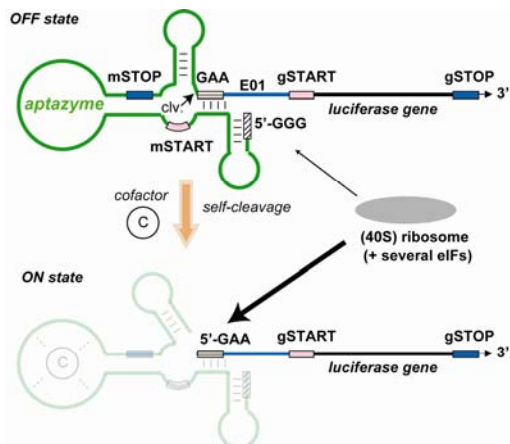


図3：アプタザイムおよび翻訳阻害配列導入遺伝子を用いた真核細胞系分子応答性タンパク質発現システム

れるが、ターゲット存在下では、アプタザイムの自己切断により、翻訳活性の高いエンハンスー配列を有したレポーター遺伝子が発現するため、翻訳活性が激増する仕組みとなっている。

本システムにおける「アプタザイム活性→タンパク質発現」変換効率は非常に高く、バイオセンサーとしての感度は、上記の原核生物系のシステムに比して数十倍となった。図4にテオフィリンを用いた例を示す。

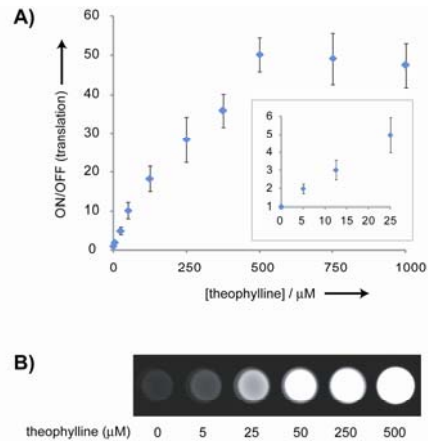


図4：テオフィリン依存性アプタザイムを用いた例  
(A) テオフィリン濃度に依存したタンパク質発現効率 (ON/OFF)  
(B) テオフィリン濃度に依存したルシフェラーゼ発現

また、本システムは、原核のシステムと同様に、アプタザイムを変換するだけで標的分子を変更できるため、一般性も極めて高い。実際に、テオフィリン依存性アプタザイムを cGMP 依存性のアプタザイムに変換するだけで、cGMP に応答するタンパク質発現システムを構築することに成功した。本システムは、本研究課題の研究目的である「検出分子に応答してタンパク質を発現させる技術の開発」を十分に満たしているだけでなく、当初の方法で予想していたよりも遥かに高いパフォーマンスを示すものとなった。実際の真核生物中でうまく働くかどうかは調査段階であるが、本システムは真核細胞内のバイオセンサーとしてのプロトタイプとして、また、外部刺激応答性ドラッグタンパク質翻訳システムとしての応用が期待される

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Atsushi Ogawa、Biofunction-Assisted Sensors Based on a New Method for Converting Aptazyme Activity into Reporter Protein Expression with High Efficiency in Wheat Germ Extract、ChemBioChem、査読有、10、2009、2465-2468

② Atsushi Ogawa, Mizuo Maeda, A Novel Label-Free Biosensor Using an Aptazyme-Suppressor-tRNA Conjugate and an Amber Mutated Reporter Gene, ChemBioChem, 査読有、9、2008、2204-2208

〔学会発表〕(計8件)

① 小川敦司、真核生物の無細胞翻訳システムを利用したアプタザイム基盤バイオセンサー、日本化学会第90春季年会、2010/03/28、東大阪

② Atsushi Ogawa、Aptazyme-Based Biosensors Using a Eukaryotic Cell-Free Translation System、The 6th International symposium on Nucleic Acid Chemistry、2009/09/29、高山

③ 小川敦司、分子応答性タンパク質発現システムの開発、第3回無細胞生命科学研究会、2009/03/17、弘前

④ 小川敦司、サプレッサーtRNA基盤リボスイッチシステムの開発、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008/09/18、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 敦司 (OGAWA ATSUSHI)

愛媛大学・上級研究員センター・上級研究員

研究者番号：30442940

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：