

RNAの環状化を用いた新規タンパク質合成法の検討

応用生物科学部 応用生命科学課程 佐藤杏香

1. 研究テーマを選んだ動機

近年タンパク質などの生体分子を薬として用いる研究が急増している。2018年に本庶佑先生が免疫チェックポイントの阻害因子であるニボルマブを発見したことがこの有名な例である。このような医薬品の多くは、生体の免疫システムである抗体が特定の抗原を特異的に認識する性質を利用した抗体医薬であり、現在用いられている例として関節リウマチの治療薬などが挙げられる。タンパク質はアミノ酸からなる高分子であるが、アミノ酸は20種類あるため、無限大に種類を増やすことができる。この特徴からタンパク質は様々な病気の医薬品として用いることができるのではないかという可能性に多くの研究者が期待している。このことはつまり、従来の薬に比べ種類が急増することとすることに繋がる。そこで、課題となるのはタンパク質医薬の保存期間が短いことである。合成医薬と異なりタンパク質は長期保存には向いておらず、的確に患者の元へと届けることは難しいことが推測できる。そこで、必要なタンパク質を必要な分だけ合成する技術が求められている。

糖尿病患者の治療に用いられるインシュリンもタンパク質を利用した薬の一種である。従来のインシュリンのようなタンパク質医薬品は大腸菌や酵母によって合成されているが、精製に難があり、大きなプラントを要求するため先のテーマには合わない。そこで、精製が容易である無細胞系と呼ばれる非生物システムによる合成法が有用であると考えた。本研究では特殊なRNAを用いて無細胞系でも安定して、タンパク質を効率よく合成するための技術を検討し、検証した。また、本技術をさらに安定化させ、有用なものとするために理論レベルでどのような改善点があるかを検討する。

2. 研究環境について

本研究における実験パートはiGEM GIFU TOKAI チームからのデータを用いている。実験については実際に自身が行ったものである。iGEMとはInternational Genetically Engineered Machine competitionの略であり合成生物学の世界最大級の大会のことである。毎年10月にアメリカ合衆国のボストンで大会が行われ、発表内容を伝えるためにホームページの作成、ポスターセッション、オーラルプレゼンテーションなどを行う。iGEMにはマサチューセッツ工科大学やハーバード大学をはじめとする世界の一流大学が数多く出場している。また、iGEM GIFU TOKAI チームは2014年に設立された岐阜大学のiGEMチームである。昨年度のiGEM Giant Jamboree 2019にて発表した研究はiVEPOP (*in vitro* eternal expression of protein)であり、環状RNAをもちいた無細胞系でのモノマータンパク質の発現についての発表を行い、銅賞を受賞した。本稿ではこの研究

を紹介するとともに、当該プロジェクトの改善点を提案することとする。

3. 生命の鎖 DNA, RNA, タンパク質

DNA はデオキシリボ核酸、RNA はリボ核酸を示している。全ての生物は形質を子孫に伝えるために DNA と呼ばれる遺伝物質を持つ。DNA はタンパク質の設計図としての役割を主に担い、生物の構造や特徴を決定づけている。DNA は RNA へと一旦情報が読み取られる。この過程は転写と呼ばれる。転写された RNA はリボソームと呼ばれる細胞小器官により翻訳され、これをもとにタンパク質が合成される。

DNA および RNA は共に核酸とよばれ、塩基、糖、リン酸から構成されるヌクレオチドが連なった構造をしている。

DNA には遺伝情報が塩基配列として保持されており、DNA の塩基には A (アデニン)、T (チミン)、G (グアニン)、C (シトシン) が用いられ、RNA では T (チミン) の代わりに U (ウラシル) が用いられる。DNA が二重螺旋構造をとるのに対し、RNA は基本的には一本鎖構造をとる。DNA と RNA はどちらも五単糖が用いられるが、DNA にはデオキシリボース、RNA にはリボースが用いられる。ヌクレオチドが結合する際にはホスホジエステル結合を形成し、連結していく(「図.1 拡散の構造」参照)。DNA が生体情報として利用される際、分子生物学のセントラルドグマというプロセスを利用する(「図.2 分子生物学のセントラルドグマ」参照)。分子生物学のセントラルドグマは2段階の反応から構築される。まず、DNA が転写され mRNA が作られる反応である。転写とは DNA の塩基配列が読み取られ、RNA に情報が写し取られる段階を指す。DNA が mRNA に転写される際は RNA ポリメラーゼという酵素が反応を触媒する。転写されてできた mRNA はリボソームと結合し、塩基配列が読み取られ暗号に対応するタンパク質に翻訳される。翻訳後、タンパク質はフォールディング (折りたたみ) という過程を経て、機能を保持するようにな

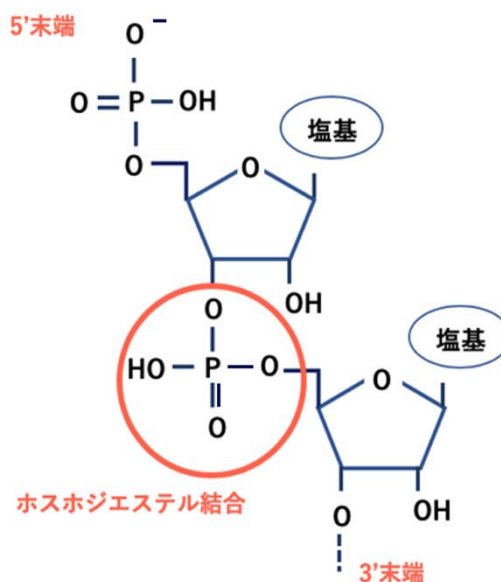


図.1 核酸の構造



図.2 分子生物学のセントラルドグマ

当研究では DNA をあらかじめ RNA に転写しておき、これを生化学的に改変する事で翻訳を安定させることを考えた。通常、RNA は線状の構造を取り、一本鎖として液体中で浮遊する。当研究では、この一本鎖 RNA の端同士を結合させることで、環状化するということを検討した。詳細については以下5章で解説する。

4. タンパク質の合成について

タンパク質は生物の重要な構成成分の一つである。生体内ではホルモンや抗体、酵素等として働く重要な役割を果たしており、特定のタンパク質が不足することで生命活動が維持できなくなる恐れがある。一般にタンパク質といえば、牛肉や豚肉などが思い浮かぶが、タンパク質には機能性を保持する種類が存在する。例えば、パイナップルにはパパインと呼ばれる酵素が含まれる。パイナップルと肉を混ぜた料理で肉が柔らかく感じるのはこのためである。

タンパク質はアミノ酸から出来ている。一般にタンパク質のアミノ酸配列を一次構造、規則的に見られる立体構造を二次構造、さらに複雑な立体的構造を三次構造と呼ぶ。つまり、タンパク質は複数のアミノ酸が結合し、立体構造をとったものであり、用いられるアミノ酸の種類により無数のタンパク質が存在する。

5. 翻訳機構の律速段階

真核生物でも原核生物でも根幹となる反応は上記の通りであるが、転写後に行われる RNA プロセッシングや翻訳後に行われる反応が真核生物では複雑なため、次の説明は原核生物に話を限定する。

原核生物のリボソームは細胞質中に遊離した状態で存在し、開始コドンを認識すると翻訳が開始する。その後リボソームは塩基配列に対応するアミノ酸を合成し、終止コドンで認識すると再び乖離される。mRNA が翻訳プロセスに突入する際、3段階の反応に分けられる(「図.3 反応機構の概説」参照)。1段階目が mRNA とリボソームが結合し、反応が開始される段階である。これは Initiation とも呼ばれる。2段階目はタンパク質が合成される反応である。これは Elongation とも呼ばれる。3段階目はタンパク質合成が終了する反応である。これは Termination とも呼ばれる。リボソームは翻訳が終了すると mRNA から乖離し、再びタンパク質を合成するためにはリボソームが再度 mRNA に結合する必要がある。mRNA の翻訳プロセスにおいて、先行研究によれば最も時間のかかる段階、すなわち律速段階は Initiation であると推定^{*1}されている。したがって、本研究のターゲットとして Initiation Process の省略化方法を検討した。Initiation Process をスキップするには RNA を環状化させ、Termination をさせないという手段が一番簡便である。RNA は通常は線状の状態が存在する。線状 RNA の両端を結合させると、これは環状 RNA となる。タ

ンパク質をより効率よく合成するには律速段階である Initiation の回数を減らすことが重要であると考えられる。そこで、一度結合したリボソームを乖離させずに、常に RNA と結合した状態にすることができないかを考えた。

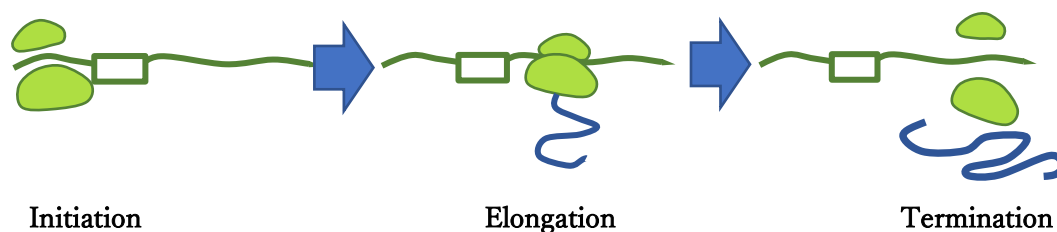


図.3 翻訳機構の概説

6. 環状 RNA によるタンパク質合成について

環状 RNA 上にリボソームを常に存在させ続けることで、リボソームが RNA 上で回転運動を続け、常にタンパク質を合成し続けるという研究は過去に Perriman と Ares によって行われている(「図.4 環状化 RNA」参照)。1998 年に Perriman と Ares は環状 RNA から終始コドンを省き Termination Process をなくすという方法で律速段階を回避する方法を検討した。そして、GFP を環状 RNA で発現できた^{*2,3} ことを報告している。これはタンデムリピート型の翻訳とも言え、数珠状にタンパク質が翻訳されている。ただし、Perriman と Ares はポリ GFP の発現には成功したが、そのタンパク質は簡単に凝集するため、蛍光を示すことはなかった。iGEM Gifu 2015 チームは同様の実験を RFP において行っているが、Perriman と Ares の結果と同様に 300 キロダルトンを超える大きな分子量を持つポリ RFP は生産したものの、それが蛍光を示すことはなかった。環状 RNA によってタンパク質を合成し、通常の線状 mRNA と効率を比較するという点では問題ないが、機能性のないタンパク質を合成するというのはナンセンスである。本研究では、この課題を解説するためにあえて終止コドンを挿入し、翻訳段階は終了させることにした、ただし、開始コドンと終始コドンの間を出来るだけ短くすることで、リボソームの乖離を防ぐ^{*4} ことを検討した。

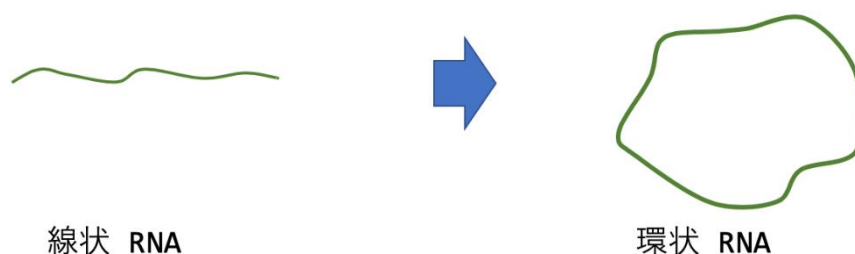


図.4 環状化 RNA

7. 実際に行った実験方法と結果

mRNAの両端と相補的な配列を持つ1本鎖DNAをガイドDNAとして用いて、T4RNAリガーゼでRNAの両端を接合*5した(「図.5 環状化の方法」参照)。

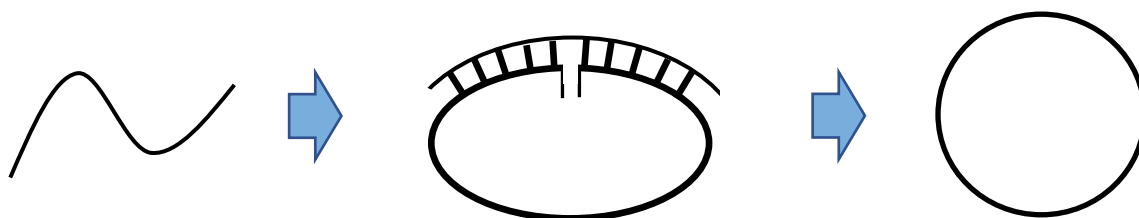


図.5 環状化の方法

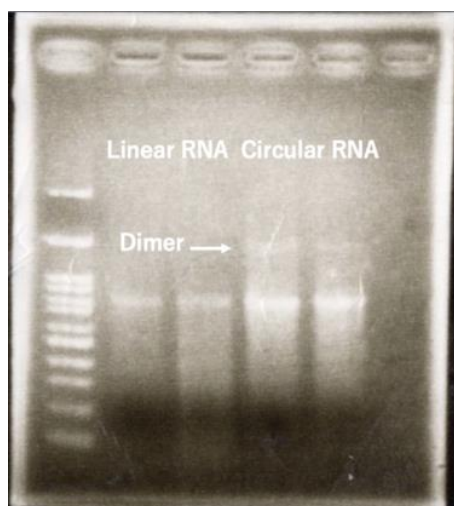


図.6 RNAの電気泳動結果

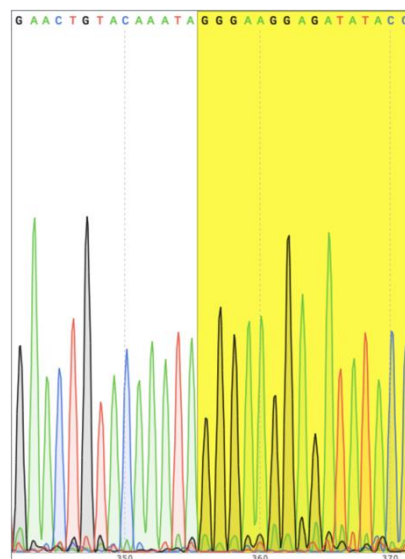
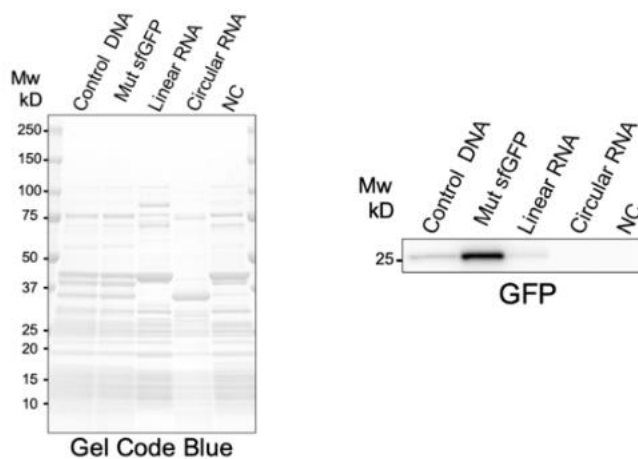


図.7 逆転写後のDNAシーケンサー

実験の結果として、環状RNAの合成には成功したが、環状化の効率は低く、タンパク質の合成をすることはできなかった。線状RNAと環状RNAを、3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行なった結果、環状RNAは観察されなかった(「図.6 RNAの電気泳動結果」参照)。最終的に逆転写後のDNAを、DNAシーケンサーを用いて確認した結果、環状RNAに特異



的な配列が確認されたため、環状 RNA が合成されていることが確認された

図.8 無細胞系でのタンパク質発現

(「図.7 逆転写後の DNA シーケンサー」参照)。また、線状 RNA と dimer を除去するため、RNase R を加えた結果、全ての RNA が分解されてしまった。RNase R は線状 RNA のみを選択的に分解する酵素であるため、このことから環状 RNA は十分量合成されていないことが確かめられた。環状 RNA からのタンパク質の発現を確認するため、myTXTL と PUREfex の二種類の無細胞系*6 を用いた。結果、タンパク質の発現は確認されなかった(「図.8 無細胞系でのタンパク質発現」参照)。これは RNA の環状化効率が低すぎたことに起因していると考えられる。したがって、当初の目的を達成するためには環状化の効率を上げる方法を検討する必要があるといえる。

8. 現状での方法における問題点

環状化の効率を上げるために、現状の方法での問題点について考えた。

仮説 1 GMP 取り込み効率が低い

線状の状態が存在する RNA には 5'末端側と 3'末端側が存在する。RNA を環状化するには RNA の 5'末端側 (先頭側) にモノリン酸基が必要となる。しかし、実際に通常通りに RNA を合成すると、転写の際に 5'末端側にトリリン酸基という別の官能基が付与されてしまう(「図.9 トリリン酸基(左)とモノリン酸基(右)」参照)。そこで、iGEM では転写反応化に GMP (グアノシンモノリン酸) という化合物を加えることで、転写をモノリン酸からスタートさせる方法を利用*7 した。しかし、本法の問題点として反応機構が不明な点があげられる。先行研究では極めて高効率に 5'末端側をモノリン酸化できていたが、iGEM でのデータではおよそ 50%以下しか 5'末端側をモノリン酸化できていない。5'末端側のモノリン酸化の効率が低い状態では RNA の環状化も十分に行うことが出来ないと考えられる。



図.9 トリリン酸基(左)とモノリン酸基(右)

仮説 2 ガイド DNA の濃度、もしくは配列長が適当でない

先行研究では短い RNA を環状化する実験が行われていたが、iGEM が検討する環状 RNA の長さはおおよそ 700 bp (700 塩基)と、先行研究よりも長い RNA である。配列長の差が反応の効率を左右するパラメータとなることは十分に考えられる。また、今回の実験で

はガイド DNA の濃度による RNA の環状化効率の関係性を検証していない。したがって、環状化反応の重要な要因であるガイド DNA の至適濃度、至適配列長の変化が RNA の環状化効率を左右する可能性は否定できない。さらに、この点については実験にて確認できていないので、新たに研究する点として有意義であると考えられる。

9. 環状化効率を上げる方法

今回は専門家に相談した結果、仮説1「GMP 取り込み効率が低い」がより検証の価値があるため、その方法論を検討した。

先に述べた通り、通常通り RNA を合成するとなると5'末端側にトリリン酸基が付与されてしまう。これではうまく環状化できない。そこで、このトリリン酸基をモノリン酸に変える酵素であるフォスファターゼ（脱リン酸化酵素）の利用を検討した。通常通り、合成した RNA をフォスファターゼによってモノリン酸化する。この方法の利点は反応機構が既知であることと、フォスファターゼと RNA の濃度を変えることで反応スピード、効率に変化を与えることができる点にある。つまり、環状化のために最適化された条件を、従来の GMP を加える方法に比べて見つけやすい可能性がある。この方法を検討することで環状 RNA によるモノマータンパク質の効率の良い合成を実現したいと考える。

10. iGEM GIFU が検討すべき方向性

以上の結果を踏まえ、iGEM Gifu では今後 GMP の取り込み効率を向上するために脱リン酸化酵素のフォスファターゼ、特にアルカリフォスファターゼを用いることが妥当であると考えられる。さらに、塩基配列が長い RNA では環状化が難しい*8 ということも報告されているため、短い配列の RNA を用いての実験を行い、環状化効率の向上に努めたい。

11. 参考文献

1. Gundula R. et al. (1994). The mechanism of translational coupling in Escherichia coli. The Journal of Biological Chemistry, 27,18118-18127
2. Laszlo J et al. (1994). Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. Biochemistry, 91, 4249-4253
3. Naoko A et al. (2015). Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells. Sci. Rep. 5, 16435; doi: 10.1038/srep16435
4. Inokuchi, Y. et al. (2000). Role of ribosome recycling factor (RRF) in translational coupling. The EMBO Journal. 19,3788-3798
5. Shimizu, Y. et al. (2001). Cell-free translational reconstituted with purified components. Nature biotechnology. 19, 751-755

6. Kao, C, Zheng, M. (1999). A simple efficient method to reduce nontemplated nucleotide addition at the 3' terminus of RNAs transcribed by T7 RNA polymerase. *RNA*, 5 1268-1272
7. Sabine, M. et al. (2017). In vitro circularization of RNA. *RNA Biology*. V.14(8), 1018-1027
8. Sonja, P et al. (2015). RNA circularization strategies in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Research*, vol 43, 2454-2465