

蛋白質の高効率生産法の開発

研究代表者

阿部 洋 名古屋大学理学部化学科 教授



1. 研究の背景と達成目標

我々が原核系で見出した新しい翻訳メカニズムである「タンパク質のローリングサークル増幅現象」を検証し、産業応用可能な技術として確立することを目指す。環状 RNA を鋳型とする本回転式翻訳反応を最適化し、タンパク質合成を高効率化する普遍性の高い方法論として確立する。特に、本現象が成立するか否かを真核生物翻訳系において検証し、その分子メカニズムを解析し、新規合成法として利用する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ 哺乳動物の翻訳系においても小さな環状 RNA を鋳型とするローリングサークル型翻訳反応が起こりうることを見出した。
- ・ 本現象のメカニズムについて解析した。現在までに、通常開始コドンとして機能するメチオニンコドンがない場合でも環状 RNA 上で翻訳反応が開始され、長鎖翻訳産物が生ずることを明らかにした。
- ・ 原核生物の翻訳系を用いたタンパク質生産の検討を行った。原核生物系においては、permuted intron-exon 法とよばれる自動スプライシング反応による環状 RNA 生成系を使用して、大腸菌体内における機能性長鎖ペプチド合成系を作成した。現在、その大量合成反応の条件を検討中である。
- ・ ヒト細胞内における環状 RNA 生成系を利用し、読み枠を連続させることで機能性蛋白質のタンデムリピート合成系を作成した。現在までに、培養細胞中でのリピートタンパク質検出には至っていないものの、環状 RNA の生成は確認できた。今後、スプライシング効率の改善・タンパク質発現量の向上を目指しさらなる検討を行う。

3. 研究成果

環状 RNA の配列からストップコドンを除くことで、ローリングサークル型の翻訳現象がおこる(図 1)。本反応では長鎖反復配列が生成物として生ずるが、我々は本反応では高効率なタンパク質合成が可能になることを大腸菌無細胞翻訳系において見出し 2013 年に報告している。今回、より複雑な哺乳動物細胞翻訳系においても、この連続的ローリングサークル型翻訳現象がおこることを明らかにした。我々は、タンパク質のタグ配列として汎用される、8アミノ酸からなる FLAG ペプチドのコード配列を繰り返し含む環状 RNA を試験管内で合成し、そのものをヒト由来の培養細胞である HeLa 細胞に導入した。その結果、導入した環状 RNA が細胞内で翻訳され、長鎖配列が生ずることを見出した(図 2)。ヒトを含む動物細胞の翻訳系に用いられる mRNA は、一般に直鎖型でキャップ構造やポリ A 構造を有する。一方、我々は、そのような構造がなくても mRNA を環状化するだけでタンパク質翻訳反応が起こることを明らかにした。近年、大量の環状 RNA が生体内で発見されているが、その機能はほとんど未知である。今回の発見

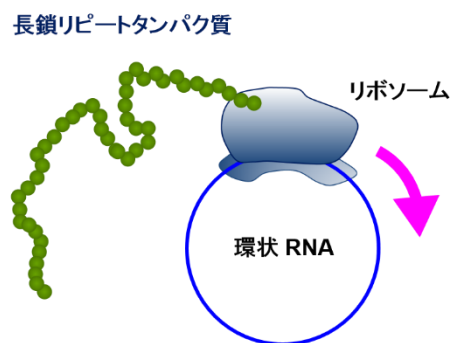


図 1. タンパクのローリングサークル増幅現象の概念図

は、環状 RNA が生体内でタンパク質翻訳の鋳型として用いられる可能性を示しており、今後の解明を引き続き目指していく。

4. 今後の展開

近年真核生物の細胞内には大量の環状 RNA が存在することが明らかにされ、その機能の解明が重要な課題となっている。環状 RNA を鋳型とする翻訳反応の機構を明らかにすることで、内因性環状 RNA の機能解明に繋げていく。さらに、環状 RNA を鋳型とした、機能性蛋白質の哺乳動物細胞内発現系の確立を目指す。

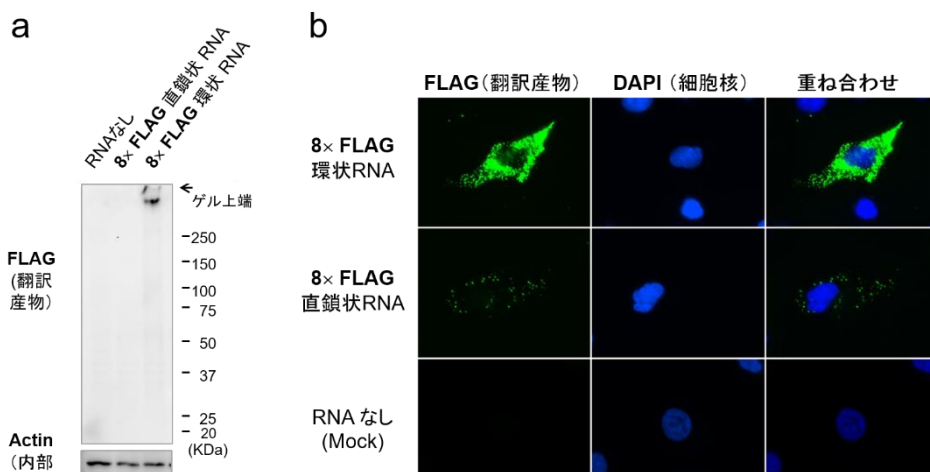


図 2. 合成環状 RNA 8× FLAG の HeLa 細胞中における翻訳反応。a) 抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット解析結果 (a) および蛍光顕微鏡観察結果 (b)。

5. 発表実績

(論文掲載)

Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells

Naoko Abe, Ken Matsumoto, Mizuki Nishihara, Yukiko Nakano, Aya Shibata, Hideto Maruyama, Satoshi Shuto, Akira Matsuda, Minoru Yoshida, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe
Scientific Reports, 5, 16435 (2015)

Preparation of Circular RNA In Vitro

Naoko Abe, Ayumi Kodama, Hiroshi Abe

Circular RNAs: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 1724, 181-192 (2018)

(出版等)

環状 RNA を用いたローリングサークル型翻訳反応

阿部奈保子, 阿部洋

生物物理, 57 巻, 1 号 p. 005-010 (2017)

環状 RNA の合成とその翻訳反応

阿部洋, 阿部奈保子

クローズアップ実験法, 実験医学月刊 2016 年 8 月号 Vol.34 No.13, 羊土社 (2016)