

2022 年 1 月 31 日  
京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

! " # \$%&' ( ) \* + , - . / 0 1 # 2 3 4 5 6 7 8 1 # 9 : ; < =  
> ? , 8 @ A B C D . E F 1 G

## ポイント

- ワクシニアウイルスキャッピング酵素<sup>注1)</sup>を用いて mRNA の 5' キャップ<sup>注2)</sup>修飾を試みた
- 市販されている GTP <sup>注3)</sup>アナログを使ってさまざまな 5' キャップ修飾を行うことができた
- 5' キャップにビオチン<sup>注4)</sup>や蛍光タンパク質を搭載することで mRNA の機能性を拡張できる

## 1. 要旨

大野博久助教(CiRA 未来生命科学開拓部門)と齊藤博英教授(CiRA 同部門)らの研究グループは、東京大学の鈴木勉教授らのグループと共同で簡単にさまざまなキャップ構造を持った機能的な mRNA を作成する方法を開発しました。

合成 mRNA は、遺伝子の運び屋としての可能性を持っているため、応用に向けた研究が活発に行われています。天然の mRNA は、先頭側(5' 側)に「5' キャップ」と呼ばれる構造をもっています。5' キャップは mRNA の安定性や翻訳活性を調節しており、化学的に修飾することで mRNA の性質を変化させられることが知られています。そのため、機能的な 5' キャップ構造の探索と合成が行われています。

今回研究グループは、ワクシニアウイルスがもつ酵素を用いて 5' キャップを修飾することにより、機能的 mRNA を簡便かつ効率的に合成する方法を報告しました。この酵素は、RNA の 5' 末端に様々な GTP

しかし、RNA は化学的・生物学的に安定であるため、生体での応用にはGHがあります。天然の mRNA は、5' 末端に 7-メチルグアニル (m<sup>7</sup>G) という化学構造が結合しており、これを 5' キャップと称します。これまでの研究で、5' キャップを化学修飾により変化させると、mRNA を安定化させたり、翻訳効率を向上させたり、機能を変化させることができることがわかっています。また、5' キャップに特定の 5-リン酸基をN<sup>6</sup>-メチルすることで、mRNA の生物学的特性のQR や機能拡張が可能となります。

これまで、修飾された 5' キャップをもつ合成 mRNA を調製する方法では、RNA の合成に使われる GTP (Guanosine Triphosphate) と似た構造を持つ 5' キャップアナログの [ \ ] で RNA の合成 (transcription) を行います。しかし、この方法で合成された mRNA にはキャップを持たない RNA も一定量生じてしまううえ、キャップアナログを化学合成することは c d ではな e, f eg 用することができていませ h でした。

そこで、研究グループでは、酵素を用いて修飾キャップを i j した mRNA を合成することを考え、ワクシニアウイルスキャッピング酵素 (kCl) に 4 5 して mn を行いました。

## o. 研究結果

### 1) VCE による 5' キャップ構造の付加

kCl を使った酵素反応による 5' キャップ構造の i j は q ] のような反応によって行われます (r s)。^ \_ された RNA の 5' 末端にある XYNL 部 と GTP を結合したのち、GTP のグアニン部 にはある t 素 u 子 (1 位) を Kチル化することでキャップ構造が v 成されます。

## 図 1 VCE による 5' キャップ付加反応

この反応の中で、GTP の代わりに、さまざまな化学修飾が行われた物質 (GTP アナログ) を用いることで、x 様な 5' キャップ / の修飾を試みました。今回使用した GTP アナログは q ] に示す 2y z { の物質です (r 2)。

**図 2 今回使用した GTP アナログ****2) GTP アナログによるキャップ構造を作る効率**

1) 任意の RNA(ss) を  $5'$  の  $3'$  で合成し、 $r$  で示した GTP アナログと KCl を使って  $s$  時間( $s$ )あるいは  $2\epsilon$  時間( $2\epsilon$ ) 対応させました。修飾された  $5'$  キャップ構造を持つ mRNA を合成できているかどうか、 $f$  ... で示しその効率を  $\hat{\epsilon}$  % しました。その結果、KCl により、さまざまな GTP アナログを使って、キャップ構造を作ることができることがわかりました( $r$  3)。

**図 3 VCE によるキャップを作る効率**

### 3) 合成した mRNA の翻訳活性

蛍光タンパク質である ASmiJG'##S を発光する mRNA を合成し、E#•& = > に導入しました。蛍光エ・を・' に、KCl により修飾したキャップ構造をもつ mRNA が・の'・翻訳されるのか、その活性を定しました(r €)。” とh・の修飾キャップ構造で、蛍光が・-され、その中には天然のキャップ構造よりも翻訳効率に優れた修飾キャップも† ‡ できました。

### 図 4 HeLa 細胞での翻訳活性

翻訳活性は天然の mRNA のキャップ構造である m<sup>7</sup>GTP を基準とした相対的な値。A-cap、Mock はネガティブコントロール。

### 4) アジド基を用いた複合体の形成

修飾 5' キャップ構造の中には p 応性の高いア<sup>TM</sup> (JN<sub>3</sub>) をもつもの (§2s, §22) もあります。このア<sup>TM</sup> は、クヱック> œストYーと呼ばれる化学 p 応を g 用して簡単に、ビオチンや蛍光タンパク質な・の機能性・子を結合させることもできます。ASmiJG'##S((mAGs) を・-<sup>TM</sup>する RNA を合成し、KCl により 5' キャップに N<sub>3</sub><sup>2'</sup> GTP を i j しました(m<sup>7</sup>N<sub>3</sub><sup>2'</sup> GJ! &VW#\$(§2s))。この RNA に、蛍光エ素である Aÿy€I をキャップ部に結合させました(m<sup>7</sup>N<sub>3</sub><sup>2'</sup> GJ! &VW#\$(§2s) Aÿy€I)。その結果、mRNA が[ \ している = > 質で

AYyEI の蛍光が・ – され、@ではみられませんでした。つまり、キャップを持つ mRNA を特異的に' j できていると考えられます。

#### 図 5 蛍光顕微鏡画像

Hoechst: 核、Merge: 左 3 つの画像の重ね合わせ、Magnified: Merge の一部拡大画像

#### ㊦. まとめとE ✕

本研究では KCl と GTP アナログを用いることで、さまざまなキャップ修飾された mRNA を簡便かつ効率的に調製できることを明らかにしました。また、A<sup>TM</sup>~ をはbめとして、p 応性の高い部位を¥P キャップ修飾された mRNA を作ることができるため、RNA の 5' 末端側を特異的に修飾することもできます。ビオチンや蛍光色素とNみ合わせてg 用することで、さまざまな機能性 mRNA の作成が可能となり、RNA 治療や生命科学の研究 野に有用なツールを提供することが可能となります。

#### §. .. ©<sup>a</sup> と« ¬

- .. ©<sup>a</sup>

“Versatile strategy using vaccinia virus-capping enzyme to synthesize functional 5' cap-modified mRNAs”

- ~ ヤーナル<sup>a</sup>

Nu! "#i! A! i\$% R#%#&'! (

- « ¬

Ei'T(i%& ©(ST<sup>1.\*+</sup> °&# A±&miS#<sup>1.2+</sup> 2 #<sup>3</sup>umi ≥ T! (i\$u±i<sup>1-</sup> ~&'iS E&μ&%(i<sup>1-</sup> ° (iSi! (i'T A±i! (i±&<sup>3-</sup> T%uUTmu ° u\$u±i<sup>3</sup> &S\$ Ei'T(i\$# ° &iUT<sup>1.\*</sup>

¶ · 頭« ¬ , 1 ° « ¬

