報道解禁指定 2 月 3 日(金)9:05、新聞は 2 月 3 日夕刊以降
報道解禁日時を厳守していただきますよう、お願い致します。

News Release

2022 年 1 月 31 日
京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

様々な 5’キャップ構造をもつ機能的な mRNA の汎用的な合成方法

酵素を用いて簡便かつ効率的に

ポイント

- ワクシニアウイルスキャッピング酵素[注 1)]を用いて mRNA の 5’キャップ[注 2)]修飾を試みた
- 市販されている GTP [注 3)]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[注 4)]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、機能性 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 アナログを導入することができ、異なる翻訳レベルを示す 5’キャップ修飾 mRNA を生成することができることを示しました。特に、これらの修飾 mRNA の中には、翻訳効率が向上したものや、他の物質と結合する部位を持ち、さらに機能性を高めることができるものもあります。今回開発した 5’キャップ修飾 mRNA の作製法は、RNA 治療や生命科学研究に有用なツールを提供できると考えています。

この研究成果は 2023 年 2 月 3 日(日本時間)に「*Nucleic Acids Research*」で公開されます。

2. 研究の背景

合成 mRNA を用いた遺伝子導入は、様々な生命医学分野への応用が期待され、着実に注目を集めています。DNA やウイルスベクターと異なり、合成 mRNA はゲノムに挿入される可能性が低いため、遺伝子治療や細胞治療において安全性が高いとされています。また、合成 mRNA は細胞の核に入る必要がないため、細胞質で効率的にタンパク質を生産することができます。

報道解禁指定 2 月 3 日(金)9:05、新聞は 2 月 3 日夕刊以降
報道解禁日時を厳守していただきますよう、お願い致します。

しかし、RNA は化学的・生物学的に不安定であるため、生体内での応用には限界があります。天然の mRNA は、5' 末端に 7-メチルグアニル酸(m^7G)という化学構造が結合しており、これを 5' キャップと言います。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'キャップに特定の分子を組み込むことで、mRNA の生物学的特性の解明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:グアノシン三リン酸)と似た構造を持つ分子(キャップアナログ)の存在下で RNA の合成(転写)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容易ではなく、広く利用することができていませんでした。

そこで、研究グループでは、酵素を利用して修飾キャップを付加した 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(VCE)に注目して検討を行いました。

3. 研究結果

1) VCE による 5' キャップ構造の付加

VCE を使った酵素反応による 5' キャップ構造の付加は以下のような反応によって行われます(図 1)。転写された RNA の 5' 末端にある三リン酸部分と GTP を結合したのち、GTP のグアニン部分にある窒素原子(7 位)をメチル化することでキャップ構造が形成されます。

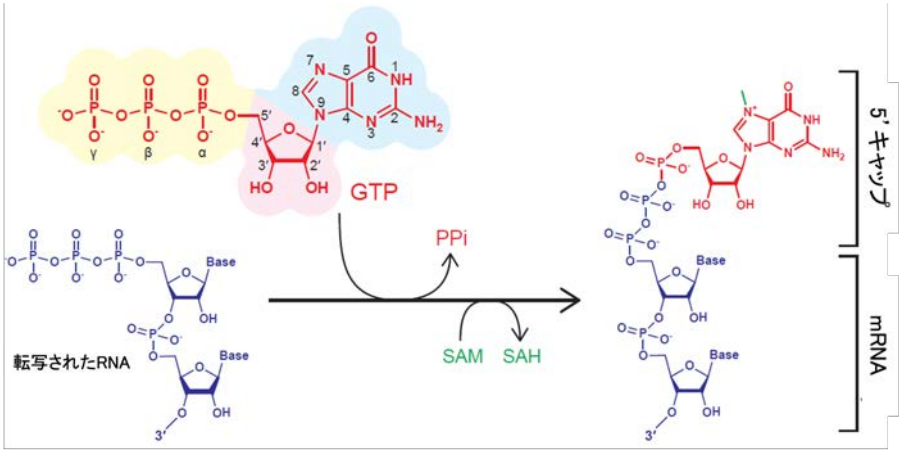

図 1　VCE による 5' キャップ付加反応

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、多様な 5' キャップへの修飾を試みました。今回使用した GTP アナログは以下に示す 26 種類の物質です(図 2)。

報道解禁指定 2 月 3 日(金)9:05、新聞は 2 月 3 日夕刊以降
報道解禁日時を厳守していただきますよう、お願い致します。

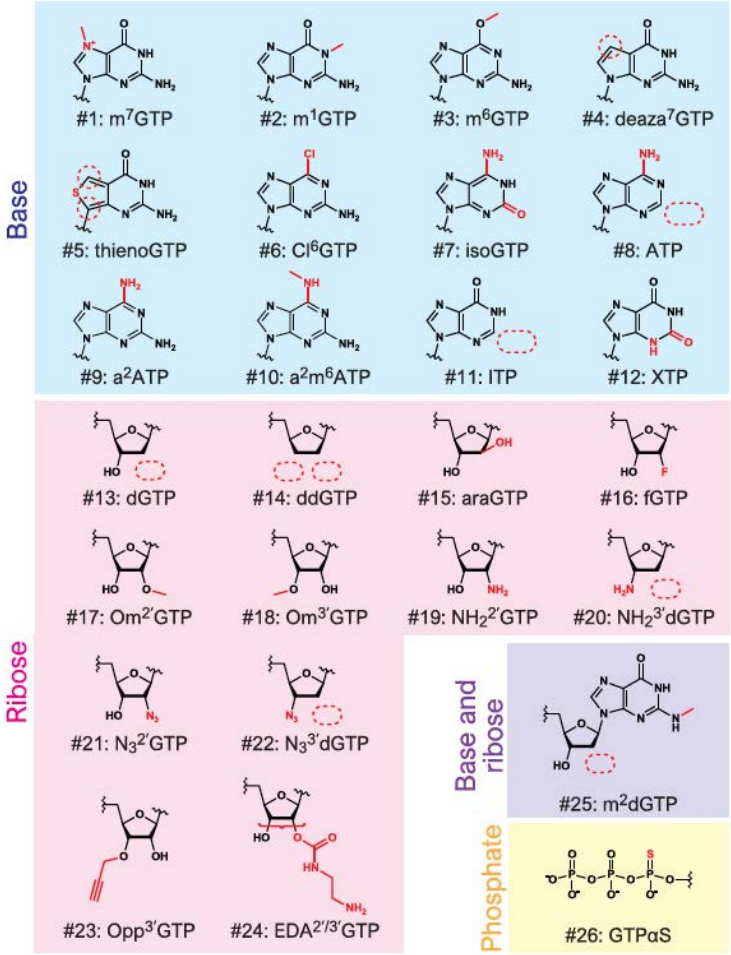

図 2 今回使用した GTP アナログ

2) GTP アナログによるキャップ構造を作る効率

短い RNA(11 塩基)を *in vitro* で合成し、図 2 で示した GTP アナログと VCE を使って 1 時間(1h)あるいは 24 時間(24h)反応させました。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、電気泳動で確認しその効率を計算しました。その結果、VCE 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(図 3)。

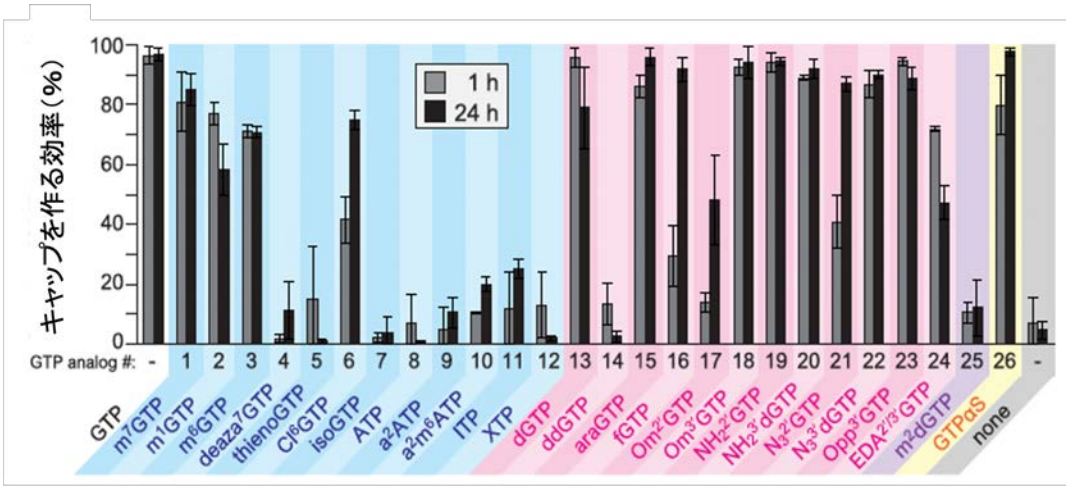

図 3 VCE によるキャップを作る効率

報道解禁指定 2 月 3 日(金)9:05、新聞は 2 月 3 日夕刊以降
報道解禁日時を厳守していただきますよう、お願い致します。

3) 合成した mRNA の翻訳活性

蛍光タンパク質である Azami-Green を発現する mRNA を合成し、HeLa 細胞に導入しました。蛍光強度を指標に、VCE により修飾したキャップ構造をもつ mRNA がどの程度翻訳されるのか、その活性を測定しました(図 4)。ほとんどの修飾キャップ構造で、蛍光が観察され、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確認できました。

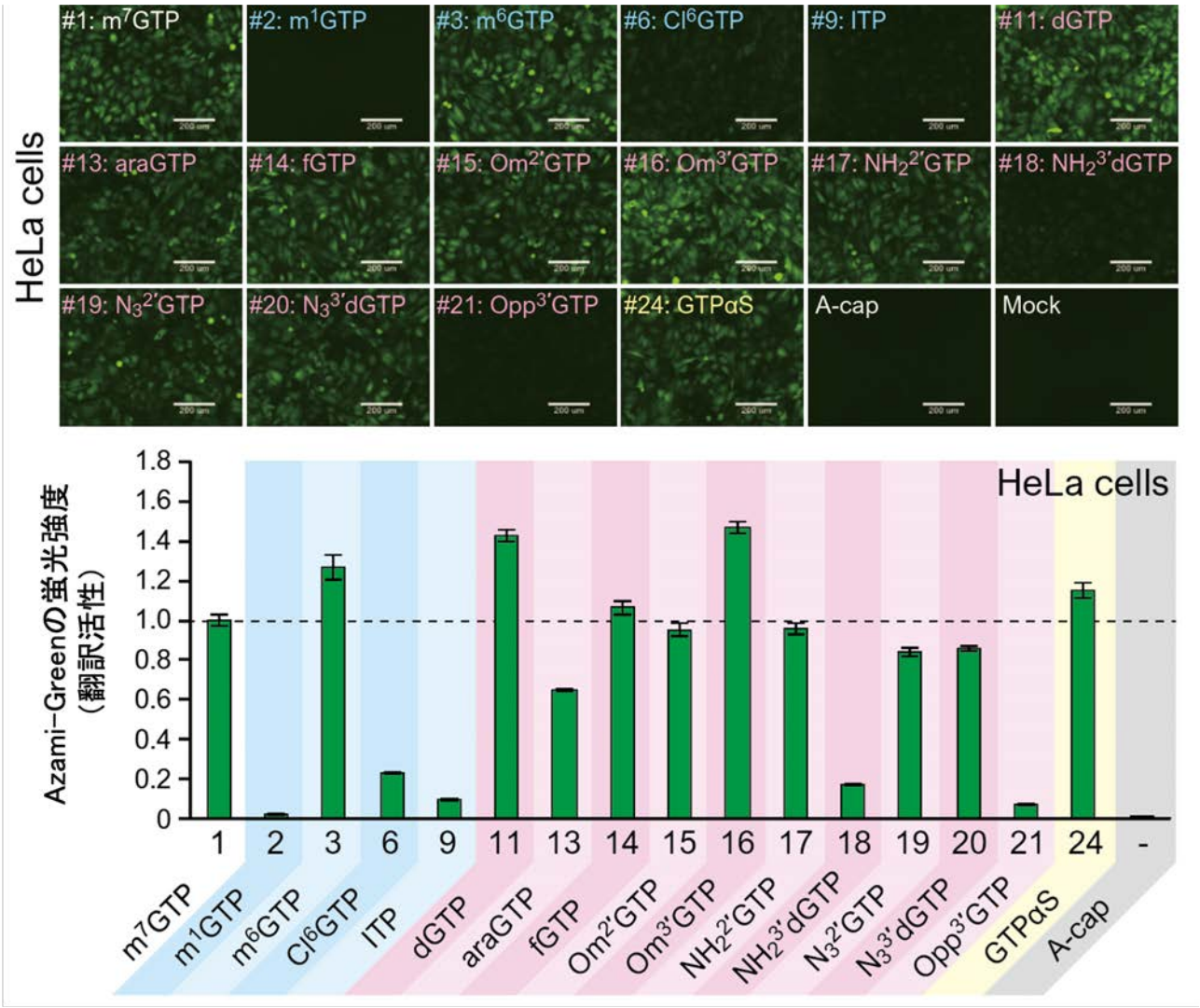

図 4 HeLa 細胞での翻訳活性

翻訳活性は天然の mRNA のキャップ構造である m^7GTP 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反応性の高いアジド基(-N_3)をもつもの(#21、#22)もあります。このアジド基は、クリックケミストリーと呼ばれる化学反応を利用して簡単に、ビオチンや蛍光タンパク質などの機能性分子を結合させることもできます。Azami-Green(hmAG1)をコードする RNA を合成し、VCE により 5' キャップに $N_3^{2'}$ GTP を付加しました($m^7N_3^{2'}$ G-capped(#21))。この RNA に、蛍光色素である AF647 をキャップ部に結合させました($m^7N_3^{2'}$ G-capped(#21)+AF647)。その結果、mRNA が存在している細胞質で

報道解禁指定 2 月 3 日(金)9:05、新聞は 2 月 3 日夕刊以降
報道解禁日時を厳守していただきますよう、お願い致します。

AF647 の蛍光が観察され、核ではみられませんでした。つまり、キャップを持つ mRNA を特異的に標識できていると考えられます。

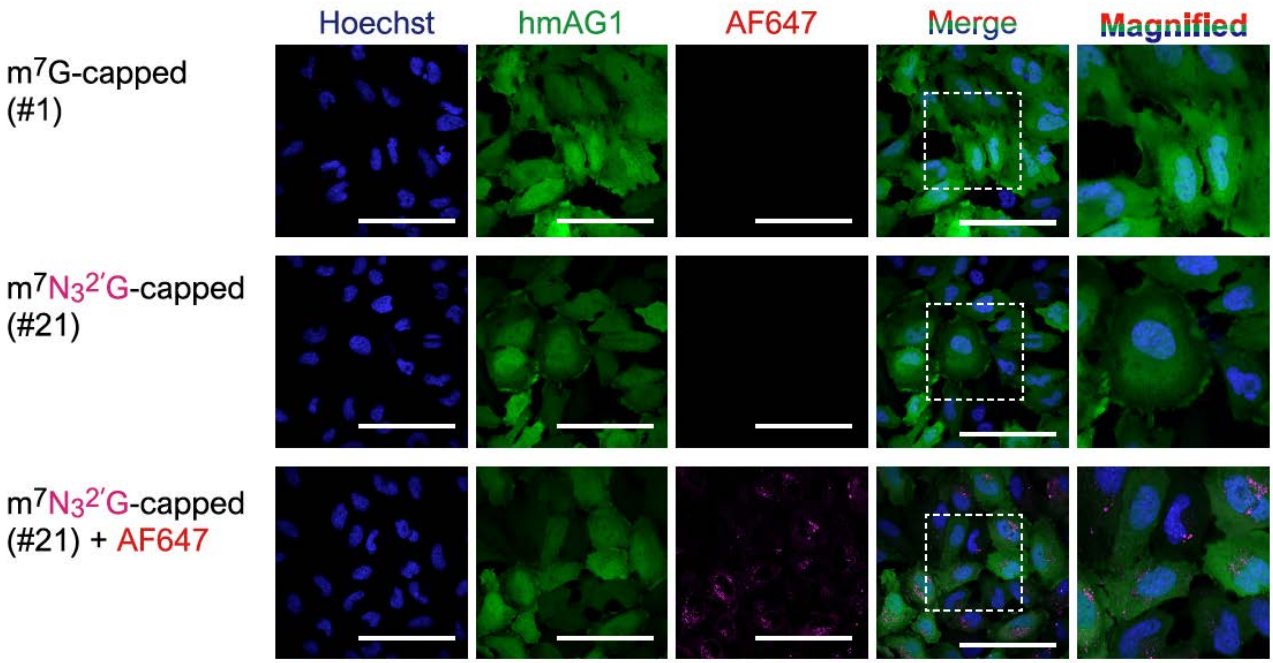

図 5 蛍光顕微鏡画像

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

4. まとめと展望

本研究では VCE 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、アジド基をはじめとして、反応性の高い部位を含む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などと組み合わせて利用することで、さまざまな機能性 mRNA の作成が可能となり、RNA 治療薬や生命科学の研究分野に有用なツールを提供することが可能となります。

5. 論文名と著者

○ 論文名

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

○ ジャーナル名

Nucleic Acids Research

○ 著者

Hirohisa Ohno[1,*,†], Sae Akamine[1,2,†], Megumi Mochizuki[1], Karin Hayashi[1], Shinichiro Akichika[3], Tsutomu Suzuki[3] and Hirohide Saito[1,*]

† 筆頭著者　＊ 責任著者

報道解禁指定 2 月 3 日(金)9:05、新聞は 2 月 3 日夕刊以降
報道解禁日時を厳守していただきますよう、お願い致します。

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
2. 京都大学大学院医学研究科
3. 東京大学大学院工学系研究科

6. 本研究への支援

本研究は、以下の支援を受けて実施されました。

- 日本学術振興会 科研費(15H05722, 16K21117, 20K12644, 20H05626)
- 武田科学振興財団
- 笹川科学研究助成;
- 持田記念医学薬学振興財団
- 日本医療研究開発機構（AMED）再生医療等実現拠点ネットワークプログラム「iPS 細胞研究中核拠点」(JP22bm0104001)
- iPS 細胞研究基金

7. 用語説明

注 1) ワクシニアウイルスキャッピンッグ酵素（VCE）
DNA ウイルスの一種であるワクシニアウイルスがもつ、mRNA の 5’末端にキャップ構造を付加する反応を促進する酵素。ワクシニアウイルスは天然痘に対する生ワクチンとして用いられた。

注 2) 5’キャップ
細胞質に存在する mRNA の 5’末端側に見られる修飾構造。mRNA の安定性や mRNA からタンパク質への翻訳開始に関与している。

注 3) GTP（Guanosine triphosphate：グアノシン三リン酸）
糖とリン酸からなるヌクレオチドの一種。細胞内のシグナル伝達やタンパク質の機能調節に広く使われている。

注 4)ビオチン
水溶性ビタミンの一種。ビタミン B7、ビタミン H などとも呼ばれる。アビジンという物質と強力な結合をすることから、特定の分子を標識する際に利用されている。

本件担当： 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
国際広報室
和田濵
TEL: 090-6982-5882
Email: media@cira.kyoto-u.ac.jp