

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^{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、生体での応用には課題があります。天然の mRNA は、5' 末端に 7-メチルグアニル (m⁷G) 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' キャップに特定の基を付加することで、mRNA の生物学的特性の改変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) と似た構造を持つ基 (キャップアナログ) の存在下で RNA の合成を行います。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 も一定量含まれてしまううえ、キャップアナログを化学合成することは容易ではありませんでした。

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 (kCl) に作用させて反応を行いました。

0. 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' キャップ構造の付加は、GTP のような反応によって行われます。合成された RNA の 5' 末端にある XYNL 部分と GTP を結合したのち、GTP のグアニン部分にある 2'-OH 基 (2 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、様々な 5' キャップ構造の修飾を試みました。今回使用した GTP アナログは図 1 に示す物質です (図 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 $5'$ で合成し、 r_2 で示した GTP アナログと KCl を使って s 時間(s)あるいは 2ϵ 時間(2ϵ) 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_n, \dots 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 m⁷GTP 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TM (JN₃) をもつもの (§2s, §22) もあります。このアTM は、ク^Yック> œスト^Y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・-TMする RNA を合成し、KCl により 5' キャップに N₃^{2'} GTP を i j しました(m⁷N₃^{2'} 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(m⁷N₃^{2'} GJ! &VW#\$(§2s) Aÿy€I)。その結果、mRNA が[\ している = > 質で

A⁺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 i 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 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⁺を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。

5. 参考文献

- ①
- “Versatile strategy using vaccinia virus-capping enzyme to synthesize functional 5' cap-modified mRNAs”
- ジャーナル^a
- Nu! "#i! A! i\$% R#%#&'! (
- << ー
- (EiT(i%& @ (ST^{1.*+} °&# A±&miS#^{1.2+} 2 #³umi ≥ T! (iŠu±i¹⁻ ~&'iS (E&μ&%(i¹⁻ ° (iSi! (i' T A±i! (i±&³⁻ T%uUTmu ° uŠu±i³ &S\$ (EiT(i\$# ° &iUT^{1.*}
- ¶ · 頭<< ー , 1 ° << ー

- « ーの » ¼機½
- 1¼ 京¿ 大学 iP° = > 研究» (CiRA)
- 2¼ 京¿ 大学大学À - 学研究科
- 3¼ 東京大学大学À Á 学À 研究科

Ã. 本研究 / のÃÃ

本研究は、q] のÃÃをÆけて3Çされました。

- 日本学È É Ê Ë 科研Ì (s5E05I 22` sy`2sssI` 20`s2y€€ 20E05y2y)
- Í Î 科学É Ê Ë Ì Ï
- ÑÒ科学研究助成Ó
- 持Ï ÒÒ- 学Ï 学É Ê Ë Ì Ï
- 日本- 療研究開発機構 (A²I 7) Ò生- 療× 3< ØÙÚットワークプログÙ: 「iP° = > 研究中@ØÙ」(ÜP22Ým0s0€00s)
- iP° = > 研究~ Þ

ß. 用à á R

4 s) ワクシニアウイルスキャッピング酵素(kCl)

7NA ウイルスの` z 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i j するp 応をâ ã する酵素。ワクシニアウイルスは天然ä にã する生ワクチンとして用いられた。

4 2) 5' キャップ

= > 質に[\ する mRNA の5' 末端側にæられる修飾構造。mRNA の安定性や mRNA からタンパク質 / の翻訳開Ç に½èしている。

4 3) GTP (Gu&ST%iS# U'iV(T%V(&U#Wグア9シン×YNL)

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。

4 €) ビオチン

é ê 性ビタœンの` z 。ビタœン ëì、ビタœン Æ とも呼ばれる。アビ~ ンという物質とZ ì な結合をすることから、特定の. 子を' j するí にg 用されている。

本î ï ÒW 京¿ 大学 iP° = > 研究» (CiRA)
 ñí f 報Ò
 óÎ ó
 TI •î 0ö0Jyö÷2J5÷÷2
 l m&i"ò m#\$i&ø! i' &¼µTUTJu&! ¼V