

博士論文

論文題目 mRNAからのタンパク発現を向上させるpoly(A)鎖長制御法の確立
とmRNA送達システムへの応用

氏 名 池上 賢

要旨

本研究では、mRNA からのタンパク質発現を制御するために、一定鎖長の長鎖長 poly(A)鎖を持つ mRNA 作製法を確立した。本作製法を用いることで、最長 360 塩基長までの長鎖長 poly(A)鎖を持つルシフェラーゼ発現 mRNA を作製した。*in vitro* 及び *in vivo* 下において作製した mRNA を導入した結果、240 塩基の poly(A)鎖を持つ mRNA が最も高いタンパク質発現を示し、安定性と翻訳開始因子を介した翻訳効率の向上が主に寄与したと考えられた。

本作製法による poly(A)鎖長の制御は、mRNA 送達を向上させる有力な手法である。

目次

1 序文	4
1.1 poly(A)鎖のタンパク質発現への関与	4
1.2 <i>in vitro</i> で作製される mRNA への poly(A)鎖付加方法の現況	5
1.3 mRNA 送達システム研究の現況	7
2 方法	14
2.1 長鎖長 poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA の作製	14
2.2 120 塩基長の poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA の作製	14
2.3 180, 210 または 240 塩基長の poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA の作製	15
2.4 270 または 360 塩基長の poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA の作製	16
2.5 テンプレート DNA からの <i>in vitro</i> 転写による mRNA の作製	17
2.6 培養細胞への mRNA の導入とルシフェラーゼタンパク質発現の評価	17
2.7 ナノミセル溶液の調製	18
2.8 動物	18
2.9 マウス下肢骨格筋へのハイドロダイナミクス法によるナノミセル投与 ..	19
2.10 下肢骨格筋におけるルシフェラーゼタンパク質発現の評価	19
2.11 Huh-7 細胞における GLuc mRNA 量の評価	19
2.12 無細胞系を用いたルシフェラーゼタンパク質発現の評価	20
2.13 免疫沈降法による GLuc mRNA と翻訳開始因子の結合能の解析	21
2.14 統計解析	21
3 結果	23
3.1 長鎖長 poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA と mRNA の作製	23
3.2 長鎖長 poly(A)鎖を持つ GLuc mRNA の培養細胞におけるルシフェラーゼタンパク質の発現	26

3.3 長鎖長 poly(A)鎖を持つ NLuc mRNA の培養細胞における Luc タンパク質の 発現	32
3.4 長鎖長 poly(A)鎖を持つ NLuc mRNA のマウス下肢骨格筋における Luc タン パク質の発現	33
3.5 高タンパク質発現を示す A240 mRNA の発現メカニズムの解析	34
3.5.1 GLuc mRNA の細胞内における残存量評価	34
3.5.2 GLuc mRNA の翻訳効率の評価	36
3.5.3 GLuc mRNA と翻訳開始因子の結合能の評価	37
4 考察	39
5 結語	47
引用文献	48
謝辞	60

1 序文

1.1 poly(A)鎖のタンパク質発現への関与

メッセンジャーRNA (mRNA)は、タンパク質に翻訳されるための塩基配列を持つ一本鎖のリボ核酸である。真核生物の mRNA は、二本鎖の DNA から RNA ポリメラーゼにより核内で転写された後、様々なプロセッシングを経て成熟した mRNA となる。成熟後の mRNA の多くは、共通構造として、5'末端に Cap 構造、3'末端に poly(A)鎖を持つが、ヒストンの mRNA は例外的に poly(A)鎖を持たず 3'末端にステムループ構造を持つことが知られる[1]。mRNA の内部は、翻訳開始コドンから終止コドンまでのタンパク質コード領域と、コード領域外である 5'末端非翻訳領域 (5'UTR)及び 3'末端非翻訳領域 (3'UTR)が存在する。

mRNA の細胞質における分解は、3'末端の poly(A)鎖の短縮過程 (デアデニレーション)によりはじまる。転写直後の酵母が持つ poly(A)鎖は 70 塩基程度であるが、約 10 塩基まで短鎖長化すると、Cap 構造が分解し(デキャッピング)、続いてエキソヌクレアーゼにより、5'から 3'方向に mRNA の分解が生じる[2-4]。他の分解経路として、デキャッピング後の 3'から 5'方向への分解経路も報告されているが[2-4]、いずれも分解の起点はデアデニレーションである。

翻訳過程において、mRNA の Cap 構造には翻訳開始因子である eukaryotic

initiation factor 4E (eIF4E)、一方 poly(A)鎖には poly(A)-binding protein (PABP)が数塩基ごとに一分子結合する。そして eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G)を介すことで複合体を形成し、mRNA は環状構造を形成する[5,6]。また eIF4G は、40S リボソームサブユニットと結合する eukaryotic initiation factor 3 (eIF3)と相互作用し、翻訳開始を促進する[5]。mRNA の環状化は、翻訳を終えたリボソームを次の翻訳開始部位に効率的にリサイクルすることを可能にし[5,7]、翻訳の活性化を担っている。

以上のように poly(A)鎖は、mRNA の分解及び翻訳双方に関与する構造である。従って poly(A)鎖長の制御により、mRNA からのタンパク質発現への影響が考えられた。

1.2 *in vitro* で作製される mRNA への poly(A)鎖付加方法の現況

in vitro で作製される (IVT) mRNA においても、タンパク質をコードする配列の 5'末端に Cap 構造、3'末端に poly(A)鎖を必要とする。従来法において、mRNA はバクテリオファージプロモーター (SP6, T3 または T7)を含むテンプレート DNA から *in vitro* 下で転写され、続いてタンパク質発現に必要である poly(A)鎖は poly(A)ポリメラーゼ (合成酵素)によって付加される。しかし酵素反応によっ

て付加されるため、作製された mRNA は様々な鎖長を含むことがわかっている [8]。

一定鎖長の poly(A)鎖を付加するため、二本鎖オリゴ DNA を用いた d(A/T))配列をテンプレート DNA に組み込む手法も報告されている[7,9-11]。しかし d(A/T))配列を挿入したテンプレート DNA には分解が見られ、作製された mRNA には不均一な塩基長が含まれた[7,9-11]。Elango らは、XL1-Blue コンピテントセルを使用することで、他のコンピテントセルに比べてプラスミドが安定であり、テンプレートベクター内で poly(d(A/T))配列を維持できることを報告した[12]。poly(d(A/T))配列が維持されたテンプレートから作製した mRNA は、従来法により poly(A)鎖を酵素付加した mRNA よりも均一な塩基長が得られ[8,12]、poly(d(A/T))配列の末端に typeIIS 型制限酵素部位を挿入することで、作製した mRNA の末端はアデニン(A)を持つことが可能である[12]。また、mRNA の作製は酵素反応を用いないため簡便である。しかし現在報告されている poly(A)鎖長は、最長 120 塩基である[8,12]。これは、poly(d(A/T))配列を作製するためのオリゴ DNA の合成と精製効率の限界に因るためである。また、哺乳類の mRNA が持つ poly(A)鎖長は約 250 塩基前後であることから[13]、一定かつ 120 塩基以上の長鎖長 poly(A)鎖を持つ mRNA は、安定性及び翻訳効率に影響する可能性が考

えられた。

本研究では、poly (d(A/T))配列を挿入することで一定かつ長鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA の作製を試みた。そして作製した mRNA を培養細胞または生体内に導入を行った。

1.3 mRNA 送達システム研究の現況

機能性を持つプラスミド DNA (pDNA)やメッセンジャーRNA といった核酸分子の生体内への導入は、タンパク質やペプチドの産生を可能にする。また、アンチセンスや RNA interference (RNAi 法)による核酸分子の導入は、遺伝子発現を制御することができる。従って核酸分子を用いた導入は、先天性遺伝性疾患だけでなく、悪性腫瘍や慢性疾患といった多くの疾患への治療適用が期待される。

これまでの核酸デリバリーの研究は、主に pDNA が用いられてきた。pDNA の導入は、発現の持続性が長期に続く一方で、ホストゲノムにランダムに取り込まれることによる挿入変異と、変異により遺伝子発現が制御できなくなる危険性がある。また非分裂細胞への導入も困難である。pDNA を用いた核酸デリバリーの臨床への応用化には、安全性が課題として挙げられる。一方で mRNA

送達 (mRNA デリバリー)は、ホストゲノムへの組み込みがないために安全性が高く、非分裂細胞への導入も可能である。

mRNA デリバリーの研究は、1980 年代に初めて電気穿孔法 (エレクトロポレーション法)やカチオン性脂質による培養細胞への導入が報告された[14,15]。

1990 年には、ベクターを用いない mRNA (naked mRNA)を筋肉内注射により導入することでタンパク質の発現が確認された[16]。2000 年代になり *ex vivo* による免疫療法への応用が展開され、癌免疫治療に対する臨床治験が行われたが、現在のところ実用化には至っていない[17-19]。mRNA の治療応用に向けた注目度は高いが、*in vivo* に mRNA を直接導入した報告例は少ない。その理由として主に二つ考えられる。一つは mRNA が生体内で不安定であるためである[20]。生体内には核酸分子の分解酵素が存在するため、mRNA は急速に分解されてしまう。もう一つの理由は、mRNA が Toll-like receptors (TLRs)の認識により免疫反応が惹起されるためである[21,22]。これらの問題を解決するため、mRNA の塩基修飾法[23,24]と、所属研究室で開発された高分子ナノミセルを用いた mRNA 導入法が報告された[25]。

TLRs の認識を回避するためのヌクレオシド修飾法は、現在二つのグループから報告されている。Kariko らはウリジンをシュードウリジンに置換し[23]、

Kormann らはウリジンとシチジンをそれぞれ 2-チオウリジンと 5-メチルシチジンに置換する方法を報告した[24]。これらのヌクレオシド修飾を行うことで、mRNA は TLRs の認識を回避し、炎症反応が減少することが報告された[23,24,26]。しかし、これらの方法を用いても免疫反応を 100 %抑制することは困難である。また修飾したヌクレオシドは内在性の mRNA には含まれていないため、臨床に応用した際の安全性が懸念される[27]。

当研究室では、これまで、高分子ナノミセルの開発研究を行ってきた。親水性かつ生体適合性ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG)と疎水性のカチオン性高分子 (ポリカチオン)からなるブロック共重合体を溶媒中で核酸分子と混合させることで、表面は PEG 層で覆われ、中心部分には凝縮した核酸分子を持つ、粒径が数十ナノメートルの高分子ナノミセルが形成された[28-31]。

ナノミセルの機能において、核酸分子と結合するポリカチオンの構造は重要である。当研究室では、poly(b-benzyl-L-aspartate) (PBLA)の側鎖にアミノリシス反応により diethylenetriamine (DET)を導入することで、poly{N-[N'-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} (PAsp(DET))ポリマーを開発した[32]。PAsp(DET)のアミノエチレン構造は、細胞外環境の pH 7.4では、主にモノプロトン化構造をとるが、エンドソーム環境である pH 5.5では、主にジプロ

トン化構造をとる。そのため細胞外において、ナノミセルは、PAsp(DET)はプロトン化率が低く膜障害活性が弱いために毒性は低い。一方でナノミセルがエンドサイトーシスによりエンドソーム内に取り込まれると、PAsp(DET)のプロトン化率が高いために膜障害活性が強く、エンドソームは破壊される。その結果、ナノミセルはエンドソームからの脱出が促進され、核酸分子の導入が可能となる[33]。市販の核酸分子導入試薬である直鎖状のポリエチレンイミン (LPEI)と比較すると、PAsp(DET)はLPEIに比べて毒性が顕著に低い[34]。理由として、PAsp(DET)は37°C下では自己触媒的に分解し、毒性の少ないAsp(DET)モノマーになることが挙げられる[35]。PAsp(DET)と転写因子遺伝子から作製したナノミセルをマウス頭蓋骨由来細胞に導入し、骨芽細胞の分化誘導を行うと、市販の核酸分子導入試薬であるPEIやFuGENE6 (Roche)に比べて高効率に細胞分化が誘導される[36]。PEIとFuGENE6による導入は、導入した遺伝子の発現効率はナノミセルと同等であったが、毒性が高いために細胞機能に影響が生じる可能性が示唆された。また、ナノミセルは生体へのデリバリーにも優れた結果を示す。先の転写因子遺伝子による骨芽細胞の分化誘導をマウス頭蓋骨骨欠損モデルに応用した結果、ナノミセル投与群において骨再生が担体の周囲に確認され、骨

芽細胞の分化誘導により骨再生が促進されることが報告された[36]。これは、ナノミセルによるpDNAの安定性の向上と徐放効果によると考えられる。

このような特性を持つナノミセルにmRNAを内包し培養細胞に導入すると、エンドソーム内でのTLRsによるmRNA認識を回避できることが明らかになった。さらに、中枢神経系に導入した結果、強い炎症を起こすことなく一週間近くにわたる持続的なタンパク質発現が確認された[25]。

当研究室では、さらに効率的なmRNAデリバリーを行うため、ポリカチオン構造の最適化を報告した[37]。近年、ポリカチオンの化学構造を変えることで細胞への導入機構に影響することが明らかになった[31,33,38-40]。そこで、従来使用してきたPAsp(DET)の他に、PBLAの側鎖にethylenediamine (EDA)を導入することで、poly[N-(2-aminoethyl)aspartamide] (PAsp(EDA))、triethylenetetramine (TET)を導入したpoly(N-{N'-[N''-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]-2-aminoethyl}aspartamide) (PAsp(TET))、そしてtetraethylenepentamine (TEP)を導入したpoly[N-(N'-{N''-[N'''-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]-2-aminoethyl}-2-aminoethyl)aspartamide] (PAsp(TEP))ポリマーを合成した。これらのポリマーから作製したポリプレックスを培養細胞に導入した結果、奇数回のアミノエチレン繰り返し構造を持つPAsp(EDA)またはPAsp(TET)とmRNAのポリプレックスは、他の偶数回の

構造を持つポリプレックスに比べて高いタンパク質発現を示した。これは、奇数回の構造を持つポリプレックスが細胞質内で内包したmRNAの分解を抑制し、発現の持続性が向上したことに起因する[37,39]。側鎖構造の選択により、ポリプレックスの細胞内動態やタンパク質の発現持続性を制御することが可能となった。

また、mRNA 自体の性能向上を検討することで、効率的なデリバリーの実現を目指した報告もされている[20,41]。現在、mRNA の UTR 配列の最適化[8,42]と同義コドンへの置き換え[43,44]の二つの方法が知られている。

グロビン mRNA は、赤血球生成の段階でグロビンタンパク質を産生するため安定性が高いことが知られ[45]、 β グロビン mRNA は、赤血球細胞において 24 時間以上の長期の半減期を持つ[46]。GFP mRNA の 3' UTR に β グロビン遺伝子の配列を挿入すると、mRNA の安定性は向上し、GFP タンパク質の発現が向上することが報告されている[8]。また、多くの哺乳類の mRNA の 3'UTR には AU rich element (ARE)が含まれ、ARE は mRNA の不安定化に影響することが知られているが[47]、この配列を β グロビン遺伝子配列に置き換えることで mRNA の半減期が長くなることも報告されている[42]。

mRNA の翻訳効率を向上する方法としては、低頻度で使用するコドンを同義

コドンへの置き換えが報告されている[43]。同じトランスファーRNA (tRNA)を再使用することでリボソームの近傍のアミノアシル tRNA により翻訳効率が向上する[44]。しかしながら、ある種のタンパク質では、低頻度のコドンを使用し翻訳を遅らせることで正確なフォールディングが起こるため[48]、コドンの最適化は、重要なコドン配列を置き換えてしまう危険性も持っている。GenScript 社では、コドン出現頻度、GC 含量や mRNA の二次構造といったパラメータを最適化することで、危険性がなく、タンパク質の発現量が高い mRNA 合成サービスを提供している。

以上のように mRNA デリバリーからのタンパク質発現を向上させるために様々な取り組みが行われているが、現状では pDNA と同等の持続的なタンパク質発現を得ることは困難である。本研究では poly(A)鎖長に着目し、長鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA の作製を試みた。そして作製した mRNA を mRNA 送達システムに応用し、タンパク質発現への影響を評価した。

2 方法

2.1 長鎖長 poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA の作製

ルシフェラーゼ遺伝子として、GLuc遺伝子 (動物種 *Gaussia princeps*由来)と NLuc遺伝子 (動物種 *Oplophorus gracilirostris*由来)を用い、それぞれpCMV-GLuc Control Plasmid (New England Biolabs)およびpNL1.1[NLuc] Vector (Promega)から制限酵素HindIIIとXbaIにより切り出した。各ルシフェラーゼ遺伝子は、pSP73ベクター (Promega)が持つT7プロモーター制御下のマルチクローニングサイト中のHindIIIとXbaIの切断部位にクローニングした。得られたプラスミドをpSP73-Lucプラスミドと呼ぶ。その後、ルシフェラーゼ遺伝子の下流にpoly(d(A/T))配列 (120, 180, 210, 240, 270または360 塩基長)を組み込んだ。二本鎖のpoly(d(A/T))配列の作製には、合成オリゴDNA (Sigma Aldrich Japan)を使用した。詳細な作製法は、以下の通りである。

2.2 120 塩基長の poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA の作製

5'-AATTC-A₁₂₁-GAGACGA-3'と5'-GATCTCGTCTC-T₁₂₁-G-3' の2つのオリゴDNAをアニールし、二本鎖DNAを作製した後、制限酵素EcoRIとBglIIを用いて直鎖状化したpSP73-Lucプラスミドに挿入し、120 塩基長のpoly(d(A/T))配列を

持つテンプレートDNAを作製した。アニールされた二本鎖DNAは、type IIS型制限酵素であるBsmBI認識配列を、BglIII認識配列の上流に持つ。30, 60, 90 塩基長のpoly(d(A/T))配列を持つテンプレートDNAも同様に、各鎖長の二本鎖DNAをpSP73-Lucプラスミドに挿入することで作製した。上記配列中、A_nは、アデニンがn 塩基長にわたり存在していることを示し、例えば、A₁₂₁は、アデニンが121 塩基長にわたり連続することを意味する。また以下、得られたプラスミドを「pSP73-Luc-A (poly(A)鎖の塩基長)」と表記する。例えば、poly(d(A/T))配列が120 塩基長のものは、pSP73-Luc-A(120)と表記される。

2.3 180, 210 または 240 塩基長の poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA の作製

5'-AATTC-A₁₂₀-GATATCA-3' と 5'-GATCTGATATC-T₁₂₀-G-3' の2つのオリゴDNAから作製した二本鎖DNAを、制限酵素EcoRIとBglIIIで直鎖状化したpSP73-Lucプラスミドに挿入し、120 塩基長のpoly(d(A/T))配列を持ち、かつ制限酵素EcoRV認識配列を含むpSP73-GLuc-A(120)-EcoRVプラスミドを作製した。続いて、得られたプラスミドを制限酵素EcoRVとBglIIIで直鎖状化し、さらに、5'-G-A_x-GAGACGA-3' と 5'-GATCTCGTCTC-T_x-C-3' (ここでxは、61, 91または121

である)の二つのオリゴDNAから作製した二本鎖DNAを挿入することで、180, 210または240 塩基長のpoly(d(A/T))配列を持つテンプレートDNAを作製した。

2.4 270 または 360 塩基長の poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA の作製

5'-G-A₁₂₀-GATATCA-3' と 5'-GATCTGATATC-T₁₂₀-C-3' の二つのオリゴ DNA から作製した二本鎖 DNA を、制限酵素 EcoRV と BglII で直鎖状化した pSP73-Luc-A(120)-EcoRV プラスミドに挿入し、pSP73-GLuc-A(240)-EcoRV プラスミドを作製した。続いて、作製したプラスミドを制限酵素 EcoRV と BglII で直鎖状化し、さらに、5'-G-A_x-GAGACGA-3' と 5'-GATCTCGTCTC-T_x-C-3' (ここで x は、31 または 121 である)の二つのオリゴ DNA から作製した二本鎖 DNA を挿入することで、各 270 または 360 塩基長の poly(d(A/T))配列を持つテンプレート DNA を作製した。各プラスミドは、Stbl3 One-Shot コンピテントセル (Invitrogen)、または XL1-Blue コンピテントセル (Agilent Technologies)を用いて形質転換し、大量培養を行った。培養後の精製は、NucleoBond Xtra Maxi (Macherey Nagel)を使用した。

2.5 テンプレート DNA からの *in vitro* 転写による mRNA の作製

テンプレート DNA は、typeIIIS 型制限酵素 BsmBI または NdeI を用いて直鎖状化し、アガロース電気泳動により精製を行った。*in vitro* 転写および Cap 構造の付加は、従来法に比べて高いタンパク質合成効率を示す ARCA (Anti-Reverse Cap Analog)構造[49]を付加するため、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Ambion)を使用した。poly(A)ポリメラーゼによる poly(A)鎖の付加には、poly(A) tail kit (Ambion)を用いた。転写された mRNA は RNeasy Mini Preparation Kit (Qiagen)にて精製を行った。mRNA 濃度は 260 nm の吸光度にて定量した。

2.6 培養細胞への mRNA の導入とルシフェラーゼタンパク質発現の評価

各種培養細胞は、96 well プレートに5,000 個/wellの条件で播種し、10 % FBS (Life Technologies Japan)含有DMEM (Sigma Aldrich)を用いて培養した。24 時間後に、Lipofectamine LTX (Invitrogen)を用いて、推奨プロトコルに従い、ルシフェラーゼmRNA 190 ng/wellを導入した。GLucタンパク質の発現評価は、導入4, 24, 48 時間後に培地を回収し、Renilla Luciferase assay system (Promega)により GloMax™ 96 microplate luminometer (Promega)で測定した。またNLucタンパク質の発現評価は、細胞溶解液を用いてNano-Glo Luciferase assay system (Promega) に

より GloMax™ 96 microplate luminometer (Promega)で測定した。ルシフェラーゼタンパク質発現量は、細胞溶解液中のタンパク質濃度で補正した。

2.7 ナノミセル溶液の調製

ポリマーは、工学系研究科 石井武彦 准教授より提供されたPEG-PAsp(DET) ブロック共重合体を使用した。¹H-NMR (Nuclear magnetic resonance) によって決定されたPEGの平均分子量は12,000、PAsp(DET)の重合度は57であった。PEG-PAsp(DET)とmRNAを10 mM のHEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)バッファーにそれぞれ溶かし、両者を混合させることでナノミセル溶液を調製した。PEG-PAsp(DET)のアミノ基 (N)とmRNAのリン酸基 (P)のモル比をN/P比とし、N/P比が8のナノミセル溶液を調製した。最終的なナノミセル溶液に含まれるmRNA濃度は、17 µg/mlとした。

2.8 動物

日本チャールスリバー株式会社より購入した Balb/c マウス (7- 10 週齢、雌)を使用した。マウスは、特定病原体防止条件下 (SPF)で飼育された。本研究における動物実験は東京大学動物実験実施規則に基づき実施した。

2.9 マウス下肢骨格筋へのハイドロダイナミクス法によるナノミセル投与

マウス下肢骨格筋へのハイドロダイナミクス法による投与は、当研究室での先行研究に基づき行った[50,51]。マウスを3 %のイソフルラン（Abbott Japan）にて麻酔した後、大腿近位部に駆血帯を留置し、下肢の血行を一時的に遮断した。そして5 μ gのmRNAを含む300 μ lのナノミセル溶液を、大伏在静脈遠位より5 秒間かけて投与し、その5 分後に駆血帯を外した。

2.10 下肢骨格筋におけるルシフェラーゼタンパク質発現の評価

下肢骨格筋で発現したルシフェラーゼタンパク質を定量した。投与72 時間後の下肢骨格筋を採取し、マルチビーズショッカー（安井器械）を用いて組織をホモジェナイズした。ルシフェラーゼタンパク質の定量は、ルシフェラーゼの発光量に基づき行なった。発光量の定量は、Nano-GLo Luciferase assay system（Promega）とGloMaxTM 96 microplate luminometer（Promega）を用いて行い、細胞溶解液中のタンパク質濃度で発光量を標準化して求めた。

2.11 Huh-7 細胞における GLuc mRNA 量の評価

Huh-7細胞にGLuc mRNAを導入し、4 時間後に培地交換を行った。4 時間と8

時間後に、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全RNAを回収し、RevertraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)により全RNAに含まれる mRNAからcDNAを作製した。GLuc mRNA量は、ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems)を用いて、定量ポリメラーゼ連鎖反応により定量を行った。プライマーは、Forward : 5'-TTGAACCCAGGAATCTCAGG-3', Reverse : 5'-CACGCCCAAGATGAAGAAGT-3'を用いた。また β -アクチンを定量し (TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Mm00607939))、標準化を行った。

2.12 無細胞系を用いたルシフェラーゼタンパク質発現の評価

ウサギ網状赤血球溶解液としてRabbit Reticulocyte Lysate, Untreated (Promega a)、ヒト無細胞抽出液としてHuman Cell-Free Protein Expression System (タカラバイオ)を用いて、GLuc mRNAをそれぞれ30 °Cで120 分間、または32 °Cで30 分間インキュベートした。発現量は、ルシフェラーゼからの発光量に基づいて定量した。Renilla Luciferase assay System (Promega)を用いてGloMax™ 96 microplate luminometer (Promega)により各mRNAからのルシフェラーゼ発光量を計測した。

2.13 免疫沈降法による GLuc mRNA と翻訳開始因子の結合能の解析

GLuc mRNAをHuman Cell-Free Protein Expression System (タカラバイオ)を用いて、32 °Cで30 分間インキュベートした。

免疫沈降は、Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (Life Technologies Japan Ltd) を使用した。ウサギ抗PABP抗体 (Abcam), ウサギ抗eIF4E抗体 (Santa Cruz Biotechnology) またはウサギ抗eIF4G抗体 (Abcam) を用いてプロトコルに従って行った。各種抗体による沈降後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全RNAを回収し、RevertraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)により全RNAに含まれるmRNAからcDNAを作製した。GLuc mRNA量は、先に記載したプライマーを用いて定量ポリメラーゼ連鎖反応により定量を行った。

免疫沈降に使用したサンプルのタンパク質は、SDS-PAGEにより分画し、ウサギ抗PABP抗体、ウサギ抗eIF4E抗体、ウサギ抗eIF4G抗体またはウサギ抗 β -アクチン抗体 (Abcam)によりウェスタンブロットにより解析した。シグナルはLAS-4000 mini image analyzer (富士フイルム) により検出した。

2.14 統計解析

データは平均 \pm 標準誤差として示された。統計学的有意差は、Student's t testま

たはrepeated measures ANOVAにより評価した。交互作用が有意である場合には、Tukey's testを行った。P値が0.05未満を統計学的有意差とした。

3 結果

3.1 長鎖長 poly(d(A/T))配列を有するテンプレート DNA と mRNA の作製

長鎖長である 120 塩基以上の poly(d(A/T))配列を持つテンプレート DNA を作製するために、120 塩基の poly(d(A/T))配列に typeII 型の制限酵素部位を持つ pSP73-GLuc-A(120)-EcoRV プラスミドを作製した。このプラスミドに typeIIS 型の制限酵素部位を持つ 120 塩基の poly(d(A/T))配列を組み込み、pSP73-GLuc-A(240)プラスミドを作製した (図 1A)。さらに pSP73-GLuc-A(120)-EcoRV プラスミドに、各 typeII、typeIIS 型の制限酵素部位を持つ 120 塩基の poly(d(A/T))配列を順に一つずつ組み込むことで、pSP73-GLuc-A(360) プラスミドを作製した (図 1A)。なお挿入した 120 塩基の断片の間には、グアニン (G)、A、チミン (T)、そして G の 4 塩基を含む (図 1B)。オリゴヌクレオチド配列がテンプレート DNA (図 1B)に含まれているかを確認するために、アガロース電気泳動により解析を行った。最長 360 塩基の 3' 末端鎖長を持つ長鎖長のテンプレート DNA が作製されたことが確認された (図 1C)。作製したテンプレート DNA から T7 プロモーターを用いて、各 poly(A)鎖長を持つ GLuc mRNA を作製し、アガロース電気泳動により GLuc mRNA の塩基長解析を行った。目的の塩基長を持つ各 GLuc mRNA が作製されていることが確認された (図 1D)。また、作製

した 240 塩基以上の長鎖長 poly(A)鎖を持つ、120 塩基間毎に含まれる 4 塩基長が発現に影響するか調べるために、二つの 60 塩基長の poly(A)鎖間に 4 塩基 (GAUG)を含む配列を持つ mRNA を作製した (図 1E)。マイクロチップ型電気泳動装置であるバイオアナライザを用いた GLuc mRNA の塩基長分布の解析では、240 塩基長, 360 塩基長の poly(A)鎖を持つ GLuc mRNA は目的の塩基長を持ち、酵素により poly(A)鎖を付加した GLuc mRNA に比べ均一塩基長であることが明らかになった (図 1F)。これらの結果に基づき、以下、X 塩基の poly(A)鎖を持つ mRNA を、AX mRNA と表記した。

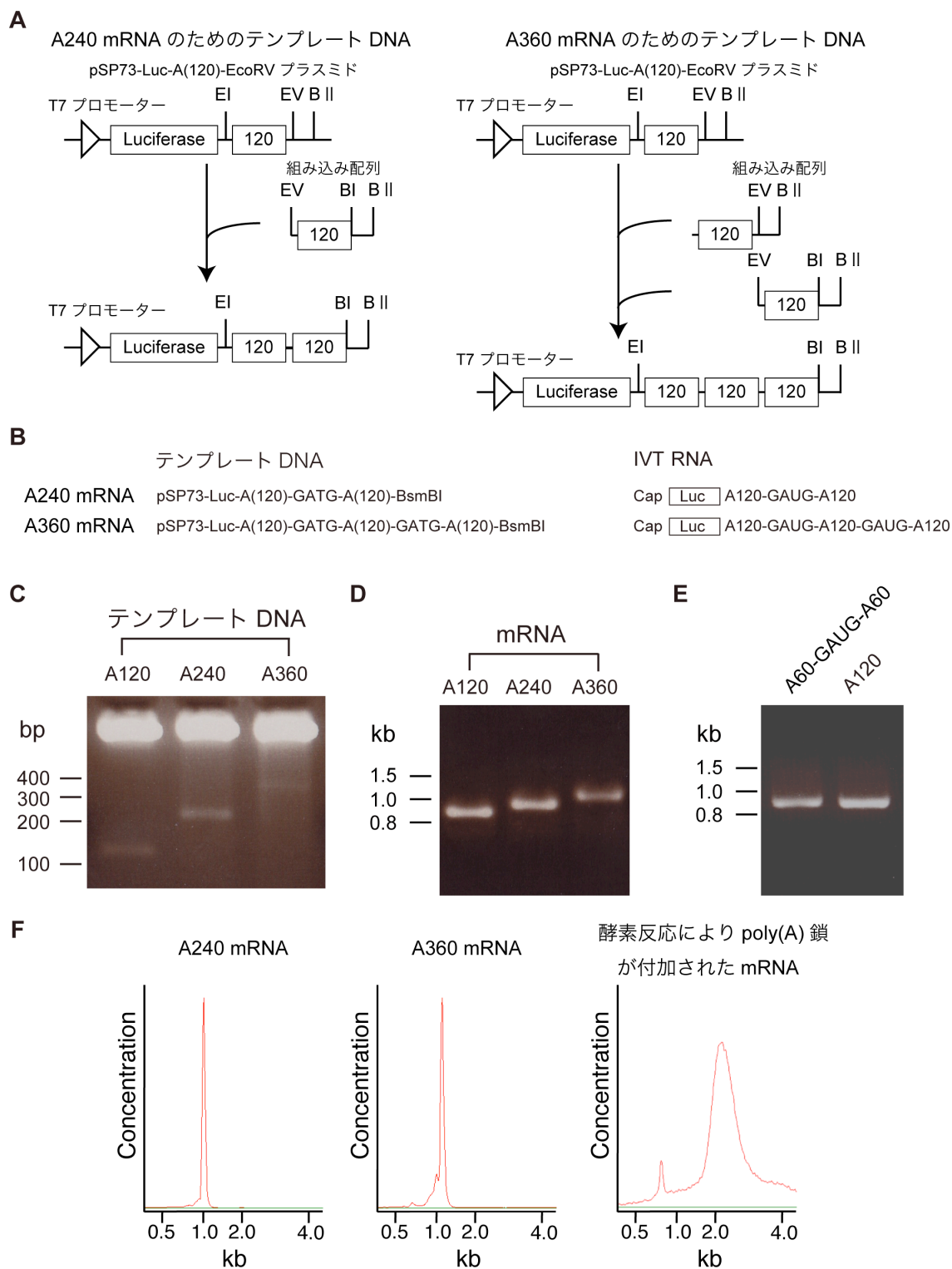


図 1 長鎖長 poly(A)鎖を持つ mRNA の作製と塩基長の確認

(A)長鎖長 poly(d(A/T))配列を持つテンプレートベクターの作製過程. 略称: ; BI, BsmBI; BII, BglII; EI, EcoRI; EV, EcoRV. (B)長鎖長 3' 末端鎖長を持つテンプレートベクターと IVT により作製された mRNA 模式図. (C)テンプレート DNA の塩基長確認. テンプレート DNA は、EcoRI と BglII で制限酵素処理した後、アガロース電気泳動により解析された. (D, E) IVT により作製された mRNA のアガロース電気泳動による塩基長確認. (F) IVT により作製された mRNA のバイオアナライザによる塩基長分布の確認.

3.2 長鎖長 poly(A)鎖を持つ GLuc mRNA の培養細胞におけるルシフェラーゼ

タンパク質の発現

本研究で作製した GLuc mRNA のタンパク質発現への影響を調べるために、GLuc mRNA を株化培養細胞に核酸分子導入試薬 Lipofectamine LTX を用いて導入した。A240 GLuc mRNA は、導入 4, 24 そして 48 時間後のいずれの時間において、poly(A)鎖を持たない A0 や、従来の poly(A)鎖最大鎖長である A120、A240 よりも長鎖長である A360 GLuc mRNA、または poly(A)ポリメラーゼにより poly(A)鎖が付加されたいずれの mRNA に比べて有意に高いルシフェラーゼ (Luc)タンパク質発現を示した (図 2A)。また初代培養細胞 (図 2 B)や Nerve growth factor (NGF)により分化誘導した PC12 細胞 (図 2C)においても同様に、A240 GLuc mRNA が有意に高い Luc タンパク質発現を示した。120 塩基間に挿

入した 4 塩基の発現への影響を調べるために、A60-GAUG-A60 GLuc mRNA を Huh-7 細胞に導入した結果、導入 24 時間後において Luc タンパク質の発現は A120 mRNA と有意な差は見られず、同等であった(図 2D)。従って 4 塩基の挿入は Luc タンパク質発現には影響しないことが明らかになった。

さらに、240 塩基長が高タンパク質発現を示す最適な鎖長であるか詳細に調べるため、240 塩基前後の塩基長である、180, 210 または 270 塩基長の poly(A)鎖を持つ A180, A210 または A270 GLuc mRNA を作製した。バイオアナライザの解析により、作製した各 poly(A)鎖長を持つ mRNA は目的の塩基長であり、均一な塩基長分布を持つことが確認された (図 3A)。各 poly(A)鎖長を持つ mRNA の導入効率を調べるため、Lipofectamine LTX を用いて Huh-7 細胞に導入を行った。導入 24 時間後において、A240 GLuc mRNA は、A180, A210 または A270 GLuc mRNA に比べて有意に高い Luc タンパク質発現を示した (図 3B)。従って、120 から 360 塩基長の poly(A)鎖の中で、240 塩基長が最も高いタンパク質発現を示す鎖長であることが示された。

また 0 から 120 塩基長までの各 poly(A)鎖長を持つ GLuc mRNA を各培養細胞種に導入した結果、60 塩基から 120 塩基長までの poly(A)鎖長を持つ mRNA は、0, 30 塩基または酵素反応により poly(A)鎖が付加された mRNA に比べて有意に

高い Luc タンパク質発現を示した (図 4)。

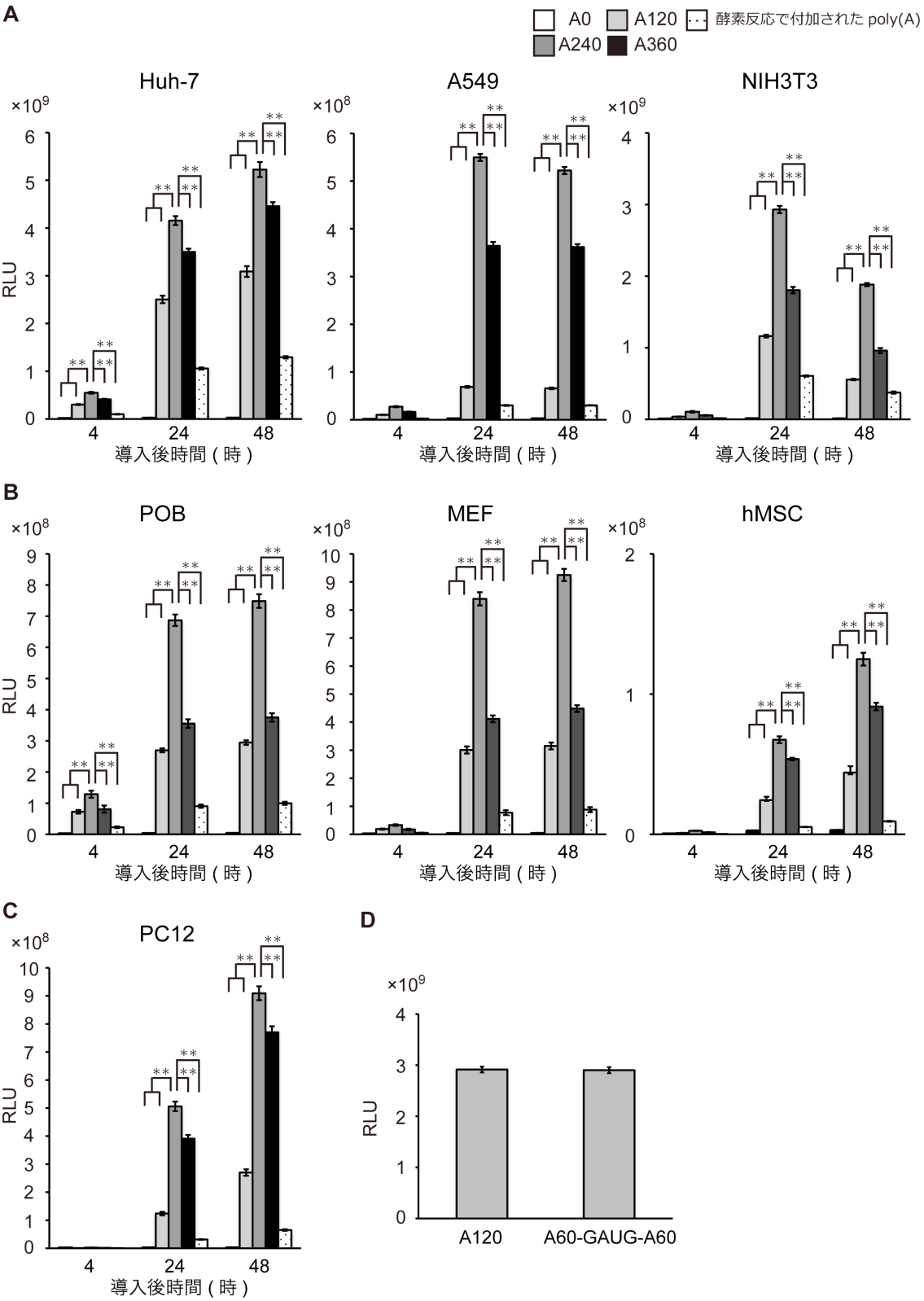


図 2 長鎖長 poly(A)鎖を持つ GLuc mRNA の培養細胞への導入による Luc タンパク質の発現

(A)Lipofectamine LTX を用いて各鎖長の GLuc mRNA (n= 10)を株化培養細胞へ導入し、4, 24, 48 時間後に Luc タンパク質の発現を測定した. 左, Huh-7 細胞; 中央, A549 細胞; 右, NIH3T3 細胞. (B)初代培養細胞への導入. 左, POB 細胞; 中央; MEF 細胞; 右; hMSC 細胞. (C)NGF により誘導した PC12 細胞への導入. (D)A120 mRNA と A60-GAUG-A60 mRNA の Huh-7 細胞へ導入し、24 時間後に Luc タンパク質の発現を測定した. **, p , 0.01; ANOVA Tukey's test または Student's *t* test.

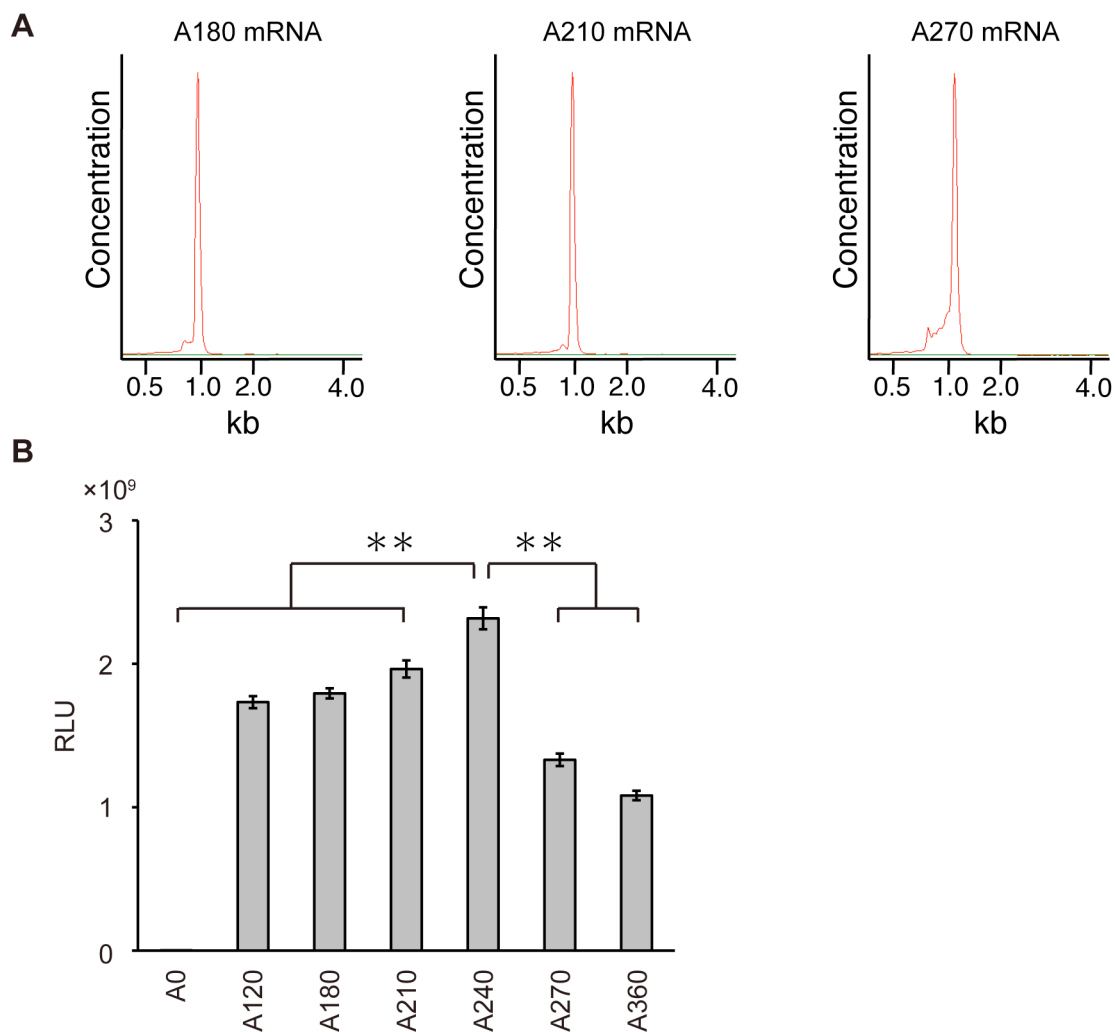


図3 長鎖長 poly(A)鎖を持つ GLuc mRNA の作製と Huh-7 細胞への導入による Luc タンパク質の発現

(A) IVT により作製された GLuc mRNA のバイオアナライザによる塩基長分布を確認した. (B) Lipofectamine LTX を用いて各 poly(A)鎖長の GLuc mRNA (n= 10)を Huh-7 細胞へ導入し、24 時間後に Luc タンパク質の発現を測定した. **, p , 0.01; ANOVA Tukey's test.

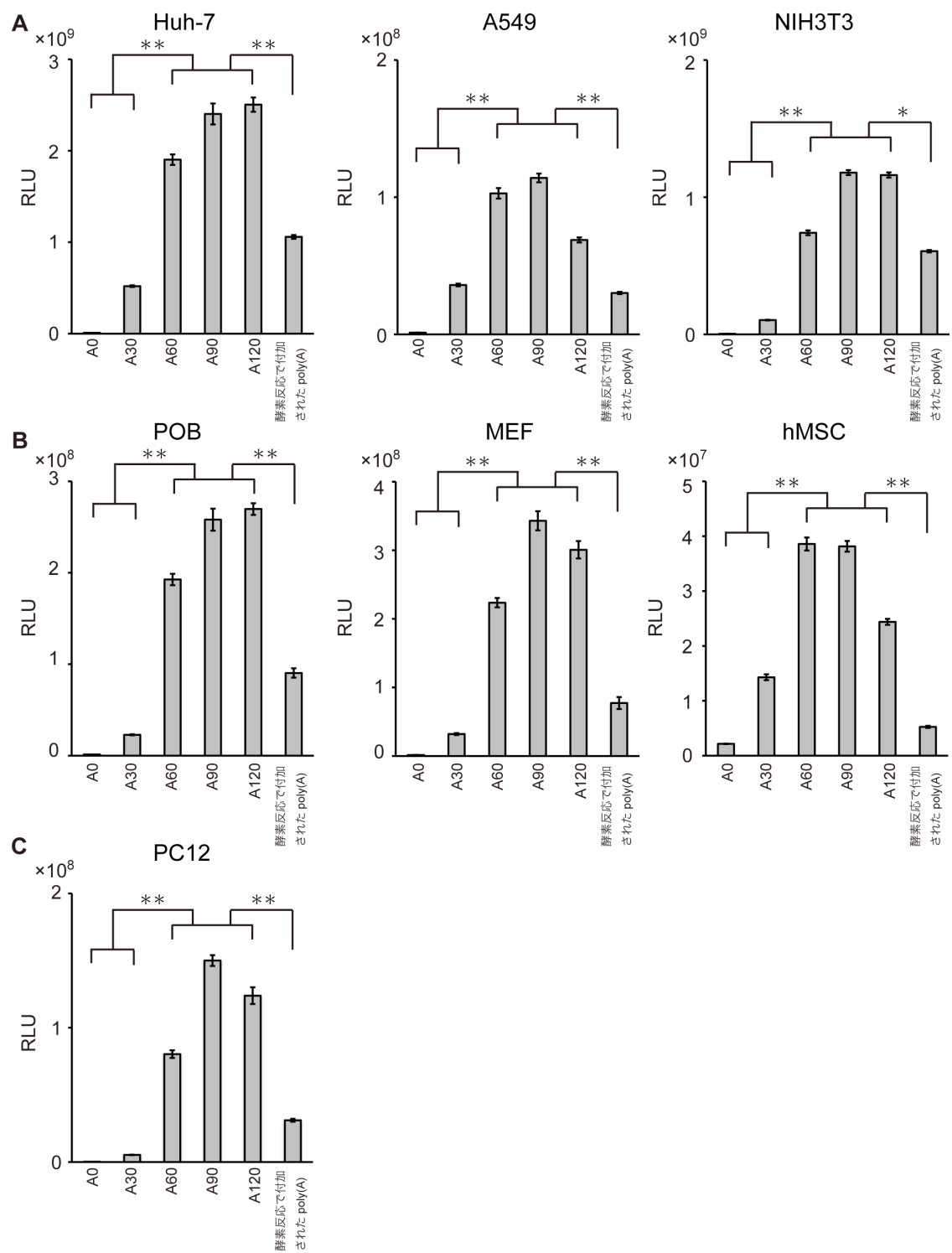


図 4 120 塩基までの poly(A)鎖を持つ GLuc mRNA の培養細胞への導入による Luc タンパク質の発現

(A)Lipofectamine LTX を用いて各鎖長の GLuc mRNA (n= 10)を株化培養細胞へ導入し、24 時間後に Luc タンパク質の発現を測定した。(B)初代培養細胞への導入。(C)NGF により誘導した PC12 細胞への導入. *, p , 0.05; **, p , 0.01; ANOVA Tukey's test.

3.3 長鎖長 poly(A)鎖を持つ NLuc mRNA の培養細胞における Luc タンパク質の発現

GLuc mRNA と同様に *oplophorus gracilirostris* 由来である NanoLuc (NLuc) 遺伝子においても、最長 360 塩基の poly(A)鎖長を持つ NLuc mRNA を作製した。Huh-7 細胞または MEF 細胞に導入し、導入 4, 24, 48 時間後において、NLuc A240 mRNA は、A360 NLuc mRNA を含む他の鎖長に比べて有意に高い Luc タンパク質の発現を示した (図 5A, B)。従って培養細胞への導入において、A240 NLuc mRNA は GLuc mRNA と同様に、他鎖長の mRNA に比べて最も高いタンパク質発現を示した。

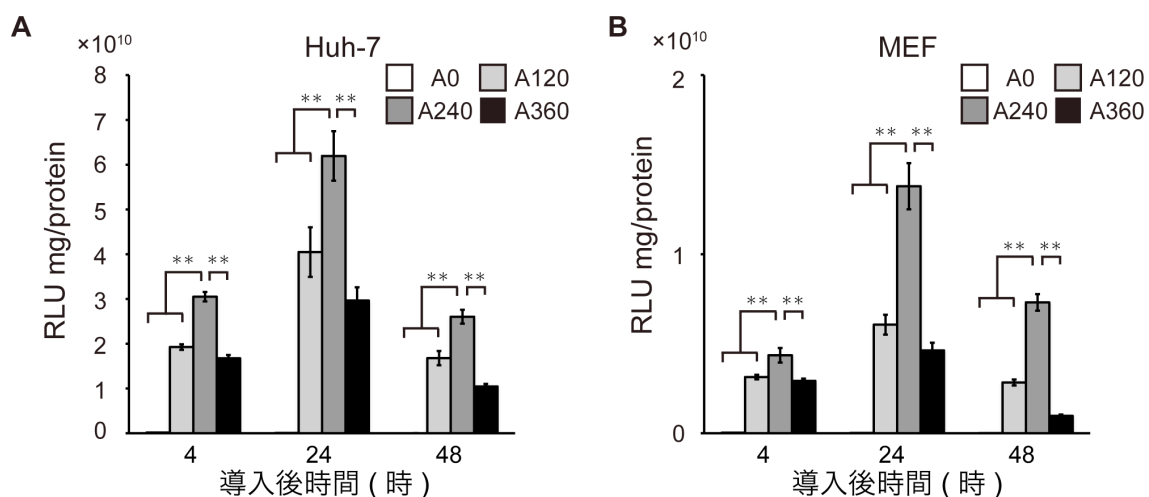


図 5 NLuc mRNA の培養細胞への導入による Luc タンパク質の発現
 A) Lipofectamine LTX を用いて各鎖長の NLuc mRNA を株化培養細胞(Huh-7 細胞)に導入し、4, 24, 48 時間後に Luc タンパク質の発現を測定した(n= 10).
 (B) Lipofectamine LTX を用いて各鎖長の NLuc mRNA を初代培養細胞(MEF 細胞)に導入し、4, 24, 48 時間後に Luc タンパク質の発現を測定した (n= 10). **, p , 0.01; ANOVA Tukey's test.

3. 4 長鎖長 poly(A)鎖を持つ NLuc mRNA のマウス下肢骨格筋における Luc タンパク質の発現

in vivo での導入において、A240 NLuc mRNA が Luc タンパク質の発現の向上に影響するのかを調べるために、マウス下肢骨格筋にハイドロダイナミクス法により、PEG-PAsp(DET) を用いて NLuc mRNA を導入した。導入 72 時間後において、A240 NLuc mRNA は他鎖長の A0, A120, A360 mRNA に比べて有意に高い Luc タンパク質の発現を示した (図 6)。よって A240 NLuc mRNA は *in vivo* に

においても最も高いタンパク質発現を示した。

以上より、本研究で作製した A240 mRNA は、解析した株化・初代培養細胞種や *in vivo* での導入において、A360 mRNA を含む他鎖長の mRNA に比べ最も高い Luc タンパク質の発現を示した。

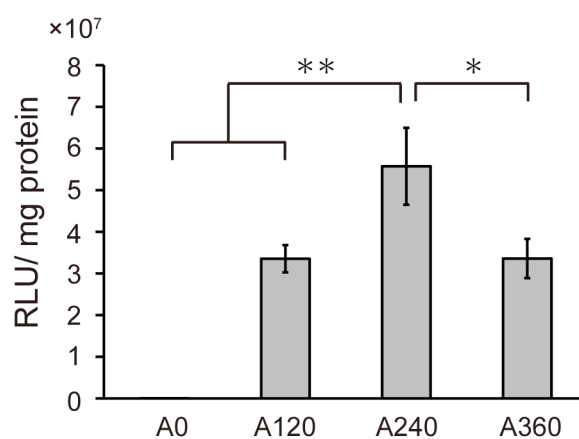


図 6 NLuc mRNA の *in vivo* での導入による Luc タンパク質の発現
マウス下肢骨格筋へのナノミセルを用いたハイドロダイナミクス法により導入した. 投与後 72 時間後に筋組織をとり、Luc タンパク質の発現を測定した (各 n=7 または 8). *, p , 0.05; **, p , 0.01; ANOVA Tukey's test.

3.5 高タンパク質発現を示す A240 mRNA の発現メカニズムの解析

3.5.1 GLuc mRNA の細胞内における残存量評価

A240 GLuc mRNA が高いタンパク質発現を示すメカニズムについて調べるた

めに、細胞内における mRNA の残存量を調べた。Lipofectamine LTX を用いて Huh-7 細胞に GLuc mRNA を導入し、導入 0、4 と 8 時間後に、細胞内の GLuc mRNA を回収した。そして qRT-PCR により定量を行った。

導入 0 から 4 時間後においては、A60 から A360 までの GLuc mRNA は、poly(A) 鎖のない A0 mRNA に比べて有意に高い残存量を示した (図 7A)。しかし、poly(A) 鎖長間における残存量の有意な差はなく、同等の残存量を示した。また酵素反応により poly(A)鎖を付加して作製した mRNA は、鎖長の短い mRNA に比べて残存量は少ない傾向が見られた。

導入 4 から 8 時間後においては、A240、A360 及び酵素反応により poly(A)鎖を付加して作製した GLuc mRNA は、A0 mRNA に比べて有意に高い残存量を示した (図 7B)。有意な差は確認できなかったが、酵素反応により poly(A)鎖を付加して作製した mRNA も含めて、長鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA は残存量が多い傾向が見られた。また A240 と A360 GLuc mRNA 間において、残存量に有意な差は確認されなかった (図 7B)。

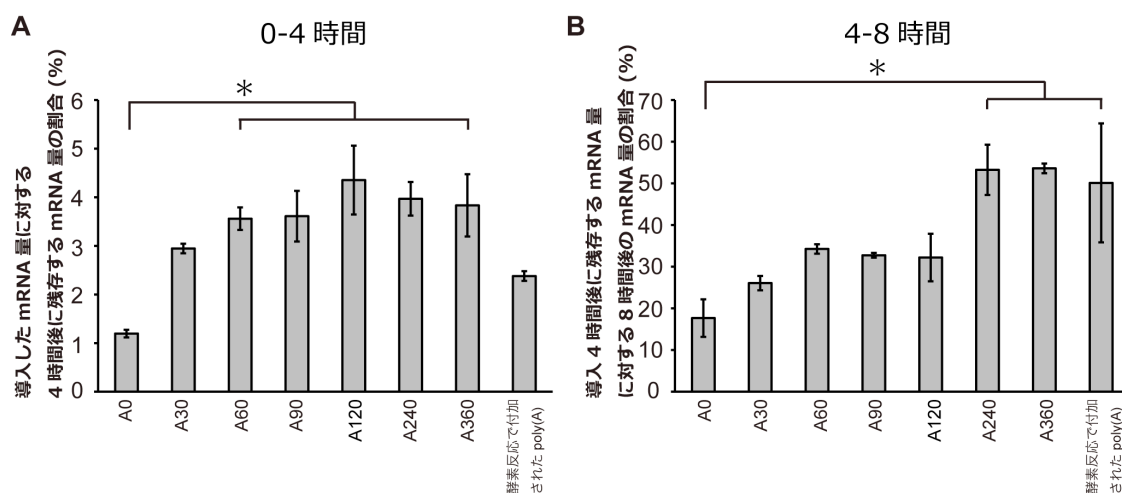


図7 GLuc mRNA の細胞内残存量

(A)Lipofectamine LTX により導入し、各鎖長の GLuc mRNA を導入後、0 と 4 時間後の GLuc mRNA 量を定量した(n=3). 0 時間後は、導入に用いた mRNA を使用した。mRNA 残存量レベルは、各鎖長の 0 時間後の mRNA 量に対する割合で表された。(B)導入 4 と 8 時間後の GLuc mRNA 量を定量した(n=3). mRNA 残存量レベルは、各鎖長の 4 時間後の mRNA 量に対する割合で表された.*, p ,0.05; ANOVA Tukey's test.

3.5.2 GLuc mRNA の翻訳効率の評価

poly(A)鎖長の長鎖長化が翻訳効率に与える影響について調べた。ウサギ網状赤血球溶解液とヒト細胞由来細胞抽出液を用いて GLuc mRNA の翻訳効率を評価した。どちらの無細胞タンパク質合成系においても、A240 GLuc mRNA が他鎖長に比べて有意に高い Luc タンパク質の発現を示した (図 8)。

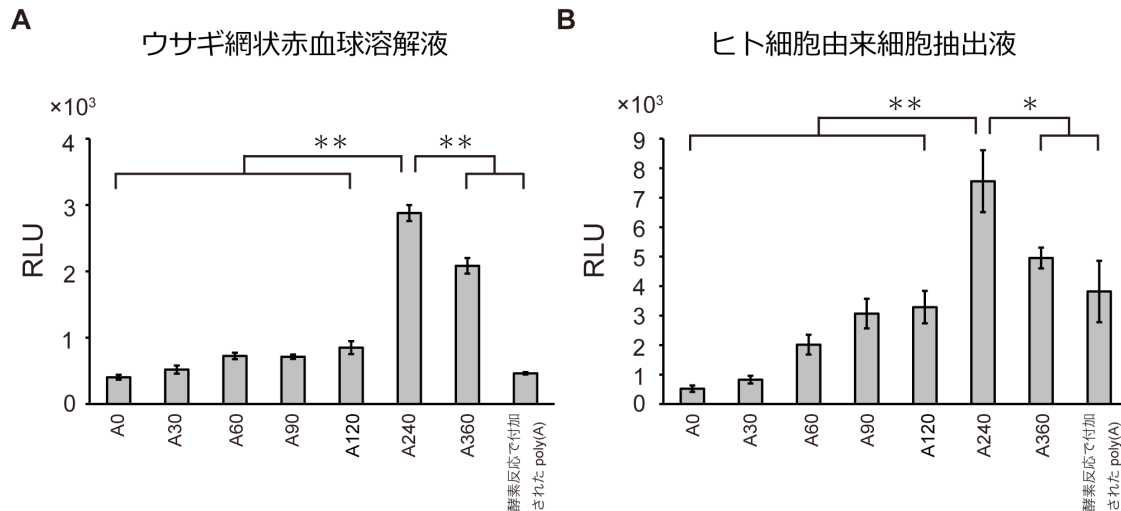


図 8 GLuc mRNA の翻訳効率

(A) ウサギ網状赤血球溶解液を用いた GLuc mRNA の翻訳. 反応 120 分後に Luc タンパク質の発現を測定した(各 n=4). (B) ヒト細胞由来細胞抽出液を用いた GLuc mRNA の翻訳. 反応 30 分後に Luc タンパク質の発現を測定した(各 n=3 または 4). *, p, 0.05; **, p, 0.01; ANOVA Tukey's test.

3.5.3 GLuc mRNA と翻訳開始因子の結合能の評価

翻訳過程における影響を調べるために、mRNA 結合タンパク質である PABP、eIF4G、または eIF4E タンパク質と GLuc mRNA の結合を免疫沈降法により解析し、qRT-PCR により定量を行った。まず免疫沈降に使用したサンプルをウェスタンブロットで解析した結果、各サンプルから PABP、eIF4G、そして eIF4E タンパク質が検出された(図 9A)。免疫沈降の結果、GLuc mRNA と PABP の結合において、A240 と A360 mRNA は、A120 mRNA に比べて有意に結合量が増加し

た (図 9B 左)。一方で eIF4E や eIF4G タンパク質との結合に関しては、A240 mRNA は、A120 や A360 mRNA よりも有意に結合量が増加した (図 9B 中央、右)。

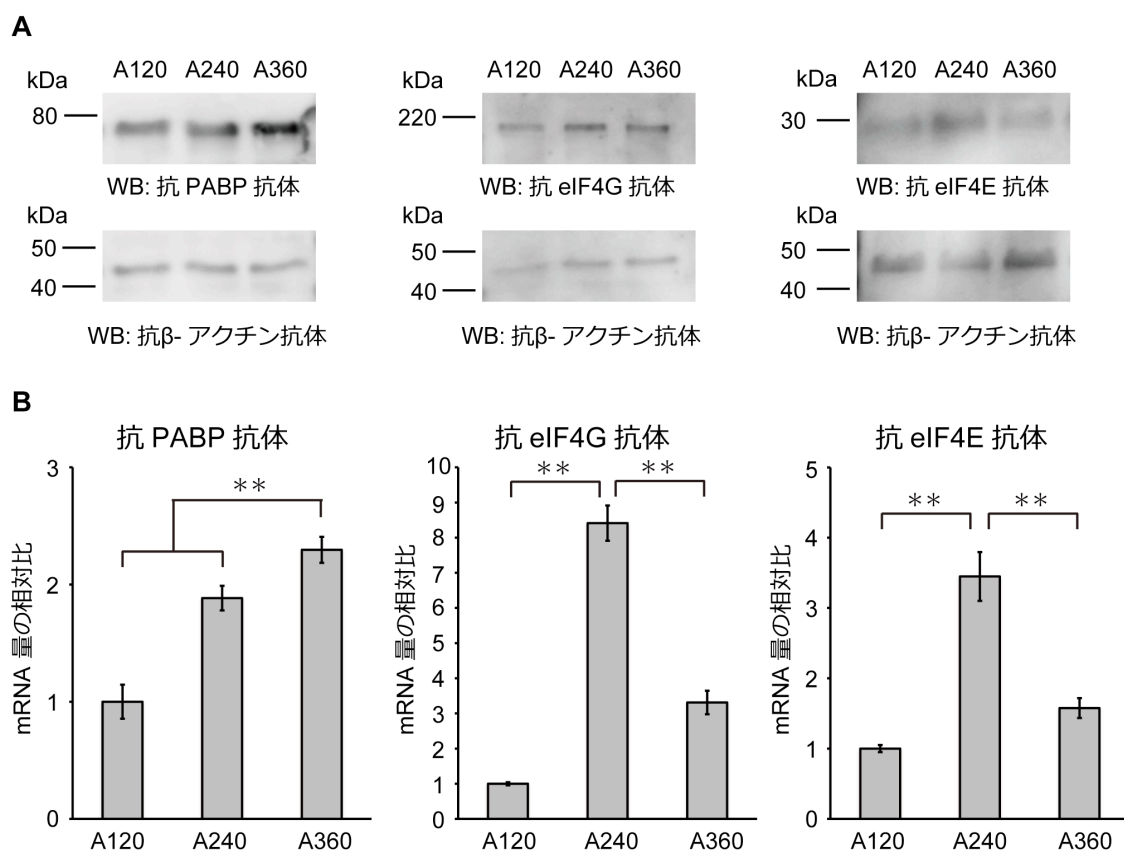


図 9 RNA 結合タンパク質と GLuc mRNA の結合能

GLuc mRNA は、ヒト細胞由来細胞抽出液を用いて翻訳を行った。(A)タンパク質は SDS-PAGE により分画し、抗 PABP 抗体、抗 eIF4G、抗 eIF4E 抗体、または抗 β -アクチン抗体を用いてウエスタンブロットにより解析した(各 $n=3$) (B)GLuc mRNA と抗 PABP 抗体 (左)、抗 eIF4G (中央)、抗 eIF4E 抗体 (右)と免疫沈降した(各 $n=6$).結合した mRNA 量は、各鎖長の免疫沈降前の mRNA 量で標準化を行い、A120 mRNA 量への相対比で表された. **, $p < 0.01$; ANOVA Tukey's test.

4 考察

本研究でオリゴ DNA を用いて作製した 120 塩基までの poly(A)鎖を持つ mRNA や長鎖長化した poly(A)鎖を持つ mRNA は、poly(A)ポリメラーゼにより poly(A)鎖が付加された酵素付加 mRNA に比べて均一鎖長であった。酵素付加 mRNA は、オリゴ DNA により poly(A)鎖を付加した mRNA よりも鎖長分布が生じることが報告されている[8]。従ってこれらの結果より、均一な poly(A)鎖を持つ mRNA を作製する上で、オリゴ DNA を用いた poly(A)鎖の付加は優れた方法である。

オリゴ DNA を用いた poly(A)鎖の最大塩基長はこれまで 120 塩基であったが [8,12]、本研究では最大 360 塩基長までの長鎖長化に成功した。今後さらに長鎖長化するためには、より安定なテンプレート DNA の作製とオリゴ DNA 自体の長鎖長合成が課題である。

一定鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA と酵素付加 mRNA の導入によるタンパク質発現への影響についてはこれまで報告されていなかった。本研究では、Lipofectamine LTX を用いて培養細胞に導入し比較した結果、一定鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA は、酵素付加 mRNA に比べて高いタンパク質発現を示した。従って、一定の poly(A)鎖長を持たないことによって生じる mRNA の純度の低下は

タンパク質発現に影響すると考えられる。

異なる poly(A)鎖長の mRNA を培養細胞に導入した際のタンパク質発現への影響については既に報告されている。TransMessenger Transfection Reagent (QIAGEN)によりホタルルシフェラーゼ mRNA を UMR-106 細胞に導入すると、poly(A)鎖長が 0 から 100 塩基までの様々な mRNA の中で、60 塩基の poly(A)鎖長を持つ mRNA が最も高いタンパク質発現を示す[12]。またエレクトロポレーション法により Green Fluorescent Protein (GFP) mRNA を樹状細胞に導入すると、120 塩基の poly(A)鎖長を持つ mRNA が最も高いタンパク質発現を示すことが報告された[8]。本研究の Lipofectamine LTX を用いて導入を行った結果では、60 から 120 塩基長までの poly(A)鎖長を持つ GLuc mRNA は、細胞種ごとに高タンパク質発現を示す鎖長は異なっており、先行論文の結果と同様の傾向を示した。従って、120 塩基長までの poly(A)鎖長を持つ mRNA は、導入する細胞種や方法によって高タンパク質発現を示す poly(A)鎖長は異なることが示唆された。

本研究で作製した A240 mRNA は、解析した株化・初代培養細胞の種類によらず、高タンパク質発現を示した。培養細胞への導入において Lipofectamine LTX を使用したが、これはナノミセルを用いて導入した際に発現するタンパク質量が低いためである。A240 mRNA は、ナノミセルを用いた下肢骨格筋への導入にお

いても最も高いタンパク質発現を示した。これまで *in vivo* 下における poly(A) 鎖長間のタンパク質発現への影響は調べられていなかったが、本研究により初めて明らかになった。以上より、GLuc と NLuc 遺伝子における 240 塩基長の poly(A)鎖は、培養細胞や生体環境下に導入する際に高タンパク質発現を示す鎖長であることが示唆された。他の核酸分子導入試薬や異なる投与部位に導入した場合も同様の傾向を示すかどうかは、今後検討が必要である。

poly(A)鎖は、細胞質における mRNA の分解機構と環状構造形成による翻訳の活性化に関与する[2-7]。本研究では、poly(A)鎖長の違いによる mRNA の安定性を評価するため、細胞内に残存する mRNA 量を調べた。導入 4 から 8 時間後において、長鎖長である A240, A360 または酵素付加 mRNA は、他の短鎖長の mRNA に比べて残存量が多く、安定性が高い傾向が見られた。過去の報告において、エレクトロポレーション法により導入された GFP mRNA は、poly(A)鎖長が 0 から 120 塩基までの mRNA においては、120 塩基長の poly(A)鎖を持つ mRNA が最も細胞質内における安定性が高いことが示された[8]、従ってこれらの結果より、短鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA は早く分解されることが示唆された。本研究の導入 0 から 4 時間後の残存量の結果は、mRNA の細胞内への導入効率と安定性の二つの要因が含まれる。360 塩基長までの mRNA は短鎖長の mRNA と同

等の残存量を示し、導入効率に大きな影響はないことが考えられる。一方で酵素付加 mRNA は短鎖長の mRNA に比べて残存量が少なかった。導入 4 から 8 時間後までにおいて、酵素付加 mRNA は他鎖長に比べて高い安定性を持つ傾向を示しており、酵素付加 mRNA の導入効率は他鎖長に比べて低いことが考えられた。

安定性の評価において、A240 と A360 GLuc mRNA の残存量は同等であった。そこで A240 GLuc mRNA の高タンパク質発現への効果は、他の要因からの影響であることが示唆されたため、翻訳効率への影響を評価した。無細胞タンパク質合成系において、A240 mRNA は最も翻訳効率が高く、*in vitro* 及び *in vivo* に導入した結果と同様の傾向を示した。従って A240 が高タンパク質発現を示したのは、短鎖長の mRNA に比べて安定性と翻訳効率が優れていること、A360 mRNA に対しては翻訳効率に因る可能性が示唆された。また酵素付加 mRNA は、安定性に関して A240 mRNA と同等であったが、導入効率と翻訳効率が低いためタンパク質発現に影響したと考えられる。

poly(A)鎖と Cap 構造は、タンパク質翻訳効率において相乗作用を持ち[20]、翻訳段階において形成される Cap-eIF4E-eIF4G-PABP-poly(A)鎖ループ構造は、リボソームのリサイクリングに影響する[5,7]。Kahvejian らは、poly(A)ポリメラー

ぜにより付加された poly(A)鎖を持つ mRNA は、無細胞系において翻訳開始因子複合体の eIF4E や eIF4G と結合することを明らかにした[52]。しかしながら poly(A)鎖長の違いによる RNA 結合タンパク質との結合性の違いを調べた報告はこれまでなかった。本研究により、一定鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA を導入した際の、翻訳開始因子複合体と mRNA の結合能が初めて明らかになった。長鎖長化した poly(A)鎖を持つ GLuc mRNA は、PABP との結合能の向上が見られ、一方で 360 塩基の長鎖長化した poly(A)鎖を持つ mRNA は翻訳開始因子との結合能の低下が見られた。本研究により、長鎖長化した mRNA と翻訳開始因子との結合能の変化が示されたが、結合能と翻訳との相関は明らかになっていない。

A360 mRNA の導入によりタンパク質発現が低下した理由としては、長鎖長化した poly(A)鎖と翻訳開始因子との結合能の低下により複合体形成が阻害され、翻訳効率の低下が起きた可能性が考えられる。

内在性の mRNA の分解機構や翻訳過程への poly(A)鎖の影響については、これまでに多くの報告がされてきた。さらに近年、次世代シーケンサーを用いた poly(A)鎖長の解析法が報告され、ゲノムワイドな解析が可能となった[53]。この技術により、poly(A)鎖が寄与する mRNA メタボリズムについて研究が大きく進展することが期待される。一方で、導入された外在性の mRNA についてはまだ

知見は十分ではない。poly(A)鎖長の違いは、本研究で調べた他の mRNA 結合因子やタンパク質間の結合の影響、また二次構造や三次構造に変化を及ぼすことも考えられる。従って、今後さらに詳細な解析が求められる。

本作製法により均一かつ長鎖長の mRNA 作製が可能になった。塩基長の一定でない mRNA は、ポリマーとの静電相互作用によるナノミセル調製の際の、物性や機能が一定しない原因の一つとしてこれまで懸念されていた問題であった。本作製法は、物性の安定したナノミセルの調製に役立つことが期待される。本作製法を用いた mRNA の導入によるタンパク質発現への効果においては、従来の最大塩基長の mRNA に比べて約二倍の発現向上が確認された。しかし臨床応用を考えるには、まだ十分な発現が得られたとは言えない。先に紹介した、 β グロビン遺伝子配列を GFP 遺伝子の 3' UTR に挿入した mRNA は、樹状細胞への導入において、約二倍のタンパク質発現の向上を示す[8]。UTR 配列が最適化されたテンプレート DNA は遺伝子配列を挿入することで簡便に作製することができるため、本作製法と併用することでさらにタンパク質発現の向上が期待できる。また、治療用 mRNA に本作製法を適用する上では、今回使用した二種のルシフェラーゼ mRNA と大きく塩基長が異なる可能性も考えられる。そのため治療用 mRNA に最適な poly(A)鎖長については、今後新たな検討が必要となって

くることが予想される。

近年、いくつかの大学において、RNA の治療応用を進展させるためのセンターが設立されている。また前臨床や臨床試験に向け、大学発のベンチャー企業も生まれている。例えば塩基修飾法を報告した Rudolph らは 2009 年に Ethris 社を設立し、塩基修飾法によって免疫原性が抑制された SNIM®-RNA を用いた疾患治療に取り組んでいる。他には、Argos Therapeutics 社、BioNTech 社、CureVac 社、eTheRNA 社、Factor Bioscience 社、Moderna 社などが設立されている。また大手製薬会社も mRNA 治療に向けた開発に参入している。ベンチャー企業が開発した mRNA 作製技術とのライセンス契約が活発に結ばれており、先に挙げた Ethris 社は 2013 年に Shire 社、Moderna 社は 2013 年と 2014 年にそれぞれ AstraZeneca 社と Alexion 社、CureVac 社は 2014 年に Sanofi Pasteur 社と契約締結を発表している。このように mRNA の治療応用に向けた取り組みは、大学や産業界で盛んに行われるようになってきており、2013 年には第一回の International mRNA Health Conference がドイツで催された。

当研究室による成果も含め、*in vivo* に mRNA を導入した mRNA デリバリーの実現はいくつか報告されているが、現在までに臨床試験に至った例はない [25,41]。今後、本作製法が mRNA 作製における有力な手法となり、*in vivo* への

mRNA 導入による治療が実現されることが期待される。

5 結語

本研究では、テンプレート DNA に typeIIS 型制限酵素認識配列を挿入した 120 塩基の poly(d(A/T))配列を複数連結して組み込むことで、一定かつ長鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA を作製する手法を確立した。本作製法を用いることで、最長 360 塩基長までの長鎖長 poly(A)鎖を持つルシフェラーゼ発現 mRNA を作製した。作製したルシフェラーゼ発現 mRNA を培養細胞またはマウス下肢骨格筋に導入した結果、240 塩基の poly(A)鎖を持つ mRNA が最も高いタンパク質発現を示し、安定性と翻訳開始因子 (eIF4G, eIF4E) を介する翻訳効率の向上が寄与することが示唆された。本作製法により高タンパク質発現な mRNA の作製が可能となった。

引用文献

1. Dávila López M, Samuelsson T. Early evolution of histone mRNA 3' end processing. *RNA*, 14(1), 1-10 (2008).
2. Norbury CJ. Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(10), 643-653 (2013).
3. Cao D, Parker R. Computational modeling of eukaryotic mRNA turnover. *RNA*, 7(9), 1192-1212 (2001).
4. Schoenberg DR, Maquat LE. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 13(4), 246-259 (2012).
5. Weill L, Belloc E, Bava FA, Méndez R. Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6), 577-585 (2012).
6. Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*, 2(1), 135-140 (1998).

7. Michel YM, Poncet D, Piron M, Kean KM, Borman AM. Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J Biol Chem*, 275(41), 32268-32276 (2000).
8. Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon, P, Koslowski M, Huber C, Türeci O, Sahin U. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 108(13), 4009-4017 (2006).
9. Rajagopalan LE, Malter JS. Turnover and translation of in vitro synthesized messenger RNAs in transfected, normal cells. *J Biol Chem*, 271(33), 19871-19876 (1996).
10. Iizuka N, Najita L, Franzusoff A, Sarnow P. Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 14(11), 7322-7330 (1994).

11. Preiss T, Muckenthaler M, Hentze MW. Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control. *RNA*, 4(11), 1321-1331 (1998).
12. Elango N, Elango S, Shivshankar P, Katz MS. Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)₁₀₀ tail-containing vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 330(3), 958-966 (2005).
13. Eckmann CR, Rammelt C, Wahle E. Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2(3), 348-361 (2011).
14. Callis J, Fromm M, Walbot V. Expression of mRNA electroporated into plant and animal cells. *Nucleic Acids Res*, 15(14), 5823-5831 (1987).
15. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(16), 6077-6081 (1989).
16. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949 Pt 1), 1465-1468 (1990).

17. Weide B, Carralot JP, Reese A, Scheel B, Eigentler TK, Hoerr I, Rammensee H G, Garbe C, Pascolo S. Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. *J Immunother*, 31(2), 180-188 (2008).
18. Weide B, Pascolo S, Scheel B, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler T K, Pawelec G, Hoerr I, Rammensee HG, Garbe C. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother*, 32(5), 498-507 (2009).
19. Mitchell DA, Nair SK. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J Clin Invest*, 106(9), 1065-1069 (2000).
20. Tavernier G, Andries O, Demeester J, Sanders NN, De Smedt SC, Rejman J. mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release*, 150(3), 238-247 (2011).
21. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via

- toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663), 1526-1529 (2004).
22. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, 279(13), 12542-12550 (2004).
23. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 16(11), 1833-1840 (2008).
24. Kormann MS, Hasenpusch G, Aneja MK, Nica G, Flemmer AW, Herber-Jonat S, Huppmann M, Mays LE, Illenyi M, Schams A, Griesse M, Bittmann I, Handgretinger R, Hartl D, Rosenecker J, Rudolph C. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol*, 29(2), 154-157 (2011).
25. Uchida S, Itaka K, Uchida H, Hayakawa K, Ogata T, Ishii T, Fukushima S,

- Osada K, Kataoka K. In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle. *PLoS One*, 8(2), e56220 (2013).
26. Karikó K, Muramatsu H, Keller JM, Weissman D. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol Ther*, 20(5), 948-953 (2012).
27. Charette M, Gray MW. Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB Life*, 49(5), 341-351 (2000).
28. Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*, 47(1), 113-131 (2001).
29. Osada K, Christie RJ, Kataoka K. Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery. *J R Soc Interface*, 6 Suppl 3, S325-339 (2009).
30. Itaka K, Kataoka K. Progress and prospects of polyplex nanomicelles for

plasmid DNA delivery. *Curr Gene Ther*, 11(6), 457-465 (2011).

31. Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K. Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses. *Chem Soc Rev*, 41(7), 2562-2574 (2012).
32. Kanayama N, Fukushima S, Nishiyama N, Itaka K, Jang WD, Miyata K, Yamasaki Y, Chung UI, Kataoka K. A PEG-based biocompatible block cationic polymer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. *ChemMedChem*, 1(4), 439-444 (2006).
33. Miyata K, Oba M, Nakanishi M, Fukushima S, Yamasaki Y, Koyama H, Nishiyama N, Kataoka K. Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J Am Chem Soc*, 130(48), 16287-16294 (2008).

34. Masago K, Itaka K, Nishiyama N, Chung UI, Kataoka K. Gene delivery with biocompatible cationic polymer: pharmacogenomic analysis on cell bioactivity. *Biomaterials*, 28(34), 5169-5175 (2007).
35. Itaka K, Ishii T, Hasegawa Y, Kataoka K. Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity. *Biomaterials*, 31(13), 3707-3714 (2010).
36. Itaka K, Ohba S, Miyata K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Chung UI, Kataoka K. Bone regeneration by regulated in vivo gene transfer using biocompatible polyplex nanomicelles. *Mol Ther*, 15(9), 1655-1662 (2007).
37. Uchida H, Itaka K, Nomoto T, Ishii T, Suma T, Ikegami M, Miyata K, Oba M, Nishiyama N, Kataoka K. Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J Am Chem Soc*, 136(35), 12396-12405 (2014).
38. Green JJ, Langer R, Anderson DG. A combinatorial polymer library approach

- yields insight into nonviral gene delivery. *Acc Chem Res*, 41(6), 749-759 (2008).
39. Uchida H, Miyata K, Oba M, Ishii T, Suma T, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K. Odd-even effect of repeating aminoethylene units in the side chain of N-substituted polyaspartamides on gene transfection profiles. *J Am Chem Soc*, 133(39), 15524-15532 (2011).
40. Suma T, Miyata K, Ishii T, Uchida S, Uchida H, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K. Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials*, 33(9), 2770-2779 (2012).
41. Sahin U, Karikó K, Türeci O. mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 13(10), 759-780 (2014).
42. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46(5), 659-667 (1986).

43. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 22(7), 346-353 (2004).
44. Cannarozzi G, Schraudolph NN, Faty M, von Rohr P, Friberg MT, Roth AC, Gonnet P, Gonnet G, Barral Y. A role for codon order in translation dynamics. *Cell*, 141(2), 355-367 (2010).
45. Aviv H, Voloch Z, Bastos R, Levy S. Biosynthesis and stability of globin mRNA in cultured erythroleukemic Friend cells. *Cell*, 8(4), 495-503 (1976).
46. Atwater JA, Wisdom R, Verma IM. Regulated mRNA stability. *Annu Rev Genet*, 24, 519-541 (1990).
47. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(6), 1670-1674 (1986).
48. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV,

- Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315(5811), 525-528 (2007).
49. Mockey M, Gonçalves C, Dupuy FP, Lemoine FM, Pichon C, Midoux P. mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem Biophys Res Commun*, 340(4), 1062-1068 (2006).
50. Nagata K, Itaka K, Baba M, Uchida S, Ishii T, Kataoka K. Muscle-targeted hydrodynamic gene introduction of insulin-like growth factor-1 using polyplex nanomicelle to treat peripheral nerve injury. *J Control Release*, 183, 27-34 (2014).
51. Itaka K, Osada K, Morii K, Kim P, Yun SH, Kataoka K. Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *J Control Release*, 143(1), 112-119 (2010).
52. Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N.

Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev*, 19(1), 104-113 (2005).

53. Zheng D, Tian B. Sizing up the poly(A) tail: insights from deep sequencing. *Trends Biochem Sci*, 39(6), 255-257 (2014).

謝辞

本学位論文をまとめるにあたり、東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門 片岡一則教授には、御指導、御鞭撻をいただきました。深く御礼申し上げます。

主査を担当していただきました鄭雄一教授、審査を担当していただきました田中栄教授、三宅健介教授、菱川慶一准教授、高井大哉講師には、貴重な御教示をいただきました。深く御礼申し上げます。

位高啓史准教授には、研究の進め方から実験結果の解釈まで研究全般に渡り、数々の御指導を賜りました。心より感謝致します。

石井武彦准教授（現ナノキャリア株式会社）、内田智士助教、内田寛邦助教には、日々の議論を通じて多くの知識や示唆をいただきました。心より感謝致します。

小倉里美さん、三好飛鳥さん、鈴木紗恵さん、玉本朋子さん、他多くの片岡研究室の方々には、実験の実施に際して御協力をいただきました。皆様に心より感謝致します。

最後に、これまで温かく見守り、支えてくれた両親に心より感謝致します。