

論文の内容の要旨

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

[背景]

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 (ヒストンを除く)は共通構造として、5'末端に Cap 構造、3'末端に poly(A)鎖を持ち、poly(A)鎖は mRNA の翻訳及び分解双方に関与する。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。

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

in vitro 転写 (IVT)によって合成される 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を含むテンプレート DNA から IVT 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、poly(A)鎖は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。この方法に代わり、一定鎖長の poly(A)鎖を付加するために、二本鎖オリゴ DNA を用いた d(A/T)配列をテンプレート DNA に組み込む手法が報告された。poly(d(A/T))配列が維持されたテンプレートから作製された mRNA は、従来法により poly(A)鎖を酵素付加した mRNA よりも均一な鎖長が得られる。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、オリゴ DNA の化学合成に制限があることから、最長 120 塩基である。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、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)鎖を持つルシフェラーゼ 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した。

3. mRNA 送達システム研究の現況

核酸送達 (デリバリー)の研究は、主に pDNA が用いられてきた。しかし、pDNA は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。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く安全性が高い方法であるため、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、mRNA が生体内で不安定であること、mRNA が Toll-like receptors (TLRs)に認識にされて免疫反応が惹起されることが挙げられる。これらの問題を解決するため、mRNA の塩基修飾法と、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。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おり、mRNA の UTR 配列の最適化と同義コドンへの置き換えの二つの方法が知られている。

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。

[結果]

本研究ではまず長鎖長である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、さらに各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んだプラスミドを作製した。poly(d(A/T))配列がテンプレートDNA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結果、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。続いて作製したテンプレートDNAからT7プロモーターを用いてGLuc mRNAを作製し、アガロース電気泳動と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によりGLuc mRNAの塩基長と分布解析を行った。その結果、240 塩基長と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 (酵素付加)GLuc mRNAに比べ均一塩基長であることが明らかになった。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、本研究では最大360 塩基長までの長鎖長化に成功した。以下、X 塩基のpoly(A)鎖を持つmRNAを、AX mRNAと表記した。

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、各種培養細胞に遺伝子導入試薬 Lipofectamine LTX を用いて導入した。A240 mRNA は解析した培養細胞種によらず、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、または酵素付加 mRNA に比べ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、高分子ナノミセルを用いてハイドロダイナミクス法によりマウス下肢骨格筋に導入した結果、A240 mRNA が他の poly(A)鎖長を持つ mRNA と比べ最も高いタンパク質の発現を示した。

A240 mRNA が高いタンパク質発現を示すメカニズムを調べるために、mRNA 導入後の細胞内における mRNA の残存量を qRT-PCR により定量を行った。導入 4 から 8 時間後においては、A240、A360 及び酵素付加 GLuc mRNA は、A0 mRNA に比べて有意に高い残存量を示した。また酵素付加 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。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。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。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。

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るため、無細胞タンパク質合成系を用いて GLuc mRNA の翻訳効率を評価した結果、A240 GLuc mRNA が他鎖長に比べて有意に高いタンパク質の発現を示した。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の向上に因る可能性が示唆された。

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、翻訳段階において形成されるループ構造は、リボソームのリサイクリングに影響する。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。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。GLuc mRNA と PABP タンパク質の結合において、A240 と A360 mRNA は、A120 mRNA に比べて有意に結合量が増加した。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。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。長鎖長化しすぎた poly(A)鎖は、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。

[まとめ]

本研究では、テンプレート DNA に typeIIIS 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。