

「翻訳反応を調節し得る mRNA 構造の熱安定性と構造特性との相関解析」

甲南大学 先端生命工学研究所

遠藤 玉樹

1 研究の背景と目的

遺伝子 (DNA) に保存された塩基配列の情報を、タンパク質という機能性分子に変換する過程 (セントラルドグマ) は、生命にとって不可欠な反応である。DNA の塩基配列情報は、転写反応を経てメッセンジャーRNA (mRNA) に変換され、その後、翻訳反応により mRNA の塩基配列がタンパク質としてのアミノ酸配列に変換される。このような反応過程の中で、mRNA は、塩基配列の一次情報を DNA からタンパク質に受け渡すための役割を担っていると考えられてきた。しかしながら近年、mRNA が形成する構造、およびその熱安定性が、翻訳反応に影響を与えることで、遺伝子の発現を調節し得ることが明らかになりつつある。翻訳反応では、リボソームが mRNA 上を 5'側から 3'側へ移動していくが、mRNA が形成する安定な構造は、リボソームの進行を一時的に妨げることでタンパク質の発現に影響を及ぼす。我々は近年、mRNA の翻訳領域中に形成される安定な RNA 四重鎖構造が、翻訳伸長反応を一時的に停滞させることを見出した¹。また、翻訳伸長反応の速度変化は、伸長反応の途中におけるフレームシフトや、翻訳後タンパク質の構造形成に影響を及ぼすことも示している²。これらの知見は、これまでセントラルドグマにおける情報伝達の仲介役として認識されてきた mRNA が、その構造や安定性により、翻訳反応過程やタンパク質機能を調節する高次なメッセージを有している可能性を示している。しかしながら、どのような構造特性を有する mRNA で、どの程度の安定性であれば、翻訳伸長反応の速度変化や停滞を引き起こすことができるのかは明らかになっていない。そこで本研究では、mRNA が形成する高次構造が翻訳反応過程に及ぼす影響について、RNA 構造の構造特性と熱安定性とを相関させて評価することを目的とした。

2 研究方法・研究内容

本研究では、翻訳の伸長反応に焦点をあて、mRNA が形成する構造が翻訳伸長反応に与える影響を評価した。また、mRNA に対して、分子間相互作用で新たな構造を形成させ、翻訳伸長反応が変化するかどうかについても検討を行った。

翻訳伸長反応を解析する手法としては、我々が構築した Synchronized Translation という手法を活用した (図 1)³。本研究で行う Synchronized Translation では、特定の RNA 構造を形成する塩基配列を 3'側に挿入したレポーターmRNA を用いる (図 2A)。まず、チロシル tRNA 合成酵素と終結因子を除去した生体外翻訳溶液で翻訳反応を開始させ、mRNA 上の最初のチロシンコドン位置でリボソームを強制的に停止させる (図 1A、第1ステップ)。また、この段階で蛍光標識されたアミノ酸を人工的に翻訳産物に導入しておく。次に、取り除かれていたチロシル tRNA 合成酵素を含む翻訳溶液を追加することに

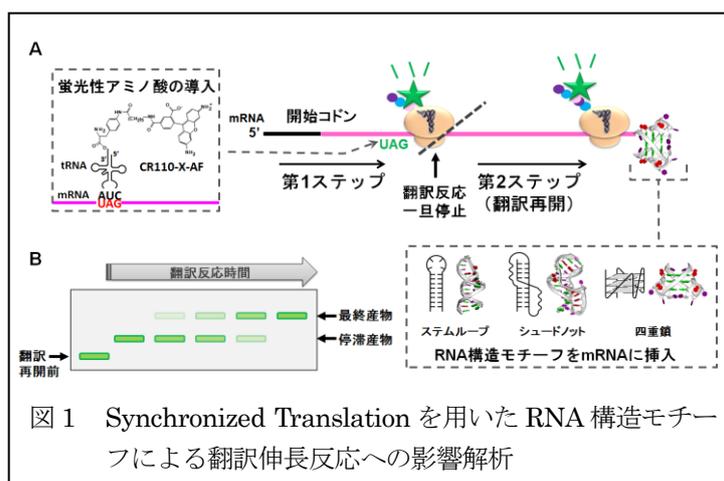


図 1 Synchronized Translation を用いた RNA 構造モチーフによる翻訳伸長反応への影響解析

より、翻訳伸長反応を再開させる (図 1A、第 2 ステップ)。そして、第 1 ステップで導入しておいた蛍光標識アミノ酸の蛍光シグナルを検出することで、翻訳伸長反応の進行度合いを継時的に解析する (図 1B)。

本研究では、レポーター mRNA の 3' 側に配置する RNA の構造モチーフとして、ステムループ構造、三重鎖構造、四重鎖構造に着目して研究を進めた。四重鎖構造については、四重鎖構造を形成する配列領域に塩基対を形成し、二重鎖構造への構造変換を促すアンチセンス RNA を用いて検討を行った。また、三重鎖構造については、ステムループ構造の二重鎖構造領域に結合するペプチド核酸 (PNA) を用いて三重鎖構造を形成させた。

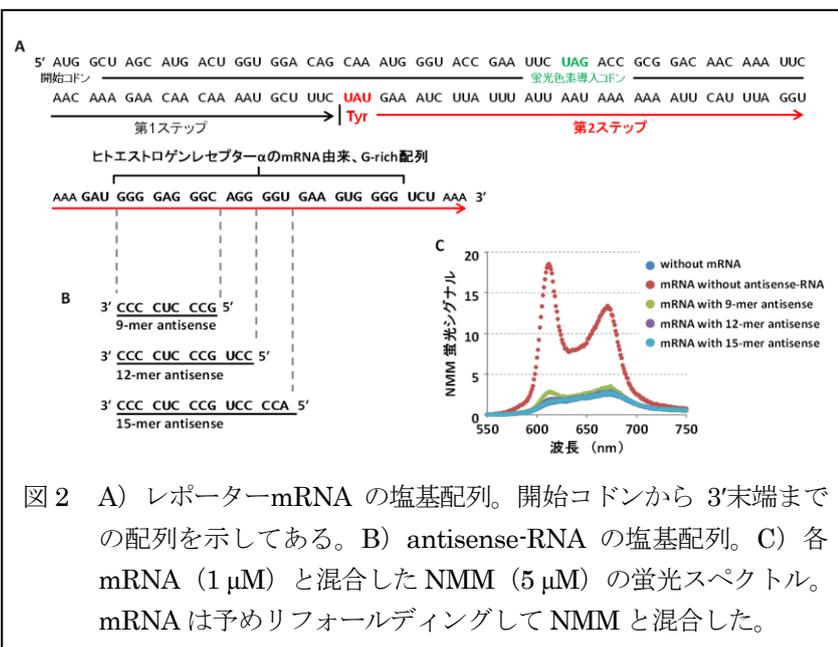
3 研究成果

● 翻訳伸長反応の抑制に対する四重鎖構造および二重鎖構造の影響

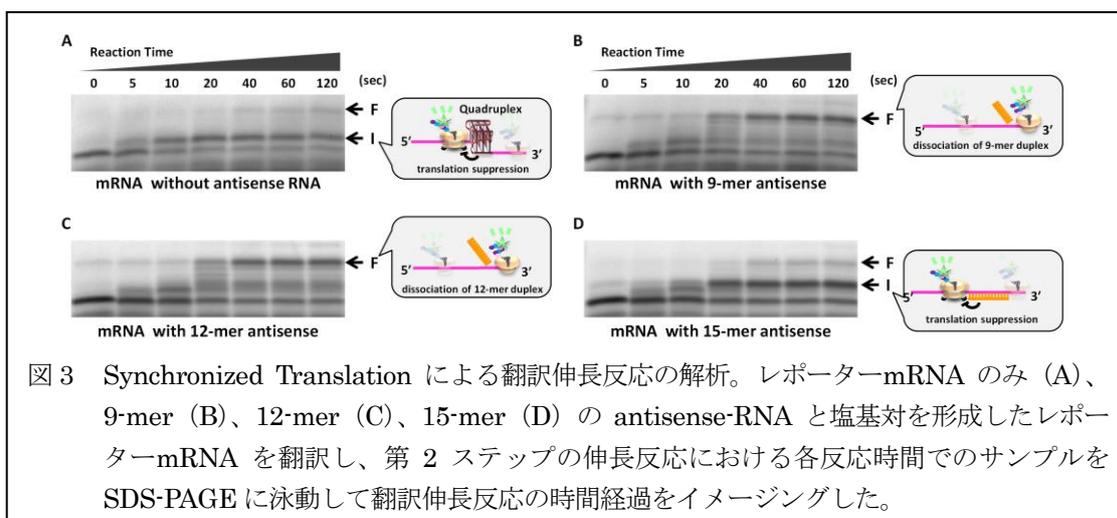
RNA 四重鎖構造と二重鎖構造による翻訳反応への影響を評価するため、3' 側に RNA 四重鎖構造を形成し得るグアニンに富んだ塩基配列 (G-rich 配列) を挿入したレポーター mRNA を設計・構築した (図 2A)。G-rich 配列には、ヒトのエストロゲンレセプター α の mRNA に由来する配列を用いた。また、この G-rich 配列に相補的な配列を有する 9-mer、12-mer、および 15-mer の antisense-RNA (図 2B) を合成した。作製したレポーター mRNA を、mRNA のみ、もしくは 3 等量の antisense-RNA を混合した状態で、100 mM KCl を含む緩衝液 (30 mM HEPES-KOH (pH 6.8)) 中でリフォールディングを行った。その後、リフォールディングした mRNA を、四重鎖構造に結合して蛍光シグナルを増大させる N-methyl mesoporphyrin (NMM) と混合し、mRNA が四重鎖構造を形成しているかどうかの検討を行った (図 2C)。その結果、mRNA のみでリフォールディングを行ったサンプルのみで、NMM の蛍光シグナルの増大が認められた。このことは、四重鎖構造が安定に存在しうる 100 mM KCl を含む溶液中においても、9-mer、12-mer、15-mer の antisense-RNA と塩基対を組んだ方が安定であることを示している。レポーター RNA が 9-mer、12-mer、15-mer の相補鎖と塩基対を形成していることは、非変性ゲル電気泳動の結果からも確認された (data not shown)。

次に、四重鎖構造を形成している mRNA、および antisense-RNA と塩基対を形成している mRNA を用いて、Synchronized Translation により翻訳伸長反応への影響を評価した (図 3)。四重鎖構造を形成している mRNA の場合、Synchronized Translation の第 2

ステップで翻訳伸長反応を再開させた後、翻訳伸長反応が進むまでの間に、途中で停滞している翻訳産物のシグナルが強く認められた (図 3A、矢印 I)。これに対し、9-mer、12-mer の antisense-RNA と塩基対を形成している mRNA の場合には、途中で翻訳伸長反応が停滞していると思われる産物のシグナ



ル強度は弱く、翻訳伸長反応の時間経過と共に、mRNA の 3'末端まで翻訳伸長反応が進行した産物のシグナルが強くなっていった (図 3B、3C、矢印 F)。このことは、9-mer および 12-mer の antisense-RNA と二重鎖構造を形成した RNA は、熱安定性の面では四重鎖構造よりも安定であるが、翻訳伸長反応を抑制する効果の面では四重鎖構造よりも弱いという事を示している。一方で、15-mer の antisense-RNA と塩基対を形成している mRNA の場合は、翻訳伸長反応が停滞している産物のシグナルが強く確認された (図 3D、矢印 I)。つまり、RNA 二重鎖構造の場合は、翻訳伸長反応を停滞させるためにはある程度の長さの二重鎖領域が必要であることを示している。9-mer、12-mer、15-mer の antisense-RNA が形成する RNA 二重鎖構造の、1M NaCl 存在下 37°C における熱安定性を予測すると、それぞれ 20.1、27.5、35.8 kcal mol⁻¹ となる。そのため、二重鎖構造で翻訳伸長反応を停滞させるためには少なくとも 27.5 kcal mol⁻¹ 以上の熱安定性が必要であると考えられる。



● PNA により誘起した三重鎖構造による翻訳伸長反応の抑制

本研究では、核酸の構造に人工分子を結合させ、新たな核酸構造を誘起することによる翻訳伸長反応への影響についても解析した。人工分子として、RNA の二重鎖構造に配列特異的に結合して三重鎖構造を形成する PNA を用いた。前述の研究結果より、12 塩基対の二重鎖 RNA では翻訳伸長反応が抑制されず、15 塩基対では抑制されていたことから、本研究では、12 塩基対のステムループ構造を形成する塩基配列を 3'側に挿入したレポーター mRNA を新たに設計・構築した (図 4A)。また、レポーター mRNA が形成するステム領域に結合する PNA を作製した。

まず、レポーター mRNA のみ、もしくは 3 等量の PNA を混合した状態で、100 mM KCl を含む緩衝液 (30 mM HEPES-KOH (pH 6.8)) 中でリフォールディングを行った。レポーター mRNA と PNA とが結合することは、アガロースゲル電気泳動により確認した (data not shown)。次に、リフォールディングした mRNA を用いて Synchronized Translation による翻訳伸長反応の解析を行った (図 4B、4C)。ステムループ構造を形成するレポーター mRNA のみで翻訳反応を行った場合には、翻訳伸長反応の時間経過に伴い高分子量側 (ゲルの上部) に翻訳産物のシグナルがシフトした (図 4B、矢印 F)。この結果は図 3C の結果とも一致しており、分子間で形成された二重鎖構造であっても、分子内で形成された二重鎖構造であっても、12 塩基対という長さは翻訳伸長反応を抑制するには不十分であると考えられる。一方で、PNA と結合して 12 塩基対の PNA/RNA 三重鎖構造を形成しているレポーター mRNA の場合には、翻訳伸長反応が途中で停滞している産物のシグナルが強く確認された (図 4C、矢印 I)。このことは、PNA が 12 塩基対のステム領域に結合し、

三重鎖構造として RNA の安定性を高めることにより、翻訳伸長反応を停滞させたと考えられる。PNA による三重鎖構造の形成を介した翻訳反応の抑制については、長鎖 mRNA からのタンパク質発現の抑制によっても確認された (data not shown)。

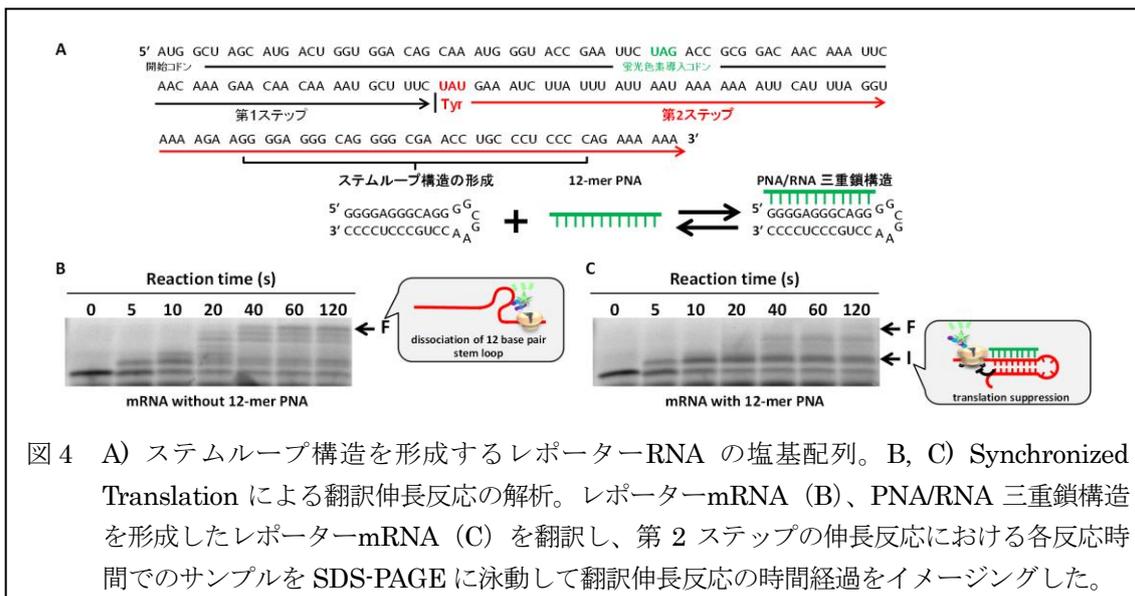


図 4 A) ステムループ構造を形成するレポーター-RNA の塩基配列。B, C) Synchronized Translation による翻訳伸長反応の解析。レポーター-mRNA (B)、PNA/RNA 三重鎖構造を形成したレポーター-mRNA (C) を翻訳し、第 2 ステップの伸長反応における各反応時間でのサンプルを SDS-PAGE に泳動して翻訳伸長反応の時間経過をイメージングした。

<研究成果発表>

遠藤玉樹、ROZNERs Eriks、HNEDZKO Dziyana、杉本直己

脱ワトソン・クリックの核酸化学(10) 非天然塩基を有するペプチド核酸による三重鎖形成を利用した生理的条件下での翻訳反応の抑制

日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月

<参考文献>

- (1) Endoh, T.; Kawasaki, Y.; Sugimoto, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 522.
- (2) Endoh, T.; Kawasaki, Y.; Sugimoto, N. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6222; Endoh, T.; Sugimoto, N. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 11435.
- (3) Endoh, T.; Kawasaki, Y.; Sugimoto, N. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 857.

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究では、二重鎖 (ステム構造) よりも四重鎖構造を形成した RNA の方が、安定性の面では低くても翻訳伸長反応の強い抑制作用を示すことを明らかにした。四重鎖構造は細胞内のような分子が込み合った環境で安定になることから、四重鎖構造という特殊な核酸構造が、遺伝子発現の調節などに関与していると考えられる。また、翻訳反応を抑制するためにどの程度安定なステム構造が必要であるかの指標を得ることで、三重鎖構造を形成する人工核酸 (PNA) を用いた翻訳反応の抑制を可能にした。この成果により、特定の化合物で mRNA 構造の安定性、および翻訳反応過程を調節し、生命現象に対して人為的に摂動を与えるという波及効果の高い研究展開を示すことができた。

<謝辞>

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました公益財団法人ひょうご科学技術協会、ならびに PNA の合成をしていただきました米国 Binghamton University の Eriks Rozners 教授に深く感謝いたします。