解説

環状RNAを用いたローリングサークル型翻訳反応

阿部奈保子, 阿部 洋 名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻(化学系)生物化学研究室

In an *E. coli* cell-free translation system, we found that a circular RNA containing an infinite open reading frame produced more translation product than its linear counterpart by two orders of magnitude, because a ribosome can work more effectively towards the elongation on circular RNA than it can on linear RNA. We then tested circular RNAs containing an infinite open reading frame could be translated in eukaryotic systems, in the absence of any particular element for internal ribosome entry, a poly-A tail, or a cap structure. We found that the circular RNAs also produced long peptides in eukaryotic translation systems, possibly owing to the rolling circle amplification mechanism.

circular RNA / rolling circle amplification / translation / protein expression / messenger RNA

1. はじめに

タンパク質へと翻訳される配列を持つ RNA をメッセンジャー RNA (mRNA) と称する。この mRNA にコードされた遺伝情報からポリペプチド鎖 (タンパク質) が合成される過程を翻訳と呼ぶ。最近我々は、従来起こりにくい反応であると考えられていた、環状構造を持つ mRNA の哺乳動物翻訳系における翻訳現象を検出し報告した¹⁾。それに先立ち、我々は大腸菌翻訳系において、環状 RNA の翻訳現象の特長について検討を行い報告している²⁾。本稿では、これら環状 RNA を鋳型とした翻訳反応の特性について紹介する。

2. ローリングサークル型 DNA 複製反応

環状構造を持つ核酸を鋳型とする生化学反応には、DNA ポリメラーゼが作用するローリングサークル型複製反応がある (図 1)³⁾。この反応は、生物学的にはプラスミドやウイルス、バクテリオファージ遺伝子等の複製時に一般的に見られる⁴⁾。環状 DNA を鋳型にして DNA ポリメラーゼが連続的に反応を進行させる結果、多数の繰り返し単位を持つ複製生成物が生ずる。このプラスミド DNA 等を鋳型とするローリングサークル複製反応では、一般に鋳型は数千塩基からなる大きな環状 DNA である。他方、1990 年代半ば、Fire らおよび Kool らは、30 塩基程度からなる非常に小さな環状一本鎖 DNA を鋳型とした場合にも、ローリングサークル型の反応が起こること、またこの反応が非常に効率的であり、増幅性を持つことを報告し

た^{3), 5), 6)}。本反応においては、鋳型が環状 DNA の場合、対照の直鎖状 DNA を用いたときに比較して、高効率に生成物が生ずるが、そのメカニズムは次のように説明される (図 2)^{3), 5), 6)}。まず、鋳型・プライマー配列複合体に DNA ポリメラーゼが結合した後、プライマー配列の伸長反応が起こる。直鎖状 DNA の場合、このポリメラーゼ反応は鋳型 DNA の末端ま

図 1
ローリングサークル型複製反応の模式図。

図 2
小さな環状一本鎖 DNA を鋳型にしたローリングサークル型 DNA 複製反応の高効率性。

Rolling Circle Translation of Circular RNA

Naoko ABE and Hiroshi ABE

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University

で進行すると一度終結する。DNA ポリメラーゼは鋳型・プライマー由来鎖複合体から乖離し、次の鋳型・プライマー配列複合体に結合し次の反応サイクルを開始する。これに対し、環状一本鎖 DNA を鋳型とした場合、鋳型 DNA・プライマー配列複合体に結合した DNA ポリメラーゼは、一旦反応を開始すると、環上を回転しながらポリメラーゼ反応を行い続けることができ、DNA ポリメラーゼが一回転した後も、鋳型上を回転しながら酵素反応を行い続けることができる。ここで、鋳型の環状 DNA のサイズが小さいために生成した二本鎖構造のひずみが大きく、鎖置換活性の低い DNA ポリメラーゼでも本反応を起こしうる⁵⁾。Fire らおよび Kool らによる報告を端緒として、この等温条件下で DNA 鎖を増幅可能な本ローリングサークル型複製反応を検出法に利用する試みが次々に報告された⁷⁾。例えば、Lizardi らはローリングサークル型複製反応をシグナル増幅法として利用し、標的鋳型中の一塩基多型を判別する方法を開発し、報告している⁸⁾。彼らは、このローリングサークル型複製反応をシグナル増幅法として利用したのである。

3. 大腸菌翻訳系における環状 RNA の翻訳反応

環状構造を持つ mRNA を鋳型に用いたタンデムリピート型タンパク質の合成法について、1998 年に Perriman と Ares が報告している (図 3)^{9), 10)}。彼らが用いた 795 ヌクレオチドの環状 RNA は、同一の読み枠 (open reading frame) の中に停止コドンを含まず、また 3 の倍数のヌクレオチド数から構成されていた¹¹⁾。そのため、環状 RNA 上で一度翻訳反応が開始されると、リボソームが同一の読み枠に沿って、停止コドンに出会うことなく、環状 RNA 上を回転しながら“連続的に”タンパク質合成を行うことになる (本稿ではこの反応を“ローリングサークル型翻訳反応”と呼ぶ)。当該論文では 300 キロダルトン以上の非常に大きな分子量を持つポリ GFP の生成が報告され

図 3 GFP 多量体合成の鋳型として機能する環状 RNA の配列模式図 (文献 9 に掲載の図を改編)。

た。残念ながら合成されたポリ GFP は蛍光性を持たなかったものの、本報告は環状 RNA を用いる翻訳反応が、タンデムリピート型タンパク質を合成するための有用な方法となる可能性を示した。我々の研究グループは、反応メカニズムの観点から本ローリングサークル型翻訳反応に着目した。すなわち、翻訳反応は開始・伸長・終結の三段階に分けて考えることができ、一般に、三段階のうち開始段階が律速で、全体の効率 (タンパク質の発現) を制御していると考えられている¹²⁾。一度開始反応が起これば伸長反応が原則的には永遠に続きうるローリングサークル型翻訳反応では、上述の複製反応の場合と同様、反応のターンオーバーを回避できる。このことから、高効率にポリペプチド産物を生じうるのではないかと予想した (図 4)。しかしながら、前述の報告においては、ローリングサークル型反応におけるポリペプチド鎖の生成効率という観点においては検証がなされていなかった^{9), 10)}。彼らの実験系では、大腸菌にプラスミド DNA を導入するとそのものから RNA が転写されるが、含まれるグループ I イントロン配列に由来する反応で自動的に RNA がスプライシング反応を起こす。この結果 RNA は環化し、生じた環状 RNA を鋳型としてタンパク質合成反応が起きる。この系では直接的に直鎖状 RNA と環状 RNA から生ずるポリペプチドの生成効率を比較することは困難だと考えられた。そこで我々は、本先行研究とは異なり、より直接的に反応を比較可能な系、すなわち化学合成法により調製した環状 RNA と

図 4 ローリングサークル型翻訳反応 (環状 RNA を鋳型とする反応) のモデル図²⁾。

無細胞翻訳液を用いた系を選択し、ローリングサークル型翻訳反応の特性、特にその効率について検証することとした。

4. 小さな合成環状 RNA を鋳型として用いたローリングサークル型翻訳反応(大腸菌無細胞翻訳系)

先に述べたように、大腸菌内で 795 スクレオチド長の環状 RNA を鋳型にし、高分子量のリピートタンパク質が生じうることは分かっていた^{9), 10)}。これを踏まえ、我々はまず、翻訳されうる最小の RNA サイズを知りたいと考えた。大腸菌のリボソームが RNA に結合するときには、約 30-35 スクレオチド (nt) が覆い隠される¹³⁾。今回は環状 RNA の最小サイズを 84-nt とし、計 4 つの鎖長の異なる環状 RNA を設計した (図 5)。L84 と名付けた 84-nt の直鎖状 RNA が基本配列であるが、これは 5' 末端側から原核生物由来の翻訳開始結合配列であるシャイン・ダルガノ (SD) 配列¹⁴⁾、開始コドン、および 2 つの FLAG コード配列を含む。SD 配列はリボソーム結合配列であり、リボソーム小サブユニット中の RNA 成分と相補性を持ち、水素結合を形成することで翻訳反応の開始を促進する¹⁴⁾。FLAG はタンパク質発現の際のタグ配列として汎用される 8 アミノ酸 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) のペプチド配列である¹⁵⁾。環サイズの異なる RNA として、L84 の 1.5 倍の鎖長を持つ 126-nt の配列 L126 を設計した。

図 5 環状 RNA の設計・合成とその翻訳反応。鎖長の異なる環状 RNA の合成スキーム (a, b) と RNA のヌクレオチド配列 (c)、および大腸菌無細胞系における翻訳反応のウェスタンブロット解析結果 (d)²⁾。

これら直鎖状 RNA は、それぞれ 2 および 3 本の鎖に分割し、それぞれの鎖を化学合成した後、DNA オリゴマーを鋳型として T4 DNA リガーゼにより連結することで得た。さらに、得られた直鎖状 RNA を T4 DNA リガーゼを用いて連結することで環状 RNA を調製した。図 5 に示すように、直鎖状 RNA を一分子で環化したもの (C84, C126)、および二分子で環化したもの (C168, C252) を調製した。得られた RNA を鋳型にした翻訳反応について、大腸菌の再構成型無細胞タンパク質合成系である PURE システムを用いて解析した¹⁶⁾。無細胞翻訳液中でこれら環状 RNA および直鎖状 RNA をインキュベートし、抗 FLAG 抗体を用いて反応のウェスタン解析を行った (図 5d)。その結果、126-nt 以上の大きさの環状 RNA からは高分子量のポリペプチド産物が観察され、連続的なローリングサークル型の翻訳反応が起きたことが分かった。一方、84-nt の環状 RNA (C84) からは長鎖のポリペプチドが生じず、本反応の鋳型として作用するには環サイズが小さすぎることが示された。

続いて、環状 RNA を鋳型としたローリングサークル型翻訳反応が、ローリングサークル型複製反応の場合と同様に、直鎖状 RNA と比較しより多くの反応産物を生成できるかどうか検討した (図 6)。その目的で、L126 の 3' 末端に停止コドンが付加した 132-nt の配列 L126(+stop)、およびその環化体 C126(+stop) を合成した (図 6a)。C126(+stop) は不連続的な読み枠を含む鋳型であり、ここでは直鎖状 RNA のモデル配列として用いた。ドットプロット法による比較の結果、環状 RNA C126 上の連続的な翻訳反応では、対照の C126(+stop) の場合と比較して、約 100 倍程度、高効率にポリペプチド産物を生じたことが分かった (図 6b, c)。本結果は、環状 RNA を鋳型とするローリングサークル型の翻訳反応においては、開始反応の繰り返しお

図 6 大腸菌無細胞系におけるローリングサークル型翻訳反応。用いた RNA 配列 (a) と翻訳反応のウェスタンブロット解析 (b) およびドットプロット解析結果 (c)²⁾。

よび反応のターンオーバーを回避できるためポリペプチドが高効率に生成する、という我々の仮説を支持する結果であると考えている。

以上述べた実験結果から、大腸菌無細胞翻訳系を用いた環状 RNA 上のローリングサークル型翻訳反応では、ローリングサークル型 DNA 複製反応の場合と同様に反応生成物が効率よく生成しうることが示された。

5. 動物細胞翻訳系におけるローリングサークル型翻訳反応

前述の原核生物の翻訳システムを用いた研究結果を受け、我々は、真核生物の翻訳系においても同様のローリングサークル型反応が起こりうるのではないかと考えた。真核生物の翻訳システムにおける開始反応は、より多くの因子の働きにより制御される複雑な過程である^{17), 18)}。同システムにおいては、環状 RNA 上の開始反応は、内部リボソーム侵入部位 (internal ribosome entry site, IRES) と呼ばれる配列を含む場合を除き非常に起こりにくいことが知られている^{11), 19)}。一般に、真核生物の翻訳反応の開始機構は**スキャニングモデル**で説明される^{17), 18), 20)}。つまり、真核生物ではリボソーム小サブユニットを含む複合体がまず mRNA の 5' 末端を認識し、そこから開始部位まで移動 (= スキャン) し、そこで大サブユニットと会合し、翻訳反応を開始する。mRNA 上のリボソーム結合部位は原核生物系においては SD 配列と名付けられた塩基配列であるのに対し、真核系においては 5' 末端に存在するキャップ構造である。環状 RNA は 5' 末端もキャップ構造も持たない。しかしながら、今回我々が、大腸菌の系を用いて検証したとおり、たとえ環状 RNA 上の翻訳開始反応が非常に非効率的で遅いとしても、もし一度起きてしまえば、連続的な読み枠上ではローリングサークル型反応が引き起こされ、高効率にポリペプチドを生じうるのではないかと推測した。

我々はまず、図 7 に示すように、複数の FLAG コード配列、および最適な周辺配列を伴う開始コドン (コザック配列, 5'-GCC AUG G-3')¹⁴⁾ を含む 129, 258, 387 ヌクレオチドの環状 RNA を設計した。前項で述べた通り、これらの配列は連続的な読み枠を含むため、一度翻訳反応が開始された場合には、リボソームが環上を回転しながらペプチド鎖を伸長しうる。T7 RNA ポリメラーゼを用いた試験管内の転写反応により得られた直鎖状 RNA の両末端をリガーゼにより連結することで環状 RNA を得た²¹⁾。得られた環状 RNA をウサギ網状赤血球由来の無細胞翻訳液中で反応させ、その翻訳産物をウェスタンブロット法により解析した

図 7 環状 RNA のウサギ網状赤血球抽出液中の翻訳反応¹⁾。用いた環状 RNA の配列模式図 (a) と直鎖型 4x FLAG RNA のヌクレオチド配列 (b)、および反応のウェスタンブロット解析結果 (c)。

図 8 環状 RNA のヒト由来培養細胞 (HeLa) 中の翻訳反応¹⁾。用いた RNA 配列の模式図 (a)。RNA を HeLa 細胞に導入・培養後、細胞溶解液をウェスタンブロット解析した結果 (b)、および細胞を免疫染色し蛍光顕微鏡観察した結果 (c) を示す。

(図 7; 一連の実験で用いている直鎖状 RNA は、環状 RNA の前駆体である。そのため、5' 末端の大部分はモノリン酸化されており、キャップ構造は持たない)。その結果、生成物として、環状 RNA からローリングサークル型反応が起きたことを示す長鎖のペプチド産物を確認できた。このとき、長さの異なる 3 つの環状 RNA のうち、FLAG コード配列を 8 つ含む 258 クレオチド長の環状 RNA (8x FLAG) から最も合成産物が多く生じたことが分かった。そこで次に、この 8x FLAG 環状 RNA をヒト由来の HeLa 細胞に導入し、生細胞内で翻訳反応が起こるかどうかを調べた (図 8)。その結果、HeLa 細胞内においてもこの環状 RNA を鋳型としたローリングサークル型翻訳反応が起こることが分かった (図 8a)。また、顕微鏡観察の結果から、この

場合コントロールとして用いた **8× FLAG** 直鎖状 RNA よりも多く、ペプチド産物を生じたことが示唆された (図 8b)。

続いて、異なる配列を持つ数種類の環状 RNA を合成し、それらのウサギ網状赤血球翻訳液中での反応を解析した (図 9)。コザック配列と 3つの FLAG コード配列に加え、ヒト由来成長因子のコード配列 (上皮成長因子 (EGF)、インスリン様成長因子 1 (IGF-1)、あるいはインスリン様成長因子 2 (IGF-2)) を含む環状 RNA を設計・合成しその翻訳反応を解析した。その結果、EGF をコードする環状 RNA (**FLAG-EGF**) からは非常に高分子量のポリペプチドの生成が観察できた (図 9b)。しかしながら、IGF-1 や IGF-2 をコードする環状 RNA (**FLAG-IGF1**, **FLAG-IGF2**) からは同様のシグナルが観察されなかった。このことから、環状 RNA の塩基配列が本ローリングサークル型の翻訳反応の効率に影響することが示唆された。成長因子コード配列部分の GC 含量を比較すると、EGF のそれが最も低い (コード配列部分の GC 含量; EGF 55%, IGF-1 59%, IGF-2 66%)。現時点では、RNA 分子内における二次構造形成が翻訳反応の開始や伸長反応を阻害したため、このような差が見られたものと考えている²²⁾。ま

た、EGF をコードする環状 RNA (**FLAG-EGF**) に停止コドン挿入した配列 **FLAG-EGF_stop** からは翻訳産物が検出されず、環状 RNA 上の翻訳開始は予想されるように非効率であることが示唆された (図 9a, c)。また、環状 RNA **FLAG-EGF** に含まれるコザック配列を、翻訳効率が低下することが報告される別配列に置きかえた (図 9a, d)¹⁴⁾。その結果、生成物量の若干の減少が見られたものの、依然として長鎖ポリペプチドの生成が観察された。大腸菌系においても同様な現象が観察されており^{21,9)}、ローリングサークル型反応においては開始反応の効率の全体への影響が小さいことを示すものと考えている。

以上述べた実験結果から、連続的読み枠を含む環状 RNA 上のローリングサークル型翻訳反応が、原核生物および真核生物で成立する普遍的な現象であることが示唆された。特に、真核生物の翻訳系において、環状 RNA に IRES 配列を導入することなく反応産物を検出することができた。環状 RNA 上の翻訳開始反応は、哺乳動物の翻訳系においては通常非常に起こりにくいはずである。ローリングサークル型の反応機構に起因する、ペプチド生成の高効率性により初めて検出可能になったものと考えている。

6.

おわりに

以上述べたように我々は、連続的読み枠を含む環状 RNA を設計・合成し、そのものを鋳型とするローリングサークル型の翻訳反応が原核生物の系のみならず哺乳動物の系においても起こりうることを示した。これまでに我々が行った実験結果からは、環状 RNA 配列により長鎖ペプチドの生じやすさは異なるようである。今後は、真核系における環状 RNA を鋳型とするローリングサークル型翻訳反応の機構について、より詳細な検討を行っていく予定である。また、本反応を長鎖のタンデムリピート型タンパク質の合成に応用していく予定である。

最近、大規模なトランスクリプトーム解析により、ヒトを含む真核生物の細胞に、多種多様な環状 RNA が含まれることが明らかになってきた^{23), 24)}。従来、環状 RNA はいくつかの遺伝子から生成することが知られていたが、これらはスプライシング過程の誤りによって生ずる例外的なものであると考えられていた。最近では、環状 RNA は非常に多くの遺伝子から生ずることが明らかになってきた。環状 RNA は細胞内において、分解酵素であるエキソヌクレアーゼにより分解されず、直鎖状 RNA に比較しより安定に存在しう

図 9 環状 RNA のウサギ網状赤血球抽出液中での翻訳反応¹⁾。用いた環状 RNA の配列を表す模式図 (a) と、翻訳反応のウェスタンブロット解析結果 (b-d)。図中 L, C は用いた RNA の構造がそれぞれ直鎖状、環状構造であることを表す。

る²⁵⁾。その機能として、細胞内でマイクロ RNA を結合することで遺伝子の発現を調節する環状 RNA 配列が見つかっている^{26), 27)}。現時点では、細胞内に存在する環状 RNA から翻訳物が生ずるとの報告はない。しかしながら、もし環状 RNA 配列が連続的な読み枠を含む場合、本稿で述べたようなローリングサークル型の翻訳反応を細胞内で引き起こす可能性は十分にあると思われる。今後我々は、実際にそのような可能性を持つ環状 RNA 配列を探索し、環状 RNA を合成し、実際に翻訳反応が起きるかどうか調べていきたいと考えている。

文 献

- 1) Abe, N. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* **5**. DOI: 10.1038/srep16435.
- 2) Abe, N. *et al.* (2013) *Angew. Chem., Int. Ed.* **52**, 7004-7008. DOI: 10.1002/anie.201302044.
- 3) Kool, E. T. (1998) *Acc. Chem. Res.* **31**, 502-510. DOI: 10.1021/ar9602462.
- 4) Khan, S. A. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 442-455.
- 5) Fire, A., Xu, S. Q. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4641-4645. DOI: 10.1073/pnas.92.10.4641.
- 6) Liu, D. Y. *et al.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1587-1594. DOI: 10.1021/ja952786k.
- 7) Ali, M. M. *et al.* (2014) *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3324-3341. DOI: 10.1039/c3cs60439j.
- 8) Lizardi, P. M. *et al.* (1998) *Nat. Genet.* **19**, 225-232. DOI: 10.1038/898.
- 9) Perriman, R., Ares, M. (1998) *RNA* **4**, 1047-1054. DOI: 10.1017/S135583829898061X.
- 10) Perriman, R. (2002) *Methods Mol. Biol.* **183**, 69-85. DOI: 10.1385/1-59259-280-5:069.
- 11) Chen, C. Y., Sarnow, P. (1995) *Science* **268**, 415-417. DOI: 10.1126/science.7536344.
- 12) Laursen, B. S. *et al.* (2005) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 101-123. DOI: 10.1128/mmb.69.1.101-123.2005.
- 13) Jenner, L. B. *et al.* (2010) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 555-560. DOI: 10.1038/nsmb.1790.
- 14) Kozak, M. (1999) *Gene* **234**, 187-208. DOI: 10.1016/s0378-1119(99)00210-3.
- 15) Terpe, K. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523-533. DOI: 10.1007/s00253-002-1158-6.
- 16) Shimizu, Y. *et al.* (2001) *Nat. Biotechnol.* **19**, 751-755. DOI: 10.1038/90802.
- 17) Sonenberg, N., Hinnebusch, A. G. (2009) *Cell* **136**, 731-745. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.042.
- 18) Parsyan, A. *et al.* (2011) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 235-245. DOI: 10.1038/nrm3083.
- 19) Filbin, M. E., Kieft, J. S. (2009) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 267-276. DOI: 10.1016/j.sbi.2009.03.005.
- 20) Hinnebusch, A. G. (2014) *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 779-812. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060713-035802.
- 21) Petkovic, S., Muller, S. (2015) *Nucleic Acids Res.* **43**, 2454-2465. DOI: 10.1093/nar/gkv045.
- 22) Yang, J. R. *et al.* (2014) *PLoS Biol.* **12**. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001910.
- 23) Salzman, J. *et al.* (2012) *PLoS ONE* **7**, e30733. DOI: 10.1371/journal.pone.0030733.
- 24) Salzman, J. (2016) *Trends Genet.* **32**, 309-316. DOI: 10.1016/j.tig.2016.03.002.
- 25) Jeck, W. R. *et al.* (2013) *RNA* **19**, 141-157. DOI: 10.1261/rna.035667.112.
- 26) Hansen, T. B. *et al.* (2013) *Nature* **495**, 384-388. DOI: 10.1038/nature11993.
- 27) Memczak, S. *et al.* (2013) *Nature* **495**, 333-338. DOI: 10.1038/nature11928.

阿部奈保子

阿部奈保子 (あべ なおこ)

名古屋大学大学院理学研究科・研究員
2000年北海道大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。博士(薬科学)(15年北海道大学)。
研究内容:核酸化学
連絡先:〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町
E-mail: naokoabe@chem.nagoya-u.ac.jp

阿部 洋

阿部 洋 (あべ ひろし)

名古屋大学大学院理学研究科・教授
2001年北海道大学大学院薬学研究科博士後期課程修了[博士(薬学)]。
研究内容:核酸化学および医薬化学
連絡先:同上
E-mail: h-abe@chem.nagoya-u.ac.jp
URL: http://biochemistry.chem.nagoya-u.ac.jp/