

RNAによる遺伝子発現制御デバイス

横林 洋平

遺伝子発現の制御は合成生物学の基盤的技術であり、現在でも、野生型もしくは改変された転写制御因子タンパク質と、それらに付随するプロモーターによる転写制御技術がその主流である。その一方で、過去数十年間にリボスイッチやmicroRNAなど、主としてRNAが関与する遺伝子発現制御機構が次々と明らかになるにつれ、古典的な転写制御因子をはじめとする、タンパク質を中心としたネットワークが遺伝子発現を制御しているという、分子生物学のイメージは見直しを迫られている。

遺伝子発現制御以外にも、RNAは多彩な機能を持つことが知られている。mRNAやtRNAによる遺伝情報の伝達はもちろん、自己切断やスプライシング機能を持つリボザイム、分子認識能を持つアプタマーなど、その化学的、生物学的機能の幅広さは、生命の誕生においてRNAが中心的な役割を果たしたとするRNAワールド仮説の根拠の一つとなっている。

筆者のグループでは、RNAの多様な機能に着目し、合成生物学に応用可能な、RNAによる遺伝子発現制御デバイスを設計できないかと考え、2004年頃より研究を行ってきた。本稿ではその主な成果を中心に、特にRNAデバイスを設計するために、我々が開発した手法に焦点を当てて紹介する。

大腸菌で動く人工リボスイッチ：遺伝的選択

リボスイッチとは2002年に初めて報告された、主にバクテリアのmRNAの5'非翻訳領域(UTR)に存在する遺伝子発現制御スイッチである。ビタミン類、アミノ酸、塩基などの代謝物を、そのアプタマー領域で認識し、それに伴うRNAの二次構造変化により、翻訳もしくは転写プロセスを制御する。リボスイッチとはいえ、その出力は任意の遺伝子の発現の有無であることから、遺伝的選択(セレクション)法の利用を試みた。

遺伝的選択においては、まずスイッチや回路の一部をランダム化してライブラリを作製し、それらの出力がONになるべき条件とOFFになるべき条件下で、望みの状態を示す変異体のみが生存もしくは増殖できるような選択圧を加えることにより、最終的に望みの機能を有する変異体を得ることができる。ON選択およびOFF選択に用いることが可能なマーカー遺伝子は、多くのものが

知られているが、ON選択とOFF選択において異なるマーカーを用いると、偽陽性の増加やマーカー変更の手段が問題となる。

試行錯誤の結果、我々は*tetA*という単一のマーカー遺伝子をON選択とOFF選択の両方に用いることにより、効率的な人工リボスイッチの選択が可能になることを見いだした(図1a)。TetAはテトラサイクリン排出トランスポーターという膜タンパク質であり、発現時(ON)には宿主にテトラサイクリン耐性を付与する。しかし、過剰発現下においては、細胞膜を不安定化し、 Ni^{2+} などの有毒物質に対する感受性が高くなると報告されている¹⁾。つまり非発現状態(OFF)では、宿主はテトラサイクリン感受性であるが、 Ni^{2+} 耐性となる。したがって、ON選択はテトラサイクリン、OFF選択は Ni^{2+} により行うことができる。

もちろん単一の選択マーカーを使う利点の一つは、ON・OFF選択間で、マーカーの入れ替えが不要なことであるが、同時に偽陽性の抑制も重要である。遺伝的選

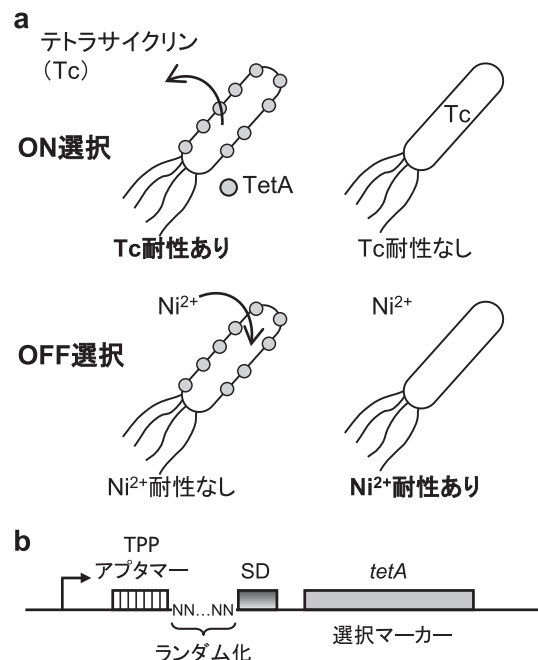


図1. TetAによるDual Genetic Selection. (a) TetAによるON選択とOFF選択のメカニズム. (b) TPP応答性人工リボスイッチの選択のために作製されたライブラリ.

択においては、自然変異による偽陽性の出現は不可避である。たとえば *tetA* 配列内でフレームシフトを生じる突然変異が起きた場合、遺伝子発現がONであってもOFF選択を通過してしまう。しかしながら、このような単純な変異体は、もう一度ON選択を行うことにより、ほぼ間違いなく排除することができる。もしON選択とOFF選択両方を通過できるようなTetA変異体如果出现すれば、偽陽性として問題になるが、そのような表現形が自然発生する確率はきわめて低いと考えられる。

我々はこの選択系をDual Genetic Selectionと名付け、それを利用してさまざまな人工リボスイッチを開発した。最初に、自然界にもっとも広く分布するリボスイッチである、チアミンニリン酸 (TPP) に応答するリボスイッチに注目した。TPPリボスイッチは主にTPP生合成に関わる酵素の発現の負フィードバック制御に関わっているため、これまでに解析されたTPPリボスイッチはすべてOFFスイッチ (TPP存在下で遺伝子発現が抑制される) として機能する。我々はTPPアプタマー下流部をランダム化したライブラリ (図1b) から、TPP存在下で遺伝子発現が活性化されるONスイッチを選択した^{2,3)}。得られたリボスイッチの中には、遺伝子発現のON/OFF比が50を超え、この種の人工リボスイッチでは最高部類の性能を示すものも含まれた³⁾。

さらに、TPPリボスイッチの上流に別のアプタマー (テオフィリン) を加え、二種類の化合物に対して、論理回路的な応答をする、二入力型リボスイッチをDual Genetic Selectionで開発した⁴⁾。さらにTPP応答性のONスイッチとOFFスイッチを連結することにより、中間濃度においてのみ遺伝子発現が起こるバンド・パス応答性リボスイッチを作製した⁵⁾ (図2a)。

ここで特筆すべき点は、複数の分子の認識、情報処理、そして遺伝子発現制御というきわめて複雑な機能が、わずか300塩基余りのRNAで実現されているということである。たとえば、Weissらが2005年に報告した、転写因子を用いたバンド・パス回路⁶⁾では4つの転写因子と5つのプロモーターが使用されている (図2b)。

人工リボスイッチがタンパク質回路に比べて遺伝子サイズ的にコンパクトであることには、いくつかの利点がある。まず、小さいサイズと、タンパク質翻訳を伴わないことで、宿主に対する代謝負荷が少ないことが期待できる。近年人工遺伝子回路が宿主に及ぼす影響が無視できないことが明らかになってきており、低負荷で高度な機能が実現可能なリボスイッチは、大いに役立つと考えられる。さらに、複数の転写因子からなる回路は、それぞれの転写因子の発現レベルやプロモーターの強度な

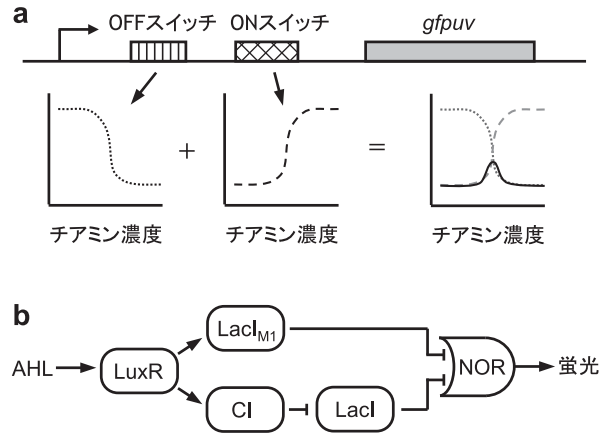


図2. バンド・パス回路。(a) 応答性が逆の2つのリボスイッチを合成したもの⁵⁾。(b) Weissらによる、4つの転写因子を組み合わせたもの⁶⁾。

ど、多くのパラメーターの調整および最適化が必要となるが、人工リボスイッチは上記のように限定的なライブラリ作製と遺伝的選択による開発が可能である。

動物細胞で働くRNAデバイス：モジュラー戦略

動物細胞においてもRNAデバイスは有望であるが、我々が大腸菌で使った、遺伝的選択のような高スループットな選択やスクリーニングを細胞を用いて実現することは技術的に困難である。したがって、我々は分子認識や遺伝子発現制御といった、単一の機能を有するRNA要素を、段階的に組み合わせて高度な機能を持つRNAデバイスを設計する、モジュラー設計戦略を追求した。

その一つとして、アプタマー、リボザイム、そしてmicroRNA前駆体 (pri-miRNA) を一つの分子に統合した、化学的RNAi誘導デバイスがある⁷⁾。まず、テオフィリンアプタマーとリボザイムを組み合わせ、テオフィリン応答性リボザイム (アプタザイム) を作製し、さらにpri-miRNAの5'末端に結合することにより、リボザイムによる自己切断が起こった時のみにpri-miRNAが放出されるように設計した (図3a, b)。

また、SmolkeらはアプタザイムをmRNAの3'UTRに挿入することにより、細菌のリボスイッチのように制御対象遺伝子をシスに制御できることを示した⁸⁾。我々もHDVリボザイムを基に、グアニンおよびテオフィリンに反応するアプタザイムを開発し、動物細胞内での遺伝子発現制御に応用した⁹⁾ (図3c)。

リボザイムの高速評価と設計

主にウイルスに由来する、自己切断活性を示すリボザ

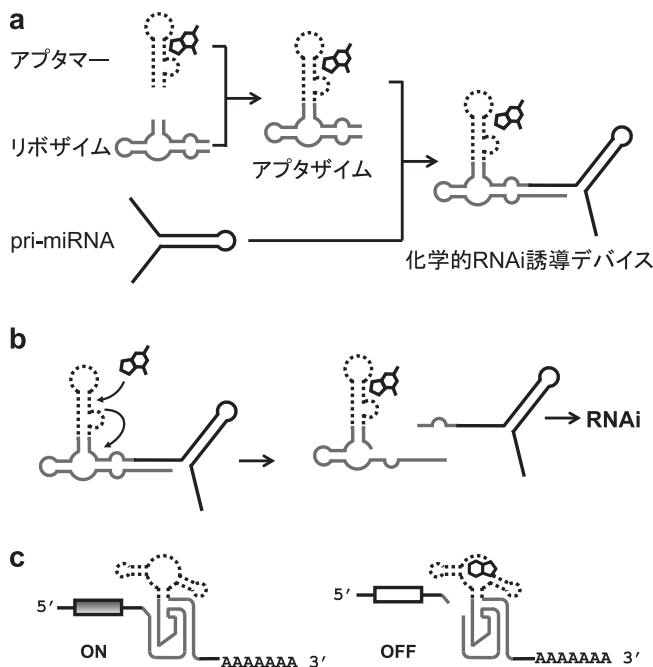


図3. モジュラーなRNAデバイス設計. (a) 機能性RNAを段階的に組み合わせ、高度な機能を持つRNAデバイスを設計する、モジュラー戦略の概念図. (b) 化学的RNAi誘導デバイス. (c) mRNAの3'UTRに挿入されたアプタザイムによる、シス型遺伝子発現制御デバイス.

イムは古くから知られているが、近年のゲノム情報とバイオインフォマティクスの発展により、あらゆる生物において、さまざまなクラスのリボザイムがゲノム中に存在することが明らかになった^{10,11)}. それらのリボザイムの生物学的機能のほとんどは不明であるが、その普遍性からリボザイム・アプタザイムの合成生物学的応用にも期待が持たれる.

前項では我々の動物細胞におけるアプタザイムを利用したRNAデバイスについて述べたが、他にもバクテリア、酵母、ウイルスにおける遺伝子発現制御への応用も報告されており、アプタザイムのRNAデバイスとしての汎用性は非常に高いと考えられる. しかしながら、アプタザイムの開発は簡単ではなく、スクリーニングや半合理的設計からスタートし、多数の変異体の個別評価が行われるのが通常である.

我々は最近、次世代シーケンシング (NGS) 技術を応用し、非常に多数 (数千個) のリボザイム変異体の活性を定量的に測定する手法を開発した¹²⁾. この手法の概略を図4に示す. まず、リボザイムの特定部位をランダム化するなどした、目的の変異体を含むリボザイムライブラリをDNA鋳型として合成し、*in vitro* 転写反応を行う. 次にNGS用配列を含むプライマーで逆転写反応を行いcDNAを作製する. その際プライマーにバーコー

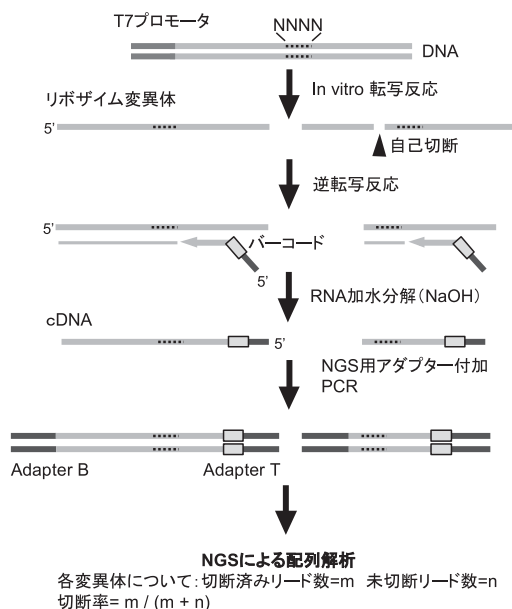


図4. 次世代シーケンシング法によるリボザイム活性の高速評価法

ド配列を挿入することにより、アプタマーリガンドの有無などの反応条件に関する情報を埋め込むこともできる. さらにcDNAの3'末端にNGS用アダプター配列を付加した後、PCRによりNGS解析用サンプルを得る.

この手法において重要なのは、ライブラリ中のすべての変異体が少なくとも数百分子以上ずつ転写されているということである. さらに解読された配列の長短から、各変異体の何%が自己切断されたかを数えることにより、特定の変異体とそのリボザイム活性 (切断率) が測定できる.

我々はこの手法を用いて、1500以上のリボザイム変異体ライブラリの切断率を一度に測定し、アプタザイムとして細胞内でも機能するものを同定することができた. より高い解析能力を持つ装置を使うことにより、理論的には 10^6 オーダーのリボザイム変異体の活性を測定することが可能である.

同じく多数の変異体から、目的の活性を持ったリボザイムを選び出す、従来のスクリーニングや選択法との大きな違いは、これら従来の手法では望みの活性を持った極少数の変異体 (「アタリ」) についてのみ、その配列を個別に解析するが、その他大多数の「ハズレ」配列とその活性データは埋もれたままとなることである. しかし、この膨大な「ハズレ」配列とその活性の相関データを活用することにより、より合理的なリボザイム設計へとつながることが期待できるのではないだろうか. また従来法では不可能であった規模の配列・活性相関データが得

られることから、リボザイムに関する基礎研究ためのツールとしても有用であろう。

おわりに

合成生物学の「夢」の一つとして、転写因子やプロモーターを始めとする、多数の単純なパーツをPlug-and-Play式に組み合わせて、複雑な遺伝子回路を組み上げるというビジョンがある。しかしながら、人工遺伝子回路が複雑になるにつれ、宿主の代謝経路に及ぼす影響、パーツ間の予期できない干渉、パーツ自体の環境依存性など、さまざまな不確定要素が影響し、多くの労力が試行錯誤による回路の最適化に費やされるという現状が明らかになってきた。

工学としての合成生物学のお手本ともいえる、電子工学に目を向けてみると、現代の複雑な電子回路の主役は、抵抗やトランジスタといった基礎パーツではなく、それらを膨大な数内包した集積回路 (IC) である。もちろん、原理的には基礎パーツのみで同等の電子回路を組むことは可能であるが、実際には熱の影響や個々のパーツ特性のバラつきにより、設計通りの動作を期待することは困難であろう。人工遺伝子回路においても、パーツ数の増加に伴う合理的設計の限界に (電子回路と比べてその複雑さは未だきわめて低い) 近づいてきているとも考えられる。電子工学のアナロジーを合成生物学にあてはめるのであれば、物理的もしくは生化学的に閉じた、複数

のパーツから成る回路の機能に相当する「集積回路」が必要な段階に来ているのかもしれない。

RNAによる遺伝子発現制御デバイスは、タンパク質と比べて、小さい遺伝子サイズと高度な機能、宿主に対する低い代謝負荷といった特徴がある。特に、高度な機能を同一分子内にコンパクトに実装するという意味では、合成生物学における集積回路の一つの方向であるとも考えられる。これらをタンパク質を基盤としたデバイスとうまく組み合わせることにより、人工遺伝子回路の高機能化と、設計プロセスの効率化に寄与することを期待する。

文 献

- 1) Podolsky, T. *et al.*: *Plasmid*, **36**, 112 (1996).
- 2) Nomura, Y. and Yokobayashi, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13714 (2007).
- 3) Muranaka, N. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **37**, e39 (2009).
- 4) Sharma, V. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 16310 (2008).
- 5) Muranaka, N. and Yokobayashi, Y.: *Chem. Commun.*, **46**, 6825 (2010).
- 6) Basu, S. *et al.*: *Nature*, **434**, 1130 (2005).
- 7) Kumar, D. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13906 (2009).
- 8) Chen, Y. Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8531 (2010).
- 9) Nomura, Y. *et al.*: *ACS Synth. Biol.*, **2**, 684 (2013).
- 10) Webb, C. H. *et al.*: *Science*, **326**, 953 (2009).
- 11) Roth, A. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 56 (2014).
- 12) Kobori, S. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **43**, e85 (2015).