
mRNA スイッチの性能を大幅に向上させることのできる修飾塩基を発見

ポイント

- 人工 mRNA は、細胞の遺伝子発現を操作するツールとして注目されている。
- N1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)が、人工 mRNA ツールの性能を大幅に向上させることを見出した。
- m1Ψ 修飾型人工 mRNA スイッチを用いることで、効率的に未分化 iPS 細胞を除去できた。
- m1Ψ 修飾型人工 mRNA スイッチを組み合わせて、目的の細胞においてタンパク質を発現させることのできる遺伝子回路を構築した。

1. 要旨

京都大学 iPS 細胞研究所 齊藤博英 教授、Callum Parr 同研究員(研究当時、現 理化学研究所 基礎科学特別研究員)、和田俊輔 同研究員(研究当時)、Yi Kuang 同研究員(研究当時、現 香港科技大学 助教)らの研究グループは、人工 mRNA^{注1)}の性能を大幅に向上させることのできる修飾塩基を見出しました。

人工 mRNA は、細胞の遺伝子発現を操作するツールとして注目を集めています。外来 mRNA は細胞に異物として認識され、免疫応答を誘発します。これを回避するために、人工 mRNA のシトシン(C)・ウリジン(U)をそれぞれ 5-メチルシトシン(m5C)・シュードウリジン(Ψ)に置換するアプローチが取られてきました。しかし、人工 mRNA の性能という点で、これらの修飾塩基が最適かどうかは検討されていませんでした。

研究グループは、様々な塩基修飾を施した人工 mRNA の性能を評価し、N1-メチルシュードウリジン(m1Ψ)を用いた人工 mRNA が最も高い性能を示すことを見出しました。さらに、m1Ψ 修飾を施した人工 mRNA スイッチ^{注2)}を応用することで、未分化 iPS 細胞をより効率的に除去できることや、狙った細胞に目的のタンパク質を発現できることを示しました。本研究成果は、より安全性の高い細胞医療や特異性の高い mRNA 医薬への応用が期待されます。

この研究成果は、2020 年 2 月 24 日に英国科学誌「Nucleic Acids Research」でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

人工 mRNA は、その塩基配列を適切に設計することで様々な機能を付与できることから、細胞の遺伝子発現を制御するツールとして注目を集めています。また、DNA と異なり、人工 mRNA は細胞に導入してもゲノムへの望まない変異導入のリスクを回避できるという点で、医薬品としての応用も期待されています。外部から導入した mRNA は、細胞に異物として認識され、細胞の免疫応答を誘発します。これを回避するために、人工 mRNA のシトシン(C)・ウリジン(U)をそれぞれ 5-メチルシトシン(m5C)・シュードウリジン(Ψ)に置換するアプローチが取られてきました。しかし、これらの修飾塩基は免疫応答を回避できますが、人工 mRNA ツールの性能という点でこれらの修飾塩基が最適なのかどうかは検討されていませんでした。

3. 研究結果

1) 修飾塩基の探索

まず、研究グループは、どの修飾塩基が mRNA ツールの性能を最大化するのか、検討を行いました。モデルとして、細胞内の小さな RNA であるマイクロ RNA (miRNA) 応答性 mRNA スイッチ (miRNA スイッチ)、RNA 結合タンパク質 (RNA Binding Protein; RBP) 応答性 mRNA スイッチ (RBP スイッチ) を使用しました。目的の miRNA・RBP 存在下において、これらの mRNA スイッチからのタンパク質の翻訳が抑制されます。これらについて様々な塩基修飾について検討を行った結果、ウリジンの代わりに N1-メチルシュードウリジン (m1Ψ) を導入したスイッチが最も高い性能を示すことを見出しました(図1)。

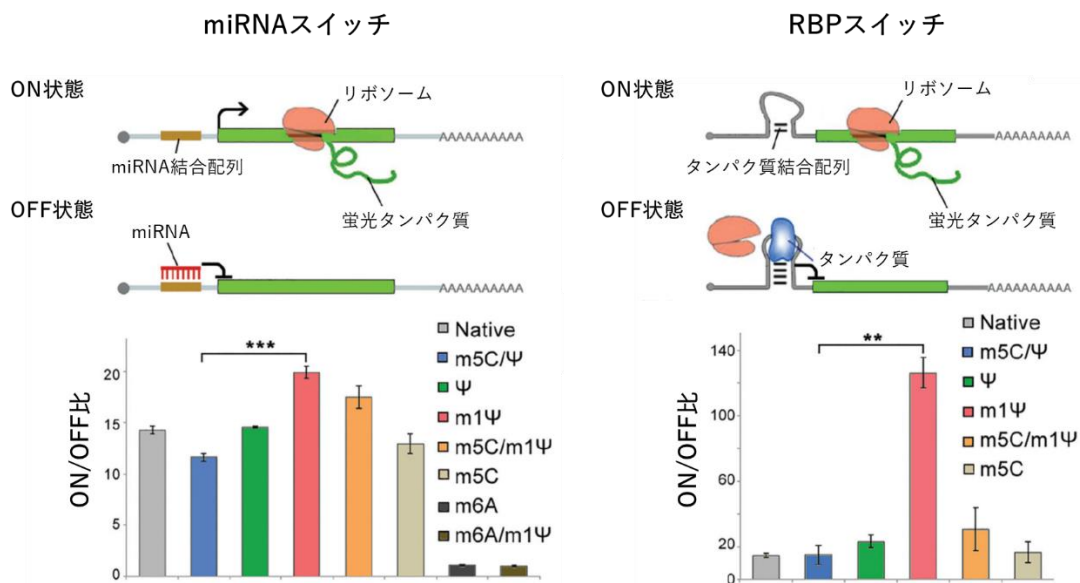


図1. mRNA スイッチの修飾塩基の検討

miRNA スイッチ、RBP スイッチについて種々の組み合わせの塩基修飾を検討した。ON 状態と OFF 状態における蛍光タンパク質の発現量を比較することで、mRNA スイッチの性能を評価した。

(Native: 非修飾型スイッチ、m5C: 5-メチルシトシン、Ψ: シュードウリジン、m1Ψ: N1-メチルシュードウリジン、m6A: N6-メチルアデニン)

2) 未分化 iPS 細胞の除去効率の改善

細胞医療では、iPS 細胞などの幹細胞から作った細胞を移植することで疾患の治療を試みます。その際、未分化 iPS 細胞が残っていた場合、移植部位で腫瘍を形成するリスクが存在します。そのため、未分化 iPS 細胞を効率よく除去することは細胞医療における大きな課題の一つです。m5C/Ψ 修飾型 miRNA スイッチを用いることで、未分化 iPS 細胞を除去できることは報告されていました。そこで、前項で見出された m1Ψ を用いることで、さらに除去効率を高められるかどうかを検証しました。その結果、m1Ψ 修飾型 miRNA スイッチは、m5C/Ψ 修飾型 miRNA よりも高効率に未分化 iPS 細胞を除去できることが示されました(図2)。

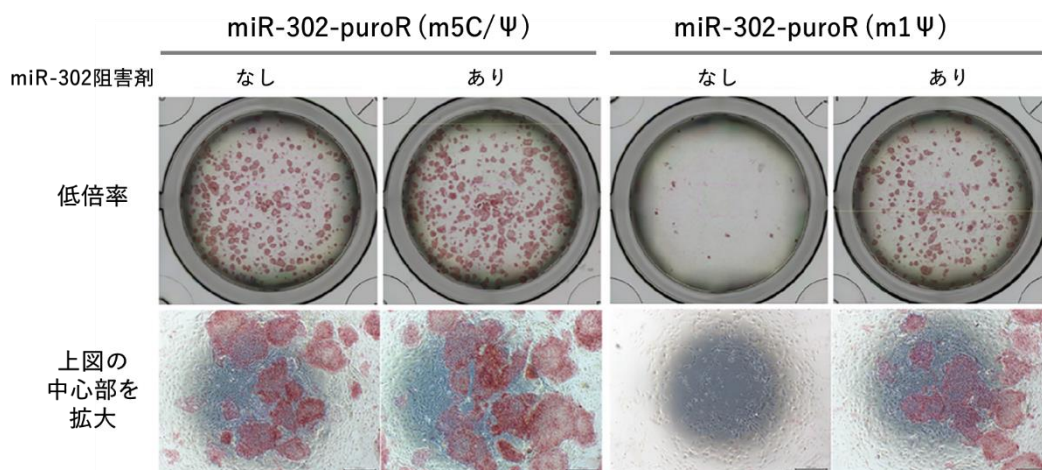


図 2. m1Ψ 修飾による未分化 iPS 細胞の除去効率の向上

iPS 細胞はマーカー Alkaline Phosphatase 染色により赤紫色で示されている。m1Ψ 修飾型 miRNA スイッチは、m5C/Ψ 修飾型 miRNA スイッチよりも効率的に iPS 細胞や分化が不完全な細胞を除去することができた。

3) 生体分子応答性 ON 回路の設計

miRNA スイッチ・RBP スイッチは、いずれも生体分子存在下でタンパク質の発現が抑制されます。最後に研究グループは、これらの mRNA スイッチを組み合わせることで、特定の miRNA 存在下でタンパク質を発現させることのできる「人工遺伝子回路」の構築を試みました。その結果、m1Ψ 修飾型 mRNA スイッチを使用することで遺伝子回路の性能を大幅に向上させることに成功しました(図3)。

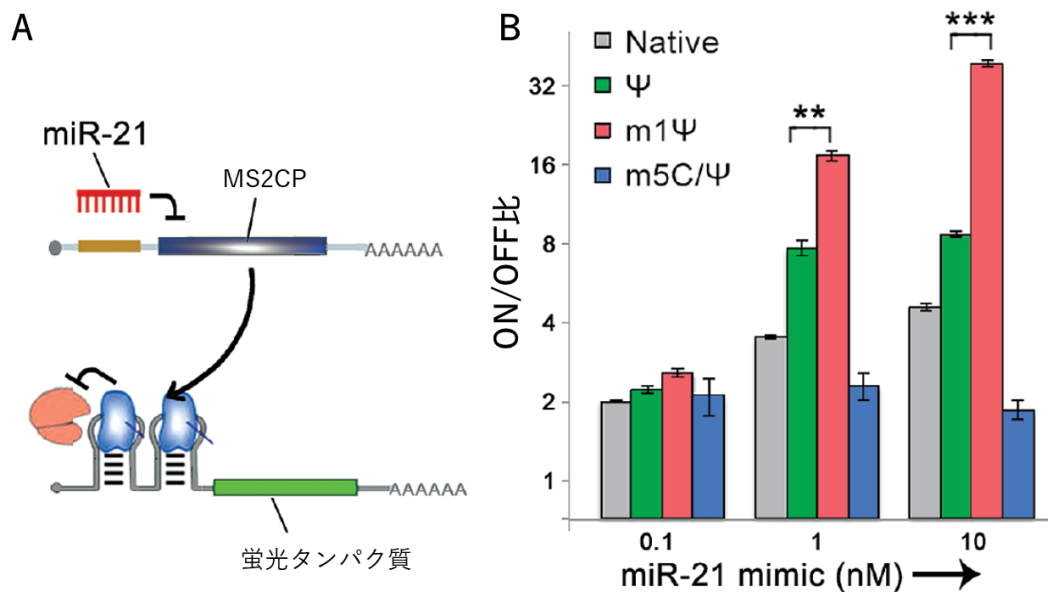


図3. m1Ψ 修飾を用いた miRNA 応答性 ON 回路のパフォーマンス向上

(A) miRNA スイッチと RBP スイッチを組み合わせた miRNA 応答性 ON 回路。OFF 状態では RNA 結合タンパク質 (MS2CP) が蛍光タンパク質の発現を抑制している。ON 状態では、miRNA により MS2CP の発現が抑制されることで、蛍光タンパク質の発現抑制が解除される。(B) 各修飾塩基を用いた ON 回路の性能比較。m1Ψ が最も高い ON/OFF 比を示した。また、miRNA mimic の濃度依存的に ON 回路のアウトプットの増大が見られた。

4. まとめ

本研究では、mRNA スイッチの性能を向上させる修飾塩基を検討し、m1Ψ による修飾を導入することで mRNA スイッチの性能を大幅に向上できることを見出しました。さらに、m1Ψ 修飾型 miRNA スイッチを用いて未分化 iPS 細胞を効率的に除去できることを見出しました。本研究成果は、より安全性の高い細胞医療の実現や特異性の高い mRNA 医薬の創出に向けて貢献できるものと期待されます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“N1-Methylpseudouridine substitution enhances the performance of synthetic mRNA switches in cells”

○ ジャーナル名

Nucleic Acids Research

○ 著者

Callum J.C. Parr^{1#}, Shunsuke Wada^{1#}, Kenjiro Kotake¹, Shigetoshi Kameda¹, Satoshi Matsuura¹, Souhei Sakashita², Soyoung Park², Hiroshi Sugiyama², Yi Kuang^{3*} and Hirohide Saito^{1*}

筆頭著者

* 責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 京都大学大学院理学研究科
3. 香港科技大学

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- 日本学術振興会 科学研究費補助金「基盤研究 S: 15H05722」
- ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム (HFSP)
- iPS 細胞研究基金

7. 用語解説

注 1) mRNA

メッセンジャー (伝令) RNA のこと。DNA 上の遺伝情報は mRNA に転写された後、mRNA からタンパク質となり (翻訳され)、細胞内で機能する。

注 2) mRNA スイッチ

目的のマイクロ RNA (miRNA) やタンパク質の発現を検知する人工 mRNA を使って、人工 mRNA からの翻訳をコントロールする概念を「mRNA スイッチ」とよぶ。