

海洋性光合成細菌を用いた機能性 RNA の発酵生産

梅影 創

(豊橋技術科学大学大学院 工学研究系)

研究の目的

アプタマー、リボザイム、二重鎖 RNA などの機能を持つ RNA は近い将来、RNA 医薬品として使用されることが期待されている。しかし、通常、RNA はリボヌクレアーゼ活性によってすぐさま分解されてしまうことから、リボヌクレアーゼに耐性な RNA の開発が望まれている。一般的に化学修飾されたヌクレオチドを用いて RNA を合成することでリボヌクレアーゼ耐性化を実現する手法が用いられるが、合成コストが大きな問題となっている。我々の研究グループでは、細胞内において環状 RNA は安定に存在することができるという点に着目し、機能性 RNA の環状化について研究を行っており、RNA アプタマーの環状化に成功している。また、将来的な安価な環状 RNA の生産法として、大腸菌に生産させる手法についても研究を行ってきた。しかし、大腸菌で生産させる場合、大腸菌はエンドトキシンを持つこと、RNA の回収には大腸菌の破碎が必要なことから、精製方法が煩雑となることが懸念されてきた。そこで、我々の研究グループでは、大腸菌に変わる微生物として海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* が能動的に菌体内の RNA を細胞外に生産する能力に着目し、機能性 RNA の菌体外生産について検討してきた。本菌を用いた機能性 RNA の菌体外生産量は 1 リットル当たり ng レベルであり、工業的生産には不十分である。

そこで今回、菌体外 RNA 生産手法を改良すべく、新たに TOP (tandem one-way transcription of PIE) 法 (Fig. 1A) を考案し、菌体外への環状 RNA 生産量の増大を目指した。

方法

恒常的なプロモーターである *lpp* プロモーターの下流に、環状 RNA を発現させることのできる PIE 配列とターミネーター配列を導入し、プロモーターからターミネーターまでを 1 転写ユニット (Fig. 1B, C) として、PCR によって増幅したのち、タンデムに同一プラスミド上に導入していった。具体的には、*KpnI* および *XhoI* 処理したプラスミドに、*KpnI* および *SalI* 処理したインサート配列 (1 転写ユニットに相当) を組み込んだ。*XhoI* サイトと *SalI* サイトはライゲーションされ、ライゲーション後の配列は、*XhoI*、*SalI* ともに認識されなくなる。インサート側の配列には、*XhoI* 配列が予めくみこまれているため、この *XhoI* サイトとプラスミド側の *KpnI* サイトを使えば、この部位に *KpnI* および *SalI* サイトを持つ転写ユニットを、新たに挿入することが可能となる (Fig. 1B)。このような手順で、1 転写ユニットずつ同一プラスミドに導入することを繰り返すことにより、転写ユニットを、原理上約 10Kb まで繰り返し導入することが可能である。このプラスミド構築手法 (TOP 法) によって、1 個から 4 個までの転写ユニットをそれぞれ導入した 4 種類のプラスミドを構築し、各プラスミドをモデル微生物である大腸菌

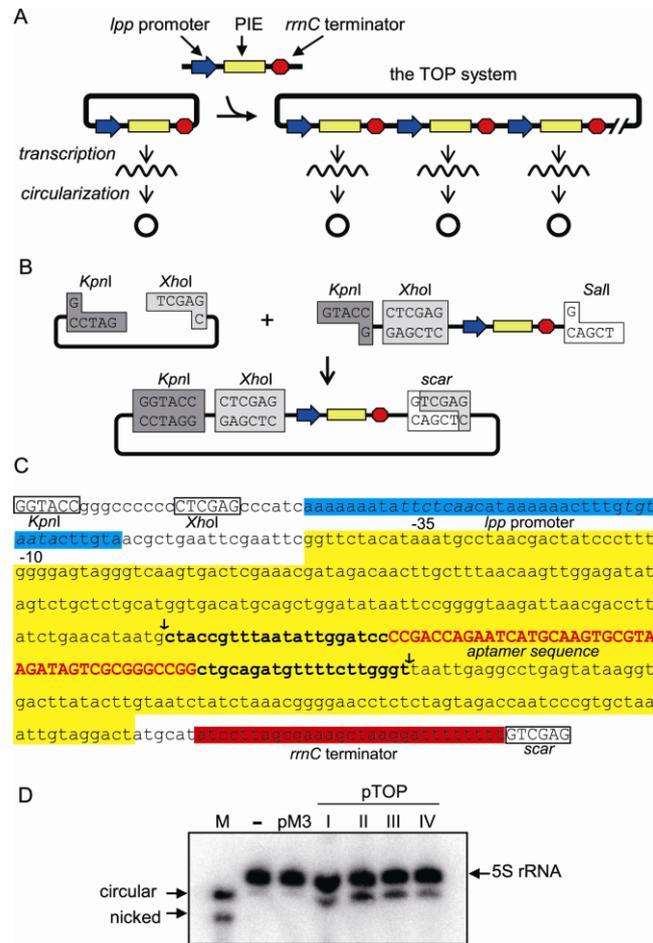


Fig. 1 TOP法の概要

(A) TOP法による環状RNA発現方法の概要、(B) TOP法におけるインサート（転写ユニット）導入方法、(C) TOP法において用いた1転写ユニットの塩基配列。矢印はスプライシングサイトを、青枠で囲まれた部位はプロモーター配列領域を、黄色で囲まれた部位はPIE配列部位を、太字部は環状RNA配列になる部位を、赤字はアプタマー配列部位をそれぞれ示す。(D)ノーザンブロットによる各TOPシステムでの環状RNA発現。circularおよびnickedは環状RNAおよび一部で切断された環状RNAの泳動位置をそれぞれ示す。5S rRNAは内部標準として用いた。pTOPのI、II、III、IVはそれぞれプラスミド上に導入された転写ユニット数を示す。

JM101Tr株に導入した。得られた形質転換株を、2×YT培地を用いて30°Cで18時間培養を行い、菌体内に環状RNAを恒常的に発現させた。トータルRNAをAGPC法によって回収した後、トータルRNAに含まれる環状RNAをノーザンブロット法によって検出、定量を行い、TOPシステムを評価した（Fig. 1D）。一方、海洋性光合成細菌*Rhodovulum sulfidophilum*に、ヒートショック法でTOPプラスミドを導入し、嫌気明条件によって培養した後、菌体内および菌体外における環状RNA発現をノーザンブロット法によって評価した。

結果

環状RNAを発現する転写ユニットを1個から4個までを持つプラスミドシリーズを作成し、先ず大腸菌内で環状RNAの発現を評価した。ノーザンブロット法によ

って、全てのプラスミドにおいても環状 RNA の発現が認められた (Fig. 1)。転写ユニットを 2 個保持するプラスミドシステムが最も環状 RNA 合成量が多く、1L 培養あたり約 0.19 mg であった (大腸菌のシステムではあるが、世界最高収量)。また、転写ユニットを 4 個保持するプラスミドからの環状 RNA の発現量は激減した (Fig. 1D)。転写ユニット数が多くなると、菌体中のプラスミドの安定な保持に支障をきたすことがアガロースゲル電気泳動によって明らかとなった。また、構築したプラスミドを海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* に導入し、環状 RNA の発現を試みたが、ノーザンブロットティングによって、環状 RNA の発現を確認することはできなかった。

結論

TOP システムは大腸菌の系においては一部有効であり、菌体内の環状 RNA 発現量を従来の約 2.7 倍 (1L 培養あたり 0.19mg の収量) に増加させた。また、プラスミド中の転写ユニット数を 4 個にすると環状 RNA 発現量が低下したことから、プラスミド保持の改善が必要であることが示唆された。プラスミドの安定保持に適した (TOP システムに適した) 宿主株 (例えば Stbl2 株) の選定などを検討する必要がある。一方、海洋性光合成細菌 *R. sulfidophilum* にこの TOP システムを導入したところ、ノーザンブロットングレベルでの環状 RNA の発現は確認できなかった。今後、プロモーターの改良や発現ベクターの変更などを行うことで、*R. sulfidophilum* を宿主とした、菌体外に環状 RNA を生産可能なシステムの構築を完成させたい。

文献

- 1) Umekage, S. & Kikuchi, Y., (2009). *In vitro* and *in vivo* production and purification of circular RNA aptamer. *J. Biotechnol.* **139**: 265-272
- 2) Umekage, S. & Kikuchi, Y., (2009). *In vivo* circular RNA production using a constitutive promoter for high-level expression. *J. Biosci. Bioeng.* **108**: 354-356