

**硫黄原子を導入した人工mRNAで高効率たんぱく質合成
～mRNA医薬品や新たなたんぱく質生産法の開発へ～**

ポイント

- 医薬品などに応用するためには天然型mRNAのたんぱく質の生産能力が十分ではなく、高生産能力を持つmRNA分子の開発が求められていた。
- mRNAのリン酸部位の酸素原子を硫黄原子に置換することで、翻訳開始が加速されたんぱく質の合成能力が20倍以上も向上した。
- mRNA医薬品や新たなたんぱく質生産法の開発が期待される。

JST 戦略的創造研究推進事業において、名古屋大学 大学院理学研究科の阿部 洋教授（糖鎖生命コア研究拠点（iGCORE）PI 兼任）、阿部 奈保子 特任助教、川口 大輔 大学院生らは、たんぱく質を高効率で合成できる人工メッセンジャーRNA（mRNA）を開発しました。

mRNAは生体内でたんぱく質を合成する機能を持つため、たんぱく質合成法やmRNA医薬品としての利用が望まれています。特にmRNA医薬品は、コロナウイルスのワクチン療法^{注1)}への適用などが期待され開発が進められています。しかし、医薬品などに応用するためには天然型mRNAではたんぱく質の生産能力が十分ではなく、高生産能力を持つmRNA分子の開発が求められていました。

生体内ではリボソーム^{注2)}がmRNAを鋳型として3つの段階を繰り返すことでたんぱく質を合成します（翻訳反応）。①開始段階：リボソームがmRNAに結合し翻訳開始複合体を形成する、②伸長段階：リボソームがmRNA上を移動しアミノ酸をつないでたんぱく質を合成する、③終結段階：たんぱく質合成が終了しリボソームが解離する、という翻訳反応サイクルの中で、最も時間がかかるのは①開始段階です。

今回本研究グループは、天然型mRNAのリン酸部の酸素原子を硫黄原子に置き換えた人工mRNAを合成しました。そして、この人工mRNAが翻訳反応の開始段階を加速させることで、天然型mRNAと比較し、たんぱく質合成効率を20倍以上向上させることを発見しました。

今回発見した人工mRNAは、新たなたんぱく質の大量生産技術やmRNA医薬品への利用が期待されます。

本研究は、理化学研究所の清水 義宏 チームリーダーと共同で行いました。

本研究成果は、2020年7月5日（英国時間）にドイツ科学誌「Angewandte Chemie International Edition」のオンライン版で公開されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（CREST）

研究領域：「ゲノムスケールのDNA設計・合成による細胞制御技術の創出」

（研究総括：塩見 春彦 慶應義塾大学 教授）

研究課題名：「化学を基盤とするゲノムスケールDNA合成技術の開発」

研究代表者：阿部 洋（名古屋大学 大学院理学研究科 教授）

研究期間：平成30年10月～令和5年3月

<研究の背景と経緯>

生体内では、DNAを鋳型にmRNAが転写され、さらにmRNAを鋳型としてたんぱく質が合成されます。mRNAは1960年代に発見されて以来、セントラルドグマと呼ばれる生命現象の根幹に関わるだけでなく、その性質からたんぱく質工学において世界中で研究されてきました。そして今や人工mRNAは酵素を用いることで、試験管内で容易に合成することができます。そのため、たんぱく質を原料とする生体材料生産やワクチン、たんぱく質補充療法^{注3)}などの産業や医療分野への応用が期待されています。特に、医療分野においては従来の低分子医薬品では標的にできなかったウイルス感染症、がん、遺伝性疾患などの治療法として、mRNA医薬品が注目を集めています。

しかし、mRNAのたんぱく質合成効率（翻訳効率）はたんぱく質生産法や医薬品として利用するには不十分です。さらにmRNAは生体内で分解酵素により速やかに分解されるため、持続的なたんぱく質合成が難しいことも大きな問題です。

これらの問題を解決するために、非天然型核酸（化学修飾された核酸）をmRNAに導入することで安定性を上げることは可能です。しかし、たんぱく質合成効率が下がり、生産量は向上しません。そのため現在まで、mRNAの医薬品への応用は非常に限定的で、たんぱく質合成効率の向上が課題でした。

<研究の内容>

核酸の一般的な化学修飾の1つとして、リン酸部位の酸素原子を硫黄原子に置換するホスホチオエート修飾（PS修飾）があります。この化学修飾は、核酸の生物学的安定性やたんぱく質との親和性を向上させることが報告されています（図1a）。このことから、PS修飾は短い核酸からなる核酸医薬品^{注4)}に多く用いられています。しかし、長鎖のmRNAに対してこの修飾を用いた例はほとんど報告されていませんでした。

mRNAはRNAポリメラーゼ^{注5)}によりリボヌクレオチド三リン酸を逐次連結していくことで合成されます（転写反応）。この転写反応において、 α 位のリンに結合する酸素原子が硫黄原子に置換されたリボヌクレオチド5'-(α -P-チオ)三リン酸（図1b）を基質として用いることで、mRNAにPS修飾を導入することができます。

本研究グループはこの手法を用いて、PS修飾を導入した16種類の人工mRNAを合成し、無細胞たんぱく質合成系で翻訳反応を解析しました。その結果、未修飾mRNAに比べて、PS修飾mRNAは高効率でたんぱく質合成ができました。さらにホタルルシフェラーゼ発光たんぱく質や蛍光たんぱく質をコードしたmRNAに対して、それぞれアデニン、グアニン、シトシン、ウラシル部位のリン酸基にPS修飾を導入したところ、いずれの場合も天然型mRNAよりも2倍から12倍もの高い翻訳効率を示しました（図2a、b）。このことからPS修飾が普遍的にたんぱく質合成効率を上昇させることが分かりました。

翻訳反応の最も時間のかかる律速段階は、リボソームやたんぱく質が集合した翻訳開始複合体を形成する開始段階だとされています。このことから、PS修飾がmRNAの翻訳開始速度を上げていると考え、その検証実験として翻訳反応の初速度を測定しました。その結果、PS修飾mRNAは天然型mRNAに比較し、その翻訳開始速度がおよそ2倍向上していることが明らかとなりました(図3)。以上の実験から、PS修飾mRNAが翻訳反応の開始段階を促進することが示唆されました。

これらの結果を基に、高効率でたんぱく質を合成できるmRNAを開発するために、PS修飾を配列特異的に導入した種々のmRNAを合成し、翻訳評価を行いました。翻訳開始に関わる領域である5'末端から開始コドン付近までの非翻訳領域をPS修飾した5'-PS-mRNAは最大で約2.2倍の翻訳効率を示しました(図4)。一方で、mRNAのたんぱく質コード領域をPS修飾した3'-PS-mRNAは約0.5倍の翻訳効率を示しており、PS修飾は翻訳反応の伸長段階をやや阻害することが示唆されました。

以上の結果から、PS修飾をmRNA 5'末端の非翻訳領域に導入することにより、翻訳反応の律速段階である開始段階を促進し、たんぱく質合成を大幅に効率化できることを示しました。このことは、mRNAに化学修飾を導入するだけで翻訳効率を向上できることから、今後の人工mRNAの設計指針となる重要な研究成果です。

<今後の展開>

今回の研究により、PS修飾mRNAが翻訳反応の律速段階を速めることによって、高効率でたんぱく質を合成できることを示しました。本手法は、たんぱく質を原料とする生体材料の生産において、大量合成法として用いることが期待されます。また今回得られた結果を真核生物の翻訳系に応用することで、たんぱく質補充療法のためのmRNA医薬品として医療への貢献が期待されます。さらに、高い機能を持つmRNAの分子デザインの設計はこれまでにほとんど報告されておらず、本成果で得られたデザインは、今後の人工mRNAの分子設計の指針となり得ます。

<参考図>

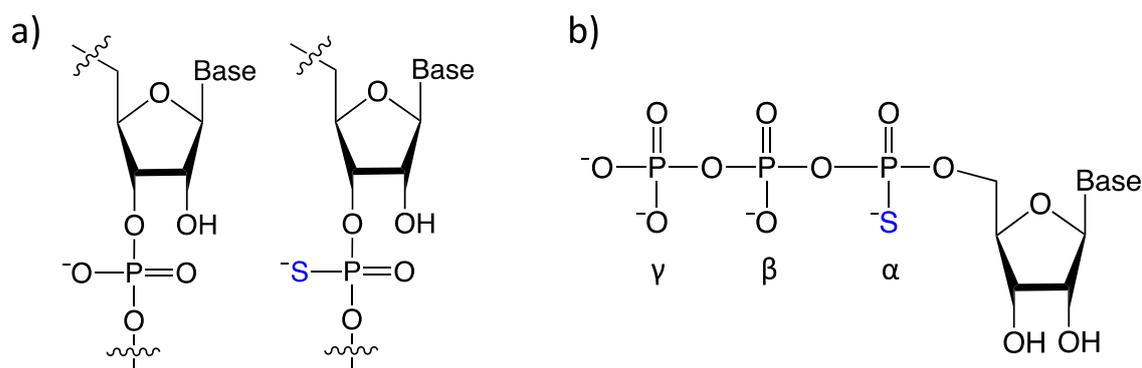


図1 PS修飾核酸の化学構造

(a) 未修飾mRNA (左) とPS修飾mRNA (右) の骨格構造。PS修飾はリン酸部位の非架橋酸素原子の1つを硫黄原子に置き換えた修飾。核酸にヌクレアーゼ耐性を付与することができるため、核酸医薬品に多く用いられる。(b) リボヌクレオチド5'-(α -P-チオ)三リン酸の化学構造式。転写反応に用いられるリボヌクレオチド三リン酸の α 位が、通常のア酸素原子から硫黄原子に置換されている。DNAを鋳型に、このモノマーを連結していくことでmRNAが合成される。

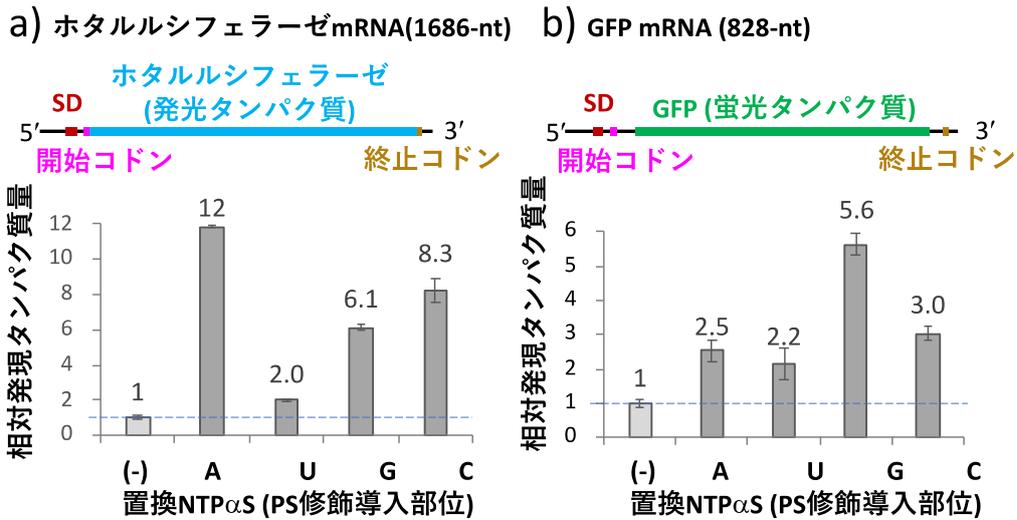


図2 無細胞たんぱく質合成系におけるPS修飾mRNAの翻訳効率

無細胞たんぱく質合成系でPS修飾mRNAを37度で3時間培養し、翻訳反応液を解析した。発現したたんぱく質量を定量した結果、PS修飾mRNAは未修飾mRNAと比べて高い翻訳効率を示した。

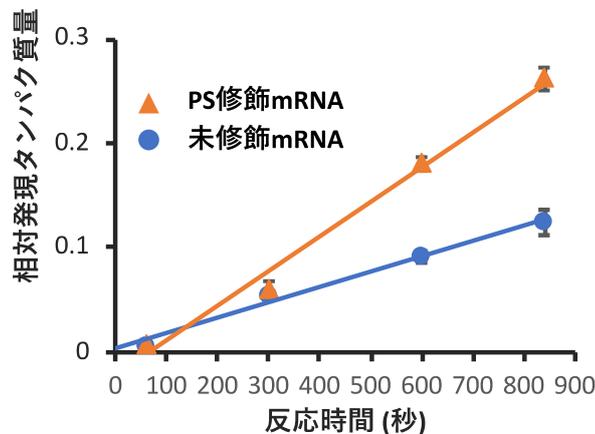


図3 翻訳反応の初速度解析

翻訳反応のシングルターンオーバー解析^{注6)}を行い、生成たんぱく質を定量した。グラフの傾きは翻訳開始速度を示す。PS修飾mRNAは未修飾mRNAに比べておよそ2倍の翻訳開始速度を示した。

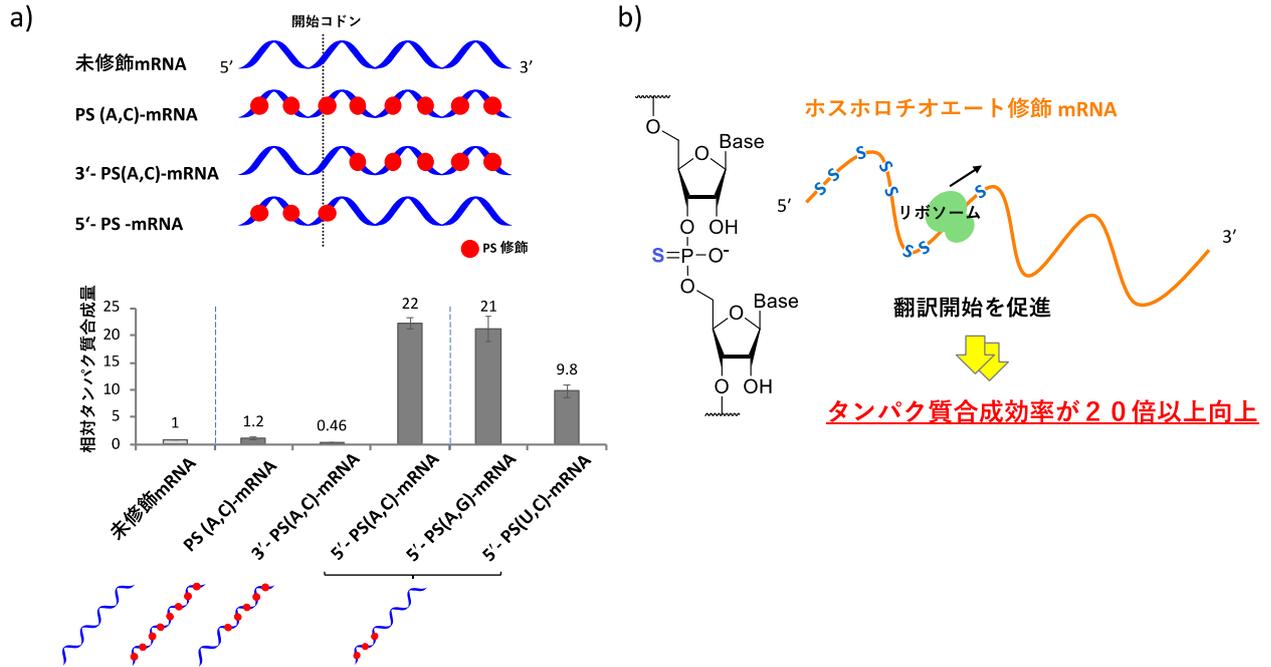


図4 5'末端部位へのPS修飾導入による翻訳効率の向上

(a) PS修飾を持つキメラmRNA (上) とその翻訳効率 (下)、(b) 本実験により得られたmRNA分子デザイン。合成した6種類のmRNAを無細胞たんぱく質合成系に加え、培養した後にたんぱく質合成量を算出した。非翻訳領域のみにPS修飾したmRNA (5'-PS-mRNA) は天然型に比べ20倍以上の高い翻訳効率を示した。

<用語解説>

注1) ワクチン療法

生体内に抗原であるたんぱく質を投与し、抗体を産出させることにより感染症などにかかりにくくする手法。mRNAワクチンの場合、抗原たんぱく質を発現するmRNAを生体内に投与することで、抗体が産出する。

注2) リボソーム

mRNA上を移動し、mRNAの配列情報を読み取ってたんぱく質を合成する場。リボソームたんぱく質とリボソームRNAから構成されている。

注3) たんぱく質補充療法

たんぱく質 (酵素など) の不足が病気・症状の原因となっている場合、その不足たんぱく質を外部から補うことで改善を図る治療法。

注4) 核酸医薬品

遺伝情報を持つ核酸 (DNAやRNA) を原料とする医薬品。化学合成で作ることができ、生体内に投与することで核酸を標的にして疾患の原因となるたんぱく質の発現を抑制できる。アンチセンスやsiRNA、アプタマーなどで知られる。

注5) RNAポリメラーゼ

DNAのプロモーター領域を認識し、ヌクレオチド三リン酸を連結させていくことによりDNAからmRNAへの転写反応を行う酵素。

注6) シングルターンオーバー解析

翻訳終了後にリボソームの解離を起こさない配列を導入したmRNAを用いることで、翻訳反応サイクルが回転せずに1回で翻訳反応が停止する。翻訳開始速度を測定することができる手法。

<論文タイトル>

“Phosphorothioate Modification of mRNA Accelerates Rate of Translation Initiation Providing More Efficient Protein Synthesis”

(ホスホロチオエート修飾mRNAは翻訳開始を促進し、たんぱく質合成を効率化する)

DOI : [10.1002/anie.202007111](https://doi.org/10.1002/anie.202007111)