

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2014

課題番号：23221011

研究課題名(和文)RNAとタンパク質の相互作用を用いたヒト細胞運命制御システムの構築

研究課題名(英文)Design and construction of new systems for regulating human cell fate

研究代表者

井上 丹(Inoue, Tan)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：40114855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 85,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞内の信号伝達経路による遺伝子発現ネットワークを自在に変換する新手法としてタンパク質応答型のshRNAスイッチを構築した。タンパク質応答型のスイッチによる翻訳制御の手法に、フィードバック制御などを導入することに成功した。新しいタンパク質応答型のスイッチに使用することができる人工のRNPモジュールを作成した。任意のmRNAの翻訳をONにする新しいONスイッチの開発を行った。

RNPから構成される三角形のデバイスが、ステレオケミカルにヒト細胞表面レセプターの集合を制御し、それにより信号伝達を定量的に制御できることを証明した。同研究の進展に必要な関連する新技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：We developed new molecular switches for synthetic biology and bio-nanotechnology that respond to a specific protein in human cell. We also successfully incorporated feedback control of the switches and related techniques for the switches. A new general method for converting existing OFF molecular switches to the corresponding ON switches was developed. We designed and constructed a triangular shaped RNP with cell-surface receptor binding protein to control the signal transduction from the receptor. The RNP device is capable of regulating the signal transduction in an OFF and ON manner in human cell that regulate the apoptotic cell death. In addition, we also developed new methods for further advance our RNP technology.

研究分野：synthetic biology

キーワード：RNP

1, 研究開始当初の背景

(1) 近年、分子生物学の急速な発展により、膨大な数の遺伝子・生体高分子 (DNA、RNA、タンパク質) の機能とそれらの詳細な立体構造、さらには、それらにより選択的な分子間の相互作用および化学反応を通じて生体内で高度な分子機能の調節がなされていることが明らかになった。よって、蓄積された試験に基づいてこれらを自在に制御することにより、新しい病気治療法や、食料・エネルギー問題などを解決する新しい手段の開発が可能となった。

(2) これを実現するために、標的となる生体分子の機能を、分子間相互作用により、直接、制御するための新しい分子をデザイン・作成し、それにより細胞内の複雑なネットワークや組織の機能を制御する方法が開発されつつある。しかし、その実用性については、初期段階にあると言わざるを得ない。

(3) われわれは、RNA と詳細な立体構造が知られている天然のタンパク質を特異的に水素結合させ、新しい人工 RNA-タンパク質複合体 (RNP) をデザイン、作成する技術を開発してきた。さらに、天然の RNA とタンパク質の特異的な相互作用を生かした、ヒト細胞の信号伝達経路を制御する新手法を開発してきた。

2, 研究の目的

(1) ヒトのがん細胞内で発現するがん特有のタンパク質 (マーカータンパク質) などを直接検知する人工 RNA スイッチを開発する。ついで、そのスイッチからの信号をリワイアリングにより細胞自身が持つ信号伝達系へ連結し、アポトーシスにより細胞死を誘導する人工システムを構築する。これにより、たとえば正常細胞ががん化すると、それに伴い発現するマーカー分子を直接検知して当該細胞を死滅させるがん細胞除去法などをターゲットとする新しい医療の基本システムを確立する。

(2) 分子デザインにより作成した正三角形の構造をもつ RNA の三つの頂点に、目的とする

細胞表面のタンパク質を特異的に認識するリガンドを結合した多機能性 RNP を作成する。この RNP を用いて、特定の任意のヒト細胞表面のレセプターとの非共有結合を行い、さらに、そのレセプターを介したシグナル経路を ON/OFF 制御することにより、細胞運命を決定するシステムを構築する。

3, 研究の方法

目的(1)、

われわれは、L7Ae タンパク質と特異的に相互作用する RNA モチーフを利用することで、翻訳抑制 (OFF) と翻訳活性化 (ON) をヒト細胞内で同時に行い、人工的にアポトーシスを誘導するシステムの構築に成功した。この技術を基盤として、より高度な哺乳類細胞内で機能する人工 RNP-ON/OFF スイッチを確立し、ヒトのがん細胞の増殖を特異的に抑制するシステムを構築する。

目的(2)、

タンパク質を RNA に装着した様々な RNP を構築するにあたり、選択性、高感度化、信号伝達制御を達成するため、足場となる scaffold RNA、RNA 結合タンパク質、機能を付加するために装着するタンパク質の 3 つの要素の設計開発と機能付加を検討する。

われわれは RNA 構造体をコンピュータ上でデザインし、実際に分子として作製するための独自のノウハウを持っている。この手法を用いて様々な大きさの RNA のデザインと作製、新たな RNP 相互作用モチーフを RNA 頂点部に装着した複数の RNA scaffold の作製を試みる。

三角形 RNP の各頂点に細胞表面レセプターに結合するリガンドを配置し、三角形 RNP の各辺の長さを調節することにより、レセプターを構成するエレメント間の距離を調整する。これにより信号を人工的に伝達する、または、伝達不能にする。すなわち、アゴニストやアンタゴニストに対応する能力を持つ三角形 RNP を、細胞接着用に開発した技術を使って作製する。これにより、三角形 RNP によ

るヒト細胞表面レセプターの信号伝達の制御法を確立する。

4, 研究成果

目的 1)

(1) ヒト細胞内の信号伝達経路による遺伝子発現ネットワークを自在に変換・改変する新手法として、shRNA と RNP 相互作用モチーフを使ったタンパク質応答型の shRNA スイッチを構築することができた。このスイッチを用いて細胞内信号伝達経路を通じた細胞運命制御が可能であることを証明した。このスイッチの標的となる遺伝子をアポトーシス制御遺伝子に改変し、これによりアポトーシスシグナルを制御することにより、特定タンパク質の発現にตอบสนองする細胞死の制御が可能であることを示した。さらには、タンパク質応答型のスイッチと shRNA スイッチを組み合わせ 1 種類のタンパク質にตอบสนองして、2 種類の mRNA の翻訳を同時かつ独立に ON/OFF 制御することに成功した。この研究で開発した shRNA スイッチシステムは既存の shRNA のループを改変することで生物学・医療研究に不可欠な RNAi 技術に応用が可能であり、今後の幅広い応用が期待される。このような立体構造を元に遺伝子発現スイッチ作動原理を解明し、それを元に 3D モデリング技術を用いてスイッチの効率を最適化することに成功した研究例は無く、今後、この研究は立体構造を元に設計をする遺伝子回路など新しいナノテクノロジー用のデバイスの開発につながることを期待される。(発表論文)

(2) タンパク質応答型のスイッチによる翻訳制御の手法をさらに進化させ、フィードバック制御など高度なスイッチの制御法を導入することに成功した。開発した制御法は RNA への結合能力が異なるタンパク質の誘導体を用いて、標的となるタンパク質の発現量を制御するが、この導入により、ヒト細胞内の特定のタンパク質の発現量を定量的に厳密に決定することを可能にした。また、数理解析モデルにより、制御は実際に RNA・タンパク質間の相互作用に依存することを確認した。フィードバック制御は、元来、細胞内において信

号伝達系の制御で一般的なものであることから、今後、複数の信号伝達経路を同時にそれぞれ定量的に制御するための技術として幅広い応用が期待できると考えている。(発表論文)

(3) 新しいタンパク質応答型のスイッチに使用することができる人工の RNP モジュール (RNA-タンパク質複合体) を天然のモジュールを改変することにより作成した。このモジュールが、ヒト細胞内で使用可能であることを、これを用いて新しいクラスのタンパク質応答型のスイッチを開発することにより証明した。(発表論文)

(4) 遺伝子発現制御のために開発されたタンパク質応答型のスイッチは殆どのものが、OFF スイッチである。そのため、より洗練された信号伝達経路の制御技術を実現するために、新しい ON スイッチの開発が望まれていた。この問題を解決するために、任意の mRNA の翻訳を ON にする新しい ON スイッチの開発を行った。このスイッチは NMD (nonsense mediated decay) を応用しており、一般的にこれまで開発されたすべての OFF スイッチを ON スイッチに変換できる能力を持つと考えられる。将来の応用例として、このスイッチと細胞死を誘導するタンパク質を結びつけることにより、がん細胞に特異的に発現するタンパク質による、がん細胞特異的な細胞死を引き起こすことが可能になることがあげられる。(発表論文)

目的 2)

(1) ヒト細胞表面に露出しているレセプターの構成ユニットであるタンパク質に、特異的に結合する能力を持つタンパク質を三角形の RNA の頂点に結合し、これによりレセプター構成ユニットである膜タンパク質間の距離を、三角形の大きさを変え、接近させる (ユニット間相互作用により信号が流れる) 遠ざける (ユニットを物理的に隔離し信号を遮断) ことで、レセプターから細胞内への信号伝達の ON/OFF 制御を行うことによる遺伝子発現制御

に成功した。具体的には、まず、さまざまな RNP を構築し、ヒト細胞表面に露出するタンパク質との結合をこころみた。その結果、ガレクチンの結合により信号伝達が起こるレセプターを用いて、ガレクチンとレセプターの非共有結合を評価するおよび結合によるアポトーシスに至る信号伝達経路の制御を行うこととした。ガレクチン誘導体を装着した三角 RNP を、三角形のサイズを変えて 5 種類作成しレセプターとの結合を評価したところ、三角形の一片が 15 ヌクレオチドから 90 ヌクレオチドの範囲では、結合能力にばらつきはあるものの結合能には大きな違いがないことがわかった。一方、細胞死を誘導する能力については、サイズが最小である一片が 15 ヌクレオチドのものが最も能力が高く、サイズが大きくなるにつれて誘導能力は低下した。結論として、ナノサイズの RNP から構成されるこのデバイスは、ステレオケミカルにヒト細胞表面レセプターの集合を制御し、それにより信号伝達を定量的に制御できることを証明した。また、このデバイスは、3-6 nm のサイズの違いにより、信号伝達の効率を定量的に制御する能力を持つことを明らかにした。この方法は、キメリックな人工レセプターを開発すれば、任意の信号伝達経路を細胞表面から制御することを可能にする。そのため、引き続きキメリックレセプターのデザインおよび構築を行っている。(発表論文)

(2) 三角形 RNP の三辺を形成する RNA 部分で RNP を物理的に三分割し、三つのユニットから構成される小 RNP を作成し、それら 3 ユニットの結合させ三角形 RNP をアセンブリーする新 RNP 作成法を開発した。これにより、異なるタンパク質を結合した上記三つの小 RNP を集合させ、三つの異なる機能を持つ RNP 分子を作成することに成功した。例えば、この手法は細胞認識、蛍光マーキング、細胞毒性をもつ三種類のタンパク質をおなじ RNA 上に設置することを可能にする。このような多機能性 RNP を用いることにより、特定の膜タンパク質を発現しているがん細胞などを特異的に認識、マークし、その細胞特異的に細胞死を起こさせる新しいがんの治療法の開発が可能になる。(発表論文)

(3) タンパク質の円順列置換法により、三角形 RNA の頂点に設置するタンパク質の配向性を変えることに成功した。将来、RNP とターゲットの結合状態を最適化するために、標的への結合能を微細に調節する必要があると考えられる。この方法は、その際に RNA 足場上のタンパク質の立体的配向の制御を通じて結合の最適化を行うことを可能にする。(発表論文)

(4) 三角形のみではなく、四つの異なるタンパク質の装着が可能になる四角形 RNP の構築研究を進め、トポロジーが異なる二種類の四角形 RNP の作成に成功した。これにより、四種類までの異なる機能性タンパク質を装着したさまざまなサイズを持つ四角形の RNP を二種類作成し、それぞれを応用研究に用いることが可能になった。今後、三角形のみではなく、さらにさまざまなデザインによる足場とさまざまなタンパク質の組み合わせによる RNP ナノデバイスの作成が可能であることを証明した。(発表論文)

(5) 上記研究で用いる三角形 RNP のアフィニティーカラムクロマトグラフィーによる精製法を開発し、これを一般的な RNP の精製法としてまとめ論文として発表した。それまで、RNP の精製法は報告がなく、独自にこれを開発する必要に迫られていた。(発表論文)

補遺)

目的 1) にある、細胞内で発現する特定のタンパク質を直接検知する人工 RNA スイッチの開発研究について、既知の数十種類の天然の RNA 結合タンパク質を用い、さまざまなスイッチを作成し、2 年間で費やしヒト細胞内でのそれらの使用をこころみた。しかし、細胞内でのスイッチの動作効率が低いため動作確認が困難であった。この研究に用いたのは、比較的単純な実験システムであるものの、一つ一つのタンパク質・RNA の組み合わせによるスイッチの作成と、続く細胞内でのテストに多くの時間がかかった。

また、もう一方の研究テーマが順調に進展

し、さらには、プロジェクトが計4年であること、私がプロジェクト終了と同時に定年退職を迎えることに鑑み、目的2)に集中することがプロジェクト全体として、よりよい成果が挙げられると判断し、ヒト細胞内で機能する人工 RNA スイッチの開発研究を中断した。研究の中断は、私の個人的な事情によるところが大きく、また、この研究テーマそのものに致命的な問題はない。時間があれば、スイッチからの信号の増幅法を開発するで、この研究を完成させることができると考えている。また、同じく時間的な制約により、最後の数編の論文は短くまとめざるを得ず、本来は、より完成度の高い形で発表すべきものである。

5, 主な発表論文など

[雑誌論文] (計 10 件) *責任著者

Kashida, Shunnichi, Inoue, Tan* and

Saito, Hirohide*,

Three-dimensionally designed protein-responsive RNA devices for cell signaling regulation,

Nucleic acids research, 40, 9369-9378 (2012)

査読有

Stapleton, James A., Endo, Kei,

Fujita, Yoshihiko, Hayashi, Karin. T

akinoue, Masahiro, Saito, Hirohide* and

Inoue, Tan*,

Feedback control of protein expression in mammalian cells by tunable synthetic translational inhibition, ACS synthetic biology, 1, 83-88 (2012) 査読有

Endo, Kei, Hayashi, Karin, Inoue, Tan* and

Saito, Hirohide*,

A versatile cis-acting inverter module for synthetic translational switches, Nature Communications, 4, 1-9 (2013) 査読有

Endo, Kei, Stapleton, James A., Hayashi, Karin,

Saito, Hirohide* and Inoue, Tan*, Quantitative and simultaneous translational control of distinct mammalian mRNAs,

Nucleic acids research, 41, 1-12 (2013) 査読有

Hara, Tomoaki, Saito, Hirohide* and

Inoue, Tan*,

Directed evolution of a synthetic RNA-protein

module to create a new translational switch, Chemical Communications, 37, 3833-3835 (2013) 査読有

Fujita, Yoshihiko, Furushima, Rie,

Ohno, Hirohisa, Sagawa, Fumihiko and Inoue, Tan*,

Cell-surface receptor control that depends on the size of a synthetic equilateral-triangular RNA-protein complex,

Scientific Reports, 4, 6422 (2014) 査読有

Ohuchi, Shoji J., Sagawa, Fumihiko, Ohno, Hirohisa and Inoue, Tan*,

A Purification Method for a Molecular Complex in Which a Scaffold Molecule Is Fully Loaded with Heterogeneous Molecules,

PLoS ONE 10(3): e0120576 (2015) 査読有

Ohno, Hirohisa and Inoue, Tan*,

Designed regular tetragon-shaped RNA-protein complexes with RPL1 for bionanotechnology and synthetic biology, ACS nano, accepted. 査読有

Ohuchi, Shoji J., Sagawa, Fumihiko,

Sakamoto, Taiichi and Inoue, Tan*,

Stereo-specific azimuth adjustment of a protein at the tip of an RNA using the circular permutation technique,

Chemical Communications, accepted 査読有

Ohuchi, Shoji J., Sagawa, Fumihiko,

Sakamoto, Taiichi and Inoue, Tan*,

A trifunctional, triangular RNA-protein complex, FEBS letters, accepted 査読有

[学会発表] 国内発表 8 件

6, 研究組織

(1) 研究代表者

井上 丹 (INOUE, Tan)

京都大学大学院・生命科学研究科・教授

研究者番号 40114855

(2) 研究分担者

斎藤 博英 (SAITO, Hirohide)

京都大学 iPS 細胞研究所・教授

研究者番号 20423014

(3) 連携研究者

樫田 俊一

京都大学大学院・生命科学研究科・大学院生

研究者番号 243164

遠藤 慧

京都大学 iPS 細胞研究所・博士研究員
研究者番号 40626074

藤田祥彦

京都大学大学院・生命科学研究科・助教
研究者番号 80192730

原知明

京都大学大学院・生命科学研究科・大学院生
研究者番号 705910

大野博久

京都大学大学院・生命科学研究科・博士研究員
研究者番号 449340

佐川文彦

京都大学大学院・生命科学研究科・技術員
研究者番号 なし

大内将司

京都大学大学院・生命科学研究科・博士研究員
研究者番号 20422412