

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13314

研究課題名(和文)細胞内RNA-Proteinナノ構造体の設計法の開発

研究課題名(英文)Desing method of intracellular RNA-protein structure

研究代表者

藤田 祥彦(Fujita, Yoshihiko)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：60589266

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、人工的にデザインしたRNAと細胞内に存在するRNAに結合するタンパク質や相互作用するmiRNAを組み合わせることで、細胞内の環境に応じてRNA-タンパク質ナノ構造を構築し、さらに翻訳量が増加するRNAスイッチを構築した。いずれも細胞の機能を自在に制御する基盤技術となる。RNAスイッチについては、特異的な細胞の選別技術を確立し、がん細胞除去や未分化細胞の除去などへ利用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文):We succeeded in controlling the cellular function depending on the intracellular environment by designed artificial RNA that interacts with endogenous protein and forms RNA-protein nanostructures. We also succeeded in constructing an RNA switch whose translational level increased in response to the activity of intracellular miRNA. Both are fundamental technologies for controlling the cellular functions. Notably, designed miRNA-responsive RNA switches enabled us to remove specific cells without a cell sorter. This result indicates the possibility of medical applications such as removal of cancer cells and undifferentiated.

研究分野: RNA synthetic biology

キーワード: RNA synthetic biology nano technology

## 1. 研究開始当初の背景

長い DNA を短い DNA の相補性を利用して折りたたみナノ構造を構築する DNA origami により、単純で周期的な形状から複雑な DNA ナノ構造を自在に構築することが可能になった。このような中で、RNA は DNA と同様に相補性を持つため、RNA を用いたナノ構造が注目されてきている。RNA は多様な構造をもち、リボザイムやリボソームに代表されるように酵素活性を持つものも知られており、DNA では実現できない構造や機能を実現できる可能性がある。また、DNA と異なり転写により細胞質へ材料を供給することができる。さらに、医療応用という観点から見ると、RNA のナノ構造はゲノムへの挿入の可能性が極めて低く安全性が高いと考えられる。現在のところ、細胞内での RNA のナノ構造をバクテリアで構築した例が報告されているものの、真核細胞内での構築例や、細胞内の環境に反応して機能を変化させる RNA 構造の報告例がない。

RNA はタンパク質や RNA などの細胞内分子と相互作用することで特有のナノ構造をとることが知られている。研究代表者は、この構造を利用することで細胞表面のレセプターの距離を自在に制御し細胞死シグナルを制御できることを示してきた。また、細胞内のタンパク質に反応して翻訳の ON/OFF を行うリボスイッチも構築してきた。これらの知見から RNA-タンパク質相互作用を利用することで、細胞内にナノ構造を構築することが可能であると考えられ、同様に細胞内分子との相互作用により細胞内環境に依存した RNA をデザインできると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では(1)RNA とタンパク質との相互作用を利用して細胞内にナノ構造を構築することを目指した。また、細胞内ナノ構造への機能付加が可能であることを、ナノ構造を利用して細胞死を引き起こすことで実証することを目指した。さらに、(2)細胞内に存在する分子(RNA など)に応じて機能が変化する RNA の構築を試みた。

## 3. 研究の方法

研究の目的 1 および 2 のそれぞれについて以下の方法で実施した。

(1) RNA ナノ構造の材料として、K-turn と呼ばれる RNA 構造と K-turn に特異的に結合することが知られている L7Ae タンパク質を選択した。K-turn と L7Ae の結晶構造を組み合わせ RNA-タンパク質複合体をデザインし、このデザインを元にした RNA 配列と L7Ae タンパク質を *in vitro* で結合させ AFM で構造を検証した。

細胞内における RNP ナノ構造の構築と機能の確認は L7Ae とアポトーシス誘導遺伝子である Caspase8 の融合タンパク質を用いて行った。Caspase8 は多量体でアポトーシスを誘

導することが知られている。そこで、Caspase8 の多量体形成に必須のドメインと L7Ae を入れ替えた融合タンパク質を作製した。L7Ae-Caspase8 融合タンパク質を細胞内で発現させ、K-turn をもつ RNA を細胞内へ導入し、細胞内で RNA-タンパク質ナノ構造体を構築し、Caspase8 をナノ構造上で多量体化させた。蛍光修飾 Annexin-V を用いアポトーシスを解析することで、細胞内ナノ構造の構築と機能の確認を行った。

(2) 細胞内に存在する分子に反応する RNA の構築を行うにあたり、細胞内タンパク質として未分化マーカーである Lin28A をターゲットとした。Lin28A-Caspase8 融合タンパク質を発現する mRNA と Lin28A の結合モチーフをもつ RNA 構造を細胞内に導入し、細胞内で Caspase8 依存的な細胞死が誘導できるかを検証した。さらに、Lin28A を発現している iPS 細胞を用い、細胞内の Lin28 との競合阻害により、細胞内 Lin28A 依存的にアポトーシスが制御できることを確認した。

また、同様に細胞内分子として miRNA をターゲットとし、miRNA に反応して翻訳が上昇する mRNA スイッチのデザインを行った。HeLa 細胞で活性が高いことが知られている miR-21 をターゲットとした mRNA スイッチを複数デザインし、HeLa へ導入し、mRNA スイッチから翻訳される EGFP の蛍光を観察することで、スイッチの評価を行った。細胞への導入に際し、リファレンスとなる iRFP670 をコードした mRNA を同時に加え iRFP670 の蛍光量で EGFP の蛍光量を割ることで、細胞毎の翻訳活性の違いを補正した。さらに、他の miRNA にも汎用的に利用できるかを確認するために、iPS 細胞で活性が高い miR-302 の ON スイッチを作製した。miR-302 のスイッチと iRFP670 の mRNA を 293FT 細胞と iPS 細胞へ導入し、iRFP670 の蛍光量で EGFP の蛍光量を補正することで、スイッチの評価を行った。

さらに、これらの miR-21 反応スイッチの出力を EGFP から細胞死制御タンパク質へ交換した miRNA 反応スイッチを用意し、HeLa 細胞と 293 細胞の共培養系へトランスフェクションした後、それぞれの細胞をカウントすることで特定の細胞が選別できているかを検討した。

## 4. 研究成果

K-turn は L7Ae の結合により 60° C の角度で固定される。3 つの K-turn と L7Ae の結合モチーフ間を double stranded RNA (dsRNA) でつなげることにより、正三角形の RNA-タンパク質構造体を構築し、AFM により形成を確認した。さらに、dsRNA の長さを 0.5 turn 分(2 重螺旋の半回転分)増減させることでジグザグ構造を *in vitro* で構築できることを AFM により確認した。さらに、多数の K-turn を導入することで巨大ならせん状の構造やジグザグ構造の構築に成功した。

このジグザグ構造は各頂点に L7Ae タンパク質が結合する。L7Ae に任意のタンパク質を融合することで、RNA 構造上にタンパク質を集積することができる。L7Ae-Caspase8 融合タンパク質を発現させた細胞で、この RNA 構造を導入すると、K-turn モチーフの数や密度依存的にアポトーシスが誘導され、細胞内でも RNA-タンパク質ナノ構造体が形成されること、それにより細胞の機能(アポトーシス)を制御できることを証明した。

さらに、内在性の Lin28A タンパク質と Lin28-Caspase8 融合タンパク質の競合を利用することで、細胞内の Lin28A 依存的な細胞死の誘導が可能であることを示した。

細胞内分子の別のターゲットとして miRNA についても検討を行った。これまで miRNA に応答して翻訳が減少する mRNA スイッチのデザインは行われていたが、今回新たに miRNA の活性に応じて翻訳が増大する mRNA スイッチの構築に成功した。蛍光タンパク質をコードした miR-21 応答の mRNA ON スイッチを用いることで、miR-21 の活性が高い HeLa 細胞と 293FT 細胞の識別に成功した。この ON スイッチは miRNA の mimic と inhibitor に対し、これまで作製されてきた miRNA-OFF スイッチとちょうど逆の応答をすることが確かめられた (Fig. 1)。

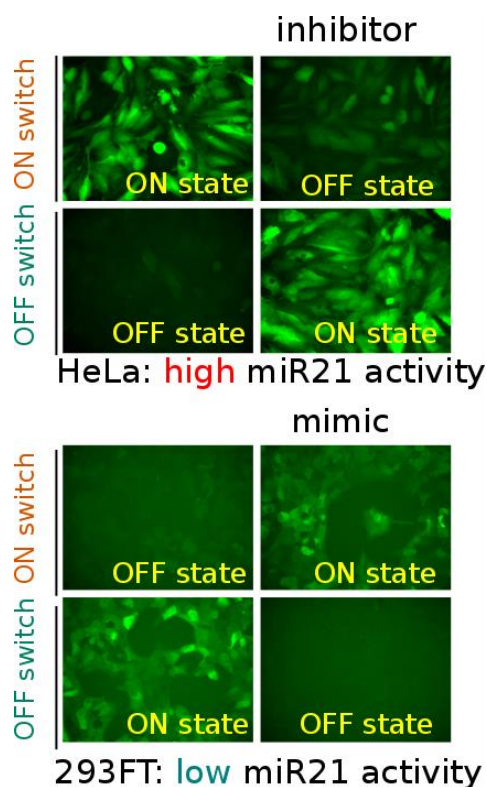


Fig. 1: miR-21 応答 ON/OFF スイッチの mimic と inhibitor に対する応答

また、iPS 細胞で活性が高い miR-302 に応答する ON スイッチを用いることで、iPS 細胞の識別に成功した (Fig. 2)。

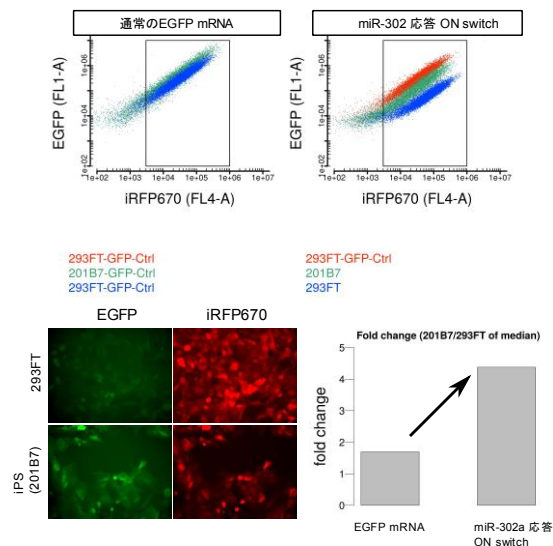


Fig. 2: miR-302 応答 ON スイッチによる iPS 細胞の検出

このスイッチの汎用性を確かめるために、異なる miRNA の配列 (miR-W, X, Y, Z) の相補配列をもつ miRNA 応答 ON スイッチを作製し、それぞれに対応する miRNA mimic を加えると、対応する miRNA mimic に応答して発現が上昇することが確認された。また、配列が異なる miRNA mimic を加えた場合は翻訳上昇が見られず、作製した miRNA 応答 ON スイッチは任意の配列を特異的に検出できることが確認できた (Fig. 3)。

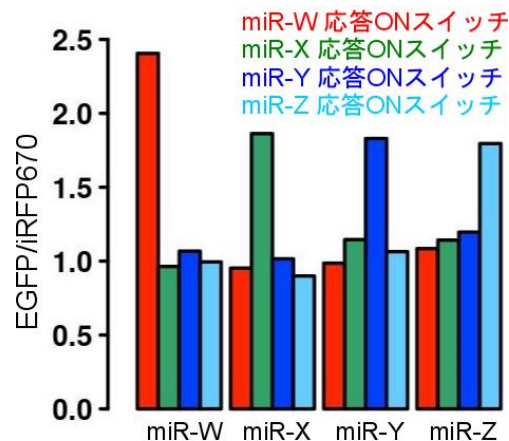


Fig. 3: miRNA に対する ON スイッチの配列特異性.

miR-21 応答 ON スイッチ及び OFF スイッチの出力タンパク質を EGFP から細胞死誘導及び抑制遺伝子に交換することで、HeLa 細胞と 293FT 細胞をモデルとして、細胞内 miRNA を指標として特定の細胞を除去できるかを検討した。細胞死誘導遺伝子をコードした miR-21 応答 ON スイッチと細胞死抑制遺伝子をコードした miR-21 応答 OFF スイッチを HeLa 細胞

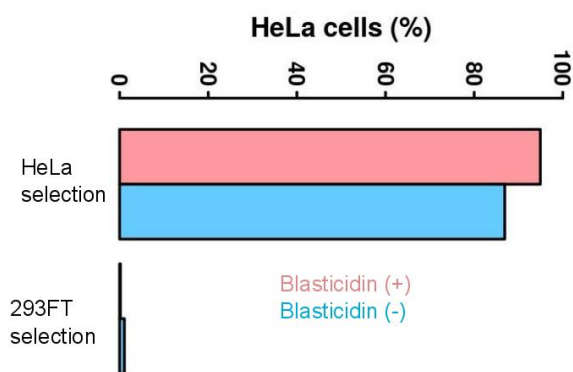
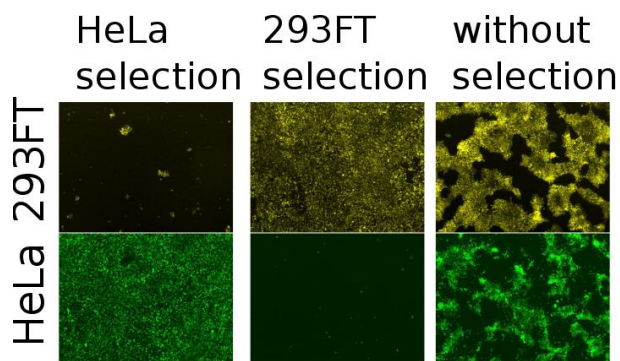


Fig. 4: 細胞死誘導遺伝子をコードした miR-21 応答 ON スイッチと OFF スイッチを用いた細胞選別。HeLa 細胞は hmAG1 を恒常発現しており、293FT 細胞は iRFP670 を恒常発現している。

と 293FT 細胞の共培養系に導入した場合、miR-21 の活性が高い HeLa 細胞で細胞死が誘導された。一方、ON と OFF のスイッチの組み合わせを逆にすると、293FT 細胞特異的に細胞死を起こすことが確認された (Fig. 4)。トランスフェクションする際に、blasticidin 耐性遺伝子をコードした mRNA を同時に導入し、blasticidin を加えることで、miRNA 応答スイッチが導入されていない細胞を除去した後、フローサイトメーターにより、HeLa 細胞の割合を定量した。その結果、共培養の状態から miRNA 応答スイッチをトランスフェクションすることで HeLa 細胞を 90% 以上になることが確認された。また、同様にスイッチの ON/OFF を逆にすることで、293FT 細胞のみを選択することができた。このことは、miRNA を指標としてフローサイトメーターを用いずに細胞を選別できることを示しており、今後、移植医療で大量に特定の細胞を調整する際に有用であると考えられる。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kawasaki, S., Fujita, Y., Nagaike, T., Tomita, K. & Saito, H., Synthetic mRNA devices that detect endogenous

proteins and distinguish mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **45** (12), e117 (2017).

2. Shibata, T., Fujita Y., *et al.*, Protein-driven RNA nanostructured devices that function in vitro and control mammalian cell fate. *Nat. Commun.* **8** (1), 540 (2017).

3. Tang, L., Fujita Y. *et al.*, Competition between translation initiation factor eIF5 and its mimic protein 5MP determines non-AUG initiation rate genome-wide. *Nucleic acids research* **45** (20), 11941-11953 (2017).

4. Hirotsawa, M., Fujita Y. *et al.*, Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch. *Nucleic Acids Res.* **45** (13), e118 (2017).

5. Karagiannis, P., Fujita, Y. & Saito, H., RNA-based gene circuits for cell regulation. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* **92** (9), 412-422 (2016).

[学会発表] (計 10 件)

1. Yoshihiko Fujita, Karin Hayashi, Hirohide Saito, Safe and versatile miRNA-responsive ON switch, THE 43rd NAITO CONFERENCE ON Noncoding RNA : Biology, Chemistry, & Diseases, 2017/6/27-2017/6/30, CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO, Japan

2. Yoshihiko Fujita, Hirohide Saito, Construction of Simple miRNA responsive ON switch, 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017/07/19-2017/07/21, 国際会議場 (富山県)

3. 藤田 祥彦, RNA 合成生物学からの再生医療へのアプローチ, 学長裁量経費プロジェクト「理工医薬 RNA アライアンス」主催 富山 RNA ワークショップ, 42807, 富山大学 杉谷

キャンパス 薬学部 研究棟 II(新棟) 7 階  
セミナー室 8

4. 藤田 祥彦, RNA/RNP による医療応用へ向けた DNA フリーな遺伝子回路, ConBio2017, 2017/12/6-2017/12/9, 神戸ポートアイランド

5. Yoshihiko Fujita, Karin Hayashi, Hirohide Saito, miRNA-responsive ON switch using non-canonical mRNA structure, ISBC2017, 2017/12/14-2017/12/16, Uji Campus, Kyoto University

6. Yoshihiko Fujita, Karin Hayashi, Hirohide Saito, Design of a miRNA-responsive ON switch, RNA 2016, 2016/6/28-2016/7/2, Kyoto International Conference Center

7. 藤田 祥彦, 齊藤博英, RNP ナノ構造の空間配置を利用したレセプターの信号制御, 2015年RNA学会, 2015/7/15-2015/7/17, ホテルライフオー ト札幌 北海道

8. 藤田 祥彦, 齊藤博英, 人工 RNA システムを利用した遺伝子操作と細胞運命制御, 日本進化学会, 2015/8/20-2015/8/20, 中央大学後楽園キャンパス

9. 藤田 祥彦, 齊藤博英, miRNA 応答 mRNA の設計と細胞の miRNA 活性プロファイルの作成, 分子ロボティクス研究会, 2016/2/20-2016/2/20, 京都大学物質-細胞統合システム拠点

10. 藤田 祥彦, 齊藤博英, iPS 細胞中で働くセンサー, 新学術領域「分子ロボティクス」第7回領域会議, 2016/3/14-2016/3/16, 愛知県蒲郡市

〔図書〕(計 1 件)

藤田 祥彦, 齊藤 博英. 翻訳制御の合成生物学. 学研メディカル秀潤社 ; 1982-, 2015. p. 783-789. ISBN: 8.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 巨核球細胞群における細胞の不均質性を識別する方法

発明者: 江藤浩之/齊藤博英/橋本一哉/藤田祥彦/林香倫/松浦理史/西河芳樹

権利者: 江藤浩之/齊藤博英/橋本一哉/藤田祥彦/林香倫/松浦理史/西河芳樹

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/033518

出願年月日: 2017/09/15

国内外の別: PCT

名称: miRNA 応答性マーカー遺伝子を有する mRNA ライブラリ作製法

発明者: 齊藤 博英/藤田 祥彦

権利者: 齊藤 博英/藤田 祥彦

種類: 特許

番号: 特願 2017-209406

出願年月日: 2017/10/30

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田祥彦 (Fujita Yoshihiko)

京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点助教

研究者番号: 60589266