

令和元年6月12日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21117

研究課題名(和文) RNPナノ構造体による細胞内分子の空間制御

研究課題名(英文) Spatial control of intracellular molecules by the RNA-protein nanostructure

研究代表者

大野 博久 (Ohno, Hirohisa)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：90612391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内においては、分子の空間的な制御がその機能発現に重要な役割を果たしている。そのような分子の分布や他分子との位置関係を規定するために生物がしばしば利用しているのが、分子足場である。本研究では、ヒト細胞内において任意の分子の空間配置を制御できる分子足場の構築を試みた。RNAとタンパク質からなる分子足場を使うことで、特定の機能性タンパク質の局在を制御することに成功し、それによって細胞運命を制御することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子足場を使うことで、細胞内分子の局在や集合、他分子との分子間相互作用を制御できることが示された。このような分子の空間配置制御を遺伝子発現の制御と組み合わせることで、より精密かつ多様な細胞内分子システムの制御が可能になると考えられる。細胞制御技術は、生命科学における有用な研究ツールとしての利用や医療分野への応用など、幅広い利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In cells, the spatial control of intracellular molecules plays important roles for their biological functions. The molecular scaffold is often used to define and control the intracellular distribution of the molecules and their spatial relationships. In this project, I aimed to build the artificial molecular scaffold for the spatial control of target molecules in human cultured cells. The molecular scaffold made from RNA and protein successfully regulated the localization of target functional proteins, and therefore controlled the cell-fate.

研究分野：合成生物学、核酸工学

キーワード：RNA RNA-タンパク質相互作用 分子足場 細胞運命制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

これまで、生物の機能・運命の人為的な制御は主に、転写や翻訳といった遺伝子発現の制御による、生体分子の発現やその量の制御を通じて行われてきた。しかし生物は、そのような生体分子の量的・時間的な制御だけでなく、細胞内分子の空間的・位置的な制御を通じた、それら分子の機能の精密な制御も行っている。例えば、複数の酵素が関与する代謝系において、しばしばそれらの酵素が集積することにより代謝反応を促進させている例が知られている。また、真核生物の MAP キナーゼカスケードにおいては、足場タンパク質上に関連キナーゼが順に配置されることで、シグナル伝達経路が正確かつ効率的に働いている。もし、これら天然のシステムのように任意の生体分子の細胞内空間配置を自在に制御できれば、シグナル伝達経路の改変による細胞運命の制御や代謝能の向上などが可能となり、生命科学研究や医療応用、物質生産などの幅広い分野において非常に有益であると考えられる。そのような分子の空間配置制御を実現する方法の一つとして、人工的な分子足場の利用が考えられる。実際に、天然の足場タンパク質を改変して利用した例も報告されているが、タンパク質は複雑な立体構造を持つ大きな分子であるため、新規なタンパク質分子の設計は非常に困難であり、タンパク質からなる分子足場は、一般的に利用されるには至っていない。

そこで研究代表者・大野は、RNA および RNA-タンパク質複合体 (RNP) を材料として分子足場を作製することを着想した。天然の RNA 分子には、タンパク質と同様に極めて複雑な立体構造を有するものが多くある。そのような複雑な立体構造は、一群の分子内・分子間相互作用からなり特有の構造パターンを示す、より小さな構造単位の集積と見做すことができる。したがって、それら構造単位 (RNA モチーフ) を人工的に組み合わせることによって、望みの形状を有する分子を構築できると考えられる。RNA の分子内・分子間相互作用を担う最も重要な要素は核酸塩基であるが、その種類はタンパク質を構成するアミノ酸の種類に比べると少なく、塩基間の相互作用パターンも精度よく予測できるため、RNA モチーフの組み合わせによる新規な形状を持つ分子の設計は、タンパク質の新規設計よりも容易であると考えられる。また、RNA とタンパク質からなる複合体において、それらの相互作用に必要な最小領域を、RNA-タンパク質相互作用モチーフ (RNPモチーフ) と捉えることも可能であり、そのような RNPモチーフを利用することで、RNA 分子中に様々なタンパク質を導入し、RNA のみでは作れない、複雑な立体構造を有する分子を作ることでもできると考えられる。実際に代表者は、世界に先駆けて部品としての RNAモチーフ・RNPモチーフに注目し、様々な RNA/RNP ナノスケール構造体 (ナノ構造体) の設計・作製に成功してきた。代表者はまた、作製した RNA/RNP ナノ構造体をタンパク質分子のための分子足場として用い、ヒト細胞表面の受容体間距離をナノメートルレベルで近接または遠隔させ、それによって細胞死シグナルの発生を制御することにも成功している。このことは、RNA/RNP ナノ構造体が標的分子を精密に配置できる足場となりうることを示している。しかし、ヒトをはじめとする真核細胞内での利用は未だ達成されていない。細菌における人工 RNA 分子足場の構築例は報告されているものの、より幅広く実用的な応用のためには、特にヒト細胞内において機能する分子足場の実現が望まれる。

そこで本研究では、ヒト細胞内において分子足場となりうる人工 RNA/RNP ナノ構造体を構築すること、およびそれを利用して細胞内タンパク質の空間配置を制御し、細胞の機能制御を行うことを目的とする。設計の容易な RNA および RNP ベースの構造体による、細胞内タンパク質の空間的・位置的な制御が実現できれば、転写や翻訳段階での制御と組み合わせ、より多層的、重層的な細胞機能の制御が可能になると考えられ、生命科学研究における新たな分子制御ツールとしてや医療分野への応用など、幅広い利用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト細胞内において人工 RNA/RNP ナノ構造体を構築し、それを分子足場として用いることで細胞内タンパク質の空間配置制御を行い、細胞の機能を制御することを目的とした。そのためにまず、RNA/RNP ナノ構造体を設計し、設計通りの構造を構築できることを試験管内で確認した。次に、その構造体または構造体をコードする遺伝子をヒト細胞に導入し、細胞内でナノ構造体を構築させることを目指した。細胞内でのナノ構造体の構築を確認した後、その構造体を分子足場として、細胞内タンパク質の空間的・位置的な制御を行い、それによる細胞の機能や運命の制御に挑戦した。また、多様な分子足場を設計するために、部品として利用可能な、新たな RNA/RNPモチーフの探索・拡充にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) RNA/RNP ナノ構造体による細胞内タンパク質の空間配置制御

まず、RNA 分子上に特定のタンパク質を選択的に集積できることを示すため、これまでに RNA/RNP ナノ構造体の構築に使われてきた RNPモチーフを利用し、標的タンパク質を集積させるための分子足場となる RNA ナノ構造体を作製した。多数の RNPモチーフを適切に配置した RNA-タンパク質複合体を設計し、その RNA 上に RNA 結合タンパク質が設計通りに結合することを、ゲルシフトアッセイおよび原子間力顕微鏡で確認した。その後、RNA 分子および RNPモチーフを形成する RNA 結合タンパク質と機能性タンパク質との融合タンパク質を発現するための mRNA を、リポフェクション法によりヒト細胞へと導入した。ナノ構造体の構築および機能性タンパク質の集積は、それによる細胞機能の変化 (細胞死) によって検出し

た。また、内在性タンパク質を検出して、分子足場としての機能を変化・発現させるシステムを構築するために、内在性タンパク質とそれが結合する RNA モチーフを利用し、上記と同様に分子足場 RNA を設計した。この RNA および内在性タンパク質をコードした mRNA を細胞に導入し、細胞内での足場としての機能を評価した。

(2) RNA/RNP モチーフの拡充

まず、立体構造が決定されている RNA/RNP 分子から特徴的な立体構造を有するものを選別した。そこから、文献情報と立体構造を基に、最小構造単位と推測される部分を抽出し、部品候補とした。それら部品候補を、形状や三次相互作用モチーフやリガンド依存的構造変化モチーフといった特性に基づき、多面体ワイヤフレーム構造体や多角形構造体のような観察しやすいと考えられる立体構造を形成するよう、コンピューター上で、適切な長さの RNA 二重鎖をリンカーとして三次元的に組み合わせて分子の三次元構造の設計を行った。分子中に組み込まれた RNA/RNP 構造モチーフの二次構造や三次構造が適切に保たれるよう、周辺領域の RNA 塩基配列の最適化を行い、RNA 分子の塩基配列を設計した。それらの RNA を試験管内転写反応で合成し、電気泳動や原子間力顕微鏡によって、設計通りの構造を形成しているかどうかを評価した。

4. 研究成果

(1) RNA/RNP ナノ構造体による細胞内タンパク質の空間配置制御

細胞内における分子配置パターンの変化による機能変化として、細胞死誘導タンパク質であるカスパーゼに注目した。ある種のカスパーゼは、集積させることで自己切断反応が起こり、細胞死シグナルを生じる。そこで、このカスパーゼ分子を RNA 結合タンパク質と融合させ、RNP 相互作用によって RNA 分子上に結合できるようにした。また、この融合タンパク質が結合できる、RNP モチーフを多数持つ分子足場 RNA を合成した。これらをヒト細胞に導入したところ、足場分子中の RNP モチーフの数に比例して細胞死が誘導されたことから、RNA 分子がカスパーゼの局在を制御する足場として、効果的に作用することが確認できた。

また、特定の細胞種で発現することが分かっている RNA 結合タンパク質 LIN28A を RNP モチーフとして使用した分子足場の系も作製した。LIN28A を発現していない細胞では、分子足場が効果的に LIN28A-カスパーゼ融合タンパク質を集積し、細胞死が引き起こされた。しかし、LIN28A を発現している細胞では、分子足場上の RNP モチーフに細胞内在性の LIN28A が結合し、LIN28A-カスパーゼ融合タンパク質の集積を阻害することで、細胞死が抑制された。

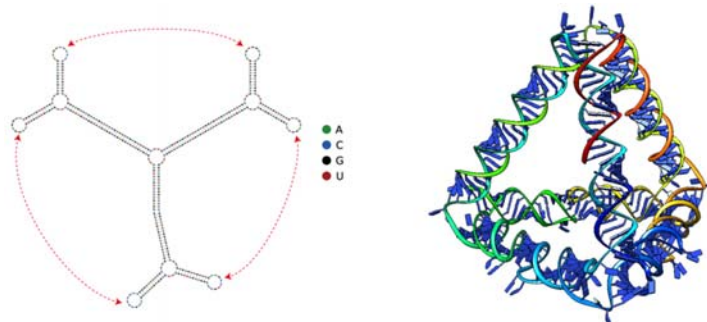
このように、RNA/RNP モチーフを部品として使用した分子足場によって、特定の分子の局在や相互作用を制御できることが示された。また、細胞内の特定のタンパク質の存在によって、機能が制御される分子足場の構築にも成功した。これらの成果から、細胞内状態を識別して特定の分子の空間配置を制御し、細胞の機能や運命を精密に制御できるようなツールの開発が期待される。

(2) RNA/RNP モチーフの拡充

今後、細胞内分子のより多様かつ精密な空間配置を実現するには、より複雑な形状の分子足場を作製できる必要がある。そのような複雑な形状を有する分子を設計・構築するためには、部品となる RNA/RNP モチーフの多様性の拡充が必要であると考え、下記のモチーフ探索に取り組んだ。

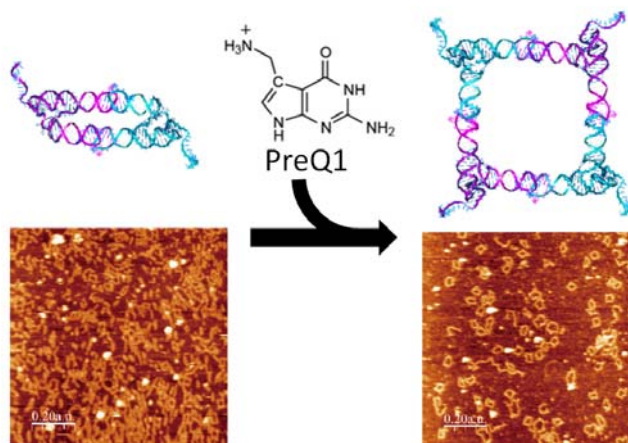
① RNA 三次相互作用モチーフ

巨大な天然の RNA/RNP 分子の多くは、塩基配列上離れた部位間での相互作用をつかさどる様々な三次相互作用モチーフを使用し、複雑な折り畳みパターンからなる極めて複雑な立体構造を形成している。そのような天然の RNA/RNP 分子の構築原理に倣い、より複雑な構造として三次元的な形状を持つナノ構造体の構築を試みた。三次相互作用モチーフの一つであるループ間相互作用モチーフ（下図左：赤破線）を使い、長鎖の一本鎖 RNA からなる正四面体構造体（下図右）を作製したところ、ゲルシフトアッセイおよび原子間力顕微鏡観察から、100%に近い極めて高い効率で設計通りの構造を形成できたことが示された。同様に、四角錐型の構造体も作製できたことから、ループ間相互作用モチーフが実用的な部品であることが確認できた。今後も、他の三次相互作用モチーフを使って様々な形状のナノ構造体の作製を行い、部品として利用しやすい三次相互作用モチーフのレパートリー、および作製可能なナノ構造体の形状のレパートリーの拡充に努める。



② リガンド特異的な構造変化を示す RNA モチーフ

特定の分子の結合によって構造変化を示すナノ構造体を作製できれば、環境中の特定のシグナルの存在に応じて、その構造および機能が変化する分子足場として利用できると考えられる。そのような構造変化を示す天然の RNA システムとして、メッセンジャー RNA 中に存在し、特定の分子との結合によって引き起こされる RNA の高次構造変化によって翻訳の制御を行う、リボスイッチが知られている。そこで、低分子に反応する各種リボスイッチを構造部品として利用し、ナノ構造体を設計した。それらは、リボスイッチから抽出した RNA 構造モチーフからなる頂点を一つ持つ RNA 分子が複数会合し、多角形状の複合体を形成する。ゲルシフトアッセイで確認したところ、PreQ1 分子に対するリボスイッチを使用した構造体において、PreQ1 非存在下では主に二量体が形成され、一方、PreQ1 存在下では四量体が主に形成されることが確認された(下図)。そこで、原子間力顕微鏡を用いて形状を観察したところ、それぞれ、小型の桿状および正方形形状の環状分子が見られ、PreQ1 の存在/非存在によって異なる構造を形成することが確認できた。PreQ1 に対するリボスイッチの他にも、リガンド分子の結合による構造変化が示唆されるモチーフが得られているため、今後それらについても解析を進め、ナノ構造体の構築に利用可能な、様々な分子に反応して構造変化を示す部品の探索・拡充を行う予定である。



③ pH 応答性 RNA モチーフ

感受する環境条件として、pH の変化によって構造が変化するモチーフの探索も行った。各核酸塩基の pKa の差異および、プロトン化した塩基による三重鎖形成特性を利用し、中性および酸性条件下で、異なる二次構造(塩基対形成パターン)を示す塩基配列を設計した。実際にそのような配列を持つ RNA 分子を合成したところ、中性条件(pH 7~8)下では形成しなかった三重鎖構造が、酸性条件(pH 3~4)下では形成され、異なる pH 条件下で異なる分子形状を示すことが確認できた。

以上のように、ナノ構造体の部品として利用可能な複数の RNA モチーフを見つけることができた。これらの新規な RNA モチーフを活用することで、より複雑な立体構造や環境条件に応答した構造変化を示すナノ構造体を構築できると考えられる。そのようなナノ構造体を分子足場として利用することで、生体分子の空間配置や相互作用のより精密な制御が実現できると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Hirohisa Ohno, Sae Akamine, Hirohide Saito, “**RNA nanostructures and scaffolds for biotechnology applications**”, *Current Opinion in Biotechnology*, **58**, 53-61, 2018, doi: 10.1016/j.copbio.2018.11.006, 査読有
- ② Tomonori Shibata, Yoshihiko Fujita, Hirohisa Ohno, Yuki Suzuki, Karin Hayashi, Kaoru R. Komatsu, Shunsuke Kawasaki, Kumi Hidaka, Shin Yonehara, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo, Hirohide Saito, “**Protein-driven RNA nanostructured devices that function in vitro and control mammalian cell fate**”, *Nature Communications*, **8**, 540, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00459-x, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Hirohide Saito, Hirohisa Ohno, “Design of artificial RNA nanostructures using natural RNA structural motifs”, 2019 RNA Nanotechnology Conference (Gordon Research Conference), 2019年

- ② 大野博久, 宮里智博, 齊藤博英, “天然の RNA 構造モチーフを利用した人工 RNA ナノ構造体の設計”, 第 41 回日本分子生物学会年, 2018 年
- ③ 大野博久, 宮里智博, 齊藤博英, “RNA 構造モチーフを利用した新規ナノ構造体の設計と構築”, 「細胞を作る」研究会 11.0, 2018 年
- ④ 大野博久, 宮里智博, 齊藤博英, “リガンドに応答して構造変化を示す RNA ナノ構造体の設計・構築”, 「細胞を作る」研究会 10.0, 2017 年
- ⑤ Hirohide Saito, Hirohisa Ohno, “Synthetic RNA-protein nanostructured devices that function in vitro and in cells”, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017 年

[図書] (計 1 件)

- ① 大野博久, 齊藤博英, “3.4 RNA ナノテクノロジーの動向” および “6.1 RNA/RNP による細胞運命の制御”, 「分子ロボティクス概論 ～分子のデザインでシステムをつくる」(分子ロボティクス研究会 著, 村田智 編集), CBI 学会出版, 2019 年, ISBN-13: 978-4990907648

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

- ① アウトリーチ活動
 - ・齊藤博英, 大野博久, 中西秀之, 川崎俊輔, 弘澤萌, 赤峰冨, 小野紘貴, 山縣茉莉, “RNA ～生命をコントロールする分子～”, 京都大学アカデミックデイ 2018, 2018 年
 - ・齊藤博英, 大野博久, 中西秀之, 余越萌, 川崎俊輔, 弘澤萌, 松浦理史, 赤峰冨, “世界を変える RNA テクノロジー”, 京都大学アカデミックデイ 2017, 2017 年
 - ・齊藤博英, 大野博久, 川崎俊輔, 弘澤萌, 長島瑠子, “RNA ～細胞の運命を自在に操る～”, 京都大学アカデミックデイ 2016, 2016 年

6. 研究組織

(1) 連携研究者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：齊藤 博英

ローマ字氏名：SAITO, Hirohide

研究協力者氏名：遠藤 政幸

ローマ字氏名：ENDO, Masayuki

研究協力者氏名：望月 めぐみ

ローマ字氏名：Mochizuki, Megumi

研究協力者氏名：宮里 智博

ローマ字氏名：MIYAZATO, Tomohiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。