

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23651203

研究課題名（和文）自己複製能をもつRNA酵素を基盤とした人工生命体モデルの創出

研究課題名（英文）

Synthetic approaches to investigate artificial living systems by RNA self-replicating ribozymes

研究代表者

齊藤 博英 (SAITO HIROHIDE)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：20423014

研究成果の概要（和文）：

生命の起源において、核酸などの化学物質から、進化する生命システムがいかにして誕生したのかという問題の解決は、生命科学が目指す大きな目標の一つである。天然に触媒分子として働く RNA が発見されて以来、遺伝子と代謝(触媒)機能の両者を兼ね備える生体分子として、RNA は生命の起源研究において注目されている。特に、RNA 同士の連結反応を触媒するリガーゼリボザイムの存在が生命初期の進化に非常に重要であると考えられている。本研究では、人工 RNA システムを基盤として、自己複製反応を触媒する人工酵素をデザインし、人工細胞モデルシステムを創出することを目指した。具体的には人工リガーゼリボザイムを用い、RNA 自己増幅系のモデルを新たに設計・構築することにより、新観点から RNA ワールド 仮説の実験的検証をおこなった。この知見を基に、RNA 構造モチーフを利用した新規 RNA 自己複製システムモデルを設計・構築した。さらに設計した RNA 分子から構成される μm サイズのコンパートメント（小胞）の構築を試み、RNA のみからなる機能性構造体の創出に向けて前進した。

研究成果の概要（英文）：

One of the main goals in science is to solve the problem of origin of life: How evolvable living systems have emerged from chemical molecules such as nucleic acids? RNA can function both as an informational molecule and as a catalyst in living organisms. This duality is the premise of the RNA world hypothesis in the origin of life theory. Specially, it is believed that RNA ribozyme that facilitates self-replicating reaction is one of the most essential molecules in primitive life. To verify whether RNA has the potential for self-replication, we constructed a new RNA self-assembling ribozyme that could have conducted an evolvable RNA self-replication reaction. The artificially designed, in vitro selected ligase ribozyme was employed as a prototype for a self-assembling ribozyme. We propose that our system implies the significance of RNA tertiary motifs in the early RNA molecular evolution of the RNA world. Furthermore, we designed the synthetic RNA sequence for making higher-order membrane like structure. Giant membrane structure might be observed by using fluorescence microscopy. Their forming condition should be investigated and the result should be reported as a research article. These results may provide a possible RNA world in which both replicator and the compartment could be made by RNA. This concept might provide an alternative way to investigate the problem of the origin of life.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：システムゲノム科学
科研費の分科・細目：合成生物学
キーワード：RNA、人工細胞モデル、生命の起源

1. 研究開始当初の背景

(1) 生命の起源において、核酸や蛋白質などの化学物質から、進化する生命システム（原始細胞）がいかんして誕生したのかという問題の解決は、生命科学が目指す大きな目標の一つである。

本研究では、我々が独自に開発した、自己複製する能力をもつ人工 RNA 酵素（リボザイム）を基盤として、これまでにない新しい人工細胞モデルシステムを創出することを旨とする。

(2) 近年、生体分子やネットワークを「人工的に創る」作業を通して生命システムの理解を目指す「シンセティック・バイオロジー」が発展しつつある。本分野の大きな目標の一つとして、「人工細胞の創成」が挙げられる。たとえば、最近 Ventor らのチームは、化学合成した DNA をバクテリアの「殻」に導入することで、複製能をもつ「人工細胞」の合成に成功したと報告した(Science, 328, 958, 2010)。しかしながら、この場合、自己複製能、代謝、膜は、バクテリアの殻(宿主 DNA を取り除いたもの)の側に付随するもので、これは事実上大規模な形質転換であり、細胞の「膜」とそれに付随する内包系そのものを包括した人工細胞の創成には至っていない。

代表者(齊藤)は、RNA 工学を専門とし、これまでの研究から人工 RNA(酵素)の分子デザインに実績がある。また分担者(野村)は、脂質小胞(リボソーム)の専門家であり、化学反応系を内包した人工細胞モデルの構築に成功している。したがって、両者の技術を融合することで、全く新しい人工 RNA 生命体モデルが構築できる可能性を検証した。

2. 研究の目的

本研究では、人工 RNA 酵素を用い、RNA 自己増幅系のモデルを新たに設計・構築することにより、新しい観点から RNA ワールド 仮説を含む生命起源モデルの実験的検証をおこなう。

具体的には、RNA 構造モチーフを利用し、RNA 間のリガーゼ反応を基本とした新規 RNA 自己複製システムモデルを設計する。さらに、RNA の高次構造形成能と自己集合特性に着目し、RNA のみからなる小胞の構築可能性について検証を行った。

3. 研究の方法

RNA 分子デザインに基づく複数分子からなる人工リガーゼリボザイムの設計をおこなった。また同じ RNA モチーフを元に、コンパートメント(=小胞)を形成しうる新規な RNA 分子をデザインし、その物性を評価した。具体的には、RNA 分子の自己集合体を核酸染色色素と蛍光顕微鏡、または原子間力顕微鏡を用いて形状および形成条件の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 当初研究計画に記載した、自身の配列を連結する人工 RNA 酵素による RNA 自己増幅系のモデルを新たに設計・構築することに成功した。この RNA 酵素は、二つの RNA フラグメントからなり、別の二種の RNA の連結反応を触媒し、RNA 自己複製系ネットワークの構成因子として機能する可能性があることがわかった。

本研究を通じて、RNA 三次元構造モチーフが RNA ワールドの進化に重要な役割を果たす新たな生命進化モデルを提唱した。

(2) さらに、RNA のみからなるコンパートメントの構築を目指した。前出の RNA 酵素の構造に基づき、RNA 同士の相互作用により末端のない自己集合構造を示す配列をデザインした。これを水中で分散させ混合することによって、数 μm 以上の直径を示す球状の構造や、数 μm^2 以上の平面構造が確認されている。

最近、RNA のみで数 nm 直径の微小球を構築したり、RNA を脂質二分子膜表面に付着させマイクロカプセルとする例が報告されており、RNA ナノテクノロジーとも呼ぶべき分野が勃興しつつある。情報分子である RNA が酵素活性を示すのみならずビルディングブロックとして機能することは、機能性分子のバリエーション拡大のみならず、生命の起源における RNA ワールド仮説の拡張に繋がる。

本研究の進展は、遺伝情報の複製と膜構造の複製という生命モデルにとって本質的に重要な二つのイベントが同一種の分子により実現されうる証拠を示しうる。その証拠を収集し、論文発表に向けて引き続き研究を進めている。

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 7 件)

Shunnichi Kashida, *Tan Inoue, and *Hirohide Saito "Three-dimensionally designed protein-responsive RNA devices for cell signaling regulation"
Nucleic Acids Research, 40(18):9369-9378
(Selected as Featured Articles represent the top 5% of papers)、査読有

James A. Stapleton, Kei Endo, Yoshihiko Fujita, Karin Hayashi, Masahiro Takinoue, *Hirohide Saito, and Tan Inoue Feedback Control of Protein Expression in Mammalian Cells by Tunable Synthetic Translational Inhibition
ACS Synthetic Biology, 1(3): 83-88
査読有

*Hirohide Saito, Yoshihiko Fujita, Shunnichi Kashida, Karin Hayashi, and *Tan Inoue Synthetic human cell fate regulation by protein-driven RNA switches
Nature Communications, 2, 160
査読有

Hirohisa Ohno, Tetsuhiro Kobayashi, Rinko Kabata, Kei Endo, Takuma Iwasa, Shige Yoshimura, Kunio Takeyasu, *Tan Inoue, and *Hirohide Saito Synthetic RNA-protein complex shaped like an equilateral triangle
Nature Nanotechnology, 6(2): 116-120
査読有

Rei Ohmori, Hirohide Saito, Yochiya Ikawa, Yoshihiko Fujita, Tan Inoue "Self-Replication Reactions Dependent on Tertiary Interaction Motifs in an RNA Ligase Ribozyme."
J Mol Evol. 2011 Nov 12.
査読有

Kei Fujiwara, Shin-ichiro M. Nomura "Condensation of an Additive-Free Cell Extract to Mimic the Conditions of Live Cells." PLoS ONE 8(1) e54155, 2013 Jan 15.
査読有

Takuma Ohtsuka, Satoshi Neki, Tamotsu Kanai, Kazunari Akiyoshi, Shin-ichiro M. Nomura, Takashi Ohtsuki "Synthesis and in situ insertion of a site-specific fluorescently labeled membrane protein into cell-sized liposomes", Analytical Biochemistry, 418, 97-101, 2011 Nov 1.
査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 齊藤博英、大野博久、井上丹
分子ロボティクスにおける RNA-タンパク質複合体の可能性
第 84 回日本生化学会大会
2011 年 9 月 21 日 京都

② 齊藤 博英
RNA-たんぱく質複合体を用いたナノバイオエンジニアリング
精密工学会 超精密加工専門委員会 第 65 回研究会
2013 年 1 月 29 日 大阪

③ Shin-ichiro M. NOMURA, Yusuke SATO, Kei FUJIWARA, Shogo HAMADA, Satoshi MURATA
Molecular robotics for artificial cell-model construction
AROB18(18th Int. Sympo. on Artificial Life and Robotics)
2013 年 1 月 30 日 韓国 Daejeon

[図書] (計 1 件)

Hirohisa Ohno, Eriko Osada, Tan Inoue, and *Hirohide Saito
Synthetic RNA-Protein Nanostructures and Their Potential Applications
Review: RNA Nanotechnology and Therapeutics, (ed. Guo, P., CRC press), in press

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/saito/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 博英 (SAITO HIROHIDE)
京都大学・白眉センター・准教授
研究者番号：20423014

(2) 研究分担者

野村慎一郎 (NOMURA SHIN-ICHIRO)
東北大学・工学（系）研究科（研究員院）
・准教授
研究者番号：50372446