

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681042

研究課題名(和文) シンセティックバイオロジーを活用した細胞機能制御技術の開発

研究課題名(英文) Controlling cell function by synthetic biology approaches

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円、(間接経費) 6,240,000円

研究成果の概要(和文)：個々の細胞内の状態に応じて、目的の遺伝子の発現を操作する技術の開発は、生命科学分野の進展のための重要なツールとなりえる。本研究では生体内で多彩な機能を担うRNAを人工的にデザインすることで、哺乳類細胞内状態に応じて遺伝子発現を制御できる新技術を開発することを目指した。その結果細胞内で発現する特定のタンパク質に反応して、目的とする遺伝子の発現をON/OFF制御することができる「RNAスイッチ」技術の開発と拡張に成功した(Nucleic Acids Res.40:9369,2012,Nucleic Acids Res.41:e135,2013,Nature Commun.4:2393,2013)。

研究成果の概要(英文)：It is important to develop a method that controls gene expression dependent on intracellular environment. In synthetic biology field, researchers aim to understand life and develop new biotechnologies through the process of designing and constructing biomolecules and biological systems. However, designing functional biomolecules and systems to control cell function has remained a challenge. In this study, we designed synthetic "RNA switches" that detect specific proteins expressed in cells and control expression of target genes. As a result, we generated several RNA switches that function in mammalian cells (Nucleic Acids Res. 40:9369, 2012, Nucleic Acids Res. 41:e135, 2013, Nature Commun. 4:2393,2013).

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：合成生物学 RNA 翻訳 RNP バイオエンジニアリング

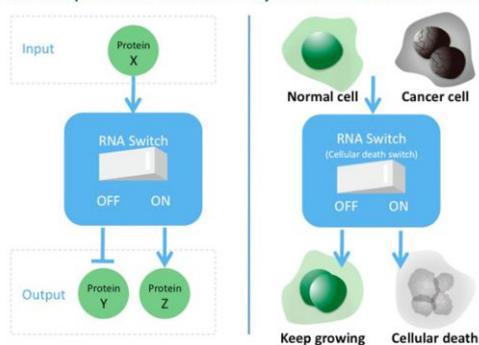
1. 研究開始当初の背景

生体分子を天然から抽出、または人工的にデザインし、それらをモジュラー・ユニットとして組み合わせ、細胞機能を自在に制御する人工生体分子・システムを創成することは、シンセティック・バイオロジー（合成生物学）分野の研究目標の一つである。しかしながら、機能性分子のデザイン研究は、端緒に終わったばかりであり、設計された分子やシステムが目的の挙動を示さない場合が多い。また、システム制御のための分子材料として利用できる生体分子も、DNA や転写因子等のタンパク質に依存している。従って、機能性分子のデザインや、生命システム構築のための新しい戦略・技術の開発が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、生体内で多彩な機能を担う「RNA および RNA-タンパク質複合体 (RNP)」の相互作用を制御することで、細胞内の状態に応じた遺伝子操作技術を開発することを目指した。具体的には、以下2つの課題を達成することを目的とした。(1) RNP 相互作用に基づいた新しい遺伝子発現制御システム (RNA スイッチ)の確立、(2) RNP スイッチを活用した細胞運命制御システムの構築。以上2つの研究目的を達成することで、特定の細胞で発現するタンパク質に反応して、その細胞機能・運命を自在にコントロールできる新技術を開発することを目的とした。

Conceptual Scheme of synthetic RNA switches



RNA スイッチによる細胞運命制御の概念図

3. 研究の方法

これまでの研究で我々のグループは、細胞内で発現する特定のタンパク質に反応して、目的遺伝子の翻訳を抑制する「RNA-OFF スイッチ」の開発に成功していた。しかしながら、遺伝子発現を自在に制御するシステムを構築するためには、特定のタンパク質の発現に反応して、目的遺伝子の発現を活性化する「ON スイッチ」も必要となる。本計画では、以下二つの方法により、RNP 相互作用を活用した

細胞運命制御システムを開発することを目指した。初めに、(1) RNP 相互作用を基盤とした、人工翻訳 ON スイッチを構築する。ON スイッチ作成のため、特定のタンパク質に結合し、目的遺伝子の翻訳を活性化する人工 RNA を分子デザインにより作成する。次に、(2) RNP-ON/OFF スイッチを活用した遺伝子操作、細胞運命制御システムを構築する。

4. 研究成果

(1) 3次元分子デザインによる人工ショートヘアピン RNA (shRNA)ON スイッチの構築

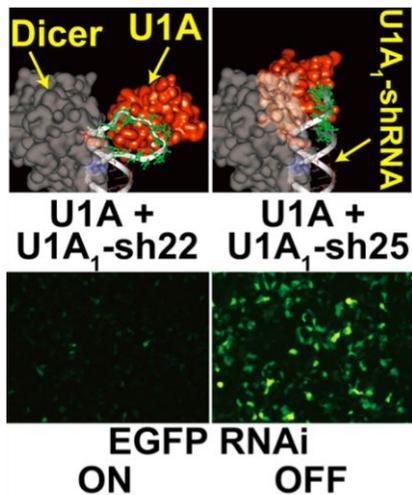
(概要)

本研究では、3D 分子モデルを用いた RNA-タンパク質相互作用の分子設計により、細胞内の状態に応じて RNA 干渉 (RNAi) の効果を制御できる「RNA スイッチ」を開発することに成功した (Nature Commun., 2011, Nucleic Acids Res., 2012)。

(具体的成果)

shRNA は Dicer (RNA 切断酵素) によって切断されることで標的の遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉 (RNAi) という現象を起こす。そのため、Dicer による切断部位に特定のタンパク質が邪魔する形で結合すると、RNA 干渉を防ぐことが予想できる。本研究では、まず 3D 分子モデルソフトを用いてこの shRNA スイッチと Dicer の立体構造および、切断時の位置関係をコンピュータ上で再現することを試み、shRNA の二重鎖部位の長さを変更することで、Dicer の切断部位に結合するタンパク質が Dicer と衝突する方向に近接するように、その位置を調節することができる可能性を見出した。

実際に、U1A (ヒト細胞中に存在するタンパク質) が結合することによって、Dicer による切断を阻害するような shRNA スイッチを細胞内に導入したところ、細胞内で U1A の生産に反応して RNAi の働きを、抑制することがわかった (図)。さらに、3D 分子デザイン法の汎用性を確かめるため、種々のがん細胞で発現している転写因子 (NF- κ B) に結合する RNA 配列を shRNA に組み込んだところ、期待通り細胞内でのこの転写因子の発現に応じて RNAi の効果を抑制することがわかった。したがって、3D 分子モデルを用いた RNA-タンパク質相互作用の分子設計を利用し、ヒト培養細胞内の特定のタンパク質の有無に応じて RNA 干渉 (RNAi) の効果を制御できる「RNA スイッチ」を開発することに成功した。このデザイン法により、特定のタンパク質に反応する RNA スイッチの細胞内での機能の予測、最適化が期待できる。



shRNA スイッチの分子設計と機能評価
Dicerの働きを阻害しないと予想された shRNA (左上) では、EGFP (蛍光蛋白質) に対する RNAi が抑制されず、EGFP (緑) の発現がみられなかった (左下)。Dicer による切断を阻害すると予想された shRNA (右上) では、RNAi が抑制されて、EGFP が発現した (右下)。

(2) OFF スイッチを ON スイッチに変換可能な「RNA インバータ」の設計と構築

(概要)

これまでに、細胞内の状態に応じて、mRNA からの翻訳を抑制する RNA スイッチ (OFF スイッチ) の作成に成功していたが、翻訳を活性化するスイッチ (ON スイッチ) の作成が望まれていた。今回開発した RNA インバータは、RNA スイッチの機能を OFF から ON へ、その特徴を維持したまま自在に変換することを可能とする (Nature Commun.2013)。

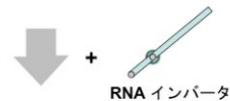
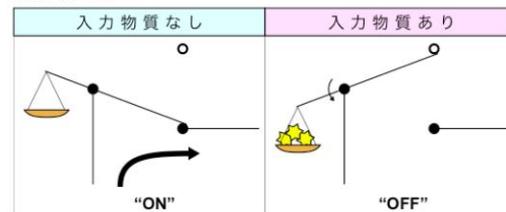
(具体的成果)

本研究で我々は、簡便に RNA スイッチの性能を調節・反転する手法を開発し、それを実現する人工 RNA からなる部品を「RNA インバータ」と名づけた。開発した RNA インバータは、RNA スイッチの機能を OFF から ON へ、その特徴を維持したまま自在に変換することができる。

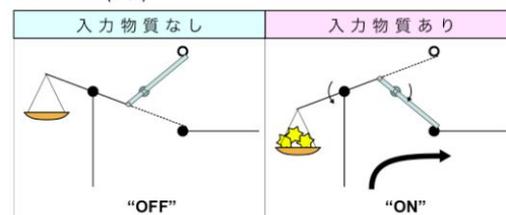
この RNA インバータを挿入した人工 mRNA は、細胞内で標的となる因子が発現していない場合、速やかに分解される。ここで標的因子が発現すると、人工 mRNA は標的に結合し (検出)、その発現量に応じて mRNA が安定化され (判断)、目的とする外来遺伝子の翻訳を活性化する (実行)。たとえば今回の成果の応用例として、がん細胞に特有の物質 (例: がんマーカー因子など) が「ある」と、その細胞が死滅する遺伝子 (例: 細胞死誘導遺伝子) を発現するスイッチの構築が考えられる。実

際今回の研究でも、RNA スイッチがコードする遺伝子を細胞死誘導タンパク質にすることで、標的因子が発現した特定の細胞に対して選択的に細胞死を誘導できることが確認できた。また、これまでの技術では、一つの因子で複数の遺伝子の発現を同時、かつ独立に制御することは困難だったが、今回の方法では、mRNA 1 分子内の改変で、スイッチの性能を調整したり、機能を反転させたりすることが可能となった。したがって、1 つの制御因子が複数の外来遺伝子の発現のオン・オフを個別かつ同時に制御することが実現できる。

OFF スイッチ



ON スイッチ (反転)



RNA インバータスイッチの概念図

(3) RNA-ON/OFF スイッチによる細胞運命制御システムの開発

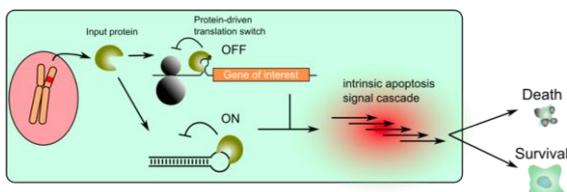
(概要)

本研究では、これまでに開発した RNA スイッチを活用して、標的細胞の運命を制御できるシステムを開発することを試みた。標的細胞が特定のタンパク質を発現すると、その発現量に応じて細胞死を制御できる仕組みを構築した (Nature Commun.2011)。

(具体的成果)

本研究では、特定のがん細胞などで発現するたんぱく質に応じて、その細胞特異的に目的とするたんぱく質 (アポトーシス誘導タンパク質など) の合成を制御できる、RNA スイッチシステムを創製した。これまでに開発した 2 つの RNA スイッチを細胞内に内在するアポトーシスネットワークに連結し、RNA スイッチによる細胞の生死を制御するシステムの開発に取り組んだ。その結果、特定のタンパク質を発現している細胞のみを死に至らしめられる、高度な細胞生死のコントロール技

術の創出に成功した。さらに、この2つのRNAスイッチは細胞内で独立に作動することが確認され、同じ特定タンパク質の発現にตอบสนองして、異なる2つのタンパク質の抑制・活性化を同時に制御できることも明らかとなった。この成果は、ヒトの細胞内で、入力たんぱく質Aの情報（発現）を出力たんぱく質Bの情報（抑制・活性化）に直接変換できる「人工情報変換システム」を構築した初めての例であり、今後、多種のRNAスイッチを同時に適用することで幅広い細胞制御が可能となることが期待される。このような細胞内状態に応じて遺伝子発現を制御する技術は、シンセティックバイオロジー（合成生物学）や次世代バイオテクノロジーの新技术としての活用が期待できる。



RNA-タンパク質複合体を利用した細胞運命制御システムの構築

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16件）

(1)Hirohide Saito, RNA-protein nanotechnology & synthetic biology, *Seikagaku*, 査読有, 86(1), 2014, 81-85

(2)Shunnichi Kashida, *Hirohide Saito, A three-dimensional design strategy for a protein-responsive shRNA switch., *Methods Mol Biol.*, 査読有, 1111, 2014, 269-286, doi: 10.1007/978-1-62703-755-6_20.

(3)Kei Endo, *Hirohide Saito, Engineering protein-responsive mRNA switch in mammalian cells., *Methods Mol Biol.*, 査読有, 1111, 2014, 183-196. doi: 10.1007/978-1-62703-755-6_13.

(4)Kei Endo, Karin Hayashi, *Tan Inoue, and *Hirohide Saito, A versatile cis-acting inverter module for synthetic translational switches, *Nature Communications*, 査読有, 4, 2013, 2393, DOI: 10.1038/ncomms3393

(5) Kei Endo, James A. Stapleton, Karin Hayashi, *Hirohide Saito, and *Tan Inoue, Quantitative and simultaneous translational control of distinct mammalian mRNAs *Nucleic Acid Res.*, 査読有, 41(13), 2013, e135. doi:10.1093/nar/gkt347.

(6)Hirohisa Ohno, Eriko Osada, Tan Inoue, and *Hirohide Saito, Synthetic RNA-Protein Nanostructures and Their Potential Applications, *RNA Nanotechnology and Therapeutics, RNA Nanotechnology and Therapeutics*, 査読有, 2013, 1, 303-312, doi:10.1201/B15152-22

(7)齊藤博英「実験進化・人工システム構築からみえてくるRNA/RNPの新機能」*実験医学*, 査読有, 31(7), 2013, 61-67

(8)遠藤慧、齊藤博英「複数の哺乳類mRNAの同時かつ特異的な翻訳チューニング法」*実験医学*, 査読有, 32(4), 2013, 595-599

(9)齊藤博英「人工RNAを用いたナノバイオエンジニアリング」*超精密 (ULTRA PRECISION)*, 査読有, 19, 2013, 38-43

(10)Tomoaki Hara, *Hirohide Saito, and *Tan Inoue, Directed evolution of a synthetic RNA-protein module to create a new translational switch. *Chem Commun (Camb)*, 査読有, 49(37), 2013 May 10, 3833-3835, doi: 10.1039/c3cc38688k.

(11)Shunnichi Kashida, *Tan Inoue, and *Hirohide Saito, Three-dimensionally designed protein-responsive RNA devices for cell signaling regulation., *Nucleic Acids Res.*, 査読有, 40(18), 2012 Oct, 9369-9378, doi: 10.1093/nar/gks668.

(12)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 Synth Biol.*, 査読有, 1(3), 2012 Mar 16, 83-88, doi: 10.1021/sb200005w.

(13)*Hirohide Saito, Yoshihiko Fujita, Shunnichi Kashida, Karin Hayashi, Takayuki Katoh and *Tan Inoue, Synthetic human cell fate regulation by protein-driven RNA switches, *Nature Communications*, 査読有, 2, 2011, 160

(14)Hirohisa Ohno, Tetsuhiro Kobayashi, Rinko Kabata, Kei Endo, Takuma Iwasa, Shige Yoshimura, Kunio T93akeyasu, *Tan Inoue, and *Hirohide Saito, Synthetic RNA-protein complex shaped like an equilateral triangle, *Nat Nanotechnol.*, 査読有, 6(2), 2011 Feb, 116-120. doi: 10.1038/nano.2010.268.

(15)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.*, 査読有, 73(3-4), 2011 Oct, 221-229, doi: 10.1007/s00239-011-9471-2.

(16)Sergii Rudiuk, Hirohide Saito, Tomoaki Hara, Tan Inoue, Kenichi Yoshikawa, Damein Baigl Light-Regulated mRNA Condensation by a Photosensitive Surfactant Works as a Series Photoswitch of Translation Activity in the Presence of Small RNAs., *Biomacromolecules.*, 査読有, 12(11), 2011 Nov 14, 3945-51, doi: 10.1021/bm200962s.

〔学会発表〕(計 27 件)

(1)遠藤慧、齊藤博英「mRNA のエンジニアリングに基づく動物細胞の遺伝子発現制御系 (招待講演)」日本農芸化学会 2014 大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学(神奈川県川崎市)

(2)齊藤博英「人工 RNA スイッチによる遺伝子操作と細胞運命制御 (招待講演)」日本薬学会第 134 年会シンポジウム、2014 年 3 月 30 日、熊本大学(熊本県熊本市)

(3)齊藤博英「人工 RNA スイッチによる遺伝子操作と細胞運命制御 (招待講演)」バイオインダストリー協会合成生物学セミナー、鉄鋼会館、2014 年 1 月 27 日鉄鋼会館(東京都中央区)

(4)齊藤博英「RNA-protein シンセティックバイオロジー・ナノテクノロジー (招待講演)」JAIST 研究科セミナー、2014 年 1 月 24 日、北陸先端科学技術大学院大学(石川県能美市)

(5)Callum Parr, 齊藤博英「Engineering RNA binding proteins to study RNA trafficking and localization」第 7 回武田科学振興財団薬科学シンポジウム、2014 年 1 月 16 日、武田薬品研修所(大阪府吹田市)

(6)樫田俊一、齊藤博英「RNP Microarray: A large scale screening system of RNP interaction motifs」第 7 回武田科学振興財団薬科学シンポジウム、2014 年 1 月 16 日、武田薬品研修所(大阪府吹田市)

(7)遠藤慧、齊藤博英「High-resolution identification of cell types by microRNA - responsive mRNAs」第 7 回武田科学振興財団薬科学シンポジウム、2014 年 1 月 16 日、武田薬品研修所(大阪府吹田市)

(8)齊藤博英「RNA スイッチ: ナノ構造と人工回路設計の共通原理 (招待講演)」第 16 回生命化学研究会、2014 年 1 月 9 日、KKR ホテル熱海(静岡県熱海市)

(9)齊藤博英「人工 RNA を用いた細胞運命制御」定量生物学の会 第 6 回年会、2013 年 11 月 22 日、大阪大学(大阪府吹田市)

(10)齊藤博英「人工 RNA による情報と構造変換: RNA 分子ロボティクスに向けて (招待講演)」細胞を創る研究会 6.0、2013 年 11 月 14 日、鶴岡市先端研究産業支援センター(山形県鶴岡市)

(11)齊藤博英「人工 RNA-Protein 複合体による細胞内外で機能する分子ロボットの創出にむけて」第 51 回 日本生物物理学会、2013 年 10 月 28 日、京都国際会館(京都府京都市)

(12)齊藤博英「RNA-protein-based nanostructures and translation switches」DNA19, September 23rd 2013, Arizona State University (Arizona, USA)

(13)長田江里子, 鈴木勇輝, 日高久美, 杉山弘, 遠藤政幸, 齊藤博英「RNP ナノ構造体を活用した RNA 動的構造変換過程の直接観察および細胞機能制御技術の開発」第 15 回 日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 24 日、愛媛県立文化会館(愛媛県松山市)

(14)遠藤慧、井上丹、齊藤博英「mRNA エンジニアリングによる外来遺伝子の発現制御」第 15 回 日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 24 日、愛媛県立文化会館(愛媛県松山市)

(15)齊藤博英「RNA 分子・システムを活用した細胞機能の制御 (招待講演)」第 15 回 日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 25 日、愛媛県立文化会館(愛媛県松山市)

(16)Hirohide SAITO “Synthetic RNP-based nanostructures and translational ON/OFF switches” FNANO 13 meeting(invited), April 17th 2013, The Snowbird Cliff Lodge(Snowbird, UT, USA)

(17) Hirohide SAITO “Synthetic RNP-based nanostructures and translational switches: Possible therapeutic applications” 2013 International Conference of RNA Nanotechnology and Therapeutics, April 2nd - April 6th 2013, Crown Plaza-The Campbell House(Lexington, KY, USA)

(18)齊藤博英「Synthetic RNA-protein complexes to control mammalian cell fate」The First Annual Winter q-bio Meeting 2013, February 18th -23rd 2013, Hilton Hawaiian Village The First Annual Winter q-bio Meeting 2013 (Waikiki, USA)

(19)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(招待講演)、2013年01月29日、メルパルク大阪(大阪府)

(20)齊藤博英「第10回日本分子生物学会三菱化学奨励賞受賞講演」第35回日本分子生物学会年会(招待講演)、2012年12月13日、福岡国際会議場(福岡県)

(21)齊藤博英「Synthetic RNA-Protein Complexes for Controlling Cell Signaling」生体機能関連部会国際シンポジウム(招待講演)、2012年11月29日、東京工業大学蔵前会館(東京都)

(22)齊藤博英「人工RNAスイッチによる自律的な細胞運命制御システムの構築に向けて」定量生物学の会 第5回年会(招待講演)、2012年11月23日、東京大学(東京都)

(23)齊藤博英「細胞内シグナル回路をデザインするRNAテクノロジー」第5回北陸合同バイオ若手シンポジウム(招待講演)、2012年11月02日、福井県民ホール(福井県)

(24)齊藤博英「分子ロボティクスにおける感覚機能の実装にむけて」生命医薬情報学連合大会、2012年10月15日、タワーホール船堀(東京都)

(25)齊藤博英、遠藤慧「人工RNAシステムを活用した遺伝子操作・細胞運命制御技術体系の創出」第14回日本RNA学会年会、2012年07月19日、東北大学百周年記念会館 川内萩ホール(宮城県)

(26)齊藤博英「Synthetic RNA-protein technologies for controlling translation in mammalian cells」第12回日本蛋白質科学会年会、2012年06月21日、名古屋国際会議場(愛知県)

(27)齊藤博英「人工RNAを用いる新しい遺伝子操作技術」ヒト多機能性幹細胞の培養・解析の標準化レクチャーシリーズ第6回 幹細胞の遺伝子操作の実践(招待講演)、2012/2/2、理化学研究所 神戸研究所 発生・再生科学総合研究センター(神戸市)

〔図書〕(計1件)

著者名：齊藤博英、他57名
出版社：エヌ・ティー・エス

書名：進化分子工学～高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発～

発行年数：2013年

総ページ数：466(243-252)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：miRNAの発現を指標として所望の細胞腫を判別する方法

発明者：齊藤博英、遠藤慧

権利者：京都大学

種類：特許

番号：特願2014-003726

出願年月日：2014年1月10日

国内外の別：国内

名称：タンパク質と高次構造を含むRNAとの相互作用を検出するためのRNAマイクロアレイ

発明者：齊藤博英、櫻田俊一、田谷敏貴

権利者：京都大学

種類：特許

番号：特願2014-003734

出願年月日：2014年1月10日

国内外の別：国内

名称：RNA-蛋白質相互作用モチーフを利用した蛋白質翻訳量調整システム

発明者：齊藤博英、遠藤慧、井上丹

権利者：齊藤博英、遠藤慧、井上丹

種類：特許

番号：US仮出願番号61/672,219

出願年月日：2012年7月16日

国内外の別：国外

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

該当なし

(3)連携研究者

該当なし