人工 RNA テクノロジーによる哺乳類細胞機能制御

齊藤 博英^{a,b}

Synthetic RNA Technologies to Control Functions of Mammalian Cells

Hirohide Saito^{a,b}

^aCenter for iPS Cell Research and Application, Kyoto University; 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan; and ^bThe Hakubi Center for Advanced Research, Kyoto University; Yoshida-Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

(Received October 3, 2014)

We recently succeeded in producing nanostructures made of RNA-protein (RNP) complexes. We show that RNA and the ribosomal protein L7Ae can form a triangular-like nanostructure that consists of three L7Ae proteins, which form the apices of the triangle, bound to one RNA scaffold. This shape is created through a 60° kink introduced into the RNA structure on L7Ae binding. By varying the size of the RNA scaffold we could in turn alter the overall size of the triangular nanostructure. Several functions can be added to this nanostructure by the introduction of effector proteins fused to L7Ae. The design and construction of functional RNP nanostructures that detect specific cancer cells are discussed herein. In parallel, we developed synthetic RNP translational switches to control production levels of particular proteins depending on certain input(s) within the intracellular environment. The RNP-binding module was successfully incorporated into mRNA to generate functional RNP switches. The designed ON/OFF translational switches detect expression of the trigger factor and repress or activate expression of a desired protein (e.g., apoptosis regulator) in target mammalian cells. Taken together, RNP-binding module could be employed for constructing designer genetic switches and functional nanostructures to regulate cellular processes.

Key words—RNA; translation; RNA switch; synthetic biology; bionanotechnology

1. はじめに

近年、生体内で重要な役割を果たす RNA の発見が相次いでいる。筆者は大学院生の頃に「機能性 RNA 酵素を試験管内でつくる」研究に着手して以来、¹⁾ 分子設計、又は実験進化により創出した人工 RNA を活用した研究を進めている。本総説では、筆者の研究室で得られた最新の成果と人工 RNA による細胞機能制御研究の今後の展望と課題について議論したい。

2. RNA ナノテクノロジー

近年、DNA ナノテクノロジー分野の発展と並行して、RNA ナノテクノロジー分野が注目を集めつつある。DNA ナノテクノロジーは、配列設計可能

な DNA を構造形成単位として、精巧に形作られた様々な二次元、三次元構造体を作製することで大きく進展した。DNA ナノテクでは達成困難な構造機能を人工 RNA で実現することは可能だろうか？ここで重要となる2つの鍵は、「創薬、治療を目指したナノ構造体の細胞応用」と、「環境に応じた構造変換、機能制御」にあると考える。例えば、DNA ナノ構造体をドラッグデリバリーに利用しようとする場合、DNA 自身が遺伝子発現調節機能を保持することは困難である。また、基本的に DNA ナノテクはロバストな構造体を設計、構築する際に大きな力を発揮するが、外部環境に応じたダイナミックな構造変換、機能制御は、DNA 鎖置換反応を用いた研究以外には展開が難しい。²⁾ これとは対照に RNA は、生体内で機能する様々な機能性 RNA 分子 (RNAi を誘導する二本鎖 siRNA や microRNA など) が存在し、細胞内状態に応じて結合するタンパク質パートナーをうまく切り替えることによって、複雑な機能制御が行われていると考

^a京都大学 iPS 細胞研究所初期化機構研究部門 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53), ^b京都大学白眉センター (〒606-8501 京都市左京区吉田牛ノ宮町)
e-mail: hirohide.saito@cira.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 134 年会シンポジウム S49 で発表した内容を中心に記述したものである。

えられる。また遺伝暗号システムに基づきタンパク質合成反応を触媒するリボソームは、RNA とタンパク質からなる究極の分子機械とも言える。このように生体内 RNA の機能構造をうまく模倣することで、RNA ナノテク独自の分野を切り開き、DNA ナノテク分野との相補的技術補完により、感覚と知能を備えた分子ロボットの創出を目指す「分子ロボティクス」などの新学術領域³⁾を発展できるのではないかと筆者らは考えている。RNA ナノテクノロジーでは、RNA の「構造モジュール」を基本単位として、ナノ構造や機能性 RNA を創るアプローチがとられている。例えば、2000 年にカリフォルニア大学の Luc Jaeger のグループは「tecto RNA」という人工 RNA 構造体形成に関する報告を行った。⁴⁾ この tecto RNA は、天然 RNA リボザイムに存在するループ・レセプター相互作用を基にしている。このループ・レセプター相互作用は、単純なワトソン・クリック型の塩基対形成による相互作用とは異なり、RNA の立体構造に基づいた強い親和性と特異性をもって基質に結合できる。Jaeger らは、この tecto RNA の構造モジュールを基に、RNA ナノ構造体や RNA フィラメントを設計・開発することに成功している。^{5,6)} 一方でテキサス大学の Pexian Guo らは、バクテリオファージに存在する pRNA 内部の「3-way junction RNA」に着目し、その多量体数を制御することで、様々なナノ構造体を創りだしており、⁷⁾ RNA ナノ構造体を医療応用に用いる研究を進めている。例えば、pRNA と siRNA、標的がん細胞に特異的に結合する RNA アプタマーを融合したナノ構造体をデザインし、*in vivo* 実験においてマウス腫瘍特異的に RNA ナノ構造体を集積させることができると報告している。これら研究では、主に RNA モジュールのみを活用し、ナノ構造体を構築している。筆者らは、生体内環境に倣い、RNA 分子単独ではなく、RNA とタンパク質との相互作用 [RNA-protein (RNP) 相互作用] をうまく利用することで、環境変動に応答して、RNA の機能構造をダイナミックに変換できるのではと考えた。例えばがん細胞を治療する分子ロボットを構築する上でも、細胞内外の場において、環境変動に応じた「構造変換」と「機能発現制御」の実現は重要なステップになると思われる。そこで筆者らは、RNA とタンパク質の相互作用を用いた、タンパク

質により構造変換を誘導できる最も単純なナノ構造体の 1 つとして、RNP ナノ三角形 (triangular RNP; Tri-RNP) の設計と構築を試みた。

3. RNA-タンパク質相互作用を利用したナノ構造体の構築

Tri-RNP 構築のために、「キンクターン」という RNA 構造モチーフとキンクターンに結合する古細菌 L7Ae リボソームタンパク質の相互作用を利用した。キンクターンは 2001 年にリボソーム RNA 内部に存在する構造モチーフとして報告され、⁸⁾ その後 RNA の立体構造形成や修飾、機能制御に重要な役割を果たす分子として注目を集めている。キンクターン RNA 及び L7Ae の特徴として、以下 3 点が挙げられる。(1) RNP 相互作用が非常に安定である。結合解離定数は約 1 nM と低く、かつ解離速度が非常に遅い ($k_{\text{off}} = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)。 (2) L7Ae タンパク質は約 100 アミノ酸、キンクターンモチーフは 20 塩基程度であり、モジュラー性が高く非常に扱いやすい。 (3) キンクターン RNA 単独ではその構造はフレキシブルであるが、L7Ae 存在下で、RNA の角度は 60° に固定される。これら 3 つの特徴を利用して、当研究室の大学院生であった大野らは、RNP からなる正三角形のデザインと構築を試みた (Fig. 1)。それぞれの辺が互いに相互作用しないように、三辺の配列を設計すると同時に、その 3 つ頂点には、3 つのキンクターンモチーフを配置させた。したがって、3 つの頂点に 3 つの L7Ae を配置させることで、正三角形のナノ構造体が構築できると考えた。原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy; AFM) を用いてその構造体を観察し、L7Ae の存在下でのみ正三角形様の構造体が形成されることが確認された。したがって、タンパク質により RNA の構造を制御できる RNP ナノ構造体の開発に成功した。また、辺にあたる部分の RNA の塩基数を変換することで、様々な異なるサイズのナノ三角形を創出することができる。さらに、本手法では任意の機能性タンパク質を、L7Ae との融合タンパク質として三角形の 3 つの頂点に呈示できる。本研究で開発されたナノ構造体作製技術は、ナノテクノロジー分野に RNA-タンパク質複合体という新しい材料を提供するものであり、特定タンパク質の存在下でのみ三角形構造体の構造形成が起こるといった構造制御を可能にした。さらにこの構造体は

Fig. 1. Synthetic RNA-protein Complex Shaped Like an Equilateral Triangle

Three L7Ae proteins bind to the three vertices of the RNA triangle (left). Sequences of the designed RNA are shown. The kink-turn is shown by shaded region.

細胞内の環境に類似した生理条件下でも安定に保持できることがわかった。

4. 高速 AFM を用いた RNP 構造体形成の高解像度リアルタイム観察

前述までの仕事は、2011 年に *Nature Nanotechnology* 誌に掲載することができたが、⁹⁾ いくつかの課題が存在した。まず、RNP ナノ構造体を大気中原子間力顕微鏡 (AFM) 測定で観測したが、その解像度は決して高くはなく、クリアな三角形ナノ構造を観測することはできなかった。また、大気中測定のため、RNA とタンパク質の相互作用に伴う RNA 構造変換を「リアルタイム」で観測することはできていなかった。さらに、RNA ナノ構造体を用いた細胞治療応用への可能性に言及していたが、実験による検証はできていなかった。最近、当研究室の長田らはこれら課題を解決することに成功し、*ACS Nano* に論文発表した。¹⁰⁾ まず高解像度かつ溶液中での RNP ナノ構造体の観察のため、京都大学遠藤政幸准教授、杉山 弘教授のグループと共同研究を開始した。遠藤、杉山らは、DNA オリガミを足場に数多くの溶液中生体化学反応を高速 AFM で観察することに優れた実績を有しており、同様の手法を RNP ナノ構造体の観察に取り入れた。驚いたことに一回目の実験で、これまで観察が不可能であった高解像度 RNP ナノ三角形画像を取得することに成功した。この画像では三角形の 3 つの頂点に 3 つの L7Ae が “dot” として結合しており、三角形の “hole” も非常にクリアに観察するこ

とができた。つまり、RNA とタンパク質それぞれ 1 分子レベルでの相互作用が確認できた。また、RNA 二本鎖の 1 辺の長さを 15 base pair から 92 base pair まで様々に変えることで、サイズの異なる 5 つの RNP ナノ三角形を構築、観察することにも成功した。本技術の利点は、溶液中で RNA やタンパク質をラベル化する必要なく、RNA ナノ構造体を観測できる点にある。それでは、RNA とタンパク質が結合する様子をリアルタイムで直接捉えることは可能だろうか？ 興味深いことに、RNA をマイカ基盤上に配置させ、過剰量のタンパク質を AFM 観察開始時に加えることにより、三角形ナノ構造が形成される過程を捉えることに成功した。タンパク質が RNA の 3 頂点に結合すると、RNA 頂点の角度が 60° に固定され、動的に構造変換する様子が観測できた。これは、化学・蛍光修飾を伴わず RNP 相互作用を直接かつリアルタイムで観測した初めての例であり、今後様々な RNP 相互作用や RNA ナノ構造体解析への応用が期待できる。

5. RNP ナノ構造体の細胞応用、RNA デリバリーにむけて

機能的 RNP ナノ構造体をデザインし、標的細胞選択的な同定や機能の制御は実現できるだろうか？ 構造的に安定な RNP ナノ三角形を足場にするので、タンパク質や RNA 等、様々な機能的分子を標的細胞選択的にデリバリーすることが期待できる。まず、標的乳がん細胞を選択的に検出し、RNA をデリバリーできるナノ構造体の設計を試みた。ある

種の乳がん細胞表面に存在する Her2 糖タンパク質 (受容体型チロシンキナーゼ) をターゲットとして選択的に結合するアフィボディペプチドを L7Ae に融合することで、三角形の 3 つの頂点にアフィボディペプチドを結合したナノ三角形構造体を作製した。このナノ構造体と種々の乳がん細胞株表面における結合性を評価したところ、期待通り、Her2 の発現量に依存して、標的乳がん細胞表面に RNP ナノ構造体が選択的に結合できることがわかった。興味深いことに、様々なサイズのナノ構造体を用いて細胞表面結合性を評価したところ、1 辺が 26 bp や 48 bp のサイズを持つ RNP ナノ構造体は効率よく標的細胞を認識したが、よりサイズの大きいナノ構造体では、その認識能が低下していた。また、頂点に呈示したアフィボディペプチドの数を 3 つから 1 つずつ減らしていくと、その数の減少に応じて、細胞認識能も低下した。アフィボディペプチドを三角形の最適な距離で配置することで、標的乳がん細胞に対する認識能を向上できる可能性が示唆される。

前述の構造体では、RNA を足場に機能性ペプチドを配置させた。同様に、機能性 RNA モジュールを配置させることも可能と考え、GFP 発現をノックダウンする siRNA 配列を呈示したナノ構造体を作製した。AFM 観察により、L7Ae タンパク質の付加で期待通りの RNP-siRNA ナノ構造体形成を確認後、GFP を恒常的に発現する HeLa 細胞にこの RNP ナノ構造体を導入したところ、GFP 発現抑制効果が認められた。すなわち、このナノ構造体は細胞内で Dicer という RNA 切断酵素により認識され、機能性 siRNA モジュールを放出することで、標的遺伝子をノックダウンできることがわかった。

今回の論文では、残念ながら上述した 2 つの機能の融合 (標的がん細胞表面に結合し、選択的にその細胞の標的遺伝子をノックダウンする) には至っていない。この実現のためには細胞膜透過ペプチドなどを組み合わせた、多機能性 RNP ナノ構造体を作製する必要がある。例えば膜透過ペプチドや細胞認識ペプチドなど、目的のペプチドに結合する複数の RNA モジュールを RNA ナノ構造体に導入することで、その達成が期待できる。

6. 翻訳をオン・オフ制御する RNA スイッチの構築

このような RNA-タンパク質相互作用モジュール

は、哺乳類細胞内で機能する「翻訳制御スイッチ」を作製するための分子材料としても利用できる。ここで筆者らが作製を目指したスイッチとは、標的細胞内で発現する特定の因子 (タンパク質など) に応答して、細胞に導入した外来遺伝子からの翻訳のオン・オフを制御する仕組みのことを指す。細胞内状態の微妙な違いを精密に識別し、それに応じて外来遺伝子の翻訳を自在に制御できれば、がん化した細胞にのみ細胞死誘導シグナルを活性化するというように、細胞内状態変動に応じた標的細胞の同定や運命制御への応用が期待できる (Fig. 2)。この RNA スイッチ技術開発のため、mRNA シスエレメントに結合しその翻訳レベルを調節する RNA 結合タンパク質の機能を模倣し、人工翻訳制御システムを設計・構築することを試みた。これまでに筆者の研究室では様々な人工 RNA スイッチを作製してきたが、¹¹⁻¹⁴⁾ ここでは近年開発した「翻訳二次元チューニング法」と「RNA インバータモジュール」について紹介したい。^{15,16)} 翻訳二次元チューニング法は、当研究室研究員の遠藤らが、mRNA シスエレメントをエンジニアリングすることで見出した。具体的には、標的タンパク質に結合する RNA モジュール (アプタマー) の「mRNA 上での場所と数」を変化させることで、様々なレベルで翻訳量を調節できる。この仕組みを利用すれば、同じ活性を持つ 1 つの入力タンパク質の発現に応じて、複数の mRNA からの翻訳を様々なレベルで調節することが可能となる。さらに遠藤らは、RNP 相互作用を利用して、遺伝子発現を抑制する「オフスイッチ」から遺伝子発現を活性化する「オンスイッチ」を自在に創出できる「RNA インバータ」を開発することに成功した。この RNA インバータを挿入した人工 mRNA の特徴について説明する。細胞内で標的となる因子が発現していない場合、この人工 mRNA は細胞内で速やかに分解されるように設計されている。この設計のためにナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay; NMD) という細胞内 mRNA 分解現象を利用した。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 (実行) するようにデザインされている。例えば今回の成果の応用例として、がん細胞に特有

Fig. 2. RNP Interaction Module and Synthetic RNA Switch to Control Gene Expression within Mammalian Cells

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。また、これまでの技術では、1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RNAインパータ技術では、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できる。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可能となった。このように、細胞内状態変動（特定タンパク質の発現）に応じて、標的外来遺伝子の発現をオン・オフ制御することが実現できる。この仕組みを用いて、特定の細胞状態のマーカーとなるタンパク質やRNAに応答するRNAスイッチの構築に現在取り組んでいる。

7. おわりに：Expanding the synthetic RNA world

人工RNAによる細胞機能制御研究を展開し、産業応用につなげるためには、RNAシステムの安全性、精密性、コスト低減が鍵となるだろう。例えば近年人工mRNAを用いた細胞リプログラミング技術が注目を集めているが、人工RNAの細胞への直接導入は、DNA遺伝子導入によるゲノム損傷のリスクを回避できると期待されている。また、人工RNAをもちいて細胞運命を精密に制御するためには、RNAと基質分子の結合に基づく精密な遺伝子発現調節といった、エンジニアリングの要素が欠か

せない。タンパク質等他の生体分子機能を模倣し、精密に作動する人工機能性RNAやRNA-タンパク質複合体創出技術の開発が、今後重要な鍵を握ると考えられる。その過程でリボソームのように自律的に化学反応を触媒する分子機械をボトムアップに創ることができれば、本分野に大きなブレイクスルーを生み出すだろう。また、「RNAワールド仮説」に代表されるように、RNAは生命起源においても重要な役割を果たしたと推察される。RNAを中心とする生体分子複合体やシステムを人工的に創ることで、現存する細胞の構築や細胞分化過程のプログラミング原理に迫る新技術を開発するとともに、生命起源における原始細胞モデルの誕生、進化にも示唆を与えることのできる研究を今後目指していきたいと考えている。

謝辞 本研究は京都大学 生命科学研究科 井上丹教授、藤田祥彦助教、大野博久研究員、iPS細胞研究所 遠藤 慧研究員、長田江里子研究員、林香倫技術員、iCEMS 杉山 弘教授、遠藤政幸准教授、鈴木勇輝研究員らとの共同研究に基づく。なお本稿で紹介した研究は、NEDO 若手グラント、科学研究費補助金若手研究A、武田科学振興財団、内藤記念科学振興財団等の助成による成果に基づく。未筆ながら、ここに感謝したい。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Saito H., Kourouklis D., Suga H., *EMBO J.*, **20**, 1797–1806 (2001).
- 2) Douglas S. M., Bachelet I., Church G. M., *Science*, **335**, 831–834 (2012).
- 3) Hagiya M., Konagaya A., Kobayashi S., Saito H., Murata S., *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1681–1690 (2014).
- 4) Jaeger L., Leontis N. B., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **39**, 2521–2524 (2000).
- 5) Chworos A., Severcan I., Koyfman A. Y., Weinkam P., Oroudjev E., Hansma H. G., Jaeger L., *Science*, **306**, 2068–2072 (2004).
- 6) Nasalean L., Baudrey S., Leontis N. B., Jaeger L., *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1381–1392 (2006).
- 7) Shu D., Shu Y., Haque F., Abdelmawla S., Guo P., *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 658–667 (2011).
- 8) Klein D. J., Schmeing T. M., Moore P. B., Steitz T. A., *EMBO J.*, **20**, 4214–4221 (2001).
- 9) Ohno H., Kobayashi T., Kabata R., Endo K., Iwasa T., Yoshimura S. H., Takeyasu K., Inoue T., Saito H., *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 116–120 (2011).
- 10) Osada E., Suzuki Y., Hidaka K., Ohno H., Sugiyama H., Endo M., Saito H., *ACS Nano*, **8**, 8130–8140 (2014).
- 11) Saito H., Kobayashi T., Hara T., Fujita Y., Hayashi K., Furushima R., Inoue T., *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 71–78 (2010).
- 12) Saito H., Fujita Y., Kashida S., Hayashi K., Inoue T., *Nat. Commun.*, **2**, 160 (2011).
- 13) Kashida S., Inoue T., Saito H., *Nucleic Acids Res.*, **40**, 9369–9378 (2012).
- 14) Hara T., Saito H., Inoue T., *Chem. Commun. (Camb)*, **49**, 3833–3835 (2013).
- 15) Endo K., Stapleton J. A., Hayashi K., Saito H., Inoue T., *Nucleic Acids Res.*, **41**, e135 (2013).
- 16) Endo K., Hayashi K., Inoue T., Saito H., *Nat. Commun.*, **4**, 2393 (2013).