

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分
平成30年3月8日現在

人工 RNP ナノシステムを活用した細胞プログラミング技術の創出
Cellular Programming Using Synthetic RNP Nanosystems

課題番号：15H05722

齊藤 博英 (Saito Hirohide)

京都大学・iPS細胞研究所・教授



研究の概要：本研究では、細胞内の状態変化に応じた自律的な遺伝子操作を実現するとともに、安全・精密な細胞運命制御技術を新たに開発する。そのために、① 細胞内部の状態を検知して目的の遺伝子発現のオン/オフを切り替えるスイッチ、② 標的タンパク質の細胞内空間配置を精密に制御できるナノ構造体、③ 機能性 RNP を取得する細胞内 RNP 実験進化システム、の開発を行う。

研究分野：複合領域

キーワード：RNA、RNP、生体内発現、合成生物学、発生、分化、幹細胞、再生医療

1. 研究開始当初の背景

RNA-タンパク質複合体 (RNP) は、生命進化の初期から現在に至るまで、生命システムにおいて最も重要な機能を担う生体分子複合体の一つである。この RNP からなる分子複合体や遺伝子発現制御システムを自在に創出することができれば、生命科学の基礎研究から医療や創薬といった応用的な研究までを革新させることが期待できる。

本研究では、研究代表者らが開発した RNP を基盤とする分子デザインや遺伝子発現制御技術を統合・発展させることで、これまで実現できなかった、細胞内状態に応じた精密かつ自律的な細胞運命の制御（細胞プログラミング）を可能にする人工 RNP ナノシステムの創出を行う。

2. 研究の目的

上記目的を実現するために、本研究では三つの研究課題に取り組む。① 標的哺乳類細胞の選別・運命制御法の開発、② 細胞内タンパク質の空間配置を制御可能な人工 RNA ナノ構造体の設計と構築、③ 生細胞内における機能性人工 RNP システムの創出、である。この①～③を達成することで、多様な細胞内状態を識別、運命制御できる様々な「人工 RNA スイッチ」を開発する。さらに、分子デザインと実験進化のアプローチを活用した新規な「RNP ナノ構造体」、「RNP 相互作用システム」を創出し、RNP を基盤とする、細胞内状態に応じた細胞プログラミング技術確立する。

3. 研究の方法

① 標的哺乳類細胞の選別・運命制御法の開発

幹細胞を活用した再生医療分野を加速するには、幹細胞から分化した目的細胞のみを安全かつ精密に選別し、不必要な細胞を確実に除去する技術が重要となる。そのため、細胞内状態（細胞内に発現している分子）を検知する RNA スイッチおよびそれを組み合わせた RNA 回路を構築し、標的細胞のみを検出する技術の開発を行う。

② 細胞内タンパク質の空間配置を制御可能な人工 RNA ナノ構造体の設計と構築

細胞内タンパク質の集積を制御できる人工 RNA ナノ構造体を設計し、哺乳類細胞内で構築する。研究代表者らは最近、種々の形状の RNP ナノ構造体を分子デザインにより設計し、実際に構築することに成功している。この RNP 分子デザイン技術を拡張することで、細胞内でタンパク質の空間配置を制御するという機能を有する RNP ナノ構造体 (RNP ナノマシン) の創出に挑戦する。

③ 生細胞内における人工 RNP システムの実験進化系の創出

標的細胞内に存在する任意の分子の発現を検出するには、そのような標的因子に特異的に結合する RNA 配列を取得できる必要がある。本課題では、既存の RNA 分子デザイン技術および実験進化法を改良し、単に標的分子に結合するのみならず、細胞内環境で任意の標的因子と結合し目的遺伝子の発現を制御できる人工 RNA システムを取得できる新たな技術を開発する。

4. これまでの成果

①標的哺乳類細胞の選別・運命制御法の開発

代表者らは、細胞内のマイクロ RNA に応答して翻訳反応を制御できる合成 mRNA スイッチを活用して、標的細胞を選別できる技術を開発した。本研究ではこの技術をさらに発展させ、様々な細胞の選別や運命制御を実現できる基盤技術の確立に成功した。具体的には、未分化 iPS 細胞を特異的に識別し、除去できる技術の開発に成功した。この研究から、分化した神経細胞の中に混在する未分化細胞を検知、特異的に除去することで、iPS 細胞の安全性を高められることを示した (**発表論文 5**)。また、マイクロ RNA 応答性のレポーターベクターを新たに開発することで、細胞分化過程の長期モニタリングと心筋細胞選別に成功した (**発表論文 4**)。

さらに、RNA スイッチを Cas9 タンパク質によるゲノム編集技術と組み合わせ、細胞内のマイクロ RNA に応じて Cas9 タンパク質の産生を制御できる「マイクロ RNA-Cas9 スイッチ」を設計した。これを用いて、特定の細胞種でのみゲノム編集を誘導し、細胞死を引き起こす新技術を開発した (**発表論文 3**)。

②細胞内タンパク質の空間配置を制御可能な人工 RNA ナノ構造体の設計と構築

生きた細胞内で機能する「RNP ナノマシン」の設計と構築に成功した。具体的には、設計した RNA ナノ構造体上に特定のタンパク質を集積させ、それによって細胞死を引き起こすシステムを作製した。次に、細胞に特異的に発現しているタンパク質によってこの集積が阻害されるようにナノ構造体を改変した。これを細胞に導入することで、細胞種特異的に細胞内タンパク質の集積を制御することができ、標的細胞特異的に細胞死の制御を行うことに成功した (**発表論文 1**)。

③生細胞内における人工 RNP システムの実験進化系の創出

本項目では、細胞内在性タンパク質を検出できる新たな RNA スイッチの開発をまず目指した。細胞内在性タンパク質を効率よく検出できる RNA デバイスを取得するため、天然の RNA 配列や実験進化法により得られた人工の RNA 配列の細胞内安定性を高められる新たな RNA 構造安定化手法を考案した。その結果、細胞に内在するタンパク質を検知し、翻訳を制御できる RNA スイッチの開発に初めて成功した (**発表論文 2**)。

また、上記の実験進化的な手法に加え、大規模な構造 RNA ライブラリの開発・利用も進めており、このライブラリを使用した新規「RNP マイクロアレイ法」を開発した (特許申請済)。細胞運命制御のために有用な人工 RNP システムを得られる可能性がある。さらに、天然の細胞内における未知の RNA-タンパク質間相互作用の研究にも活用できる (未発表データ)。

5. 今後の計画

①RNA スイッチ技術の高度化を目指し、様々な細胞を生きたまま識別し、その運命を細胞内環境に応じて特異的に制御できる技術を確認する。具体的には、標的マイクロ RNA に応答して翻訳を活性化できる「オンスイッチ」の開発し、それを用いた細胞運命制御技術を開発する。

②低分子や標的因子に応じてダイナミックに構造や機能を変換できる RNA ナノ構造体を設計し、その構造体を原子間力顕微鏡等を用いて直接観察する。さらに、細胞内外で機能する RNA (RNP) ナノ構造体を構築する。

③構造 RNA ライブラリや新たな RNP 実験進化法を活用し、細胞機能を制御できる様々な人工 RNP 配列やシステムを取得できる新技術を開発する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

【発表論文】(主要なもののみ)

1. Shibata T, Fujita Y, Ohno H, Suzuki Y, Hayashi K, Komatsu KR, Kawasaki S, Hidaka K, Yonehara S, Sugiyama H, Endo M, Saito H. “Protein-driven RNA nanostructured devices that function in vitro and control mammalian cell fate”, *Nat Commun.* **14**, 540 (2017)
2. 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**, e117 (2017)
3. Hirose M, Fujita Y, Parr CJC, Hayashi K, Kashida S, Hotta A, Woltjen K, Saito H. “Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch”, *Nucleic Acids Res.* **45**, e118 (2017)
4. Nakanishi H, Miki K, Komatsu KR, Umeda M, Mochizuki M, Inagaki A, Yoshida Y, Saito H. “Monitoring and visualizing microRNA dynamics during live cell differentiation using microRNA-responsive non-viral reporter vectors”, *Biomaterials* **128**, 121-135 (2017)
5. Parr CJ, Katayama S, Miki K, Kuang Y, Yoshida Y, Morizane A, Takahashi J, Yamanaka S, Saito H. “MicroRNA-302 switch to identify and eliminate undifferentiated human pluripotent stem cells”, *Sci Rep.* **6**, 32532 (2016)

【受賞】

- ・第 23 回ゴールド・メダル賞 (読売テクノ・フォーラム)、2017 年 4 月

研究室ホームページ

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