

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020～2024  
課題番号：20H05626  
研究課題名：RNAを基盤とする合成生命システムの創成

研究代表者氏名（ローマ字）：齊藤 博英（SAITO Hirohide）  
所属研究機関・部局・職：京都大学・iPS細胞研究所・教授  
研究者番号：20423014

研究の概要（4行以内）:

本研究では、生命機能の制御に重要な役割を果たすRNAやRNP（RNA-タンパク質複合体）に注目し、細胞内でのRNAやRNPの相互作用ネットワークを解明する。さらに、細胞の機能を制御する人工RNAやRNPからなる構造物やシステムを構築し、次世代の生命科学や医学に有用な技術を開発することを目指す。RNAやRNPが司る生命現象の理解と制御を通じ、合成生命システム創生分野を新たに切り拓く。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学、RNA、RNA-タンパク質相互作用、人工オルガネラ、人工細胞、遺伝子回路

1．研究開始当初の背景

生体分子や生命システムを人工的に創ることで生命を理解し、新たなテクノロジーの創出を目指す Synthetic Biology（合成生物学）研究が、国内外で大きく進展している。しかしながら、これまでの合成生物学はDNAテクノロジーに大きく依存しており、細胞内でシステム制御のための分子材料として利用できる人工生体分子の種類は極端に少ない。さらに、合成生物学の哺乳類細胞への活用は未だ黎明期にあり、その可能性は未知数である。DNAとタンパク質に関する知見は蓄積しつつあるが、RNAやRNA-Protein（RNP）相互作用が制御する遺伝子ネットワークの情報や、細胞内RNA/RNP構造物の形成原理など、RNA・RNPが生命システムの制御に果たす役割の多くは、未だ明らかになってはいない。

2．研究の目的

本研究では独自の「RNA・RNP分子デザイン技術」を活用し、（1）細胞機能を制御するRNAやRNP相互作用ネットワークを包括的に同定するとともに、（2）RNPによる細胞内構造物（オルガネラ）の作動原理を解明し、RNPからなる人工オルガネラを構築する。さらに、（3）哺乳類細胞や個体で作用する人工のRNA・RNPシステムおよび機能性人工細胞を開発する。加えて、（4）生命システム創発原理の理解を目指し、RNAシステムに基づく人工細胞モデルの創出に挑む。最終的に、RNAやRNPが司る生命現象を統合的に理解するとともに、次世代の生命科学や医療の発展に資する人工RNAシステムを開発することで、RNAを基盤とする合成生命システムの創出に挑戦する。

3．研究の方法

本研究ではまず、RNAやRNP相互作用ネットワークを明らかにする。次に、その理解をもとに細胞機能を制御する人工RNAシステムや構造物を分子デザインし、RNAを基盤とする生命システムの制御と創成に取り組む。具体的には、（1）大規模RNA構造ライブラリを活用したRNA/RNP相互作用ネットワークの解明、（2）RNP構築原理の理解に基づく人工オルガネラの設計と構築、（3）医療応用に資する機能性人工RNA/RNPシステムおよび機能性人工細胞の開発、（4）生命進化における人工RNA/RNP細胞モデルの開発、という4つの計画を統合的に推進し、RNAを基盤とする生命システムの構築原理の解明と制御を実現する。

4．これまでの成果

**大規模RNA構造ライブラリを活用したRNA/RNP相互作用ネットワークの解明**

様々な生物種のゲノムからRNA構造モチーフを抽出できる独自のアルゴリズム及びRNP相互作用をマイクロアレイ上で包括的に同定できる新技術FOREST（Folded RNA Element Profiling with Structure library）の開発に成功した（**発表論文6**）。本技術により、数千-数万種類のRNA構造ライブラリを作成し、タンパク質との相互作用を生化学的に大規模に解析できる。実際に、これまで大規模解析が困難であったRNA高次構造であるRG4構造の定量に成功し、それらと相互作用する3つのタンパク質の結合特異性と強度を明らかにした。FORESTはRNA構造と様々な相互作用を大規模に生化学解析可能な幅広いプラットフォームとなり、今後RNA構造に関連する基礎研究や創薬開発など、さまざまな領域で活用が期待できる。

**医療応用に資する機能性人工RNA・RNPシステムおよび機能性人工細胞の開発**

細胞医療を推進する上で、細胞純化の技術は重要な役割を果たす。我々は、マイクロRNA（miRNA）に応答して遺伝子発現を活性化させる合成mRNA（miRNA応答ONスイッチ）を開発し、純度の高い細

胞選別システムを確立した（**発表論文 3、図 1**）。これまでに開発した、miRNA に応答して遺伝子の発現を抑制させる miRNA 応答 OFF スイッチと組み合わせることで、多様な細胞種をより高純度に純化することが可能になった。本手法を用いて、iPS 細胞や iPS 細胞から分化した心筋細胞の高効率での純化が可能であることを確認した。本手法を用いることで、移植細胞を安全に大量に安価に供給でき、がん細胞などをターゲットとした mRNA 医薬品の開発にもつながることが期待される。

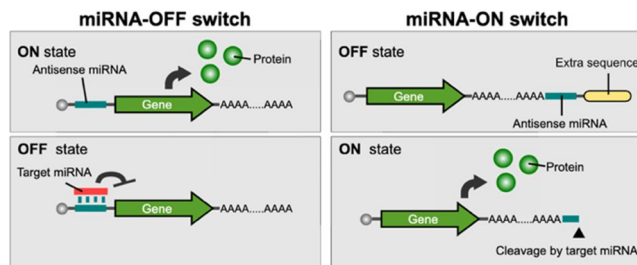


図 1. miRNA 応答性 OFF スイッチと ON スイッチの開発

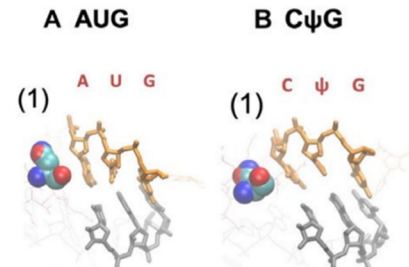


図 2. 修飾塩基による遺伝暗号読み替え

加えて、遺伝子発現の時空間的制御のために、これまでに開発した人工翻訳制御システム CaVT (Caliciviral VPg-based Translational activator) を改変し、合成 mRNA の翻訳を光により制御可能にした（**発表論文 5**）。

また、当初予見していなかった研究成果として、翻訳開始効率は、合成 mRNA に導入した塩基の化学修飾によって変化するという新たな現象、「修飾塩基による mRNA の遺伝暗号読み替えメカニズム」を発見することに成功した（**発表論文 1、図 2**）。

## 5 . 今後の計画

RNA/RNP を基軸とした生命システムの構築原理の解明と制御技術の開発を進める。特に、以下の研究項目を推進する。

### RNP 構築原理の理解に基づく人工オルガネラの設計と構築

細胞の状態に応じた RNP オルガネラの制御による遺伝子発現・細胞機能制御技術を開発する。

### 医療応用に資する機能性人工 RNA・RNP システムおよび機能性人工細胞の開発

人工 RNA・RNP 回路や構造体、機能性人工細胞の機能を哺乳類細胞やマウス個体で評価する。

### 生命進化における人工 RNA/RNP 細胞モデルの創製

分子デザインした RNA や RNP を活用した人工細胞モデルを開発する。

## 6 . これまでの発表論文等（受賞等も含む） \*責任著者

1. Fujita Y, Kameda T, Singh CR, Pepper W, Cecil A, Hilgers M, Thornton M, Asano I, Moravek C, \*Togashi Y, \*Saito H, \*Asano K. **Translational recoding by chemical modification of non-AUG start codon ribonucleotide bases.** *Sci Adv.* 2022, 8:eabm8501.
2. \*Pardi ML, Wu J, Kawasaki S, \*Saito H. **Synthetic RNA-based post-transcriptional expression control methods and genetic circuits.** *Adv Drug Delivery Reviews.* 2022.
3. \*Fujita Y, Hirotsawa M, Hayashi K, Hatani T, Yoshida Y, Yamamoto T, \*Saito H. **A versatile and robust cell purification system with an RNA-only circuit composed of microRNA-responsive ON and OFF switches.** *Sci Adv.* 2022, 8(1):eabj1793.
4. Minegishi K, Rothé B, Komatsu KR, Ono H, Ikawa Y, Nishimura H, Katoh TA, Kajikawa E, Sai X, Miyashita E, Takaoka K, Bando K, Kiyonari H, Yamamoto T, \*Saito H, \*Constam DB, \*Hamada H. **Fluid flow-induced left-right asymmetric decay of Dand5 mRNA in the mouse embryo requires a Bicc1-Ccr4 RNA degradation complex.** *Nat Commun.* 2021, 12(1):4071.
5. Nakanishi H, Yoshii T, Kawasaki S, Hayashi K, Tsutsui K, Oki C, Tsukiji S, \*Saito H. **Light-controllable RNA-protein devices for translational regulation of synthetic mRNAs in mammalian cells.** *Cell Chem Biol.* 2021, 28(5):662-674.e5.
6. Komatsu KR, Taya T, Matsumoto S, Miyashita E, \*Kashida S, \*Saito H. **RNA structure-wide discovery of functional interactions with multiplexed RNA motif library.** *Nat Commun.* 2020, 11(1):6275.

## 7 . ホームページ等

[https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/hsaito\\_summary.html](https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/hsaito_summary.html)

<https://sites.google.com/view/hirohidesaitolabjp>

<https://www.youtube.com/watch?v=-mpYH89NIrs>