みにれびゅう

RNA-タンパク質ナノテクノロジー＆シンセティックバイオロジー

齊藤　博英

1.　はじめに

京都の桜が満開になった2013年の4月初め，帰国するころには桜は散っているだろうと後ろ髪を引かれる思いであったが，RNAナノテクノロジーの国際学会（RNA Nanotechnology & Therapeutics）に参加するためアメリカLexingtonに向かった．この学会ではナノサイズのRNAデザインとその医療応用に関連する最近の研究動向に関する講演，議論が行われた．またその翌週にはアメリカSalt Lake Cityで行われたFNANOという生体分子ナノテクノロジー分野の国際学会にも参加した（FNANO13）．このように近年，人工生体分子を活用したナノテクノロジー分野やシンセティックバイオロジー分野に国内外で注目が集まっている．日本でも平成23年度，および24年度から文部科学省が支援する新学術領域として「合成生物学」や「分子ロボティクス」研究分野が立ち上がり，若手研究者がこれら異分野融合分野に参入し活況を呈し始めている．筆者は，大学院で研究を始めて以来今に至るまで，RNAやタンパク質を「分子デザイン」することで，新しい機能性分子を創る研究や，人工翻訳制御システムを創る研究を進めてきた．実際，上記にあげたナノテクノロジーやシンセティックバイオロジー研究分野においても，RNAやRNA-タンパク質複合体（RNP）は，人工生体分子や人工遺伝子回路を組み立てる際の「モジュール」として重要な役割を果たす[1]．RNAはDNAと同様に基本四つの塩基，糖，リン酸を骨格に組み立てられるが，DNA単独では困難である多彩な機能と構造を生み出すことができる．DNAのように自己複製の鋳型に用いられることもあれば，タンパク質のように酵素反応を触媒することもできる．このことから，生命の起源においてRNA分子が生命システム形成に重要な役割を果たしたとする「RNAワールド仮説」が提唱された．筆者はRNA分子のもつ魅力に大学院生のころから引き込まれ，人工RNAやRNPを創る研究を通じ，その構築原理の理解と細胞機能を制御できる新しい技術開発を目指している．本稿では，RNAを軸とする上記二つの研究分野の最新の研究動向と，自身が進めているRNPナノ構造体や，細胞内で翻訳制御デバイスとして機能する人工RNAを創る研究について紹介したい．

京都大学白眉センター，京都大学iPS細胞研究所（CiRA）（〒606-8507　京都市左京区聖護院川原町53）

RNA-Protein nanotechnology & synthetic biology

Hirohide Saito（The Hakubi Center for Advanced Research & Center for iPS Cell Research and Application（CiRA）, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan）

2.　RNAナノテクノロジーの研究動向

「DNAオリガミ」という言葉を皆さんはご存知だろうか？　2006年の*Nature*誌の表紙をDNAで精巧に組み立てられたニコちゃんマークが飾り，しかも著者が1人だったこともありその登場は鮮烈だった[2]．しかもその後勢いは衰えることなく，世界中で，DNAオリガミ技術を用いた研究は拡大している．約1400塩基の一本鎖DNAを元に，多種類の「staple DNA」をはめこんでいくことでさまざまな二次元，三次元構造体の作製が実現されている．この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」分野にも注目が集まり始めている[3]．現在のRNAナノテクノロジー分野では，RNAやRNP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．たとえば，2000年にカリフォルニア大学のLuc Jaeger博士のグループは「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・受容体相互作用を元にしている．このループ・受容体相互作用は，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の立体構造に基づき強い親和性と特異性を保持して基質に結合できる．Jaeger博士らは，このtecto RNAの構造モジュールを元に，RNAナノ構造体やRNAからなるフィラメントを設計・開発することに成功している[5,6]．一方でケンタッキー大学のPexian Guo博士らは，バクテリオファージに存在するパッケージングRNA（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，さまざまなナノ構造体を創り出している[7]．さらにGuo博士らは，そのRNAナノ構造体を医療応用に用いる研究も進めている．たとえば，pRNAと低分子干渉RNA（siRNA），

標的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たと報告している．今回のRNAナノテクノロジー学会でも，pRNAを足場とし，siRNAの効果を100倍程度高め，上皮増殖因子受容体（EGFR）アプタマーと融合させることでiPS細胞から分化させた標的細胞の増殖を制御できるといった発表がなされていた．しかしこのpRNAを足場とするナノ構造体が腫瘍特異的に集積する理由は明らかではなく，今後のメカニズムの解明が待たれる．また，アメリカ国立がん研究所（NCI）のBruce Shapiro博士，Kirill Afonin博士らのグループは，RNAのコンピュータデザインと細胞内での実験を組み合わせ，DNA-RNAハイブリッド型のナノ構造をデザインし，細胞内でのRNAナノ構造体の安定性を高めるとともに，DNA-RNA相互作用に基づきRNAi活性を制御する技術を開発することに最近成功した[8]．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．翻って生体内での現象を考えてみると，RNAはタンパク質との相互作用を利用し，適切な時間と場所でRNAの構造を折りたたみ，目的の機能を発現している．ここで着目すべき点は，天然RNAの機能構造は生体内環境に応答して，「ダイナミックに変換」できる点にある．今後の生体分子を利用したナノテクノロジー発展のためには，細胞外環境，細胞内環境の両反応場において，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．したがって筆者らは，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RNPナノ構造体の構築を試みた．

3. RNPナノ三角形の設計と構築

RNPナノ構造体構築のために，「キンクターン」という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（**図1**）．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[9]，その後リボソームRNA内部のさまざまな箇所に存在し，RNAの立体構造形成に重要な役割を果たす分子として注目を集めている．（http://www.dundee.ac.uk/biocentre/nasg/kturn/）．キンクターンRNAおよびL7Aeの特徴として，以下三点があげられる．
（1） RNP相互作用が非常に安定である．結合解離定数は約1nMと低く，かつ解離速度が非常に遅い（$k_{off}=10^{-4}s^{-1}$）．
（2） それぞれの配列が短く，モジュラー性が高い．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，合成や精製の面で非常に扱いやすい．
（3） L7AeがキンクターンのRNAの角度を60度に固定する．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度に固定される．これら三つの特徴を利用して，筆者らのグループでは，RNPからなる人工正三角形のデザインと構築を試みた[10]．デザインにはDiscovery Studioという分子設計ソフトを用いた．まずコンピュータ内でそれぞれの辺が互いに相互作用しないように，三辺の配列を設計しておく．その三つ頂点には，三つ

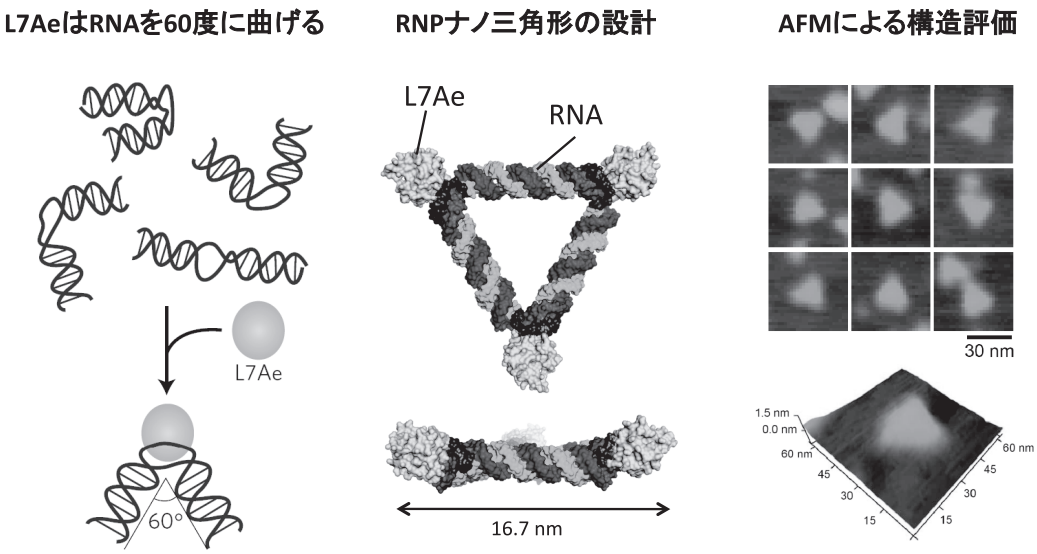

図1 RNPによるナノサイズの三角形構造体の設計
黄色部分がL7Aeであり，このタンパク質がRNAを60度に折り曲げている．二本鎖RNAは直線のため，全体としては正三角形の形状となる（図中央）．作製したナノ三角形構造をAFMにより観察した（右図）．RNA単独では球形の形をとる場合が多いが，RNAがL7Aeと結合すると正三角形状にナノ構造体が変換する．

のキンクターンモチーフを配置させた．したがって，三つの頂点に三つの L7Ae を配置させることで，正三角形状のナノ構造体が構築できるのではと考えた．筆者の共同研究者である大野博久博士が RNP 三角形分子をデザインしたときは，RNA 分子の形を直接自分の目でみてみたいという思いもあって，「とりあえず観察してみよう！」という軽いのりで始めたプロジェクトであった．しかし，最初に原子間力顕微鏡（AFM）を用いてその構造体を観察したときに，三角形状の構造体がいきなり現れたので驚いた．しかも，L7Ae が存在しない場合と明らかに構造が異なっている．その後，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（図 1，右）．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初めて成功した[10]．また，辺にあたる部分の RNA の塩基数（長さ）を変換することで，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，さまざまな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三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．この構造体は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．実際，標的細胞表面を RNP ナノ構造で認識し，細胞機能を制御できることが最近の研究から明らかになっており（長田，齊藤ら，論文投稿中），RNP がナノバイオテクノロジー分野における新しいマテリアルとなることが期待できる．

4. RNP 相互作用に基づく人工翻訳制御

前節で記述した RNP 相互作用モジュールは，細胞内における翻訳制御のための新しいデバイスとしても活用できる．天然のシステムにおいても，RNA-タンパク質相互作用を基盤とした翻訳制御の例はいくつか知られている．たとえば真核細胞における鉄結合タンパク質，アコニターゼは，細胞内鉄濃度に応じて鉄貯蔵タンパク質および鉄輸送タンパク質をコードする mRNA に結合し，それぞれの翻訳を抑制，活性化することで，巧妙な細胞内鉄濃度の調節を行っている．他にも興味深いシステムとして，細菌のリボソームタンパク質や，アミノアシル tRNA 合成酵素によるネガティブ・フィードバック機構がある．これらタンパク質は，自身を発現する mRNA の 5′ 非翻訳領域（5′ -UTR）に直接結合し，細胞内のタンパク質濃度に依存してその発現を調節する．このように RNA-タンパク質相互作用モチーフを利用して，人工の翻訳制御システムやネガティブ・フィードバックシステムを構築できるのだろうか？それが実現できれば，さまざまな面白い技術開発につながると筆者は考えている．たとえば，細胞運命を自在に制御するために，細胞内で発現した任意の因子のシグナル情報（入力）を目的タンパク質の翻訳の情報（出力）に変換する技術が期待できる（**図 2**，左）．その実現のために，翻訳を制御する「人工 RNA スイッチ」が「情報変換素子」として活用できるのではないかと考えた．このような人工 RNA スイッチをさまざまな入力因子（標的細胞でのマーカータンパク質や RNA など）に対し汎用的に構築できれ

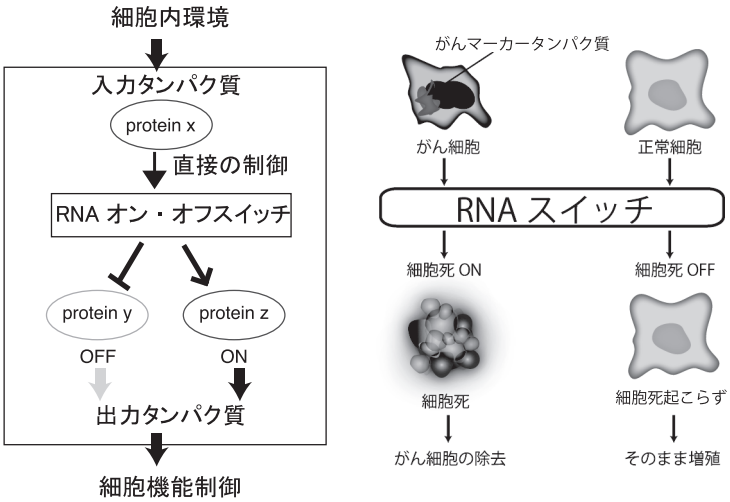

図 2　人工 RNA スイッチの概念図
細胞内で発現する特定のタンパク質（入力）に応答して，目的遺伝子の翻訳をオン・オフ（出力）できる人工 RNA スイッチを作製した（左）．このスイッチを細胞死誘導経路に接続することで，特定がん細胞等の運命を自在に制御できる人工 RNA スイッチシステムが構築できる（右）．

ば，標的がん細胞のみでアポトーシス関連タンパク質の翻訳を制御することでその細胞を特異的に除去するといった，細胞内の環境変動に応じた運命制御技術の開発が期待できる（図2，右）．そのモデルシステム開発のため，再びL7Aeとキンクターン RNA の相互作用を利用した．すなわち，mRNA の5′-UTR に挿入したキンクターン RNA に L7Ae を結合させることで，目的遺伝子の翻訳を抑制する「mRNA オフスイッチ」を開発した[11,12]．試験管内での生化学的解析の結果を反映し，細胞内でもキンクターン RNA を導入した mRNA は L7Ae と強固な複合体を形成することがわかった．したがって，L7Ae 存在下では mRNA 上でのリボソーム機能が阻害され，翻訳反応が顕著に抑制される．この理由として，mRNA 上に結合した L7Ae がキンクターン RNA の構造を強力に安定化することで，その著しい翻訳抑制効果を実現していると考えられる．興味深いことに，天然のシステムにおいても mRNA に内在するキンクターン構造を保持するリボスイッチに L7Ae が結合し，その構造を安定化するという論文が報告されている．このように，人工システム構築において優れた機能を発揮する RNP 相互作用をスクリーニングすることで，それが自然界でも同様の働きを持つ場合があるかもしれない．

さらに我々は，RNP 相互作用を利用した，翻訳制御に基づく人工ネガティブ・フィードバック回路を哺乳類細胞内で構築することに成功した[13]．L7Ae が自身をコードする mRNA に結合するように設計すると，自己ネガティブ・フィードバックループによる翻訳制御が実現できた．さらに，L7Ae やキンクターンに変異を導入することで，翻訳量をさまざまなレベルに調節できることがわかった．この翻訳量は RNP 親和性を記述した単純な常微分方程式による数理モデルからも予測できることがわかった．近年網羅的な遺伝子発現とタンパク質発現解析の研究から，RNA の転写量とタンパク質の発現量が相関しないケースが多々報告されており，転写後の翻訳制御システムの重要性が注目されている．mRNA の発現量や局在には影響を与えず，翻訳のみを特異的に制御できる上記技術は，これら天然システムにおける「翻訳制御の意義」を検証する研究に活用できるかもしれない．

5. おわりに

本稿では，人工 RNA・RNP モジュールを用いたナノ構造体の構築や，人工翻訳制御の研究例について紹介した．両者に共通するのは，タンパク質による RNA のダイナミックな構造変換と機能発現の制御である．さまざまな RNA/RNP ナノ構造体を細胞内外で構築し，その構造形成に基づいて生化学反応を制御する研究は興味深いと思われる．それは試験管内で，さまざまな入力を感覚として検知し，その入力に基づきアクチュエータを自在に駆動する分子ロボットの開発につながるかもしれないし[14]，細胞内で機能する人工 RNA デバイスの設計原理に新たな切り口を与えるかもしれない．筆者は，このような「創る研究」を通じて，RNA や RNP からなる分子やシステムの構築原理に迫れたらと考えている．たとえば，リボソームのような精巧な分子機械をボトムアップに創り出すことは可能なのだろうか？　生命起源における RNA ワールドを模倣したシステムを実験室で実際に創り出すことはできるのだろうか？　これら疑問に答えることは容易ではないが，分子生物学，進化分子工学，ナノテクノロジー，シンセティックバイオロジーの技術などを総動員することで明らかになる日がやってくるかもしれない．そのような研究は生命システム構築原理に新たな示唆を与えるとともに，細胞機能制御のための革新的技術を産み出すだろう．

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，Jim Stapleton 研究員，京都大学 iPS 細胞研究所　遠藤慧研究員，長田江里子研究員，樫田俊一研究員，林香倫技術員らとの共同研究に基づく．なお本研究は科学技術振興機構　ICORP，NEDO 若手研究グラント，科学研究費補助金，武田科学振興財団，内藤記念科学振興財団，持田記念医学薬学振興財団，鈴木謙三記念医科学応用研究財団の助成による．末筆ながら，ここに謝意を表する．

1）Saito, H. & Inoue, T.（2009）*Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 398–404.
2）Rothemund, P.W.（2006）*Nature*, **440**, 297–302.
3）Guo, P.（2011）*Nat. Nanotechnol.*, **5**, 833–842.
4）Jaeger, L. & Leontis, N.B.（2000）*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **39**, 2521–2524.
5）Chworos, A., Severcan, I., Koyfman, A.Y., Weinkam, P., Oroudjev, E., Hansma, H.G., & Jaeger, L.（2004）*Science*, **306**, 2068–2072.
6）Nasalean, L., Baudrey, S., Leontis, N.B., & Jaeger, L.（2006）*Nucl. Acids Res.*, **34**, 1381–1392.
7）Shu, D., Shu, Y., Haque, F., Abdelmawla, S., & Guo, P.（2011）*Nat. Nanotechnol.*, **6**, 658–667.
8）Afonin, K.A., Viard, M., Martins, A.N., Lockett, S.J., Maciag, A.E., Freed, E.O., Heldman, E., Jaeger, L., Blumenthal, R., & Shapiro, B.A.（2013）*Nat. Nanotechnol.*, **8**, 296–304.
9）Klein, D.J., Schmeing, T.M., Moore, P.B., & Steitz, T.A.（2001）*EMBO J.*, **20**, 4214–4221.
10）Ohno, H., Kobayashi, T., Kabata, R., Endo, K., Iwasa, T., Yoshimura, S. H., Takeyasu, K., Inoue, T., & Saito, H.（2011）*Nat. Nanotechnol.*, **6**, 116–120.
11）Saito, H., Kobayashi, T., Hara, T., Fujita, Y., Hayashi, K., Furushima, R., & Inoue, T.（2010）*Nat. Chem. Biol.*, **6**, 71–78.
12）Saito, H., Fujita, Y., Kashida, S., Hayashi, K., & Inoue, T.（2011）*Nat. Commun.*, **2**, 160.
13）Stapleton, J. A., Endo, K., Fujita, Y., Hayashi, K., Takinoue,

M., Saito, H., & Inoue, T.（2012）*ACS Synth. Biol.*, **1**, 83–88.
14）Murata, S., Konagaya, A., Kobayashi, S., Saito, H., & Hagiya, M.（2013）*New Gener. Comput.*, **31**, 27–45.

著者寸描

●齊藤博英（さいとう　ひろひで）

京都大学白眉センター，京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）特定准教授．博士（工学）．

■略歴　2002 年東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻博士課程修了．1999～2001 年ニューヨーク州立大学バッファロー校化学科へ研究留学．99～02 年日本学術振興会特別研究員 DC1（東京大学），02～05 年 SPD（癌研究所），05～10 年京都大学生命科学研究科助教等を経て 10 年より京都大学白眉プロジェクト特定准教授．11 年より京都大学 iPS 細胞研究所准教授を兼任．

■抱負　RNA による細胞運命制御技術の開発，生命起源モデルの探究．

■ホームページ　http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/saito/

■趣味　鴨川を散歩．映画鑑賞．