



京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

細胞内でタンパク質を検出して運命制御できる 「RNA ナノマシン」の構築

ポイント

- タンパク質を検知して作動する、ナノメートルサイズの RNA からなる分子マシン (RNA ナノマシン) を構築した。
- RNA ナノマシンは、細胞内で特定のタンパク質を精密に検知し、RNA 上に集積できた。
- RNA ナノマシンを使い、細胞内のタンパク質 (Lin28^{注1}) に応答して、細胞死のシグナルを精密に操作することができた。
- iPS 細胞とヒーラ細胞内の環境を見分け、ヒーラ細胞特異的に細胞死を誘導できた。

1. 要旨

柴田知範特任助教 (現大阪大学、元京都大学 CiRA 研究員)、齊藤博英教授 (京都大学 CiRA) らの研究グループは、タンパク質と相互作用できる RNA からなる機能性ナノ構造体、「RNA ナノマシン」を構築し、生きた細胞内で RNA ナノマシンが機能して細胞の運命決定を操作できることを確認しました。

DNA や RNA を扱った核酸ナノテクノロジー^{注2}はこれからの生命科学や医療において大いに期待される技術ですが、これまで細胞死などの細胞の運命を操作できるような核酸ナノマシンは開発されていませんでした。そこで研究グループはまず、RNA とタンパク質の相互作用によって生じる RNA の構造変化やタンパク質の集積を制御できる RNA ナノマシンを構築しました。次に、構築した RNA ナノマシンを用いて細胞内タンパク質を検知、集積して細胞死のシグナルを精密に操作することに成功しました。この研究から、RNA や RNA-タンパク質複合体を材料とし、細胞内で機能する様々な「分子ロボット」の構築が期待できます。

この研究成果は 2017 年 9 月 14 日午前 10 時 (英国時間 : 日本時間 9 月 14 日午後 6 時) に英国科学誌「Nature Communications」でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

DNA や RNA を扱った核酸ナノテクノロジーは細胞の機能を変えうる技術であり、これからの医療において大いに期待される分野です。これまで、DNA を基本にした DNA ナノマシン^{注3}は開発されており、細胞の検出や化学反応の制御などに使われています。RNA ナノマシンにおいては、RNA の持つ特徴的な高次構造により、多様なナノ構造体が構築できることが期待され注目を集めています (Ohno H. *et al.*, *Nat. Nanotech.*, 2011, Osada E. *et al.*, *ACS Nano*, 2014, <http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/140819-114824.html>)。

これまでいくつかの核酸ナノマシンが構築され報告されていますが、哺乳類の細胞内で機能するナノマシンの開発は未知であり、標的タンパク質を検知して、精密に集積させることによって細胞の運命を操作できる RNA ナノマシンの開発は達成されていませんでした。

3. 研究結果

1) 特定のタンパク質を検知して構造と機能を変化できる RNA ナノマシンを構築した。

キンクターン (K-turn) という構造を持った RNA に K-turn 結合タンパク質である L7Ae^{注4}を導入すると、約 60° の角度を持った安定した構造の RNA になります (図1)。この特性を用い RNA の構造変化を際立たせるため、2つの K-turn 構造と3つの RNA 二重鎖を繋げて、L7Ae の導入でトライアングル状の構造を持つ RNA を構築しました (図2)。これらの結果より、RNA-タンパク質相互作用により、RNA 構造がダイナミックに変化し、RNA 上にタンパク質を集積できることが分かりました。

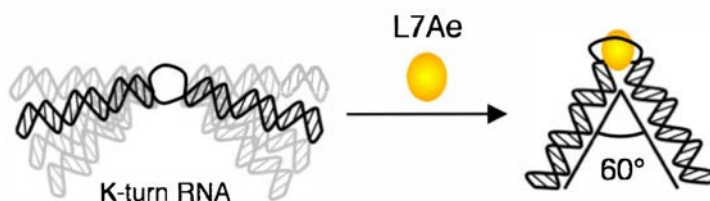


図1 結合タンパク質 L7Ae と結合して構造変化する K-turn RNA

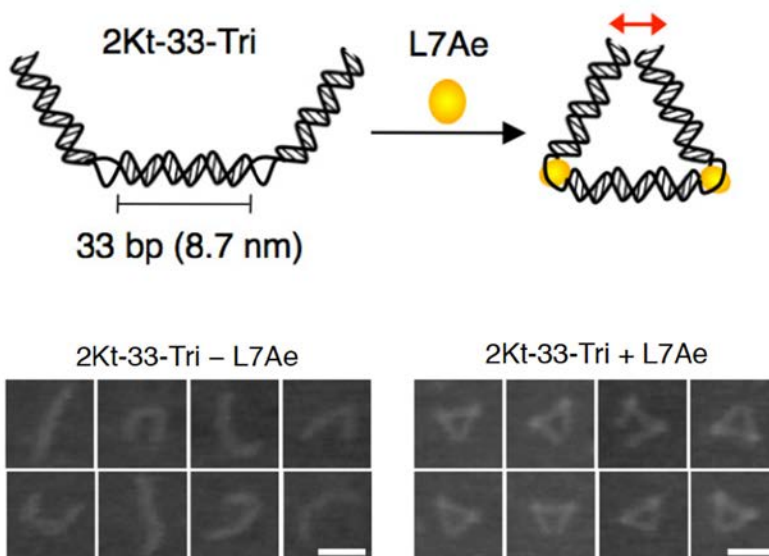


図2 3つに連なる RNA 二重鎖が L7Ae の導入でトライアングル状の構造変化になる様子
下図は原子間力顕微鏡 (AFM) による観察像 (スケールバーは 20nm)

2) 構築した RNA ナノマシンを使ってタンパク質を精密に集積し、細胞死を操作する方法を確立した。

集積するとアポトーシス^{注5}を促進するタンパク質である Casp-8 を L7Ae に取り付け (L7Ae-dCasp-8)、RNA とタンパク質の相互作用で Casp-8 の機能を操作できる設計にしました (図3)。Casp-8 が機能するには、多数のタンパク質を集積させる必要があるため、14 個の K-turn を導入し、トライアングル状の RNA ナノ構造が連なるようにした RNA (14Kt-33-Tri) を設計しました。原子間力顕微鏡でタンパク質を集積する RNA ナノマシンが構築されたことを確認し (図4a)、その RNA ナノマシンと L7Ae-dCasp-8 を産生する mRNA をヒーラ細胞^{注6}に導入して、24 時間後の細胞の変化を位相差顕微鏡とフローサイトメトリー^{注7}で解析しまし

た。すると、ヒラ細胞内で RNA ナノマシンが機能し、明らかに細胞死を促進していることが分かりました (図 4b)。比較のため、L7Ae と相互作用しない変異体 RNA (rcKt) を用いた場合の同実験では、細胞死は促進されることなく、細胞が生き残っていることが確認できました (図 4c)。これらの結果より、構築した RNA ナノマシンが細胞内でタンパク質との相互作用によって細胞死を操作できる機能を持つことが分かりました。

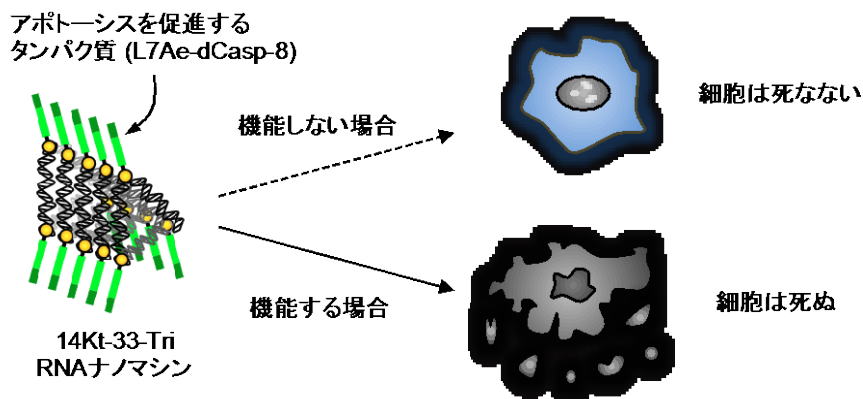


図 3 RNA ナノマシンによって細胞死を操作する方法

目的のタンパク質と相互作用し、トライアングル状の RNA 構造体が構築されて Casp-8 が機能する場合は細胞は死に、目的のタンパク質との相互作用がなく RNA 構造体が構築されない場合は Casp-8 が機能しないので細胞は死なない。

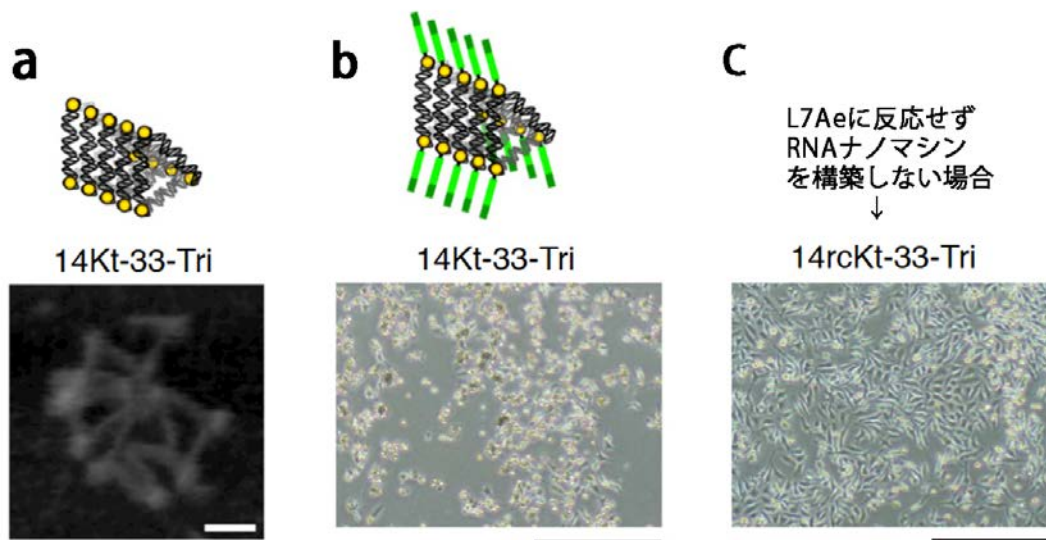


図 4 RNA ナノマシンによって細胞死を操作している様子

a. L7Ae によって構築されたトライアングル状の RNA 構造体を示す原子間力顕微鏡による観察像 (スケールバーは 10nm) b. RNA ナノマシンによって細胞死が促された様子を示す顕微鏡画像 (スケールバーは 500 μ m) c. L7Ae に反応せず RNA ナノマシンを構築しない場合の細胞死が促されていない顕微鏡画像 (スケールバーは 500 μ m)

3) RNA ナノマシンを使い、細胞内のタンパク質 (Lin28A) を検知して細胞死のシグナルを精密に操作できた。

Lin28 タンパク質は、様々ながん細胞や幹細胞で働くことが知られており、その検出技術の開発が注目されています。

Lin28A と相互作用するよう、RNA ナノマシン (9Kt-33-Tri) の一部 (K-turn RNA) を pre-let-7d (let-7d マイクロ RNA 前駆体^{注8}から由来する RNA) で置き換え、新たな RNA ナノマシン 9pre-let7d-33 を構築しました。また細胞死のシグナルを制御するために Lin28A に Casp-8 を繋げることにより Casp-8 が機能するように設計しました。この RNA ナノマシンは細胞に内在する Lin28A と結合すると、Lin28A-dCasp-8 が結合できなくなるため、細胞死のシグナルが抑制されて細胞死を招きません。RNA ナノマシン (9pre-let7d-33) が Lin28A が存在しないときに細胞死を促進していることをヒラ細胞で確認した後 (図 5 a)、Lin28A を導入した場合のヒラ細胞では RNA ナノマシン (9pre-let7d-33) が細胞死を抑制していることを確認しました。さらに、元々 Lin28A が含まれるヒトの iPS 細胞で同様の実験をし、細胞死が抑制される同様の結果を得ました (図 5 b)。この実験結果によって、L7Ae だけでなく、Lin28A との相互作用によって細胞死を操作することが可能な RNA ナノマシンが構築できました。

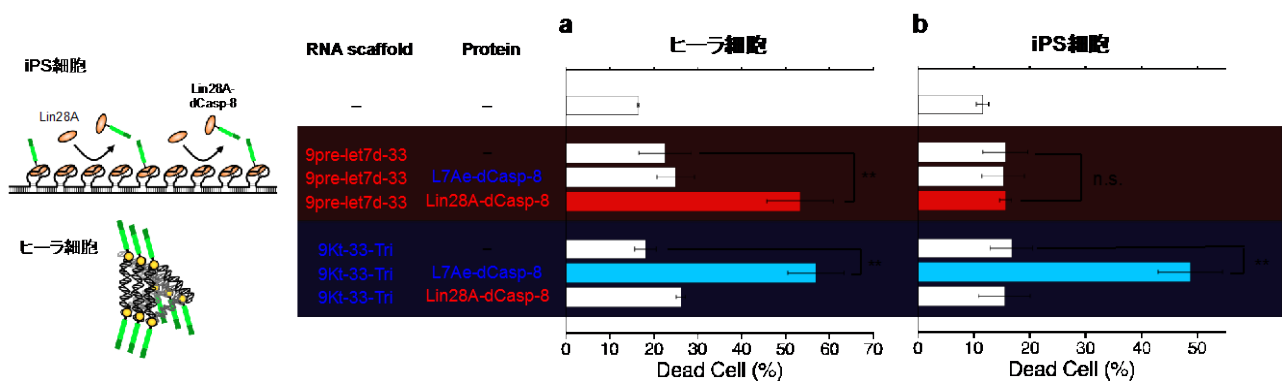


図 5 二つの RNA ナノマシン (9pre-let7d-33 と 9Kt-33-Tri) が細胞死を抑制/促進している実験結果

- ヒラ細胞に両 RNA ナノマシンを入れた結果。Lin28A-dCasp-8 と 9pre-let7d-33 及び L7Ae-dCasp-8 と 9Kt-33-Tri の組み合わせで細胞死を促進している。
- 元々 Lin28A が細胞内に含まれるヒトの iPS 細胞に両 RNA ナノマシンを入れた結果。Lin28A-dCasp-8 と 9pre-let7d-33 では細胞死が抑制されている。

4. まとめ

本研究グループは、RNA とタンパク質の相互作用によって生じる RNA の構造変化やタンパク質の集積を利用して RNA ナノマシンを構築し、哺乳類の細胞内において、RNA ナノマシンを使って特定のタンパク質を検知し、ナノメートルサイズの距離に集積させ、細胞死を精密に操作することに成功しました。

特定のタンパク質と結合し、機能する RNA ナノマシンは、ナノメートルスケールで構造を制御し、細胞死のシグナルを制御できるため、目的の細胞を精密に選別し、死滅させることができる画期的な手法です。さらに、合成 RNA の導入のみで、標的細胞内において RNA ナノマシンが構築できるので、遺伝子を傷つけるリスクが低く、安全性と有効性に優れています。このような合成 RNA ナノマシンの技術は、遺伝子の発現シグナルやタンパク質を検知したり、RNA の構造や機能の変化を誘導したり、細胞の運命を操作したりする「RNA 分子ロボット」として今後発展することが期待できます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

Protein-driven RNA nanostructured devices that function *in vitro* and control mammalian cell fate

○ ジャーナル名

Nature Communications

○ 著者

Tomonori Shibata,¹ Yoshihiko Fujita,¹ Hirohisa Ohno,¹ Yuki Suzuki,^{2,+} Karin Hayashi,¹ Kaoru R. Komatsu,¹ Shunsuke Kawasaki,¹ Kumi Hidaka,² Shin Yonehara,³ Hiroshi Sugiyama,^{2,4} Masayuki Endo,⁴ and Hirohide Saito^{1,*}

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門
 2. 京都大学 大学院理学研究科 化学専攻
 3. 京都大学 大学院生命科学研究科
 4. 京都大学 高等研究院物質-細胞統合システム拠点
- + 現所属：東北大学 学際科学フロンティア研究所

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- ・ 日本学術振興会 科学研究費補助金 「若手研究（B）」
- ・ 文部科学省 新学術領域研究 「分子ロボティクス」
- ・ 日本学術振興会 科学研究費補助金 「基盤研究（S）」
- ・ 公益財団法人 内藤記念科学振興財団
- ・ キヤノン財団
- ・ 公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団

7. 用語説明

注 1) LIN28A

特定の種類の細胞内に存在するタンパク質であり、細胞の初期化や幹細胞の維持に関わる。ヒト iPS 細胞は、Lin28A を高発現している。初期化遺伝子の一つである *Lin28* によって符号化される。

注 2) 核酸ナノテクノロジー

核酸（DNA や RNA）を用いて、物質をナノメートル（nm, 1nm=10⁻⁹m）の領域すなわち原子や分子のスケールにおいて操作する技術のこと。

注 3) DNA ナノマシン

DNA 同士の相互作用などを使って DNA の塩基配列を調整し、特定の機能を操作できるようにしたナノサイズの装置。例えば、がん細胞を検知して抗体を放出する DNA ナノロボットなどが開発された。

注 4) L7Ae

古細菌リボソーム大サブユニットに存在するたんぱく質の一つであり、リボソーム構築に必須の因子であるとともに、RNA 塩基の修飾や、mRNA への結合など、複数の機能を担う。

注 5) アポトーシス

細胞死の 1 つで、細胞内の何らかの異常に反応して起こるプログラムされた細胞死。発生の過程で不要となった細胞の除去などにも利用されている。

注 6) ヒーラ (HeLa) 細胞

ヒト由来の最初の細胞株。ヒト子宮頸がんから分離され株化された細胞で、世界中で広く利用されている細胞の 1 つ。

注 7) フローサイトメトリー解析

流動細胞計測法。レーザー光を用いて光散乱や蛍光測定を行うことにより、水流の中を通過する単一細胞の大きさ、DNA 量など、細胞の生物学的特徴を解析することができる。

注 8) *let-7d* マイクロ RNA 前駆体

遺伝子 *let-7d* を持つマイクロ RNA 前駆体 (マイクロ RNA になる前の RNA 分子)。Lin28 は、*let-7* miRNA 前駆体に結合し、ウリジン付加という作用をすることが分かっている。