

## ICORP「RNA シンセティック・バイオロジー」プロジェクト

### 追跡評価報告書

#### 総合所見

シンセティック・バイオロジー（合成生物学）とは、生体内で機能する分子や制御回路を人工的にデザインし、それを用いて細胞機能を人為的に制御するシステムを創出し、さらにそれらを医療技術などに応用することを目指す新しい研究分野である。本プロジェクトでは、日本側の井上研究総括のリボザイムに関する RNA の基盤研究と、フランス側の Westhof 研究総括のバイオインフォマティクスを基盤とした RNA の構造生物学を組み合わせ、RNA 機能分子による新しい人工的な制御技術を構築しようという挑戦的なものであった。本プロジェクト期間中に、すでに自然界の RNA モチーフと相互作用タンパク質を利用した RNP 翻訳制御スイッチ及び RNP ナノ構造体を構築するといった優れた成果が得られていたが、本プロジェクト終了後にその成果を大きく展開させ、特定の細胞の標識・分離・選別などを行える実用的な技術に成熟させた。特に iPS 細胞分化過程での細胞種の選別技術は、本プロジェクト発の研究成果が、我が国発の iPS 細胞研究に結びついた点で特筆に値する。これらの成果は、国際一流誌に多数論文発表されており、世界的にも大きなインパクトを与え、「RNA シンセティック・バイオロジー」という新たな研究分野を開拓し、牽引する役割を果たしていると高く評価できる。また本プロジェクトは、若手研究者の育成にも大きな役割を果たした。特に井上研究総括からこの研究を引き継ぎ、その後京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 教授に就任した斎藤博士は、我が国の合成生物学のリーダーとして国際的に活躍している。またフランス側の Westhof 研究総括が、日本側の若手研究者と交流し重要なアイデアを与えたことを考慮すると、この国際共同研究という形態が、研究の遂行と若い研究者の育成に大きな役割を果たしたと判断できる。

以上のように、本プロジェクトの研究成果は、その後の後継者による継続研究の発展を導き、世界の RNA 合成生物学研究の進展に大きく貢献した点で、極めて高く評価できる。

#### 1. 研究成果の発展状況や活用状況

##### (1) プロジェクト終了後の研究の継続、発展

本プロジェクトでは、研究期間中に RNA モチーフと相互作用タンパク質を材料とした合成生物学によって、オリジナルな二つの成果を得た。一つは、天然 RNA モチーフであるキンクターンとその相互作用タンパク質を利用した翻訳スイッチの開発である。二つ目は、その天然 RNP をモジュラーユニットとして組み合わせて設計した三角形の RNP ナノ構造体の作製である。これらの成果は、いずれも RNA モチーフをもとに人工的にデザインして作り上げ

られた機能分子装置のプロトタイプとも呼べるものであり、本プロジェクトの研究成果として高く評価された。一方で、合成生物学の真価は、人工的にデザインされた機能分子装置が、実際にどのように活用できるかを示すことによって判断できる。

本研究は、プロジェクト終了後に、井上研究総括の科研費（基盤 S）研究を経て、全面的に斎藤グループリーダーに引き継がれ、さらなる合成生物学的な発想を柔軟に取り入れ、多くの研究成果に結びついた。またその一部は、細胞の質的評価技術として活用され始めている。例えば、翻訳スイッチ効率の人為的コントロールや、インバータスイッチ等の複雑な制御回路の設計、細胞内のマイクロ RNA に作用する人工 RNA スwitch の構築などが挙げられる。特にこの人工 RNA スwitch は、iPS 細胞の分化段階に応じた識別・分離・除去等に活用され、iPS 細胞から分化させた細胞群の質を高める成果に繋がっている点が高く評価できる。一方で、RNP ナノ構造体の成果からは、高速 AFM を用いた構造体の構造変換過程の一分子観察、標的乳がん細胞に選択的に結合して細胞機能を制御できる RNP ナノ構造体の開発、さらには RNP ナノ構造体の各頂点に複数因子を一定距離間に提示することで細胞機能を制御する手法が開発された。また元々の三角形だけではなく正方形の構造体の作製にも成功し、そのバリエーションが増えてきている。こうした核酸を用いた人工的な分子形状デザインは、DNA オリガミなどに代表されるように、近年注目を集めているが、本研究によって生み出された RNP 構造体のデザインは、世界的にもあまり例がなく、オリジナリティの高いものと考えられる。本プロジェクト期間中には、論文発表が 15 報であったが、終了後には 26 報が発表されており、Nature Communications など一流誌での論文発表もなされている。

## (2) 相手国チームとの交流の効果

相手国の Westhof 研究総括(仏 CNRS)は、バイオインフォマティクスに基づく RNA 分子構造研究の世界的権威であり、本プロジェクトでの RNP 分子設計については、井上研究総括が率いる日本グループが実験的に、一方で Westhof 研究総括らのフランスグループが理論的にアプローチすることによって、両者の利点を最大限に活用して、得られたデータを相互補完し、それに立脚したさらなる解析が展開できる理想的な構成となっている。合成生物学による機能分子デザインの RNA 素材として、古細菌 box C/D snoRNA のキックターンモチーフとリボソームタンパク質 L7Ae との相互作用の有用性を選択したことが、プロジェクト成功への大きな一歩であったが、このモチーフの有用性に示唆を与えたのは、Westhof 研究総括のアイデアであった。よって、この時点で二国間チームが共同でプロジェクトを推進した力は十分発揮されたといえる。また実際に、本プロジェクト期間中に Westhof 研究総括が 3 回来日し、井上研究総括と斎藤グループリーダーがそれぞれ 2 回フランスを訪問、さらには日本側の若手研究員が Westhof 研究室に 9 ヶ月滞在し、活発な交流が行われたことが、多く

の研究成果を上げたことの一因と考えられる。本プロジェクト終了後にも、Westhof 教授との継続的な協力関係が維持されて、本プロジェクトで培った研究成果をさらに発展させたことも、Westhof 教授の協力が有効であったと考えられる。

## 2. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的及び経済的な効果・効用及び波及効果

### (1) 科学技術の進歩への貢献

本プロジェクト期間中の主な研究成果として、まずフランス側の Westhof 研究総括のアイデアによるキクタン RNA モチーフと L7e タンパク質の組み合わせを起点にデザインされた人工 RNA スイッチの作製が挙げられる。さらに、この基盤システムを発展させ、shRNA を用いた人工 ON スイッチの開発、複雑なフィードバック回路の開発といった研究成果を挙げた。これらは、上記の RNP スイッチの標的遺伝子を、蛍光蛋白質やアポトーシス制御蛋白質になるようにデザインすることにより、それらの機能タンパク質の発現を人為的に制御し、それによって細胞運命を制御したり、それらを選別したりする応用を見据えた段階にまで発展した。

本プロジェクト終了後、上記のプロジェクト研究成果はさらに大きく展開した。特に斎藤グループリーダーが、京都大学 CiRA に移籍してから開発した特筆すべき成果として、マイクロ RNA による人工 RNA スイッチの開発が挙げられる。細胞内のマイクロ RNA を入力信号とすることで、細胞内状態が反映したマイクロ RNA の量的変化を検知し、それに従って細胞運命をコントロールすることが可能となった。これによって、特定のマイクロ RNA を発現する標的がん細胞のみに細胞死を誘導することや、iPS 細胞の分化状況に応じて未分化細胞のみを選別・除去することや、カスケードやインバータといったより複雑な RNA 人工回路をデザインし、実際にそれを働かせることにも成功した。これらの研究成果は、マイクロ RNA などの自然界に存在する RNA 制御の仕組みを十分吟味した上で有効活用したものであり、アイデアだけにとどまらず、それを実現した点は高く評価できる。

一方で、もう一つの研究成果として、RNP 形状をもとにして分子形状をデザインする方法を考案し、安定な三角形構造を有する RNP ナノ構造体を創出したことが挙げられる。この研究成果についても、本プロジェクト終了後も高速 AFM により、ナノ構造体の生成の過程を動的にとらえることに成功した。このナノ構造体は、一定の距離間に特異的なタンパク質を配置させることが可能である。そのためこのナノ構造体の頂点上で機能する蛋白質を人工的に提示することによって、細胞機能を制御することにも成功した。また、これらの RNP ナノ構造体が、RNA 単独の構造体よりも RNA 分解酵素に対して極めて安定であることを見出し、このナノ構造体が今後細胞内の機能性デバイスとして利用できる可能性を示した。

本プロジェクト終了後の研究成果は、Cell Stem Cell、Nature Biotechnology (MIT グル

ープとの共同)、Nucleic Acids Research 等の一流誌に発表されている。また、多数海外招待講演や総説執筆等も行っており、それらは世界の関連研究に対する大きなインパクトを与えている。関連研究の進展全体を通じて、合成生物学の世界に RNA/RNP を素材とした「RNA シンセティック・バイオロジー」という新たな学問分野を切り開いたと判断でき、高く評価できる。

## (2) 応用に向けての発展

本プロジェクトの井上、Westhof 両研究総括は、共に純粋にサイエンティフィックな基礎研究者であり、本プロジェクトは産業応用を掲げたものというよりは、RNA 特性を利用した人工的機能分子デザインを行う基礎研究プロジェクトであった。しかし一方で、合成生物学は、生命現象の記述を目標とする従来の生物学とは異なり、何らかの応用目的で機能分子を人工的にデザインする側面を有している。本研究においても、基盤的な RNP 翻訳スイッチのデザインとその機能性の実証から端を発し、本プロジェクト終了後の継続研究によって、この機能分子を応用目的に活用できる段階まで漕ぎ着けたことは、大きな意味を持つと考えられる。

まず、キンクターン RNA と L7e タンパク質の組み合わせによる翻訳スイッチを細胞内で自在に操れるまでに系を成熟させた。さらに複雑な回路を細胞内で設計して自由に操ることができるようになった。これらの技術は、まずは生命科学の基礎研究のためのツールとして有用と考えられる。さらに情報入力にマイクロ RNA を活用し、出力側として蛍光蛋白質やアポトーシス関連蛋白質などの機能分子を用いることにより、細胞内の状況に応じてスイッチを制御し、細胞の運命制御、特定の細胞種を特異的に検出・分離することが可能になり、一つの汎用性のある技術として活用できる段階に達したと判断できる。こうした人工的な機能分子をデザインする数多くの研究の中で、自ら発案した分子スイッチを活用して、実際に応用可能な状態にまで系を整備した例は実際には稀であり、この点は高く評価できる。特に、本プロジェクトの実質的な後継者である斎藤が、京都大学 CiRA に移籍し、この研究所の重要課題である iPS 細胞の分化過程における細胞の品質管理に、本技術を活用したことは、我が国の研究戦略を考える上でも意義深く、今後の iPS 細胞研究にさらに重要な貢献をすることが期待できる。

医療応用する場合、RNA を素材として用いることには大きな利点がある。例えば、RNA は機能した後に一定時間で分解して消失することから、安全性の面でゲノム (DNA) に傷をつけるゲノム編集より優位性がある。しかし一方で、この技術を実際の治療に用いる際の問題点としては、標的 RNA と制御蛋白質の双方を外部から導入する必要があることが高いハードルとなる。長い RNA を高効率に合成することや細胞への導入効率を上げることも今後の

課題となるだろう。こうした問題は、核酸医薬分野の共通の問題点でもあるので、この分野の研究者との連携によって、さらなる発展が期待される。

もう一つの研究成果である RNP ナノ構造体については、本プロジェクト終了後に、この構造体が血清中でもある程度の安定性をもつことが示された。もともと三角形の構造体であったが、その後正方形の構造体が創出されるなど、今後その形のバラエティが増大できることが期待でき、さらに RNA 鎖長をコントロールすることによって、構造体の形状を自在にデザインすることも可能になることが期待される。また RNA ナノ構造体に、タンパク質や低分子化合物を同時に複数結合させ、生体内で空間的に定まった位置に提示することによって、遺伝子発現や細胞機能を制御できる新技術が開発できる可能性が期待される。

応用に用いる場合に重要なのは、知財権の確保である。本プロジェクトでは特許出願も意識的に進められており、日本国内に 6 件出願、うち 5 件が国際出願されている。登録まで至ったものも国内 4 件、米国・EU・中国で 3 ファミリー計 8 件ある。その中には基本となる「翻訳制御 RNP スイッチ」の特許も含まれており、今後、医療等に応用する際に基本特許が確保されているというのは極めて重要である。

### (3) 参加研究者の活動状況

本プロジェクトでグループリーダーを務めた斎藤は、本プロジェクト期間中に京都大学次世代研究者育成センターの特定准教授に就任し、PI として研究を展開する基盤を作ったが、その後京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)教授に転進し、我が国における合成生物学の旗手として、「細胞を創る」研究会の会長を務めるなど華々しく活躍している。もう一人のグループリーダーであった藤田と研究員であった大野は、現在京都大学 CiRA の斎藤研究室の特定拠点助教及び研究員として本プロジェクトから派生した研究に尽力している。また、本プロジェクト研究員であった遠藤は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の助教に就任し、RNA 関連分野の研究に携わっている。また本プロジェクトの初期に、京都大学の井上研究総括の助教として基盤形成に関わった井川は、その後九州大学大学院工学研究院の准教授を経て、富山大学大学院理工学教育部教授に転進し、今年度富山で開催された日本 RNA 学会の年会長を務めるなど、我が国を代表する RNA 研究者として活躍している。以上のように、本プロジェクトに参画していた研究者から、我が国の RNA 研究や合成生物学研究の中核を担う研究者が複数輩出されていることから、人材育成という面からも本プロジェクトは大きな役割を果たしたと言える。

### 3. その他

本プロジェクトは、今日までに多くの優れた研究成果を生み出した。これは一重に日仏両

国の研究総括の成果至上主義に陥らない高いレベルでの協力関係が有効に機能したこと、またグループリーダーに抜擢された若手研究者が恵まれた研究環境の中で大きな力を発揮したことによると考えられる。本プロジェクトは期間中の研究成果を、終了後にさらに発展させ、極めて貴重な医療応用可能な技術までに発展させた。この成功の理由としては、大型の競争的研究費が継続的に得られたことも大きいと考えられる。さらに本プロジェクトは、もともと産業応用を目指した研究ではなかったが、iPS細胞関連の産業応用が期待される成果が生まれてきている。このように、我が国独自の優れた技術を、我が国が推進する別の最新技術と融合させることは、今後これらの研究発展に相乗的な効果を生むことが期待でき、本プロジェクトを起点とした道筋は一つの良い成功例となるだろう。最後に、海外のエスタブリッシュした一流研究者と信頼関係を築き、我が国のオリジナルな学術研究の発展を支援する制度は、今後も重要であると考えられる。