

## ICORP RNA シンセティック・バイオロジープロジェクト事後評価（最終評価）報告書

【研究総括】 井上 丹 （京都大学大学院 生命科学研究科／教授）  
Eric Westhof （ルイパスツール大学構造生化学講座／教授、  
CNRS（仏国 国立科学研究所）分子細胞生物学研究所／所長）

### 【評価委員】（五十音順）

饗場 弘二 （委員長；鈴木医療科学大学薬学部／教授）  
山東 信介 （九州大学 稲盛フロンティア研究センター／教授）  
菅 裕明 （東京大学 大学院理学研究科 化学専攻／教授）  
廣瀬 哲郎 （産業技術総合研究所 バイオメディシナル情報研究センター／  
研究チーム長）

## 評価の概要

「シンセティックバイオロジー」とは、分子生物学、生化学の研究成果に立脚して、生体内で機能する人工分子のデザインおよび合成をおこない、細胞機能を自在に制御できるシステムの創成およびそれらの医療技術などへの応用を目指す新しい研究分野である。

ICORP RNA シンセティック・バイオロジープロジェクトでは、日本側研究総括である井上丹博士がこれまでに実施してきた RNA とタンパク質相互作用（RNP 相互作用）研究の経験を生かし、ユニークな機能を有する人工 RNP 創製のための基盤技術を確立し、さらにはこれを利用した医療応用に資する細胞機能制御技術の開発を目指している。RNA モチーフと相互作用タンパク質のセットによる RNP 合成生物学は、未だ研究例がほとんど存在しておらず、挑戦的なプロジェクトと言えるが、自然界の最も基盤的な分子装置が RNP であることを考えると、これらを人為的にデザインし細胞活性をコントロールするという発想は理にかなったものであり、今後の合成生物学に新しい研究潮流を形成するものと期待できるプロジェクトである。

これまでに、RNP モチーフを活用してヒト細胞内で特定のタンパク質に応答する翻訳制御系を構築し、これをもとに環境変動に応答して細胞の生死を制御できる様々な RNP システムを開発するとともに、RNP を利用して RNA 単独では形成不可能な構造体の構築に成功している。これらはオリジナリティとクオリティが高く、ヒト細胞の認識や機能制御など複数の機能を備えた RNP をデザインすることに成功したと言える。今後、RNP を活用した新しい検査薬、治療薬の開発などの医療応用への基盤になりうるものと期待できる。

なお研究の推進にあたっては、若手研究者、技術者を適切に結集するなど井上研究総括のリーダーシップが発揮されている。加えて、Eric Westhof 博士（ルイパスツール大学、CNRS 分子細胞生物学研究所）との研究交流より、本プロジェクトの研究成果のキーポイントである RNP モチーフの選択がなされるなど ICORP の特徴が有効に活かされていると言える。

以上を総合して、本 ICORP プロジェクトは優秀な研究水準にあると認められ、戦略目標「医療応用等に資する RNA 分子活用技術（RNA テクノロジー）の確立」に資する成果が得られたと判断する。

## 1. 研究プロジェクトの設定・運営、および相手国機関との研究交流実施状況

### 1-1. プロジェクトの全体構想

シンセティックバイオロジーは分子生物学、生化学の研究成果に立脚して、生体内で機能する人工分子のデザインおよび合成をおこない、細胞機能を自在に制御できるシステムの創成、および、それらの医療技術などへの応用を目指す新しい研究分野である。本プロジェクトは、天然に存在する RNA-タンパク質複合体 (RNP) をもとに、ユニークな機能を有する人工 RNP 創製のための基盤技術を確立し、さらにはこれを利用した細胞機能制御技術の開発を目指している。井上研究総括のこれまでの RNA とタンパク質相互作用 (RNP 相互作用) 研究の経験を生かし、その相互作用をシンセティックバイオロジーに応用することで、独自性を高めた研究を目指している。共同研究先である Eric Westhof 博士 (ルイパスツール大学・CNRS 分子細胞生物学研究所) は RNA 立体構造予測などバイオインフォマティクス分野で活躍している研究者である。実験-理論両面から相互補完的な協力体制を築き、新しい RNA 分子活用技術を創製する試みは独特の切り口を盛り込んだ挑戦的・創造的・融合的なプロジェクトといえる。

### 1-2. プロジェクトの枠組みや研究体制、および研究活動の状況

本プロジェクトは生産科学開発研究所 (京都市左京区) を研究実施場所とし、研究チームは比較的小規模であるが、シンセティックバイオロジー、分子生物学、生化学、構造生物学、バイオインフォマティクス、細胞生物学など異分野の若手研究者、技術者を適切に結集して目標を実現するための研究体制が構築されている。グループリーダー、メンバーを適時入れ替えるなど、研究進展状況に応じて柔軟に対応しており、グループ間の有機的な連携が実現できたのは研究総括のリーダーシップによるところが大きい。特にグループリーダーに若手研究者を起用するとともに、ポストドクあるいは学生の斬新なアイデアを生かしつつ研究を推進していることが伺える。

プロジェクト発足当時に掲げた2つの達成目標を着実に成果に結びつけている点は、高く評価できる。得られた成果は、両研究総括のオリジナルな発想と試行錯誤の結果生まれたものであり、高品質な論文掲載にも繋がっている。本 ICORP プロジェクトのサイエンティフィックな成果としては、申し分ない成果といえる。一方で長い目で考えた際に、本成果が独自性、特殊性から一般的な重要知見に結びつくかどうかを、今後見極めるための研究展開が望まれる。その後の応用技術への進展のためにもこの点が重要である。

### 1-3. 相手国機関との研究交流実施状況

本プロジェクトの相手国機関である仏国・ルイパスツール大学構造生化学講座教授・CNRS 分子細胞生物学研究所所長の Eric Westhof 博士のグループは、バイオインフォマティクスに基づく RNA 構造研究の世界的なリーダーである。このグループとの共同研究は機能性 RNP 分子設計を実験的、理論的側面から相互補完する非常に優れたものであると言え、Westhof 博士が専門としている RNA 構造のモデリング技術が本プロジェクトの中に随所で有効活用されている。

研究交流の評価できる点として次の2点が挙げられる。第1には翻訳制御機能をもつ RNP モチーフ選定に際し、Westhof グループから重要なアイデアが提案され、これがプロジェクト進展に大きく寄与したことである。具体的には、本研究で主に利用された L7Ae とキンクターン RNA との相互作用の有用性についての助言と提案がされたことであった。

第2には、RNA構造の専門家である研究員が Westhof 研究室に1年弱滞在し、RNAとタンパク質の配列情報およびRNAの2次構造からみたRNA-タンパク質相互作用の解析、さらにはこれらをもとにした新たなRNP分子デザインの研究を実際に展開したことである。

上記の有機的な交流に向けて井上研究総括やグループリーダーがフランス側 Eric Westhof 教授を訪問し、また、Eric Westhof 教授を数度にわたって招聘するなど研究進展に向けた意思疎通を図ってきたことが認められる。

今後、実験データと理論的解析のフィードバックを密に行うことで、細胞で機能する汎用的なRNP設計指針の確立へ向けた研究が進展することを期待したい。

〔研究プロジェクトの設定および運営〕 a（的確かつ効果的であった）

〔研究活動の状況〕 a（良好な研究展開を示した）

## 2. 研究成果

### 2-1. 信号伝達 RNP 研究グループ

信号伝達 RNP 研究グループではヒト細胞内で特異的、かつ、高親和的に機能する RNP モチーフをもとに、入力タンパク質の発現に応答する新しい翻訳制御技術を構築し、それを基盤として細胞内環境に응答して細胞の運命や機能を制御できる新しいシステムを開発することを目指している。これまでに DNA 上に制御配列を組み込んだ遺伝子発現スイッチは数多く存在するが、RNA レベルでの発現スイッチで実用的なものはほとんど存在していないため、この目標設定は適切かつ挑戦的であるといえる。主な研究成果としては以下にまとめられる。

(1)古細菌のリボソームタンパク質 L7Ae とそれに特異的に結合するキンクターン RNA の相互作用を利用して、試験管内で異なる mRNA の翻訳抑制と活性化を同時に制御できるシステムの構築に成功したこと

(2)(1)の翻訳制御系をヒト細胞内で働かせることに成功したこと

(3)L7Ae とキンクターン RNA の相互作用を利用し、L7Ae に応答して細胞のアポトーシスの誘導に成功したこと

人工翻訳不活性化(OFF)RNP システム構築では、キンクターン配列を組み込んだ mRNA の翻訳を L7Ae タンパク質の発現で不活性化する OFF システムを構築し、ヒト細胞内にて機能する事を実証している。

人工翻訳活性化(ON)RNP システム構築では、目的遺伝子の発現を活性化する ON スイッチの開発に取り組み、RNP 形成を利用した siRNA 発現制御を可能にする汎用性が高い手法を提案し、ヒト細胞内における RNP 型 siRNA-ON スイッチの実現に初めて成功している。

これらの ON/OFF-RNP スイッチの実現により、細胞運命を人工的に制御する RNP スイッチの構築も可能となり、これらを細胞アポトーシスネットワークに組み込む事で、ゲノムから発現されたインプットタンパク質に응答し、アポトーシスによる細胞の生死決定を人工制御することに成功している。

また、上記(1)~(3)の基盤的研究成果を発展させ、RNA-タンパク質相互作用による人工ネガティブフィードバック回路の設計と構築など、斬新な RNP システムの構築が可能であることを実証している。加えて、L7Ae-キンクターン RNA 以外にも、複数の RNP 相互作用モチーフを見出し、複雑な制御系をシンセティックバイオロジーとして設計し、実現するための基盤技術を生み出している。

以上をまとめると、独自のサイエンスに基づく RNP の開発から、ON/ OFF スイッチ設

計の確立、また、それらを用いた細胞の運命を決定する人工 RNP 回路の構築まで、基礎から応用まで着実に蓄積された優れた研究成果であり、RNP を利用した新しい翻訳制御システム構築の試みとして世界的にもインパクトを与えている。

今後更なる進展が期待できるが、本研究のアプローチに一般性をどこまで出せるかが課題となる。現在の系では、標的 RNA と制御蛋白質の双方を外部から導入しなければならないことから、いかに内在性因子に依存した系に変換させていくかが重要であり、癌治療などの医療応用を指向した場合には、この点は避けては通れないと考えられる。本プロジェクト期間内にも、本課題克服に向けた取り組みを精力的に進めており、その実現を期待したい。

## 2-2. 多機能性 RNP 研究グループ

多機能性 RNP 研究グループでは、構造既知の RNP を独立した構造単位（モジュール）として捉え、RNA 独自の構造と組み合わせた RNP ナノ構造体の構築を実現するとともに、これら RNP ナノ構造体を利用した応用を目指し、研究を実施している。これらの研究目標は、極めて斬新でオリジナリティが高いといえる。主な研究成果は、以下にまとめられる。

- (1) RNA を 60 度に折り曲げる RNP モジュールを利用したナノ構造体を設計し、三角形の構造を持つ RNP ナノ構造体の構築を実現したこと
- (2) RNP モチーフのカットアンドペーストをもとにしたデザインを用い、種類の異なるタンパク質を微小空間内に精密に配置することに成功したこと
- (3) RNP 正三角構造体の各頂点にタンパク質を配置できる基盤技術を確立したこと
- (4) リボソームタンパク質 L1 と L1 結合 RNA モチーフを使用した正方形の構造体を構築したこと

信号伝達 RNP 研究グループで検証されている古細菌のリボソームタンパク質 L7Ae とそれに特異的に結合する RNA モチーフの複合体中では RNA が 60 度に曲げられることに着目して RNA をデザインし、2 本鎖 RNA と L7Ae からなる正三角形構造体の構築に成功した。これは、基礎研究として非常に優れた成果である。当初計画に含まれておらず、研究の展開の中で生まれてきたアイディアによるもので、当初目標や計画とは異なる新たな研究の展開の好例と言える。その設計のしやすさから、三角形の辺の長さを変えたナノアーキテクチャーを合成できる可能性がある。RNA 構造予測を専門にする Eric Westhof 博士との議論を通して開拓した構造体であり、ここでも ICORP の利点が示されていると言える。RNA のみでは形成できない三角形構造を初めて実現できた点は高く評価できる。また、同じコンセプトで三角形以外の RNP 構造を作成可能であることを実証しており、RNP モチーフを部品とする分子デザイン法が有用であることを示した。

この作出した分子を何らかの形で活用できるとさらに望ましいが、RNA の基礎研究者のアイディアだけでは限度があると考えられ、今後様々な分野の研究者に対して、この RNA 分子デザインの成果を発信することが重要である。そのような取り組みにより思いもかけない活用法が考案される可能性がある。

また、複数の RNP を利用して異なるタンパク質を 3 次的に精密に配置させることに成功しており、天然に存在する RNP をもとに、ユニークな機能を有する人工 RNP を創製することが可能であることを見事に示した点で、関連分野を先導しうる、新たな科学技術のシーズ、将来の新しい流れを生み出したといえる。認識分子の空間配置と細胞認識能の評価を進めるなど、斬新な基盤技術に基づいた基礎研究も着実に進んでおり、標的細胞の選別や機能制御など、様々な応用展開を期待させる成果である。

以上2つのグループの研究成果および所見を記述してきた。両グループのテーマにおいて最も基礎となるのは細胞で機能する RNP モチーフの選択であった。相手国機関との共同作業を通じ、古細菌が持つリボソームタンパク質の1つである L7Ae と L7Ae に特異的に結合する RNA であるキンクターン RNA に着目がなされ、この RNP の選択が本研究成果を生み出した最も大きな要因の1つであったと言える。国際共同研究 ICORP プロジェクトとして実施する意義を見いだすことができる。

RNP モチーフを活用してヒト細胞内で特定のタンパク質に応答する翻訳制御系の構築や、これらの翻訳制御系を利用して、ヒト細胞内で環境変動に応答した細胞の生死を制御できるシステムを開発したこと、RNP を利用して RNA 単独では形成不可能なナノ構造体を構築することに成功したこと、などは斬新でオリジナリティが高く、大きなインパクトを与える研究成果である。

また、これらの基盤的成果をふまえ、ヒト細胞の運命制御など複数の機能を備えた RNP をデザインすることに成功した。このことから、今後、RNP を基盤とする新しい検査薬、治療薬の開発などの産業応用、医療応用への道が開かれたといえる。これらが、10~15年後には、新たな産業的・経済的価値や社会的価値を生み出し、国民生活を発展せしめるものへと繋がるかどうか、現段階で予測することは決して容易ではないが、その可能性はある。

主な成果は RNA の機能研究から脱して、それをを用いた応用研究の領域に入りつつある。RNP スイッチによる細胞死の人為的誘導制御を可能にするなど、合成生物学ならではのデザイン分子をモデル系に適用する事に成功しており高く評価できる。さらには、RNA-タンパク質間相互作用を基盤とする人工フィードバック回路の作製も行っており、今後の応用技術開発の展開としては、既に作成に成功した三角形 RNA 共々、様々な分野の研究者にこの成果を知ってもらい、新たな発想によってこれらの成果が、何らかの実用化に繋がることを願う。

【研究成果（科学技術的側面）】 a+（成果として秀逸である）

【研究成果（産業社会的側面）】 a（成果として良好である）

### 3. 総合評価

本プロジェクトは、天然に存在する RNA-タンパク質複合体（RNP）をもとに、生体内外で機能する人工 RNP のデザインおよび合成をおこない、細胞機能を自在に制御できるシステムを創成すること、および、それらの医療技術などへの応用を目指すことを目標に立案された。井上研究総括をはじめとする多様な研究背景を持つ研究者の独創的なアプローチ、また、フランス側 Eric Westhof 教授との有機的な連携により研究は順調に進展した。特に若手研究者をリーダーに起用し、将来本研究領域のリーダーとして活躍できる人材の育成も行っている。また、予備事後評価後は、指摘点に十分配慮し、柔軟な対応で目標実現に向けた研究の舵取りを行うなど、プロジェクト運営における研究総括の手腕は高く評価できる。

RNP モチーフを活用してヒト細胞内で特定のタンパク質に応答する翻訳制御系を構築したこと、これらの翻訳制御系を利用して、ヒト細胞内で環境変動に応答した細胞の生死を制御できるシステムを開発したこと、RNP を利用して RNA 単独では形成不可能な正三角形構造を構築することに成功したこと、などに象徴されるように、斬新でオリジナリティとクオリティが高い研究成果を挙げている。特に、RNP 三角構造体をデザイン合成した成果は、RNP の特性を利用した斬新なアイデアを形にしたものとして高く評価できる。

したがって、本プロジェクトは、基礎研究、基盤研究としては大きな成功をおさめつつあると評価できる。また、これらの基盤的成果をふまえ、ヒト細胞の運命制御など複数の機能を備えた RNP をデザインすることに成功したことから、今後、RNP を活用した新しい検査薬、治療薬の開発などの医療応用への基盤ができたともいえる。この意味で本プロジェクトは、応用研究としても評価できる。世界で過酷な競争が繰り広げられている領域ではあるが、RNP という視点からは独自性の高いスタンスを保っており、チームは今後も研究を大きく発展できる立ち位置にいる。

本プロジェクトの成果として、高いレベルのジャーナルへの論文発表がなされ、国際特許の出願状況も良好である。この期間のプロジェクト成果としては、申し分ないものと判断できる。また、残念ながら研究期間中に論文発表には至ってはいないが、今後、インパクトの高い論文として発表が期待できる優れた研究成果も出ている。

幸いにもポスト ICORP 研究として、井上総括の科学研究費 基盤 S が開始される。上記のような優れた成果が、単に独自、特殊な合成物に終始せず、合成生物学の中に新しい潮流を作るような成果に繋がるよう、今後の研究を更に発展させていただきたい。特にこれまでに開発した翻訳スイッチを有効活用できる生命現象の模索、新たな分子スイッチや多機能分子デザインのための有用な RNP モチーフの探索、多機能 RNP 分子の画期的な活用法、RNA のイメージング技術への応用などについて、プロジェクト終了後もさらなる進展があることを希望する。

以上を総合して、本 ICORP プロジェクトは優秀な研究水準にあると認められ、戦略目標「医療応用等に資する RNA 分子活用技術（RNA テクノロジー）の確立」に資する成果が得られたと判断する。

〔総合評価〕 A（戦略目標の達成に資する成果が得られた）