

京都大学	博士 (医科学)	氏名	川崎俊輔
論文題目	Synthetic mRNA devices that detect endogenous proteins and distinguish mammalian cells (内在性タンパク質を検出し細胞を識別する人工 mRNA デバイス)		
(論文内容の要旨)			
<p>生きた細胞の内部状態を識別し、所望の出力を行う人工生体分子の開発は、合成生物学の医療応用において重要な課題である。任意の入出力応答を実現するプログラマブルな機能を持たせるため、RNA を基盤とした人工分子デバイスが開発されている。また、RNA デバイスの標的細胞への直接導入は、ゲノム損傷のリスクが低いため、安全な細胞操作技術になりうる。これまでに、RNA デバイスの一つとして、細胞内で発現する特定のタンパク質を検知し、外来遺伝子の翻訳を制御する「mRNA スイッチ」が作製されている。mRNA スイッチは、mRNA の 5' UTR に特定のタンパク質と結合する RNA (アプタマー) 領域を持つ遺伝子スイッチである。このスイッチは、mRNA 上のアプタマーに標的タンパク質が結合することで、自身の翻訳を抑制する。原理的には、任意のタンパク質と結合するアプタマーを mRNA に組み込むことで、望んだタンパク質を検出し翻訳を抑制する mRNA スイッチが作製できる。細胞の種類や状態は、主にタンパク質によって決定されている。従って、標的細胞で特異的に発現するタンパク質の存在を検知し、その細胞運命を制御できれば、生命工学、医療分野において有用なツールとなりうる。しかしながら、これまでに、生きた哺乳類細胞の内在性タンパク質を検知できる mRNA スイッチは報告されておらず、mRNA スイッチの開発には、新たな設計原理が必要であると考えられた。</p> <p>本論文では、新たに発見した人工 mRNA スイッチの設計原理とその機能について報告する。第一に、mRNA に組み込むアプタマーの 2 次構造を安定化させることで、より高感度に標的タンパク質の検出が可能となった。この設計戦略は、天然に存在する RNA から抽出したモチーフ (スプライシング関連タンパク質 U1A、及び幹細胞マーカータンパク質 LIN28A に対するアプタマー) のみならず、人工的に取得されたアプタマー (転写因子 NF-<math>\kappa</math>B のサブユニット p50 に結合する人工 RNA) に対しても適応可能である。第二に、今回開発した mRNA スイッチは、内在のタンパク質 (U1A 及び LIN28A) 発現レベルで機能する。また、その翻訳抑制効率は、細胞内タンパク質発現量と相関することが観察された。第三に、今回開発した mRNA スイッチは、従来のプラスミド DNA による細胞導入法のみならず、ゲノム損傷のリスクが低い RNA トランスフェクション法であっても機能する。第四に、LIN28A を検出できる mRNA スイッチを細胞に導入することで、ヒト iPS 細胞と自発的に分化した細胞をフローサイトメトリー解析によって識別可能である。重要なことに、この mRNA スイッチは、LIN28A による内在マイクロ RNA の発現調節を阻害しないことが示唆された。</p> <p>これらの結果は、新たな人工 mRNA スイッチの設計方法を用いて、任意のタンパク質を検知する mRNA スイッチが作製できることを示唆している。特に、内在性タンパク質を検出する mRNA スイッチは、細胞種特異的に遺伝子発現を</p>			

制御できる。従って、ヘテロな細胞集団から目的の細胞のみを識別し、単離することが可能となる。このような手法は、今後の再生医療分野での活用が期待される。また、mRNA スイッチは、その翻訳抑制効率が細胞内タンパク質量と相関するため、生細胞内における目的タンパク質の発現量測定が期待できる。従って、今回開発したタンパク質応答性 mRNA スイッチは、生きた細胞の内部状態をタンパク質の発現状態に基づいて識別し、細胞機能をプログラムできる可能性を示した。

(論文審査の結果の要旨)

合成生物学の医療応用において、細胞内の状態を識別し、所望の出力を行う人工生体分子の開発は重要な課題である。本論文では、3 種類の内在性タンパク質 (U1A、NF- $\kappa$ B、LIN28A) を検出する mRNA デバイスの設計法とその機能について報告している。この研究において、mRNA デバイスの作製には、挿入するアプタマーの 2 次構造安定性が重要であることが明らかにされた。構造を安定化させたアプタマーを挿入した mRNA デバイスは、標的タンパク質に対する高い感受性と特異性を保持していることを多角的に証明している。加えて、mRNA デバイスは、濃度依存的な翻訳抑制能をもつことも示されている。このことは、mRNA デバイスを用いて、生細胞内タンパク質量を遺伝子改変の必要なく、簡便に測定できることを示唆している。さらに、LIN28A を検出する mRNA デバイスが、ゲノム損傷の危険性が低い RNA 導入法によっても機能することを示した。この知見を用いて、iPS 細胞と分化細胞を内在マイクロ RNA の発現調節を阻害することなく識別することにも成功している。この成果は、細胞表面マーカーに依存しない新たな細胞識別法を提供する点で、非常に意義深い。

以上の研究は、内在性タンパク質を検出できる高い感度と安全性を兼ね備えた実用的な mRNA デバイスの設計法を解明した点で、今後のバイオテクノロジー・医学研究の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 6 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降