

京都大学	博士（医科学）	氏名	小野 紘 貴
論文題目	Orthogonal Protein-Responsive mRNA Switches for Mammalian Synthetic Biology (哺乳類合成生物学に資する直交タンパク質応答型 mRNA スイッチ)		
(論文内容の要旨) <p>哺乳類細胞を用いた合成生物学分野において、生体高分子を人為的に改変することで遺伝子発現を制御するためのデバイスが開発されてきた。さらには、こうしたデバイスをモジュール的に接続することで人工遺伝子回路を構築し、遺伝子発現のタイミングや強度等を精緻に制御することが可能となる。タンパク質応答型 mRNA スイッチは、mRNA の 5'-UTR に RNA 結合タンパク質 (RBP) と相互作用する RNA 配列 (RBP 結合モチーフ) を挿入することで作製できる、RNA-RBP 間結合依存的に翻訳を抑制するデバイスである。このような RNA を基盤とするデバイスは、転写因子やリコンビナーゼを用いた DNA を基盤とするデバイスと異なり、細胞内に外来 DNA を送達する必要がないため、ゲノムの損傷リスクが少なく、安全に外来遺伝子の発現を制御する手法として有用である。しかしながら、翻訳を効率的に制御可能なタンパク質応答型 mRNA スイッチの数は限定的であり、それらを組み合わせた人工遺伝子回路の構築を阻む一因となっていた。</p> <p>本論文では RBP 結合モチーフおよび RBP の改変により、効率的に翻訳を制御可能なタンパク質応答型 mRNA スイッチの拡充を試みた。まず、バクテリオファージ MS2 由来 RBP (MS2CP) と、それに結合するモチーフ (MS2SL) からなるスイッチの改善を試みた。先行研究において RBP 結合モチーフの構造安定性が RBP による効率的な翻訳抑制に重要であることが示唆されていたことから、本研究では RNA 構造を安定化できる足場配列に RBP 結合モチーフを挿入することにより翻訳抑制効率の改善を試みた。2 コピーの MS2SL を足場配列に挿入したスイッチは、単に 1 コピーまたは 2 コピーの MS2SL を挿入したスイッチに比べ、より強い翻訳抑制を示した。加えて、MS2SL と高い親和性を持つ変異体は、野生型に比べ、より効率的に翻訳を抑制できた。次に、RBP 結合モチーフを足場配列に挿入する手法を用いて、シュードモナスファージ PP7 由来 RBP (PP7CP) とその結合モチーフ (PP7SL) からなる新たなスイッチの作製を試みた。その結果、PP7SL を足場配列に挿入したスイッチは、1 コピーまたは 2 コピーの PP7SL を挿入したスイッチよりも高い翻訳抑制効率を示した。さらに、ヒト U1A タンパク質に応答するスイッチの改善を試みた。これまで U1A を用いた遺伝子発現制御デバイスでは核局在シグナルを欠く変異体を使用されてきたが、今回野生型の U1A を用いることで、翻訳抑制効率を向上できることを見出した。</p> <p>続いて、タンパク質応答型 mRNA スイッチの直交性 (RBP-RBP 結合モチーフ間相互作用の特異性) を確認した。この特性は、遺伝子発現制御デバイスを組み合わせて人工遺伝子回路を構築する際に極めて重要である。今回作製したスイッチ 3 種類と既報のスイッチ 2 種類の直交性を検証したところ、これら 5 種類のスイッチは互いに高い直交性を持つことが示され、RNA を基盤とする人工遺伝子回路の構築に資することが示唆された。</p> <p>最後に、今回開発した 3 種類のスイッチが RNA の直接導入でも動作するかを検証した。これまでの一連の実験ではプラスミドベクターを用いて細胞内でスイッチと RBP を発現させており、本スイッチ群が真に DNA を使用せずに駆動するかどうか不明であった。そこで、スイッチおよび RBP をコードする mRNA を試験管内合成し哺乳類細胞に導入したところ、スイッチからの翻訳は対応する RBP の存在下で効率よく抑制された。</p> <p>本研究で作製した mRNA スイッチは、高い翻訳抑制効率と直交性を示し、RNA の直接導入法を用いても哺乳類細胞内で機能した。したがって、これらのスイッチは翻訳制御を基盤とした人工遺伝子回路の構築・拡張に貢献できる。今後 mRNA スイッチや RNA を基盤とした人工遺伝子回路は、細胞療法分野において安全かつ精密な細胞運命制御システムの開発に貢献することが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨) <p>タンパク質応答型 mRNA スイッチは、RNA 結合タンパク質 (RBP) と RBP 結合配列の相互作用依存的に翻訳を制御する人工 mRNA である。このような RNA を基盤とした遺伝子発現制御デバイスは、DNA を基盤とするデバイスに比べてゲノムへの挿入リスクが低く、安全に外来遺伝子の発現を制御する手段として有用である。また、タンパク質応答型 mRNA スイッチは、複雑な論理演算を実行可能な人工遺伝子回路を組み立てる際のパーツとして有望である。しかしながら、翻訳を効率的に制御可能なタンパク質応答型 mRNA スイッチの数は限定的であり、それらを組み合わせた人工遺伝子回路の構築を阻む一因となっていた。本研究では、まず RBP 結合配列および RBP にエンジニアリングを施すことにより、MS2CP および U1A タンパク質を利用した既存のタンパク質応答型 mRNA スイッチの機能改善に成功し、PP7CP タンパク質を利用した新規 mRNA スイッチの開発にも成功した。次に、本研究で報告した mRNA スイッチと既存の mRNA スイッチが、互いに干渉し合わない直交性を有するものであることを実証し、人工遺伝子回路の構築に資するパーツであることが示唆された。最後に、本研究で開発した mRNA スイッチが、プラスミド DNA からの過剰発現系を使用せずとも駆動するかどうかを、試験管内転写した mRNA の哺乳類細胞への導入系を用いて実証した。</p> <p>以上の研究は、人工 mRNA を基盤とした外来遺伝子発現制御技術の開発に貢献し、合成生物学の発展に寄与するところが多いと考えられる。</p> <p>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。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 4 年 2 月 21 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。</p>								
要旨公開可能日： <table style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="width: 100px; height: 20px;"></td> <td style="width: 100px; height: 20px;"></td> <td style="width: 100px; height: 20px;"></td> <td style="width: 100px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td>年</td> <td>月</td> <td>日</td> <td>以降</td> </tr> </table>					年	月	日	以降
年	月	日	以降					