

京都大学	博士（医科学）	氏名	小松将大
論文題目	<b>Target-dependent RNA polymerase as universal platform for gene expression control in response to intracellular molecules</b> (細胞内分子に応答した遺伝子発現制御を実現する標的依存性 RNA ポリメラーゼの開発)		
(論文内容の要旨) 特定の細胞内分子に応答して遺伝子発現を制御することは、細胞の状態をモニタリングし、細胞の機能を制御する目的において強力な戦略となる。これまで、遺伝子発現や細胞の機能を人工的に制御するには、細胞内の転写・翻訳制御因子が利用されてきた。しかし、細胞内の制御因子の種類は限られているため、従来の遺伝子制御プラットフォームが対応できる分子の種類は乏しく、その多くは低分子であった。一方、細胞内にはタンパク質・ペプチドや RNA などの多くの生体高分子が存在する。これらの生体高分子はウイルス感染や疾患など細胞の様々な状態を反映する有用な生化学的情報であるが、これらの生体高分子に柔軟に応答して遺伝子発現を制御できる技術プラットフォームは確立されていなかった。 この課題を解決するために、本研究では、抗体を利用して任意の分子依存的に遺伝子発現を制御できる技術を開発した。抗体はタンパク質や RNA、低分子などの多種多様な分子を認識できる特徴を有する上に、分子認識を担う抗体の可変領域は分子サイズが小さく、細胞内の分子を標的化する目的にも利用されている。さらに、可変領域は重鎖と軽鎖の2つのドメインから成り、これら2つは分割された状態でも、それぞれが標的分子と結合して再会合する特徴をもつ。そこで、抗体の可変領域を細胞内分子の標的化ドメインおよび、標的分子依存的な再会合ドメインとして利用することで、細胞内分子に依存した遺伝子発現制御の実現を試みた。 抗体を用いて分子依存的に遺伝子発現を制御する手法として、抗体と標的分子の結合に依存した分割型 T7 RNA ポリメラーゼ (Split RNAP) の活性化システムを着想した。Split RNAP は 2 つの断片から成り、それぞれに融合したタンパク質間の相互作用に依存して RNA 転写活性を示す。Split RNAP の融合タンパク質として抗体の可変領域を利用することで、標的分子依存的な可変領域の再会合を介した Split RNAP の活性化とそれに続く RNA 転写が実現できると考えた。 この着想のもと、様々な抗体の可変領域を Split RNAP に融合した結果、抗体の標的分子に依存した Split RNAP の活性化に成功した。まず、GCN4 ペプチドに対する抗体を融合した Split RNAP を用いて、Split RNAP の活性が細胞内の GCN4 ペプチドの存在量および、GCN4 ペプチドに対する抗体の結合親和性に依存して増加することを示した。次に、融合する抗体を FLAG ペプチドと EGFP に対する抗体に置換することで、異なるペプチド・タンパク質に対しても Split RNAP を活性化できることを実証した。さらに、ウイルス由来 RNA とフルオレセインに対する抗体に置換することで、RNA と低分子に対する Split RNAP の活性化にも成功した。 最後に、抗体を用いた Split RNAP の活性化を応用して、細胞内分子に応答した細胞制御を実現した。まず、2 種類の抗体と 2 種類の Split RNAP を組み合わせ、2 つの異なる細胞内分子に対応して 2 種類の遺伝子を独立して制御できることを実証した。最後に、2 種類の細胞のゲノムにコードされた遺伝子産物の違いを抗体によって識別して、CRISPR-Cas9 の gRNA 発現を制御することで、細胞特異的なゲノム編集を実現した。 本技術により遺伝子発現の制御に利用できる分子の種類が大幅に拡大され、細胞内の状態に応じた遺伝子治療など複雑な細胞制御が可能になると期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

特定の細胞内分子に応答して遺伝子発現を制御することは、細胞の状態をモニタリングし、細胞の機能を制御する目的において強力な戦略となる。しかし、従来の遺伝子制御プラットフォームが対応できる分子の種類は乏しく、その多くは低分子であった。そのため、タンパク質・ペプチドや RNA などの様々な生体分子に柔軟に応答して遺伝子発現を制御できる技術プラットフォームは確立されていなかった。

この課題を解決するために、本研究では抗体の重鎖と軽鎖からなる可変領域をスプリット RNA ポリメラーゼ (Split RNAP) の融合タンパク質として利用することで、標的分子依存的な Split RNAP の活性化とそれに続く RNA 転写を実現する標的依存性 RNA ポリメラーゼ (TdRNAP) を開発した。TdRNAP に融合する抗体の変更によって、タンパク質/ペプチド・RNA・低分子などの様々な細胞内分子に依存して遺伝子を発現できることが実証された。さらに、複数の TdRNAP を用いることで人工的な遺伝子回路を細胞内に構築し、分子依存的な細胞機能の制御を実現した。最後に、2 種類の細胞のゲノムにコードされた遺伝子産物の違いを TdRNAP によって識別して CRISPR-Cas9 の gRNA 発現を制御することにより、標的細胞特異的なゲノム編集を実現した。

以上の研究は、細胞内の多様な分子に応答して任意の遺伝子を制御できる新たな遺伝子工学技術を提供するものであり、遺伝子工学および細胞・生体医工学への応用と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、令和6年2月7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