

Title	Development of gene regulation system using ligand-inducible -1 ribosomal frameshifting
Author(s)	松本, 咲
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61498
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (松 本 咲)	
論文題名	Development of gene regulation system using ligand-inducible -1 ribosomal frameshifting (小分子誘起型-1リボソームフレームシフトを用いた遺伝子発現制御システムの開発)
論文内容の要旨	
生体高分子の一つであるRNAはそのほとんどが一本鎖で存在し、分子間或は分子内で相補的な塩基対を形成することにより、複雑で多様な高次構造を形成する。RNAの高次構造は、内部リボソーム導入部位(IRES)による翻訳開始制御、リボスイッチやフレームシフトによる翻訳制御など、様々な生物学的過程で重要な役割を果たす。RNAが生体内で果たす役割の重要性を考えると、RNAは小分子による生物学的反応制御の魅力的なターゲットであると考えられる。 リボソームフレームシフトは、リボソームの読み枠が通常の0フレームからプラス(+)もしくはマイナス(-)方向に1～2塩基シフトする再コード機構であり、これにより一本のmRNAから異なる二種類のタンパク質が生産される。-1リボソームフレームシフト(-1PRF)は、滑り配列と呼ばれる7塩基からなる配列と、それに隣接するmRNAの二次構造(ほとんどがシュードノット構造)により引き起こされる。本研究では、RNAに配列特異的に結合する合成小分子を用いて、mRNA上にシュードノット構造の形成を誘起し、更にはそのシュードノット構造形成がシグナルとなって起こる-1リボソームフレームシフトを制御することで遺伝子の発現を自在にON/OFFすることを目的とした。 当研究室で開発されたG-Gミスマッチ結合性分子、ナフチリジンカルバメートテトラマー(NCTn, n = 5, 6, 7, 8)は四つのナフチリジンが柔軟なメチレンリンカーで繋がれた分子であり、ナフチリジンがグアニンと水素結合を形成することで、DNAのCGG/CGG配列に選択的に結合することが明らかにされている。更にNCTnはRNAのCGG/CGG配列にも結合し、RNAのループ-ループ構造を誘起することが示されている。 1) 合成小分子によるRNAシュードノット構造誘起の実証 まず、NCTnがRNAのループとそれに続く一本鎖部分のCGG配列に同時に結合することにより、シュードノット構造を誘起することを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により実証した。更に、シフトしたバンド強度を定量することにより、NCTnがシュードノット構造を誘起する結合の、みかけの解離定数(K_d)を算出した。 2) リガンド誘起型シュードノット構造によるin vitroでの-1リボソームフレームシフトの制御 NCTn誘起型シュードノット構造が-1リボソームフレームシフトを引き起こすことを、ウェスタンブロッティング及びレポーターアッセイにより実証した。具体的には、NCTnでmRNA中にシュードノット構造を誘起することにより、フレームシフト効率、即ち下流遺伝子の翻訳を調製できることを明らかにした。ウミシイタケルシフェラーゼ(Rluc)遺伝子とホタルルシフェラーゼ(Fluc)遺伝子の間に、リボソームフレームシフトに必要な滑り配列(AAA AAA C)とNCTn誘起型シュードノットの配列を導入したmRNAを調製し、in vitro翻訳反応をおこなった。NCTnの添加によりフレームシフト効率が上昇することを、翻訳反応産物のバンド定量(ウェスタンブロッティング)及びルシフェラーゼ活性測定(レポーターアッセイ)により明らかにした。 3) 細胞内でのリガンド誘起型-1フレームシフトの実証 NCTnによって誘起される-1リボソームフレームシフトを用いて、タンパク質の発現制御をヒト細胞内で実証した。RNAの変異体を用いた対照実験により、NCTnがヒト細胞内でも、RNAへの配列選択的な結合により-1PRFを誘起することを確認した。更に応用例として、レポーター遺伝子として二種類の蛍光タンパク質とミトコンドリア局在化シグナルを導入することにより、NCTnによる蛍光タンパク質の局在化制御をヒト細胞内で達成した。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松 本 咲)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 中 谷 和 彦
	副 査	教 授 加 藤 修 雄
	副 査	教 授 高 尾 敏 文

論文審査の結果の要旨

申請者は、設計・合成した小分子の結合により誘起された RNA のシュードノット構造を用いて、-1（マイナス1）リボソームフレームシフトによる遺伝子発現制御システムの開発研究に取り組み、以下の成果を上げた。

1) 合成小分子、NCTn による RNA シュードノット構造の誘起

RNA の CGG/CGG 配列に特異的に結合することが報告されていた NCTn の結合特性を活かし、NCTn の結合により RNA シュードノット構造を誘起することを試みた。様々な変異 RNA を用いたポリアクリルアミドゲルシフトアッセイにより、NCTn が RNA のループ部分とそれに続く一本鎖部分の CGG 配列に同時に結合することにより、RNA シュードノット構造を誘起できることを明らかにした。

2) NCTn によって誘起されたシュードノット構造による、in vitro での-1リボソームフレームシフトの実証

NCTn によって mRNA 上にシュードノット構造誘起することにより、-1リボソームフレームシフトを制御できることを in vitro で実証した。エピトープタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、NCTn によって誘起された-1リボソームフレームシフトにより、意図した通りのペプチドが生成していることを確認した。同時に、ルシフェラーゼ活性測定によっても、NCTn が-1リボソームフレームシフトを制御し得ることを明らかにした。

3) ヒト細胞内での NCTn 誘起型-1リボソームフレームシフトの実証

NCTn によって誘起されたシュードノット構造が、ヒト細胞内においても-1リボソームフレームシフトを制御することにより、遺伝子発現を制御し得ることを明らかにした。蛍光タンパク質を導入したコンストラクトを用いた実験により、NCTn の添加により、細胞内の蛍光タンパク質の発現を制御できることを実証した。

上記の成果は、設計・合成した小分子により RNA シュードノット構造を誘起できることを実証し、小分子によって誘起された RNA シュードノット構造が-1リボソームフレームシフトを制御することにより、in vitro 及びヒト細胞内で遺伝子の発現を制御できることを明らかにしており、高く評価できる。

よって本論文は、博士(理学)の学位論文として十分価値があるものと認める。