

審査の結果の要旨

氏名 池上 賢

本研究はmRNAからのタンパク質発現を制御するために、オリゴDNAを用いて一定鎖長の長鎖長poly(A)鎖を持つルシフェラーゼ発現mRNAの作製を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 120塩基のpoly(d(A/T))配列を複数連結して組み込み、360塩基鎖長までの長鎖poly(d(A/T))鎖を持つテンプレートDNAを作製した。続いて作製したテンプレートDNAからT7プロモーターを用いてGLuc mRNAを作製し、塩基長と分布解析を行った結果、作製したGLuc mRNAは目的の塩基長を持ち、酵素によりpoly(A)鎖を付加した(酵素付加)GLuc mRNAに比べ均一塩基長であることが明らかになった。最大360塩基長までのpoly(A)の長鎖長化に成功した。
2. 作製したルシフェラーゼ発現mRNAを各種培養細胞に遺伝子導入試薬を用いて導入した。240塩基のpoly(A)鎖を持つA240 mRNAは解析した培養細胞種によらず、他のpoly(A)鎖長を持つmRNAに比べて最も高いタンパク質発現を示した。また、高分子ナノミセルを用いたハイドロダイナミクス法によるマウス下肢骨格筋への導入においても、A240 mRNAが他のpoly(A)鎖長を持つmRNAと比べ最も高いタンパク質の発現を示した。
3. mRNA導入後の細胞内におけるmRNAの残存量をqRT-PCRにより定量を行った。短鎖長のpoly(A)鎖を持つmRNAは早く分解されることが示唆された。A240とA360 GLuc mRNA間においては、残存量に有意な差は認められなかった。
4. 無細胞タンパク質合成系を用いてGLuc mRNAの翻訳効率を評価した結果、A240 GLuc mRNAが他鎖長に比べて有意に高いタンパク質の発現を示した。A240 mRNAが高タンパク質発現を示したのは、短鎖長のmRNAに比べて安定性と翻訳効率が優れていること、A360 mRNAに対しては翻訳効率に因る可能性が示唆された。
5. mRNA結合タンパク質であるPABP、eIF4G、またはeIF4Eタンパク質とGLuc mRNAの結合を免疫沈降法により解析し、qRT-PCRにより定量を行った。GLuc mRNAとPABPタンパク質の結合において、A240とA360 mRNAは、A120 mRNAに比べて有意に結合量が増加した。一方でeIF4EやeIF4Gタンパク質との結合に関しては、A240 mRNAは、A120やA360 mRNAよりも有意に結合量が増加した。長鎖長化しすぎたpoly(A)鎖は、翻訳開始因子との結合能の低下により複合体形成が障害され、翻訳効率の低下が起きた可能性が考え

られた。

以上、本論文は一定かつ長鎖長の poly(A)鎖を持つ mRNA を作製する手法を確立した。本作製法により、安定性と翻訳開始因子を介した翻訳効率の向上による高タンパク質発現な mRNA の作製が可能となった。今後、本作製法が mRNA 導入による臨床応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。