

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	リポソーム型人工細胞の接合ナノポアタンパク質の構築及び遺伝子発現制御に関する研究
Title(English)	Study on construction of junctional protein nanopores and switchable control of gene expression in liposomal artificial cells
著者(和文)	石井裕太
Author(English)	Yuta Ishii
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12818号, 授与年月日:2024年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松浦 友亮,瀧ノ上 正浩,上野 隆史,加納 ふみ,藤島 皓介
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12818号, Conferred date:2024/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

## 論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第 号		学位申請者氏名		石井 裕太	
		氏名	職名		氏名	職名
論文審査 審査員	主査	松浦 友亮	教授	審査員	藤島皓介	准教授
	審査員	上野 隆史	教授			
		瀧ノ上 正浩	教授			
		加納ふみ	教授			

## 論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「リポソーム型人工細胞の接合ナノポアタンパク質の構築及び遺伝子発現制御に関する研究」と題し、4章より構成される。

第一章「緒言」では、人工多細胞技術の背景と課題について述べている。まず従来の解析的生物学に対する合成生物学の位置づけについて述べ、人工的に多細胞体を構築する技術開発がボトムアップ合成生物学における課題の一つだとしている。人工多細胞システムを実現することで、化学人工知能やドラッグデリバリーシステムなどの社会的に恩恵の大きい技術を開発できると述べている。人工多細胞系の構築の難しさの一つは、それぞれの人工細胞に異なる生物学的機能を持たせる点にあると述べている。最後に、本博士研究の目的が自発的に相互に接続するナノポアタンパク質と人工細胞内遺伝子発現制御機構を設計することであり、これにより人工多細胞系に利用できる生物学的機能モジュールを拡張できると述べている。

第二章「相互接続するタンパク質ナノポアの構築」では、リポソームベース人工細胞が相互に接続された人工多細胞組織を構築するため、自発的に相互に接続するタンパク質ナノポアの開発について述べている。まず人工多細胞系についての先行研究について触れ、油中水滴エマルション型人工多細胞組織の構築技術が確立されていること、一方で、リポソーム型人工細胞多細胞組織に必要な人工細胞同士をナノポアで接続する技術は存在しないと述べている。これを達成するため、黄色ブドウ球菌 (*S. Aureus*) 由来膜孔形成毒素  $\alpha$ -ヘモリシン (AH) に SpyTag/SpyCatcher を融合した AH-SpyTag/SpyCatcher を設計したと述べている。これらのタンパク質は、脂質膜へのナノポア形成能を維持していること、SpyTag と SpyCatcher を介して結合できることを示している。AH-SpyTag と AH-SpyCatcher の混合物は自発的に7量体ナノポア同士が頭合せに結合した14量体を形成するように設計されており、クライオ電子顕微鏡トモグラフィーにより実際に溶液中で設計通りの14量体構造を取るものが原子レベルで確認されたとしている。

第三章「リポソームを用いた人工細胞内発現制御」では、互いに直交するリボスイッチ2種を用いた人工細胞内遺伝子発現制御技術について述べている。まず無細胞翻訳系を封入した人工細胞の有用性について述べ、生細胞と同じく従来の人工細胞内での遺伝子発現制御は転写制御によるものが主であったとしている。一方で、無細胞翻訳系では通常 RNA やタンパク質の分解系を欠くため転写レベルでの制御では、遺伝子発現を ON/OFF できないことを述べている。その解決法として、リボスイッチによる翻訳制御がなりうることを述べている。そこで、リポソーム型人工細胞で使用できる遺伝子発現制御技術を拡張するため、膜透過性低分子化合物 ASP2905 及びテオフィリンにそれぞれ応答して下流の遺伝子配列の翻訳を開始する AC17-5c リボスイッチと Theo-3c リボスイッチを用いて、GFP 発現と mScarlet-I3 発現を独立に制御する系を構築したとしている。この系を封入した人工細胞は、細胞が存在する溶媒を置換するだけで、遺伝子発現を独立に制御でき、人工細胞内の異なる2種の遺伝子発現の順序を制御できることを示している。本系は人工多細胞系におけるシグナル応答機構としてだけでなく、一部の膜タンパク質が発現に要求する Sec トランスロコンに適用し、発現困難な膜タンパク質の人工細胞系での発現にも応用可能であると述べている。

第四章「結言」では、本研究の結果を総括し、その技術の応用可能性と今後の展望について述べている。本博士論文は、脂質膜上でナノポアを形成するタンパク質のプロトマー同士に結合ドメインを導入することで、2つの脂質二重層間を架橋する接合ナノポアタンパク質を形成できること、及びそれぞれの低分子化合物に直交して応答する2つのリボスイッチを人工細胞内で利用することでタンパク質発現順序を制御できることを報告している。同様の戦略で人工細胞の内側から無細胞翻訳系を用いて発現できる接合ナノポアタンパク質や膜非透過性物質に応答するリボスイッチを用いることで、人工細胞の半自発的な形態形成を実現できるだろうと論じている。

以上、本論文は人工多細胞系に必要な人工細胞の機能モジュールを拡充した成果を示すものであり、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。