

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23119005

研究課題名(和文)人工遺伝子回路の機能向上のための進化分子工学による生体分子の改良

研究課題名(英文)Evolutionary engineering of biomacromolecules for improvement of artificial genetic circuits

研究代表者

木賀 大介(Kiga, Daisuke)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授

研究者番号：30376587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 125,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、成果の第一として、天然のRNA-蛋白質複合体(RNP)を改変し、進化分子工学的手法により信号伝達経路の制御などに使える新しいRNPモジュール(独立した機能構造単位)を作成することに成功した。また、高度な機能を有するRNA酵素を基盤として、複数のRNA酵素が協同して行なうRNA編集反応を開発し、生体内で利用されるRNA編集反応に適用し、遺伝子回路ツールとして利用することに成功した。さらに、人工遺伝子回路へのプロモーター強度の変更による生きた細胞集団への摂動が、情報科学や制御工学による数理モデル上での摂動と同等の結果を示すことを、情報科学班との融合研究として明らかにした。

研究成果の概要(英文)：By evolutionary engineering method applied for natural RNP (RNA-protein complex), this research leads to preparation of novel RNP modules for control of signal transduction pathway. Also, a double RNA splicing reaction system was developed artificially, in which a pair of splicing ribozymes worked cooperatively to edit two distinct RNA sequences. This system can be employed as a module for RNA-based genetic circuits in vivo. As interdisciplinary studies with information science researchers, furthermore, we have demonstrated that the same results can be obtained as a result of the same perturbation, modulation of strength for promoters of artificial genetic circuits, both on living cell population and model established by information science and control engineering.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 進化分子工学 タンパク質 RNA 数理モデル リボザイム 遺伝暗号

1. 研究開始当初の背景

合成生物学において、人工遺伝子回路を構築するために、プロモーターなどのパーツを数理モデルに基づいて組み合わせることが重要となっていた。しかしながら、その数理モデル化との協働やパーツのバラエティに限界があり、それらの拡大が重要となっていた。

2. 研究の目的

合成生物学の本質は、数理モデルによって生きた細胞内の動作が保障された遺伝子部品や遺伝子サブシステムを組み合わせ、サイズが拡大されたシステムを作成する際に、その拡大システムの動作もモデル化し事前に検証することで、確実なシステム構築が可能になる点にある。本研究では、この研究サイクルに資する制御系を、進化工学などを活用して構築することを目的とした。

3. 研究の方法

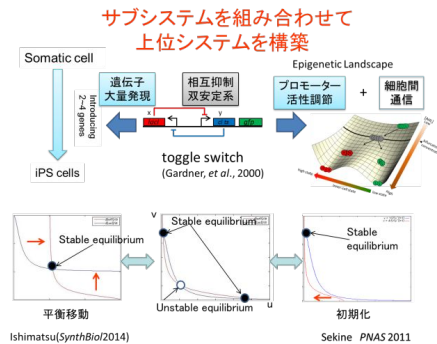
数理モデル化と生物実験との協働を進めるために、数理モデルが要求する使用を持つプロモーターを開発し、これを生物実験で動作する人工遺伝子回路に実装しその動作を検証することで、数理モデルの検証と、さらなる回路の高度化を行った。

新たな制御手法の開発として、天然の RNA-蛋白質複合体(RNP)を改変し、進化分子工学的手法により信号伝達経路の制御などに使える新しい RNP モジュール(独立した機能構造単位)の作成を行った。さらに多段階での発現制御系として、RNA 酵素を用いた RNA 編集の系をデザインした。

4. 研究成果

本研究では、情報科学班との協働により、必要な特性を持つ部品を作成することで、合成生物学のテストヘッドとなっている、2つのリプレッサーが互いに他の生産を抑制することで双安定システムを構築した際に遺伝子発現パターンの多様化を担保しうる、トグルスイッチの機能を拡張した。トグルスイッチに細胞間通信を行う部品を組み合わせることにより単安定と双安定を切り替える自発的な多様化システムによる細胞種比率の制御につづき (Sekine et al., PNAS 2011), トグルスイッチにリプレッサーの大量発現の量を任意に調節する部品を組み合わせることで、発現誘導の強度によって初期状態に依存せず任意の遺伝子発現状態を作成し、さらに、発現誘導の解除によって、誘導強度によって決定される任意の分化比率を形成できることを、理論と培養実験によって示し

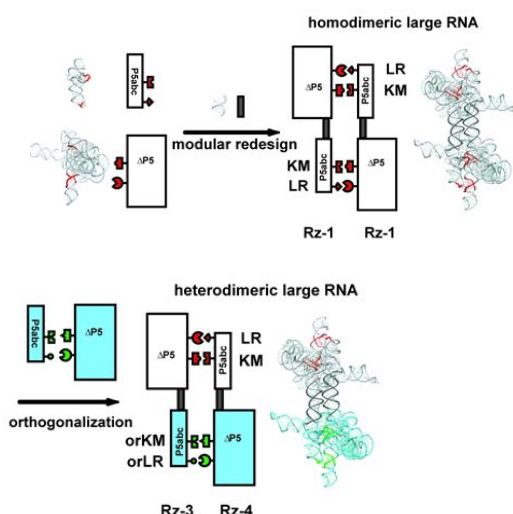
た(ASC Synthetic boil., Ishimatsu 2014)。



天然の RNA-蛋白質複合体(RNP)を改変し、進化分子工学的手法により信号伝達経路の制御などに使える新しい RNP モジュール(独立した機能構造単位)を作成することに成功した。ヒト細胞表面に露出する特定の細胞表面レセプターへの RNP の特異的な結合法の開発に成功した。レセプターを形成するパーツであるタンパク質ユニット(これらの集合によりレセプターとして働く)に三角形 RNP や新たに開発した四角形状 RNP を結合させ同ユニット間の距離を調節し、信号伝達の ON/OFF を制御して、アポトーシスの誘導及びその阻害を三角形のサイズ変化に応じて定量的に行うことに成功した。さらなる信号制御法として、L7Ae 蛋白質の末端残基を、円順列置換によって野生型蛋白質とは異なる残基とし、新たな末端箇所へ目的蛋白質を融合する事で、提示配向性を変化させる事や、別のタンパク質を提示させることに成功した。提示蛋白質の配向性を自在に調整する事で、より高度な機能性複合体のデザインが可能になる。

また、高度な機能を有する RNA 酵素を二分子組み合わせ RNA が並列的(シス)に編集される分子システムを構築し細胞内と類似の環境で作動させることに成功した。モジュール集積型構造を有するグループ I リボザイムを 2つの主要なモジュールに分割し(図左)野生型とは異なる位置で再結合させ、対面型ホモ二量体を形成する人工リボザイムのデザインに成功した(図中央)。本リボザイムは二量化に応じて触媒機能が発現した。さらに変異を加え、異なる基質特異性を有する 2種の改変リボザイムがヘテロ 2 量化し(図右)、2 量化に応じて 2 種類のリボザイムがそれぞれの基質を協調的に RNA 編集することも実証した。さらに改変リボザイムの RNA 編集反応の進行を、蛍光 RNA を基質として細胞類似の条件化でリアルタイム追跡できる系を構築し、ヘテロ 2 量化に依存した RNA 編集反応を追跡した。その結果、ヘテロ 2 量化に依存した RNA 編集反応を両方のリボザイムで確認できた。以上の結果について、並列的な RNA 編集システム、RNA 編集を蛍光モニタリ

ングする系の構築をそれぞれ論文として報告した。



人工遺伝子回路へのプロモーター強度の変更による生きた細胞集団への摂動が、情報科学や制御工学による数理モデル上での摂動と同等の結果を示すことを、情報科学班との融合研究として明らかにした。摂動の結果は、細胞集団の内部状態の多様化時における、細胞種の割合としてあらわれる。このような多様化の制御は、今後の合成生物学の実用化に向けた基盤モデルとなっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計33件)

- (1) Takahiro Tanaka, Shigeyoshi Matsumura, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa, Tecto-GIRz: engineered group I ribozymes the catalytic ability of which can be controlled by self-dimerization, *ChemBioChem*, 査読有, 2016
DOI:10.1002/cbic.201600190
- (2) Manami Ito, Haruka Sugiura, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, Masahiro Takinoue, A bacterial continuous culture system based on a microfluidic droplet open reactor, *Analytical Sciences*, 査読有, 32, 2016, 61-66
DOI : 10.2116/analsci.32.61
- (3) Saki Inuzuka, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa, Optimization of RNA-based c-di-GMP fluorescent sensors through tuning their structural modules, *Journal of Bioscience Bioengineering*, 査読有, 2016

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.011

- (4) Saki Inuzuka, Kei-Ichiro Nishimura, Hitoshi Kakizawa, Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa, Mutational analysis of structural elements in a class-I cyclic di-GMP riboswitch to elucidate its regulatory mechanism, *J. Biochem.*, 査読有, 2016
DOI: 10.1093/jb/mvw026
- (5) Airi Furukawa, Takaya Maejima, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa, Characterization of an RNA receptor motif that recognizes a GCGA tetraloop, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, 80, 2016, 1386-1389
DOI: 10.1080/09168451.2016.1156483
- (6) Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa, Artificial ligase ribozymes isolated by a "design and selection" strategy, *Methods in Molecular Biology*, 査読有, 1316, 2015, 113-125
DOI: 10.1007/978-1-4939-2730-2_10
- (7) Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Hirohisa Ohono, Tan Inoue, A purification method for a molecular complex in which a scaffold molecule is fully loaded with heterogeneous molecules, *PLoS ONE*, 査読有, 10, 2015, e0120576
DOI: 10.1371/journal.pone.0120576
- (8) 井川善也, 集積ナノ構造と生体分子デバイス構築に向けたモジュール型RNAの人工改変, *ファルマシア (日本薬学会会誌)*, 査読有, 51, 2015, 42-46
- (9) Shigeyoshi Matsumura, Tatsunobu Ito, Takahiro Tanaka, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa, Modulation of group I ribozyme activity by cationic porphyrins, *Biology*, 査読有, 4, 2015, 251-263
DOI: 10.3390/biology4020251
- (10) Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Taiichi Sakamoto, Tan Inoue, A trifunctional, triangular RNA-protein complex, *FEBS*, 査読有, 589, 2015, 2424-2428
DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.005
- (11) Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Taiichi Sakamoto, Tan Inoue, Altering the orientation of a fused protein to the RNA-binding ribosomal protein L7Ae and its derivatives through circular permutation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 466, 2015,

- 388-392
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.035
- (12) Hirohisa Ohno, Tan Inoue, Designed regular tetragon-shaped RNA-protein complexes with Ribosomal Protein L1 for bionanotechnology and synthetic biology, *ACS Nano*, 査読有、9、2015、4950-4956
DOI: 10.1021/nn5069622
- (13) Kana Ishimatsu, Takashi Hata, Atsushi Mochizuki, Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga, General Applicability of Synthetic Gene-Overexpression for Cell-Type Ratio Control via Reprogramming, *ACS Synthetic Biology*, 査読有、3、2014、638-644
DOI: 10.1021/sb400102w
- (14) Kazuaki Amikura, Yoko Sakai, Shun Asami, Daisuke Kiga, Multiple Amino Acid-Excluded Genetic Codes for Protein Engineering Using Multiple Sets of tRNA Variants, *ACS Synthetic Biology*, 査読有、3、2014、140-144
DOI: 10.1021/sb400144h
- (15) Fujita Y, Furushima R, Ohno H, Sagawa F, Inoue T, Cell-surface receptor control that depends on the size of a synthetic equilateral-triangular RNA-protein complex, *Scientific Reports*, 査読有、4、2014、6422
DOI: 10.1038/srep06422
- (16) Kazuaki Amikura, Daisuke Kiga, The number of amino acids in a genetic code, *RSC Advances*, 査読有、3、2013、12512-12517
DOI: 10.1039/C3RA40609A
- (17) Kazuaki Amikura, Daisuke Kiga, Reassignment of codons from Arg to Ala by multiple tRNAAla variants, *Viva Origino*, 査読有、41、2013、20-23
- (18) Shoji Ohuchi, Identification of RNA aptamers against recombinant proteins with a hexa-histidine tag, *Methods in Molecular Biology*, 査読有、1111、2014、41-56
DOI: 10.1007/978-1-62703-755-6_4
- (19) Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga, Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits, *BMC Systems Biology*, 査読有、8、2014、S4
DOI: 10.1186/1752-0509-8-S4-S4
- (20) Akio Kawahara-Kobayashi, Mitsuhiro Hitotsuyanagi, Kazuaki Amikura, Daisuke Kiga, Experimental Evolution of a Green Fluorescent Protein Composed of 19 Unique Amino Acids without Tryptophan, 査読有、*Orig Life Evol Biosph*, 44、2014、75-86
DOI: 10.1007/s11084-014-9371-8
- (21) Thiprampai Thamamongood, Nathaniel Z. L. Lim, Trevor Y.H. Ho, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, King L. Chow, Cultivation of Synthetic Biology with the iGEM Competition, *Journal of Advanced Computational Intelligence and Intelligent Informatics*, 査読有、17、2013、161-166
- (22) Kei Endo, James A. Stapleton, Karin Hayashi, Hirohide Saito, Tan Inoue, Quantitative and simultaneous translational control of distinct mammalian mRNAs, *Nucleic Acids Research*, 査読有、41、2013、1-12
DOI: 10.1093/nar/gkt347
- (23) Ryuhei Harada, Naoya Tochio, Takanori Kigawa, Yuji Sugita, Michael Feig, Reduced native state stability in crowded cellular environment due to protein-protein interactions, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有、135、2013、3696-3701
DOI: 10.1021/ja3126992
- (24) Takayoshi Matsuda, Satoru Watanabe, Takanori Kigawa, Cell-free synthesis system suitable for disulfide-containing proteins, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有、431、2013、296-301
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.107
- (25) Kei Endo, Karin Hayashi, Tan Inoue, Hirohide Saito, A versatile cis-acting inverter module for synthetic translational switches, *Nature Communications*, 査読有、4、2013、1-9
DOI: 10.1038/ncomms3393
- (26) Tomoaki Hara, Hirohide Saito, Tan Inoue, Directed evolution of a synthetic RNA-protein module to create a new translational switch, *Chemical Communications*, 査読有、49、2013、3833-3835
DOI: 10.1039/C3CC38688K
- (27) Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, Design strategy for an initial state-independent diversity generator, *Chem-Bio Informatics Journal*, 査読有、12、2012、39-49
- (28) Akio Kawahara-Kobayashi, Akiko

- Masuda, Yuhei Arais, Yoko Sakai, Atsushi Kohda, Masahiko Uchiyama, Shun Asami, Takayoshi Matsuda, Ryuichiro Ishitani, Naoshi Dohmae, Shigeyuki Yokoyama, Takanori Kigawa, Osamu Nureki, Daisuke Kiga, Simplification of the genetic code: restricted diversity of genetically encoded amino acids, *Nucleic Acids Research*, 査読有、40、2012、10576-10584
DOI: 10.1093/nar/gks786
- (29) Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Masami Hagiya, Daisuke Kiga, Tunability of the ratio of cell states after the synthetic diversification by the diversity generator, *Communicative & Integrative Biology*, 査読有、5、2012、393-394
DOI: 10.4161/cib.20310
- (30) Takayoshi Matsuda, Shozo Furumoto, Kae Higuchi, Jun Yokoyama, Ming-Rong Zhang, Kazuhiko Yanai, Ren Iwata, Takanori Kigawa, Rapid biochemical synthesis of C-11-labeled single chain variable fragment antibody for immuno-PET by cell-free protein synthesis, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有、20、2012、6579-6582
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.09.038
- (31) Shotaro Ayukawa, Yoko Sakai, Daisuke Kiga, An aptazyme-based molecular device that converts a small-molecule input into an RNA output, *Chemical Communications*, 査読有、48、2013、7556-7558
DOI: 10.1039/C2CC31886E
- (32) Satoru Akama, Masayuki Yamamura, Takanori Kigawa, A Multiphysics Model of In Vitro Transcription Coupling Enzymatic Reaction and Precipitation Formation, *Biophysical Journal*, 査読有、102、2012、221-230
DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.014
- (33) Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Shotaro Ayukawa, Kana Ishimatsu, Satoru Akama, Masahiro Takinoue, Masami Hagiya, Daisuke Kiga, Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 査読有、108、2011、17969-17973
DOI: 10.1073/pnas.1105901108
- [学会発表](特筆すべきもの計2件)
- (1) Daisuke Kiga "19 and 21 Amino Acid Codes" Gordon Research conference "Origins of Life" January 12-17, 2014, Galveston, TX
- (2) 木賀 大介, 日本学術会議主催シンポジウム デュアルユース問題と BSL4 施設シンポジウム 日本学術会議講堂 「合成生物学とデュアルユース問題」 2012年12月14日
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
木賀 大介 (KIGA, Daisuke)
東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授
研究者番号: 30376587
- (2) 研究分担者
井上 丹 (INOUE, Tan)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 40114855
- 井川 善也 (IKAWA, Yoshiya)
富山大学・大学院理工学研究部・教授
研究者番号: 70281087
- (3) 連携研究者
木川 隆則 (KIGAWA, Takanori)
理化学研究所・生命分子システム基盤研究領域・副領域長
研究者番号: 20270598
- 齊藤 博英 (SAITO, Hirohide)
京都大学・白眉センター・准教授
研究者番号: 20423014