

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03332

研究課題名(和文)人工シグナル分子による隣接細胞間の動的通信経路の構築と応用

研究課題名(英文)Engineering synthetic cell-cell signaling that transmit dynamic information

研究代表者

磯村 彰宏 (Isomura, Akihiro)

京都大学・高等研究院・連携助教

研究者番号：70512466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：人工遺伝子回路を活用した合成生物学の発展は、広範な細胞機能の再構成を可能にしてきた。しかし、哺乳動物細胞における細胞間の動的コミュニケーションを人工的に構築した例はほとんど報告されていない。そこで、synNotchシステムを起点とした新規人工シグナル伝達経路を作製し、光遺伝学技術によって動的コミュニケーション能力を検証することを試みた。その結果、改変synNotchシステムを使用することで送信細胞における振動的な転写活性を隣接細胞間で様々な速度で伝達可能であることが明らかになった。さらに、得られた新しい人工シグナル伝達経路を応用することで、変異細胞集団の遺伝子発現の集団同期の回復が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、効率的な動的情報伝達を可能とする人工リガンド・人工受容体の選別プラットフォームが実現した。この技術の更なる進展によって、哺乳動物細胞の多細胞動態を人工遺伝子回路を使って制御・再構築することが可能になり、再生医療に資する人工多細胞組織の作製などの応用に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We thought to build novel cell-cell signaling pathway that can transmit dynamic information in mammalian cells. We modified ligands and receptors of the synNotch signaling pathway, and found that the engineered pathway can transmit oscillatory information in sender cells to receiver cells.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 人工遺伝子回路 光遺伝学 細胞間コミュニケーション Notchシグナル 分節時計

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の究極の目標の一つは、外因性の転写因子などを人工的に配線した「人工遺伝子回路」を組み込んだ改変細胞によって、ヒトの生体機能や微生物集団の挙動を自在に制御することである。もしそれが可能になれば、例えば病変組織の状態を感知して薬理作用のある物質を放出させて病気を治療できるような移植可能なヒト由来細胞や、バイオ燃料などの有用な代謝物を大量に生産する微生物集団を作製できることになり、その社会的なインパクトは計り知れない。そのような背景の中、ここ10年の間で、集団的挙動を人工遺伝子回路によってプログラムして高度な振る舞いを人工的に構築する試みが、主に大腸菌などを対象に行われてきた。

しかし、ヒトへの直接的な医療応用が期待される哺乳動物細胞では集団ダイナミクスを人工的に構築した例は全く報告されていない。これは、動的コミュニケーションを可能にする遺伝子回路の部品を哺乳動物細胞において設計・構築・検証・選別する基盤技術が存在しなかったためと考えられる。もし、そのような一連の工程を実現するプラットフォームを整備することができれば、動的コミュニケーションを可能にする人工リガンド・受容体の作製が実現し、多細胞組織の動的な時空間パターンを制御・再構成するための革新的技術の確立に繋がると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳動物細胞集団における動的情報通信を可能にする人工シグナル伝達経路を作製・検証するための基盤技術を確立し、構築した新規人工シグナル分子を使った多細胞組織の制御の実証を目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、synNotch システム (Morsut et al. Cell 2016) の人工リガンドと人工受容体の双方を遺伝子改変することで新規人工シグナル伝達経路を作製した。そして、光遺伝学技術を活用し、人工シグナル伝達経路における細胞間の動的情報伝達を検証し、その動的特性を精密計測した。具体的には、青色光に応答して人工リガンド(細胞膜上に提示されたmCherry)を発現する送信細胞と、人工リガンドの入力に応答して発光レポーターが発現する受信細胞(mCherryと交差するラクダ由来抗体を使った人工受容体を発現)をマウス筋芽細胞株C2C12を用いて作製し、共培養しながら周期的な光刺激を与えることで動的情報伝達が可能かどうかを調べた(光遺伝学的送受信アッセイ, 図1A)。

さらに、得られた動的情報伝達を可能とする人工シグナル経路を使って、マウスES細胞から分化誘導した分節時計様細胞における遺伝子発現リズムの集団同期の人工制御を試みた。具体的には、分節時計におけるHes7転写活性のレポーター遺伝子を導入したマウスES細胞を樹立し、CRISPR-Cas9によるゲノム編集で集団同期に必要な遺伝子をノックアウトした。その後、人工シグナル伝達経路を導入して集団同期の回復を試みた。

4. 研究成果

まず、改変前のsynNotch システムにおける人工リガンドと人工受容体を使って光遺伝学的送受信アッセイを行った。具体的には、送信細胞と受信細胞の共培養系に4時間周期の青色光照射を行い、人工リガンドの周期的発現に伴う、受信細胞からの生物発光レポーターシグナルの周期的な応答の検出を

試みた。その結果、受信細胞において送信細胞からの入力に伴うレポーターシグナルの上昇は認められたが、4時間周期の振動は検出できなかった。このことから、動的情報伝達能力が限定的で送信細胞内における振動的情報を伝達する効率が非常に低いことが分かった。そこで、人工リガンドと人工受容体の遺伝子改変を行ったところ、送信細胞における振動的な転写活性を隣接細胞間で効率的に伝達可能な新規人工シグナル伝達経路が得られた(図1B-C)。さらに、人工リガンドと人工受容体を遺伝子改変して光遺伝学的送受信アッセイを行った結果、情報伝達速度や利得が様々なツールキットが得られた。

そこで、新しく得られた人工シグナル伝達経路の応用可能性を検証するため、マウスES細胞から分化誘導した分節時計様細胞における遺伝子発現リズムの集団同期の人工制御を試みた。まず、変異ES細胞由来の分節時計様細胞集団ではHes7転写の集団リズム同期が早期に乱れて脱同期した。一方で、変異ES細胞に人工シグナル伝達経路を導入した改変ES細胞由来の分節時計様細胞集団では、集団リズム同期が変異ES細胞の場合と比べてより延長して回復していることが示唆された。現在、様々な人工リガンドと人工受容体の組み合わせについて、リズム同期の回復度を比較・検証しているところである。

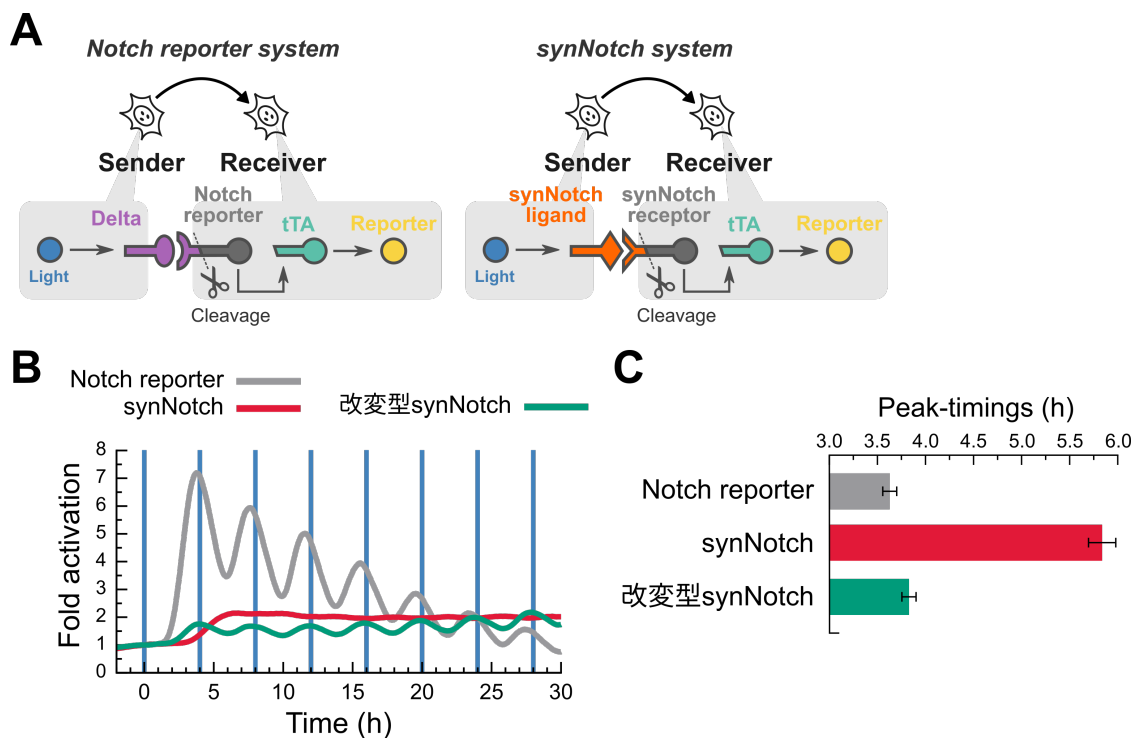


図 1: 人工シグナル分子による隣接細胞間の動的通信経路の構築。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ines Lahmann, Dominique Brohl, Tatiana Zyrianova, Akihiro Isomura, Maciej T Czajkowski, Varun Kapoor, Joscha Griger, Pierre-Louis Ruffault, Despoina Mademtoglou, Peter S Zammit, Thomas Wunderlich, Simone Spuler, Ralf Kuhn, Stephan Preibisch, Jana Wolf, Ryoichiro Kageyama, Carmen Birchmeier	4. 巻 33
2. 論文標題 Oscillations of MyoD and Hes1 proteins regulate the maintenance of activated muscle stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & development	6. 最初と最後の頁 524-535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.322818.118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akari Takagi, Akihiro Isomura, Kumiko Yoshioka-Kobayashi, Ryoichiro Kageyama	4. 巻 35
2. 論文標題 Dynamic Delta-like1 expression in presomitic mesoderm cells during somite segmentation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 119094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gep.2019.119094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kumiko Yoshioka-Kobayashi, Marina Matsumiya, Yusuke Niino, Akihiro Isomura, Hiroshi Kori, Atsushi Miyawaki, Ryoichiro Kageyama	4. 巻 580
2. 論文標題 Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 119-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1882-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯村 彰宏
2. 発表標題 Notchシグナルによる動的情報伝達の光制御と光計測
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------