

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12050

研究課題名(和文) マイクロ流体技術と光遺伝学技術の融合によるタンパク質発現ダイナミクスの精密制御

研究課題名(英文) Control of protein expression dynamics by using microfluidic and optogenetic technology

研究代表者

金田 祥平 (Kaneda, Shohei)

工学院大学・工学部・准教授

研究者番号：10542467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低分子化合物濃度条件と光刺激条件の2入力を精密に調整しうるマイクロ流体デバイスを中心とした実験プラットフォームを構築し、タンパク質発現ダイナミクス(出力)を制御することを試みた。低分子化合物濃度条件の調整はシリンジポンプの流量制御により、光刺激条件の調整は青色LED光源の制御により実現し、タンパク質発現量をモニタリングしつつ2入力を調整可能なフィードバック系を実装した。また、数秒の光照射で蛍光タンパク質(RFP)を発現、その分解速度を低分子化合物により濃度依存的に抑制可能なC2C12細胞も作成し、ダイナミクスの細胞機能制御への意義を解明するための技術基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果である、マイクロ流体デバイスを中心とした低分子化合物濃度条件と光刺激条件の2入力を精密に調整可能な実験プラットフォームは、タンパク質発現ダイナミクスを人工的に制御する際の自由度を増大することができます。これにより、タンパク質発現ダイナミクスが、増殖や分化などの細胞機能制御へ果たす役割を解明することに役立つことが期待されます。

研究成果の概要(英文)：An experimental platform was developed using a microfluidic device capable of precisely adjusting two inputs: the concentration conditions of a low-molecular weight (LMW) compound and light stimulation conditions. This platform aimed to control the dynamics of protein expression (output). The concentration conditions in the microchannels as cell culture chambers, were adjusted by controlling the flow rate of syringe pumps. The light stimulation conditions for the chambers were adjusted by controlling the blue LED light source. Additionally, a feedback system was implemented into the platform to monitor the protein expression level and adjust the two inputs.

Furthermore, C2C12 cells to visualize of the dynamics were generated, which could express RFP through light stimulation and suppress its degradation rate in a concentration-dependent manner using the compound. In conclusion, the technical foundation was established to elucidate the significance of these dynamics for cell functions.

研究分野：マイクロ流体デバイス

キーワード：マイクロ流体 光遺伝学技術 タンパク質発現ダイナミクス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質をコードする遺伝子のうち 82.2%は 1 日の間に発現が周期的に増減することが報告された[1]。これにより光遺伝学技術を用いて光刺激によりタンパク質発現ダイナミクスを人工的に制御し、その細胞機能への影響を調べる研究[2]がますます注目を集めていたが、①タンパク質量を一定とする持続的な発現制御が難しい、②光刺激の条件検討に時間がかかる、③オープンループ制御で精度がよくない、④従来の発光タンパク質を用いた発現ダイナミクスの可視化法では露光に長時間を要するため高い時間分解能での制御ができない、などの課題があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、マイクロ流体技術に着目し、低分子化合物を入力としたタンパク質発現制御系も併用することで、光刺激と低分子化合物濃度の 2 入力の実験プラットフォームを構築することを目的とした。タンパク質発現ダイナミクス制御にフィードバック系を導入することに加えて、発現ダイナミクスの可視化に露光時間が数秒で済む蛍光タンパク質を用いることで、上記課題の克服とタンパク質発現ダイナミクス制御の高精度化(数時間オーダーから分オーダーの制御)を達成することを試みた。

### 3. 研究の方法

本研究では、シリコンゴムとガラスを材料としたマイクロ流体デバイスを設計・製作した。シリンジポンプと LED 光源を実験系に組み込むことで入力である低分子化合物濃度条件と光刺激条件を調整する。また、マイクロ流体デバイスを顕微鏡下で観察することにより、タンパク質発現ダイナミクスをリアルタイム計測し、入力量を調整するフィードバック制御系を実装する。ダイナミクス可視化のため、低分子化合物濃度と光刺激でタンパク質発現ダイナミクスを制御可能な細胞を作成し、これを実験プラットフォームの評価に用いた。

### 4. 研究成果

本研究の成果を以下に報告する。

#### ① 2 入力発現制御と蛍光タンパク質によるダイナミクス可視化技術の確立

青色光の光刺激により、数秒の露光時間で観察が可能な赤色蛍光タンパク質(RFP)を発現し、その分解速度を低分子化合物のトリメトプリム(TMP)[3]により濃度依存的に抑制可能なマウス横紋筋細胞(改変 C2C12 細胞)を作成した。これにより分オーダーでのダイナミクス制御が可能となった。

#### ② 2 入力発現制御用マイクロ流体デバイスの開発とフィードバック系の実装

低分子化合物濃度条件と光刺激条件の 2 入力を精密に調整可能なマイクロ流体デバイスを中心とした実験プラットフォームを構築した。デバイスはふたつのインレット(TMP あり, なし培養液の導入用)とふたつのアウトレット(培養液排出用)ならびに、4 本の微小流路からなる細胞培養チャンバ(図 4)もち、インレットに接続するシリンジポンプの流量制御により、細胞培養チャンバ内の TMP 濃度条件をデジタル(TMP あり, なし条件)に調整することができる(図 5)。光刺激条件(照射強度/照射時間)は、青色 LED 光源の制御により実現している。シリンジポンプ、LED 光源ならびに蛍光観察用 CCD カメラなど実験プラットフォームに組み込んだ機器の制御を顕微鏡周辺機器制御用ソフト Micromanager で行うこ

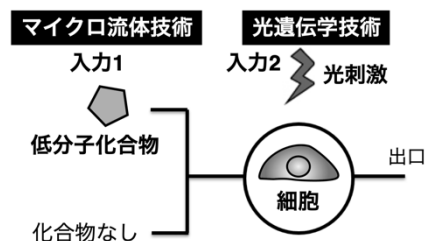


図 1. 低分子化合物濃度と光刺激の 2 入力によるタンパク質発現ダイナミクス制御の模式図。

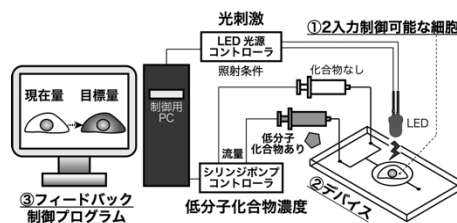


図 2. マイクロ流体デバイスを中心とした実験プラットフォーム。

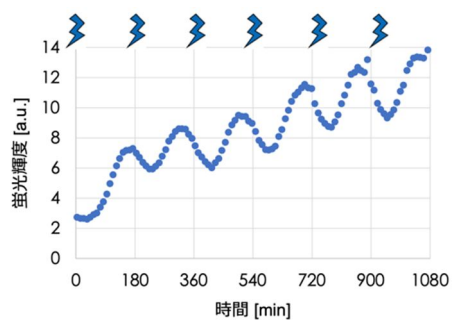


図 3. 光刺激による RFP 発現制御結果

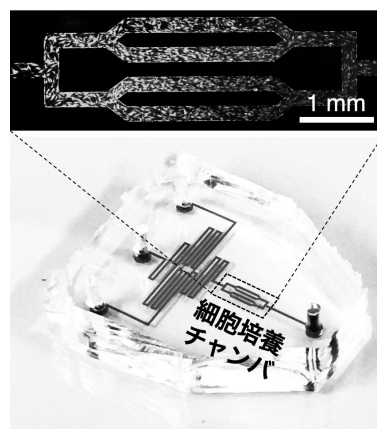


図 4. 2 入力発現制御用デバイス

とで,タンパク質発現量をリアルタイムにモニタリングしつつ,発現量に応じて2入力を ON/OFF 制御可能なフィードバック系を実現した.

③タンパク質発現応答の網羅的解析デバイスの開発  
マイクロ流体濃度勾配場形成技術を利用し,TMP 濃度 8 条件化での光刺激に対する RFP 発現の応答を網羅的に取得可能なマイクロデバイスを設計・製作した(図 6).このデバイスを用いることで,下記のシミュレータ構築に必要な応答特性把握に必要な実験回数や時間を減らすことを試みた.

④タンパク質発現ダイナミクスシミュレータの構築  
さまざまな光刺激条件での,RFP 発現ダイナミクスを計測し,数値解析ソフトウェア MATLAB を用いてシステム同定を行い,シミュレータを構築した(図 7).本研究項目を実施することを通じ,タンパク質発現ダイナミクスの精密なフィードバック制御系実装のための礎を築いた.

以上の研究成果により,タンパク質発現ダイナミクスの細胞機能制御への意義を解明するための技術基盤を本研究で確立できたと考える.

#### 参考文献

- [1] Mure LS, Le HD, Benegiamo G, Chang MW, Rios L, Jillani N, Ngotho M, Kariuki T, Dkhissi-Benyahya O, Cooper HM, Panda S. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science*. 2018 Mar 16;359(6381).
- [2] Imayoshi I, Isomura A, Harima Y, Kawaguchi K, Kori H, Miyachi H, Fujiwara T, Ishidate F, Kageyama R. Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science*. 2013 Dec 6;342(6163):1203-8.
- [3] Iwamoto M, Björklund T, Lundberg C, Kirik D, Wandless TJ. A general chemical method to regulate protein stability in the mammalian central nervous system. *Chem Biol*. 2010 Sep 24;17(9):981-8.

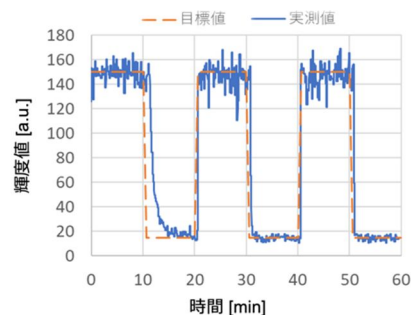


図 5. TMP 濃度のデジタル調整.

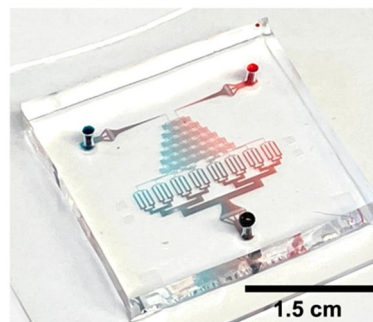


図 6. タンパク質発現応答の網羅的解析デバイス.

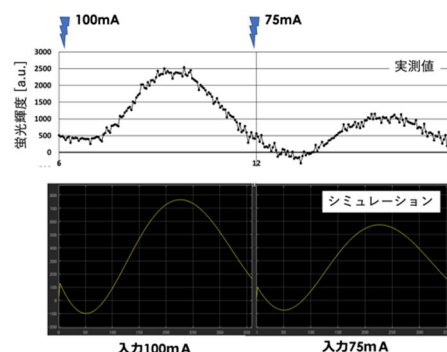


図 7. シミュレーション結果.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本科学研究費補助金についての基本情報  
<http://klab.tokyo/about/budget/>  
 本科学研究費補助金研究の概要  
[http://klab.tokyo/research\\_category/microfluidics/](http://klab.tokyo/research_category/microfluidics/)  
 工学院大学教員情報データベース  
<https://er-web.sc.kogakuin.ac.jp/Profiles/15/0001481/profile.html>

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
研究 分 担 者	磯村 彰宏  (Isomura Akihiro)  (70512466)	京都大学・高等研究院・連携助教    (14301)	

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
---------	---------