

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15149

研究課題名（和文）匂い物質に応答して遺伝子発現可能な人工細胞の構築

研究課題名（英文）Construction of an artificial cell capable of gene expression in response to odorants

研究代表者

外岡 大志（Tonooka, Taishi）

京都工芸繊維大学・機械工学系・助教

研究者番号：50745031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：カルシウムイオン濃度に応答する遺伝子発現機構について研究を進めた。この機構は、DREAMと呼ばれる哺乳類細胞内に存在するタンパク質を中心としたものである。このタンパク質は、カルシウムイオン非存在下で、ゲノム上のDRE配列に結合することにより、下流の遺伝子発現を抑制する。一方で、カルシウムイオン存在下において、DREAMはDRE配列から解離し、遺伝子発現は再活性化する。本研究では、再構成系を用いて、DRE配列を有するDNAとDREAMタンパク質の相互作用について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルシウムイオン濃度に応答する遺伝子発現機構を人工細胞内で利用する際の指針が示された。匂い受容体の中には、匂い受容の際に陽イオンを細胞内に取り込むことにより情報伝達を行うものがある。このような匂い受容体を人工細胞に搭載した際には、陽イオンの一種であるカルシウムイオンも同時に人工細胞内に取り込まれると考えられ、本研究で得られた知見と組み合わせることにより、匂い応答可能な人工細胞を実現できると期待される。

研究成果の概要（英文）：We proceeded with research on the mechanism of gene expression in response to calcium ion concentration. This mechanism is centered on a protein called the Downstream-regulatory-element agonist modulator (DREAM) that exists in mammalian cells. This protein suppresses downstream gene expression by binding to the Downstream regulatory element (DRE) sequence on the genome in the absence of calcium ions. On the other hand, in the presence of calcium ions, DREAM dissociates from the DRE sequence and gene expression is reactivated. In this study, we investigated the interaction between DNA having a DRE sequence and the DREAM protein using a cell-free protein expression system.

研究分野：合成生物学

キーワード：人工細胞

1. 研究開始当初の背景

人工細胞とは、細胞膜を模擬した脂質二重膜カプセル(リポソーム)の内部にタンパク質を合成する溶液(無細胞タンパク質発現系)を封入したものである。このような人工細胞は、細胞の基本的な機能である DNA からタンパク質を合成する機能を模擬したものであり、発現させたいタンパク質をコードする DNA を同時に封入することにより内部で目的のタンパク質を発現させることが可能である。最近では、その DNA とそれを制御するタンパク質の組み合わせにより人工的な遺伝子ネットワーク(人工遺伝子回路)を構築し、人工細胞内で論理演算を行った例が報告されている。このような人工遺伝子回路を備えた人工細胞の特長として、一度入力を何らかの方法により遺伝子発現に変換することができれば、その後の情報処理は自在に行うことが可能であるという点が挙げられる。例えば、入力信号が特定波長の光であった場合、この光に反応して遺伝子発現を行う機構が人工細胞に備わっていれば、入力光があった場合に出力を 1 として返すような情報処理も、入力光があった場合に出力を 0 として返すような情報処理も、下流の遺伝子回路の設計次第で可能である。さらには、別の入力と論理回路を形成し、予め設計された論理演算の結果を出力として返すことも可能であり、様々な入力を情報処理して出力を返すシステムを構築することができる。人工細胞に情報処理可能な形式で入力を与えるためには、入力信号を遺伝子発現に変換することが必要十分であることから、人工細胞に外部環境のセンシング機構を付加する場合には、いかに人工細胞の外部の情報を入力細胞内の遺伝子発現に変換するかという部分が重要となる。

人工細胞は将来的には、診断機能を有するドラッグデリバリーシステムや高感度バイオセンサーとしての応用が期待されており、これを実現するためには人工細胞に外部環境を検知する機能を統合する必要がある。人工細胞の膜である脂質二重膜は基本的には物質を透過しないため、人工細胞外部の物質を検知することは困難である。

そこで、同様の膜に覆われているにも関わらず、様々な外部環境に反応して遺伝子発現が可能な「細胞」の外部環境の検知機構に学び、昆虫の匂い受容体を人工細胞のセンサとして応用することを着想した。しかし、昆虫細胞の匂い受容体から遺伝子発現までの機構は様々なタンパク質が関わる複雑な機構であるため、そのまま人工細胞で再現することは現実的ではないと思われた。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫の匂い受容体が陽イオンチャネルとなっていることを踏まえて、陽イオン濃度の上昇に反応して遺伝子発現が可能な機構を、人工細胞内に構築することを目指すこととした。その際に我々は、細胞内でカルシウムイオン濃度に反応した遺伝子発現を担っている Downstream-regulatory-element agonist modulator (DREAM) というタンパク質に着目した。このタンパク質は、カルシウムイオン非存在下で、ゲノム上の Downstream regulatory element (DRE) 配列に結合することにより、下流の遺伝子発現を抑制する。一方で、カルシウムイオン存在下において、DREAM は DRE 配列から解離し、遺伝子発現は再活性化する。そこで本研究では、この DREAM を利用したカルシウムイオン濃度依存的な遺伝子発現を無細胞タンパク質発現系内で実現することを目的とした。

これを実現するために、DREAM と結合する特異的な塩基配列配列(DRE 配列)を有する DNA と DREAM との結合条件について、実験とシミュレーションにより調査を行った。また、DREAM とカルシウムイオンの結合についてもシミュレーションにより条件検討を行った。加えて、これらの分子の相互作用を利用して、無細胞タンパク質発現系内におけるタンパク質発現の制御を行った。

3. 研究の方法

DRE 配列を有する DNA と DREAM の結合条件の調査は以下の方法により行った。まず、T7 プロモーター下流に DRE 配列と緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を順にコードした DNA を作製した。この DNA と DREAM タンパク質を様々な濃度条件で混合し、GFP の発現量を蛍光プレートリーダーにより観察した。また、DRE 配列を有する DNA と DREAM との結合を、解離定数(文献値)を用いてモデル化し、各濃度条件での結合状態のシミュレーションを行った。

また、DREAM とカルシウムイオンの結合については、上記 DRE 配列を有する DNA と DREAM との結合状態のシミュレーションと同様に、カルシウムイオンと DREAM の解離定数を用いて平衡状態をモデル化し、DREAM、DRE 配列を有する DNA、カルシウムイオンの 3 種類の物質が様々な濃度で存在する条件での結合状態のシミュレーションを行った。

4 . 研究成果

DRE 配列を有する DNA と DREAM の濃度を様々に変更して遺伝子発現実験を行った結果、DREAM 濃度が高いほど、GFP の発現量が小さくなることが示された。このことから、構築した系において、DREAM が DRE 配列へ結合することにより GFP 発現を抑制していることが示唆された。このような、DREAM 濃度依存的に遺伝子発現の抑制度合いが高くなる傾向は、DRE 配列を有する DNA と DREAM タンパク質の結合シミュレーションの結果とも一致した。

また、シミュレーションによりカルシウムイオン検知に適した DREAM 濃度の予測を行った結果、DREAM の濃度が小さ過ぎても大き過ぎても、DREAM と結合しておらずタンパク質発現可能な DNA のカルシウムイオン検知前後の濃度比は小さくなることが示された。この結果は、検知したいカルシウムイオン濃度によって、系に添加すべき最適な DREAM 濃度が存在することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tatsuhiko Hasegawa, Taishi Tonooka
2. 発表標題 Single-channel electrical recording of ssrA-tagged -hemolysin in a lipid bilayer
3. 学会等名 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脂質二重膜における貫通孔形成制御	発明者 外岡大志、長谷川達彦	権利者 京都工芸繊維大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-29968	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

京都工芸繊維大学研究者総覧 https://www.hyokadb.jim.kit.ac.jp/profile/ja.7fa0df662b348aee605b22cdcd86472b.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
---------------------------	-----------------------	----

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