

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

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：23119006

研究課題名（和文）人工遺伝子回路の機能評価のためのマイクロ流体プラットフォームの開発

研究課題名（英文）Development of microfluidic platforms for functional evaluation of artificial gene networks

研究代表者

ロンドレーズ ヤニック（Rondelez, Yannick）

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：10548770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 59,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本班では、合成生物学を支える実験技術基盤の確立を目指して、人工的遺伝子回路や人工代謝経路の機能評価を行うためのマイクロ流体プラットフォームの開発を担ってきた。プラットフォームとしては(1)マイクロチャンバ系、(2)マイクロ液滴系と(3)多班の要望に応えるマイクロ流体プラットフォームを開発した。(2)のマイクロ液滴系では、人工遺伝子回路や人工代謝経路の動作条件を網羅的に解析する際に必要とされる回路・経路の反応系における着目分子の濃度条件を迅速(約1万通りの異なる反応条件を一度)に探索しうるプラットフォームを開発した。

研究成果の概要（英文）：To establish fundamental experimental technologies to support development of the research area of synthetic biology, we developed microfluidic platform can be used for evaluation for functions of artificial gene networks and artificial metabolic pathways. In particular, (1) microchamber-based microfluidic platforms, (2) microdroplet-based microfluidic platform and (3) microfluidic platforms for other groups in this research area. In the development of (2) microdroplet-based microfluidic platform, a microfluidic device can search conditions of concentrations of target molecules in reaction networks in a high-throughput manner (screen ten-thousands conditions of concentrations at once) could be successfully realized.

研究分野：In vitro反応ネットワーク

キーワード：マイクロ・ナノデバイス マイクロ液滴 マイクロ流体デバイス 合成生物学 In vitro反応ネットワーク
DNA toolbox

1. 研究開始当初の背景

本新学術領域研究は、「眺めて解析する」ことにとどまっているシステム生物学に対して、「創って解析する・利用する生物学」としての合成生物学を展開するための技術基盤の構築を目指すものである。システム生物学分野では、複雑な生体分子ネットワークとそれらの動的機能との関係を明らかにすることを目的として、実験的手法で得られたデータを理論に基づいて解釈する試みが進められ、動的な生体機能が一定程度明らかにされてきた。しかしながら、理論の妥当性を確かめるためには、生体分子ネットワークに対して時空間的に制御された入力を与える必要があるにもかかわらず、従来(研究開始当初まで)の実験系を用いるかぎり、そのような入力制御を行うことは極めて困難であった。一方、生体分子ネットワークの構成要素それぞれに関する知見を集約するためには、化学物質濃度等に代表されるような外部環境条件に対して、個々の反応系やそれを有する細胞等がどのように応答するかを網羅的に調べる手段が必要であるが、現時点(研究開始当初)ではそのような手段が無く、例えば 2000 年頃から米国でスタートした合成生物学の研究においても、人工遺伝子回路や人工代謝経路の設計などの試みがなされているが、それらはいずれも小規模であり、主として trial and error で構築されているのが現状であった。すなわち、「眺めて解析する」システム生物学から「創って解析する・利用する」合成生物学へのパラダイムシフトを実現するためには、生体分子ネットワークに対して時空間的な入力制御が可能であり、なおかつ網羅的解析が行える実験プラットフォームの開発が必要であったと言える。

2. 研究の目的

本計画研究班では、「眺めて解析する」システム生物学から「創って解析する・利用する」合成生物学へのパラダイムシフトを実現するために、実験と理論を結びつける新しい実験プラットフォームの開発を行った。マイクロ流体デバイス技術を用いることにより、生体分子ネットワークに対し、理論上想定した動的な入力を与えることができ、なおかつ網羅的解析が行える機能評価プラットフォームを実現することを通して、合成生物学の工学的技術基盤を構築することを目的とした。本計画研究は、反応系や細胞などを用いて様々な実験を行う『場』としてマイクロ流体デバイス技術を用いれば、従来の実験技術では実現困難であった「実験と理論を結びつける実験プラットフォーム」を実現しうるとの着想に基づくものである。

3. 研究の方法

本計画研究班では、デザインした人工的遺伝子回路や人工代謝経路の機能評価をハイスループットに行うためのマイクロ流体

プラットフォームとして、(1)マイクロチャンバ系と(2)マイクロ液滴系との2種類の系と、これに加え、(3)多班の要望に応えるマイクロ流体プラットフォームを開発することを通じて、合成生物学を支える実験技術基盤の確立を目指した。また、上記に加えて、(4)合成 DNA と 3 種類の酵素で構成される、In vitro 反応ネットワークに関する研究を展開し、動的なふるまいを持つ In vitro 反応回路を構築することを通じて、本新学術領域研究の目指す「動的で多要素な生体分子ネットワーク」の構築に貢献することを目指した。

4. 研究成果

(1)のマイクロチャンバ系については、研究期間開始以前の研究成果にて、ほぼ開発を完了しており、領域全体会議などを通じ、その技術を多班に紹介することで領域内の潜在ニーズの開拓を図った。

(2)のマイクロ液滴系に関しては、人工遺伝子回路や人工代謝経路の動作条件を網羅的に解析する際に必要とされる回路・経路の反応系における着目分子の濃度条件をハイスループット(約 1 万通りの異なる反応条件を一度)に探索しうるマイクロ液滴系プラットフォームを開発した(A. Genot et al., Nat Chem, in press)。プラットフォーム内の交差する流路を用い、油相と水相を組み合わせることにより oil-in-water 型のマイクロ液滴を生成し、その液滴を反応容器として用いる(図 1a)。水相は、反応系における着目分子と着目分子の濃度表示(バーコード)用蛍光分子を含む溶液が入力となり、最大 3 入力(着目分子 3 種類)まで対応している(図 1a は P と Q の 2 種類)。入力側の圧力を制御することで様々な混合比を持つ液滴を生成可能である(図 1b)。ここでは、バーコード用蛍光分子(赤色・緑色)の蛍光強度により、着目分子 P と Q の濃度を見積もっている。バーコード用蛍光分子とは異なる色を持つ色素(青色・オレンジ色)由来の蛍光を観察することで、回路の反応状態をモニタリングする。本研究では、これを双安定性回路などの in vitro 反応ネットワークに適応し、それら回路の動作する濃度条件を網羅的に(1 万通りの異なる条件)解析することに成功した。本プラットフォームを用いることで、図 1c に示すような回路動作条件の分岐図を迅速(実験数は 1 回)に取得できる。本成果は、回路動作条件の実験結果を情報科学分班にフィードバックすることで反応回路のシミュレーションの精度を向上するというサイクルの実現や、領域の多班で構築される人工遺伝子回路や人工代謝

経路の動作条件探索に要する時間を大幅に短縮しうる成果であり、本研究領域全体のための実験技術基盤を構築できたと言える。また本技術は、合成生物学分野にとどまらず、広く化学反応・生化学反応ネットワークの濃度条件探索に応用できるもので、その波及効果は大きいものと考えられる。

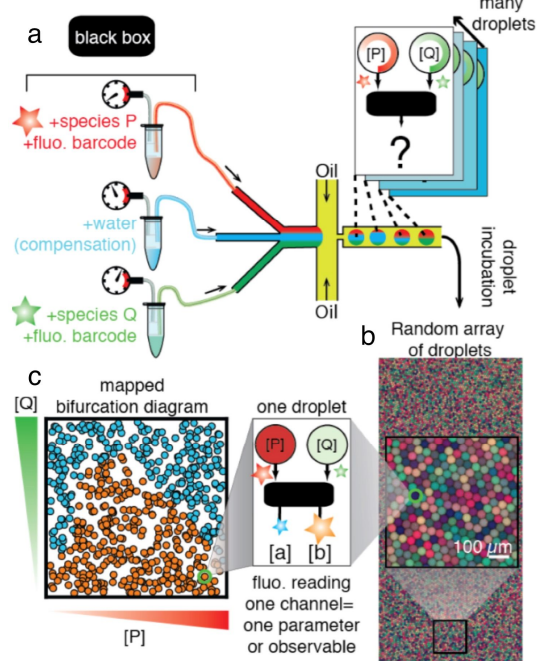


図 1. 回路動作条件を網羅的に解析するマイクロ液滴系プラットフォーム。

(3) の多班の要望に応えるマイクロ流体プラットフォームは、主に生物学班(A1)との共同研究を展開することで開発を行った。具体的には、花井班と理論上想定した動的な入力を与えることができる、人工遺伝子回路を導入した大腸菌の観察用デバイスや、田川班と、肝前駆細胞分化制御用マイクロ流体デバイスなどを共同開発することを通じて、本新学術領域研究の発展に寄与した。

(4)の In vitro 反応ネットワークに関する研究では、自然界に見られる捕食-被捕食者関係を再現する反応ネットワークや(T. Fujii et al., ACS Nano, 2013)、双安定性回路(A. Padirac et al., PNAS 2012)の開発に成功し、領域内の共同研究の成果として伊庭班と In vitro 反応ネットワークの反応回路を In Silico 進化させる手法の開発に成功した(D. Q. Huy et al., IEEE Transaction on Evolutionary Computations 2014)。また、仏国の A. Estévez-Torres らのグループと In vitro 反応ネットワークを用いた反応・拡散系における反応進行波に関する研究(A. Padirac et al., JACS 2013, A. S. Zadorin, et al., Phys. Rev. Lett 2015 など)を行い、捕食-被捕食者関係反応ネットワークの反応進行の様子を可視化すること等に成功した。

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 19 件)

A. J. Genot, A. Baccouche, R. Sieskind, N. Aubert-Kato, N. Bredeche, J.F. Bartolo, V. Taly, T. Fujii, and Y. Rondelez, “High-resolution mapping of bifurcations in nonlinear biochemical circuits,” *Nat Chem*, doi:10.1038/nchem.2544 (2016).

A. S. Zadorin, Y. Rondelez, J.-C. Galas, A. Estevez-Torres: Synthesis of Programmable Reaction-Diffusion Fronts Using DNA Catalyzers, *Phys. Rev. Lett*, 114, 068301 (2015).

H. van Roekel, L. Meijer; S. Masroor, G. Zandra, A. Estévez-Torres, Y. Rondelez, A. Zagaris, M. Peletier, P. Hilbers, T. de Greef Automated Design of Programmable Enzyme-Driven DNA Circuits. *ACS Synthetic Biology*, DOI: 10.1021/sb500300d (2014) .

A. Zambrano, A. Zadorin, Y. Rondelez, A. Estévez-Torres, J.-C. Galas, Pursuit-and-evasion Reaction-diffusion Waves In Micro-reactors with Tailored Geometry *Journal of Physical Chemistry B* 10.1021/jp509474w (2015).

A. Baccouche, K. Montagne, A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Dynamic DNA reaction network: a walkthrough, *Methods* 10.1016/j.ymeth.2014.01.015 (2014).

N. Aubert, T. Fujii, M. Hagiya, Y. Rondelez: Computer Assisted Design for Scaling Up Systems based on DNA Reaction Networks, *J. R. Soc. Interface*, 11 20131167 (2014).

D. Q. Huy, N. Aubert, N. Noman, T. Fujii, Y. Rondelez, H. Iba: An Effective Method for Evolving Reaction Network in Synthetic Biochemical Systems, *IEEE Transaction on Evolutionary Computations*, doi 10.1109/TEVC.2014.2326863 (2014).

N. Aubert, Y. Rondelez, T. Fujii, M. Hagiya: Enforcing delays in DNA computing systems, *Natural Computing*, Vol.13, Issue 4, pp 559-572, 2014.

K. Hasatani, M. Leocmach, A. J. Genot, A. Estevez-Torres, T. Fujii, Y. Rondelez: High-throughput observation of compartmentalized biochemical oscillators, *Chem. Commun*, 49 (73), 8090 - 8092 (2013).

A. Padirac, T. Fujii, A. Estévez-Torres, Y. Rondelez: Spatial waves in synthetic biochemical networks, *J. Am. Chem. Soc*, 135 (39), 14586–14592 (2013).

A. Genot, T. Fujii & Y. Rondelez: Scaling down DNA circuits with competitive neural networks, *J. R. Soc. Interface*, 10,

20130212 (2013).
N. Aubert, Q. H. Dinh, M. Hagiya, T. Fujii,
H. Iba, N. Bredeche, Y. Rondelez:
Evolution of Cheating DNA-based Agents
Playing the Game of Rock-Paper-Scissors,
Advances in Artificial Life, vol. 12,
1143-1150 (2013).
T. Fujii, Y. Rondelez: Predator-prey
molecular ecosystems, ACS Nano, 7, 27-34
(2013).
A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez:
Bottom-up construction of in vitro
switchable memories, Proc. Natl. Acad. Sci.
U. S. A., 109, E3212-E3220 (2012).
L. Desbois, A. Padirac, S. Kaneda, Y.
Rondelez, D. Hober, D. Collard, T. Fujii: A
microfluidic device for on-chip agarose
microbeads generation with ultralow
reagent consumption, Biomicrofluidics, 6,
044101 (2012).
Y. Rondelez: Competition for catalytic
resources alters biological networks
dynamic, Physical Review Letters, 108,
018102 (2012).
A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Nucleic
acids for the rational design of reaction
circuits, Curr. Op. Biotech., 24, 1-6 (2012).
A. Genot, T. Fujii, Y. Rondelez: Computing
with computation in biochemical networks,
Phys. Rev. Lett., 109, 208102 (2012).
A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez:
Quencher-free multiplexed monitoring of
DNA reaction circuits, Nucleic Acid
Research, 1-7 (2012).

〔学会発表〕(計 32件)

SysChem2015, Y. Rondelez, DNA
Circuitry, 19~22.May, 2015, Rolduc
Netherlands.
Gordon Research Conference on
Oscillations & Dynamic Instabilities in
Chemical Systems, Y. Rondelez, Rational
building of molecular programs with DNA,
13-18.Aug., 2014, Spain.
DNA19 Conference: Y. Rondelez,
Molecular programming with the DNA
toolbox. 22-27.Sept, 2013, Tempe Arizona,
USA.
FNANO 2012: Y. Rondelez: Emerging
temporal patterns from DNA networks,
16-19, Apr., 2012, Snowbird, Utah, USA.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: *METHOD OF ELIMINATING
BACKGROUND IN ISOTHERMAL
AMPLIFICATION*
発明者: Yannick Rondelez, Kevin Montagne,

Guillaume Gines, Teruo Fujii
権利者: the University of Tokyo and CNRS 種
類:
番号: PCT/FR2016/050357 and
PCT/IB2016/000352
出願年月日: 16.02.2015
国内外の別: PCT 国際出願

取得状況(計 2件)

名称: *MOLECULAR COMPUTING
COMPONENT AND METHOD OF
MOLECULAR COMPUTING*
発明者: Yannick Rondelez, Guillaume Gines,
Teruo Fujii.
権利者: the University of Tokyo and CNRS
種類:
番号: PCT/ FR2016/050356,
PCT/IB2016/000419
取得年月日: 16.02.2016
国内外の別: PCT 国際出願

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp>
<http://limshp.iis.u-tokyo.ac.jp>
<http://www.yannick-rondelez.com>

6. 研究組織
(1)研究代表者
ロンドレーズ ヤニック (RONDELEZ
YANNICK)
東京大学・生産技術研究所・特任准教授
研究者番号: 10548770
(2)研究分担者
なし
(3)連携研究者
藤井 輝夫 (FUJII TERUO)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号: 30251474
金田 祥平 (KANEDA SHOHEI)
東京大学・生産技術研究所・助教
研究者番号: 10542467