

令和元年6月13日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0148

研究課題名(和文)動物細胞における複数人工遺伝子回路の組み合わせのシステム理論の確立と実践

研究課題名(英文) Establishment and practice of system theory for assembling multiple synthetic gene circuits in mammalian cells

研究代表者

鮎川 翔太郎 (Ayukawa, Shotaro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・産総研特別研究員

研究者番号：70645845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：合成生物学では、細胞の挙動を制御するために、遺伝子配列を組み合わせた人工遺伝子回路が用いられる。本研究の目的は、数理モデルと生物実験の組み合わせにより有用な人工遺伝子回路の構築を実現する合成生物学的手法を、これまで難しかった動物細胞にも適用させるためのシステム論を開発することである。この目的のため、本研究では人工遺伝子回路の組み合わせの手法を用いて、数理モデルに基づいた細胞種の多様化比率が制御可能な人工遺伝子回路の作製を試みた。結果として目的の機能を持つ人工遺伝子回路の完成には至らなかったものの、実現に必要な要素の設計や妥当性の検証、今後の課題についての理解を深めることができたといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成生物学では、数値シミュレーションを用いて有用な生命システムを効率的に設計、構築するという手法が用いられる。この手法は、微生物ではすでに多くの成果が得られており方法論もある程度確立されていたが、動物細胞では難しいというのが現状であった。そこで、本研究では動物細胞に対してこうした手法を活用するためのシステム論を確立することを目的とした。こうした動物細胞における合成生物学的手法が確立は、再生医療などへの応用につながると期待される。結果的に、本研究ではシステムの完成形の実装には至らなかったものの、必要な要素の検証やモデルの妥当性の確認を行い、今後の課題についての理解を深めることは出来たといえる。

研究成果の概要(英文)：In synthetic biology, synthetic gene circuits that are constructed by assembling several genetic sequences are used to control cellular behaviors as desired. A purpose of this research is to develop a method to apply this synthetic biological strategy, which is a combination of mathematical modeling and biological experiments, to construct useful gene circuits in mammalian cells. For this purpose, we tried to construct a synthetic gene circuit in which diversification ratio of cellular types are controllable based on mathematical models by assembling multiple gene circuits. Even though the gene circuit with desired functions was not realized, we could design the necessary elements for the system, inspected the validity of the system, and deepen the understanding about the future problems.

研究分野：合成生物学

キーワード：人工遺伝子回路

1. 研究開始当初の背景

合成生物学では、実験者がタンパク質コード配列や制御配列を組み合わせる人工遺伝子回路を用いることで、系内の相互作用の強さが変化したシステムを構築することが容易である。合成生物学では、これまで主に微生物を実験材料として、人工遺伝子回路を持つ細胞について数理モデルに基づいた研究が進展している。数理モデルと対応した人工遺伝子回路を用いた研究の利点は、そのような人工遺伝子回路を組み合わせ、より複雑な挙動を数理モデルに基づいて設計できることにある。近年では、動物細胞を題材とした人工遺伝子回路の活用が、動物個体内での応用面と、相互抑制回路や発振回路などの基盤面との両面で発表されてきているが、数理モデルと生細胞との間にギャップが大きいのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動物細胞で細胞の多様化比率における数理モデルと実際の細胞の挙動との対応の精緻化というテーマを通して、動物細胞内に複数の人工遺伝子回路を組み合わせるためのシステム論を確立することである。この目的の達成のため、本研究では、動物細胞における人工遺伝子回路の組み合わせの手法を用いて、数理モデルに基づいた細胞種の多様化比率が制御可能な人工遺伝子回路(図1)の作製を試みた。この回路では、抑制タンパク質の大量発現とその解除により、基底状態で双安定となるうちの一つの安定状態にある細胞から、もう一つの安定状態を持つ細胞が生じ、細胞の多様化が達成される。

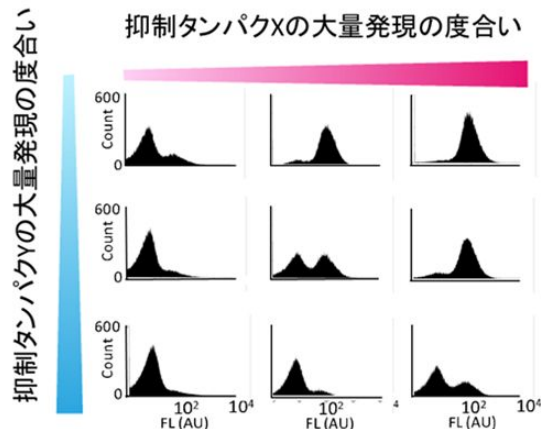


図1. 人工遺伝子回路による細胞腫の多様化比率の制御

3. 研究の方法

本研究では、パラメータに微小な差異を持った種々の人工遺伝子回路を数理モデルに基づいて動物細胞内に組み合わせるためのシステム論を確立することをゴールとしている。この目的の達成のため、細胞種の多様化比率が制御可能な人工遺伝子回路の作製を試みた。この回路では、抑制タンパク質の大量発現とその解除により、基底状態で双安定となるうちの一つの安定状態にある細胞から、もう一つの安定状態を持つ細胞が生じ、細胞の多様化が達成される。本研究では、この回路の実装のために必要な遺伝子部品の作製、人工遺伝子回路の設計、モデル化などを中心に行った。

相互抑制ネットワークを持つ人工遺伝子回路にロバストな双安定性を持たせるため、転写抑制因子の協同性を高めるという設計変更を行う計画であった。先行研究で作製された相互抑制ネットワークを持つ人工遺伝子回路は、TAL エフェクターを用いた人工転写抑制因子の組み合わせによる構造をもっている。この転写抑制因子の協同性を高めるために転写抑制因子が結合する DNA 配列の数を増加させるという設計変更をしたが、研究の過程で実装が困難であることがわかったそこで、TAL エフェクターと同様に人工転写因子として用いられる CRISPR-dCas9 などを用いた人工遺伝子回路の設計変更を行った。ロバストな双安定性を持つ相互抑制ネットワークを人工遺伝子回路によって作製するためには、協同性の高い転写タンパク質を用いることがこれまでの一般的な考えであった。これは転写タンパク質の協同性によって入力に対する出力応答の非線形性を高めるためであるが、分子滴定という考え方をを用いることで協同性が高くない人工転写タンパク質でも、高い非線形性を持たせることができることがわかった。そこで、dCas9 から構成される人工転写調節タンパク質を用いて、分子滴定により双安定性を持つ人工遺伝子回路の設計を行った。さらに、設計した回路の実装に必要な部品を作製し、数理モデルをもとにシミュレーションを行い、回路の妥当性を確認した。また、分子滴定が設計通りに起きることを確認するため、精製した dCas9 や gRNA などの因子を用いて、ゲルシフトアッセイを行った。この実験では、DNA と AcrIIA の混合液に dCas9-gRNA を加え、所定の温度で1時間のインキュベーションしたサンプルを電気泳動してバンドパターンを確認することで、各因子の結合や解離を測定した。

4. 研究成果

当初は、特定の DNA 配列に結合するようにデザインできる TAL effector を利用した融合タンパク質を用いた相互抑制回路を作製する予定であったが、TAL エフェクターを用いた転写抑制因子の協同性が低いため、双安定性を示さないことが、細胞実験と数値解析の結果からわかった。そこで、これまで使用していた TAL エフェクターではなく、dCas9 から構成される人工転写調節タンパク質を用いるための設計変更を行った。近年の研究から、分子滴定という手法を用いることで協同性が高くない人工転写タンパク質でも、高い非線形性または超高感度性を持たせることができることがわかった。そこで、dCas9 から構成される人工転写調節タンパク質を用いて、分子滴定により双安定性を持つ人工遺伝子回路の設計を行った。

分子滴定反応では、転写因子と DNA、転写因子と結合する阻害因子が用いられる。ここで、転写因子 - 阻害因子の解離定数は、転写因子 - DNA の解離定数よりも小さい必要がある。この条件下では転写因子は、DNA よりも阻害因子に対して優先的に結合する。この関係性により、転写因子の発現量を入力としたとき、発現初期では阻害因子によって DNA への結合が阻害される緩衝効果が生まれる。本研究では、遺伝子回路に分子滴定反応を実装するため、anti-CRISPR タンパク質を阻害因子として用いた。Anti-CRISPR タンパク質の代表例である AcrIIA は、CRISPR-dCas9 系の転写因子である dCas9-gRNA に強く結合し、DNA への結合能を失わせる役割を持つ。このように設計した分子滴定反応モデルを図 2 に示す。

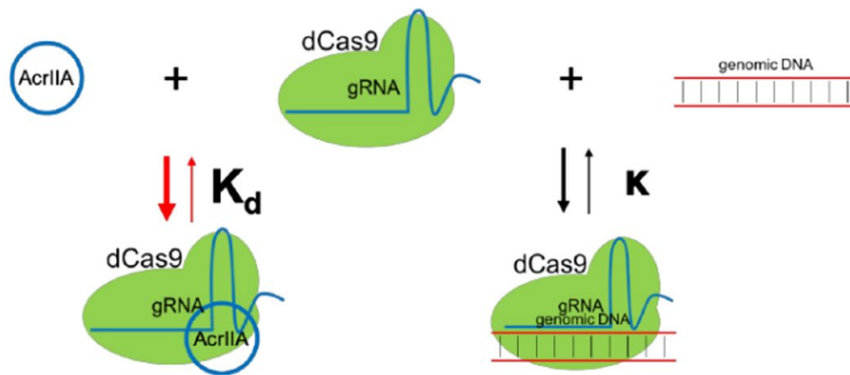


図 2 CRISPR-dCas9 system と AcrIIA を組み合わせた分子滴定反応モデル

作成した分子滴定反応モデルで超高感度性が発生することを確認するため、数値シミュレーションを行った。まずは、dCas9-gRNA、DNA、AcrIIA の試験管内における反応モデルをたて、シミュレーションを行った。状況設定として AcrIIA、DNA の濃度は固定し、dCas9-gRNA の濃度を変化させたときの dCas9-gRNA と結合した DNA の割合を検証した。パラメータのセットは、試験管内での各分子の適切な濃度として、 $[DNA]_{total} = 50 \text{ nM}$ 、 $[AcrIIA]_{total} = 100 \text{ nM}$ とした。

と K_d は文献値を参考にそれぞれ 1 nM と 0.1 nM と設定した。このシミュレーション結果を図 3 に示す。この結果は、適切な活性を持つ要素を適切な濃度で組み合わせることで、図 2 に示した反応モデルにより、超高感度性が発生することを示唆している。さらに、この超高感度性の発生機構において、 $[AcrIIA]_{total}$ を変化させたシミュレーションを行ったところ、 $[AcrIIA]_{total}$ の値が大きくなるにつれて、立ち上がりの濃度、つまり閾値が大きくなることが確認された。

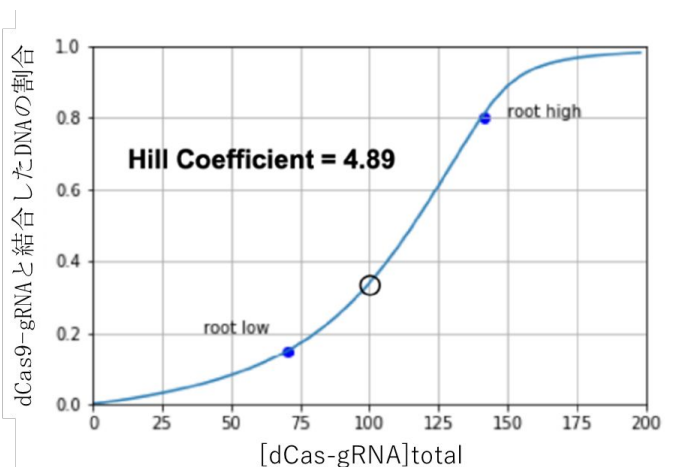


図 3 . 分子滴定反応モデルを用いた超高感度シミュレーション

続いてAcrIIAによるdCas9-gRNAへの阻害効果を確認するためゲルシフトアッセイを行った。まずは、37 の条件下でAcrIIAがdCas9-gRNAに結合することで、dCas9-gRNAとDNAの複合体形成が阻害されるかを確認した。ゲルシフトアッセイの結果、AcrIIAの濃度依存的にdCas9-gRNAとDNAの複合体のバンドが減少したことから、AcrIIAによる阻害が起きていることが確認できた。ただし、この阻害効果は大きくなかったため、さらなる改良が必要であった。そこで、AcrIIAが温度に感受性であるという報告から、反応温度を下げての実験を行った。22 において同様の実験を行ったところ、AcrIIAによる阻害効果に大きな差は見られなかった。4 においては37 や22 と比べて、大きな阻害効果が確認できた(図4)。ただし、4 ではdCas9-gRNAとDNAが複合体を形成する活性が低下しているという問題があった。また、細胞実験を考えた場合4 での反応は、現実的はないと考えられる。こうした問題を解決するためには、適切な活性をもつAcrIIAを自然界から探す、あるいは進化分子工学で作製する必要があると考えられる。

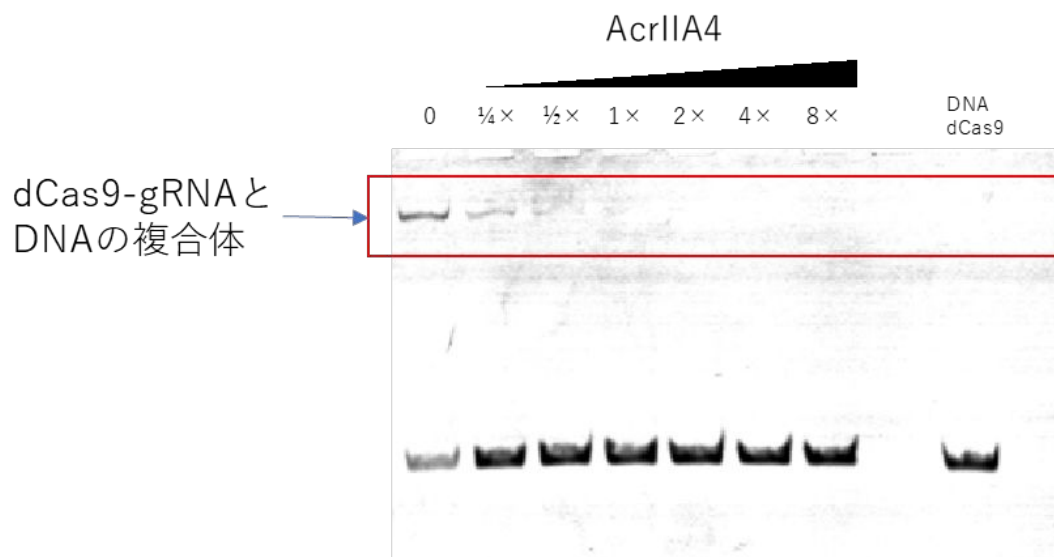


図4 . 4 でのAcrIIAによるdCas9-gRNAへの阻害効果の確認

本研究では、細胞種の多様化比率が制御可能な人工遺伝子回路の作製のために、dCas9-gRNA、DNA、AcrIIAなどの因子から構成される反応モデルを設計し、このモデルが超高感度性を発生させることをシミュレーションで確認した。また、AcrIIAがdCas9-gRNAに対して阻害効果を持つことも実験的に確認した。ただし、阻害効果を得るためには多量のAcrIIAが必要であることやAcrIIAの温度感受性といった問題が超高感度性の実現を難しくしていることがわかった。これらの結果から、超高感度性を利用した人工遺伝子回路を実装するためには、AcrIIAの特性を改良が必要があることが示唆された。本研究を総合し、細胞種の多様化比率が制御可能な人工遺伝子回路の完成には至らなかったものの、必要な要素の設計と妥当性の検証、今後の課題についての理解を深めることができたといえる。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

鮎川翔太郎、合成生物学, 人工遺伝子ネットワーク Synthetic biology, Synthetic gene network、アストロバイオロジーセンターシンポジウム 2018、2018年1月16日、国立天文台三鷹キャンパス(東京都三鷹市大沢)

Hata, T., Ayukawa, S., Zhang, Z., Shi, Y., Nishida, A., Yamamura, M., Kiga, D., Repeats of diversification on Waddington landscape realized with synthetic gene circuit, SB 7.0, The Seventh International Meeting on Synthetic Biology, Jun 13-16, 2017, National University of Singapore (Singapore)

鮎川翔太郎、木賀大介、サブシステムの組み合わせによる人工遺伝子回路の設計と構築、「細胞を創る」研究会 9.0、2016年11月21日-22日、早稲田大学 国際会議場 井深大記念ホール（東京都新宿区）

Shotaro Ayukawa, Design and construction of synthetic microbial communities by combining synthetic biological subsystems, The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2016年11月27日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

Shotaro Ayukawa, Design strategy to construct synthetic gene circuits working in living cells, The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2016年12月1日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：木賀大介

ローマ字氏名：Daisuke KIGA

所属研究機関名：早稲田大学

部局名：理工学術院

職名：教授

研究者番号（8桁）：30376587

(2)研究協力者

研究協力者氏名：千葉洸

ローマ字氏名：Kou CHIBA

研究協力者氏名：山岡智浩

ローマ字氏名：Tomohiro YAMAOKA

また東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻の濡木理教授と西増弘志助教には、cas9 ベクターの供与と調製法のご指導を賜りました。

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、研究者個人に帰属されます。