様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　５ 月 １８ 日現在

機関番号：３８００５
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ１９９４４

研究課題名（和文）ヒスタミンに応答するインテリジェント人工細胞の開発

研究課題名（英文）Intelligent Artificial Cells that Respond to Histamine

研究代表者
横林　洋平（Yokobayashi, Yohei）

沖縄科学技術大学院大学・核酸化学・工学ユニット・教授

研究者番号：７０７６９７５２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アレルギーなどに関連するヒスタミンという化学物質を検知し、任意のタンパク質を合成する「リボスイッチ」という遺伝子スイッチを開発した。さらにそのリボスイッチを、人工細胞膜に封入し、「人工細胞」を構築した。この人工細胞は外部から加えたヒスタミンに応答して、蛍光を発するタンパク質を合成したり、細胞膜にナノサイズの穴を作って、細胞内の化学物質を放出したりすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
細胞の機能を、細胞を使わずに再現することを目指す、「人工細胞」の研究が進んできている。このような「人工細胞」は、我々が細胞の機能を理解するために役立つだけでなく、将来医療や環境分野での応用も期待される。本研究では、このような「人工細胞」に、化学物質に応答して、別の化合物を放出したり、自己破壊する機能を持たせた。このような研究の積み重ねにより「人工細胞」がより高度で複雑な機能を装備し、本物の細胞に近づき、さらには超えていくことを目指す。

研究成果の概要（英文）：In this project, we constructed a genetic switch called riboswitch that detect histamine (involved in allergy, etc.) and respond by synthesizing arbitrary protein. We then inserted the riboswitch in artificial membrane compartments to build artificial cells. These artificial cells can respond to externally added histamine by synthesizing fluorescent proteins or by making nanopores on the membrane to release chemical compounds inside the cells.

研究分野：核酸化学

キーワード：人工細胞　リボスイッチ　合成生物学

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

「人工細胞」とは細胞膜と同様の組成を持つリポソーム（もしくは細胞様のマイクロカプセル）中に DNA、RNA、タンパク質等の生体分子を内包し、環境応答やタンパク質合成といった細胞機能の一部を化学的に再現する研究で、合成生物学の一つの新しい潮流として注目を集めつつあった。しかし、学術的な意義を超えて、医療分野などへの応用を念頭に置いた研究は極めて限定的であった。

２．研究の目的

ヒスタミンはアレルギーや炎症に伴って放出され、多くの疾患に関わる物質である。したがって、体内で放出されるヒスタミンを検知し、抗ヒスタミン薬を放出したり、抗炎症作用を持つタンパク質（サイトカイン）を合成するなど、自律的に対処するような人工細胞があれば、特に急性アレルギー疾患などの治療に大いに役立つと期待できる。

本研究では、申請者の研究室で開発されたヒスタミンを選択的かつ高感度で認識する RNA 分子（アプタマー）を基に、ヒスタミンを感知して、薬やタンパク質を放出したり、蛍光信号を発するような、「インテリジェント人工細胞」を開発することを目指した（図 1）。

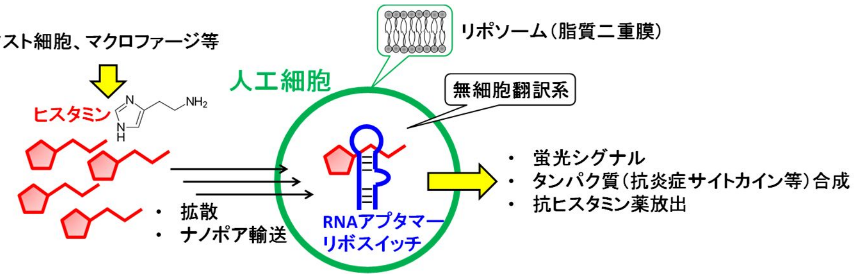

図1. ヒスタミン応答性人工細胞の概念図

３．研究の方法

(1) 無細胞翻訳系で機能するヒスタミン応答リボスイッチの開発

無細胞翻訳系 PUREfrex を用い、ヒスタミンアプタマーを mRNA の 5’UTR に組み込んだリボスイッチを開発した。まず、5’UTR 領域の二次構造予測を行い、アプタマー部位が翻訳開始領域（リボソーム結合部位および開始コドン）と相互作用するように設計した。このことのより、ヒスタミン非存在下で、翻訳効率が低くなると想定した。また、ヒスタミンがアプタマー部位に結合すると、翻訳制御領域がアクセスしやすくなるので、翻訳活性が上がると考えた。この設計思想により、20 種類以上のリボスイッチを設計・評価し、ヒスタミン存在下で大きく翻訳活性が向上するリボスイッチを得た[1]。

(2)ヒスタミン応答リボスイッチを内包した人工細胞の構築

次に、大阪大学の松浦友亮准教授（当時）との共同研究により、ヒスタミン応答リボスイッチをリポソームに封入した人工細胞を構築した。リボスイッチにより、蛍光タンパク質 mCherry、ナノポアタンパク質α-hemolysin、および脂質分解酵素 phospholipase C の発現を制御した。その結果をフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡により解析した[1]。

４．研究成果

(1) ヒスタミン応答リボスイッチの解析

作成したリボスイッチのうち、H2 リボスイッチは、5 mM ヒスタミン存在下で約 30 倍もの蛍光タンパク質(mCherry)発現量向上を示した（図 2）。変異解析により、リボスイッチ応答が、アプタマーへのヒスタミン結合に起因することが確かめられた[1]。

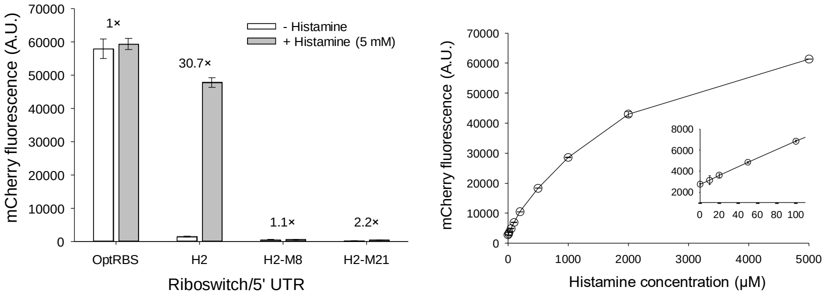

図 2. 無細胞翻訳系におけるヒスタミン応答リボスイッチ

(2) リボスイッチを内蔵した人工細胞の構築
次に人工細胞内に PUREfrex 無細胞翻訳系とリボスイッチを封入した。まずヒスタミンを人工細胞外に添加することにより、mCherry 発現を制御した。これによりヒスタミンが脂質膜を拡散により透過し、人工細胞内のリボスイッチを活性化できることが示された（図 3）[1]。

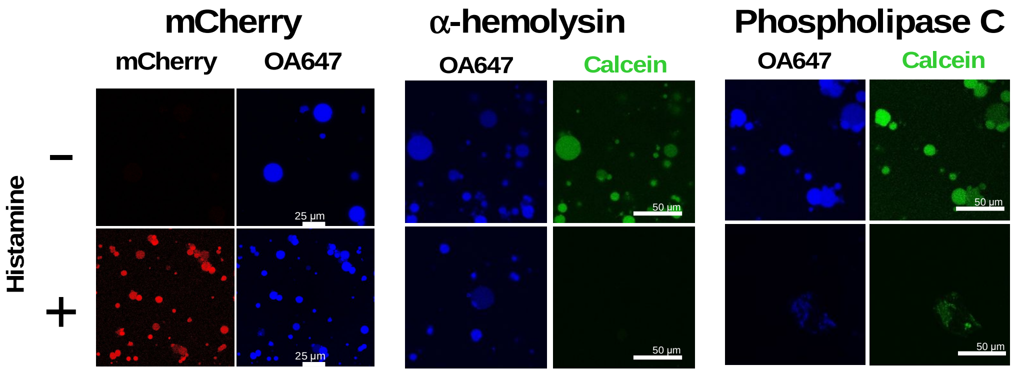

図 3. ヒスタミン応答性リボスイッチを組み込んだ人工細胞。mCherry、a-hemolysin、phospholipase C の発現をヒスタミンにより制御した。OA647 は蛍光ラベルしたタンパク質。Calcein は低分子蛍光化合物。

さらにリボスイッチによりα-hemolysin の発現を制御すると、人工細胞内の Ovalbumin 647 タンパク質は細胞内に留まるものの、ナノポアを通過する蛍光低分子である Calcein は細胞外に放出されることが示された（図 3,4）[1]。これは人工細胞による drug delivery の概念の実証とも考えられる。

最後にリボスイッチにより、脂質を分解する phospholipase C を制御したところ、ヒスタミン存在下で人工細胞が自己破壊を起こすことが明らかになった（図 3,4）[1]。このような人工細胞の「自殺」メカニズムは、将来の医療や環境分野への応用にも大切である。

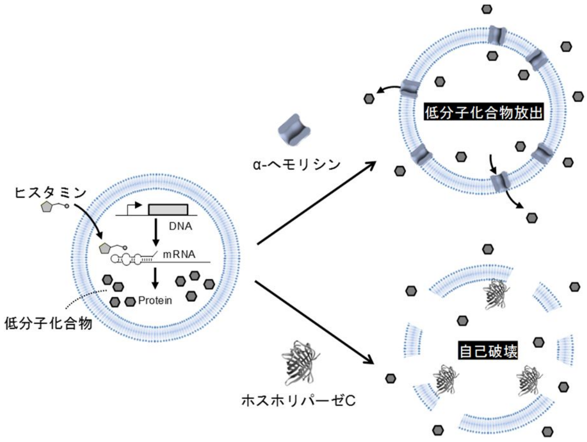

図 4. ヒスタミン応答性リボスイッチを組み込んだ人工細胞。mCherry、a-hemolysin、phospholipase C の発現をヒスタミンにより制御した。OA647 は蛍光ラベルしたタンパク質。Calcein は低分子蛍光化合物。

(3) まとめ
本研究ではリボスイッチが、人工細胞の化学センサーとして有望であることが実証できた。リボスイッチは、SELEX によって様々な化合物に対して得られる RNA アプタマーにより、多くの化学シグナルに応答できると考えられる。また、リボスイッチはタンパク質を必要としないため、人工細胞の限られた資源を遺伝子スイッチのためにムダにしない。一方で、無細胞翻訳系で機能するリボスイッチの開発が簡単ではないという課題も明らかになった[2]。人工細胞の高機能化にリボスイッチが貢献できるよう、今後とも研究を発展させていきたい。

＜引用文献＞
1) Dwidar et al., Programmable Artificial Cells Using Histamine-Responsive Synthetic Riboswitch. *J Am Chem Soc* 2019; 141: 11103-11114.

2) 横林 洋平, 「セルフリーシステムにおける人工リボスイッチの構築」, 生物工学会誌 2020; 98, 655-658.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　5件）

1．著者名 横林　洋平	4．巻 98
2．論文標題 セルフリーシステムにおける人工リボスイッチの構築	5．発行年 2020年
3．雑誌名 生物工学	6．最初と最後の頁 655-658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 －

1．著者名 Dwidar Mohammed、Seike Yusuke、Kobori Shungo、Whitaker Charles、Matsuura Tomoaki、Yokobayashi Yohei	4．巻 141
2．論文標題 Programmable Artificial Cells Using Histamine-Responsive Synthetic Riboswitch	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6．最初と最後の頁 11103～11114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.9b03300	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 －

1．著者名 Kobori Shungo、Nomura Yoko、Yokobayashi Yohei	4．巻 47
2．論文標題 Self-powered RNA nanomachine driven by metastable structure	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Nucleic Acids Research	6．最初と最後の頁 6007～6014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkz364	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 －

1．著者名 Nomura Yoko、Yokobayashi Yohei	4．巻 47
2．論文標題 Systematic minimization of RNA ligase ribozyme through large-scale design-synthesis-sequence cycles	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Nucleic Acids Research	6．最初と最後の頁 8950～8960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkz729	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 －

1．著者名 Dwidar Mohammed、Yokobayashi Yohei	4．巻 9
2．論文標題 Development of a histamine aptasensor for food safety monitoring	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 16659

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52876-1	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 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　3件／うち国際学会　4件）

1．発表者名 横林　洋平
2．発表標題 セルフリーシステムにおける人工リボスイッチの構築
3．学会等名 生物工学Webシンポジウム2020（招待講演）
4．発表年 2020年

1．発表者名 Yokobayashi Y
2．発表標題 Designing RNA Devices in Test Tubes and Cells
3．学会等名 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 横林　洋平
2．発表標題 人工細胞でも使える（？）RNAデバイスの作成
3．学会等名 「細胞を創る」研究会12.0（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Yokobayashi Y, Dwidar M, Seike Y, Kobori S, Whitaker C, Matsuura T
2．発表標題 Expanding Chemical Interface of Artificial Cells by Synthetic Riboswitch
3．学会等名 Cell Free Systems Conference（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Tabuchi T, Yokobayashi Y.
2．発表標題 High-Throughput Screening of Cell-Free Riboswitches by Droplet Sorting
3．学会等名 Cell Free Systems Conference（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Nomura Y, Yokobayashi Y.
2．発表標題 Systematic Minimization of RNA Ligase Ribozyme Through Large-Scale Design-Synthesis-Sequence Cycles
3．学会等名 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry（国際学会）
4．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
AN RNA APTAMER THAT SPECIFICALLY BINDS HISTAMINE	Yokobayashi Y, Dwidar M	同左
産業財産権の種類、番号	**出願年**	**国内・外国の別**
特許、JP2019-026510	2020年	外国

〔取得〕　計0件

〔その他〕

ヒスタミンに応答する人工細胞を初めて合成 https://www.oist.jp/ja/news-center/press-releases/34046 Synthesizing Chemical-sensing Cells from Scratch https://www.oist.jp/news-center/press-releases/synthesizing-chemical-sensing-cells-scratch

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