

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16110

研究課題名（和文）翻訳制御を基盤とした大規模な哺乳類細胞コンピューティングの実現

研究課題名（英文）Mammalian biocomputing platform by translational modulators

研究代表者

川崎 俊輔（Kawasaki, Shunsuke）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：10816036

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳動物細胞において、遺伝子発現を正確に制御することは、細胞工学および医療応用にとって重要である。この実現のため、人工遺伝子回路の構築が進められている。特に、翻訳制御に基づく回路は、ゲノム損傷のリスクが低い合成RNAやレプリコンなどのベクターで機能する。しかし、複雑な人工遺伝子回路に実装できる翻訳制御因子の種類は非常に少ない。

本研究では、利用可能な人工翻訳制御因子を大幅に拡張した。特に、Casタンパク質を翻訳制御因子として転用できることを発見し、50以上の人工翻訳制御因子の設計、多数の人工遺伝子回路の構築を可能とした。この成果は、今後の細胞コンピューティング研究を加速するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、翻訳制御因子の種類を拡充し、それら翻訳制御因子からなる回路の構成およびその連結様式を検証し、大規模な翻訳制御回路の構築原理の解明を目指した。このような遺伝子回路によって、将来的には治療機能を持つ細胞の挙動や、遺伝子治療薬の機能を正確にプログラム可能となる。これにより、治療効果の強度や、発揮のタイミング、パターンを調節可能な新しい治療戦略を提供できる。

研究成果の概要（英文）：Precise control of gene expression in mammalian cells by using synthetic gene circuits is important for cell engineering and medical applications. In particular, the circuits based on translational modulators can function with various vectors such as synthetic RNAs and replicons which are regarded as the low genomic harm. However, the variety of translational modulators that can be implemented in complex circuits has been limited yet. We expanded the library of the available translational modulators and also demonstrated that Cas proteins can be repurposed as translational modulators. We designed over 50 different modulators and built over 60 synthetic circuits. These translational modulators have the potential to provide "biological Integrated-Circuits" which facilitate the development of biocomputers.

研究分野：合成生物学

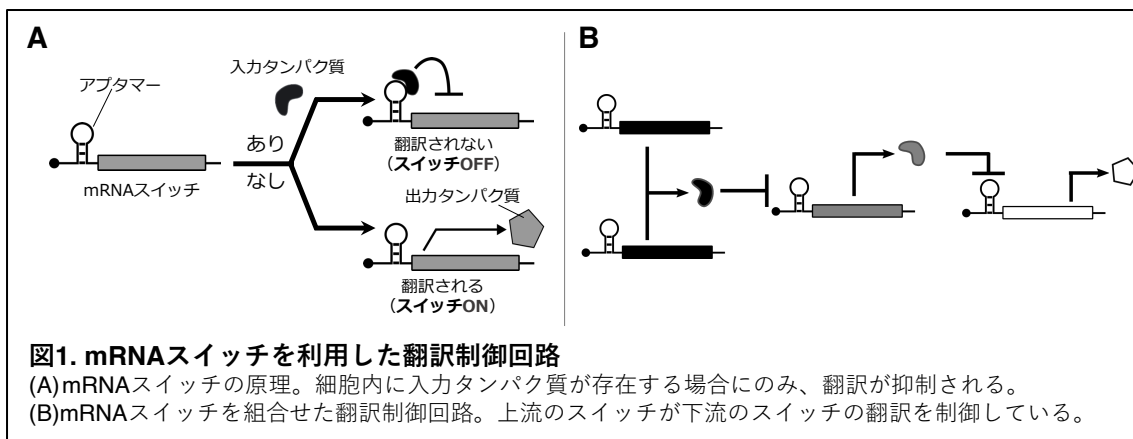
キーワード：人工遺伝子回路 翻訳制御 RNA/RNP 細胞コンピューティング

1. 研究開始当初の背景

合成生物学分野では、細胞機能・運命をコンピュータのように制御する研究が進められてきた。任意の遺伝子発現パターンをプログラム可能とすることで、生命現象の理解や新たな医療手段の創発が期待されている。このような細胞コンピューティングの基盤となるのが、生物学的モジュールを組合わせて構築した人工遺伝子回路である。これまでの研究では、転写制御モジュールが回路の構築によく利用されてきた。それに伴って、利用可能なモジュールが複数報告されているが、複雑な哺乳類細胞内で自在に駆動させることができる大規模な遺伝子回路の構築例は非常に少ない。加えて、回路を大規模化する際には、より多くのモジュールをベクターに搭載する必要がある。これは、ベクターの作製及び細胞内への回路の送達を困難にする可能性がある。さらに、転写制御回路を利用するためには、モジュールをDNA導入法によって細胞に送達する必要がある。こうした外来DNAを細胞内へ送達することは、ゲノムへの組み込みによる健常細胞のがん化などの問題を孕んでいるため、遺伝子回路の医療応用可能性を制限する。したがって、モジュールの拡張とシステムの大規模化が容易にでき、かつ、安全性が高い遺伝子回路の設計法を確立する必要があった。

2. 研究の目的

これまでに、申請者はmRNAスイッチと呼ばれる、RNAとタンパク質をモジュールとした翻訳制御デバイスを開発してきた。mRNAスイッチは、mRNAの5'非翻訳領域に特定の分子と結合する配列（アプタマー）が存在し、ここに細胞内のタンパク質が結合することで、出力タンパク質の翻訳を抑制できる（図1A）。つまり、特定の入力タンパク質の存在に応じて、導入した出力遺伝子の発現がスイッチのようにON/OFF制御される。この翻訳制御モジュールを拡充し、転写制御モジュールと組み合わせることで、ベクター内の回路素子の集積度を大幅に向上できる。また、mRNAスイッチから発現する出力タンパク質は、別のmRNAスイッチの入力タンパク質として機能する（図1B）。すなわち、mRNAスイッチを組合せるだけで、大規模な回路を実現できる可能性がある。さらに、翻訳制御デバイスは、DNAのみならず、RNAもベクターとして利用できる。そのため、RNAによる遺伝子導入法は、DNAを用いた手法と比べ、ゲノム損傷の危険性が少なく安全性が高い。従って、mRNAスイッチを活用することで、安全性と拡張性を持つ大規模回路が構築できる可能性が高いと考えた。そこで、本研究では、「翻訳制御デバイスを拡充し、大規模細胞コンピューティングを実現するための基本的な枠組みを明らかにすること」を目的とする。



3. 研究の方法

翻訳制御を基盤とした細胞コンピューティングを実現するために以下の2計画を遂行した。

(1) RNAエンジニアリングを用いた新規翻訳制御デバイスの発明と拡充

複雑な翻訳制御回路構築に向けて、標的のmRNAスイッチのみが特異的に制御できる（直交性が高い）RNA-タンパク質（RNP）のセットが多数必要である。そこで、既知のRNA結合タンパク質（RBP）を用いてmRNAスイッチを作製し、その特性決定を行った。具体的には、HEK293FT細胞を利用し、スイッチの翻訳抑制が引き起こされるかどうかを検証した。スイッチの翻訳抑制能は、蛍光タンパク質の発現が入力タンパク質の存在時にのみ抑制されるかどうか定量することで確認した。最後に、作製したスイッチの直交性を確認した。mRNAスイッチと準備したタンパク質をあらゆる組合せで細胞に共導入し、意図したmRNAスイッチとタンパク質の組合せの場合にのみ翻訳抑制が生じるかどうか検証した。

(2) 翻訳制御デバイスを組合せた高度な遺伝子回路の構築原理の解明

高度な人工遺伝子回路を構築するために、2入力の論理回路と演算回路を構築した。ここでは、基本的な論理回路として、AND, NAND, NOR回路を構築した。各論理ゲートは、入力存在状態に応じて、蛍光タンパク質の発現が変化するように設計されている。蛍光タンパク質の発現が意図したとおりに変化しているかどうかは、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターを用いて解析した。

最後に、挙動を確認した複数のmRNAスイッチを接続することで、さらに複雑な出力を行う演算回路を構築した。ここでは、半減算器と呼ばれるものを構築した。この演算回路は、2種類の入力タンパク質の存在状態に応じて、複数の出力タンパク質の発現が変化する。論理回路の構築と同様に蛍光タンパク質の発現が意図したとおりに変化しているかどうか、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 既知のRNPを利用した翻訳制御デバイスの拡張

既知の5種類のRBPに対して、タンパク質のエンジニアリングおよびアプタマー構造の再設計を行いmRNAスイッチの感度改善と新規開発に成功した。また、新たに作製したスイッチと既存のスイッチ合計5種類が、互いに干渉しあわない（直交性が高い）ことを見出した（図2）。これは、スイッチを組合せて人工遺伝子回路を構築する際に極めて重要な特性である。また、これらスイッチがmRNA導入法によっても機能することを確かめた。

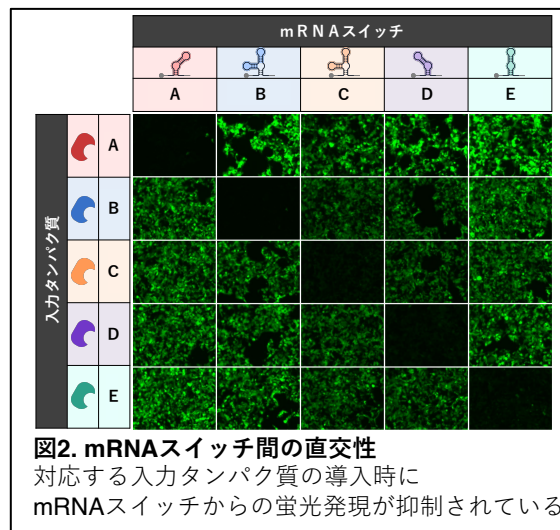


図2. mRNAスイッチ間の直交性
対応する入力タンパク質の導入時に mRNAスイッチからの蛍光発現が抑制されている

(2) CRISPR関連タンパク質を利用した翻訳制御デバイスの拡張

既知のRBPによるmRNAスイッチの作製過程で、ゲノム編集分野で利用されているCRISPR関連タンパク質（Casタンパク質）をRBPとして利用することを着想した。Casタンパク質はgRNAと呼ばれる対応するRNAと結合し、ゲノム編集効果を発揮している。そこで、Casタンパク質をRBP、gRNAをアプタマーとして利用することで、さらにmRNAスイッチが拡張できると考えた（図3A）。

25種類のCasタンパク質に対してmRNAスイッチを設計し、評価したところ、その多くが期待した通り、翻訳制御能を持つことがわかった。さらに、これらのスイッチが、直交性を有し、大規模な翻訳制御回路の構築に利用可能かどうか検証した。25種類のmRNAスイッチについてその性質を評価し、13種類が高い直交性を示すことを見出した（図3B）。

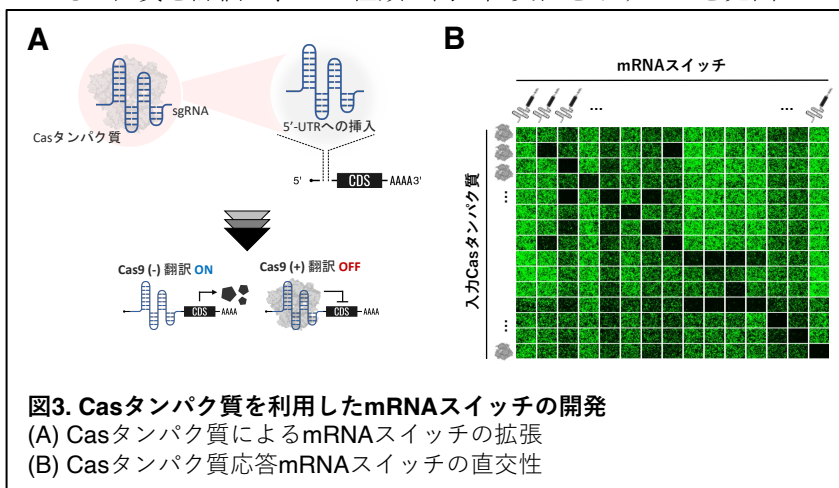


図3. Casタンパク質を利用したmRNAスイッチの開発

(A) Casタンパク質によるmRNAスイッチの拡張

(B) Casタンパク質応答mRNAスイッチの直交性

(3) 翻訳制御デバイスを組合わせた人工遺伝子回路の構築

直交性が高いと目されるRBP、スイッチの組合せを選び出し、2入力の基本的な論理回路として、AND、NAND、NOR回路を構築した。AND、NOR回路は、Casタンパク質を入力として使用し、NAND回路は、これまでゲノム編集分野で培われてきたCasタンパク質の改変方法を転用することで構築できた。特に、AND回路(図4A)については、60パターン(0と1はそれぞれ入力(出力シグナル)あり、なしを表しており、多くの組合せでAND回路の挙動(両入力があるときにのみ出力が起こる)を実現できた。

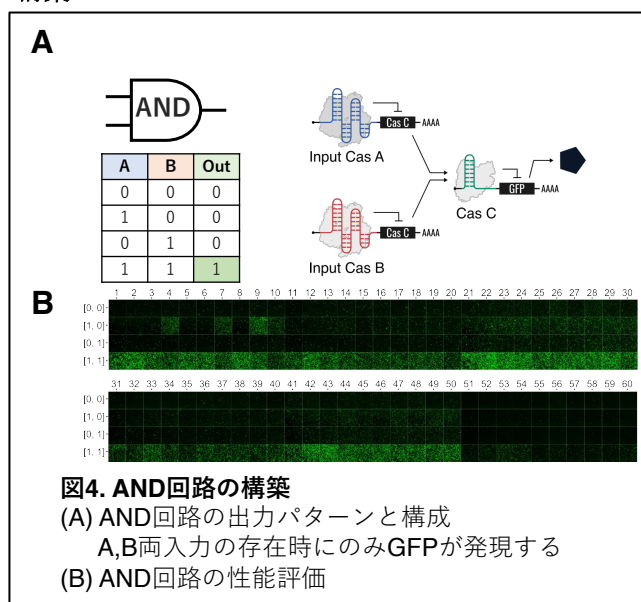


図4. AND回路の構築

(A) AND回路の出力パターンと構成

A,B両入力の存在時にのみGFPが発現する

(B) AND回路の性能評価

(4) 転写-翻訳の同時制御による少モジュール演算回路の構築

Casタンパク質を回路のモジュールとすることで、同一のタンパク質を用いて、転写と翻訳を同時に制御できるようになった。つまり、単一の入力分子を用いて転写制御による遺伝子発現は活性化し、翻訳レベルでの遺伝子発現制御は不活性化することが可能となる。この特徴を活用し、より少ないモジュールでより複雑な回路が構築できると考えた。そこで、先行研究において、転写制御モジュールと翻訳制御モジュールを合計4つ使用して構築されていた半加減器の構築を試みた(図5)。Casタンパク質を利用することで、転写と翻訳を同時に制御できるため、半分のモジュール数(2つ)で同様の挙動を哺乳類細胞に実装できることを示した。

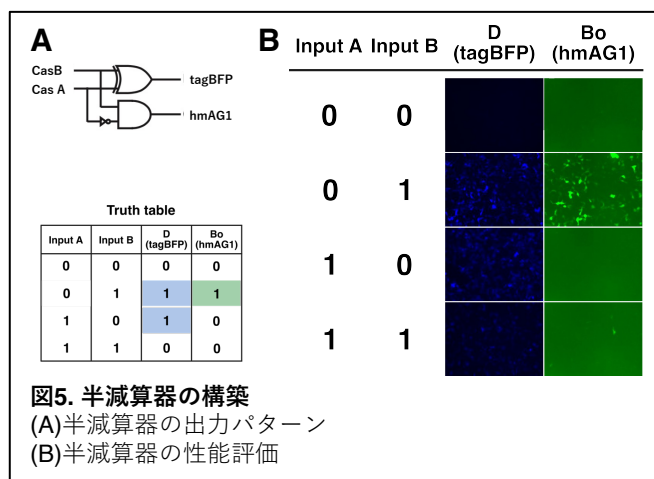


図5. 半減算器の構築

(A)半減算器の出力パターン

(B)半減算器の性能評価

このように、本研究の成果は、日本発の哺乳類細胞コンピューティングの基盤を整えるものであり、より少ない分子パーツ(モジュール)でより複雑な情報プロセッシングを可能とする「生物学的集積回路」を提供するものである。

また、(1)の成果は、「ACS Synthetic Biology」で発表した。(2) - (4)の成果については、「bioRxiv」で公開し、現在国際誌に投稿中(under revision)である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono Hiroki, Kawasaki Shunsuke, Saito Hirohide	4. 巻 9
2. 論文標題 Orthogonal Protein-Responsive mRNA Switches for Mammalian Synthetic Biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.9b00343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki Shunsuke, Ono Hiroki, Hirotsawa Moe, Saito Hirohide	4. 巻 63
2. 論文標題 RNA and protein-based nanodevices for mammalian post-transcriptional circuits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Biotechnology	6. 最初と最後の頁 99 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.copbio.2019.11.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pardi Malvin L., Wu Juanqi, Kawasaki Shunsuke, Saito Hirohide	4. 巻 184
2. 論文標題 Synthetic RNA-based post-transcriptional expression control methods and genetic circuits	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Drug Delivery Reviews	6. 最初と最後の頁 114196 ~ 114196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.addr.2022.114196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki Shunsuke, Ono Hiroki, Hirotsawa Moe, Kuwabara Takeru, Saito Hirohide	4. 巻 Sep
2. 論文標題 Programmable mammalian translational modulators by CRISPR-associated proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.09.17.460758	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川崎俊輔、桑原傑、齊藤博英
2. 発表標題 哺乳類細胞内で機能するRNAを用いた新規分子検出プラットフォーム
3. 学会等名 MBSJ分子生物学会（2021年会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎俊輔、小野紘貴、弘澤萌、齊藤博英
2. 発表標題 新規タンパク質応答型mRNAスイッチによる人工遺伝子回路の生細胞内計算能力の拡張
3. 学会等名 第12回「細胞を創る」研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎俊輔、小野紘貴、弘澤萌、齊藤博英
2. 発表標題 翻訳制御に基づく哺乳類細胞コンピュータ
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 mRNAスイッチ及びこれを用いたタンパク質の発現制御方法	発明者 齊藤 博英、川崎 俊輔、弘澤 萌、小野 紘貴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-218386	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

タンパク質を検出する合成mRNAスイッチの拡張：より複雑な細胞操作に向けて
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/191217-100000.html>
Four RNA good, 5 RNA better
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/pressrelease/news/191217-100000.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
研究協力者	小野 紘貴 (Ono Hiroki)		
研究協力者	弘澤 萌 (Hirosawa Moe)		

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