

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03540

研究課題名（和文）人工遺伝子回路による体節組織形成の再構成と操作

研究課題名（英文）Programming somitogenesis with synthetic cell-cell signaling

研究代表者

磯村 彰宏（Isomura, Akihiro）

京都大学・医生物学研究所・特定准教授

研究者番号：70512466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞自律的または非自律的に働く人工遺伝子回路の動的特性を遺伝子発現の光制御・光計測技術によって定量的に測定・評価するための基盤技術を確立し、体節の組織形成プログラムの人工操作へ応用することで、人工遺伝子回路の機能性を実証することを目的とした研究を行った。その結果、新規開発した人工シグナル伝達経路の動的特性がより明確になるとともに、その応用によって変異細胞由来のオルガノイド組織における分節時計の集団同期が回復した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、効率的な動的情報伝達を可能とする人工リガンド・人工受容体の選別・機能評価プラットフォームが、オルガノイド技術の導入を経て深化した。この技術の更なる進展によって、哺乳動物細胞の組織構築を人工遺伝子回路を使って制御・再構築することが可能になり、再生医療に資する人工多細胞組織の作製などの応用に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research was to establish a fundamental technology for quantitatively measuring and evaluating the dynamic characteristics of synthetic gene circuits to demonstrate the functionality in morphogenesis. The dynamic properties of the newly developed synthetic signaling pathway were further clarified, which further applied to the manipulation of the segmentation clock in mutant organoids.

研究分野：生物物理学

キーワード：合成生物学 人工遺伝子回路 オルガノイド 分節時計 光遺伝学

## 1.研究開始当初の背景

合成生物学の究極の目標の一つは、外因性の転写因子などを人工的に配線した「人工遺伝子回路」を組み込んだ改変細胞によって、ヒトの生体機能や微生物集団の挙動を自在に制御することである。もしそれが可能になれば、例えば病変組織の状態を感知して薬理作用のある物質を放出させて病気を治療できるような移植可能なヒト由来細胞や、バイオ燃料などの有用な代謝物を大量に生産する微生物集団を作製できることになり、その社会的なインパクトは計り知れない。そのような背景の中、ここ 10 年の間で、細胞集団の挙動を人工遺伝子回路によってプログラムして高度な振る舞いを人工的に構築する試みが、主に大腸菌などを対象に行われてきた。

しかし、ヒトへの直接的な医療応用が期待される哺乳動物細胞では動的かつ精緻な組織構築過程の操作に成功した例はほとんど報告されていない。これは、作製した人工遺伝子回路の動的特性を定量的に計測・評価することが困難で、人工回路の動作検証に有用な組織構築のモデル実験系が存在しなかったためと考えられる。もし、そのような一連の工程を実現する統合的なプラットフォームを整備することができれば、多細胞組織の動的な時空間パターンを制御・再構成するための革新的技術の確立に繋がると期待される。

## 2.研究の目的

本研究では、細胞自律的または非自律的に働く人工遺伝子回路を構築し、その動的特性を遺伝子発現の光制御・光計測技術によって定量的に測定・評価するための基盤技術を確立し、体節の組織形成プログラムの人工操作に応用することで人工遺伝子回路の機能性を実証することを目的とした研究を行った。

## 3.研究の方法

本研究では、synNotch システム (Morsut et al. Cell 2016) の人工リガンドと人工受容体の双方を遺伝子改変することで細胞非自律的に働く新規人工シグナル伝達経路を作製した。そして、光遺伝学技術を活用し、人工シグナル伝達経路における細胞間の動的情報伝達を検証し、その動的特性を精密計測した。具体的には、青色光に応答して人工リガンド(細胞膜上に提示された mCherry)を発現する送信細胞と、人工リガンドの入力に応答して発光レポーターが発現する受信細胞 (mCherry と交差するラクダ由来抗体を使った人工受容体を発現)をマウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて作製し、共培養しながら周期的な光刺激を与えることで動的情報伝達が可能かどうかを調べた(光遺伝学的送受信アッセイ)。

さらに、得られた動的情報伝達を可能とする人工シグナル経路を使って、マウス ES 細胞から分化誘導した分節時計様細胞における遺伝子発現リズムの集団同期の人工制御を試みた。具体的には、分節時計における Hes7 転写活性のレポーター遺伝子を導入したマウス ES 細胞を樹立し、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集で集団同期に必要な遺伝子をノックアウトした。その後、人工シグナル伝達経路を導入して集団同期の回復を試みた。回復実験には、体節の 3 次元組織を簡便に人工誘導できる新規技術を開発して利用した。

## 4.研究成果

まず、細胞自律的な人工遺伝子回路を選定する目的で、Hes7 の転写フィードバックの遅延時間の改

変を試みた。具体的には、Hes7 プロモーターによって人工転写活性化因子(synTA)を誘導し、synTA のターゲットプロモーター(pSyn)によって Hes7 の発現を振動的に誘導するデザインを試した。しかし、pSyn の下流での振動的な発現を誘導できなかった。

次に、細胞非自律的な人工遺伝子回路を選定する目的で、人工リガンドと人工受容体を使って光遺伝学的送受信アッセイを行った。具体的には、送信細胞と受信細胞の共培養系に 4 時間周期の青色光照射を行い、人工リガンドの周期的発現に伴う、受信細胞からの生物発光レポーターシグナルの周期的な応答の検出を試みた。本研究開始前の結果では、改変前の synNotch システムにおいて 4 時間周期の振動の送受信能力が限定的である一方で、人工リガンドの改変によって振動情報を伝達できることがわかってきた(図 1A-B)。本研究で、人工リガンドにレポーター遺伝子を融合して翻訳後の細胞内輸送を直接タイムラプス観察した結果、改変前人工リガンドは細胞膜上への輸送が改変後人工リガンドと比べて遅いことが分かった。

そこで、新しく得られた人工シグナル伝達経路の応用可能性を検証するため、マウス ES 細胞から分化誘導した分節時計様細胞における遺伝子発現リズムの集団同期の人工制御を試みた。DII1 遺伝子変異 ES 細胞由来の 2 次元培養下の分節時計様細胞集団では Hes7 転写の集団リズム同期が早期に乱れて脱同期することが本研究開始前に分かっていた。本研究では新たに体節組織を模倣したオルガノイドを誘導する技術を導入し、人工シグナルによる回復を検証した(図 1C)。その結果、改変後の人工リガンドを使用した場合は体節オルガノイドにおける Hes7 振動回数が回復する一方で、改変前の人工リガンドでは顕著な回復が見られなかった(図 1D)。

以上の結果から、分節時計の同期振動における細胞間シグナルの動的特性の重要性が、光遺伝学による機能評価とオルガノイド技術による検証実験の融合的手法によって構成的に明らかになった。

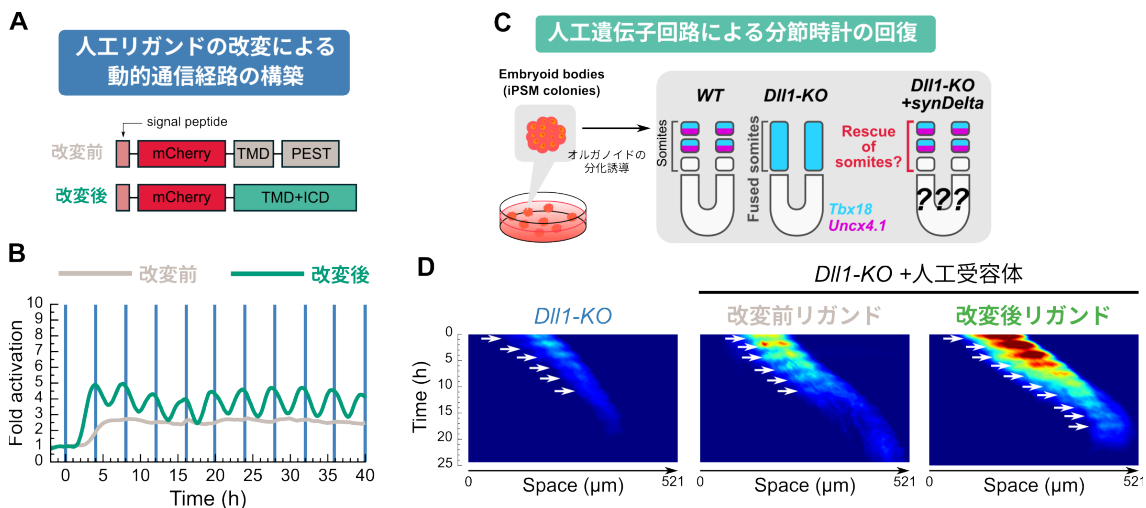


図 1: 人工細胞間シグナルによる分節時計の人工操作。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maeda Yuki, Isomura Akihiro, Masaki Taimu, Kageyama Ryoichiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Differential cell-cycle control by oscillatory versus sustained Hes1 expression via p21	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112520 ~ 112520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112520	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 Kageyama Ryoichiro, Isomura Akihiro, Shimojo Hiromi	4. 巻 38
2. 論文標題 Biological Significance of the Coupling Delay in Synchronized Oscillations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiology	6. 最初と最後の頁 63 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physiol.00023.2022	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯村 彰宏
2. 発表標題 分節時計における遺伝子発現振動波の制御機構
3. 学会等名 第75 回日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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