

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23680031

研究課題名(和文) 哺乳細胞内で動作する人工遺伝子回路によるエピジェネティック・ランドスケープの構築

研究課題名(英文) Epigenetic landscape defined by artificial genetic circuit

## 研究代表者

木賀 大介 (Kiga, Daisuke)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30376587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物において細胞が多様化していく様は、同一の遺伝子セットを持った細胞群が、細胞内・細胞間の分子ネットワークによって自律的に地形を規定し、この地形に沿って状態変化するよう自らをプログラムしていると、とらえることができる。また、細胞間の分子ネットワークは、細胞相互の位置関係も重要な意味を持つ。本研究では、この現象を追及するために、本質を抽出したシステムとして人工遺伝子回路を研究者が構築し解析することを行った。

研究成果の概要(英文)：Cell diversification in multi-cellular organism can be described by a trajectory on a programmed landscape which is defined by molecular networks inside and between cells. Especially in such networks between cells, allocations of cells are an important parameter of the program. Here, artificial genetic circuits constructed in this study are used for pursuing mechanisms in cell diversification process.

研究分野：合成生物学

キーワード：人工遺伝子回路 合成生物学 エピジェネティック・ランドスケープ 数理モデル 分化

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において細胞が多様化していく様子を抽象的にあわらした図が、エッジネティック・ランドスケープである。当初は、安定状態が1つから多数へと、経時的に変化するポテンシャルを連続的に記したものと理解されたこの地形では、球の転がり方は発生過程での細胞の分化に相当すると考えられた。しかし、iPS化による“逆行”が可能であることは、地形上での運動は単なる時間変化では無いことを示している。つまり、同一の遺伝子セットを持った細胞群が、細胞内・細胞間の分子ネットワークによって自律的に地形を規定し、この地形に沿って状態変化するよう自らをプログラムしていると、とらえることができる。また、細胞間の分子ネットワークは、細胞相互の位置関係も重要な意味を持つ。複雑なシステムについての研究では、あえて、本質を抽出したシステムを研究者が構築し解析することも有効な手段である。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞間シグナル分子の効果を概念的に示している Waddington の地形を規定できるように遺伝子を組み合わせた人工ネットワークを細胞に導入し、細胞の位置関係に対応してどのようなパターン形成が達成されるかを、数理モデルと合わせ検証することを目的とする。細胞たちは、自律的にシグナル分子を生産しながら、この地形に沿って状態変化することになる。

### 3. 研究の方法

本研究では、これまで液体培養での研究にて細胞間通信に依存した分化の成果を得てきた人工遺伝子回路を導入した大腸菌を用いた実験によるパターン形成を検証し、および、哺乳類培養細胞における相同回路の構築を試みた。

大腸菌を用いたパターン形成では、Sekine, et al. (2011) によって報告されたものを拡張したものをを用いた。この系では、AHL 送受信系と Clts-LacI 相互抑制系を組み合わせることで、人工遺伝子回路を導入された大腸菌が表現形 L の細胞集団からシグナル分子 AHL のやり取りを通して表現形 H の細胞集団と表現形 L の細胞集団へと多様化がなされるようにプログラムされている。本研究では、人工遺伝子回路に RFP の制御を加え、GFP と RFP を排他的に発現できるようにしたものである。この系では、2つのプラスミドが用いられている。片方のプラスミドには L-1 con プロモーター ( $P_{L-1\ con}$ )、LacI、LuxI、Lux/Lac プロモーター ( $P_{Lux/Luc}$ )、Clts、GFP のそれぞれの遺伝子を、もう片方のプラスミドには tet プロモーター ( $P_{tet}$ )、LuxR、 $P_{L-1\ con}$ 、RFP のそれぞれの遺伝子を含んでいる。遺伝子の発現誘導状態は、フローサイトメーターによ

る蛍光強度の測定により行った。

平面上での大腸菌のコロニー形成と観察には、菌液をガラスボトムディッシュ上に置き、ガラス上で大腸菌が生育できるように上から LB-agarose ゲルを被せて 32 の環境下で培養した。

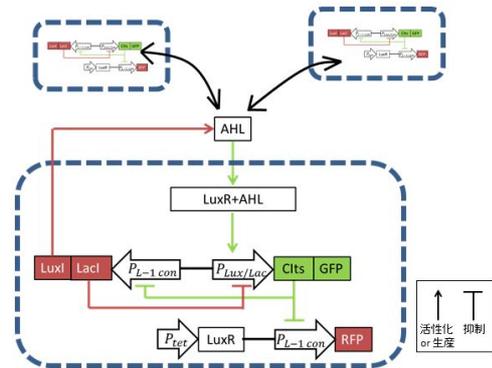


図1 パターン形成用人工遺伝子回路

哺乳類培養細胞における相同回路の構築のために、まず、遺伝子発現の相安定性の発揮の動作検証を、2種類の回路について行った。

第一の回路は、を構成する2つの転写抑制タンパク質は、Streptomyces の Pip と E. coli エリスロマイシン・リプレッサーそれぞれに、真核生物の転写サイレンサーである KRAB ドメインを融合させたものである。それぞれの抑制タンパク質が特異的に結合する配列は、SV40 プロモーター直下に配置している。

第二の回路は、二種類の TAL エフェクターを用い、双方それぞれに、転写活性化ドメイン VP16、転写サイレンサーである KRAB を結合させた、4種類の転写制御タンパク質を用いた。

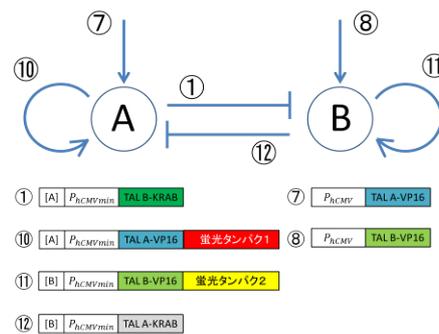


図2 哺乳細胞用の相安定性回路

### 4. 研究成果

まずパターン形成に先立って、RFP の制御を加えると試験管培養での大腸菌集団の表現形多様化に影響がないかを調べた。実験の準備として、IPTG 濃度 2 mM と AHL 濃度 1  $\mu$  M の条件下で一定時間 32 培養することで大腸菌をすべて GFP 発現側に誘導した。0h 後の誘導直後のサンプルに対して(図3右上段)、

2h後のサンプル(図3右二段目)では大腸菌のGFP発現の減衰が観察された。4h後のサンプル(図3右三段目)ではGFP発現集団とRFP発現集団が分かれ、6h後のサンプル(図3右最下段)では4hのときに分裂した2つの集団がそれぞれ高い蛍光強度で固定されていることが確認された。

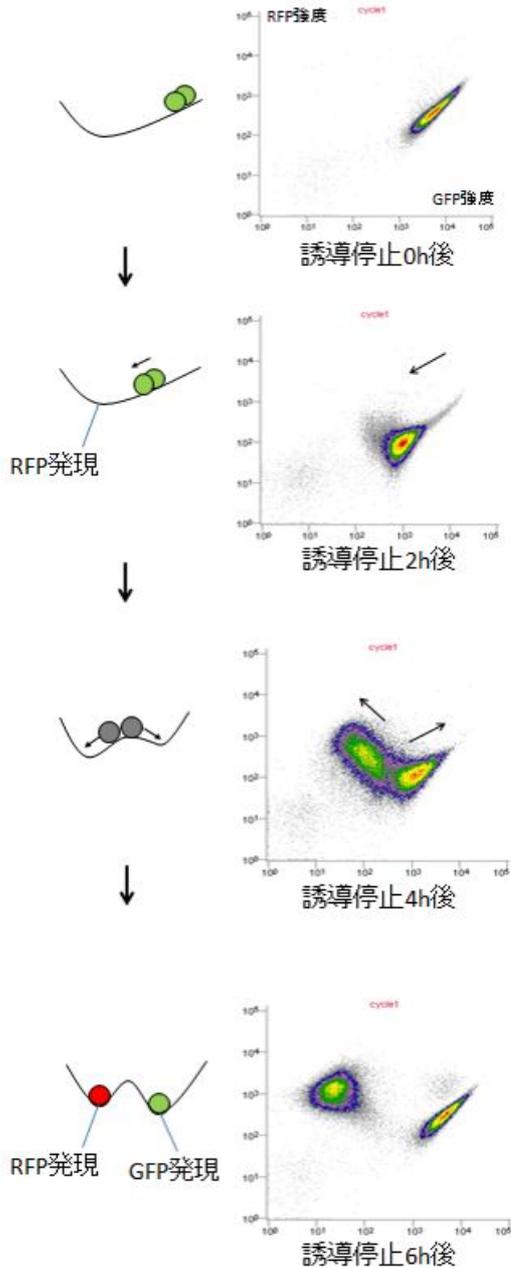


図3 多様化の過程

続いて、個体培地上でのパターン形成を確認したところ、細胞が密な場合と疎な場合の、細胞間の位置の違いによって、多様化のパターンが異なることを確認した。図4にその概略を示す。

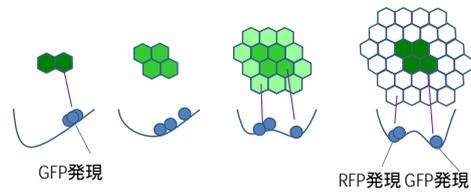


図4 細胞の位置に依存したパターン形成

哺乳細胞内における多様化観察のため、これまでに報告されている論文を参考に、2種類の相安定性回路を作成した。Pip とエリスロマイシン・リプレッサーを使用した系については、個々の転写抑制因子の挙動を細胞集団に対して確認できたものの、相互抑制系を構築した際の相安定性を確認することはできなかった。また、TAL エフェクターを使用した系については、活性化および抑制のヒル係数が1を超える場合は図5のように相安定性を期待できるものの、係数が1の場合には、他の報告に反して、相安定性が期待できないことを確認した。実際、この相互抑制・自己活性化系を導入した細胞個々の挙動を蛍光顕微鏡で観察したものの、単に蛍光タンパク質の発現を行うプラスミド2種類を導入した際との明瞭な差を認めることはできなかった。

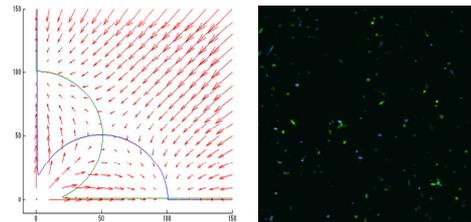


図5 遺伝子回路の挙動を示す相図と、細胞の応答

本研究を総合し、哺乳細胞の多様化における細胞の位置の効果を示すことはできなかったものの、そのエッセンスを抽出した系を大腸菌を使用して構築し、種々の条件での多様化の結果から考察を進められていることは(現時点ではデータ非公開)、多様化システムの理解に新たな一面を加えることに成功できたと考える。

<引用文献>

Sekine, R., et al. "Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108, 17969-17973. (2011)

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 10 件)

T. Moriya, M. Yamamura, and D. Kiga,  
*Effects of downstream genes on  
synthetic genetic circuits.*, BMC Syst  
Biol, 査読有, Vol. **8 Suppl 4** No., 2014, p.  
S4,

DOI: 10.1186/1752-0509-8-S4-S4.

K. Ishimatsu, T. Hata, A. Mochizuki, R.  
Sekine, M. Yamamura, and D. Kiga,  
*General applicability of synthetic  
gene-overexpression for cell-type ratio  
control via reprogramming.*, ACS  
Synthetic Biology, 査読有, Vol. **3** No. 9,  
2014, p. 638-644,

DOI: 10.1021/sb400102w.

関根亮二、木賀大介、「人工遺伝子回路」  
の構築とその制御、生化学会誌、査読無、  
86 巻 2 号、2014、 p201-208

[http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/  
uploads/2014/11/86-02-11.pdf](http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/11/86-02-11.pdf)

関根亮二、木賀大介、ロバストな試験管  
内・細胞内分子ネットワークの構築、査読  
無、細胞工学、33 巻 1 号、2014、 p26-30  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40019927163>

D. Kiga, *Synthetic Biology and Dual  
Use.*, Journal of Disaster Research, 査  
読有, Vol. **8** No. 4, 2013, p. 698-704,  
[https://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?  
mode=present&inputfile=DSSTR00080  
0040016.xml](https://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?mode=present&inputfile=DSSTR000800040016.xml).

T. Thamamongood, N.Z.L. Lim, T.Y.H.  
Ho, S. Ayukawa, D. Kiga, and K.L.  
Chow, *Cultivation of Synthetic Biology  
with the iGEM Competition*, Journal of  
Advanced Computational Intelligence  
and Intelligent Informatics, 査読有, Vol.  
**17** No. 2, 2013, p. 161-166,

[https://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?  
mode=present&inputfile=JACII001700  
020004.xml](https://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?mode=present&inputfile=JACII001700020004.xml).

関根亮二、木賀大介、Waddington 地形に  
沿った細胞種多様化のモデル実験、生物  
物理学会誌、査読有、53 巻 6 号、2013、  
p319-320

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bioph  
ys/53/6/53\\_319/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/53/6/53_319/_article/-char/ja/)

関根亮二、木賀大介、細胞内における人工  
遺伝子回路の構築、生物工学会誌、査読無、  
91 巻 6 号、2013、 p327-333,

[http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/  
file/sbj/9106/9106\\_tokushu\\_5.pdf](http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9106/9106_tokushu_5.pdf)

R. Sekine, D. Kiga, and M. Yamamura,  
*Design strategy for an initial  
state-independent diversity generator.*,  
Chem-Bio Informatics Journal, 査読有,  
Vol. **12** No., 2012, p. 39-49,

DOI: 10.1273/cbij.12.39.

R. Sekine, M. Yamamura, M. Hagiya,  
and D. Kiga, *Tunability of the ratio of  
cell states after the synthetic  
diversification by the diversity  
generator.* Communicative &

Integrative Biology, 査読有, Vol. **5** No. 4,  
2012, p. 393-394,

DOI: 10.4161/cib.20310.

〔学会発表〕(計 7 件)

加藤和人、木賀大介、シンポジウム「細胞  
を創る研究と社会の関わり」について、今、  
一度振り返る、細胞を創る研究会 6.0、  
2013 年 11 月 15 日、鶴岡メタポロームキ  
ャンパスレクチャーホール(山形県鶴岡  
市)

Daisuke Kiga, Implementation of  
artificial genetic circuits based on  
deformation of a nullcline, The first  
annual winter q-bio meeting, Feb 18,

2013, Honolulu (USA)

Daisuke Kiga, Conferring multipotency to the bistable system by overexpression of genes, Joint Conference on Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology, Oct 15, 2012, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

木賀大介, ヌルクラインの変形に基づく人工遺伝子回路の実装、第 35 回分子生物学会シンポジウム複雑な生命システムへの理論的・構成的アプローチ、2012 年 12 月 12 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県博多区)

木賀大介, 数理モデルと定量結果とに基づいた人工遺伝子回路の改善サイクル、定量生物学会 第五回年会、2012 年 11 月 25 日、東京大学 駒場 キャンパス 生産技術研究所 An 棟 コンベンションホール (東京都目黒区)

石松愛、木賀大介 遺伝子大量発現によって双安定システムに多能性を与える、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 26 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, A repeat of the synthetic diversification by periodical dilution, COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCE on Synthetic Biology, Nov 28, 2012, Suzhou (China)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木賀 大介 (KIGA, Daisuke)  
東京工業大学・大学院総合理工学研究科・  
准教授  
研究者番号：30376587