

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830139

研究課題名(和文)人工細胞を用いた遺伝学および合成生物学的手法の融合

研究課題名(英文)Integrating reductive and synthetic approaches in biology using artificial cells

研究代表者

青木 航(Aoki, Wataru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10722184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、還元的方法と構成的方法を一度に進められる超高速解析法の構築を目指した。本方法の最も重要な要素は、リボソーム内部に再構成転写翻訳システム(リボソームとRNA合成酵素)を導入した人工細胞である。例えば、何らかの生物学的システムの機能の指標となるレポーターを作成し、それと共に、全遺伝子ライブラリから遺伝子を“ランダム”に人工細胞に封入する。封入された遺伝子はRNA合成酵素とリボソームによって発現し、機能を発揮する。レポーターが反応すれば、その人工細胞内部には対象の生物学的システムの機能に必要な遺伝子セットが存在すると思われる。

研究成果の概要(英文)：We propose ‘synthetic genetics’ as a novel methodology that integrates reductive and synthetic approaches used in life science research. ‘Synthetic genetics’ enables determinations of sets of genes required for the functioning of any biological subsystem. This method utilizes artificial cell-like compartments, including a randomly introduced whole gene library, strictly defined components for in vitro transcription and translation, and a reporter that fluoresces ‘only when a particular function of a target biological subsystem is active.’ The set of genes necessary for the target biological subsystem can be identified by isolating fluorescent artificial cells and multiplex next-generation sequencing of genes included in these cells.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 構成的遺伝学

1. 研究開始当初の背景

生命科学の目的は genotype と phenotype の関係性を明らかにすることであり、還元的な方法 (広義の genetics including omics approach) と合成的な方法 (Synthetic biology) という 2 つの方法論により研究が進められる。還元的な方法は、研究対象の生物学的システム (転写、翻訳、代謝など) に対し、それに寄与する遺伝子を同定することを目的とする。還元的な方法は、研究対象となる生物学的システムに寄与する遺伝子を個別に見出せるが、システムの全体像を明らかにすることは難しい。この欠点を克服するために、合成的な方法が用いられる。合成的な方法では、既知の遺伝子群を単離して組み合わせ、ターゲットとなる生物学区的システムを再構成し、全体像の完全な理解 (proof) を目指す。生命科学においては、この二つの方法論を交互に組み合わせる研究が行われるが、研究対象のシステムにおける知識ギャップを埋めるのは難しく、完全な理解には莫大な時間と労力が必要とされる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、還元的な方法と合成的な方法の融合、即ち、システムに寄与する遺伝子の探索とシステム全体の再構成を同時に、かつハイスループットに進めることのできる、構成的な遺伝学を提唱することである。本方法のコアとなる要素は、内容物が厳密に決定された人工細胞である。人工細胞とは、*in vitro* 転写翻訳系 (PURE system) を含むリポソームであり、任意の遺伝子断片を導入すると、機能的なタンパク質が合成される。このリポソームは 10^{10} ほどの個数を作成でき、かつ、内部に含まれる遺伝子の機能を、genotype-phenotype linkage を保ったまま評価できる。

3. 研究の方法

本論文で提案する構成的な遺伝学の概略は以下のとおりである。まず、研究対象となる生物の全遺伝子ライブラリーを準備し、そのライブラリーをランダムに封入した人工細胞を作成する。同時に、再構成を試みるシステムが“機能した場合のみに”蛍光を発するレポーターを封入する。次に、さまざまな組み合わせの遺伝子セットを内包する人工細胞ライブラリーを作成する。PURE system により、封入された遺伝子セットからタンパク質が合成され機能を発揮するため、もしターゲットとなるシステムの機能に必要なとされる遺伝子セットがたまたま内部に含まれるならば、その人工細胞は蛍光を発する。これらの蛍光人工細胞を FACS によって単離し、次世代シーケンサーを用いて、それぞれの蛍光人工細胞に含有される遺伝子を個別に決定する。それぞれの人工細胞には必要とされない遺伝子も多く含まれるため、クラスター解析により、蛍光人工細胞に共通して含まれる遺伝子セットを決定する。この共通因子が、ターゲットとなるシステムに必要なとされる遺伝子セットであると考えられる。本方法の重要な点は、内容物が厳密に決定されている人工細胞を足場として、全遺伝子ライブラリーを出発点とした genetics 的探索を行うことで、システムに寄与する遺伝子の探索とシステム全体の再構成を同時に行えることである。次世代シーケンサーの大規模情報処理能力により、この方法は実現可能となる。

4. 研究成果

我々は、大腸菌の全遺伝子ライブラリーを出発点として、“ β -galactosides 分解システム”の超高速再構成を試みた。まず、T7 promoter が付加された、大腸菌

の全 4123 遺伝子を含む *E. coli* ORF library を作成した。次に、PURE system solution, 100 μ M CMFDG, 1 μ M transferrin-Alexa Fluor 647 conjugate (volume marker), 5 nM *E. coli* ORF library を含む人工細胞ライブラリーを作成した。CMFDG は β -galactosides 分解システムによって加水分解されると、蛍光を発するレポーターである (図 1a)。作成された人工細胞を顕微鏡で観察すると、その平均サイズは 2.4 μ m (平均体積は 7.2 fL)であったことから、各リポソームにはおよそ 20 種の遺伝子がランダムに分配されていると推定される。重複組み合わせの公式から計算すると、4123 遺伝子からランダムに 20 種の遺伝子を選んだ場合、そこにターゲットとなるひとつの遺伝子が含まれている確率は、0.48%である。次のステップとして、作成された人工細胞を 37°C でインキュベートして遺伝子を発現させ、FACS で解析を行った。その結果、*E. coli* ORF library を含まないリポソームでは CMFDG 由来の蛍光は検出されなかったが、*E. coli* ORF library を含むリポソームでは、0.26%の人工細胞に蛍光が検出された (図 1b)。 β -galactosides 分解システムに必要とされる遺伝子を決定するために、蛍光リポソーム、および、ネガティブコントロールとして非蛍光リポソームを単離し、次世代シーケンサーにより含有されていた遺伝子を同定した。蛍光リポソームに含まれていた遺伝子に対してクラスター解析を行うと、全ての人工細胞に *LacZ* 遺伝子が含まれて明瞭なクラスターを形成し、それ以外には共通因子は見つからなかった。また、非蛍光リポソームに対しても同様の解析を行ったところ、共通成分はひとつも見出されなかった (図 2)。

これらの結果から、全遺伝子ラ

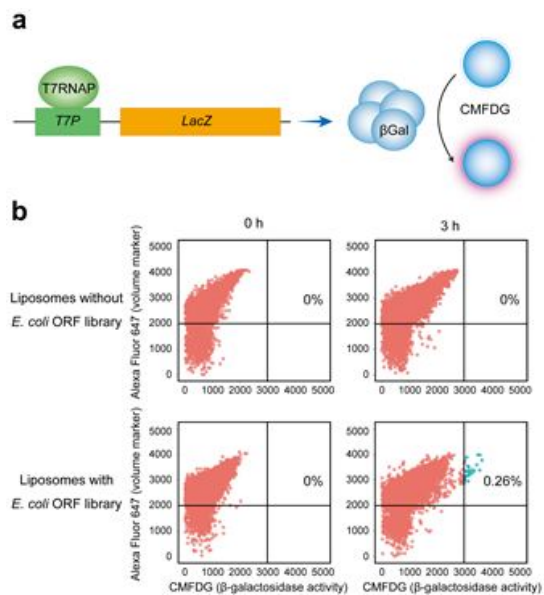


図 1 FACS 解析

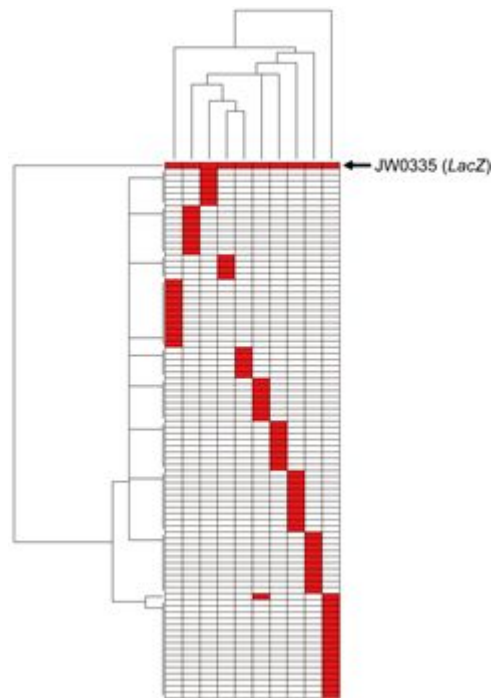


図 2 次世代シーケンサー解析

縦軸が個別遺伝子、横軸が個別リポソームを表す。赤色で示されたカラムが、各リポソームで同定された遺伝子。

イブラリー (約 4000 遺伝子) を出発点として、 β -galactosides 分解システムの超高速再構成に成功したと考えられる。実際に、同定された *LacZ* 遺伝子のみを含む人工細胞を作成すると、ほぼ全ての人工細胞が蛍光を持つようになった。本研究で

はβ-galactosides 分解システムをターゲットとして用いたが、適切なレポーターを設定すること、任意の生物学的システムに対して同様の実験が可能である。

この研究費助成事業で得られた成果を基にして、さらに複雑なシステムであるゲノム修復システムや大腸菌リボソーム生合成システムを研究対象とし、その完全再構成を試みる予定である。

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 2 件)

1. Espulgar W, Aoki W, Ikeuchi T, Mita D, Saito M, Lee JK, Tamiya E. Centrifugal microfluidic platform for single-cell level cardiomyocyte-based drug profiling and screening. *Lab on a Chip*, 15(17), 3572–3580, **2015**.
2. Espulgar W, Yamaguchi Y, Aoki W, Mita D, Saito M, Lee JK, Tamiya E. Single cell trapping and cell-cell interaction monitoring of cardiomyocytes in a designed microfluidic chip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207, 43–50, **2015**.

[学会発表](計 4 件)

1. Aoki W, Saito M, Tamiya E. Integrating reductive and synthetic approaches in biology using man-made cell-like compartments. PACIFICHEM、ハワイ、ホノルル、2015年12月15日~20日
2. Aoki W, Ueda M. Synthetic approaches for understanding biological phenomena. University of Bordeaux-Kyoto University Mini-Symposium on Biomolecular Science、京都、京都大学、2016年1月25日
3. Aoki W. Integrating reductive and synthetic approaches in biology using artificial cell. Integaration of Synthetic Biology and Systems Biology of Microbes、生駒、奈良先端大学、2016年3月17日~18日
4. Aoki W, Komura S, Tamiya E, Ueda M. Integrating reductive and synthetic

approaches in biology using man-made cell-like compartments. ASBMB、サンディエゴ、アメリカ、2016年4月2日~4月6日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 航 (AOKI, Wataru)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：10722184

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：