

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されず

研究課題名	遺伝子発現ネットワークの新たな性質解明を目指した合成生物学的アプローチ
研究機関・ 部局・職名	京都大学・学際融合教育研究推進センター 生命科学系キャリアパス形成ユニット・特定助教
氏名	戎家美紀

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	52,687,019	52,687,019	0	52,687,019	52,687,019	0	0
間接経費	15,806,105	15,806,105	0	15,806,105	15,806,105	0	0
合計	68,493,124	68,493,124	0	68,493,124	68,493,124	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	3,158,542	38,937,335	9,091,592	0	51,187,469
旅費	0	40,080	422,310	0	462,390
謝金・人件費等	0	0	0	0	0
その他	0	198,019	839,141	0	1,037,160
直接経費計	3,158,542	39,175,434	10,353,043	0	52,687,019
間接経費計	0	0	15,806,105	0	15,806,105
合計	3,158,542	39,175,434	26,159,148	0	68,493,124

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
サーマルサイクラー	アプライドバイオシステムズ Veriti96	1	831,600	831,600	23. 3.10	京都大学
極微量分光高度計	Thermo Fisher Scientific Nanodrop2000c	1	1,804,950	1,804,950	23. 3. 9	京都大学
セルソーター	DCS-240Y-CM	1	29,925,000	29,925,000	23.12.28	京都大学
バイオシェーカー	BR-23FP-MR	1	604,800	604,800	24. 1.25	京都大学
輸入マウス	JR#8875	1	520,380	520,380	24. 1.20	京都大学
BKL TRANSFAC online Flat File	ソフトウェア利用権付ID・非営利団体向け(最少使用単位)	1	630,000	630,000	24. 4. 2	京都大学

5. 研究成果の概要

本研究では、(1) 細胞パターンの作製、(2) 転写履歴追跡法の開発、(3) 転写の波及効果の再現、に取り組んだ。課題1では、目標としていた細胞パターンである、「シグナル伝播パターン」を生み出す人工遺伝子ネットワークの作製に成功した。多細胞生物での細胞パターン作製は世界的にも例がなく、本遺伝子ネットワークは重要な基礎技術となる。課題2では、ゲノムへの変異導入方法を複数検討したが、転写頻度に応じた変異導入という条件に合うものは無かった。課題3では、IEGのプロモーター配列をゲノムに挿入したが、この方法では波及効果は再現されることがわかった。課題2と3で検討した様々なゲノム改変技術は、今後より複雑な遺伝子ネットワークを作製していく際に有用である。

課題番号	LS058
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	遺伝子発現ネットワークの新たな性質解明を目指した合成生物学的アプローチ
	Synthetic biology approaches to new understandings of gene expression network
研究機関・部局・職名 (下段英語表記)	京都大学・学際融合教育研究推進センター 生命科学系キャリアパス形成ユニット・特定助教
	Kyoto University, Career-Path Promotion Unit for Young Life Scientists, Assistant professor
氏名 (下段英語表記)	戎家美紀
	Miki Ebisuya

研究成果の概要

(和文):

本研究では、(1) 細胞パターンの作製、(2) 転写履歴追跡法の開発、(3) 転写の波及効果の再現、に取り組んだ。課題 1 では、目標としていた細胞パターンである、「シグナル伝播パターン」を生み出す人工遺伝子ネットワークの作製に成功した。多細胞生物での細胞パターン作製は世界的にも例がなく、本遺伝子ネットワークは重要な基礎技術となる。課題 2 では、ゲノムへの変異導入方法を複数検討したが、転写頻度に応じた変異導入という条件に合うものは無かった。課題 3 では、IEG のプロモーター配列をゲノムに挿入したが、この方法では波及効果は再現されないことがわかった。課題 2 と 3 で検討した様々なゲノム改変技術は、今後より複雑な遺伝子ネットワークを作製していく際に有用である。

(英文):

I have proposed and carried out three projects: (1) Creation of cell patterns, (2) Development of a transcriptional tracking method, and (3) Recreation of the transcriptional ripple effect. In the project-1, I have succeeded in creating a "signal propagation cell pattern", where a gene expression

様式21

signal propagates to the neighboring cells. This work represents the first creation of a cell pattern in multicellular organisms and will serve as a foundation for more complex artificial gene networks. In the project-2, I tried multiple methods to cause genome mutations in proportion to the frequency of transcription, but none of the methods served the purpose. In the project-3, I inserted the promoter sequence of IEG into the genome, but the inserted sequence did not cause the transcriptional ripple effect. However, the genome modification methods I investigated in the projects-2 & -3 should be useful to create more complex gene networks in the future.

1. 執行金額 68,493,124 円
(うち、直接経費 52,687,019 円、 間接経費 15,806,105 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成25年3月31日

3. 研究目的

本研究では、遺伝子発現にフォーカスして、新しいものを作ることで既存の問題を解決したり新しい理解を得ることを目指した。具体的には、「(1) 細胞パターンの作製」「(2) 転写履歴追跡法の開発」「(3) 転写の波及効果の再現」という3つの課題に取り組んだ。

課題(1): 隣接した細胞間で働く小規模な人工遺伝子発現ネットワークを作り、細胞パターンの作製を目指した。特に、シグナルが隣接細胞に伝播していくような、シグナル伝播パターンを作製し、パターン形成の条件を探ることを目指した。

課題(2): 過去にどの遺伝子でどれだけ転写が起きていたのかという履歴を、遡って調べるしくみの開発を目指した。

課題(3): 私達が見いだした転写の波及効果という現象を、人工的に作りだすことを目指した。

なお、課題が3つもあるため、早い時点で選択と集中を行うべきとの指摘を本研究開始時に受けた。よって、課題(1)に最も重点を置いて研究を行った。

4. 研究計画・方法

課題(1): Notch シグナル伝達経路を改変した部品を組み合わせて、隣接細胞間で機能する人工遺伝子ネットワークを培養細胞上に作製した(図 1)。まず、Notch の細胞内ドメインを、原核生物由来の転写因子 tTA と置き換えたキメラ分子を作製した。これは、Notch 細胞内ドメインのまま使用すると、Notch 経路の内在性の標的遺伝子が活性化されてしまい、それらの標的遺伝子が再び Notch 経路に影響を与えるので、原核生物の tTA を用いることでそういった影響を避けるためである。この遺伝子ネットワークでは、隣接細胞から Delta の入力を受けると、Notch の細胞内ドメイン(tTA)が切断され、自由になったtTAが核に移行して転写因子として機能する。そして、tTAで誘導されるプロモーターTREの下流でDeltaの発現が誘導されるような遺伝子ネットワークを作製した。つまり、隣接細胞間でポジティブフィードバックループを作製した。ここに元々Deltaが発現し

ている細胞(トリガー細胞)を配置すると、隣の細胞で Delta の発現が誘導され、そのことによってさらに周囲の細胞でも Delta の発現が誘導され・・・、といった具合に遺伝子発現シグナルが伝播していくパターンが作れると期待された(図 2)。

課題(2): 転写が起こる度にゲノムに印をつける新規キメラ分子を作製しようと試みた。このキメラ分子を細胞に一過的に発現させた後、その細胞を増殖させてゲノム配列を解読すれば、その細胞でどのような遺伝子発現変化が起きていたか、網羅的に履歴を解析することができるかと期待された。

課題(3): 培養繊維芽細胞を増殖因子で刺激すると、Immediate-early genes (IEG)と呼ばれる一群の遺伝子の転写が誘導されるが、この時 IEG の近傍遺伝子や遺伝子間領域でも転写が起こりやすくなることを、以前の研究で発見した(転写の波及効果)。そこで、IEG のプロモーター配列をゲノムの別領域に移植し、移植した先の近傍領域で転写が起こりやすくなるか調べた。

図 1. 人工遺伝子ネットワーク

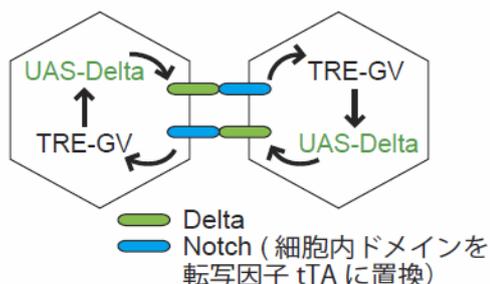


図 2. シグナル伝播パターン

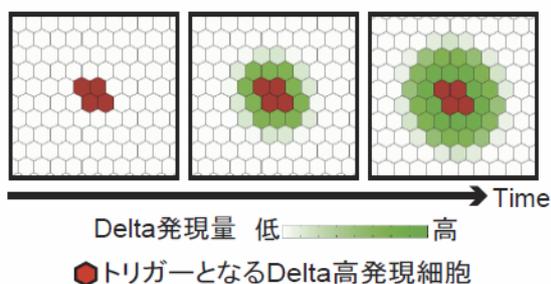


図 3. シグナル伝播パターン

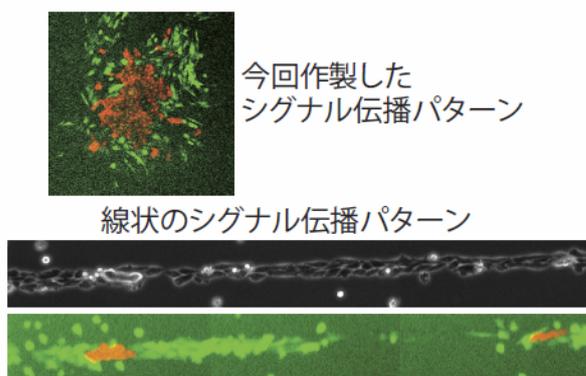
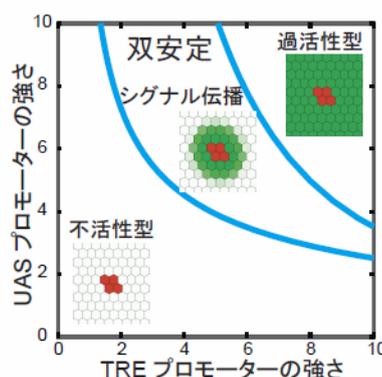


図 4. シグナル伝播の条件



5. 研究成果・波及効果

課題(1): 目標としていた細胞パターンである、シグナル伝播パターンの作製に成功した(図 3)。すなわち、Delta を発現する細胞領域(緑色)が、トリガー細胞(赤色)の付近に形成され、時間とともに周囲に伝播していく様子が観察できた。このことによって、隣接細胞間ポジティブフィードバックが、シグナル伝播パターンに十分と示せた。また、簡単な数理モデルを用いた解析と、その予測に基づいた実験から、シグナル伝播パターンができるためのネットワークの形やパラメーターを明

らかにした。まず、シグナルを十分に増幅するためには、tTA が直接 Delta の発現を誘導する遺伝子ネットワーク(1段階)よりも、tTA が別の転写因子(Gal4VP16, GV)の発現を誘導し、GV が Delta の発現を誘導する(2段階)の方が適しているとわかった。さらに、2段階ネットワークにおいて、2つのプロモーター(TRE と UAS)の強さの組み合わせによって、系の安定性が変化することがわかった。つまり、シグナル伝播が起こるためには、パラメーターの組み合わせが双安定領域に位置する必要があるとわかった(図4)。系が双安定でない時には、Delta 発現領域が全く形成されない(不活性型)か、トリガー細胞の非存在下でも Delta 発現領域が形成されてしまった(過活性型)。以上の結果は、平成24年4月の Science Signaling 誌にて発表した。当該論文は Science 誌と共催の Computational Biology 特集でも取り上げられ、高い評価を受けた。このようなシグナル伝播パターンは、生体内の内耳などで観察されるため、本研究で明らかになった条件は、発生過程のパターン形成にも示唆を与えるものである。また、本研究で得られた人工遺伝子ネットワークの部品や作製技術は、今後より複雑な遺伝子ネットワークを作製していく際の重要な基礎技術となる。細胞間のコミュニケーションを制御する人工遺伝子ネットワークは、将来の人工組織形成に有用である。

課題(2): RNA ポリメラーゼ・エンドヌクレアーゼ・ターミナルトランスフェラーゼを組み合わせたキメラ分子の作製や、AID(activation-induced cytidine deaminase)のようにゲノムを切断することなく配列に変異を入れるような酵素の利用を検討したが、転写頻度に応じた変異導入という条件を満たしたものは無かった。

課題(3): レンチウイルスを用いて IEG のプロモーター配列をゲノムに挿入し、その近傍で転写の波及効果が起こるか調べたが、この方法では波及効果は再現されることがわかった。本課題を遂行する上で、TALEN、JumpIN などのゲノム改変法も検討した。これらの技術は、今後より複雑な遺伝子ネットワークを作製していく際に有用である。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 4 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件 Synthetic Signal Propagation Through Direct Cell-Cell Interaction. Sci. Signal., 5, ra31 (2012). Matsuda M, Koga M, Nishida E & <u>Ebisuya M.</u> http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;5/220/ra31</p> <p>A fasting-responsive signaling pathway that extends life span in <i>C. elegans</i>. Cell Rep., 3, 79-91 (2013). Uno M, Honjoh S, Matsuda M, Hoshikawa H, Kishimoto S, Yamamoto T, <u>Ebisuya M.</u>, Yamamoto T, Matsumoto K & Nishida E. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124713000053</p> <p>Stemness-related Factor Sall4 Interacts with Transcription Factors Oct-3/4 and Sox2 and Occupies Oct-Sox Elements in Mouse Embryonic Stem Cells. J. Biol. Chem., 288, 5027-5038 (2013). Tanimura N, Saito M, <u>Ebisuya M.</u>, Nishida E & Ishikawa F. http://www.jbc.org/content/288/7/5027.long</p> <p>ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin. Nat. Commun., 3, doi: 10.1038/ncomms1634 (2012). Matsumura S, Hamasaki M, Yamamoto T, <u>Ebisuya M.</u>, Sato M, Nishida E & Toyoshima F. http://www.nature.com/ncomms/journal/v3/n1/full/ncomms1634.html</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 8 件</p>	<p>専門家向け 計 4 件 CIRA seminar, Apr 17, 2012, CIRA, Kyoto Univ. Miki Ebisuya, Reconstitution of cell patterns that are driven by Notch signaling.</p> <p>さきがけ領域会議, Oct 2-5, 2012, OIST. 戎家美紀, 細胞間フィードバック回路による細胞運命の制御.</p> <p>Riken CDB seminar, Jan 24, 2013, Riken CDB. Miki Ebisuya, Reconstitution of cell patterns that are driven by Delta-Notch signaling.</p> <p>2012 年 1 月 8 日 - 1 月 9 日 定量生物の会 第4回年会 名古屋大学野依記念学術交流会館 戎家美紀 細胞間ポジティブフィードバックループによるシグナル伝播パターンの作製</p> <p>一般向け 計 4 件 The first annual Winter Qbio meeting, Feb 18-21, 2013, Hawaii. Mitsuhiro Matsuda, Makito Koga, Eisuke Nishida, & Miki Ebisuya, Construction of genetic circuits underlying Delta-Notch cell patterns.</p> <p>iCeMS symposium on Theoretical and Computational biology, Mar 1, 2013, Kyoto Univ. Miki Ebisuya, Reconstitution of genetic circuits that generate multicellular patterns.</p>

様式21

	<p>日本生物物理学会第 50 回年会, Sep 22-23, 2012, Nagoya Univ. 戎家美紀, 細胞のパターンをうみだす遺伝子回路の作製.</p> <p>2012年1月-2月1日 The Second International Young Scientists Career Development Organization Symposium 京都大学芝蘭会館 戎家美紀 Analysis and synthesis of gene networks</p>
図書	
計0件	
産業財産権	(取得済み) 計0件
出願・取得状況	(出願中) 計0件
計0件	
Webページ (URL)	
国民との科学・技術対話の実施状況	
新聞・一般雑誌等掲載	
計0件	
その他	

7. その他特記事項