

| |
|--------------------------|
| 領域略称名：合成生物学 領域番号：4302 |
|--------------------------|

平成25年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る中間評価報告書

「動的・多要素な生体分子ネットワークを理解
するための合成生物学の基盤構築」

(領域設定期間)

平成23年度～平成27年度

平成25年 6月

領域代表者 九州大学・農学研究院・教授・岡本正宏

目 次

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1. 研究領域の目的及び概要 | 3 |
| 2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況 | 5 |
| 3. 研究の進展状況 | 7 |
| 4. 若手研究者の育成に関する取組状況 | 11 |
| 5. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む） | 12 |
| 6. 総括班評価者による評価 | 13 |
| 7. 主な研究成果（発明及び特許を含む） | 15 |
| 8. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等） | 18 |
| 9. 今後の研究領域の推進方策 | 23 |
| 10. 組織変更等の大幅な計画変更がある場合は当該計画 | 25 |

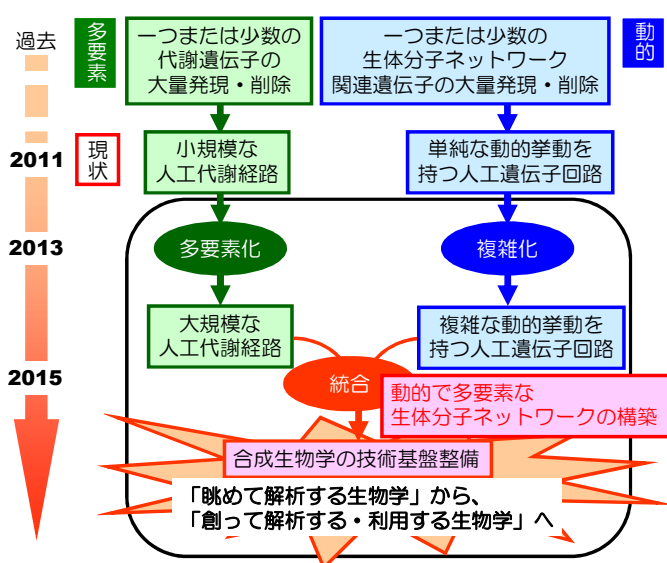
1. 研究領域の目的及び概要（2 ページ程度）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、これまでの研究成果を進展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

生体分子ネットワークを「眺めて解析する生物学」から、「創って解析する・利用する生物学」を目指し、2000年頃から米国で合成生物学という研究が行われている。「創って」と言っても「無から生物を創る」ことを指しているのではない。サイエンスの面では、同定済みの相互作用する生体分子を組み合わせた人工遺伝子回路を設計して、発振やスイッチなどの特定の細胞内現象を再現させようとする試みがなされている。また、応用面では、別の生物由来の酵素遺伝子を複数組み合わせた人工代謝経路を設計し、その生物が本来生産できない物質を大量生産させる試みが行われている。しかしながら、人工遺伝子回路や人工代謝経路は小規模であり、trial and error で構築されているのが現状であり、合成生物学を展開するための技術基盤は未だ確立されていない。しかし、合成生物学を進めていけば、生体分子ネットワークに積極的に働きかけるような発振やスイッチなどの機能を持つ人工遺伝子回路を導入し細胞応答を詳細に解析する研究、ES細胞、iPS細胞に様々な分化誘導因子を人工遺伝子回路で導入することで分化系譜を探る研究、細胞のセンサータンパク質と組み合わせ外的環境に自ら適応して物質生産を行わせる細胞工場を実現する研究、などを通じて生物をより深く理解し、広く利用することが可能になると考えられる。

本領域では、生体分子ネットワークをより深く理解し、利用するために、①人工遺伝子回路や人工代謝経路の探索・設計を行う情報科学と、②無細胞系(*in vitro*)で回路・経路構築を行う工学と、③細胞内(*in vivo*)へ回路・経路を導入する分子生物学の技術を結集し、有機的に連携することで、世界に先駆けた合成生物学を展開するための技術基盤を構築する。

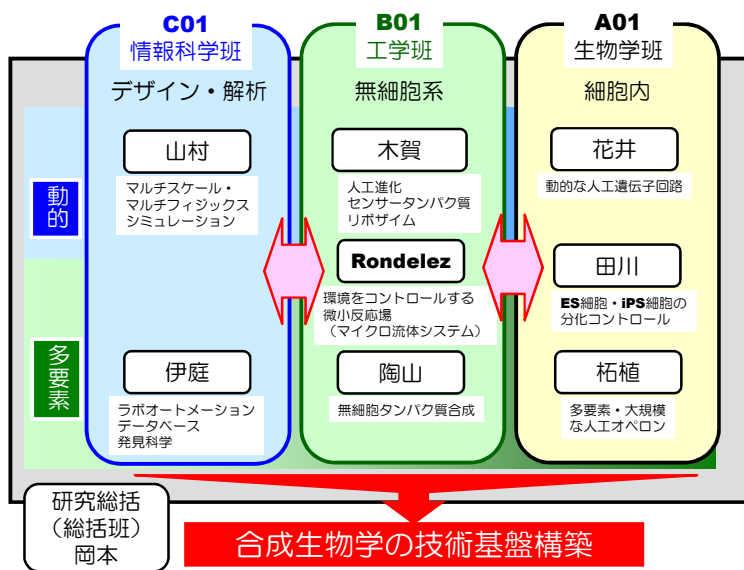
現在、我が国では、一つまたは少数の遺伝子改変による生体分子ネットワークの理解や物質生産の向上がなされているに過ぎない。米国においても、右図の「現状」のように、小規模な人工代謝経路や人工遺伝子回路が、trial and error で試みられているだけである。本領域では、まず、これら人工代謝経路を大規模化し、人工遺伝子回路同士を組み合わせることで複雑化を行う。次に、それら二つを統合することで、代謝と遺伝子発現を大規模かつ複雑に制御することが可能となり、合成生物学発展のための技術基盤が構築される。以上より、従来の「眺めて解析する生物学」から「創って解析する・利用する生物学」へのパラダイムシフトを狙う。



2000年頃から米国で、機能(スイッチ、発振など)を持つ人工遺伝子回路を設計し、細胞内に導入するといった技術が開発され、合成生物学と呼ばれる研究分野がスタートした。その後、米国では、微生物を用いたバイオアルコール生産などにその手法が導入され、グリーンバイオと相まって国家プロジェクトに発展している。一方、我が国では、合成生物学の研究は、本申請領域の計画研究の代表者 花井(Nature(2008))、柘植(Nature Methods(2008))、分担研究者 井上(Nature Chemical

Biology(2010))の個別研究に頼っているのが現状である。しかし、米国の研究でも **trial and error** で、①回路の探索、設計、②無細胞系での再構築、③細胞内への導入と環境変化に応じた制御といった一連の過程を繋げた合成生物学展開のための技術基盤は構築されていない。③の部分では、外部環境への応答を正確に知るために、細胞外の環境を精密にコントロールする必要があるが、本申請の計画研究代表者である **Rondelez** はこの分野で世界的業績(Nature(2005)、 Nature Biotechnology(2005))をあげている。以上のような状況下で、本申請領域の着想に至った。

代謝と遺伝子発現を大規模かつ複雑に制御するには、下図のように、動的な(時間的に変化する)人工遺伝子回路設計と多要素の回路設計のための要素技術が必要となる。また、人工遺伝子回路のデザイン・解析のためには情報科学、無細胞系(*in vitro*)では工学、細胞内(*in vivo*)では生物学に基礎を持つ要素技術が必要であり、これらの要素技術の結集が合成生物学の基盤構築には必要である。本領域では、まず、**動的で多要素な人工遺伝子回路を構築する。次に、それを利用して、万能細胞の分化誘導システムの構築、外的環境に自ら適応して物質生産を行う細胞工場の実現、生体分子ネットワークの理解への適用を試みる。その結果、合成生物学の技術基盤を構築する。**



計画研究は、A01 合成生物学の分子生物学的技術基盤、B01 合成生物学の工学的技術基盤、C01 合成生物学の情報科学的技術基盤の3つの研究項目からなり、これらに、合成生物学の技術基盤構築を行う総括班が加わり、全体を統括する。

A01 には、細胞応答制御のための人工遺伝子回路の開発を行う花井班(九大)と、ES細胞、iPS細胞に対して、様々な分化誘導因子を導入し、分化誘導システムを構築する田川班(東工大)と、代謝経路をターゲット

にして、多数のゲノムを再構築することで人工代謝経路を構築する柘植班(慶應大)の3つの計画研究がある。B01 には、デザインした人工遺伝子回路の無細胞での機能評価を網羅的・体系的に行うRondelez班(東大)と、無細胞で人工遺伝子回路が機能向上するためのタンパク質等の生体分子の改良を行う木賀班(東工大)と、無細胞タンパク質合成系で動作する人工遺伝子回路を構築する陶山班(東大)の3つの計画研究がある。さらに、C01 には、数理モデルを用いて人工遺伝子回路の設計と動的機能特性を調べる山村班(東工大)と、多要素(遺伝子とタンパク質等)が複雑に関係する人工遺伝子回路をデザインするための情報基盤システムの構築を行う伊庭班(東大)の2つの計画研究がある。

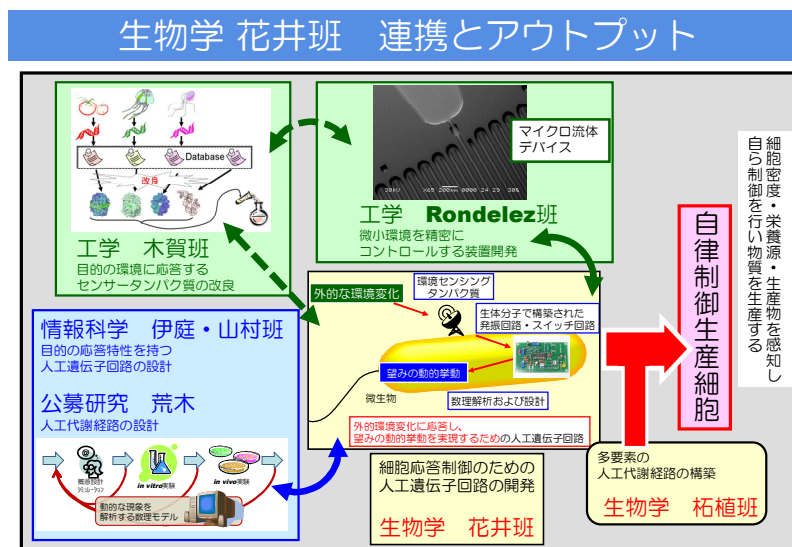
研究の進め方としては、情報科学的技術を用いて、1)人工遺伝子回路探索とその動的特性解析、2)実験計画(人工遺伝子回路が機能発現するための遺伝子部品等の検索、およびその組み合わせ手法等)の提案を行い、次に、工学的技術を用いて、3)無細胞系で再構築した人工遺伝子回路の機能評価、4)機能向上のためのタンパク質等の生体分子の改良、5)無細胞タンパク質合成系での人工遺伝子回路の構築を行う。ここまでのステップで、細胞という複雑な反応場を考慮せずに、回路探索から回路再構築、機能評価を行うことができる。次に、3~5 までの知見を基に、6)比較的少数の要素から構成される人工遺伝子回路を細胞内に導入、7)多要素から構成される人工オペロンの開発により人工代謝経路を構築する。以上、1~7 に示す対応で、合成生物学の技術基盤が構築できる。

2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2 ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、研究組織間の連携状況について図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

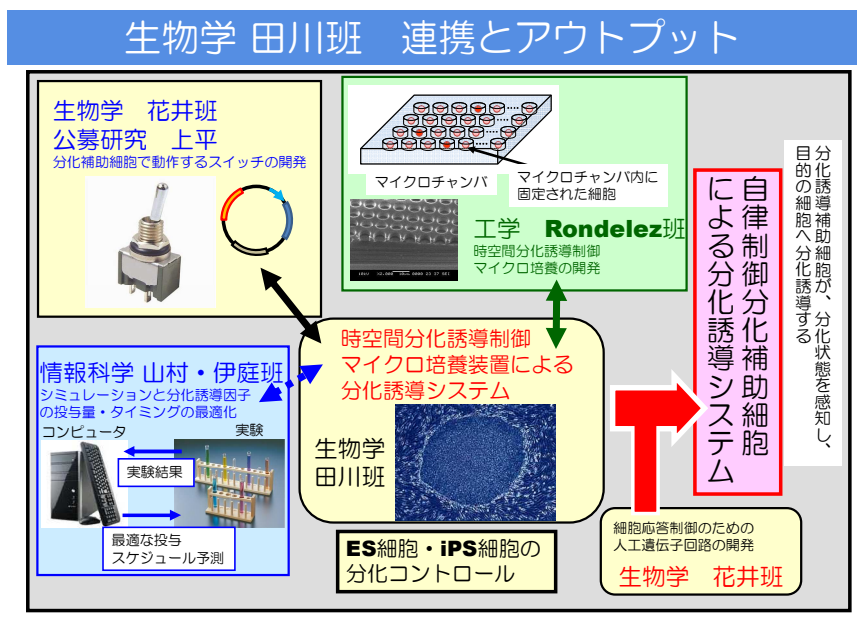
本研究領域では、生物班がリーダーシップをとり、生物班が必要とする要素技術を各計画班が開発し、提供することで、合成生物学の基盤構築を目指す。このことで、各計画班が行う研究のベクトルがいくつかの大きなピークに向かうと考えている。このため、8 件設定した計画研究班同士は、必ず共同研究を行う様に領域開始時に設定されている。現在、計画研究と 15 件設定した公募研究も含め、領域全体で大きく 13 の共同研究が行われている。ここでは、リーダーシップをとる A01 生物班の花井、田川、柘植班の連携を中心に説明を行う。なお、図中の実線はすでに開始している連携を、点線は後期 2 年で連携する予定を示している。

花井班では、生体分子 10 要素以下の少数要素で構成され、望みの動的挙動を実現するための人工遺伝子回路を生体内 (*in vivo*) に構築することを目的に研究を行っている。このため、伊庭班 (C01 班) ならびに山村班 (C01 班) の数理計算法と発見科学を利用し、安定して発振する人工遺伝子回路の設計を行っている。また、公募班の荒木が開発した酵素反応データベースを利用する人工代謝経路設計ソフトウェアを用い、人工代謝経路を設計し、細胞内で構築している。Rondelez 班 (B01 班) で開発されたマイクロ流体リアクターを利用することで、細胞外の環境を精密にコントロールした状態で、一細胞の動特性を正確に解析している。前期では、現存の生体分子を用いた人工遺伝子回路と人工代謝経路を行っているが、後期においては、意図した動作特性を持つ生体分子パーツがない場合は、木賀班 (B01 班) にタンパク質の改良を依頼する。最終的には、柘植班 (A01 班) の大規模な人工代謝経路構築技術と組み合わせることで、細胞密度、栄養源・生産物濃度などの培養環境を感知し、その環境に自ら適応し、物質生産を行う自律制御生産微生物を作製する予定である。

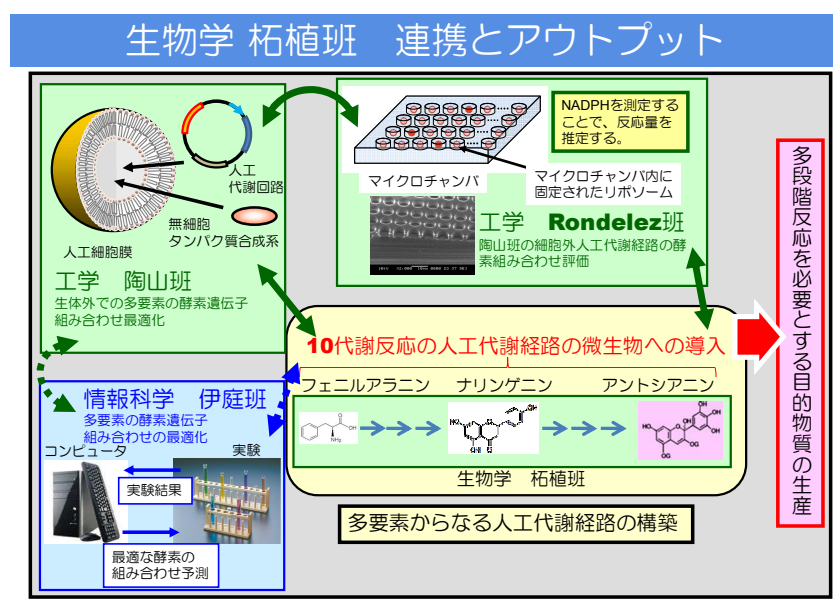


田川班では、分化誘導因子の時空間的制御をしながら、ES 細胞や iPS 細胞を成熟肝細胞まで分化誘導する合成生物学的アプローチを開発する。本研究班では、最終的に、人工遺伝子回路によって分化誘導因子を分化補助細胞から分泌させることを目標としているが、研究初期である前期においては、外部から誘導因子を与えることになる。このため、Rondelez 班と共同で、肝前駆細胞から肝細胞と胆管細胞への分化制御のための流体マイクロデバイスシステムを作製して、肝前駆細胞株を用いて検討を行っている。この際、誘導因子候補物質の詳細な濃度やタイミング、組み合わせ等の条件は、天文学的な数となるため、データが集まる後期においては、山村班と共同で分化誘導メカニズムの解

明、伊庭班と共同で条件の最適化を行う予定である。また、分化補助細胞から複数の分化補助因子を順次分泌させるために、Dox 添加により2つの分化補助因子の分泌が切り替わるスイッチの作成を、花井班および公募研究の上平と行っている。



柘植班では、細胞中の代謝経路のような、多数 (~数 10) の遺伝子が関与する複雑系において、各遺伝子発現量 (酵素量) の量比を協調的に制御することでアウトプット (代謝産物量) を最大化するための回路、すなわち“多因子”による“定常的”遺伝子発現の回路の構築を目的としている。in vivo でアントシアニンの合成に成功したが、酵素量の量比の最適化のために、前期においては主に、in vitro におけるデータの蓄積を行うこととした。このため、in vitro 代謝経路構築を目指し、陶山班 (B01 班) とのジャイアントベシクル内でのアントシアニン合成経路の構築の観点で共同研究を行っている。また、in vitro でのアントシアニン合成量の測定のために、マイクロ流体デバイスによる NADPH 測定系の開発を Rondelez 班と行っている。さらに、遺伝子集積技術の技術指導で、公募研究の朝井と連携している。in vitro および in vivo のデータが蓄積する後期においては、伊庭班の発見科学およびラボオートメーションの手法を用いて、最適な人工オペロンの設計を行う予定である。



3. 研究の進展状況〔設定目的に照らし、研究項目又は計画研究毎に整理する〕（3ページ程度）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在どこまで研究が進展しているのか記述してください。また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らして、どのように発展したかについて研究項目又は計画研究毎に記述してください。

計画研究「細胞応答制御のための人工遺伝子回路の開発」花井班：

本計画研究の目標は、生体分子 10 要素以下の少要素数で構成され、望みの動的挙動(経時的变化)を実現するための人工遺伝子回路を細胞内(*in vivo*)で構築することである。具体的には期間内に、①発振回路や外的環境に応じて ON-OFF をおこなう人工遺伝子回路を実現する。次に、②複雑な制御が行われているとされる解糖系等に、複数の動的な変化を同時に加え、生体分子間の相互作用を解析する。最後に、③バイオアルコールまたは有用物質生産系と組合せ、細胞密度、栄養源・生産物濃度などの培養環境を感知し、その環境に自ら適応し、物質生産を行う自律制御生産微生物を作製することが申請時の目標である。①に関しては、Rondelez 班の開発した外部環境を調節可能な微小流体リアクターで、人工遺伝子回路を構築した大腸菌の動作確認を行うことが可能となった。また、シアノバクテリア由来のヒスチジンキナーゼを用いて、緑色光下で特異的に遺伝子発現を行う大腸菌の構築に成功した。さらに、伊庭班・山村班で構築された安定した発振系をデザインするソフトウェアを用いて、人工遺伝子回路の構築を行っている。これ以外に、公募研究の荒木と共同で、生体反応データベースを利用した、人工代謝経路設計ソフトウェアを用い、その有効性を確認している。②および③に関しては、構築したトグルスイッチを用いて、誘導剤を添加することで、解糖系から TCA サイクルをつなぐ *gltA* の ON から OFF への制御を行った。*gltA* 破壊株ではほとんど増殖できないが、このスイッチ導入により、ある程度細胞増殖を行わせた後、*gltA* の発現を停止させることが可能となり、TCA サイクルで無駄に利用されてしまう代謝物を酢酸（酢酸の生産量は数倍に増加）に変換することが可能となった。

計画研究「人工遺伝子回路による人工肝組織モデルの構築」田川班：

本計画研究の目標は、ES細胞・iPS細胞を利用し、分化系譜が明確にフォローできる組織培養肝組織形成システムを構築し、最終的には、人工遺伝子回路による組織培養高機能肝臓モデルの実現を試みることである。具体的には、①Rondelez班により開発された流体マイクロデバイス/ヒトES細胞・iPS細胞の単一細胞を播種し、成熟肝細胞への分化系確立のため、最適因子類の時空間的情報を得る。②それらの情報を基に、伊庭班、木賀班および花井班で構築された遺伝子回路を細胞に導入し、各過程において最適微小環境を整えるように遺伝子発現が変化する分化補助細胞（ストローマ細胞）を作出する。③このストローマ細胞によりES細胞・iPS細胞を肝細胞へ分化、人工肝組織モデルを構築する。本班は、細胞内部の操作等による合成生物学から、組織を人工的に構築する発展的分野を創出し、合成生物学の医薬領域への応用を目指すことが申請時の目標である。

技術的に一番難しいとされる a)未分化維持から内胚葉系への分化と b)肝前駆細胞から成熟肝細胞へ分化する段階について前期は取り組んだ。①に関しては、Rondelez 班との共同により 2 種類の培地を層流で流す流体マイクロデバイスの開発を行い、我々が独自で樹立した b のマウス肝前駆細胞を用いて成熟肝細胞と胆管上皮細胞への分化選別条件の情報を得ている状況である。②に関しては、b の細胞分化における遺伝子発現に関してリアルタイム PCR アレイにより発現遺伝子の情報を得たので、後期に伊庭班と共同で解析を行う予定である。③に関しては、TetON/OFF システムにより、a のための LIF とアクチビン A（肝臓特異的 β 肝サブユニット）の発現を Dox で制御するシステムを花井・上平班と共同で作製し、ヒト血管内皮細胞株への導入を試みた。

計画研究「多要素からなる人工代謝経路の構築」柘植班：

本計画研究の目標は、細胞中 (*in vivo*) の代謝経路のような多因子 (~数 10 個) が関わる遺伝子回路をボトムアップの方法論により遺伝子断片からデザインする方法の確立である。現在の大腸菌を宿主とした遺伝子工学技術では多数の遺伝子を効率よく集積することは困難であった。本計画研究の目的は、独自に開発した枯草菌の遺伝子集積技術 (OGAB 法) を適用して、①代謝経路ごとに多数の遺伝子を集積してユニット化し、代謝産物の安定的な生産に必要な因子、要素を検討すること。その成果に基づき、②新規代謝経路の設計図を作成するための汎用的で実用的なプロトコールを提供することである。②に関しては、①の研究を進めることで知見が得られると考え、①の研究に集中した。①に関しては、「アントシアニン」合成代謝経路構築は、人工オペロン設計のためのまず中間代謝産物のナリングニンからアントシアニン色素 (ペラルゴニジン-3-グリコシド) に至る 4 酵素 (F3H, DFR, LDOX, 3-GT) に集中して、*in vitro* 系での色素生産に必要な発現量のパラメータの収集を行った。ここで各酵素の至適量比を求めるために、Rondelez 班の微小流体技術を利用して反応基質の NADPH 測定チップの開発を行った。また陶山班の独自技術のジャイアントベシクルを用いて、ベシクル内でのアントシアニン合成系の再構成を行い、中間代謝物質のジヒドロケンフェロールを基質として 2 つの酵素 (DFR と LDOX) による色素合成に成功した。これらの情報を元に 3-GT を除く 3 酵素の遺伝子を連結した人工オペロンを構築し、大腸菌で発現させることでアントシアニン色素 (ペラルゴニジン) の合成にも成功した。また、アントシアニン以外にもグルコースからの「カロテノイド」合成代謝経路構築を目指し、人工解糖系オペロン、人工非メバロン酸オペロン、人工カロテノイドオペロンのデザインに成功した。

計画研究「人工遺伝子回路の機能向上のための進化分子工学による生体分子の改良」木賀班：

本計画研究の目標は、人工遺伝子回路研究 (A01 花井班 田川班) で使用される、種々のパラメータセットを持った生体高分子の創生を、進化分子工学等を活用して行うことである。具体的には、①原核生物内で動作するプロモータの開発と②ヒト細胞における人工遺伝子回路の構築に必要な新しい部品のデザインについての研究を行っている。①に関しては、人工遺伝子回路研究で使用される新規なプロモータを開発し、国内特許を申請した。開発したプロモータが他班でも活用できる例示として、このプロモータと同様に 2 入力を統合できるプロモータを活用し、細胞間通信と細胞内の抑制と統合した遺伝子ネットワークを開発した。また、進化分子工学のこのプロセスを効率化するために、無細胞タンパク質合成系を改良した。さらに、リボスイッチを活用して自律的に動作する転写制御系の改変について、精査を行い、論文を発表した。②に関しては、進化分子工学を駆使して信号伝達経路の制御などに用いることができる新しい RNP (RNA-蛋白質複合体) モジュール (スイッチ) を開発することを一つの大きな目標として来た。現時点で、実際にこの手法によりヒト細胞内で信号伝達制御に用いることのできる新しい RNP モジュールの開発に成功した。このモジュールがヒト細胞内で実際に使用可能であるかどうかを検証するために、既に開発されている翻訳制御システムにこれを組み込み、新しいクラスの翻訳制御スイッチが開発できていることを確認した。

計画研究「人工遺伝子回路の機能評価のためのマイクロ流体プラットフォームの開発」Rondelez 班：

本計画研究の目標は、「眺めて解析する」システム生物学から「創って解析する・利用する」合成生物学へのパラダイムシフトを実現するために、実験と理論を結びつける新しい実験プラットフォームの開発を行うことである。マイクロ流体デバイス技術を用いることにより、生体分子ネットワークに対し、理論上想定した動的な入力を与えることができ、なおかつ網羅的解析が行える機能評価プラッ

トフォームを実現することを通して、合成生物学の工学的技術基盤を構築することを目的とする。本研究課題では、他の班で開発される無細胞反応系あるいは人工遺伝子回路を組み込んだ細胞の機能評価とそのセレクションをハイスループットに行うプラットフォームとして①マイクロチャンバ系と②マイクロ液滴系の2種類のマイクロ流体システムを開発する。まず、①では人工遺伝子回路を導入した単一細胞の解析を行うため、単一細胞の捕捉し観察可能なプラットフォームを開発し、チャンバ内での細胞の生存について基礎的検討を行うとともに、領域内各班から提供される人工遺伝子回路等の評価を行うための検出方法(蛍光・発光等)について検討した。また、動物細胞だけではなく大腸菌単一細胞の捕捉が可能なマイクロチャンバアレイを開発した。②では *in vitro* 遺伝子回路の反応のための安定的な液滴プラットフォームを開発した。開発されたマイクロチャンバ系やマイクロ液滴系の評価のため、独自に、DNA鎖と数種類の酵素からなるツールボックスを用いて *in vitro* 反応ネットワークを構築し、マイクロチャンバを用いて反応ネットワークの空間的(2次元)な伝播の可視化に成功し、マイクロ液滴を用いて各液滴中で独立された反応ネットワークの観察に成功した。

計画研究「無細胞タンパク質合成系で動作する人工遺伝子回路の構築」陶山班：

本計画研究の目標は、多要素からなる人工遺伝子回路を実現するために、無細胞系で大量の組み合わせ実験を正確・高速に行う実験技術の開発である。無細胞系で、①多要素からなる人工遺伝子回路の発現プロファイルの時系列を定量的かつ迅速に計測する手法(多要素回路計測法)、②反応容器の体積が超微小である細胞のモデルとして用いられるジャイアントベシクル(GUV)内に人工遺伝子回路を構築する手法(GUV内回路構築法)、さらに、③組み合わせによる人工遺伝子回路の生成を出来るだけ合理的に行えるように、核酸相互作用による発現制御を用いて人工遺伝子回路を構築する手法(合理的回路構築法)の開発を目標としている。①については、RNAの絶対量を同時に計測できるPhoto-DEAN法により、微量な生細胞およびGUV内に存在する多数のRNA転写産物の絶対量を同時に高感度で迅速に測定できる手法を開発した。また、この方法により、柘植班が大腸菌内に構築を目指しているアントシアニン人工代謝経路の大腸菌内での動作とGUV内での動作を計測する実験の準備を行った。②については、無細胞タンパク質合成系溶液を封入したGUVを効率よく調製できるPSGH法を開発した。手法の評価を行うために、柘植班と連携してGUV内で2つの酵素によるペラルゴニジンの合成を試みて成功した。また、公募研究車班と連携して膜貫通型タンパク質 α -ヘモリンと細胞質性タンパク質GFPとの融合タンパク質を発現させることを試みて成功した。③については、RTRACS(核酸分子同士の相互作用と転写・逆転写反応により情報処理を行う生体分子計算システム)を利用して、任意の2つのシグナルRNAにより任意の標的遺伝子(実験ではGFP遺伝子)の発現量をダイナミックに制御する人工遺伝子回路を構築した。

計画研究「数理モデルを用いた動的な人工遺伝子回路の設計と解析」山村班：

本計画研究では、実験系計画研究(A01花井班、B01木賀班)で用いる人工遺伝子回路の探索、機能解析を数理モデル(マルチフィジックス・マルチレイヤーモデルなど)を用いて行うことを目標としている。これらの目標を達成するための具体的な研究テーマとその進捗は、以下の通りである。①基本素子のモデル化は、細胞群の分化比の制御(B01木賀班との共同研究)、人工遺伝子回路方式の自動設計(C01伊庭班との共同研究)に成功しており予定より進んでいる。②複雑な回路のデザインは、基礎理論構築途上である。③大規模システムの制御は、複雑ネットワーク解析の基礎理論構築途上である。④細胞群システムの制御は、①と関連して細胞群による情報処理の基礎理論構築途上である。⑤共通モデリングベンチは、必要となる最適化技術の開発を中心として構想段階である。

計画研究「多要素人工遺伝子回路のデザインオートメーション」伊庭班：

本計画研究では、進化計算を活用してデータベースに格納された遺伝子部品等の検索を行い、それらを組み合わせて人工遺伝子回路を自動設計する技術の開発を目的とする。さらに、人工遺伝子回路を設計するための実験計画を立案する技術の構築を目指す。具体的には、①環境変化に対して頑健な遺伝子回路モジュールを設計すること、②MediaWiki をベースとして、合成生物学実験を計画・管理・運営し、実験結果を記録・検索するためのデータベース・フレームワークを開発することである。①については、発振器を例にし、A01 花井班および B01Rondelz 班と共同で遺伝子制御ネットワークのトポロジーを進化計算に基づいて探索する手法を構築した。探索の結果、得られたネットワークには、既存の repressilator と呼ばれる発振器に auto regulation を追加したような構造、および repressilator を二つ結合させたような構造が得られた。モデル中に含まれる全てのパラメータをランダムに設定して発振確率を調べるモンテカルロ法を用いてネットワークの頑健性を既存の発振器と比較したところ、シンプルな構造にも拘わらずより高い確率で発振することが示された。このことから合成生物学におけるシステムレベルの開発に対して進化計算手法の有用性が確認されている。現在、より複雑な遺伝子回路の合成やウェット実験での検証について研究を行っている。

②については、P1 実験室の承認を受け、学術支援専門職員を雇用して、フレームワークを開発するためのケーススタディとして、実際に合成生物学実験を遂行した。実験スケジュールを記述するためのテンプレートを整備するとともに、実験スケジュールの記述から実験のワークフロー（実際にはマテリアルと実験ステップをノードとするデータフロー）を生成・表示するエクステンションを開発し、ユーザインタフェースの向上を図った。ケーススタディを通して、主な合成生物学実験に対するいくつかの有用なテンプレートを実現している。

4. 若手研究者の育成に係る取組状況（1 ページ程度）

領域内の若手研究者の育成に係る取組状況について記述してください。

若手研究者の人材育成を目的とする合成生物学技術セミナー開催：

申請時に、若手研究者の人材育成を目的とした、「合成生物学技術セミナー（基礎・応用）」を毎年開催するように計画した。第1回目として、実験研究者のための合成生物学技術セミナー（情報科学編）を平成24年10月18日に東京大学で行った。講義に引き続き、ソフトウェアを用いて、トグルスイッチモデル、オシレーターモデル等を構築し、構成する遺伝子の発現量を変化させたシミュレーションを行うことで、機能発現のためには、どのような条件が必要なのかを実習させた。出席者は22名であった。第2回目は、平成25年10月に情報科学研究者のための合成生物学技術セミナー（分子生物学編）を企画している。



細胞を創る研究会 5.0 の共催（「細胞を創る」研究会主催）：

本領域の計画研究代表者の木賀大介氏（東工大）が大会実行委員長となって、平成24年11月21~22日に東京工業大学で開催し、本領域は共催した。参加者は302名であった。



5. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1 ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

領域内で共有する設備、装置の購入はないが、領域内で構築されたサンプルや実験結果は伊庭班で構築されるデータベースにて共有され、有効に利用される。本研究領域では、Rondelez 班によって提供される微小流体リアクターを利用することが多いが、このリアクターは Rondelez 班がすでに所有する製作装置で製作され、各班に提供される。また、個々の研究者は機器ならびに試薬購入の際に、安価な会社から購入するよう努めており、研究費の有効利用に取り組んでいる。

総括班の活動状況：

1) ホームページの作成

本領域のホームページを作成し (<http://www.syn-biol.com/>)、領域全体の研究の動向、行事等を公開している。この中間評価に、領域全体のこれまでの研究成果の公表を行う。

2) 社会との関わり 1（領域全体会議の開催）

平成 23 年度に本領域が採択されて、これまで（平成 25 年 6 月）までに 3 回、領域会議を開催した（平成 23 年 8 月 18 日（東大）、平成 23 年 11 月 13~14 日（慶應大（鶴岡））、平成 24 年 5 月 16~18 日（福岡）。特に、第 3 回目は、公募研究班も含めての開催であった。第 4 回目は、平成 25 年 10 月 28 日~31 日（東京）の予定。



3) 社会との関わり 2（国際公開シンポジウムの開催）

国際公開シンポジウムを平成 25 年 10 月 28 日に東京で開催し(<http://www.biomedpharminfo.org/>)、米国の合成生物学の先駆的研究者である、Timothy Gardner (Amyris, USA)を招聘し、プレナリー講演を行う予定。また、本領域の研究からいくつかのトピックスを講演する。

4) 社会との関わり 3（諸学会での特別シンポジウム開催、プレナリー講演）

- ① 15th International Biotechnology Symposium にて、韓国の研究グループと共同でシンポジウム「Recent advances in synthetic biology : 1st Korea-Japan Synthetic Biology Symposium」を企画、開催(2012 年 9 月 18 日)
- ② 化学工学会第 44 回秋季大会にて、合成生物学シンポジウム「合成生物学が拓くバイオプロセス開発へのインパクト」を企画し、共催(2012 年 9 月 20 日)
- ③ “Bio-Inspired Methods & Applications”(February 4, 2013, Embassy of France in Japan)で領域代表の岡本が招待・プレナリー講演 (Overview of the National Research Project, “Synthetic Biology for the Comprehension of Biomolecular Networks”)
- ④ Symposium on Frontiers in Systems and Synthetic Biology, 2013 (Mar 20 – Mar 24, 2013, Georgia Tech., Atlanta)で領域代表の岡本が招待・プレナリー講演(Synthetic Systems Biology for the Comprehension of Biomolecular Networks)

6. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

本研究領域では、総括班評価者として、情報科学分野の立場から東京大学生産技術研究所 合原一幸 教授、合成生物学およびシステム生物学の国際情勢の立場から理化学研究所 八尾 徹 アドバイザー、タンパク質工学およびシステム生物学分野の立場から慶應大学理工学部 柳川弘志 教授に評価を依頼した。各評価者からの評価コメントを以下に示す。

東京大学生産技術研究所 教授 合原一幸

本新学術領域研究は、生体分子ネットワークを「眺めて解析する生物学」から「創って解析する・利用する生物学」への進展を目標にして、合成生物学を展開するための技術基盤の確立を目指す重要なテーマに挑戦している。研究は順調に進展していると評価できる。

まず、生物学班、工学班、情報科学班の3つの分野を連携させ、出口である生物学班がリーダーシップをとるとともに、工学班が、生物学班と情報科学班の橋渡しの役割を果たすという研究体制がたいへんうまく機能している。特に工学班の実験では、かなり精緻な条件設定が可能であり、生物と理論の橋渡しにはきわめて効果的である。今後は、後半の重要課題である情報科学との連携の大きな進展が望まれる。

次に、若手教員が主要な役割を務める研究体制、さらには若手研究者の人材育成を目的とする「合成生物学技術セミナー」開催や「細胞を創る」研究会共催など、若手研究者の育成に力を大いに入れている点も高く評価される。この分野の将来を担う人材がこのような試みから生まれることが期待できる。

また、本研究で行われているような回路レベルでの摂動は、従来の生物学研究で主として行われている単一遺伝子等のいわば「微少摂動」を越えた「大きな摂動」の意味を明らかにすることに結びつく可能性が高く、生物学のみならず、生命の数理モデル研究全般に大きな影響をもたらす実に興味深い研究テーマである。

理化学研究所 アドバイザー 八尾 徹

合成生物学の研究は、米国が先行しており、イギリスでも昨年度より大型の国家プロジェクトが立ち上がるなど、国際的に大変盛んな分野であり、我が国でこのような新学術領域が立ち上がったのは非常に意義深い。特に、全体目標に向けて生物班・工学班・情報班の異分野融合体制を築き、生物班が提起した具体的テーマを各班協力して行う運営を取っていることは、大変すばらしい。3テーマ（人工遺伝子回路、代謝回路、肝組織モデルの開発）はいずれも合成生物学の展開にとって重要な基盤となる野心的なテーマであるが、順調な進捗をしているように見受けられた。本来であれば、このような異分野融合を効率よく進めるには、一つの屋根にすべての人員を配置し、随時、密接に交流することが重要であると考えられるが、研究機関が別々の現状では難しい。その代わり現在は、共同研究テーマごとにテレビ会議などを通じて、密に交流されているようであるが、今後も密に連絡を取り合い、研究を進めてもらいたい。

更に、合成生物学の「多様性」と「社会性」について、今後とも留意して頂きたい。合成生物学の対象・レベル・方法論は実に広範・多様で、微生物・植物・動物・ヒトを対象に、ゲノム・蛋白・細胞・組織・器官・個体レベルまで、また天然物改変体から全人工物体まで多岐に亘る。本プロジェクトはその一部に過ぎない。しかし、その体制や運営は、正に他の多くのプロジェクトの模範と

なる先導的なものになり得るであろう。ここでの成功例が大きな波及効果を発揮すること、そしてこのことが真に新しい領域を切り拓いていくことを期待する。また、合成生物学は今後、医学・工学分野ほか多方面に活用されていくと考えられ、社会および生命倫理においても配慮を行う必要がある。この領域が共催した「細胞を創る研究会」でも、バイオセキュリティについてのセッションが用意されていたが、今後もこのような問題にも積極的に配慮していただきたい。

慶應大学理工学部 訪問教授 柳川弘志

医療や環境への応用から「合成生物学」に対する社会の関心がきわめて高い米国と比較して、我が国における合成生物学の認知度はまだまだ高いとは言い難い。そんな中で本研究領域は、我が国における合成生物学研究の基盤確立を目指して、生物学・工学・情報科学という異分野の研究者を結集し、「新学術領域」の名にふさわしい野心的な研究領域を形成している。

【研究組織および連携状況について】

生物学班（A01）の特長ある3つのテーマと、それを支える工学班（B01）および情報科学班（C01）という体制が、わかりやすく役割分担されており、きわめて妥当な研究組織といえる。Rondelez 班のマイクロ流体デバイスの利用3件を始め、13件の共同研究が進行中であり、連携状況は良好である。

【これまでの進展状況について】

実質1年半が経過した時点であり、研究業績については個々の要素技術に関するものが多いが、PNASなどの一流誌を始め多くの論文発表により研究グループのポテンシャルの高さを示している。具体的には、①人工遺伝子回路による細胞応答制御、②幹細胞の分化制御、および、③ゲノムデザインによる人工代謝経路の開発という最終目標に向けて、概ね順調に課題をクリアしており、非公開情報も含めて未発表の着目すべき成果も得られている。

【今後の推進方策について】

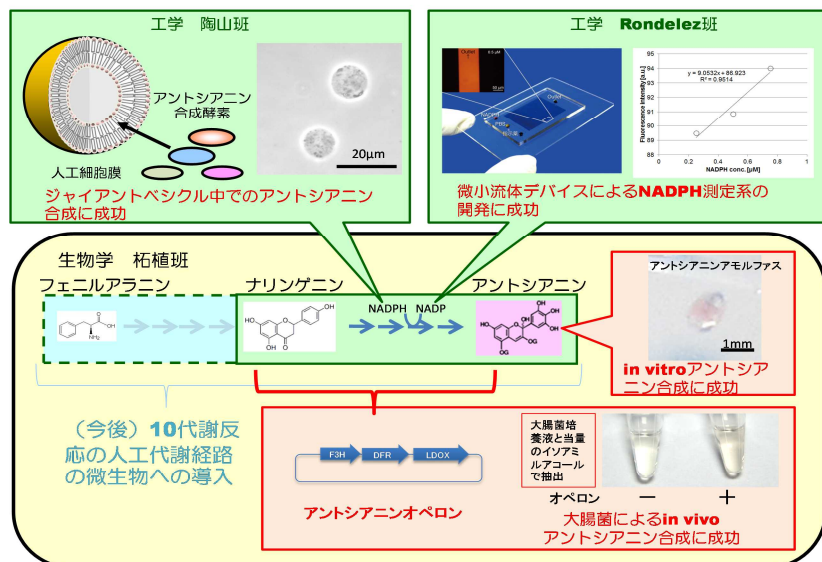
前半、情報科学班（C01）の公募申請が少なかったことから、今後、情報系の研究者を増やす必要性が指摘されているが、工学班（B01）の公募研究も少ない。マイクロ流体デバイスのRondelez 班との連携は十分だが、これは合成生物学に限らず生命科学全般に言えることである。今後は、細胞内の代謝物のセンサーや回路の分子パーツの作製に関する研究者の補強も重要と考えられる。我が国には進化分子工学の研究者も多いので、様々なパーツの作製方法に関する「引き出し」を増やすことが望ましい。

7. 主な研究成果（発明及び特許を含む）[研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理する]

（3 ページ程度）

現在実施している新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

A01 計画研究 柘植班



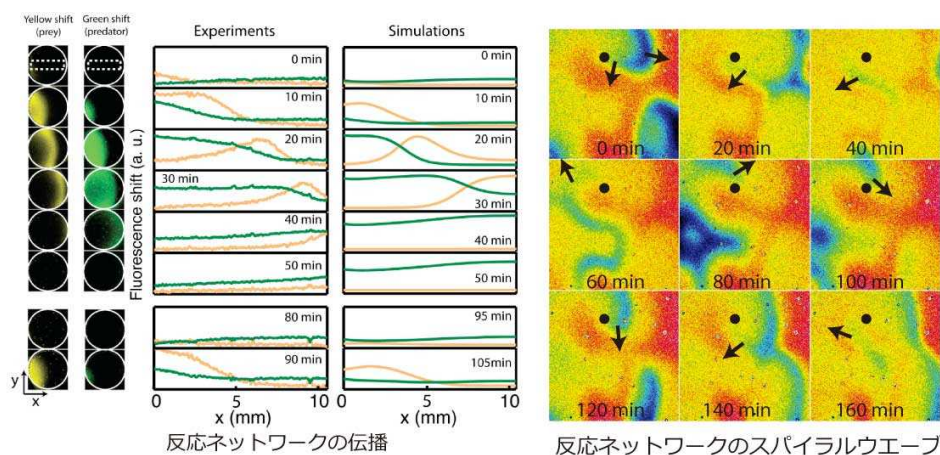
多要素の酵素反応からなる「アントシアニン」と「カロテノイド」の代謝経路について、以下の成果が得られた。

「アントシアニン」では、ナリンゲニン以降の 4 酵素 (F3H, DFR, LDOX, 3-GT) を混合した *in vitro* 反応系において、アントシアニンの一種の色素化合物ペラルゴニジン-3-グリコシドの合成に初めて成功した (左図)。これは、精製酵素によるアントシアニン合成の初めて例と考えられる。さらにアントシアニン合成に関わる各酵素の至適酵素量を求めるために、Rondelez 班と連携

携して基質となる NADPH の消費量を蛍光法で測定するマイクロ流体デバイスを製作した (左図)。また陶山班のジャイアントベシクルを用いて、ベシクル内でのアントシアニン合成の再構成を行い、中間代謝産物のジヒドロケンフェロールを基質として 2 つの酵素 (DFR と LDOX) によるペラルゴニジンの合成に成功した (左図)。さらに、3 酵素 (F3H, DFR, LDOX)、の遺伝子を連結した人工オペロンを構築し、大腸菌で発現させることでアントシアニンの一種の色素ペラルゴニジンの合成にも成功した (左上図)。

B01 計画研究 Rondelez 班

本班は、マイクロチャンバとマイクロ液滴の2種類のマイクロ流体システムを開発し、基礎的検討を行った。具体的にはマイクロチャンバ系ではマイクロチャンバの底面部分に電極を配置することによって、単一細胞を誘電泳動によって効率よくチャンバ内にトラップすることに成功した。また、細胞を生きたまま捕捉出来ることと、人工遺伝子回路の評価で一般的に用いられる細胞内の蛍光タンパク質発現のモニタリングが可能なることを確認した。マイクロ液滴系では反応ネットワークを液滴の微小な体積の液体中で長時間観察するために安定なマイクロ液滴プラットフォームを開発した。開発されたマイクロチャンバまたはマイクロ液滴内を用いて細胞内に導入した人工遺伝子回路の機能評価または反応ネットワークの観察のため、DNA鎖と数種類の酵素からなるツールボックスを用いて *in vitro* 反応ネットワークを構築した(MBS 2011)。また、いろんな蛍光色素を使った反応ネットワークを開発(NAR 2012)することによって、より複雑な反応ネットワーク、すなわち、ふたつの定常状態を持つネットワークを構築している(PNAS 2012)。さらに、「捕食 (predation)、競争 (competition)、共生 (symbiosis)」などの実際の生態系 (ecosystem) ネットワークを分子レベルで実現した(ACS nano 2013)。分子や細胞ネットワークについて、競争の役割を説明するための新しい理論的なアイデアを導入した (PRL 2012a, PRL 2012b, Curr opin biotech 2012, JBA 2013, JRSoc Interface 2013)。設計された反応ネットワークを用いて、反応の空間的(2次元)な伝播を可視化するためのマイクロ流体プラットフォームを開発し、反応ネットワークの伝播やスパイラルウェーブの観察に成功した(JACS 2013)。このように、合成生物学の網羅的解析が行える機能評価プラットフォームの開発に成功した。



本計画研究では、進化計算を活用してデータベースに格納された遺伝子部品等の検索を行い、それらを組み合わせて人工遺伝子回路を自動設計する技術を開発することを目的とする。さらに、人工遺伝子回路を設計するための実験計画を立案する技術の構築を目指す。

本研究では、生物学者からのフィードバックの手法として、定量的に表現することが困難な生物学的性質や経験に基づく予測などを反映させることが可能な対話型進化計算 (Interactive Evolutionary Computation: IEC) の利用を提案した。IEC とはユーザの主観的評価を評価値として直接利用することで、個人の嗜好や感情などの計算機上で明確な表現が困難な暗黙の指標を用いて最適化を行う手法であり、発想支援やデータマイニング、工学分野での最適化など様々な局面で応用されている。IEC を利用することで、実用的な人工遺伝子回路を効率よく設計する手法を構築することが、本研究の目的である。遺伝子回路設計においては、反応ネットワークの最適化と数値パラメータの最適化の2つを行う必要がある。遺伝子回路が目的の振る舞いをするかどうかは反応ネットワークの構成に大きく依存するため、反応ネットワーク最適化の際に専門研究者のフィードバックを加える。また数値パラメータの最適化は反応ネットワークの最適化後に評価関数を用いた進化計算で行うことにする。本研究のシステムではユーザ評価と評価関数の両方を用いて最適化するシステムになっている。図1には IEC による遺伝子回路設計システムの外観を示す。これらの研究については、Rondelez 班および花井班との共同研究を行っており、合成された遺伝子回路についてウエット実験による有効性を検証することを計画している。図2は共同研究をもとに最適化設計を行っている遺伝子回路の例である。

さらに MediaWiki をベースとして、合成生物学実験を計画・管理・運営し、実験結果を記録・検索するためのデータベース・フレームワークを開発している。そのために P1 実験室の承認を受け、学術支援専門職員を雇用して、フレームワークを開発するためのケーススタディとして実際に合成生物学実験を遂行した。実験スケジュールを記述するためのテンプレートを整備するとともに、実験スケジュールの記述から実験のワークフロー (実際にはマテリアルと実験ステップをノードとするデータフロー) を生成・表示するエクステンションを開発し、ユーザインタフェースの向上を図った。これまでに、AND Gate (Ayukawa, et al., BMC Genomics, 2010) の追試とその改変、AND Gate に基づく delay gate の作成、Riboregulator (Isaacs et al., Nat Biotechnol, 2004) の追試等を検証実験として行っている。

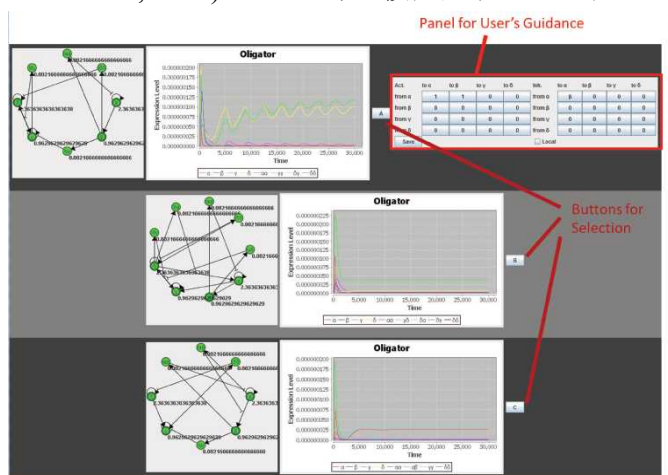


図1 IECによる遺伝子回路の設計

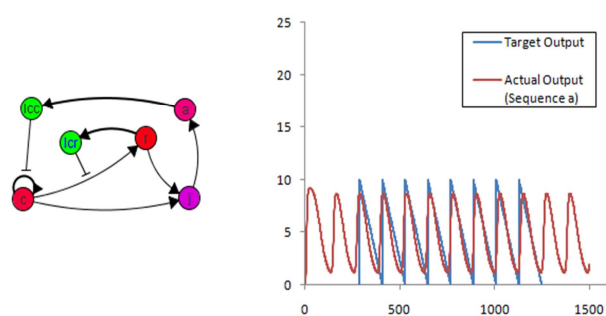


図2 合成された遺伝子回路 (triangle oscillation)

8. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5 ページ程度）

現在実施している新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

現在まで、領域全体で100報の学術論文、197件の学会発表を行っている。計画研究および公募研究の代表的な業績の一部を下記に示す。

A01 計画研究 花井泰三班

1. Y. Soma, Y. Motomura, M. Murakami, S. Yasutake, K. Tsuruno, M. Okamoto, T. Hanai: Experimental and theoretical analysis for the quantitative control of the target gene expression of genetic switch circuit, *Frontiers in Systems and Synthetic Biology* (2013).
2. A. Komori, Y. Maki, M. Nakatsui, I. Ono, *M. Okamoto: Efficient numerical optimization algorithm based on new real-coded genetic algorithm, AREX + JGG, and application to the inverse problem in systems biology, *Appl. Math.*, 3, 1463-1470 (2012).
3. 岡田元弘, 金田祥平, 本村洋平, 岡本正宏, 藤井輝男, 花井泰三: 大腸菌を用いた人工遺伝子回路による生体オシレーターの設計と開発, *分子生物学会* (2012).
4. H. Murakami, *H. Aiba: Another way to induce synchronous meiosis, *Cell Cycle*, 11, 1874-1875 (2012).
5. 花井泰三: 合成生物学の有用物質生産への応用, *化学工学会秋季大会* (2012).

A01 計画研究 田川陽一班

1. M. Tamai, E. Adachi, *Y. Tagawa: Characterization of a liver organoid tissue composed of hepatocytes and fibroblast in dense collagen fibrils, *Tissue Eng. part A*, in press.
2. Ryu Je-Young, A. Siswanto, K. Harimoto, and *Y. Tagawa: Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreatic acini, *Transgenic Res.*, 22, 549-556 (2013).
3. Y. Tagawa: *Developmental Engineering, Regenerative Medicine Technology, and Synthetic Biology* (2013).
4. Y. Toyoda, M. Tamai, K. Kashikura, S. Kobayashi, Y. Fujiyama, T. Soga, *Y. Tagawa: Acetoaminophen-induced hepatotoxicity in a liver tissue model consisting of primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network, *Drug Metab. Dispos.*, 40, 169-177 (2012).
5. Haque, A., X.-S. Yue, A. Motazedian, Y. Tagawa, *T. Akaike: Characterization and neural differentiation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells on cadherin-base substrata, *Biomaterials*, 33, 5094-5106 (2012).

A01 計画研究 柘植謙爾班

1. S-K. Chen, W-C. Chin, K. Tsuge, C.C. Huang, *S-Y. Li: Fermentation approach for enhancing 1-butanol production using engineered butanogenic *Escherichia coli*, *Bioresour. Technol.*, in press.
2. K. Tsuge, K. Nakahigashi, T. Togashi, M. Hasebe, Y. Takai, M. Hasegawa, Y. Igarashi, N. Sugiyama, N. Sato, Y. Hirayama, Y. Ishihama, T. Soga, M. Tomita, M. Itaya: Investigation of an artificial glycolytic operon toward bottom-up designing of a genome, *UK-Japan Systems Biology workshop in Kyoto* (2013).
3. Hiroe, K. Tsuge, C.T. Nomura, M. Itaya, *T. Tsuge: Rearrangement of gene order in the phaCAB operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 3177-3184 (2012).

4. K. Tsuge: Gnome construction technology and genome design, 14th A-IMBN Annual Conference: Life Science and Frontiers of Biorefinery Technology (2012).
5. K. Tsuge: Construction of metabolic pathway by artificial operon, The 5th International Conference on Industrial Bioprocesses (IFIB-2012) (2012).

A01 公募研究 鈴木石根班

1. 鈴木石根: 進化的視点からシグナル伝達を考える-シアノバクテリアから高等植物まで: 第54回日本植物生理学会年会 (2013).

A01 公募研究 古田芳一班

1. K. Yahara, Y. Furuta, K. Oshima, M. Yoshida, T. Azuma, M. Hattori, I. Uchiyama, *I. Kobayashi: Chromosome painting in silico in a bacterial species reveals fine population structure, *Mol. Biol. Evol.*, 30, 1454-1464 (2013).
2. Y. Furuta, *I. Kobayashi: Movement of DNA sequence recognition domains between non-orthologous proteins, *Nucleic Acids Res.*, 40, 9218-9232 (2012).
3. K. Yahara, M. Kawai, Y. Furuta, N. Takahashi, N. Handa, T. Tsuru, K. Oshima, M. Yoshida, T. Azuma, M. Hattori, I. Uchiyama, *I. Kobayashi: Genome-wide survey of mutual homologous recombination in a highly sexual bacterial species, *Genome Biol. Evol.*, 4, 628-640 (2012).

A01 公募研究 納富拓也班

1. *T. Notomi, Y. Ezura, *M. Noda: Identification of two pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis, *J. Biol. Chem.*, 287, 35057-35064 (2012).
2. D. Miyajima, T. Hayata, T. Suzuki, H. Hemmi, Y. Ezura, T. Nakamoto, T. Notomi, T. Amagasa, R. T. Böttcher, M. Costell, R. Fässler, *M. Noda: Profilin1 regulates sternum development and endochondral bone formation, *J. Biol. Chem.*, 287, 33545-33553 (2012).
3. R. Hanyu, V. L. Wehbi, T. Hayata, S. Moriya, T. N. Feinstein, Y. Ezura, M. Nagao, Y. Saita, H. Hemmi, T. Notomi, T. Nakamoto, E. Schipani, S. Takeda, K. Kaneko, H. Kurosawa, G. Karsenty, H. M. Kronenberg, J. P. Vilardaga, *M. Noda: Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the beta2-adrenergic receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, 7433-7438 (2012).

A01 公募研究 野村涉班

1. T. Narumi, H. Arai, K. Yoshimura, S. Harada, Y. Hirota, N. Ohashi, C. Hashimoto, W. Nomura, S. Matsushita, *H. Tamamura: CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 2518-2526 (2013).
2. T. Narumi, H. Aikawa, T. Tanaka, C. Hashimoto, N. Ohashi, W. Nomura, T. Kobayakawa, H. Takano, Y. Hirota, T. Murakami, N. Yamamoto, *H. Tamamura: Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers, *ChemMedChem*, 8, 118-124 (2013).
3. T. Narumi, T. Tanaka, C. Hashimoto, W. Nomura, H. Aikawa, A. Sohma, K. Itotani, M. Kawamata, T. Murakami, N. Yamamoto, *H. Tamamura: Pharmacophore-Based Small Molecule CXCR4 Ligands, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 4169-4172 (2012).

A01 公募研究 今西未来班

1. 今西未来: 人工転写因子を用いた細胞分子時計の操作, 日本薬学会第133年会 (2013).
2. *M. Imanishi, K. Yamamoto, H. Yamada, Y. Hirose, H. Okamura, *S. Futaki: Construction of a rhythm transfer system that mimics the cellular clock, *ACS Chem. Biol.*, 7, 1817-1821 (2012).
3. *M. Imanishi: Design of artificial DNA binding proteins toward control and elucidation of cellular functions, *Yakugaku Zasshi*, 132, 1431-1436 (2012).

A01 公募研究 上平正道班

1. S. Huang, *M. Kamihira: Development of hybrid viral vectors for gene therapy, *Biotechnol. Adv.*, 31, 208-223 (2013).
2. M. Yamaguchi, A. Ito, N. Okamoto, Y. Kawabe, *M. Kamihira: Heat-inducible transgene expression system incorporating a positive feedback loop of transcriptional amplification for hyperthermia-induced gene therapy, *J. Biosci. Bioeng.*, 114, 460-465 (2012).
3. A. Ito, N. Okamoto, M. Yamaguchi, Y. Kawabe, *M. Kamihira: Heat-inducible transgene expression with transcriptional amplification mediated by a transactivator, *Int. J. Hyperthermia*, 28, 788-798 (2012).

A01 公募研究 末次正幸班

1. 末次正幸, 片山勉: 試験管内再構成系における大腸菌ミニ染色体複製の開始—伸長—終結サイクル, 第85回日本生化学会大会 (2012).
2. 末次正幸, 片山勉: 大腸菌ミニ染色体複製の試験管内再構成における粗画分系と精製系の解析, 日本遺伝学会第84回大会 ワークショップ「細胞創成に向けた遺伝子とゲノムデザイン」のシナリオ (2012).
3. 末次正幸, J. Errington: 枯草菌染色体複製とその開始制御におけるDnaNクランプの役割, 第24回日本薬学会微生物シンポジウム (2012).

A01 公募研究 宮崎健太郎班

1. K. Kitahara, *K. Miyazaki: Revisiting bacterial phylogeny: Natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA, *Mob Genet Elements*, 3, in press.
2. K. Kitahara, Y. Yasutake, *K. Miyazaki: Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, 19220-19225 (2012).
3. 宮崎健太郎, 佃美雪「翻訳特性の改変された大腸菌」特願2012-102128.

B01 計画研究 木賀大介班

1. S. Ayukawa, Y. Sakai, *D. Kiga: Aptazyme-based molecular device that converts a small-molecule input to an RNA output, *Chem. Commun.*, 48, 7556-7558 (2012).
2. J. A. Stapleton, K. Endo, Y. Fujita, K. Hayashi, M. Takinoue, H. Saito, *T. Inoue: Feedback control of protein expression in Mammalian cells by tunable synthetic translational inhibition, *ACS Synth. Biol.*, 1, 83-88 (2012).
3. R. Ohmori, H. Saito, Y. Ikawa, Y. Fujita, *T. Inoue: Self-replication reactions dependent on tertiary interaction motifs in an RNA ligase ribozyme, *J. Mol. Evol.*, 73, 221-229 (2012).
4. R. Sekine, M. Yamamura, S. Ayukawa, K. Ishimatsu, S. Akama, M. Takinoue, M. Hagiya, *D. Kiga: Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 17969-17973 (2011).

5. 木賀大介、生命は人工合成できるか～遺伝子工学の拡張と“あり得た生命”の創造, アウトリーチ 読売テクノフォーラム 143回研究交流会 (2011)

B01 計画研究 Yannick Rondelez班

1. A. Padirac, T. Fujii, *A. Estévez-Torres, *Y. Rondelez: Spatial waves in synthetic biochemical networks, *J. Am. Chem. Soc.* (2013), in press.
2. T. Fujii, *Y. Rondelez: Predator-prey molecular ecosystems, *ACS Nano*, 7, 27-34 (2013).
3. A. Padirac, T. Fujii, *Y. Rondelez: Bottom-up construction of *in vitro* switchable memories, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, E3212–E3220 (2012).
4. L. Desbois, A. Padirac, S. Kaneda, Y. Rondelez, D. Hober, D. Collard, *T. Fujii: A microfluidic device for on-chip agarose microbeads generation with ultralow reagent consumption, *Biomicrofluidics*, 6, 044101 (2012).
5. A. Genot, T. Fujii, Y. Rondelez: An in-vitro toolbox to model gene regulatory networks, International Biotechnology Symposium (2012).

B01 計画研究 陶山明班

1. K. Shohda, K. Takahashi, *A. Suyama: Preparation of oil-free giant unilamellar vesicles encapsulating an active enzymatic solution, submitted to *ChemBioChem*.
2. M. Yokomori, O. Gotoh, *A. Suyama: A multiplex and sensitive RNA quantification method for determining the absolute amounts of mRNAs without reverse transcription processes, submitted to *Nat. Methods*.
3. A. Kan, Y. Sakai, K. Shohda, *A. Suyama: A DNA based molecular logic gate capable of a variety of logical operations, *Nat. Comput.*, in press.
4. A. Kan, K. Shohda, *A. Suyama: A DNA-based molecular logic gate capable of a broad class of logical operations, *LNCS*, 7433, 86–97 (2012).
5. K. Kurihara, M. Tamura, K. Shohda, T. Toyota, K. Suzuki, *T. Sugawara: Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA, *Nat. Chem.*, 3, 775-781 (2011).

B01 公募研究 車兪徹班

1. 車兪徹, Construction of membrane protein complexes by cell-free system, 第35回日本分子生物学会年会 (2012).
2. 車兪徹, 無細胞系で創る膜タンパク質複合体, 「細胞を創る」研究会5.0 (2012).
3. 車兪徹, 無細胞タンパク質合成系による膜タンパク質複合体の構築, 第7回無細胞生命科学研究会 (2012).

B01 公募研究 野澤彰班

1. A. Nozawa, *Y. Tozawa: Modification of wheat germ cell-free system for functional proteomics of plant membrane proteins, *Methods in Molecular Biology*, in press.
2. 岡田有右, 野澤彰, 戸澤譲: 酵母ミトコンドリアキャリアータンパク質の機能解析, 日本農芸化学会中四国支部第34回講演会 (2012).
3. Y. Okada, R. Fujimoto, A. Nozawa, Y. Tozawa. From bacteria to organelles: Cell-free analysis and characterization of mitochondrial carrier proteins, The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free

C01 計画研究 山村班

1. R. Sekine, D. Kiga, and *M. Yamamura: Design strategy for an initial state-independent diversity generator, *Chem-Bio Informatics Journal*, 12, 39-49 (2012).
2. T. Nakamura, D. Saito, A. Kawasumi, K. Shinohara, Y. Asai, K. Takaoka, F. Dong, A. Takamatsu, J. A. Belo, A. Mochizuki, *H. Hamada: Fluid flow and interlinked feedback loops establish left-right asymmetric decay of *cer12* mRNA in the mouse embryo, *Nat. Commun.*, 3, 1322 (2012).
3. W. Miura, H. Takayasu, *M. Takayasu: Effect of coagulation of nodes in an evolving complex network, *Phys. Rev. Lett.*, 108, 168701 (2012).
4. *Y. Suzuki: Behaviors of Chemical Reactions with Small Number of Molecules Lecture Notes in Computer Science, 5777, 394-401 (2011).
5. 濱田直希, 永田裕一, 小林重信, *小野功: 被覆度を考慮したマルチスタート法による多目的連続関数最適化, *Adaptive Weighted Aggregation*, *進化計算学会論文誌*, 3, 31-46 (2012).

C01 計画研究 伊庭斉志班

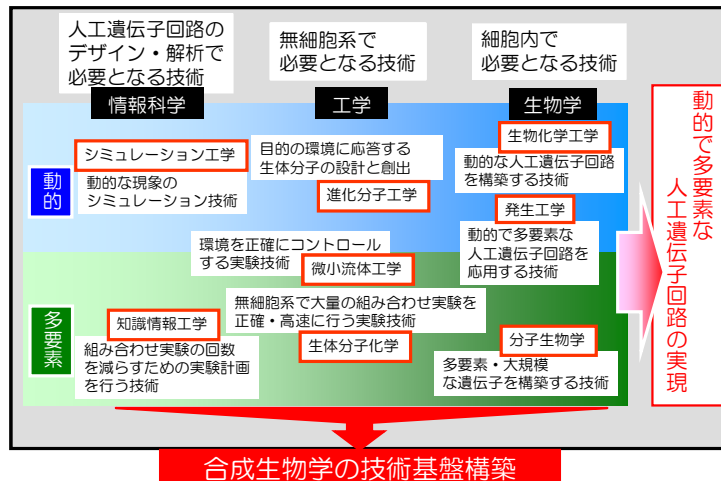
1. *L. Palafox, N. Noman, H. Iba: Reverse Engineering of Gene Regulatory Networks using Dissipative Particle Swarm Optimization, *IEEE Trans. Evol. Comput.*, accepted.
2. *N. Noman, L. Palafox, H. Iba: On model selection criteria in reverse engineering gene networks using RNN model, *Convergence and Hybrid Information Technology, LNCS*, 7425, 155-164 (2012).
3. *L. Palafox, N. Noman, H. Iba: Study on the use of evolutionary techniques for inference in gene regulatory networks, *Natural Computing and Beyond*, Suzuki, Y. and Nakagaki, T. (Eds.), 6, 82-92 (2012).
4. *R. Sekine, M. Yamamura, S. Ayukawa, K. Ishimatsu, S. Akama, M. Takinoue, M. Hagiya, D. Kiga: Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 17969-17973 (2011).
5. *H. Iba, N. Noman: *New Frontiers in Evolutionary Algorithms: Theory and Applications* (2011).

9. 今後の研究領域の推進方策（2ページ程度）

今後どのように領域研究を推進していく予定であるか、研究領域の推進方策について記述してください。また、領域研究を推進する上での問題点がある場合は、その問題点と今後の対応策についても記述してください。また、目標達成に向け、不足していると考えているスキルを有する研究者の公募班での重点的な補充や国内外の研究者との連携による組織の強化についても記述してください。

【領域全体の研究推進】

代謝と遺伝子発現を大規模かつ複雑に制御するには、下図のように、動的な(時間的に変化する)人工遺伝子回路設計と多要素の回路設計のための要素技術が必要となる。



本領域のキーポイントは、生物学（特に分子生物学）と工学と情報科学の要素技術を目的に向かって如何に連携を進めるかであり、この点は、採択の際の審査結果の所見にも述べられている。さらに、審査所見では、要素技術の統合を具体性のあるモデルに適用する点が評価される一面、全体としてみるといくつかの単独研究の集合体にも見える、出口が明確で無い等、指摘されている。これまで、合成生物学の研究領域は単独研究の成果が大半で、生物、工学、情報科学の連携体制から生まれたものは殆ど無い。したがって、領域全体会議では、常に、出口である「生物サイド」から工学、情報科学の班員に連携を積極的に働きかけ、お互いの情報を密にして、リーダーシップをとるように指示をしている（5～6ページ参照）。その結果、出口である3つの生物学領域の研究課題は、*in vivo*の系を*in vitro*で構築できるように、この前半2年半は、まず工学との連携を積極的に働きかけ、3つとも特に、Rondelez班の持つ微小流体工学技術（環境を正確にコントロールする実験技術）と装置・回路の開発を推し進めた。また、陶山班の持つ無細胞系でのタンパク質合成系も整備されつつある。他の計画研究班、特に、情報科学との連携は、実験データがかなり必要で、そのことから、*in vitro*での実験環境が整備されてきた後半に積極的に行う。つまり、前半は、人工代謝系においては、経路変換回路（トグルスイッチ等）、種の異なる代謝酵素遺伝子の導入技術といった要素技術の開発が完成し、人工遺伝子回路においては、人工オペロンの設計・構築を行なってきた。この結果を基に、後半は、大規模な代謝経路および複雑な動的挙動を持つ人工遺伝子回路を構築させ、本領域の最終目的である、生物、工学、情報科学の要素技術を統合した、動的で多要素な生体分子ネットワークの構築をめざす。**前半の公募研究申請にC01（理論系）が少なかったのが問題であり、情報科学の研究者に合成生物学研究への参画を積極的に働きかける。**

【各計画研究班の研究推進】

1) A01 花井班 安定して動作するトグルスイッチ、光波長に反応するセンサー回路、人工代謝経路などのパーツについては構築済みであり、データも集まりつつある。今後は、これらを複数組み合

わせ、複雑な動作を行わせる。複雑な動作を行わせるためには、複数のセンサー回路が必要になるので、自ら開発を進めるとともに B01 木賀班と一緒に生体分子の改良を進める。C01 伊庭班とはこれまで、ソフトウェアを用いた人工遺伝子回路設計を共同研究で進めており、今後も情報科学との連携体制を密にする。

2) A01 田川班 B01 Rondelez 班との共同研究で、2種類の培地を層流で流す流体マイクロデバイスの開発を行い、独自で樹立したマウス肝前駆細胞から成熟幹細胞と胆管上皮細胞への分化選別を観察できるようにした。また、リアルタイム PCR アレイを用いて発現遺伝子の情報を得ることができたので、今後、C01 伊庭班と細胞分化過程と遺伝子発現量の変化をシステム解析する予定。

3) A01 柘植班 アントシアニン等色素性代謝経路を題材に、大腸菌中で機能する人工オペロンの構築を行う。最終的に、人工オペロンに A01 花井班の動的要素を組み合わせることにより、新規代謝経路の設計図を作成するための汎用的で実用的なプロトコールを提供することを目指す。具体的には、これまで B01 Rondelez 班の作成した微小流体装置を用いて、人工オペロン中の各遺伝子の発現量の設定に生かす。また、B01 陶山班の独自の技術であるジャイアントベシクル内で、プラスミドを導入した無細胞系でのアントシアニン合成を行う。C01 伊庭班連携のもとで行い、*in vivo* での最適オペロンのデザインを行う。

4) B01 木賀班 C01 伊庭班の web フォーマットを活かしてプロモータ開発を続け、C01 山村班、A01 花井班に情報を提供する。B01 Rondelez 班、A01 柘植班が必要とする酵素を改変する。A01 田川班と協力し、哺乳細胞人工遺伝子回路の設計を進める。無細胞タンパク合成系の改変も進める。

5) B01 Rondelez 班 システム生物学の実験と理論を結びつける新しい実験プラットフォームとしてマイクロチャンバ系とマイクロ液滴系のマイクロ流体システムを開発した。プラットフォームの超並列化を行い、反応ネットワークのハイスループットスクリーニングを実現する。改良されたマイクロチャンバ系とマイクロ液滴系のプラットフォームを用いて、生物班から提供される人工遺伝子回路を導入した細胞内の遺伝子回路の評価を行う。

6) B01 陶山班 目標である多要素からなる人工遺伝子回路を実現するために、これまでの A01 柘植班との連携研究を引き続き推進するとともに、無細胞系での実験結果の蓄積にとまない C01 伊庭班との連携研究を本格的に開始する。また、これまで行ってきた公募研究の車班との連携研究は、多要素からなる人工遺伝子回路の長時間動作を可能にする GUV の調製法の開発に役立つものである。

7) C01 山村班 人工代謝経路や人工遺伝子回路モデルの多数のパラメータを効率よく最適化するためのソフトウェアを A01 花井班と共同で開発した。また、マルチフィジックス・マルチレイヤー数理モデルのコンピュータシミュレーション環境を A01 花井班、B01 木賀班と共同で開発した。C01 伊庭班と共同で、人工遺伝子回路方式の自動設計に成功している。今後はこれらの要素技術を生物班の実験データに適用する。

8) C01 伊庭班 MediaWiki をベースにして、合成生物学実験を計画・管理・運営し、実験結果を記録・検索するためのデータベース・フレームワークのプロトタイプを完成させ、生物班の実験結果等を入力できる環境整備を行った。これまでに、A01 花井班および B01 Rondelez 班と発振を起こす遺伝子回路系の自動導出を共同研究で行なっており、今後、田川班と細胞分化過程と遺伝子発現量の最適化問題について共同研究を実施する。細胞内で動作する人工遺伝子回路のためのタンパク質生産システムの調整に用いる。

10. 組織変更等の大幅な計画変更がある場合は当該計画（研究代表者の変更は真にやむを得ない場合に限る）（2～5ページ程度）【非公開】※本欄に記載の計画研究については、全て3年度目の審査の対象となります。

領域内の計画研究の研究代表者の交替や組織体制に大幅な変更がある場合（新しく計画研究を追加する場合や既存の計画研究を廃止する場合、領域全体の交付予定額の範囲内で各計画研究の研究経費を変更する場合（計画研究に係る経費を減額し、公募研究に係る経費を増額する場合等））には必ず記入してください。その際、以下の点を含めてください。

- ・計画研究を追加する場合は、追加の必要性、その計画研究が領域内で果たす役割、他の計画研究への影響等
- ・計画研究を廃止する場合は、廃止の理由、当該計画研究を廃止しても領域として支障がないことの説明等
- ・研究代表者の交替の場合は、交替の必要性、新旧の研究組織の異なる点（組織構成、領域内で果たす役割等）、新たに研究代表者になろうとする者が、旧研究代表者に替わって研究を実施できることの根拠、妥当性及びその者の研究業績等
- ・計画研究に係る経費と公募研究に係る経費の額の変更については、その必要性、1回目の公募研究の応募・採択状況等（公募研究に係る経費を減額して計画研究に係る経費を増額する変更は真にやむを得ない場合に限る。また、公募研究の規模に係る最低基準を下回らないこと。）
- ・以上の各変更に伴う他の計画研究の研究経費の変更及びその妥当性等

大きな変更はない。