

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

領域番号：4302

平成 23 年度～平成 27 年度
科学研究費助成事業（科学研究費補助金）
（新学術領域研究（研究領域提案型））
研究成果報告書

平成 29 年 6 月

領域代表者 岡本正宏

九州大学・農学研究院・教授

はしがき

「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」を終了して

領域代表者 岡本 正宏（九州大学大学院農学研究院）

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さかんに行われています。「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ありません。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きました。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も行われておりました。しかしながら、本領域がスタートする平成23年当時では、人工遺伝子回路や人工代謝経路は小規模であり、trial and errorで構築されている状態であり、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おりました。しかし、合成生物学研究を精力的に進めていけば、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期待できます。

本領域は、平成23年度より28年度（28年度は成果取りまとめ）まで、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、という目標を設定して、研究を推進してまいりました。

具体的なテーマとして、1)細胞密度・栄養源・生産物を感知し、自ら制御を行い、物質を生産する『自律制御生産細胞』の構築、2)多数(10以上)の遺伝子から構成される人工代謝経路を構築し、目的の物質を生産する『人工代謝経路を用いた多段階反応を必要とする目的物質の生産』、3)分化誘導補助細胞が、分化状態を感知し、目的の細胞へ分化誘導する『自律制御分化補助細胞による分化誘導システム』の構築、の3つの共通研究目標を設定しました。

5年間を通して、計画研究9件、公募研究32件を遂行し、世界に誇れる成果が挙がり、この報告書に収めることができました。また、個々の研究成果のみならず、領域全体会議を

通じて、3つの共通目標研究推進のために、関連する公募研究を融合するように働きかけ、最終的には、剣客研究班—計画研究班の共同研究11件、計画研究班—公募研究班の共同研究14件、公募研究班—公募研究班の共同研究8件の合計33件もの共同研究が行われたことも大きな成果としてあげられます。

合成生物学は、大きな発展分野であり、ここで扱われている分子レベルの技術は、細胞・器官・個体などの上位レベルの合成生物学の基盤となります。また、生物をシステムとして捉える、システム生物学の研究とも密接に関連します。そして、合成生物学とシステム生物学を両輪とする「合成システム生物学」が今後の研究の基軸になるものと期待できます。

最後になりましたが、本領域の研究の進め方、研究成果に対する貴重なご助言をいただきました総括班評価者の合原一幸先生（東京大学）、八尾 徹先生（理化学研究所）、柳川弘志先生（慶應義塾大学）および、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究（研究領域提案型）の本領域ご担当の学術調査官の先生方、並びに、ご協力頂きましたすべての皆様に心より感謝申し上げます。

研究組織

【計画研究】

- 領域代表者：岡本 正宏（九州大学・農学研究院・教授）
- 研究代表者：花井 泰三（九州大学・農学研究院・准教授）
- 研究代表者：田川 陽一（東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授）
- 連携研究者：宮川 眞一（信州大学・医学部・教授）
- 研究代表者：柘植 謙爾（慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任講師）
- 連携研究者：板谷 光康（慶應義塾大学・政策・メディア研究科・教授）
- 研究協力者：吉積 毅（理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員）
- 研究代表者：木賀 大介（東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授）
- 研究分担者：井上 丹（京都大学・大学院生命科学研究所・教授）
- 研究分担者：井川 善也（富山大学・大学院理工学研究部・教授）
- 連携研究者：木川 隆則（理化学研究所・生命分子システム基盤研究領域・副領域長）
- 連携研究者：齋藤 博英（京都大学・白眉センター・准教授）
- 研究代表者：Yannick Rondelez（東京大学・生産技術研究所・特任准教授）
- 連携研究者：藤井 輝夫（東京大学・生産技術研究所・教授）
- 連携研究者：金田 祥平（東京大学・生産技術研究所・助教）
- 研究代表者：陶山 明（東京大学・総合文化研究科・教授）
- 研究分担者：庄田耕一郎（東京大学・総合文化研究科・助教）
- 研究代表者：山村 雅幸（東京工業大学・大学院総合理工学研究科・教授）
- 連携研究者：小長谷明彦（東京工業大学・総合理工学研究科・教授）
- 連携研究者：鈴木 泰博（名古屋大学・情報科学研究科・准教授）
- 連携研究者：小林 徹也（東京大学・生産技術研究所・准教授）
- 連携研究者：望月 敦史（理化学研究所・望月理論生物学的研究室・主任研究員）
- 連携研究者：高安 美佐子（東京工業大学・総合理工学研究科・准教授）
- 連携研究者：小野 功（東京工業大学・総合理工学研究科・准教授）
- 連携研究者：伊藤 浩史（九州大学・芸術工学研究院・助教）
- 連携研究者：関根 亮二（理化学研究所・生命システム研究センター・研究員）
- 研究代表者：伊庭 斉志（東京大学大学院・情報理工学研究科・教授）

【公募研究】

- 研究代表者：鈴木 石根（筑波大学・生命環境系・教授）
- 研究代表者：朝井 計（埼玉大学・理工学研究科・准教授）
- 連携研究者：吉川 博文（東京農業大学・バイオサイエンス研究科・教授）
- 研究代表者：古田 芳一（東京大学・新領域創成科学研究科・特任助教）
- 連携研究者：小林 一三（東京大学・新領域創成科学研究科・教授）
- 連携研究者：板谷 光康（慶應義塾大学・政策・メディア研究科・教授）
- 研究代表者：車 兪澈（東京工業大学・地球生命研究所・特任准教授）
- 研究代表者：納富 拓也（東京医科歯科大学・歯学部・講師）
- 研究代表者：野村 渉（東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授）
- 研究代表者：今西 未来（京都大学・化学研究所・助教）
- 研究代表者：荒木 通啓（神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授）
- 研究代表者：松野 浩嗣（山口大学・理工学研究科・教授）
- 連携研究者：森 浩禎（奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授）
- 連携研究者：杉井 学（山口大学・国際総合科学部・准教授）
- 連携研究者：フォレ・アドリエン（山口大学・創成科学研究科・助教）
- 研究代表者：小川 敦司（愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授）
- 研究代表者：野澤 彰（愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師）
- 研究分担者：戸澤 譲（愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授）
- 研究代表者：上平 正道（九州大学・大学院工学研究院・教授）
- 連携研究者：井藤 彰（九州大学・大学院工学研究院・准教授）
- 研究代表者：末次 正幸（立教大学・理学部・准教授）
- 研究代表者：伊藤 浩史（九州大学・芸術工学研究院・助教）
- 研究分担者：今井 圭子（関西医科大学・教養部・助教）
- 研究代表者：宮崎 健太郎（産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長）
- 研究代表者：西山 賢一（岩手大学・農学部・教授）
- 連携研究者：島本 啓子（公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・主幹研究員）
- 連携研究者：徳田 元（盛岡大学・栄養科学部・教授）
- 研究代表者：イハベ 侑エン（應 蓓文）（筑波大学・生命環境系・准教授）
- 研究代表者：清尾 康志（東京工業大学大学院・生命理工学研究科・准教授）
- 研究代表者：塩尻 信義（静岡大学・理学部・教授）
- 連携研究者：佐藤 信一（静岡大学・理学部・教授）

研究代表者：中野 秀雄（名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授）
 連携研究者：兒島 孝明（名古屋大学・大学院生命農学研究科・講師）
 研究代表者：磯村 彰宏（京都大学・ウイルス再生科学研究所・共同研究者）
 研究代表者：西田 敬二（神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授）
 研究代表者：内田 誠一（九州大学・大学院システム情報科学研究院・教授）
 研究代表者：倉田 博之（九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授）
 研究代表者：矢田 哲士（九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授）
 連携研究者：鈴木 穰（東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授）
 連携研究者：入江 拓磨（東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教）
 研究代表者：古澤 力（理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|----------|---------|---------|-----------|
| 平成 23 年度 | 121,100 | 32,685 | 153,785 |
| 平成 24 年度 | 218,000 | 65,400 | 283,400 |
| 平成 25 年度 | 192,600 | 57,780 | 250,380 |
| 平成 26 年度 | 180,090 | 54,000 | 234,090 |
| 平成 27 年度 | 174,000 | 52,182 | 226,182 |
| 平成 28 年度 | 3,000 | 900 | 3,900 |
| 総 計 | 888,790 | 262,947 | 1,151,737 |

研究発表

(1) 雑誌論文

| 研究項目 | 計画/公募 | 班 | 業績 | 発表年度 | 査読の有無 | 国際/国内 |
|------|-------|-------|---|------|-------|-------|
| X00 | 総括 | 岡本正宏班 | X00 総括 岡本正宏班 | | | |
| X00 | 計画 | 岡本正宏班 | Yohei Motomura, Hiroyuki Hamada, Masahiro Okamoto, An Effective Numerical Calculation Method for Multi Time-Scale Mathematical Models in Systems Biology, Appl. Math, 7, 2241-2268 (2016) | H27 | 有 | 国際 |
| X00 | 計画 | 岡本正宏班 | R. Saito, N. Terasaki, M. Yamazaki, N. Masutomi, N. Tsutsui, M. Okamoto: Estimation of the Mechanism of Adrenal Action of Endocrine-Disrupting Compounds Using a Computational Model of Adrenal Steroidogenesis in NCI-H295R Cells. J Toxicol, 2016:4041827 (2016). | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 岡本正宏班 | A. Komori, Y. Maki, I. Ono, M. Okamoto: Investing noise tolerance in an efficient engine for inferring biological regulatory networks, J. Bioinform. Comput. Biol., 13(3), 1541006 (2015). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 岡本正宏班 | K. Iwamoto, H. Hamada, Y. Eguchi, M. Okamoto: Stochasticity of Intracellular Biochemical Reaction Processes Controls the Final Decision of Cell Fate Associated with DNA Damage, PLOS ONE, 9, e101333 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 岡本正宏班 | A. Komori, Y. Maki, I. Ono, M. Okamoto: How to infer the interactive large scale regulatory network in 'omic' studies, Procedia Computer Science 23, 44-52 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 岡本正宏班 | 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). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | A01 計画研究 花井泰三班 | | | |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Y. Soma, T. Yamaji, F. Matsuda, T. Hanai: Synthetic metabolic bypass for a metabolic toggle switch enhances acetyl-CoA supply for isopropanol production by Escherichia coli. J. Biosci. Bioeng., 123, 5, 625-633 (2017) | H29 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Hori, M., Oka, S., Sugie, Y., Ohtsuka, H., and Aiba, H. Construction of a photo-responsive chimeric histidine kinase in Escherichia coli. J. Gen. Appl. Microbiol. 63, 44-50 (2017) DOI:10.2323/jgam.2016.07.005 | H29 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Y. Sugie, M. Hori, S. Oka, H. Ohtsuka, H. Aiba: Reconstruction of a chromatic response system in Escherichia coli. J. Gen. Appl. Microbiol. 62, 140-143 (2016) DOI: 10.2323/jgam.2016.01.006 | H28 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | K. Tsuruno, H. Honjo, T. Hanai: Enhancement of 3-hydroxypropionic acid production from glycerol by using a metabolic toggle switch. Microb Cell Fact. 14(1):155. doi: 10.1186/s12934-015-0342-1, (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Y. Soma, T. Hanai: Self-induced Metabolic State Switching by a Tunable Cell Density Sensor for Microbial Isopropanol Production, Metabolic Engineering, doi:10.1016/j.ymben.2015.04.005, (2015). | H27 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|----|
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | H. Honjo, K. Tsuruno, T. Tatsuke, M. Sato, T. Hanai: Dual synthetic pathway for 3-hydroxypropionic acid production in engineered <i>Escherichia coli</i> , <i>J. Biosci. Bioeng.</i> doi:10.1016/j.jbiosc.2014.12.023, (2015). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | H. Ohtsuka, M. Ishida, C Naito, H.Murakami and H. Aiba: Sexual development of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> is induced by zinc or iron limitation through <i>Ecl1</i> family genes. <i>Mol. Genet. Genomics</i> 290(1), 173-185 (2015). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Y. Soma, K. Tsuruno, A. Yokota, T. Hanai: Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch, <i>Metabolic Engineering</i> , 23, 175-184 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | C. Naito, H. Ito, T. Oshiro, H. Ohtsuka, H. Murakami and H. Aiba: A new <i>pmal</i> mutation identified in a chronologically long-lived fission yeast mutant. <i>FEBS Open Bio</i> 4, 829-833 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | K. Murakami-Y. Tonami, H. Ohtsuka, H. Aiba and H. Murakami: Regulation of <i>wee1</i> + expression during meiosis in fission yeast. <i>Cell Cycle</i> 13:18, 2853-2858 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | T. Shimasaki, H. Ohtsuka, C. Naito, H. Murakami and H. Aiba: <i>Ecl1</i> is activated by the transcription factor <i>Atf1</i> in response to H2O2 stress in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> . <i>Mol. Genet. Genomics</i> 289(4), 685-693 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | H. Ohtsuka, S. Ogawa, H. Kawamura, E. Sakai, K. Ichinose, H. Murakami and H. Aiba: Screening for long-lived genes identifies <i>Ogal</i> , a guanine-quadruplex associated protein that affects the chronological lifespan of the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> . <i>Mol. Genet. Genomics</i> 288(5), 285-295 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | K. Takuma, H. Ohtsuka, K. Azuma, H. Murakami and H. Aiba: The fission yeast <i>php2</i> mutant displays a lengthened chronological lifespan. <i>Biosci. Biotech. Biochem.</i> 77(7), 1548-1555 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | H. Ohtsuka, K. Azuma, S. Kubota, H. Murakami, Y. Giga-Hama, H. Tohda, H. Aiba: Chronological lifespan extension by <i>Ecl1</i> family proteins depends on <i>Prr1</i> response regulator in fission yeast, <i>Genes to Cells</i> , 17, 39-52 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | H. Murakami, H. Aiba: Another way to induce synchronous meiosis, <i>Cell Cycle</i> , 11, 1874-1875 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | K. Azuma, H. Ohtsuka, H. Murakami, H. Aiba: Extension of chronological lifespan by <i>ScEcl1</i> depends on mitochondria in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Biosci. Biotech. Biochem.</i> 76, 1938-1942 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | A01 計画研究 田川陽一班 | | | |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Yu Toyoda, Kasumi Kashikura, Tomoyoshi Soga, *Yoh-ichi Tagawa, "Metabolomics of an in vitro liver model containing primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network: comparative study on the metabolic stability and the effect of acetaminophen treatment" <i>Journal of Toxicological Sciences</i> in press. | H29 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|----|
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Yue, Y., M. Tamai, and *Y. Tagawa, “Nitric Oxide is Critical for Avoiding Hepatic Lipid Overloading via IL-6 Induction during Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice” <i>Experimental Animals</i> in press. doi: 10.1538/expanim.17-0017. | H29 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | K. Nakajima, M. So, K. Takahashi, Y. Tagawa, M. Hirao, Y. Goto, and *H. Ogi : Optimized Ultrasonic Irradiation Finds Out Ultra-stable Aβ1 – 40 Oligomer, <i>J. Phys. Chem. B</i> 121:2603-2613, 2017. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b01409 | H29 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Furuzono, S., M. Meguro, S. Miyauchi, S. Inoue, T. Homma, K. Yamada, Y. Tagawa, F. Nara, and T. Nagayama: A novel aldosterone synthase inhibitor ameliorates mortality in pressure-overload mice with heart failure. <i>European Journal of Pharmacology</i> , 795:58-65, 2016. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.049 | H28 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | S. Yagi, Y. Tagawa, N. Shiojiri: Transdifferentiation of mouse visceral yolk sac cells into parietal yolk sac cells in vitro, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 470, 4, 917-923 (2016) | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保、田川陽一：哺乳類の合成生物学、そして人工生命体へ、特集：「細胞を創る」研究とその展開、 <i>生物工学会誌</i> , 93: 620-622, 2015 | H27 | 無 | 国内 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | S. Ahn, M. Tamai, K. Nakashima, M. Ito, T. Suzuki, Y. Tagawa: An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 118, 1, 107-111 (2014) | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Aratsu, F, I. Harada, S. Yoshimura, C.-S. Cho, T. Akaike, and Y. Tagawa: Dynamic chemotactic response of fibroblasts to local stimulation using EGF-immobilized microbeads, <i>Biomaterials</i> , 35, 8, 2471-2476 (2014) | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Aikawa, H., M. Tamai, K. Mitamura, F. Itmainati, G. Barber, and Y. Tagawa: Innate immunity in an in vitro murine blastocyst model using embryonic and trophoblast stem cells, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 117, 3, 358-365 (2014) | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Y. Shang, M. Tamai, R. Ishii, N. Nagaoka, Y. Yoshida, M. Ogasawara, J. Yang, and Y. Tagawa: A hybrid sponge comprised of galactosylated chitosan and hyaluronic acid mediates the co-culture of hepatocytes and endothelial cells, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> 117, 1, 99-106 (2014) | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Miyanokoshi, M., T. Tanaka, M. Tamai, Y. tagawa, K. Wakasugi: Expression of the rodent-specific alternative splice variant of tryptophanyl-tRNA synthetase in murine tissues and cells, <i>Sci. Rep.</i> 3, 3477, 2013 | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Tamai, M., M. Aoki, A. Nishimura, K. Morishita, and Y. Tagawa: In vitro recapitulation of the urea cycle using murine embryonic ste cell-derived in vitro liver model, <i>Amino Acids.</i> , 45, 6, 1343-51 (2013) | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Tamai, M., E. Adachi, and Y. Tagawa: Characterization of a liver organoid tissue composed of hepatocytes and fibroblast in dense collagen fibrils, <i>Tissue Engineering part A</i> . 19, 21-22, 2527-2535 (2013) | H25 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|----|
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Ryu Je-Young, A. Siswanto, K. Harimoto, and Y. Tagawa: Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreatic acini, <i>Transgenic Res</i> , 22, 549-556 (2013). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Haque A, X-S. Yue, A. Motazedian, Y. Tagawa, and T. Akaike: Characterization and neural differentiation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells on cadherin-base substrata, <i>Biomaterials</i> , 33, 5094-5106 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | K. Harimoto, Y. Yoshida, K. Yoshihara, N. Nagaoka, T. Matsumoto, and Y. Tagawa: Osteoblast compatibility of materials depends on serum protein absorbability in osteogenesis, <i>Dent Mater J</i> , 31, 674-680 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Y. Toyoda, M. Tamai, K. Kashikura, S. Kobayashi, Y. Fujiyama, T. Soga, and Y. Tagawa: Acetaminophen-induced hepatotoxicity in a liver tissue model consisting of primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network, <i>Drug Metab. Dispos.</i> , 40, 169-177 (2012). | H23 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 田川陽一 創立90周年記念特別企画 特集「こんな研究にもES細胞やiPS細胞が役に立つーノックアウトマウス、再生医療、毒性試験だけではないー」 特集によって. 生物工学会誌, 90:546, 2012 | H23 | 無 | 国内 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保、田川陽一：マウスES/iPS細胞を用いた <i>in vitro</i> 肝器官形成システムとそのミトコンドリア機能変化の解析. 生物工学会誌, 90:560-561, 2012 | H23 | 無 | 国内 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 三田村圭祐、田川陽一：RNaseの豊富な組織からのRNA抽出のコツ 実験医学 30:2641-2647, 2012 | H23 | 無 | 国内 |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | A01 計画研究 柘植謙爾班 | | | |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | K. Tsuge, Y. Sato, Y. Kobayashi, M. Gondo, M. Hasebe, T. Togashi, M. Tomita, and M. Itaya. Method of preparing an equimolar DNA mixture for one-step DNA assembly of over 50 fragments. <i>Scientific Reports</i> 5, 10655 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | S-K. Chen, W-C. Chin, K. Tsuge, C.C. Huang, S-Y. Li: Fermentation approach for enhancing 1-butanol production using engineered butanogenic <i>Escherichia coli</i> , <i>Bioresour. Technol</i> , 145, 204-209 (2013) | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 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 <i>Escherichia coli</i> , <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 78, 3177-3184 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 鈴木石根班 | A01 公募研究 鈴木石根班 | | | |
| A01 | 公募 | 鈴木石根班 | T. Kotajima, Y. Shiraiwa, I. Suzuki: Functional analysis of the N-terminal region of an essential histidine kinase, Hik2, in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. <i>FEMS Microbiol Lett.</i> (2014) 351(1):88-94 | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 鈴木石根班 | Y. Hirokawa, I. Suzuk, T. Hanai: Optimization of isopropanol production by engineered cyanobacteria with a synthetic metabolic pathway. <i>J. Biosci. Bioeng.</i> (2-015) 119, 585-590 | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 朝井計班 | A01 公募研究 朝井計班 | | | |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|----|
| A01 | 公募 | 朝井計班 | H. Inoue, D. Suzuki, K. Asai: A putative bactoprenol glycosyltransferase, CsbB, in <i>Bacillus subtilis</i> activates SigM in the absence of co-transcribed YfhO, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 436, 6-11 (2013). | H24 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 朝井計班 | M. Hashimoto, T. Seki, S. Matsuoka, H. Hara, K. Asai, Y. Sadaie, K. Matsumoto: Induction of extracytoplasmic function sigma factors in <i>Bacillus subtilis</i> cells with defects in lipoteichoic acid synthesis, <i>Microbiology</i> , 159, 23-35 (2013). | H24 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | A01 公募研究 古田芳一班 | | | |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | Y. Furuta, H. Namba-Fukuyo, T.F. Shibata, T. Nishiyama, S. Shigenobu, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Hasebe, I. Kobayashi: Methylome diversification through changes in DNA methyltransferase sequence specificity. <i>PLoS Genet.</i> 10(4):e1004272 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | K. Miyazono, Y. Furuta, M. Watanabe-Matsui, T. Miyakawa, T. Ito, I. Kobayashi, M. Tanokura: A sequence-specific DNA glycosylase mediates restriction-modification in <i>Pyrococcus abyssi</i> . <i>Nat. Commun.</i> 5: 3178 (2014). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 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, <i>Mol. Biol. Evol.</i> 30, 1454-1464 (2013). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | Y. Furuta, I. Kobayashi: Movement of DNA sequence recognition domains between non-orthologous proteins, <i>Nucleic Acids Res.</i> 40, 9218-9232 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 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, <i>Genome Biol. Evol.</i> 4, 628-640 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | K. Lim, Y. Furuta, I. Kobayashi: Large variations in bacterial ribosomal RNA genes, <i>Mol. Biol. Evol.</i> 29, 2937-2948 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | A01 公募研究 納富拓也班 | | | |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Notomi (Corresponding author), M. Kuno, A. Hiyama, Y. Ezura, M. Honma, T. Ishizuka, K. Ohura, H. Yawo, M. Noda, Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitabile osteoblasts. <i>Bone</i> , 81: 1: 306-14, 2015 | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Notomi (Corresponding author), M. Kuno, A. Hiyama, K. Ohura, M. Noda, TM. Skerry: Zinc-induced effects on osteoclastogenesis involves activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide modulated channels via changes in membrane potential. <i>J Bone Miner Res.</i> 30: 9: 1618-26, 2015 | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Yamada, Y. Ezura, T. Hayata, S. Moriya, J. Shirakawa, T. Notomi, S. Aryal, M. Kawasaki, Y. Izu, K. Harada, M. Noda: $\beta 2$ Adrenergic receptor activation suppresses BMP-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells. <i>J Cell Biochem.</i> 116: 6: 1144-52, 2015 | H27 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|----|
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | S. Moriya, T. Hayata, T. Notomi, S. Aryal, T. Nakamoto, Y. Izu, M. Kawasaki, T. Yamada, J. Shirakawa, K. Kaneko, Y. Ezura, M. Noda: PTH regulates β 2-adrenergic receptor expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. <i>J Cell Biochem</i> , 116: 1: 142-8, 2015 | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Notomi (Corresponding author), I. Karasaki, Y. Okazaki, N. Okimoto, Y. Kato, K. Ohura, M. Noda: Toshihata Nakamura, Masashige Suzuki, Insulinogenic sucrose + amino acid mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic effect on bone compared with non-insulinogenic fructose + amino acid mixture in growing rats. <i>Bone</i> , 65: 1: 42-48, 2014 | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | J. Shirakawa, Y. Ezura, S. Moriya, M. Kawasaki, T. Yamada, T. Notomi, T. Nakamoto, T. Hayata, A. Miyawaki, K. Omura, M. Noda: Migration linked to FUCI-indicated cell cycle is controlled by PTH and mechanical stress. <i>J Cell Physiol</i> , 229: 10: 1353-8, 2014 | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | C. Watanabe, M. Morita, Y. Ezura, T. Nakamoto, T. Hayata, C. Kikuguchi, L. Xue, Y. Kobayashi, N. Takahashi, T. Notomi, K. Moriyama, T. Yamamoto, M. Noda: Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via Cnorf3. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 111: 7: 2692-7, 2014 | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Suzuki, T. Notomi, D. Miyajima, F. Mizoguchi, T. Hayata, T. Nakamoto, R. Hanyu, P. Kamolratanakul, A. Mizuno, M. Suzuki, Y. Ezura, Y. Izumi, M. Noda: Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force, <i>Bone</i> , 54, 172-8 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | A. Smiritti, K. Miyai, Y. Ezura, T. Hayata, T. Notomi, T. Nakamoto, T. Pawson, M. Noda: Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss. <i>J. Cell. Physiol</i> , 228, 1397-1403 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Notomi, Y. Ezura, M. Noda: Identification of two pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis. <i>J. Biol. Chem</i> , 287, 35057-35064 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 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. <i>J. Biol. Chem</i> , 287, 33545-33553 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 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. Vilaridaga, M. Noda: Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the beta2-adrenergic receptor. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , 109, 7433-7438 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Sakuma, T. Nakamoto, H. Hemmi, S. Kitazawa, R. Kitazawa, T. Notomi, T. Hayata, Y. Ezura, T. Amagasa, M. Noda: CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. <i>J. Cell. Physiol</i> , 227, 2807-2812 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村涉班 | A01 公募研究 野村涉班 | | | |
| A01 | 公募 | 野村涉班 | W. Nomura, N. Ohashi, A. Mori, H. Tamamura: An In-cell Fluorogenic Tag-probe System for Protein Dynamics Imaging Enabled by Cell-Penetrating Peptides, <i>Bioconjugate Chem.</i> , 26, 1080-1085 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村涉班 | 野村 涉 人工酵素によるゲノム編集工学とその応用, 可能性 <i>Yakugaku Zasshi</i> , 135, 405-414 (2015). | H26 | 有 | 国内 |

| | | | | | | |
|-----|----|------|---|-----|---|----|
| A01 | 公募 | 野村渉班 | N. Ohashi, W. Nomura, N. Minato, H. Tamamura: Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer, <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , 62, 1019-1025 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | J. Yamamoto, N. Maeda, C. Komiya, T. Tanaka, M. Denda, K. Ebisuno, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otake: Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker, <i>Tetrahedron</i> , 70, 5122-5127 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | H. Takano, T. Narumi, N. Ohashi, A. Suzuki, T. Furuta, W. Nomura, H. Tamamura: Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups, <i>Tetrahedron</i> , 70, 4400-4404 (2014) | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | J. Yamamoto, M. Denda, N. Maeda, M. Kita, C. Komiya, T. Tanaka, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otake: Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins, <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 12, 3821-3826 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | C. Hashimoto, T. Narumi, H. Otsuki, Y. Hirota, H. Arai, K. Yoshimura, S. Harada, N. Ohashi, W. Nomura, T. Miura, T. Igarashi, S. Matsushita, H. Tamamura: A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics, <i>Bioorg. Med. Chem.</i> , 21, 7884-7889 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | C. Hashimoto, W. Nomura, T. Narumi, M. Fujino, T. Nakahara, N. Yamamoto, T. Murakami, H. Tamamura: CXCR4-derived synthetic peptides inducing anti-HIV-1 antibodies, <i>Bioorg. Med. Chem.</i> , 21, 6878-6885 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | C. Hashimoto, W. Nomura, T. Narumi, M. Fujino, H. Tsutsumi, M. Haseyama, N. Yamamoto, T. Murakami, H. Tamamura: Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4, <i>ChemMedChem</i> , 8, 1668-1672 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | W. Nomura, H. Aikawa, N. Ohashi, E. Urano, M. Métifiot, M. Fujino, K. Maddali, T. Ozaki, A. Nozue, T. Narumi, C. Hashimoto, T. Tanaka, Y. Pommier, N. Yamamoto, JA. Komano, T. Murakami, H. Tamamura: Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products, <i>ACS Chem. Biol.</i> , 8, 2235-2244 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | W. Nomura, C. Hashimoto, T. Suzuki, N. Ohashi, M. Fujino, T. Murakami, N. Yamamoto, H. Tamamura: Multimerized CHR-Derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors, <i>Bioorg. Med. Chem.</i> , 21, 4452-4458 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 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, <i>Bioorg. Med. Chem.</i> , 21, 2518-2526 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 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, <i>ChemMedChem</i> , 8, 118-124 (2013). | H25 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|----|
| A01 | 公募 | 野村涉班 | 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, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 22, 4169-4172 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 今西未来班 | A01 公募研究 今西未来班 | | | |
| A01 | 公募 | 今西未来班 | 今西未来: 細胞概日時計の人為的制御、化学と生物 (日本農芸化学会誌) (印刷中) | H28 | 有 | 国内 |
| A01 | 公募 | 今西未来班 | M. Tsuji, S. Futaki, M. Imanishi: Creating a TALE protein with unbiased 5'-T binding, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 441, 262-265 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 今西未来班 | M. Imanishi, K. Yamamoto, H. Yamada, Y. Hirose, H. Okamura, S. Futaki: Construction of a rhythm transfer system that mimics the cellular clock, <i>ACS Chem. Biol.</i> , 7, 1817-1821 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | A01 公募研究 上平正道班 | | | |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | A. Ono, A. Ito, T. Sato, M. Yamaguchi, T. Suzuki, Y. Kawabe, M. Kamihira: Hypoxia-responsive transgene expression system using RTP801 promoter and synthetic transactivator fused with oxygen-dependent degradation domain, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 113, 7, 1600-1610 (2016). | H29 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | Y. Kawabe, T. Shimomura, S. Huang, S. Imanishi, A. Ito, M. Kamihira: Targeted transgene insertion into the CHO cell genome using Cre recombinase-incorporating integrase-defective retroviral vectors, <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , in press, doi: 10.1002/bit.25923 (2016). | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | A. Ono, A. Ito, T. Suzuki, M. Yamaguchi, Y. Kawabe, M. Kamihira: DNA damage-responsive transgene expression mediated by the p53 promoter with transcriptional amplification, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 120, 4, 463-466 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | T. Inao, Y. Kawabe, T. Yamashiro, Y. Kameyama, X. Wang, A. Ito, M. Kamihira: Improved transgene integration into the Chinese hamster ovary cell genome using the Cre-loxP system, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 120, 1, 99-106 (2015). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | M. Yamaguchi, A. Ito, A. Ono, Y. Kawabe, M. Kamihira: Heat-inducible gene expression system by applying alternating magnetic field to magnetic nanoparticles, <i>ACS Synth. Biol.</i> , 3, 273-279 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | S. Huang, M. Kamihira: Development of hybrid viral vectors for gene therapy, <i>Biotechnol. Adv.</i> , 31, 2, 208-223 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | M. Yamaguchi, A. Ito, N. Okamoto, Y. Kawabe, M. Kamihira: A Heat-inducible transgene expression system for gene therapy, <i>World Academy of Science, Engineering and Technology</i> , 71, 1341-1344 (2012). | H24 | 無 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 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, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 114, 460-465 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | A. Ito, N. Okamoto, M. Yamaguchi, Y. Kawabe, M. Kamihira: Heat-inducible transgene expression with transcriptional amplification mediated by a transactivator, <i>Int. J. Hyperthermia</i> , 28, 788-798 (2012). | H24 | 有 | 国際 |

| | | | | | | | |
|-----|----|--------|--|-----|---|--|----|
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | A01 公募研究 末次正幸班 | | | | |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | Suetsugu M, Harada Y, Keyamura K, Matsunaga C, Kasho K, Abe Y, Ueda T. and Katayama T: DnaA N-terminal domain interacts with Hda to facilitate replicase clamp-mediated inactivation of DnaA. Environ. Microbiol. 15, 3183-3195 (2013). | H25 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | A01 公募研究 宮崎健太郎班 | | | | |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | Nakashima N, Miyazaki K (2014) Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. Int J Mol Sci 15(23):2773-2793. | H26 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | Komori H, Sugiyama R, Kataoka K, Miyazaki K, Higuchi Y, Sakurai T (2014) New insights into the catalytic active-site structure of multicopper oxidases. Acta Crystallogr Sect D 70(3):772-779. | H26 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | Tsujimura S, Asahi M, Goda-Tsutsumi M, Shirai O, Kano K, Miyazaki K (2013) Direct electron transfer of a metagenome-derived laccase fused to affinity tags near the electroactive copper site. Phys Chem Chem Phys 15(47):20585-20589. | H25 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | Uchiyama T, Miyazaki K (2013) Metagenomic screening for aromatic compound-responsive transcriptional regulators. PLoS One 8(9):e75795. | H25 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | Tsukuda M, Miyazaki K (2013) Directed evolution study unveiling key sequence factors that affect translation efficiency in Escherichia coli. J Biosci Bioeng 116(5):540-545. | H25 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | Tsukuda M, Miyazaki K (2013) DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin. J Biosci Bioeng 116(5):644-646. | H25 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K (2013) Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. J Biol Chem 288(25):18325-18334. | H25 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | D. Verma, Y. Kawarabayasi, K. Miyazaki, T. Satyanarayana: Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (Mxyl) retrieved from compost-soil metagenome, PLoS One, 8, e52459 (2013). | H25 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | 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, 19220-199225 (2012). | H24 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 磯村彰宏 | A01 公募研究 磯村彰宏 | | | | |
| A01 | 公募 | 磯村彰宏 | *A. Isomura, F. Ogushi, H. Kori and *R. Kageyama “Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information” Genes. Dev., 31, 524-535, (2017). | H29 | 有 | | 国際 |
| A01 | 公募 | 磯村彰宏 | *A. Isomura and *R. Kageyama “Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions” Development, 141, 3627-3636, (2014). | H26 | 有 | | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | B01 計画研究 木賀大介班 | | | | |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|----|
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Takahiro Tanaka, Shigeyoshi Matsumura, Hiroyuki Furuta, *Yoshiya Ikawa: Tecto-GIRz: engineered group I ribozymes the catalytic ability of which can be controlled by self-dimerization., ChemBioChem (2016). | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Manami Ito, Haruka Sugiura, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, and *Masahiro Takinoue: A bacterial continuous culture system based on a microfluidic droplet open reactor, Analytical Sciences, 32, 61-66 (2016). | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Saki Inuzuka, Shigeyoshi Matsumura, and *Yoshiya Ikawa: Optimization of RNA-based c-di-GMP fluorescent sensors through tuning their structural modules, Journal of Bioscience Bioengineering (2016). | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Saki Inuzuka, Kei-Ichiro Nishimura, Hitoshi Kakizawa, Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta, Shigeyoshi Matsumura, and *Yoshiya Ikawa: Mutational analysis of structural elements in a class-I cyclic di-GMP riboswitch to elucidate its regulatory mechanism, J. Biochem (2016). | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Airi Furukawa, Takaya Maejima, Shigeyoshi Matsumura, and *Yoshiya Ikawa: Characterization of an RNA receptor motif that recognizes a GCGA tetraloop, Biosci. Biotech. Biochem (2016). | H27 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | *Shigeyoshi Matsumura and Yoshiya Ikawa: Artificial ligase ribozymes isolated by a "design and selection" strategy, Methods in Molecular Biology, 1316, 113-125 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Hirohisa Ohono, and *Tan Inoue: A purification method for a molecular complex in which a scaffold molecule is fully loaded with heterogeneous molecules, PLoS ONE, 10, e0120576 (2015). | H27 | 有 | 国内 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | *井川善也: 集積ナノ構造と生体分子デザイン構築に向けたモジュラー型RNAの人工改変, フォルマシア (日本薬学会会誌), 51, 42-46 (2015). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Kana Ishimatsu, Takashi Hata, Atsushi Mochizuki, Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, and *Daisuke Kiga: General Applicability of Synthetic Gene-Overexpression for Cell-Type Ratio Control via Reprogramming, ACS Synthetic Biology, 3, 638-644 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Kazuaki Amikura, Yoko Sakai, Shun Asami, and *Daisuke Kiga: Multiple Amino Acid-Excluded Genetic Codes for Protein Engineering Using Multiple Sets of tRNA Variants, ACS Synth. Biol., 3, 140-144 (2014). | H27 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Shigeyoshi Matsumura, Tatsunobu Ito, Takahiro Tanaka, Hiroyuki Furuta, and *Yoshiya Ikawa: Modulation of group I ribozyme activity by cationic porphyrins, Biology, 4(2), 251-263 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Taiichi Sakamoto, and *Tan Inoue: A trifunctional, triangular RNA-protein complex, FEBS, 589, 2424-2428 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Taiichi Sakamoto, and *Tan Inoue: Altering the orientation of a fused protein to the RNA-binding ribosomal protein L7Ae and its derivatives through circular permutation, Biochemical and Biophysical Research Communications, 466, 388-392 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Hirohisa Ohno and *Tan Inoue: Designed regular tetragon-shaped RNA-protein complexes with Ribosomal Protein L1 for bionanotechnology and synthetic biology, ACS Nano, 9, 4950-4956 (2015). | H27 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|----|
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Fujita Y, Furushima R, Ohno H, Sagawa F & *Inoue T: Cell-surface receptor control that depends on the size of a synthetic equilateral-triangular RNA-protein complex, <i>Sci. Rep.</i> , 4, 6422 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Kazuaki Amikura and *Daisuke Kiga: The number of amino acids in a genetic code, <i>RSC Advances</i> 3, 12512-12517 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Kazuaki Amikura, and *Daisuke Kiga: Reassignment of codons from Arg to Ala by multiple tRNAAla variants, <i>Viva Origin</i> , 41, 20-23 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | *Shoji Ohuchi: Identification of RNA aptamers against recombinant proteins with a hexa-histidine tag, <i>Methods in Molecular Biology</i> , 1111, 41-56 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, and *Daisuke Kiga: Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits, <i>BMC Systems Biology</i> , 8, S4 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Akio Kawahara-Kobayashi, Mitsuhiro Hitotsuyanagi, Kazuaki Amikura, and *Daisuke Kiga: Experimental Evolution of a Green Fluorescent Protein Composed of 19 Unique Amino Acids without Tryptophan, <i>Orig Life Evol Biosph</i> , 44, 75-86 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Thirampai Thamamgond, Nathaniel Z. L. Lim, Trevor Y.H. Ho, Shotaro Ayukawa, *Daisuke Kiga, and *King L. Chow: Cultivation of Synthetic Biology with the iGEM Competition, <i>Journal of Advanced Computational Intelligence and Intelligent Informatics</i> , 17, 161-166 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Kei Endo, James A. Stapleton, Karin Hayashi, *Hirohide Saito, and *Tan Inoue: Quantitative and simultaneous translational control of distinct mammalian mRNAs, <i>Nucleic Acids Research</i> , 41, 1-12 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Ryuhei Harada, Naoya Tochio, Takanori Kigawa, Yuji Sugita, and *Michael Feig: Reduced native state stability in crowded cellular environment due to protein-protein interactions, <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 135, 3696-3701 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Takayoshi Matsuda, Satoru Watanabe, and *Takanori Kigawa: Cell-free synthesis system suitable for disulfide-containing proteins, <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 431, 296-301 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Kei Endo, Karin Hayashi, *Tan Inoue, and Hirohide Saito: A versatile cis-acting inverter module for synthetic translational switches, <i>Nature Communications</i> , 4, 1-9 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Tomoaki Hara, *Hirohide Saito, and *Tan Inoue: Directed evolution of a synthetic RNA-protein module to create a new translational switch, <i>Chemical Communications</i> , 49, 3833-3835 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, and *Masayuki Yamamura: Design strategy for an initial state-independent diversity generator, <i>Chem-Bio Informatics Journal</i> , 12, 39-49 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | A. Kawahara-Kobayashi, Akiko Masuda, Yuhei Arais, Yoko Sakai, Atsushi Kohda, Masahiko Uchiyama, Shun Asami, Takayoshi Matsuda, Ryuichiro Ishitani, Naoshi Dohmae, Shigeyuki Yokoyama, Takanori Kigawa, Osamu Nureki, and *Daisuke Kiga: Simplification of the genetic code: restricted diversity of genetically encoded amino acids, <i>Nucleic Acids Research</i> , 40, 10576-10584 (2012). | H24 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|--------------------------|--|-----|---|----|
| B01 | 計画 | 本質大介班 | Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Masami Hagiya, and *Daisuke Kiga: Tunability of the ratio of cell states after the synthetic diversification by the diversity generator, <i>Communicative & Integrative Biology</i> , 5, 393-394 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 本質大介班 | Takayoshi Matsuda, Shozo Furumoto, Kae Higuchi, Jun Yokoyama, Ming-Rong Zhang, Kazuhiko Yanai, Ren Iwata, and *Takanori Kigawa: Rapid biochemical synthesis of C-11-labeled single chain variable fragment antibody for immuno-PET by cell-free protein synthesis, <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , 20, 6579-6582 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 本質大介班 | Shotaro Ayukawa, Yoko Sakai, and *Daisuke Kiga: An aptazyme-based molecular device that converts a small-molecule input into an RNA output, <i>Chemical Communications</i> , 48, 61, 7556-7558 (2013). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 本質大介班 | Satoru Akama, Masayuki Yamamura, and *Takanori Kigawa: A Multiphysics Model of In Vitro Transcription Coupling Enzymatic Reaction and Precipitation Formation, <i>Biophysical Journal</i> , 102, 221-230 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | 本質大介班 | Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Shotaro Ayukawa, Kana Ishimatsu, Satoru Akama, Masahiro Takinoue, Masami Hagiya, and *Daisuke Kiga: Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , 108, 17969-17973 (2011). | H23 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | B01 計画研究 Yannick Rondelez班 | | | |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | G. Gines, A. Zadorin, J.-C. Galas, T. Fujii, A. Estevez-Torres, and Y. Rondelez, "Microscopic Agents Programmed by DNA Circuits", <i>Nature Nanotechnology</i> (2017) advanced online publication, doi:10.1038/nnano.2016.299 | H29 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | K. Montagne, G. Gines, T. Fujii, and Y. Rondelez, "Boosting functionality of synthetic DNA circuits with tailored deactivation", <i>Nature Communications</i> , Vol.7 (2016) | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A.J. Genot, A. Baccouche, R. Sieskind, N. Aubert-Kato, N. Bredeche, J.F. Bartolo, V. Taly, T. Fujii, Y. Rondelez*, "High-resolution mapping of bifurcations in nonlinear biochemical circuits," <i>Nat Chem</i> , Vol.8 (2016) pp.760-767. | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A.J. Genot, A. Baccouche, R. Sieskind, N. Aubert-Kato, N. Bredeche, J.F. Bartolo, V. Taly, T. Fujii, Y. Rondelez*, "High-resolution mapping of bifurcations in nonlinear biochemical circuits," <i>Nat Chem</i> , in press. | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. S. Zadorin, Y. Rondelez, J.-C. Galas, A. Estevez-Torres: Synthesis of Programmable Reaction-Diffusion Fronts Using DNA Catalysts, <i>Phys. Rev. Lett.</i> , 114, 068301 (2015). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | H. van Roekel, L. Meijer, S. Masroor, G. Zandra, A. Estévez-Torres, Y. Rondelez, A. Zagaris, M. Peletier, P. Hilbers, T. de Greef Automated Design of Programmable Enzyme-Driven DNA Circuits. <i>ACS Synthetic Biology</i> , DOI: 10.1021/sb500300d (2014) | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. Zambrano, A. Zadorin, Y. Rondelez, A. Estévez-Torres, J.-C. Galas, Pursuit-and-evasion Reaction-diffusion Waves In Micro-reactors with Tailored Geometry <i>Journal of Physical Chemistry B</i> 10.1021/jp509474w (2015) | H27 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------------------|--|-----|---|----|
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. Baccouche, K. Montagne, A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Dynamic DNA reaction network: a walkthrough, <i>Methods</i> 10.1016/j.ymeth.2014.01.015 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | N. Aubert, T. Fujii, M. Hagiya, Y. Rondelez: Computer Assisted Design for Scaling Up Systems based on DNA Reaction Networks, <i>J. R. Soc. Interface</i> , 11 20131167 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | D. Q. Huy, N. Aubert, N. Noman, T. Fujii, Y. Rondelez, H. Iba: An Effective Method for Evolving Reaction Network in Synthetic Biochemical Systems, <i>IEEE Transaction on Evolutionary Computations</i> , doi 10.1109/TEVC.2014.2326863 (2014). | H27 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | N. Aubert, Y. Rondelez, T. Fujii, M. Hagiya: Enforcing delays in DNA computing systems, <i>Natural Computing</i> , Vol.13, Issue 4, pp 559-572, 2014 | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | S-H. Kim, X. He, S. Kaneda, J. Kawada, D. Fourmy, H. Noji, and T. Fujii: Quantifying Genetically Inserted Fluorescent Protein in Single iPS Cells to Monitor Nanog Expression Using Electroactive Microchamber Arrays, <i>Lab on a Chip</i> , Vol.14 (2014) pp. 730-736. | | | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | K. Hasatani, M. Leocmach, A. J. Genot, A. Estevez-Torres, T. Fujii, Y. Rondelez: High-throughput observation of compartmentalized biochemical oscillators, <i>Chem. Commun</i> , 49 (73), 8090 - 8092 (2013) | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. Padirac, T. Fujii, A. Estévez-Torres, Y. Rondelez: Spatial waves in synthetic biochemical networks, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 135 (39), 14586-14592 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. Genot, T. Fujii & Y. Rondelez: Scaling down DNA circuits with competitive neural networks, <i>J. R. Soc. Interface</i> , 10, 20130212 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | N. Aubert, Q. H. Dinh, M. Hagiya, T. Fujii, H. Iba, N. Bredeche, Y. Rondelez: Evolution of Cheating DNA-based Agents Playing the Game of Rock-Paper-Scissors, <i>Advances in Artificial Life</i> , vol. 12, 1143-1150 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | T. Fujii, Y. Rondelez: Predator-prey molecular ecosystems, <i>ACS Nano</i> , 7, 27-34 (2013). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Bottom-up construction of in vitro switchable memories, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , 109, E3212-E3220 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | 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, <i>Biomicrofluidics</i> , 6, 044101 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | Y. Rondelez: Competition for catalytic resources alters biological networks dynamic, <i>Physical Review Letters</i> , 108, 018102 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Nucleic acids for the rational design of reaction circuits, <i>Curr. Op. Biotech.</i> , 24, 1-6 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. Genot, T. Fujii, Y. Rondelez: Computing with computation in biochemical networks, <i>Phys. Rev. Let.</i> , 109, 208102 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Quencher-free multiplexed monitoring of DNA reaction circuits, <i>Nucleic Acid Research</i> , 1-7 (2012). | H24 | 有 | 国際 |

| | | | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|--|--|----|
| B01 | 計画 | 陶山明班 | B01 計画研究 陶山明班 | | | | | |
| B01 | 計画 | 陶山明班 | R. Barish, A. Suyama: Counting substrate cycles in topologically restricted metabolic networks. <i>LNCS 10307</i> , 1-12 (2017). | H29 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 計画 | 陶山明班 | T. Kojima, A. Suyama: Importance of sequence design methods considering hybridization kinetics for in vivo DNA computers. <i>BIO SIGNALS</i> , 4, 248-252 (2017). | H29 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 計画 | 陶山明班 | A. Kan, K. Shohda, A. Suyama: A DNA-based molecular logic gate capable of a broad class of logical operations, <i>LNCS</i> , 7433, 86-97 (2012). | H24 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 計画 | 陶山明班 | 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, <i>Nat. Chem.</i> , 3, 775-781 (2011). | H23 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | B01 公募研究 小川敦司班 | | | | | |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | A. Ogawa: Engineering of Ribosomal Shunt-Modulating Eukaryotic ON Riboswitches by Using a Cell-Free Translation System, <i>Methods Enzymol.</i> , 550, 109-128 (2015). | H26 | 無 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | A. Ogawa: Rational Design of Artificial ON-Riboswitches, <i>Methods Mol. Biol.</i> , 1111, 165-181 (2014). | H25 | 無 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | Y. Nakahira, A. Ogawa, H. Asano, T. Oyama, Y. Tozawa: Theophylline-dependent Riboswitch as a Novel Genetic Tool for Strict Regulation of Protein Expression in <i>Cyanobacterium Synechococcus elongatus PCC 7942</i> , <i>Plant Cell Physiol.</i> , 54, 1724-1735 (2013). | H25 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | A. Ogawa: Ligand-Dependent Upregulation of Ribosomal Shunting, <i>ChemBioChem</i> , 14, 1539-1543 (2013). | H25 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | A. Ogawa, Y. Susaki: Multiple-input and visible-output logic gates using signal-converting DNA machines and gold nanoparticle aggregation, <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 11, 3272-3276 (2013). | H25 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | B01 公募研究 車愈激班 | | | | | |
| B01 | 公募 | 車愈激 | Y. Kuruma and T. Ueda (2015) The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins. <i>Nature Protocols</i> , 10, 1328-1344 | H27 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 車愈激 | P.L. Luisi and Y. Kuruma (2015) Open Questions on the Origin of Life (OQOL)-Introduction to the Special Issue : A workshop in Association with the Origins 2014 Meeting. <i>Orig Life Evol Biosph.</i> Jan 15, Springer. | H27 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 車愈激 | H. Matsubayashi, Y. Kuruma, and T. Ueda (2015) Cell-Free Synthesis of SecYEG Translocon as the Fundamental Protein Transport Machinery. <i>Orig Life Evol Biosph.</i> Jan 15, Springer. | H27 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 車愈激 | H. Matsubayashi, Y. Kuruma, and Ueda T. (2014) In vitro synthesis of the E. coli Sec Translocon from DNA. <i>Angew. Chem. Int. Ed. Engl.</i> 53:7535-8. (As Double First) | H26 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 車愈激 | Yutetsu Kuruma, Hideaki Matsubayashi and Takuya Ueda. (2014) In Vitro Reconstruction of Functional Membrane. <i>ARTIFICIAL LIFE</i> 14, Page 963-964, The MIT Press. | H26 | 有 | | | 国際 |
| B01 | 公募 | 車愈激 | Yoshihiro Shimizu, Yutetsu Kuruma, Takashi Kanamori, Takuya Ueda (2014) Methods in Molecular Biology, The PURE system for protein production, 1118:275-84. | H26 | 有 | | | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|----|
| B01 | 公募 | 車愈澈 | van Nies P, Nourian Z, Kok M, van Wijk R, Moeskops J, Westerlaken I, Poolman JM, Eelkema R, van Esch JH, Kuruma Y, Ueda T, Danelon C. (2013) Unbiased tracking of the progression of mRNA and protein synthesis in bulk and in liposome-confined reactions. ChemBioChem. 14:1963-6. | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 車愈澈 | Yutetsu Kuruma, Hideaki Matsubayashi and Takuya Ueda. (2013) Autonomous construction of synthetic cell membrane. Advances in Artificial Life, ECAL 2013, Page 9-10, The MIT Press. | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 車愈澈 | Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Takuya Ueda (2013) In vitro Synthesis of Membrane Protein Machinery toward the Construction of Artificial Cell. Advances in Artificial Life, ECAL 2013, Page 824, The MIT Press. | H25 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | B01 公募研究 野澤彰班 | | | |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | A. Nozawa, Y. Tozawa: Incorporation of adenine nucleotide transporter, Ant1p, into proteoliposomes facilitates ATP translocation and activation of encapsulated luciferase, Journal of Bioscience and Bioengineering, 118, 130-133 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | A. Nozawa, Y. Tozawa: Modifications of wheat germ cell-free system for functional proteomics of plant membrane proteins, Methods in Molecular Biology, 1072, 259-272 (2014). | H26 | 無 | 国際 |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | B01 公募研究 清尾康志班 | | | |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | K. Seio, Y. Ohno, K. Ohno, L. Takeshita, T. Kanamori, Y. Masaki: 1. Photo-controlled binding of MutS to photo-caged DNA duplexes incorporating 4-O-(2-nitrobenzyl) or 4-O-[2-(2-nitrophenyl)propyl]thymidine. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 26, 4861-4863 (2016) | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | M. Tokugawa, Y. Masaki, C. J. Canggadibirata, K. Kaneko, T. Shiozawa, T. Kanamori, M. Grotli, L. M. Wilhelmsson, M. Sekine, K. Seio: 7-(Benzofuran-2-yl)-7-deazadeoxyguanosine as a fluorescence turn-ON probe for single-strand DNA binding protein. Chem. Commun., 52, 3809-3812 (2016) | H27 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | T. Kanamori, H. Ohzeki, A. Ohkubo, M. Takahashi, K. Tsuda, T. Ito, M. Shirouzu, K. Kuwasako, Y. Muto, K. Seio: Controlling the fluorescence of benzofuran-modified uracil residues in oligonucleotides by triple-helix formation. ChemBiochem, 16, 167-176 (2015) | H26 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | B01 公募研究 西山賢一班 | | | |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Nishikawa, H., Sasaki, M., *Nishiyama, K. "Membrane insertion of F0c subunit of F0F1 ATPase depends on glycolipoyzyme MPase and is stimulated by YidC" Biochem. Biophys. Res. Commun., 487, 477-482 (2017) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.095 | H29 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | *Nishiyama, K. and Tokuda, H. "Novel translocation intermediate allows re-evaluation of roles of ATP, proton motive force and SecE at the late stage of preprotein translocation" Gene Cells 21, 1353-1364 (2016) doi: 10.1111/gtc.12447 | H28 | 有 | 国際 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Endo, Y. and *Nishiyama, K: Relationship between glycolipoyzyme MPase and components comprising the protein transport machinery: Med. Res. Arch., 2, No 11, 1-24 (2015) http://journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/403/260 | H27 | 有 | 国際 |

| | | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|--|----|
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 西山賢一, 島本啓子, "糖脂質酵素 (Glycolipozyme) " MPaseの構造と作用機作, 酵素工学, 74, 14-18 (2015) http://www.enzyme-eng.com/modules/pico02/index.php?content_id=79 | H27 | 有 | | 国内 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y. Maturana, A.D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., *Tsukazaki, T. and *Nureki, O. "Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC", Nature (査読あり) 509, 516-520 (2014) doi:10.1038/nature13167 | H26 | 有 | | 国際 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | *Nishiyama, K. and Shimamoto, K. "Glycolipozyme Membrane Protein Integrase (MPIase): Recent Data", Biomol. Concepts, 5, 429-438 (2014) doi: 10.1515/bmc-2014-0030 | H26 | 有 | | 国際 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | *島本啓子、西山賢二 「タンパク質膜挿入の鍵を握るグライコリポザイム〜タンパク質でない酵素?〜」 実験医学増刊「代謝」 32, 115-122 (2014) https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758103411 | H26 | 有 | | 国内 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | *島本啓子、西山賢二 「膜タンパク質膜挿入の鍵を握る糖脂質酵素MPIase」 生命化学研究レター、 44, 9-14 (2014) http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/FBCmember/FBC_NewsLetterNo44.pdf | H26 | 無 | | 国内 |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | B01 公募研究 中野秀雄班 | | | | |
| B01 | 公募 | 中野秀雄 | Murzabaev, M., Kojima, T., Mizoguchi, T., Kobayashi, I., DeKosky, B. J., Georgiou, G., and Nakano, H. (2016) Handmade microfluidic device for biochemical applications in emulsion. J. Biosci. Bioeng. 121,471-476 | H28 | 有 | | 国際 |
| B01 | 公募 | 中野秀雄 | Kojima, T., Mizoguchi, T., Ota, E., Hata, J., Homma, K., Zhu, B., Hitomi, K., and * Nakano, H. (2016) Immobilization of proteins onto microbeads using a DNA binding tag for enzymatic assays. J. Biosci. Bioeng. 121, 147-153. | H28 | 有 | | 国際 |
| B01 | 公募 | 中野秀雄 | Zhu, B., Mizoguchi, T., Kojima, T., and * Nakano, H. (2015) Ultra-High-Throughput Screening of an In Vitro-Synthesized Horseradish Peroxidase Displayed on Microbeads Using Cell Sorter. PLoS One 10, e0127479. | H27 | 有 | | 国際 |
| B01 | 公募 | 中野秀雄 | Ninomiya, R., Zhu, B., Kojima, T., Iwasaki, Y., and Nakano, H. (2014) Role of disulfide bond isomerase DsbC, calcium ions, and hemin in cell-free protein synthesis of active manganese peroxidase isolated from Phanerochaete chrysosporium. J. Biosci. Bioeng. 117, 652-657. | H26 | 有 | | 国際 |
| B01 | 公募 | 西田敬二班 | B01 公募研究 西田敬二班 | | | | |
| B01 | 公募 | 西田敬二 | Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A.(2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Science. 2016 Sep 16;353(6305). pii: aaf8729. doi: 10.1126/science.aaf8729. Epub 2016 Aug 4. | H28 | 有 | | 国際 |

| | | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|--|----|
| B01 | 公募 | 西田敬二 | Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A.(2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. Nat Biotechnol. 2017 May;35(5):441-443. doi: 10.1038/nbt.3833. Epub 2017 Mar 27. | H28 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | C01 計画研究 山村雅幸班 | | | | |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Masaki Ogawa, Ito Hiroshi, Takeharu Seno: Vection is unaffected by circadian rhythm, Psychology, 6, 440-446 (2015). | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Gaudreau P, Hayami K, Aoki Y, Safoui H, and Konagaya A: Improvements to the Cluster Newton method for underdetermined inverse problems. Journal of Computational and Applied Mathematics, 283, 122-141 (2015). | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Shingo Gibo and Hiroshi Ito: Discrete and ultradiscrete models for biological rhythms comprising a simple negative feedback loop, Journal of Theoretical Biology 378, 89-95 (2015). | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Seichi Tada, Qingmin Zang, Wei Wang, Masuki Kawamoto, Mingzhe Liu, Michiru Iwashita, Takanori Uzawa, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, and Yoshihiro Ito: In vitro selection of a photoresponsive peptide aptamer to glutathione-immobilized microbeads, Journal of Biscience and Bioengineering, 119, 137-139 (2015). | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Qingmin Zang, Seiichi Tada, Takanori Uzawa, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, and Yoshihiro Ito: Genetic PEGylation with different lengths on polypeptide backbone, Chemical Communications, 51, 14385-14388 (2015). | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Yuuki Kawasaki, Hiroshi Ito, and Hisashi Kajimura: Equilibrium frequency of endosymbionts in multiple infections based on the balance between vertical transmission and cytoplasmic incompatibility, PLoS ONE, 9, e94900 (2014) | H26 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | 青木康憲, 速水 謙, 小長谷明彦: 劣決定逆問題に対するCluster Newton法とその薬物動態モデルへの応用, 応用数理, 24(4) 7-15 (2014). | H26 | 有 | | 国内 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Yasunori Aoki, Ken Hayami, Hans De Sterck, and Akihiko Konagaya: Cluster Newton Method for Sampling Multiple Solutions of Underdetermined Inverse Problems: Application to a Parameter Identification Problem, SIAM J. Scientific Computing, 36, B14-B44 (2014). | H26 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, and Daisuke Kiga: Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits, BMC Systems Biology, 8, S4 (2014). | H26 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Kana Ishimatsu, Takashi Hata, Atsushi Mochizuki, Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, and Daisuke Kiga: General Applicability of Synthetic Gene-Overexpression for Cell-Type Ratio Control via Reprogramming, ACS Synthetic Biology, 3, 638-644 (2014). | H26 | 有 | | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Bernold Fiedler, Atsushi Mochizuki, Gen Kurosawa, and Daisuke Saito: Dynamics and control at feedback vertex sets. I: Informative and determining nodes in regulatory networks, Journal of Dynamics and Differential Equations, 25, 563-604 (2013). | H25 | 有 | | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|----|
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Atsushi Mochizuki, Bernold Fiedler, Gen Kurosawa, and Daisuke Saito: Dynamics and control at feedback vertex sets. II: A faithful monitor to determine the diversity of molecular activities in regulatory networks, <i>Journal of Theoretical Biology</i> , 335, 130-146 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Yasunobu Mano, Tetsuya J. Kobayashi, Jun-ichi Nakayama, Hiroyuki Uchida, Masaya Oki: Single Cell Visualization of Yeast Gene Expression Shows Correlation of Epigenetic Switching Between Multiple Heterochromatic Regions Through Multiple Generations, <i>Plos Biology</i> , Vol.11(7), e1001601 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Kenta Yoshida, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, and Akihiko Konagaya: Estimation of feasible solution space using Cluster Newton Method: application to pharmacokinetic analysis of irinotecan with physiologically-based pharmacokinetic models, <i>BMC Syst Biol</i> , 7 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Yasuhiro Suzuki: Harness the Nature for Computation, <i>Natural Computing and Beyond</i> , 6, 47-70 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | 林 孝文: 周波数特性を用いた振動する人工遺伝子回路の自動設計, 計測自動制御学会 第40回知能システムシンポジウム資料集, 211-216 (2013). | H25 | 無 | 国内 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Ryoji Sekine and Masayuki Yamamura: Design and Control of Synthetic Biological Systems, <i>Natural Computing and Beyond</i> , 6, 104-114 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, and *Masayuki Yamamura: Design strategy for an initial state-independent diversity generator, <i>Chem-Bio Informatics Journal</i> , 12, 39-49 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Tetsuya Nakamura, Daisuke Saito, Aiko Kawasaki, Kyosuke Shinohara, Yasuko Asai, Katsuyoshi Takaoka, Fenglan Dong, Atsuko Takamatsu, Jose Antonio Belo, Atsushi Mochizuki, and Hiroshi Hamada: Fluid flow and interlinked feedback loops establish left-right asymmetric decay of cerl2 mRNA in the mouse embryo, <i>Nature Communications</i> , 3, 1-13 (2012). | H24 | 無 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | 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ヌスタート法による多目的連続関数最適化, <i>Adaptive Weighted Aggregation</i> , 進化計算学会論文誌, 3, 31-46 (2012). | H24 | 無 | 国内 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Masami Hagiya, and *Daisuke Kiga: Tunability of the ratio of cell states after the synthetic diversification by the diversity generator, <i>Communicative & Integrative Biology</i> , 5, 393-394 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Tetsuya J. Kobayashi, and Atsushi Kamimura: Theoretical aspects of cellular decision-making and information processing, <i>Advances in Experimental Medicine and Biology</i> , 736, 275-291 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Asako Komori, Yukihiko Maki, Masahiko Nakatsui, Isao Ono, and Masahiro Okamoto: Efficient Numerical Optimization Algorithm Based on New Real-Coded Genetic Algorithm, <i>AREX + JGG</i> , and Application to the Inverse Problem in Systems Biology, <i>Applied Mathematics</i> , 3, 1463-1470 (2012). | H24 | 無 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Yasuhiro Suzuki: Behaviors of Chemical Reactions with Small Number of Molecules, <i>Cecture Notes in Computer Science</i> , 5777, 394-401 (2012). | H24 | 無 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|----|
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Satoru Akama, Masayuki Yamamura, and *Takanori Kigawa: A Multiphysics Model of In Vitro Transcription Coupling Enzymatic Reaction and Precipitation Formation, <i>Biophysical Journal</i> , 102, 221-230 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Tetsuya J. Kobayashi: Connection between noise-induced symmetry breaking and an information-decoding function for intracellular networks, <i>Physical Review Letters</i> , 106 (2011). | H23 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | 山村雅幸: 進化的計算のDNA実装とその応用, <i>電気学会誌</i> , 132, 221-224 (2012). | H23 | 無 | 国内 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Satoru Akama, Masayuki Yamamura, and Takanori Kigawa: Multi-Objective Robust Optimization for In Vitro RNA Synthesis, <i>The Sixth IASTED International Conference on Computational Intelligence and Bioinformatics (CBI 2011)</i> , 74-80 (2011). | H23 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Shotaro Ayukawa, Kana Ishimatsu, Satoru Akama, Masahiro Takinoue, Masami Hagiya, and Daisuke Kiga: Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , 108, 17969-17973 (2011). | H23 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | C01 計画研究 伊庭斉志班 | | | |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | Y. Peng, Y. Hasegawa, N.Noman, *H.Iba: Temperature compensation via cooperative stability in protein degradation, <i>Physica A</i> , vol.431, pp.109-123 (2015) | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | Noman N, Monjo T, Moscato P, Iba H: Evolving Robust Gene Regulatory Networks, <i>PLoS One</i> . 2015 Jan 23;10(1):e0116258. doi 10.1371/journal.pone.0116258. eCollection (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | Dinh H, Aubert N, Noman N, Fujii T, Rondelez Y, Iba H : An Effective Method for Evolving Reaction Networks in Synthetic Biochemical Systems, <i>IEEE Transactions on Evolutionary Computation</i> , DOI:10.1109/TEVC.2014.2326863 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | Q.H.Dinh, N.Noman, H.Iba: Oscillatory synthetic biological system construction using interactive evolutionary computations, <i>Journal of Computer Science</i> 10 (12), 2640-2652 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | L. Palafox, N. Noman, H. Iba: Reverse Engineering of Gene Regulatory Networks using Dissipative Particle Swarm Optimization, <i>IEEE Trans. Evol. Comput.</i> , 17, 577-587 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | N. Noman, L. Palafox, H. Iba: Evolving Genetic Networks for Synthetic Biology, <i>New Generation Computing</i> , 31, 71-88 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | M. Hagiya, T. Kawamata: Towards Co-evolution of Information, Life and Artificial Life, <i>Natural Computing and Beyond, Proceedings in Information and Communications Technology</i> , 6, 39-48 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | N. Noman, L. Palafox, H. Iba: On model selection criteria in reverse engineering gene networks using RNN model, <i>Convergence and Hybrid Information Technology, LNCS</i> , 7425, 155-164 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | L. Palafox, N. Noman, H. Iba: Study on the use of evolutionary techniques for inference in gene regulatory networks, <i>Natural Computing and Beyond, Suzuki, Y. and Nakagaki, T. (Eds.)</i> , 6, 82-92 (2012). | H24 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|----|
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | N. Noman, L. Palafox, H. Iba: Reconstruction of Gene Regulatory Networks from Gene Expression Data Using Decoupled Recurrent Neural Network Model, Natural Computing and Beyond, Suzuki, Y. and Nakagaki, T. (Eds.), 93-103 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | I. Kawamata, N. Aubert, M. Hamano, M. Hagiya: Abstraction of Graph-Based Models of Bio-Molecular Reaction Systems for Efficient Simulation, Computational Methods in Systems Biology, 10th International Conference, CMSB 2012, Lecture Notes in Bioinformatics, 7605, 187-206 (2012). | H24 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | 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). | H23 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | H. Iba, N. Noman: New Frontiers in Evolutionary Algorithms: Theory and Applications (2011). | H23 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | S. Liu, H. Iba: A Study on Computational Efficiency and Plasticity in Baldwinian Learning, Journal of Advanced Computational Intelligence and Intelligent Informatics, 15, 1300-1309 (2011). | H23 | 有 | 国際 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | M. Kabir, N. Noman, H. Iba: Reverse engineering gene regulatory network from microarray data using liner time-variant model, BMC Bioinformatics, 11, S56 (2010). | H22 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | C01 公募研究 荒木通啓班 | | | |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | Ye, X., Morikawa, K., Ho, S.H., Nishida, K., Araki, M., Hasunuma, T., Hara, K.Y., Kondo, A. "Evaluation of genes involved in oxidative phosphorylation in yeast by developing a simple and rapid method to measure mitochondrial ATP synthetic activity" Microbial Cell Factories, 14 (1), 56 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | M. Araki, R.S. Cox III, H. Makiguchi, T. Ogawa, T. Taniguchi, K. Miyaoku, M. Nakatsui, KY. Hara, A. Kondo: M-path: A Compass for Navigating Potential Metabolic Pathways, Bioinformatics, 31(6) 905-911 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | KY. Hara, M. Araki, N. Okai, S. Wakai, T. Hasunuma, A. Kondo: Development of bio-based fine chemical production through synthetic bioengineering, Microbial Cell Factories, 13: 173 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | KY. Hara, K. Morita, M. Mochizuki, K. Yamamoto, C. Ogino, M. Araki, A. Kondo: Development of a multi-gene expression system in Xanthophylomyces dendrorhous, Microbial Cell Factories, 13: 175 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | KY. Hara, K. Morita, Y. Endo, M. Mochizuki, Araki, A. Kondo: Evaluation and screening of efficient promoters to improve astaxanthin production in Xanthophylomyces dendrorhous, Appl. Microbiol. Biotechnol., 98: 6787-6793 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | M. Nakatsui, M. Araki, A. Kondo: An Approach for Dynamical Network Reconstruction of Simple Network Motifs, BMC Systems Biology, 7(Suppl 6), S4 (2013). | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | C01 公募研究 塩尻信義班 | | | |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | Yagi, S. and Shiojiri, N. (2017) Identification of novel genetic markers for mouse yolk sacs by using microarray analyses. Placenta, 49, 68-71. | H29 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|----|
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | Yagi, S., Tagawa, Y. and Shiojiri, N. (2016) Transdifferentiation of mouse visceral yolk sac cells into parietal yolk sac cells in vitro. <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> , 470, 917-923. | H28 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | Fukuda, T., Fukuchi, T., Yagi, S. and Shiojiri, N. (2016) Immunohistochemical analyses of cell cycle progression and gene expression of biliary epithelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy of the mouse. <i>Exp. Anim.</i> , 65, 135-146. | H28 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | T. Ueno, A. Ishihara, S. Yagi, T. Koike, K. Yamauchi, N. Shiojiri: Histochemical analyses on biliary development during metamorphosis of <i>Xenopus laevis</i> tadpoles. <i>Zool. Sci.</i> , 32, 88-96 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | Y. Sugiyama, Y. Takabe, S. Yagi, T. Koike, N. Shiojiri: Immunomagnetic exclusion of PECAM-1-positive endothelial cells in fetal mouse liver cell cultures causes impaired growth and gene expression of hepatoblasts and stellate cells. <i>Biomed. Res.</i> , 35, 271-283 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | C01 公募研究 内田誠一班 | | | |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | T. Nakayasu, M. Yasugi, S. Shiraishi, S. Uchida, E. Watanabe, Three-Dimensional Computer Graphic Animations for Studying Social Approach Behaviour in Medaka Fish: Effects of Systematic Manipulation of Morphological and Motion Cues, <i>PLoS ONE</i> , 12(4): e0175059, April (2017) | H29 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | K. Kimura, A. Mamane, T. Sasaki, K. Sato, J. Takagi, R. Niwayama, L. Hufnagel, Y. Shimamoto, J-F. Joanny, S. Uchida, A. Kimura, Endoplasmic-Reticulum-Mediated Microtubule Alignment Governs Cytoplasmic Streaming, <i>Nature Cell Biology</i> , 19(4), pp.399-406, March (2017) | H29 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | Y. Sato, K. Nagatoshi, A. Hamano, Y. Imamura, D. Huss, S. Uchida, R. Lansford, Basal Filopodia and Vascular Mechanical Stress Organize Fibronectin into Pillars Bridging the Mesoderm-Endoderm Gap, <i>Development</i> , 144(2), pp.281-291, (2017) | H29 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | S. Matsumura, T. Kojidani, Y. Kamioka, S. Uchida, T. Haraguchi, A. Kimura, F. Toyoshima, Interphase adhesion geometry is transmitted to an internal regulator for spindle orientation via caveolin-1, <i>Nature Communications</i> , 7, June (2016) | H28 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | M. Goldstein, S. Uchida, A Comparative Evaluation of Unsupervised Anomaly Detection Algorithms for Multivariate Data, <i>PLoS ONE</i> , 11(4): e0152173, April (2016) | H28 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | K. Aoki, F. Maeda, T. Nagasako, Y. Mochizuki, S. Uchida, J. Ikenouchi: A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 113(13):E1863-71 (2016) | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 内田誠一, バイオイメージングフォマティクスと画像情報学, 電子情報通信学会誌 = The journal of the Institute of Electronics, Information and Communication Engineers 98(7), 597-603 (2015) | H27 | | 国内 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 内田誠一, 数値最適化とバイオイメージ・インフォマティクス, <i>Medical Imaging Technology</i> 33(3), 97-104 (2015) | H27 | | 国内 |

| | | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|--|----|
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 山口 遼, 深澤大我, 渡辺英治, 内田誠一, 対象の重なりを許容した大局的最適な多物体同時追跡, 電子情報通信学会技術研究報告. PRMU, パターン認識・メディア理解 114(454), 75-80 (2015) | H27 | | | 国内 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 野口将之, 本館利佳, 鈴木利治, 内田誠一, 最適化に基づく樹状突起からのspine検出, 電子情報通信学会技術研究報告 = IEICE technical report : 信学技報 115(24), 83-88 (2015) | H27 | | | 国内 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 松田修, 末次憲之, 内田誠一, 和田正三, 射場厚. 近接ハイパスペクトルイメージングに基づく植物遺伝学研究の新展開, 日本生態学会誌 64(3), 205-213 (2014) | H26 | 有 | | 国内 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | K. Chiba, M. Araseki, K. Nozawa, K. Furukori, Y. Araki, T. Matsushima, T. Nakaya, S. Hata, Y. Saito, S. Uchida, Y. Okada, A. C. Nairn, R. J. Davis, T. Yamamoto, M. Kinjo, H. Taru, T. Suzuki: Quantitative Analysis of APP Axonal Transport in Neurons - Role of JIP1 in Enhanced APP Anterograde Transport -, Molecular Biology of the Cell, 25(22), 3569-3580 (2014) | H26 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | C01 公募研究 應蓓文班 | | | | |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | BW Ying, S Seno, H Matsuda, T Yomo (2017) A simple comparison of the extrinsic noise in gene expression between native and foreign regulations in Escherichia coli. Biochem Biophys Res Comm 486:852-857. | H28 | 有 | | 国際 |
| C02 | 公募 | 應蓓文班 | M Kurokawa, S Seno, H Matsuda, BW Ying (2016) Correlation between genome reduction and bacterial growth. DNA Res 23: 517-525. | H28 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | BW Ying, K Yama, K Kitahara & T Yomo (2016) The Escherichia coli transcriptome linked to growth fitness. Genomics Data 7:1-3 | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | T Kishimoto, BW Ying+, S Tsuru, L Iijima, S Suzuki, T Hashimoto, A Oyake, H Kobayashi, Y Someya, D Narisawa & *T Yomo (2015) Molecular clock of neutral mutations in a fitness-increasing evolutionary process. PLOS Genet 11: 1005392. (+equal contribution) | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | K Yama, Y Matsumoto, Y Murakami, S Seno, H Matsuda, K Gotoh, D Motooka, S Nakamura, BW Ying & *T Yomo (2015) Functional specialization in regulation and quality control in thermal adaptive evolution. Genes Cells 20: 943-55. | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | BW Ying, T Honda, S Tsuru, S Seno, H Matsuda, Y Kazuta & T Yomo (2015) Evolutionary consequence of a trade-off between growth and maintenance along with ribosomal damages. PLOS ONE 10: 0135639. | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | BW Ying, Y Matsumoto, K Kitahara, S Suzuki, N Ono, C Furusawa, T Kishimoto & *T Yomo (2015) Bacterial transcriptome reorganization in thermal adaptive evolution. BMC Genomics 16: 802. | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | Y Murakami, Y Matsumoto, S Tsuru, BW Ying, T Yomo: Global coordination in adaptation to gene rewiring. Nucleic Acids Res, 43,1304-1316 (2015). | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | Y Ishizawa, BW Ying, S Tsuru, T Yomo: Nutrient-dependent growth defects and mutability of mutators in Escherichia coli. Genes Cells, 20, 68-76 (2015). | H27 | 有 | | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|---|-----|---|----|
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | M Yoshida, S Tsuru, N Hirata, S Seno, H Matsuda, BW Ying, T Yomo: Directed evolution of cell size in <i>Escherichia coli</i> . <i>BMC Evol Biol</i> , 14, 257 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | A Shibai, S Tsuru, BW Ying, D Motooka, K Gotoh, S Nakamura, T Yomo: Mutation accumulation in bacteria exposed to UV radiation. <i>Artificial Life</i> , 14, 757-758 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | Y Akeno, BW Ying, S Tsuru, T Yomo: A reduced genome decreases the host carrying capacity for foreign DNA. <i>Microbiol Cell Factories</i> , 13, 49 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | BW Ying, S Tsuru, S Seno, H Matsuda, T Yomo: Gene expression scaled by distance to the genome replication site. <i>Mol Biosyst</i> , 10, 375-379 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | C01 公募研究 伊藤浩史班 | | | |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | Murayama Y, Kori H, Oshima C, Kondo T, Iwasaki H, Ito H Low temperature nullifies the circadian clock in cyanobacteria through Hopf bifurcation Proceedings of National Academy of Sciences in press (2017) | H28 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | Nakatsuji N, Ihara H, Seno T, Ito H Visualizing similarity of appearance by arrangement of cards Frontiers in Psychology 7, 698 (2016) | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | Tsuchiya Y, Umemura Y, Minami Y, Koike N, Hosokawa T, Hara M, Ito H, Inokawa H, Yagita K: Effect of Multiple Clock Gene Ablations on the Circadian Period-Length and Temperature Compensation in Mammalian Cells. <i>Journal of Biological Rhythms</i> 31, 48-56 (2016) | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | Gibo S, Ito H: Discrete and ultradiscrete models for biological rhythms comprising a simple negative feedback loop. <i>Journal of Theoretical Biology</i> 378, 89-95 (2015) | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | Ogawa Y, Ito H, Seno T: Vection is unaffected by circadian rhythm. <i>Psychology</i> 6, 440-446 (2015) | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | Kawasaki Y, Ito H*, Kajimura H. (*corresponding author): Equilibrium frequency of endosymbionts in multiple infections based on the balance between vertical transmission and cytoplasmic incompatibility. <i>PLoS ONE</i> 9, e94900 (2014) | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | Lu Y, Nishio K, Matsuda S, Toshima Y, Ito H, Konno T, Ishihara K, Kato S, Hashimoto K, Nakanishi S: Regulation of the cyanobacterial circadian clock by electrochemically-controlled extracellular electron transfer <i>Angewandte Chemie International Edition</i> 126, 2240-2241 (2014) | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | C01 公募研究 松野浩嗣班 | | | |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | M. Sugii, H. Matsuno, Extension of artificial genetic circuits with mathematical analysis, Proc. The 30th International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC2015), in CD-ROM, pp.230-233, 2015. | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | M. Sugii, K. Kawano, A. Faure, H. Matsuno, A mathematical analysis of the behavior of genetic toggle switch, The 29th International Technical Conference on Circuits/Systems, Computers and Communications (ITC-CSCC2014), in CD-ROM, pp.845-848, 2014. | H26 | 有 | 国際 |

| | | | | | | |
|-----|----|-------|--|-----|---|----|
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | Z. Tian, A. Faure, H. Mori, H. Matsuno, Identification of key regulators in glycogen utilization in E.coli based on the simulation from a hybrid functional Petri net model, BMC Systems Biology, vol.7(Suppl 6):S1, 2013. | H25 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 倉田博之 | C01 公募研究 倉田博之班 | | | |
| C01 | 公募 | 倉田博之班 | Hiroyuki Masunaga, Yurie Sugimoto, Shigeyuki Magi, Ryunosuke Itasaki, Mariko Okada-Hatakeyama, Hiroyuki Kurata Robustness analysis of the detailed kinetic model of an ErbB signaling network by using dynamic sensitivity, PLoS ONE in press | H29 | 有 | 国際 |
| C02 | 公募 | 倉田博之班 | A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Mathematical comparison of memory functions between mutual activation and repression networks in a stochastic environment. Journal of Theoretical Biology, in press. | H29 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 倉田博之班 | A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Competitive Memory Functions in Gene Regulatory Network. Information Processing Society 47th Bio and Information Science Society of guidance (IPSSJ), Vol. 2, pp. 1-3. 2016-BIO-47 | H28 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 倉田博之班 | A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Gene expression noise can induce stochastic bimodality, even multimodality in deterministically monostable description with non-cooperative binding. Bioinformatics and Biostatistics for Agriculture, health and Environment, 2017, ISBN: 978-984-34-0996-6, pp. 397-405. | H29 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 倉田博之班 | A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Robustness of Memory Functions between Competitive Genes Regulatory Network. Proceedings of 4th International Symposium on Applied Engineering and Sciences (SAES2016), Kitakyushu, Japan, Paper-B17, Dec 17-18, 2016. | H28 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | C01 公募研究 矢田哲士班 | | | |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | Liu Y, Irie T, Yada T, Suzuki Y: A new computational method to predict transcriptional activity of a DNA sequence from diverse datasets of massively parallel reporter assays, Nucleic Acids Res, (in press). | H29 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | Ichinose N, Yada T, Wada H: Estimating optimal sparseness of developmental gene networks using a semi-quantitative model, PLoS One, 12:e0176492, (2017). | H29 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | S Maekawa, N Imamachi, T Irie, H Tani, K Matsumoto, R Mizutani, K Imamura, M Kakeda, T Yada, S Sugano, Y Suzuki, N Akimitsu: Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance, BMC Genomics, 16:154 (2015). | H27 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | N Ichinose, T Yada, O Gotoh: Tetrahedral gray code for visualization of genome information, PLoS One, 9:e86133 (2014). | H26 | 有 | 国際 |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | K Imamura, N Imamachi, G Akizuki, M Kumakura, A Kawaguchi, K Nagata, A Kato, Y Kawaguchi, H Sato, M Yoneda, C Kai, T Yada, Y Suzuki, T Yamada, T Ozawa, K Kaneki, T Inoue, M Kobayashi, T Kodama, Y Wada, K Sekimizu, N Akimitsu: Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli, Mol Cell, 53:393-406 (2014). | H26 | 有 | 国際 |

| | | | | | | | |
|-----|----|------|---|-----|---|--|----|
| C01 | 公募 | 古澤力班 | C01 公募研究 古澤力班 | | | | |
| C01 | 公募 | 古澤力班 | Kunihiko Kaneko, Chikara Furusawa, and Tetsuya Yomo: Universal relationship in gene-expression changes for cells in steady-growth state, <i>Phys. Rev. X</i> , 5, 011014 (2015) | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 古澤力班 | Chikara Furusawa and Kunihiko Kaneko: Global relationships in fluctuation and response in adaptive evolution, <i>Jour. Roy. Soc. Inter.</i> , 12, 109, 20150482 (2015) | H27 | 有 | | 国際 |
| C01 | 公募 | 古澤力班 | Shingo Suzuki, Takaaki Horinouchi, and Chikara Furusawa: Phenotypic changes associated with the fitness cost in antibiotic resistant <i>Escherichia coli</i> strains, <i>Mol. Biosys.</i> , 12, 2 414-20 (2016) | H27 | 有 | | 国際 |

(2)学会発表

| 研究項目 | 計画/公募 | 班 | 業績 |
|------|-------|-------|--|
| X00 | 総括 | 岡本正宏班 | X00 総括 岡本正宏班 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | A01 計画研究 花井泰三班 岡駿佑, 堀慎佑子, 杉江よしみ, 大塚北斗, 饗場浩文:合成生物学の展開に向けた光応答性大腸菌の創成, 第9回日本ゲノム微生物学会年会 (2015). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 石田麻衣子, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文:分裂酵母は亜鉛もしくは鉄枯渇下で有性生殖を引き起こす 理系女性研究者の活躍推進シンポジウム「シーズ&ニーズ・マッチングフォーラムおよび女性研究者交流会」(2015). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 相馬悠希, 鶴野圭悟, 花井泰三:人工遺伝子回路による代謝流束制御を用いた大腸菌でのインゾプロパノール生産, 第21回日本生物工学会九州支部熊本大会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 相馬悠希, 鶴野圭悟, 花井泰三:バイオプロセス効率化に向けた細胞内代謝制御のための人工遺伝子回路, 「細胞を創る」研究会 7.0 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Y Soma, K Tsuruno, T Hanai: Metabolic flux redirection for productivity improvement by metabolic toggle switch, iBio-T2014 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 花井泰三:合成代謝経路と人工遺伝子回路による物質生産, 合成生物シンポジウム (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Y Soma, K Tsuruno, T Hanai: Metabolic toggle switch for improvement of productivity in synthetic pathway, AOAIS2014 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 花井泰三:代謝トグルスイッチによる物質生産向上の試み, 第66回日本生物工学会大会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 山路大樹, 相馬悠希, 花井泰三:ピルヒン酸と酢酸を効率的に利用するために改良した代謝トグルスイッチによるIPA生産性の向上, 第66回日本生物工学会大会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 本庄宏, 鶴野圭悟, 花井泰三:遺伝子群を用いた新規3-ヒドロキシプロピオン酸生産合成代謝経路, 第66回日本生物工学会大会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 花井泰三:合成生物学の物質生産への利用, 農芸化学会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 岡駿佑, 堀慎佑子, 杉江よしみ, 大塚北斗, 饗場浩文:合成生物学の展開に向けた光応答性大腸菌の構築, 第37回日本分子生物学会年会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 高嶋智子, 三輪由紀子, 饗場浩文, 村上浩士:Forkhead型転写因子Fkh2による細胞周期制御機構の解析, 第37回日本分子生物学会年会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 島崎高史, 大塚北斗, 石田麻衣子, 内藤知佳子, 饗場浩文:分裂酵母における経時寿命延長因子EclIファミリータンパク質の解析, 第37回日本分子生物学会年会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 石田麻衣子, 大塚北斗, 村上浩士, 饗場浩文:新規な性分化シグナル・亜鉛枯渇におけるEclIファミリー遺伝子の機能解析, 第37回日本分子生物学会年会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 岡駿佑, 堀慎佑子, 杉江よしみ, 大塚北斗, 饗場浩文:シアノバクテリア由来の2成分制御系を用いた光応答性大腸菌の構築, 日本農芸化学会中部支部第171回例会 (2014). 「日本農芸化学会中部支部学術奨励賞受賞」 |

| | | | |
|-----|----|-------|--|
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 島崎嵩史, 大塚北斗, 石田麻衣子, 内藤知佳子, 饗場浩文: 分裂酵母における経時寿命延長因子 EclIファミリータンパク質の解析, 日本農芸化学会中部支部第171回例会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 石田麻衣子, 大塚北斗, 村上浩士, 饗場浩文: 新規な性分化シグナル・亜鉛枯渇におけるEclIファミリー遺伝子の機能解析, 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 大塚北斗, 島崎嵩史, 石田麻衣子, 内藤知佳子, 饗場浩文: 分裂酵母における経時寿命延長因子EclIファミリータンパク質の解析, 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 石田麻衣子, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母はFe, Zn枯渇下で有性生殖を引き起こす 名古屋大学若手女性研究者サイエンスフォーラム (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Komori A, Maki Y, Ono I, Okamoto M. Investigating noise tolerance in an efficient engine for inferring biological regulatory networks, 5th International Conference on Computational Systems-Biology and Bioinformatics (CSBio2014), Singapore, November, 2014. |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Yuki Soma, Keigo Tsuruno, Masaru Wada, Atsushi Yokota and Taizo Hanai: Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch, Annual Meeting & Exhibition Society for Industrial Microbiology and Biotechnology (2014). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 古森朝子, 牧幸浩, 小野功, 岡本正宏: システム生物学研究のための大規模分子間相互作用ネットワーク推定手法の開発, 平成25年度日本生化学会九州支部例会, 佐賀, May, 2013. |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Komori A, Maki Y, Ono I, Okamoto M. The Inferring Method of the large scale regulatory network for omics studies, Chem-Bio Informatics Society (CBI) Annual Meeting 2013, Tower Hall Funabori, Tokyo, October, 2013. |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Komori A, Maki Y, Ono I, Okamoto M. How to infer the interactive large scale regulatory network in 'omic' studies, 4th International Conference on Computational Systems-Biology and Bioinformatics (CSBio2013), Seoul, Korea, November, 2013. |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 相馬悠希, 鶴野圭悟, 花井泰三: 環境に応答する人工遺伝子回路の構築, 「細胞を創る」研究会 6.0 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 相馬悠希, 本村洋平, 村上舞, 安武俊介, 鶴野圭悟, 岡本正宏, 花井泰三: 工学的応用に向けた人工遺伝子回路の開発, 生物学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 島崎嵩史, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: H2O2ストレスに応答して経時寿命延長因子EclIは転写因子Aif1によって活性化される, 第36回日本分子生物学会年会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 石田麻衣子, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母はFe, Znの枯渇で性分化を起こす, 第36回日本分子生物学会年会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 石田麻衣子, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母はFe, Znの枯渇で性分化を起こす, 日本農芸化学会中部支部第168回例会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 島崎嵩史, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: 経時寿命延長因子EclIはH2O2ストレスに応答して転写因子Aif1により活性化される, 日本農芸化学会中部支部第168回例会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 酒井枝里香, 大塚北斗, 小川真悟, 川村英彰, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母の新規経時寿命延長因子ogaI ^r の同定と解析, 日本農芸化学会中部支部第168回例会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 島崎嵩史, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母における経時寿命延長因子 EclIの解析, 酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会 (2013). |

| | | | |
|-----|----|-------|--|
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 石田麻衣子, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母は微量元素Fe, Znの枯渇で性分化を起こす, 酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 酒井枝里香, 大塚北斗, 小川真悟, 川村英彰, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母の新規経時寿命延長因子oga1 ⁺ の同定と解析, 酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Yuki Soma, Yohei Motomura, Mai Murakami, Shunsuke Yasutake, Keigo Tsuruno, Masahiro Okamoto, Taizo Hanai: Mathematical modeling and theoretical analysis for the quantitative control of the target gene expression of synthetic genetic circuit, CBI (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | Yuki Soma, Kentaro Inokuma, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo, Chiaki Ogino, Taizo Hanai: Isopropanol production from cellobiose by <i>E. coli</i> , SIMB Annual Meeting (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | T Hanai, Synthetic pathway for C3 or C4 alcohol production, Japan-UK meeting systems microbiology symposium (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 花井泰三: イソプロパノール生産合成代謝経路による物質生産, 細胞を創る会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 田附 常幸, 鶴野 圭悟, 花井 泰三: 遺伝子組換え微生物を用いたイソプロパノール生産, 化学工学会 (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | H. Ito, T. Oshiro, H. Ohtsuka, H. Aiba: Pma1, a P-type proton ATPase, is a determinant of chronological lifespan in fission yeast, Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | H. Ohtsuka, K. Azuma, H. Aiba: Identification of novel genes, ecl1 ⁺ , ecl2 ⁺ , and ecl3 ⁺ , which extend chronological lifespan in fission yeast, Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | K. Azuma, Ho. Ohtsuka, Y. Koga, C. Naito, H. Murakami, H. Aiba: Functional characterization of lifespan elongation factor Ecl1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | K. Takuma, H. Ohtsuka, K. Azuma, H. Murakami, H. Aiba: Pmp2 mutant extends the chronological lifespan of fission yeast, Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | S. Ogawa, H. Ohtsuka, E. Sakai, H. Kawamura, H. Murakami, H. Aiba: A novel gene SPBC16A3.08c which extends chronological lifespan in fission yeast functions downstream of TOR pathway, Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology (2013). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 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). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 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定と開発, 分子生物学会 (2012). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 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 | 花井泰三班 | 大塚北斗, 琢磨和晃, 東劍虹, 村上浩士, 饗場浩文: pmp2変異株は分裂酵母の経時寿命を延長させる, 酵母遺伝学フォーラム第45回研究報告会 (2012). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 島崎高史, 大塚北斗, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母における経時寿命延長因子Ecl1の解析, 日本農芸化学会中部支部第165回例会 (2012). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 東劍虹, 大塚北斗, 古賀由梨枝, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母におけるRACK1ホモログCpc2についての研究, 日本農芸化学会中部支部第165回例会 (2012). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 琢磨和晃, 大塚北斗, 東劍虹, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母pmp2+が経時寿命に与える影響に関する研究, 日本農芸化学会中部支部第165回例会 (2012). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 小川真悟, 大塚北斗, 酒井枝里香, 川村英彰, 村上浩士, 饗場浩文: 分裂酵母の新規経時寿命延長因子に関する研究, 日本農芸化学会中部支部第165回例会 (2012). |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 東剣虹, 大塚北斗, 古賀由梨枝, 内藤知佳子, 村上浩士, 饗場浩文:ロイシンは分裂酵母のCpc2欠損における胞子形成欠陥を相補する, 第35回日本分子生物学学会年会 (2012). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 琢磨和晃, 大塚北斗, 東剣虹, 村上浩士, 饗場浩文:分裂酵母Php2の変異によって経時寿命が長くなる, 第35回日本分子生物学学会年会 (2012). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 小川真悟, 大塚北斗, 酒井枝里香, 川村英彰, 村上浩士, 饗場浩文:分裂酵母の新規経時寿命延長遺伝子SPBC16A3.08cはTOR経路の下流で働く, 第35回日本分子生物学学会年会 (2012). |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | 花井泰三:細胞応答制御のための人工遺伝子回路の開発, 生物工学会 (2011). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | A01 計画研究 田川陽一班 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 藤山陽一, 田川陽一:マウスES/iPS細胞由来 in vitro 肝組織モデルの肝細胞極性, 第9回「長野ミーティング:生物資源の有効利用を目指して」, 長野(フフォーレ倶楽部白馬八方)2015年(口頭) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 田川陽一, 玉井美保, 守矢恒司, 藤山陽一:人工哺乳類システム, 第9回「長野ミーティング:生物資源の有効利用を目指して」, 長野(フフォーレ倶楽部白馬八方)2015年(口頭) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 守矢恒司, 玉井美保, 豊田優, 小松銀河, 田川陽一:アセトアミノフエン誘導肝障害 in vivo モデルにおける概日リズムの影響, 第9回「長野ミーティング:生物資源の有効利用を目指して」, 長野(フフォーレ倶楽部白馬八方)2015年(口頭) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 田川陽一:B型肝炎感染・増殖 in vitro システム, イノベーションジャパン2014, 東京(ビックサイト), 2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 藤山陽一, 田川陽一:In vitro liver model derived from murine ES/iPS cells for animal use alternative:動物実験代替を目指した in vitro 肝組織モデル, 日本組織培養学会第87回大会, 東京(星陵会館), 2014年(口頭&ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 崎宏悟, 田川陽一:A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells 霊長類ES/iPS細胞用緩慢法凍結保存液の開発, 日本組織培養学会第87回大会, 東京(星陵会館), 2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 酒井宏司, 宮川眞一, 田川陽一:マウス門脈結紮による肝再生モデルにおけるIL-6依存性, 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 北海道(北海道大学)2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 守矢恒司, 玉井美保, 豊田優, 田川陽一:アセトアミノフエン誘導肝障害の in vivo および in vitro モデルによる解析, 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 北海道(北海道大学)2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 苅谷智行, 玉井美保, 相川博明, 田川陽一:ES細胞およびTS細胞を用いたマウス胚盤胞 in vitro モデルにおけるTLR応答, 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 北海道(北海道大学)2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 田川陽一:マウスES/iPS細胞由来 in vitro 肝組織モデルにおける肝代謝能, 第21回肝細胞研究会, 東京(東京医科歯科大学), 2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 守矢恒司, 玉井美保, 豊田優, 田川陽一:概日リズムを考慮したアセトアミノフエン誘導肝障害 in vivo モデルにおける急性期タンパク質による保護作用, 第21回肝細胞研究会, 東京(東京医科歯科大), 2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 藤山陽一, 田川陽一:流体デバイスを用いたマウスES細胞由来 in vitro 肝組織モデル, 第66回日本生物工学会大会, 北海道(札幌コンベンションセンター), 2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 竹下裕治, 張本乾一, 玉井美保, 南隆之, 荻博次, 長岡紀幸, 松川昭博, 吉田靖弘, 田川陽一:QCM-Dによる様々な細胞種の接着と伸展の観察, 第66回日本生物工学会大会, 北海道(札幌コンベンションセンター)2014年(ポスター) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Yoh-ichi TAGAWA, Miho Tamai, Sungho Ahn, Kenji Nakashima, Masahiko Ito, and Tetsuro Suzuki: Human iPS cell-derived in vitro model for Hepatitis B virus infection and proliferation, 2014 World Stem Cell Summit, San Antonio(Marriott Rivercenter)2014年(posters) |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Miho TAMAI, Yoichi Fujiyama, Yoh-ichi TAGAWA: High- and multi-functional in vitro liver model derived from mouse ES/iPS cells on micro-fluidic device, 2014 World Stem Cell Summit, San Antonio(Marriott Rivercenter)2014年 (poster) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Yoh-ichi Tagawa, Miho Tamai, Yoichi Fujiyama: Mouse ES cell-derived in vitro heart, liver, and pancreas model on microfluidic device, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Miho Tamai, Hiroshi Sakai, Shinichi Miyagawa, Eijiro Adachi, Yoh-ichi Tagawa: Characterization of Liver Organoid Tissues Composed of Murine Hepatic Progenitor Cells and Fibroblasts in Dense Collagen Fibrils, International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Yoh-ichi Tagawa and Miho Tama: Super-functional and high responsive in vitro liver model derived from mouse ES cells and its application to a liver chip, The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (2013) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Sungho Ahn and Yoh-ichi Tagawa: High Functional in vitro liver model consisting of human ES / iPS cell-derived hepatic lineage cells and endothelial networks, The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (2013) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Y. Tagawa: Super-functional and high responsive in vitro liver model from mouse ES/iPS cells (2013). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Y. Tagawa: Developmental Engineering, Regenerative Medicine Technology, and Synthetic Biology (2013). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 田川陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞のin vitro肝組織構築とその過程におけるミトコンドリア能力の獲得, 第85回日本生化学会大会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 守矢恒司, 豊田優, 田川陽一: アセトアミノフェン誘導肝障害のin vivoおよびin vitroモデルによる解析, 第85回日本生化学会大会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 内沢秀光, 白川和浩, 齋藤ゆかり, NILUBOL Chonnipa, 玉井美保, 田川陽一: シジミ由来オルニチン含有トリペプチドβ-Ala-Orn-Ornの肝保護効果, 日本生化学会大会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 内沢秀光, 白川和浩, 齋藤ゆかり, NILUBOL Chonnipa, 玉井美保, 田川陽一: シジミ由来トリペプチドβ-Ala-Orn-Ornの肝保護効果及びGABA-Orn-Ornの存在, 日本食品科学工学会東北支部大会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 今松伸介, 安成皓, 馬場憲三, 岡崎宏悟, 田川陽一: 操作を簡便化したマウスES細胞, 霊長類ES細胞凍結保存液の開発, 日本組織培養学会第85回大会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 田川陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞のin vitro肝組織構築とその過程におけるミトコンドリア能力の獲得, 第11回日本再生医療学会総会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 商怡, 玉井美保, 楊軍, 田川陽一: 天然多糖類の三次元の細胞足場を用いた肝前駆細胞分化誘導, 第11回日本再生医療学会総会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 安成皓, 田川陽一: ヒトES/iPS細胞由来in vitro肝臓モデルを用いた肝機能解析, 第11回日本再生医療学会総会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Yu Yue, 玉井美保, 田川陽一: マウス部分肝切除モデルにおけるアミノ酸の再生促進効果, 第11回日本再生医療学会総会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Chonnipa Nilubol, 玉井美保, 齋藤ゆかり, 内沢秀光, 田川陽一: シジミ由来非タンパク質構成アミノ酸からなるトリペプチドのin vitro肝組織やマウス固体における肝保護効果, 第11回日本再生医療学会総会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 相川博明, 田川陽一: マウス胚盤胞における自然免疫応答研究のためのin vitro評価系の確立, 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 田川陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞由来in vitro肝組織構築における細胞極性とミトコンドリア能力の獲得, 第19回肝細胞研究会 (2012). |

| | | | |
|-----|----|-------|--|
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Yu Yue, 玉井美保, 田川陽一: 肝障害と肝再生における一酸化窒素の役割, 第19回肝細胞研究会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | M. TAMAI, Y. TAGAWA: In vitro recapitulation of the hepatic metabolism using in vitro liver model from murine ES/iPS cells, 3rd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | K. Harimoto, Y. Yoshida, K. Yoshihara, N. Nagaoka, Bart Van MEERBEEK, Y. TAGAWA: Osteoblasts defeat fibroblasts on titanium surface during osteointegration steps, 3rd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 今松伸介, 安成皓, 馬場憲三, 岡崎宏悟, 田川陽一: 霊長類ES/iPS細胞用緩慢凍結保存液の開発, 日本生物工学会第64回大会 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 田川陽一: マウスES/iPS細胞を用いたin vitro肝モデルにおける細胞極性の構築, 「細胞を創る」研究会 5.0 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 相川博明, 田川陽一: 栄養外胚葉幹細胞株の樹立と胚盤胞のin vitroモデル構築の試み, 「細胞を創る」研究会5.0 (2012). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 安成皓, 三田村圭祐, 安達栄治郎, 田川陽一: ヒトES/iPS細胞を用いたin vitroヒト肝組織モデルの構築, 第34回日本分子生物学会年会 (2011). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Je-young Ryu, Y. Tagawa: Clonality of pancreatic acini and ducts in chimeric mice, 第34回日本分子生物学会年会 (2011). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 守矢恒司, 豊田優, 田川陽一: マウス個体を用いたアセトアミノフェン誘導肝障害モデル構築の試み: 概日リズムと肝毒性との相関性, 第34回日本分子生物学会年会 (2011). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 張本乾一, 長岡紀幸, 鈴木一臣, 吉田靖弘, 田川陽一: オッセオインデグレーションにおける線維芽細胞の影響, 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Y. Tagawa: In vitro model of liver organogenesis using embryonic stem cells, Taiwanese Society of Molecular Medicine (2011). |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | Y. Toyoda, K. Moriya, S. Kobayashi, M. Tamai, E. Adachi, Y. Tagawa: Acetaminophen-induced hepatotoxicity in liver tissue-like structure consisting of primary hepatocytes assembling around endothelial cell network, 第84回日本生化学会大会 (2011). |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | A01 計画研究 柘植謙爾班 |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | Tsuge K, Togashi T, Hasebe M, Tomita M, and Itaya M: Design and Construction of an Artificial Nonmevalonate Operon of Escherichia coli. Metabolic Engineering X(2014) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | Tsuge K: An attempt to construct an artificial operon for nonmevalonate pathway. The 13 th Asian Conference on Transcription (2014) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 富樫貴, 長谷部雅子, 富田勝, 板谷光泰: 大腸菌非メバロン酸経路の人工オペロン化, 日本農芸化学会2014年大会 (2014) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 富樫貴, 長谷部雅子, 富田勝, 板谷光泰: 大腸菌一次代謝経路遺伝子群の人工オペロン化 第37回日本分子生物学会 (2014) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 吉積毅, 富田勝, 板谷光泰, 柘植謙爾: 人工オペロン設計による植物特異的色素・アントシアニン合成の試み 第37回日本分子生物学会 (2014) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 富樫貴, 長谷部雅子, 富田勝, 板谷光泰: 一次代謝経路遺伝子群の人工オペロン化 2014年グラム陽性菌ゲノム機能会議 (2014) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 吉積毅, 富田勝, 板谷光泰, 柘植謙爾: 植物特異的色素・アントシアニン合成経路の移植をモデルとした人工オペロン設計手法確立の試み 2014年グラム陽性菌ゲノム機能会議 (2014) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | Tsuge, K: Construction of metabolic pathways that are comprised of multi-genes by operon strategy CBI学会(2013) |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 富樫貴, 長谷部雅子, 富田勝, 板谷光泰: 人工非メバロン酸経路オペロン構築の試み 第36回日本分子生物学会 (2013) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 吉積毅, 富田勝, 板谷光泰, 柘植謙爾: 人工オペロン設計手法の確立を目指して〜植物特異的色素・アントシアニン合成経路の移植〜 第36回日本分子生物学会 (2013) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 富樫貴, 長谷部雅子, 富田勝, 板谷光泰: 一次代謝経路の人工オペロンの構築「細胞を創る」研究会6.0 (2013年11月, 山形県鶴岡市) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 吉積毅, 富田勝, 板谷光泰, 柘植謙爾: アントシアニン合成人工オペロン設計に向けた網羅的酵素反応「細胞を創る」研究会6.0 (2013) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 吉積毅, 富田勝, 板谷光泰, 柘植謙爾: Toward the establishment of design rule for artificial operons; transplanting plant specific pigment anthocyanin biosynthetic pathway as a model CBI学会 (2013) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 富樫貴, 長谷部雅子, 富田勝, 板谷光泰: 枯草菌ゲノム工学: OGAB法による人工オペロンの構築 2013年グラム陽性菌ゲノム機能会議 (2013) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 吉積毅, 富田勝, 板谷光泰, 柘植謙爾: 人工オペロン設計手法の確立を目指して〜植物特異的色素・アントシアニン合成経路の移植〜 2013年 グラム陽性菌ゲノム機能会議 (2013) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 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 (2013). |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾: 人工オペロンによるボトムアップ型ゲノムデザイン, 第3回新規材料創製を目指した合成生物学シンポジウム (2012). |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 中東憲治, 富樫貴, 長谷部雅子, 高井幸, 長谷川美紀, 五十嵐康行, 杉山直幸, 石濱泰, 富田勝, 板谷光泰: ゲノムデザイン学: 人工解糖系オペロンの転写・翻訳解析, 日本農芸化学会大会2012 大会 (2012). |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | K. Tsuge, K. Nakahigashi, T. Togashi, M. Hasebe, Y. Takai, M. Hasegawa, Y. Igarashi, N. Sugiyama, M. Tomita, M. Itaya: Construction of glycolytic pathway by artificial operon toward genome design, The 12th Asian Conference on Transcription (ACT2012) (2012). |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 中東憲治, 富樫貴, 長谷部雅子, 高井幸, 長谷川美紀, 五十嵐康行, 杉山直幸, 佐藤尚美, 平山由明, 石濱泰, 曽我朋義, 富田勝, 板谷光泰: 人工オペロン構築を目指したオペロン内遺伝子発現バイアスの解析, 2012年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 (2012). |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 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 artificial glycolytic operon toward elucidation of operon rule, The 4th Foundations of Systems Biology in Engineering (FOSBE2012) (2012). |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | 柘植謙爾, 中東憲治, 富樫貴, 長谷部雅子, 高井幸, 長谷川美紀, 五十嵐康行, 杉山直幸, 佐藤尚美, 平山由明, 石濱泰, 曽我朋義, 富田勝, 板谷光泰: Investigation of arrangement problem of artificial operons in designed genome, 第35回日本分子生物学会年会 (2012). |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | T. Yoshizumi, K. Ikeda, T. Soga, M. Tomita, M. Itaya, K. Tsuge: Toward production of a plant pigment, anthocyanin in <i>E. coli</i> with synthetic biological approach, 第35回日本分子生物学会年会 (2012). |
| A01 | 公募 | 鈴木石根班 | A01 公募研究 鈴木石根班 |
| A01 | 公募 | 朝井計班 | A01 公募研究 朝井計班 |

| | | | |
|------------|-----------|--------------|---|
| A01 | 公募 | 朝井計班 | 朝井計, 高橋宏輝, 渡辺智, 吉川博文: 枯草菌を用いたシアノバクテリア RNAポリメラーゼの再構成系の構築, 第87回日本遺伝学会 (2015). |
| A01 | 公募 | 朝井計班 | 朝井計, 清水 葉子, 吉川 博文: 枯草菌の定常菌の細胞死におけるSigIシグマ因子の役割, 日本農芸化学会2015年度大会 (2015). |
| A01 | 公募 | 朝井計班 | 朝井計, 市島睦生: 枯草菌シグマ因子SigIの定常期における機能解析, 第85回日本遺伝学会 (2013). |
| A01 | 公募 | 朝井計班 | 朝井計, 市島睦生, 関口順一: 枯草菌SigI による定常期における細胞維持機構の解析, 日本農芸化学会2013年度大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 朝井計班 | 朝井計, 三輪明穂, 松本貴嗣, 吉川博文: 細菌のシグマ因子の多様性の意義解明への遺伝学的アプローチ, 第84回日本遺伝学会 (2012). |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | A01 公募研究 古田芳一班 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 小林一三: Methylome diversification through changes in the sequence specificity of DNA methyltransferases, 第87回日本細菌学会総会, P2-171, 東京, 2014年3月28日, ポスター発表 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 南波宏枝, 柴田朋子, 西山智明, 菅野純夫, 鈴木稜, 菅野純夫, 長谷部光泰, 小林一三: PacBio RSを用いたピロリ菌メチロームの種内比較解析, 第8回日本ゲノム微生物学会年会, 1P-019, 東京, 2014年3月8日, ポスター発表 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 南波宏枝, 柴田朋子, 西山智明, 重信秀治, 鈴木稜, 菅野純夫, 長谷部光泰, 小林一三: DNAメチル化系の認識配列変換によるメチローム多様化: 種内複数株でのメチローム解読からの証拠, 日本進化学会第15回大会 (2014) |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 南波宏枝, 柴田朋子, 西山智明, 重信秀治, 鈴木稜, 菅野純夫, 長谷部光泰, 小林一三: DNAメチル化系の認識配列変換によるメチローム多様化: 種内複数株でのメチローム解読からの証拠, 第36回日本分子生物学学会年会, 3P-0034, 兵庫, 2013年12月5日, ポスター発表 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 南波宏枝, 柴田朋子, 西山智明, 重信秀治, 鈴木稜, 菅野純夫, 長谷部光泰, 小林一三: 一分子リアルタイム(SMRT)シーケンシングによるメチローム解読と「エピジェネティクス駆動進化」仮説, 日本遺伝学会第85回大会, WS9-1, 神奈川, 2013年9月21日, 口頭発表 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 小林一三: DNA配列認識ドメインの非オゾンログス遺伝子間の移動, 第86回日本細菌学会総会 (2013). |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 小林一三: DNA配列認識ドメインの非オゾンログス遺伝子間の移動, 第7回日本ゲノム微生物学会年会 (2013). |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 小林一三: DNA配列認識ドメインの非オゾンログス遺伝子間の移動, 第35回日本分子生物学学会年会 (2012). |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | 古田芳一, 小林一三: ピロリ菌CagA発がんタンパクのDNA組換えによる進化, 第18回日本ヘリコバクター学会学術集会 (2012). |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | Y. Furuta, I. Kobayashi: Epigenome evolution-Two mechanisms in alteration of DNA sequence recognition domains in restriction-modification systems. Bacteria, Archaea & Phages, CSHL meeting (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | A01 公募研究 納富拓也班 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Notomi, I. Karasaki, Y. Okazaki, N. Okimoto, Y. Kato, K. Ohura, M. Noda, T. Nakamura, M. Suzuki: Insulinogenic sucrose+amino acids mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic effect on bone compared with non-insulinogenic fructose+amino acids mixture in growing rats, ASBMR 2014 Houston, Texas, USA, 2014 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | Y. Ezura, T. Hayata, T. Notomi, I. Sekiya, M. Noda: Preferentially expressed genes in synovium derived stromal cells include atypical genes not expressed highly in mouse synovium but in embryonic cartilages, ASBMR 2014 Houston, Texas, USA, 2014 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 納富拓也, 大浦清, 野田政樹: レジスタンス運動直後のインスリン高刺激性糖摂取は, インスリン低刺激性糖摂取に比べて骨量・骨強度を増大させる, 第56回 歯科基礎医学会, 福岡, 2014 |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 天野均, 納富拓也, 大浦清: スフィンゴシン1リン酸はin vitroの破骨細胞形成系において分化促進する, 第56回 歯科基礎医学会, 福岡, 2014 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 納富拓也, 唐崎郁晃, 岡崎雄一, 沖本信和, 加藤雄士, 大浦清, 野田政樹, 中村利孝, 鈴木正成: レジスタンス運動直後のインスリン高刺激性糖(砂糖) + アミノ酸溶液摂取は, インスリン低刺激性糖(果糖) + アミノ酸溶液摂取に比べて骨量・骨強度を増大させる, 第32回 日本骨代謝学会, 大阪, 2014 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 川崎真希理, 早田匡芳, 中元哲也, 納富拓也, 江面陽一, 野田政樹: 培養軟骨細胞ATDC5において, TGF-beta1は一次繊維毛構成遺伝子Ift88の発現を抑制し, 一次繊維毛を短縮させる, 第32回 日本骨代謝学会, 大阪, 2014 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Notomi, M. Kuno, Y. Ezura, M. Noda: Depolarizing Membrane Potential by PTH and VD3 Regulates RANKL-intracellular Transportation; A Novel Mechanism of PTH- and VD3-induced Osteoclastogenesis, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | Y. Ezura, T. Hayata, T. Notomi, I. Sekiya, M. Noda: Genes significantly highly expressed in synovium derived stromal cells than in bone marrow derived cells are conserved both in mouse and human, and may contribute to higher potential for chondrogenic differentiation, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | J. Shirakawa, Y. Ezura, M. Kawasaki, T. Yamada, S. Moriya, T. Notomi, T. Hayata, K. Omura, M. Noda: PTH Additively Enhances The Mechanical Stress-induced Proliferation of Calvarial Osteoblasts, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | M. Kawasaki, T. Nakamoto, T. Notomi, T. Hayata, Y. Ezura, M. Noda: TGF-β1 inhibits maturation of chondrogenic cell line ATDC5 by impeding canonical hedgehog signaling through direct down-regulation of ciliary component gene Ift88, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | S. Moriya, T. Hayata, J. Shirakawa, M. Kawasaki, T. Notomi, Y. Ezura, K. Kaneko, M. Noda: Tob1, a BMP repressor, is activated by parathyroid hormone in osteoblasts in vitro and in vivo and reciprocally regulates PTH signaling, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Yamada, T. Hayata, T. Notomi, Y. Ezura, K. Harada, M. Noda: β2Adrenergic Receptor agonist suppresses BMP-induced osteoblastic differentiation in MC3T3E-1 cells while epinephrine modulates it differently, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 江面陽一, 近藤久貴, 長尾雅史, Smriti Aryal, 鈴木允文, 早田匡芳, 納富拓也, 野田政樹: メカニカルストレスに応じた骨代謝制御に関わる分子機構の解明, 第36回 分子生物学会, 神戸, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 江面陽一, 早田匡芳, 中元哲也, 納富拓也, 関谷一郎, 宗田大, 野田政樹: 滑膜・半月板および靭帯由来間葉系幹細胞における選択的発現遺伝子の同定, 第31回 日本骨代謝学会, 神戸, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 渡辺千穂, 森田齊弘, 江面陽一, 中元哲也, 早田匡芳, 菊池千智, 李雪, 納富拓也, 山本雅, 野田政樹, 森山啓司: Cnot3はRANKmRNAの安定性制御を介し骨量維持を行う, 第11回 日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会, 東京, 2013 |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | T. Notomi, Y. Ezura, M. Noda: Lysosomal Calcium Channel, TPC2, Regulates Osteoclastogenesis via Generation of Intracellular Ca2+ Response and Subsequent NFATc1 Localization: A Novel Mechanism of Osteoclastic Ca2+ Signaling, ASBMR 2012 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | S. Moriya, T. Hayata, J. Shirakawa, T. Nakamoto, T. Notomi, Y. Ezura, K. Kaneko, M. Noda: Parathyroid Hormone Stimulates Tob1 Expression in Osteoblastic Cells in vitro and in vivo, ASBMR 2012 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | S. Jumpei, Y. Ezura, T. Notomi, T. Hayata, T. Nakamoto, S. Moriya, K. Omura, M. Noda: PTH Enhances Mechanical Stress-induced Osteoblast Proliferation in Calvarial Derived Osteoblasts via Up-regulation of CyclinD1 Expression, ASBMR 2012 (2012). |

| | | | |
|-----|----|-------------|---|
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | C. Watanabe, M. Morita, Y. Ezura, T. Nakamoto, T. Hayata, T. Notomi, K. Moriyama, T. Yamamoto, M. Noda: Cnot3 (Ccr4-not complex subunit3), a Regulator of mRNA Stability, Regulates Bone Mass and Gene Expression Related to Osteoclast Formation, ASBMR 2012 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | Y. Ezura, T. Hayata, T. Nakamoto, T. Notomi, T. Muneta, I. Sekiya, M. Noda: Identification of Signature Genes Selectively Expressed in Mesenchymal Stem Cells Derived from Synovial Joint Tissues, ASBMR 2012 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | Smriti Aryal A.C, K. Miyai, Y. Ezura, T. Hayata, T. Notomi, T. Nakamoto, T. Pawson, M. Noda: Nck, an Actin Cytoskeleton Modulator, Controls Expression of Osteocytic Genes, Phosphate Homeostasis by Regulating FGF 23 Expression in Bone and Maintains Bone Mass, ASBMR 2012 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | M. Kawasaki, T. Nakamoto, T. Notomi, T. Hayata, Y. Ezura, M. Noda: TGF- β 1 Decreases Iff88 Expression in Chondrocytic Cell Line ATDC5, ASBMR 2012 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 納富拓也, 江面陽一, 野田政樹: Two Pore Channel 2を介したリンソーム由来Ca ²⁺ による新たな破骨細胞分化制御機構, 第30回日本骨代謝学会 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 川崎真希理, 中元哲也, 納富拓也, 早田匡芳, 江面陽一, 野田政樹: 一次繊維毛タンパクBbs3は骨代謝に関与する, 第30回日本骨代謝学会 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 渡辺千穂, 江面陽一, 早田匡芳, 中元哲也, 納富拓也, 森山啓司, 野田政樹: 骨量制御の新転写後性分子機構: mRNA deadenylase であるCcr4-not complex構成因子Cnot3の欠失による高回転型の骨量減少の解析, 第30回日本骨代謝学会 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 守屋秀一, 早田匡芳, 中元哲也, 納富拓也, 江面陽一, 金子和夫, 野田政樹: 骨芽細胞におけるGタンパク質共役型受容体 (GPCR) によるRANKL制御の検討, 第30回日本骨代謝学会 (2012). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | 江面陽一, 早田匡芳, 中元哲也, 納富拓也, 関谷一郎, 宗田大, 野田政樹: ヒト骨髄および滑膜由来間葉系細胞において異なる CpGメチル化を示す遺伝子群の探索と骨軟骨細胞分化の制御に関わる転写因子群の抽出: RUNX2およびRUNX3, D+X5, ALX4 遺伝子, 第30回日本骨代謝学会 (2012). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | A01 公募研究 野村渉班 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Efficient conversion of genomic promoter region by genome engineering systems, Pacificchem 2015 (2015). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Simultaneous digestion by site-specific nucleases for efficient gene deletion: study of hTERT promoter function, Conference on Transposition and Genome Engineering (2015). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Genome deletion by ZFN and CRISPR-Cas targeting promoter region for analysis of hTERT function, 細胞を創る会8.0 (2015). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: 配列特異的分割型DNAメチル化酵素の作用機構解析, 第59回日本薬学会関東支部大会 (2015). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: 人工転写因子の協奏的な働きによる遺伝子発現調節機構の構築, 第59回日本薬学会関東支部大会 (2015). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: ゲノム編集を用いた複数箇所切断によるプロモーター領域の配列変換, 日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会 (2015). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: ゲノム編集法による効率的な配列欠損反応, 「細胞を創る」研究会7.0 (2014). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: プロモーター領域を標的としたDNA二重鎖切断による配列欠損反応の解析, 第4回ゲノム編集研究会 (2014). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: ゲノム編集法による複数箇所同時切断が示す配列欠損反応効率の向上, 第8回バイオ関連化学シンポジウム (2014). |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Enhanced Gene Disruption at Specific Promoter Region By Simultaneous Digestion of ZFN or CRISPR/Cas System, The Synthetic Biology: Engineering, Evolution & Design (SEED) conference 2014 (2014). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Enhanced Gene Disruption by Simultaneous Digestion of ZFN or CRISPR/Cas System at hTERT Promoter Region, FASEB SRC "Genome Engineering Cutting-Edge Research and Applications (2014). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Creation of DNA Modification Enzymes Based on Sequence-Specificity of Zinc Finger Domains, 第6回 CBIR 若手インスパイアシンポジウム(2013). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: テロメラーゼプロモーター領域を標的としたゲノム編集, 細胞を創る会6.0 (2013). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Creation of Zinc Finger Nucleases Targeting Telomerase Promoter Region, 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium (2013). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: DNA Modification Enzymes Utilizing Sequence-Specificity of Zinc Finger Domains, CBI学会2013年大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Effects of Zinc Finger Nucleases Targeting Telomerase Promoter Region, The 2nd Annual Conference of the International Chemical Biology Society (2013). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: ジンクフィンガーヌクレアーゼによるテロメア活性の制御, 第7回バイオ関連化学シンポジウム(2013). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Development of zinc finger enzymes for genome engineering, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry 2012 (2012). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: Quantitative analysis of sequence-specific reactions by artificial DNA recombinase, 第49回ペプチド討論会 (2012). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Development of zinc finger nucleases targeting Epstein-Barr virus genome for suppression of viral production in B cells, FASEB SRC, Genome Engineering: Research & Applications (2012). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | Nomura W, et al: Studies of designer zinc finger enzymes and applications for genome editing and modification, The 26th Annual Symposium if the Protein Society (2012). |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村 渉, 他: ジンクフィンガー融合型酵素によるゲノム編集法の開発, 日本ケミカルバイオロジー学会第7回年会 (2012). |
| A01 | 公募 | 今西未来班 | A01 公募研究 今西未来班 |
| A01 | 公募 | 今西未来班 | 今西未来, 中村篤史, 山本和俊, 土居雅夫, 岡村均, 二木史朗: 人工DNA結合蛋白質による細胞分子時計の操作, 「細胞を創る」研究会5.0 (2012). |
| A01 | 公募 | 今西未来班 | M. Imanishi, A. Nakamura, M. Doi, H. Okamura, S. Futaki: Control of cellular circadian phase by an artificial zinc-finger transcription factor, ISNAC2012 第39回国際核酸化学シンポジウム(2012). |
| A01 | 公募 | 今西未来班 | M. Imanishi, A. Nakamura, M. Doi, H. Okamura, S. Futaki: Resetting the cellular circadian clock by an artificial zinc-finger transcription factor, FASEB SCIENCE RESEARCH CONFERENCES Genome Engineering: Research & Applications (2012). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | A01 公募研究 上平正道班 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | Jane Tonello, 菌田 裕人, 山元 秀晃, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道: Generation of genetically modified hepatoma cells with inducible high liver functions, 化学工学会第80年会 (2015). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 今西 傑, 下村 卓矢, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道: Cre組込み型レンチウイルスベクターによる特定ゲノム部位への遺伝子導入, 化学工学会第80年会 (2015). |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| A01 | 公募 | 上平正道班 | Akihiko Ono, Akira Ito, Taiga Suzuki, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira: DNA damage-induced gene expression system for living cell sensors, The 27th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (IAACT2014) (2014). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 佐藤智詠, 井藤彰, 河邊佳典, 上平正道: 低酸素応答型細胞センサーの開発, 化学工学会第46回秋季大会 (2014). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 今西 傑, 下村卓矢, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道: Cre組込み型レトロウイルスベクターによる配列特異的遺伝子導入, 第66回日本生物工学会大会 (2014). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 小野 章彦, 井藤彰, 鈴木大雅, 山口 雅紀, 河邊佳典, 上平正道: DNAダメージ誘導型遺伝子発現システムを用いた細胞センサーの開発, 第66回日本生物工学会大会 (2014). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 今西 傑, 下村卓矢, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道: Cre組込み型ハイブリッドレトロウイルスベクターの作製, 第51回化学関連支部合同九州大会 (2014). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 佐藤智詠, 井藤彰, 河邊佳典, 上平正道: 低酸素誘導型遺伝子発現システムの開発, 化学工学会第79年会 (2014). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 河邊佳典, 小畑 玲奈, 矢野 敬二郎, 松田 直樹, 山田 紀子, 井藤彰, 上平正道: 卵管特異的にTGF- β を発現する遺伝子導入ニワトリの作製, 化学工学会第79年会 (2014). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | Takuya Shimomura, Shuohao Huang, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira: Site-specific cellular modification by Cre-incorporating integrase-defective retroviral vectors, CBI学会2013年大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | Masaki Yamaguchi, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira: A magnetically triggered gene expression system mediated by heating of nanoparticles, CBI学会2013年大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 山口 雅紀, 井藤彰, 河邊佳典, 上平正道: 磁場誘導型遺伝子大量発現システムを用いた遺伝子治療法の開発, 第65回日本生物工学会大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 三分一 孝則, 山元 秀晃, Tonello Jane, 河邊 佳典, 井藤彰, 上平正道: 高肝機能誘導型遺伝子改変ヘパトマ細胞における遺伝子発現解析, 化学工学会第45回秋季大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 鈴木大雅, 井藤彰, 山口 雅紀, 河邊佳典, 上平正道: DNAダメージ誘導型遺伝子発現システムを用いた細胞センサーの開発, 化学工学会第45回秋季大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | Jane M Tonello, Hideaki Yamamoto, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira: Development of genetically modified hepatoma cells with inducible liver functions, 第50回化学関連支部合同九州大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 矢野 敬二郎, 黒原 健志, 原田 翔太, 河邊 佳典, 井藤彰, 上平正道: 遺伝子導入ニワトリにおける卵管特異的導入遺伝子発現, 第50回化学関連支部合同九州大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 藪田 裕人, 山元 秀晃, 三分一 孝則, 河邊 佳典, 井藤彰, 上平正道: 高肝機能化ヘパトマ細胞のための遺伝子発現制御システムの開発, 第50回化学関連支部合同九州大会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 山口 雅紀, 井藤彰, 河邊佳典, 上平正道: ハイブリッドプロモーターシステムを用いた磁場誘導型がん温熱遺伝子治療法の開発, 化学工学会第78年会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 下村卓矢, 黄碩豪, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道: 部位特異的遺伝子導入のためのCre組込みレトロウイルスベクターの作製, 化学工学会第78年会 (2013). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 鈴木大雅, 山口 雅紀, 井藤彰, 河邊佳典, 上平正道: ハイブリッドプロモーターシステムを用いたストレス応答型細胞センサーの開発, 第49回化学関連支部合同九州大会 (2012). |

| | | | |
|-----|----|--------|---|
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 下村卓矢, 黄碩豪, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道: IN欠損型レンチウイルスベクターを用いた動物細胞染色体上への配列特異的遺伝子導入, 第49回化学関連支部合同九州大会 (2012). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 下村 矢, 黄碩豪, 稻生崇規, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道: Cre組込型レンチウイルスベクターによるCHO細胞への部位特異的遺伝子導入, 化学工学会第44回秋季大会 (2012). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | Masaki Yamaguchi, Akira Ito, Noriaki Okamoto, Yoshinori Kamihira, Masamichi Kamihira: A heat-inducible gene expression system for gene therapy. World Academy of Science, Engineering and Technology 2012 (WASET 2012-Paris) (2012). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | 河邊佳典, 黄碩豪, 下村卓矢, 井藤彰, 上平正道: インテグラーゼ欠損型ガンマレトロウイルスおよびレンチウイルスベクターを用いた組換え酵素による配列特異的遺伝子導入法の開発, 第35回日本分子生物学学会年会 (2012). |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | Masaki Yamaguchi, Akira Ito, Noriaki Okamoto, Yoshinori Kamihira, Masamichi Kamihira: Heat-inducible gene expression system using hybrid HSP70 promoter for hyperthermia gene therapy, The 11th International Congress of Hyperthermia Oncology & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine (ICHO & JCTM 2012) (2010). |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | A01 公募研究 末次正幸班 |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | 松本健佑, 末次正幸: 大腸菌における細胞周期依存の転写活性変動のリアルタイム観測系を用いた解析, 第37回分子生物学学会年会(2014) |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | 松本健佑, 末次正幸: 大腸菌における細胞周期依存性の転写活性変動のリアルタイム観測, 第11回 21世紀大腸菌研究会(2014) |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | 末次正幸, 小林 寛子, 松本 健佑, 片山 勉: 再構成アプローチによる大腸菌染色体複製周期の解析. 日本農芸化学会(2014) |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | 末次正幸, 小林 寛子, 藤光 和之, 片山 勉: 大腸菌染色体「複製サイクル」再構成にむけた試験管内反応系. 第36回日本分子生物学学会年会(2013) |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | Suetsugu M, Kobayashi H. and Katayama T: An approach to reconstruction of cell cycle oscillation of DnaA activity for replication initiation and transcription regulation. CBI学会(2013) |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | 末次正幸, 片山勉: 精製蛋白質によって再構成される大腸菌染色体の複製サイクル, 第10回21世紀大腸菌研究会(2013) |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | A01 公募研究 宮崎健太郎班 |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | 北原圭, 宮崎健太郎: 16SリボソームRNAのヘリックス41はリボヌクレアーゼIの特異的インヒビターである, 第9回 21世紀大腸菌研究会 (2012). |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | 城俊徳, 矢追克郎, 宮崎健太郎, 若木高善, 伏信進矢: メタゲノム由来GHI β -グルコシダーゼTd-2F2のグルコース阻害耐性の構造基盤, 日本応用糖質科学会平成24年度大会 (2012). |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | 佃美雪, 宮崎健太郎: 16S rRNAの置換変異による大腸菌宿主デザイン, 細胞を創る」研究会5.0 (2012). |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | 佐藤允治, 宮崎健太郎: 系統ネットワーク法で見る腸内細菌目16S rRNAの網状進化, 第2回リボソームミーティング (2012). |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | 佃美雪, 宮崎健太郎: 16S rRNA置換変異による大腸菌宿主改良, 第2回リボソームミーティング (2012). |
| A01 | 公募 | 磯村彰宏 | A01 公募研究 磯村彰宏 |
| A01 | 公募 | 磯村彰宏 | Akihiro Isomura, Fumiko Ogushi, Hiroshi Kori, Ryoichiro Kageyama: Controlling Natural Genetic Oscillators by Light, The 2015 Winter q-bio meeting (2015). |
| A01 | 公募 | 磯村彰宏 | 磯村 彰宏: 光遺伝学による短周期遺伝子発現リズムの引き込み同調, 第37回 日本分子生物学学会年会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | B01 計画研究 木賀大介班 |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Ohuchi S, Sagawa F, and Inoue T: Purification of a triangular RNA-protein complex fully loaded with an RNA-binding protein by sequential affinity elimination. The 41st Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Nov. 5, Fukuoka (2015). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 清岡隆司, 松村茂祥, 井川善也: 二分子スプライシング・リボザイムを基盤としたシグナル増幅型RNAデバイス, 日本化学会 第95春季年会 (2015). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 平田悠介, 井川善也, 松村茂祥: キメラ二量化リボザイムによるクロス・スプライシング・システムの構築, 日本化学会 第95春季年会 (2015). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 藤田 祥彦, 佐川 文彦, 大野 博久, 井上 丹: "RNP ナノ構造による細胞表面レセプターの信号制御" 京都 分子生物学会(2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 田中貴大, 古田弘幸, 井川善也: RNA 2分子間の同時編集制御を目指したTetrahymenaグループリボザイム2量体の構築, 第16回日本RNA学会年会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 西村圭一郎, 柿澤仁史, 古田弘幸, 井川善也: c-di-GMP応答型リボスイッチの発現プラットフォームの機能解析, 第8回バイオ関連化学シンポジウム (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 藤田大介, 上原成海, 松村茂祥, 古田弘幸, 井川 善也: グループIイントロンをモジュール単位とした一次元, 二次元RNAナノ構造の構築 第8回バイオ関連化学シンポジウム (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | T. Tanaka, F. Hiroyuki, Y. Ikawa: Self-dimerizing group I ribozymes as a new class of modular units for cooperative editing between two RNA strands, The 20th International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | T. Tanaka, H. Furuta, Y. Ikawa: Construction of splicing control module between two intron RNA strands by dimerization of the Tetrahymena group I ribozyme, The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | N. Uehara, D. Fujita, S. Matsumura, H. Furuta, Y. Ikawa: Catalytic ID & 2D-supramolecular RNA nanostructures formed by self-assembly of engineered group I ribozymes, The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 柿澤仁史, 西村圭一郎, 松村茂祥, 古田弘幸, 井川善也: コレラ菌由来c-di-GMP応答型リボスイッチの機能構造相関解析, 日化近畿支部 北陸地区研究発表会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 藤田大介, 上原成海, 松村茂祥, 古田弘幸, 井川善也: グループ I イントロンを構成単位としたID・2DRNAナノ構造体の構築と活性発現の制御, 日化近畿支部 北陸地区研究発表会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 平田 悠介, 富永 雄人, 古田 弘幸, 井川 善也: キメラ二量化リボザイムによる交差型スプライシング・システムの構築, 日化近畿支部 北陸地区研究発表会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 田中貴大, 古田弘幸, 井川善也: Tetrahymenaグループリボザイム2量化による2つのイントロンRNA間のスプライシング制御モジュールの構築, 日化近畿支部 北陸地区研究発表会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 柿澤仁史, 西村圭一郎, 古田弘幸, 井川善也: c-di-GMP応答型リボスイッチの発現プラットフォームの機能及び構造解析, 第37回日本分子生物学会年会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 田中貴大, 古田弘幸, 井川善也: Tetrahymenaグループリボザイム2量化による2つのイントロンRNA間のスプライシング制御モジュールの構築, 第37回日本分子生物学会年会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | D. Kiga: "19 and 21 Amino Acid Codes", Gordon Research conference "Origins of Life"(2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木賀大介, 石松愛, 畑敬士: 「合成生物学による遺伝子大量発現によって双安定システムに多分化能を与える」, 日本農芸化学会 2013年度大会 (2014). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 網蔵和晃, 木賀大介: 「原始タンパク質を創造するための単純化異伝暗号表」, 生命の起原および進化学会第38回学術講演会 (2013). |

| | | | |
|-----|----|-------------------|--|
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木賀大介:「合成生物学による『生命』の創製」, 日本ヒト細胞学会(2013). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | D. Kiga: Synthetic/constructive experiment of life and evolution of genome, The first ELSI symposium (2013). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木賀大介:生命・細胞をつくる, 武田シンポジウムついで理解 細胞から宇宙まで(2013). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 榎田俊一, 井上丹, 齊藤博英:三次元分子デザイン:蛋白質に応答する人工RNAデバイスの構築, 分子ロボティクス研究会6月定例会(2013). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木川隆則:生命分子構造動態研究の発展に資する標識技術, 第46回よこはまNMR構造生物学研究会ワークショップ(2013). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 石松愛, 畑敬士, 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). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 河原晃大, 木賀大介:単純化遺伝暗号を活用したタンパク質修飾法の開発, 日本化学会第6回バイオ関連化学シンポジウム(2012). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木川隆則:理研横浜NMR施設と立体構造解析パイプライン, 日本薬学会 第132年会(2012). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木川隆則:スパースなデータを活用した生命分子NMR計測の高度化, 第4回圧縮センシングとその周辺(2012). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 野地博行, 木賀大介:細胞を創ることを目指した遺伝子ネットワークの構成的研究とその基盤技術, 第33回日本分子生物学会年会(2011). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木賀大介:つくる核酸, 「細胞を創る」研究会4.0(2011). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Takanori Kigawa: The Use of the Improved E. coli Cell-Free Protein Synthesis for Structural Biology, PEGS2011, (2011). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木川隆則:核磁気共鳴(NMR)法における情報処理, 圧縮センシングとその周辺(2)(2011). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | 木川隆則:理研横浜NMR施設の現状とこれから, 大阪大学蛋白質研究所セミナー(2011). |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | Takanori Kigawa: Cell-Free Protein Synthesis for Biomolecular NMR, 4th Asia-Pacific NMR Symposium (2011). |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | B01 計画研究 Yannick Rondelez班 |
| B01 | 計画 | 陶山明班 | B01 計画研究 陶山明班 |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | B01 公募研究 小川敦司班 |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | 小川敦司:Hybridization switch-freeの真核系ONリボスイッチを創る, 第8回バイオ関連化学シンポジウム(2014). |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | 中平洋一, 小川敦司, 浅野宏幸, 小山時隆, 戸澤譲:人工リボスイッチを基盤としたラン藻の新規遺伝子発現制御技術, 第55回日本植物生理学会年会(2014). |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | 中平洋一, 小川敦司, 浅野宏幸, 小山時隆, 戸澤譲:人工リボスイッチを用いたラン藻のための新規遺伝子発現制御技術, 第36回日本分子生物学会年会(2013). |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | Y. Nakahira, A. Ogawa, H. Asano, T. Oyama, Y. Tozawa: Theophylline-dependent Riboswitch as a Useful Genetic Tool for Synthetic Biology in Cyanobacteria, CBI Annual Meeting 2013 (2013). |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | Y. Doi, A. Ogawa: t-Riboregulator: Regulation of Nonsense Suppression by Modulating 3' Processing of Suppressor tRNA, CBI Annual Meeting 2013 (2013). |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | Y. Nakahira, A. Ogawa, H. Asano, T. Oyama, Y. Tozawa: Theophylline-dependent synthetic riboswitch is a useful genetic tool for strict regulation of protein expression in cyanobacteria, Protein Island Matsuyama International Symposium 2013 (2013). |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | 中平洋一, 小川敦司, 浅野宏幸, 小山時隆, 戸澤譲:ラン藻のための新規遺伝子発現制御技術の開発, 第54回日本植物生理学会年会(2013). |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | 小川敦司:IRES依存翻訳を利用した真核系リボスイッチの合理設計, 第7回無細胞生命科学研究会(2013). |

| | | | |
|------------|-----------|-------------|---|
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | A. Ogawa: Rational Design of IRES-Based Eukaryotic ON-Riboswitches, Protein Island Matsuyama International Symposium 2012 (2012). |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | 小川敦司:合成生物学基盤技術を指向した人工リボスイッチの開発, 新世代の生物有機化学研究会2012 (2012). |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | B01 公募研究 車愈激班 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Takuya Ueda: Cell-free synthesis of Sec translocon on liposome membrane, Biophysical Society 59th Annual Meeting (Feb. 7-11, 2015), Maryland, USA. |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | Yutetsu Kuruma: Construction of artificial cell membrane for the study of the origin and evolution of life, The 3rd ELSI (Earth-Life Science Institute) International Symposium (Jan. 13-15, 2015), Tokyo, Japan. |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 松林英明, 車ゆうてつ, 西山賢一, 上田卓也: PURE systemによる膜タンパク質合成システムの構築, 第9回無細胞生命科学研究会, 大阪 (2014年12月) |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 古里匠, 松林英明, 車ゆうてつ, 上田卓也: 無細胞タンパク質合成系を用いた細胞分裂系の再構成, 第9回無細胞生命科学研究会, 大阪 (2014年12月) |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | Yutetsu Kuruma: Fatty Acid Synthesis Inside Giant Unilamellar Vesicle - Toward the construction of self-reproducing protocell -, 領域横断研究会「細胞力学と細胞運動の協奏」, Fukuoka, December 2014 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 松林英明, 車愈激, 上田卓也: 無細胞翻訳系による SecYEG トランスロコンの合成, 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014年11月 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 松林英明, 車愈激, 上田卓也: Sec transloconのin vitro再構成, 「細胞を創る」研究会7.0, 東京, 2014年11月 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 古里匠, 松林英明, 車ゆうてつ, 上田卓也: 無細胞タンパク質合成系を用いた細胞分裂系の再構成, 「細胞を創る」研究会7.0, 東京, 2014年11月 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 松林英明, 車愈激, 上田卓也: 無細胞翻訳系による SecYEG トランスロコンの合成, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌 (2014年9月) |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 車愈激: 自己複製可能な人工細胞の構築に向けて, 第2回「ゆらぎと構造の協奏」領域研究会, 2014年8月29日-31日, 北海道大学工学部オーブンホール |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 車愈激: 生命の誕生に必須な膜の形成—ポトムアップとトップダウンアプローチ—, 日本進化学会 第16回大阪大会, 2014年8月21日~8月24日, 高槻現代劇場 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | Yutetsu Kuruma: In Vitro Reconstruction of Functional Membrane, ALIFE 14, New York, July 2014 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Takuya Ueda: In Vitro Synthesis of Sec Translocon from DNA, Open Questions of the Origin of Life 2014, Kyoto, July 2014 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | Yutetsu Kuruma: Creation a possible living organism that might exist in an early earth condition, ORIGINS2014, Nara, July 2014 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 車愈激: 人工細胞の構築に向けた生体膜機能の再構築, 第11回21世紀大腸菌研究会, 2014年6月5日-6日, 岩手県盛岡市 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 松林英明, 車愈激, 上田卓也: 無細胞翻訳系による SecYEG トランスロコンの合成, 2014年6月5日-6日, 岩手県盛岡市 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | Yutetsu Kuruma: Autonomous construction of synthetic cell membrane, 12th European Conference on Artificial Life, Taormina, Italy, September 2-6 2013 |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | Construction of membrane protein complexes by cell-free system, 第35回日本分子生物学会年会 (2012). |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 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). |
| B01 | 公募 | 車愈激班 | 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 | 野澤彰班 | B01 公募研究 野澤彰班 |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | 野澤彰, 戸澤讓: Adenine nucleotide transporter ANTIを膜上に配置したプロテオリポソームにおける内封ルシンプラセ活性の外 部からの制御, 日本農芸化学会年会 (2014). |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | 野澤彰, 戸澤讓: 脂質組成と再構成ミトコンドリアキャリア蛋白質の膜輸送活性との関係, 日本農芸化学会中四国支部第36回講演 会 (2013). |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | 岡田有右, 野澤彰, 藤本竜治, 戸澤讓: 酵母ミトコンドリアキャリア蛋白質の無細胞合成および膜輸送活性の再構成, 日本農芸化学 会年会 (2013). |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | 岡田有右, 野澤彰, 戸澤讓: 酵母ミトコンドリアキャリア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). |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | 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 Sciences (2012). |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | B01 公募研究 清尾康志班 |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | 竹下玲央 大野健太郎 正木慶昭 関根光雄 清尾康志 DNA-タンパク質相互作用の光制御をめざした光ケージされたデオキシ シユードウリジンを含む核酸の合成および性質 日本化学会第96春季年会 (2016) |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | Kentaro Ohno, Leo Takeshita, Yoshihiro Iijima, Takashi Kanamori, Yoshiaki Sekine, Kohji Seio. Synthesis of oligonucleotides containing photo-caged 2'-deoxypseudo |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | uridine for the regulation of DNA-protein interaction. The 42th International symposium on nucleic acids chemistry (2015) |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | 大野健太郎 正木慶昭 金森功史 関根光雄 清尾康志 光ケージドヌクレオチドの合成と性質 (2015)第17回日本 RNA学会年会 |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | 飯島良紘, 竹下玲央, 大野健太郎, 金森功史, 正木慶昭, 関根光雄, 清尾康志: 光分解性保護基を有するデオキシシユードウリジ ンの合成と性質 第95日本化学会春季年会(2015) |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | 大野百合恵, 大野健太郎, 金森功史, 正木慶昭, 大窪章寛, 関根光雄, 清尾康志: 光分解性保護基を有する核酸の合成および性 質評価 第16回日本RNA学会(2014) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | B01 公募研究 西山賢一班 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 西川華子, 佐々木優, 西山賢一: F0F1-ATPase cサブユニット (F0-c) の膜挿入の再構成、デザイン生命工学研究会第2回大会 神 戸大学統合研究拠点 (兵庫県・神戸市) (2017) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 沢里克宏, 飯村直紀, 田村康, 西山賢一: タンパク質膜挿入反応に関する糖脂質酵素MPIase (Membrane Protein Integrase) の 生物種間における普遍性の検証、デザイン生命工学研究会第2回大会 神戸大学統合研究拠点 (兵庫県・神戸市) (2017) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 松村健児, 山田美和, 西山賢一, 下飯仁, 磯部公安: Ochrobactrum sp. AIU 033由来アルコール酸化酵素の高機能化、日本農芸 化学会2017年度大会 京都女子大学 (京都市) (2017) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 池田汐里, 藤川紘樹, 島本啓子, 西山賢一: 化学合成標品を用いたタンパク質膜挿入に関する糖脂質酵素MPIaseの構造と機 能の解析、日本農芸化学会2017年度大会 京都女子大学 (京都市) (2017) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 藤川紘樹, 西山賢一, 島本啓子: 大腸菌膜タンパク質の膜挿入機構解明に向けた糖脂質MPIase部分構造の合成、日本農芸化学 会2017年度大会 京都女子大学 (京都市) (2017) |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Katsuhiko Sawasato, Ryo Sato, Michael Moser, Yasushi Tamura, Toshiya Endo, and Ken-ichi Nishiyama: In vivo analysis of MPIase (Membrane Protein Integrase) involved in protein integration and translocation, Conference on Protein Secretion in Bacteria, Zing Conferences, Florida (USA) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 車 愈 徹、藤 見 麻 衣、笠 間 健 嗣、松 林 英 明、上 田 卓 也、西 山 賢 一: 無 細 胞 系 を 基 盤 と し た 人 工 細 胞 構 築 の た め の 脂 質 合 成 代 謝 系 の 実 装、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 鈴 木 苑 実、沢 里 克 宏、西 山 賢 一: タ ン パ ク 質 膜 挿 入・膜 透 過 に 関 与 す る 糖 脂 質 酵 素 MPIase 発 現 誘 導 機 構 の 解 析、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 中 村 匠 汰、斎 藤 大 明、西 山 賢 一: 生 体 膜 に お け る 自 発 的 タ ン パ ク 質 膜 挿 入 抑 制 機 構 の 解 明、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 沢 里 克 宏、佐 藤 諒、Michael Moser、田 村 康、遠 藤 斗 志 也、西 山 賢 一: タ ン パ ク 質 膜 挿 入 反 応・膜 透 過 反 応 に 関 与 す る 糖 脂 質 MPIase (Membrane Protein Integrase) の in vivo に お け る 機 能 解 析、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 佐 々 木 優、松 林 英 明、車 愈 徹、上 田 卓 也、西 山 賢 一: 再 構 成 系 を 用 いた タ ン パ ク 質 膜 挿 入 機 構 の 解 明、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 佐 藤 諒、澤 里 克 宏、藤 川 絃 樹、山 口 敏 幸、Moser Michael、島 本 啓 子、西 山 賢 一: タ ン パ ク 質 膜 挿 入 に 必 須 の 糖 脂 質 酵 素 MPIase 生 合 成 に 関 す る 研 究、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 佐 々 木 優、松 林 英 明、車 愈 徹、上 田 卓 也、西 山 賢 一: 再 構 成 系 を 用 いた タ ン パ ク 質 膜 挿 入 機 構 の 解 明、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 佐 藤 諒、澤 里 克 宏、藤 川 絃 樹、山 口 敏 幸、Moser Michael、島 本 啓 子、西 山 賢 一: タ ン パ ク 質 膜 挿 入 に 必 須 の 糖 脂 質 酵 素 MPIase 生 合 成 に 関 す る 研 究、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 西 川 華 子、西 山 賢 一: F0F1-ATPase c サ ブ ユ ニ ッ ト (F0-c) の 膜 挿 入 の 再 構 成、第 11 回 無 細 胞 生 命 学 研 究 会 ゆ こ た ん の 森 (岩 手 県・雫 石 町) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 鈴 木 苑 実、沢 里 克 宏、西 山 賢 一: タ ン パ ク 質 膜 挿 入 阻 害 に よ る 糖 脂 質 酵 素 MPIase 発 現 誘 導 機 構 の 解 析、第 89 回 日 本 生 化 学 会 大 会 仙 台 国 際 セ ン タ ー (宮 城 県・仙 台 市) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 西 川 華 子、西 山 賢 一: F0F1-ATPase c サ ブ ユ ニ ッ ト (F0-c) の 膜 挿 入 機 構 の 解 明、第 13 回 21 世 紀 大 腸 菌 研 究 会 グ リ ー ン ピ ー 南 阿 蘇 (熊 本 県・南 阿 蘇 村) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 沢 里 克 宏、Michael Moser、佐 藤 諒、田 村 康、遠 藤 斗 志 也、西 山 賢 一: タ ン パ ク 質 膜 挿 入 反 応 に 関 与 す る 糖 脂 質 酵 素 MPIase (Membrane Protein Integrase) の in vivo に お け る 機 能 解 析、第 13 回 21 世 紀 大 腸 菌 研 究 会 グ リ ー ン ピ ー 南 阿 蘇 村 (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 志 水 優 子、佐 々 木 優、Ross Dalbey、西 山 賢 一: 糖 脂 質 酵 素 MPIase に 依 存 す る タ ン パ ク 質 膜 挿 入 反 応 は YidC に よ り 促 進 さ れ る、日 本 農 芸 化 学 会 2016 年 度 大 会 (札 幌) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 沢 里 克 宏、佐 藤 諒、西 山 賢 一: タ ン パ ク 質 膜 挿 入 に 関 与 す る 糖 脂 質 酵 素 MPIase の in vivo に お け る 機 能 解 析、第 1 回 ギ ン 生 命 工 学 研 究 会 (横 浜) (2016) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Yuta Endo, Toshiyuki Yamaguchi, Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Takuya Ueda, Keiko Shimamoto, Ken-ichi Nishiyama: Characterization of an MPIase homologue in plants that catalyses membrane protein integration, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii) (2015) |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Masaru Sasaki, Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Takuya Ueda, Ken-ichi Nishiyama: Reconstitution of glycolipoyzome MPIase-dependent protein integration into membrane, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Katsuhiko Sawasato, Michael Moser, Ryo Sato, Ken-ichi Nishiyama: Glycolipoyzome MPIase functions as membrane protein integrase in vivo, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Ryo Sato, Keiko Shimamoto, Toshiyuki Yamaguchi, Michael Moser, Ken-ichi Nishiyama: Identification of biosynthetic enzymes for MPIase, a glycolipoyzome essential for membrane protein integration, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Ken-ichi Nishiyama, Michael Moser, Shoichi Kusumoto, Keiko Shimamoto: MPIase (membrane protein integrase), a glycolipoyzome involved in protein integration into and protein translocation across the cytoplasmic membrane of E. coli, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 沢里 克宏, Michael Moser, 佐藤 諒, 田村 康, 遠藤 斗志也, 西山 賢一: タンパク質膜挿入・膜透過に関与する糖脂質酵素MPIaseのin vivoにおける機能解析, 第38回分子生物学年会・第88回生化学会大会合同大会BMB2015 (神戸) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 遠藤 佑太, 松林 英明, 山口 敏幸, 車 ゆうてつ, 上田 卓也, 島本 啓子, 西山 賢一: タンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素MPIaseの植物ホモログの精製, 第38回分子生物学年会・第88回生化学会大会合同大会BMB2015 (神戸) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 佐藤 諒, 澤里 克宏, 山口 敏幸, Moser Michael, 島本 啓子, 西山 賢一: タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素MPIaseの生合成因子の同定, 第10回 無細胞生命科学研究会 (横浜) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 沢里 克宏, Michael Moser, 佐藤 諒, 田村 康, 遠藤 斗志也, 西山 賢一: 大腸菌タンパク質膜挿入因子MPIaseのin vivoにおける役割, 第12回21世紀大腸菌研究会 (大津) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 佐々木 優, 松林 英明, 車 ゆうてつ, 上田 卓也, 西山 賢一: 再構成によるタンパク質膜挿入における必須因子の決定, 第12回21世紀大腸菌研究会 (大津) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 佐藤 諒, 山口 敏幸, Moser Michael, 島本 啓子, 西山 賢一: タンパク質膜挿入に必須な糖脂質酵素MPIaseの生合成経路の解明, 第12回21世紀大腸菌研究会 (大津) (2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 佐々木 優, Moser Michael, 永野 孝典, 松林 英明, 車 ゆうてつ, 上田 卓也, 西山 賢一: 糖脂質酵素MPIaseとタンパク質膜透過チャネル SecYEGに依存したタンパク質膜挿入反応の再構成, 日本農芸化学会大会2015 大会(2015) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Ken-ichi Nishiyama: Interaction between MPIase, a glycolipid involved in membrane protein integration and preprotein translocation, and its target proteins, The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity (2014) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 西山 賢一: タンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素MPIaseとYidCとの機能的相互作用, 第9回無細胞生命科学研究会(2014) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | 遠藤 佑太, 松林 英明, 車 愈澈, 上田 卓也, 西山 賢一: タンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素MPIase の植物ホモログの探索, 第9回無細胞生命科学研究会(2014) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Ken-ichi Nishiyama: Functional interaction between glycolipoyzome MPIase and the YidC protein in protein integration into membranes, Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces (2014) |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | Michael Moser, Maria Huber, 西山 賢一: タンパク質膜透過・膜挿入に関わる糖脂質酵素MPIaseとYidCとの機能的相互作用, 21世紀大腸菌研究会(2014) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | B01 公募研究 中野秀雄班 |

| | | | |
|-----|----|-------|--|
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | M. Musabaev, I. Kobayashi, T. Kojima, H. Nakano: In vitro transcription/translation in emulsion produced by a simple flow-focusing device, 249th ACS Meeting & Exposition (2015) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | B. Zhu, T. Mizoguchi, T. Kojima, H. Nakano: In vitro synthesis of horseradish peroxidase with DNA binding tag and its fluorogenic assay for bead display-based ultra-high-throughput screening. Japan-Italy Joint Symposium. (2014) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | B. Zhu, T. Mizoguchi, T. i Kojima, and H. Nakano: In Vitro Synthesis of Horseradish Peroxidase with DNA binding tag and its fluorogenic assay for bead display-based ultra-high-throughput screening. 日本農芸化学会中部支部 第171回例会 (2014) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | 太田 英里, 朱 博, 兒島 孝明, 中野秀雄: DNA 結合タンパク質を用いたビーズディスプレイ法による糸状菌由来マンガンペルオキシダーゼのハイスループットスクリーニング系の開発. 第171回例会 (2014) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | 溝口 琢郎, 兒島 孝明, 八見 清隆, 中野 秀雄: DNA 結合タンパク質を用いたタンパク質の新規ビーズディスプレイ法の構築とトランスクルミナーゼアッセイへの応用. 日本農芸化学会中部支部 第171回例会 (2014) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | 太田 英里, 朱 博, 二宮 涼子, 兒島 孝明, 中野 秀雄: ビーズディスプレイ法を用いたマンガンペルオキシダーゼのハイスループットスクリーニング方法の開発. 日本生物工学会66回大会(2014) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | B. ZHU, T. MIZOGUCHI, T. KOJIMA, Y. IWASAKI, H. NAKANO: Cell-free synthesis of horseradish peroxidase and single-chain lambda Cro repressor fusion protein for bead display-based high-throughput screening. 日本生物工学会66回大会(2014) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | M. MURZABAEV, T. KOJIMA, I. KOBAYASHI, H. NAKANO: A simple flow-focusing device for high-throughput applications in emulsion. 日本生物工学会66回大会, (2014) |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | B. Zhu, T. Mizoguchi, T. Kojima, Y. Iwasaki and H. Nakano: Cell-free Synthesis of Horseradish Peroxidase and Single-chain Lambda Cro Repressor Fusion Protein for Bead Display-based High-throughput Screening. The 7th International Congress on Biocatalysis 2014. August, 2014. Hamburg, Germany. |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | B. Zhu, T. Mizoguchi, T. i Kojima, and H. Nakano: Cell-free Synthesis of Horseradish Peroxidase and Single-chain Lambda Cro Repressor Fusion Protein for Bead Display-based High-throughput Screening. 71st Semi-annual Meeting of the Japanese Society of Enzyme Engineering, April 2014, Fukuoka |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | 太田 英里, 朱 博, 二宮 涼子, 兒島 孝明, 中野 秀雄: ビーズディスプレイ法を用いたマンガンペルオキシダーゼの酵素機能改変技術の構築. 生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー(2014) |
| B01 | 公募 | 西田敬二班 | B01 公募研究 西田敬二班 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | C01 計画研究 山村雅幸班 |
| C01 | 計画 | 伊庭斉志班 | C01 計画研究 伊庭斉志班 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | C01 公募研究 荒木通啓班 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 荒木通啓, 牧口大旭, 小川哲平, 近藤昭彦: 代謝シミュレーション基盤を利用した網羅的メタボローム推定, 日本薬学会第135回年会 (2015). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 原清敬, 望月正雄, 蓮沼誠久, 中津井雅彦, 荒木通啓, 近藤昭彦: MALDI-TOF/MSを用いた発現タンパク質プロファイル測定方法の開発, 第9回日本ゲノム微生物学会年会 (2015) |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | T. Ogawa, H. Makiguchi, RS. Cox III, M. Nakatsui, A. Kondo, T. Taniguchi, K. Miyaoku, M. Araki: M-path: Construction of a Database for Expanded Metabolic Pathways, Active Enzyme Molecule 2014 (2014). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | RS. Cox III, M. Nakatsui, H. Makiguchi, T. Ogawa, A. Kondo, M. Araki: Meta-synthetic metabolism: in silico design of novel amino acids from all-organism data, GIW ISCB-ASIA 2014 (2014). |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 中津井雅彦, 荒木通啓, 近藤昭彦: 遺伝子発現における時系列データ・制御様式の整合性評価, 第37回分子生物学学会 (2014). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 牧口大旭, 小川哲平, 中津井雅彦, Cox III, RS., 近藤昭彦, 谷口岳志, 宮奥康平, 荒木通啓: M-path: 拡張代謝パスウェイデータベースの構築, 第37回分子生物学学会 (2014). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 小川哲平, 牧口大旭, 谷口岳志, 宮奥康平, 中津井雅彦, Cox III, RS., 近藤昭彦, 荒木通啓: バイオプロセス合成経路データベース "M-path" の構築, 第3回生命医薬情報学連合大会 (2014). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 中津井雅彦, 荒木通啓, 近藤昭彦: 時系列データを利用した遺伝子制御ネットワーク選択手法の開発, 第3回生命医薬情報学連合大会 (2014). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | RS. Cox III, M. Nakatsui, T. Ogawa, H. Makiguchi, A. Kondo, M. Araki: Mpath: Computationally-Aided Design of Synthetic Metabolic Pathways, DNA20 (2014). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | RS. Cox III, M. Nakatsui, T. Ogawa, H. Makiguchi, A. Kondo, M. Araki: Mpath: Computationally-Aided Design of Synthetic Metabolic Pathways, SEED2014 (2014). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | M. Araki, RS. Cox III, T. Ogawa, H. Makiguchi, T. Taniguchi, K. Miyaoku, M. Nakatsui, A. Kondo: A Computational Method to Construct an Extensive Metabolic Pathway Database, Metabolic Engineering X (2014). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 牧口大旭, 小川哲平, 中津井雅彦, Cox III, RS., 近藤昭彦, 荒木通啓: Bioprocess design platform : Development of the bioprocess database of amino acids, 第36回分子生物学学会 (2013). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 中津井雅彦, 牧口大旭, 荒木通啓, 近藤昭彦: 細胞内ダイナミクス解析ツールの設計・開発, 「細胞を創る」研究会6.0 (2013). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | RS. Cox III, M. Nakatsui, T. Ogawa, H. Makiguchi, A. Kondo, M. Araki: Meta-synthetic metabolism: Identification of critical intermediates for synthetic amino acid derivative production, CBI学会 2013年大会 (2013). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | M. Araki: Construction of a computational platform for metabolic pathway design, CBI学会 2013年大会 (2013). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 荒木通啓, 牧口大旭, 小川哲平, 谷口岳志, 宮奥康平: 合成パスウェイの設計基盤構築, 日本薬学会第133回年会 (2013). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 牧口大旭, 小川哲平, 谷口岳志, 宮奥康平, 荒木通啓: Development of a computational tool for designing metabolic pathways, 第35回日本分子生物学学会 (2012). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 荒木通啓, 谷口岳志, 宮奥康平: 合成パスウェイ設計のための情報解析技術の開発 第64回日本生物工学会 (2012). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | 谷口岳志, 宮奥康平, 牧口大旭, 荒木通啓: 合成パスウェイ設計のための基盤ツールの開発, 第64回日本生物工学会 (2012). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | M. Araki, T. Taniguchi, K. Miyaoku, K. H. Makiguchi: A Computational Platform for Designing Natural Products, INCOB2012, P66 (2012). |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | M. Araki, T. Taniguchi, K. Miyaoku, K. H. Makiguchi: A Computational Method for Exploring Extensive Biosynthetic Pathways, Metabolic Engineering IX, P46 (2012). |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | C01 公募研究 塩尻信義班 |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | 福地智一, 山本 太一, 野口 民夫, 塩尻 信義, マイクロアレイを用いた肝臓特異的Rhhex 欠失マウス肝臓における遺伝子ネットワーク解析 第24回肝細胞研究会 (2017) |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | 福地智一, 西岡侑哉, 塩尻信義, 網羅的遺伝子発現データ解析によるマウス肝臓の成熟化過程におけるシグナルネットワークモジュールの構築 第23回肝細胞研究会 (2016) |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | 西岡侑哉, 八木志乃海, 福地智一, 吉井亮裕, 田川陽一, 佐藤信一, 小池亨, 塩尻信義, マウス胎仔肝臓の成熟化におけるシグナル伝達の変化 日本動物学会第86回大会 (2015) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | C01 公募研究 内田誠一班 |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 前田恵佑, 内田誠一, 野寄朋彦, 小野寺武, 都甲 潔: 動画画像解析を用いた線虫の走化性評価に関する研究, 電子情報通信学会MEとバイオサイバネティクス研究会 (2017) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 杉本潤, 近藤 興, 木村 晁, 内田誠一: 細胞内の中心体追跡と移動原理推定, 電子情報通信学会パターン認識・メディア理解研究会(2016) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 徳永 誠, 内田誠一: 任意の非マルコフ的制約下での多物体追跡, 電子情報通信学会パターン認識・メディア理解研究会 (2016) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 原田大輔, Brian Iwana, 岡 早苗, Day Timothy, 藤森俊彦, 内田誠一: CNNを用いたバイオイメージングメンテナーション, 電気関係学会九州支部連合大会 (2016) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 前田恵佑, 内田誠一, 野寄朋彦, 小野寺武, 都甲 潔: カメラ画像解析による線虫の走化性定量的評価 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 平成28年E部門総合研究会 ケミカルセンサ研究会 (2016) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 野口将之, 本館利佳, 鈴木利治, 内田誠一: 最適化に基づく樹状突起からのspine検出, 電子情報通信学会パターン認識・メディア理解研究会 (2015) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 岡田二郎, 廣瀬 陽, 吉濱海斗, 藤崎顕彰, 内田誠一: チゴガニのウェービング行動に対するイミダクロブリドおよびクロチアニジンの影響, 環境ホルモロン学会第18回研究発表会 (2015) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 豊暉原侑心, 宮本隼佑, 木村啓志, 佐甲靖志, 荒田幸信, 内田誠一: オプティカルフローと物体追跡を用いたC. elegansの局所挙動解析, 電気関係学会九州支部連合大会 (2015) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 内田誠一: 画像情報学の現状とバイオイメージ・インフォマティクス, 第6回バイオメダイカルインタフェースワークショップ(2015) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 山口 遼, 深澤大我, 渡辺英治, 内田誠一: 対象の重なりを許容した大局的最適な多物体同時追跡, 電子情報通信学会パターン認識・メディア理解研究会(2015) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 徳永 誠, 深澤大我, Volkmar Frinken, フォンヤオカイ, 内田誠一: 非マルコフ制約を導入した多物体追跡, 電子情報通信学会パターン認識・メディア理解研究会(2015) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 内田誠一: バイオイメージ・インフォマティクスに関する「協働」研究の状況報告, 第7回定量生物学の会年会(2015) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 廣瀬 陽, 岡田二郎, 藤崎顕彰, 内田誠一: チゴガニのウェービング行動に対するイミダクロブリドの影響, 環境ホルモロン学会第17回研究発表会(2014) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 亀津達也, 山口 遼, フォンヤオカイ, 内田誠一: バイオイメージインフォマティクスのための動き解析のための動き解析の検討, 電気関係学会九州支部連合大会 (2014) |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 野口将之, 濱野あゆみ, 堺 優花, 花井泰三, 内田誠一: 顕微鏡画像中の大腸菌セグメンテーションに関する試み, 電気関係学会九州支部連合大会 (2014) |
| C01 | 公募 | 應蓓文班 | C01 公募研究 應蓓文班 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | C01 公募研究 伊藤浩史班 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | H. Ito: Cyanobacterial circadian rhythms are nullified under low temperature conditions via Hopf bifurcation", International Symposium on Artificial Life and Robotics (2013). |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | H. Ito: Cyanobacterial circadian rhythms are nullified under low temperature conditions via Hopf bifurcation", The First Annual Winter q-bio Meeting (2013). |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | C01 公募研究 松野浩嗣班 |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | M. Kubota, M. Sugii, H. Matsuno, Behavior analysis on Boolean and ODE models for extension of genetic toggle switch from bi-stable to tri-stable, International Conference on Artificial Life and Robotics 2017, pp.P502-P506, (2017) |

| | | | |
|-----|----|-------|---|
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | M. Sugii, H. Matsuno, Extension of artificial genetic circuits with mathematical analysis, The 30th International Technical Conference on Circuit/Systems Computers and Communications (ITC-CSCC), pp.230-233, (2015) |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | M. Sugii, K. Kawano, H. Matsuno: Extension of genetic toggle switch with a mathematical analysis for artificial genetic circuits, German Conference on Bioinformatics 2014, poster abstracts No.51, (2014) |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | K. Mitani, H. Matsuno, A. Faure, Circuit functionality analysis in a gene regulatory network using GINsim, The 29th International Technical Conference on Circuit/Systems Computers and Communications (ITC-CSCC), pp.834-837, (2014) |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | M. Sugii, K. Kawano, A. Faure, H. Matsuno: A Mathematical Analysis of the Behavior of Genetic Toggle Switch, The 29th International Technical Conference on Circuit/Systems Computers and Communications (ITC-CSCC), pp.845-848, (2014) |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | M. Sugii, A. Faure, H. Matsuno: Extension of genetic toggle switch based on the effective search of state transitions, Proc. International Conference on Artificial Life and Robotics 2014, OS7-62, in CD-ROM, (2014) |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | Z. Tian, A. Faure, H. Mori, H. Matsuno: Systematic understanding of switch mechanism on carbohydrate supply in E.coli, The 13th International Conference on Systems Biology, poster abstract, No.187B, 104 (2012) |
| C01 | 公募 | 倉田博之 | C01 公募研究 倉田博之班 |
| C01 | 公募 | 倉田博之 | A.B.M. Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Stochastic Simulation of Dynamical Behavior in Gene Regulatory Network Automatic construction of calculable metabolic networks from public database. Proceedings of The Third BMIRC International Symposium for VirtualPhysiological Human, 34, Iizuka, March 5-6, 2015. |
| C01 | 公募 | 倉田博之 | A.B.M. Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: A Study of Genetic Noise in Biochemical Network. Proceedings of GIW/InCoB, Tokyo, Sep 9-11, 2014. |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | C01 公募研究 矢田哲士班 |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | 入江拓磨, 劉瑩, 榊原雄大, 門城拓, 関真秀, 菅野純夫, 矢田哲士, 鈴木穰, 次世代シークエンサーを用いた変異プロモーターの網羅的解析, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~2016年12月02日, 横浜. |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | Yada T, Taniguchi T, Irie T, Suzuki Y, Functional dissection of human promoters at single-base resolution and its application to rational design of promoter sequences, 第5回生命医薬情報連合大会, 2016年09月29日~2016年10月01日, 東京. |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | Yada T, A putative scenario for de novo gene origination in Saccharomyces cerevisiae genome, 日本進化学会2016年年会, 2016年8月25~28日, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京. |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | 劉瑩, 入江拓磨, 門城拓, 矢田哲士, 鈴木穰, 変異導入プロモーターの転写活性データをを用いて転写制御コードを解読する, BMB2015(第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会), 2015年12月01日~2015年12月04日, 神戸ポートアイランド. |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | 入江拓磨, 劉瑩, 門城拓, 関真秀, 榊原雄大, 菅野純夫, 矢田哲士, 鈴木穰, 次世代型シークエンサーを用いた変異プロモーターの網羅的解析, BMB2015(第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会), 2015年12月01日~2015年12月04日, 神戸ポートアイランド. |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | Yada T, Taniguchi T, Observing de novo gene birth through reconstruction of ancestral DNA sequences, 日本バイオインフォマティクス学会2015年年会, 2015年10月29~2015年10月31日, 京都大学宇治キャンパス, 京都. |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | Hori K, Yada T, Inference of genetic mutation causing host shifts of rabies virus, 日本バイオインフォマティクス学会2015年年会, 2015年10月29~2015年10月31日, 京都大学宇治キャンパス, 京都. |

| | | | |
|------------|-----------|-------------|---|
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | Tetsushi Yada, Takuma Irie, Takeaki Taniguchi, Yutaka Suzuki: Next generation sequencing data and its bioinformatics analysis dissect genomic regulatory elements, International Symposium on Genome Science 2015, Jan 20-21, Tokyo, Japan. |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | 入江拓磨, 門城拓, 劉エイ, 関真秀, 菅野純夫, 矢田哲士, 鈴木權: 次世代シーケンサーによる変異プロモーターの網羅的解析, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25-27日, 横浜, 日本. |
| C01 | 公募 | 古澤力班 | C01 公募研究 古澤力班 |

(3) 図書

| 研究項目 | 計画/公募 | 班 | 業績 |
|------|-------|-------|---|
| X00 | 総括 | 岡本正宏班 | X00 総括 岡本正宏班 |
| A01 | 計画 | 花井泰三班 | A01 計画研究 花井泰三班 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | A01 計画研究 田川陽一班 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 玉井美保, 小池亨, 田川陽一: 肝組織構築における培養条件の設定とシステム開発: 動物細胞の培養を成功させる条件設定集, 《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, 技術情報協会(2014), (総ページ数: 584) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 今松伸介, 安成皓, 馬場憲三, 岡崎憲三, 田川陽一: 霊長類ES/iPS細胞の凍結保存・輸送・解凍, 《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, (株)技術情報協会(2014), pp. 504-508 (総ページ数: 584) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 馬場憲三, 今松伸介, 安成皓, 田川陽一: 再生医療用保存液の開発 「再生医療の細胞培養技術と産業展開」 (52名) シームシー出版(2014) pp. 90-101 (総ページ315) |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 今松伸介, 安成皓, 馬場憲三, 岡崎憲三, 田川陽一: 霊長類ES/iPS細胞の凍結保存・輸送・解凍, 「再生医療への事業参入」, 技術情報協会, (2013) p. 129-132 |
| A01 | 計画 | 田川陽一班 | 今松伸介, 安成皓, 馬場憲三, 岡崎憲三, 田川陽一: 霊長類ES/iPS細胞の凍結保存・輸送・解凍, 「再生医療・細胞培養の開発と市場」, シームシー出版, (2013) p. 89-96 (総ページ: 258) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | A01 計画研究 柘植謙爾班 |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | Itaya, M., Kaneko, S., and Tsuge, K: Chapter 4 Efficient and accurate production of de novo designed large-size gene clusters by a novel Bacillus subtilis-based system. In Microbial Production, Anazawa, H., and Shimizu, S. eds. Springer (2014) |
| A01 | 計画 | 柘植謙爾班 | Itaya, M., and Tsuge, K: Chapter 9 Genome integrity, instability and construction In Escherichia coli and Bacillus subtilis; the frontiers of molecular microbiology revisited, Sadaie, Y, and Matsumoto, K. eds. Research Signpost (2012) |
| A01 | 公募 | 鈴木石根班 | A01 公募研究 鈴木石根班 |
| A01 | 公募 | 朝井計班 | A01 公募研究 朝井計班 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | A01 公募研究 古田芳一班 |
| A01 | 公募 | 古田芳一班 | Furuta Y, Kobayashi I: Restriction-modification systems as mobile epigenetic elements, In: Adam Roberts and Peter Mullany editors, Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements, Landes Bioscience, 85-103 (2013). |
| A01 | 公募 | 納富拓也班 | A01 公募研究 納富拓也班 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | A01 公募研究 野村渉班 |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村渉, 田中智博, 相川春夫, 玉村啓和: 多価結合型GPCRリガンドの合成とがん細胞イメージングへの応用, 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用, 267-273 (2012) |
| A01 | 公募 | 野村渉班 | 野村渉, 田中智博, 玉村啓和: HIV阻害剤・腫瘍認識プローブとしてのケモカイン受容体リガンド, ペプチド医薬の最前線, 101-107 (2012) |

| | | | | | |
|-----|----|-------------------|--|------|-------------------|
| A01 | 公募 | 今西未来班 | A01 | 公募研究 | 今西未来班 |
| A01 | 公募 | 上平正道班 | A01 | 公募研究 | 上平正道班 |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | A01 | 公募研究 | 末次正幸班 |
| A01 | 公募 | 末次正幸班 | Katayama T. and Sutsugu M. Chromosome replication in E.coli and B.subtilis. Escherichia coli and Bacillus subtilis; the frontiers of molecular microbiology revisited, chapter 3-1, Research Signpost, 29-43 (2012) | | |
| A01 | 公募 | 宮崎健太郎班 | A01 | 公募研究 | 宮崎健太郎班 |
| A01 | 公募 | 磯村彰宏 | A01 | 公募研究 | 磯村彰宏 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | B01 | 計画研究 | 木賀大介班 |
| B01 | 計画 | 木賀大介班 | E. Osada, Y. Suzuki, K. Hidaka, H. Ohno, H. Sugiyama, M. Endo, H. Saito: Engineering RNA-protein complexes with different shapes for imaging and therapeutic applications , ACS Nano 8, 8130-8140 (2014). | | |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | B01 | 計画研究 | Yannick Rondelez班 |
| B01 | 計画 | Yannick Rondelez班 | • T. Plasson & Y. Rondelez. Synthetic biochemical dynamic circuits, in “Multiscale Analysis and Nonlinear Dynamics: From Molecules to the Brain”, edited by M. Pesenson. (Wiley Series: Reviews of Nonlinear Dynamics and Complexity). ISBN-10: 3527411984 ISBN-13: 978-3-527-41198-6. www.wiley-vch.de/publish/dt/books/bySubjectPH00/ISBN3-527-41198-4 | | |
| B01 | 計画 | 陶山明班 | B01 | 計画研究 | 陶山明班 |
| B01 | 計画 | 陶山明班 | 庄田耕一郎, 陶山明: RNAを転写因子とする人工遺伝子回路の創製. 人工細胞の創製とその応用, 植田充美(監修), pp. 123-133, シーエムシー出版 (2017). | | |
| B01 | 計画 | 陶山明班 | M. Yokomori, O. Gotoh, N. Nishida, K. Tokunaga, A. Suyama: Biological information analysis method based on DNA computing, Natural Computing, in press. | | |
| B01 | 公募 | 小川敦司班 | B01 | 公募研究 | 小川敦司班 |
| B01 | 公募 | 車愈澈班 | B01 | 公募研究 | 車愈澈班 |
| B01 | 公募 | 車愈澈 | Pasquale Stano, Tereza Pereira de Souza, Yutetsu Kuruma, Paolo Carrara and Pier Luigi Luisi. (2013) Synthetic Biology Tools and Applications (ELSEVIER Edt. H. Zhao), Chapter 14, page 261-276, “Semi-Synthetic Minimal Cells: Biochemical, Physical, and technological Aspects”. | | |
| B01 | 公募 | 野澤彰班 | B01 | 公募研究 | 野澤彰班 |
| B01 | 公募 | 清尾康志班 | B01 | 公募研究 | 清尾康志班 |
| B01 | 公募 | 西山賢一班 | B01 | 公募研究 | 西山賢一班 |
| B01 | 公募 | 中野秀雄班 | B01 | 公募研究 | 中野秀雄班 |
| B01 | 公募 | 西田敬二班 | B01 | 公募研究 | 西田敬二班 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | C01 | 計画研究 | 山村雅幸班 |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Y. Suzuki: Harness the Nature for Computation, Natural Computing and Beyond, 49-70 (2013). | | |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | R. Seine, M. Yamamura: Design and Control of Synthetic Biological Systems, Suzuki and Nakagaki eds, Natural Computing and Beyond, 104-114 (2013). | | |
| C01 | 計画 | 山村雅幸班 | Y. Suzuki: Behaviors of Chemical Reactions with Small Number of Molecules Lecture Notes in Computer Science, 5777, 394-401 (2011). | | |

| | | | | | |
|-----|----|-------|---|------|-------|
| C01 | 計画 | 伊庭育志班 | C01 | 計画研究 | 伊庭育志班 |
| C01 | 公募 | 荒木通啓班 | C01 | 公募研究 | 荒木通啓班 |
| C01 | 公募 | 塩尻信義班 | C01 | 公募研究 | 塩尻信義班 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | C01 | 公募研究 | 内田誠一班 |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 内田誠一：画像データの基礎知識～画像の種類と見せ方，バイオ画像解析 手とり足とりガイド(小林 徹也，青木 一洋編)，羊土社 (2014) | | |
| C01 | 公募 | 内田誠一班 | 内田誠一：トラッキングの基礎とその周辺，バイオ画像解析 手とり足とりガイド(小林 徹也，青木 一洋編)，羊土社 (2014) | | |
| C01 | 公募 | 應替文班 | C01 | 公募研究 | 應替文班 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | C01 | 公募研究 | 伊藤浩史班 |
| C01 | 公募 | 伊藤浩史班 | 伊藤浩史：生物リズムを学び楽しむために，生物時計の生態学-リズムを刻む生物の世界 (種生物学研究シリーズ) 249-267 文一総合出版 (2015) | | |
| C01 | 公募 | 松野浩嗣班 | C01 | 公募研究 | 松野浩嗣班 |
| C01 | 公募 | 倉田博之班 | C01 | 公募研究 | 倉田博之班 |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | C01 | 公募研究 | 矢田哲士班 |
| C01 | 公募 | 矢田哲士班 | 矢田哲士：遺伝子発見 (人工知能学事典)，共立出版，(印刷中) | | |
| C01 | 公募 | 古澤力班 | C01 | 公募研究 | 古澤力班 |
| C01 | 公募 | 古澤力 | 古澤力：進化学に残された謎：複数の形質が絡み合う進化プロセスはどのようにして可能か？ 進化の謎をゲノムで解く，学研メディアカル秀潤社，p. 8-19 (2015) | | |

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119001

研究課題名（和文）合成生物学の技術基盤構築

研究課題名（英文）Synthetic Biology for the Comprehension of Biomolecular Networks

研究代表者

岡本 正宏（OKAMOTO, MASAHIRO）

九州大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：40211122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 47,000,000円

研究成果の概要（和文）：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。すでに、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、振動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や、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。

本領域では、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、無細胞系で回路・経路構築を行う工学と、細胞内へ回路・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。

研究成果の概要（英文）：In order to make the paradigm shift from the concept of “watched and analyzed biology” to that of “synthetic and analyzed or utilized biology”, the innovative research named Synthetic Biology was started from 2000 in US, such as designing synthetic genetic circuit by combining known interrelated biomaterials, realizing a certain bio-functional behaviors such as switch, oscillation, in vivo, designing synthetic metabolic pathways by incorporating enzyme coded genes from other origins into the cells. The objectives of this research project is to establish the coordination between the fundamental technologies for synthetic biology in order to comprehend biomolecular networks by integrating the following three missions: 1) design synthetic genetic circuit or metabolic pathway with using the methods of computational science, 2) construct the circuit in vitro with using the method of engineering, 3) construct the circuit in vivo or in the cell with using the methods of molecular biology.

研究分野：合成システム生物学

 キーワード：システムゲノム科学 生物工学 システム生物学 マイクロ流体デバイス 細胞分化 ゲノム情報科学
タンパク質工学 システム最適化

1. 研究開始当初の背景

細胞を、多数の相互作用する生体分子ネットワークからなるシステムとして捉える「システム生物学」と呼ばれる研究が行われているが、全てのネットワークが十分には理解されていないため、真の意味での「システム生物学」は完成しておらず、現状では、遺伝子、mRNA、代謝物などの大量のデータを「眺めて解析する生物学」ととどまっている。

一方、このような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、振動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。

一方、生体分子ネットワークは、ホメオスタシスと環境適応の両面を持っており、現在広く行われている一つまたは少数の遺伝子の過剰発現・破壊を行っても、ネットワークの応答に変化がないことが多い。このため、生体分子ネットワークに積極的に働きかけるような振動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。

2. 研究の目的

本申請領域では、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。

代謝と遺伝子発現を大規模かつ複雑に制御するには、図1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。

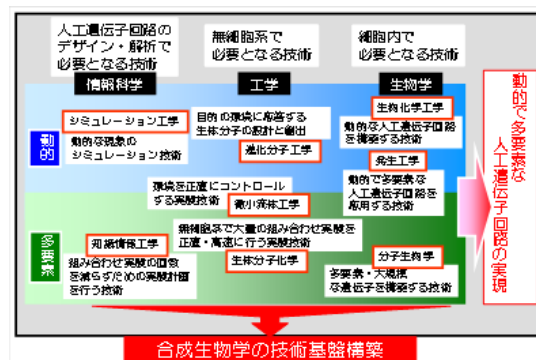


図1 合成生物学の技術基盤

3. 研究の方法

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る。これに総括班として、合成生物学の技術基盤構築が統括する。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(図2参照)。これに、斬新的なアイデア・技術を持って遂行する研究を公募する。

総括班の運営方針は、『合成生物学の技術基盤を構築することで、「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図る』をスローガンに、情報科学、工学、分子生物学の研究者が集った本研究領域の諸研究について、研究を効率よく推進し、領域全体の研究目的を達成し、その結果を社会に広

く公開する活動を行うことである。また、この研究領域に、特に多くの若い研究者が参画するよう、技術セミナーを開催して人材育成を行うことも総括班の重要な使命であると考える。したがって、総括班は、各研究の進捗状況を的確に把握し、必要に応じて計画の修正を求める。具体的な活動としては、イ) 領域全体の研究方針策定および各研究間の調整、(ロ) 研究評価、(ハ) 班会議および国際シンポジウムの企画と実施、(ニ) ホームページを通じての結果の公表。また、以下の3項目を総括班全体として行う：1) データベースの調整 2) 若手研究者人材育成を目的とする合成生物学技術セミナー開催、3) 社会との関わり

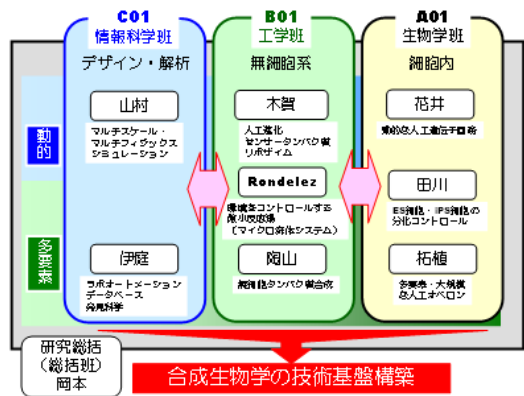


図2 計画研究体制

4. 研究成果

本研究領域では、生物班(A01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。領域の具体的な目標は次の3つである。1) 細胞密度・栄養源・生産物を感知し、自ら制御を行い、物質を生産する『自律制御生産細胞』の構築、2) 分化誘導補助細胞が、分化状態を感知し、目的の細胞へ分化誘導する『自律制御分化補助細胞による分化誘導システム』の構築、3) 多数(10以上)の遺伝子から構成される人工代謝経路を構築し、目的の物質を生産する『人工代謝経路を用いた多段階反応を必要とする目的物質の生産』。どの目標も、生物班のみでは達成できず、情報科学班(C01)、工学班(B01)との連携が必須であり、3つの目標のどれも達成できれば、世界初の画期的な成果となる。

1) に関し、これまでの研究成果は、以下の通りである；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た。伊庭班(C01班)ならびに山村班(C01班)の数理論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た。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、細胞内で構築した。また、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た。前半2年間は、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た。最終的に、①十分な菌体密度を担保しながら中央代謝経路の余剰な代謝流束を物質生産に転用するための代謝トグルスイッチ開発、②光波長に応答して遺伝子発現制御(緑色でON、赤色でOFF)を行う大腸菌の構築、③任意の菌体密度で自律的に代謝流束制御を行うイソプロパノール生産大腸菌の構築、に成功した。

2) に関し、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、研究初期である前半2年間は、外部から誘導因子を与えることにした。このため、Rondelez班(B01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きた。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(A01班)および公募班の上平と行った。最終的に、①分化誘導因子の時空間的制御手法の最適化、②未分化維持に重要なLIFと内胚葉分化に必要なアクチビンの発現ベクターの作製、③肝前駆細胞から肝細胞と胆管上皮細胞を分化誘導する系において、B01Rondelez班(計画班)との共同研究によりマイクロ流体デバイスで、各々の分化誘導因子を層流で流し分化誘導を試み、デバイスの最適化を進める、の成果を得た。

3) に関しては、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。一連の遺伝子群を連結した人工オペロンをどのようにデザインすればよいかを、大腸菌が本来生産しないカロテノイド・アントシアニンといった色素性物質の代謝経路を具体例に取り上げて検証した。その結果、①グルコースからカロテノイドまでの一連の28個の代謝経路遺伝子を連結した人工オペロンプラスミドをOGAB法により構築し、大腸菌ではあるが酵母の一次代謝経路遺伝子によりカロテノイドを生産する株の構築、②シロイヌナズナよりクローン化したアントシアニン合成遺伝子群をどのような比率で発現するかをin vitroの反応系により突き止め、こ

の酵素量比で発現する人工オペロンを構築し、アントシアニンをコロニーが着色する程度に生産する大腸菌の構築、に成功した。

以下に、総括班の活動を年度ごとにまとめる。

2011年度

- ① 8月18日：第1回領域全体会議（東京）
- ② 8月22日：第63回日本生物工学会大会（東京）にて、ワークショップ「合成生物学の挑戦と将来」を企画・発表
- ③ 11月13—14日：第2回領域全体会議（山形）

2012年度

- ① 5月16—18日：第3回領域全体会議（福岡）
- ② 9月18日：15th. International Biotechnology Symposium and Exhibition（韓国）にて、ワークショップ1st. Korea-Japan Synthetic Biology Symposiumを共同企画・発表
- ③ 9月20日：化学工学会第44回秋季大会（仙台）にて、ワークショップ「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・協賛・発表
- ④ 10月18日：第1回合成生物学技術セミナー（東京）開催（合成生物学の情報科学実習（モデリング・シミュレーション））
- ⑤ 11月21—22日：「細胞を創る」研究会5.0共催・発表

2013年度

- ① 10月29—31日：第4回領域全体会議（東京）、CBI学会2013年大会（東京）にて、“Emerging Hot Topics in Chem-Bio-Informatics”を科研費新学術領域「分子ロボティクス」と共催し、公開国際シンポジウム”Synthetic Biology for Comprehension of Biomolecular Network”を企画・発表
- ② 11月14—15日：「細胞を創る」研究会6.0共催・発表
- ③ 3月10—11日：第2回合成生物学技術セミナー（東京）開催（合成生物学の分子生物学実習（遺伝子組換え実験・発現実験））

2014年度

- ① 5月19—21日：第5回領域全体会議（福岡）
- ② 11月13—14日：「細胞を創る」研究会7.0共催・発表

2015年度

- ① 9月17日—9月18日：International Symposium on Synthetic Systems Biology: Synthetic Metabolic Pathway, Mathematical System Analysis and Design of Bio-inspired Systems 開催（福岡）
- ② 9月28日—10月2日：第3回合成生物学技術セミナー（福岡）開催（合成生物学の分子生物学実習および合成生物学の情報科学実習）

- ③ 10月5—6日：第6回領域全体会議（福岡）
- ④ 11月12—13日：「細胞を創る」研究8.0共催・発表（基調講演）、オーガナイズドセッション「合成生物学の基盤構築—その現状と課題—」企画・発表

5. 主な発表論文等

*総括班研究代表者（岡本正宏）のみ
〔雑誌論文〕（計6件）

- ① 岡本正宏、合成システム生物学の展望、生物工学会誌、査読有、94(4)、2016、177-179、ISSN 0919-3758
- ② A. Komori, Y. Maki, I. Ono, M. Okamoto: Investing noise tolerance in an efficient engine for inferring biological regulatory networks, J. Bioinform. Comput. Biol., 査読有, 2015, 13(3), 1541006
- ③ K. Iwamoto, H. Hamada, Y. Eguchi, M. Okamoto: Stochasticity of Intranuclear Biochemical Reaction Processes Controls the Final Decision of Cell Fate Associated with DNA Damage, PLOS ONE, 査読有, 2014, 9, e101333
- ④ A. Komori, Y. Maki, I. Ono, M. Okamoto: How to Infer the Interactive Large Scale Regulatory Network in “Omic” Studies, Procedia Computer Sci., 査読有, 2013, 23, 44-52
- ⑤ 岡本正宏、合成生物工学の技術的展望、生物工学会誌、査読有、91(6)、2013、177-179、ISSN 0919-3758
- ⑥ 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, Applied Mathematics, 査読有, 2012, 03(30), 1463-1470

〔学会発表〕（計2件）

- ① 岡本正宏：合成生物学の基盤構築—その現状と課題—、「細胞を創る」研究会8.0、基調講演、2015年11月12-13日、大阪
- ② M. Okamoto: Switching Mechanisms of Cyclic Enzyme System: Role as Chemical Diode, French-Japanese Seminar, Bioinspired Methods and Applications, Feb 4-6, 2013, Tokyo

〔図書〕（計1件）

- ① 厨 祐喜、岡本正宏：代謝工学によるバイオアルコール生産の向上、植田充美監修、合成生物工学の隆起、シーエムシー出版、東京、p.82-90（2012）

〔その他〕

ホームページ：<http://www.syn-biol.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 正宏 (Masahiro, Okamoto)
九州大学・大学院農学研究院・主幹教授
研究者番号：40211122

(3) 連携研究者

花井 泰三 (Taizo, Hanai)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：60283397

田川 陽一 (Yoichi, Tagawa)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授
研究者番号：70262079

柘植 謙爾 (Kenji, Tsuge)
慶応義塾大学・大学院政策・メディア研究
科・講師
研究者番号：70399690

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

ロンデレーズ ヤニック (Yannick,
Rondelez)
東京大学・生産技術研究所・准教授
研究者番号：10548770

陶山 明 (Akira, Suyama)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：90163063

山村 雅幸 (Masayuki, Yamamura)
東京工業大学・大学院総合理工学研究院・
教授
研究者番号：00220442

伊庭 斉志 (Hitoshi, Iba)
東京大学・大学院工学系研究院・教授
研究者番号：40302773

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119002

研究課題名（和文）細胞応答制御のための人工遺伝子回路の開発

研究課題名（英文）Construction of synthetic genetic circuit for control of cell response

研究代表者

花井 泰三（Taizo, Hanai）

九州大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：60283397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 144,300,000円

研究成果の概要（和文）：本計画研究班の研究目的は、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）に構築することである。そのため、安定動作する遺伝子トグルスイッチの構築、遺伝子トグルスイッチの応用研究、センサータンパク質の改良、クオラムセンシングの再構成と改良を行った。特に回路の設計および結果の解析については、コンピュータシミュレーションも利用した。これら研究を通じて、最終的には、細胞密度・栄養源・生産物などを感知し、自ら制御を行い、物質を生産する「自律制御物質生産微生物」を構築した。

研究成果の概要（英文）：The goal of this research project is to construct the synthetic genetic circuit which realizes a desired dynamic behavior. This circuit is composed of 10 or less biological molecular parts. In order to reach this goal, we accomplished 1) construction of genetic toggle switch operating with high stability, 2) application of genetic toggle switch, 3) modification of sensor proteins, 4) reconstruction and modification of quorum sensing system. We used not only molecular biology but also mathematical analysis for the system design of the synthetic genetic circuit. Through these researches, at last, we succeeded to construct “target product producing microorganism autonomously controlled” which could sense cell number and change intracellular metabolite distribution suitable for from cell growth to production according to cell number and produce 3 times more target product than the control strain.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 シミュレーション トグルスイッチ 人工遺伝子回路 合成代謝経路 2成分制御系 クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の具体的なゴールは、サイエンスの分野では、特定の生命現象を、同定済みの生体分子を利用して再構築し、詳細に解析する「人工遺伝子回路」の構築や、少数遺伝子の破壊や過剰発現といった従来手法とは異なる人為的な変化を生体分子ネットワークに加えることで未知の相互作用を理解することだと考えている。また、エンジニアリングの分野では、環境をセンシングし、自ら最適な制御を自律的に行う細胞をつくることであると考えている。いずれのゴールにも、刺激に応答し、時間経過とともに望みの遺伝子に望みの発現軌跡をたどらせる必要がある。しかし、このような「動的（時間経過で変動する）な遺伝子発現のコントロール」のためには、環境をモニターする仕組み、複数種類の mRNA やタンパク質の合成・分解速度、それら複数要素によるレギュレーションなどが複雑に絡み合うことから、多くの困難が伴う。このような状況から、研究開始当初のみならず現在でも、世界的に見て、上記のような合成生物学の研究においては、小規模な人工遺伝子回路および特定の物質を生産するための合成代謝経路についての報告があるのみである。

2. 研究の目的

このような背景に基づいて、本計画研究班の研究目的は、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*) に構築することとした。具体的には、安定動作する遺伝子トグルスイッチの構築、遺伝子トグルスイッチの応用研究、センサータンパク質の改良、クオラムセンシングの再構成と改良を行う。これらの研究には、分子生物学、培養工学による実験のみならず、特に回路の設計および結果の解析については、コンピュータシミュレーションを利用する。また、この研究を通じて、最終的には、細胞密度・栄養源・生産物などを感知し、自ら制御を行い、物質を生産する「自律制御物質生産微生物」を構築する。この他に、同じ領域内の公募研究班および計画研究班との共同研究を進める。

3. 研究の方法

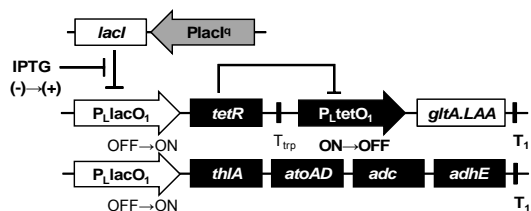
安定動作する遺伝子トグルスイッチ

我々は、すでに、恒常的に発現するリプレッサー LacI によって発現抑制された pLlacO1 プロモーターの下流に、pLtetO1 プロモーターのリプレッサーである *tetR* を挿入した遺伝子トグルスイッチを作成しており、pLlacO1 あるいは pLtetO1 の下流にレポーター遺伝子 *gfpmut3.1* を導入することで、その動作を確認済みである。しかし、誘導剤 IPTG 添加によって、pLtetO1 下流のレポーターの生産は速やかに停止 (OFF) するが、pLlacO1 下流のレポーターの生産は一時的に行われる (ON)

ものの、すぐに生産量が低下した。このことが、この遺伝子トグルスイッチの応用研究に大きな問題となっていたため、この遺伝子トグルスイッチの改良を試みた。

遺伝子トグルスイッチの応用研究

この研究で構築した遺伝子トグルスイッチを、バイオプラスチック材料として注目されているイソプロパノールを生産する大腸菌の代謝制御に応用することとした。大腸菌によるイソプロパノール生産では、大腸菌内のアセチル CoA を消費して、4 つの外来酵素遺伝子からなる合成代謝経路により、生産が行われる。アセチル CoA は、細胞増殖で重要な TCA サイクルで消費される中間代謝物であるが、細胞増殖後でも大量に TCA サイクルで消費される。つまり、TCA サイクルとイソプロパノール生産合成代謝経路では、アセチル CoA を奪い合う競合関係にある。アセチル CoA は、クエン酸シターゼによって TCA サイクルに取り込まれているため、大腸菌のクエン酸シターゼ遺伝子 (*gltA*) をノックアウトすれば、アセチル CoA のほとんどはイソプロパノールの生産に利用され、大腸菌一つあたりのイソプロパノールの生産量を増やすことができる。しかし、この場合、TCA サイクルが停止するため、菌体増殖することができず、結果的に生産量は低くなってしまう。このため、*gltA* ノックアウト大腸菌に、pLtetO1 下流に *gltA* に導入した遺伝子トグルスイッチと pLlacO1 で発現制御したイソプロパノール生産合成代謝経路を導入することとした(下図)。この株は、IPTG 添加前は *gltA* が発現することで菌体増殖し、十分な細胞増殖後に IPTG を添加すれば、*gltA* の発現が抑制され TCA サイクルでのアセチル CoA の消費も抑制されることとなる。結果として、発現したイソプロパノール合成代謝経路遺伝子によるイソプロパノール生産量の向上が期待できる。



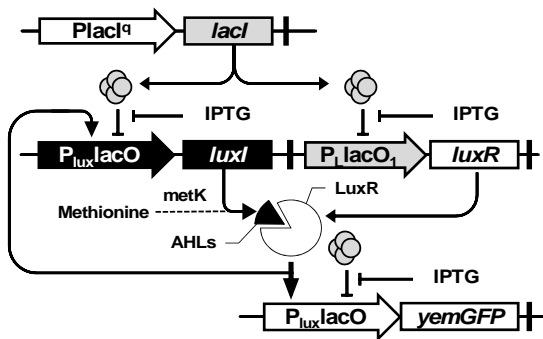
センサータンパク質の改良

大腸菌において遺伝子発現を光の波長によって人為的に ON/OFF できるスイッチを開発するため、シアノバクテリア (*Nostoc punctiforme*) 由来の 2 成分制御系 CcaS/CcaR、および CcaS に結合する発色団フィコシアノピリンを大腸菌内に発現させる。この大腸菌に、レスポンスレギュレーター CcaR の転写活性によって活性化するプロモーターを用いることで、緑色光下で ON、赤色光下で OFF となる光応答性の大腸菌の構築が期待でき

る。さらに、大腸菌由来のヒスチジinkinナーゼに光応答性を付与することを目指して、各種キメラヒスチジinkinナーゼを作成した。

クオラムセンシングの再構成と改良

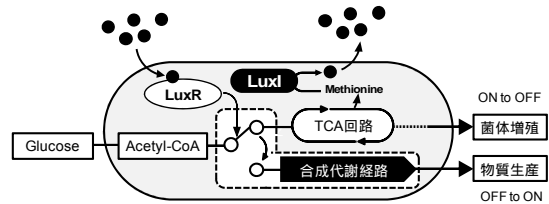
菌体密度を感知して、自律的な制御を行う大腸菌を構築するため、クオラムセンシング(QS)機構の再構成と改良を行った。QSは、微生物が互いの菌体密度を感知して相互に遺伝子発現を制御し合うシステムである。我々は、最も研究されたQSの1つである*Vibrio fischeri*由来のLuxシステムを大腸菌内で再構成することとした。Luxシステムでは、LuxIによって合成させる自己誘導剤アシルモホセリンラクトン(AHL)が細胞間を拡散し、転写調節因子LuxRと結合する。このAHL-LuxR複合体がpluxプロモーターを活性化することで、下流の遺伝子発現が誘導される。培養液中のAHL濃度は菌体増殖とともに増加し、その濃度がある閾値に達すると特定遺伝子が発現する。AHL合成遺伝子であるluxIはpluxプロモーター制御下にあり、ポジティブフィードバックでその発現が促進される。ただし、Luxシステムを大腸菌内に構築しただけでは、非常に低く、決まった菌体密度でしか動作しない回路となることが知られており、物質生産で利用される高密度菌体では利用できない。そこで、QSにより遺伝子発現が誘導される菌体密度(閾値菌体密度)をもっと高い菌体密度で、しかも、閾値を変更可能とするために、pluxプロモーターの両端にlacO配列を導入したpluxlacOプロモーターを考案し、AHL-LuxR複合体によるプロモーターへの結合をLacIリプレッサーによる立体障害により制限することとした。この改良Luxシステム(下図)では、培養開始時に異なる濃度のIPTGを添加することで、pluxlacOプロモーター活性およびその制御下にあるAHL合成の速度が変化するため、閾値菌体密度を自由に調整可能な菌体密度センサーとして機能すると期待された。



自律制御物質生産微生物の構築

で構築した、遺伝子トグルスイッチによるイソプロパノール生産大腸菌の生産量向上に関する研究では、IPTGの添加タイミングにより、菌体増殖およびイソプロパノール生産量が大きく異なる。これは、IPTG添加

が早いとTCAサイクルが培養初期で停止し、十分な菌体増殖が得られないために、イソプロパノールの生産量が低くなり、逆に、添加が遅いと、十分な菌体増殖は得られるものの、その後もTCAサイクルでアセチルCoAが消費されるため、イソプロパノールの生産量が低くなるためである。菌体が自らの菌体密度を感知し、適切なタイミングで遺伝子トグルスイッチを自ら制御し、生産量を最大化するような菌体を作成するため、で構築した遺伝子トグルスイッチに、で構築した改良Luxシステムを融合させた(下図)。



同じ領域内の計画研究、公募研究との共同研究

領域内の10以上のグループと議論をして、共同研究を進めた。特に、伊庭班が開発した解析ソフトで安定動作する振動回路をコンピュータに自動設計させ、我々が人工遺伝子回路を生体内に作成し、Rondelez班が作成した微小流体リアクターを利用して菌体の培養を行い、人工遺伝子回路の動作を内田班が作成した画像解析ソフトによって解析する研究を進めた。

4. 研究成果

安定動作する遺伝子トグルスイッチ

構築済みの遺伝子トグルスイッチを改良するため、時系列的に詳細な解析を行った。その結果、レポーターとして利用しているGFPmut3.1に、多量体形成による大腸菌への毒性が予想された。また、これを支持する報告もあったため、多量体形成に関するアミノ酸配列に変異を加えたyemGFPを利用したところ、10時間以上、遺伝子発現が維持されることがわかった。また、遺伝子トグルスイッチに関する基礎データを収集し、数理解析を行っている。

遺伝子トグルスイッチの応用研究

gltA破壊株に、gltAを導入した遺伝子トグルスイッチ組み込み、gltA制御株を作成したところ、この株はIPTG非存在下では野生株と同等の生育を示した。また、対数増殖期中期(培養開始後9h)にIPTGを添加したところ、速やかにクエン酸シンターゼ活性が低下し、最終的に野生株と比較して93%以上の活性の低下が認められた。この際、TCAサイクル前半の代謝物であるクエン酸およびα-ケトグルタル酸濃度は野生株と比較して96%以上低下し、細胞内のアセチルCoA濃度は3.2倍に向上した。このように、遺伝子トグルスイッチを用いることで菌体増殖に重要

な代謝経路を培養の任意のタイミングで遮断し、物質生産の起点となる目的の中間代謝物濃度を向上させることができた。

TCA サイクルの遮断により増加した細胞内アセチル CoA を実際の物質生産に利用するため、イソプロパノール生産合成代謝経路を *gluA* 制御株に導入した。この回路では、グルコースからアセチル CoA を経て TCA サイクルに流れる代謝物の流れ（代謝流束）を、IPTG 添加により、イソプロパノール生産合成代謝経路への代謝流束に転換することが可能となる。この株を代謝トグルスイッチ株とした。代謝トグルスイッチ株では、前述のように、IPTG 添加タイミングによって、菌体増殖およびイソプロパノール生産量が大きく異なると考えられたので、さまざまなタイミングで IPTG を添加し、イソプロパノール生産量を比較した（下表）。培養開始直後に IPTG を添加した場合は、著しい菌体増殖の低下が見られたものの、最終的なイソプロパノール生産量はコントロール株の 3.3 倍まで向上した。菌体増殖の低下を招かず、最適なタイミング（OD₆₀₀ ≈ 1.6）で TCA サイクルを停止した場合は、イソプロパノール生産量はコントロール株（大腸菌にイソプロパノール生産合成代謝経路を導入した株）の 3.7 倍、対グルコース収率は 3.1 倍まで向上した。このように、代謝トグルスイッチによる代謝流束制御は、十分な菌体密度を担保しながら中央代謝経路の余剰な代謝流束を物質生産に転用するために非常に有用な合成生物工学的ツールと考えられた。

| 誘導時間 (h) | 誘導時菌体密度 (OD ₆₀₀) | IPA 生産量 (mM) | 比増殖速度 (h ⁻¹) |
|----------|------------------------------|--------------|--------------------------|
| 0 | 0.1 | 45.7 | 0.07 |
| 6 | 0.5 | 48.3 | 0.21 |
| 9 | 1.6 | 50.9 | 0.20 |
| 12 | 3.6 | 38.1 | 0.22 |
| 15 | 5.3 | 20.5 | 0.23 |
| コントロール株 | 0.5 | 13.7 | 0.21 |

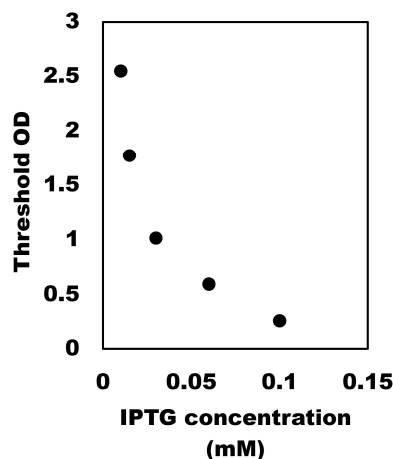
センサータンパク質の改良

シアノバクテリア由来の 2 成分制御系を大腸菌内に再構成し、光波長に反応して遺伝子発現制御（緑色で ON、赤色で OFF）を行う大腸菌を構築した。さらに、シアノバクテリアの光波長センサータンパク質 *CcaS* と大腸菌の嫌気センサータンパク質 *ArcB* とのキメラ（*ArcaS*）を作成し、大腸菌の嫌気応答レギュロンの発現を光で制御できることを示した。

クオラムセンシングの再構成と改良

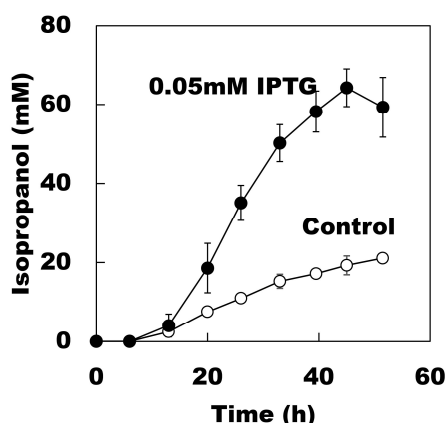
菌体密度を感知して、自律的な制御を行う大腸菌を構築するため、QS 機構の再構成と改良を行った。そのため、*plux* プロモーターの両端に *lacO* 配列を導入した *pluxlacO* プロモーターを構築し、レポーター遺伝子として *yemGFP* を用い、改良 Lux システムとした。培養開始時に添加する IPTG 濃度を変更し、

実験を行ったところ、IPTG 濃度依存的に、閾値菌体密度が変化することがわかった。また、低い IPTG 濃度では、物質生産で応用できるような高い菌体密度で遺伝子発現を誘導できることが明らかとなった。（下図）



自律制御物質生産微生物の構築

改良 Lux システムを遺伝子トグルスイッチの *pLacO1* 制御系と置換することで、任意の菌体密度で自律的に代謝流束制御を行うイソプロパノール生産大腸菌の構築に成功した。この自律制御物質生産微生物は、培養開始時に添加する IPTG 濃度に依存して、イソプロパノール生産量が大きく変化した。最適な IPTG 濃度（本研究では 0.05mM）では、十分な菌体密度に到達したことを自ら感知し、細胞内代謝を増殖に適した状態から生産に適した状態に代謝流束を自律的に制御した。その結果、IPTG の添加タイミングをマニュアルで最適化した代謝トグルスイッチ株とほぼ同等の生産量を達成した。（下図）



同じ領域内の計画研究、公募研究との共同研究

安定動作する振動回路をコンピュータに自動設計させる研究に関しては、現在までのところ、振動する菌体の作成には成功していないが、研究期間終了後も、各研究項目の改良を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Keigo Tsuruno, Hiroshi Honjo, Taizo Hanai, Enhancement of 3-hydroxypropionic acid production from glycerol by using a metabolic toggle switch, *Microbial Cell Factories*, 査読有, Vol. 14, 2015, 155,

DOI: 10.1186/s12934-015-0342-1

Yuki Soma, Taizo Hanai, Self-induced Metabolic State Switching by a Tunable Cell Density Sensor for Microbial Isopropanol Production, *Metabolic Engineering*, 査読有, Vol. 30, 2015, 7-15,

DOI: 10.1016/j.ymben.2015.04.005

Hiroshi Honjo, Keigo Tsuruno, Tsuneyuki Tatsuke, Masaki Sato, Taizo Hanai, Dual synthetic pathway for 3-hydroxypropionic acid production in engineered *Escherichia coli*, *J Biosci Bioeng.* 査読有, Vol. 120, 2015, 199-204,

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.023

Yuki Soma, Keigo Tsuruno, Masaru Wada, Atsushi Yokota, Taizo Hanai, Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch, *Metabolic Engineering*, 査読有, Vol. 23, 2014, 175-184,

DOI: 10.1016/j.ymben.2014.02.008

Hiroyuki Hamada, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, and Masahiro Okamoto: Exploring the implicit interlayer regulatory mechanism between cells and tissue: Stochastic mathematical analyses of the spontaneous ordering in beating synchronization, *BioSystems*, 査読有, 111, 208-215, 2013,

DOI:

10.1016/j.biosystems.2013.02.007

この他 12 報の論文を発表しております。

〔学会発表〕(計 80 件)

岡駿佑、堀槇佑子、杉江よしみ、大塚北斗、饗場浩文、合成生物学の展開に向けた光応答性大腸菌の創成、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Hiroyuki Hamada, Masahiro Okamoto, System analysis for the accessory gene regulator system of *Staphylococcus aureus*, International Symposium on Synthetic Systems Biology Joint 14th

Symposium of Biochemical Systems Theory, 2015.9.17-18, JR Hakata City AMU (福岡県・福岡市)

Taizo Hanai, Synthetic Genetic Circuit for Improvement of Iso-propanol Production, KMB2015, 2015 年 6 月 24 日~2015 年 6 月 26 日、慶州市(韓国)招待講演

この他、77 件の学会発表を行っております。

〔図書〕(計 2 件)

鶴野圭悟、花井泰三、シーエムシー出版、リサイクルバイオテクノロジー(バイオマスからの C3 アルコール生産)、2013、34-42

花井泰三、シーエムシー出版、合成生物学の隆起(合成代謝経路によるバイオアルコール生産)、2012、91-95

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 新規人工遺伝子回路

発明者: 花井泰三、相馬悠希、鶴野圭悟

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-004659

出願年月日: 平成 26 年 1 月 14 日

国内外の別: 外国

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.syn-biol.com/>

<http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/~taizo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花井 泰三(HANAI, Taizo)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 6 0 2 8 3 3 9 7

(2) 研究分担者

饗場 浩文(AIBA, Hirohumi)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号: 6 0 2 1 1 6 8 7

濱田 浩幸(HAMADA, Hiroyuki)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 8 0 3 4 6 8 4 0

岡本 正宏(Okamoto, Masahiro)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 4 0 2 1 1 1 2 2

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119003

研究課題名（和文）人工遺伝子回路による人工肝組織モデルの構築

研究課題名（英文）Construction of hepatic tissue model by developing synthetic biological systems

研究代表者

田川 陽一（Tagawa, Yoh-ichi）

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：70262079

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 63,700,000円

研究成果の概要（和文）：合成生物学的手法を開発することにより肝組織器官形成のin vitroモデルを構築するために、我々は哺乳類における合成生物学的アプローチのプラットフォームの確立を目指した。各発生段階のマウス肝の遺伝子発現解析をおこない、肝組織分化を補助するための肝由来内皮細胞株を樹立した。肝臓発生初期のES細胞を未分化維持または内胚葉系分化のためにLIFまたはアクチビンのコンディショナル発現システムを構築し、内皮細胞に導入した。マイクロ流体デバイスを用いた肝前駆細胞から肝組織の成熟分化手法を確立した。哺乳類の合成生物学のためのプラットフォームとして、細胞間クロストークを考慮した例を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：To construct an in vitro model of hepatic tissue organogenesis by developing synthetic biological systems, we challenged to establish an adequate platform for synthetic approach in mammalian. Gene expression analysis was carried out at several liver developmental stages in mouse. Next, a hepatic endothelial cell strain was established as support cell for hepatic differentiation of mouse ES cells. To prepare in vitro system corresponding to early hepatic development period, conditional expression system of LIF and activin was constructed and was introduced into endothelial cell line to keep undifferentiation and endodermal differentiation of mouse ES cell, respectively. Mouse hepatic progenitor cells were cultured and differentiated to mature hepatocytes or cholangiocytes under the laminar flow-supplied different medium conditions in a same micro-fluidic device. In conclusion, we could show an adequate example as platform in consideration of cross talk for synthetic biology in mammal.

研究分野：生体医工学

キーワード：肝 肝細胞 内皮細胞 星細胞 分化 肝幹細胞 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

身体を形成するすべての組織へ分化する能力 (pluripotency: 万能性) を有している胚性幹細胞 (ES細胞: M. Evansら (ノーベル賞受賞) により最初に樹立) やマウスES細胞の染色体DNAを操作することにより作出される遺伝子改変マウス (M. Cappecciら (ノーベル賞受賞)) により、生物学は飛躍的に発展した。また、これまで分化方向は不可逆と考えられていたが、2006年、山中らによりES細胞特異的発現転写因子群を分化体細胞に導入することによりES細胞に限りなく近い細胞 (iPS細胞) への可逆が確認された。幹細胞を用いる再生医療の実現の可能性が高まり、国内外を問わず関連研究は激しい競争になっている。そのような応用的側面だけでなく、転写因子の発現制御ができれば、細胞の分化を制御できることがわかり、合成生物学領域においても幹細胞からの分化をモデルにした研究が注目されている (B.D. MacArthur, et al, 'Systems Biology of stem cell fate and cellular reprogramming', Nature, 2009 等) が、実際には合成生物学によるES細胞の厳密な分化モデルの検証やその出口に至る報告はまだなかった。

また、本提案の出口の一つである肝組織マイクロ培養システムに関しても、肝細胞のみの単層またはスフェロイド培養による (Fukuda, J., et al, 2006; Tanaka, Y., et al, 2006 など) 肝細胞チップの研究は盛んに行われていた。しかし、肝細胞単独のシステムではアルブミン産生や尿素合成能は確認できても、その他の多くある代謝活性までは報告できていない。我々が開発したES細胞から肝細胞だけでなく管腔構造を有した内皮細胞も分化誘導した「肝組織」を分化誘導した高肝機能な独自のシステムは複数の検証論文として報告されているが、そのES細胞由来肝組織を利用したマイクロ培養システムの報告はまだなかった。

2. 研究の目的

肝細胞は、物質生産や薬物を取り込み修飾して排出するという生命維持に必要な200以上の機能を有している。ただし、肝細胞を単独で *in vitro* 培養してもそれらほとんどの機能は低下してしまうことから、人工肝臓の開発が遅れている。申請者らは、万能な分化能力を有しているES細胞から、肝細胞だけでなく、非実質細胞の内皮細胞等も同時に分化誘導するシステムを開発し、さらに、流路を有するマイクロ培養装置により、高肝機能を維持することに成功した。しかし、この肝組織形成は10%以下の分化効率であり、最適な分化誘導系とはいえない。そこで、実験とシミュレーションを繰り返すことにより、最適な分化誘導手法を探索したいと考えた。さらに、合成生物分野で研究されて

いる人工遺伝子回路を応用して、分化誘導に必要、かつ、肝組織における肝細胞極性を維持できるようなさまざまな機能を有する分化補助細胞を作出することを考えた。

そこで、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こととした。まずは、分化誘導課程の動的シミュレーションを構築し、成熟肝細胞分化誘導・維持のために最適な人工遺伝子回路を情報科学的方法で設計し、その人工遺伝子回路を持ったストローマ細胞 (分化補助細胞) を開発し、個体の肝に近い肝細胞を *in vitro* で維持すること (肝組織の構築) を目指した。

3. 研究の方法

(1) ES・iPS細胞から肝組織構築までのプロセスが安定的にできることを確認する。さらに、肝組織構築までの各段階の遺伝子発現の解析をRT-PCRによりおこなった。

(2) *in vitro* 肝組織に培地流路のあるマイクロデバイスを開発し、マウスES細胞由来肝組織チップにおいて肝機能を向上させることを試みる。さらに、独自に樹立した門脈結紮誘導肝幹細胞から安定的に肝細胞誘導や肝組織構築する手法を確立した。

(3) 成熟肝細胞へ分化誘導薬をサポートするための内皮細胞の樹立を試みる。類洞内皮細胞を樹立するため、温度感受性SV40T抗原変異DNAの作製し、発現ベクターに組み込む。この発現ベクターをマウス個体へ導入し、類洞内皮細胞の樹立を試みた。

(4) 遺伝子回路設計のための応答性プロモーターの設計・シミュレーションを行った。

4. 研究成果

(1) マウスES細胞から分化誘導により作製した *in vitro* 肝細胞と内皮細胞を有した肝組織を用いた、尿素回路活性化によるアルコール誘導性肝細胞障害の抑制に成功した。また、独自に開発したバイオリアクターを用いて、マウス初代培養肝細胞を高密度で培養し、コラーゲン細線維を有する肝組織モデルを構築した。これは、大スケールでの肝組織構築であり、臨床応用へも期待できる。また、内皮細胞の足場材料であるヒアルロン酸と肝細胞の足場材料となるガラクトシル化キトサンを用いたハイブリットスポンジを作製し、肝細胞と内皮細胞の共培養系を構築した。分化誘導課程の動的シミュレーションのための遺伝子発現を網羅的に解析するため、未分化マウスES細胞と我々が独自に開発した分化誘導法における肝組織 (分化18日目) における遺伝子発現のリアルタイムPCRア

レイによる発現解析系を確立した。また、アルブミン遺伝子発現制御配列を上流にDsRed2 遺伝子を導入したマウス ES 細胞を作製し、分化誘導における肝細胞への分化を可視化できるシステムを構築した。分化誘導因子の時空間的制御手法の確立をおこなうため、ヒト ES・iPS 細胞を用いた肝細胞系譜細胞への分化誘導方法の検討をおこない、肝組織構築までのプロセスを明確にすることを試みた。その結果、比較的安定的に組織構築できる条件を見出した。また、肝臓形成における各段階での遺伝子発現解析のため、マウス肝臓を胎仔 (E18.5)、新生仔、4 週齢におけるステージで採取し、PCR アレイにより Signal Transduction Pathway の解析をおこないどのように推移するのかを検証し基礎的データが得られた。また、塩尻班 (公募班) との共同研究により、マウス胎生期肝臓発生ならびに肝臓オルガノイド形成系における遺伝子発現をマイクロアレイ法で経時的に解析し、肝臓構築における細胞間相互作用ネットワークの探索をおこない、PPI (Protein-Protein Interaction) 解析がネットワーク探索に有効であり、各遺伝子相互作用の解析に成功した。また、幹細胞の性質をもつ臓側卵黄嚢細胞の分化多能性を検証し、壁側卵黄嚢ふくめ種々の細胞に分化することを証明した。

(2) 精密な発現誘導をするために、微小環境で分化誘導因子を制御するためのマイクロデバイスの開発を研究班相互の共同研究で開発に着手した。2 種類の培地を層流で培養槽に流れ込むマイクロデバイスを構築し、我々が独自に樹立した肝細胞と胆管上皮細胞の両分化能を有するマウス門脈結紮誘導肝前駆細胞株を用いて、2 種類の細胞への分化誘導による肝組織構築を試みた。分化誘導因子の精密な時空間制御により分化誘導制御ができつつある。この肝幹細胞 1 つから成熟肝細胞へ分化するような微小環境コントロール可能なデバイスの開発も進めている。また、*in vitro* 肝組織に培地流路のあるマイクロデバイスを開発し、マウス ES 細胞由来肝組織をデバイス内で構築した肝組織チップにおいて肝機能を向上させることに成功した。

(3) 遺伝子回路の導入をおこなうためのストロマ細胞として、類同内皮細胞株の樹立も試みた。TS 変異 SV40LT 抗原発現ベクターを構築した。このベクターをマイクロダイナミクスインジェクションにより門脈内へ投与することで肝臓内の細胞に遺伝子を導入する手法を試みたが、安定的な遺伝子導入は困難であった。肝臓のコラゲナーゼ灌流法により、肝非実質細胞を調製し、類洞内皮細胞や星細胞、線維芽細胞の樹立をおこなった。

(4) 遺伝子回路設計のための応答性プロモーターの設計・シミュレーションを行った。上平班 (公募班) と花井班 (計画班) と共同で、哺乳類細胞における誘導型遺伝子発現回路の設計をおこなった。未分化維持に重要な LIF と内胚葉分化に必要なアクチビンの発現ベクターを上平班との共同研究により作製し、分化誘導制御を検討した。またこれまでに上平班が開発したテトラサイクリン応答による肝細胞機能維持に関わる転写遺伝子の発現系における肝組織としての機能性について検討をおこなった。さらにテトラサイクリン誘導プロモーターによる肝細胞関連転写因子発現ベクター導入肝細胞株を用い、肝機能発現における各遺伝子発現の変動の解析を試み、細胞レベルでの概日リズムの再現に成功した。

肝組織分化途中のプロセスを制御する系は完成に至っていないが、哺乳類細胞系における合成生物学研究の方向性として、哺乳類では単一細胞ではなく細胞間クロストークによる組織形成が重要であることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 15 件)

1. Yagi S, Y. Tagawa, and N. Shiojiri: Transdifferentiation of mouse visceral yolk sac cells into parietal yolk sac cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470:917-923 (2016) doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.149. 【査読有】
2. 玉井美保、田川陽一: 哺乳類の合成生物学、そして人工生命体へ. 特集「細胞を創る」研究とその展開: 生物工学会誌. 93: 620-622 (2015) 【査読無】
3. Ahn S., M. Tamai, K. Nakashima, M. Ito, T. Suzuki and Y. Tagawa: An *in vitro* liver model consisting of endothelial vascular networks and hepatic cell lines improves human hepatitis B virus replication. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118:107-11 (2014) doi:10.1016/j.jbiosc.2013. 12.016 【査読有】
4. Aratsu, F., I. Harada, S. Yoshimura, C.-S. Cho, T. Akaike, and Y. Tagawa: Dynamic chemotactic response of fibroblasts to local stimulation using EGF-immobilized microbeads. *Biomaterials* 35:2471-2476 (2014) doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.013. 【査読有】
5. Aikawa H., M. Tamai, K. Mitamura, F. Itmainati, G.N. Barber, Y. Tagawa: Innate immunity in an *in vitro* murine

- blastocyst model using embryonic and trophoblast stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117:358-65 (2014) doi:10.1016/j.jbiosc.2013.09.001 【査読有】
6. Shang, Y., M. Tamai, R. Ishii, N. Nagaoka, Y. Yoshida, M. Ogasawara, J. Yang, and Y. Tagawa: Hybrid sponge comprised of galactosylated chitosan and hyaluronic acid mediates the co-culture of hepatocytes and endothelial cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117:99-106 (2014) doi:10.1016/j.jbiosc.2013.06.015 【査読有】
 7. Miyanokoshi, M., T. Tanaka, M. Tamai, Y. Tagawa, and K. Wakasugi: Expression of the rodent-specific alternative splice variant of tryptophanyl-tRNA synthetase in murine tissues and cells. *Sci.Rep.* 3:3477 (2013) doi:10.1038/srep03477 【査読有】
 8. Tamai, M., M. Aoki, A. Nishimura, K. Morishita, and Y. Tagawa: *In vitro* recapitulation of the urea cycle using murine embryonic stem cell-derived *in vitro* liver model. *Amino Acids* 45:1343-51 (2013) doi: 10.1007/s00726-013-1594-x. 【査読有】
 9. Tamai, M., E. Adachi, and Y. Tagawa: Characterization of a liver organoid tissue composed of hepatocytes and fibroblast in dense collagen fibrils. *Tissue Engineering part A* 19:2527-2535 (2013) doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0704. 【査読有】
 10. Ryu, J.-Y., 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) doi: 10.1007/s11248-012-9661-8. 【査読有】
 11. Harimoto, K., Y. Yoshida, K. Yoshihara, N. Nagaoka, T. Matsumoto, and Y. Tagawa: Osteoblast compatibility of materials depends on serum protein absorbability in osteogenesis. *Dental Materials Journal* 31:674-680 (2012) doi.org/10.4012/dmj.2012-075 【査読有】
 12. 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) doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.003. 【査読有】
 13. 田川陽一、編 創立90周年記念特別企画 特集「こんな研究にもES細胞やiPS細胞が役に立つ - ノックアウトマウス、再生医療、毒性試験だけではない - 」生物工学会誌. 90:546-561 (2012) 分担執筆として、
 - ・田川陽一：特集によせて. 546
 - ・玉井美保、田川陽一：マウス ES/iPS細胞を用いた *in vitro* 肝器官形成システムとそのミトコンドリア機能変化の解析. 560-561【査読無】
 14. 三田村圭祐、田川陽一：RNase の豊富な組織からの RNA 抽出のコツ 実験医学 30:2641-2647 (2012) 【査読無】
 15. Toyoda, Y., M. Tamai, K. Kashikura, S. Kobayashi, Y. Fujiyama, T. Soga, and 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) doi: 10.1124/dmd.111.041137. 【査読有】
- 〔学会発表〕(計78件)
1. 田川陽一、玉井美保、藤山陽一：細胞間等コミュニケーションを考慮した合成生物学 - デザイン生命工学 - . 日本農芸化学会 2016 2016年3月30日、北海道
 2. 玉井美保、藤山陽一、田川陽一：哺乳類 *in vitro* モデル構築の試み Mammal *in vitro* model using fluidic culture device. 日本農芸化学会 2016 2016年3月30日、北海道
 3. 田川陽一、玉井美保、藤山陽一：デザイン生命工学による最小哺乳類 *in vitro* システム. 第1回 デザイン生命工学研究会 2016年3月8日、横浜
 4. 玉井美保、田川陽一：免疫細胞応答を考慮した *in vitro* 肝炎モデル構築の試み. 第1回 デザイン生命工学研究会 2016年3月8日、横浜
 5. 玉井美保、藤山陽一、田川陽一：流体デバイスをを用いた肝組織チップによる肝機能の向上 Recapitulation of the hepatic functions in liver tissue chips using fluidic cell culture device. 第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会 BMB2015 2015年12月2日、神戸
 6. 田川陽一、玉井美保、藤山陽一：動物実験代替法を目指した最小哺乳類 *in vitro* システム. 第80回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2015年7月18日、東京
 7. Tamai, M., Y. Fujiyama, Y. Tagawa: Murine ES/iPS cell-derived *in vitro*

- liver model on a micro-fluidic device. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (ISSCR), 25 June 2015, Stockholm Sweden
8. 玉井 美保、酒井 宏司、宮川 眞一、田川 陽一: 門脈枝結紮誘導肝前駆細胞株樹立における IL-6 依存性について. 第 22 回肝細胞研究会 2015 年 6 月 4 日、米子
 9. 田川 陽一、玉井 美保、藤山 陽一: 最小哺乳類 *in vitro* モデルの構築と応用 -ES/iPS 細胞を用いた試み-. 第 14 回分子予防環境医学研究会 2015 年 2 月 13 日、大阪
 10. Tagawa, Y., M. Tamai, S. Ahn, K. Nakashima, M. Ito, and T. Suzuki: Human iPS cell-derived *in vitro* model for Hepatitis B virus infection and proliferation. 2014 World Stem Cell Summit 4 December 2014, San Antonio
 11. Tamai, M., Y. Fujiyama, Y. Tagawa: High- and multi-functional *in vitro* liver model derived from mouse ES/iPS cells on micro-fluidic device. 2014 World Stem Cell Summit 4 December 2014, San Antonio
 12. 田川 陽一、玉井 美保、藤山 陽一: 再生医科学研究オーバービュー:ES 細胞から分化細胞、組織、そして、生命システム。「細胞を創る」研究会 7.0 2014 年 11 月 14 日、北海道
 13. 田川 陽一、玉井 美保、藤山 陽一: 最小哺乳類 *in vitro* システムの戦略と応用. 第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 10 日、北海道
 14. 玉井 美保、藤山 陽一、田川 陽一: 流体デバイスを用いたマウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデル. 第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 10 日、北海道
 15. 玉井 美保 田川陽一: マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織モデルにおける肝代謝能. 第 21 回肝細胞研究会 2014 年 6 月 27 日、東京
 16. 玉井 美保、酒井 宏司、宮川 眞一、田川 陽一: マウス門脈結紮による肝再生モデルにおける IL-6 依存性. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2014 年 6 月 19 日、北海道
 17. 玉井 美保、藤山 陽一、田川 陽一: *In vitro* liver model derived from murine ES/iPS cells for animal use alternative, 動物実験代替を目指した *in vitro* 肝組織モデル. 日本組織培養学会第 87 回大会 2014 年 5 月 29 日、東京
 18. Tamai, M. and Y. Tagawa: マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝器官形成モデルにおける肝細胞極性. 第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 03 月 15 日、京都
 19. Tamai, M. and Y. Tagawa: Recapitulation of the hepatic function using *in vitro* liver model from murine ES/iPS cells. 情報計算化学生物学会 2013 年大会 2013 年 10 月 29 日 ~ 2013 年 10 月 31 日、東京
 20. Tamai, M., H. Sakai, S. Miyagawa, E. Adachi, Y. Tagawa: Reconstruction of Liver Tissues Model Composed of Murine Hepatic Progenitor Cells and Fibroblasts in Dense Collagen Fibrils. 第 20 回肝細胞研究会 2013 年 09 月 27 日、大阪
 21. 玉井美保、田川陽一: マウス ES 細胞由来 *in vitro* 肝組織における糖レベル調節能. 日本生化学会大 86 回大会 2013 年 09 月 11 日 ~ 2013 年 09 月 12 日、横浜
 22. 田川 陽一: 最小哺乳類システム構築の試み. 2013 年度生物工学フォーラム (招待講演) 2013 年 07 月 19 日、東京
 23. Tagawa, Y., M. Tamai, Y. Fujiyama: Mouse ES cell-derived *in vitro* heart, liver, and pancreas model on microfluidic device. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013) 2013 年 06 月 12 日、米国 ポストン
 24. Tamai, M., H. Sakai, S. Miyagawa, E. Adachi, Y. Tagawa: Characterization of Liver Organoid Tissues Composed of Murine Hepatic Progenitor Cells and Fibroblasts in Dense Collagen Fibrils. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013) 2013 年 06 月 12 日、米国 ポストン
 25. Tagawa, Y. and M. Tamai: Super-functional and high responsive *in vitro* liver model derived from mouse ES cells and its application to a liver chip. 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013 年 06 月 09 日、シンガポール
 26. Tagawa, Y.: Super-functional and high responsive *in vitro* liver model from mouse ES/iPS cells. Nankai University Bioengineering Seminar (招待講演) 2013 年 03 月 26 日、南開大学 (Tianjin, P.R. China)
 27. 田川 陽一: ES/iPS 細胞の凍結保存液の開発と肝組織分化誘導. ゲノム未来会議 2.0 招待講演 2013 年 02 月 08 日、慶応大学生命科学研究所 (山形県)
 28. Tagawa, Y.: Developmental Engineering, Regenerative Medicine Technology, and Synthetic Biology. Cathay General Hospital Seminar (招待講演) 2013 年 01 月 25 日、Cathay General Hospital (Taipei, Taiwan)

29. 田川 陽一: ES/iPS 細胞の凍結保存液の開発と肝組織分化誘導. 国立生育医療研究センターセミナー(招待講演)2012年12月18日, 国立生育医療研究センター(東京都)
30. 玉井 美保, 田川 陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞の *in vitro* 肝組織構築とその過程におけるミトコンドリア能力の獲得. 第 85 回日本生化学会大会 2012年12月16日, マリンメッセ福岡(福岡県)
31. 玉井 美保, 田川 陽一: マウスES/iPS細胞を用いた *in vitro* 肝モデルにおける細胞極性の構築. 細胞を創る」研究会 5.0 2012年11月21日~2012年11月22日, 東京工業大学(神奈川県)
32. 田川 陽一: 肝細胞・組織培養工学の新しいプラットフォーム-Body-On-Chipsの試みとその応用. スフェロイド分科会セミナー(招待講演)2012年11月18日, 名古屋都市センター(愛知県)
33. 田川 陽一: マウスES/iPS細胞を用いた *in vitro* 肝臓モデル. 慶應義塾大学先端研究セミナー(招待講演)2012年11月06日, 慶応大学生命科学研究所(山形県)
34. Tamai, M. and Y. Tagawa: *In vitro* recapitulation of the hepatic metabolism using *in vitro* liver model from murine ES/iPS cells. 3rd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2012年09月06日, Hofburg Congress Center (Vienna, Austria)
35. 玉井 美保, 田川 陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞由来 *in vitro* 肝組織構築における細胞極性とミトコンドリア能力の獲得. 第19回肝細胞研究会 2012年06月29日, 札幌医科大学(北海道)
36. 玉井 美保, 田川 陽一: マウス胚性幹/人工万能性幹細胞の *in vitro* 肝組織構築とその過程におけるミトコンドリア能力の獲得. 第11回日本再生医療学会総会 2012年06月12-13日, パシフィコ横浜(神奈川県)

〔図書〕(計 5件)

1. 玉井美保, 小池 亨, 田川 陽一: 肝組織構築における培養条件の設定とシステム開発. 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術: 動物細胞の培養を成功させる条件設定集: 技術情報協会. 第 9 章, 第 14 節 (2014) 総ページ: 584
2. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 霊長類 ES/iPS 細胞の凍結保存・輸送・解凍, 最新 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, (株)技術情報協会, p.504-508 (2014)

3. 田川陽一, 他 12 名: 生命理工系のための大学院基礎講座 生物化学 工学図書株式会社(2013) 総ページ: 187
4. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 霊長類 ES/iPS 細胞の凍結保存・輸送・解凍 「再生医療における臨床研究と製品開発」 技術情報協会 p.129-132 (2013)
5. 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: 霊長類 ES/iPS 細胞の凍結保存・輸送・解凍 「再生医療・細胞培養の開発状況」シーエムシー出版 p.89-96 (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3件)

1. 名称: 肝炎組織体、肝炎ウイルスの感染方法、肝炎組織体の製造方法、肝炎ウイルスの増殖方法、肝炎ワンクテンの製造方法、スクリーニング方法、およびキット
 発明者: 田川陽一、玉井美保、アンソンホ、鈴木哲朗、伊藤昌彦、中島謙治
 権利者: 東工大、浜松医科大
 種類: 特許
 番号: 特開 2015-173635(特願 2014-052754)
 出願年月日: 2014年03月14日
 国内外の別: 国内

2. 名称: 肝組織培養用デバイス、肝組織培養用システム、肝組織の培養方法及び肝機能の評価方法
 発明者: 藤山陽一、田川陽一
 権利者: 島津製作所、東工大
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2013/080207
 出願年月日: 2013年11月08日
 国内外の別: 外国

3. 名称: 細胞培養用デバイス、細胞培養用システム及び細胞培養方法
 発明者: 藤山陽一、田川陽一
 権利者: 島津製作所、東工大
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2014/060572
 出願年月日: 2014年4月14日
 国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1)研究代表者

田川 陽一 (TAGAWA, Yoh-ichi)
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授
 研究者番号: 70262079

(2)連携研究者

宮川 眞一 (MIYAGAWA, Shinichi)
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号: 80229806

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119004

研究課題名（和文）多要素からなる人工代謝経路の構築

研究課題名（英文）Construction of artificial metabolic pathway that is comprised of multiple genes

研究代表者

柘植 謙爾（TSUGE, Kenji）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任講師

研究者番号：70399690

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 64,200,000円

研究成果の概要（和文）：一連の代謝遺伝子群を連結した人工オペロンをどのようにデザインすればよいかを、特に遺伝子の人工オペロン内の連結順序に着目して、大腸菌が本来生産しないカロテノイド・アントシアニンといった色素性物質の代謝経路を具体例に取り上げて検証した。

その結果、グルコースからカロテノイドまでの一連の代謝経路を連結した人工オペロンプラスミドによりカロテノイドを生産する大腸菌の創出に成功した。また、*in vitro*の酵素反応で最適な酵素比率を求め、これに基づいたアントシアニンの人工オペロンを構築し、大腸菌に導入したところ、アントシアニンの生産に成功した。これらの結果より、人工オペロンの設計指針を示すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to elucidate how to design artificial polycistronic operon, especially in terms of gene order in the operon. We used carotenoid and anthocyanin biosynthetic pathway which don't exist in *Escherichia coli*.

As a result, we succeeded in construction of artificial carotenoid operon plasmid that is fully responsible for carotenoid production starting from glucose. We also succeeded in construction of artificial anthocyanin operon that is designed using information of optimal ration of responsible 4 enzymes by *in vitro* experiment. Through these case studies, we propose possible rule for construction of artificial operon.

研究分野：ゲノムデザイン学

キーワード：ゲノムデザイン 遺伝集積 オペロン 遺伝子発現制御 代謝工学

1. 研究開始当初の背景

生命活動は一次代謝経路 (= 基本代謝) および二次代謝経路 (= ヒトが利用できる生産物) に大別される。それぞれの経路はおおむね 10 を越える遺伝子で構成される。それぞれの代謝系を構成する遺伝子はゲノム中に経路ごとに整然と並んでいることは少なく、位置も方向もばらばらである。このばらばらな遺伝子群をひとまとめにして、それぞれの発現を最適化して別の適切な生産系に移植できれば、その応用展開は計り知れない。この方向性は、全く新しい遺伝子を組み合わせる合成生物学でのボトムアップ的アプローチである。

しかしながら現在の大腸菌を宿主とした遺伝子工学技術で同時に取り扱える遺伝子数はせいぜい数個にとどまっている。従って多数の遺伝子を効率よく集合させ実際に DNA として構築すること自体が困難であり、異なる宿主に経路ごと移植するのは至難の業である。しかし柘植らが独自に開発した枯草菌の遺伝子集積技術 OGAB 法 (引用文献、雑誌論文) はこのステップにブレイクをもたらした。

2. 研究の目的

OGAB 法を基盤技術として、細胞中 (in vivo) で実際に機能する人工遺伝子回路を合成生物学的観点でデザインする技術を発展させることを目的とした。特に、細胞中の代謝経路のような多因子の遺伝子が関与する複雑系において、各遺伝子の協調的な発現調節により定常的な代謝経路を機能させるための手法の確立を目標とした。具体的には大腸菌には本来存在しない代謝経路を対象に取り上げ、これらの代謝経路を構成する一連の遺伝子群を人工オペロン化し異種宿主細胞中で協調的に機能させるようにするための遺伝子の発現調節法の模索を行った。特に色素性化合物の (1) カロテノイド、(2) アントシアニンをアウトプットとしてモニターすることにより、その生産量の増大を指標に評価した。最終的に代謝経路の人工的な遺伝子回路のデザイン技術を確立めざした。

3. 研究の方法

代謝経路ごとに、バクテリアのゲノム中に良く見いだされる複数の遺伝子が 1 つの転写単位で転写されるポリシストロニックオペロン構造を人工的に設計するためにどのようにしたらよいかを検討した。特に、人工オペロン内で、遺伝子断片を、唯一のプロモーターの下流にどのような順序で連結すればよいかを調べるといった観点で行った。そのために、様々に単位遺伝子断片の連結順序を変更した人工オペロンを構築して、その機能性を評価した。これらの複雑な人工オペロンの構築については、枯草菌のプラスミド形質転換法で、一度に 50 個以上の DNA 断片が連結可能な OGAB 法により効率的に行った。

具体的な人工オペロンの題材については、その機能性の評価が容易な点から、大腸菌が本来生産しない色素性化合物の、(1) カロテノイドと、(2) アントシアニンを取り上げ、以下のように行った。

(1) カロテノイド

大腸菌はカロテノイドを生産しないが、その反応前駆体であるイソペンテニル 2 リン酸 (IPP) までの代謝経路は存在するため、これ以降のカロテノイド代謝経路の 5 つの遺伝子を大腸菌に導入することでカロテノイドの一種である、ゼアキサンチンを生産することが可能になる。一方、本来カロテノイドを生産しない大腸菌では、全ての代謝経路、具体的にはグルコースなどの炭素源から IPP に至るまでの解糖系と非メバロン酸経路が、カロテノイドの生産に最適化されているということはないので、これらの 2 つの代謝経路と、カロテノイド経路の 3 つの代謝経路に関わる一連の遺伝子群をカロテノイドの生産に適した形へのデザインを目指した。

まず、大腸菌の解糖系の各代謝経路の遺伝子を、文献データベースなどから選択した。複数のアイソザイム酵素が存在する代謝ステップについては、最も主要な働きをすると考えられる酵素遺伝子 1 つを選択する方法で、一連の代謝酵素遺伝子 10 個を選択した。これらの 10 個の単位遺伝子断片を、野生型の大腸菌中の対象遺伝子の mRNA 量を参考に、転写量の多い順に、ラムダファージ由来の Pr プロモーターに近くなるように OGAB 法を用いて連結した人工オペロン (mRNA 量順オペロン) を持つプラスミドを構築した。

構築した人工オペロンプラスミドを野生型の大腸菌に導入し、その後、大腸菌のゲノム DNA 中に存在するアイソザイムを含む全ての解糖系遺伝子を削除する方法により、ゲノム中の解糖系遺伝子が全くなく、プラスミド中の解糖系遺伝子により生存する大腸菌を構築した。

解糖系の遺伝子の連結順序を変更した人工オペロンについては、上述のゲノム中の解糖系遺伝子を全て削除した大腸菌の解糖系オペロンプラスミドを新しいオペロンと置換 (スワッピング) する方法により得た。

また、大腸菌ではなく、真核生物である出芽酵母の解糖系遺伝子についても、同様の方法により、11 個の一連の遺伝子群を選抜し、酵母人工解糖系オペロンを構築し、上述のゲノム中の解糖系遺伝子を全て削除した大腸菌の解糖系オペロンプラスミドとスワッピングすることにより得た。

非メバロン酸経路についても解糖系オペロンと同様に、代謝経路から 9 個の遺伝子を選択し、mRNA 量順オペロンを構築後、野生型の大腸菌に導入したのち、対応する反応ステップの全ての遺伝子を削除することにより行った。

大腸菌の非メバロン酸経路に対応する、酵

母のメバロン酸経路についても9個の一連の遺伝子群を選抜し、人工酵母メバロン酸経路オペロンを構築し、上述のゲノム中の非メバロン酸経路遺伝子を全て削除した大腸菌の人工非メバロン酸経路オペロンプラスミドと人工酵母メバロン酸経路オペロンプラスミドをスワッピングすることにより得た。

カロテノイドの人工オペロンについては、既に作成済みのものを利用した(引用文献)

これらのオペロンを連結して1つのプラスミドにする工程も OGAB 法により行った。得られたオペロンプラスミドをまず、ゲノム中の解糖系遺伝子を全て削除した大腸菌に導入後、非メバロン酸経路遺伝子群を完全に削除することにより行った。

(2) アントシアニン

アントシアニンは植物のみが合成し、一次代謝産物であるフェニルアラニンからアントシアニン的一种であるペラルゴニジンに至る経路には9段階の生合成ステップで合成される。途中の中間代謝物質としてナリングニンが知られているが、ナリングニンまでを生産する大腸菌は既に構築されており、ナリングニンを境として、前半と後半の代謝経路に分割して取り組んだ。

ナリングニンからペラルゴニジン-0-グリコシドまでの経路は、4つの酵素(F3H, DFR, LDOX, 3-GT)が必要であるがこれらの酵素の必要量比が不明なため、まずはこれを求めるために、シロイヌナズナから対応遺伝子をクローニングし、大腸菌でタンパク質を生産させ、これらを精製した。様々な量比で4つの酵素を *in vitro* 反応系に導入し、最終産物のペラルゴニジン-0-グリコシドと、その代謝ステップ手前の産物であるペラルゴニジンの生産量を調べた。

4. 研究成果

(1) カロテノイド

大腸菌遺伝子を用いた人工解糖系オペロンの遺伝子の連結順序の異なるオペロンを170種類以上構築し、ゲノム上の解糖系遺伝子群を全て削除した大腸菌に導入した。得られた大腸菌株を、グルコースを唯一の炭素源とする培地での比増殖速度を指標にオペロンの機能性を検証した。その結果、最初に構築した mRNA 量順の人工解糖系オペロンが野生株とほぼ同等の比増殖速度を示したのに対して、その他の配列のうち、mRNA 量順と近い順番で連結されている一部のものが、同じように野生株並みに増殖するという例外を除いて、概ね、野生株で mRNA 量が多い遺伝子がプロモーターから遠い場所に動くほどに増殖速度が遅くなる傾向が観察された。

この現象を詳細に調べるために、人工オペロンを持つ各大腸菌株の解糖系遺伝子の mRNA 量とタンパク質量を詳細に調べたところ、プロモーターから離れるにしたがって概

ね単調に減少することが確認され、また、mRNA とタンパク質量との間では、遺伝子の種類ごとにではあるが、ほぼ正比例することが判明した。また、mRNA 量順の人工解糖系オペロンを持つ大腸菌の解糖系タンパク質量は、他の人工解糖系オペロンのタンパク質量と比較して極めて野生株大腸菌の解糖系のタンパク質量に近い存在量を示し、野生型に近いタンパク質の発現量に制御すれば、野生型大腸菌と同じように機能させることが可能であることが判明した。

解糖系は、生物にとって広く普遍的な代謝経路であるため、大腸菌以外の遺伝子であっても、人工オペロンの知見を利用して、各酵素の発現量を最適化できれば大腸菌以外の遺伝子からなる解糖系を大腸菌中に再現可能であると考え、真核生物である酵母遺伝子による人工解糖系オペロンの構築を試みた。酵母内の各遺伝子の発現量を文献により調べたところ、対応する大腸菌遺伝子とほぼ同等の発現順位であったため、大腸菌の mRNA 量順と同様の遺伝子連結順序の酵母人工解糖系オペロンを OGAB 法により構築した。これをゲノム中の解糖系遺伝子を全て削除した大腸菌の解糖系オペロンプラスミドとスワッピングすることにより得て、グルコースを唯一の炭素源とした最少培地で増殖したところ、比増殖速度で野生株大腸菌の半分程度ではあったが、解糖系として機能することが判明し、人工オペロンの有効性を示すことに成功した。

次に、大腸菌の非メバロン酸経路の9遺伝子についても、mRNA 量順に遺伝子を連結した人工オペロンを構築し、これを用いて遺伝子削除を行った。しかしながらゲノム中の遺伝子のうち *dxr* 遺伝子については、mRNA 量順の人工オペロンを持ってゲノムから削除できなかったため、*dxr* 遺伝子の発現量が少ないためであると考え、mRNA 量順の8番目の位置にある *dxs* 遺伝子を先頭に移動することで発現量の増強を期待した mRNA 量順オペロンを作製したところ、こちらは全てのゲノム中の非メバロン酸経路遺伝子の除去を完了することができた。

このように作成したゲノム中の全ての非メバロン酸経路遺伝子を削除した大腸菌を用いて、途中経路は異なるが、最終代謝産物が同一となる、酵母のメバロン酸経路に変換するべく、解糖系と同様に酵母のメバロン酸経路についてオペロンを構築した。複数の人工オペロンの試行を経て、最終的に野生型の大腸菌とほぼ同等の機能性を示す、酵母人工メバロン酸経路オペロンを構築すること成功した。

大腸菌の人工解糖系オペロンと非メバロン酸人工オペロンと、人工カロテノイドオペロンを連結して、一連の代謝経路からなる人工オペロンプラスミドを構築して、その後対応するゲノム中の遺伝子を全て欠損した。グルコースを唯一の炭素源とした最少培地で

培養したところ、特にプラスミドの保持のための抗生物質などの選択圧を入れることなく培養しても、人工オペロンプラスミドが脱落することなく、ゼアキサンチンを生産した。

その後、大腸菌の遺伝子のオペロンを全て酵母の遺伝子のオペロンに置換することを試みた。しかしながら、酵母人工解糖系オペロンを有する人工オペロンプラスミドは増殖が非常に遅かったため、ゼアキサンチン生産用宿主としては、大腸菌人工解糖系オペロンと、酵母人工メバロン酸オペロン、人工カロテノイドオペロンを連結したオペロンプラスミドを持つ大腸菌を選択した。

大腸菌の非メバロン酸経路と、酵母のメバロン酸経路の最終代謝産物は IPP であるが、出発物質が異なっており、非メバロン酸経路では、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸を用いるのに対して、メバロン酸はピルビン酸からさらに反応したアセチル CoA と異なっている。この時点で存在する大腸菌は、非メバロン酸経路を利用するにあたっては、ゲノム中の遺伝子を使うことなく、人工オペロンプラスミド中の遺伝子に頼ってゼアキサンチンを生産するが、メバロン酸経路を利用する場合は、宿主ゲノムのピルビン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子群を利用しているので、この遺伝子群についても、人工オペロンプラスミドに搭載し、その後、ゲノムから削除した。

得られた大腸菌は、ゲノム中のグルコースからアセチル CoA を経由して、IPP に至る一連の遺伝子群を欠損し、大腸菌解糖系オペロン、酵母メバロン酸経路オペロン、大腸菌メバロン酸デヒドロゲナーゼオペロン、カロテノイドオペロンの一連の 28 遺伝子からなる人工オペロンにより生育し、カロテノイドを生産した (図 1)。その生産量は過去の論文で知られる最大生産量に匹敵する 2mg/dcw-g 程度のゼアキサンチンを生産し、多数の遺伝子の発現量を協調的に制御することに成功した。

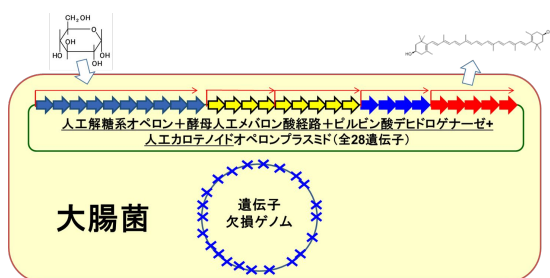


図 1 グルコースからゼアキサンチンまでの一連の代謝経路を人工オペロンプラスミドを持つ大腸菌

(2) アントシアニン

アントシアニンの生産に必要な、後半経路の遺伝子群のそれぞれの発現量のデータがなかったため、invitro 試験により、最適な酵素比率を求めることを行った。まずは、4

つの酵素 (F3H, DFR, LDOX, 3-GT) を精製し、人工オペロンでのプロモーターからの距離が遠くなるほどに発現量が減少する様子をまねるために、最も量の多い酵素のモル比率を 100% としたときに、2 番目以降の酵素のモル比が順次 80% となるように等比的に減少させる invitro 反応系 24 個を準備した。ここに基質となるナリンゲニンを加えて反応を行い、ペラルゴニジン - O - グリコシドとその一つ手前の色素のペラルゴニジンについて生産量を調べた。何れも、F3H, DFR, LDOX, 3-GT の順番に連結するものが最も生産量が多いことを確認した。

この結果を検討したところ、3-GT がなくとも色素のペラルゴニジンを生産することから、反応系を簡単にするために、3-GT を除いて、F3H, DFR, LDOX の順にプロモーターに連結した人工オペロンを構築し、これを発現誘導可能な大腸菌により遺伝子発現したところ、ペラルゴニジンの生産により菌ペレットをわずかに赤く染めることに初めて成功し、人工オペロンの有効性を示すことに成功した (図 2)。

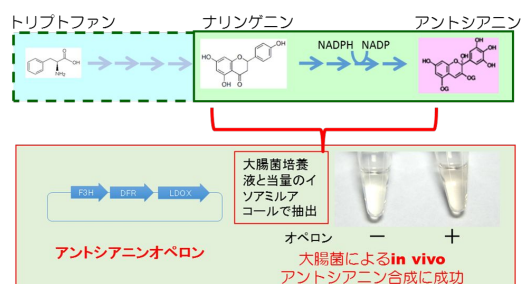


図 2 invitro 解析より得られた結果を元に構築したアントシアニンオペロンによるアントシアニン生産の確認

次に、ここで作成した人工オペロンを削らな作成した 5 遺伝子によりチロシンからナリンゲニンを生産する大腸菌 (引用文献) に導入したところ、ごく微量のペラルゴニジンを検出した。この低生産の理由を 3 種類のプラスミドが 1 つの大腸菌の中に共存することであると考え、これらの 3 つのプラスミドに分散している遺伝子 8 個を、OGAB 法により 1 つの人工オペロンプラスミドに集積したが、残念ながら、顕著なペラルゴニジンの生産は認められなかった。

<引用文献>

Tsuge, K., Matsui, K., and Itaya, M. One step assembly of multiple DNA fragments with a designed order and orientation in *Bacillus subtilis* plasmid. *Nucleic Acids Res.* 31, e133 (2003)

Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N., and Yanagawa, H. Metabolic engineering of carotenoid

biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1355-1361 (2007)

Miyahisa, I., Kaneko, M., Funa, N., Kawasaki, H., Kojima, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Appl. Microb. Biotech.*, 68, 498-504 (2005)

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 7 件)

柘植謙爾、板谷光泰 第二世代 OGAB 法が可能にした 50 個以上の DNA 断片集積バイオサイエンスとインダストリー 73, 471-475 (2015) 査読無
http://www.jba.or.jp/pc/archive/2015/vol73_no6_1.html

柘植謙爾、板谷光泰 枯草菌を用いた遺伝子集積法の OGAB 法による長鎖 DNA 合成 日本生物工学会誌 93, 527-529 (2015) 査読無

Tsuge, K., Sato, Y., Kobayashi, Y., Gondo, M., Hasebe, M., Togashi, T., Tomita, M., Itaya, M. Method of preparing an equimolar DNA mixture for one-step DNA assembly of over 50 fragments. *Scientific Reports*, 5, 10655 (2015) 査読有 doi: 10.1038/srep10655

Chen, S-K., Chin, W-C., Tsuge, K., Huang, C.C., Li, S-Y. Fermentation approach for enhancing 1-butanol production using engineered butanogenic *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 145, 204-209 (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.115

板谷光泰、柘植謙爾 長鎖 DNA の合成と合成生物学での活用 日本生物工学会誌 91, 319-321 (2013) 査読無

Hiroe, A., Tsuge, K., Nomura, C. T., Itaya, M., Tsuge, T. Rearrangement of gene order in the *phaCAB* operon leads to effective production of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia*

coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3177-3184 (2012) 査読有 doi: 10.1128/AEM.07715-11

柘植謙爾、板谷光泰 ゲノムビルダーおよびゲノムデザイナーとしての枯草菌 日本生物工学会誌 90, 280-283 (2012) 査読無

[学会発表](計 37 件)

柘植謙爾 “ゲノムデザインにおける合成生物学の現状” JBA「合成生物学セミナー」-最近の科学技術動向と合成生物学を取り巻く課題について 2015年3月5日 「鉄鋼会館(東京都中央区)」

柘植謙爾 “OGAB法を用いたボトムアップ型ゲノムデザイン戦略” 合成生物シンポジウム 2014年11月26日 「神戸大学(兵庫県神戸市)」

柘植謙爾 “Designing of metabolic pathway by operon strategy” For Innovative Biorefinery in Beijing 2013 2013年10月21日 「北京市(中国)」

柘植謙爾 “Construction of metabolic pathways that are comprised of multi-genes by operon strategy” CBI学会 2013年10月30日 「タワーホール船堀(東京都江東区)」

柘植謙爾 “合成生物学の手法による多要素からなる生物システムの再構築” 第85回日本生化学会大会 2012年12月16日 「福岡国際会議場(福岡県福岡市)」

柘植謙爾 “人工オペロンによるボトムアップ型ゲノムデザイン” 第3回新規材料創製を目指した合成生物学シンポジウム 2012年11月16日 「理化学研究所(埼玉県和光市)」

柘植謙爾 “Construction of metabolic pathway by artificial operon” The 5th International Conference on Industrial Bioprocesses (IFIB-2012) 2012年10月9日 「台北市(台湾)」

柘植謙爾 “Investigation of design rule for artificial operon toward whole genome design” 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012) 2012年9月17日 「大邱市(韓国)」

柘植謙爾 “オペロン戦略による代謝経路の構築” 第44回日本化学工学会秋

季大会 2012年9月20日「東北大学
(宮城県仙台市)」

柘植 謙爾 "Genome construction
technology and genome design" 14th
A-IMBN Annual Conference: Life
Science and Frontiers of Biorefinery
Technology、2012年3月1日「パトゥ
ムターニー(タイ)」

〔図書〕(計 4 件)

板谷光泰、金子真也、柘植謙爾 Chapter 4
Efficient and accurate production of
de novo designed large-size gene
clusters by a novel *Bacillus*
subtilis-based system. In *Microbial*
Production, Anazawa, H., and Shimizu,
S. eds. Springer 全 306 ページ
(pp.35-52)(2014)

板谷光泰、柘植謙爾 Chapter 9 Genome
integrity, instability and
construction In *Escherichia coli* and
Bacillus subtilis; the frontiers of
molecular microbiology revisited,
Sadaie, Y., and Matsumoto, K. eds.
Research Signpost 全 362 ページ
(pp.297-318)(2012)

柘植謙爾、板谷光泰 第1章ゲノムから
の視点「ゲノム再構築技術の応用と課
題：汎用性，迅速性，コスト」(pp1-9)
合成生物学の隆起 有用物質の新たな
生産法構築をめざして シー・エム・
シー出版 全 227 ページ(pp.1-9)(2012)

柘植謙爾(他共同執筆者多数)ひらく、
ひらく「バイオの世界」14歳からの生物
工学入門 日本生物工学会編 全 169 ペ
ージ (pp.146-147)(2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：単位 DNA 組成物の調製方法及び DNA 連
結体の作成方法

発明者：柘植謙爾、板谷光泰

権利者：高機能遺伝子デザイン技術研究組合

種類：特許出願

番号：PCT/JP2014/073579

出願年月日：平成 26 年 9 月 5 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.syn-biol.com/research/group03.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柘植 謙爾 (TSUGE, Kenji)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特
任講師

研究者番号：70399690

(2)連携研究者

板谷 光泰 (ITAYA, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・教
授

研究者番号：60374013

(3)研究協力者

吉積 毅 (YOSHIKUMI, Takeshi)

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119501

研究課題名（和文）藻類ファージの生活史をまねた多元代謝経路によるアルカン高生産系の構築

研究課題名（英語）Construction of a multi-step metabolic pathway for high productivity of alkane by mimicking the life cycle of cyanophage

研究代表者

鈴木石根（鈴木石根） 筑波大学・生命環境系・教授

研究成果の概要

微細藻類は陸上植物と比べて油脂生産性が高いため、少ない面積で油脂の高い収量が期待できること、十分な水が得られれば食糧生産と競合しないなど利点が多い。そのため再生可能エネルギーの獲得のために大いに注目を集めている。しかしながら、光合成により固定した炭素を物質生産に振り向けるため細胞の増殖を制限したり、産物の毒性等により生育が阻害されたりして十分な生産性を発揮できない現実がある。また、細胞を回収し細胞内から産物を抽出したりする手間とコストも少なくない。本研究では、天然に存在するシアノバクテリアのファージの生活環に習い、細胞増殖のフェーズに続いて代謝を人工的なセンサーにより制御し、増殖から物質生産に切り替え、最終的に細胞を溶菌して産物を回収できる系の構築を目指した。水に不溶なガス状の分子をシグナルとする人工的なセンサーの構築を目指した。助成期間中はエチレンのセンサーの構築を目指したが、シロイヌナズナの5種のエチレンセンサーとシアノバクテリアのリン酸欠乏センサーのキメラセンサーのうち、3つは構成的に活性型で、2つは構成的に不活性型であった。そこで、*Pseudomonas* のトルエンを認識するセンサーTodSのキメラを作製することにより、トルエン応答性のセンサーを構築することができた。また、ファージの溶菌酵素をリン酸欠乏条件で誘導する細胞を作製し、リン酸欠乏条件で溶菌する株の作出に成功した。

研究分野：合成生物学

キーワード：ヒスチジンキナーゼ、シアノバクテリア、エチレン、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

微細藻類は石油代替物質となりうる高純度の油脂生産の細胞工場として期待されていたが、生産コストの面で実用段階には至っていない。細胞の培養・回収・抽出・改質の各段階での技術開発が必要である。我々は生産性を高めて生産コストを低減し、実用化に近づけるため細胞の増殖と物質生産を代謝の切換により振り分けること、細胞内に蓄積した産物を細胞の自発的な溶菌により細胞外へ回収するシステムの構築を目指した。当時明らかとなったシアノバクテリアのファージは、子ファージの生産のため感染した細胞の光合成活性を抑制し、酸化のペントースリン酸経路を促進してヌクレオチド合成を促進し、最終的に細胞壁を溶菌して子ファージを培地中に放出する仕組みを有していた。この仕組みを模倣し、人工的なセンサー分子を開発して代謝を切り替えること、ファージの溶菌遺伝子を発現して細胞内の物質を培地中へ放出する系の構築を目指した。

2. 研究の目的

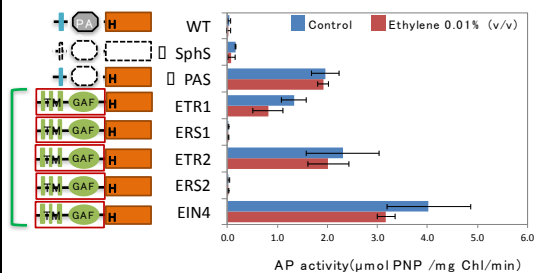
以前から、シアノバクテリアのフォトリセプターのシアノバクテリオクロームを改変して、特殊な波長の光でスイッチングするセンサー分子や、重金属イオンの排出系を制御するセンサーを改変したセンサーが開発されていた。しかしながら、光のセンサーは最も安価な太陽光を培養に用いることができず、完全に人工光での培養を行う必要があるため現実ではないと判断した。また、重金属イオンは一旦培地に添加すると除去することは現実的には不可能で、一方方向の一度だけの制御しかできないという欠点があった。そこで我々は水に不溶なガス状の分子をシグナルとして利用できる人工センサーの構築を目指した。また、ファージの溶菌酵素遺伝子をシアノバクテリアで制御できるようにし、外部からの刺激により溶菌できる系の開発を行った。

3. 研究の方法・成果

①エチレンに応答する人工センサーの開発

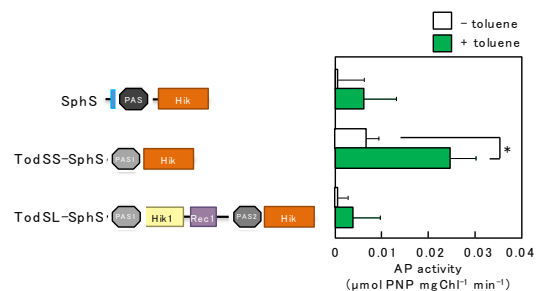
水に不溶なガス状分子としてまず対象としたのは、エチレンである。エチレンは植物ホルモンとしてよく知られ、そのセンサーはシロイヌナズナでは5種類存在し、ヒスチジンキナーゼと類似のタンパク質であることが分かっていた。5種のエチレンセンサー(ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4)のシグナル検知ドメインとシアノバクテリアのリン酸欠乏センサーのキナーゼドメインとを融合したキメラタンパク質遺伝子を構築し、シアノバクテリアの染色体上に相同組み換えで導入し、リン酸欠乏センサーのプロモーターで発現制御できるようにした。その結果、ETR1, ETR2, EIN4の3種のキメラセンサーは

構成的に活性を有し、エチレンの添加の有無にかかわらず下流の遺伝子の発現を誘導した。一方、ERS1, ERS2のキメラセンサーは、構成的に不活性型であり、エチレンの添加によっても遺伝子発現の制御はできなかった。エチレンセンサーのシグナル検知ドメインには、3つの膜貫通ドメインとGAFドメインが存在する。ETR1とERS1のそれぞれのドメインの交換やポイントミューテーション、シグナル検知ドメインとキナーゼドメインのリンカー領域の長さを改変するなど多様な試みを行ったが、いずれもポジティブな結果が得られなかった。



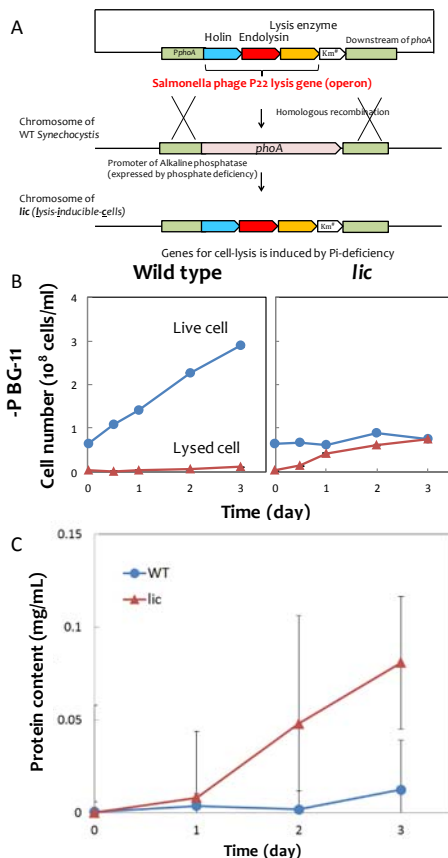
②トルエン応答性のセンサーの開発

エチレンのセンサーが思い通りに進まなかったため、別のガス状分子のセンサーに着目し、トルエン資化能を持つ *Pseudomonas putida* のトルエンセンサーTodSに着目した。TodSは分子内にPAS-Hik-Hpt-PAS-Hikとヒスチジンキナーゼをタンデムに有している。上流のPASドメインはトルエンを結合することが示されている。下流のPASドメインの機能は明らかではなかったが、Hik-Hpt-HikとHis-Aspリン酸基転位が起こり、シグナルの増幅や調節に関わっているものと推定されていた。そこで、我々は上流のPASドメインにシアノバクテリアのリン酸欠乏誘導性センサーのキナーゼを融合したキメラセンサーと、下流のHikドメインを置き換えたキメラセンサーの2種を作成し、シアノバクテリア細胞に導入した。その結果、上流のPASドメインとの融合センサーは、トルエンに応答し下流の遺伝子発現を制御できた。これはラン藻細胞内でガス状の分子によって遺伝子発現を制御した最初の例である。トルエンによる遺伝子発現は30時間まで連続して活性化が起こり、トルエンの暴露を停止すると発現は停止した。



③細胞溶菌系の開発

サルモネラ菌のファージの溶菌酵素遺伝子をシアノバクテリアのリン酸欠乏応答性プロモーターでドライブし、リン酸欠乏条件下で細胞の溶菌を誘導するシステムを構築した。この細胞をリン酸欠乏条件下で培養すると、2日間で約50%の細胞が死滅することがわかった。その後、死細胞からリン酸化合物が遊離するためか、死細胞の割合は低下した。溶菌の課程で細胞内のタンパク質が培地中に放出されることが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計17件)

- ① Hirokawa Y, Suzuki I, Hanai T. Optimization of isopropanol production by engineered cyanobacteria with a synthetic metabolic pathway. *J. Biosci. Bioeng.* 査読有 Vol. 119, 2015, 585-590. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.005.
- ② Osanai T, Shirai T, Iijima H, Kuwahara A, Suzuki I, Kondo A, Hirai MY. Alteration of cyanobacterial sugar and amino acid metabolism by overexpression hik8, encoding a KaiC-associated histidine kinase. *Environ. Microbiol.* 査読有 Vol. 17, 2015, 2430-2440. doi: 10.1111/1462-2920.12715.

- ③ Nanatani K, Shijuku T, Takano Y, Zulkifli L, Yamazaki T, Tominaga A, Souma S, Onai K, Morishita M, Ishiura M, Hagemann M, Suzuki I, Maruyama H, Arai F, Uozumi N. Comparative analysis of kdp and ktr mutants reveals distinct roles of the potassium transporters in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 査読有 Vol. 197, 2015, 676-687. doi: 10.1128/JB.02276-14.
 - ④ Kotajima T, Shiraiwa Y, Suzuki I. Functional analysis of the N-terminal region of an essential histidine kinase, Hik2, in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 査読有 Vol. 351, 2014, 88-94. doi:10.1111/1574-6968.12346.
- その他に6編の論文有

〔招待講演〕(計80件)

- ① 鈴木石根、微細藻類を活用した下水からの炭化水素生産に向けて、第38回日本分子生物学会年会、2013.8.2、仙台市市民フォーラム(宮城県・仙台市)
- ② 鈴木石根、微細藻類を用いた有用バイオマスの生産に向けて、富山経済同友会セミナー、2015.8.6、オークスカナルパークホテル富山(富山県・富山市)
- ③ Iwane Suzuki, Algae Energy Projects for Tohoku Recovery Combination of heterotrophic and autotrophic alga for treatment of waste water in Sendai, International Symposium on Algal Biomass, 5 Sep. 2013, Nomura Conference Plaza, Tokyo, Japan
- ④ 鈴木石根、微細藻類を用いた炭化水素生産の現状と課題、環境資源工学会 第131回例会-茨城から発信する環境・エネルギー技術-2013.10.24.産総研(茨城県、つくば市)
- ⑤ 鈴木石根、藻類バイオマスの実用化に向けた取り組みと課題、エコプロダクツ2013.12.14.東京ビッグサイト(東京都)
- ⑥ Iwane Suzuki, Functional analyses of histidine kinases by expression of fusion sensors and its utilization for artificial sensors to regulate gene expression in cyanobacteria, Indo-Japan Binational Seminar University of Hyderabad, 2013.12.16-18. Hyderabad, India.
- ⑦ Iwane Suzuki, Botryococcus's Potential for Biofuel Production., 2009.9.30. 2nd Algae World Asia, Bangkok, Thailand
- ⑧ 鈴木石根、藻類を用いたバイオマス生産の現状と将来展望、国土交通省、LFPI 環境エネルギー講演会、2014/5/23、東

- 京都
- ⑨ Iwane Suzuki, Functional Study of Histidine Kinase and Regulation of Gene Expression by Artificial Sensors in Cyanobacteria, Japan-Finland 2014, 2014. 10. 9-14. Sapporo Japan.
- ⑩ Iwane Suzuki, Functional Analysis of Histidine Kinase by Expression of Chimeric Kinase in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Cyanofactory, 2015. 3. 5-6. Tokyo Univ. Agric. Tech.
- ⑪ Iwane Suzuki, Construction of novel sensors for modification of metabolism in *Synechocystis*. German-Japanese Binational Seminar 2015. 3. 21-26. Atami Japan
- ⑫ Iwane Suzuki, Construction of novel sensors for modification of metabolism in *Synechocystis*. NCAP 2015. 3. 25-27. Narai Hotel, Bangkok, Thailand
- ⑬ Iwane Suzuki, Development of chimeric sensor to analyze function of histidine kinases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Photosynthesis Research for Sustainability in honor of Dr. George C. Papageorgiou, 2015. 9. 21-26. Crete, Greece
- ⑭ Iwane Suzuki, Development of integration technology of algae biomass production and water treatment process. ISAB 2015, 2015. 11. 7, Tokyo
- ⑮ Iwane Suzuki, Development of novel sensor functioning in *Synechocystis* cells using *Arabidopsis* ethylene sensor. Global Strategy for Algal Biomass for Bioenergy and Biorefinery; PacifiChem 2015, 2015. 12. 18-19, Honolulu, USA
- ⑯ 鈴木石根、東北復興次世代エネルギー研究開発プロジェクト微細藻類のエネルギー利用について、2016. 8. 23 地球環境技術推進懇談会水再生バイオソリッド研究会、大阪科学技術センター(大阪市)
- ⑰ Iwane Suzuki, Production of the Cyclopropane Fatty Acids and the C16 Unsaturated Fatty Acid in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, IMBC2016, 30 Aug. 2016, Baltimore, USA
- ⑱ Iwane Suzuki, Production of Novel Fatty Acids in the Model Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, TGSW2016, 19 Sep. 2016, Tsukuba Epochal, Tsukuba, Japan
- ⑲ Iwane Suzuki, Development of the novel cyanobacterial strains producing

novel fatty acids and expressing the inducible cell-lysing system, APCAB2016, 15 Nov. 2016, Bangkok, Thailand

〔図書〕(なし)

〔産業財産権〕

○出願状況(なし)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木石根 (SUZUKI, Iwane)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10290909

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119502

研究課題名（和文）蛋白質間相互作用原理に基づく多数遺伝子の逐次的オン・オフ転写制御系の開発

研究課題名（英語）Construction of system for transcriptional on-off-regulation of multi genes based on protein-protein interaction

研究代表者

朝井計（Kei Asai） 埼玉大学・理工学研究科・准教授

連携研究者

吉川博文（Hirofumi Yoshikawa） 東京農業大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究成果の概要

合成生物学の観点から、細胞に人工的に導入した数十あるいは百以上の多数の遺伝子の発現をより細やかに制御するためには、転写のオン・オフを速やかに行える可逆的なシグナルによる複数の転写制御系が必要であるが、現在までのところその数も質も足りていない。そこで細菌の ECF シグマ因子転写制御系群を利用した、環境変化シグナルに応答して遺伝子の転写を誘導する系の構築を行った。まずは、枯草菌の 7 つの ECF シグマ因子の中でも、 σW -YbbM（アルカリ性応答）と σM -YhdK（酸性応答）の 2 つの転写制御系のみを有する枯草菌株を構築した。この株を培養し、培養中の培地の pH を中性からアルカリ性→酸性→中性と変化させた。中性からアルカリシフトで σW -YbbM 系のオンのみがおこり、その後酸性にシフトすることで、 σW -YbbM 系のオフと同時に σM -YhdLK 系のオンという転写制御の逐次的なスイッチが起こることを確認した。また、枯草菌以外の細菌の ECF シグマ因子転写制御系として、放線菌の酸化ストレス応答系 SigR-RsrA、を枯草菌に導入して、異種間導入により制御系の種類を増やした。

研究分野：ゲノム遺伝学

キーワード：転写制御 遺伝子 細菌

1. 研究開始当初の背景

これまでに微生物による異種遺伝子群の発現例はあるが、かけ離れた生物種（例えば真核生物やアーキア）の遺伝子を細菌に複数導入し発現させ、協調的に機能させ、働かせた例はまだない。

それは、多数の遺伝子を効率的に簡便に導入することに手間がかかること。導入できたとしても、生物種によって遺伝子発現の様式が異なり、宿主と適合させるのが難しいこと。仮に発現できたとしても、複数の遺伝子を協調的に発現させるには、多種多様な遺伝子制御系を有する宿主が必要だからである。

合成生物学の観点から、細胞に人工的に導入した数十あるいは百以上の多数の遺伝子の発現をより細やかに制御するためには、転写のオン・オフを速やかに行える可逆的なシグナルによる複数の転写制御系が必要であるが、現在までのところその数も質も足りていない。

2. 研究の目的

数十あるいは百以上の多数の遺伝子を細胞に人工的に導入し、その遺伝子発現を、より細やかに制御することは合成生物学において必須であるが、そのためには発現制御系が、多種類必要である。細菌のシグマ因子サブファミリーの ECF シグマ因子には 1) ECF シグマ因子に特異的に結合して、単純な蛋白質間相互作用の原理に基づいて、対応する ECF シグマ因子の転写誘導活性を制御する抗シグマ因子蛋白質がある、2) 抗シグマ因子は膜蛋白質で、環境ストレスに反応して ECF シグマ因子の活性を制御する、などの有用な特徴がある。形質転換による外来遺伝子の導入が容易な枯草菌を宿主として用い、誘導条件（温度、pH、酸化等の環境ストレス）の異なる複数の ECF シグマ因子-抗シグマ因子制御機構によって、細胞内に導入した多数の遺伝子群の転写のオン・オフを、逐次的に、独立に制御することが可能なマルチ転写制御系の構築を試みる。

3. 研究の方法

枯草菌にはもともと 7 つの異なる ECF シグマ因子-抗シグマ因子制御機構がある。全ての ECF シグマ因子を除いた破壊株を基礎となる宿主細胞とすることで、不必要な転写制御系の邪魔無く必要な複数の ECF シグマ因子-抗シグマ因子系のみによるクリアな遺伝子発現制御系の構築を試みる。

導入する ECF シグマ因子-抗シグマ因子系にはまず、これまでに解析のよく行われている枯草菌の、 σM -YhdKL (酸性応答)、 σW -YbbM (アルカリ性応答)、 $\sigma Y1aC$ -Y1aCD (酸化応答)、 σI -YkrI (高温応答) 等を用いる。これらの環境応答シグナルはインプットしたのちに初期状態にリセットすることが容易である。

それぞれの ECF シグマ因子に特異的に制御されるプロモーターDNA 配列を、 β ガラクトシダーゼや β グルクロニダーゼ等の分解酵素レポーター遺伝子と融合し基質の分解活性によって発現制御状態をモニターする。また、GFP や RFP 等の蛍光蛋白質遺伝子との融合遺伝子を作製し、初年度購入予定の微量吸光・蛍光光度計・スペクトロメーターやフローサイトメーターを利用して、蛍光強度を指標としてモニターする。

まずは単独の ECF シグマ因子-抗シグマ因子系がそれぞれの環境応答シグナルを導入、その後除去することによって、対応する制御融合遺伝子の転写がもくろみ通りオン・オフされるかを解析する。その後複数の ECF シグマ因子-抗シグマ因子系を同時に細胞内に導入し、それぞれ異なるレポーター遺伝子との制御融合遺伝子を用いて、誘導条件を変化させることで、転写制御のオン・オフ、スイッチが可能な逐次的多段階転写制御系の構築を試み、実際に動作確認を行う。

枯草菌の ECF シグマ因子-抗シグマ因子系だけでは、解析の進んでいないものも多く、数に限りがあるので、他の細菌の系の枯草菌への転用を目指す。端緒として、酸化-還元状態に反応する放線菌の酸化ストレス応答系 SigR-RsrA 系を枯草菌に異種導入し、前述の方法で動作確認を行う。

これらの誘導条件の異なる複数の ECF シグマ因子転写制御系を一度に枯草菌染色体上に導入して、誘導条件を変化させることで、転写制御のオン・オフ、スイッチが可能な逐次的多段階転写制御系の構築を試みる。

遺伝子集積技術 (OGAB 法) を用いて多数の遺伝子を 1 段階で集積させ、これを枯草菌の染色体上に組み込ませる。具体的にはアーキアの脂質合成系遺伝子群を枯草菌染色体上に導入し、これと枯草菌の脂質合成系遺伝子群を対象として、構築された逐次的多段階転写制御系によって実際に転写制御を行い、その動作確認を行う。

4. 研究成果

枯草菌の 7 つの ECF σ 因子を全て除いた破壊株を宿主細胞とし、不必要な転写制御系の邪魔無く必要な複数の ECF σ 因子-抗 σ 因子系のみによるクリアな遺伝子発現制御系の構築を初めて行った。導入する転写制御系は、 σW -YbbM (アルカリ性応答)、 σM -YhdKL (酸性応答) を用いた。それぞれの ECF σ 因子に特異的に制御されるプロモーターDNA 配列を、レポーター遺伝子と融合し、レポーターの活性によって発現制御状態をモニターした。 σW -YbbM のみを有する株では、pH が中性でも σW が構成的に活性化した。一方 σM -YhdKL と σW -YbbM を共存させたところ、 σW の活性は野生株のレベルまで減少した。この原因を究明すれば、 σW -YbbM の制御機構の解明につながる可能性がある。

この株を用い、培地の pH をアルカリ側にシフトすると σ^W の活性化がみられ、転写のオンが起きることをレポーター活性測定により確認した。また、この時 σ^M は活性化せず、シグナルの特異性も確認した。

また、枯草菌以外の細菌の ECF シグマ因子転写制御系として、放線菌の酸化ストレス応答系 SigR-RsrA、を枯草菌に導入して、異種間導入により制御系の種類を増やした。

遺伝子集積技術 (OGAB 法) を用いてアーキアの脂質合成系遺伝子群を 1 段階で枯草菌を用いてプラスミド上に集積させた。さらにこれを枯草菌の染色体上に組み込ませた。アーキアの膜脂質を枯草菌で合成させるためには、アーキアの脂質合成系遺伝子群と枯草菌の脂質合成系遺伝子群の転写を制御する必要がある。構築された逐次的多段階転写制御系はそのための有効な制御系となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Hashimoto M, Seki T, Matsuoka S, Hara H, Asai K, Sadaie Y, Matsumoto K, Induction of extracytoplasmic function sigma factors in *Bacillus subtilis* cells with defects in lipoteichoic acid synthesis, *Microbiology*, 査読有, Vol. 159, 2013, 23-35
DOI: 10.1099/mic.0.063420-0.
- ② Inoue H, Suzuki D, Asai K, A putative bactoprenol glycosyltransferase, CsbB, in *Bacillus subtilis* activates SigM in the absence of co-transcribed Yfh0. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有 Vol. 436, 2013, 6-11,
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.064.
- ③ Yamamoto T, Obana N, Yee LM, Asai K, Nomura N, Nakamura K, SP10 infectivity is aborted after bacteriophage SP10 infection induces *nonA* transcription on the prophage SP β region of the *Bacillus subtilis* genome. *J Bacteriol*, 査読有 Vol. 196, 2014, 693-706.
DOI: 10.1128/JB.01240-13.

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① 朝井計、細菌のシグマ因子の多様性の意義解明への遺伝学的アプローチ、日本遺伝学会第 84 回大会 (招待講演)、2012 年 09 月 24 日~2012 年 09 月 26 日、九州大学医学部 (福岡県福岡市)
- ② 朝井計、枯草菌 SigI による定常期における細胞維持機構の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 24 日~2013 年 03 月 28 日、東北大学 (宮城県・仙台市)
- ③ Asai Kei, Alternative Sigma Factor,

SigI, Regulates the Cell Wall Metabolism in Concert with WalRK Two-Component Regulatory System in *Bacillus subtilis*, Asian and Oceanian Conference on transcription, 2012 年 06 月 06 日~2012 年 06 月 09 日、Jeju Island, Korea (韓国)

- ④ 朝井計、白川文教、松本貴嗣、古園さおり、吉川博文、枯草菌の転写装置を解剖する試み、「細胞を創る」研究会 6.0 慶應義塾大学鶴岡キャンパス、2013 年 11 月 14 日~2013 年 11 月 15 日、慶應義塾大学鶴岡キャンパス (山形県・鶴岡市)
- ⑤ 朝井計、小穴 秋弓、今泉 優、長谷川 登志夫、香気性の植物抽出物の細菌の増殖に与える影響の解析、日本農芸化学会 2014 大会、2014 年 03 月 28 日~2014 年 03 月 30 日、明治大学 (神奈川県・川崎市)
- ⑥ 朝井計、古園さおり、吉川博文、ゲノム改造によるバクテリアの RNA ポリメラーゼの多様性と互換性の解析、日本農芸化学会 2014 大会 (招待講演)、2014 年 03 月 30 日~2014 年 03 月 30 日、明治大学 (神奈川県・川崎市)
- ⑦ Mustuki Ichishima, Kazue Obata, and Kei Asai, Alternative Sigma Factor, SigI, responds to Cell Wall and DNA damage in *Bacillus*, The 13th Asian Conference on Transcription, 2014 年 02 月 19 日~2014 年 02 月 22 日、University College Melbourne, Australia (豪州)
- ⑧ Noriko Ueki, Miwa Akiho, Takashi Matsumoto, Hirofumi Yoshikawa & Kei Asai, Determination of minimum number of the sigma factors required for growth in *Bacillus subtilis*, The 13th Asian Conference on Transcription, 2014 年 02 月 19 日~2014 年 02 月 22 日、University College Melbourne, Australia (豪州)
- ⑨ 朝井計、市島睦生、枯草菌シグマ因子 SigI の定常期における機能解析、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 09 月 19 日~2013 年 09 月 21 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川・横浜市)
- ⑩ 中風呂裕樹、Yee Lii Mien、柘植 謙爾、朝井計、アーキア型膜脂質合成遺伝子群の枯草菌への導入、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 09 月 19 日~2013 年 09 月 21 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川・横浜市)
- ⑪ 小穴秋弓、新城優、長谷川登志夫、朝井計、枯草菌の溶菌を誘発する香気性の植物抽出物の解析、日本遺伝学会第 85 回大会 2013 年 09 月 19 日~2013 年 09 月 21 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川・川崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝井計 (ASAI, Kei)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：70283934

(2) 連携研究者

吉川博文 (Yoshikawa, Hirofumi)

東京農業大学・バイオサイエンス研究科・
教授

研究者番号：50175676

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2012-2013 年度

課題番号：24119503

研究課題名（和文）配列特異的 DNA メチル化酵素によるエピゲノム工学：合成生物学・ゲノム工学の拡張へ

研究課題名（英語）Epigenetic engineering by target specific DNA methyltransferase

研究代表者

古田芳一（Yoshikazu Furuta） 東京大学・新領域創成科学研究科・特任助教

連携研究者

小林一三（Ichizo Kobayashi） 東京大学・新領域創成科学研究科・教授

板谷光泰（Mitsuhiro Itaya） 慶應義塾大学・環境情報学部・教授

研究成果の概要

本研究は、ドメイン配列が移動することによってメチル化標的配列を多様化するメカニズムを応用し、望みの認識配列を持つメチル化酵素を創出し、ゲノム中のメチル化分布を自由に作り出す「エピゲノム工学」を確立することが目的である。これまでの遺伝子制御ネットワーク解析を拡大し、ゲノム工学産物に多様なトランスクリプトーム状態を実現し、合成生物学の強力なツールとしての活用が期待できる。配列特異的 DNA 配列メチル化酵素遺伝子を人工的に改変し、遺伝子制御ネットワーク改変のツールに応用するための基礎研究として、①I 型制限修飾系の配列認識遺伝子のドメイン多様性の網羅的情報解析、②メチローム解析による I 型メチル化酵素の認識配列の決定、③メチル化配列の変化によるトランスクリプトーム変化の測定を行った。その結果、ゲノムメチル化状態の変化が適応進化の原動力となる可能性を示唆し、ゲノムの DNA メチル化状態の多様化の育種への応用の可能性を示す結果を得た。

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：DNA メチル化 制限修飾系 メチローム PacBio シークエンサー DNA メチル化多様化メカニズム トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

細菌の DNA メチル化酵素は、特異的な DNA 配列をメチル化する。これらは、ゲノム修復の際の目印になることや、ゲノム複製開始の調節、絨毛遺伝子の発現スイッチングなど、多様な遺伝子発現制御を行うことがわかっている。また、トランスクリプトーム解析から、メチル化酵素の発現の変化によって制御される遺伝子の存在も明らかにされてきた (Srikhanta et al., 2005)。

細菌の DNA メチル化酵素の中でも、I 型のものは同じ種内でも非常に多様性が高いことが知られている。I 型のメチル化酵素は、メチル化を担う遺伝子と、配列認識を担う遺伝子とが別になっている (図 1)。配列認識遺伝子が二つの配列認識ドメイン (Target Recognition Domain, TRD) の組み合わせで認識配列を決定しており、制限酵素による DNA 切断活性、メチル化酵素によるメチル化活性の双方に必須となっている。この I 型制限修飾系のメチル化によって規定されるエピゲノム状態が、ピロリ菌の場合は、宿主との相互作用、胃癌形成に重要である可能性が指摘されている (Bjorkholm et al., 2002)。

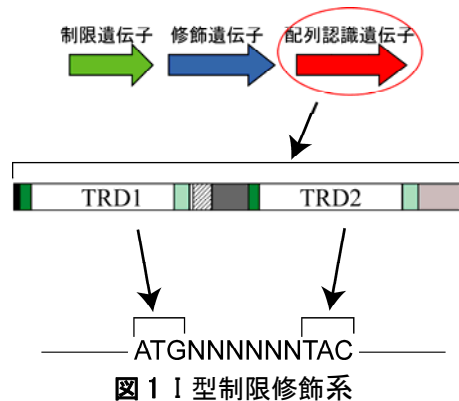


図 1 I 型制限修飾系

我々は、ピロリ菌のゲノム比較解析を通じて、I 型制限修飾系の配列認識遺伝子の多様化の新しい機構を見出した。DNA 組換えにより、2つのドメインの間を配列が移動する「ドメイン移動」という現象によって、ドメインのシャッフリングが起きていることを示した (Furuta et al., 2011, 図 2)。このシャッフリングから、I 型制限修飾系の認識配列が多様化し、ゲノムのメチル化サイト分布が多様化されることが予想された。遺伝子制御等に重要なサイトのメチル化が多様化することにより、多様なトランスクリプトームが実現されていると考えられる。

2. 研究の目的

I 型制限修飾系の配列認識遺伝子は、配列認識ドメインと認識配列が 1 対 1 に対応しているため、二つのドメインの組み合わせにより、メチル化配列を直接決定できる。この性質を利用して、望みの認識配列を持

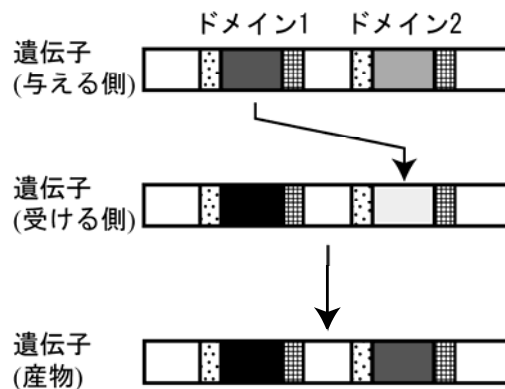


図 2 ドメイン移動

つメチル化酵素を創出し、ゲノム中のメチル化分布を自由に作り出す「エピゲノム工学」の確立を着想した。メチル化が遺伝子制御に関わることから、新規の遺伝子調節機構や、多様なトランスクリプトーム状態の創出など、遺伝子制御ネットワークの多様化を行うためのツールとなることが期待できる。

配列特異的 DNA 配列メチル化酵素遺伝子を人工的に改変し、遺伝子制御ネットワーク改変のツールに応用するための基礎研究として、①I 型制限修飾系の配列認識遺伝子のドメイン多様性の網羅的情報解析、②メチローム解析による I 型メチル化酵素の認識配列の決定、③メチル化配列の変化によるトランスクリプトーム変化の測定を行った。

3. 研究の方法

①I 型制限修飾系の配列認識遺伝子のドメイン多様性の網羅的情報解析

日本人由来のピロリ菌株 30 株について、HiSeq シークエンサーを用いてゲノム解読を行った。より完全に近いゲノム配列が得られるよう、二種類のインサート長のライブラリを作成、解析した。得られたリードを de novo アセンブリすることで、1 本のコンティグにつながったゲノム配列を得ることができた。

得られたゲノム配列についてアノテーションを行い、制限修飾系をコードしている遺伝子を抜き出した。すでにデータベース上に登録されているピロリ菌株ゲノムからも同様に制限修飾系をコードしている遺伝子を抜き出し、株間でレパートリーを比較した。遺伝子配列比較を行うことにより、制限修飾系の多様性について解析した。

②メチローム解析による I 型メチル化酵素の認識配列の決定

申請の段階では生化学的な方法での認識配列決定を提案していたが、メチル化サイトを塩基単位で決定するメチローム解析を行える PacBio RS シークエンサーの使用が可能となった。過去の解析ですでにゲノム配列がわかっているピロリ菌株 5 株について、ゲノ

ム DNA を抽出し、PacBio RS で解読するためのライブラリを作成した。得られたデータからメチル化を受けた DNA 配列モチーフを検索し、メチル化関連酵素のドメイン配列と比較することで、各メチル化関連酵素の標的配列を決定した。

③メチル化配列の変化によるトランスクリプトーム変化の測定

ピロリ菌について、I 型制限修飾系の配列認識遺伝子を欠損した株を作成し、野生株とトランスクリプトーム比較解析を行った。各株より RNA を抽出し、cDNA ライブラリを作成、HiSeq シークエンサーにて解読を行った。

大腸菌について、ピロリ菌のメチル化酵素をコードしたプラスミドを作成し、形質転換を行った。ピロリ菌同様、野生株とのトランスクリプトーム比較解析を行ったほか、形質への影響についても検討した。

4. 研究成果

①I 型制限修飾系の配列認識遺伝子のドメイン多様性の網羅的情報解析

ピロリ菌の日本人由来株 30 株についてゲノム解読を行い、データベースに登録済みのピロリ菌全ゲノム配列の情報も取り入れ、制限修飾系の比較解析を行った。特に I 型制限修飾系の配列認識ドメインについて解析した結果、過去に調べた 10 株から見つかったドメインの数よりも多くの種類の配列を検出することができた (Kojima, Furuta et al, 2016)。特に一つの I 型制限修飾系について、配列認識ドメインが 20 種類以上存在することがわかり、これによって 1000 以上の多様性を持つ配列認識遺伝子を含んだメチル化遺伝子ライブラリを作ることが理論的に可能となった。

②メチローム解析による I 型メチル化酵素の認識配列の決定

上述の多様化メカニズムが実際にメチロームを多様化しているのか、またピロリ菌株間でどの程度メチロームが多様化しているのかを調べるため、PacBio RS シークエンサーを用いて、ピロリ菌 5 株のゲノム中の DNA メチル化箇所を 1 塩基レベルの解像度で明らかにした (Furuta et al, 2014)。

ピロリ菌 5 株について、いずれの株もゲノム中の 1~2% の塩基がメチル化されていることが明らかとなり、既知のメチル化認識配列のメチル化も検出できた。また、これまで実験的にメチル化認識配列を決定することが難しかった I、III 型メチル化酵素による DNA メチル化について、本手法でその認識配列を検出することに成功し (図 3)、TRD 多様化のメカニズムによって実際に DNA メチル化が多様化していることを実際に証明できた。

③メチル化配列の変化によるトランスクリプトーム変化の測定

配列認識遺伝子の欠損株と、コントロール株のトランスクリプトームを比較した結果、一つのオペロン中の複数の遺伝子の発現が有意に変化することが見出された。ノックアウトした配列認識遺伝子のメチル化ターゲット配列がこのオペロン中にあり、長いパリンドローム配列中にあることから、メチル化によってゲノム DNA の高次構造の取りやすさに変化が生じることで、発現制御を行っていることが示唆された。

大腸菌へのメチル化酵素遺伝子水平伝達を行った結果、トランスクリプトームに影響を与えるメチル化酵素遺伝子、トランスクリプトームにほとんど影響を与えないメチル化酵素遺伝子があることが判明した。RNA-seq データを解析した後、発現変動遺伝子、既知の転写因子結合部位とメチル化標的配列の相対的位置関係を調べたところ、各メチル化酵素遺伝子にユニークに発現変動している遺伝子のいくつかについて、上流部においてメチル化標的モチーフが認められた。あるメチル化酵素遺伝子にユニークに発現変動している遺伝子群の上流部においては、転写因子結合部位とメチル化標的部位のオーバーラップが認められた。これは DNA メチル化が転写因子のプロモーター領域 DNA への結合に正または負の影響を与えることが、トランスクリプトーム変化の直接的原因であることを示唆する。大腸菌のトランスクリプトーム解析の結果に基づき、メチル化酵素の保持が大腸菌の生育に正に作用する条件を予想し、その環境での菌の生育パターンを調べたところ、ある条件ではメチル化酵素の保持によって菌の生育がよくなることが判明した。これは、ゲノムメチル化状態の変化が適応進化の原動力となる可能性を示唆し、ゲノムの DNA メチル化状態の多様化の育種への応用の可能性を示した。



図 3 I 型制限修飾系の認識配列決定

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119505

研究課題名（和文）膜電位操作回路による生体骨構築のための基盤研究－光照射による骨リモデリング制御－

研究課題名（英語）Regulation of bone remodeling via light-controlled membrane potential circuit

研究代表者

納富拓也（Takuya Notomi） 大阪歯科大学・歯学部・講師

研究成果の概要

骨疾患の治療・改善には、骨リモデリング機構を明らかにするとともに、そのコントロールが必要である。本研究では、開発した膜電位操作回路を用いて、光操作により骨リモデリング制御を目指した。改良した膜電位操作回路を骨芽細胞・破骨細胞に組み込んで、骨リモデリングに関与する最重要な細胞機能（石灰化、破骨細胞形成因子(RANKL)分泌、酸放出、細胞分化)を光照射により自由に制御することに成功した。また、膜電位操作分子を組み入れた骨関連細胞をマウスに移植して、局所的な光照射をおこなうことで、生体内の骨構築導入を確認した。

研究分野：合成生物学、骨生物学

キーワード: 骨代謝、膜電位、イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えて、骨粗鬆症を代表とする骨疾患は 1000 万人を超えると推定される。この治療・改善には、骨リモデリング機構を明らかにするとともに、そのコントロールが必要である。私は骨量増加作用の強い力学的負荷と骨リモデリング機構の関係を検討するなかで、骨代謝における細胞膜上イオンチャネルの重要性を発見して、膜電位が骨代謝を制御するという示唆を得た。そこで、本研究では、創りだして利用することを主題として、膜電位操作回路導入骨芽細胞・破骨細胞を創り出した。

2. 研究の目的

超高齢化社会を迎えて、骨粗鬆症を代表とする骨疾患は 1000 万人を超えると推定される。この治療・改善には、骨リモデリング機構を明らかにするとともに、そのコントロールが必要である。私は骨量増加作用の強い力学的負荷と骨リモデリング機構の関係を検討するなかで、骨代謝における細胞膜上イオンチャネルの重要性を発見して、膜電位が骨代謝を制御するという示唆を得た。そこで、光活性化型イオンチャネル・ポンプを用いて、骨芽細胞・破骨細胞に膜電位操作回路を導入することに成功した。その結果、骨リモデリングに関係する細胞機能を光照射により自由に制御することを可能とした。本研究では、創りだして利用することを主題として、創出した膜電位操作回路導入骨芽細胞・破骨細胞を用いて、骨リモデリング制御により、生体内で任意の部位・時期で骨構築をおこなうことを目的とする。さらに、膜電位操作回路を発展させるために、膜電位センサー分子を組み込み、新たな細胞機能を獲得・操作することを目指す。

3. 研究の方法

骨芽細胞・破骨細胞に膜電位操作分子を組み入れて、その機能検討をおこなっていく。骨芽細胞・破骨細胞の機能の確認は、細胞内イオンイメージング、パッチクランプ法を用いて検討した。細胞分化の検討は、分化培地を用いて標準的方法によりおこなった。膜電位操作回路の発展のために、FLIPR 法により、機能的スクリーニングをおこない、同定した分子の機能と膜電位操作回路との関係をあわせて検討した。また、膜電位操作回路と組み入れた細胞をマウスに移植して、生体内骨構築を試みる。創出した骨の質は、高精細マイクロ CT および骨形態計測法・強度試験にて、その構造・強度を測定して評価する

4. 研究成果

膜電位操作回路の導入により、骨芽細胞・破骨細胞の膜電位を操作して、それらの細胞機能をコントロールすることに成功した（発表

論文 1, 2)。レンチウイルスによる遺伝子導入を用いて、マウス生体内で膜電位操作回路を組み込んで、骨構築を試みた。頭頂骨部に焦点をあてて、頭頂骨を切り取った部分に、マトリゲルとともに膜電位操作回路を組み入れた細胞を埋め込み、定着させることに成功した。その後、光照射により、欠損部における骨構築を確認した。

また、膜電位感受性分子の機能的スクリーニングをおこない、その結果、ライソソームにある膜電位感受性イオンチャネルのひとつ TPC2 を同定した。このイオンチャネルは、ライソソームからのカルシウムイオン放出になっており、細胞内カルシウム経路において ER からのカルシウム放出を促す鍵となるものである。破骨細胞の分化過程において、細胞内カルシウム濃度の変動が深くかかわっているが、TPC2 はこの細胞内カルシウム変動を制御しており、破骨細胞分化をコントロールしていることを報告した（発表論文 10）。また、別のイオンチャネルである TRPV4 の骨芽細胞における細胞内カルシウム変動における役割の検討をすすめて、力学的負荷・膜電位変動時における骨芽細胞の細胞内カルシウム変動に TRPV4 の関与を見出した（発表論文 8）。非興奮性細胞における膜電位の役割を検討するため、軟骨細胞株に膜電位操作回路を組み入れて、検討をすすめた結果、過分極により軟骨細胞分化が促進して、脱分極により分化抑制が生じることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 13 件）

1. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Yoichi Ezura, Masashi Honma, Toru Ishizuka, Kiyoshi Ohura, Hiromu Yawo, Masaki Noda, Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitable osteoblasts. *Bone*, 81: 1: 306-14, 2015, 査読有
2. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Timothy M. Skerry, Zinc-induced effects on osteoclastogenesis involves activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide modulated channels via changes in membrane potential. *J Bone Miner Res*, 30: 9: 1618-26, 2015, 査読有
3. Takayuki Yamada, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Shuichi Moriya, Jumpei Shirakawa, **Takuya Notomi**, Smriti Aryal, Makiri Kawasaki, Yayoi Izu, Kiyoshi Harada, *Masaki Noda,

- β 2 Adrenergic receptor activation suppresses BMP-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells. *J Cell Biochem*, 116: 6: 1144-52, 2015, 査読有
4. Shuichi Moriya, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Smriti Aryal, Tetsuya Nakamoto, Yayoi Izu, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, Jumpei Shirakawa, Kazuo Kaneko, Yoichi Ezura, * Masaki Noda, PTH regulates β 2-adrenergic receptor expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem*, 116: 1: 142-8, 2015, 査読有
 5. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Ikuaki Karasaki, Yuichi Okazaki, Nobukazu Okimoto, Yushi Kato, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Toshitaka Nakamura, Masashige Suzuki, Insulinogenic sucrose + amino acid mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic effect on bone compared with non-insulinogenic fructose + amino acid mixture in growing rats. *Bone*, 65: 1: 42-48, 2014, 査読有
 6. Jumpei Shirakawa, Yoichi Ezura, Shuichi Moriya, Makiri Kawasaki, Takayuki Yamada, **Takuya Notomi**, Tetsuya Nakamoto, Tadayoshi Hayata, Atsushi Miyawaki, Ken Omura, * Masaki Noda, Migration linked to Fucci-indicated cell cycle is controlled by PTH and mechanical stress. *J Cell Physiol*, 229: 10: 1353-8, 2014, 査読有
 7. Chiho Watanabe, Masahiro Morita, Yoichi Ezura, Tetsuya Nakamoto, Tadayoshi Hayata, Chisato Kikuguchi, Li Xue, Yasuhiro Kobayashi, Naoyuki Takahashi, **Takuya Notomi**, Keiji Moriyama, Tadashi Yamamoto, * Masaki Noda, Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via Cnot3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 7: 2692-7, 2014, 査読有
 8. Takafumi Suzuki, * **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Daisuke Miyajima, Fumitaka Mizoguchi, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Ryo Hanyu, Paksinee Kamolratanakul, Atsuko Mizuno, Makoto Suzuki, Yoichi Ezura, Yuichi Izumi, Masaki Noda, Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force. *Bone*, 54: 1: 172-8, 2013, 査読有
 9. Aryal Smriti, Kentaro Miyai, Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, **Takuya Notomi**, Tetsuya Nakamoto, Tony Pawson, * Masaki Noda, Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss. *J Cell Physiol*, 228: 7: 1397-1403, 2013, 査読有
 10. **Takuya Notomi (Corresponding author)**, Yoichi Ezura, Masaki Noda, Identification of two pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, 287: 42: 35057-64, 2012, 査読有
 11. Daisuke Miyajima, Tadayoshi Hayata, Takafumi Suzuki, Hiroaki Hemmi, Yoichi Ezura, Tetsuya Nakamoto, **Takuya Notomi**, Teruo Amagasa, Ralph T Böttcher, Mercedes Costell, Reinhard Fässler, * Masaki Noda, Profilin1 regulates sternum development and endochondral bone formation. *J Biol Chem*, 287: 40: 33545-53, 2012, 査読有
 12. Ryo Hanyu, Vanessa L. Wehbi, Tadayoshi Hayata, Shuichi Moriya, Timothy N. Feinstein, Yoichi Ezura, Masashi Nagao, Yoshitomo Saita, Hiroaki Hemmi, **Takuya Notomi**, Tetsuya Nakamoto, Ernestina Schipani, Shu Takeda, Kazuo Kaneko, Hisashi Kurosawa, Gerard Karsenty, Henry M. Kronenberg, Jean-Pierre Vilardaga and * Masaki Noda, Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the beta2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 19: 7433-8, 2012, 査読有
 13. Tomomi Sakuma, Tetsuya Nakamoto, Hiroaki Hemmi, Sohei Kitazawa, Riko Kitazawa, **Takuya Notomi**, Tadayoshi Hayata, Yoichi Ezura, Teruo Amagasa and * Masaki Noda, CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. *J Cell Physiol*, 227: 7: 2807-12, 2012, 査読有
- [学会発表] (計 27 件)
1. **Takuya Notomi**, Ikuaki Karasaki, Yuichi Okazaki, Nobukazu Okimoto, Yushi Kato, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda, Toshitaka Nakamura, Masashige Suzuki, Insulinogenic sucrose+amino acids mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic

effect on bone compared with non-insulinogenic fructose+amino acids mixture in growing rats, ASBMR 2014 Houston, Texas, USA, 13th September 2014

2. **納富拓也**、大浦清、野田政樹、レジスタンス運動直後のインスリン高刺激性糖摂取は、インスリン低刺激性糖摂取に比べて骨量・骨強度を増大させる、第 56 回 歯科基礎医学会、福岡国際会議場、福岡県、福岡市、2014 年 9 月 26 日
3. **Takuya Notomi**, Miyuki Kuno, Yoichi Ezura, Masaki Noda, Depolarizing Membrane Potential by PTH and VD₃ Regulates RANKL-intracellular Transportation; A Novel Mechanism of PTH- and VD₃-induced Osteoclastogenesis, ASBMR 2013, Baltimore, Maryland, USA, 6th October 2013

他 24 件

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

納富 拓也 (NOTOMI, Takuya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：6 0 2 8 3 3 9 7

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2012-2014,2014-2016

課題番号：24119506,26119703

研究課題名（和文）新規トランスジェニック細胞樹立の基盤技術確立と合成生物学への応用

研究課題名（英語）Development of methods for establishing transgenic cell lines and application for synthetic biology

研究課題名（和文）哺乳類細胞での合成生物学を志向した次々世代型ジェネティックエンジニアリング技術

研究課題名（英語）Development of genome engineering for synthetic biology in mammalian cells

研究代表者

野村渉（Wataru Nomura） 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究成果の概要

Synthetic Biology（合成生物学）の分野では、細胞を部品の集合であると考え、それらの部品を人工的なものに置き換えてみる、もしくは完全な人工物で集合体（細胞・広い意味での生物）を組み上げる（再構成する）研究が進んでおり、細胞ベースの優れた技術を生み出す領域としての役割も担う。細胞の構成要素としてのゲノムは、普遍的遺伝情報を格納する場としてその他の生体高分子の成り立ちにも大きく影響をもつ。従って、ゲノムを自在に操作および制御する技術が、合成生物学研究、特に哺乳類細胞における研究の発展に大きく貢献すると期待される。ゲノムに対する人為的な制御を可能とするためには30億塩基対から構成されるヒトゲノム配列に対して標的となるDNA配列に対して高い特異性で結合するタンパク質が必要となる。これを用いてエフェクタードメインを融合させ、酵素機能を有する機能分子を創製することができる。かつタンパク質発現系を利用して細胞内で作用させることができる。

DNA切断反応を用いたゲノム編集技術によって内因性遺伝子に自在にトランス遺伝子や変異を導入できる。前半期間（2012-2014）では、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用いたトランスジェニック（ノックアウト）細胞樹立を行い、テロメア伸長酵素であるhTERT遺伝子のプロモーター領域を標的としたゲノム編集に成功した。他の標的としてこれまでノックアウトマウスの作製が困難であったASH1遺伝子（耐性致死）のエクソン配列を標的とし、それぞれZFNによる配列特異的なDNA切断による変異導入で標的箇所をゲノム編集した細胞を得ることに成功した。また、標的遺伝子部分を特異的に組み換えるDNA組換え酵素（ZFR）を用いた研究では目的とする欠損配列を生成させることに成功した。以上の結果は哺乳類細胞での内因性遺伝子に対するエンジニアリング技術基盤の確立につながると考えられる。

後半期間（2014-2016）では哺乳類細胞のゲノムに特化した技術、任意の標的配列を編集もしくは改変できる技術としてヌクレアーゼによるゲノム編集技術であるZFN、TALEN、CRISPR-Cas9システムの3技術の各特長を組み合わせ、合成生物学研究に利用できる基盤技術としての体系化を推進した。その成果として、ラバマイシンにより会合が誘導されるFKBP-FRBドメインを利用したDNA切断系の構築と転写制御システムへの応用につながる成果を得た。

研究分野：合成生物学，生物化学

キーワード：ゲノム編集，DNA結合，DNA切断

1. 研究開始当初の背景

Synthetic biology の分野では多様な技術開発が進んでいる。細胞を部品からなる集合体と考えるこの研究分野ではそれぞれのパーツを人工的に創り出し、生命体を機能させることに挑戦が続いている。そこから生まれる知識、知見は生命機能・原理の理解や創薬やバイオテクノロジー開発に直結する。これまで遺伝子機能研究ではレポーター遺伝子を利用する方法やノックアウトマウスを利用する方法が主に利用されてきた。内因性遺伝子の配列そのものに対して外来遺伝子の導入やノックアウトなどによる発現抑制などが効率よく行うことが可能になれば、バイアスのかかった可能性のある実験結果やノックアウト作製に費やす時間の短縮、個体を用いることなく細胞そのものでシグナルの伝達経路などを直接的に観察するなどといったことが可能になる。近年になり、ゲノム配列特異的に結合するタンパク質を活用した DNA 修飾酵素の開発が盛んになりつつある。DNA 結合タンパク質を用いた融合酵素として二重鎖 DNA 切断酵素、組換え酵素、メチル化酵素などが創製されている。特に FokI 酵素ドメインを用いた DNA 二重鎖切断酵素は、二重鎖切断による非相同末端結合反応 (Non-Homologous End Joining; NHEJ) の活性上昇を誘起するため、標的配列付近に変異を導入できる。この方法では、より簡便に標的遺伝子をノックアウトした細胞、個体を作製可能になる。近年、ZFN の開発を足掛かりとして、それに続いて TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)、最近では CRISPR/Cas system が開発され、高い効率でゲノムでの変異導入/ノックアウトが可能になりつつある (Esvelt, K. M. & Wang, H. H. Mol. Systems Biol. 2013, 9; 641.)。TALEN, CRISPR/Cas system はそれぞれ 2011, 2013 年に第一報が報告され、当該領域が立ち上げられてからこれまでの間にノックアウト技術革新が進みつつある。次世代のゲノム編集技術として注目を集める ZFN だけでなく、現在は TALEN, CRISPR/Cas system を加えた 3 技術が並行して開発が進められている。すなわち、次々世代型 Genetic Engineering 技術という枠組みで、3 技術をそれぞれの特長を組み合わせ、目的に応じた利用が望まれている。

2. 研究の目的

本研究提案では遺伝子回路研究を初めとする合成生物学研究に有用になる哺乳類細胞での内因性遺伝子に対するエンジニアリング技術基盤を確立する。配列特異的に genetic engineering が行えるジンクフィンガー融合酵素を用いて (1) 化合物によるコンディショナルな遺伝子ノックダウンを行えるシステムの構築 (ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いる), (2) 耐性致死遺伝子研究用細胞株の樹立とその解析 (ジンクフィンガーリコンビナーゼを用いる), (3) 核内動態

の観察と解析手法の確立、に取り組む。DNA 切断を行う FokI の酵素ドメインとジンクフィンガードメインとの融合体は直接の融合体とするのではなく、ラパマイシン (有機小分子化合物) を介してヘテロ二量体を形成する FK506-binding protein (FKBP) と FKBP12-rapamycin associated protein1, FRAP1 fragment (FRB) の組み合わせを用い、ラパマイシン添加で切断活性を誘導できるユニットを構築する。この方法によって①標的とする配列上において②時間的に制御をして、切断反応を行い転写活性の変化を解析できる系が構築される。ジンクフィンガーリコンビナーゼは付加配列が必要ない組換え反応が可能のため、ORF を標的とした組換えによる遺伝子ノックアウトを行う。

ZFN だけでなく、TALEN, CRISPR/Cas system を加えた 3 技術を、次々世代型 Genetic Engineering 技術という枠組みで各特長を組み合わせ、合成生物学研究に利用できる基盤技術としての体系化を推進する。多要素な生体分子ネットワークを哺乳類細胞で再構築するには特に複雑な遺伝子改変技術が必要である。(1) 人工遺伝子回路のゲノムへの導入技術, (2) 細胞バーコーディング技術, (3) ゲノムワイドな染色体改変技術, (4) 細胞特異的プロモーター活性の利用技術, (5) トランスジェニック (ノックアウト) 細胞ラインの樹立技術, の研究項目に取り組み、計算モデル—原核細胞モデル—真核 (哺乳類) 細胞モデルをシームレスにつなげることを目標とする。

3. 研究の方法

① in vitro 翻訳系による各タンパク質の発現確認とラパマイシンによる DNA 切断誘導実験

構築したヌクレアーゼ遺伝子について in vitro 翻訳系での発現を確認する。FokI ドメインは DNA 切断活性のために E. coli を用いる発現系では毒性を発現することが予測される。そのため、in vitro での解析に関しては in vitro による翻訳を行うことで効率よく FokI 切断ドメインの機能評価を行う。DNA 結合ドメインとしてジンクフィンガードメインあるいは TALE ドメインを利用し、それらに FKBP ドメインを融合させたものを in vitro 翻訳系によって翻訳し、蛍光染色ゲル電気泳動によって発現を確認する。切断ドメインとして一本鎖型の FokI ドメイン、もしくは通常の FokI ドメインを検討する。標的遺伝子配列を有するプラスミド遺伝子を構築し、それを用いて各ドメインの濃度を振り分け、ラパマイシンによる切断誘導が最も効果的に起こる濃度について検討を行う。胎生致死遺伝子の重要性は個体の成長過程において解明が困難であるため、細胞をベースとした解析が必要であると考えられる。そこで、ゲノム編集技術を利用した、遺伝子欠損タイプの細胞樹

立法を確立する。これらの遺伝子の ORF の両末端にジンクフィンガーリコンビナーゼあるいはヌクレアーゼの標的配列を検索し、適合する配列に対して結合するジンクフィンガードメインを構築する。

③核移行シグナルを融合した各タンパク質遺伝子の構築

in vitro での結果に基づき、切断効率を最適化したユニットを用いて哺乳類細胞内での DNA 二重鎖切断実験を行う。各ユニットタンパク質には核移行シグナル配列を付加して細胞内での発現と同時に核内に局在するようにデザインする。核への局在はタンパク質ユニットに HA, FLAG などのタグ配列を付加して免疫染色により確認を行う。

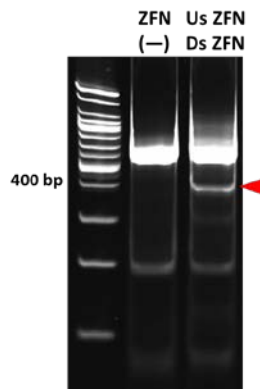
④哺乳類細胞における標的配列特異的 DNA 二重鎖切断誘導実験

in vitro での実験でラパマイシンによるヘテロ二量体形成が二重鎖切断を誘導するシステムの構築を確認しているため、DNA 結合ドメイン-FKBP に HA タグ, FRB-FokI ドメインに FLAG タグを付加した状態で各ユニットタンパク質の細胞内局在を観察する。DNA 結合ドメイン-FKBP はゲノムに結合している状態で存在すると考えられる。しかし、FRB-FokI ドメインは核移行シグナルによって核内に移動はしているがゲノム遺伝子の近くには存在しないと考えられる。そのため、ラパマイシンの添加によって FRB-1 本鎖 FokI ドメインの核内での局在に変化が確認できると考えられる。すなわち、ヘテロ二量体形成をラベル化した抗 HA 抗体と抗 FLAG 抗体の共局在を検出する。

4. 研究成果

①hTERT プロモーター領域を標的とした ZFN, CRISPR-Cas9 による遺伝子切除反応

テロメア伸長に参与する逆転写酵素 hTERT のプロモーター領域を標的とする ZFN をデザインし遺伝子構築, *in vitro* での切断実験を行った。ZFN の DNA 結合ドメインにはジンクフィンガーを構築し、ELISA 法によって DNA 結合親和性を評価した。構築した ZFN の切断活性化確認されたので哺乳類細胞を用いて DNA 切断による変異導入確認実験を行った。ZFN を導入した細胞を 72 時間培養後に回収し、ゲノム DNA を抽出後、PCR によって当該領域の遺伝子増幅を行った。その結果、プロモーター領域の上流と下流の 2 箇所を標的とする ZFN を同時に作用させたところ切断部位の間に存在する配列が切除されていることを見出した (右図)。

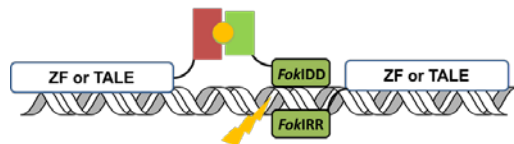


CRISPR-Cas9 システムを利用して同様の標的部位を認識するガイド RNA を数種類構築し、それぞれについて DNA 切断実験を行った。上流の配列を認識するガイド RNA と下流の配列を認識するガイド RNA を組み合わせ、2 箇所同時に切断した場合、ZFN で観察されたのと同様に標的配列の間が切除される反応が確認された。プロモーター領域を切除した細胞におけるテロメラーゼ活性を確認するために、染色体が 2 組に近い組成をもつ HCT116 細胞を用いて CRISPR-Cas9 システムで 2 箇所の配列を同時に切断する操作を行った。得られた細胞群からシングルクローンを取得し遺伝子解析を行った。その結果、プロモーター領域が両方のアレルで切除されているクローンが得られた。このクローンについてテロメア活性を確認したところテロメア活性は維持されていることが明らかになった。本成果は個体を対象にしたゲノム編集操作ではなく培養細胞を利用して個体では調べることの難しい致死性遺伝子などの機能解析が行えることを示すと考えられる。

②ラパマイシンで誘導可能な DNA 切断システムの構築

FKBP-FRB ドメインがラパマイシンの誘導によって会合する性質を利用して化合物によって DNA 切断を制御するシステムの構築を行った。DNA 結合ドメインとしてジンクフィンガードメイン、TALE ドメイン、切断不活性化 Cas9 (dCas9) を利用し、それぞれを FokI ドメインに対して FKBP ドメインを融合し、FokI ドメインに対して FRB ドメインを融合した。AAVS1 遺伝子を標的配列として切断活性を調べる実験を行った。ジンクフィンガーを基にしたシステムについて *in vitro* 翻訳系でそれぞれの融合タンパク質を得て *in vitro* での切断活性を確認したところ、DNA 結合ドメインと FokI ドメインが直接融合している全長型のヌクレアーゼと組み合わせることで DNA 切断活性が確認されることが明らかになった (下図)。

● Rapamycin

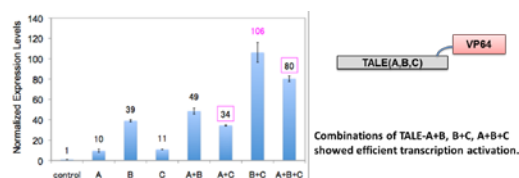


これを参考に哺乳類細胞における実験でも FKBP, FRB に DNA 結合ドメインと FokI ドメインのそれぞれを融合させた分割型ヌクレアーゼと全長型ヌクレアーゼの組み合わせを利用することにした。DNA 切断活性を定量する方法として分割型ルシフェラーゼ遺伝子を利用したレポーターアッセイを用いた。この手法は Single Strand Annealing (SSA) を利用しており、分割型にしたルシフェラーゼ遺伝子が切断されることでオーバーラッ

プしている部分の組換えによって全長のルシフェラーゼ遺伝子が回復され、発光が確認される。3種類のDNA結合ドメインについて切断活性を確認したところTALEドメインを利用する場合に最も高い活性が得られることが明らかになった。また切断配列におけるスパーサーの長さについてもTALEドメインを利用したシステムでは許容性が最も高いことが示された。dCas9を利用したシステムについてはFKBPドメインの融合部分について最適化するなど検討する余地があることも示されている。化合物によって切断を誘導するシステムを利用することでゲノムにおけるDNA切断、それに伴う修復過程がどのようなタイムスケールで起こるのか、などが明らかにされると期待できる。

③化合物で誘導可能な転写制御システムへの人工転写因子の協奏的な結合効果の利用

低分子化合物や光刺激によって会合が誘導されるドメインを利用することで細胞機能の制御が行える。特に標的とする遺伝子の転写活性を自在に制御することによって遺伝子にコードされるタンパク質機能の時間依存的な機能発現機構などが明らかにされる。DNA結合ドメインとしてTALEドメイン、dCas9を利用し、それらにFKBPドメインを融合した。転写活性を制御するドメインとしてVP64、SIDドメインを利用し、それらにFRBを融合した。また、ポジティブコントロールとして転写調節ドメインとDNA結合ドメインを直接融合させたタンパク質(人工転写因子)を構築した。ポジティブコントロールを利用して転写調節機能をレポーター遺伝子アッセイによって検討したところ、複数のサイトに結合するDNA結合ドメインをもつ人工転写因子を同時に複数個作用させることで効率的に転写活性を調節できることが明らかになった(下図)。



FKBP-FRBドメインの会合を制御するラパマイシンを用いた実験では化合物の添加によって転写活性が制御できることが示された。また内因性遺伝子に対する作用についても人工転写因子を導入し、ラパマイシンを添加した細胞についてmRNAを抽出し、リアルタイムPCRを利用して解析を行った。その結果、内因性遺伝子についても遺伝子発現を化合物によって制御できることが示された。また化合物の添加時間によっても遺伝子発現量などが調節可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

- ① W. Nomura, N. Ohashi, A. Mori, H. Tamamura: An In-cell Fluorogenic Tag-probe System for Protein Dynamics Imaging Enabled by Cell-Penetrating Peptides, *Bioconjugate Chem.*, 26, 1080-1085 (2015). (査読有)
- ② 野村 渉 人工酵素によるゲノム編集工学とその応用, 可能性 *Yakugaku Zasshi*, 135, 405-414 (2015). (査読無)
- ③ 野村 渉, 玉村啓和: ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブ, *化学工業*, 65, 8-14 (2014). (査読無)
- ④ N. Ohashi, W. Nomura, N. Minato, H. Tamamura: Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer, *Chem. Pharm. Bull.*, 62, 1019-1025 (2014). (査読有)
- ⑤ J. Yamamoto, N. Maeda, C. Komiya, T. Tanaka, M. Denda, K. Ebisuno, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otake: Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker, *Tetrahedron*, 70, 5122-5127 (2014). (査読有)
- ⑥ H. Takano, T. Narumi, N. Ohashi, A. Suzuki, T. Furuta, W. Nomura, H. Tamamura: Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups, *Tetrahedron*, 70, 4400-4404 (2014). (査読有)
- ⑦ J. Yamamoto, M. Denda, N. Maeda, M. Kita, C. Komiya, T. Tanaka, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otake: Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins, *Org. Biomol. Chem.*, 12, 3821-3826 (2014). (査読有)
- ⑧ C. Hashimoto, T. Narumi, H. Otsuki, Y. Hirota, H. Arai, K. Yoshimura, S. Harada, N. Ohashi, W. Nomura, T. Miura, T. Igarashi, S. Matsushita, H. Tamamura: A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 7884-7889 (2013). (査読有)
- ⑨ C. Hashimoto, W. Nomura, T. Narumi, M. Fujino, T. Nakahara, N. Yamamoto, T. Murakami, H. Tamamura: CXCR4-derived synthetic peptides inducing anti-HIV-1 antibodies, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 6878-6885 (2013). (査読有)
- ⑩ C. Hashimoto, W. Nomura, T. Narumi, M. Fujino, H. Tsutsumi, M. Haseyama, N. Yamamoto, T. Murakami, H. Tamamura: Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4, *ChemMedChem*,

- 8, 1668-1672 (2013). (査読有)
- ⑪ N. Ohashi, W. Nomura, T. Narumi, H. Tamamura: Peptide-Based Ligand Screening and Function Analysis of Protein Kinase C, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, 100, 613-620 (2013). (査読有)
- ⑫ W. Nomura, H. Aikawa, N. Ohashi, E. Urano, M. Métifiot, M. Fujino, K. Maddali, T. Ozaki, A. Nozue, T. Narumi, C. Hashimoto, T. Tanaka, Y. Pommier, N. Yamamoto, JA. Komano, T. Murakami, H. Tamamura: Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products, *ACS Chem. Biol.*, 8, 2235-2244 (2013). (査読有)
- ⑬ W. Nomura, C. Hashimoto, T. Suzuki, N. Ohashi, M. Fujino, T. Murakami, N. Yamamoto, H. Tamamura: Multimerized CHR-Derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 4452-4458 (2013). (査読有)
- ⑭ 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). (査読有)
- ⑮ 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). (査読有)
- ⑯ 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). (査読有)
- [学会発表] (計 23 件)
- ① 野村 渉: 人工 DNA 修飾酵素の構築戦略とゲノム・エピゲノム編集への展開, 日本薬学会第 135 年会シンポジウム-エピゲノム創薬技術の最前線. 神戸学院大学 (神奈川県横浜市) 2015 年 3 月 26-28 日. 招待講演
- ② 野村 渉. 人工酵素によるゲノム編集工学とその応用、可能性. シンポジウム「薬学における生命指向型化学」 日本薬学会第 134 年会. ホテル日航熊本 (熊本県・熊本市), 2014 年 3 月 27-30 日. 招待講演
- ③ 野村 渉. ジンクフィンガーからゲノム編集ツールへの展開. 2013 年東日本スクリプス会. ゆうぼうと五反田 (東京都・品川区), 2013 年 12 月 7 日. 招待講演
- ④ Wataru Nomura. Development of Peptide-derived Molecular Probes and Inhibitors Based on the Interactions with

Biomacromolecules. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. ホテル阪急エキスポパーク (大阪府・吹田市), 2013 年 11 月 6-8 日. 招待講演

- ⑤ 野村 渉: ジンクフィンガー融合型酵素による遺伝子発現制御法の開発, 日本薬学会第 133 年会シンポジウム-創薬を志向したエピジェネティクス研究の最前線. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2013 年 3 月 27-30 日. 招待講演
- ⑥ 野村 渉: 人工酵素のデザインに基づくゲノム修飾・編集法の開発, 「細胞を創る」研究会 5.0. 東京工業大学 (神奈川県・横浜市) 2012 年 11 月 21-22 日. 招待講演

この他に 25 件の学会発表

[図書] (計 2 件)

- ① 野村 渉, 田中智博, 相川春夫, 玉村啓和: 多価結合型 GPCR リガンドの合成とがん細胞イメージングへの応用, 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用, 267-273 (2012).
- ② 野村 渉, 田中智博, 玉村啓和: HIV 阻害剤・腫瘍認識プローブとしてのケモカイン受容体リガンド, ペプチド医薬の最前線, 101-107 (2012).

[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

[http:// tamamura-tmd.sakura.ne.jp/](http://tamamura-tmd.sakura.ne.jp/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 渉 (NOMURA, Wataru)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号: 80463909

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119507

研究課題名（和文）細胞時計を模倣した周期的遺伝子発現システムの構築

研究課題名（英語）Construction of oscillating gene expression system based on the circadian clock

研究代表者

今西未来（Miki Imanishi） 京都大学・化学研究所・助教

研究成果の概要

遺伝子の発現振動は様々な遺伝子に見られるが、転写因子の DNA 結合と遺伝子発現振動との分子レベルでの関係は、未だ明らかではない。人工的に周期的発現を生み出すことができれば、遺伝子発現の振動メカニズムを解明するための新しい方法になると考えられる。本研究では、概日振動リズムを持った遺伝子発現パターンを誘起する時計タンパク質を利用した人工転写因子をデザインし、本来は振動発現しない遺伝子を周期的に発現させることに成功した。

研究分野：合成生物学

キーワード：遺伝子発現 概日時計

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現振動はサーカディアンリズムに関わる遺伝子をはじめとして、様々な遺伝子に見られる。しかし転写因子の DNA 結合と遺伝子発現振動との分子レベルでの関係は、明らかではない。人工的に周期的発現を生み出すことができれば、遺伝子発現の振動メカニズムを解明するための新しい方法になると考えられるが、トグルスイッチに代表される原核細胞での例が報告されているのみで、真核細胞での成功例は僅かであった。一方、哺乳細胞での概日リズムの発振機構に関しては、分子生物学的な観点から研究が進んでおり、時計を司る転写因子の転写翻訳フィードバック制御機構の重要性が示唆されてきた。それゆえ、合成生物学的な観点から、概日リズム機構を利用することに興味を持たれた。さらに、代表者を含む世界中の研究から、代表的な DNA 結合モチーフであるジンクフィンガーを改変することによって、様々な遺伝子配列に結合できる人工 DNA 結合タンパク質や速度論的特徴が異なる人工 DNA 結合タンパク質を作製できることが明らかになってきており、この性質を合成生物学分野に応用することができると考えた。

2. 研究の目的

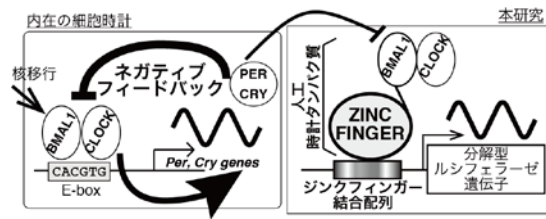
本研究では、人工 DNA 結合タンパク質を利用して、本来は振動発現をしない遺伝子に関して、人工的に振動発現パターンを誘起する遺伝子発現システムの開発し、さらに、そのような人工システムで用いる転写因子の性質を変化させることによって、転写因子の DNA 結合と遺伝子発現振動との関係を明らかにすることを目的とする。具体的には、①人工遺伝子発現振動誘起システムの基盤構築、②遺伝子振動発現における転写因子の寄与に関する知見を得ること、③本来は振動発現しない内在の遺伝子に対する振動発現の誘導、に取り組んだ。

3. 研究の方法

①人工遺伝子発現振動誘起システムの基盤構築

哺乳細胞では、相当数の遺伝子の発現が概日リズムを示す。それらの多くは、プロモーター中に E-box など、時計タンパク質 BMAL1/CLOCK による正の制御と、PER/CRY による負の制御を受けるシスエレメントを有している。正の転写因子を人為的に標的とする遺伝子プロモーターへ近づけることができれば、負の因子による制御が周期的にかかり、その結果、遺伝子の振動発現が誘導されるのではないかと考えた。そこで、正の転写因子として、BMAL1 および CLOCK を、任意のプロモーターへそれらを近づけるための DNA 結合ドメインとしては、代表的な

C2H2 型ジンクフィンガーとして知られる Zif268 由来のジンクフィンガードメインを用い、これらの融合タンパク質をデザインした。これらをそれぞれ、Zif-Bmal、Zif-Clock とした (下図)。



哺乳細胞内で遺伝子発現への効果を調べるために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子のプロモーター中に SV40 プロモーター及び Zif268 結合配列を挿入した ZBS-luc プラスミドを調整した。コントロールとしては、Zif268 結合配列中に変異を導入した mtZBS-luc 及び、Zif268 結合配列を持たない noZBS-luc を用いた。発現ベクター、レポーターベクターを NIH3T3 細胞へ同時にトランスフェクションし、48 時間後にフォルスコリンの添加によって、内在の概日時計をリセットし、その後のルシフェラーゼ活性をリアルタイムでモニタリングした。

②遺伝子振動発現における転写因子の寄与の検討

転写因子の DNA 結合性と振動発現との関係に関する知見を得るため、Zif-Bmal、Zif-Clock のジンクフィンガー結合配列への標的選択性を高めるための変異を導入し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現パターンへの影響を①と同じ方法を用いて調べた。また、レポーター遺伝子プロモーター中のジンクフィンガー結合配列のサイト数を変化させたレポーターベクターを構築し、発現パターンへの影響を調べた。

また、転写因子の分解の効果を調べるため、Zif-Bmal、Zif-Clock に分解促進配列を導入した融合タンパク質をデザインし、レポーター遺伝子の発現パターンへの影響を調べた。

③内在遺伝子に対する振動発現の誘導

これまでに、vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子プロモーターに特異的に結合するジンクフィンガードメインが開発されている。そこで、その人工ジンクフィンガードメインと Bmal1 および Clock との融合体を作成した。この時、野生型に加えて、②で標的選択性を高めたコンストラクトを用いた。VEGF 遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーターを作製し、NIH3T3 細胞で、ルシフェラーゼ活性をリアルタイムでモニタリングした。

⑥同じ領域内での共同研究

領域内で計算科学を専門とする伊藤班と、より大きな振幅を得るための要因やフィードバックループの設計に関して、ディスカッションを重ねた。

4. 研究成果

①人工遺伝子発現振動誘起システムの基盤構築

Zif-Bmal、もしくは Zif-Clock 発現ベクターと ZBS-luc レポータープラスミドをトランスフェクションした細胞では、ルシフェラーゼの活性が約 24 時間周期で変化した。一方、レポーターとして、Zif268 結合配列中に変異を導入した mtZBS-luc 及び、Zif268 結合配列を持たない noZBS-luc を用いた場合には、Zif-Bmal や Zif-Clock による遺伝子発現の変化は見られず、発現振動は生じなかった。これらの結果から、Bmal1 や Clock が直接 DNA に結合していなくても、外来の DNA 結合ドメインを用いてプロモーターに近づけるだけで、振動発現を誘導することができるということが明らかになった。また、ジンクフィンガーのような外来の DNA 結合ドメインを利用することで、本来は振動発現しない遺伝子の発現を概日リズムに同調させるシステムを構築することができたといえる。

②遺伝子振動発現における DNA 結合の寄与の検討

本研究で用いている Bmal1 や Clock は、それ自身が DNA 結合タンパク質であるため、外来の DNA 結合ドメインと融合させた場合も、DNA 結合活性を発揮してしまう。そこで、Bmal1 および Clock の DNA 結合ドメインに変異を入れ、これらとジンクフィンガーとを融合した融合タンパク質を作製した。ZBS-luc レポーターの発現をリアルタイムでモニタリングした結果、野生型の融合体と比較して、振動発現の振幅が大きくなることがわかった。また、レポーター遺伝子プロモーター中のジンクフィンガー結合配列のサイト数を変化させ、各々のルシフェラーゼ発現をモニタリングした結果、遺伝子発現リズムの振幅は認識サイトの数に依存することがわかった。これらの結果より、転写因子の DNA 結合親和性は発現振動の振幅に寄与する一方で、周期やリズム位相には影響しないということが示された。一方、Zif-Bmal、Zif-Clock に分解促進配列を導入した融合タンパク質を用いた場合には、野生型と比べて、レポーター遺伝子の発現レベルが低下し、振動発現を評価することはできなかった。

③内在遺伝子に対する振動発現の誘導

VEGF プロモーターを標的とするジンクフ

ィンガーに Bmal1、Clock の野生型、および DNA 結合ドメイン変異型を融合させた人工転写因子をデザインした。まず、これらの外来転写因子が発現していない細胞では、VEGF プロモーター駆動性のレポーター遺伝子は発現振動していないことを確認した。この細胞に、Bmal1、Clock 野生型との融合転写因子を発現させた場合も、VEGF プロモーター駆動性のレポーター遺伝子は発現振動しないという結果であった。一方、Bmal1、Clock の DNA 結合ドメイン変異型を融合させた人工転写因子を発現させた場合には、弱いながらも、約 24 時間周期の振動発現が認められた。①②で用いた人工プロモーターのシステムとは異なり、VEGF プロモーターにはジンクフィンガーが結合できるサイトが一つしかない。Bmal1、Clock の DNA 結合ドメイン変異型でのみ振動発現が誘導できたという結果は、外来 DNA 結合ドメインによる、人工転写因子のプロモーターへの強い結合が、振動発現の誘導には重要であるという②の結果を支持するものである。今後、DNA 結合ドメインの結合親和性を高めることによって、本来は振動発現しない内在遺伝子の発現パターンを自在に操ることができると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Miki Imanishi, Kazutoshi Yamamoto, Hiroyuki Yamada, Yuka Hirose, Hitoshi Okamura, and Shiroh Futaki, Construction of a rhythm transfer system that mimics the cellular clock, *ACS Chem. Biol.*, 査読有, Vol. 7, 2012, 1817, DOI: 10.1021/cb300432s
- ② Miki Imanishi, Design of artificial DNA binding proteins toward control and elucidation of cellular functions, *Yakugaku Zasshi*, 査読有, Vol. 132, 2012, 1431, https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/132/12/132_12-00228/_article
- ③ Shogo Tsuji, Shiroh Futaki, Miki Imanishi, Creating a TALE protein with unbiased 5' -T binding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 441, 2013, 262-265, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.060

[学会発表] (計 10 件)

- 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 年回、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 招待講演

- ② 今西未来、中村篤史、山本和俊、土居雅夫、岡村均、二木史朗、人工 DNA 結合蛋白質による細胞分子時計の操作、2012. 11. 21, 「細胞を創る」研究会 5.0 東京工業大学 (神奈川県・横浜市)
- ③ Miki Imanishi, Atsushi Nakamura, Masao Doi, Hitoshi Okamura, Shiroh Futaki, Control of cellular circadian phase by an artificial zinc-finger transcription factor, ISNAC2012 第 39 回国際核酸化学シンポジウム、2012 年 11 月 17 日、名古屋大学 (愛知県・名古屋市)
- ④ Miki Imanishi, Atsushi Nakamura, Masao Doi, Hitoshi Okamura, Shiroh Futaki, Resetting the cellular circadian clock by an artificial zinc-finger transcription factor, FASEB SCIENCE RESEARCH CONFERENCES Genome Engineering: Research & Applications, 2012 年 9 月 5 日, Lucca (Italy)
- ⑤ 今西未来、ジンクフィンガーモチーフを用いた人工転写因子の創製と応用、ナノバイオ研究会、2012 年 11 月 14 日、名古屋工業大学 (愛知県・名古屋市) 招待講演

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 未来 (IMANISHI, Miki)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号: 8 0 3 6 2 3 9 1

(2) 研究分担者

なし

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119709

研究課題名（和文）細胞時計同調の包括的理解と人為的制御のための人工入力系の構築

研究課題名（英語）Construction of artificial input system of the circadian clock

研究代表者

今西未来（Miki Imanishi） 京都大学・化学研究所・助教

研究成果の概要

概日時計システムは、生体分子ネットワークが生み出す振動現象を理解するためのモデルとして極めて重要である。メカニズム解明が比較的進んでいる発振系とは異なり、哺乳細胞時計が外的環境に応答して時刻（位相）を双方向にシフトさせる「同調機構」に関する情報は不足している。本研究では、単一の時計遺伝子を標的とする人工転写因子を作製した。そして、その細胞内蓄積量をリガンド添加によってコントロールできるシステムを構築した。概日時計振動周期における様々なタイミングでリガンドを添加したところ、リガンド添加のタイミングによって位相を前後にシフトさせることが可能なこと、またリガンド濃度に応じて位相シフトの変化量が変わるという結果を得た。本結果は、血清やホルモンなどの従来用いられてきた同調刺激が様々な遺伝子に作用してしまうのに対し、単一の時計遺伝子の活性化が細胞時計の同調に寄与することを示唆するものである。

研究分野：合成生物学

キーワード：遺伝子発現 概日時計

1. 研究開始当初の背景

「同調（入力）系・発振系・出力系」から構成される概日時計システムは、生体分子ネットワークが生み出す振動現象を理解するためのモデルとして極めて重要である。メカニズム解明が比較的進んでいる発振系とは異なり、哺乳細胞時計が外的環境に反応して時刻（位相）を双方向にシフトさせる「同調機構」に関する定量的な評価は未だ欠落しており、それゆえ、人工遺伝子回路を用いたリズム同調の評価系のデザインに対する情報も不足しているといえる。

同調の定量的な評価が困難な理由として、血清やホルモン刺激などの同調刺激に対して、同時にいくつもの遺伝子発現やシグナルの変化が生じてしまうことが挙げられる。一方、研究代表者は、ジンクフィンガードメインを用いて、時計遺伝子 *Period1* プロモーターに選択的に結合する人工転写因子をデザインし、リズム位相を変えることに成功していた。しかし、その位相シフトの度合いは小さく、入力応答性と位相シフトとの定量的な関係を明らかにするには至っていなかった。

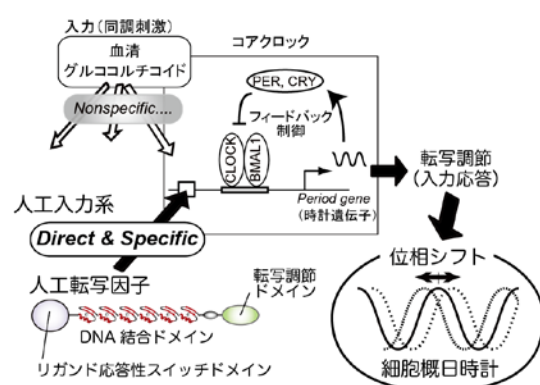
2. 研究の目的

本研究では、ゲノムの標的配列に特異的に結合して単一遺伝子の転写を制御する人工転写因子を用いた様々な人工入力系を構築し、「入力応答性」と「位相シフト」との関係を明らかにすることを目的とする。さらに、これを通して、細胞概日時計同調の分子メカニズムに関する知見が得られることが期待される。具体的には、これまでに作製した概日時計の人工入力系の改良を目指して、①同調機能を持つ人工転写因子の作製、②入力刺激と同調レベルに関する知見を得ること、に取り組んだ。

3. 研究の方法

①同調機能を持つ人工転写因子の作製

DNA 結合タンパク質として知られるジンクフィンガーや Transcription Activator-like Effector (TALE) を鋳型として、任意の DNA 配列に結合できる DNA 結合ドメインをデザインできるようになってきた。これらを用いた人工転写因子を作製することで、体内時計を司る単一の遺伝子を活性化することが可能になる。一方、体内時計の制御は、人工転写因子を機能させるタイミングが重要になると予想され、人工転写因子を刺激（リガンド）によって機能させるシステムが必要である。そこで、ジンクフィンガーや TALE と転写活性化ドメイン、機能スイッチ領域を融合させた、スイッチ型人工転写因子の作製に取り組んだ（下図）。



作製した人工転写因子の標的とする DNA 配列への結合性、リガンド応答性は、レポーターアッセイで評価した。DNA 結合性およびリガンド応答性を示したものに関して、哺乳細胞内で体内時計の同調効果を調べた。そのために、人工転写因子発現ベクターと時計遺伝子プロモーター駆動性のルシフェラーゼレポーターベクターを NIH3T3 細胞へ同時にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性をリアルタイムでモニタリングした。36-52 時間までの様々なタイミングでリガンドを添加し、引き続きルシフェラーゼ活性をモニタリングした。溶媒を添加したものをコントロールとして、リガンド添加後の位相のずれを解析した。

②入力刺激と同調レベルに関する検討

①で同調効果を示したリガンド応答性人工転写因子に関して、まず、リガンドの添加量と機能型人工転写因子の細胞内存在量との相関をウエスタンブロッティングで調べた。

また、入力刺激のタイミングと位相シフトの関係を調べるために、人工転写因子発現ベクターと時計遺伝子プロモーター駆動性のルシフェラーゼレポーターベクターをトランスフェクションした NIH3T3 細胞のルシフェラーゼ活性をリアルタイムでモニタリングした。概日時計振動周期における様々なタイミングでリガンドを添加後、引き続きルシフェラーゼ活性をモニタリングし、位相シフト量を解析した。さらに、入力刺激の強さと位相シフトとの関係を調べるために、リガンド量を変化させ、様々なタイミングでの位相シフト効果を検証した。

⑥同じ領域内での共同研究

領域内の田川班に概日時計同調機能をもつ人工転写因子を提供し、細胞分化の過程で必要となる同調刺激としての人工転写因子の可能性を検討した。

4. 研究成果

①スイッチ型人工転写因子の作製と同調効果の検討

デザインの簡便性から TALE を鋳型として、時計遺伝子 *Period1* プロモーターを標的とする人工転写因子を数種デザインし、その多くが標的配列を持つレポーターに結合することを確認できた。リガンド応答性ドメインとしては、リガンド刺激に応答して DNA 結合活性を発揮させることが期待されるエストロゲン受容体 (ER) リガンド応答ドメイン、および、リガンド存在下でタンパク質を安定化する分解制御ドメイン (DD ドメイン) を候補として、これらと DNA 結合ドメインとの融合体を作製した。前者に関しては、リガンド添加前から転写活性化能を示し、本入力系としては適さないことがわかった。一方、分解制御ドメインを用いた場合には、リガンドの添加に応答して、転写を活性化することが確認できた。

さらに、DNA 結合性とリガンド応答性を持ち合わせた人工転写因子について、体内時計の同調効果を調べた。しかしながら、TALE を用いた人工転写因子のうち、時計遺伝子発現リズムの位相シフトを誘起するものを得ることはできなかった。そこで、既に同調効果を持つことを見出している、ジンクフィンガーを用いて作製した人工転写因子をもとに、その転写活性化ドメインの性質を変化させた改変型を作製した。同調効果を検討したところ、転写活性化ドメインを強力なものにした場合も、その位相シフトの大きさは顕著には変わらないという結果が得られた。一方、興味深いことに、転写活性化ドメインを持たない場合にも、概日時計の同調効果が弱いながらも認められた。この結果は、細胞時計の同調にとって、*Period1* の誘導に加えて、このジンクフィンガーが標的とする *Period1* プロモーター中のグルココルチコイド応答配列の重要性を示唆するものである。

②入力刺激と同調レベルに関する検討

人工転写因子を発現させた細胞に、様々なタイミングでリガンドを添加したところ、添加のタイミングによって、時計遺伝子発現リズムの位相を前後にシフトさせることが可能ながわかった。また、リガンド濃度に応じて、人工転写因子の細胞内蓄積量に変化し、さらには位相シフトの変化量が変化することが明らかになった。既存の同調刺激 (血清刺激やホルモン刺激など) が様々な遺伝子に強力に作用してしまうのに対して、本システムを用いた結果は、単一の時計遺伝子 *Period1* の発現に摂動を加えるだけで、細胞時計全体の位相シフトを誘起できることを示唆している。また、刺激の大きさに応じた位相変化が生じることを、単一遺伝子に着目して示した初めての例である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 今西未来, 細胞概日時計の人為的制御
化学と生物, 査読有, Vol. 7, 2016, 1817,
DOI: 10.1021/cb300432s
- ② 今西未来, 体内時計の人工制御:リズム治療への挑戦, *化学工業*, 査読無, Vol. 64, 2014, 64-69,

[学会発表] (計 6 件)

- ① Miki Imanishi, Control of the circadian clock by artificial transcription factors, 3rd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium, 2014 年 10 月 3 日, Bern (Switzerland) 招待講演
- ② Miki Imanishi, Manipulation of the cellular clock using artificial transcription factors, FASEB SCIENCE RESEARCH CONFERENCES Genome Engineering: Cutting-edge research and application, 2014 年 6 月 24 日, Nassau (Bahamas) 招待講演
- ③ 今西未来, 遺伝子発現リズムを操る人工タンパク質の創製、「細胞を創る」研究会 7.0, 2014 年 11 月 14 日, 東京大学 (東京都) 招待講演
- ④ Miki Imanishi, Design of artificial DNA binding proteins towards manipulation of cellular functions, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13 日, 金沢大学 (石川県・金沢市) 招待講演
- ⑤ Miki Imanishi, Design of artificial DNA binding proteins towards manipulation of biological rhythms, RNA & Clock 2015, 2015 年 3 月 26 日, 淡路夢舞台 (兵庫県・淡路市) 招待講演
- ⑥ Miki Imanishi, Control of circadian rhythms by artificial transcription factors, Molecular Clock 2014, 京都大学 (京都府・京都市) 招待講演

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 未来 (IMANISHI, Miki)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：80362391

(2) 研究分担者

なし

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119512

研究課題名（和文）機能モジュールライブラリーから構築した環境応答型合成プロモーターシステムの開発

研究課題名（英語）Development of stimuli-responsive promoter systems constructed from a functional module library

研究期間：2014-2015

課題番号：26119714

研究課題名（和文）合成生物学的手法による環境応答型プロモーターシステムの開発と応用

研究課題名（英語）Development and application of stimuli-responsive promoter systems using synthetic biological approaches

研究代表者

上平正道（Masamichi Kamihira）九州大学・工研究院・教授

連携研究者

井藤 彰（Akira Ito）九州大学・工研究院・准教授

研究成果の概要

動物組織細胞の高次分化機能遺伝子の発現調節は細胞機能に依存しており、電子回路や機械装置のように、設計された遺伝子回路が細胞内で確実に機能して自由に生物を操作できるような技術レベルには至っていない。遺伝子機能単位を部品のように扱い、それを組み合わせていくことによって細胞内で機能する遺伝子回路を作製できるようにするための技術基盤として、系統的な遺伝子発現ユニット作製法の確立と確実に細胞ゲノム上で機能する遺伝子発現ユニットを構築するための技術開発に取り組んだ。本研究では、時間的、空間的、量的な遺伝子発現制御を可能とするシステム構築法を提示するために、それぞれの機能モジュールを組み合わせることによって温度・酸素濃度・細胞障害といった環境因子誘導型の大量遺伝子発現システムの作製を行った。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 バイオテクノロジー 遺伝子発現制御 環境応答 遺伝子プロモーター

1. 研究開始当初の背景

Craig Venter らによる人工的に合成された遺伝子から生物を創成する試み [Gibson et al., Science, 329, 52-56 (2010)] が示すように、遺伝子機能の解析的なアプローチから構成的なアプローチへ転換していくことが、次世代の遺伝子工学の方向性として明確に示されている。しかし、構成的なアプローチによる遺伝子回路の設計は容易ではなく、電子回路や機械装置のように、設計された遺伝子回路が細胞内で確実に機能して自由に生物を操作できるような技術レベルには至っていない。これは、遺伝子の発現調節が細胞機能に依存しており、細胞機能は遺伝子発現に依存していることから、ともすればパラドックス関係になること、さらにネットワークとしての遺伝子機能の解析がいまだに困難な点が多ことに起因している。将来、電子回路や機械装置のように遺伝子機能単位を部品のように扱い、それを組み合わせ、組み立てていくことによって細胞内で機能する遺伝子回路を作製できるようにするための技術基盤をつくる必要がある。

2. 研究の目的

電子回路や機械装置のように、遺伝子機能単位を部品のように扱い、それを組み合わせ、組み立てていくことによって細胞内で機能する遺伝子回路を作製できるようにするための技術基盤として、構成的手法による遺伝子発現ユニット作製法の確立と確実に細胞ゲノム上で機能する遺伝子発現ユニットを構築していくための技術開発に取り組むこととした。本研究では、機能モジュールを組み合わせることによって特色をもった遺伝子発現ユニットを設計し、実際に応用することとした。機能モジュールライブラリーから構築した遺伝子発現ユニットの例として、温度・酸素濃度・細胞障害といった環境因子誘導型の大量遺伝子発現ユニットや量的制御が可能な複数遺伝子の同時発現やカスケード発現システムの作製を行った。

3. 研究の方法

動物細胞における外来遺伝子の発現ユニットは、単純には、転写プロモーター、目的遺伝子およびポリ A 付加シグナルの各配列を直列につなぐことで構成される。外来遺伝子の発現調節を行いたいときには、今でも生物由来の既存のプロモーターの選択によって行われることが多い。これまでに、塩基配列解析や遺伝子の機能解析による塩基配列やタンパク質において機能的な最小単位（機能モジュール）の同定がされており、膨大な知見の蓄積ができてきている。こういった機能モジュールに関する知見の蓄積によって、機能モジュールの組合せによる再構成的なアプローチ、すなわち、人工的にデザインしたものを細胞内で機能させることが可能となっ

ている。遺伝子工学分野での合成生物学的アプローチは、発現ユニットの設計から、それらを組み合わせた遺伝子回路・代謝経路の設計、ゲノム設計および遺伝子をベースとした細胞機能のデザインということになる。遺伝子に関する各材料・部品から統合したものまで合成生物学的アプローチが可能である。外来遺伝子の発現調節を伴う遺伝子発現ユニットの設計でも、機能モジュールの再構成による手法を用いることができる（図1）。機能モジュールとして、システムのスイッチや発現量制御のためのプロモーター/エンハンサー、リプレッサー/トランスアクチベーター、インスレーター、内部リボソーム結合領域（IRES）などのポリシストロニックな発現のための配列因子、人工イントロン、mRNA 安定化/不安定化配列などが利用できる。転写レベルでの調節だけでなく、翻訳後のプロセッシング、例えば、プロテアーゼによる分解やユビキチン化などの修飾による分解制御を利用することによって生産調節することも可能である。また、外来遺伝子発現ユニットを細胞に導入して発現調節を行わせる際に、細胞がもともと有している転写調節機構を利用するだけでなく、転写を活性化するための人工トランスアクチベーターシステムも開発されている。これは特異的な DNA 配列を認識するタンパク質を利用して転写活性化タンパク質との融合タンパク質とすることで目的遺伝子発現を内在の発現調節と独立して働かせるもので、代表的なものに大腸菌の Tet タンパク質とその認識配列 *tetO* や、酵母の Gal4 タンパク質とその認識配列 *UAS* を利用するものがあり、動物細胞でも利用されている。動物細胞においても、複数の遺伝子発現ユニットを構成して相互作用させながら遺伝子回路として設計し、電気回路の論理回路に相当する遺伝子発現調節系を作る試みもなされている。複数の遺伝子発現ユニットが相互作用する場合には、それぞれの遺伝子発現ユニットからの発現量の調節が必要となる。また、ゲノムに組み込んで機能させる必要がある場合は、導入ゲノム部位の周囲環境や発現ユニットの配置方法も考慮すべき問題となる。これらにより、電気回路と異なり、設計段階において細胞内で正しく機能することを保証するのは困難であり、試行錯誤によるチューニングが必須となる。

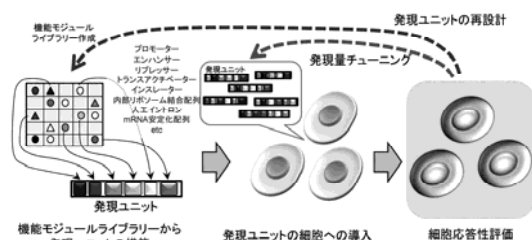


図1. 機能モジュールの再構成による遺伝子発現ユニットの構築

動物細胞における人工的な外来遺伝子発現システムとして、先駆的かつ有用な薬剤誘導型の遺伝子発現システムに Tet システム（タカラバイオ）がある。このシステムでは、大腸菌のテトラサイクリン耐性遺伝子のオペロン由来の Tet リプレッサータンパク質とその結合塩基配列 (*tetO*) を基にしており、Tet リプレッサーと転写活性化ドメイン (VP16) のキメラタンパク質を転写活性化因子として用いる人工トランスアクトベーターシステムである。Tet リプレッサータンパク質はテトラサイクリン系抗生物質（通常はドキシサイクリン [Dox] が用いられる）と結合すると構造変化によって応答塩基配列 (TRE) との結合性が変化するため、TRE のすぐ下流に最小プロモーターを配置すると、Dox の添加/非添加によって人工トランスアクトベーターの TRE への結合を制御することによってプロモーター下流の目的遺伝子の発現を誘導することができる (図2上)。Tet システムでは、基本的に人工トランスアクトベーター (TA) タンパク質を細胞内で発現しておく必要があり、そのために TA の発現ユニットを目的遺伝子の発現ユニットとは別に構成して、常時発現させておく場合が多い。そして誘導薬剤の添加の有無で TA の活性化により目的遺伝子発現を誘導する。元々は Dox 添加により TRE との結合が消失することにより目的遺伝子発現をオフにするシステムとして開発されたが (Tet-Off)、変異 Tet リプレッサーの開発により Dox 添加により発現誘導するシステム (Tet-On) も利用できるようになっている。

Tet システムは薬剤添加によって好みのタイミング (時間的な制御) によって外来遺伝子を発現させることができるシステムであるが、空間的な制御あるいは量的な制御については考慮されていない。我々は、Tet システムのような人工的な転写誘導システムをベースに時間的、空間的および量的制御ができる遺伝子発現システムの開発を行った。

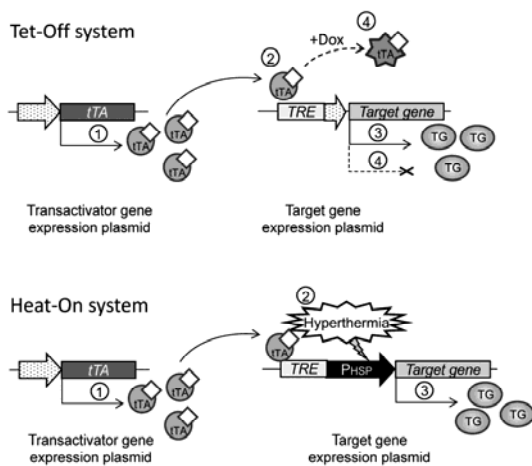


図2. Tet-OnシステムとHeat-Onシステム

4. 研究成果

①温熱誘導型発現システムの開発

遺伝子治療や動物細胞による物質生産などへの応用においても精緻な発現制御を伴う遺伝子発現システムの開発が必要となっている。我々は、このために組織特異的あるいは環境因子に応答して自律的に大量遺伝子発現を誘導するためのシステムを開発してきた。組織特異的あるいは環境因子に応答する発現システムを構成する際に、単純には、元来生物が有している機能の利用として、それに対応する組織あるいは環境因子によって特異的に発現しているタンパク質のプロモーター領域を利用することが考えられる。しかし、生物が独自に進化させた発現ユニットは細胞内でそのタンパク質発現のために構成が最適化されているので、発現させるタンパク質を変えて人工的な発現ユニットとして再構成する場合には、高発現にならなかったり、制御領域全体を利用するとかなり長大な領域を必要とすることがある。また、このアプローチでは一般性をもって発現ユニットを設計することは困難である。我々は、単純化された機能モジュールの組合せによる発現ユニットの再構成という考えに基づいて、発現をオンにする機能 (スイッチ) と発現量を増大させる機能 (アンプ) を分けてそれらの組み合わせることによって大量発現を誘導するシステムの開発を行った。具体的な応用として、温熱誘導型の遺伝子発現システムの例を示す。温熱誘導のような環境因子刺激応答型のシステムでは、時間的、空間的発現制御が可能となる。ここでは、アンプ機能に Tet トランスアクトベーターシステムを利用することとし、温熱誘導できるヒートショックプロテイン (HSP70B') プロモーターの機能領域を同定して (456bp) をスイッチとして、Tet システムでの目的遺伝子発現のための TRE 下流の最小プロモーターの代わりに用いた (図2下)。HSP70B' プロモーターは 43-45°C の温熱刺激によって、ヒートショックファクター (HSF) が細胞質から核へ移行し、HSP プロモーター上のヒートショックエレメント (HSE) へ結合することによって下流遺伝子の転写が開始される。HSP70B' プロモーターは比較的厳密に誘導されるプロモーターであるが、転写活性は高発現ウイルスプロモーターと比べるとあまり高くない。この発現誘導システムでは、転写活性型 TA を細胞内で恒常的に発現させておくと、温熱の有無により発現を誘導できる Heat-On システムとなった。転写活性型 TA が存在しても温熱誘導がかからない場合には、目的遺伝子の転写はほとんどおこらず、温熱により HSF が転写をオンにすると、HSF よりも強い転写活性をもつ TA により HSP プロモーター単独より目的遺伝子の高い発現が誘導された。温熱刺激は長時間かけると細胞に対してダメージとなるので、基本的に一過的な刺激を加えることになる。その

ため、この温熱応答型遺伝子誘導システムでは、温熱刺激によって誘導された目的遺伝子発現は持続せず速やかに低下した。物質生産への応用では、一回の温熱刺激により持続的な目的遺伝子の大量発現が誘導されることが望ましい場合が多い。これを実現するため、上記の温熱誘導型遺伝子発現システムの機能モジュールの配置構成を変えたシステムを開発した(図3上)。このシステムでは、HSPプロモーターをTAの発現制御に用いることとし、HSPプロモーターの直下流に最小プロモーター領域をとまうTREを配置した。これにより、まず温熱刺激により転写活性型TAの発現誘導がおこり(①)、生産された転写活性型TAは目的遺伝子の発現誘導も行うが、HSPプロモーター下流のTREにも結合しポジティブフィードバック的に自身の発現を増強することによって持続的に転写活性型TAが生産される(②)。これにより、目的遺伝子の大量発現が持続的に誘導されることになる(③)。いままで解説したシステムでは、TAを転写活性化に利用するため、目的遺伝子とTAの2つ発現ユニットが必要である。温熱誘導でかつ持続型の発現システムにおいて、IRESを用いたバイシストロニックな発現システムを取り入れることで、システムを1つの発現ユニットにまとめたワンパックシステムとすることができる(図3下)。ワンパックシステムでは、温熱誘導により目的遺伝子とTAの両方のタンパク質の同時生産がIRESにより行われ、生産されたTAにより、HSPプロモーター下流のTREに結合しポジティブフィードバック的に目的遺伝子とTA生産を持続的に誘導する。これらの遺伝子発現システムを作製して、目的遺伝子としてレポーター遺伝子を用いて細胞に導入し、43℃に1時間晒した後に導入レポーター遺伝子の発現挙動を解析したところ、温熱刺激により発現が誘導され、TA生産のポジティブフィードバックループによる目的遺伝子の発現増強も観察された。温熱誘導型遺伝子発現システムを開発することができたので、本システムを用いたがん温熱療法における遺伝子治療への応用について検討した。

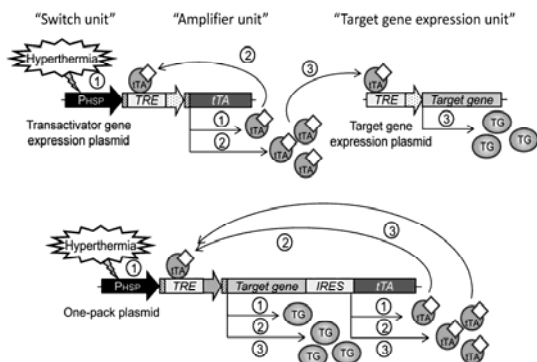


図3. 持続発現型Heat-Onシステム

②温熱誘導型発現システムの遺伝子治療への応用

一般にがん細胞は正常組織の細胞に比べて熱に弱い性質を持つため、熱を利用してがん細胞を殺す、温熱療法が行われている。がん組織は42℃以上で傷害を受けるとされ、その温度まで加温することで熱によりがん細胞を物理的に殺すことが可能となる。温熱療法の治療効果としては、熱でがん細胞を物理的に殺すほかに、がん免疫を増強する効果があることが分かっている。一方で、腫瘍組織だけを局所的に加温することは容易ではなく、正常細胞までも傷つけるおそれがあり、温熱治療の問題点となっている。生体内での局所加温の方法として、交流磁場中で発熱する磁性ナノ粒子をドラッグデリバリーシステムによって腫瘍部位に送達し、磁場照射を行うことで腫瘍部位だけを加温する治療法の研究が行われている。しかし、温熱療法だけでがん組織を消滅させることは困難な場合もあり、放射線療法、化学療法、免疫療法といった他の治療法との併用も行われる。ここでは、先に述べた温熱誘導型遺伝子発現システムを、温熱療法との併用効果をねらったがんの遺伝子治療における治療遺伝子発現システムとして利用の可能性について検証を行った。

まず *in vitro* で評価するために治療遺伝子として単純ヘルペスウイルス由来のチミンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を温熱誘導型遺伝子発現システムの目的遺伝子として導入した。HSV-TKは、抗ウイルス薬として使われているプロドラッグであるガンシクロビル (GCV) に作用して、DNA合成阻害を引き起こす毒性物質に変換することで殺細胞作用を発揮する。HSV-TK発現細胞はGCV投与で特異的に殺されることから、がん遺伝子治療の治療遺伝子候補として用いられている。がん細胞のモデルとしてHeLa細胞に、HSV-TK遺伝子を発現する温熱誘導型遺伝子発現システムが搭載されたプラスミドを導入し、43℃、30分間加温の有無により、

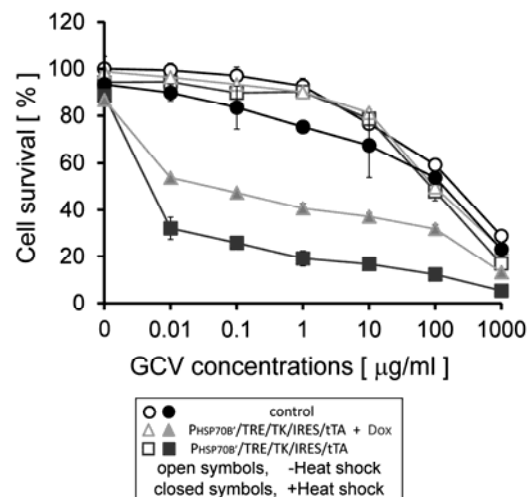


図4. 温熱誘導型遺伝子発現システムの細胞での評価

種々の GCV 濃度下での培養において、その後の細胞生存率の変化を測定した (図 4)。加温を行わなかった条件では、10 mg/ml 以上の高濃度の GCV により細胞死が観察されたが、それ以下の濃度では細胞死は認められなかった。今回の条件では、加温だけではあまり殺細胞効果はみられなかった。一方、治療プラスミドを導入し、43°C の加温を行った条件では、臨床で応用できる GCV 濃度範囲で、温熱による遺伝子発現の効果により顕著に高い殺細胞効果が得られた。また、Dox を添加した後に加温を行った条件では、TA のポジティブフィードバック効果がキャンセルされるため、殺細胞効果が抑制された。これらの結果より、我々が構築した温熱誘導型で転写のポジティブフィードバックループを含む遺伝子発現システムは、温熱により治療遺伝子が誘導発現され、ポジティブフィードバックループにより発現増強されることで、GCV による殺細胞に顕著な効果があることがわかった。次に、担癌モデルマウスを使って *in vivo* での効果を検証した。In vivo での実験では局所加温を行う必要があるため。加温には、磁性ナノ粒子に磁場照射することによって行うことにした。また治療用遺伝子としては、TNF- α 遺伝子を用いた。A549 細胞をマウスに移植し、その後がん組織に治療用プラスミドをカチオンリポソームとともに注入した (図 5)。24 時間後に磁性ナノ粒子 (マグネタイトカチオンリポソーム) をがん組織に注入した。磁性ナノ粒子の注入から 24 時間後に交流磁場照射により腫瘍表面が 43°C になるように維持しながら、30 分間処理した。その後、腫瘍組織での TNF- α 生産量と経時的なマウス内の腫瘍体積の変化を測定した (図 6)。その結果、磁場照射によって腫瘍組織内で TNF- α の生産が誘導された。転写のポジティブフィードバックループを組み込んだものは、無いものに比べて腫瘍組織内の TNF- α 生産量も高くなった。腫瘍体積に関しては、遺伝子導入の有無にかかわらず磁場照射による温熱治療処理をしなかったマウスでは腫瘍体積の著しい増大が観察されたのに対して、磁場照射による温熱処理によって腫瘍体積の増大を抑えることができ、転写のポジティブフィードバ

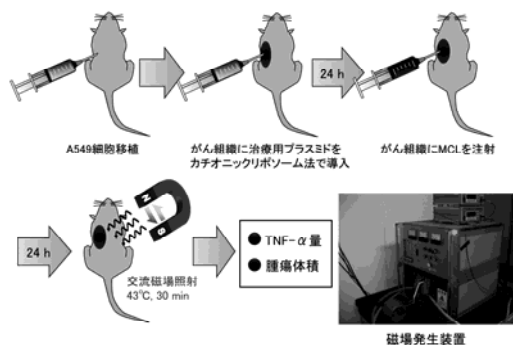


図5. 担癌モデルマウスを使った温熱遺伝子治療の実験スキーム

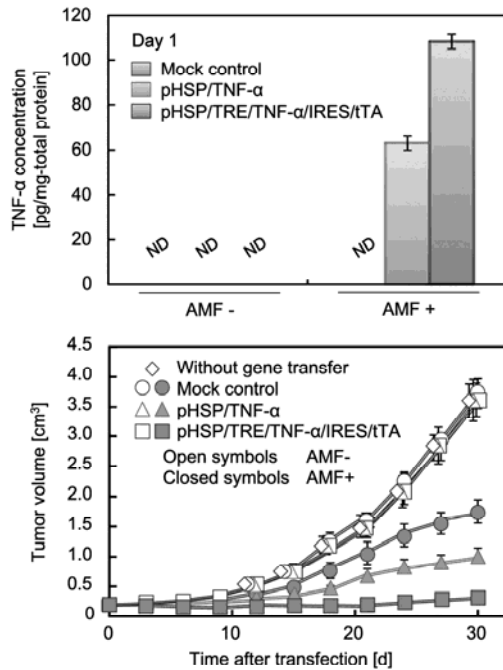


図6. 温熱遺伝子治療の治療効果の検証。腫瘍組織での TNF- α 生産量(上)と経時的な腫瘍体積の変化(下)

ックループを含む温熱誘導型 TNF- α 発現プラスミドを導入したマウスでは、腫瘍体積の増大がほとんど見られなく、本システムによる温熱遺伝子治療の有効性を確認することができた。

このように、本システムは温熱誘導型の遺伝子発現システムであるが、磁性ナノ粒子との併用によって磁場誘導型の遺伝子発現システムとして利用できる。磁性ナノ粒子を細胞内に取り込ませると、磁場照射による細胞内の局所的な加温によっても遺伝子発現誘導が可能であることがわかっている。この場合は、周囲の環境の温度上昇はほとんど観察されないことから、磁性ナノ粒子を含んだ細胞と含んでいない細胞で磁場照射による厳密な遺伝子発現制御が可能であると考えられる。

③その他の遺伝子発現システムへの応用

温熱誘導型遺伝子発現システムの開発と遺伝子治療への応用について主に記載したが、本システムでは、発現誘導のスイッチとなるプロモーターを置き換えることで、汎用的な大量遺伝子発現システムとして利用することが可能である。プロモーターとして p53 プロモーターを用いることで DNA 損傷を及ぼす薬剤などのスクリーニングに利用可能な細胞センサー構築のための遺伝子発現システムの開発を行っている。また、酸素濃度感受性プロモーターを用いて、さらに人工トランスアクチベーターにも酸素濃度によって分解機能を持たせることによって厳密な誘導制御を可能とした、組織内の酸素濃度検知に利用できる細胞センサーのための遺伝子発現システムを開発した。さらに改良

を進めることによって、これらの遺伝子発現システムが実際の応用に使われるようになるものと思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① A. Ono, A. Ito, T. Sato, M. Yamaguchi, T. Suzuki, Y. Kawabe, M. Kamihira, Hypoxia-responsive transgene expression system using RTP801 promoter and synthetic transactivator fused with oxygen-dependent degradation domain, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, in press
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.012
- ② A. Ono, A. Ito, T. Suzuki, M. Yamaguchi, Y. Kawabe, M. Kamihira, DNA damage-responsive transgene expression mediated by the p53 promoter with transcriptional amplification, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, **120**, 463-466 (2015).
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.02.009
- ③ M. Yamaguchi, A. Ito, A. Ono, Y. Kawabe, M. Kamihira, Heat-inducible gene expression system by applying alternating magnetic field to magnetic nanoparticles, *ACS Synth. Biol.*, 査読有, **3**, 273-279 (2014).
DOI: 10.1021/sb4000838
- ④ 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.*, 査読有, **114**, 460-465 (2012).
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.05.006
- ⑤ A. Ito, N. Okamoto, M. Yamaguchi, Y. Kawabe, M. Kamihira, Heat-inducible transgene expression with transcriptional amplification mediated by a transactivator, *Int. J. Hyperthermia*, 査読有, **28**, 788-798 (2012).
DOI: 10.3109/02656736.2012.738847

この他 4 報の論文を発表しております。

[学会発表] (計 25 件)

- ① A. Ono, A. Ito, T. Suzuki, Y. Kawabe, M. Kamihira, DNA damage-induced gene expression system for living cell sensors, The 27th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2014), 2014.11.14. 北九州国際会議場 (北九州市) .

- ② 佐藤 智詠, 井藤 彰, 河邊 佳典, 上平 正道, 低酸素応答型細胞センサーの開発, 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014.9.17. 九州大学 (福岡市) .
- ③ M. Yamaguchi, A. Ito, N. Okamoto, Y. Kawabe, M. Kamihira, A heat-inducible gene expression system for gene therapy, World Academy of Science, Engineering and Technology 2012 (WASET 2012-Paris), 2012.11.29. (Paris).

この他、22 件の学会発表を行っております。

[解説・総説] (計 2 件)

- ① 上平正道, 井藤 彰, 動物細胞で作動する温熱応答型遺伝子発現システムの開発, 生物工学会誌, **94**, 180-184 (2016).
- ② S. Huang, M. Kamihira, Development of hybrid viral vectors for gene therapy, *Biotechnol. Adv.*, 査読有, **31**, 208-223 (2013).

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/>
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002690/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上平 正道 (KAMIHIRA, Masamichi)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：40202022

(2) 連携研究者

井藤 彰 (ITO, Akira)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：60345915

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119513

研究課題名（和文）枯草菌細胞内への細胞周期回路の人工合成

研究課題名（英語）Construction of an artificial-cell cycle in *Bacillus subtilis*

研究代表者

末次正幸（MASAYUKI Su'etsugu） 立教大学・理学部・准教授

研究成果の概要

大腸菌では、染色体複製開始蛋白質 DnaA の活性があたかもサイクリンのように周期変動する。この DnaA 活性の変動は複製開始制御だけでなく、様々な遺伝子の発現を制御し、細胞周期の駆動を保證するシステムとして機能すると考えられている。我々は蛍光顕微鏡により大腸菌細胞内での DnaA 活性の周期変動をリアルタイムで観測する手法を開発し、いかにして DnaA 活性変動が細胞周期性遺伝子の転写変動を導いているのかについて明らかにした。また、大腸菌 DnaA 活性変動のシステムを枯草菌という異種細胞内で再構成することを試みた。

研究分野：合成生物学

キーワード：染色体複製 DnaA 枯草菌 大腸菌 細胞周期 転写制御

1. 研究開始当初の背景

原核、真核を問わず細胞が秩序よく自己複製を繰り返すためには、1つ1つの細胞周期イベントが、規則正しく、順を追って実行されなければならない。細胞周期はこの秩序を保証するものである。真核生物の細胞周期の進行は、複数のCdk/サイクリン複合体活性の周期変動によってもたらされ、必要な遺伝子が適切なタイミングで転写されるよう制御されている。より原始的な細胞であるバクテリアにおいても、細胞周期的な遺伝子発現の制御機構は保存されており、細胞周期プロセスの区切りが明確なバクテリアであるカウロバクターでは、20%もの遺伝子が転写の細胞周期制御を受けていることが知られている。大腸菌においては、細胞周期の明確な区切りはあまりなく、増殖が速い場合には、細胞周期のラウンドを重複させながら増殖する。一方で、増殖速度が十分に遅い場合にはやはり、染色体複製の開始から終結、細胞分裂といったイベントが重複せずに秩序正しく進行する。またこのとき、幾つかの遺伝子については細胞周期を通じて、その転写レベルが変動することも分かっている。転写の周期変動がみられる遺伝子の多くはプロモーター近傍に複製開始蛋白質 DnaA の結合配列 (DnaA box) をもつ。DnaA の細胞内量は一細胞あたり約 1000 分子であり、細胞周期を通じてほぼ一定に保たれている。一方で、DnaA の複製開始活性が ATP/ADP 結合によって制御されており、活性型 (ATP 結合型) DnaA の割合が複製開始時期をピークに、あたかも Cdk/サイクリンのように細胞周期変動することが知られている。そして DnaA 活性レベルの周期変動が、遺伝子転写の周期制御に機能する事を示唆する報告がこれまでいくつかなされている。

2. 研究の目的

DnaA の複製開始活性の細胞周期オシレーションを導くための原理を解明すべく、枯草菌という異種細胞の中に、DnaA をはじめとした大腸菌染色体複製因子群及び DnaA 活性制御因子を導入し、DnaA 活性オシレーションを人工的に再現することを目指した。また、これと並行して、DnaA 活性周期変動が細胞周期性遺伝子の発現パターンに及ぼす影響を知るため、細胞内での DnaA 活性の変動を蛍光観測技術を用いてリアルタイムにモニターする手法の開発を目指した。

3. 研究の方法

①枯草菌細胞内における DnaA 活性オシレーション系の人工合成

これまでの精力的な生化学的研究により、DnaA 活性制御の基本的なメカニズム及び必要な構成因子はほぼ分かっている。そこで本研究では、この活性制御機構を再

構築することで DnaA 活性の細胞周期オシレーションを人工的に再現することとした。複製開始後、DNA 上に多数のクランプ分子 (DNA 複製装置の構成因子) が装着される。クランプの DNA 装着に依存して DnaA に結合した ATP の加水分解が進行し、不活性な ADP 結合型 DnaA が生じる。よってフィードバック的に、続くラウンドの複製開始が抑制される。複製終結後、クランプが DNA から解離すると、フィードバック抑制が解除されるため、活性型である ATP 結合型 DnaA が再蓄積、次ラウンドの複製開始が導かれる。そこで我々はまず、DNA へのクランプの装着・解離の動態を枯草菌という異種細胞内で導くことができるか検討した。続いて、以上の大腸菌遺伝子の発現は IPTG 依存に発現量をコントロール可能なようにし、発現レベルの最適化を行いながら検討を行った。また、クランプ及び DnaA にはそれぞれ蛍光タンパク質で標識し、その細胞内での挙動を蛍光顕微鏡を用いてリアルタイムに観測できるようにした。

②細胞内における細胞周期依存の DnaA 活性変動のリアルタイム蛍光観測技術の開発

大腸菌においては、*mioC*, *nrdAB* といった遺伝子の転写量について、その細胞周期依存的な変動が知られている。*mioC* プロモーター (*PmioC*), *nrdAB* プロモーター (*PnrdAB*) 近傍には、複製開始タンパク質 DnaA が特異的に結合する配列 (DnaA box) がみられる。これらのプロモーターの下流に蛍光タンパク質を導入したプラスミドを作製し、そのプラスミドをもつ大腸菌の蛍光顕微鏡によるタイムラプス観測を行った。蛍光タンパク質としては折りたたみ速度が早いことが知られている GFP 変異体を使用し、さらに速やかに分解されるよう分解誘導配列の付加も施した。

これと並行して、既知の遺伝子プロモーター以外にも DnaA 活性により制御を受けるプロモーターがあるのではないかと考え、DnaA 活性型に応じたゲノムワイドな DNA 結合パターンについて ChIP-seq を用いた解析を行った。

今回の研究により、DnaA はその活性型に依存してプロモーターに特異的に結合し、転写制御を行うことが分かった。さらに、プロモーター構造に応じて、その制御は抑制的あるいは促進的に機能した。今回解析した遺伝子以外にもプロモーター近傍に DnaA box をもつ遺伝子が幾つか知られている。おそらく、DnaA は細胞周期依存的な転写の ON/OFF を行うマスターレギュレーターとして機能しているものと考えられる。DnaA を介して染色体複製開始と遺伝子転写を共役するという機構は、秩序だった細胞周期進行を保証する上で重要であると考えられ、本研究の結果はそのための分子基盤を提唱するもので

ある。

③DnaA の活性型に依存した遺伝子転写制御メカニズムの解明

②で構築した DnaA 活性変動の観測系を基盤に、DnaA 活性変動の蛍光検出に必要なプロモーター上の塩基配列要素を調べた。さらに、各種プロモーター変異体の解析より得られた結果をもとに、DnaA 活性型に依存した転写調節の分子機構モデルを構築し、このモデルを実証するための *in vitro* 転写反応再構成系を用いた解析を行った。

4. 研究成果

①枯草菌細胞内における DnaA 活性オシレーション系の人工合成

まず、大腸菌クランプの DNA 装着・解離の動態を枯草菌という異種細胞内において再現できるか検討した。枯草菌内で発現した大腸菌クランプの蛍光顕微鏡解析を行ったところ、クランプが枯草菌染色体 DNA 上に装着されていることを示唆する結果が得られた。この大腸菌クランプの装着は枯草菌の複製周期に依存しており、複製開始とともに DNA へと装着され、複製終了後には DNA から解離するという動態をうまく捉えることができた。この時、大腸菌クランプの発現は内在する枯草菌自身のクランプの機能を相補することはできず、また枯草菌細胞増殖に対して影響することもなかった。

続いて、大腸菌 DnaA の枯草菌内への導入についても検討した。クランプと異なり、過剰な DnaA 発現は枯草菌細胞の増殖阻害を導くものであった。しかしながら、発現量を抑える事で枯草菌に大腸菌 DnaA を保持させる事が可能であった。また、この時 DnaA は核様体上に局在することが蛍光顕微鏡観察により見出された。DnaA の活性がクランプ動態に依存して変動しているかを知るべく、DnaA 活性のリアルタイム検出系を用いた解析を進めているところである。

②細胞内における細胞周期依存の DnaA 活性変動のリアルタイム蛍光観測技術の開発、および③DnaA の活性型に依存した遺伝子転写制御メカニズムの解明

PmioC 活性の変動をリアルタイムで解析するため、プロモーターの下流に蛍光タンパク質を導入したプラスミドを作製した。そのプラスミドをもつ大腸菌を蛍光顕微鏡によりタイムラプス観測したところ、個々の細胞で細胞周期的な蛍光量の変動が見られた。この変動が複製開始のタイミングに依存するか調べるために、複製周期を同調した細胞における蛍光量の変動を解析した。その結果、*PmioC* 活性は複製開始前で抑制されることが分かった。さらに各種プロモーター変異体を構築して転写変動に必要な最小要素を調べたところ、DnaA box および DnaA box に隣接した ATP-DnaA box が必要であることが見出された。この ATP-DnaA box は *PmioC*

配列上、RNA ポリメラーゼの結合部位(-35 box)と重複するものであった。

同様に *PnrdAB* の転写活性についても解析を行った。*PmioC* と同様に、DnaA box と並んだ ATP-DnaA box を含む最小要素が浮かび上がった。興味深いことに、同調細胞の解析を行ったところ、*PmioC* とは相反して、複製開始前までに転写活性が促進されることが分かった。*PmioC* と異なり、*PnrdAB* では ATP-DnaA box が -35 box の数塩基上流にある。このことが *PmioC* とは相反する促進的な転写制御を導く原因となっているのかもしれない。

続いて実際に *PmioC*, *PnrdAB* に対して、ATP-DnaA 特異的な結合があるのか否かについて、精製 DnaA を用いて検討した。ATP-DnaA box (コンセンサス: AGatct)は、同時に Bgl II の認識配列である。このことを利用して Bgl II protection assay を行ったところ、*PmioC*, *PnrdAB* いずれを用いた場合も、ADP-DnaA に比べ、ATP-DnaA において強いプロテクションが検出された。この結果は、DnaA のプロモーターへの結合がその活性型に応じて制御されていることを示唆する。

DnaA の活性型に依存したプロモーター結合が、遺伝子転写に制御的に機能するか否かを知るため、RNA ポリメラーゼホロ酵素を用いた *in vitro* 転写系を構築した。*PmioC*, *PnrdAB* 転写活性への影響を解析したところ、両プロモーターとも ATP-DnaA 特異的に顕著な影響が見られた。そしてこのとき、*in vivo* の結果と対応するように、*PmioC* の転写活性においては抑制的、*PnrdAB* においては促進的、というプロモーターに応じた ATP-DnaA の相反する作用についても検出された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Su'etsugu, M., Harada, Y., Keyamura, K., Matsunaga, C., Kasho, K., Abe, Y., Ueda, T. and Katayama, T. DnaA N-terminal domain interacts with Hda to facilitate replicase clamp-mediated inactivation of DnaA. *Environ. Microbiol.*, 15, 3183-3195 (2013). 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 松本健佑、末次正幸、染色体複製開始のタイミングと共役して遺伝子転写を抑制/促進する機構、第 23 回 DNA 複製・組換え修復ワークショップ、焼津、2015 年 10 月
- ② 松本健佑、末次正幸、大腸菌における細胞周期性転写活性制御機構の解析、第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、滋賀県大津、2015 年 6 月
- ③ 末次正幸、松本健佑、小林寛子、大腸菌

遺伝子転写の細胞周期制御、「細胞を創
る」研究会 7.0、東京、2014年11月

- ④ 松本健佑、末次正幸、大腸菌における細胞周期依存の転写活性変動のリアルタイム観測系を用いた解析、第37回分子生物学会年会、横浜、2014年11月
- ⑤ 末次正幸、小林 寛子、松本 健佑、片山 勉、再構成アプローチによる大腸菌染色体複製周期の解析。日本農芸化学会2014年度大会シンポジウム「ゲノム変化による潜在能力覚醒を基にした細菌研究の新展開」、東京、2014年3月

〔図書〕(計1件)

- ① Katayama, T. and Su'etsugu, M. Chromosome replication of *E.coli* and *B.subtilis*. *Escherichia coli and Bacillus subtilis; the frontiers of molecular microbiology revisited* (Sadaie, Y. & Matsumoto, K., eds), chapter 3-1, Research Signpost, 29-43 (2012)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.rikkyo.ac.jp/web/sue-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末次 正幸 (MASAYUKI Su'etsugu)

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：00363341

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A05 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119515

研究課題名（和文）翻訳システム改変による人工細胞創成

研究課題名（英語）Escherichia coli host engineering by translational system engineering

研究代表者

宮崎健太郎（Kentaro Miyazaki） 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究成果の概要

大腸菌の翻訳プロファイル改変を目的に、リボソームの改変を行った。様々な環境よりメタゲノムより 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。得られた増幅産物を 16S rRNA 遺伝子発現ベクターに組み込み、次いで大腸菌 16S rRNA 遺伝子欠損株 $\Delta 7$ 株を形質転換した。ショ糖によるカウンターセクションにより機能相補株を選抜し、数万規模のライブラリーを構築した。コロニーの大きさなどの観点からいくつかの変異株を選抜し、16S rRNA 遺伝子の配列解析を行った結果、大腸菌の属するプロテオバクテリアとは門(Phylum)のレベルで異なる遺伝子が生育を相補することを示した。これらの変異株の生育速度は野生株（ $\Delta 7$ 株を大腸菌 16S rRNA で機能相補した株）と比較して遅い値を示したが、実験室内進化を行うことにより、生育速度の短縮した変異株を得ることに成功した。変異株に含まれる 16S rRNA 遺伝子を解析した結果、大腸菌に残存する 16S rRNA 遺伝子断片と一部の領域で組換えが生じていることが判明した。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 翻訳 リボソーム 大腸菌 水平伝播

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の分野にあって、「細胞を創る」アプローチとして主流となっている方法は、人為的な代謝系や遺伝子回路の設計、組み込みである。既存の生物にはない遺伝子制御系や生合成系を導入することにより、新たな生物機能を付与することができる。こうした方法は、モジュラー化したコンパクトな機能ユニットを宿主の代謝系と干渉しない形で組み込んでいる。より高次の機能の実現に向け、遺伝子制御ユニットの多様化やアレンジ、創り込みが盛んに行われている。ここでは予期せぬ機能の創出というよりも、期待通りの機能を構成的なアプローチにより正確に実現できるかどうか、設計アルゴリズムの是非を問うている。また機能しない場合には、その原因を突き止め修正するという知の探求に力点が置かれている。これに対し我々は、非構成的なアプローチで切り込みたい。期待通りの機能を創造するのではなく、機能発現の起点となる制御系を改変することで、様々な表現型を生み出すこと、その表現型ライブラリーの中から目的機能を同定するというコンビナトリアルなアプローチを提唱する。

我々が改変対象とする制御系は翻訳システム（リボソーム）である。リボソームは3つのRNAと55のタンパク質からなる複雑な超分子複合体であるが、その合理的改変は困難を極める。とくに小サブユニットの中心に位置する16S rRNAは、微生物の系統解析にも用いられる種固有の分子である。ところが我々は、大腸菌16S rRNAの完全欠損株を宿主に異種生物由来の16S rRNAで相補させる実験を行ったところ、予想に反して大腸菌16S rRNA遺伝子とは80%程度の相同性しかもたない遠縁生物由来の16S rRNAが生育を相補することを見出した。種固有と思われた16S rRNAが大腸菌の他因子と協調して機能することはリボソームの可塑性を示すとともに、大規模に改変する余地のある分子であることを示した。

さらに異種16S rRNAの導入された変異株は、増殖速度、温度特性、アルコール耐性、コロニー性状など、様々な点で野生株とは異なる特徴を示した。この結果は、リボソームの意外な可塑性とともに、リボソーム変異を起点とした細胞工学という細胞創成の新たな可能性を示している。多様化した細胞から目的の形質を示す株を選抜することで「欲しい細胞」を創ることができるはずである。「多様性からの選択」は生物の基本戦術であり、細胞工学の手法としてもきわめて合理的・汎用的な手法になると考え、このアイデアに基づき研究を行う。

2. 研究の目的

細胞機能の中枢を担うリボソームを改変することで翻訳システムに摂動を与え、細胞表現型の多様化、育種を行うための技術を開発

する。とくに、16S rRNA置換変異に基づく人工細胞創成という手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

大腸菌16S rRNA遺伝子の完全欠損株の生育を相補しうる16S rRNA遺伝子を、環境DNA（メタゲノム）をソースとして徹底探索する。次に生育を相補する16S rRNA遺伝子をDNAシャッフリングにより掛け合わせ、非天然型の16S rRNAを創出する。さらに、それらを用いた生育相補性のスクリーニングを行う。同様の手法を50Sサブユニットの骨格を形成する23S rRNAにも展開する。課題別にまとめると以下ようになる。各課題で得られた16S rRNA、23S rRNAの変異部位・パターンを既知の変異情報などと比較するとともに、進化系統的特徴などと合わせて体系化する。大腸菌のrRNAオペロンの完全（七重）欠損株の生育を異種生物由来の16S rRNAにより相補させる。16S rRNA遺伝子の供給源としては環境ゲノム（メタゲノム）を用い、多様な生物由来の16S rRNA遺伝子を徹底的にスクリーニングする。16S rRNAの置き換わった変異株の表現型を、増殖速度、各種ストレス（塩、有機溶媒など）耐性、抗生物質耐性、温度感受性、コロニー性状など多様な観点から行う。

4. 研究成果

大腸菌16S rRNA遺伝子の完全欠損株（ $\Delta 7$ 株）を相補しうる遺伝子をより徹底的に探索することを目的に、各種環境試料よりメタゲノムを調製し、16S rRNAをPCR増幅した。16S rRNAの発現ベクターに組み込み、 $\Delta 7$ 株を形質転換した。ショ糖によるカウンターセレクトシオンの有無により機能相補率を判定した結果、数千規模の相補株を取得した。中でも、とくに生育の遅い変異株に着目して分離し、大腸菌16S rRNA遺伝子との配列相同性80%前後のものを数多く分離することに成功した。相補株の総計は数千規模に上り、大規模な変異株ライブラリーの創成に成功した。

更に、異種遺伝子発現という点から大腸菌変異株ライブラリーを様々なレポーター遺伝子を用いてスクリーニングした。その結果、大腸菌自身の16S rRNAを保持した株よりも高い発現レベルを示す変異株を同定することができた。また増殖速度の観点からも同様にスクリーニングを行い、37°Cでの生育に優れた変異株、高温での生育に優れた変異株、低温感受性を示す株など、多種多様な変異株を同定することに成功した。

このように、翻訳システムを改変することで生物の基本特性を改変・改良することが可能なことを、大腸菌をモデルに示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

1. Nakashima N, Miyazaki K (2014) Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *Int J Mol Sci* 15, 2773-2793 (査読有)
2. Kitahara K, Miyazaki K (2013) Revisiting bacterial phylogeny: Natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA. *Mob Genet Elements* 3, e24210 (査読有)
3. Uchiyama T, Miyazaki K (2013) Metagenomic screening for aromatic compound-responsive transcriptional regulators, *PLOS ONE*, 8, e75795 (査読有)
4. Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K (2013) Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. *J Biol Chem*, 288, 18325-18334 (査読有)
5. Verma D, Kawarabayasi Y, Miyazaki K, Satyanarayana T (2013) Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (mxyl) retrieved from compost-soil metagenome, *PLOS ONE*, 8, e52459 (査読有)
6. Tsukuda M, Miyazaki K (2013) Directed evolution study unveiling key sequence factors that affect translation efficiency in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 116, 540-545 (査読有)
7. Tsukuda M, Miyazaki K (2013) DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin. *J Biosci Bioeng*, 116, 644-646 (査読有)
8. Engel K, Ashby D, Brady SF, Cowan DA, Doemer J, Edwards EA, Fiebig K, Martens EC, McCormac D, Mead DA, Miyazaki K, Moreno-Hagelsieb G, O' Gara F, Reid A, Rose DR, Simonet P, Sjöling S, Smalla K, Streit WR, Tedman-Jones J, Valla S, Wellington EMH, Wu C-C, Liles MR, Neufeld JD, Sessitsch A, Charles TC (2013) Meeting Report: 1st International Functional Metagenomics Workshop May 7-8, 2012, St. Jacobs, Ontario, Canada. *Stand Genomic Sci*, 8, 106-111 (査読無)
9. Kitahara K, Yasutake Y, Miyazaki K (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 19220-19225 (査読有)
10. 佃 美雪, 佐藤 允治, 宮崎 健太郎 (2014) 16S rRNAの「水平伝播」—異種16S

rRNAによる遺伝的相補一, 化学と生物, 52-2, 70-72 (査読無)

11. 宮崎 健太郎 (2012) リボソームに翻訳以外の機能を発見, 産総研TODAY, 12, 20-20 (査読無)

〔学会発表〕(計30件)

1. 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 日本農芸化学会大会 2014, 神奈川県, 2014/03/29
2. 末永 光, 水田 志織, 宮崎 健太郎, 矢追 克郎, メタゲノム手法は培養法を凌駕するのか: 遺伝子資源取得に際しての手法間の比較, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 神奈川県, 2014/03/28
3. 佐藤 允治, 宮崎 健太郎, 腸内細菌目の 16S rRNA の網状進化, 第 8 回 日本ゲノム微生物学会年会, 東京都, 2014/03/07
4. 宮崎 健太郎, Functional metagenomics and *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, Kasetsart university Seminar, Bangkok, Thailand, 2014/02/21
5. 宮崎 健太郎, *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, AMBC2014, Bangkok, Thailand, 2014/02/20
6. 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 産業微生物の力を深化させる日本の技~育種の最前線~ 我が国独自の起点・技術から, 東京都, 2013/12/17
7. 佃 美雪, 中島 信孝, 宮崎 健太郎, アンチセンス RNA を用いた新規カウンターセレクション技術の開発, 細胞を創る研究会 6.0, 山形県, 2013/11/14
8. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 細胞を創る研究会 6.0, 山形県, 2013/11/14
9. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, CBI 学会 2013 年大会, 東京都, 2013/10/28
10. 宮崎 健太郎, *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, Enzyme Engineering XXII Conference, 富山県, 2013/09/24
11. 宮崎 健太郎, リボソーム工学に基づく大腸菌の宿主機能改変, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島県, 2013/09/19
12. 宮崎 健太郎, *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, 2013 SIMB Annual Meeting, San Diego, USA, 2013/08/12
13. 北原 圭, 宮崎 健太郎, 大腸菌への遺伝子水平伝播実験により示された 16S rRNA の種間和合性, 第 10 回 21 世紀大腸菌研究会, 静岡県, 2013/06/20

14. 佐藤 允治, 宮崎 健太郎, 系統ネットワーク法で見る腸内細菌目 16S rRNA の網状進化, 第2回リボソームミーティング, 東京都, 2013/03/26
15. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, 16S rRNA 置換変異による大腸菌宿主改良, 第2回リボソームミーティング, 東京都, 2013/03/26
16. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, 16S rRNA の置換変異による大腸菌宿主デザイン, 「細胞を創る」研究会 5.0, 神奈川県, 2012/11/21
17. 宮崎 健太郎, メタゲノムからの有用遺伝子探索, 次世代シーケンス東京セミナー・メタゲノムセミナー, 東京都, 2012/10/25
18. 北原 圭, 宮崎 健太郎, 16S リボソームRNA のヘリックス 41 はリボヌクレアーゼ I の特異的インヒビターである, 第9回 21世紀大腸菌研究会, 滋賀県, 2012/06/21
19. 宮崎 健太郎, Functional screening strategy, International Functional Metagenomics Workshop, Waterloo, Canada, 2012/05/07

〔図書〕(計10件)

1. Suenaga H, Miyazaki K (2014) Encyclopedia of Metagenomics, extradiol dioxygenases retrieved from the metagenome, Springer
2. 宮崎 健太郎 (2013) 進化分子工学の最前線, 生物種を超えた 16S rRNA 遺伝子の機能相補性の解明, pp. 223-229, NTS
3. 宮崎 健太郎 (2012) 生体の科学, リボソームに翻訳以外の機能があるーリボヌクレアーゼ作用阻害, pp. 356-357, 医学書院
4. 宮崎 健太郎 (2012) 生命システム工学, 遺伝子資源の多様化, pp. 18-27, 化学同人
5. 宮崎 健太郎 (2012) 生命システム工学, 進化分子工学の事始, pp. 3-17, 化学同人

〔産業財産権〕

○出願状況 (計3件)

名称: 新規なカウンターセクション法
 発明者: 佃 美雪, 中島 信孝, 宮崎 健太郎
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特願 2013-226229
 出願年月日: H25/10/31
 国内外の別: 国内

名称: 翻訳特性の改変された大腸菌
 発明者: 宮崎 健太郎, 佃 美雪
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特願 2012-102128

出願年月日: H24/04/27

国内外の別: 国内

名称: 翻訳特性の改変された大腸菌

発明者: 宮崎 健太郎, 佃 美雪

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 61/611827

出願年月日: H24/03/16

国内外の別: 国外(米国)

○取得状況 (計1件)

名称: 酵素遺伝子スクリーニング法

発明者: 内山拓, 宮崎 健太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特 5397666

取得年月日: 2013/11/01

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

1. <https://staff.aist.go.jp/miyazaki-kentaro/group/index.html>

2. <https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-synthe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 健太郎 (Miyazaki Kentaro)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号: 60344123

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：A01 班 公募研究

研究期間：2013-2015

課題番号：26119708

研究課題名（和文）遺伝子発現の光応答性人工トグルスイッチ回路の構築

研究課題名（英語）Construction of synthetic genetic toggle switch circuit responsive to light

研究代表者

磯村彰宏（Akihiro Isomura） 京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・共同研究者

研究成果の概要

本公募班は光刺激によって遺伝子発現を非可逆的に ON にできるような光応答性の人工トグルスイッチ回路を構築することを目的とした研究を行った。具体的には、哺乳動物細胞において相互抑制型の転写制御回路を構築するために、Tet オペレータまたは Lac オペレータ配列を含んだ新規プロモーター配列を作製するとともに、光応答性の新規人工転写抑制因子を作製し、光照射条件下におけるスイッチング機能の検証を試みた。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 光遺伝学 トグルスイッチ 人工遺伝子回路

1. 研究開始当初の背景

生物における感覚機能は、各種シグナルに対応した受容体タンパク質によってその入力機能が実現される。その入力細胞内における分子ネットワークによる処理機能を経て出力に変換される。これまで、化学物質、イオン濃度、熱、機械張力などの様々な刺激に対する受容体が同定されてきた。また、フィードバック制御などの制御工学的な概念の導入により、細胞内の情報処理回路の制御機構の基本特性が明らかになりつつある。これらの知見の工学的な利用は、生命機能の基礎研究に限らず機能的な人工分子ネットワークの構築にも大きく寄与するものと考えられる。しかし、これまで構築されてきた人工遺伝子回路の多くは、特定の化学物質に応答する機能に限定されている^{1,2)}。そこで、人工遺伝子回路に化学物質ではない様々な感覚機能を導入すれば、質的に新しい人工的分子ネットワークの構築が可能になる。

近年、光遺伝学 (Optogenetics) と呼ばれる、遺伝的にコードされた光応答性タンパク質によって細胞機能を制御する技術が急速に発展し、光制御可能な細胞機能の範囲が拡大しつつある^{3,4)}。しかし、遺伝子発現の光制御に関する研究は、機能分子の発見が数例報告されているだけの黎明期にあり、その更なる進展が大きな課題となっている。もし、光受容機能を備えた人工遺伝子回路が構築できれば、光の時空間制御の容易さを遺伝子発現の制御技術にもたらしことになり、より有用な人工遺伝子回路の実現に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

現在の遺伝子発現の光操作技術では、持続的な遺伝子発現を実現するためには持続的な光照射が必要であり(図 1)、持続的な光照射によって細胞へのダメージが蓄積したり、持続的に光照射をしている間は細胞状態の蛍光・発光観察が困難になるなどの問題点がある。そのため、より簡便な持続発現の光誘導システムが必要である。そこで、本研究では一過的に光を照射すればその後は光照射を止めても持続的に遺伝子

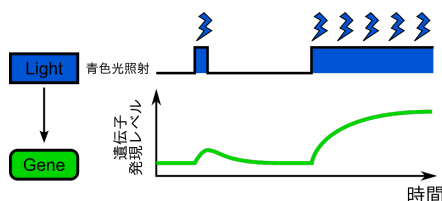


図 1: 本研究の背景。既存の光受容タンパク質だけでは持続的な発現制御は困難である。

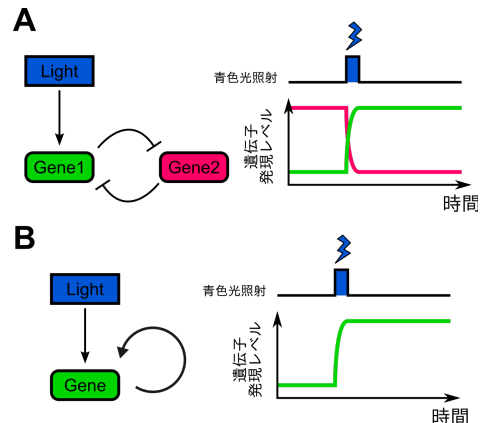


図 2: 本研究の目的。相互抑制型(A)または自己活性化型(B)の光応答性トグルスイッチ回路を構築して、一過的な光刺激で回路の状態を操作する。

発現の転写・翻訳活性が ON になるような、光刺激によって遺伝子発現を非可逆的に ON にできるような光応答性の人工トグルスイッチ回路を構築することを目的とした研究を行った(図 2)。

3. 研究の方法

本研究では、哺乳動物由来の培養細胞において、相互抑制型のトグルスイッチ回路(図 2 A)、または自己活性化型のトグルスイッチ回路(図 2 B)に光応答性を付与させることで、光刺激に応答可能で可逆的なトグルスイッチを構成するための研究を行った。この目的のために、トグルスイッチ回路人工遺伝子回路や光応答性転写因子のプラスミドベクターを構築し、培養細胞のゲノムに組み込むことによって、人工遺伝子回路を内包した樹立に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 光応答性相互抑制型回路の作製

いくつかの先行研究において、哺乳動物細胞で動作するトグルスイッチ回路が報告されている²⁾。しかし、それらはエピジェネティックな修飾ドメイン(KRAB)による抑制効果を利用している。一方で、KRABドメインが非可逆に遺伝子座をサイレンシングすることが報告されており⁵⁾、既存のトグルスイッチ回路は可逆的に動作しない可能性が考えられた。そこで、エピジェネティックな修飾因子を使わない、幹細胞で動作可能なプロモーターをベースとした新奇な転写抑制モジュールの開発に取り組んだ。

まず、ES 細胞や神経幹細胞で動作が確認されているヒト EF プロモーターに Tet オペレータ配列または Lac オペレータ配列を融合させた人工プロモーターを作製した。そして、これらを用いて相互抑制型の回路を構築し(図 3 A)、培養細胞に一過的にトランスフェクションして誘導剤

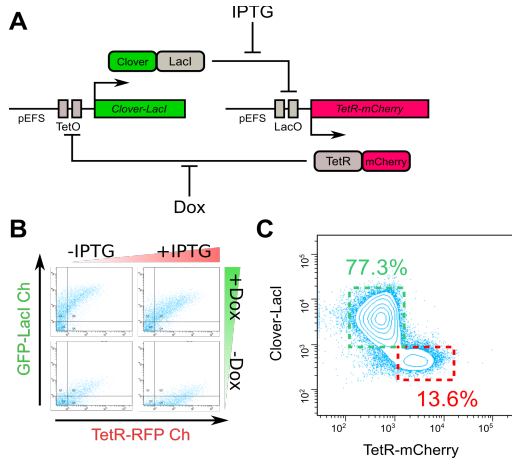


図 3: 相互抑制型トグルスイッチ回路の動作検証。(A) LacI-TetR によるトグルスイッチ回路の模式図。(B)一過的トランスフェクションと薬剤添加による抑制機能の検証。(C)安定発現株による双安定状態の検証。

(IPTG と Dox)の条件を変えることによって相互抑制能を調べた。その結果、TetR または LacI 転写因子による人工プロモーターの抑制効果が確認できた(図 3B)。

次に、トランスポゾン酵素を使ってプラスミド配列を染色体上に組み込むことによって、安定発現株を樹立した。薬剤(IPTG 及び Dox)を投与してスイッチ状態をリセットした後に、薬剤を除去することによって再びスイッチ状態を有効化したところ、TetR-RFP 陽性な細胞集団と LacI-GFP 陽性な細胞集団が得られた(図 3C)。この結果は、構築したトグルスイッチ回路が双安定状態を実現できることを示唆している。

そこで、この人工遺伝子回路に光応答性回路を付加することを試みた。具体的には、転写抑制因子 TetR に LOV ドメインを含んだ機能部位を融合することで、青色光依存的に転写抑制能を阻害できる新たな人工転写抑制因子を作製した。そして、上記のトグルスイッチ回路に組み込み(図 4A、B)、光応答的なトグルスイッチ機能の確認を試みた。その結果、TetR-mCherry 陽性細胞(図 4C)をソートした後、IPTG 及び Dox を投与せずに暗条件下で培養すると、約 30%がそのまま抑制能を維持した(図 4D)。一方で、同様にソートした細胞を、IPTG 及び Dox を投与せずに光照射条件下で培養すると、抑制能を維持した細胞集団の割合が約 15%と半分に低下した。この結果は、光照射依存的な転写抑制状態の解除に成功していることを示唆している。現在、暗条件下で TetR 抑制能を維持しつつ、光依存的に LacI 優勢状態にスイッチできるような細胞集団の構築を試みている。

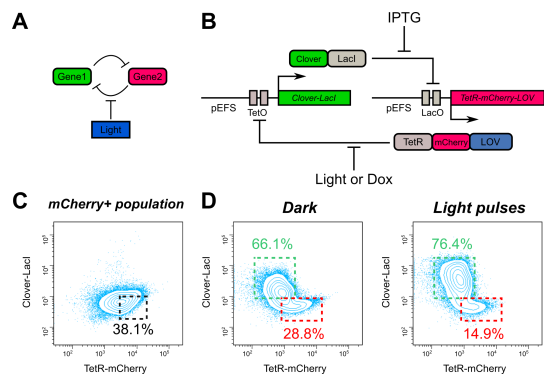


図 4: 光応答性トグルスイッチ回路の構築。詳細は本文参照。

(2) 自己活性化型回路のための新しい光応答性人工転写因子の作製

本新学術領域の先行研究において、Tet プロモーターを使った自己活性化型トグルスイッチ回路の温度制御に関する成功例が報告されている⁶⁾。もし Tet プロモーターを活性化可能な光応答性転写因子を作製できれば、Tet プロモーターを使った光活性化型トグルスイッチ回路を制御できると期待される(図 5A)。そこで、光によって UAS プロモーターを活性化可能な GAVPO を遺伝子改変した人工転写因子を作製し、Tet プロモーターの光制御を試みた。

GAVPO は Gal4DNA 結合領域と、青色光に応答する VVD、及び p65 転写活性化領域といった、3つの別々の機能領域で構成されてい

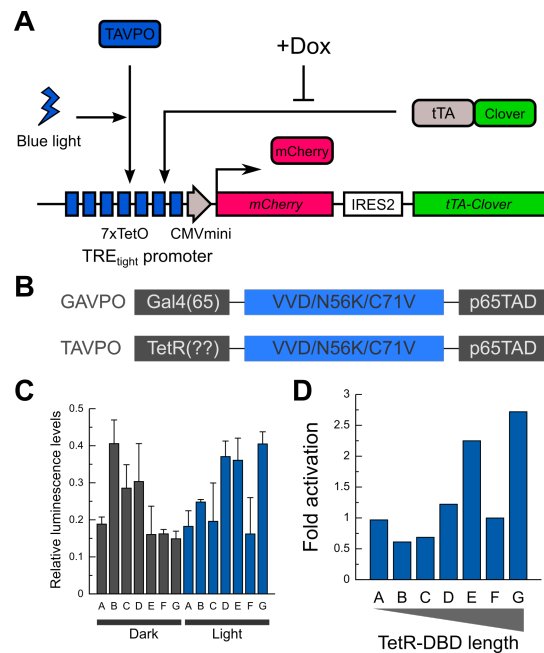


図 5: 自己活性化型回路を光制御するための新規光応答性転写因子 TAVPO の作製。(A) 自己活性化型トグルスイッチの光制御の模式図。(B)GAVPO と TAVPO の比較。(C、D)新規転写因子による Tet プロモーター活性の光誘導。

る。そのため、Gal4DNA 結合領域だけを TetR の DNA 結合領域に置換することで、Tet プロモーターへとターゲット配列を改変できるのではないかと考えられた(図 5B)。そこで、Gal4DNA 結合領域を様々な長さの TetR 結合領域に置換し、青色光照射によってその転写活性化能を検証した。その結果、幾つかの組み合わせによって、青色光照射時に 2 倍以上転写を活性化可能な新規転写因子を確認できた(図 5C,D)。今後、見つかった転写因子の更なる遺伝子改変によって誘導効率を向上させるとともに、自己活性化型回路と一緒に動作させることで、一過的光照射による持続的遺伝子発現の実現を目指す。

また、上記と関連する光による遺伝子発現の制御技術について、その具体例と応用例に関する研究結果及びレビューを学術誌に発表した(業績 1,2,3)。

(引用文献)

- 1) Gardner T. S. *et al. Nature* **403**, 339 (2000).
- 2) Kramer B. P. *et al. Nat. Biotech.* **22**, 867 (2004).
- 3) Deisseroth, K. *Nat. Meth.* **8**, 26 (2011).
- 4) Gautier, A. *et al. Nat. Chem. Biol.* **10**, 533 (2014).
- 5) Bintu, L. *et al. Science* **351**, 720 (2016).
- 6) Yamaguchi, M. *et al. ACS Synth. Biol.* **3**, 273 (2014).

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 3 件)

- 1) *A. Isomura, F. Ogushi H. Kori and *R. Kageyama “Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information” *Genes. Dev.* **31**, 524-535 (2017).
- 2) 磯村 彰宏、“遺伝子発現ダイナミクスの人工光制御とその応用” *生物工学会誌*, **94**, 194-197 (2016).
- 3) *A. Isomura and *R. Kageyama “Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions” *Development*, **141**, 3627-3636 (2014).

[学会発表](計 2 件)

- 1) Akihiro Isomura
Interrogating oscillatory gene expression by optogenetics, International Symposium on Synthetic Systems Biology Joint 14th Symposium of Biochemical Systems Theory (BST2015), Sep. 17th, 2015 (Fukuoka).

2) Akihiro Isomura, Fumiko Ogushi, Hiroshi Kori, Ryoichiro Kageyama
“Controlling Natural Genetic Oscillators by Light”, The 2015 Winter q-bio meeting, Feb. 19th, 2015 (Hawaii).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯村 彰宏 (ISOMURA, Akihiro)
京都大学ウイルス研究所 研究員
研究者番号: 70512466

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119005

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Evolutionary engineering of biomacromolecules for improvement of artificial genetic circuits

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 125,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、成果の第一として、天然の RNA-蛋白質複合体(RNP)を改変し、進化分子工学的な手法により信号伝達経路の制御などに使える新しい RNPモジュール(独立した機能構造単位)を作成することに成功した。また、高度な機能を有する RNA酵素を基盤として、複数の RNA酵素が協同して行なう RNA編集反応を開発し、生体内で利用される RNA編集反応に適用し、遺伝子回路ツールとして利用することに成功した。さらに、人工遺伝子回路へのプロモーター強度の変更による生きた細胞集団への摂動が、情報科学や制御工学による数理モデル上での摂動と同等の結果を示すことを、情報科学班との融合研究として明らかにした。

研究成果の概要（英文）：By evolutionary engineering method applied for natural RNP (RNA-protein complex), this research leads to preparation of novel RNP modules for control of signal transduction pathway. Also, a double RNA splicing reaction system was developed artificially, in which a pair of splicing ribozymes worked cooperatively to edit two distinct RNA sequences. This system can be employed as a module for RNA-based genetic circuits in vivo. As interdisciplinary studies with information science researchers, furthermore, we have demonstrated that the same results can be obtained as a result of the same perturbation, modulation of strength for promoters of artificial genetic circuits, both on living cell population and model established by information science and control engineering.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 進化分子工学 タンパク質 RNA 数理モデル リボザイム 遺伝暗号

1. 研究開始当初の背景

合成生物学において、人工遺伝子回路を構築するために、プロモーターなどのパーツを数理モデルに基づいて組み合わせることが重要となっていた。しかしながら、その数理モデル化との協働やパーツのバラエティに限界があり、それらの拡大が重要となっていた。

2. 研究の目的

合成生物学の本質は、数理モデルによって生きた細胞内の動作が保障された遺伝子部品や遺伝子サブシステムを組み合わせ、サイズが拡大されたシステムを作成する際に、その拡大システムの動作もモデル化し事前に検証することで、確実なシステム構築が可能になる点にある。本研究では、この研究サイクルに資する制御系を、進化工学などを活用して構築することを目的とした。

3. 研究の方法

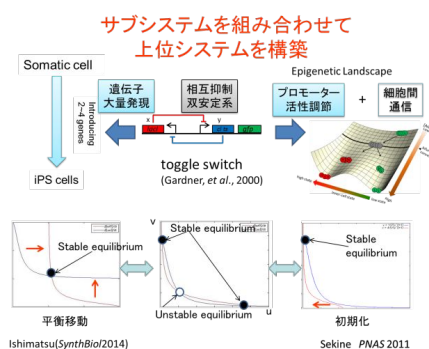
数理モデル化と生物実験との協働を進めるために、数理モデルが要求する使用を持つプロモーターを開発し、これを生物実験で動作する人工遺伝子回路に実装しその動作を検証することで、数理モデルの検証と、さらなる回路の高度化を行った。

新たな制御手法の開発として、天然の RNA-蛋白質複合体(RNP)を改変し、進化分子工学的手法により信号伝達経路の制御などに使える新しい RNP モジュール(独立した機能構造単位)の作成を行った。さらに多段階での発現制御系として、RNA 酵素を用いた RNA 編集の系をデザインした。

4. 研究成果

本研究では、情報科学班との協働により、必要な特性を持つ部品を作成することで、合成生物学のテストヘッドとなっている、2つのリプレッサーが互いに他の生産を抑制することで双安定システムを構築した際に遺伝子発現パターンの多様化を担保しうる、トグルスイッチの機能を拡張した。トグルスイッチに細胞間通信を行う部品を組み合わせることにより単安定と双安定を切り替える自発的な多様化システムによる細胞種比率の制御につづき (Sekine et al., PNAS 2011), トグルスイッチにリプレッサーの大量発現の量を任意に調節する部品を組み合わせることで、発現誘導の強度によって初期状態に依存せず任意の遺伝子発現状態を作成し、さらに、発現誘導の解除によって、誘導強度によって決定される任意の分化比率を形成できることを、理論と培養実験によって示し

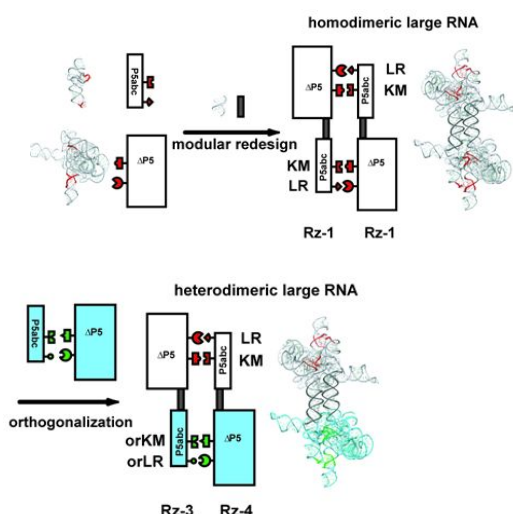
た(ASC Synthetic boil., Ishimatsu 2014)。



天然の RNA-蛋白質複合体(RNP)を改変し、進化分子工学的手法により信号伝達経路の制御などに使える新しい RNP モジュール(独立した機能構造単位)を作成することに成功した。ヒト細胞表面に露出する特定の細胞表面レセプターへの RNP の特異的な結合法の開発に成功した。レセプターを形成するパーツであるタンパク質ユニット(これらの集合によりレセプターとして働く)に三角形 RNP や新たに開発した四角形状 RNP を結合させ同ユニット間の距離を調節し、信号伝達の ON/OFF を制御して、アポトーシスの誘導及びその阻害を三角形のサイズ変化に応じて定量的に行うことに成功した。さらなる信号制御法として、L7Ae 蛋白質の末端残基を、円順列置換によって野生型蛋白質とは異なる残基とし、新たな末端箇所へ目的蛋白質を融合する事で、提示配向性を変化させる事や、別のタンパク質を提示させることに成功した。提示蛋白質の配向性を自在に調整する事で、より高度な機能性複合体のデザインが可能になる。

また、高度な機能を有する RNA 酵素を二分子組み合わせ RNA が並列的(シス)に編集される分子システムを構築し細胞内と類似の環境で作動させることに成功した。モジュール集積型構造を有するグループ I リボザイムを 2 つの主要なモジュールに分割し(図左)野生型とは異なる位置で再結合させ、対面型ホモ二量体を形成する人工リボザイムのデザインに成功した(図中央)。本リボザイムは二量化に応じて触媒機能が発現した。さらに変異を加え、異なる基質特異性を有する 2 種の改変リボザイムがヘテロ 2 量化し(図右)、2 量化に応じて 2 種類のリボザイムがそれぞれの基質を協調的に RNA 編集することも実証した。さらに改変リボザイムの RNA 編集反応の進行を、蛍光 RNA を基質として細胞類似の条件化でリアルタイム追跡できる系を構築し、ヘテロ 2 量化に依存した RNA 編集反応を追跡した。その結果、ヘテロ 2 量化に依存した RNA 編集反応を両方のリボザイムで確認できた。以上の結果について、並列的な RNA 編集システム、RNA 編集を蛍光モニタリ

ングする系の構築をそれぞれ論文として報告した。



人工遺伝子回路へのプロモーター強度の変更による生きた細胞集団への摂動が、情報科学や制御工学による数理モデル上での摂動と同等の結果を示すことを、情報科学班との融合研究として明らかにした。摂動の結果は、細胞集団の内部状態の多様化時における、細胞種の割合としてあらわれる。このような多様化の制御は、今後の合成生物学の実用化に向けた基盤モデルとなっている。

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33件)

- (1) Takahiro Tanaka, Shigeyoshi Matsumura, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa, Tecto-GIRz: engineered group I ribozymes the catalytic ability of which can be controlled by self-dimerization, *ChemBioChem*, 査読有, 2016
DOI:10.1002/cbic.201600190
- (2) Manami Ito, Haruka Sugiura, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, Masahiro Takinoue, A bacterial continuous culture system based on a microfluidic droplet open reactor, *Analytical Sciences*, 査読有, 32, 2016, 61-66
DOI : 10.2116/analsci.32.61
- (3) Saki Inuzuka, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa, Optimization of RNA-based c-di-GMP fluorescent sensors through tuning their structural modules, *Journal of Bioscience Bioengineering*, 査読有, 2016
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.011
- (4) Saki Inuzuka, Kei-Ichiro Nishimura, Hitoshi Kakizawa, Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa, Mutational analysis of structural elements in a class-I cyclic di-GMP riboswitch to elucidate its regulatory mechanism, *J. Biochem.*, 査読有, 2016
DOI: 10.1093/jb/mvw026
- (5) Airi Furukawa, Takaya Maejima, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa, Characterization of an RNA receptor motif that recognizes a GCGA tetraloop, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, 80, 2016, 1386-1389
DOI: 10.1080/09168451.2016.1156483
- (6) Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa, Artificial ligase ribozymes isolated by a "design and selection" strategy, *Methods in Molecular Biology*, 査読有, 1316, 2015, 113-125
DOI: 10.1007/978-1-4939-2730-2_10
- (7) Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Hirohisa Ohono, Tan Inoue, A purification method for a molecular complex in which a scaffold molecule is fully loaded with heterogeneous molecules, *PLoS ONE*, 査読有, 10, 2015, e0120576
DOI: 10.1371/journal.pone.0120576
- (8) 井川善也, 集積ナノ構造と生体分子デバイス構築に向けたモジュール型RNAの人工改変, *ファルマシア (日本薬学会会誌)*, 査読有, 51, 2015, 42-46
- (9) Shigeyoshi Matsumura, Tatsunobu Ito, Takahiro Tanaka, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa, Modulation of group I ribozyme activity by cationic porphyrins, *Biology*, 査読有, 4, 2015, 251-263
DOI: 10.3390/biology4020251
- (10) Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Taiichi Sakamoto, Tan Inoue, A trifunctional, triangular RNA-protein complex, *FEBS*, 査読有, 589, 2015, 2424-2428
DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.005
- (11) Shoji J. Ohuchi, Fumihiko Sagawa, Taiichi Sakamoto, Tan Inoue, Altering the orientation of a fused protein to the RNA-binding ribosomal protein L7Ae and its derivatives through circular permutation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 466, 2015,

- 388-392
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.035
- (12) Hirohisa Ohno, Tan Inoue, Designed regular tetragon-shaped RNA-protein complexes with Ribosomal Protein L1 for bionanotechnology and synthetic biology, *ACS Nano*, 査読有、9、2015、4950-4956
DOI: 10.1021/nn5069622
- (13) Kana Ishimatsu, Takashi Hata, Atsushi Mochizuki, Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga, General Applicability of Synthetic Gene-Overexpression for Cell-Type Ratio Control via Reprogramming, *ACS Synthetic Biology*, 査読有、3、2014、638-644
DOI: 10.1021/sb400102w
- (14) Kazuaki Amikura, Yoko Sakai, Shun Asami, Daisuke Kiga, Multiple Amino Acid-Excluded Genetic Codes for Protein Engineering Using Multiple Sets of tRNA Variants, *ACS Synthetic Biology*, 査読有、3、2014、140-144
DOI: 10.1021/sb400144h
- (15) Fujita Y, Furushima R, Ohno H, Sagawa F, Inoue T, Cell-surface receptor control that depends on the size of a synthetic equilateral-triangular RNA-protein complex, *Scientific Reports*, 査読有、4、2014、6422
DOI: 10.1038/srep06422
- (16) Kazuaki Amikura, Daisuke Kiga, The number of amino acids in a genetic code, *RSC Advances*, 査読有、3、2013、12512-12517
DOI: 10.1039/C3RA40609A
- (17) Kazuaki Amikura, Daisuke Kiga, Reassignment of codons from Arg to Ala by multiple tRNAAla variants, *Viva Origino*, 査読有、41、2013、20-23
- (18) Shoji Ohuchi, Identification of RNA aptamers against recombinant proteins with a hexa-histidine tag, *Methods in Molecular Biology*, 査読有、1111、2014、41-56
DOI: 10.1007/978-1-62703-755-6_4
- (19) Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga, Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits, *BMC Systems Biology*, 査読有、8、2014、S4
DOI: 10.1186/1752-0509-8-S4-S4
- (20) Akio Kawahara-Kobayashi, Mitsuhiro Hitotsuyanagi, Kazuaki Amikura, Daisuke Kiga, Experimental Evolution of a Green Fluorescent Protein Composed of 19 Unique Amino Acids without Tryptophan, 査読有、*Orig Life Evol Biosph*, 44、2014、75-86
DOI: 10.1007/s11084-014-9371-8
- (21) Thiprampai Thamamongood, Nathaniel Z. L. Lim, Trevor Y.H. Ho, Shotaro Ayukawa, Daisuke Kiga, King L. Chow, Cultivation of Synthetic Biology with the iGEM Competition, *Journal of Advanced Computational Intelligence and Intelligent Informatics*, 査読有、17、2013、161-166
- (22) Kei Endo, James A. Stapleton, Karin Hayashi, Hirohide Saito, Tan Inoue, Quantitative and simultaneous translational control of distinct mammalian mRNAs, *Nucleic Acids Research*, 査読有、41、2013、1-12
DOI: 10.1093/nar/gkt347
- (23) Ryuhei Harada, Naoya Tochio, Takanori Kigawa, Yuji Sugita, Michael Feig, Reduced native state stability in crowded cellular environment due to protein-protein interactions, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有、135、2013、3696-3701
DOI: 10.1021/ja3126992
- (24) Takayoshi Matsuda, Satoru Watanabe, Takanori Kigawa, Cell-free synthesis system suitable for disulfide-containing proteins, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有、431、2013、296-301
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.107
- (25) Kei Endo, Karin Hayashi, Tan Inoue, Hirohide Saito, A versatile cis-acting inverter module for synthetic translational switches, *Nature Communications*, 査読有、4、2013、1-9
DOI: 10.1038/ncomms3393
- (26) Tomoaki Hara, Hirohide Saito, Tan Inoue, Directed evolution of a synthetic RNA-protein module to create a new translational switch, *Chemical Communications*, 査読有、49、2013、3833-3835
DOI: 10.1039/C3CC38688K
- (27) Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, Design strategy for an initial state-independent diversity generator, *Chem-Bio Informatics Journal*, 査読有、12、2012、39-49
- (28) Akio Kawahara-Kobayashi, Akiko

- Masuda, Yuhei Araiso, Yoko Sakai, Atsushi Kohda, Masahiko Uchiyama, Shun Asami, Takayoshi Matsuda, Ryuichiro Ishitani, Naoshi Dohmae, Shigeyuki Yokoyama, Takanori Kigawa, Osamu Nureki, Daisuke Kiga, Simplification of the genetic code: restricted diversity of genetically encoded amino acids, *Nucleic Acids Research*, 査読有、40、2012、10576-10584
DOI: 10.1093/nar/gks786
- (29) Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Masami Hagiya, Daisuke Kiga, Tunability of the ratio of cell states after the synthetic diversification by the diversity generator, *Communicative & Integrative Biology*, 査読有、5、2012、393-394
DOI: 10.4161/cib.20310
- (30) Takayoshi Matsuda, Shozo Furumoto, Kae Higuchi, Jun Yokoyama, Ming-Rong Zhang, Kazuhiko Yanai, Ren Iwata, Takanori Kigawa, Rapid biochemical synthesis of C-11-labeled single chain variable fragment antibody for immuno-PET by cell-free protein synthesis, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有、20、2012、6579-6582
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.09.038
- (31) Shotaro Ayukawa, Yoko Sakai, Daisuke Kiga, An aptazyme-based molecular device that converts a small-molecule input into an RNA output, *Chemical Communications*, 査読有、48、2013、7556-7558
DOI: 10.1039/C2CC31886E
- (32) Satoru Akama, Masayuki Yamamura, Takanori Kigawa, A Multiphysics Model of In Vitro Transcription Coupling Enzymatic Reaction and Precipitation Formation, *Biophysical Journal*, 査読有、102、2012、221-230
DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.014
- (33) Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Shotaro Ayukawa, Kana Ishimatsu, Satoru Akama, Masahiro Takinoue, Masami Hagiya, Daisuke Kiga, Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 査読有、108、2011、17969-17973
DOI: 10.1073/pnas.1105901108
- [学会発表](特筆すべきもの計2件)
- (1) Daisuke Kiga "19 and 21 Amino Acid Codes" Gordon Research conference "Origins of Life" January 12-17, 2014, Galveston, TX
- (2) 木賀 大介, 日本学術会議主催シンポジウム デュアルコース問題と BSL4 施設シンポジウム 日本学術会議講堂 「合成生物学とデュアルコース問題」 2012年12月14日
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
- (2) 研究分担者
井上 丹 (INOUE, Tan)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 40114855
- 井川 善也 (IKAWA, Yoshiya)
富山大学・大学院理工学研究部・教授
研究者番号: 70281087
- (3) 連携研究者
木川 隆則 (KIGAWA, Takanori)
理化学研究所・生命分子システム基盤研究領域・副領域長
研究者番号: 20270598
- 齊藤 博英 (SAITO, Hirohide)
京都大学・白眉センター・准教授
研究者番号: 20423014

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119006

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Development of microfluidic platforms for functional evaluation of artificial gene networks

研究代表者

ロンドレーズ ヤニック（Rondelez, Yannick）

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：10548770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 59,300,000円

研究成果の概要（和文）：本班では、合成生物学を支える実験技術基盤の確立を目指して、人工的遺伝子回路や人工代謝経路の機能評価を行うためのマイクロ流体プラットフォームの開発を担ってきた。プラットフォームとしては(1)マイクロチャンバ系、(2)マイクロ液滴系と(3)多班の要望に応えるマイクロ流体プラットフォームを開発した。(2)のマイクロ液滴系では、人工遺伝子回路や人工代謝経路の動作条件を網羅的に解析する際に必要とされる回路・経路の反応系における着目分子の濃度条件を迅速(約1万通りの異なる反応条件を一度)に探索しうるプラットフォームを開発した。

研究成果の概要（英文）：To establish fundamental experimental technologies to support development of the research area of synthetic biology, we developed microfluidic platform can be used for evaluation for functions of artificial gene networks and artificial metabolic pathways. In particular, (1) microchamber-based microfluidic platforms, (2) microdroplet-based microfluidic platform and (3) microfluidic platforms for other groups in this research area. In the development of (2) microdroplet-based microfluidic platform, a microfluidic device can search conditions of concentrations of target molecules in reaction networks in a high-throughput manner (screen ten-thousands conditions of concentrations at once) could be successfully realized.

研究分野：In vitro反応ネットワーク

キーワード：マイクロ・ナノデバイス マイクロ液滴 マイクロ流体デバイス 合成生物学 In vitro反応ネットワーク DNA toolbox

1. 研究開始当初の背景

本新学術領域研究は、「眺めて解析する」ことにとどまっているシステム生物学に対して、「創って解析する・利用する生物学」としての合成生物学を展開するための技術基盤の構築を目指すものである。システム生物学分野では、複雑な生体分子ネットワークとそれらの動的機能との関係を明らかにすることを目的として、実験的手法で得られたデータを理論に基づいて解釈する試みが進められ、動的な生体機能が一定程度明らかにされてきた。しかしながら、理論の妥当性を確かめるためには、生体分子ネットワークに対して時空間的に制御された入力を与える必要があるにもかかわらず、従来(研究開始当初まで)の実験系を用いるかぎり、そのような入力制御を行うことは極めて困難であった。一方、生体分子ネットワークの構成要素それぞれに関する知見を集約するためには、化学物質濃度等に代表されるような外部環境条件に対して、個々の反応系やそれを有する細胞等がどのように応答するかを網羅的に調べる手段が必要であるが、現時点(研究開始当初)ではそのような手段が無く、例えば 2000 年頃から米国でスタートした合成生物学の研究においても、人工遺伝子回路や人工代謝経路の設計などの試みがなされているが、それらはいずれも小規模であり、主として trial and error で構築されているのが現状であった。すなわち、「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は、生体分子ネットワークに対して時空間的な入力制御が可能であり、なおかつ網羅的解析が行える実験プラットフォームの開発が必要であったと言える。

2. 研究の目的

本計画研究班では、「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った。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した。本計画研究は、反応系や細胞などを用いて様々な実験を行う『場』としてマイクロ流体デバイス技術を用いれば、従来の実験技術では実現困難であった「実験と理論を結びつける実験プラットフォーム」を実現しうるとの着想に基づくものである。

3. 研究の方法

本計画研究班では、デザインした人工的遺伝子回路や人工代謝経路の機能評価をハイスループットに行うためのマイクロ流体

プラットフォームとして、(1)マイクロチャンバ系と(2)マイクロ液滴系との2種類の系と、これに加え、(3)多班の要望に応えるマイクロ流体プラットフォームを開発することを通じて、合成生物学を支える実験技術基盤の確立を目指した。また、上記に加えて、(4)合成 DNA と 3 種類の酵素で構成される、In vitro 反応ネットワークに関する研究を展開し、動的なふるまいを持つ In vitro 反応回路を構築することを通じて、本新学術領域研究の目指す、「動的で多要素な生体分子ネットワーク」の構築に貢献することを目指した。

4. 研究成果

(1)のマイクロチャンバ系については、研究期間開始以前の研究成果にて、ほぼ開発を完了しており、領域全体会議などを通じ、その技術を多班に紹介することで領域内の潜在ニーズの開拓を図った。

(2)のマイクロ液滴系に関しては、人工遺伝子回路や人工代謝経路の動作条件を網羅的に解析する際に必要とされる回路・経路の反応系における着目分子の濃度条件をハイスループット(約 1 万通りの異なる反応条件を一度)に探索しうるマイクロ液滴系プラットフォームを開発した(A. Genot et al., Nat Chem, in press). プラットフォーム内の交差する流路を用い、油相と水相を組み合わせることで油-in-water型のマイクロ液滴を生成し、その液滴を反応容器として用いる(図 1a)。水相は、反応系における着目分子と着目分子の濃度表示(バーコード)用蛍光分子を含む溶液が入力となり、最大 3 入力(着目分子 3 種類)まで対応している(図 1a は P と Q の 2 種類)。入力側の圧力を制御することで様々な混合比を持つ液滴を生成可能である(図 1b)。ここでは、バーコード用蛍光分子(赤色・緑色)の蛍光強度により、着目分子 P と Q の濃度を見積もっている。バーコード用蛍光分子とは異なる色を持つ色素(青色・オレンジ色)由来の蛍光を観察することで、回路の反応状態をモニタリングする。本研究では、これを双安定性回路などの in vitro 反応ネットワークに適用し、それら回路の動作する濃度条件を網羅的に(1 万通りの異なる条件)解析することに成功した。本プラットフォームを用いることで、図 1c に示すような回路動作条件の分岐図を迅速(実験数は 1 回)に取得できる。本成果は、回路動作条件の実験結果を情報科学分班にフィードバックすることで反応回路のシミュレーションの精度を向上するというサイクルの実現や、領域の多班で構築される人工遺伝子回路や人工代謝

経路の動作条件探索に要する時間を大幅に短縮しうる成果であり、本研究領域全体のための実験技術基盤を構築できたと言える。また本技術は、合成生物学分野にとどまらず、広く化学反応・生化学反応ネットワークの濃度条件探索に応用できるもので、その波及効果は大きいものと考えられる。

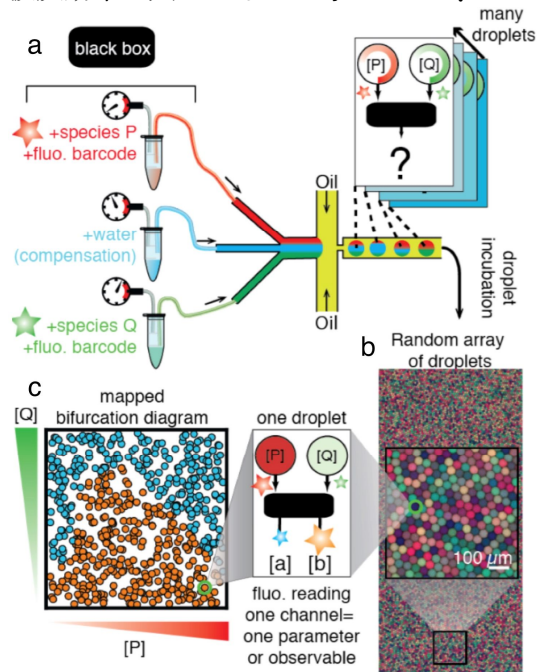


図1. 回路動作条件を網羅的に解析するマイクロ液滴系プラットフォーム。

(3) の多班の要望に応えるマイクロ流体プラットフォームは、主に生物学班(A1)との共同研究を展開することで開発を行った。具体的には、花井班と理論上想定した動的な入力を与えることができる、人工遺伝子回路を導入した大腸菌の観察用デバイスや、田川班と、肝前駆細胞分化制御用マイクロ流体デバイスなどを共同開発することを通じて、本新学術領域研究の発展に寄与した。

(4)の In vitro 反応ネットワークに関する研究では、自然界に見られる捕食-被捕食者関係を再現する反応ネットワークや(T. Fujii et al., ACS Nano, 2013), 双安定性回路(A. Padirac et al., PNAS 2012)の開発に成功し、領域内の共同研究の成果として伊庭班と In vitro 反応ネットワークの反応回路を In Silico 進化させる手法の開発に成功した(D. Q. Huy et al., IEEE Transaction on Evolutionary Computations 2014)。また、仏国の A. Estévez-Torres らのグループと In vitro 反応ネットワークを用いた反応・拡散系における反応進行波に関する研究(A. Padirac et al., JACS 2013, A. S. Zadorin, et al., Phys. Rev. Lett 2015 など)を行い、捕食-被捕食者関係反応ネットワークの反応進行の様子を可視化すること等に成功した。

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 19 件)

- ① A. J. Genot, A. Baccouche, R. Sieskind, N. Aubert-Kato, N. Bredeche, J.F. Bartolo, V. Taly, T. Fujii, and Y. Rondelez, “High-resolution mapping of bifurcations in nonlinear biochemical circuits,” *Nat Chem*, doi:10.1038/nchem.2544 (2016).
- ② A. S. Zadorin, Y. Rondelez, J.-C. Galas, A. Estevez-Torres: Synthesis of Programmable Reaction-Diffusion Fronts Using DNA Catalyzers, *Phys. Rev. Lett*, 114, 068301 (2015).
- ③ H. van Roekel, L. Meijer; S. Masroor, G. Zandra, A. Estévez-Torres, Y. Rondelez, A. Zagaris, M. Peletier, P. Hilbers, T. de Greef Automated Design of Programmable Enzyme-Driven DNA Circuits. *ACS Synthetic Biology*, DOI: 10.1021/sb500300d (2014).
- ④ A. Zambrano, A. Zadorin, Y. Rondelez, A. Estévez-Torres, J.-C. Galas, Pursuit-and-evasion Reaction-diffusion Waves In Micro-reactors with Tailored Geometry *Journal of Physical Chemistry B* 10.1021/jp509474w (2015).
- ⑤ A. Baccouche, K. Montagne, A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Dynamic DNA reaction network: a walkthrough, *Methods* 10.1016/j.ymeth.2014.01.015 (2014).
- ⑥ N. Aubert, T. Fujii, M. Hagiya, Y. Rondelez: Computer Assisted Design for Scaling Up Systems based on DNA Reaction Networks, *J. R. Soc. Interface*, 11 20131167 (2014).
- ⑦ D. Q. Huy, N. Aubert, N. Noman, T. Fujii, Y. Rondelez, H. Iba: An Effective Method for Evolving Reaction Network in Synthetic Biochemical Systems, *IEEE Transaction on Evolutionary Computations*, doi 10.1109/TEVC.2014.2326863 (2014).
- ⑧ N. Aubert, Y. Rondelez, T. Fujii, M. Hagiya: Enforcing delays in DNA computing systems, *Natural Computing*, Vol.13, Issue 4, pp 559-572, 2014.
- ⑨ K. Hasatani, M. Leocmach, A. J. Genot, A. Estevez-Torres, T. Fujii, Y. Rondelez: High-throughput observation of compartmentalized biochemical oscillators, *Chem. Commun*, 49 (73), 8090 - 8092 (2013).
- ⑩ A. Padirac, T. Fujii, A. Estévez-Torres, Y. Rondelez: Spatial waves in synthetic biochemical networks, *J. Am. Chem. Soc*, 135 (39), 14586–14592 (2013).
- ⑪ A. Genot, T. Fujii & Y. Rondelez: Scaling down DNA circuits with competitive neural networks, *J. R. Soc. Interface*, 10,

- 20130212 (2013).
- ⑬ N. Aubert, Q. H. Dinh, M. Hagiya, T. Fujii, H. Iba, N. Bredeche, Y. Rondelez: Evolution of Cheating DNA-based Agents Playing the Game of Rock-Paper-Scissors, *Advances in Artificial Life*, vol. 12, 1143-1150 (2013).
- ⑭ T. Fujii, Y. Rondelez: Predator-prey molecular ecosystems, *ACS Nano*, 7, 27-34 (2013).
- ⑮ 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).
- ⑯ 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).
- ⑰ Y. Rondelez: Competition for catalytic resources alters biological networks dynamic, *Physical Review Letters*, 108, 018102 (2012).
- ⑱ A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Nucleic acids for the rational design of reaction circuits, *Curr. Op. Biotech.*, 24, 1-6 (2012).
- ⑲ A. Genot, T. Fujii, Y. Rondelez: Computing with computation in biochemical networks, *Phys. Rev. Lett.*, 109, 208102 (2012).
- ⑳ A. Padirac, T. Fujii, Y. Rondelez: Quencher-free multiplexed monitoring of DNA reaction circuits, *Nucleic Acid Research*, 1-7 (2012).

〔学会発表〕 (計 32 件)

- ① SysChem2015, Y. Rondelez, DNA Circuitry, 19~22.May, 2015, Rolduc Netherlands.
- ② Gordon Research Conference on Oscillations & Dynamic Instabilities in Chemical Systems, Y. Rondelez, Rational building of molecular programs with DNA, 13-18.Aug., 2014, Spain.
- ③ DNA19 Conference: Y. Rondelez, Molecular programming with the DNA toolbox. 22-27.Sept, 2013, Tempe Arizona, USA.
- ④ FNANO 2012: Y. Rondelez: Emerging temporal patterns from DNA networks, 16-19, Apr., 2012, Snowbird, Utah, USA.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称 : *METHOD OF ELIMINATING BACKGROUND IN ISOTHERMAL AMPLIFICATION*

発明者 : Yannick Rondelez, Kevin Montagne,

Guillaume Gines, Teruo Fujii

権利者 : the University of Tokyo and CNRS 種類 :

番号 : PCT/FR2016/050357 and PCT/IB2016/000352

出願年月日 : 16.02.2015

国内外の別 : PCT 国際出願

○取得状況 (計 2 件)

名称 : *MOLECULAR COMPUTING COMPONENT AND METHOD OF MOLECULAR COMPUTING*

発明者 : Yannick Rondelez, Guillaume Gines, Teruo Fujii.

権利者 : the University of Tokyo and CNRS

種類 :

番号 : PCT/ FR2016/050356, PCT/IB2016/000419

取得年月日 : 16.02.2016

国内外の別 : PCT 国際出願

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp>

<http://limmshp.iis.u-tokyo.ac.jp>

<http://www.yannick-rondelez.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

ロンドレーズ ヤニック (RONDELEZ YANNICK)

東京大学・生産技術研究所・特任准教授

研究者番号 : 10548770

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

藤井 輝夫 (FUJII TERUO)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号 : 30251474

金田 祥平 (KANEDA SHOHEI)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号 : 10542467

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119007

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Construction of synthetic gene regulatory networks in a cell-free protein synthesis system

研究代表者

陶山 明（SUYAMA, Akira）

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：90163063

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 64,200,000円

研究成果の概要（和文）：人工遺伝子回路をつくるこれまでの方法は、手間のかかる trial and error の過程が必要である。そのことが、人工遺伝子回路を合成生物学で利用するときに障害となっている。そこで、もっと合理的に人工遺伝子回路を設計して構築できる方法を、RTRACS と呼ばれるモジュール化された DNA コンピュータの枠組みを利用して開発した。この方法を用いて、細胞サイズの小胞に内包した無細胞タンパク質合成系の中に人工遺伝子回路を構築し、動作させることに成功した。小胞の中につくられた回路は、基本的に、標準的な遺伝子組み換え技術を用いて、生細胞の中に組み込むことができる。

研究成果の概要（英文）：Conventional methods to construct synthetic gene regulatory networks (GRNs) need time-consuming trial and error steps, preventing their use in synthetic biology. Thus, we have developed a method to more rationally design and construct synthetic GRNs using the framework of a modular DNA computer RTRACS. Using the present method, we successfully built and drove a GRN in a cell-free protein synthesis system confined in a cell-sized vesicle. A GRN constructed in a vesicle by the present method can be basically integrated into a living cell using standard molecular cloning technology.

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 無細胞タンパク質合成系 遺伝子ネットワーク 遺伝子発現制御 転写因子 ベクシル DNA コンピュータ

1. 研究開始当初の背景

合成生物学は、人工的につくられた生体分子システムを生命科学の研究や産業に利用することを旨とした学問である。代表的な例の一つが人工遺伝子回路である。大腸菌内に遺伝子回路を人工的に構築し、細胞内の遺伝子回路の機能を調べたり、大腸菌が本来生産しない物質を産生したりすることが試みられている。しかし、これまでの設計や構築方法では、回路の実現に多大な trial and error が必要であるため、要素数の少ない人工遺伝子回路でも実現は容易でない。そのため、多要素からなる、工学的にも利用価値の高い人工遺伝子回路を合理的に設計して構築できる方法の実現が切望されている。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、無細胞タンパク質合成系で動作する、多要素からなる人工遺伝子回路を、合理的に設計して構築する方法を開発することである。生細胞より無細胞系の方が実験操作が容易である。また、無細胞系の方が反応場に関与する分子の種類を制限し易い。そのため、ブラックボックスに近い生細胞と違って、人工遺伝子回路の動作の障害を取り除き易い。さらに、最終的には生細胞に組み込む回路であっても、まずは無細胞系で安定に動作する回路を設計して構築し、その後、細胞内でも動作するように回路の修正を行う方が効率よく目的の人工遺伝子回路が実現できると考えられる。

本研究のもう一つの目的は、人工遺伝子回路が宿主細胞の増殖速度に与える影響を明らかにすることである。人工遺伝子回路を動作させると宿主細胞の増殖速度が大幅に低下することが多く、手間のかかる trial and error による回路の修正が強いられる。人工遺伝子回路が宿主細胞の増殖速度に与える影響の普遍的機構が明らかになれば、それを考慮することにより、宿主細胞内で動作する可能性の高い人工遺伝子回路を合理的に設計できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 人工遺伝子回路の合理的構築

無細胞タンパク質合成系で動作する、多要素からなる人工遺伝子回路を合理的に設計して構築する方法を開発する研究を行うために、DNA コンピュータ RTRACS の仕組みを利用することにした。

多要素からなる人工遺伝子回路の合理的構築を困難にしている大きな原因は、回路の構築に利用できる転写因子が限られているからである。必要な転写制御活性をもち、他の転写因子と干渉しない転写因子を新たに設計することは、タンパク質 核酸相互作用

やタンパク質 タンパク質相互作用の設計が容易でないために困難である。

この転写因子の数の問題は、DNA コンピュータ RTRACS の仕組みを利用することで解決できる。RTRACS は入出力 RNA を介して通信するモジュールのネットワークを用いて計算を行う。計算プログラムに対応するネットワークの構造は核酸同士の相互作用で決定される。モジュールの基本的な反応は、入力 RNA の配列をモジュールの機能に対応した出力 RNA の配列に変換して転写する反応である。この反応は、出力 RNA 遺伝子の発現を転写因子である入力 RNA で制御する反応と見なすことができる。核酸同士の相互作用はタンパク質 核酸相互作用やタンパク質 タンパク質相互作用と比べてはるかに設計が容易である。したがって、RTRACS の仕組みを利用することで、転写因子の数の問題を解決することができる。

RTRACS の仕組みを利用すると、無細胞タンパク質合成系での人工遺伝子回路の合理的構築も可能になる。RTRACS は無細胞タンパク質合成系で使用する溶液条件でも動作する。また、RTRACS の計算回路はモジュール化されているので、合理的に回路を構築する仕組みをはじめから備えている。

RTRACS の仕組みを用いて構築した回路は、無細胞系での合成生物学に利用できるだけでなく、宿主細胞内に組み込んで利用することも十分に可能である。標準的な遺伝子組み換え実験の技術を用いて、RTRACS の回路を大腸菌の中に入れることは可能である。

(2) 人工遺伝子回路の宿主細胞への影響

人工遺伝子回路が宿主細胞の増殖速度に与える影響を明らかにする研究は、大腸菌の解糖系の 10 個の遺伝子の発現量を様々に変えた 143 株の大腸菌を用いて行うことにした。人工遺伝子回路の動作が宿主細胞に与える影響は複数の宿主遺伝子の発現量を強制変化させる摂動に相当すると考えられる。これらの大腸菌株を用いると、解糖系の 10 遺伝子の発現量を強制的に変化させたときの増殖速度の変化や他の遺伝子の発現量の変化を調べることができる。

研究に使用した大腸菌株は慶応大学の柘植研究室で OGAB 法を用いて作成されたものである。大腸菌の解糖系の 10 遺伝子をポリシストロンとして集積したプラスミドを組み込んだ株で、ゲノム上の対応する遺伝子はすべてノックアウトされている。

(3) 要素技術の開発

以上の研究を実施するためには、いくつかの要素技術の開発も必要である。これらの要素技術は汎用性があるため、合成生物学の研究において広く利用することが可能である。

4. 研究成果

(1) 人工遺伝子回路の合理的構築

無細胞タンパク質合成系で動作する多要素からなる人工遺伝子回路を、合理的に設計して構築する方法を開発する研究については、合理的な設計と構築により、巨大一枚膜ベシクル(GUV)内の無細胞タンパク質合成系で動作する人工遺伝子回路を実現することに成功した。

GUV は細胞と同程度の大きさを持ち、その膜構造は細胞と同じ一枚膜の閉鎖小胞である。細胞サイズの GUV に遺伝子回路を封入することで、内包分子の少数性、脂質二分子膜の表面効果、物質の膜透過など、試験管内の実験には存在しない因子を系に取り込むことができる。

GUV 内に構築した人工遺伝子回路は、GUV 外に添加した IPTG で回路の動作を開始させる分子スイッチ、二種類の人工遺伝子が同時に発現すると GFP の mRNA を発現する AND 型人工遺伝子回路、mRNA から GFP を翻訳する無細胞タンパク質合成系から構成されている。遺伝子組み換え実験で使用される誘導分子 IPTG で動作を開始するようにしたのは、今後人工遺伝子回路を大腸菌に導入することを考えてのことである。

分子スイッチ部分はプロモーター上流近傍に Lac-O 配列を配した二本鎖 DNA で、初期状態では Lac-O 配列に Lac-R が結合して転写が抑制され、スイッチはオフの状態である。GUV の脂質二分子膜は、オリゴ核酸やタンパク質のような分子量が大きい分子は透過しないが、IPTG のように分子量が小さい分子は比較的速く透過する。GUV 外から IPTG を添加すると、しばらくしてスイッチがオンになり、AND 型人工遺伝子回路が動作する。

IPTG 添加直後はいずれの GUV からも GFP の蛍光は見られなかったが、37 °C で 14 時間経過すると、発現した人工遺伝子の RNA が GUV 内に存在する場合のみ、約 40% の GUV から GFP の蛍光が観測された。

今後は、生物学的あるいは工学的に価値が高い、多要素から成る人工遺伝子回路を GUV 内で動作させたい。また、GUV 内で動作させた人工遺伝子回路を遺伝子組み換え実験により大腸菌に組み込んで動作させる実験を計画している。

試験管内の無細胞タンパク質合成系では GUV 内よりさらに大きな人工遺伝子回路を合理的に設計して構築することに成功した。GUV 内で動作させた人工遺伝子回路は転写ユニットを 2 つしか含まない回路である。試験管内では転写ユニットを 6 つ含む人工遺伝子回路を合理的に構築して動作させることに成功した。この回路は、2 つのグループの遺伝子が異なる種類の遺伝子を発現したときのみ標的遺伝子を発現する人工遺伝子回路である。

(2) 人工遺伝子回路の宿主細胞への影響

人工遺伝子回路が宿主細胞の増殖速度に与える影響を明らかにする研究については、影響を緩和するための普遍的な機構が存在することが実験結果から示唆された。この仕組みが利用できるように人工遺伝子回路を設計すれば、宿主細胞の増殖速度を大幅に落とさずに動作する人工遺伝子回路が実現できる。

人工遺伝子回路の動作が宿主細胞に与える影響は複数の宿主遺伝子の発現量を強制変化させる摂動に相当すると考えられる。そこで、解糖系の 10 個の遺伝子の発現に様々な摂動を与えたときの宿主細胞の増殖速度と遺伝子発現量の変化を調べた。

実験に使用した大腸菌に導入されたプラスミド上には、ゲノムからノックアウトした、解糖系の 10 種の遺伝子がポリシストロニックなオペロンとして集積されている。ポリシストロニックなオペロン上の遺伝子はプロモーターからの距離が大きくなるほど発現量が小さくなることが知られており、遺伝子が並ぶ順番を変化させることで各遺伝子の発現量比を変化させることができる。

こうして得た、様々な順番のオペロンを持つ 143 株の、グルコースを炭素源とする最少培地での増殖速度は、どれも野生型よりも小さかったが、幅広い値を示した。また、このうちの 1 株、解糖系の 10 遺伝子の野生型での発現量比の順番にオペロン上で並べたもの(以下、標準株と呼ぶ)は、比較的野生型に近い増殖速度を示した。

増殖速度との相関が最も良くなるように数値化した摂動の大きさと増殖速度の関係をみると、摂動の小さいところでは比較的増殖速度が大きい、摂動の大きいところでは幅広い増殖速度を示すような特徴が見られた。摂動と増殖速度は単純な関係にはないことがわかった。

摂動による株間の増殖速度の違いがどのように起きているか調べるために、遺伝子発現解析を行った。摂動の大きさと増殖速度の関係が互いに異なるように 17 株選出し、Photo-DEAN 法でオペロン上の遺伝子と、それ以外に代謝関連遺伝子 100 種について mRNA を定量した。

摂動によって野生型からどれだけ発現プロファイルが変動しているかを、オペロン上の遺伝子以外の定量遺伝子について野生型との発現比の分散でみたところ、増殖速度と高い負の相関があり、摂動によって増殖速度が減少する株ほど、摂動による発現プロファイルの変動が大きいという関係があることがわかった。また、5 株について DNA マイクロアレイによる全ゲノム解析を行ったところ、発現の変動はゲノム上の全遺伝子にわたっているが、比の分散と増殖速度については同様の相関関係を示すことがわかった。

この関係についてさらに詳しく解析することで、摂動、すなわち、人工遺伝子回路の動作が宿主細胞の増殖速度に及ぼす影響を緩和するための普遍的な機構が明らかになると考えられる。その機構が利用できるように人工遺伝子回路を設計すれば、宿主細胞の増殖速度を大きく落とさずに人工遺伝子回路を動作させることができると考えられる。

(3) 要素技術の開発

必要な要素技術の開発については、RNA 定量法である Photo-DEAN 法、GUV 調製法である PSGH 法、および DNA のハイブリダイゼーション速度の予測法を新規に開発した。

Photo-DEAN 法は、細胞内、ベシクル内で動作する遺伝子回路で転写される多種類の RNA の絶対量を同時に高感度・高精度で測定する方法である。人工遺伝子回路は化学反応系なので、その動作を解析するためには転写産物である RNA の濃度情報が必要である。Photo-DEAN 法は、バイアスが問題となる逆転写反応を必要としないので、total RNA から直接、mRNA の量を決定できる。また、mRNA と同時に miRNA の絶対量の測定も可能である。現在の感度は 15 zmol 程度であるが、さらに向上させることが可能である。逆転写した cDNA を介さずに多種類の RNA の絶対量を同時に高感度で測定できる、現時点では唯一の方法である。

PSGH 法は、膜タンパク質を用いた合成生物学に適した、オイルを使用しない GUV 調製法である。最も標準的な GUV 調製法は油中水滴界面通過法である。しかし、この方法は大量のオイルを使用するので、オイルが GUV 膜中に混入する。そのため、膜タンパク質を使用する場合、GUV 膜中のオイルが膜タンパク質の機能を阻害する危険性がある。PSGH 法は、この問題を解決するための GUV 調製法である。実際に PSGH 法で調製した GUV 内で膜タンパク質を発現して膜に組み込むことができるかどうかを、細胞膜を貫通するポアを形成する膜タンパク質 ヘモリシンと GFP の融合タンパク質を使って調べた。GUV 内で融合タンパク質の遺伝子はきちんと転写され翻訳された。しかし、発現した融合タンパク質がどの程度、膜に移行してポアを形成したかどうかは更なる検証が必要である。

核酸のハイブリダイゼーション速度を核酸配列から予測する方法は、RTRACS の仕組みを利用した合理的な人工遺伝子回路の設計に必要である。核酸同士の相互作用が回路の構造と特性を決定するが、回路は一定温度で動作するため、その設計には平衡論だけでなく速度論に基づく核酸相互作用の予測が必要である。平衡論に基づく予測はすでに核酸配列の設計に広く用いられている。しかし、人工遺伝子回路の構築に使用する、平衡論的には安定な自己二次構造を形成しないような配列については、速度論に基づく予測法は

まったくない。そこで、このような配列について、多種類の配列のハイブリダイゼーション実験の結果に基づいて、核酸配列からハイブリダイゼーション速度を予測する方法を開発した。その方法を用いたハイブリダイゼーション速度の予測が実際に人工遺伝子回路の設計に役立つことが、回路の設計と構築の実験により確かめられた。

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 6 件)

Koh-ichiroh Shohda, Kei Takahashi, Akira Suyama. A method of gentle hydration to prepare oil-free giant unilamellar vesicles that can confine enzymatic reactions. *Biochem. Biophys. Reports*, 3, 76-82 (2015). (査読有)
Anton Kan, Yoko Sakai, Koh-ichiroh Shohda, Akira Suyama. A DNA based molecular logic gate capable of a variety of logical operations. *Nat. Comput.*, 13, 573-581 (2014). (査読有)

[学会発表](計 49 件)

Koh-ichiroh Shohda, Toru Nishikata, Yutetsu Kuruma, Akira Suyama. Vesicle encapsulation of externally controllable synthetic gene regulatory networks driven by RNA transcription factors. *Synthetic Biology Congress 2015*, October 20-21, 2015, London (UK).

[図書](計 1 件)

額田崇志, 陶山明. エヌ・ティーエス, 進化分子工学 高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発 (伏見譲編), 99-109 (2013).

[その他]

ホームページ等

<http://dna.c.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陶山 明 (SUYAMA, Akira)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：90163063

(2) 研究分担者

庄田 耕一郎 (SHOHDA, Koh-ichiroh)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号：00401216

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：B01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119510

研究課題名（和文）真核系無細胞翻訳システムを利用した shunting 基盤人工リボスイッチの開発

研究課題名（英語）Development of ribosomal shunting-based riboswitches by utilizing a eukaryotic cell-free translation system

研究代表者

小川敦司（Atsushi Ogawa） 愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究成果の概要

リボスイッチは、分子結合部位（アプタマー）および遺伝子発現制御部位から成っており、前者と対応分子の結合が後者の構造変化を誘起する仕組みで、分子に応答した遺伝子発現制御を実現する。天然リボスイッチのアプタマーは代謝産物に結合するものに限定されるが、任意分子に結合する人工アプタマーは別途獲得できるため、その人工アプタマーを適切に用いれば、任意分子に応答する人工リボスイッチが構築できると考えられる。実際、これまでに多くの原核系人工リボスイッチ（特に翻訳制御型）が報告されてきた。一方、真核系においては、その翻訳システムの特徴のため、翻訳制御型 ON リボスイッチの構築は困難であった。そこで本研究では、特殊な真核系リボソーム進入機構である『shunting』を利用した、真核系人工 ON リボスイッチの構築を試みた。

まず初めに、真核系無細胞翻訳システム（コムギ胚芽抽出液）中における shunting 機構を詳細に調査し、その情報をもとに、mRNA への人工アプタマーの挿入位置および方法を決定した。次にモデルとしてテオフィリンアプタマーを使用し、テオフィリン依存的に shunting および下流遺伝子の発現が促進される「shunting リボスイッチ」を開発した。この shunting リボスイッチは、スイッチング時に RNA2 本鎖の組換えを伴わず、エネルギーロスが軽減できるため、高い翻訳スイッチング効率を示した。また、2 本鎖組換えが必要ないので、設計が簡便であるという利点もある。実際、アプタマーの配列情報だけで shunting リボスイッチが構築できるように「合理的設計法」も確立した。今後は、合成生物学における種々の応用が期待される。

研究分野：生体分子工学

キーワード：リボスイッチ アプタマー 合成生物学 shunting

1. 研究開始当初の背景

人工遺伝子回路や人工代謝経路の構築にあたり、『特定の分子が存在する時のみ、特定の遺伝子の発現が抑制あるいは促進されるシステム』は必要不可欠である。この種のシステムを任意の分子に対して人工的に構築する場合、生物が元来有するシステムを参考にする事が望ましいが、複雑かつ統一性の無いシステムでは汎用性を欠いてしまう。そこで我々が注目したのが、2002年に天然の原核生物で発見されたノンコーディングRNA『リボスイッチ』である。リボスイッチは、mRNAの非翻訳領域に存在する、cis作用型の分子応答性遺伝子発現制御システムであり、単純かつ統一性のある制御機構を有している。リボスイッチは、制御分子（天然では代謝産物）と結合する「アダプター部位」および遺伝子発現をコントロールする「発現制御部位」から成っており、制御分子とアダプターの結合が発現制御部位の構造変化を引き起こすことによって、下流（or 上流）の遺伝子発現（転写 or 翻訳）を制御している。機構の明瞭さに加えて、cis作用型であるため、trans作用型と異なり、制御遺伝子に対する特異性が高いのも特徴である。

天然のリボスイッチは、代謝産物に応答するものに限られるが、任意の分子に結合する人工アダプターは *in vitro* selection 法によって獲得できるので、その人工アダプターを使って人工リボスイッチを構築する試みが、近年盛んに行われている。とりわけ、“転写制御”より単純な“翻訳制御”の人工リボスイッチが多く、例えば、原核生物の翻訳系では、mRNAの5'非翻訳領域(5'-UTR)にアダプターとともにランダム塩基を挿入し、*in vivo*でセレクションを行うことによって、幾つかの翻訳制御人工リボスイッチが得られている。しかし、原核系のリボスイッチの場合、この方法で促進タイプ(ONスイッチ)も抑制タイプ(OFFスイッチ)も獲得することができるのに対して、真核生物の翻訳系においては、OFFスイッチしか得られない。これは、真核mRNAには原核mRNAにあるようなShine-Dalgarno配列が無いからである。真核生物の翻訳系において、リボソームはmRNAの5'末端から進入してくるため、5'-UTRにアダプターを挿入すると、アダプターとアダプターのターゲット分子との結合が、リボソームの進行を阻害してしまう。従って、合成生物学において有用な「ONスイッチ」構築のためには、リボソーム進入部位の上流にアダプターを挿入する必要があるが、5'-cap前に挿入するのは不可能である。

一方我々は、IRES(内部リボソーム進入サイト)を用いることで上記の問題を解消し、『真核系ONリボスイッチ』を人工構築することに成功した。つまり、真核系の翻訳システムにおいてもリボソームをmRNAの中腹から進入させることで、リボソーム進入サイ

トの前にアダプターを挿入することを可能にしたのである。さらに、アダプターの配列情報だけで、このIRES基盤リボスイッチが構築できるように、合理的設計法も確立した。

しかしながら、このIRES基盤リボスイッチには欠点があるため、それらを克服した、より有能な真核系人工リボスイッチを構築しようと、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

IRES基盤リボスイッチの欠点は、「5'末端依存翻訳を止める必要がある」、という点である。この点については、mRNAの5'末端の高次構造によって、それなりに克服することができるが、ゼロにすることができない以上、原核系リボスイッチと比べて不利であることは明白である。また、「アダプターとIRESの距離が近く、ターゲット分子によってはアダプターとの複合体がIRES活性を阻害する可能性がある」のも欠点として挙げられる。

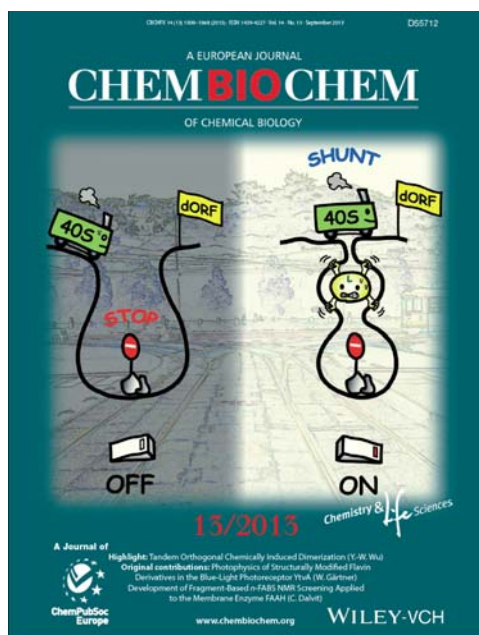
そこで、本研究では、5'末端依存翻訳における内部リボソーム進入機構である『shunting』を利用して、上記欠点を克服した新しい真核系リボスイッチを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

まず初めに、*in vitro*で調製した種々のmRNAを用いて、真核系無細胞翻訳システム(コムギ胚芽抽出液)中におけるshunting機構を詳細に調査した。次に、その情報をもとにして、mRNAへの人工アダプターの挿入位置および方法を決定した。さらに、モデルとしてテオフィリンアダプターを使用し、テオフィリン依存的にshuntingおよび下流遺伝子の発現が促進されるよう周辺配列を合理的に最適化した。また、テオフィリンアダプター以外のアダプターについても検討した。

4. 研究成果

合理的に設計したshunting基盤ONリボスイッチ(下図:論文の表紙図に採用)は、スイッチング時にRNA2本鎖の組換えを伴わず、エネルギーロスが軽減できる点で優れており、非常に高い翻訳スイッチング効率を示した(1 mMテオフィリンにおける翻訳促進倍率は約15倍)。また、2本鎖の組換えが必要ないので、設計が簡便であるという利点もある。実際、テオフィリンアダプター以外のアダプターについても、その配列情報だけでshunting基盤ONリボスイッチが構築できるように合理的設計法を確立した。今後は、真核系合成生物学における基盤技術として、種々の応用が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① A. Ogawa, Ligand-Dependent Upregulation of Ribosomal Shunting, *ChemBioChem*, 査読有, Vol. 14, 2013, 1539-1543, DOI: 10.1002/cbic.201300362
- ② Y. Nakahira, A. Ogawa, H. Asano, T. Oyama, Y. Tozawa, Theophylline-dependent Riboswitch as a Novel Genetic Tool for Strict Regulation of Protein Expression in Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Plant Cell Physiol*, 査読有, Vol. 54, 2013, 1724-1735, DOI: 10.1093/pcp/pct115
- ③ A. Ogawa, Y. Susaki, Multiple-input and visible-output logic gates using signal-converting DNA machines and gold nanoparticle aggregation, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, Vol. 11, 2013, 3272-3276, DOI: 10.1039/C3OB40313K

この他 2 報の論文を発表しております。

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① 小川 敦司、Hybridization switch-free の真核系 ON リボスイッチを創る、第 8 回 バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9 月 11 日-13 日、岡山大学（岡山県・岡山市）
- ② 小川 敦司、小麦胚芽無細胞翻訳システムを利用した真核系人工リボスイッチの開発、第 1 回合成生物学研究部会セミナー、2014 年 3 月 3 日、愛媛大学（愛媛県・松山市）招待講演
- ③ 小川 敦司、コムギ無細胞システムを利用した真核リボスイッチの合理設計、第

15 回日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 24 日-26 日、ひめぎんホール（愛媛県・松山市）招待講演

この他、10 件の学会発表を行っております。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/ogawa/innovative%20area.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 敦司 (OGAWA ATSUSHI)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：30442940

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：B01 班 公募研究

研究期間：2012-2015

課題番号：24119504（2012-2013）、26119704（2014-2015）

研究課題名（和文）無細胞膜タンパク質合成による脂質代謝系の再構築（2012-2013）、リン脂質代謝系を組み込んだ人工細胞の構築（2014-2015）

研究課題名（英語）Reconstruction of lipid synthesis metabolism by cell-free system

研究代表者

車 兪 徹（Yutetsu Kuruma） 東京工業大学・地球生命研究所・特任准教授

研究分担者

研究成果の概要

本研究の目的は、細胞膜を構成する主要なリン脂質の、最小合成経路をリデザインし、無細胞系をベースとした再構築を試みることである。リン脂質の生合成反応は網目状のネットワーク構造を形成しており、多くの酵素が関わる複雑な生体システムである。これまでに Archaea の脂質生合成経路を大腸菌などの生物種で部分的に再構築した例は2、3あるが、In vitro で再構築した例は無く、また統合的な解析を行うための技術基盤も確立されていない。そこでリン脂質合成に関わる最小限の酵素8種を選別し無細胞系により合成することで、リン脂質合成代謝系をボトムアップ的に再構築する。これにより、リン脂質代謝をモデルとした膜タンパク質分子間ネットワークを無細胞内再構築することを目的とする。

合成する酵素は膜局在タンパク質であるため、その局在場所として NanoDisc（脂質二重膜をディスク状に束ねたもの）やリボソームを無細胞系に投入した。本研究計画において、plsB、plsC、cdsA、pssA、psd、pgsA、pgpA、cls 遺伝子の無細胞発現を確認し、またそれら合成産物の約80%以上が Nanodis 膜への自発的挿入していることを確認した。plsB と plsC については以前からアシルトランスフェラーゼ活性の検出に成功していたが、今回さらに cdsA についてその活性の一端を検出する結果が得られている。また関連技術として、巨大膜小胞（GUV）内においてモデル膜タンパク質である、アルファヘモリジンとバクテリオロドプシン（それぞれ GFP フージョンプロテインとして）を合成させたところ、効率的な GUV 内合成と、GUV 膜挿入を顕微鏡下で観察することができた。

本研究で得られた成果は、これまでに理想的な手段がなかった、脂質膜環境中でどのような分子ダイナミクスが行なわれているかを詳細に解析する、試験管内技術の創造に資するものである。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 人工細胞 リン脂質合成 脂質代謝ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

リン脂質の生合成反応は、網目状のネットワーク構造を形成しており、多くの酵素が関わる複雑な生体システムである。これまでに Archaea の脂質生合成過程を大腸菌などの生物種に部分的に再構築した例は2、3あるものの、*in vitro* で再構築した例は無く、また統合的な解析をおこなうための技術基盤も構築されていない。その理由の一つにリン脂質合成に関わる酵素の多くが、細胞膜局在タンパク質であることが考えられる。膜タンパク質酵素は細胞内での高発現化や単離精製過程において、多くのエフォートと時間を要するため、一般的に非常に困難である。また、膜タンパク質酵素の生化学的解析は、界面活性剤により可溶化した状態で行うため、カスケード型の連続反応や、ネットワーク型の代謝反応の解析にはこれまで不向きであった。この問題に対し、試験管内でタンパク質を合成する無細胞タンパク質系（無細胞系）が近年大きな注目を集めている。無細胞系は細胞の生死に左右されないため、任意のタンパク質を試験管内で自由に合成できる利点がある。これに人工的に調製したリポソームや Nanodisc などの脂質膜を投入することで、膜タンパク質の合成が可能である。このような手法を用いることで、今まで困難であったリン脂質合成に代表される、膜タンパク質の代謝ネットワークの再構築を行うことが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

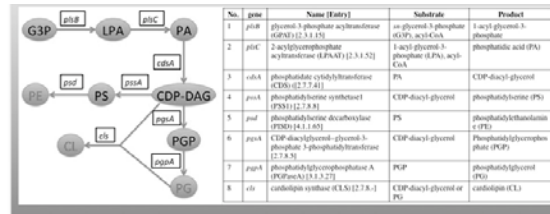
この様な背景に基づいて、本公募研究班の研究目的は、大腸菌をモデルとした、リン脂質合成に必須な8種類の酵素を選別しそれら無細胞系で合成することで、人工的なリン脂質代謝ネットワークを構築することである。これら8種の酵素は膜局在タンパク質であるためその局在場所として Nanodisc（脂質二重膜をディスク状に束ねたもの）や小胞型のリポソームを系内に投入する。これにより、無細胞合成された酵素群から、リン脂質生合成プロセスをボトムアップ的に再構築し、リン脂質代謝をモデルとした膜蛋白質分子間ネットワークの無細胞内再構築を目的とする。

3. 研究の方法

①リン脂質合成のためのミニマルな代謝系の再構築

細胞内で行われるリン脂質合成は一般的に網目構造のネットワークを持つ極めて複雑な代謝系である。これに対し、研究代表者は大腸菌のゲノムから8種類の遺伝子 (*plsB*, *plsC*, *cdsA*, *pssA*, *psd*, *pgsD*, *pgpA*, *cds*) を選別し、ミニマルな代謝系をデザインする。隠れマルコフモデルを用いたタンパク質のトランスメンブレンヘリックス予想による

と、これらの酵素は細胞膜貫通領域を持った膜局在タンパク質であることが予想された。そのため、無細胞系内に人工的に調製した脂質二重膜を投入し、膜存在下でタンパク質合成を行なう。このように上記の8種類の酵素を連携させることで、大腸菌の持つ主要なリン脂質、phosphatidic acid (PA)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylglycerol (PG)、cardiolipine (CL) を全て合成することが可能である。



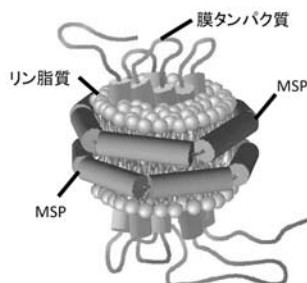
②膜タンパク質合成に特化した無細胞系の構築

膜タンパク質は脂質膜上で機能を発現するタンパク質である。細胞内における膜タンパク質の合成は、N末端側の疎水的シグナル配列がSRP (signal recognition particle) により認識され、細胞膜内壁に局在するRS (SRP receptor) を介して膜まで運ばれ、その後膜内にあるSecトランスロコンを介して、翻訳反応と同時に脂質膜内へ挿入される。細胞内ではこのように高度にコントロールされた反応ではあるが、我々はこれまでに多くの膜タンパク質が自発的に人工脂質膜に膜挿入し、さらにNativeは膜内構造を維持することを見出している。この現象を利用して、膜タンパク質合成に特化した無細胞系内の構築を行なう。無細胞系は、ある種の細胞抽出液をその基盤として用いるものがほとんどである。しかしながら抽出液中には一般的に細胞由来の膜画分を含むリスクが高く、これらは合成産物の活性評価等の段階で解析上の不都合が起こることが多い。今回我々の系ではタンパク質合成に必要な酵素や因子をそれぞれ個別に精製し、1試験管内に再構築した無細胞系 (PURE system) を使用している。これにより、膜画分の持ち込みによるデータジャミングをゼロにし、タンパク質合成以降の反応を構成的に再構築させることを試みる。

③人工膜画分の構築

無細胞系に投入する膜画分については、リポソームまたは Nanodisc を使用する。リポソームは、DOPC や POPC などの合成脂質あるいは、大豆や卵黄から抽出した極性脂質を水溶液に懸濁し、超音波処理や Freeze&Thaw を繰り返すことで、または define されたポアサイズのフィルム膜を透過させることで、直径 200-400nm の小胞型のリン脂質膜を調製する。リポソーム上で伸長された疎水的なペプチド鎖は物理的にリポソームの膜にコンタクトし、脂質二重膜に挿入することで膜タンパク質が合成される。

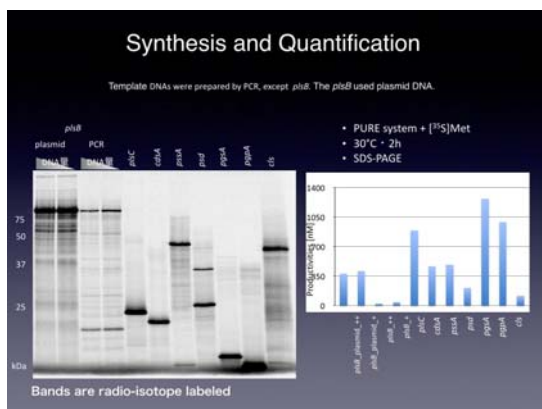
Nanodiscはリン脂質をディスク状に束ねるMSP (membrane scaffold protein) を合成脂質とともに界面活性剤で可溶化し、単分散させた状態から界面活性剤濃度を下げることで自発的にディスク状の膜を形成する。このNanodisc存在下においても膜タンパク質が合成と同時に自発的に挿入されることが確認されている。



4. 研究成果

①リン脂質合成酵素の無細胞合成

上記の8種の酵素をコードしたDNAをPCRにより調製し、^[35S]メチオニン存在下のPURE systemで合成した。その結果、plsBとclsを除いた全てにおいて良好な合成が確認された。plsBについては、当初合成量が極めて低かったが、DANを直鎖型から感情のプラスミドに変えることで大幅な合成効率の上昇が得られた。また、cdsはそのアミノ酸配列状にプロリンが4つ連続するモチーフを持つ。このPPPPモチーフは翻訳段階において、リボソーム内トンネルにスタックし翻訳スピードを著しく低下させるという報告があった。そのため、これを解消するEF-Pを精製し、系内に新たに加えたところ、若干の合成効率の上昇が見られた。合成量については数4nMのDNA投入により、350-1300nMのタンパク質の合成が確認できた。

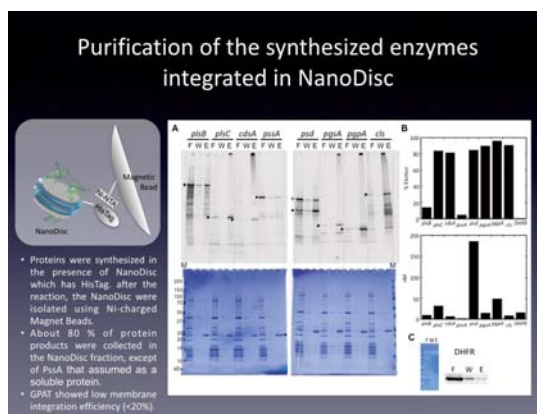


②合成された膜タンパク質酵素の膜局在

上記の要領で調製したNanodiscをPURE system反応液に投入し、8種の膜タンパク質酵素を合成した。合成後、反応液をNi-NTAをチャージしたマグネットビーズと反応させ、MSPに付加されたHisTagを介することで、Nanodiscのみを単離した。その後単離したNanodisc画分はSDS-PAGEにより展開し、タンパク質のバンドを定量することで、膜局在

効率を評価した。その結果、plsBとplsAを除く全てにおいて、約80%以上の膜局在効率を観察することができた。PlsBの低局在化の原因については明らかではないが、その一時配列が影響しているものと考えられる。これについては、他の公募班の西山等の研究により、解決される可能性が高いと考えている。また、plsAについては、アミノ酸一次配列の予想から、皮膜タンパク質である可能性が高い。

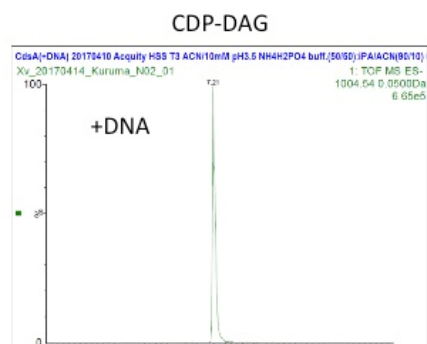
無細胞系を用いた本手法は、これまでの膜タンパク質解析の方法と比べ、極めて迅速で簡単に結果が得られるものであるため、DNAの調製から膜局在評価までを1-2日で完了することが可能である。



③無細胞合成されたリン脂質合成酵素の活性評価

リン脂質合成の初段階を担うplsBとplsCについては、無細胞合成された酵素が膜状で活性を発現することで、それぞれlysophosphatidic acidとphosphatidic acidの合成を触媒する活性があることが研究代表者の過去の研究において示されている。本プロジェクトでは新たに、cdsAの活性が示された。CdsAはplsCのプロダクトであるphosphatidic acid (PA)とCTPを基質としてCDP-DAGの合成を触媒する膜タンパク質酵素である。CDP-DAGはその後、PE、PG、CL合成のハブとなる重要なリン脂質である。PURE system反応液に、DOPCとDOPAのみからなるリボソームを投入し、cdsAの合成を行った。合成後、反応液をMeOH:H₂Oで希釈し、そのままLC-MSにより解析した。その結果、DNAを加えてタンパク質合成をおこなったものに関しては、CDP-DAGを示すと思われる顕著なMSピークが観察された、このピークはさらにMSMS解析され、目的の反応産物であるCDP-DAGであることが確認できた。DNAを添加しなかった系では、CDP-DAGを示すピークは観察されなかった。また、DOPAを使用しなかったリボソームを使用した場合も同じようにプロダクトは観察されなかった。ここでおこなった、無細胞合成を用いたcdsAの合成と、LC-MSを用いた活性評価は極めて迅速であり1日で完了することが可能であった。このことは、今後のリン脂質合成酵素解析の

大きな発展を示唆するものである。
 さらに cdsA は CDP-DAG の合成を触媒する正規の反応以外に、西山等の解析する MPIase の前駆体脂質を合成する可能性があることがわかってきた。これについては西山等のグループと共同研究を行い、無細胞系で合成した cdsA が MPIase 前駆体合成を触媒することを確認し、細胞内におけるその生理的意義を解析する予定である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kuruma, Y. and Ueda, T., “The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins”, *Nature Protocols* 10 (2015), pp. 1328-13444, 査読有
- ② Kuruma Y., “Creation of Simple Biochemical Systems to Study Early Cellular Life”, *Orig Life Evol Biosph.* 45 (2015), pp. 359-360.
- ③ Matsubayashi H, Kuruma Y, and Ueda T. “Cell-Free Synthesis of SecYEG Translocon as the Fundamental Protein Transport Machinery”, *Orig Life Evol Biosph.*, 44 (2014), pp. 331-334.
- ④ Matsubayashi, H., Kuruma, Y., and Ueda, T., “In vitro synthesis of the E. coli Sec Translocon from DNA”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53 (2014), pp. 7535-75384, 査読有
- ⑤ Yoshihiro Shimizu, Yutetsu Kuruma, Takashi Kanamori, and Takuya Ueda, “The PURE system for protein production” *Methods in Molecular Biology* 1118 (2014), pp. 275-284.
- ⑥ van Nies P, Nourian Z, Kok M, van Wijk R, Moeskops J, Westerlaken I, Poolman JM, Eelkema R, van Esch JH, Kuruma Y, Ueda T, and Danelon C., “Unbiased tracking of the progression of mRNA and protein synthesis in bulk and in liposome-confined reactions”, *ChemBioChem.* 14 (2013), pp. 1963-19664, 査読有
- ⑦ Kuruma, Y., Suzuki, T., Ono, S., Yoshida, M., and Ueda, T., “Functional analysis of membraneous Fo-a subunit of F1Fo-ATP synthase by

in vitro protein synthesis”, *Biochem. J.* 442 (2012), pp. 631-6384, 査読有 (その他 2 報)

[学会発表] (計 20 件)

- ① Yutetsu Kuruma, In Vitro Reconstruction of Functional Membrane, ALIFE 14, New York, July 2014
 - ② Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Takuya Ueda: In Vitro Synthesis of Sec Translocon from DNA, Open Questions of the Origin of Life 2014, Kyoto, July 2014
 - ③ Yutetsu Kuruma: Creation a possible living organism that might exist in an early earth condition, ORIGINS2014, Nara, July 2014
- この他、17 件の学会発表を行っております。

[その他]

ホームページ等

<https://members.elsi.jp/%7Ekuruma/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

車 兪澈 (KURUMA, Yutetsu)

東京工業大学・地球生命研究所・特任准教授

研究者番号：40508420

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：B01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119511

研究課題名（和文）人工細胞内の代謝を制御する膜輸送系の構築

研究課題名（英語）Construction of membrane transport system for controlling metabolism of artificial cells

研究代表者

野澤彰 (Akira Nozawa) 愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究分担者

戸澤譲 (Yuzuru Tozawa) 愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究成果の概要（和文）

本研究班の研究目的は、合成生物学の基盤技術として人工細胞内に構築した反応系を持続的に稼働させるために必要不可欠な物質輸送系の構築技術を確認することである。そのため、①コムギ無細胞系で機能型膜輸送体タンパク質を合成する技術の高度化、②リポソーム内に簡易的な人工代謝系を構築する技術の開発、③コムギ無細胞系で合成した膜輸送体タンパク質を利用してプロテオリポソームを構築する技術の高度化を行った。これら研究を通じて、最終的には、④人工細胞内の代謝反応系をその膜上に配置した膜輸送体を利用することで外部から制御することに成功した。

研究成果の概要（英文）高度化

The goal of this research project is to construct the membrane transport system for controlling metabolism of artificial cells. In order to reach this goal, we accomplished 1) development of functional membrane transporter protein production system based on wheat cell-free system, 2) development of technology for inclusion of metabolic system into artificial cells, and 3) development of technology for proteoliposome reconstitution system using transporter proteins synthesized by cell-free system. Through these researches, we succeeded to demonstrate that the activity of luciferase entrapped in vesicles is modulated by addition of external ATP by function of membrane-integrated Ant1p, which facilitates exchange of ATP/AMP across the lipid bilayer.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 コムギ無細胞タンパク質合成系 プロテオリポソーム ミトコンドリアキャリア ルシフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

生物機能を持つ細胞は、多くの場合、系の持続性そのものが寿命に直結する。単純な微生物においても、多くの物質膜輸送系がシステムの持続性を支えている。本研究では、合成生物学の工学的基盤技術として、人工細胞内に構築した反応系を持続的に稼働させるために必要不可欠となる物質輸送系の構築を目指した研究を進め、基質取り込み、代謝物排出などの制御システムの構築を図る。

申請者はこれまでに無細胞系を用いて機能的膜輸送蛋白質をリポソーム上に合成する技術を開発してきた。我々が開発したリポソーム添加によるコムギ無細胞合成系では、試みた約 100 種の膜蛋白質の 9 割以上が 40% 以上の頻度で合成反応中にリポソーム膜上へ移行することを確認している。この方法で調製したシロイヌナズナ葉緑体内膜のリン酸交換輸送体 AtPPT1 は、精製蛋白質や酵母で発現した蛋白質と同等以上の比活性を示した。最近では植物ミトコンドリアキャリアファミリー蛋白質 AtDTC の解析において、無細胞合成 AtDTC が既報と同様の基質特異性を示すことを確認し、リポソーム添加型無細胞合成法が機能型ミトコンドリアキャリアファミリータンパク質の合成にも適用可能であることを示した。ミトコンドリアキャリアファミリー蛋白質は真核生物の膜輸送体蛋白質の中では最大のファミリーで、ミトコンドリアキャリアファミリーにはエネルギー分子である ATP や GTP に対する輸送体も含まれることから、それら輸送体を用いた人工リポソーム内へのエネルギー供給制御システムの構築を計画し、本申請の着想に至った。

2. 研究の目的

本申請では、我々がこれまでに開発してきたコムギ無細胞系を基盤とした膜輸送体タンパク質の合成方法やプロテオリポソームへの再構成系の高度化を図るとともに、人工細胞構築へ向けた基盤技術の開発を目的として、リポソーム内に内封した人工代謝経路に対し外部からのエネルギー分子供給システムを付与することでその人工代謝経路を外部から制御するシステムの構築を行う。

3. 研究の方法

①コムギ無細胞系で機能型膜輸送体タンパク質を合成する技術の高度化

本研究では、ATP を輸送する膜タンパク質としてミトコンドリアキャリアタンパク質を利用することとした。最近、膜タンパク質の機能がその膜タンパク質が局在する膜系に存在する脂質に影響を受けている可能性を示す報告が相次いでいる。そこで、本研究では、膜タンパク質を合成する技術の高度化

として、無細胞系での膜タンパク質合成時に添加するリポソームの脂質組成の検討を行った。ミトコンドリア膜を構成する脂質の特徴としてはミトコンドリア膜に特徴的な脂質カルジオリピンの存在があげられる。本研究では、無細胞タンパク質合成系でのミトコンドリアキャリアタンパク質の合成時に添加するリポソームにおけるカルジオリピンの添加の影響を解析した。その結果、ミトコンドリアキャリアタンパク質の合成時には、カルジオリピンを添加したリポソームを使用することで高活性のタンパク質を合成できることが明らかになった。この時添加するリポソームのカルジオリピン濃度はミトコンドリア内膜での存在割合とほぼ同程度の 15% 前後で高活性タンパク質が合成されることが明らかになった。また、ミトコンドリアキャリアファミリータンパク質の中には、ミトコンドリア以外に局在するものも存在するが、そのようなタンパク質ではカルジオリピンの添加効果が観察されなかった。

②リポソーム内に簡易的な人工代謝系を構築する技術の開発

本研究では、リポソーム内に簡易的な代謝系としてルシフェラーゼによるルシフェリン酸化経路の構築を試みることにした。ルシフェラーゼはホタルのものが一般的に利用されているが、本研究ではホタルのものとヒカリコメツキムシのルシフェラーゼをコムギ無細胞系で合成し、両者の活性を比較した。その結果、ヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼの方が約 4 倍の比活性を示すことが確認され、本研究ではヒカリコメツキムシのルシフェラーゼを利用することとした。また、このヒカリコメツキムシのルシフェラーゼに様々なタグ配列を付加し、それらの活性を比較したところ、N 末端に His タグを付加しても比活性が変わらないことを見出した。His タグ付加ルシフェラーゼを精製し、活性に対する EDTA の影響を検討した。活性に Mg^{2+} を必要とするルシフェラーゼは 20 mM の EDTA の添加により活性が 0.1% 以下に低下することが確認された。次に、この精製ルシフェラーゼをリポソーム内に封入する技術の開発を行った。精製ルシフェラーゼをアズレクチン溶液と混合し超音波処理によりルシフェラーゼを内封したリポソームを作成した。リポソームへのルシフェラーゼの内封率を求めめるために内封処理後、Accudenz を利用した密度勾配遠心によりリポソームと内封されなかったルシフェラーゼを分離し、回収したリポソームをプロテアーゼで処理後内封されたルシフェラーゼのタンパク質量を測定した。アズレクチンとルシフェラーゼの混合量比を検討した結果、最大で 20% のルシフェラーゼがリポソーム内に封入されることを確認した。

③コムギ無細胞系で合成した膜輸送体タンパク質を利用してプロテオリポソームを構築する技術の高度化

我々は、無細胞系で合成した膜タンパク質をプロテオリポソームに再構成することに成功し、その手法をすでに報告している。本研究では、報告済みの従来法よりもより簡便で信頼性の高い手法の開発を試みた。従来の方法では、合成したタンパク質の精製を行わずに合成反応液をそのままプロテオリポソームの作成に用いていた。そのため無細胞合成系のコムギ胚芽抽出液に由来するタンパク質が存在したままであった。コムギ胚芽抽出液中には、本研究で利用するトランスポーターの基質である ATP を代謝する酵素も含まれるため、それらを除く方法の開発を試みた。試行錯誤の結果、合成反応後を反応液を遠心し、合成膜タンパク質をリポソームとの複合体として沈殿させ回収することで、コムギ胚芽抽出液由来のタンパク質成分を除去することに成功した。また、この操作では沈殿画分を任意のバッファーに懸濁することでリポソームの外側のバッファー系を容易に交換することが可能であり、従来のカラムを用いたバッファー交換法よりも簡便で安価な手法の開発につながった。

4. 研究成果

我々は、これまでにコムギ無細胞蛋白質合成系を用いて機能的膜輸送蛋白質をリポソーム上に合成する技術を開発してきた。本課題では、この膜蛋白質合成技術を高度化し、人工的に調製したリポソーム内部に構築した代謝経路に外部からエネルギー分子を輸送することでその代謝経路を駆動・制御するシステムの構築を試みた。まず、コムギ無細胞合成系を用い、酵母ゲノムにコードされるミトコンドリアキャリア蛋白質全34種の合成を行なった。ミトコンドリアキャリア蛋白質は真核生物の膜輸送体蛋白質の中では最大のファミリーで、エネルギー分子であるATP、GTPからアミノ酸、コエンザイムA、プロトンなど多様な分子の輸送を担う輸送体蛋白質群である。これら34種のうち、現在までに11種について輸送活性を持つことを確認し、活性に対するリポソームを構成する脂質組成の影響についても解析を行い、カルジオリピンの影響を明らかにすることができた。

次に我々は、活性型タンパク質として合成できたミトコンドリアキャリアの中で、ATP/AMP交換輸送活性を持つAnt1pを用い、リポソームに内封したルシフェラーゼへATPを供給するシステムの構築を行った。まず、Ant1pがATPとAMPとの交換輸送活性を有することを確認した。次に、無細胞系でルシフェラーゼを合成し、ルシフェリン酸化活性を有することを確認した。また、この活性は最終濃度20 mMのEDTAを添加しMg²⁺をキレートすることで約0.1%まで低下することを確認した。

次に、Ant1pを膜上に配置したリポソームに凍結融解と超音波処理によりAMP、ルシフェリン、Mg²⁺およびルシフェラーゼを内封した。このリポソームの外部にATPを添加すると、ルシフェラーゼのルシフェリン酸化反応による発光が検出された(Fig. 1-1)。このとき、Ant1pを持

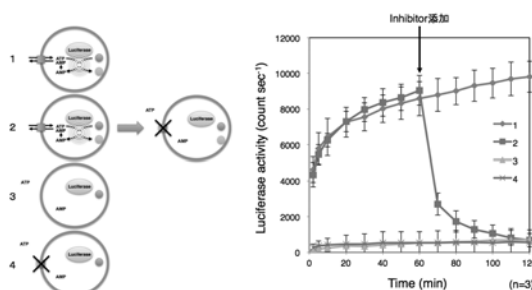


Fig. 1. リポソーム内封ルシフェラーゼへのATP供給システムの構築
たないリポソームや(Fig. 1-3)、Ant1pを配置したリポソームにおいてもAnt1pの阻害剤であるPLPとMersalylを添加した場合は(Fig. 1-4)、外部からATPを加えてもルシフェラーゼによる発光は検出されなかった。また、ATPの添加により発光が観察されたAnt1pプロテオリポソームにPLPとMersalylを添加すると速やかに発光の消失が観察された(Fig. 1-2)。以上の結果より、リポソーム膜上に輸送体蛋白質を配置することにより、リポソーム内部の酵素蛋白質の活性を外部から制御することに成功した。

本研究では、様々な基質を輸送するミトコンドリアキャリア蛋白質を無細胞系により機能を保持した状態で合成できることを確認し、それら輸送体の活性に膜脂質組成が影響を与えることを明らかにした。また、合成した輸送体蛋白質を利用し、リポソーム内の酵素活性制御系の構築に成功した。本研究成果は、将来的に人工細胞の作成につながる合成生物学の要素技術として期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Akira Nozawa, Yuzuru Tozawa, Incorporation of adenine nucleotide transporter, Ant1p, into proteoliposomes facilitates ATP translocation and activation of encapsulated luciferase, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, Vol. 118, 2014, 130-133, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.001
- ② Akira Nozawa, Yuzuru Tozawa, Modifications of wheat germ cell-free system for functional proteomics of plant membrane proteins, *Methods in Molecular Biology*, 査読なし, Vol. 1072, 2014, 259-272, DOI: 10.1007/978-1-62703-631-3_19

〔総説・解説〕(計1件)

- ① 野澤彰, 戸澤譲, 膜輸送体タンパク質の完全インビトロ機能解析系, バイオサイエンスとインダストリー, Vol. 72, 2014, 190-196

[学会発表] (計 8 件)

- ① Akira Nozawa, Yuzuru Tozawa. Cell-free system for functional analysis of membrane transporters, The 12th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences, 2014. 9. 17, Ehime Univ. (愛媛県・松山市) 招待講演
- ② 野澤彰, 戸澤譲, Adenine nucleotide transporter ANT1 を膜上に配置したプロテオリポソームにおける内封ルシフェラーゼ活性の外部からの制御, 日本農芸化学会年会, 2014. 3. 28, 明治大学. (神奈川県・川崎市)
- ③ 野澤彰, 戸澤譲, 無細胞系を利用した膜蛋白質合成法の開発とその合成生物学への応用, 第一回合成生物学研究部会, 2014. 3. 3, 愛媛大学. (愛媛県・松山市) 招待講演
- ④ 野澤彰, 戸澤譲, 脂質組成と再構成ミトコンドリアキャリア蛋白質の輸送活性との関係, 日本農芸化学会中四国支部36回講演会, 2013. 6. 8, 島根大学. (島根県・松江市)
- ⑤ 野澤彰, 戸澤譲, コムギ無細胞翻訳系を利用した膜蛋白質の機能解析系の構築, 日本植物生理学会年会シンポジウム「植物科学のための最先端蛋白質解析技術」, 2013. 3. 23, 岡山大学. (岡山県・岡山市) 招待講演
- ⑥ 岡田有右, 野澤彰, 藤本竜治, 戸澤譲, 酵母ミトコンドリアキャリア蛋白質の無細胞合成および膜輸送活性の再構築, 日本農芸化学会年会, 2013. 3. 25, 東北大学. (宮城県・仙台市)
- ⑦ 岡田有右, 野澤彰, 戸澤譲, 酵母ミトコンドリアキャリア蛋白質の機能解析, 日本農芸化学会中四国支部34回講演会, 2013. 3. 25, 山口大学. (山口県・宇部市)
- ⑧ Yusuke Okada, Ryoji Fujimoto, Akira Nozawa, Yuzuru Tozawa. From bacteria to organelles: Cell-free analysis and characterization of mitochondrial carrier proteins, The 10th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences, 2012. 9. 25, Ehime Univ. (愛媛県・松山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野澤 彰 (NOZAWA, Akira)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
講師
研究者番号：30432800

(2) 研究分担者

戸澤 譲 (TOZAWA, Yuzuru)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
教授
研究者番号：90363267

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分:B01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119705

研究課題名（和文）DNA-タンパク質相互作用の光制御を利用した遺伝子回路への光分子スイッチの導入

研究課題名（英語）Incorporation of photo-switch to artificial genetic circuit by photo-controlled DNA-protein interaction

研究代表者

清尾康志（Kohji Seio） 東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究成果の概要

DNA 化学合成や試験管内タンパク質合成の進展に伴い、化学合成した遺伝子の試験管での転写・翻訳が可能になった。このような技術進歩を背景に、転写された RNA や翻訳されたタンパク質による遺伝子のフィードバック制御や、より複雑な DNA-RNA-タンパク質の協働現象などを、試験管内で定量的に解析する *in vitro* 遺伝子回路の研究が生命科学の新技术として注目されている。本研究では遺伝子発現を外部から制御するための分子スイッチとして、光照射により除去される保護基（光ケージ基）を有するヌクレオシドユニットを導入した人工遺伝子を開発し、開発した人工遺伝子と遺伝子発現に関わるタンパク質との相互作用を制御することで遺伝子発現を制御することを目指した。

光ケージ基として 2-ニトロベンジル基(NB 基) および 3-ニトロフェニルプロピル基(NPP 基)を選択し、これらをチミジンの 4 位の酸素原子に導入した光ケージ基を導入したデオキシヌクレオシド ^{NB}T と ^{NPP}T 基を合成し DNA に化学合成方法により導入した。このようにして合成した光ケージド DNA に対するミスマッチ結合タンパク質 MutS の結合を評価した結果、光照射により MutS の結合を制御することが可能であり、また、MutS の結合制御を利用して DNA からの転写反応を制御できることも明らかにした。

また、上記の化学合成法により光ケージド DNA を合成する技術を補完する技術として、DNA ポリメラーゼなどの核酸合成酵素より DNA 中に取り込むことのできる新規ケージドヌクレオシドを開発した。そのためのヌクレオシドとしてワトソンクリック塩基対形成部位を保持し、かつ DNA に導入された際にメジャーグループ側に嵩高い基をもつよう光ケージドデオキシシユードウリジン(^{NB}dψ, ^{NPOM}dψ)を設計し、その合成と DNA 鎖への酵素的な取り込み反応を検討した。その結果、^{NB}dψ, ^{NPOM}dψは Klenow Fragment により DNA 鎖に取り込まれることが分かった。また、DNA 鎖中に導入した NB 基および NPOM 基が転写反応を阻害する効果があることも *in vitro* 転写反応を行い明らかにした。

研究分野：合成生物学

キーワード: 合成生物学 光ケージド化合物 人工ヌクレオシド三リン酸 DNA 結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

DNA 化学合成や試験管内タンパク質合成の進展に伴い、化学合成した遺伝子の試験管での転写・翻訳が可能になった。このような技術進歩を背景に、転写された RNA や翻訳されたタンパク質による遺伝子のフィードバック制御や、より複雑な DNA-RNA-タンパク質の協働現象などを、試験管内で定量的に解析する *in vitro* 遺伝子回路の研究が生命科学の新技术として注目されている。*in vitro* 遺伝子回路の研究をさらに推進するには、遺伝子発現を単純に追跡するだけではなく、「ある遺伝子の転写を急に停止すると系はどのように変化するか」、「活性化されていた遺伝子 A を急に不活性化し、同時に遺伝子 B を活性化するとどのようなタイムコースで系が変化するか」など、系に対する様々な摂動により生じるダイナミクスを解析し、より精密な数理モデルを構築することが次の課題である。しかし、遺伝子発現に摂動を加えるための技術は十分整備されておらず、手軽にかつ再現性良く遺伝子発現を外部から制御できる分子スイッチが必要であった。

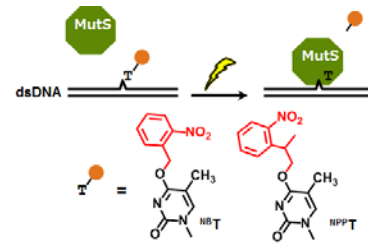
2. 研究の目的

本研究では遺伝子発現を外部から制御するための分子スイッチとして、照射により構造が変化するヌクレオシドユニットを導入された人工遺伝子を開発し、開発した人工遺伝子と遺伝子発現に関わるタンパク質との相互作用を制御することで遺伝子発現を制御することを考えた。

具体的には光で除去される保護基（光ケージ基）を利用して DNA-タンパク質相互作用を制御する独自技術を開発し、*in vitro* 遺伝子回路に任意のタイミングで、複数遺伝子を自在に On/OFF する摂動を導入するための光分子スイッチの基盤技術を開発することを目的とし研究を行った。

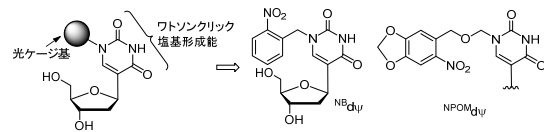
3. 研究の方法

①光ケージド DNA とミスマッチ結合タンパク質 MutS との結合制御と転写制御への応用
光ケージ基として 2-ニトロベンジル基(NB基) および 3-ニトロフェニルプロピル基(NPP基)を選択し、これらをチミジンの 4 位の酸素原子に導入した光ケージ基を導入したデオキシヌクレオシド ^{NB}T と ^{NPP}T 基を合成し DNA に化学合成方法により導入する。このようにして合成した光ケージド DNA に対するミスマッチ結合タンパク質 MutS の結合をゲルモビリティシフトアッセイにより評価し、照射により MutS の結合を制御できるか解析する。また、MutS の結合制御を利用して DNA からの転写反応を制御できるかどうかについても検討する。



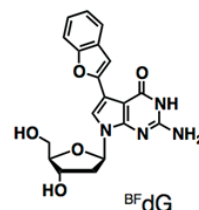
②光ケージドヌクレオシド三リン酸の DNA ポリメラーゼによる取り込みと転写制御への応用

上記①で開発した ^{NB}T および ^{NPP}T は化学合成法により DNA に合成するためのヌクレオシドユニットであったのに対し、それを補完する技術として、DNA ポリメラーゼなどの核酸合成酵素より DNA 中に取り込むことのできる新規ケージドヌクレオシドの開発を行うことにした。そのためのヌクレオシドとしてワトソクリック塩基対形成部位を保持し、かつ DNA に導入された際にメジャーグループ側に嵩高い基をもつよう光ケージドデオキシシユードウリジン(^{NB}dψ, ^{NPOM}dψ)を設計し、その合成と DNA 鎖への酵素的な取り込み反応を検討する。また、DNA 鎖中に導入した NB 基および NPOM 基が転写反応を阻害する効果があるかどうかについても *in vitro* 転写反応を行い検討した。



③DNA-タンパク質相互作用を検出する新規蛍光核酸の開発

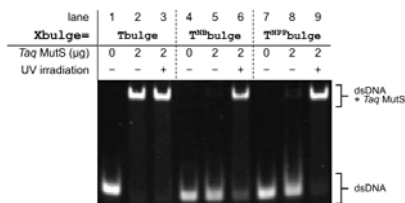
DNA とタンパク質の相互作用を制御するためには、試験管内や細胞内で DNA と DNA 結合タンパク質がどのように相互作用しているのかを検出するための技術があわせて必要である。そこで、DNA に導入することが可能で、かつ DNA がタンパク質と結合した時のみ強い蛍光を発する新規蛍光核酸を開発することを計画した。DNA 結合タンパク質の中には DNA のメジャーグループ側から結合するものが多いことを鑑み、プリン環の 7 位にベンゾフラン-2-イル基を有す 7-(ベンゾフラン-2-イル)-7-デアザデオキシグアノシン(^{BF}dG)を合成し、そのヌクレオシド状態での蛍光特性と種々の DNA 結合タンパク質との相互作用に伴う蛍光スペクトルの変化を評価した。



4. 研究成果

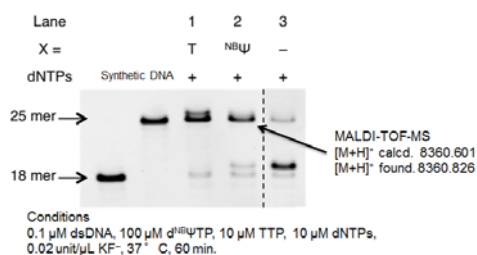
①光ケージド DNA とミスマッチ結合タンパク質 MutS との結合制御と転写制御への応用

^{NBT} および ^{NPP}T のホスホロアミダイトユニットを合成し、それを用いて光ケージ基を導入した DNA を合成した。合成した DNA に対する MutS の結合をゲルシフトアッセイで解析したところ、光ケージ基を有する DNA は MutS に全く結合しなかった。一方、光照射により光ケージ基を除去するとほぼ 100% MutS の結合が回復することが分かった。また、新たに T7 プロモーター配列を有する光ケージド DNA を合成し、その *in vitro* 転写反応を MutS の存在下で行ったところ、光ケージ基が存在する条件での転写効率を 100% とすると、光を照射して MutS の結合を誘導すると転写効率が約 70% まで低下することが分かった。以上の結果から、光ケージ基を有する人工 DNA を合成し、光照射により光ケージ基を除去することで、DNA 結合タンパク質の結合を誘導し、それを利用して転写反応を部分的に阻害することができることを明らかにした。



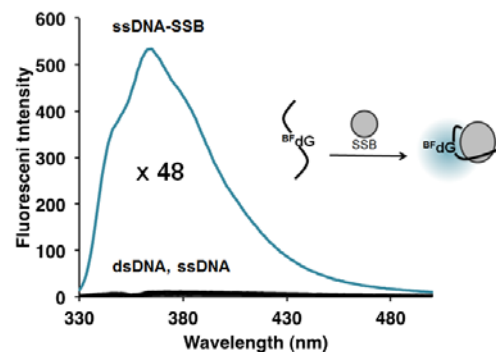
②光ケージドヌクレオシド三リン酸の DNA ポリメラーゼによる取り込みと転写制御への応用

^{NB}dψ のホスホロアミダイトユニットを合成し、それを用いておよび T7 プロモーター中に ^{NB}dψ を含む DNA を化学合成した。合成した DNA の T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応を検討したところ、^{NB}dψ を鋳型鎖に含む DNA の転写効率は低下し、光照射で NB 基を除去することで約 50% 転写効率が增强することが分かった。これにより、光ケージ基を DNA に導入することで、転写反応の光制御が可能になることが明らかになった。また、光ケージされた DNA を DNA ポリメラーゼ反応で合成するために、^{NB}dψ および ^{NPOM}dψ の三リン酸体を化学合成し、Klenow フラグメントによる DNA 鎖伸長反応を行った。その結果予想通り ^{NB}dψ および ^{NPOM}dψ を含む DNA を酵素合成することに成功した。



③DNA-タンパク質相互作用を検出する新規蛍光核酸の開発

^{BF}dG およびそのホスホロアミダイトを化学合成し、^{BF}dG を含む DNA を化学合成した。まず、^{BF}dG のヌクレオシドレベルでの蛍光特性を評価したところ、^{BF}dG はプロトン性溶媒中で消光し、非プロトン性溶媒中で蛍光強度が増大することが分かった。また、^{BF}dG を含む DNA の蛍光特性も評価したところ DNA 中では ^{BF}dG は周囲の核酸塩基との相互作用により消光することが分かった。一方、合成した DNA に一本鎖結合タンパク質(SSB)を添加したところ、^{BF}dG の蛍光は著しく増大し、最大で 48 倍増大することが分かった。これらの結果から、^{BF}dG は SSB などの DNA 結合タンパク質と DNA との相互作用を検出するための蛍光プローブとして用いることが分かった。



2.5 μM oligonucleotide, 7.5 μM SSB, 50 mM sodium phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.0, 10 °C, A₃₁₈, 318 nm.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Photo-controlled binding of MutS to photo-caged DNA duplexes incorporating 4-O-(2-nitrobenzyl) or 4-O-[2-(2-nitrophenyl)propyl]thymidine. (2016) Kohji Seio, Yurie Ohno, Kentaro Onho, Leo Takeshita, Takashi Kanamori, Yoshiaki Masaki. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26, 4861-4863. doi:10.1016/j.bmcl.2016.07.075.
2. 7-(Benzofuran-2-yl)-7-deazadeoxyguanosine as a fluorescence turn-ON probe for single-strand DNA binding protein. (2016) Munefumi Tokugawa, Yoshiaki Masaki, Jan Christian Canggadibrata, Kazuhei Kaneko, Takashi Shiozawa, Takashi Kanamori, Morten Grotli, L. Marcus Wilhelmsson, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. *Chemical Communications*, 52, 3809-3812. DOI10.1039/c5cc09700b.
3. Synthesis of responsive fluorescent nucleobases 7-(benzofuran-2-yl)-7-deazahypoxanthine and 7-(Benzofuran-2-yl)-7-deazaguanine using cross-coupling reaction. (2015)

Munefumi Tokugawa, Kazuhei Kaneko, Masanori Saito, Takashi Kanamori, Yoshiaki Masaki, Akihiro Ohkubo, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. *Chemistry Letters* 44, 64-66. doi:10.1246/cl.140879

4. Controlling the fluorescence of benzofuran-modified uracil residues in oligonucleotides by triple-helix formation. (2015) Takashi Kanamori, Hiroki Ohzeki, Akihiro Ohkubo, Mari Takahashi, Kengo Tsuda, Takuhiro Ito, Mikako Shirouzu, Kanako Kuwasako, Yutaka Muto, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. *ChemBioChem*, 16, 167-176. DOI:10.1002/cbic.201402346

〔学会発表〕(計5件)

1. DNA-タンパク質相互作用の光制御をめざした光ケージされたデオキシシユードウリジンを含む核酸の合成および性質 (2016) 竹下玲央 大野健太郎 正木慶昭 関根光雄 清尾康志 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 2016-03-27
2. Synthesis of oligonucleotides containing photo-caged 2' -deoxypseudo uridine for the regulation of DNA-protein interaction. (2015) Kentaro Ohno, Leo Takeshita, Yoshihiro Iijima, Takashi Kanamori, Yoshiaki Masaki, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. The 42th International symposium on nucleic acids chemistry I-messae hall, Himeji 2015-09-2
3. 光ケージドヌクレオシド三リン酸の合成と性質(2015)大野健太郎 正木慶昭 金森功吏 関根光雄 清尾康志 第17回日本RNA学会年会 ホテルライフオーソ札幌 2015-07-15 - 2015-07-16
4. 光分解性保護基を有するデオキシシユードウリジンの合成と性質(2015) 飯島良紘 竹下玲央 大野健太郎 金森功吏 正木慶昭 関根光雄 清尾康志 第95日本化学会 春季年会 日本大学船橋キャンパス 2015-03-26-2015-03-29
5. 光分解性保護基を有する核酸の合成および性質評価(2014) 大野百合恵 大野健太郎 金森功吏 正木慶昭 大窪章 寛 関根光雄 清尾康志 第16回日本RNA学会年会 名古屋市・ウインクあいち 2014-07-23 - 2014-07-25

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.skn.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清尾 康志 (Seio, Kohji)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：20313356

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：B01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119701

研究課題名（和文）人工細胞開発のための機能的膜タンパク質試験管内合成システムの構築

研究課題名（英語）

研究代表者

西山賢一（Ken-ichi Nishiyama） 岩手大学・農学部・教授

連携研究者

島本啓子（Keiko Shimamoto） 公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究
所・主幹研究員

徳田元（Hajime Tokuda） 盛岡大学・栄養科学部・教授

研究成果の概要

合成生物学の究極の目的は、人工的に細胞を作製し、それが自己複製能力をもつことであると言える。人工的なリボソームに生体膜のような自己合成能を付与することができれば、人工細胞作製の大きな一歩となる。膜タンパク質は生合成に共役して膜挿入するが、その際いくつかの膜挿入因子の協調的作用が必要となる。我々はタンパク質膜挿入に必須の糖脂質 **MPIase** を発見し、*in vivo* の反応を忠実に反映したタンパク質膜挿入反応の再構成系の構築を完了した。リン脂質生合成に関わる **CdsA** タンパク質が **MPIase** 生合成にも関与することが明らかとなった。**CdsA** はシグナル認識粒子 **SRP** や膜透過チャンネル **SecYEG** に依存して膜挿入する膜タンパク質である。**CdsA** を膜挿入可能なプロテオリポソーム存在下で試験管内合成させると、**MPIase** 生合成中間体の精製が認められた。この結果は試験管内で合成した **CdsA** が機能的なタンパク質として膜挿入したことを示している。さらに、**FOF1-ATPase** の *c* サブユニット (**F0-c**) も **MPIase** に依存して膜挿入し、高次構造を形成することを明らかにした。これらのことから、我々の再構成系で機能的な膜タンパク質を合成できることが確認された。現在、膜挿入に必要な因子を再構成したプロテオリポソームにタンパク質合成系を封入することを試みている。このプロテオリポソームはもっとも単純な人工細胞といえるものと考えられる。

研究分野：合成生物学

キーワード：人工細胞 タンパク質膜挿入 リボソーム **MPIase**

1. 研究開始当初の背景

細胞は脂質二重膜により形成される生体膜によって外界と区別されている。生体膜は物質の取り込み・排出や情報のやりとりを行うだけでなく、細胞分裂の際には生体膜自身を生成したり分裂させたりする。合成生物学の究極の目的は、人工的に細胞を作製し、それが自己複製能力をもつことであると言える。代謝回路や遺伝子回路のクロストークについてはすでに多くの研究が蓄積されている一方、生体膜のバイオジェネシスについては不明な点が多く残されている。リポソームのような人工膜と生体膜の大きな違いは、自己合成能の有無であると言っても過言ではない。そのため、人工的なリポソームに生体膜のような自己合成能を付与することができれば、人工細胞作製の大きな一歩となる。単に脂質合成酵素などをリポソームに組み込んだ場合、一過的に膜の合成が観察することができるかもしれないが、合成に伴い合成酵素も希釈されてくるため、これらも恒常的に供給する必要がある。

多くの脂質合成酵素等は膜内在性タンパク質である。膜タンパク質は、その生合成に伴い膜挿入するが、その際いくつかの膜挿入因子の協調的作用が必要となる。具体的には、合成途中の膜タンパク質がSRP (シグナル認識粒子) により認識され、SR (SRP受容体) を介して膜上にターゲットされる。その後、タンパク質膜透過チャンネル (真核生物ではSec61、バクテリアではSecYEG) において膜挿入が進行する。膜挿入中は膜シャペロンTRAM (真核生物) やYidC (バクテリア) の作用を受け機能をもつ膜タンパク質が発現すると考えられている。SRPは合成途中の膜タンパク質とのみ結合するため、膜タンパク質のサイズが小さい場合、また膜貫通領域がC末端にある場合は、SRPだけでなくSec因子も利用することができなくなる。この経路では、我々が発見した糖脂質MPIase

(Membrane Protein Integrase) (図1) が作用する。MPIaseはSec依存の経路でも作用する。これらの経路については、我々が再構成系を構築し報告している。これらの再構成系では、膜挿入したタンパク質は膜により保護されるため、プロテアーゼ消化されない断片(MPF; membrane protected fragment) が出現することを指標として解析されている。そのため、膜挿入したタンパク質が実際に高次構造を形成し、酵素活性をはじめとした機能が発現しているかどうかは全くの不明である。

再構成系構築でもう一つ問題になるのは、多くの膜タンパク質が人工的なリポソーム膜に自発的に膜挿入する点である。膜タンパ

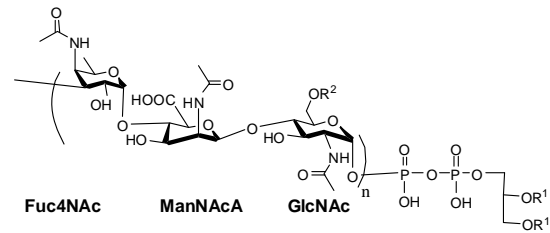


図1 MPIase の構造。nは9~11の整数、R¹は炭素鎖16~20の飽和/不飽和脂肪酸残基、R²は水素原子またはアセチル基である。また、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、ManNAcAはN-アセチルマンノサミンウロン酸、Fuc4NAcは4-N-アセチルアミノフコースを示す。

ク質によっては自発的膜挿入で十分機能発現が達成される場合もあるかもしれない。しかし、生体膜では無秩序な自発的膜挿入はまったく起こらないうえ、人工細胞作製を視野に入れた場合、発現させる膜タンパク質は*in vivo*の条件により近い形で膜挿入することが望ましい。我々は生体膜構成因子ジアシルグリセロール(DAG)をリポソームに生理的濃度添加することにより自発的膜挿入が完全に抑制されることを見出し、このことがMPIase発見につながった。

2. 研究の目的

本研究では、人工細胞作製を視野に入れた、汎用的な試験管内タンパク質膜挿入システムを構築することを第一の目的とし、さらにはこれらの膜挿入システムをリポソーム内に封入して作動させることを第二の目的とする。まず、膜挿入完全再構成系の確立を目指す。現在明らかになっている因子(SecYEG、MPIase、YidC、SRPなど)をリポソームに再構成し、プロテアーゼ消化によるMPF出現を指標として、タンパク質膜挿入因子が効率の良く進行する条件を検討する。その上で、MtlA(マンニトールパーミアーゼ)、LacY(ラクトースキャリア)、SecG、F₀F₁-ATPaseのcサブユニットなど、膜挿入したタンパク質が酵素活性を発現するかどうか、あるいはオリゴマー構造を形成しているかどうか調べる。活性発現、オリゴマー形成が観察されなかった場合は、必要な新因子を探索する。続いて、膜タンパク質合成システムのリポソーム内への封入を試みる。タンパク質膜挿入の完全再構成系確立後、この系をリポソーム内部に組み込む条件検討を行い、人工細胞作製の基本的な知見を得る。さらに、上記成果を踏まえて、MPIase生合成の再構成を行う。MPIaseは複数の生合成遺伝子の作用により生合成されると考えられる。これらの遺伝子も同定でき次第、試験管内で発現させ、試験管内MPIase生合成を試みる。

3. 研究の方法

人工細胞作製を見据えた試験管内機能的

膜タンパク質合成システム確立のため、以下の研究を実施する。

①タンパク質膜挿入完全再構成系の確立

現在明らかになっている因子をリポソームに再構成し、プロテアーゼ消化による膜挿入断片の出現を指標として、タンパク質膜挿入因子が効率の良く進行する条件を検討する。その上で、MtlA、LacY、SecE、F₀F₁-ATPase の c サブユニット (Foc)、DgkA など、膜挿入したタンパク質が酵素活性を発現するかどうか、あるいはオリゴマー構造を形成しているかどうか調べる。さらに、シグナルペプチダーゼ発現による分泌タンパク質のプロセッシングやリポタンパク質の成熟体化の再構成も行う。膜タンパク質の活性発現、オリゴマー形成が観察されなかった場合は、必要な新因子を探索する。

②機能的膜タンパク質合成システムのリポソームへの封入

①の研究では、タンパク質合成はリポソームの外側で起こり、細胞における反応とは反対の方向である。そのため、タンパク質合成系をリポソームの内部に封入する必要がある。機能的膜タンパク質合成システムをリポソーム内部への封入の検討を行う。

③MPIase の生合成の再構成

MPIase は糖脂質であるため多くの酵素の作用によって生合成されていると考えられる。MPIase 生合成酵素群の試験管内発現系の確立のため、同定された MPIase 生合成遺伝子をこのシステムで発現させる。この実験は、MPIase を生合成できるリポソームの構築につながり、ひいては人工細胞作成の足がかりになると考えられる。

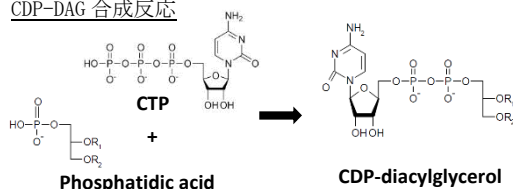
4. 研究成果

①MPIase の機能解析

MPIase (図1) はタンパク質膜挿入に必須の因子として再構成系を用いて同定した糖脂質である。一方、YidC はタンパク質膜挿入反応への関与を示す報告が数多くなされている半面、再構成系でその機能を示した報告はなされていなかった。再構成で詳しく MPIase と YidC の作用を解析したところ、基質膜タンパク質の量が十分多く、MPIase と YidC が共存した場合、膜挿入活性が MPIase 単独のときより 3 倍程度促進されていることが明らかとなった。これらの実験結果から、MPIase が膜挿入初期段階で機能し、その後 YidC 機能により膜挿入が完了するモデルが考えられる。基質が少ないときは MPIase だけで十分な膜挿入活性が検出できるが、MPIase の作用後に YidC に効率よく膜タンパク質が受け渡されると、再度反応開始可能な MPIase 分子が増加するため膜挿入活性が促進されたと考えられる。

Foc の膜挿入に関しても MPIase 依存で進行し、YidC により促進を受けることが判明した。Foc は MPIase と相互作用できず、酸性リン脂質と相互作用したときは、膜挿入の有無にかかわらずプロテアーゼ耐性の構造を取ることが明らかとなった。Foc 膜挿入にかかわる多くの矛盾点が本研究により解決した。

CDP-DAG 合成反応



予想される MPIase 中間体合成反応

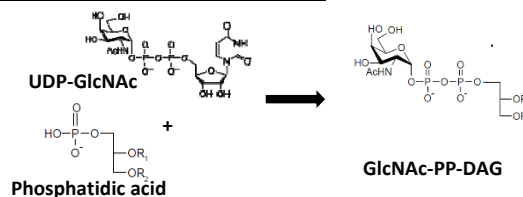


図2 予想される MPIase 生合成反応(下段)と CDP-diacylglycerol 生合成反応(上段)。

②MPIase の生合成酵素の同定

MPIase の構造を元に MPIase の生合成経路を推定した(図2)。UDP-GlcNAc とフォスファチジン酸 (PA) に大腸菌膜画分とを混合すると、MPIase 生合成中間体と考えられる物質 (GlcNAc-PP-DAG) が検出された。この活性を指標に精製を進めたところ、機能未知な YnbB が同定された。YnbB はリン脂質合成にかかわる CDP-DAG 生合成酵素、CdsA と相同的である。YnbB や CdsA がこの反応を触媒することを確認するため、試験管内で CdsA を合成し、リポソームに膜挿入させたところ、UDP-GlcNAc や PA に依存して GlcNAc-PP-DAG の生成が確認された。

ynbB と *cdsA* 遺伝子を破壊したところ、MPIase の枯渇が確認された。この条件では、タンパク質膜挿入反応がまったく進行しなくなっていた。したがって、MPIase は *in vivo* でも再構成系と同様、膜挿入反応を触媒していることが明らかとなった。

③同じ領域内の計画研究、公募研究との共同研究

車班とは CdsA の試験管内合成やタンパク質生合成システムのリポソーム内への封入に関して共同研究を続行している。CdsA の試験管内生合成に関しては、現在論文準備中である。タンパク質生合成システムのリポソーム内への封入に関しては、研究期間終了後も改良を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

- ① Nishikawa, H., Sasaki, M., Nishiyama, K., Membrane insertion of F0 c subunit of FOF1 ATPase depends on glycolipozyme MPIase and is stimulated by YidC, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 487, 477-482 (2017)
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.095
- ② Nishiyama, K. and Tokuda, H., Novel translocation intermediate allows re-evaluation of roles of ATP, proton motive force and SecE at the late stage of preprotein translocation, *Gene Cells*, 査読有, 21, 1353-1364 (2016)
doi: 10.1111/gtc.12447
- ③ Endo, Y. and Nishiyama, K., Relationship between glycolipozyme MPIase and components comprising the protein transport machinery, *Med. Res. Arch.*, 査読有, 2, No 11, 1-24 (2015)
<http://journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/403/260>
- ④ Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A.D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T. and Nureki, O., Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC, *Nature*, 査読有, 509, 516-520 (2014)
doi:10.1038/nature13167
- ⑤ Nishiyama, K. and Shimamoto, K., Glycolipozyme Membrane Protein Integrase (MPIase): Recent Data, *Biomol. Concepts*, 査読有, 5, 429-438 (2014)
doi: 10.1515/bmc-2014-0030

この他 5 報の論文を発表しております。

〔学会発表〕 (計 37 件)

- ① 西山賢一、タンパク質膜挿入に関わる糖脂質酵素 MPIase の作用原理の解明とその応用、第 16 回酵素応用シンポジウム研究奨励賞受賞講演 (天野エンザイム)、2015 年 6 月 12 日、招待講演 (愛知県・北名古屋市)
- ② 西山賢一、前田 将秀、Moser Michael、楠本 正一、徳田 元、タンパク質膜挿入・膜透過に関与する糖脂質酵素 (Glycolipozyme)MPIase の構造と機能、日本農芸化学会大会 2015 大会、2015 年 3 月 26 日~29 日、招待講演 (岡山県・岡山市)
- ③ Ken-ichi Nishiyama, Reconstitution of preprotein translocation across and membrane protein integration into the

cytoplasmic membrane of E. coli, 「細胞を創る」研究会 7.0、2014 年 11 月 14 日~14 日、招待講演 (東京都・文京区)

この他、34 件の学会発表を行っております。

〔その他〕

ホームページ等

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~sec/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 賢一 (NISHIYAMA, Ken-ichi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80291334

(2) 連携研究者

島本 啓子 (SHIMAMOTO, Keiko)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生

物有機科学研究所・主幹研究員

研究者番号：70235638

徳田 元 (TOKUDA, Hajime)

盛岡大学・栄養科学部・教授

研究者番号：40125943

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：B01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119707

研究課題名（和文）無細胞系ナノ構造化生物機能システムの開発

研究課題名（英語）Construction of nanostructured bio-systems by cell-free reactions.

研究代表者

中野秀雄（Hideo Nakano） 名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

連携研究者

兒島孝明（Takaaki Kojima） 名古屋大学・大学院生命農学研究科・講師

研究成果の概要

水/油エマルジョンを用いた pL スケールでの極微細空間中で、マイクロビーズ上に固定した、一分子 DNA の増幅、転写、翻訳反応、さらにはタンパク質の整列化までが可能なシステム開発を行った。この技術は、生細胞を全く用いず、膨大な数の DNA, RNA、タンパク質分子を様々な形でビーズ上に提示させ、多様な分子スクリーニングを可能にする技術である。エマルジョンの微小空間中で、セントラルドグマを人工的に再構築した、合成生物システムともいえる。本システムを用いることで、様々な機能を有する分子、および複合体の選別を、セルソーターを利用することで、1 時間当たり 10^8 分子種の解析と選別が可能であり、新機能分子の探索の強力なツールになる。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 エマルジョン 一分子 PCR 無細胞タンパク質合成系 タンパク質整列化技術

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の最終的なゴールの一つとして、「人工細胞」があげられる。すなわち物質移動が制限された閉じられた微細空間中で、様々な生物機能を再構成し、生物現象を理解するとともに、それを利用した工学的研究である。

生物の基幹的機能としては、セントラルドグマが有る。遺伝情報の複製、転写、翻訳を通じ、DNA に刻まれた情報が、RNA、タンパク質として発現され、それらが機能分子のとなり様々な生物現象を担っているのである。一方でこのような微細空間としてエマルジョン以外にも、リポソームを用いた例も報告され、世界的に非常に注目されている研究分野の一つである。

2. 研究の目的

我々の研究目的は、エマルジョンの極微小空間中で、ビーズ上に DNA ライブラリーを構築し、その DNA から無細胞タンパク質合成系により転写・翻訳して同じビーズ上にタンパク質を提示する手法は、様々なタンパク質機能向上に用いることができる。

そこで我々はタンパク質提示の足場として DNA を使い、標的としている酵素や基質をナノレベルで制御された位置に配置することで、多様な産業用酵素の「実基質」を使用可能なアッセイ系をビーズ上で構築できるシステムを想起し、Enzyme-TRAIN :Enzyme Tandem Reaction Arrangement Initiated by Nucleic acid と名づけた。その概略を図1に示す。D アミノ酸オキシダーゼ (DAO) を例として示している。この場合 DAO が D アミノ酸と反応すると生じる過酸化水素と、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) が反応し、もう一つの基質であるピオチン化チラミドをラジカル化した結果、近傍の Tyr に結合することで、DAO の活性に応じてセルソーターによるスクリーニングが可能である。

このシステムは、HRP やラッカーゼ、マンガンペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ酵素、グルコースオキシダーゼなどの過酸

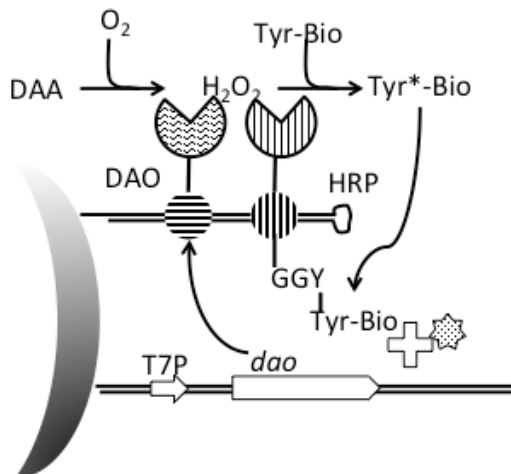


図1 ENZYME-TRAIN の概念図

化水素を生じる酵素だけでなく、例えばアルコールオキシダーゼを加えることで、リパーゼの活性測定も可能になる。このように Enzyme-TRAIN は非常に多くの酵素群に対して、「実基質」に対するアッセイシステムが構築できる、非常に汎用性の高くかつ10の9乗レベルのライブラリーサイズに対してスクリーニング可能な、これまでに無いシステムである

3. 研究の方法

①フローフォーカシング技術を用いた均一なエマルジョン液滴の調製法の開発

無細胞タンパク質合成系に代表される in vitro 反応系は、生体分子ライブラリーの迅速な構築とスクリーニングを可能とする反面、反応あたりのコストが生細胞の系に比べ著しく高い。この解決策として、スクリーニングの低コスト化、高集積化を目的として、W/O エマルジョン液滴を用いた微小スケールの in vitro 反応系がこれまでに考案されている。しかしながら、攪拌機を用いた従来のエマルジョン調製法では均一な液滴形成が困難である為、均一なライブラリーを構築する上でこれは大きな障害であった。そこで我々は、流体力学的な液滴作製技術の一種、フローフォーカシング技術を用い、均一なエマルジョン液滴の簡便に調製を可能とするジェットタイプ、キャピラリータイプ、2種類のデバイスの構築を行った。さらにこのデバイスを用いて、in vitro 転写反応および無細胞タンパク質合成反応を行い、その有用性を検証した。

②西洋ワサビペルオキシダーゼのディスプレイシステムの開発

過酸化水素を基質として様々な化合物の酸化反応を触媒する西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) アイソザイム C1a は、ファインケミカル合成、医療診断、バイオリミディエーション等の分野で広く利用されている産業用酵素の一つである。ビーズディスプレイ法は、本研究室で開発されたエマルジョン PCR と無細胞タンパク質合成系を組み合わせた in vitro タンパク質スクリーニングシステムである。このビーズディスプレイ法を用いて HRP C1a を含むペルオキシダーゼの新規ハイスループットスクリーニングシステムの構築を目指した。

③複数タンパク質の DNA 上への精密配置システムの開発

また2種類の DNA 結合タンパク質を用いて、トランスグルタミナーゼの基質および酵素を DNA 上にタンデムに配置するシステム開発を行った。

4. 研究成果

①フローフォーカシング技術を用いた均一なエマルジョン液滴の調製法の開発

市販の部品のみで構築可能である。上記2種

類のデバイスを用いて W/O エマルジョン液滴を作製したところ、攪拌機を用いた従来のエマルジョン液滴調製法に比べ、いずれのタイプにおいても極めて均一な液滴調製が迅速に調製できることが示された。

次に上記キャピラリータイプデバイスを、リガーゼリボザイムとエマルジョン液滴を用いた *in vitro* 転写活性解析法に応用した。調製されたエマルジョン液滴中でリガーゼリボザイムは T7 プロモーターを認識した T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応によって発現し、ビオチン化基質 RNA を介して同一ビーズ上に固定化される。このビーズに対して蛍光標識プライマーを用いた逆転写反応によって蛍光標識を施し、転写活性をフローサイトメトリーによって解析したところ、攪拌機を用いた場合の CV 値が 39 を示したのに対し、デバイスを用いた場合は 29.7 であった。

上記ジェットタイプデバイスを W/O エマルジョン中無細胞タンパク質合成系への応用を試みた。ラムダファージ由来の転写因子 Cro 二量体をリンカーによって融合された single chain Cro (scCro) はその結合コンセンサス配列 OR consensus DNA (ORC) と非常に強固な複合体を形成する。この scCro 遺伝子を T7 プロモーター、SD 配列および T7 ターミネーターを保持する鋳型 DNA としてマイクロビーズ上に固定化し、無細胞タンパク質反応溶液とともにジェットタイプデバイスを用いて W/O エマルジョン液滴中に封入した。調製されたエマルジョン液滴中の無細胞タンパク質合成により scCro が発現し、発現した scCro は ORC をあらかじめ固定化した自身のマイクロビーズ上に固定化される。このビーズ複合体を回収し、scCro 固定化量をフローサイトメトリーによって解析したところ、攪拌機を用いた場合の CV 値が 59.4 であったのに対し、デバイスを用いた場合 42.3 であった。以上の結果から、本デバイスが均一な微小 *in vitro* 生化学反応系の構築に大きな力を発揮することが示された。

② 西洋ワサビペルオキシダーゼのディスプレイシステムの開発

ジスルフィド結合を保持する HRP C1a は組み換えタンパク質として発現することが困難とされている。そこでまず、無細胞タンパク質合成系を用いた HRP C1a の発現条件の最適化を試みた。ジスルフィド結合の架け替えを触媒する DsbC の添加、ヘミン、カルシウムイオン濃度及び反応温度について詳細な検討を行い、可溶性画分に HRP を高効率に発現させる条件の確立に成功した。

次にフローサイトメトリーを用いたマイクロビーズ上での HRP 活性解析法を検討した。チラミドは、ペルオキシダーゼの作用により近傍のチロシンなどの芳香族アミノ酸残基に共有結合する化合物である。HRP C1a をマイクロビーズ上に固定化し、このチラミドに

蛍光標識を施したフルオレセインチラミドを基質としてマイクロビーズ上で反応を行った。フローサイトメトリーを用いてビーズ複合体の蛍光強度を解析したところ、HRP C1a を固定化したビーズ複合体でのみ、優位な蛍光シグナルが観察された。

また、DNA 結合タンパク質を介した HRP C1a をマイクロビーズ上により安定に固定化する手法を検討した。①で使用した scCro と HRP C1a の融合タンパク質を無細胞タンパク質合成系によって発現させたところ、scCro を HRP C1a の N 末端、C 末端いずれに付加した場合においても、その可溶性発現量の著しい改善が見られた。次に、これら scCro 融合 HRP C1a を無細胞タンパク質合成系によって発現し、ORC を予め固定化したマイクロビーズと混合することでこれを固定化した。ビオチン化チラミドを基質として HRP アッセイを行い、Cy5-ストレプトアビジンを用いて蛍光標識を施した後、フローサイトメトリーを用いてビーズ複合体の蛍光強度を解析した。その結果、scCro を HRP の N 末端、C 末端いずれに付加した場合においても、有意な HRP 活性が検出された。

さらに、C 末端に scCro を保持する活性型 HRP 及び非活性型 HRP を無細胞タンパク質合成系によって発現し、ORC を介してマイクロビーズ上で固定化した後、HRP アッセイを行い、FACS を用いて蛍光を有するビーズ複合体を分取した。PCR によってビーズ上に固定化した DNA を回収し、その解析を行ったところ、活性型 HRP 遺伝子の有意な濃縮が確認された。

③ 複数タンパク質の DNA 上への精密配置システムの開発

TG のビーズディスプレイ法への応用を志向して、その要素技術である scCro タグの評価を行った。

scCro タグは野生型 scCro (以下 scCro) と変異型 scCro (以下 scCroM) を用いた。まず、それぞれの DNA 結合領域 ORC、mORC を設計し、BioLayer Interferometry (BLI) 法による分子間相互作用解析装置によって見かけの親和性を測定した。さらに、ORC 及び mORC をタンデムに配置した DNA リガンドを設計し、これに対する scCro 及び scCroM の結合を解析したところ、両アナライトが 25 nM の条件下において、それぞれの結合領域に対する選択的な結合が確認された。この結果から scCro 及び scCroM を DNA 結合タグとして適切に用いることにより、任意の蛋白質を空間的に配置できることが示唆された。

次に、scCro タグを用いたビーズディスプレイ上での TG 活性の解析系を二種類デザインした。TG とそのグルタミン側基質ペプチド、さらに scCroM タグを融合した蛋白質 scCroM-TG-T26 を構築し、1 分子によるビーズ上 TG 酵素活性を測定した。

scCro タグとグルタミン側基質 ペプチド

T26 の融合蛋白質 scCro-T26、scCroM タグと TG の融合蛋白質 scCroM-TG の二種類を構築し、これらの両蛋白質をビーズ上に固定し、TG 酵素活性を測定した。それぞれのビーズ複合体についてフローサイトメーターを用いた解析を行ったところ、いずれのビーズにおいても TG 活性を示す有意なシグナルが検出された。

以上より DNA を足場としたタンパク質の精密空間配置系を開発することに成功したといえる。

5. 主な発表論文等

- ① Kojima, T., Mizoguchi, T., Ota, E., Hata, J., Homma, K., Zhu, B., Hitomi, K., and Nakano, H. (2016) Immobilization of proteins onto microbeads using a DNA binding tag for enzymatic assays. *J. Biosci. Bioeng.* 121, 147-153.
- ② Murzabaev, M., Kojima, T., Mizoguchi, T., Kobayashi, I., DeKosky, B. J., Georgiou, G., and Nakano, H. (2016) Handmade microfluidic device for biochemical applications in emulsion. *J. Biosci. Bioeng.* 121, 471-476.
- ③ Zhu, B., Mizoguchi, T., Kojima, T., and Nakano, H. (2015) Ultra-High-Throughput Screening of an In Vitro-Synthesized Horseradish Peroxidase Displayed on Microbeads Using Cell Sorter. *PLOS ONE* 10, e0127479.
- ④ Kojima, T., Zhu, B., and Nakano, H. (2015) Construction of a DNA library on microbeads using whole genome amplification. *Whole Genome Amplification, Methods in Molecular Biology*, T. Kroneis (ed.) 1347, 87-100.
- ⑤ Ninomiya, R., Zhu, B., Kojima, T., Iwasaki, Y., and Nakano, H. (2014) Role of disulfide bond isomerase DsbC, calcium ions, and hemin in cell-free protein synthesis of active manganese peroxidase isolated from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 652-657.
- ⑥ 兒島孝明、中野秀雄 (2014) 「超微細生化学反応系」技術の最前線 *化学と生物* 52, 159-165.
- ⑦ 兒島孝明、中野秀雄 (2014) ビーズディスプレイ法を用いた DNA-転写因子間相互作用のハイスループット解析 *バイオサイエンスとインダストリー* 72, 306-308.
〔学会発表〕(計 12 件)
- ① M. Musabaev, I. Kobayashi, T. Kojima, H. Nakano, : In vitro transcription/translation in emulsion produced by a simple flow-focusing device, 249th ACS Meeting & Exposition (2015)
- ② B. Zhu, T. Mizoguchi, T. Kojima, H. Nakano. : In vitro synthesis of horseradish peroxidase with DNA binding tag and its

fluorogenic assay for bead display-based ultra-high-throughput screening. Japan-Italy Joint Symposium. (2014)

③ H. Nakano, E. Ota, B. Zhu, T. Kojima. : Bead display of heme enzymes for function-based high-throughput screening. Japan-Italy Joint Symposium. Nov, (2014)

④ B. ZHU, T. MIZOGUCHI, T. KOJIMA, Y. IWASAKI, H. NAKANO: Cell-free synthesis of horseradish peroxidase and single-chain lambda Cro repressor fusion protein for bead display-based high-throughput screening. 日本生物工学会 66 回大会 (2014)

⑤ M. MURZABAEV, T. KOJIMA, I. KOBAYASHI, H. NAKANO: A simple flow-focusing device for high-throughput applications in emulsion. 日本生物工学会 66 回大会, (2014)

⑥ B. Zhu, T. Mizoguchi, T. Kojima, Y. Iwasaki and H. Nakano. : Cell-free Synthesis of Horseradish Peroxidase and Single-chain Lambda Cro Repressor Fusion Protein for Bead Display-based High-throughput Screening. The 7th International Congress on Biocatalysis 2014. August, 2014. Hamburg, Germany.

⑦ B. Zhu, T. Mizoguchi, T. Kojima, and H. Nakano. : Cell-free Synthesis of Horseradish Peroxidase and Single-chain Lambda Cro Repressor Fusion Protein for Bead Display-based High-throughput Screening. 71st Semi-annual Meeting of the Japanese Society of Enzyme Engineering, April 2014, Fukuoka

この他、4 件の学会発表を行っております。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 秀雄 (NAKANO, Hideo)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号 : 00237348

(2) 連携研究者

兒島 孝明 (KOJIMA, Takaaki)
名古屋大学・生命農学研究科・講師
研究者番号 : 40509080

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：B01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119710

研究課題名（和文）DNA 塩基置換酵素の“逆進化”誘導による DNA を切らないゲノム編集ツールの開発

研究課題名（英語）Development of non-cleaving genome editing tool by reverse-evolution of DNA base-exchanging enzymes

研究代表者

西田敬二（Keiji Nishida） 神戸大学大学院・科学技術イノベーション研究科・教授

研究分担者

なし

研究成果の概要

ゲノム情報を生きた細胞のなかで操作することが出来る技術は、「創って解析する・利用する生物学にとって基盤となる合成生物学技術である。本研究の目的は塩基変換反応を利用して染色体を切断せずに直接ゲノム DNA 配列情報を書き換える技術を開発・高度化することである。具体的には DNA 塩基変換酵素として、塩基の脱アミノ化反応を行う酵素（デアミナーゼ）を DNA 配列認識モジュールと結合させて至適化した人工酵素を開発し（Target-AID）、実際にそのゲノム編集技術としての有効性を実証した。ヌクレアーゼ活性を除いた CRISPR/Cas9 を配列認識モジュールとして利用すると、標的配列内の 4 塩基程度の範囲内の Cytosine に高効率に点変異を導入することが出来た、複数の異なる遺伝子標的に対しても同時に効率よく、また毒性なく変異導入することが出来た。これまでに発芽酵母、大腸菌、動物細胞、植物での有効性を確認することが出来ており、基本的にどのような生物材料でも適用が可能な汎用性ゲノム編集ツールの開発を行うことが出来た。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 ゲノム編集、CRISPR-Cas9、Target-AID

1. 研究開始当初の背景

細胞内の遺伝子回路ないしゲノムの配列を効率よく書き換えることができる技術は、本領域の「創って解析する・利用する生物学」の基盤となる技術である。動物細胞や高等植物細胞などでは相同組み換えによる遺伝子操作が困難であり特にES細胞やiPS細胞などでの基礎研究から遺伝子治療の現場において、高効率で正確かつ毒性の少ないゲノム編集ツールに対するニーズが非常に高まっている。

細胞内で直接ゲノム編集できるツールとしては近年開発されたZFN、TALEN、CRISPRなどが挙げられる(総説; Gaj et al, Trends Biotechnol. 2013)。これらの技術はいずれも標的となるDNA配列を認識するようデザインすることが可能で、基本的にはその部位でDNA二重鎖を切断し(図1)、その後宿主細胞が修復する過程で配列の変換を期待するものである。ES細胞やiPS細胞なども含めた幅広い応用が期待されている一方で、共通する問題としては必ずしも期待通りの配列変換にならないこと、そしてやはり染色体を切断してしまうことの毒性の強さがある。

この問題に対して私はDNA脱アミノ化酵素(Deaminase)を用いることで、“DNAを切らないゲノム編集”が可能であると着想した。Deaminaseは核酸塩基の特定の部位を脱アミノ化して異なる塩基として認識させるので結果として塩基置換を引き起こす(図2)。自然界においては抗体分子の多様性を産み出す体細胞超変異を担うActivation-induced deaminase (AID)などが存在する。しかしこのようなDeaminaseはそのまま異所的に発現させても活性が低く、これまで応用化は実現してこなかった。AIDのファミリーは免疫系を備えた脊椎動物以上に見られるが、興味深いことに最も原始的な形質を残すと考えられるヤツメウナギのPmCDAが最大の活性を示すことが報告されている。進化の過程でゲノムへの無秩序な変異導入を避けるようDeaminaseが厳しい制御を加えられてきたであろうことは想像に難くない。私はDeaminaseの進化を遡るように既存の制御から解放し、さらに人工的な配列認識能を賦与することで特定の塩基を書き換える新奇の人工酵素を産み出すことが可能であると考えた。

2. 研究の目的

革新的な合成生物学的基盤技術として“DNAを切らないゲノム編集”および“人工的遺伝子超変異”を可能とする人工酵素ツールを開発・提供して、我が国の合成生物学の飛躍的な発展を牽引すること、さらには合成生物学と進化デザインが融合した“合成進化生物学”ともいべき新たな分野の先駆けとなることを目的とする。

具体的には、まずDNA脱アミノ化酵素(Deaminase)を素材として、DNA塩基置換酵素の“逆進化”誘導による活性化によって強力で自由自在に操ることができる人工酵素を創り出し、同時に自然界の重要なDeaminase制御機構についても明らかとする。それと並行しながらDeaminaseにDNA配列認識能を移植して人工的に制御する配列認識モジュールの結合による“切らないゲノム編集”を実現する。iPS細胞やES細胞への応用も期待すべき波及効果の大きな新たなゲノム編集ツールとして広く社会・国民への還元を果たす。さらに挑戦的な課題としてDeaminaseの特定転写装置への結合による人工的遺伝子超変異の実現においては細胞内で特定遺伝子領域のみの超変異を引き起こすという、従来の進化学および生命進化の限界を凌駕する人工進化ツールを創り出す。以上が具体的な目標である。

3. 研究の方法

ゲノム情報を生きた細胞の中で操作することができる技術は「創って解析する・利用する生物学」にとって基盤となる合成生物学的技術である。本研究の目的は塩基置換反応を利用して染色体を切断せずに直接ゲノムDNA配列情報を書き換える技術を、進化的なアプローチを導入して高度化することである。そのため、DNA塩基の変換反応を触媒する機能ドメインを選び出し、DNA配列認識モジュールと結合させて至適化した人工酵素遺伝子コンストラクトを作成して出芽酵母内において発現させ、そのゲノム編集技術の有効性を検証した(右図参照)。具体的にはDNA塩基置換酵素としてDNA塩基の脱アミノ化反応を行うものに着目して、ヒト由来のActivation-induced cytidine deaminase (AID)、そして脊椎動物として最も原始的とされるヤツメウナギ由来のPmCDA1、また本来はRNA編集酵素であるウニ由来のAdenosine deaminase:ADAR2などを候補とした。DNA配列認識モジュールとしては、Talエフェクター、改変T7 RNA polymerase、ヌクレアーゼ活性を除いたCRISPR/Cas9などを試験した。結合様式としてペプチドリンカー融合タンパク質およびタンパク質相互作用ドメインとしてSH3ドメインを採用した。これらの組み合わせを検討し、PmCDA1とCas9を用いたものが、標的とした遺伝子への特異的な変異導入活性を示すことが明らかとなった(右図)。標的配列内の4塩基程度の範囲内のCytosineに高効率に点変異を導入することが出来た。複数の異なる遺伝子標的に対しても同時に

効率よく、また毒性なく変異導入することが出来た。これまでに原核生物から真核生物まで幅広く有効性を確認することが出来、汎用的なゲノム編集技術としての確立することが出来た。また領域内共同研究として、公募研究 C01 の課題「人工代謝経路のスクープの拡張」との連携により、全ゲノムの非変異を次世代シーケンサー解析によって所得し、より包括的な変異導入パターンを明らかとした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A. (2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol.* May;35(5):441-443. doi: 10.1038/nbt.3833. Epub 2017 Mar 27. (査読有)
- ② Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* Sep 16;353(6305). pii: aaf8729. doi: 10.1126/science.aaf8729. (2016) (査読有)
- ③ Ye X, Morikawa K, Ho SH, Araki M, Nishida K, Hasunuma T, Hara KY, Kondo A. (2015) Evaluation of genes involved in oxidative phosphorylation in yeast by developing a simple and rapid method to measure mitochondrial ATP synthetic activity. *Microb Cell Fact.* 2015 Apr 16;14:56. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西田 敬二、荒添 貴之、坂野 聡美、近藤 昭彦：塩基変換による切らないゲノム編集，日本農芸化学 2017 年度大会 シンポジウム 3SY05 ゲノム編集技術の実用化への期待と課題。京都 平成 29 年 3 月 19 日
- ② 西田 敬二：Genome editing by targeted deaminase. PAG XXV- Plant & Animal Genome Conference. Plant Genome Engineering workshop. San Diego, USA 平成 29 年 01 月 15 日
- ③ 西田 敬二：DNA 塩基変換反応を利用した点変異導入型ゲノム編集技術 新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会・材料分科会 講演会 東京 平成 28 年 8 月 19 日

- ④ 西田 敬二：Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Seoul National University Seminar. Seoul, Korea 平成 28 年 8 月 11 日
- ⑤ 西田 敬二：Pin-point genome editing without cleaving DNA. International Symposium on Plant genome engineering. Tsukuba University. 平成 27 年 11 月 28 日
[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

- 1) 発明者：西田敬二、小嶋聡美、近藤昭彦
出願番号：PCT/JP2016/076448
発明の名称：Cascade タンパク質核酸複合体によって DNA を切断せずにゲノム中の狙った領域に変異を導入する技術
- 2) 発明者：西田敬二、島谷善平、近藤昭彦
出願番号：PCT/JP2016/085075
発明の名称：標的化した DNA 配列の核酸塩基を特異的に変換する、単子葉植物のゲノム配列の変換方法、及びそれに用いる分子複合体
- 3) 発明者：向山正治、市毛栄太、西田敬二、近藤昭彦
出願番号：PCT/JP2016/076711
発明の名称：標的化した DNA 配列の核酸塩基を特異的に変換する、グラム陽性菌のゲノム配列の変換方法、及びそれに用いる分子複合体
- 4) 発明者：荒添貴之、西田敬二、島谷善平、近藤昭彦
出願番号：特願 2016-085631
発明の名称：ゲノム配列改変技術における変異導入効率の向上方法、及びそれに用いる分子複合体

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 敬二 (Nishida, Keiji)
神戸大学・大学院科学技術イノベーション
研究科・教授
研究者番号：10620338

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119008

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Design and Analysis for Dynamical Genetic Circuits based on various Mathematical Models

研究代表者

山村 雅幸（YAMAMURA, Masayuki）

東京工業大学・総合理工学研究科・教授

研究者番号：00220442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,800,000円

研究成果の概要（和文）：5つのサブテーマに沿って研究を進めた。（1）基本素子のモデル化では、木賀班と連携して最も基本的な転写回路と細胞間通信を対象とした。（2）複雑な人工遺伝子回路のデザインでは、与えられた振動パターンを実現する発振回路をベンチマーク題材とした。（3）大規模な人口代謝経路システムの制御では、基本素子の接続についての解析に焦点を絞った。（4）細胞群システムのデザインと制御では、当初計画の多細胞生物の臓器に替えて、複数種からなる微生物マットを題材とした。（5）共通モデリングベンチの開発では、非線形微分方程式システム、確率過程システム、セル構造ダイナミックシステムなどの個別のモデル化手法を実装した。

研究成果の概要（英文）：The research plan is divided into following five subgoals. (1) We achieved to model fundamental processes such as gene regulation and inter cellular communication, collaborating with Kiga-project. (2) We achieved to design oscillating artificial genetic circuits by using genetic algorithms with frequency characteristics as the fitness evaluation. (3) We analyzed cascading two artificial genetic circuit from the viewpoint of impedance matching. (4) We proposed a multicellular development model for multi layered bacterial sheet in hot fountain. (5) In order to build common modeling bench for Synthetic Biology, we collect necessary mathematical methodology such as non-linear differential equation system, stochastic process system, cellular automata system, and so on.

研究分野：システム科学

キーワード：人工遺伝子回路 非線形力学 確率過程 複雑ネットワーク 並列シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の先駆的研究では非線形システム解析の常套手段が援用されてきた。

[1] Becksel ら[Nature 405, 590-593, 2000]は単純なフィードバックによる安定化 (=ゆらぎの低減)を示すために、非線形微分方程式にノイズ項を加えたモデルでシミュレーションした。

[2] Gardner ら[Nature 405, 339-342, 2000]は遺伝子トグルスイッチ回路の実現可能性を非線形微分方程式の分岐 (bifurcation) 分析で確かめた。

[3] Elowitz ら[Nature 405, 335-338, 2000]は発振回路の発振条件を非線形微分方程式の分岐分析で調べ、微生物による実現のパラメータ設計に利用した。

これらの発展研究、例えば Donino ら[Nature 463, 327-330, 2010]は発振回路の細胞間同期を実現したが、基本となるモデルは非線形微分方程式とその数値シミュレーションである。そこでは十分多くの分子が関与し、均一系である試験管内のような単純化された状況が想定されてきた。

一方、合成生物学のターゲットは、理想化・単純化された回路から大規模・複雑・不均一なものにシフトしつつあった。そこでは分子・細胞・組織・個体といった生命の階層のすべてにまたがるマルチフィジックス、マルチレイヤーの現象を取り扱う必要があり、従来の数理モデルの予測能力は限界に達していた。新しい数理モデルの構築とシミュレーション技術が求められていた。

2. 研究の目的

およそモノづくりは、概念設計から実現に至るまで系統的なアプローチをとるべきである。分子や細胞のように手に取って調べられない対象に対しては、各段階での分析・設計、試行からのフィードバックに、適切な数理モデリングと、パラメータ最適化、シミュレーション、システム構造解析等のコンピュータの利用が欠かせない。本研究の目的は、これら合成生物学を支える情報科学的基盤技術の開発にある。

3. 研究の方法

合成生物学を支える情報科学的基盤技術の開発を次の5つのサブテーマに分ける。

- (1) 基本素子の動的プロセスのモデル化
- (2) 複雑な機能を持った人工遺伝子回路のデザイン
- (3) 大規模な人工代謝経路システムの制御
- (4) 細胞群システムのデザインと制御
- (5) 共通モデリングベンチの開発

4. 研究成果

当初計画に従って5つのサブテーマに分けて研究を進めた。(1)基本素子の動的プロセスのモデル化では、B01 木賀班と連携して最も基本的な転写回路と細胞間通信を対象

とした。非線形微分方程式と確率過程の2通りのモデル化手法を、分子数による揺らぎの大小によって使い分けた。ここで開発したモデル化技法は、ダイバーシティ・ジェネレータ[Sekine 2011, 2012, 2013]の設計・解析・実験に役立った。(2)複雑な機能を持った人工遺伝子回路のデザインでは、当初計画の論理回路に替えて、与えられた振動パターンを実現する発振回路をベンチマーク題材とした。3遺伝子および4遺伝子による発振回路のネットワークポロジータとパラメータの同時最適化に成功した。(3)大規模な人口代謝経路システムの制御では、大規模システムの構築に必要な基本素子の接続についての解析に焦点を絞った。直列接続では電気回路等と同様に高い入力インピーダンスと低い出力インピーダンスに留意する必要があることを示した。(4)細胞群システムのデザインと制御では、当初計画の多細胞生物の臓器に替えて、複数種からなる微生物マットを題材とした。2次元セル構造をベースにした予備的シミュレーションに成功した。(5)共通モデリングベンチの開発では、非線形微分方程式システム、確率過程システム、セル構造ダイナミックシステムなどの個別のモデル化手法は実装されたが、全体をまとめて共通システムとするレベルには至らなかった。サブテーマ毎に進捗に差はあるが、設定目的は概ね達成できたと考える。

次に、最も重要な研究成果として、上記サブテーマの(1)と(2)について詳細を述べる。

(1) ダイバーシティ・ジェネレータ

ダイバーシティ・ジェネレータはGardner[2]のトグルスイッチをもとに作られた回路である。トグルスイッチの回路は、個々の細胞のなかで独立して機能するため、原理としては面白いが、それだけでは実用に結び付けるのは困難である。トグルスイッチ回路を組み込んだ大腸菌を培養しているところは、例えば、電気パーツのスイッチがたくさんバケツに入っている状況に近い。スイッチはそれぞればらばらな状態になっていて、全体としては何もしていない。この状況に何かの意味付けを行おうためには、何らかの付加的要素が必要である。我々は社会性昆虫(アリ、ハチ)の分業をヒントに細胞間通信を付加することで発想を始めたが、多細胞生物における細胞の分化のコントロールのモデルとなることに気が付いた。

多細胞生物において、膵臓や肝臓といった臓器は、よく知られるように異なる機能を持った複数種類の細胞群が、ある比率で混ざり合ったような構造をしている。この比率はいつも一定になるように何らかの方法で維持されている。例えば、特定の種類の細胞が死滅したとしても、何日かすると元の比率に回復することが知られている。このようにスイッチのON/OFF状態(分化)の比率を維持するしくみを、合成生物学の新しい基本回路と

して設計し、その特性を検討することとした。細胞の種類の多様性を生み出すしくみ、という意味で「ダイバーシティ・ジェネレータ」と呼ぶ。

図1にダイバーシティ・ジェネレータの人工遺伝子回路を示す。回路の骨格はトグルスイッチそのものである。ただし、細胞集団全体としてのスイッチの ON/OFF 比を知るために細胞間通信を加えてある。スイッチの ON/OFF による2つの安定状態を、図の上下にかき分けてある。で示しているのが、スイッチ間の「配線」に相当するシグナル小分子 AHL である。遺伝子調整領域には特別なシグナル分子依存性プロモータを用いて、論理演算 AND ゲートを実現している。

図1上側の大腸菌では、スイッチは右側に ON になっている。リプレッサー R1 が生産されて、左側の転写を抑制している。それと同時にシグナル小分子 AHL を合成するタンパク質も生産している。下の大腸菌では、スイッチは左側に ON になっている。リプレッサー R2 が生産され、右側の転写を抑制している。ここで、GFP と mCherry はスイッチの状態の観察に用いるレポーター蛍光タンパク質である。

シグナル分子依存性プロモータは、リプレッサー R1 とシグナル小分子 AHL が同時に存在するときだけ機能するようになっている。シグナル小分子 AHL の濃度が高いときにはリプレッサーによる抑制が確実に働くため、トグルスイッチの状態はより安定になる。一方、AHL の濃度が低くなるとリプレッサーによる抑制が働かなくなるため、トグルスイッチの状態は不安定になり、変動しやすくなる。したがって、大腸菌の集団全体としては、AHL の濃度とスイッチの ON/OFF の比とがともある一定の値になるあたりで安定する。

ダイバーシティ・ジェネレータの数理モデルは、トグルスイッチの数理モデルに、シグナル小分子 AHL の濃度の変化項を付け加えただけのシンプルなものである。解析の方法は、トグルスイッチと同様に、各微分値が 0 となるヌルクライン曲線を用いる。ダイバーシティ・ジェネレータでは、安定点の数が AHL の濃度によってコントロールされるようなグラフが得られる。本研究では数理モデル解析から予想されるとおりに、ダイバーシティ・ジェネレータが分化比を維持できることを生物学実験によって示した。

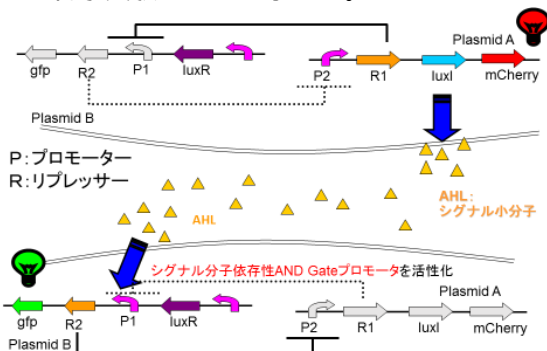


図1 ダイバーシティ・ジェネレータ

(2) 人工遺伝子回路の自動設計

従来実装されてきた人工遺伝子回路において、プリミティブな要素回路のバリエーションがそれほど大きくない。アナログ系の増幅回路、反転回路、発振回路、デジタル系の ON/OFF 回路、論理回路程度でしかない。さらに複雑な要素回路を開発するためには自動設計の助けを借りる必要がある。およそ人間のアイデアだけに依存したデザインでは、バリエーションが簡単に尽きてしまうからである。図2に回路の自動設計の考え方を示す。

人工遺伝子回路の自動設計では、ネットワークの構造と、パラメータとを同時に最適化することは困難な課題である。既存研究では、ネットワーク構造とパラメータのどちらかを固定するアプローチが多い。我々は発振動作する人工遺伝子回路の設計を対象として、ネットワーク構造とパラメータを同時に自動設計することを試みた。数理モデルは酵素反応の方程式の一般形である「他の分子との関連である分子の生産速度と分解速度が決まる」という意味をストレートに表現した方程式を用いた。最適化問題としての決定変数には、アナログ量となる速度変数の他に、アナログ量ではないネットワークの構造については、0、1、-1 のデジタルな値を取る特別なパラメータを用意してネットワークの接続関係を表し、まとめて行列とし、これをひとつのパラメータセットとして、遺伝的アルゴリズムによって最適化した。

回路の自動設計を最適化問題として見たときに、通常は「欲しい挙動を時間に対するタイムコースとして与えられたときに、これにぴったりフィットして誤差が小さくなる」という誤差を評価関数とする。振動する遺伝子回路を対象とするとき、単なる誤差では問題が生じることが知られている。2つの振動を比較したときに、同じ振動数で振動しているという意味では正しい動作をしているものであっても、位相が半周期ずれている時には誤差が最大になる。これと、値が平均値にとどまったままで全然振動しない動作を比較すると、誤差の最小化だけを考えたのでは振動しない方が高い評価となることがある。

そこで、我々は振動する回路を設計するのであれば、振動しているという特徴を表現するような評価関数にすべきだと考えて、周波数特性を考慮することとした。ターゲットの挙動と設計対象の挙動をフーリエ変換したときの周波数成分を比較して、その差を取る項を単純に追加した。

計算機実験によって自動設計手法の効果を確認した。まず、遺伝子を3つだけ使ってよいという制約条件の下に発振回路を自動設計したところ、すべての試行で発振解のみを得ることができた。これと比べて評価関数に周波数特性を使わない場合には、発振しない回路が多数設計される。次に、4 遺伝子で

自動設計を試みたところ、やはりすべての試行で発振解を得ることができた。回路の規模は大きくないが、スケールアップに関する計算量の増大も見積ることができた。

自動設計された回路の構造を分析すると、3 遺伝子のもは Elowitz[3] のリプリッシーレーターを必ず 1 個含んでいる。4 遺伝子のもは、一見複雑に見えるが、複数個のリプリッシーレーターの重ね合わせになっていて、そこに自己フィードバック回路が挿入されている。自己フィードバックは、当初予想になかった負荷要素であるが、天然の細胞に存在する遺伝子回路にもよく見られる構造である。自己フィードバックの機能としては、振動の立ち上がりのスピードアップに貢献しており、ターゲットへの位相の同調に貢献していることが分かった。

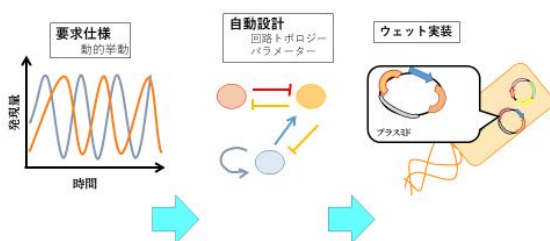


図2 人工遺伝子回路の自動設計

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 31 件)

Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga, Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits, BMC Systems Biology, 査読有、8 巻、2014
DOI: 10.1186/1752-0509-8-S4-S4

Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Design and Control of Synthetic Biological Systems, Natural Computing and Beyond, 査読有、6 巻、2013、104 - 114
DOI:10.1007/978-4-431-54394-7_9

林 孝文、周波数特性を用いた振動する人工遺伝子回路の自動設計、計測自動制御学会 第 40 回知能システムシンポジウム資料集、査読無、2013、211 - 216

Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, Design strategy for an initial state-independent diversity generator, Chem-Bio Informatics Journal, 査読有、12 巻、2012、39 - 49

Satoru Akama, Masayuki Yamamura, Takanori Kigawa, A Multiphysics Model of In Vitro Transcription Coupling

Enzymatic Reaction and Precipitation Formation, Biophysical Journal, 査読有、102 巻、2012、221 - 230
DOI:10.1016/j.bpj.2011.12.014

Satoru Akama, Masayuki Yamamura, Takanori Kigawa, Multi-Objective Robust Optimization for In Vitro RNA Synthesis, The Sixth IASTED International Conference on Computational Intelligence and Bioinformatics (CBI 2011), 査読有、2011、74 - 80

Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Shotaro Ayukawa, Kana Ishimatsu, Satoru Akama, Masahiro Takinoue, Masami Hagiya, Daisuke Kiga, Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 査読有、108 巻、2011、17969 - 17973
DOI:10.1073/pnas.1105901108

[図書](計 1 件)

山村 雅幸 他、近代科学社、第 2 章 合成生物学 (萩谷 昌巳、横森 貴編 ナチュラルコンピューティングシリーズ「第 0 巻 自然計算へのいざない」)、2015、45 - 72

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 雅幸 (YAMAMURA, Masayuki)
東京工業大学・総合理工学研究科・教授
研究者番号: 0 0 2 2 0 4 4 2

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小長谷 明彦 (KONAGAYA, Akihiko)
東京工業大学・総合理工学研究科・教授
研究者番号:

鈴木 泰博 (SUZUKI, Yasuhiro)
名古屋大学・情報科学研究科・准教授
研究者番号: 5 0 2 9 2 9 8 3

小林 徹也 (KOBAYASHI, Tetsuya)
東京大学・生産技術研究所・准教授
研究者番号: 9 0 5 1 3 3 5 9

望月 敦史 (MOCHIZUKI, Atsushi)
理化学研究所・望月理論生物学研究室・主任研究員
研究者番号: 1 0 3 0 4 7 2 6

高安 美佐子 (TAKAYASU, Misako)

東京工業大学・総合理工学研究科・准教授
研究者番号：20296776

小野 功 (ONO, Isao)
東京工業大学・総合理工学研究科・准教授
研究者番号：20078166

伊藤 浩史 (ITO, Hiroshi)
九州大学・芸術工学研究院・助教
研究者番号：20512627

関根 亮二 (SEKINE, Ryoji)
理化学研究所・生命システム研究センター・研究員
研究者番号：70730232

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601
 研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）
 研究期間：2011～2015
 課題番号：23119009
 研究課題名（和文）多要素人工遺伝子回路のデザインオートメーション

 研究課題名（英文）Design automation of multi-element gene circuits

 研究代表者
 伊庭 斉志（Iba, Hitoshi）

 東京大学・情報理工学（系）研究科・教授

 研究者番号：40302773

 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,800,000円

研究成果の概要（和文）：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した。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した。そこで本研究では構成モジュールの特性の違いや周囲の温度などといった環境変化に対して頑健な遺伝子回路モジュールを合成することを試みた。また連携研究者の萩谷らは、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た。

研究成果の概要（英文）：The design of genetic networks has been studied for implementing desired biological systems, and in particular, some researchers have proposed automatic design methods using optimization techniques. However, it is difficult to implement genetic networks designed by previous methods due to overly simplified model descriptions whose parameters are infeasible in the real world. Additionally, the methods do not ensure robustness against parameter perturbation. In this project, we have proposed an effective design method and a fitness function evaluating robustness to create genetic networks which can be implemented experimentally. Further, we suggest the knowledge about robust network structures from results of optimization.

研究分野：進化計算

キーワード：遺伝子ネットワーク 進化計算 DNAツールボックス ラボラトリーオートメーション 遺伝的アルゴリズム 遺伝的プログラミング 人工遺伝子回路

1. 研究開始当初の背景

近年、複数の生体分子を組み合わせて有用な反応系を創り、その過程で生命システムを理解しようとする、合成生物学の試みが盛んに行われている。しかし、現時点では極めて小規模な反応系の構築に留まっている。反応系の大規模・複雑化を阻む要因としては、

(1) 反応系の設計から検証実験までが人手による試行錯誤により行われている点、および(2) 実験データを含む各種データが十分な粒度と信頼性をもって公開・共有されていないために、複数の研究者が構築した反応系を組み合わせることが困難な点が挙げられる。

ウェブ技術を活用して科学研究の促進を図る試みはオープンサイエンスと呼ばれており、合成生物学の学生コンテストであるiGEM(The international Genetically Engineered Machine competition)でもその手法が適用されている。iGEMでは、各研究チームがDNAや大腸菌を利用して新規の反応系を構築するが、それらの反応系はウェブ上のデータベースに登録することが義務づけられている(http://partsregistry.org/Main_Page)。そのため、回を重ねるごとにデータベースが充実していき、より大規模・複雑な反応系を創るための部品が増えていくことになる。

しかしながら、データベースに蓄積されているデータの粒度や信頼性が一様でないという理由から、データが十分に活用されていない状況が明らかになっている。この原因としては、ウェブ上への情報の整備・公開をほぼ全て人的作業に頼っているということが挙げられる。また、大規模・複雑な反応系を構築するためには、上述のようにして構築された巨大なデータベースに格納された遺伝子部品等の検索を効率よく行い、それらを適切に組み合わせることが必要である。さらに、少数の実験結果から最適な組み合わせを求めるには、発見科学的アプローチが有効であると考えられる。

以上に加えて、目標の反応系を構築するためには、既存のリソースを効果的に用いる実験計画を立案しなければならない。最終的には、実験の省力化のため、自動実験装置との組み合わせによるラボオートメーションが

重要と考えられる。このような概念はまだ開発途上であり、研究例が希少でありそれらを組み合わせ発展させ、合成生物学に適応した研究例はほとんどない。

2. 研究の目的

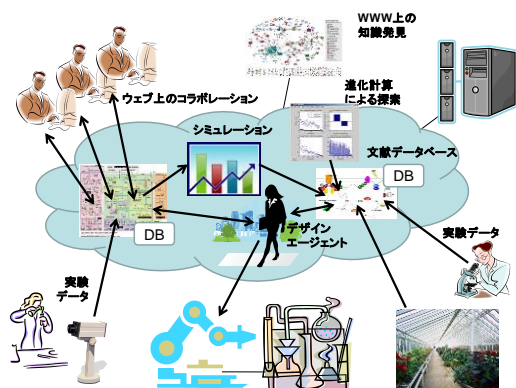
本計画研究では、上記の問題を解決し得る情報基盤システムの構築を目的とする。特に、多くの遺伝子が複雑に関連し合う多要素人工遺伝子回路を設計するための情報基盤システムの構築を目指す。具体的には、(1) 実験データから各種解析データを自動生成するラボオートメーション(ラボオートメーション)技術の開発、(2) 実験データや解析データのデータベース化を支援するとともに、ネットワーク上でのコラボレーションを促進するウェブ環境の整備、(3) 進化計算を活用してデータベースに格納された遺伝子部品等の検索を行い、それらを組み合わせ人工遺伝子回路を自動設計する技術、設計した人工遺伝子回路を構築するための実験計画を立案する技術を開発する。これらの技術により、実験系研究班の研究活動を促進する。

3. 研究の方法

本研究では、生体分子ネットワークをより深く理解しかつ利用するために、(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、(2)in vitro で回路・経路構築を行う工学、および(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、かつ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ことを目的とする。

人工遺伝子回路を設計し、細胞内に導入し、そして細胞応答を解析するためには、いくつかの関門をクリアしなければならない。最大の問題点は、①理論やシミュレーションで得た予想通りに、人工遺伝子回路が無細胞系で挙動しない(ドライ系とウェット系との結果のギャップ)、②人工遺伝子回路が無細胞での挙動通りに細胞内では挙動しない(無細胞系と細胞内(in vivo)との結果のギャップ)ということである。本計画研究は、それらのギャップを埋めるために、タンパク質や核酸などの生体分子の改良を行う際に有用な情報基盤技術の構築を目指す。

そこで、まず各種の実験データファイルから自動的に実験データを抽出し、データベースへの保存を行う機能を実装する。次に、山村班が開発する高度なシミュレーション技術や解析プログラムを基盤システム上で実行する機能を実装することにより、実験データファイルのアップロード→実験データの抽出・データベースへの保存→各種シミュレーションやデータ解析の実行→結果のデータベースへの保存、という一連の作業を自動実行するシステムを構築する。さらに、進化計算という人工知能の手法に基づいて、デー



データベースに格納された遺伝子部品等を検索し、それらを組み合わせて新規の反応系とその構築手順を設計するプログラム（デザイナーエージェント）の開発を行う。全体として、人工遺伝子回路のデザインオートメーションを目指し、各種のツールをエージェントとしてウェブ環境上で容易に利用可能にする。構築した基盤システムは、フリーソフトウェアとして一般に公開する。

従来の化学・生物実験を伴う研究をオープンサイエンスで促進していく試みは、いずれも散発的なものである。オープンサイエンスを指向した統合的な基盤システムを構築することができれば、本領域から芽生えた研究活動を促進するツールとして利用し続けていくことが可能である。さらに、構築した情報基盤システムをフリーソフトウェアとして公開することにより、実験を伴う研究活動を促進するための一般的な方法論を提示することになる。これは、従来行われてきた、人間による試行錯誤に基づいた実験系研究の在り方に対して、根本から変革を迫るものである。

合成生物学において、人工遺伝子回路や人工生体分子ネットワークの効率的な設計手法を確立するためには、ウェット実験班と協力して実際的な助言を仰ぎながらアルゴリズムを開発する必要があることを痛感した。そのため、伊庭班では、学生やポスドクを積極的に実験班に派遣し、可能な限り実習生や技術指導の制度を利用して緊密な研究協力を図れるようにした。具体的には以下の項目を実施した。

- (1) Rondelez 班に対して、複数の博士課程の学生を実習生として派遣し、その後本計画研究で採用したポスドクを常駐させて共同研究を遂行した。さらに定期的に勉強会や討論会を共同で開催することで、ウェット系とドライ系の相互理解を進めることができた。一部の博士課程の学生やポスドクは、Rondelez 班における実際のウェット実験に参画することで、ドライ系が設計した遺伝子回路を実際にウェット実装することの困難さ・問題点を理解することができた。この困難さをドライ系の設計手法により改善することが重要な研究テーマの1つとなった。
- (2) 花井班には、卒論生および修士課程の学生を派遣し、定期的に遠隔会議を行って共同研究を遂行した。またウェット実験の内容を把握することで、ウェット環境に特有な構成モジュールの特性の違いや周囲の温度などの変化に対する頑健性について理解を深めることができた。これに基づいて遺伝子回路を設計し、実際にウェット実験を行って検証することを行った。
- (3) 柘植班との共同研究では、定期的に研究成果の進捗状況を報告・議論する機会を設けた。その結果、人工的に構築したオ

ペロンを持つ大腸菌と野生型の大腸菌の特徴を把握することができた。さらに、機械学習のためには学習データの量が不足しており追加実験の必要性を相互で認識し、提案したオペロン順序に基づいて実際にウェット実験を複数回行ってフィードバックを得ることができた。このようにして、オペロンの遺伝子連結順序を決定する際の重要な手がかりに着目することが可能になった。

以上のような連携の結果、国際的に権威のある論文誌や学会において共同研究を発表できるまでに至っている。

4. 研究成果

本研究計画の成果として、Rondelez 班と共同して、DNA ツールボックスを基にした遺伝子ネットワークの進化的合成手法 ERNe を構築した。DNA ツールボックスは、任意の遺伝子ネットワークをつないで構成できる DNA ベースの触媒活性化、または抑制化反応の遺伝子セットである。ERNe は ANN（人工ニューラルネットワーク）と化学反応ネットワークの類似性に着目した方法であり、実際的な生化学システムの探索に成功している。具体的には、倒立振子（振り子を逆立ちさせた不安定な構造物）の制御や AND/NAND/OR などの単純な論理回路の合成に成功した。さらに、より困難な探索問題として、特定の機能（サイン波、方形、鋸歯状の振動）を実現する遺伝子回路の進化的合成を試みた。図 1 は方形振動の結果を示す。ほとんどの実行で、3つの抑制が一緒にリンクした自己活性化配列に収束した。図にはトポロジーに対する変化のみが表示されているが、進化の途中には多くのパラメータが最適化されている。得られた構造には、二つのテンプレートスイッチ突然変異が同時に活性化部分に起こっており、構造の発見に伴って成績の大きな向上が見られた。

さらに花井班との共同研究では、数種類の発振回路を進化的に探索し、ウェット上での実装実験を行って有効性を検証する作業を行った。そのために遺伝子回路のネットワーク構造と反応速度式のモデルでのパラメータ値を二段階に分けて最適化する手法を提案した。またウェット実験での実現可能性を見据えて、この最適化において遺伝子ネットワークの発振特性だけでなくその頑強性も評価した。具体的には、最適化したパラメータ値に変動を加えたときの遺伝子ネットワークの出力を評価することで頑強性を調べた。提案手法による探索では、パラメータ変動に対してより頑強な遺伝子回路を発見することに成功した。

また、柘植班との共同研究により、人工解糖系オペロンの構築のための機械学習（C5.0、ランダム・フォレスト、クラシファイア・システム、マルチレイヤー・パーセプションの合議制）による最適化を試みた。より詳細に

は、解糖系遺伝子のうちの 10 個を取り上げ、それらの順序による大腸菌の増殖速度を機械学習によって解析し、増殖速度の大きいオペロンを自動構築することに成功した。

連携研究者の萩谷らは、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た。とくに、P1 実験室の承認を受けて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。これまでに、AND Gate の追試とその改変、AND Gate に基づく delay gate の作成、Riboregulator の追試等の実験をケーススタディとして行った。以上の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實現している。

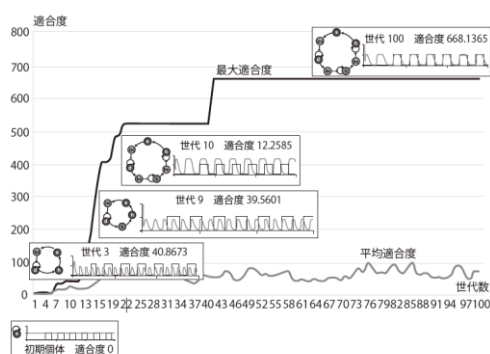


図 1 方形振動子の進化のようす

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- ① Noman, A., Iba, H.: "ε constrained differential evolution for economic dispatch with valve-point effect", *International Journal of Bio-inspired Computation*, vol. 3, no. 6, pp. 346-357, 2011.
- ② Liu, S., Iba, H.: "A Study on Computational Efficiency and Plasticity in Baldwinian Learning", *Journal of Advanced Computational Intelligence and Intelligent Informatics*, vol. 15, no. 9, pp. 1300-1309, 2011.
- ③ 丹治信, 伊庭斉志: "関係クリーク推定を用いた確率モデル遺伝的プログラミング", *進化計算学会論文誌*, vol. 2, no. 1, pp. 41-52, 2011.
- ④ 渡辺晃生, 伊庭斉志: "対話的パラメータ最適化のための集団探索打ち切り型探索アルゴリズムの提案", *進化計算学会論文誌*, vol. 2, no. 2, pp. 47-62, 2012.
- ⑤ Noman, N., Palafox, L., Iba, H.: "On Model Selection Criteria in Reverse Engineering

Gene Networks Using RNN Model," *Convergence and Hybrid Information Technology, Lecture Notes in Computer Science*, vol. 7425, pp. 155-164, 2012.

⑥ Noman, N., Palafox, L., Iba, H.: "Reconstruction of Gene Regulatory Networks from Gene Expression Data using Decoupled Recurrent Neural Network Model," *Natural Computing and Beyond*, Suzuki, Y. and nakagaki, T. (Eds.), Springer, pp. 93-103, 2012

⑦ Palafox, L, Noman, N., Iba, H.: "Study on the Use of Evolutionary Techniques for Inference in Gene Regulatory Networks," *Natural Computing and Beyond*, Suzuki, Y. and nakagaki, T. (Eds.), Springer, pp. 82-92, 2012.

⑧ Noman, N., Palafox, L., Iba, H.: "Evolving Genetic Networks for Synthetic Biology," vol. 3, no. 2, pp. 93-103, 2013.

⑨ Palafox, L, Noman, N., Iba, H.: "Reverse Engineering of Gene Regulatory Networks Using Dissipative Particle Swarm Optimization," *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, vol. 17, no. 4, pp. 557-587, 2013.

⑩ Noman, N., Palafox, L., Iba, H.: "Inferring Genetic Networks with a Recurrent Neural Network Model Using Differential Evolution," *Springer Handbook of Bio-/Neuro-Informatics*, Kasabov, Nikola, K. (ed.), pp. 355-373, 2013.

⑪ Noman, N., Monjo, T., Moscato, P., Iba, H.: "Evolving Robust Gene Regulatory Networks," *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0116258, vol. 10, no. 1, 2015.

⑫ Dinh, H., Noman, N., Iba, H.: "Oscillatory synthetic biological system construction using interactive evolutionary computations," *Journal of Computer Science*, vol. 10, no. 12, pp. 2640-2652, 2015.

⑬ Penga, Y., Hasegawa, Y., Noman, N., Iba, H.: "Temperature compensation via cooperative stability in

⑭ protein degradation, *Physica A*, vol. 431, pp. 109-123, 2015.

⑮ Noman, N., Monjo, T., Moscato, P., Iba, H.: "Evolving Robust Gene Regulatory Networks," *PLoS One*, 2015 Jan 23;10(1), e0116258. doi 10.1371/journal.pone.0116258. eCollection, 2015.

⑯ Dinh, Q. H., Aubert, N., Noman, N., Fujii, T., Rondelez, Y., Iba, H.: "An Effective Method for Evolving Reaction Networks in Synthetic Biochemical Systems," *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, DOI:10.1109/TEVC.2014.23268

63, 2015.

[学会発表] (計 24 件)

① Noman, N., Bollegala, D., Iba, H., "Differential evolution with self adaptive local search", The 13th Annual Genetic and Evolutionary Computation Conference, 2011 年 7 月 12-16 日, Dublin, Ireland

② Vatanutanon, J., Noman, N., Iba, H., "Polynomial selection scheme with dynamic parameter estimation in cellular genetic algorithm", 13th Annual Genetic and Evolutionary Computation Conference, 2011 年 7 月 12-16 日 Dublin, Ireland

③ Bollegala, D., Noman, N., Iba, H., "RankDE: learning a ranking function for information retrieval using differential evolution", Proc. of GECCO 2011, pp.1771-1778, 2011 (**GECCO Best paper 受賞**). 2011 年 7 月 12-16 日 Dublin, Ireland

④ Liu, S., Iba, H. "Imitation tendencies of local search schemes in baldwinian evolution", Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference (GECCO2011), pp. 553- 560, 2011. 2011 年 7 月 12-16 日 Dublin, Ireland

⑤ Noman, N., Bollegala, D., Iba, H.: "An adaptive differential evolution algorithm", Proceedings of IEEE Congress on Evolutionary Computation 2011 (CEC2011), pp. 2229- 2236, 2011. 2011 年 6 月 5-8 日, New Orleans, LA, USA

⑥ Noman, N., Iba, H.: "Reconstruction of gene regulatory networks from gene expression data using recurrent neural network model", Proceedings of 6th International Workshop on Natural Computing (IWNC6), 2012. 2012 年 3 月 28-30 日, Tokyo, Japan

⑦ Palafox, L., Iba, H.: "Study on the use of Evolutionary Techniques for inference in Gene Regulatory Networks", Proceedings of 6th International Workshop on Natural Computing (IWNC6), 2012. 2012 年 3 月 28-30 日, Tokyo, Japan

⑧ Palafox, L., Iba, H., "On the use of Population Based Incremental Learning to do Reverse Engineering on Gene Regulatory Networks", IEEE Congress on Evolutionary Computation 2012 (CEC2012),

⑨ 2012 年 06 月 10 日~2012 年 06 月 15 日, Australia, Brisbane

⑩ Sato, H., Hasegawa, Y., Bollegala, D., Iba, H., "Probabilistic model building GP with Belief propagation", IEEE Congress on Evolutionary Computation 2012 (CEC2012),

⑪ 2012 年 06 月 10 日~2012 年 06 月 15 日, Australia, Brisbane

⑫ Palafox, L., Iba, H.: "Gene regulatory network reverse engineering using population based incremental learning and K-means," Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference (GECCO2012), pp. 1423-1424, 2012. 2012 年 7 月 7-11 日, Philadelphia, PA, USA.

⑬ Komiya, K., Noman, N., Iba, H.: "The search for robust topologies of oscillatory gene regulatory networks by evolutionary computation," Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference (GECCO2012), pp. 1419- 1420, 2011. 2012 年 7 月 7-11 日, Philadelphia, PA, USA.

⑭ Noman, N., Palafox, L., Iba, H.: "On Model Selection Criteria in Reverse Engineering Gene Networks Using RNN Model," Proceedings of Convergence and Hybrid Information Technology - 6th International Conference, (ICHIT2012), LNCS vol.7425, pp.155-164, 2012. 2012 年 8 月 23-25 日, Daejeon, Korea.

⑮ Palafox, L., Noman, N., Iba, H., "Extending Population Based Incremental Learning using Dirichlet Processes," Proceedings of IEEE Congress on Evolutionary Computation 2013 (CEC2013), pp.1686-1693, 2013. 2013 年 7 月 20-23 日, Cancun, Mexico.

⑯ Hettiarachchi, D. S., Noman, N., Iba, H., "Messy Genetic Algorithm for evolving mathematical function evaluating variable length gene regulatory networks," Proceedings of IEEE Congress on Evolutionary Computation 2013 (CEC2013), pp.2154-2161, 2013. 2013 年 7 月 20-23 日, Cancun, Mexico.

⑰ Aubert, N., Dinh, Q. H., Hagiya, M., Iba, H., Fujii, T., Bredeche, N., Rondelez, Y., "Evolution of Cheating DNA-based Agents Playing the Game of Rock-Paper-Scissors," Proceedings of the Twelfth European Conference on the Synthesis and Simulation of Living Systems, Advances in Artificial Life (ECAL2013), pp.1143-1150, 2013. 2013 年 9 月 2-6 日, Taormina, Italy.

⑱ Eita, M., Shoukry, A., Iba, H., "Constrained Group Counseling Optimization," Proceedings of Alife' 14, The Fourteenth International Conference On The Synthesis and Simulation Of Living Systems, pp.631-638, 2014. 2014 年 7 月 30 日-8 月 2 日, New York, NY, USA.

⑲ Dinh, H., Iba, H., Rondelez, Y., "Evolutionary construction of dynamic biochemical systems performing mathematical calculations," Proceedings of DNA20 (DNA Computing and Molecular

Programming), 2014. 2014年9月22-25日, Kyoto, JAPAN.

⑳ Noman, N., Iba, H., Pablo, M., “Designing Robust Network Topology with Surrogate Assisted Genetic Algorithm,” Proceedings of The 15th International Conference on Systems Biology (ICSB), 2014. 2014年9月14-18日. Melbourne, Australia

㉑ Peng, Y., Hasegawa, Y., Noman, N., Iba, H., “Nonlinear protein degradation for temperature compensation,” Proceedings of GIW / ISCB-Asia 2014. 2014年12月15-17日, Tokyo, Japan.

㉒ Ivert, A., Aranha, C., Iba, H., “Feature selection and classification using ensembles of genetic programs and within-class and between-class permutations,” Proceedings of IEEE Congress on Evolutionary Computation 2015 (CEC2015), pp.1121-1128, 2013. 2013年5月25-28日, Sendai, Japan.

㉓ Naruse, Y., Hamada, H., Hanai, T., Iba, H., “Evolutionary design of oscillatory genetic networks in silico,” Proceedings of IEEE Congress on Evolutionary Computation 2015 (CEC2015), pp.1596-1603, 2013. 2013年5月25-28日, Sendai, Japan.

㉔ Nobile, M. S., Iba, H., “A double swarm methodology for parameter estimation in oscillating Gene Regulatory Networks,” Proceedings of IEEE Congress on Evolutionary Computation 2015 (CEC2015), pp.2376-2383, 2013. 2013年5月25-28日, Sendai, Japan.

[図書] (計6件)

① Iba, H. and Noman, N.: “New Frontiers in Evolutionary Algorithms: Theory and Applications,” World Scientific Publishing Company, ISBN-10: 1848166818, 2011.

② 伊庭齊志: 人工知能と人工生命の基礎, オーム社, 2013.

③ Iba, H., Agent-Based Modeling and Simulation with Swarm, Chapman and Hall/CRC, ISBN 10-146656234X, 2013.

④ 伊庭齊志: 人工知能の方法—ゲームからWWWまで, コロナ社, 2014.

⑤ 伊庭齊志: 進化計算と深層学習—創発する知能—, オーム社, 2015.

⑥ H. Iba, N. Noman (eds.), Evolutionary Computation in Gene Regulatory Network Research, Wiley, 2016.

[その他]

ホームページ等

<http://www.iba.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊庭 齊志 (IBA HITOSHI)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・教授

研究者番号: 40302773

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2012-2015

課題番号：

24119508

26119711

研究課題名（和文）

人工代謝経路の設計基盤の構築

人工代謝経路のスキープの拡張

研究課題名（英語）

Construction of a design platform for artificial metabolic pathways

Expansion of the scope of artificial metabolic pathways

研究代表者

荒木通啓（Michihiro Araki） 神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授

研究成果の概要

大腸菌や酵母などのモデル生物において有用物質を高効率で生産していくためには、これまでに蓄積された網羅的情報を利用し、実効性の高い代謝パスウェイを推定、設計していくことが必要となる。本研究では、網羅的な化学構造・酵素反応データをもとにして、化学・生物情報解析により未知の化合物・酵素反応を推定し、様々な化合物に対して、代謝パスウェイを設計していくことを目標とした。実際には、代謝パスウェイの設計技術の開発を中心に、要素技術の高度化と設計ツールを開発することにより、設計基盤の構築と有効性の評価を行った。さらに、構築した設計基盤を利用して、バイオ合成ルートの効率的探索基盤を構築するとともにこれを利用した人工代謝経路のスキープの拡張を実施した。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 代謝工学 バイオインフォマティクス ケモインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

大腸菌や酵母などのモデル生物において有用物質を高効率で生産していくためには、これまでに蓄積された網羅的情報を利用し、実効性の高い代謝パスウェイを推定、設計していくことが必要となる。代謝パスウェイを設計基盤としては、すでに BNICE (Hatzimanikatis ら)、XTMS (Carbonell ら)、FMM (Chou ら)、MetRxn (Kumar ら) といった設計フレームにおいて、合成代謝経路の設計に向けた情報解析技術が開発されている。一方、これらの設計ツールは、化学情報解析・計算アルゴリズムの観点から、利用できる化合物・反応バリエーションが少なく、その適用範囲は極めて限定されている。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的な化学構造・酵素反応データをもとにして、化学・生物情報解析により未知の化合物・酵素反応を推定し、様々な化合物に対して、代謝パスウェイを設計していくことを目標とした。実際には、これまでに開発してきた代謝パスウェイの設計技術をもとに、要素技術の高度化と設計ツールを開発することにより、設計基盤の構築と有効性の評価を行った。さらに、構築した設計基盤を利用して、目的化合物に適した条件設定、運用面でのノウハウ蓄積を行い、設計ツールの活用利便性を向上させていくことで、バイオ合成ルートの効率的探索基盤を構築した。

3. 研究の方法

①人工代謝経路の設計基盤の構築

代謝設計に利用するデータベースとして、KEGG・PubChem・BRENDA 等の標準データベースをもとに、独自のデータベースを構築した。特に化学構造の高速比較のために、PubChem 由来の独自の化学構造データベースを構築した。化学構造・反応表現方法としては、アトム・ボンドのバリエーションについて検討することで、より精緻な化学構造を判別できる高次のデータ形式を考案した。反応比較方法については、開発した化学構造・反応表現方法をもとに、fingerprint を利用した Tanimoto 係数等を指標に反応分類を行い、既知反応に対して未知反応のアサインと遺伝子・酵素機能アノテーションを行った。未知反応により得られる未知化合物については、化学構造データベースの利用によりアノテーションを行い、類似指標計算によるスコア付けを行った。化合物データについては、PubChem データベースのアップデートに対応し、約 5 千万化合物のデータを抽出し、化合物データベースを構築した。反応データベースは、KEGG データのアップデートに加えて、BRENDA データベースよりデータ抽出を行うことで、基質・生成物ペアとして 2 万余の反応データベースを構築した。また、本設

計プラットフォーム (M-path) を公開していくためのウェブインターフェイスの構築を行った。

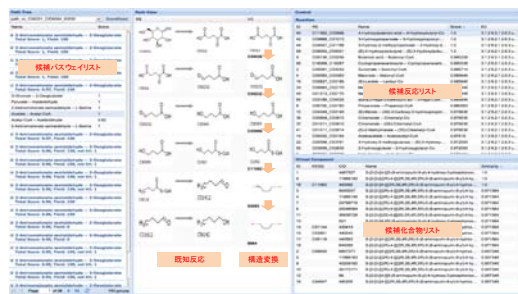
②人工代謝経路のスコープの拡張

人工代謝経路のスコープの拡張していくために、非天然型化合物を含む化合物群について網羅的に代謝経路を設計し、これをもとに代謝パスウェイの拡張データベースを構築していくためのプラットフォームを開発した。

4. 研究成果

①人工代謝経路の設計基盤の構築

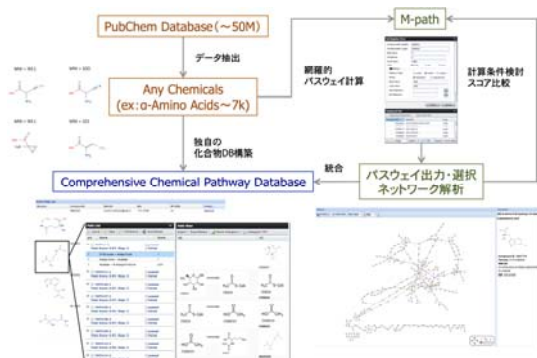
構築した反応データについて、独自の判定ルールを検討するとともに、データ追加およびキューレーションを実施し、データの取捨選択を行った。また、ジョブ入力における各オプション (反応ステップ数・反応データ数・計算サイクル数等) 設定についても検討を行い、得られた結果についても一定の評価規準を設定することで、効率的にチェックできる仕組み作りを行った。設計プロセスにおいては、逐次的化合物出力 (逐次法)、線形計画法を用いた反応ネットワークのランダム組合せ最適化 (ランダム法) の各方法について、新たにユーザインターフェイス (UI) への実装と各種のパラメータ入出力に対応できるようにプログラムを変更した。また、ルート中の新規化合物・反応の候補数、熱力学的解析による化学反応性評価、化学構造類似性評価など種々のフィルタリング手法の組合せによる評価により、実効可能性の高いルートを選択する方法を開発し、UI への実装を行った。



②人工代謝経路のスコープの拡張

人工代謝経路のスコープを拡張していくためのテストケースとして、PubChem データベースより非天然アミノ酸・ケト酸を抽出し、これらを目的化合物として網羅的に代謝パスウェイを計算した。代謝パスウェイの得られたアミノ酸について化合物 (アミノ酸) データベースを構築し、得られた代謝パスウェイを一定の判定規準 (スコア) で統合し、ネットワーク出力を行うプラットフォームを構築した。特に、スコアの高い代謝パスウェイについて目視で確認したところ、特徴ある反応がいくつか選択されることが明らかと

なり、本プラットフォームの有効性が示された。さらに、本プラットフォームを公開していくためのウェブインターフェイスを構築した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

- ① Ye, X., Morikawa, K., Ho, S.H., Nishida, K., Araki, M., Hasunuma, T., Hara, K.Y., Kondo, A. "Evaluation of genes involved in oxidative phosphorylation in yeast by developing a simple and rapid method to measure mitochondrial ATP synthetic activity" *Microbial Cell Factories*, 14 (1), 56 (2015).
【論文・査読有】
DOI: 10.1186/s12934-015-0239-z
 - ② *Araki, M., Cox III, R.S., Makiguchi, H., Ogawa, T., Taniguchi, T., Miyaoku, K., Nakatsui M., Hara, K.Y., Kondo, A. "M-path: A Compass for Navigating Potential Metabolic Pathways" *Bioinformatics*, 31(6) 905-911 (2015).
【論文・査読有】
DOI: 10.1093/bioinformatics/btu750
 - ③ Hara, K.Y., Aoki, N., Kobayashi, J., Kiriya, K., Nishida, K., Araki, M., Kondo, A. "Improvement of oxidized glutathione fermentation by thiol redox metabolism engineering in *Saccharomyces cerevisiae*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 9771-9778 (2015).
【論文・査読有】
DOI: 10.1007/s00253-015-6847-z
 - ④ Hara, K.Y., Araki, M., Okai, N., Wakai, S., Hasunuma, T., Kondo, A. "Development of bio-based fine chemical production through synthetic bioengineering" *Microbial Cell Factories*, 13: 173 (2014).
【論文・査読有】
DOI: 10.1186/s12934-014-0173-5
 - ⑤ Nakatsui, M., *Araki, M., *Kondo, A.
- "An Approach for Dynamical Network Reconstruction of Simple Network Motifs" *BMC Systems Biology*, 7(Suppl 6), S4 (2013).
【論文・査読有】
DOI: 10.1186/1752-0509-7-S6-S4
- 〔学会発表〕 (計 50 件)
- ① 荒木通啓 「In Silico 代謝設計ツールの開発とその展開」 農芸化学会 2016 年度大会 (2016. 3. 30 札幌コンベンションセンター、札幌) 【招待講演】
 - ② 荒木通啓 「代謝デザインの展開」 第 1 回デザイン生命工学研究会 (2016. 3. 8 東京工業大学) 【招待講演】
 - ③ Michihiro Araki 「Expanding the Scope of Metabolic Pathway In Silico」 The 7th International Symposium of Innovative BioProduction Kobe (iBioK) (2016. 1. 27 神戸大学、神戸) 【招待講演】
 - ④ 荒木通啓 「代謝設計基盤 (M-path) によるバイオ合成スコープの拡張」 合成生物学シンポジウム (2014. 11. 25 神戸大学・統合拠点、神戸) 【招待講演】
 - ⑤ Michihiro Araki 「Computational platform for designing synthetic metabolic pathways」 7th International Congress on Biocatalysis (2014. 9. 3 Hamburg University of Technology, Hamburg) 【招待講演】
 - ⑥ 荒木通啓 「知識拡張による代謝デザインとその展開」 生物工学技術セミナー (2014. 1. 15 神戸大学、神戸) 【招待講演】
 - ⑦ 荒木通啓 「代謝パスウェイ情報の抽象化と具体化」 酵素工学研究会 第 70 回講演会 (2013. 10. 25 東京大学・山上会館、東京) 【招待講演】
 - ⑧ Michihiro Araki 「A Knowledge-Based Approach for Metabolic Pathway Design」 Enzyme Engineering XXII Session (Co-Chair) : Bioinformatics and Systems Biology (2013. 9. 23 Toyama International Conference Center, Toyama) 【招待講演】
- 〔図書〕 (計 4 件)
- ① 荒木通啓 「合成生物学をデザインするデータベースについて」 H26 環境対応技術開発等報告書 (一般財団法人バイオインダストリー協会) (2015)
 - ② 荒木通啓 「データベースからの再発見」

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：合成経路作成装置、合成経路作成方法
及び合成経路作成プログラム

発明者：荒木通啓、宮奥康平、谷口岳志

権利者：三菱化学

種類：特許

番号：特許第 5907072 号

出願年月日：平成 22 年 12 月 19 日

取得年月日：平成 28 年 4 月 1 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/michihiroaraki/>

<http://bp.scitec.kobe-u.ac.jp/m-path/server/>

<http://bp.scitec.kobe-u.ac.jp/m-path/db/>

<http://bp.scitec.kobe-u.ac.jp/pathpod/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 通啓 (ARAKI, Michihiro)

神戸大学・大学院科学技術イノベーション

研究科・特命准教授

研究者番号：40396867

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119706

研究課題名（和文）肝臓構築過程における細胞間相互作用ネットワークの解析

研究課題名（英語）Signal network for cell-cell interactions during mouse liver development

研究代表者

塩尻信義（Nobuyoshi SHIOJIRI） 静岡大学・理学部・教授

連携研究者

佐藤信一（Shinichi SATO） 静岡大学・理学部・教授

研究成果の概要

本研究の目的は、マウス胎生期肝臓構築における細胞間相互作用ネットワークの探索と解明、そして数理モデル構築を通して、肝臓の人工遺伝子回路の探索・設計を行うことである。そのため、胎生期肝臓発生ならびに肝臓オルガノイド形成系における遺伝子発現の、マイクロアレイ法で得たデータについて、①GO エンリッチメント解析及び Pathway エンリッチメント解析、②タンパク質間相互作用（Protein-Protein Interaction）解析を行い、肝発生過程では、オンコスタチン M、FGF、EGF、NGEF、インテグリン、核ホルモン受容体等に加え、これまで報告のないシグナルがネットワークを形成して肝成熟化に働くことを見出した。③同時刻相互相関と S-system を併用したネットワーク推定を行い、いくつかの遺伝子について相互作用を推定できた。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 肝臓構築 人工遺伝子回路 数理モデル マイクロアレイ PPI

1. 研究開始当初の背景

動物の器官構築過程では、構成細胞間で数多くの相互作用、しかも複雑にはりめぐらされた相互作用ネットワークが働くことと推定される。申請者はそのネットワークの解明に向け、マウス肝臓の発生系をモデルに、実験的研究を進めてきた。哺乳類胎生期肝臓は造血器官であるため、組織学的に極めて複雑で、その発生・分化メカニズムの全容解明は他の系に比べ遅れ気味であるが、ES/iPS細胞から *in vivo* の肝臓に近い肝臓構築を *in vitro* で迅速に行わせるには、その胎生期肝臓の細胞間でのネットワーク情報の解明が必要不可欠と考えたからである。マウスの場合、肝臓原基は肝幹細胞である肝芽細胞、星細胞(結合組織細胞の一種)、血管内皮細胞、造血細胞、Kupffer細胞などから構成されるが、発生初期は肝機能をほとんど示さない。これらの構成細胞間での秩序だった相互作用を通して、それぞれ細胞は増殖、分化・成熟化し、成熟肝組織を形づくる。これらの過程での細胞間相互作用に、HGF やオンコスタチン M、VEGF、FGFs 等が関わることが報告されていたが、相互作用に関わる因子はまだ未知なものが多いし、細胞間相互作用に関わる因子群のネットワーク全体の解明も遅れていた。

2. 研究の目的

このような背景に基づいて、本研究では、マウス胎生期肝臓構築における細胞間相互作用ネットワークの探索と解明、数理モデル構築を通して、肝臓形成に係る人工遺伝子回路の探索・設計を行うことを目的とした。具体的には、まず①インビトロにおける胎生期肝臓細胞が成熟化し、密な細胞間相互作用が働いていることを初代培養系で実験的に示す。次にマウス胎生期肝臓発生ならびにインビトロの肝臓オルガノイド形成系における遺伝子発現に関するマイクロアレイ法で得た経時的データについて、②GO エンリッチメント解析及び Pathway エンリッチメント解析、③タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction; PPI) 解析、④同時刻相互相関と S-system を併用したネットワーク推定を行い、肝臓形成に関わる細胞間相互作用ネットワークを推定するとともに、いくつかの遺伝子について相互作用を推定した。この他に、⑤本新学術研究領域内の他の研究班と、幹細胞の性質をもつ発生期の細胞について共同研究を進めた。

3. 研究の方法

マウス 12.5 日胎仔肝臓細胞の初代培養における遺伝子発現を調べるとともに、この培養系から免疫磁気ビーズ法により血管内皮細胞を除去することで、緊密な細胞間相互作用がおこっていることを実験的に示した。次に胎生期肝臓発生ならびにインビトロにおける肝臓オルガノイド形成系における遺伝子発現をマイクロアレイ法で経時的に解析

し、GO エンリッチメント解析及び Pathway エンリッチメント解析、PPI 解析、同時刻相互相関と S-system を併用したネットワーク推定を行った。また幹細胞の性質をもつ臓側卵黄嚢細胞の分化多能性をインビトロ培養系で検証した。

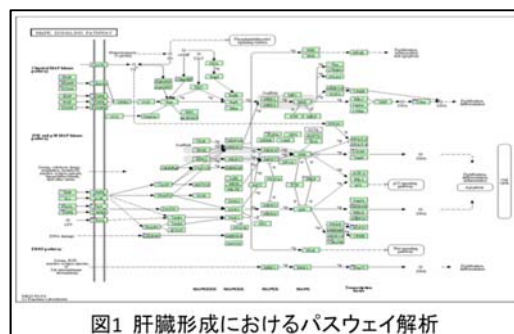
4. 研究成果

①インビトロにおける肝臓オルガノイド形成系における成熟化と細胞間相互作用ネットワーク

マウス胎仔肝臓細胞の初代培養を行うと、培養 3 日以内に肝臓の成熟マーカーの発現や微細血管網構築をともなう肝臓オルガノイドが形成された。血管内皮細胞を免疫磁気ビーズ法で除去すると、肝芽細胞/肝細胞、星細胞等の細胞増殖や遺伝子発現が著しくそこなわれた。これは肝臓形成系において、緊密な細胞間相互作用ネットワーク形成が不可欠であることを示している。

②マウス肝臓形成系における GO エンリッチメント解析及び Pathway エンリッチメント解析

GO エンリッチメント解析、Pathway エンリッチメント解析を行ったところ、肝発生過程ならびにインビトロ培養系ともに、その発生



と培養の進行とともに肝機能に関与する因子の発現上昇が認められ、かつこれに種々の細胞増殖・分化誘導シグナルや細胞外マトリックス等を介したシグナルが作用するデータを得た(図1)。特にインビトロ培養系では、細胞外マトリックスや細胞接着を介したシグナル系の活性化がインビトロに比べ著しいことが明らかとなった。この成果はインビトロ培養系では人工産物的なシグナルカスケードが働く可能性が高いことを示しており、注意が必要である。

③マウス肝臓形成系における PPI 解析

PPI 解析がシグナルカスケードのネットワーク探索に有効で、肝発生過程では、これまでに報告のあるオンコスタチン M、FGF、EGF、インテグリン、核ホルモン受容体等などが関わることに加え、報告のないシグナル (chemokine receptor、Eph シグナルなど) がネットワークを形成して肝成熟化に働くことが示された(図2)。このネットワークからは、細胞間相互作用ネットワーク情報も推察された。インビトロ培養系でも同様の細胞

間相互作用ネットワークが形成されることを確認した。またPPI解析でも細胞外マトリ

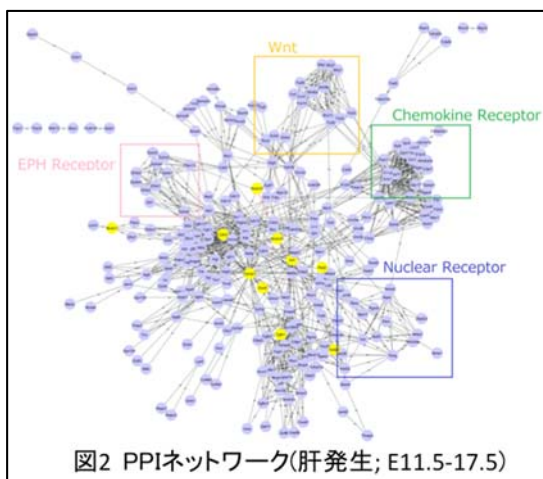


図2 PPIネットワーク(肝発生; E11.5-17.5)

クスや細胞接着を介したシグナル系の活性化がインビボに比べ著しいことが示された。(田川班と共同)

④マウス肝臓形成系における同時刻相互相関と S-system を併用したネットワーク推定
S-system による解析に向けて、マイクロアレイデータの角度分類、UpDown 分類などにより遺伝子のクラスタリングを試みたがうまくいかなかった。次に、同時刻相互相関と S-system を併用したネットワーク推定を試みたところ、上皮成長因子受容体(Egfr)などいくつかの遺伝子について相互作用を推定できた。(田川班と共同)

⑤同じ領域内の計画研究、公募研究との共同研究
幹細胞の性質をもつ臓側卵黄嚢細胞の分化多能性を検証し、壁側卵黄嚢、腸管細胞、多層上皮細胞、栄養芽細胞ふくめ種々の細胞に分化することを証明した。この細胞から肝臓を作り出すことが可能か、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析等を実施した。(田川班と共同)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Yagi, S. and Shiojiri, N. (2017) Identification of novel genetic markers for mouse yolk sacs by using microarray analyses. *Placenta*, 49, 68-71. 査読有
DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.11.013>
- ② Yagi, S., Tagawa, Y. and Shiojiri, N. (2016) Transdifferentiation of mouse visceral yolk sac cells into parietal yolk sac cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 470, 917-923. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.149

- ③ Fukuda, T., Fukuchi, T., Yagi, S. and Shiojiri, N. (2016) Immunohistochemical analyses of cell cycle progression and gene expression of biliary epithelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy of the mouse. *Exp. Anim.*, 65, 135-146. 査読有
DOI: 10.1538/expanim.15-0082
- ④ 塩尻信義 (2015) 胆管発生. *肝胆臓*, 70, 385-393. 査読なし
- ⑤ Ueno, T., Ishihara, A., Yagi, S., Koike, T., Yamauchi, K. and Shiojiri, N. (2015) Histochemical analyses on biliary development during metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles. *Zool. Sci.*, 32, 88-96. 査読有
DOI:
<http://dx.doi.org/10.2108/zs140104>
- ⑥ Sugiyama, Y., Takabe, Y., Yagi, S., Koike, T. and Shiojiri, N. (2014) Immunomagnetic exclusion of PECAM-1-positive endothelial cells in fetal mouse liver cell cultures causes impaired growth and gene expression of hepatoblasts and stellate cells. *Biomed. Res.*, 35, 271-283. 査読有
DOI:
<http://doi.org/10.2220/biomedres.35.271>

[学会発表] (計 6 件)

- ① Tatsuya Fukuda, Tomokazu Fukuchi, and Nobuyoshi Shiojiri (2015), Periportal hepatocytes may give rise to biliary epithelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy of mouse. The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (Tsukuba), June 3-5.
- ② 西岡侑哉, 八木志乃海, 福地智一, 吉井亮裕, 田川陽一, 佐藤信一, 小池亨, 塩尻信義 (2015), マウス胎仔肝臓の成熟化におけるシグナル伝達の変化. 日本動物学会第 86 回大会 (朱鷺メッセ; 新潟) [9月17-19日]
- ③ 福地智一, 西岡侑哉, 佐藤信一, 塩尻信義 (2016), マイクロアレイを用いたマウス胎仔肝臓細胞の *in vitro* 培養系における遺伝子発現解析方法の検討. 第 1 回デザイン生命工学研究会 (東工大; 横浜) [3月8日]
- ④ 塩尻信義 (2016), マウス肝発生過程における細胞間相互作用ネットワークのマイクロアレイデータによる解析. 第 1 回 デザイン生命工学研究会 (東工大; 横浜) [3月8日]
- ⑤ 福地智一, 西岡侑哉, 塩尻信義 (2016),

網羅的遺伝子発現データ解析によるマウス肝臓の成熟化過程におけるシグナルネットワークモデルの構築. 第23回肝細胞研究会(大阪) [7月7-8日]

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.syn-biol.com/>

<http://liverlovers95.wixsite.com/shiojiri-koike-lab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩尻 信義 (SHIOJIRI, Nobuyoshi)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号: 70162568

(2) 連携研究者

佐藤 信一 (SATO, Shinichi)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号: 30196240

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119715

研究課題名（和文）画像情報学による合成生物のダイナミクス解析

研究課題名（英語）Image-based dynamics analysis for synthetic biology

研究代表者

内田誠一（Seiichi Uchida）九州大学・システム情報科学研究所・教授

研究分担者

なし

研究成果の概要

C01 公募班では、計画班花井准教授（九州大学）と共同で、分裂する大腸菌の追跡および追跡結果を利用した大腸菌のタンパク質生成のオシレーションについて解析を行った。前者については、度重なるミーティングを実施し、撮影条件および追跡精度の妥協点を見出す努力を最大限に図った。特に撮影条件については、顕微鏡のフォーカスやコントラスト、さらには大腸菌を生育するための MEMS の構造および流速についても細かな調整を行った。その結果、極めて鮮明な映像ができ、さらにそれにより追跡の前段階である個々の大腸菌の検出が極めて高精度にできるようになった。さらにそれを受けて、検出結果を時間的につなぐ処理、すなわち追跡処理についても精度が格段に向上した。なおこの追跡処理については、最適化法の一つである安定結婚アルゴリズムを利用した。また、そのままでは分裂による対象数の増減に対応できないために、後処理により分裂状況を同定し、その付近での追跡経路を補正した。こうして得た追跡経路について、同時に撮影したタンパク質発現量の蛍光観察画像の輝度値の時間変化を見ることで、大腸菌のタンパク質生成量の時間変化を自動観察することに成功した。なおこの課題に関連して、細胞内中心体やマウスおよびメダカの追跡についても実施した。いずれの追跡課題も、対象の挙動や撮影状況が異なるために、それに適した個別のアルゴリズムを実装する必要がある、従ってバイオイメージ・インフォマティクスにはテイラーメイド型の開発が必要であることを実証した。

研究分野：画像情報学

キーワード：バイオイメージ・インフォマティクス 対象追跡 対象検出 最適化

1. 研究の目的

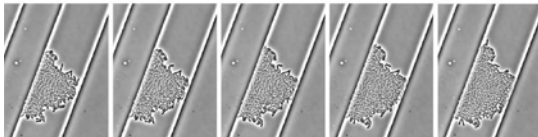
バイオイメージ・インフォマティクスとは、生物学と画像情報学の融合に基づく新しい研究分野である。この分野では、高度に発達したバイオイメージング技術による画像、特に顕微鏡観察による静止画や動画象を対象として、そこからの自動定量化ならびに知識発見を目指している。

本研究課題では、バイオイメージ・インフォマティクスの合成生物学への貢献として、「人工遺伝子組み込みによりオシレーション機能を持たせた大腸菌の顕微鏡観察動画象」を具体的対象とし、そのオシレーションの動的特性の定量的解析を目的とした。この目的のために、第一に、各フレームにおいて画像中の大腸菌を個々に領域分割（セグメンテーション）した上で、さらにそれぞれを時間的に追跡（トラッキング）する必要がある。

この対象動画象では、大量の大腸菌が密集して存在し、かつ途中で分裂を繰り返すため、これらの画像処理は非常にチャレンジングな課題となる。セグメンテーションについて精度を高めながら、トラッキングの手法についても実装する必要がある。さらに、花井班と連携しながら、撮像系やMEMSの調整を行う。

2. 顕微鏡画像中の大腸菌の性質

下図に大腸菌を撮影した顕微鏡動画象内の5つのフレームを例として示す。これらは、動画象内から30フレーム間隔で抜き出している。同図から分かるように、追跡対象となる大腸菌は同色、同面積、同形状となっており、各個体をその形状情報から区別することは困難である。また撮影に使用している位相差顕微鏡の特性上、大腸菌の周囲にはハロと呼ばれるオーラ状の光が発生しており、大腸菌が密集している領域とその他の領域とでは、大腸菌の全体的な輝度値に差が出ている。これにより、単純な二値化による大腸菌領域の切り分けも困難となっている。



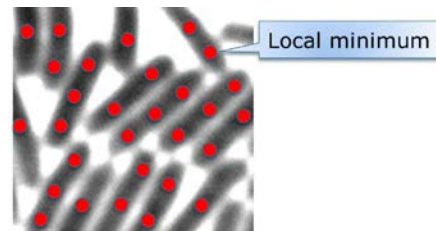
また、動画象内における大腸菌が分裂・増殖する速度もかなり高速である。上図の上下両端の図を参照されたい。わずか150フレーム、一般的な動画象のフレームレートで考えるとわずか5秒で1.5倍程度に増えている。加えて、個々の大腸菌が分裂を行うため、その増加速度は今後さらに爆発的に高まり続ける。

3. 提案手法①：大腸菌領域の検出

大腸菌を追跡するに際し、動画象の各フレーム内から大腸菌領域を切り出す必要がある。本研究では、初めから大腸菌領域を切り出し

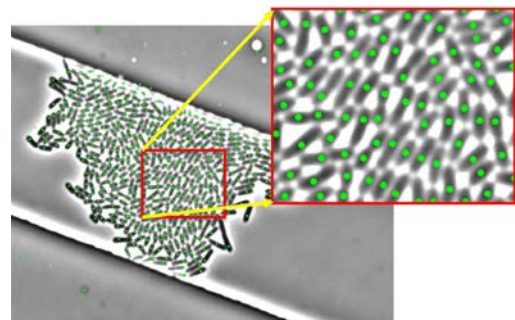
にかかるのではなく、まずは輝度値が局所最小となる点を探索することで大腸菌の位置を特定した。これは前項でも述べたように、撮影を行っている位相差顕微鏡の特性上大腸菌が密集した領域とその他の領域とでは全体的な輝度値に差があり、単純に2値化等の処理を行うだけでは個々の大腸菌を切り分けることができないためである。

大腸菌の位置の特定には、局所最小点の探索をベースとして2段階の処理を行う。すなわち、第1は局所最小点探索、第2は各大腸菌領域の重複検出点の除去である。下図に単純に局所最小点探索のみを行った場合の結果のイメージ図を示す。これに示すように、単純に局所最小点を見つけるにとどまる場合、同一の大腸菌に複数の検出点が表れてしまう。



そこで本研究では、局所最小点探索で検出された点をあくまで候補点と置き重複検出点の削減を行う。具体的には、まず全ての候補点を値が小さい順にソートする。上位に来た候補点から順に、入力画像に対し塗りつぶしアルゴリズム(Flood fill algorithm)をかける。ここで、自分より上位の候補点に塗りつぶされてしまった場合は、候補内から除去される。もし同一の大腸菌内に同じ輝度値を持つ候補点が存在した場合は、塗りつぶされる領域の幾何学的な中心に近いものが最終的な検出点として採用される。

局所最小点探索による大腸菌の検出結果を下図に示す。同図より、高い精度で大腸菌を検出出来ていることが分かる。



こうして求めた検出点を、直接追跡に用いることはできない。理由の一つには、検出点の座標が安定せず、大腸菌領域内で振動してしまうことが挙げられる。個々の大腸菌が密接していることもあいまり、この現象は追跡時に問題となってしまふ。また、最終的に追跡している大腸菌について、周期的な挙動を解析する必要がある点も考慮しなくてはな

らない。具体的には、大腸菌に組み込んだ GFP（緑色蛍光たんぱく質）の蛍光具合を解析したい。この解析を行う際、個々の大腸菌領域を切り出していないと不自由が生じてしまう。

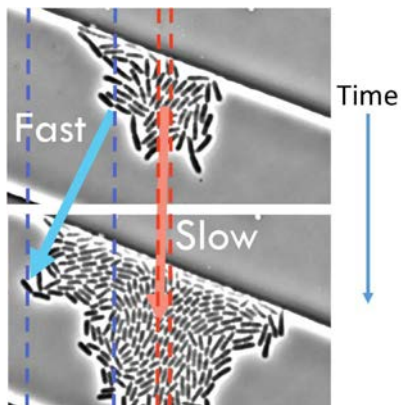
そこで、求めた検出点の周囲より個々の大腸菌領域を切り出し、その重心点を追跡時の代表点とする。このようにすることで、追跡に用いる代表点の振動を抑えることができる。まず、検出点をベースとしてウォータージェットアルゴリズムをかけ、セグメンテーションを行う。

下図にセグメンテーションを行った結果の図を示す。原画像において、同図のセグメント結果の個々のセグメントごとに大津の閾値を計算し、局所 2 値化を行う。先述したとおり、この 2 値化した大腸菌領域の重心点を追跡に用いる代表点とする。



4. 提案手法②：安定結婚アルゴリズムを用いた大腸菌の追跡

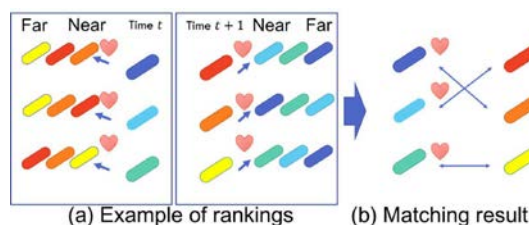
動画像内の密集した大腸菌は、その群の内側と外側で一定時間における移動量が異なっている。下図に、移動量が異なっている様子が分かる例を示す。大腸菌は分裂・増殖し、その数が爆発的に増加する。これにより、個々の大腸菌が密接し、群の外側に行くほど内側から押し出され、一定時刻における移動量が増加している。



個々の追跡対象の移動量が異なる本事例のような状況下において、ユークリッド距離に代表される絶対的な距離を指標としての追跡は適しているとは言えない。連続フレーム間で追跡対象の対応付けを行う際、次のフレームで別の大腸菌との距離が近くなってしまい、追跡対象を誤る恐れがある。特に、本研究では動画をタイムラプスで撮影しており十分なフレームレートを確保できているとは言えないため、上記の現象に頑健な追跡手法をとる必要がある。

そこで本研究では、ランキングベースのマ

ッチングアルゴリズムである安定結婚アルゴリズムを用いて連続フレーム間の検出点のマッチングを行った。下図に、安定結婚アルゴリズムの模式図を示す。具体的には、予め同図のように、連続フレーム間における大腸菌ごとの距離ランキングを作成する。その後、各々のランキングで最も不都合のない、言い換えれば最も安定したマッチングを探索する。

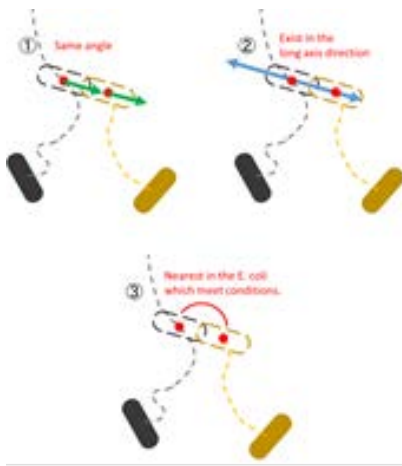


本手法は、第 t フレームと第 $t+1$ フレームの代表点数が一致しない場合についても、安定マッチングを求めることができる。その際、本手法が基本的には 1 対 1 の対応関係を求めるものであることから、マッチング先が決定されない代表点が存在してしまう。マッチング先が決定されない代表点については、ひとまず新たな発現点、もしくは消失点として処理を行う。従って、大腸菌のように分裂を行う対象を本手法で追跡した場合、分裂後はどちらか片方を追跡し続け、もう片方についてはその時点での新たな発現点として扱われる。

5. 提案手法③：分裂対応のための事後処理
本研究では、前項によって得られる追跡軌跡に対し、追跡終了後に各軌跡をつなぎ合わせる処理を行った。前項で得られる大腸菌の追跡軌跡は、大腸菌が分裂する際分裂後のどちらか片方を選択し追跡を続けている。従って、選択されなかった大腸菌は、その時点での新たな発現点として扱われる。このような状況では追跡軌跡が分断されてしまい、1 本の動画像から得られる解析結果の量が減少してしまう。

そこで大腸菌が分裂する際の特徴を利用して各大腸菌の分裂判定を行い、軌跡のつなぎ合わせを行った。大腸菌は、分裂する際にその長軸方向に成長し分離する。従って、同じ個体から分かれた大腸菌 2 個体は、密接している上にその向いている角度が等しく、またその長軸方向に並んでいる。上記に特性に基づき、大腸菌の分裂を判定するため基準を設定し、それを満たす際に大腸菌が分裂を行ったと判断する。

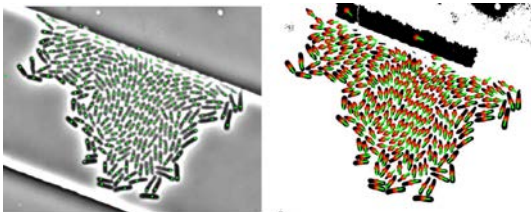
下図に、大腸菌の分裂判定の基準を示す。動画像各フレームにおける新たな発現点に対し、同一フレーム内の他の大腸菌から分裂したものであるかを図示した基準で判定した。全ての基準を満たした際に、それぞれの追跡軌跡に対対応付けを行う。



6. 結果と考察①：大腸菌の検出結果

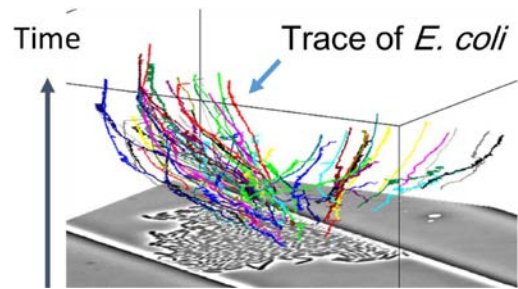
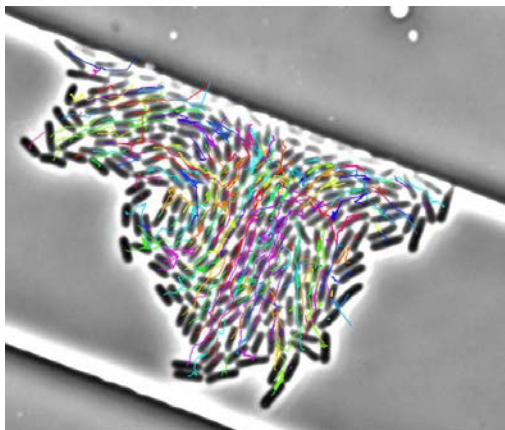
下図に、大腸菌の検出結果を示す。同図左の局所最小点探索をベースとして行った大腸菌の検出結果を見ると、ほぼ全ての大腸菌を検出出来ていることが分かる。検出漏れが起きている箇所は、ハロの影響により極端に明るくつぶれてしまったことによる、目視でも大腸菌であると判断することが難しい箇所のみであった。

また、同図右に大腸菌領域を切り出した結果を示す。結果より、大腸菌領域を正しく切り出せていることが分かる。各大腸菌の境界に注目しても、個々の大腸菌が連結することなく、適切に個別に切り出すことが出来ている。図中の赤点は、各大腸菌領域の重心点である。追跡の際には、この重心点を各大腸菌の代表点として扱う。



7. 結果と考察②：大腸菌の追跡結果

大腸菌を追跡した結果の軌跡を動画像中の1フレームに描画したもの、およびZ軸に時間を取り3次元的に表示したものを数に示す。この追跡結果は、全追跡軌跡の中からより一定時間以上長く追跡出来ているものを表示したものである。



本追跡結果について、より長く追跡を行っている30本が最後まで追跡対象を間違えずに終わっているのかを目視により調査した。結果として、30本中25本が最後まで追跡対象を間違えずに追跡ができており、その精度(適合率)は83%であった。

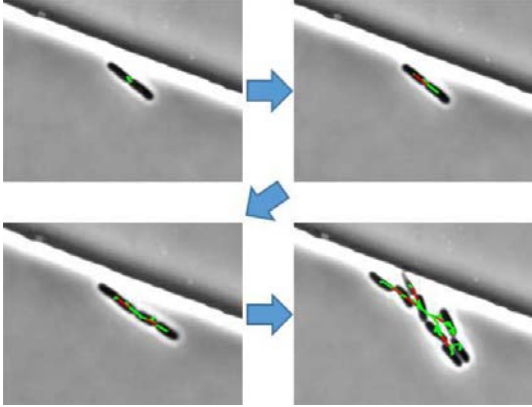
また、安定結婚アルゴリズムが本課題に適しているかを調べるため、ユークリッド距離を指標に連続フレーム間の対応関係を求める、ILP(Integer Linear Programming)アルゴリズムと追跡精度の比較を行った。ILPアルゴリズムは、全フレームの情報を用いて連続フレーム間の対応関係を求める。従って、大局的な最適解を得ることができ、一般的には安定結婚アルゴリズムのような逐次的に対応関係を求める手法よりも高い精度が保証できる。

本実験は、大腸菌が十分に増殖したフレームからランダムに大腸菌の個体を選び、時間を遡りつつ追跡軌跡を確認して精度を評価した。具体的には、ランダムで選択した大腸菌の正しい軌跡を目視にて確認し、その軌跡との適合率を調べた。時間を遡りつつ精度を評価したのは、大腸菌が分裂した際にどちらを追跡するか判断が両手法で違う場合があるからである。どちらかの手法の軌跡を基準としてしまうと、基準とした手法の方が有利になってしまう。従って、上記の様に時間を遡りつつ軌跡を確認することで、精度評価に用いる軌跡を一意に定めた。評価には、大腸菌の追跡軌跡20本を用いた。

結果として、安定結婚アルゴリズムは20本中11本の追跡に成功しており、追跡精度(適合率)は55%、ILPトラッキングは20本中5本の追跡に成功し、追跡精度(適合率)は25%であった。追跡に失敗した箇所を確認すると、両手法ともに追跡に失敗している箇所については、大腸菌領域の2値化時に領域が除去され、追跡に必要な対応点が存在していないケースが多い印象を受けた。ILPトラッキングのみ追跡に失敗した箇所では、追跡途中で軌跡が途切れ、その地点から新たな発現点としてカウントされているものが見られた。失敗したフレームの大腸菌検出結果を確認すると、二個体の大腸菌を一つとして検出、もしくは一個体の大腸菌を二つと認識していた。上記の場合、安定結婚アルゴリズムは新たな発現点を用意せず、よりランキング上で上位のものとマッチングを行う。この点も効果を発揮し、ILPアルゴリズムを上回

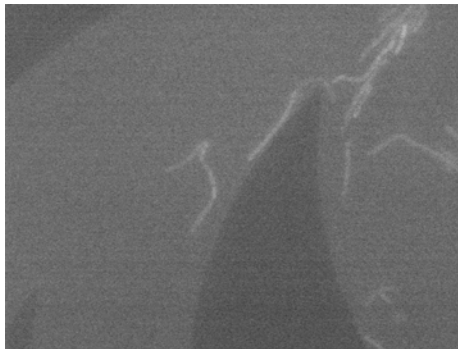
る精度を出せたのではないかと考える。

8. 結果と考察③：大腸菌の分裂判定結果
下図に、大腸菌の分裂判定結果を示す。同図にて、赤線は分裂した判定された箇所を示している。図より、各々の大腸菌の分裂箇所にて各軌跡が正しく繋ぎ合わされていることが分かる。全体的に見ても、大腸菌の2値化が正しく出来ている箇所において、分裂箇所の多くが正しくつなぎ合わされていた。



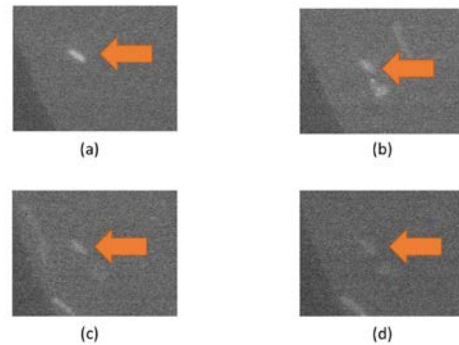
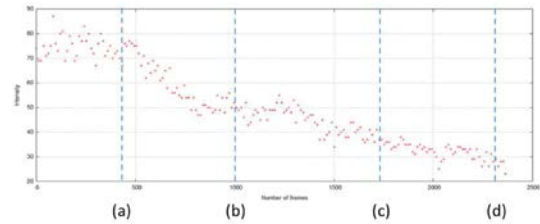
繋ぎあわせに失敗した箇所では、他の大腸菌と分裂する瞬間が重なり、更に注目している大腸菌の長軸方向に同時に分裂した大腸菌が入り込んできた場合が見られた。これは、大腸菌が長軸方向に存在するという基準のしきい値をより厳しく設定することで回避ができると思われる。しかし、動画像資料のフレームレートが低いこともあり、あまり厳しく設定すると正しい大腸菌の分裂を捉えられない可能性が高くなる。この点に関しては、現在動画像資料のフレームレートを考慮しながら、資料ごとに実験的にしきい値を調節するにとどまっており、今後対策を考える必要がある。

9. 結果と考察④：大腸菌の GFP 蛍光解析
本研究では、最終的な目標である大腸菌を追跡しながらの GFP 蛍光解析についても併せて取り組んだ。下図に、大腸菌を蛍光撮影した画像資料の例を示す。この蛍光画像は、前項まで追跡に用いていた大腸菌の動画像を取得しながら、同時に撮影されている。実際の解析は、大腸菌の追跡を行いつつ各大腸菌領域と重なる蛍光画像上の領域を切り抜き、その輝度値の平均を算出することにより行

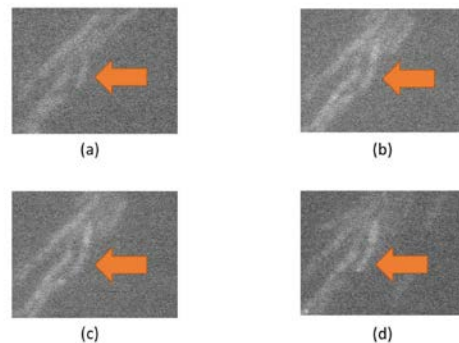
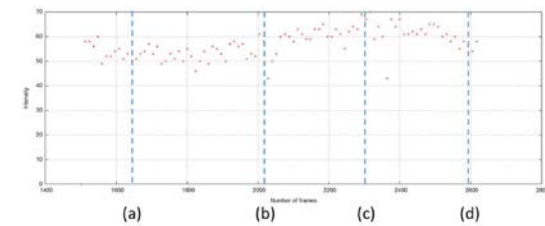


っている。また、解析を行う際には蛍光画像各フレーム間で画像全体の輝度値にゆらぎが生じることを考慮し、背景の輝度値の平均をもとに解析結果を正規化している。

下図に、GFP 蛍光解析を行った結果を示す。結果上のグラフは、蛍光画像上の各大腸菌領域の輝度値の平均を縦軸に、動画像のフレーム番号を横軸にとっている。また、グラフ上の破線(a)~(d)は、グラフ下部に並べた動画像中から抽出したフレームと対応している。同図中、矢印で示す大腸菌が、ここで注目し蛍光解析を行っている個体である。



上図を見ると、そのグラフ上で時間が進むにつれ、蛍光度合いが低下していく様子が見て取れる。実際の画像で現在注目している大腸菌を確認すると、実際にグラフ同様、その蛍光度合いが低下していた。グラフ上で蛍光度合いにばらつきが生じるのは、背景のノイズが非常に多いこと、また画像全体の輝度値に各フレーム間で揺らぎが生じることに起因する。



上図は別の結果である。前の結果と同様、実際の画像と見比べて矛盾のない解析結果を得ることが出来た。同図(d)に注目すると、同図(c)よりも蛍光画像上で大腸菌が明るく見えるのにも関わらず、その蛍光値は同図(c)よりも低くなっている。これは、(d)に該当するフレームの全体の輝度値が全体的に低下したため、それに引っ張られるようにしてGFP解析結果の値も低下したものと思われる。従って、今後は背景の輝度値をもとに解析結果を正規化するだけでなく、他にも何らかの対策を講じる必要がある。

10. まとめ

顕微鏡により撮影された分裂・増殖する大腸菌を全自動で追跡することを目的とし、その手法を提案した。提案手法は、顕微鏡画像中からの大腸菌の検出部位及び追跡部位の2段階により構成されている。顕微鏡からの大腸菌の検出には、輝度値の局所最小値探索をベースとした手法を用いた。しかし、これにより求まる大腸菌の位置座標が安定しないこと、また後に大腸菌の挙動解析を行いたく、その際に大腸菌の切り出しを行いたくことから、ウォーターシェッドアルゴリズムを用いて各大腸菌領域へのセグメンテーションを行い、各セグメントに局所2値化して大腸菌領域の切り出しを試みた。結果として、各大腸菌領域の切り出しが行えていることを確認した。追跡部位では、大腸菌群の内側と外側でその一定時間での移動距離が異なることを考慮し、連続フレーム間での追跡点の対応付けを、安定結婚アルゴリズムを用いたランキングベースの手法により行った。

11. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

- ① T. Nakayasu, M. Yasugi, S. Shiraishi, S. Uchida, E. Watanabe, Three-Dimensional Computer Graphic Animations for Studying Social Approach Behaviour in Medaka Fish: Effects of Systematic Manipulation of Morphological and Motion Cues, *PLoS ONE*, 査読有, 12(4): e0175059, April (2017)
- ② K. Kimura, A. Mamane, T. Sasaki, K. Sato, J. Takagi, R. Niwayama, L. Hufnagel, Y. Shimamoto, J-F. Joanny, S. Uchida, A. Kimura, Endoplasmic-Reticulum-Mediated Microtubule Alignment Governs Cytoplasmic Streaming, *Nature Cell Biology*, 査読有, 19(4), pp. 399-406, March (2017)
- ③ Y. Sato, K. Nagatoshi, A. Hamano, Y. Imamura, D. Huss, S. Uchida, R. Lansford, Basal Filopodia and Vascular Mechanical Stress Organize

Fibronectin into Pillars Bridging the Mesoderm-Endoderm Gap, *Development*, 査読有, 144(2), pp. 281-291, (2017)

- ④ S. Matsumura, T. Kojidani, Y. Kamioka, S. Uchida, T. Haraguchi, A. Kimura, F. Toyoshima, Interphase adhesion geometry is transmitted to an internal regulator for spindle orientation via caveolin-1, *Nature Communications*, 査読有, 7, June (2016)
- ⑤ M. Goldstein, S. Uchida, A Comparative Evaluation of Unsupervised Anomaly Detection Algorithms for Multivariate Data, *PLoS ONE*, 査読有, 11(4): e0152173, April (2016)
- ⑥ K. Aoki, F. Maeda, T. Nagasako, Y. Mochizuki, S. Uchida, J. Ikenouchi: A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. *Proc Natl Acad Sci USA (PNAS)*, 査読有, 113(13):E1863-71 (2016)
- ⑦ 内田誠一, バイオイメージングフォーマティクスと画像情報学, *電子情報通信学会誌*, 招待解説記事, 98(7), 597-603 (2015)
- ⑧ 内田誠一, 数理最適化とバイオイメージ・イメージング, *Medical Imaging Technology* 招待解説記事, 33(3), 97-104 (2015)

この他4報の論文を発表しております。

〔学会発表〕(計80件)

- ① 内田誠一, 最適化および機械学習とバイオイメージングフォーマティクス応用, 医用画像情報学会(MII)平成28年度春季(第177回)大会(2017), 招待講演
この他、6件の招待講演、15件の学会発表を行っております。

〔図書〕(計2件)

- ① 内田誠一, 画像データの基礎知識～画像の種類と見せ方, バイオ画像解析手とり足とりガイド(小林 徹也, 青木 一洋 編), 羊土社 (2014)
- ② 内田誠一, トラッキングの基礎とその周辺, バイオ画像解析手とり足とりガイド(小林 徹也, 青木 一洋 編), 羊土社 (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://human.ait.kyushu-u.ac.jp/>

12. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 誠一 (UCHIDA, Seiichi)
九州大学・大学院システム情報科学研究
院・教授
研究者番号：70315125

(2) 研究分担者
なし

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119702

研究課題名（和文）人工的遺伝子回路の発現レベルの予測モデルの構築

研究課題名（英語）Gene expression prediction of synthetic gene circuits

研究代表者

イン ベイウエン（Bei-Wen Ying） 筑波大学・生命環境系・准教授

研究成果の概要

遺伝子発現量の変化は、プロモーターといった制御機構によって決まる要因のほか、遺伝子座の局在や遺伝子発現の確率性（ノイズ）にも影響される。そのため、人工的に構築された遺伝子ネットワークが、細胞のなかに導入されると、設計通りに機能しないことがある。本公募研究班の研究目的は、人工遺伝子回路のゲノム上の組み換え位置および遺伝子発現の確率性を考慮した発現量を予測する。様々な遺伝子座における遺伝子発現量の計測と解析により、ゲノム上の位置で規格化された遺伝子発現の単純な計算方式を決定し、遺伝子発現ノイズのゲノム上での相関関係を明らかにした。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 大腸菌 遺伝子発現 人工遺伝子回路 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

生体内ネットワークのデザインと応用を目指す実験と理論の融合研究が盛んである。計測技術の進歩により、一遺伝子や一細胞レベルの網羅的評価ができるようになったにも拘らず、大量のデータを「眺める」レベルにとどまっており、データに基づく工学的法則が開発されていない。そのため、人工的遺伝子回路の細胞内導入は、分子生物学的予測に頼っていることが現状である。しかし、細胞は機械と違って、独特の柔らかさがあるため、設計原理が予定通りに機能しないことがある。その結果、合成生物学的アプローチを用いた成功例は、膨大な試行錯誤で達成されているのが現状である(McDaniel and Weiss, 2005, *Curr Opin Biotechnol*; Haseltine and Arnold, 2007, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*)。そこで、従来の分子生物学的法則に、細胞の柔らかさを考慮した遺伝子発現の予測モデルを構築することを本研究の目的とする。

2. 研究の目的

生体内ネットワークのデザインと応用のため、人工的遺伝子回路の細胞内導入が盛んである。しかし、細胞は機械と違って、独特の柔らかさがあるため、設計原理が予定通りに機能しないことがある。その結果、合成生物学的アプローチを用いた成功例は、膨大な試行錯誤で達成されているのが現状である。そこで、従来の分子生物学的法則に、細胞の柔らかさを考慮した遺伝子発現量を評価することを本研究の目的とする。

分子生物学的法則とは、制御機構の種類に決められた遺伝子発現の平均である。細胞の柔らかさとは、ある決まった制御機構による遺伝子発現のばらつきである。つまり、細胞内タンパク質濃度の変化は制御機構に支配されるだけではなく、その制御機構を司る分子間相互作用の確率性にも左右されている。遺伝子発現量とその確率性は、大まかに遺伝子発現の制御に由来する成分と遺伝子座のゲノム位置に由来する成分の二つの要素が考えられる(図1)。本研究は、ゲノム位置の効果と制御機構の効果を分離して、遺伝子発現の平均量とその遺伝子発現ノイズを評価する。

3. 研究の方法

まず、遺伝子発現の予測モデルを構築するために、網羅的データを取得する。遺伝子発現量とそのノイズは、大まかに遺伝子発現の制御に由来する成分と遺伝子座のゲノム位置に由来する成分の二つの要素が考えられる(次のページ、図2)。ゲノム複製フォークの進行に伴い、複製開始点から近いほど遺伝子コピー数が多い。そのため、遺伝子発現量の平均値がゲノム複製開始点(oriC)から近いほど高いと言われているが、定量的な評価はされていない。また、特定の制御が特定の

ゲノム位置における発現ノイズが報告されているが(Taniguchi et al, 2010, *Science*)、制御機構とゲノム位置を切り離した評価がされていない。そこで、本研究は、ゲノム位置の効果と制御機構の効果を分離して、遺伝子発現の平均量とその遺伝子発現ノイズを評価する。具体的には、ゲノム位置に沿って、遺伝子発現の集団平均量とばらつきを定量化し、その結果を抽象化する。次に、以上のデータから遺伝子発現量の予測モデルを構築する。遺伝子回路を新規的に細胞内導入し、数式化した予測モデルの妥当性を評価する。

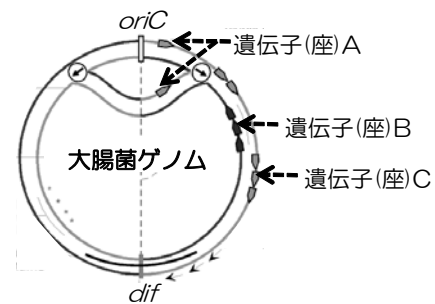
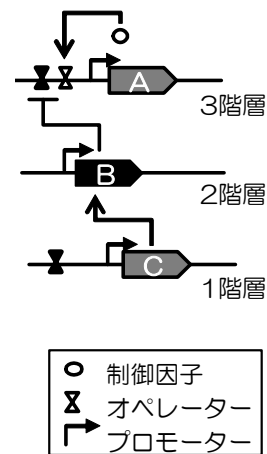


図1 遺伝子発現の平均値とノイズの決定要素

- 1) 制御機構に由来する
- 2) ゲノム位置に由来する

4. 研究成果

前述通り、遺伝子回路の正確な制御は生物工学の中心的課題の一つである。遺伝子発現レベルの予測に必要な情報と方法論がまだ完全でない。工学的応用においては、天然な遺伝子回路が複雑で予測不可能であるため、既知の分子機構による人工的遺伝子回路の構築が一般的に採用されている。しかし、これらの遺伝子回路は生きた細胞のなかで働くので、遺伝子発現の制御機構以外にいくつかの制約が依然として存在している。そのうちの1つは、ゲノムの位相構造です。遺伝子発現量がプロモーター強度だけではなく、ゲ

ノム構造にも部分的に影響されている。つまり、転写因子といった遺伝子発現に関わる制御因子が染色体へのアクセシビリティがその遺伝子の染色体上の位置と関係する。そのため、大腸菌ベースに、ゲノム位置のみに依存し、遺伝子発現レベルが複製開始点までの距離との単純化した定量的関係に焦点を当てた実験を実施した。その結果、遺伝子の染色体位置からゲノム複製開始点までの距離で規格化された遺伝子発現の単純な計算方式を決定した(図2)。この評価は遺伝子発現能力のゲノム位置の効果を表す一般的な式となり、指数期のゲノム複製モデルを支持するものである。それに関連して、2つ目に考えられる要素は遺伝子発現ノイズの影響である。同じ実験系を用いて、遺伝子発現のノイズを評価したところ、全体的に天然な遺伝子回路より人工回路の発現ノイズが小さい傾向にある(図3)。そして、こういった遺伝子発現ノイズが細胞増殖にポジティブな影響を与えることも確認できた。これらの成果が理論的なシミュレーションと遺伝子工学の構築に指針を与えることを期待できる。

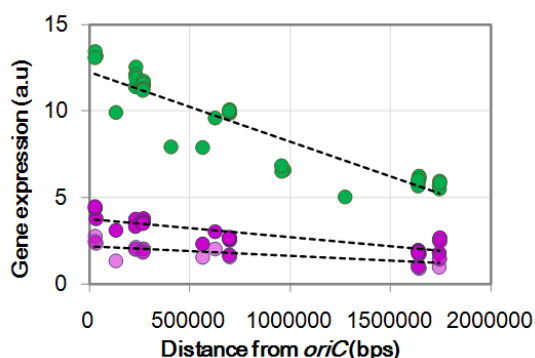


図2 遺伝子発現量とゲノム距離の関係

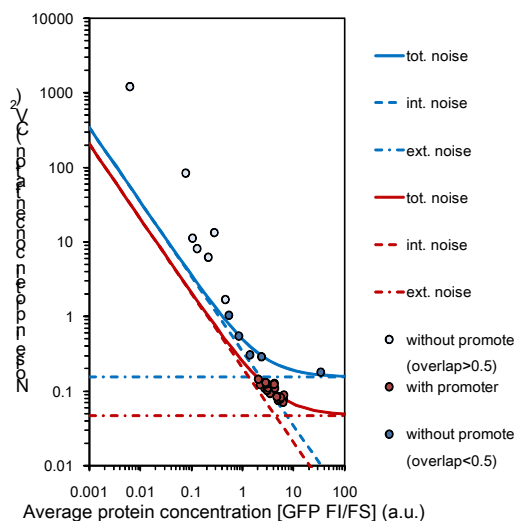


図3 遺伝子回路違いによる遺伝子発現量

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① BW Ying, S Seno, H Matsuda & T Yomo (2017) A simple comparison of the extrinsic noise in gene expression between native and foreign regulations in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Comm* 486:852-857.
- ② Y Murakami, Y Matsumoto, S Tsuru, BW Ying & T Yomo (2015) Global coordination in adaptation to gene rewiring. *Nucleic Acids Res* 43: 1304-1316.
- ③ Y Akeno, BW Ying, S Tsuru & T Yomo (2014) A reduced genome decreases the host carrying capacity for foreign DNA. *Microbial Cell Factories* 13: 49.
- ④ BW Ying, S Tsuru, S Seno, H Matsuda & T Yomo (2014) Gene expression scaled by distance to the genome replication site. *Mol Biosyst* 10: 375-379.

この他 10 報の論文を発表しております。

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~ying/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

イン バイウエン (YING, Bei-Wen)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号:

(2) 研究分担者

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119514

研究課題名（和文）試験管内概日リズム同期現象のモデル化

研究課題名（英語）Modeling of synchronization of in vitro circadian rhythms

研究代表者

伊藤浩史（Hiroshi Ito）九州大学・芸術工学研究院・助教

研究分担者

今井圭子（Keiko Imai）関西医科大学・教養部・助教

研究成果の概要

概日リズム研究の歴史において、合成生物学的手法が効果的に用いられた例として KaiC リン酸化リズム再構成系があげられる。試験管内にて 24 時間周期で自律的に振動するこの生化学反応は構成要素が全てはっきりしておりかつ振る舞いが複雑という点で、生体分子ネットワークモデル研究としては良い材料である。

申請者らは、超離散化モデルと呼ばれるシンプルな数理モデルを用いて、KaiC リン酸化リズムに代表される、分子が生み出す離散的な化学反応のモデルを作成した。また非線形動力学という分野の分岐理論というものを用いて、KaiC リン酸化リズムが低温下で消失するメカニズムに関して検証を行った。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 非線形動力学 リミットサイクル 超離散化 分岐理論

1. 研究開始当初の背景

合生命現象のうち約 24 時間周期でおこる現象は概日リズムと呼ばれている。概日リズムの座はどこにあるのかという KaiC 問題は長い研究の歴史があり現在でも多くの研究者が取り組んでいる。様々な生物種の中でも最も研究が進んでいるのは、申請者が扱ってきたシアノバクテリア(藍色細菌)である。プレイクスルーとなった研究は 2005 年申請者を含む名古屋大学理学研究科近藤孝男研究室のグループの生物時計試験管内再構成系と呼ばれる生化学反応である。シアノバクテリアの概日リズムに関与していると言われていた 3 つの遺伝子 kaiA, kaiB, kaiC の組み替えタンパク質を ATP と一緒に試験管内で混合したところ 24 時間周期である自律的なリズムが観察された(Nakajima et al. Science 2005)。KaiC タンパク質は自己リン酸化活性を持っているのだが、リン酸化された KaiC の割合が約 24 時間周期で振動した。この研究以前は、複雑な遺伝子発現の制御ネットワークが概日リズムを生み出していると考えられ教科書に記載されるほどのドグマであった(The Cell 第 5 版)が、遺伝子は関与しないという常識を覆す発見であった。またこの反応は温度に対して周期が不依存であることや温度の周期的な刺激に同調する性質(Yoshida et al. PNAS 2008)が実際の細胞の中で見られる概日リズムと同じであり、概日リズムを生み出す中心振動体であると考えられている。遺伝子発現を必要としない概日リズムは、核のない赤血球や転写阻害剤を投与した藻類でも最近見つかってきており O'Neill et al. Nature 2011)シアノバクテリアだけに留まらない現象ではないかと概日リズムの研究コミュニティでは考えられ始めてきている。

2. 研究の目的

この KaiC リン酸化リズム試験管内再構成系は構築から 6 年ほど経過して生化学の立場から多くの知見が集積してきている。しかしモデル化という観点からはあまり進展があるとは言えない。

化学振動反応という点で似ている BZ 反応はオレゴネーターと呼ばれる再現力のあるモデルが提案されている野に対し、KaiC リン酸化リズムに関しては未だ百花繚乱という状態で様々なモデルが提案されている続けている(例えば、Yoda et al. PLoS One 2007, Zon et al. PNAS 2007 など)。これら既存のモデルの共通した問題点は

1. 詳細な素過程からモデルを組み上げており、未発見の生化学プロセスを仮定している
2. 実際の実験結果をどこまで再現できるかが未検証であり、検証方法の提案もされていないという点である。本研究提案では振動する分子ネットワークのモデルの構築を目的とする。

3. 研究の方法

①離散化・超離散化によるリズム現象

概日リズム生み出すメカニズムの数理モデリングに関しては従来常微分方程式を用いて行われてきた。しかし、概日リズムの構成因子の分子数は数 100 のオーダーのことも知られており、常微分方程式が仮定している質量作用の法則が成り立たない状況が想定される。

このような状況に対応する方法として、微分方程式の時間を離散化した、離散方程式、さらに従属変数を離散化した超離散方程式によるモデリングを試みる。超離散化方程式は分子の一粒レベルの解像度のダイナミクスの記述、向いていると考えられる。

②低温下でリズム停止現象の分岐解析

多くの生物の体内時計は低温下で概日リズムが消失することが知られており、試験管内に再構成された KaiC リン酸化リズムも 19°C以下に冷やすとリズムが消失することがわかった。

一方非線形動力学の分野では、自律振動子の生成と消失についていくつかのパターンに分類できることが知られている。典型的には Hopf 分岐(ホップぶんき)と SNIC 分岐(スニックぶんき)とよばれるシナリオに分類される。Hopf 分岐はパラメータの変化と共に振幅が小さくなって振動が消失してしまうパターンであり、SNIC 分岐は、パラメータの変化と共に周期が無限大に発散して振動が停止してしまうパターンである。KaiC リン酸化リズムの低温下でのダイナミクスを検討するため、どちらの分岐が起こるかを検討した。標準系理論によって、分岐の種類がわかると、少数変数の本質的なモデル(標準系と呼ばれる)を得ることができると期待される。

③体内時計共鳴現象

低温下で概日リズムとブランコが似ているという事実から、申請者らは次の実験を着想した。ブランコは乗り手がこぐのをやめても、後ろから適切なタイミングで押してやれば揺れを取り戻すことができる。この現象は共鳴と呼ばれ、初等力学ではよく研究されてきた。分岐点以下の温度で周期的な温度パルスを与えることによって共鳴現象を引き起こすことを狙いとする。

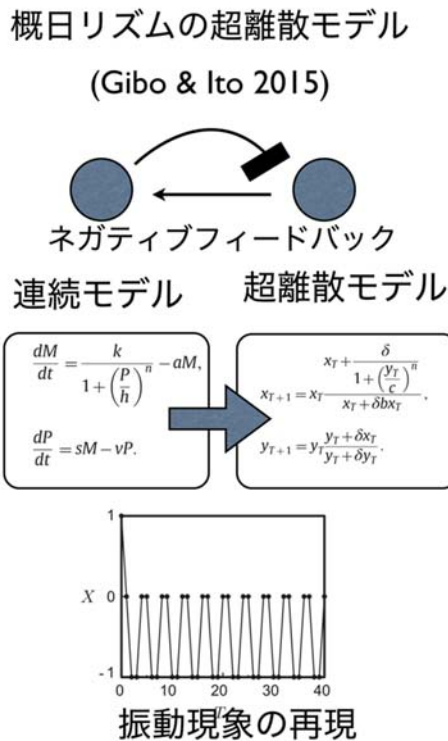
④リン酸化リズム同期現象のモデル化

シアノバクテリア KaiC リン酸化リズムの周期を短縮/延長する変異体はこれまでに多数報告されている(Kondo et al. Science 1994)。それらの変異は KaiC 上に存在し、KaiC リン酸化リズム再構成系の周期と生理学実験で観察される周期は相関がある(Nakajima et al. Science 2005)。本研究提案

では KaiC リン酸化リズムの同期現象を再現する数理モデルを構築し、周期決定機構に関する解明を試みた。

4. 研究成果

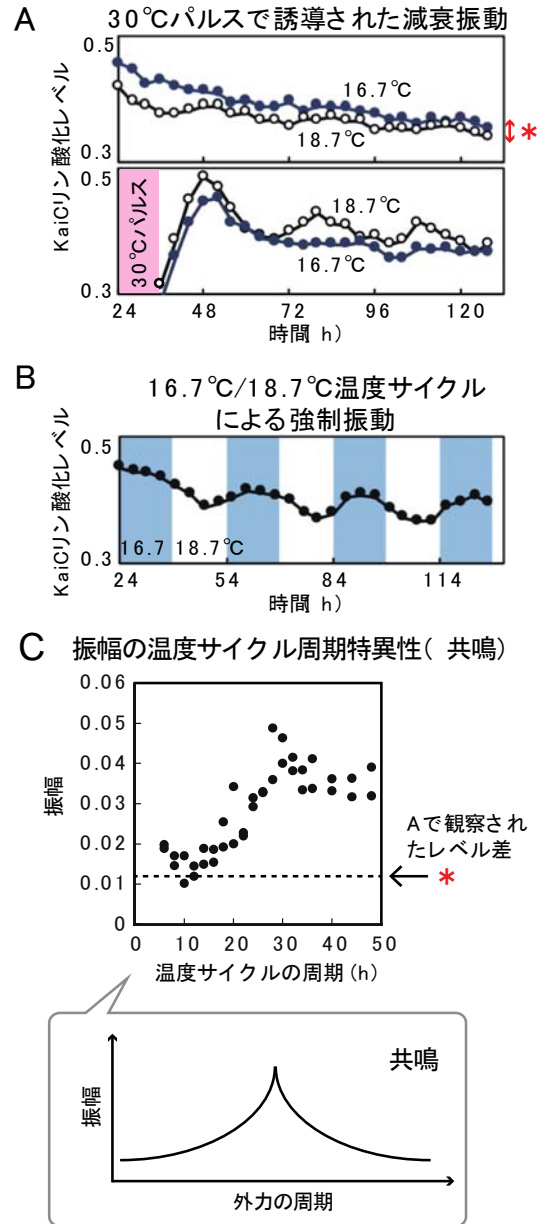
①離散化・超離散化によるリズム現象
そこで離散化および超離散化されたネガティブフィードバックモデルを以下のように導出した。これらのモデルについてリズムを生み出す条件について導出し、常微分方程式よりもリズムを生み出す条件がとかなり緩和されることを見いだした(Gibo & Ito J. Theor. Biol. 2015)。これは、すなわち分子が少数であれば、本研究は合成生物学的手法でリズムを生み出す分子ネットワークのモデリングに寄与すると考えられる。



②低温下でリズム停止現象の分岐解析
研究提案者らは温度を細かくふって KaiC リン酸化リズムの変化について検討をおこなったところ、温度の低下と共に徐々に振幅が小さくなっていき、Hopf 分岐のシナリオによって概日リズムが消失することを突きとめた。

③体内時計共鳴現象
そこで低温下で減衰振動子となった KaiC リン酸化リズムに 28 時間程度の周期で 2°C の温度変化を与えたところ、共鳴が起こり低温では決して観察されないような大きな振幅のリズムに回復することを発見した。ニュートン力学で観察される共鳴現象が生化学の現象でも起こりうるというのは非自明な発見である。しかしこれは偶然の一致

では無く Hopf 分岐を経て生まれた減衰振動子の共鳴現象は一般に起こるということ数理モデルの解析を通して我々は明らかにした。



④リン酸化リズム同期現象のモデル化
in vitro の実験によれば、KaiC 脱リン酸化反応自体がポジティブフィードバックを有しており、他の KaiC の脱リン酸化反応を促進していることが示唆された。この相互作用を行う位相モデルを構築し、リズムの同期現象が再現されることがわかった。またこの KaiC リン酸化リズムの同期モデルは、vivo における極めて早い KaiC の合成分解のターンオーバーに対してロバストにふるまうことが示された。この事実は、シアノバクテリアが 24 時間未満の倍化時間を持つのに関わらず、概日リズムを維持

できているのかという古くからの問いに説明をつけるものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

- ① Tsuchiya Y, Umemura Y, Minami Y, Koike N, Hosokawa T, Hara M, Ito H, Inokawa H, Yagita K: Effect of Multiple Clock Gene Ablations on the Circadian Period-Length and Temperature Compensation in Mammalian Cells. *Journal of Biological Rhythms* 31, 48-56 (2016)
- ② Gibo S, Ito H: Discrete and ultradiscrete models for biological rhythms comprising a simple negative feedback loop. *Journal of Theoretical Biology* 378, 89-95 (2015)
- ③ Ogawa Y, Ito H, Seno T: Vection is unaffected by circadian rhythm. *Psychology* 6, 440-446 (2015)
- ④ Kawasaki Y, Ito H*, Kajimura H. (*corresponding author): Equilibrium frequency of endosymbionts in multiple infections based on the balance between vertical transmission and cytoplasmic incompatibility. *PLoS ONE* 9, e94900 (2014)
- ⑤ Lu Y, Nishio K, Matsuda S, Toshima Y, Ito H, Konno T, Ishihara K, Kato S, Hashimoto K, Nakanishi S. Regulation of the cyanobacterial circadian clock by electrochemically-controlled extracellular electron transfer *Angewandte Chemie International Edition* 126, 2240-2241 (2014)

[図書] (計2件)

- ① 伊藤浩史
生物リズムを学び楽しむために
種生物学研究 第38号 (種生物学研究シリーズ) 249-267 文一総合出版 (2015)

- ② Ito H
A reconsideration of loss of circadian rhythms under low temperature conditions
Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN (Edited by K. Honma) (2014)

[その他]

ホームページ等
<http://www.design.kyushu-u.ac.jp/~hito/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 浩史 (ITO, Hiroshi)
九州大学・大学院芸術工学研究院・助教

研究者番号 : 20512627

(2) 連携研究者

今井 圭子 (Imai, Keiko)
関西医科大学・教養部・助教
研究者番号 : 90454610

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2012-2013

課題番号：24119509

研究課題名（和文）大腸菌グリコーゲン機構をモデルとした転写・酵素・代謝物相互作用ネットワークの理解

研究課題名（英語）Understanding of mutual interaction network over transcription, enzyme, and metabolite levels on glycogen utilization mechanism in E.coli.

研究代表者

松野浩嗣（Hiroshi Matsuno） 山口大学・創成科学研究科・教授

連携研究者

森 浩禎（Hirotada Mori） 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
フォレ・アドリエン（Adrien Faure） 山口大学・創成科学研究科・助教

研究成果の概要

合成生物学の基盤技術を確立するためには、酵素による代謝反応の調節、その逆調節といえる代謝物による遺伝子発現の調節、さらにはそれらの調節制御を司る遺伝子の相互作用など、動的要素を含んだ階層的ネットワーク構造を明らかにする必要がある。本研究ではグリコーゲン代謝経路とその制御機構を題材にしてこの課題に取り組み、大腸菌の生活環におけるグリコーゲン利用は、HPr と EIIA^{Glc} を中心とする因子群によって制御されることをシミュレーションによって検証し、大腸菌のライフサイクルにおいて重要な働きをしているグリコーゲンの利用プロセスを明快に説明することができた。

研究分野：合成生物学

キーワード：大腸菌 グリコーゲン 代謝経路 ペトリネット シミュレーション PTS

1. 研究開始当初の背景

合成生物学を展開するための基盤技術を確立するためには、実際の細胞の代謝ネットワーク制御機構を理解する必要がある。そのためには、酵素による代謝反応の調節、その逆調節といえる代謝物による遺伝子発現の調節、さらにはそれらの調節制御を司る遺伝子の相互作用を調べ、動的要素を含んだ階層的ネットワーク構造を明らかにしなくてはならない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、グリコーゲン代謝経路を題材とし、代謝物濃度の時系列データ、代謝物を調節する酵素の発現データ、遺伝子ダブルノックアウトによる大腸菌生育変化のデータに基づき、このネットワークモデルを構築することを通して、代謝ネットワーク制御機構を理解することである。最終目標は、遺伝子制御も含んだ大規模人工代謝経路を構築することであり、これは微生物による有用物質生産の効率化等に应用できる。

3. 研究の方法

まず、広範囲な文献調査やデータベース調査を実施し、グルコース取り込みシステム、ペントースリン酸経路、解糖経路、グリコーゲン経路、及びPTSリン酸リレー系を含むモデルを図1Aに示すダイアグラムにまとめた。さらに図1Bに示すような、遺伝子、酵素、代謝物に加えて、局在情報も組み込んだ

階層モデルを作成し、階層的ネットワーク構造を明らかにした。

次に、図1Aをハイブリッド関数ペトリネットを用いてモデル化し、シミュレーションを実行しながら、大腸菌の各生育段階、すなわち、誘導期初期、誘導期後期、対数期、定常期におけるグリコーゲンの利用方法について考察した。

さらに、グリコーゲン利用を制御する因子の働きを明らかにするため、文献調査とシミュレーション実験を行った。

4. 研究成果

大腸菌生育の誘導期(lag phase)において、グルコースとともにグリコーゲンが糖として使われることが分っているが、その利用を制御するメカニズムはよく知られていない。

本研究ではまず文献調査により、グリコーゲン代謝経路とそれに関わる解糖経路とペントースリン酸経路、及びこれらの代謝経路を制御するPTSリン酸リレー系とその他の制御因子を整理した統合モデルを作成した。つぎにこの統合モデルを基にして、ハイブリッド関数ペトリネットによるシミュレーションモデルを構築し、各代謝物とそれを制御する酵素等の因子のダイナミクスを数値的に観察した。

その結果、PTSタンパク質のHPrとEIIAGlcの作用がグリコーゲン代謝の制御に重要な働きをしていることが示唆された。具体的には、大腸菌の生活環におけるグリコーゲン利用の仮説、すなわち、誘導期初期では補助的

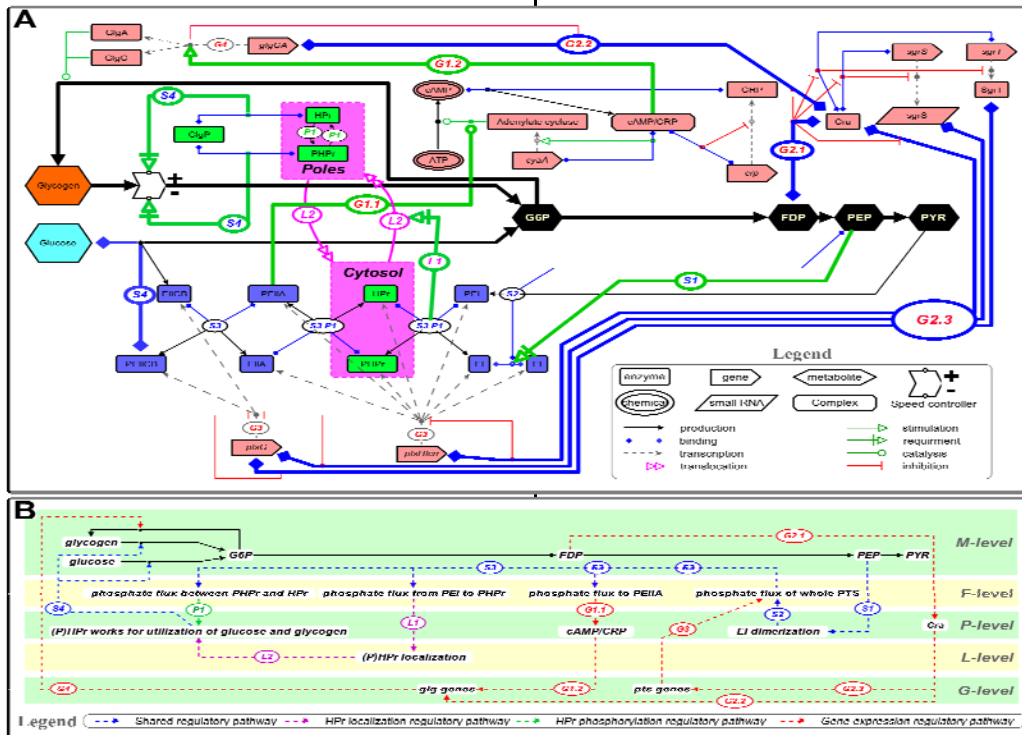


図1 グリコーゲン代謝制御ネットワーク

エネルギーとして使われるが、誘導期後期から対数期(log phase)の間で大腸菌内に蓄積され、定常期(stationary phase)においてゆるやかな生存のために少量ずつ消費される、という一連のグリコーゲン利用は、HPr と EIIAGlc を中心とする因子群によって制御されることをシミュレーションによって検証した。具体的には、以下の通り。

- (1) 大腸菌の解糖経路代謝物の濃度変化、生育曲線、及び培地中グルコースの濃度変化のデータを用い、代謝経路の入り口であるグルコースからグルコース 6-リン酸への変換過程のモデル化とシミュレーションを実施した。結果として、最も代謝が盛んな対数増殖期では、グルコースが使われると同時にグリコーゲンへの変換と貯蓄が始まり、安定期になると、グルコースはグリコーゲンとして貯蓄され、次の細胞増殖に備えることを示した。
- (2) これまで比較的軽視されてきた、代謝物制御に関わるタンパク質局在の影響を積極的に考慮し、HPr タンパク質の局在がグリコーゲン分解の決定要因として強く働いていることを示した。
- (3) PTS タンパク質の HPr と EIIAGlc の作用がグリコーゲン代謝の制御に重要な働きをしていることを示した。具体的には、大腸菌の生活環におけるグリコーゲン利用の仮説、すなわち、誘導期初期では補助的エネルギーとして使われるが、誘導期後期から対数期の間で大腸菌内に蓄積され、定常期においてゆるやかな生存のために少量ずつ消費される、という一連のグリコーゲン利用は、HPr と EIIAGlc を中心とする因子群によって制御されることをシミュレーションによって検証した。

これまでの大腸菌代謝経路の研究ではグリコーゲン代謝に対する注目度は低かったが、本研究の成果で、グリコーゲン代謝が大腸菌の生存戦略を理解するための重要な要素であることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Z. Tian, A. Faure, H. Mori, H. Matsuno, Identification of key regulators in glycogen utilization in E.coli based on the simulation from a hybrid functional Petri net model, BMC Systems Biology, vol.7(Suppl 6):S1, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

- ① Z. Tian, H. Matsuno, Intelligent mechanisms in E.coli in processing carbon sources, Proc. International

Conference on Artificial Life and Robotics 2014, OS7-2, in CD-ROM, Oita-city, Jan. 13, 2014.

- ② Z. Tian, A. Faure, H. Mori, H. Matsuno, Identification of key regulators in glycogen utilization in E.coli based on the simulations from a hybrid functional Petri net model, 4th International Workshop on Biological Processes & Petri nets, Milan, Italy, June 24, 2013.
- ③ Z. Tian, A. Faure, H. Matsuno, Regulation of glycogen utilization in E.coli identified from the computational model with hybrid functional Petri net, The 14th International Conference on Systems Biology, abstract No.519, Copenhagen Denmark, Aug.29-Sep.4, 2013.
- ④ Z. Tian, A. Faure, H. Mori, H. Matsuno, Systematic understanding of switch mechanism on carbohydrate supply in E.coli, The 13th International Conference on Systems Biology, poster abstract, No.187B, 104, Tronto, Canada, Aug.19-23, 2012.

〔図書〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 浩嗣 (MATSUNO, Hiroshi)
山口大学・大学院創成科学研究科・教授
研究者番号：10181744

(2) 研究分担者

森 浩禎 (MORI, Hirotada)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授
研究者番号：901822030

フォレ アドリエン (FAURE, Adrien)
山口大学・大学院創成科学研究科・助教
研究者番号：00610627

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119713

研究課題名（和文）論理モデルによる構造探索を使用した多要素人工遺伝子回路の効率的設計
方法の開発

研究課題名（英語）Development of an effective design method of multi-element artificial genetic
circuit based on structure search by using a logical model

研究代表者

松野浩嗣（Hiroshi Matsuno） 山口大学・創成科学研究科・教授

連携研究者

森 浩禎（Hirotsada Mori） 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

杉井 学（Manabu Sugii） 山口大学・国際総合科学部

フォレ・アドリエン（Adrien Faure） 山口大学・創成科学研究科・助教

研究成果の概要

人工遺伝子回路とは、遺伝子発現のタイミングや量があらかじめ設計した方法により制御された人工の遺伝子ネットワークであり、これまでに Gardner ら(2000)のトグルスイッチをはじめ、加算回路や発振回路などが実現されている。本研究では、はじめに 2 状態遺伝子トグルスイッチ、さらにそれにインデューサを付加したものについて、GINSim による論理モデルと Scilab による連続値モデルとの対応付けを行った。

次にフリップフロップ(FF)回路のメモリ機能を人工遺伝子回路で実現するための解析を行った。はじめに RS-FF 回路の微分方程式モデルを作ってその動作解析を行い、論理モデルとの対応がとれることを確認した。同様に JK-FF 回路についても動作解析と論理モデルとの対応付けを行った。各 FF 回路について微分方程式モデルのヌルクラインを調べることで、遷移表通りの動作をすることも確認した。

今後の課題は、RS-FF と JK-FF の働きをもつ遺伝子制御を実際の細胞に実現し、メモリ機能を含んだ人工遺伝子回路を実現することである。

研究分野：合成生物学

キーワード：人工遺伝子回路 トグルスイッチ 論理モデル 連続モデル フリップフロップ

1. 研究開始当初の背景

合成生物学研究における人工遺伝子回路設計では、目標現象(スイッチや振動等)を設定し、数理モデルによる動的解析によって生体分子間の反応速度パラメータの予測等を行なった後に、実際の分子反応を *in vivo/in vitro* 的に実現する。目標現象を生成する人工遺伝子回路は何通りもあるため、適切な回路の選別を効率的に行う手法があれば有効である。本研究の目的は、論理的手法による探索で構造情報を確定した後に、生産や分解等の動的要素を組み込む2段階のアプローチにより、効率的に数理モデルを設計する手法を開発することである。論理的な構造情報の選択作業には GINSim を使い、数理モデルは微分方程式(アトラクタ等の動的解析)とハイブリッドペトリネット(視覚的・生物学的なわかりやすさ)によって作成する。

2. 研究の目的

Gardner ら(2000)らのトグルスイッチの微分方程式モデルから出力されるヌルクラインを、論理モデルと対応付ける。これは、人工遺伝子回路の設計のためには、細胞内反応の強弱調整を表現する連続モデルが必要であるが、論理モデルによって大まかな定性的動作を予め把握できれば、その連続モデルの獲得の効率化が図れることが期待できるためである。

トグルスイッチについては、Inducer ありの2状態遺伝子トグルスイッチについても同様に機能の作業を行う。さらに、より複雑な順序回路であるフリップフロップ回路についても、連続モデルと論理モデルの対応付けを

試みる。この際、トグルスイッチ回路との関係や、レーシングなどの回路特有の現象への対応についても留意する。

3. 研究の方法

連続モデルの作成は、Gardner ら(2000)の方法と同様に、微分方程式によって行い、その挙動の解析、すなわち安定点に至る軌跡の見極めは相平面上のヌルクラインによって行う。ツールとしては Scilab を用いる。

2変数の場合は、相平面を4分割し、それぞれの区画を[0,0], [0,1], [1,0], [1,1]の4つの状態に対応させる。区画を横切る場合を状態推移とすれば、論理モデルに対応させることができる。この論理モデルのシミュレーションは GINSim を用いて行う。

準備として既存の遺伝子トグルスイッチモデルを用いて論理モデルと動的モデルの対応付けをおこない、論理モデルの状態推移のシミュレーションを GINSim で実行して、ブーリアンレベルでトグルスイッチシステムの動作を把握し、Gardner らの2変数モデルとの対応関係が取れることを確認した。

4. 研究成果

① 3変数遺伝子トグルスイッチ

本研究では、まず Gardner らの2変数遺伝子トグルスイッチについて、そのブーリアンネットワーク(BN)モデルの状態推移挙動と微分方程式(ODE)モデルによる相平面上の軌跡挙動の一致を表現するため、必要な数学的定式化を行い、相平面上の不安定定常状態を

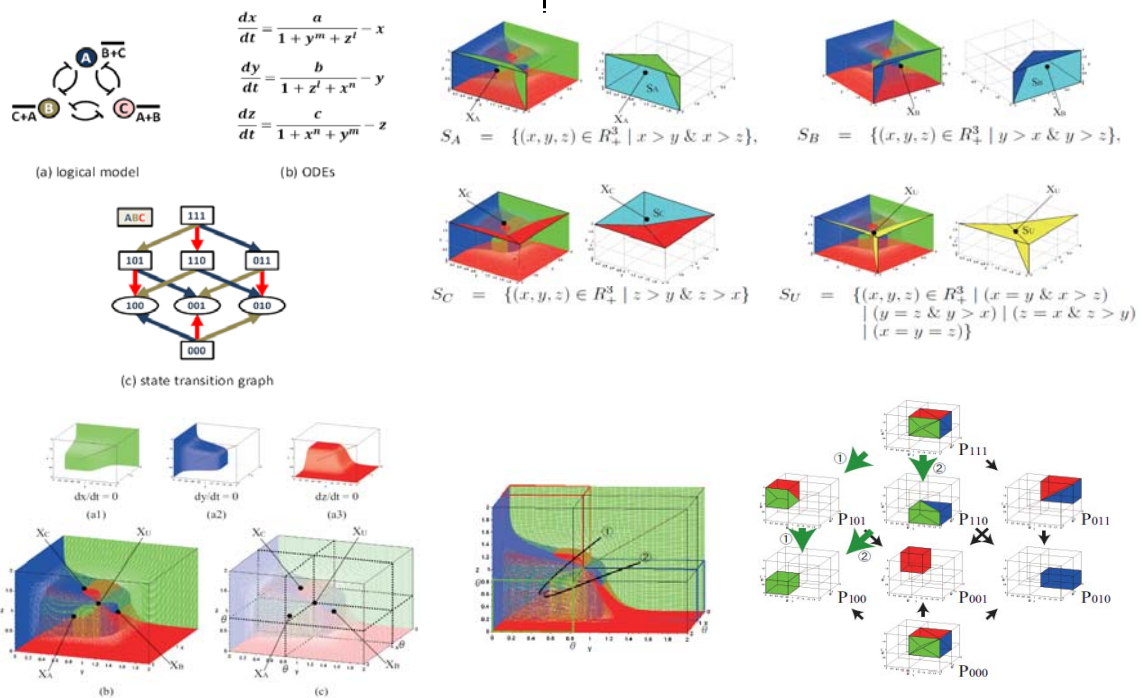


図1 3変数遺伝子トグルスイッチのBNモデルとODEモデルの対応

基点にして2変数それぞれの閾値をとることにより、それらの挙動の対応付けができることを示した。

次に、この2変数での定式化を基に3変数拡張を行い、3変数遺伝子トグルスイッチモデルのBNモデルとODEモデルを構成し、3変数の場合も、2変数の場合の挙動と同様な挙動の対応関係となることを示した(図1)。2変数BNモデルは2つのNOT回路による相互抑制で表現され、3変数BNモデルは3つのNOR回路の三つ巴の抑制で表現される。Elowitzらの3変数遺伝子振動回路についても、BNモデルとODEモデルの挙動の対応関係を示したが、これは3つのNOT回路の三つ巴抑制で表現できる。

②フリップフロップ回路の挙動解析

RSフリップフロップの特性方程式を作成し、論理モデルとの対応付けを行った。この連続モデルの4つの変数、Qとnot Q及びRとSの値の範囲はどれも[0, 2]とし、入力変数であるRとSに対する出力変数Qとnot Qの挙動をグラフとして示したものが図2である。この図には、論理値Qと論理値RとSの値も重ねてある。これより、特性方程式は正しく動作していることが分かる。RSフリップフロップは基本的にはインデューサ付トグルスイッチと同様な動作をする。

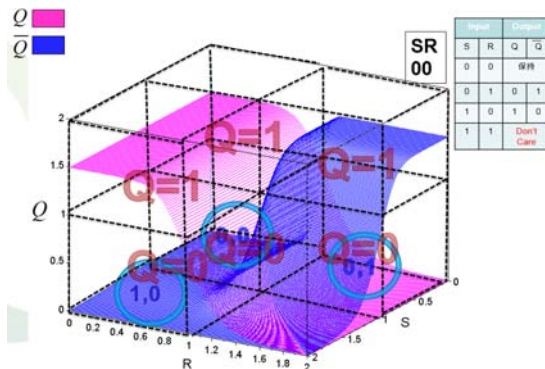


図2 RSフリップフロップ連続モデルの挙動

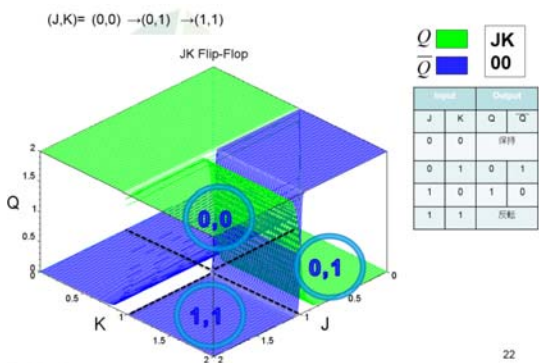


図3 JKフリップフロップ連続モデルの挙動

JKフリップフロップについても同様に特性方程式を作成し、論理モデルとの対応付けを行った。その結果が図3である。このモデルについてもその動作が論理回路と一致していることを確認した。すなわち、[0, 2]の間で適当なスレッシュホールド値を決めることにより、連続モデルにおいてもデジタル回路のJKフリップフロップと同じ動作をする。TTL-ICやCMOS-ICは内部的にはトランジスタで構成されていることを考えると、この電子回路的な技術がそのまま反映されているともいえる。

フリップフロップ回路の状態が意図せずに変化するレーシング現象も見られたので、 $J=1$ かつ $K=1$ の領域では、前の状態の連続値Qとnot Qの値を保持させ続けることでこの現象を解消した。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

- ① M. Kubota, M. Sugii, H. Matsuno, Behavior analysis on Boolean and ODE models for extension of genetic toggle switch from bi-stable to tri-stable, International Conference on Artificial Life and Robotics 2017, Miyazaki-city, Miyazaki, Jan. 19-22, 2017.
- ② M. Sugii, H. Matsuno, Extension of artificial genetic circuits with mathematical analysis, The 30th International Technical Conference on Circuit/Systems Computers and Communications (ITC-CSCC), pp. 230-233, Seoul Korea, June 29- July 2, 2015.
- ③ M. Sugii, K. Kawano, H. Matsuno, Extension of genetic toggle switch with a mathematical analysis for artificial genetic circuits, German Conference on Bioinformatics 2014, poster abstracts No.51, Bielefeld, Germany, Sep. 29- Oct. 1, 2014.
- ④ M. Sugii, K. Kawano, A. Faure, H. Matsuno, A mathematical analysis of the behavior of genetic toggle switch, The 29th International Technical Conference on Circuit/Systems Computers and Communications (ITC-CSCC), Phuket, Thailand, July 1-4, 2014.
- ⑤ M. Sugii, A. Faure, H. Matsuno, Extension of genetic toggle switch based on the effective search of state transitions, Proc. International Conference on Artificial Life and Robotics 2014, Oita-city Oita, Jan. 11-13, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 浩嗣 (MATSUNO, Hiroshi)
山口大学・大学院創成科学研究科・教授
研究者番号：10181744

(2) 連携研究者

森 浩禎 (MORI, Hirotada)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授
研究者番号：901822030

杉井 学 (SUGII, Manabu)
山口大学国際総合科学部・准教授
研究者番号：00359910

フォレ アドリエン (FAURE, Adrien)
山口大学・大学院創成科学研究科・助教
研究者番号：00610627

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：2611971

研究課題名（和文）ノイズが引き起こす確率的挙動を考慮した生体分子ネットワークの実用的設計

研究課題名（英語）Noise-induced stochastic behaviors of biomolecular networks and practical design

研究代表者

倉田博之（Hiroyuki Kurata）九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究分担者

無

研究成果の概要

細胞中における数が少なく、動力学的性質がゆらぐタンパク質や遺伝子が相互作用する生体分子ネットワークの挙動は、ノイズの影響を強く受ける。本研究では、固有ノイズや外来ノイズが生み出す生体分子ネットワークの確率的挙動が、遺伝子発現の時間的変化や細胞集団全体の遺伝子発現分布に与える影響を解析した。ノイズが基本ネットワークの生物機能（ダイナミクス）に与える影響を Fokker-Planck の方程式を用いた理論解析と Gillespie の確率シミュレーションを用いて解析した。決定論的モデルからは見えてこないノイズに関する生物特有の設計原理を解明した。2 遺伝子間の相互抑制ネットワークと相互活性化ネットワークの決定論的挙動と確率的挙動を解析した。決定論的モデルでは双安定性を示さない相互抑制ネットワークに、ノイズを付与すると、双峰性の遺伝子発現分布が現れた。決定論的モデルは、双安定性を与える正のフィードバックループ構造をもつ相互抑制ネットワークによって、メモリー機能を容易に作ることができた。しかし、確率的モデルでは、メモリー機能を実現するために負のフィードバックループを追加してロバストネスを向上させる仕組みが必要であった。以上をふまえて、ノイズが引き起こす確率的挙動を考慮した実用的細胞合成技術を提案した。

研究分野：合成生物学

キーワード：確率モデル 相互活性化モデル 相互抑制モデル Fokker-Planck Gillespie

1. Introduction

Systems biology and theoretical biology have revealed some mechanisms of how a biochemical network generates a variety of functions such as switching, amplification, adaptation, pulse generation, oscillation, and memory. A positive feedback loop of a mutual activation network comprising p42 MAPK and Cdc2 presented a bistable memory module. Coupling of mutual inhibition proteins (LacI and TetR or LacI and cI) of prokaryotic genes with ultrasensitivity addressed the bistable gene expression memory module in *E. coli*. To our knowledge, accurate comparison of the mutual activation and mutual repression has not been performed. It is interesting to reveal mechanisms by which different types of mutually closed loops generate memory function.

2. Objectives

We investigated two types of gene regulatory network models: regulated mutual activation network (MAN); regulated mutual repression network (MRN). The mathematical comparison was used to analyze the deterministic or stochastic memory between the proposed models at the steady state.

3. Methods

We constructed two simple models of the gene regulatory networks that consist of two genes encoding a transcription factor, as shown Fig. 1. We calculated the ordinary differential equations for deterministic simulation. The Gillespie algorithm was used to perform the stochastic simulation. The MATLAB (Mathworks) was employed. The Fokker-Planck equations were used for theoretical analysis.

4. Results and Discussion

We analyzed the mechanism of how competitive gene regulatory networks generate a robust memory under noise. For the MAN model, we showed that persistent memory is obtained in deterministic or in stochastic approaches for hill coefficient $n=2$ (Fig. 2). On the other hand, the MRN model neither obtained persistent memory in the deterministic nor in stochastic approaches for hill coefficients $n=2$ and $n=3$. The full stochastic memory requires a high hill coefficient $n=8$. In the MRN model, noise may deteriorate the memory. The MAN model exhibited a larger memory window for both the deterministic and stochastic approaches than the MRN model. The MAN model is more convenient compared to the MRN model in

order to realize more reliable memories in noisy genetic environments.

Mathematical comparison of the theoretical networks improved an understanding of the potential applications of engineered memory networks.

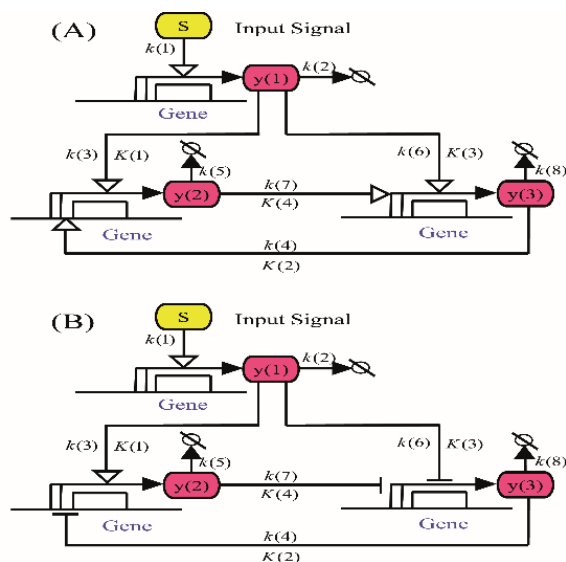


Fig. 1 Employed gene regulatory networks. (A) MAN model; (B) MRN model.

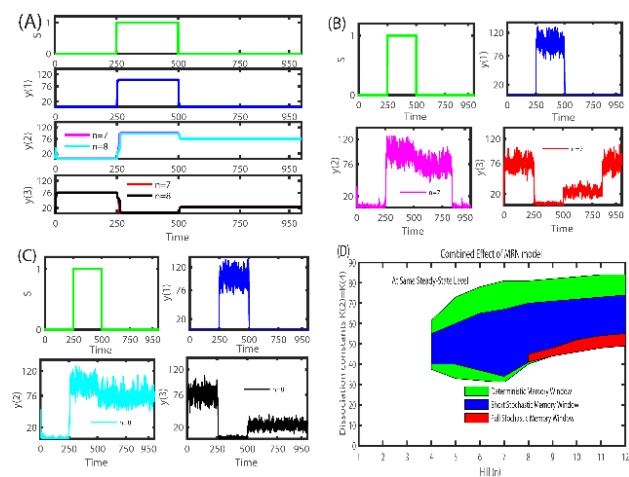


Fig. 2 Analysis of the MAN model (A) Deterministic simulations (B-C) Corresponding stochastic simulations which shows the short and full memory respectively (D) Memory windows (green, blue and red colors area represents the deterministic, short stochastic and full stochastic memory windows respectively).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Hiroyuki Masunaga, Yurie Sugimoto,

Shigeyuki Magi, Ryunosuke Itasaki, Mariko Okada-Hatakeyama, Hiroyuki Kurata, Robustness analysis of the detailed kinetic model of an ErbB signaling network by using dynamic sensitivity, PLoS ONE, in press

2. A.B.M. Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Mathematical comparison of memory functions between mutual activation and repression networks in a stochastic environment. Journal of Theoretical Biology, in press.

〔国際会議紀要〕（計 3 件）

1. A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Competitive Memory Functions in Gene Regulatory Network. Information Processing Society 47th Bio and Information Science Society of guidance (IPJS), Vol. 2, pp. 1-3. 2016-BIO-47

2. A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Gene expression noise can induce stochastic bimodality, even multimodality in deterministically monostable description with non-cooperative binding. Bioinformatics and Biostatistics for Agriculture, health and Environment, 2017, ISBN: 978-984-34-0996-6, pp. 397-405.

3. A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Robustness of Memory Functions between Competitive Genes Regulatory Network. Proceedings of 4th International Symposium on Applied Engineering and Sciences (SAES2016), Kitakyushu, Japan, Paper-B17, Dec 17-18, 2016.

〔学会発表〕（計 7 件）

1. A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata, A Study of Genetic Noise in Biochemical Network, Proceedings of GIW/ISCB-Asia 2014, Tokyo, Japan, Poster-96, Dec 15 – 17, 2014

2. A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata, Stochastic Simulation of Dynamical Behavior in Gene Regulatory Network, Proceedings of “The Third BMIRC International Symposium for Virtual Physiological Human” Fukuoka, Japan, Poster-3, March 5 – 6, 2015

3. A.B.M. Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata, For mutually repression: Noise induced bimodality, even multimodality in deterministically monostable description without cooperative binding, Proceedings of GIW/InCoB2015, Tokyo, Poster-99, Sept 9-11, 2015

4. A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Memory Module in Stochastic Environment of Gene Regulatory Network. Proceedings of

Japanese Society for Bioinformatics (JSBI), Tokyo, Japan, Poster-48, Sept 29 to Oct 1, 2016.

5. A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Dynamic behavior of genetic networks by computer simulations. Proceedings of International conference on Bioinformatics and Biostatistics for Agriculture, health and Environment (ICBBAHE2017), Rajshahi, Bangladesh, January 24-25, 2017.

6. A.B.M.Shamim Ul Hasan, Hiroyuki Kurata: Enhancement of Gene Expression Memory Module in Stochastic Environment. Proceedings of BIT2016 and Kyutech-NYMU Joint Symposium for Biomedical Informatics & Biotechnology, Taipei, Taiwan, March 3-4, 2016.

7. Shamim Ul Hasan, 倉田博之, ノイズ下でロバストなメモリー機能を生み出す遺伝子ネットワーク機構の解明 化学工学会第 82 回年会、2017 年 3 月 8 日、芝浦工業大学（口頭発表）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cadlive.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田博之 (KURATA, HIROYUKI)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：90251371

(2) 研究分担者

無

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C01 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119717

研究課題名（和文）プロモーター配列の情報科学的解体と再構成による遺伝子回路の設計

研究課題名（英語）

研究代表者

矢田哲士（Tetsushi Yada）九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

連携研究者

鈴木穰（Yutaka Suzuki）東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

入江拓磨（Takuma Irie）東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教

研究成果の概要

人工遺伝子回路の大規模化と細胞プログラムの多様化への道を開くために、ここでは、体系的で網羅的なデータに基づいたプロモーターの転写活性の設計技術確立することを目指す。そこで、まず、野生型のヒトプロモーターについて、数万種類の変異型を用意し、それらの転写強度と塩基配列を体系的に測定する実験系を確立した。さらに、この実験系による測定データに基づいて、野生型プロモーターとその変異型プロモーターの塩基配列から、それらの転写強度を1塩基レベルの解像度で予測する回帰モデルを導出するアルゴリズムを開発した。そして、導出された回帰モデルに基づいて、野生型プロモーターの塩基配列を改変し、改変プロモーターの配列合成と転写活性の測定を通してプロモーターの転写活性の設計技術の評価した。具体的には、ヒト *EEF1a1* プロモーターについて、培養細胞 *HEK293* における変異型プロモーターの転写強度と塩基配列のデータを体系的に測定し、それらのデータに基づいて *EEF1a1* の野生型プロモーターと変異型プロモーターの転写強度を1塩基レベルの解像度で予測する回帰モデルを導出した。この回帰モデルを用いて *EEF1a1* の野生型プロモーターの塩基配列を改変したところ、転写強度の設計値と実測値の回帰直線は $y=0.96x-0.09$ (ほぼ $y=x$) であった。

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学, バイオインフォマティクス, 遺伝子発現調節, 配列設計

1. 研究開始当初の背景

人工の遺伝子回路の素子は互いに干渉することが多く、そうした複雑さが細胞をプログラムするために使える素子の数を制限し、遺伝子回路の大規模化とプログラムの多様化の大きな障壁になっている。これらの障壁を打ち破るためには、プロモーターの転写活性(培養細胞における転写強度)を巧みに設計することが求められる。しかし、プロモーターの塩基配列と転写活性の関係には未知の部分が多く、これまでは、極めて限られた知識によってプロモーターの転写活性が設計されてきた。

2. 研究の目的

ここでは、発見的で限定的な知識ではなく、体系的で網羅的な知識に基づいたプロモーターの転写活性の設計を実現し、人工遺伝子回路の大規模化と細胞プログラムの多様化への道を開く。ここでは、人工遺伝子回路の医学分野への応用を考え、ヒトをモデル生物とし、培養細胞として HEK293(human embryonic kidney cells 293)を用いた。

3. 研究の方法

①転写強度の回帰モデルの導出

野生型のヒトプロモーターについて、error-prone PCR を用いて数万種類の変異型を用意し、それらの転写強度と塩基配列を次世代シーケンサーを用いて体系的に測定する実験系を確立した。さらに、この実験系の測定データに基づいて、野生型プロモーターとその変異型プロモーターの塩基配列から、それらの転写強度を1塩基レベルの解像度で予測する回帰モデルを導出するアルゴリズムを開発した。ここでは、bolasso (bootstrap LASSO)を用いることで、導出されるモデルの過学習を防ぐとともに、統計的信頼性が高いモデルを導出することに成功した。

②プロモーター塩基配列の設計

導出された転写強度の回帰モデルに従って野生型プロモーターに塩基置換を導入することで、転写強度の設計技術を評価した。具体的には、回帰モデルが示唆する潜在的な転写因子の結合部位(TFBS)について、転写強度の増大が見込める幾つかの塩基置換を組み合わせて導入し、各改変プロモーターの転写強度をLuciferase レポーターアッセイを用いて測定した。さらに、複数のTFBSに塩基置換を組み合わせて導入し、同様の測定を行なった。

4. 研究成果

①転写強度の回帰モデルの導出

ここでは、ヒト EF1a1 プロモーターの34,000の変異型プロモーターを用意し、それらのHEK293における転写強度と塩基配列の

データを取得した。プロモーター長は1,100nt、変異型プロモーターにおける突然変異率は1.8%、突然変異の内訳は、置換が92%、挿入が1%、欠失が7%であった。

このデータを用いて導出した転写強度の回帰モデルを図1(a)に示す。10分割クロス検定によると、この回帰モデルは相関係数0.649で転写強度を予測することができる。また、この回帰モデルは、これまでに報告されているヒトEF1a1プロモーター中のTFBSを捉えている(-100.. -82がEFP1、-64.. -53がEFP2、-32.. -16がTATA box、-1.. +21が転写開始点(TSS)近傍のシグナル配列)。-77.. -68と-45.. -37には、潜在的なTFBSが存在していると考えられる。

②プロモーター塩基配列の設計

TFBS -77.. -68について、回帰モデルによって転写強度の増大が見込める3つの塩基置換を組み合わせて導入し、各改変プロモーターの転写強度を測定した(図1(b)左)。ここでは、塩基置換の組み合わせ的な導入による相加的な転写強度の増大が観察されたが、-74T>A、-72G>Aの導入では転写強度の低下が観察された。

そこで、その理由をTRANSFAC解析によって明らかにした(図1(b)右)。ここでは、野生型と各改変プロモーターの塩基配列について、TRANSFACが予測したTFBSとそれらに与えられたスコアを示す。それによると、多くの改変プロモーターではV\$CREB1_Q6がスコア0.93以上で予測されているのに対し、-74T>A、-72G>Aの改変プロモーターではV\$IRX2_01がスコア0.92で予測されている。すなわち、多くの改変プロモーターでは、置換の導入によってV\$CREB1_Q6が機能するが、-74T>A、-72G>Aの導入ではV\$CREB1_Q6が機能していないと考えられる。

次に、3つのTFBS(-100.. -82、-77.. -68、-45.. -37)に塩基置換を組み合わせて導入し、各改変プロモーターの転写強度を計測した(図1(c)左)。塩基置換の組み合わせ的な導入による相加的な転写強度の増大は、TFBSをまたいで観察され、転写強度の設計値と実測値の回帰直線は $y=0.96x-0.09$ (ほぼ $y=x$)であった(図1(c)右)。

さらに、3つのヒトプロモーター(EF1a1、GAPDH、DDX5)の転写強度の回帰モデルについて、TATA box プロファイルと比較した。すると、TATA boxのコア領域のプロファイルは互によく似ているが、その周辺はプロモーターごとに異なることが明らかになった。このことは、TFBS コアの周辺領域のプロファイルは、プロモーター全体のコンテキストに影響を受けていて、この領域への置換の導入は、プロモーターごとに異なる結果をもたらすことを示唆する。

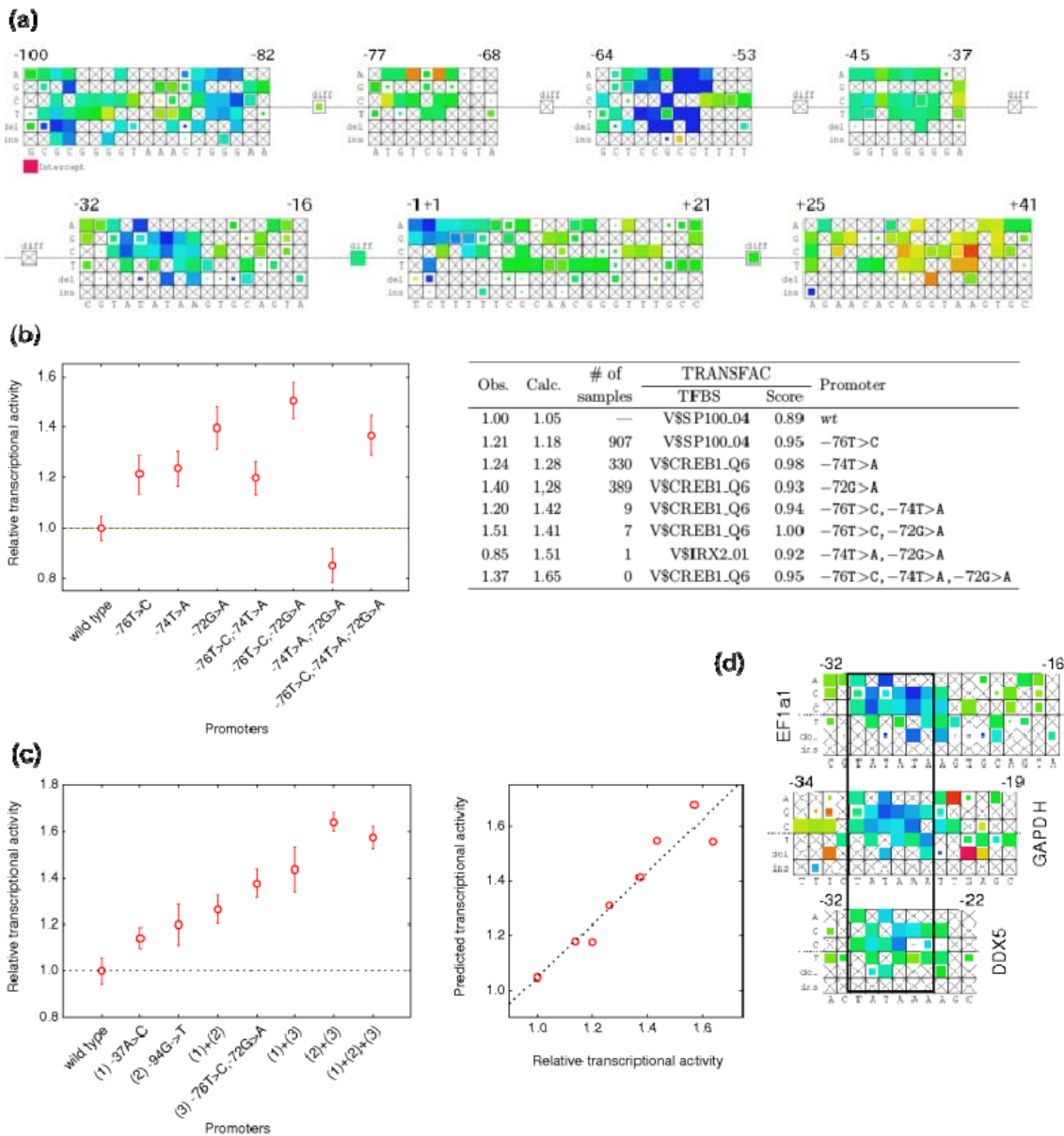


図 1: (a) ヒト EF1a1 プロモーターの転写強度の回帰モデル。回帰モデルは、TFBS 中の各位置における塩基と挿入・欠失のプロファイルと TFBS 間の距離のプロファイルから成る。上段の数字はプロモーター中の位置を表し(+1 が TSS)、下段の塩基は野生型プロモーターの塩基を表す。TFBS では、各位置における 4 つの塩基と挿入と欠失が転写強度に与える影響をプロファイリングしている。TFBS 間では、野生型プロモーターと変異型プロモーターの TFBS 間の距離の差が転写強度に与える影響をプロファイリングしている。赤は正の影響を、青は負の影響を表し、×印は影響がないことを表す。(b) 転写強度の回帰モデルに従って TFBS -77..-68 に塩基置換を組み合わせて的導入し、その転写強度を計測した(左)。 $-76T>C$ は、-76 番目の野生型の塩基 T を C に置換したことを表す。エラーバーは標準偏差を表す。ここでは、回帰モデルに従って転写強度の増大が見込める昇順で改変プロモーターを横軸に並べている。(c) 転写強度の回帰モデルに従って 3 つの TFBS(-100.. -82, -77.. -68, -45.. -37) に塩基置換を組み合わせて的導入し、その転写強度を計測した(左)。ここでも、転写強度の増大が見込める昇順で改変プロモーターを横軸に並べている。(d) 3 つのヒトプロモーター(EF1a1, GAPDH, DDX5)の転写強度の回帰モデルにおける TATA box プロファイルの比較。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① Liu Y, Irie T, Yada T, Suzuki Y, A new computational method to predict transcriptional activity of a DNA sequence from diverse datasets of massively parallel reporter assays, *Nucleic Acids Res*, in press.
- ② Ichinose N, Yada T, Wada H, Estimating optimal sparseness of developmental gene networks using a semi-quantitative model, *PLoS One*, 査読有, Vol. 12, 2017, e0176492, DOI: 10.1371/journal.pone.0176492
- ③ Maekawa S, Imamachi N, Irie T, Tani H, Matsumoto K, Mizutani R, Imamura K, Kakeda M, Yada T, Sugano S, Suzuki Y, Akimitsu N, Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance, *BMC Genomics*, 査読有, Vol. 16, 2015, 154, DOI: 10.1186/s12864-015-1358-y
- ④ Ichinose N, Yada T, Gotoh O, Tetrahedral gray code for visualization of genome information, *PLoS One*, 査読有, Vol. 9, 2014, e86133, DOI: 10.1371/journal.pone.0086133
- ⑤ Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N, Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli, *Mol Cell*, 査読有, Vol. 53, 2014, 393-406, DOI: 10.1016/j.molcel.2014.01.009

〔学会発表〕(計12件)

- ① 入江拓磨, 劉瑩, 榊原雄太, 門城拓, 関真秀, 菅野純夫, 矢田哲士, 鈴木穰, 次世代シーケンサーを用いた変異プロモーターの網羅的解析, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~2016年12月02日, 横浜.
- ② Yada T, Taniguchi T, Irie T, Suzuki Y, Functional dissection of human promoters at single-base resolution and its application to rational design of promoter sequences, 第5回生命医薬情報連合大会, 2016年09月29日~2016年10月01日, 東京.
- ③ 劉瑩, 入江拓磨, 門城拓, 矢田哲士, 鈴木穰, 変異導入プロモーターの転写

活性データを用いて転写制御コードを解読する, BMB2015(第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会), 2015年12月01日~2015年12月04日, 神戸ポートアイランド.

- ④ Yada T, Irie T, Taniguchi T, Suzuki Y, Next generation sequencing data and its bioinformatics analysis dissect genomic regulatory elements, International Symposium on Genome Science 2015, 2015年01月20日~2015年01月21日, Tokyo, Japan.
- ⑤ 入江拓磨, 門城拓, 劉エイ, 関真秀, 菅野純夫, 矢田哲士, 鈴木穰, 次世代シーケンサーによる変異プロモーターの網羅的解析, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日~2014年11月27日, 横浜.
- ⑥ 矢田哲士, ゲノム大規模データを解析する-転写制御領域の解読と設計-, 新生命科学分野開拓とスーパーコンピューター「京」. 2014年9月16日. 九州大学, 福岡. (招待講演)
- ⑦ Yada T, Computer aided design of human promoter sequences based on massively parallel reporter assay data, JSMB/SMB 2014. Jul 28-Aug 1, 2014. Osaka International Convention Center, Osaka. (招待講演)

他に5件の学会発表を行なった。

〔図書〕(計1件)

- ① 矢田哲士, 共立出版、人工知能学事典(遺伝子発見)、印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢田哲士 (YADA, Tetsushi)
九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授
研究者番号: 10322728

(2) 連携研究者

鈴木穰 (SUZUKI, Yutaka)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号: 40323646

入江拓磨 (IRIE, Takuma)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教
研究者番号: 50625944

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究区分：C03 班 公募研究

研究期間：2014-2015

課題番号：26119719

研究課題名（和文）ダイナミックモデルを用いた代謝システムの安定性の解明

研究課題名（英語）Study on robustness of metabolic systems using dynamical modeling

研究代表者

古澤力（Chikara Furusawa） 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究成果の概要

代謝のダイナミクスは、環境条件に応じて様々に変化することが可能であるが、どのような制御によってその安定性が維持されているかは不明な点が残されている。そこで本研究では、細胞モデルを用いた数理的なアプローチにより、代謝ダイナミクスが持つ一般的な性質を解析した。その結果として、定常状態を仮定することにより、取り得る状態変化が低次元のダイナミクスに拘束され、小さい環境摂動を与えた場合の応答が、全ての変数（タンパク質や代謝物質量）で一定のトレンドに従うことが示された。また、ATP や NADH などの循環的な反応を持つ補酵素を取り入れた代謝モデルにより、素反応の時間スケールより十分に長い時間スケールの緩和ダイナミクスが出現することを明らかにした。今後、この数理的な解析からの予言を実験的に検証する必要があるが、ここで示された性質は、合成生物学アプローチによる構成論的理解に貢献すると期待される。

研究分野：生物物理学

キーワード：代謝システム 計算機シミュレーション 力学系

1. 研究開始当初の背景

代謝のダイナミクスは、環境条件に応じて様々に変化することが可能であるが、どのような制御によってその安定性が維持されているかは不明な点が残されている。実際に、複雑な代謝ネットワークを微分方程式を用いてモデル化すると、力学系として容易に不安定化してしまい、広いパラメータ領域において非自明な解（増殖をする状態）を安定に保つことが難しい。むしろ、精巧な代謝反応の制御がその安定性の維持を担っていると考えられるが、その制御機構がどのような性質を持つ必要があるか、明らかになったとは言い難いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、代謝ダイナミクスの安定性の解析を軸として、代謝システムの可塑性の理解を目指す。単に実験結果を再現する代謝モデルの構築を目指すのではなく、多様な環境に対して安定性を維持しつつ、適応・進化が可能である代謝というシステムの本質を理解することを目的とする。具体的には、高次元の代謝反応ダイナミクスを適切な微分方程式によって記述し、それが広い環境条件で安定であるためのメカニズムについて、進化シミュレーションを用いて解析する。代謝ダイナミクスが安定であるために必要な代謝ネットワークの構造や、制御機構の存在様式を抽出し、既知の代謝ネットワークに関する情報と対比させることにより、そこでの一般的な性質を探索する。こうした解析により、合成生物学的アプローチによる代謝改変に向けて、どのような代謝システムへの摂動が可能で、どのような摂動がシステムの不安定化をもたらすかを予言し、検証可能な実験システムの提案を行う。

3. 研究の方法

①定常増殖する細胞系における状態変化の解析

増殖する細胞系における一般的な性質を探索するために、簡単な微分方程式モデルの数理解析と、内部に確率的な化学反応ネットワークを持つ細胞モデルの計算機シミュレーションを行い、その状態変化が従う一般的な性質を解析した。

②循環的な代謝反応を含む代謝ダイナミクスの解析

ATP や NADH などの循環的な反応様式を持つ補酵素が含まれた代謝ネットワークが、どのような性質のダイナミクスを持つかを簡単な数理モデルを用いて解析した。

4. 研究成果

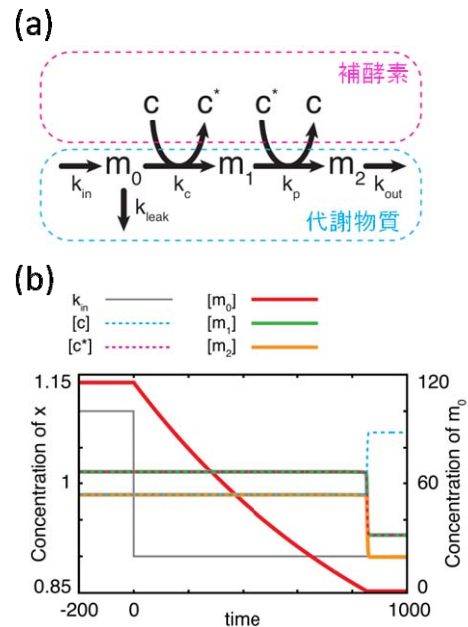
①定常増殖する細胞系における状態変化の解析

十分に大きい種類の化学成分を含み、定常的に増殖する細胞モデルを考える。簡単な数

理解析により、時間的に内部状態が変化しない定常状態を仮定することにより、小さい環境摂動を与えた場合の応答が、全ての変数（タンパク質や代謝物質）で一定のトレンドに従うことが示された。この数理モデルからの予言は、大腸菌にストレスを添加した場合の応答や、進化実験における表現型変化の実験データによく対応することが示された (Kaneko, Furusawa et al, Phys. Rev. X 2015; Furusawa and Kaneko, Jour. Roy. Soc. Inter. 2015)。こうした解析から、生体分子ネットワークが持つ普遍的な拘束条件を抽出することに成功した (Furusawa and Kaneko, submitted)。

②循環的な代謝反応を含む代謝ダイナミクスの解析

代謝反応ネットワーク、特に ATP や NADH などの循環的な反応様式を持つ補酵素が含まれた代謝ネットワークが、どのような性質のダイナミクスを持つかを簡単な数理モデルを用いて解析した。その結果、循環的な補酵素の反応が代謝ネットワークに存在することにより、その反応フラックスが保存量として振る舞い、それによる拘束を通じて、素反応の時間スケールより十分に長い時間スケールの緩和ダイナミクスが出現することを明らかにした (下図参照)。このようなガラス的な長い時間スケールを持つ緩和ダイナミクスの出現は、特定のモデルやパラメータに依存しない、代謝ダイナミクスが持つ



図：循環的な補酵素反応を含む代謝モデル。(a) モデルの概念図。代謝経路が補酵素 C と C^* の循環的な反応を含む。(b) 代謝物質濃度変化の一例。time=0 で流入フラックス (k_{in}) を変化させたとき、代謝物質濃度 $[m_0]$ の長い時間スケールを持つ緩和の後に $[m_1]$ と $[m_2]$ の急激な変化が生じる。

般的な性質であることが示唆された。また、こうしたダイナミクスにより、代謝システム全体が、環境変動や代謝物質量の揺らぎに対して頑強性を持つことが示された (Hatakeyama and Furusawa, submitted)。今後、この数理的な解析からの予言を実験的に検証する必要があるが、ここで示された性質は、合成生物学アプローチによる構成論的理解に貢献すると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① “Global relationships in fluctuation and response in adaptive evolution”, *C. Furusawa and K. Kaneko, *Jour. Roy. Soc. Interface*, 12(109), 20150482 (2015) doi: 10.1098/rsif.2015.0482 査読有
- ② “Universal Relationship in Gene-Expression Changes for Cells in Steady-Growth State”, K. Kaneko, C. Furusawa and T. Yomo, *Phys. Rev. X*, 5, 011014 (2015) doi: 10.1103/PhysRevX.5.011014 査読有
- ③ “Phenotypic changes associated with the fitness cost in antibiotic resistant *Escherichia coli* strains”, S. Suzuki, T. Horinouchi, *C. Furusawa, *Molecular Biosystems*, 12(2), 414-20 (2016) doi: 10.1039/c5mb00590f 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 古澤力, 代謝デザインへ向けたシステムバイオロジー, 第 105 回発酵学懇話会, 2014/8/19, キリンビール(株)神戸工場 (兵庫県神戸市)
- ② Chikara Furusawa, Creating stress tolerant bacterial cells by experimental evolution, 5th Asian Symposium on Innovative Bio-production and Biorefinery, 2014/9/10, Tainan(Taiwan)
- ③ Chikara Furusawa, Theoretical/experimental analysis of robustness and plasticity in biological systems, 第 56 回日本植物生理学会年会シンポジウム, 2015/3/16, 東京農業大学(東京都世田谷区)
- ④ 古澤力, ゲノム解析の先に何が見えるか? ~大腸菌進化実験の表現型・遺伝子型解析~, 1030 回生物化学セミナー (東京大学理学部生物学会), 2015/5/10, 東京大学 (東京都文京区)
- ⑤ Chikara Furusawa, Phenotypic Convergence in Experimental Evolution of Antibiotic Resistant Bacteria, 2nd Symposium on Complex Biodynamics Networks, 2015/5/12, 鶴岡市先端研究産業支援センターレクチャーホール(山形県鶴岡市)
- ⑥ 古澤力, ゲノム解析の先に見えるもの: 大腸菌進化実験の表現型・遺伝子型解析,

NGS 現場の会第 4 回研究会, 2015/7/2, 筑波国際会議場(茨城県つくば市)

- ⑦ 古澤力, 適応進化ダイナミクスの解明: 微生物実験と理論解析, 東京大学理学部物理学科談話会, 2015/7/17, 東京大学(東京都文京区)
- ⑧ Chikara Furusawa, Toward Understanding of Adaptive Evolution: Computational Analysis and Experimental Evolution, QBIC Symposium: High-dimensional data for the design principles of life, 2015/8/24, 理化学研究所生命システム研究センター(大阪府吹田市)
- ⑨ 古澤力, 大自由度ダイナミクスから「生きている状態」の記述へ, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015/9/14, 金沢大学角間キャンパス(石川県金沢市)
- ⑩ 古澤力, 大腸菌の進化実験を用いた進化ダイナミクスの解析とその応用, 第 67 回日本生物工学大会, 2015/10/28, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)
- ⑪ 古澤力, 生物システムの安定性と可塑性: 大腸菌進化実験によるアプローチ, 山田研究会「生物と非生物をつなぐ」, 2015/11/16, ラフォーレ修善寺(静岡県伊豆市)
- ⑫ 古澤力, 生物システムの安定性と可塑性: 理論と実験からのアプローチ, 第 34 回 BMIRC 研究会, 2015/12/10, 九州工業大学(福岡県飯塚市)
- ⑬ 古澤力, 大腸菌進化実験と細胞シミュレーションを用いた適応進化ダイナミクスの解析, 第 38 回日本分姿勢武具学会年会シンポジウム, 2015/12/2, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

[図書] (計 1 件)

- ① 「進化学に残された謎: 複数の形質が絡み合う進化プロセスはどのようにして可能か?」, 古澤力, 進化の謎をゲノムで解く, 学研メディカル秀潤社, p. 8-19 (2015)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
<http://www.qbic.riken.jp/mbd/index.html>
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ubifurusawa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 古澤力 (FURUSAWA, Chikara)
 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー
 研究者番号: 00372631