

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でき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。これら的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