

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20300102
 研究課題名（和文） シミュレーションと分子生物学実験の融合による人工遺伝子回路網のシステム設計
 研究課題名（英文） System design of artificial genetic circuit by integration of dry and wet experiment
 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：60283397

研究成果の概要（和文）：

ラムダファージプロモータを用いた、発振ユニットの構築を行った。その結果、pRMプロモータの発現強度が弱いことが問題となった。発現量が向上を狙いpRMプロモータの変異、リボゾーマルバンインディングサイトの変更を行ったが、望むような結果にはならなかった。プロモータの発現強度のバランス、培養環境の不均一性が原因であると予想された。

lac および tet リプレッサーを利用したトグルスイッチの構築を行った。placIq-lacI 遺伝子を、ゲノム、低コピープラスミド、中コピープラスミドに導入したところ、低コピープラスミドに導入した場合のみ、望みの動作をした。このデータに基づき、理論モデルを構築したところ、実験データを再現できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

By using lambda phage promoters, construction of oscillatory genetic circuit was carried out. From the preliminary experiment, the expressional weakness of pRM promoter is problem for the oscillation. In order to increase the expression level from pRM promoter, several mutations of pRM and RBS with higher translation efficiency were applied to this circuit. Despite these efforts, we could not get the continuous oscillation.

By using lac and tet repressors, we tried to construct a toggle switch. *placIq-lacI* gene was introduced into genome, on low copy plasmid, or medium copy plasmid. The toggle switch on high copy plasmid was transformed with each *pLlacIq-lacI* gene. As the result of the GFP expression experiment, only the strain with low copy plasmid as a source of lac repressor worked as we desired. Mathematical model was also constructed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：合成生物学

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：生体生命情報学、生物・生体工学、システム生物学、合成生物学、システム解析

1. 研究開始当初の背景

近年、複数の相互に調節しあう遺伝子を組み合わせ、遺伝子発現の発振現象などを起こさせる人工遺伝子回路 (Genetic circuit) または合成生物学 (Synthetic biology) と呼ばれる研究が行われ始めている。この研究では、遺伝子相互の制御関係を利用し、それらの遺伝子を人工的に組み合わせることで、複雑な遺伝子発現を実現することを目指している。この研究分野は、システム制御および設計に相当すると考えられ、特に実験と計算サイド両方からのアプローチが必要である。しかし、海外では少数のグループが実験・計算サイド両方の研究を行っているが、国内では計算サイドのアプローチがわずかに数例なされているだけである。

2. 研究の目的

本研究では、合成生物学に関する過去の研究を融合・発展させ、環境変化により遺伝子発現の ON-OFF を自在にコントロールするトグルスイッチユニット、永続的な発振を行う発振回路ユニットなどの開発・改良を行い、これらを組み合わせることで、まるで電気回路を設計するように、自由に望みの発現パターンを実現する人工的な小規模遺伝子発現制御系 (以下、人工遺伝子回路網と呼ぶ) のシステム設計を目指す。

3. 研究の方法

発振ユニットは、2005年に報告された Fungら (Nature) のメタボレータを基本構造とした。この発振回路では、発現した遺伝子が翻訳され、翻訳された遺伝子が代謝物を変換する酵素として働く。そして、代謝物が遺伝子発現をコントロールする構造となっている。メタボレータの概要を、以下に詳しく述べる。M1 および M2 は代謝物、E1 および E2 はそれらを代謝する酵素として考える。初期状態では解糖などの代謝経路により、代謝物 M1 が生産されることにより蓄積する。この状態では M1 を基質に M2 を生産する酵素である E1 が発現する。E1 により M1 の濃度が徐々に低下し、逆に M2 の濃度が上昇する。そして M2 が高濃度になり、M1 が低濃度の状態になる。この状態の時に代謝物 M2 が酵素 E1 の発現を抑制、E2 の発現を促進することで M2 から M1 への反応量が増大する。M2 から M1 への反応がおこなわれることで M2 の濃度は低下し始め、逆に M1 の濃度は上昇する。最終的には初期状態と同じ M1 が高濃度で M2 が低濃度の状態になる。

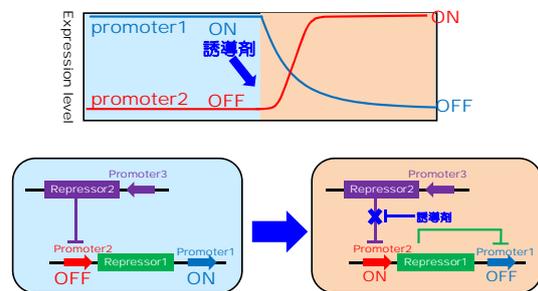
実際の分子としては、M1 にアセチル CoA、M2 に酢酸、E1 に Pta (phosphate acetyltransferase)、E2 に ACS (acetyl-CoA synthetase)、酢酸感受性プロモータとしては *glnAP2* プロモータを用いた。glnAP2 プロ

モータ下流に ACS および lacI リプレッサーを配置している。

本研究では、*glnAP2* プロモータ下流にラムダプロモータの CI 遺伝子を配置し、Pta および ACS の発現調整に、ラムダファージプロモータを利用することで、よりシンプルな構造とし、ラムダファージで得られた知見を応用することで、ユニットの改良が容易になると考え、ユニットを構築した。

二つの遺伝子の発現の ON、OFF を同時に制御できるスイッチである遺伝子トグルスイッチの作製を行った。遺伝子トグルスイッチとは二つの遺伝子のうち片方の発現が ON になっている時に、もう片方の発現を OFF にするようなスイッチである。

以下のような仕組みを設計することで遺伝子トグルスイッチを実現できると考えた。



この仕組みでは、初期状態では紫色でしめす Promoter3 よりリプレッサーが恒常的に発現し、赤で示す Promoter2 からの転写は OFF になっている。このとき、青で示す Promoter1 からの転写は ON になっている。

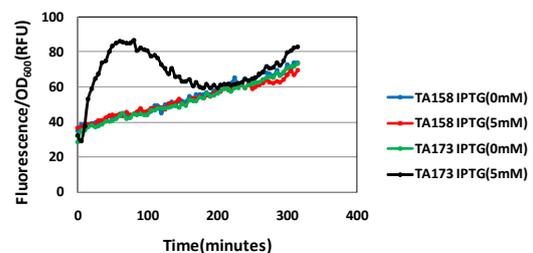
ここで、Repressor2 の機能を抑制する誘導剤を加えることにより Promoter2 が ON になり、同時に発現する repressor1 のタンパク質により Promoter1 からの転写は OFF になる。

本研究では上記の仕組みを用いて遺伝子トグルスイッチの作製を目指した。

4. 研究成果

1) 発振回路ユニットについて

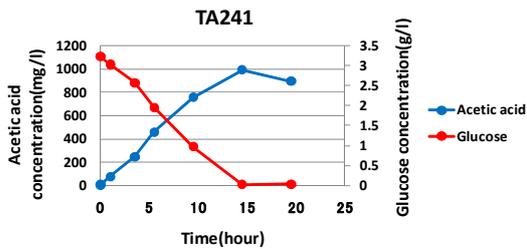
Wt 株である TA158 および発振ユニットを導入した TA173 を用いて、遺伝子発現実験を行った。



IPTG の添加と同時に、ユニットが動き出し、約 150 分で一つのピークが確認された。しかし、200 分前後に再び上昇し始めた蛍光強

度は下がることなく上がり続け周期的な発振現象を観察することはできなかった。また、IPTGを添加していないTA173や宿主株であるTA158の蛍光強度も徐々に上昇し続けることから、GFP以外のタンパク質など菌の増殖に伴い産生される物質も蛍光を持っていると考えられた。

発振が継続しない原因を調べるために、酢酸濃度およびグルコース濃度を測定した。設計した通り、発振現象が起こるのであれば、酢酸濃度は振動するはずである。



TA241は、別のタイミングで形質転換を行ったTA173と同じ株である。酢酸濃度は上記のグラフのように振動することなく上昇し続け、グルコースの枯渇と同時に生産が止まるという結果を示した。これは、アセチル CoA から酢酸を生産する経路と比較して、酢酸からアセチル CoA を生産する経路の代謝流量が小さいということを示している。すなわち、酢酸からアセチル CoA を生産する酵素である ACS の活性が不十分である、もしくは ACS を発現させる PRM プロモータの転写活性が弱いと考えられた。

pRM プロモータ支配下に ACS を導入したところ、遺伝子発現が弱いと考えられたため、pRM プロモータからの遺伝子発現量を増加させることを試みた。具体的には文献上で pRM プロモータ遺伝子発現量を約 2.5 にしている prmp-1 という変異を導入することにした。pRM(prmp-1)および pRM の下流に、GFP を導入し、IPTG 誘導型プロモータ下流に CI 遺伝子を導入した。この株に、IPTG を添加し、遺伝子発現を観察したところ、どちらの株からもほとんど GFP が観察されなかった。同様に、pRM プロモータの OR2 領域に他の文献で報告されている変異を加えたが、変化は観察されなかった。

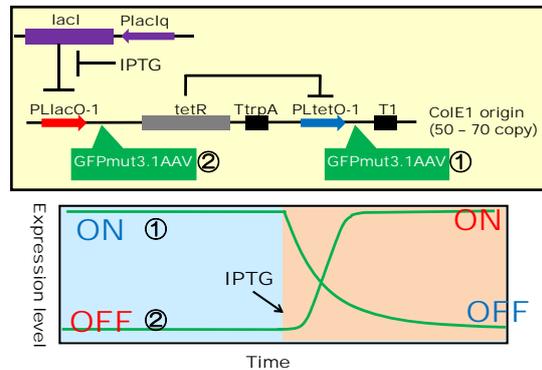
本研究では、レポーター遺伝子として GFP を用いたが、GFP はある程度の発現量がないと今回の観測方法では感知できない可能性がある。これは、pRM プロモータの発現が、ほとんど観測されなかった理由と考えられる。また、培養期間を通じて、細胞増殖、グルコース濃度の変化、溶存酸素や温度の変化などがあるのも、安定した発振現象の継続には問題となったと考えられる。いずれにしても、今回選択したラムダファージプロモータが、全体のシステム設計に大きな影響を与え、

設計したような結果にならなかったと考えられた。

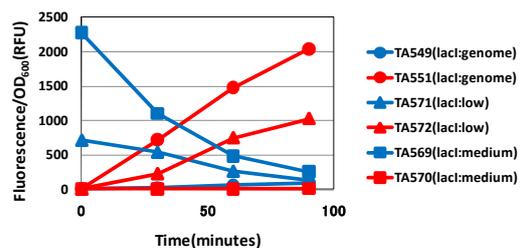
今後は、マイクロ流体リアクターを利用した環境の精密制御、プロモータ強度のバランスに関する検討が必要であると考えられた。

2) トグルスイッチについて

トグルスイッチ構築のため、PLlacOI および PLtetOI プロモータを用いて、下記のような遺伝子回路を構築した。



トグルスイッチ遺伝子群は、高コピープラスミドに導入し、レポーター遺伝子としては、GFP を用いた。二つのスイッチ (プロモータ) の活性を見るために、一つのプロモータの下流に GFP 遺伝子を持つ株、PLtetOI の下流に GFP 遺伝子を持つ株の二種類を作成し、各々のプロモータの活性を観察することとした。lacI 供給源として、placIq-lacI 遺伝子をゲノム (1 コピー)、低コピープラスミド、中コピープラスミドに導入した。コピー数が増えることで、lacI の供給速度が上昇することとなる。これらの株を用いて、発現実験を行った結果が下図である。



赤のプロットが PLlacOI の支配下に GFP を配置した株を示しており、青のプロットが PLtetOI の支配下に GFP を配置した菌株を示している。この結果から、lacI 供給源として低コピープラスミドを用いた場合のみ、トグルスイッチとしての機能していることがわかった。

これは、lacI の供給速度が速すぎると、IPTG 添加にもかかわらず、pLlacOI プロモータから転写が起きず、逆に、lacI の供給速度が低すぎると、pLlacOI プロモータからの転写抑制が不十分で、tet リプレッサーが生産

され、pLtetOI プロモータからの転写が起これないことを示している。

この事象について、数理モデルを作成し、解析したところ、実験結果をよく再現できることがわかった。

以上の研究を通じて、各生体分子を望みの事象が起こるよう配置してみても、予想以外の事象および相互作用のため、なかなか望みの事象が実現できないと明らかになった。このため、数学モデルによる理論解析の重要性がさらに強調される結果となった。また、細胞の周りの環境を、精密にコントロール必要があることもわかった。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

安武俊輔・花井泰三、遺伝子トグルスイッチの構築と解析、日本生物工学会、2010/10/28、宮崎市

花井泰三・安武俊輔・岡本正宏、遺伝子トグルスイッチの試作とその特性、化学工学会、2010/3/24、小金井市

[その他]

ホームページ等

<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：60283397

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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：40211122