

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20700271

研究課題名（和文） システム生物学・構成的生物学に基づく弛張型発振経路の設計と構築

研究課題名（英文） Design and construction of genetic relaxation oscillators based on systems and synthetic biology.

研究代表者

柚木 克之（YUGI KATSUYUKI）

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：70433745

研究成果の概要（和文）：弛張型発振回路(relaxation oscillator)として機能する人工遺伝子回路を設計し、微生物細胞内に構築することを試みた。要素技術として、(1)蛍光イメージングによる反応速度論定数測定系、(2)細胞内ノイズを利用した分子数推定系、の2手法を開発し、さらに細胞シミュレーション技術によるシステムの挙動予測と特性解析を行った。これにより、従来は ad hoc に構築されていた人工遺伝子回路設計を合理的に行うことができる。

研究成果の概要（英文）：Design and measurement methods for rational design of artificial genetic networks were developed toward constructing genetic relaxation oscillators. The measurement methods are employed for

quantification of kinetic parameters of "genetic parts" composing the genetic circuits. Integration of these measurement methods and in silico model enables rational design of artificial genetic circuits.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：生体生命システム情報学、構成的生物学

1. 研究開始当初の背景

近年、天然の細胞から見つかった制御機構を、遺伝子工学技術を用いて人工的に作り出すことを目指す合成生物学あるいは構成的生物学 (synthetic biology) と呼ばれる分野が勃興しつつある [1]。例えば、プリンストン大学の Elowitz と Leibler はリング発振器の構造にヒントを得て、3つのリプレッサー遺伝子 (*lacI*, *tetR*, λcI) がネガティブ・フィードバックによって互いの発現を抑制し合う人工的な転写制御系 (人工遺伝子回路)

を設計し、大腸菌内に構築した [2]。この制御系を構成する遺伝子の発現量は時間的に振動し、その波形は正弦波状になることが確認された。Elowitz らはこれを "repressilator (repressor + oscillator)" と名づけた。repressilator は構成分子の数が限られている上に、その性質もよく知られているため、同じく正弦波状の振動を示す概日リズムの機構を解析するためのモデル系として盛んに取り上げられている [3]。

一方、正弦波の発振とは別に、スパイク状

の振動を起こすメカニズムとして弛張型発振回路 (relaxation oscillator) が知られている。弛張型発振回路は速い(時定数の小さい)ポジティブ・フィードバックと遅い(時定数の大きい)ネガティブ・フィードバックを組み合わせることで構成できる。生体内現象としては、洞房結節(心臓ペースメーカー)や細胞周期が弛張型発振回路と同等のメカニズムによって機能していることが知られている [4]。

弛張型発振回路として機能する人工遺伝子回路は未だに構築されていない。ただし、実現可能性については複数の理論的研究が存在し、アクチベーターとプロテアーゼによって速いポジティブ・フィードバックと遅いネガティブ・フィードバックを実現する方法が議論されている [5, 6]。

2. 研究の目的

本研究のゴール：弛張型発振回路の人工的構築

本研究では、これまで実細胞で人工的に実現されたことの無い弛張型発振回路の構築を目指した。研究代表者は、実際の微生物(主に大腸菌)で弛張型発振回路の構築に成功していないのは、(1)既存研究で提唱された系では遺伝子発現の反応速度パラメータの調節が困難であり、さらに、(2)シミュレーション・モデルの反応速度パラメータが実態を反映していないことが原因であると仮説を立てた。そこで本研究では(1)を解決するため、研究代表者らが構築済みの大腸菌デュアル・プロモーターを利用した。このプロモーターは構成的生物学における「分子部品標準規格」を提唱する”Registry of Standard Biological Parts” (<http://parts.mit.edu>) に BBa_J54143 および BBa_J54154 として登録済みである。この分子部品は2つの転写制御因子(例: AraC と LacI) がともに IPTG 等の有機小分子(以下、インデューサーと総称)によって誘導可能であるため、培地に添加するインデューサーの量によって発現強度 (= 反応速度パラメータ) の調節が可能である。(2)については、システム生物学分野において Weizmann Institute の Ronen らが開発した、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて測定したプロモーター活性の時系列から反応速度パラメータを求める手法 [7] を一部改変して用いる。また、振動周期が変動するなど、ノイズによって発振回路が不安定になったと考えられる現象が見られた場合には、ロバストネス向上のため遺伝子回路の設計を変更する。設計の指針としては、ネガティブ・フィードバック等によってノイズが低減されることを示したシステム生物学の先行事例 [8] を適宜応用する。

本研究の意義：細胞周期発振メカニズムのモデル系

研究期間中には、まず人工遺伝子回路の構成部品として用いるプロモーターの反応速度論定数を蛍光イメージングにより測定する系の確立を最優先する。測定した諸定数は微分方程式モデルに反映させ、これを元にシミュレーションおよびモデル解析(相平面解析、分岐解析)で系の発振可能性を評価する。発振可能性を示したシミュレーション結果に基づいて弛張型発振回路を設計・構築する。遺伝子の集積はプラスミド上または染色体 DNA 上で行う。最終的に発振回路の構築が完了すれば、細胞周期発振メカニズムを理論・実験の両面から解析するためのモデル系として応用が期待できるほか、「部品」となるプロモーターの定量的計測からシステムの設計・構築までを一貫して行った研究例として、構成的生物学の方法論を具現化した先駆的な業績となりうる。

3. 研究の方法

プロモーター活性時系列測定系の確立

転写制御因子およびそのターゲット遺伝子のプロモーター活性を蛍光強度時系列として測定する系を構築する。

まず、有機小分子によって発現誘導可能なプロモーター(例えば P_{BAD}) の直下に *gfpmut3* 遺伝子を持つプラスミド”Reporter 1”を構築する。この Reporter 1 は転写制御因子の発現時系列測定に用いる。次に、ターゲット遺伝子の測定に用いる”Reporter 2”プラスミドを構築する。Reporter 2 は P_{BAD} プロモーター直下に任意の転写制御因子遺伝子(ここでは *LuxR*) を、その転写制御因子によって調節されるプロモーター (P_{LUX}) の直下に *gfpmut3* 遺伝子を持つように設計する。

構築した Reporter 1, 2 プラスミドはどちらか片方を大腸菌に形質転換し、インデューサー(ここではアラビノース)を与えて発現を誘導する。その結果、Reporter 1 プラスミドを持つ株からは転写制御因子の発現時系列が、Reporter 2 プラスミドの株からはターゲット遺伝子の発現時系列が取得できる。通常、ターゲット遺伝子の発現速度式は転写制御因子の関数として表されるので、速度式の形が定まれば、転写制御因子およびターゲット遺伝子の時系列から速度式のパラメータが推定できる。本研究計画では、文献[2]等で用いられている Hill 式を採用し、そのパラメータを時系列に合うよう推定する。

弛張型発振回路とパラメータ推定

弛張型発振回路の構築には、速いポジティブ・フィードバックと遅いネガティブ・フィードバックが1つずつ必要であることが知られている [5, 6]。これを実現するため、我々

はアクチベーターである LuxR タンパク質とリプレッサーである LacI タンパク質を組み合わせた遺伝子回路を考案した。

LuxR タンパク質の結合部位 (LuxR-BS) を luxR 遺伝子の転写開始点上流に置くことで LuxR の自己活性化を実現できる。また一方、LuxR は lacI 遺伝子の発現も誘導するが、LacI タンパク質結合部位 (LacI-BS) は luxR 遺伝子の転写開始点直下に配置する。これにより、LacI を介したネガティブ・フィードバックを実現する。LuxR および LacI タンパク質がプロモーター活性に与える影響の大きさは、AHL、IPTG 等の有機小分子の濃度によって調節可能である。

これらの転写調節領域のうち、LuxR-BS と LacI-BS を持つデュアル・プロモーターは作製済みである。これを luxR 遺伝子上流に配置し、前記の発現時系列測定系を用いて速度式のパラメータを推定する。LuxR-BS を持つ lacI 遺伝子についても同様にパラメータ推定を行う。ここまでの過程に必要なプラスミド、オリゴ DNA プライマー、培地等各種試薬のほかコンピテントセルを実験試薬費から購入する。

取得したパラメータを元に微分方程式モデルの構築を開始し、助成申請した数式処理ソフト (Mathematica、MATLAB 等を想定) を用いて、発振するパラメータを探索する。また、International Conference on Systems Biology にて進捗状況と展望を発表し、本研究について国外の研究者からの助言・批判を仰ぐ。

前記の準備段階が完了した後、シミュレーションによる発振条件探索、培地の条件検討、染色体 DNA 上での遺伝子集積シミュレーション・モデルを線形化して得たヤコビ行列の固有値から Hopf 分岐の存在、すなわち発振の可否を判定する。振動が起きないと予測された場合、培地に添加するインデューサーの濃度条件を変更してプロモーター活性を再測定する。発振するパラメータセットが得られるまでこれを繰り返す。また、時系列計測の結果がバラつきやすい遺伝子の発現にフィードバック・ループを加えた場合のモデルも検討する。

発振パラメータが得られたら、その条件下で弛張型発振回路に相当する人工遺伝子回路を構築する。プラスミド DNA 上にて構築を完了した人工遺伝子回路は染色体 DNA に移し、ゲノムの一部として安定的に存在可能か検証する。染色体 DNA への遺伝子挿入状況を確認するため、設備備品費に計上した染色体 DNA 電気泳動装置 (冷却水循環装置、パルスタイマーを含む) で染色体 DNA の電気泳動を行い、「TITECH HB100B」 (ハイブリダイゼーション・オープン) を用いてプローブとのハイブリッド形成を確認する。

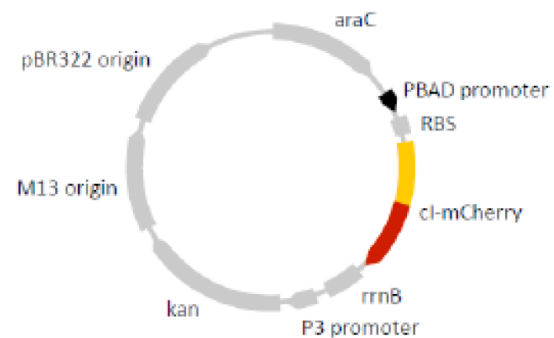
4. 研究成果

本研究で目指す人工遺伝子回路の合理的設計・構築のためには、構成部品となる各種転写調節因子と、その制御下にあるプロモーターとの入出力関係を定量測定することが欠かせない。そこでまず、大腸菌の 1 細胞蛍光イメージングにより、蛍光強度時系列から転写調節因子とプロモーターとの入出力関係を定量測定する系の確立を第一目標とした。

当初計画では大腸菌群の蛍光をバルクで計測することを想定していたが、二色蛍光イメージングを用いることで、1 細胞における転写制御の入出力関係が測定可能となった。ここで入出力関係とは、プロモーター直下に置いた遺伝子の発現速度を転写調節因子濃度の関数として表した反応速度式のことを指す。

最初に測定する転写調節因子には λ cI リプレッサー (CI タンパク質) を選び、これを赤

pBAD18-cl-mCherry



pZC320-PR-gfpmut3b

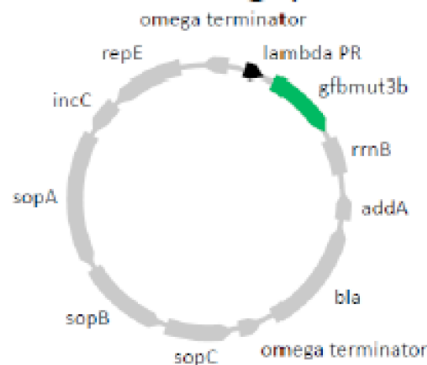


図 1(上) mCherry で標識した λ cI リプレッサー遺伝子を保持する pBAD18-cl-mCherry プラスミド。(下) CI リプレッサーで調節される pR プロモーター直下に gfpmut3b 遺伝子を配置した pZC320-PR-gfpmut3b プラスミド。

色蛍光タンパク質 mCherry と融合したものを「入力」のプローブとして P_{BAD} プロモーター

の直下に配置したプラスミド pBAD18-cI-mCherry を構築した(図 1 上)。CI リプレッサーによって発現強度が左右される P_L プロモーターの直下には緑色蛍光タンパク質の変異体である *gfpmut3b* 遺伝子を配置し、これを「出力」のプロンプとした(図 1 下)。

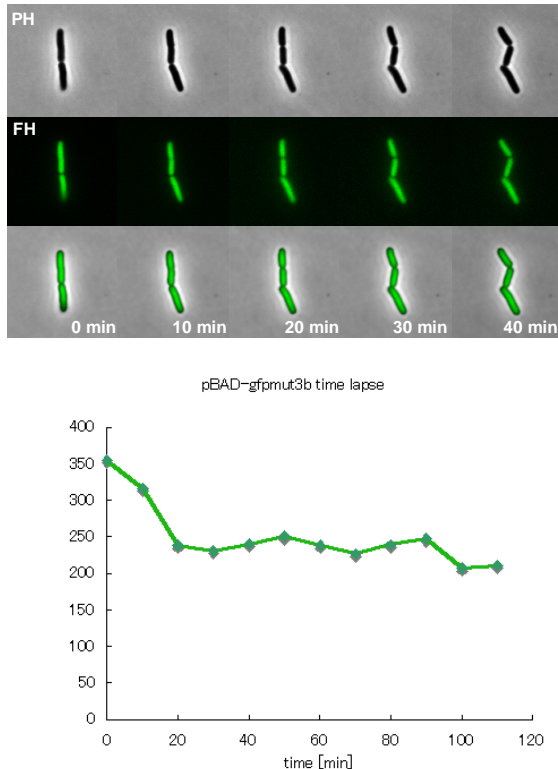


図 2(上) GFPmut3b を発現する大腸菌を経時的に追跡した連続写真(一部)。上段は位相差像、中段が蛍光像、下段は前二者を重ね合わせたもの。GFPmut3b は pZC320-PR-gfpmut3b プラスミドから発現する。(下)上の写真から得られた蛍光強度時系列。

まず、緑色蛍光について、細胞分裂する大腸菌の 1 細胞蛍光強度時系列を測定することに成功した(図 2)。

この DNA コンストラクトは、プロモーターや転写調節因子遺伝子をカセット化しているため、 λ cI リプレッサー/ P_R プロモーター以外の組み合わせの転写調節因子・プロモーターの定量測定に容易に応用可能な設計となっている。これを用いて、合成生物学で用いられている各種転写調節因子とプロモーターの入出力関係を定量測定できる。

二色蛍光の時系列計測に基づく速度論定数推定と並行して、人工遺伝子回路の設計とシミュレーションによる評価を行った。「3. 研究の方法」で示した遺伝子回路を(図 3)を

次のような二元の連立常微分方程式で記述した。

$$\begin{cases} \frac{d[LuxR]}{dt} = \alpha_A + \frac{V_A \left(\frac{[LuxR]}{K_A}\right)^n}{1 + \left(\frac{[LuxR]}{K_A}\right)^n + \left(\frac{[LacI]}{K_L}\right)^m} - d_A[LuxR] \\ \frac{d[LacI]}{dt} = \alpha_L + \frac{V_L \left(\frac{[LuxR]}{K_A}\right)^n}{1 + \left(\frac{[LuxR]}{K_A}\right)^n} - d_L[LacI] \end{cases}$$

上下両式とも、右辺はそれぞれ基礎発現量、調節を受ける発現量、分解量を示す。

この微分方程式モデルをシミュレーションした結果、弛張型振動子特有のスパイク状の振動を得た(図 4A)。振動子の動態をさらに詳しく吟味するため、相平面に上下両式に対応するヌルクラインをプロットした(図 4B)。図 4A で示した時系列をこの上に重ねたところ、両ヌルクラインの交点を囲む閉曲線となったことから、リミットサイクルによる非線形振動が生じていることが裏付けられた(図 4C)。パラメータを変化させたシミュレーションの結果においても、振動の発生が見られ、転写調節因子のインデューサー(IPTG、aTc など)の濃度を変化させて DNA への結合強度を調節することにより、設計した人工遺伝子回路による発振が可能であるとの結果を得た。

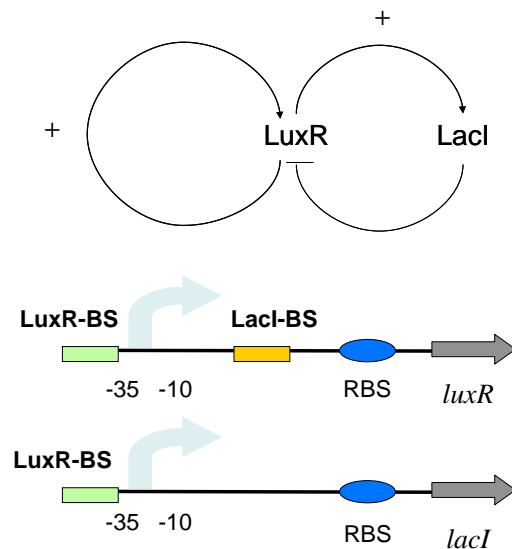


図 3(上) 設計した人工遺伝子回路。速いポジティブ・フィードバックと遅いネガティブ・フィードバックを組み合わせることにより弛張型発振として動作する。(下)上のネットワークを実現する DNA コンストラクト。

この他、蛍光タンパク質分子数推定法の開発を行った。1 細胞における転写制御の入出力関係を定量的に定式化するためには二色蛍光による標識が必須であり、さらに二色の蛍光強度をそれぞれ分子数に変換する必要がある。

本研究で開発した分子数推定法は画像処理に基づく手法であり、分裂前後の細胞を撮

影する必要のある先行手法よりも簡便で応用範囲が広い。大腸菌の蛍光画像を用いて手法の検証を行い、分子数既知の大腸菌細胞内タンパク質の値と本手法による推定値を比較した。結果としては、比較的妥当な分子数推定値が安定して得られた。当初はここまでの内容で特許を出願する予定であったが、知財専門家との協議の結果、適用範囲の広い特許とすることを旨し、大腸菌以外の細胞における応用可能性を現在検討中である。

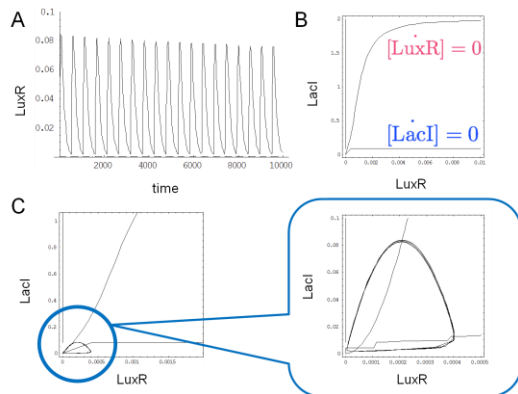


図 4(A) 設計した人工遺伝子回路モデルは弛張型振動子特有のスパイク状波形を示した。(B) 同モデルの相平面のヌルクライン。(C) シミュレーション結果を相平面にプロットすると、ヌルクラインの交点を囲む閉曲線となり、リミットサイクルによる非線形振動を裏付けた。

(引用文献)

- [1] Benner, S. A. and Sismour, A. M., *Nat. Rev. Genet.* 6(7):533-543, 2005.
- [2] Elowitz M. B., and Leibler S., *Nature* 403(6767):335-8, 2000.
- [3] Garcia-Ojalvo, J., Elowitz, M. B. and Strogatz, S. H., *PNAS* 101(30):10955-60, 2004
- [4] Pomerening, J. R., Sontag, E. D., Ferrell, J. E. Jr., *Nat. Cell. Biol.* 5(4):346-51, 2003.
- [5] McMillen, D., Kopell, N., Hasty, J. and Collins, J. J., *PNAS* 99(2):679-84, 2002.
- [6] Hasty, J., Isaacs, F., Dolnik, M., McMillen, D., Collins, J. J., *Chaos* 11(1):207-220, 2001.
- [7] Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B. I. and Alon, U., *PNAS* 99(16):10555-60, 2002.
- [8] Becskei, A. and Serrano, L., *Nature* 405(6786):590-3, 2000.

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

柚木克之、小島貴之、榊原康文: “蛍光強度時系列からの遺伝子発現速度定数測定” 第 31 回日本分子生物学会年会. (20081211). 神戸ポートピアホテル

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柚木 克之 (YUGI KATSUYUKI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教
研究者番号：70433745

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし