

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300111

研究課題名(和文)外部トリガーにより安定・同期化する振動人工遺伝子回路の構築

研究課題名(英文)Construction of a stabilized and synchronized synthetic genetic oscillator

研究代表者

花井 泰三 (HANAI, TAIZO)

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) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：外部からトリガーを与えることにより、より安定に動作し、かつ同期化する振動人工遺伝子の構築を目指し、研究を行った。まず、外部環境を正確に均一にするための微小流体リアクターの試作を行い、先行研究のプラスミドを入手し、GFP発現の振動実験を行った。個々の細胞の振動は、振幅、周期とも大きくばらついており、多くの細胞の測定が必要であること、一つの細胞の振動を測定するためには目視と手動による画像処理を数多く行う必要があること、リアクター内で細胞が重なるなどすると上手く測定できないことが明らかとなった。これらのことから、リアクターのさらなる改良と画像処理ソフトウェアの開発が必要であると分かった。

研究成果の概要(英文)：In order to construct a stabilized and synchronized synthetic genetic oscillator, this research was carried out. At first, a micro fluid reactor was produced for keeping the extracellular condition constant. We used this reactor and reported plasmids for GFP oscillation experiment. As the result of this experiment, we found there were three big problems. 1) The amplitude and the period of the oscillation for each cell was wildly varied. For statistical analysis, the large numbers of data are needed. 2) We needed a long time for image analysis because there were no automatic analysis software. 3) We had many troubles in micro fluid reactor because the cells were piled up and were moved in the reactor. For the further experiment, the modifications of the micro fluid reactor and the automatic image analysis software are needed.

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：合成生物学 振動現象 マイクロ流体リアクター 理論解析

1. 研究開始当初の背景

近年、アメリカで合成生物学(Synthetic biology)と呼ばれる研究領域が形成され、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研究が行われ始めている。この研究分野は、試行錯誤で分子生物学実験を行い、回路が構築されており、数理解析では構築された回路のシステム解析がなされているのみである。振動する人工遺伝子回路はElowitz (Nature, 2000)を始め、いくつかの研究例が存在するが、振動が安定して継続しない、個々の細胞の振動が同期しない、など実際の生命現象とは異なっている。振動現象を観察する際には、レポーター遺伝子として蛍光タンパク質(GFP)を用い、細胞を顕微鏡で観察することとなる。この際、ゲル状にした培地に細胞を固定することになるが、ゲルの栄養成分や酸素濃度を一定に保つことが難しい。また、細胞分裂で細胞内の遺伝子、タンパク質が分裂後の細胞に分割されるが、均一に分割されないため、振動の周期が不均一になるだけでなく、振動が停止する場合もある。また、細胞自身には、遺伝子発現が確率的に起こるといふ揺らぎの問題を本質的に抱えており、安定で同期した振動現象の実現を難しいものとしている。

人工遺伝子回路による振動現象を安定化させる研究例として、細胞外の環境を精密にコントロールする試みが数例なされている。一例は、申請者の論文である(Lab Chip, 2010)。これは、微小流体リアクターと呼ばれるマイクロリッターレベルのチャンパーに細胞を固定し、チャンパー内の培養液を一定速度で交換することで、細胞環境を精密にコントロールしている。この様な方法結果、振動現象が安定し、ある程度の時間、継続することが明らかとなった(Hasty, Nature 2008)。また、人工遺伝子回路による振動現象を同期させる研究例として、細胞が合成する細胞膜を自由に出入りできる分子を利用し、この分子の相互作用を利用した人工遺伝子回路を作成した試みがごく最近報告された(Hasty, Nature 2010)。細胞密度の増大にともない、同期した振動現象が観察されるが、振動は安定せず、長時間の継続は難しい。

2. 研究の目的

振動現象(oscillation)は、サーカディアンリズムなど生命で広く観察される現象で、振動する人工遺伝子回路を設計・解析することは、生命情報科学でも大変興味深い。しかし、今までの報告例では、振動が安定せず短時間で振動が停止し、各々の細胞が別々に振動し同期せず、実際の生命現象とは大きく異なっている。そこで、本研究では、外部から周期的にトリガーを与え、それにより各細胞の振動周期を同期(Synchronization)させ、振動を安定化させる人工遺伝子回路をシステム設計

し、分子生物学実験により実証をすることを目的とする。また、システム解析を行い、人工遺伝子回路の改良に利用する。さらに、引き込み現象(Entrainment)の設計・解析も試みる。

3. 研究の方法

細胞内で構築された人工遺伝子回路を正確に、安定に動作させるためには、外部の環境を正確にかつ均一に、安定に制御する必要がある。そのため、まず、Fig.1 に示すHasty(Nature, 2008)の微小流体リアクターを東京大学藤井研に作成してもらい、利用することとした。また、これらの装置の動作確認のため、すでに振動回路として報告されているHasty(Nature, 2008)のプラスミドを分与してもらい、実験を行った。

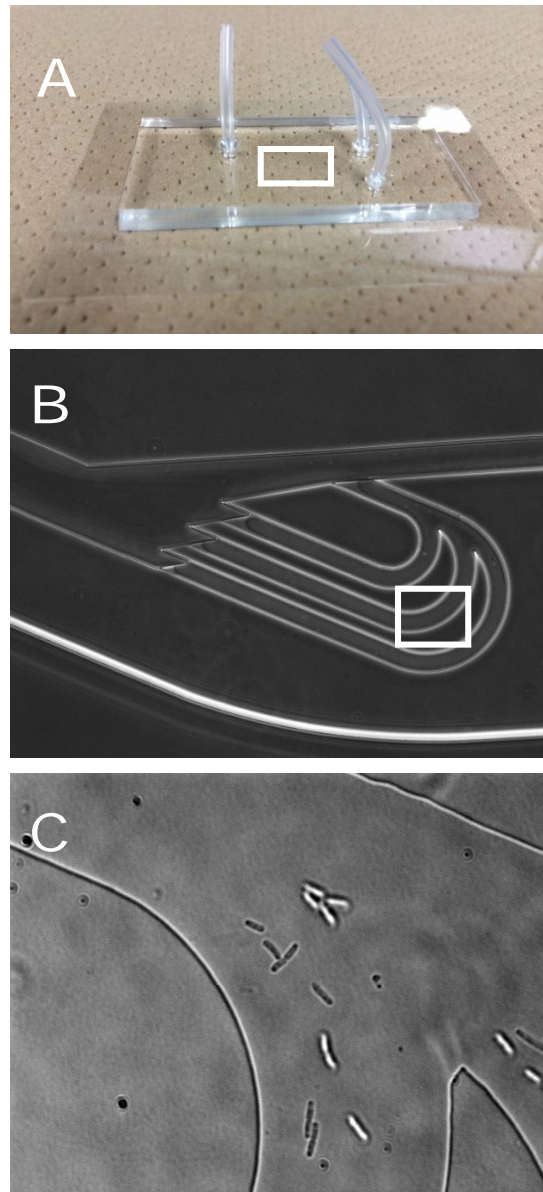


Fig.1 微小流体リアクター

A 外観写真(横幅 約 50mm)、B 菌体固定ステージ(Aの写真の白い四角の部分に相当、左上から菌体を流入、培地は右側から投入U字型の部分は高さが低く、菌がトラップされる。) C 菌体固定ステージにおける菌体増殖(Bの白い四角の部分に相当)

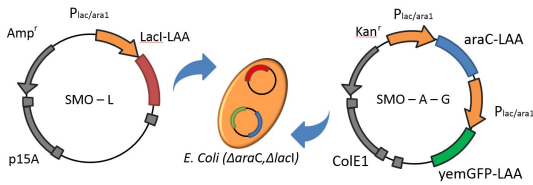


Fig.2 遺伝子発現振動系を有する大腸菌

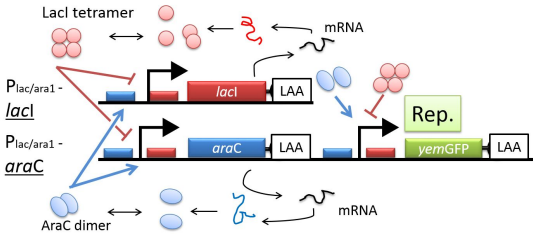


Fig.3 振動系の動作原理

Hasty プラスミド導入株として、*lacI* (lac リプレッサー) および *araC* 欠損大腸菌を作成した (Fig.2)。Fig.3 に、この振動系の動作原理を示す。この振動系は、3 つの要素から構成されている。一つ目の要素は YemGFP タンパク質であり、レポーターとして蛍光を発する。残りの二つは、lac リプレッサーと AraC タンパク質である。すべての要素は *plac/ara1* プロモータで発現調整されている。このプロモータにより、lac リプレッサーはすべての要素タンパク質の生産を抑制し、AraC タンパク質はすべての要素タンパク質の生産を活性化する。lac リプレッサーのみに着目すると、lac リプレッサーの濃度が増加すると、*plac/ara1* プロモータによる発現量が低下し、lac リプレッサーの生産は停止し、濃度の減少が起こる。この結果、lac リプレッサー濃度が減少すると、*plac/ara1* プロモータによる発現量が増加し、lac リプレッサーの生産が開始し、濃度の増加が起こる。このようにして、lac リプレッサー濃度の振動現象が起こる。AraC タンパク質に関しては、逆の現象で振動現象が起こる。最後に、lac リプレッサー、AraC タンパク質が相互作用することで、振動現象が強化される構造となっている。また、それぞれのタンパク質には、分解タグと呼ばれる LAA 配列が導入され、短い時間で分解される。IPTG の添加量が増えると、lac リプレッサーの抑制は弱くなり、アラビノースの添加量が増えると、AraC タンパク質による活性化は強くなる。

4. 研究成果

上記の株を用いて、微小流体リアクターによる観測を行ったところ、Hasty とほぼ同じ結果が得られた (Fig.4)。しかし、細胞間の振動周期・振幅にある程度の差があり、個体差が大きいことが明らかとなった。このため、多数の細胞を観測し、統計的にデータ整理する必要があると考えられた。しかし、現在提

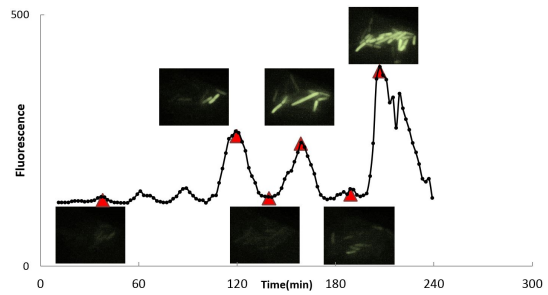


Fig.4 微小流体リアクターによる振動系の観測

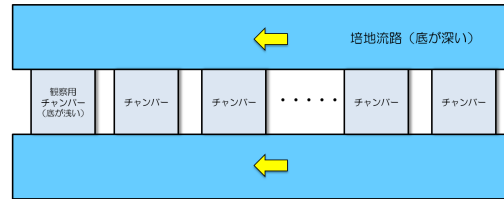


Fig.5 マルチステージ微小流体リアクター

案されている微量流体リアクターでは、一度の実験で、1 ないし 2 細胞しかうまく観測できない。なぜなら、微小流体リアクターによる観測では、細胞は単層である必要があるが、積層されてしまい、うまく観測できないケースが多く見られた。また、細胞増殖が進むと、リアクター内に細胞が完全に充填され、外部環境を安定に均一状態に制御できないことも明らかになった。よって、一度の実験で多数の細胞を観測できるリアクターまたは一度の実験で多くの実験条件を観測できるリアクターの開発が必要であると考えられた。

そこで、一度に多くのサンプルが観測できるように改良したマルチステージ微小流体リアクター (Fig.5) を東京大学藤井研に試作してもらい、実験に用いることとした。上述の Hasty の人工遺伝子回路を利用して、マルチステージ微小流体リアクターの動作確認を行ったところ、先に作成した微小流体リアクターと同等の結果が、マルチステージ微小流体リアクターでも観測された。

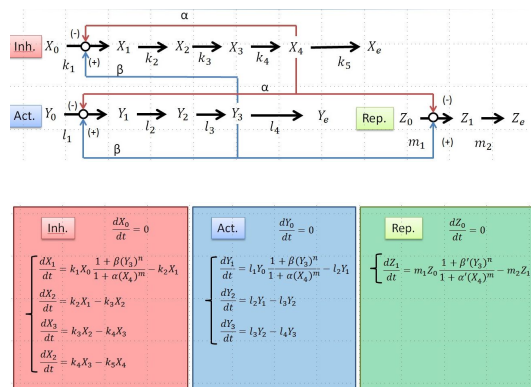


Fig.7 振動現象の数理モデル

次に、数理モデル(Fig.7)を構築し、振動現象に対する外部環境の影響を調べたところ、Hasty の実験結果同様、lac リプレッサーによる抑制強度および AraC タンパク質による活性強度を変更することで、周期が変動することが予想された。このため、IPTG 濃度およびアラビノース濃度を変更して微小流体リアクターで培養実験をしたところ、数理モデル通りに周期が変化することが明らかとなった。

本研究は、光強度あるいは誘導剤濃度などをトリガーとして、振動現象が同期するように、振動系を設計し、遺伝子組換え等で実現する予定であったが、研究開始後、海外のグループが本研究と同じアイデアを発表したため、急遽、人工遺伝子回路研究を実行するための問題点を明らかにすることに注力した。本研究における実験結果から、一度の実験で多数の細胞を観測できるリアクターおよび一度の実験で多くの実験条件を観察できるリアクターが必要であると考えられた。特に、振動現象を測定するためには長時間測定を行う必要があり、培養後期では菌体増殖が激しく、環境を一定に保つのが難しいだけでなく、測定していた菌体が押し流されてしまう現象が観測された。本研究では、マルチステージ微小流体リアクターへ改良し、一度に多くの振動現象が測定できるようになったが、この細胞が押し出される現象の回避は難しく、新たな微小流体リアクターの開発が必要であることが明らかとなった。また、振動現象の観察には、5-10分おきに、顕微鏡で位相差画像と蛍光画像を測定し、測定対象菌体内の蛍光値を数値化する作業が必要となるが、この処理は観測者が手動で長時間かける必要がある。このことが、多数の振動現象の測定には大きな問題であるとわかった。これは、長時間の測定で、細胞が分裂するため、徐々に対象の菌体の場所がずれ、なおかつ二つに分かれるため、従来の画像認識ソフトウェアを改良するだけでは、困難であるためである。このため、新しいアイデアのソフトウェア開発が必要不可欠であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

花井泰三、合成生物学によるバイオアルコールの生産、生命科学夏の学校(日本生化学会)招待講演、2011.9.4、八王子

岡田元弘・金田祥平・本村洋平・岡本正宏・藤井輝男・花井泰三、分子生物学会、2012.12.11-14、福岡

〔その他〕

ホームページ等

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

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)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