

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25730176

研究課題名(和文) 合成生物学的手法を用いた人工共生システムの構築と解析

研究課題名(英文) Synthetic biological approach to construct and analyze a synthetic microbial ecosystem

研究代表者

鮎川 翔太郎 (Ayukawa, Shotaro)

東京工業大学・情報生命博士教育院・特任助教

研究者番号：70645845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：微生物の多くは互いにコミュニケーションを取り合うことで複雑な構造と機能を持つ共生システムを形成することが知られている。本研究ではこうした微生物共生システムが成立する条件の理解のため、実験者による制御、解析が容易な人工相利共生システムを合成生物学的手法を用いて構築した。まずは適切な機能を持つ遺伝子部品を組み合わせて、細胞間コミュニケーション分子を介して抗生物質耐性遺伝子の発現を誘導し合うことでお互いの生存を助け合う相利共生関係を形成させる人工遺伝子回路を設計、構築した。さらに大腸菌を用いた培養実験と数値シミュレーションの両方で、構築した人工相利共生システムが安定して存在していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Many microbes are living by forming symbiotic systems that have complex structures and functions by communicating with other microbes. In order to understand the design principle of these symbiotic systems, we constructed a synthetic mutualistic system that is easy to be controlled and analyzed with the synthetic biological approach. Firstly, we designed and constructed synthetic genetic circuits that make E.coli cells to form a mutualistic system in which two types of cells help the other's survival by inducing expression of antibiotic resistance genes through cell-cell communication molecules. Furthermore, we confirmed that the synthetic mutualistic system can exist stably with culture experiments and numerical simulations.

研究分野：合成生物学

キーワード：人工遺伝子回路 微生物共生系

1. 研究開始当初の背景

微生物の多くは互いにコミュニケーションを取り合うことで複雑な構造と機能を持つ共生システムを形成することが知られている。こうしたシステムの性質を知るためには、システムの一部を改変したり、摂動を与えたりした時に、システムがどのような挙動を示すかを調べることが有効である。しかし、天然のシステムを改変することは、その系の複雑さから困難である。一方合成生物学では、実験者がタンパク質コード配列や制御配列を組み合わせる人工遺伝子回路を用いることで、系内の相互作用の強さが変化したシステムを構築することが容易である。

合成生物学では人工遺伝子回路を導入することで、細胞に所望の機能をプログラムするという手法が用いられてきた。この手法を用いてこれまで様々な成果が出ている。物質生産の研究としては、抗マラリア薬前駆体の合成系遺伝子群を微生物に組み込むことの実現がある。ネットワーク制御に関する研究では、抑制タンパク質三種類を組み合わせた制御系遺伝子回路によって大腸菌が点滅する大腸菌発振子の構築などの成果がある。制御系の研究では特に、電子回路のように、シンプルな部品を組み合わせ、大規模な人工遺伝子回路を構築していこうという動きがさかんである。またシミュレーションを用いて、構築した回路が設計した通りに作動するかの予測も行われている。さらに、細胞間通信の機能を利用して複数の細胞を共同的に働かせる人工遺伝子回路も構築されている。大腸菌集団に空間パターンの同心円縞模様を構築させた研究や、集団に同期した振動を起こさせた研究では、同じ人工遺伝子回路を導入された大腸菌の集団が相互作用することによって複雑なダイナミクスを再現している。また、二種類の異なる人工遺伝子回路をそれぞれ導入した大腸菌に相互作用させることで、positive feedback システムや Lotka Volterra モデルなどの構築も行われてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、人工遺伝子回路を導入した大腸菌集団を用いて人工的な共生システムを作製し、シミュレーションとともにその挙動を解析することで、共生システムの実現に必要な条件を導き出すことである。自然界では多くの微生物が、お互いにコミュニケーションを取り合うことで複雑な機能を持つ共生システムを形成しているが、この設計原理については不明な点が多い。本研究では、実験者がゼロから構築した人工遺伝子回路を用いて、大腸菌で相利共生系を構築し、シミュレーションと合わせた解析を行うことで、共生システムの設計原理に関する知見を深める。

3. 研究の方法

(1) 人工遺伝子回路の設計と構築

本研究では、人工遺伝子回路を用いて二種類の大腸菌が、お互いが存在するときのみ生存が可能となる共生システムを作製し、この挙動を調べるという手法を採った。

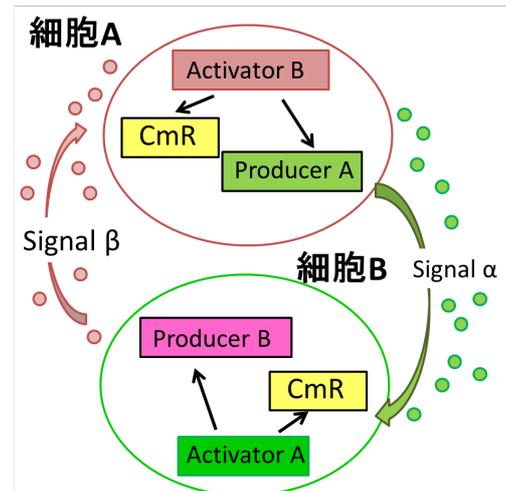


図1 人工相利共生システム

この人工相利共生システムの概念図を図1に示す。このシステムでは、異なる人工遺伝子回路を導入された大腸菌同士が、細胞間コミュニケーション分子を介してお互いの状態を感知し合い、相手からのシグナル分子が存在するときのみ生存が可能になる。このために、以下の3条件を満たした人工遺伝子回路を大腸菌に導入した。1.) 二種類の大腸菌 A と B は異なるシグナル分子を合成する。2.) 細胞 A は細胞 B の合成するシグナル分子 (Signal) を感知して、シグナル分子 (Signal) の合成を行う。同様に、細胞 B は細胞 A の合成するコミュニケーション分子 を感知して、シグナル分子 を合成する。3.) 細胞 A 内では、シグナル分子 によって抗生物質耐性遺伝子 (CmR) の発現が誘導される。同様に細胞 B 内では、シグナル分子 によって抗生物質耐性遺伝子の発現が誘導される。この人工遺伝子回路の働きにより、細胞 A と B が、お互いが存在するときのみ抗生物質存在下で生存が可能となる共生システムが形成される。

(2) 数理モデリング

設計した人工相利共生システムの挙動を数値シミュレーションにより解析するため、次に示す数理モデルを構築した。

$$\frac{dN_A}{dt} = r_A \cdot N_A \cdot \left(1 - \frac{N_A + N_B}{C} - i_{Cm} \cdot \frac{K_R}{K_R + R_A}\right)$$

$$\frac{dN_B}{dt} = r_B \cdot N_B \cdot \left(1 - \frac{N_A + N_B}{C} - i_{Cm} \cdot \frac{K_R}{K_R + R_B}\right)$$

$$\frac{dS_A}{dt} = \alpha_{SA} \frac{V_{in}}{V_{out}} \cdot N_A - d_S \cdot S_A$$

$$\frac{dS_B}{dt} = \alpha_{SB} \frac{V_{in}}{V_{out}} \cdot N_B - d_S \cdot S_B$$

$$\frac{dR_A}{dt} = \alpha_{RA} \cdot \frac{S_B}{K_{SB} + S_B} - d_R \cdot R_A$$

$$\frac{dR_B}{dt} = \alpha_{RB} \cdot \frac{S_A}{K_{SA} + S_A} - d_R \cdot R_B$$

N_A, N_B : 細胞A、細胞Bの濃度
 S_A, S_B : シグナルA、Bの濃度
 R_A, R_B : 抗生物質耐性タンパク質濃度

r_A, r_B : 成長速度

C : 環境収容力

i_{C_m} : 抗生物質の阻害効果

K_{RA}, K_{RB} : 抗生物質阻害のミカエリス定数

$\alpha_{SA} \frac{V_{in}}{V_{out}}, \alpha_{SB} \frac{V_{in}}{V_{out}}$: シグナル生産速度

d_S : シグナル分解速度

α_{RA}, α_{RB} : 抗生物質耐性生産速度

K_{SA}, K_{SB} : 抗生物質耐性のミカエリス定数

d_R : 抗生物質耐性タンパク質の分解速度

4. 研究成果

(1) 人工遺伝子回路の実装のための遺伝子部品の選定

人工相利共生システムを実装するための遺伝子部品の選定と性質の確認を行い、人工遺伝子回路の設計を行った。研究当初は、細胞間コミュニケーションを実装するために Las 系と Lux 系の転写活性化タンパク質とシグナル合成酵素の遺伝子を使用することを考えていたが、予備実験の結果、Lux 系の転写活性化タンパク質 LuxR が、Las 系のシグナル分子 3OC12HSL と結合してしまうことがわかった。この性質のため、LuxR と LasI を導入した細胞 B 内で自己フィードバックがかかり、細胞 A がいなくても生存してしまうという問題が起きた。このため、Las 系のシグナルとのクロストークがないことを確認した Rhl 系の遺伝子を Lux 系の遺伝子の代わりに使用することにした。Las 系と Rhl 系の遺伝子群を用いて設計した人工遺伝子回路と、これを導入して形成される人工相利共生システムを図 2 に示す。

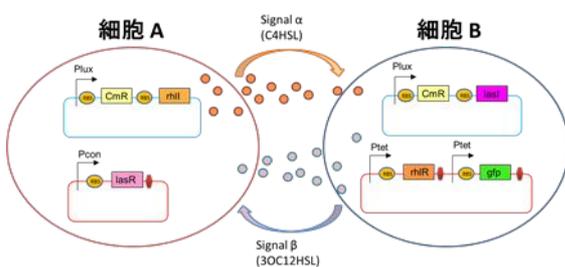


図 2 人工相利共生システムを実装するための人工遺伝子回路

(2) 人工相利共生システムの形成の確認

細胞 A と細胞 B を抗生物質存在下で共培養することで、増殖率が上昇することを確認した。図 2 の人工遺伝子回路を導入した細胞 A と細胞 B を共培養した結果を図 3 に示す。細胞 A と細胞 B を初期菌密度 0.005 ずつ 1:1 の割合で植菌して共培養をすることで、単独で培養したときと比べて、増殖率が上昇することが確認された。この結果は、細胞 A と細胞 B がお互いの増殖を促進する相利共生の関係にあることを示している。

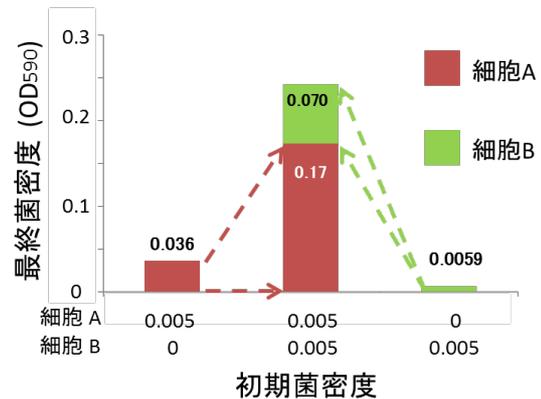


図 3 共培養による増殖率の変化の確認

(3) 遺伝子部品の改良

図 3 で示した結果から、人工遺伝子回路を導入した細胞 A と細胞 B が設計通り相利共生の関係を持つことが示されたが、細胞 A は単独でも少し増殖してしまうという傾向がみられた。これは抗生物質耐性遺伝子の発現のリークが原因であると考えられる。リークの影響を軽減するため、抗生物質耐性タンパク質に、細胞内での分解率を上昇させるタグ配列を付加するという改良を行った。タグ配列の効果を確認するため、タグなしの抗生物質耐性タンパク質とタグ付の抗生物質耐性タンパク質それぞれの ORF を小分子誘導が可能なプロモーターの下流に導入し、大腸菌に導入した。これらの大腸菌を抗生物質存在下で培養すると、タグなしの抗生物質耐性タンパク質を導入した大腸菌ではリークにより誘導がなくても増殖してしまったが、タグ付きの抗生物質耐性タンパク質を導入した大腸菌では増殖が見られなかった。この結果は、タグ付の抗生物質耐性タンパク質を用いることで、細胞 A の単独での増殖を抑制できることを示唆している。

(4) 数値シミュレーションによる人工相利共生システムの解析

数理モデルをもとに安定性解析を行った結果、今回作製した共生システムは、どのような初期菌密度から始めても、あらかじめ定めた細胞比率に収束するという結果が得ら

れた。図4左図は、人工遺伝子回路で作製した共生関係をもつ細胞Aと細胞Bがある細胞比率で安定に共存することを示している。一方、図4の右図は二種類の細胞の間に共生関係がないと、細胞Aと細胞Bは安定に共存しえないことを示している。この結果から、本研究で用いた手法により、一定の細胞比率を持った安定な共生システムを作製できることが確認された。

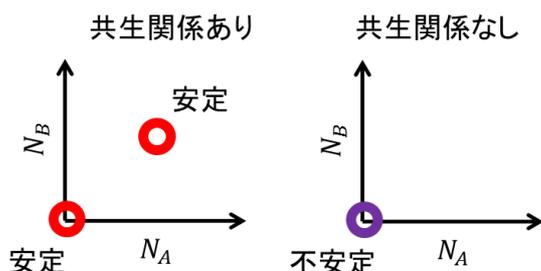


図4 人工相利共生システムの安定性の確認

人工相利共生系の細胞比率の制御可能性を確認するため、数値シミュレーションを行った。図5は細胞Aの抗生物質耐性遺伝子生産効率を変えることで細胞Aと細胞Bの比率が変わることを示している。

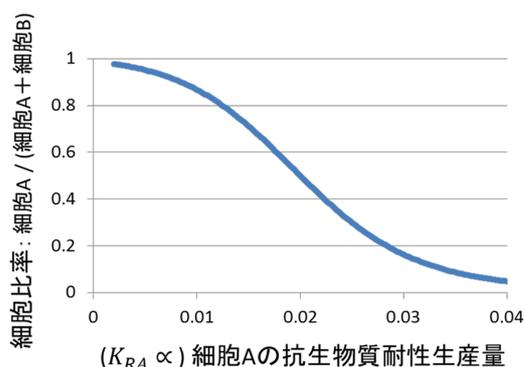


図5 細胞比率の制御可能性の確認

抗生物質耐性遺伝子の生産効率を変化させることは、プロモーターやリボソーム結合サイト(RBS)の配列といった遺伝子部品の強さを変えることで実現可能であるため、このような細胞比率の制御は妥当な方法であるといえる。

(5) マイクロ流体デバイスの開発

本研究では、人工遺伝子回路を用いて微生物の性質を変化させることで共生システムを成立させるという手法をとったが、共生システムの形成には環境条件の制御も重要になってくる。そこで、大腸菌を微小環境中で様々なパラメータを制御しながらの培養が可能なマイクロ流体デバイスの作製を行った。

(6) 研究成果のまとめ

本研究では、人工遺伝子回路を用いて二種類の大腸菌がお互いの生存を助け合う相共

生系を構築してその挙動を解析することで、微生物共生システムの実現に必要な条件を知ることを目的とした。このために、細胞間コミュニケーション分子を介して抗生物質耐性遺伝子の発現を誘導し合うことでお互いの生存を助け合う機能を持った人工遺伝子回路を、適切な遺伝子部品を組み合わせで構築した。さらに構築した人工遺伝子回路を大腸菌に導入して作製した細胞Aと細胞Bが設計した通り、抗生物質存在下で共存することを確認した。なお、抗生物質耐性遺伝子の発現リークにより細胞Aが単独でも若干増殖してしまうという問題が見られたが、抗生物質耐性タンパク質に分解タグを付加することで発現リークを抑えることができることを確認した。また人工遺伝子回路の数値モデルを作成し、数値シミュレーションにより、設計した共生システムの安定性や比率の制御可能性を確認した。さらに共生システムの形成に適した環境条件の制御のため、微小環境内での細菌の連続培養が可能なマイクロ流体デバイスの開発を行った。

(7) 今後の展望

今後は、遺伝子部品を調節することでより安定な人工相利共生システムの構築を目指す。まず発現リークを抑えることができると確認された分解タグ付の抗生物質耐性タンパク質を人工遺伝子回路に組み込むことで、単独では増殖がみられない、絶対相利共生の関係をもつ人工共生システムを構築する。続いて、システムの一部を変更したときシステムの挙動がどのように変わるかを確認する。この解析によって、作製した共生システムがどのような条件下で成立するのかを確認する。さらに、相利共生系以外の片利共生や競争といった関係をもつ共生システムも、同様の手法により作製し解析を行う。

本研究では、人工遺伝子回路を用いことで遺伝子発現量や抗生物質耐性などの生物学的パラメータを操作に制御を置いたが、共生系の成立には培養環境のサイズや栄養の流入量、増えすぎた微生物の排出量などの環境パラメータの制御も重要だと考えられる。本研究で作製したマイクロ流体デバイスは、こうした環境パラメータを制御することが可能なデバイスである。今後は人工遺伝子回路を導入して作製した微生物共生システムをマイクロ流体デバイス上で連続培養することで、生物学的パラメータと環境パラメータの両方を制御しながら微生物共生システムの成立条件を調べていく予定である。

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 1 件)

Manami ITO, Haruka SUGIURA, Shotaro AYUKAWA, Daisuke KIGA, Masahiro

TAKINOUE "A Bacterial Continuous Culture System Based on a Microfluidic Droplet Open Reactor" Analytical Sciences Vol. 32 (2016) No. 1 p. 61-66
<http://doi.org/10.2116/analsci.32.61>

〔学会発表〕(計 4 件)

鮎川翔太郎, 西田暁史, 木賀大介、人工遺伝子回路を用いた微生物共生システムの構築、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、「岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)」

木賀大介, 西田暁史, 鮎川翔太郎、合成生物学的アプローチに基づく 2 細胞の相互遺伝子発現制御システムの構築、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、「岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)」

鮎川翔太郎, 西田暁史, 木賀大介、人工微生物共生システム構築のための合成生物学的アプローチ、「細胞を創る」研究会 7.0、2014 年 11 月 13 日-2014 年 11 月 14 日、「東京大学弥生キャンパス弥生講堂 (東京都文京区)」

西田暁史, 鮎川翔太郎, 山村雅幸、共生系への合成生物学的アプローチ、環境微生物学会合同大会、2014 年 10 月 21 日-2014 年 10 月 24 日、「アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県浜松市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎川翔太郎 (Shotaro AYUKAWA)

東京工業大学・情報生命博士教育院・特任助教

研究者番号：70645845