

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300101

研究課題名（和文）

生物回路の設計原理に基づく合成生物学

研究課題名（英文）

Biological design principle-based synthetic biology

研究代表者

倉田 博之 (Kurata Hiroyuki)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：90251371

研究成果の概要（和文）：

生体分子ネットワーク中に埋め込まれている生物学的な基本回路の構造と機能の関係（設計原理）を体系化して、合成生物学の基盤となるデータベースを構築した。それを基にして、基本回路の複合化システムである大腸菌中央代謝経路（解糖系+TCA 回路+ペントースリン酸回路）の設計原理を解析して、それを合理的に設計するための遺伝子組換え戦略を提案した。物質生産の基盤である中央代謝経路を再設計することによって、エタノール発酵系や乳酸発酵系の生産性を向上させて、環境エネルギー問題に貢献する。

研究成果の概要（英文）：

We define bioalgorithms as the step-by-step molecular process of how the biochemical networks including elementary networks and network motifs generate their particular functions, that is to say, the network-function relationships (NFR). The bioalgorithms would be invaluable for synthetic biology, providing an instruction for how we engineer robust biological circuits that carry out a target function. In this study, based on the bioalgorithms, we combined subnetworks of glycolysis, TCA cycle, pentose phosphate pathway, and the anapleurotic pathways to present a dynamic model of the *E. coli* central metabolic network. Our model reproduced the changing patterns of extracellular and intracellular metabolite concentrations in the batch and continuous cultivations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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

1. 研究開始当初の背景

ゲノム科学、オミックス技術の進歩とともに、バイオインフォマティクスやシステム生物学が生物学発展の主要な役割を担ってい

る。分子ネットワーク構造が細胞機能を生み出すメカニズムを解明する過程で、解析（理解）から合成（設計）という方向性が明確になった。一方、ネットワークモチーフとよぶ

ものを含めて、細胞機能を担う基本遺伝子回路がいくつか見つかかり、それらを用いて遺伝子スイッチング回路を細胞内に構築して、細胞機能を制御する研究が始まった。これからは、基本回路の組み合わせが細胞機能を創発するメカニズムの解明が必要である。分子レベルから細胞機能をボトムアップで合成する時代と言える。

環境問題では、バイオマスを利用した有用物質（生物燃料、代替石油化学品）生産プロセスの開発が求められる。合成生物学は、スクリーニング法や少数の標的の遺伝子組換え戦略に代わり、微生物等による有用物質生産性を向上させるために、遺伝子調節回路を合成（再設計）する基礎技術である。

サイバネティクスが生物学の調節と工学制御の類似性が指摘したとおり、分子ネットワークレベルでは、フィードバックやフィードフォワードを組み合わせによって、多様な生物機能を発揮する。今後は、相似性だけではなく、工学と生物学の相違性に注目することが重要である。工学的回路には見られない生物特有のネットワーク構造と機能の探索である。たとえば、環境変化を感知してから遺伝子発現をするまでの信号伝達経路や転写調節ネットワーク構造は、同一パターンの回路が重複し、クロストークしている。

制御のブロックダイアグラムから観ると、生物と工学の類似性は明快である。その類似性に着目して、生物がロバストネスを生み出す基本的法則を解明して、生物機能を合理的に設計する手法を開発されている。一方で、生物機能を生み出すネットワーク構造は工学回路の構造とは一致していない。生物学と工学の相違性に着目して、生物特有の設計原理を解明して、細胞を分子レベルから合成する研究に取り組むことが大切である。

2. 研究の目的

これまでの膨大な微生物に関する研究成果の中から分子ネットワークの基本回路の設計原理を探索して、合成生物学の基盤となるデータベースを構築する。そして、基本回路の複合化した制御システムである大腸菌中央代謝経路（解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸回路）の設計原理を解明して、その合理的設計を行うための遺伝子組換え戦略を提案する。物質生産の基盤である中央代謝経路を再設計することによって、エタノール発酵系や乳酸（ポリ乳酸の原料）発酵系の生産性を向上させて、環境エネルギー問題に貢献する。

3. 研究の方法

1 生物学的基本回路の設計原理の解析

合成生物学の出発点は、生物学的基本回路

を理解することである。ネットワークモチーフ（フィードフォワードループ、単入力モジュール、自己フィードバックループ）を含めて基本回路のいくつかの断片は提案された。生物合成の観点から、生物学的基本回路を探索して、その構造と機能の関係をデータベース化する。ネットワークモチーフは、転写調節ネットワークにおいて出現頻度の高い回路である。実際は、タンパク質相互作用、代謝物相互作用を含む多様な生物学的回路の存在が想定される。出現頻度に関わらず、特徴的構造や機能をもつ基本回路をすべて探索する。

2 中央代謝回路モデリング

図1に示すような大腸菌中央代謝回路マップ（解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸回路とその酵素遺伝子発現を調節するネットワーク）を構築する。酵素遺伝子発現分布の変化を代謝ネットワークに統合する数学モデルを開発する。

酵素遺伝子発現分布を用いて代謝流束分布を推定する数学モデルを開発する。酵素発現量分布を用いて代謝物濃度分布を計算する場合、微分方程式を用いた動的モデルが適切な選択である。本研究では、申請者と分担者らが構築している中央代謝回路の微分方程式モデルを利用する。微分方程式モデルに酵素発現量分布を代入して、代謝流束分布を計算して、細胞の増殖を評価する。

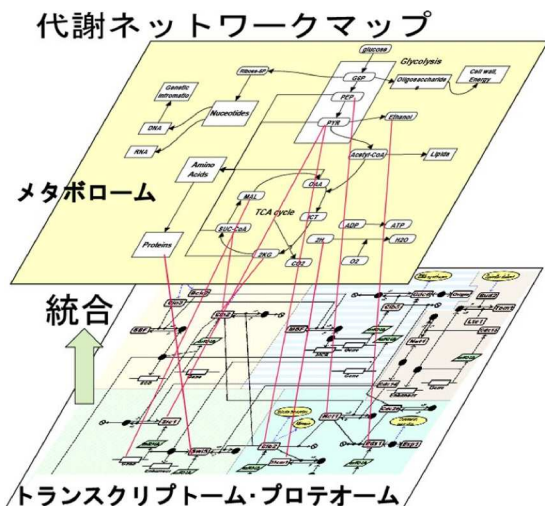


図1 代謝ネットワークマップ

3 中央代謝回路の合成と解析

中央代謝回路にエタノール合成に必要な酵素反応（アセチル CoA からエタノールへの経路）を追加して、エタノール生産速度を向上させるために中央代謝回路の遺伝子組換え戦略を立案する。代謝酵素遺伝子の転写調節モデルと代謝流束分布推定モデルを用い

て、過剰発現、遺伝子ノックアウトを網羅的に行った細胞株における増殖やエタノール生成流束をシミュレーションする。増殖やエタノール生成流束を最大化する遺伝子組換え条件を選択する。予測結果は生物学的実験によって証明する。予測と実験が不一致の場合、代謝モデルを改良する。生物学的実験(遺伝子ノックアウト、遺伝子発現量分布測定、代謝流束測定等)は分担研究者と共同で行う。

システムのロバストネス解析を行う。多数の起点をもつ階層型フィードフォワードからなる中央代謝回路は、環境の変化(基質の変化)や遺伝的变化(遺伝子ノックアウトや過剰発現)に抗して生存するために、どのような特徴的ネットワーク構造を進化させたのであろうか。感度解析、安定性解析を含むシステム解析を行う。

4. 研究成果

生物合成の観点から、生物学的基本回路を探索して、その構造と機能の関係をデータベース化した。

大腸菌中央代謝回路マップ(解糖系、TCA回路、ペントースリン酸回路とその酵素遺伝子発現を調節するネットワーク)を構築した。

多数の起点をもつ階層型フィードフォワードからなる中央代謝回路は、環境の変化(基質の変化)や遺伝的变化(遺伝子ノックアウトや過剰発現)に抗するためのメカニズムを進化させていることを解明した。中央代謝回路の設計原理を探索した。

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 10 件)

1. Kazuhiro Maeda, Keisuke Yoshida, Keisuke Yoshida, Hiroyuki Kurata, Flux module decomposition for parameter estimation in a multiple-feedback loop model of biochemical networks, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36:333-344, 2013. (査読有)
2. Kentaro Inoue, Kazuhiro Maeda, Yuki Kato, Shinpei Tonami, Shogo Takagi, Hiroyuki Kurata, CADLIVE Optimizer: Web-based Parameter Estimation for Dynamic Models, *Source Code for Biology and Medicine* 7:9, 2012 (査読有)
3. Kentaro Inoue, Shinichi Shimozono, Hideaki Yoshida, Hiroyuki Kurata, Application of Approximate Pattern Matching in Two Dimensional Spaces to Grid Layout for Biochemical Network Maps. *PLoS ONE* 7: e37739, 2012. (査読有)

4. Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, A Symmetric Dual Feedback System Provides a Robust and Entrainable Oscillator. *PLoS ONE* 7: e30489, 2012(査読有)
5. Koichi Masaki, Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, Biological design principles of complex feedback modules in the E. coli ammonia assimilation system. *Artificial Life* 18:53-90, 2012 (査読有)
6. Kentaro Inoue, Sayaka Tomeda, Shinpei Tonami, Yuki Shimokawa, Masayo Ono, Hiroyuki Kurata, CADLIVE Converter for constructing a biochemical network map. *Biochem Eng J* 54:200-206, 2011. (査読有)
7. Kazuhiro Maeda, Yuya Fukano, Shunsuke Yamamichi, Daichi Nitta, Hiroyuki Kurata, An integrative and practical evolutionary optimization for a complex, dynamic model of biological networks. *Bioproc Biosys Eng* 34:433-446, 2011 (査読有)
8. Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, Quasi-multiparameter sensitivity measure for robustness analysis of complex biochemical networks *J Theor Biol* 272:174-186, 2011. (査読有)
9. Kentaro Inoue, Weijiang Li and Hiroyuki Kurata, Diffusion Model Based Spectral Clustering For Protein-Protein Interaction Networks. *PLoS ONE*, 5:e12623, 2010. (査読有)
10. Quanyu Zhao, Hiroyuki Kurata, Use of maximum entropy principle with Lagrange multipliers extends the feasibility of elementary mode analysis. *J Biosci Bioeng*, 110:254-261, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

1. Md. Bahadur Badsha, Nusrat Jahan, Md. Nurul Haque Mollah, Hiroyuki Kurata, Metabolic Engineering for Systematic Organization and Analysis of Complex Metabolic Networks, *Proceedings of the International Conference on Statistical Data Mining for Bioinformatics Health Agriculture and Environment*, University of Rajshahi, Bangladesh, 22-24 December 2012
2. Md. Bahadur Badsha, Nusrat Jahan, Md. Nurul Haque Mollah, Hiroyuki Kurata, Sequential Extraction of Several Gene-sets with Proper Groups of Individuals for Gene Expression Data Analysis, *Proceedings of the International Conference on Statistical*

- Data Mining for Bioinformatics Health Agriculture and Environment, University of Rajshahi, Bangladesh, 22-24 December 2012.
3. Hiroyuki Kurata, Soma Tabata, Quanyu Zhao, Computational framework for integration of metabolic flux analysis with its associated omics data. Proceedings of the 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Deagu, Korea, September 18, 2012.
 4. Shinichi Shimozono, Kentaro Inoue, Hiroyuki Kurata, Efficient Grid Graph Layout by Approximate Point-set Matching on the Plane, IPSJ SIG Technical Report, 2012-BIO-30 No. 1, 1-3. Iizuka, August 9, 2012. (Oral presentation)
 5. 前田和勲, 倉田博之, 大腸菌アンモニア同化システムのダイナミックモデルの構築, 情報処理学会研究報告, 2012-BIO-30 No. 5, 1-6. 飯塚, 8月9日, 2012. (Oral presentation)
 6. Noorlin Mohd Ali, Kentaro Inoue, Soma Tabata, Hiroyuki Kurata, The effect of implementing objective functions in analyzing the changes of enzyme activity profiles. IPSJ SIG Technical Report, 2012-BIO-30 No. 8, 1-2. Iizuka, August 9 2012. (Oral presentation)
 7. Hiroyuki Kurata, Soma Tabata, Quanyu Zhao, Computational framework for integration of metabolic flux analysis with its associated omics data. Proceedings of the 8th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology and 1st International Conference on Coastal Biotechnology, 55, Adelaide, Australia, July 9, 2012
 8. Hiroyuki Kurata, Quanyu Zhao, Maximum entropy principle optimizes the large-scale elementary modes for a broad range of genetic mutants. Asian Congress on Biotechnology, Shanghai, May 11-15, 2011.
 9. Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, Robustness Analysis of Feedback Systems of Circadian Rhythm, IPSJ SIG Technical Report, 2011-BIO-24 No.7, 1-6, Kyoto, March 10-11, 2011. (Oral presentation)
 10. Kentaro Inoue, Shinichi Shimozono, Hideaki Yoshida and Hiroyuki Kurata, Hybrid Layout Algorithm using Approximate Pattern Matching in Two Dimensional Space for Biochemical Network Layout, IPSJ SIG Technical Report, 2011-BIO-24 No.6, 1-6, Kyoto, March 10-11, 2011 (Oral presentation)
 11. Kazuhiro Maeda and Hiroyuki Kurata, Robustness Analysis of Feedback Systems of Circadian Rhythm, IPSJ SIG Technical Report, 2011-BIO-24 No.7, 1-6, Kyoto, March 10-11, 2011 (Oral presentation)
 12. Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, Quasi-Multiparameter Sensitivity Analysis reveals Remarkable Robustness of Dual Feedback Circadian Oscillators. The 11-th international Conference on Systems biology, Edinburgh, October 10-16, 2010. (Poster)
 13. Kentaro Inoue, Shin Shimozono, Hideaki Yoshida, Sayaka Tomeda, Kazuya Fukami, Shinpei Tonami, Hiroyuki Kurata, CADLIVE: Data Integrator with Network Layout Module. The 11-th international Conference on Systems biology, Edinburgh, October 10-16, 2010. (Poster)
 14. Kazuhiro Maeda, Yuya Fukano, Daichi Nitta, Shunsuke Yamamichi, Hiroyuki Kurata, An integrative and practical strategy for optimizing a large-scale dynamic model of biochemical systems. The 9-th International Conference on Bioinformatics (InCoB2010), Tokyo, September 26-28, 2010 (Oral presentation)
 15. Hiroshi Minamida, Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, An optimization aiming for diverse parameter sets of a large-scale and dynamic model of biochemical networks. The 9-th International Conference on Bioinformatics (InCoB2010), Tokyo, September 26-28, 2010 (Poster)
 16. Souma Tabata, Quanyu Zhao, Hiroyuki Kurata, Development of elementary mode-based algorithms for designing a metabolic system. The 9-th International Conference on Bioinformatics (InCoB2010), Tokyo, September 26-28, 2010 (Poster)
 17. Kentaro Inoue, Hiroyuki Kurata, A Novel Spectral Clustering of Protein Interaction Networks. The 9-th International Conference on Bioinformatics (InCoB2010), Tokyo, September 26-28, 2010 (InCoB2010 Best Poster Award)

〔図書〕（計2件）

1. Hiroyuki Kurata, Modularity of biochemical networks, In: Biomedical Engineering and Cognitive Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications, pp. 336-346, IGI Global, Hershey, USA, 2012
2. 倉田博之, システム工学的アプローチを用いた細胞設計, In 抗体医薬のための細胞構築と培養技術 (ファインケミカルシリーズ), 監修: 大政健史, シーエムシー出版, 133-140, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 博之 (Kurata Hiroyuki)
九州工業大学・情報工学研究院・教授
研究者番号: 90251371

(2) 連携研究者

清水 和幸 (Shimizu Kazuyuki)
九州工業大学・情報工学研究院・教授
研究者番号: 00150318