

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119001

研究課題名（和文）合成生物学の技術基盤構築

研究課題名（英文）Synthetic Biology for the Comprehension of Biomolecular Networks

研究代表者

岡本 正宏（OKAMOTO, MASAHIRO）

九州大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：40211122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 47,000,000円

研究成果の概要（和文）：2000年頃から米国で合成生物学という研究が行われている。すでに、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試みや、別の生物由来の酵素遺伝子を複数組み合わせ合わせた人工代謝経路を設計し、その生物が本来生産できない物質を大量生産させる試みが行われている。

本領域では、人工遺伝子回路や人工代謝経路の探索・設計を行う情報科学と、無細胞系で回路・経路構築を行う工学と、細胞内へ回路・経路を導入する分子生物学の技術を結集し、有機的に連携することで、世界に先駆けた合成生物学を展開するための技術基盤を構築する。

研究成果の概要（英文）：In order to make the paradigm shift from the concept of “watched and analyzed biology” to that of “synthetic and analyzed or utilized biology”, the innovative research named Synthetic Biology was started from 2000 in US, such as designing synthetic genetic circuit by combining known interrelated biomaterials, realizing a certain bio-functional behaviors such as switch, oscillation, in vivo, designing synthetic metabolic pathways by incorporating enzyme coded genes from other origins into the cells. The objectives of this research project is to establish the coordination between the fundamental technologies for synthetic biology in order to comprehend biomolecular networks by integrating the following three missions: 1) design synthetic genetic circuit or metabolic pathway with using the methods of computational science, 2) construct the circuit in vitro with using the method of engineering, 3) construct the circuit in vivo or in the cell with using the methods of molecular biology.

研究分野：合成システム生物学

 キーワード：システムゲノム科学 生物工学 システム生物学 マイクロ流体デバイス 細胞分化 ゲノム情報科学
タンパク質工学 システム最適化

1. 研究開始当初の背景

細胞を、多数の相互作用する生体分子ネットワークからなるシステムとして捉える「システム生物学」と呼ばれる研究が行われているが、全てのネットワークが十分には理解されていないため、真の意味での「システム生物学」は完成しておらず、現状では、遺伝子、mRNA、代謝物などの大量のデータを「眺めて解析する生物学」ととどまっている。

一方、このような生体分子ネットワークを「眺めて解析する生物学」から、「創って解析する・利用する生物学」を目指し、2000年頃から米国で合成生物学という研究が行われている。「創って」と言っても「無から生物を創る」ことを指しているのではない。サイエンスの面では、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試みがなされている。また、応用面では、別の生物由来の酵素遺伝子を複数組み合わせた人工代謝経路を設計し、その生物が本来生産できない物質を大量生産させる試みが行われている。しかしながら、人工遺伝子回路や人工代謝経路は小規模であり、trial and error で構築されているのが現状であり、合成生物学を展開するための技術基盤は未だ確立されていない。

一方、生体分子ネットワークは、ホメオスタシスと環境適応の両面を持っており、現在広く行われている一つまたは少数の遺伝子の過剰発現・破壊を行っても、ネットワークの応答に変化がないことが多い。このため、生体分子ネットワークに積極的に働きかけるような振動やスイッチなどの機能を持つ人工遺伝子回路を導入し細胞応答を詳細に解析する研究、ES細胞、iPS細胞に様々な分化誘導因子を人工遺伝子回路で導入することで分化系譜を探る研究、細胞のセンサータンパク質と組み合わせ外的環境に自ら適応して物質生産を行わせる細胞工場を実現する研究、などを通じて生物をより深く理解し、広く利用することが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本申請領域では、生体分子ネットワークをより深く理解し、利用するために、①人工遺伝子回路や人工代謝経路の探索・設計を行う情報科学と、②無細胞系(in vitro)で回路・経路構築を行う工学と、③細胞内(in vivo)へ回路・経路を導入する分子生物学の技術を結集し、有機的に連携することで、世界に先駆けた合成生物学を展開するための技術基盤を構築する。

代謝と遺伝子発現を大規模かつ複雑に制御するには、図1のように、動的な(時間的に変化する)人工遺伝子回路設計と多要素の回路設計のための要素技術が必要となる。また、人工遺伝子回路のデザイン・解析のためには情報科学、無細胞系(in vitro)では工学、細胞

内(in vivo)では生物学に基礎を持つ要素技術が必要であり、これらの要素技術の結集が合成生物学の基盤構築には必要である。本領域では、まず、動的で多要素な人工遺伝子回路を構築する。次に、それを利用して、万能細胞の分化誘導システムの構築、外的環境に自ら適応して物質生産を行う細胞工場の実現、生体分子ネットワークの理解への適用を試みる。その結果、合成生物学の技術基盤を構築する。

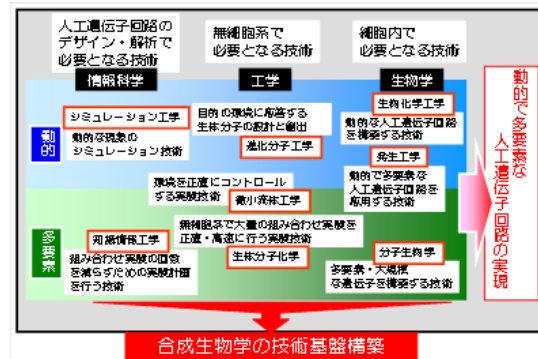


図1 合成生物学の技術基盤

3. 研究の方法

計画研究は、A01 合成生物学の分子生物学的技術基盤、B01 合成生物学の工学的技術基盤、C01 合成生物学の情報科学的技術基盤の3つの研究項目からなる。これに総括班として、合成生物学の技術基盤構築が統括する。A01には、細胞応答制御のための人工遺伝子回路の開発を行う花井班(九大)と、ES細胞、iPS細胞に対して、様々な分化誘導因子を導入し、分化誘導システムを構築する田川班(東工大)と、代謝経路をターゲットにして、多数のゲノムを再構築することで人工代謝経路を構築する柘植班(慶應大)の3つの計画研究がある。B01には、デザインした人工遺伝子回路の無細胞での機能評価を網羅的・体系的に行うRondelez班(東大)と、無細胞で人工遺伝子回路が機能向上するためのタンパク質等の生体分子の改良を行う木賀班(東工大)と、無細胞タンパク質合成系で動作する人工遺伝子回路を構築する陶山班(東大)の3つの計画研究がある。さらに、C01には、数理モデルを用いて人工遺伝子回路の設計と動的機能特性を調べる山村班(東工大)と、多要素(遺伝子とタンパク質等)が複雑に関係する人工遺伝子回路をデザインするための情報基盤システムの構築を行う伊庭班(東大)の2つの計画研究がある(図2参照)。これに、斬新的なアイデア・技術を持って遂行する研究を公募する。

総括班の運営方針は、『合成生物学の技術基盤を構築することで、「創って解析する・利用する生物学」へのパラダイムシフトを図る』をスローガンに、情報科学、工学、分子生物学の研究者が集った本研究領域の諸研究について、研究を効率よく推進し、領域全体の研究目的を達成し、その結果を社会に広

く公開する活動を行うことである。また、この研究領域に、特に多くの若い研究者が参画するよう、技術セミナーを開催して人材育成を行うことも総括班の重要な使命であると考えた。したがって、総括班は、各研究の進捗状況を的確に把握し、必要に応じて計画の修正を求める。具体的な活動としては、イ) 領域全体の研究方針策定および各研究間の調整、(ロ) 研究評価、(ハ) 班会議および国際シンポジウムの企画と実施、(ニ) ホームページを通じての結果の公表。また、以下の3項目を総括班全体として行う：1) データベースの調整 2) 若手研究者人材育成を目的とする合成生物学技術セミナー開催、3) 社会との関わり

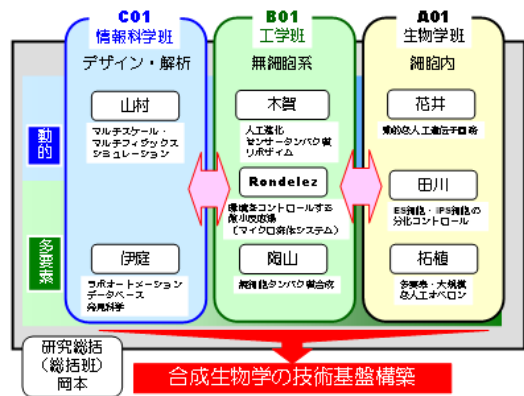


図2 計画研究体制

4. 研究成果

本研究領域では、生物班(A01班)がリーダーシップをとり、生物班が必要とする要素技術を各計画班が開発し、提供することで、合成生物学の基盤構築を目指す。このことで、各計画班が行う研究のベクトルがいくつかの大きなピークに向かうと考えている。このため、8件設定した計画研究班同士は、必ず共同研究を行う様に領域開始時に設定されている。領域の具体的な目標は次の3つである。1) 細胞密度・栄養源・生産物を感知し、自ら制御を行い、物質を生産する『自律制御生産細胞』の構築、2) 分化誘導補助細胞が、分化状態を感知し、目的の細胞へ分化誘導する『自律制御分化補助細胞による分化誘導システム』の構築、3) 多数(10以上)の遺伝子から構成される人工代謝経路を構築し、目的の物質を生産する『人工代謝経路を用いた多段階反応を必要とする目的物質の生産』。どの目標も、生物班のみでは達成できず、情報科学班(C01)、工学班(B01)との連携が必須であり、3つの目標のどれも達成できれば、世界初の画期的な成果となる。

1) に関し、これまでの研究成果は、以下の通りである；生体分子10要素以下の少数要素で構成され、望みの動的挙動を実現するための人工遺伝子回路を生体内(in vivo)に構築することを目的に研究を行った。伊庭班(C01班)ならびに山村班(C01班)の数理論法と発見科学を利用し、安定して発振

する人工遺伝子回路の設計を行った。また、公募班の荒木が開発した酵素反応データベースを利用する人工代謝経路設計ソフトウェアを用い、人工代謝経路を設計し、細胞内で構築した。また、Rondelez班(B01班)で開発されたマイクロ流体リアクターを利用することで、細胞外の環境を精密にコントロールした状態で、一細胞の動特性を正確に解析した。前半2年間は、現存の生体分子を用いた人工遺伝子回路と人工代謝経路を行った。最終的に、①十分な菌体密度を担保しながら中央代謝経路の余剰な代謝流束を物質生産に転用するための代謝トグルスイッチ開発、②光波長に応答して遺伝子発現制御(緑色でON、赤色でOFF)を行う大腸菌の構築、③任意の菌体密度で自律的に代謝流束制御を行うイソプロパノール生産大腸菌の構築、に成功した。

2) に関し、最終的に、人工遺伝子回路によって分化誘導因子を分化補助細胞から分泌させることを目標としているが、研究初期である前半2年間は、外部から誘導因子を与えることにした。このため、Rondelez班(B01班)と共同で、肝前駆細胞から肝細胞と胆管細胞への分化制御のための流体マイクロデバイスシステムを作製して、肝前駆細胞株を用いて検討を行ってきた。また、分化補助細胞から複数の分化補助因子を順次分泌させるために、Dox添加により2つの分化補助因子の分泌が切り替わるスイッチの作成を、花井班(A01班)および公募班の上平と行った。最終的に、①分化誘導因子の時空間的制御手法の最適化、②未分化維持に重要なLIFと内胚葉分化に必要なアクチビンの発現ベクターの作製、③肝前駆細胞から肝細胞と胆管上皮細胞を分化誘導する系において、B01Rondelez班(計画班)との共同研究によりマイクロ流体デバイスで、各々の分化誘導因子を層流で流し分化誘導を試み、デバイスの最適化を進める、の成果を得た。

3) に関しては、細胞中の代謝経路のような、多数(～数10)の遺伝子が関与する複雑系において、各遺伝子発現量(酵素量)の量比を協調的に制御することでアウトプット(代謝産物量)を最大化するための回路、すなわち“多因子”による“定常的”遺伝子発現の回路の構築を目的としている。一連の遺伝子群を連結した人工オペロンをどのようにデザインすればよいかを、大腸菌が本来生産しないカロテノイド・アントシアニンといった色素性物質の代謝経路を具体例に取り上げて検証した。その結果、①グルコースからカロテノイドまでの一連の28個の代謝経路遺伝子を連結した人工オペロンプラスミドをOGAB法により構築し、大腸菌ではあるが酵母の一次代謝経路遺伝子によりカロテノイドを生産する株の構築、②シロイヌナズナよりクローン化したアントシアニン合成遺伝子群をどのような比率で発現するかをin vitroの反応系により突き止め、こ

の酵素量比で発現する人工オペロンを構築し、アントシアニンをコロニーが着色する程度に生産する大腸菌の構築、に成功した。

以下に、総括班の活動を年度ごとにまとめる。

2011年度

- ① 8月18日：第1回領域全体会議（東京）
- ② 8月22日：第63回日本生物工学会大会（東京）にて、ワークショップ「合成生物学の挑戦と将来」を企画・発表
- ③ 11月13—14日：第2回領域全体会議（山形）

2012年度

- ① 5月16—18日：第3回領域全体会議（福岡）
- ② 9月18日：15th. International Biotechnology Symposium and Exhibition（韓国）にて、ワークショップ 1st. Korea-Japan Synthetic Biology Symposium を共同企画・発表
- ③ 9月20日：化学工学会第44回秋季大会（仙台）にて、ワークショップ「合成生物学が拓くバイオプロセス開発へのインパクト」を企画・協賛・発表
- ④ 10月18日：第1回合成生物学技術セミナー（東京）開催（合成生物学の情報科学実習（モデリング・シミュレーション））
- ⑤ 11月21—22日：「細胞を創る」研究会 5.0 共催・発表

2013年度

- ① 10月29—31日：第4回領域全体会議（東京）、CBI学会2013年大会（東京）にて、“Emerging Hot Topics in Chem-Bio-Informatics”を科研費新学術領域「分子ロボティクス」と共催し、公開国際シンポジウム”Synthetic Biology for Comprehension of Biomolecular Network”を企画・発表
- ② 11月14—15日：「細胞を創る」研究会 6.0 共催・発表
- ③ 3月10—11日：第2回合成生物学技術セミナー（東京）開催（合成生物学の分子生物学実習（遺伝子組換え実験・発現実験））

2014年度

- ① 5月19—21日：第5回領域全体会議（福岡）
- ② 11月13—14日：「細胞を創る」研究会 7.0 共催・発表

2015年度

- ① 9月17日—9月18日：International Symposium on Synthetic Systems Biology: Synthetic Metabolic Pathway, Mathematical System Analysis and Design of Bio-inspired Systems 開催（福岡）
- ② 9月28日—10月2日：第3回合成生物学技術セミナー（福岡）開催（合成生物学の分子生物学実習および合成生物学の情報科学実習）

- ③ 10月5—6日：第6回領域全体会議（福岡）
- ④ 11月12—13日：「細胞を創る」研究 8.0 共催・発表（基調講演）、オーガナイズドセッション「合成生物学の基盤構築—その現状と課題—」企画・発表

5. 主な発表論文等

*総括班研究代表者（岡本正宏）のみ
〔雑誌論文〕（計6件）

- ① 岡本正宏、合成システム生物学の展望、生物工学会誌、査読有、94(4)、2016、177-179、ISSN 0919-3758
- ② A. Komori, Y. Maki, I. Ono, M. Okamoto: Investing noise tolerance in an efficient engine for inferring biological regulatory networks, J. Bioinform. Comput. Biol., 査読有, 2015, 13(3), 1541006
- ③ K. Iwamoto, H. Hamada, Y. Eguchi, M. Okamoto: Stochasticity of Intranuclear Biochemical Reaction Processes Controls the Final Decision of Cell Fate Associated with DNA Damage, PLOS ONE, 査読有, 2014, 9, e101333
- ④ A. Komori, Y. Maki, I. Ono, M. Okamoto: How to Infer the Interactive Large Scale Regulatory Network in “Omic” Studies, Procedia Computer Sci., 査読有, 2013, 23, 44-52
- ⑤ 岡本正宏、合成生物学の技術的展望、生物工学会誌、査読有、91(6)、2013、177-179、ISSN 0919-3758
- ⑥ A. Komori, Y. Maki, M. Nakatsui, I. Ono, M. Okamoto: Efficient Numerical Optimization Algorithm Based on New Real-Coded Genetic Algorithm, AREX+JGG, and Application to the Inverse Problem in Systems Biology, Applied Mathematics, 査読有, 2012, 03(30), 1463-1470

〔学会発表〕（計2件）

- ① 岡本正宏：合成生物学の基盤構築—その現状と課題—、「細胞を創る」研究会 8.0, 基調講演, 2015年11月12-13日、大阪
- ② M. Okamoto: Switching Mechanisms of Cyclic Enzyme System: Role as Chemical Diode, French-Japanese Seminar, Bioinspired Methods and Applications, Feb 4-6, 2013, Tokyo

〔図書〕（計1件）

- ① 厨 祐喜、岡本正宏：代謝工学によるバイオアルコール生産の向上、植田充美監修、合成生物学の隆起、シーエムシー出版、東京、p. 82-90 (2012)

〔その他〕

ホームページ：<http://www.syn-biol.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 正宏 (Masahiro, Okamoto)
九州大学・大学院農学研究院・主幹教授
研究者番号：40211122

(3) 連携研究者

花井 泰三 (Taizo, Hanai)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：60283397

田川 陽一 (Yoichi, Tagawa)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授
研究者番号：70262079

柘植 謙爾 (Kenji, Tsuge)
慶応義塾大学・大学院政策・メディア研究
科・講師
研究者番号：70399690

木賀 大介 (Daisuke, Kiga)
東京工業大学・大学院総合理工学研究院・
准教授
研究者番号：30376587

ロンデレーズ ヤニック (Yannick,
Rondelez)
東京大学・生産技術研究所・准教授
研究者番号：10548770

陶山 明 (Akira, Suyama)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：90163063

山村 雅幸 (Masayuki, Yamamura)
東京工業大学・大学院総合理工学研究院・
教授
研究者番号：00220442

伊庭 斉志 (Hitoshi, Iba)
東京大学・大学院工学系研究院・教授
研究者番号：40302773