

## 「人工遺伝子回路」の構築とその制御

関根 亮二<sup>1,3</sup>, 木賀 大介<sup>1,2</sup>

人工遺伝子回路は、宿主の遺伝子発現の時空間パターンをプログラムするように遺伝子の組み合わせが設計・構築された、遺伝子の相互作用ネットワークである。人工遺伝子回路の設計において、生化学的な知見に基づいてたてた数理モデルを使った機能予測が重要である。精度の高い機能予測のための数理モデルへの改良は、遺伝子発現ダイナミクスに関する仮説を提唱または検証することにつながり、生化学に新たな視点を与えることが期待される。本稿では、筆者らの研究を例にして、人工遺伝子回路の設計と構築およびより数理モデルの重要性が高い制御について解説し、その後人工遺伝子回路の設計と構築そして制御に関する近年の研究について解説する。

### 1. はじめに

生命は、多種の生体高分子によって構成される生化学反応系に支えられている。各々の生化学反応の解析には数理モデル化が伴い、試験管内や細胞内に達成された各種条件それぞれの生化学反応のダイナミクスが化学反応式や経験則から導き出された数式で記述できる。数理モデル化された反応式を複数組み合わせることで、より大規模な生化学反応系について計算機シミュレーションすることも可能である。そして、近年の技術的進歩により、多段階からなる生化学反応系を、試験管内や細胞内にも構築できるようになってきた。実験者が構築した生化学反応系の実際の反応

の時間変化を十分に記述できる数理モデルを改良し生化学に新たな視点を与えることが、生化学の応用分野としての、人工遺伝子回路研究の目的である。

人工遺伝子回路は、遺伝子発現の時空間パターンがプログラムされた動作を示すように、生化学的な知見に基づいて遺伝子の組み合わせが設計・構築された、遺伝子の相互作用ネットワークである。組み合わせられる遺伝子の試験管内の生化学的な性質は多くの場合既知である。必要に応じて新たに改変される遺伝子についても、生化学的な性質をあらかじめ測定する、もしくは、設計に基づいて改変の要求仕様を知ることが重要である。このため、人工遺伝子回路の構築は、ネットワーク構造の設計、計算機シミュレーションによる設計の評価を含む<sup>1)</sup>。設計の評価では、生化学反応として妥当なパラメータで計算機シミュレーションを行い、所望の機能を実現できるかどうかをチェックする。所望の機能を実現できない場合や、実現できるパラメータの範囲が著しく狭い場合は、設計をし直す。設計の評価が終わったら、人工遺伝子回路を部分構造単位で部分機能のチェックをしながら段階的に構築する。当然、部分構造どうしをつなぎ合わせる時に、モデルと実際の反応の差異が蓄積され設計どおりの動作から外れてしまう場合があるので、遺伝子配列への変異導入によるパラメータチューニングが必要になるケースもある。このような工学的なアプローチによって、同調振動子<sup>2)</sup>やパターン形成<sup>3,4)</sup>、論理ゲート<sup>5)</sup>など多様な機能を実現できている。

人工遺伝子回路でプログラムされた機能の微修正をする場合、新たな回路構造を構築する以外に、人工遺伝子回路を「制御」することもできる。人工遺伝子回路の制御は、

<sup>1</sup> 東京工業大学総合理工学研究科知能システム科学専攻(〒226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259)

<sup>2</sup> 東京工業大学地球生命研究所(〒152-8551 東京都目黒区大岡山 2-12-1)

<sup>3</sup> 現所属：理化学研究所再生発生科学総合研究センター再構成生物学研究ユニット(〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3)

**Construction and control of synthetic genetic circuits**  
**Ryoji Sekine<sup>1,3</sup> and Daisuke Kiga<sup>1,2</sup>** (<sup>1</sup>Department of Computational Intelligence and Systems Science, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-tyo, Yokohama Midori-ku, Kanagawa 226-8503, Japan, <sup>2</sup>Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8551, Japan)

<sup>3</sup>Laboratory for Reconstitutive Developmental Biology, RIKEN Center for Developmental Biology (Minatojiminamimach 2-2-3, Kobe Chuo-ku, Hyogo650-0047, Japan)

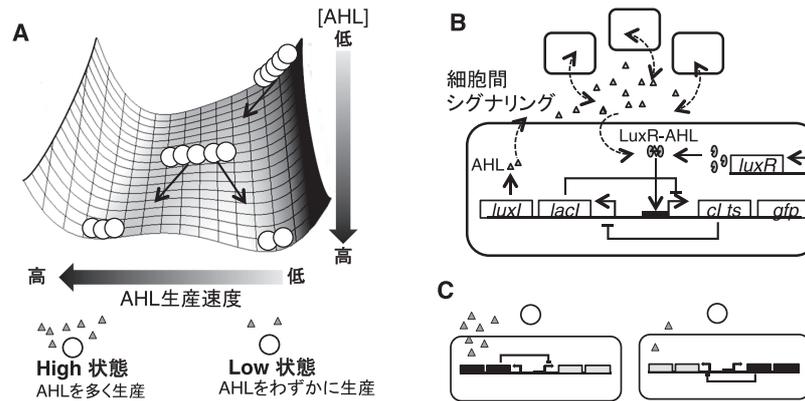


図1 細胞種多様化を大腸菌にプログラムする人工遺伝子回路の設計  
(A) 筆者らが目的とする細胞種多様化の様子. (B) 多様化回路のネットワーク構造. (C) High状態の細胞とLow状態の細胞の細胞内の遺伝子発現の様子. 黒が高発現, 灰色が低発現を示す.

静的制御と動的制御とに区別できる. 静的制御は遺伝子配列への変異導入によるパラメータチューニングや, 決められた量・タイミングでの外部刺激による発現誘導である. 動的制御は遺伝子発現量の現在の値を観測しながら, 適宜外部刺激のオン・オフパターン, または刺激の大きさを変えることである. 静的制御に関しては, 進化分子工学の技術を使ったパラメータチューニング法<sup>6)</sup>や, *de novo*にリボソーム結合配列を設計する方法<sup>7)</sup>など多岐にわたって研究が進んでいる. 動的制御に関しては, 近年いくつかの研究が発表されている<sup>8,9)</sup>. 人工遺伝子回路の「制御」は, 遺伝子発現に関して所望の時間パターンを持つ摂動を定量的に与えるという使い方ができる. それゆえに, 宿主生物の目的の遺伝子の働きを調べる上で, 遺伝子発現の単純なオン・オフという従来の方法よりも多くの情報を得ることが期待できる.

本稿では, まず筆者らが行った細胞種多様化研究<sup>10)</sup>を例にして, 人工遺伝子回路の構築および静的制御について解説する. 続いて人工遺伝子回路の動的制御の近年の進捗について紹介したのち, 人工遺伝子回路の構築とその制御について今後の展望と課題を議論する.

## 2. 細胞種多様化のための人工遺伝子回路(多様化回路)

筆者らは, 細胞間シグナル分子濃度を介して細胞種が一つから二つに多様化する機能(図1A)を大腸菌にプログラムする人工遺伝子回路, 「多様化回路」(図1B)を, Waddington地形の概念をもとに構築した. Waddington地形とは一つだった谷の数が奥から手前に向かって増えるポテンシャルマップ様の概念<sup>11)</sup>で, それぞれの谷が個々の細胞種を表す. 細胞種多様化は, Waddington地形上に置かれた玉を細胞と見立てて, 玉が転がるようすで解釈される. Waddington地形の本質は, 安定状態の数が増えることといえるので, 筆者らは, 多様化回路としてシグナル分子の濃度増加によって安定状態が一つから二つに分岐するような回路を設計した.

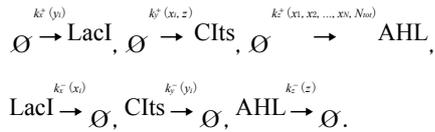
多様化回路は相互抑制機構と細胞間シグナリング機構とからなる. 双安定性機構には, 2種類のタンパク質LacIとCltsによる, 合成生物学で頻用される相互抑制構造<sup>12)</sup>を利用した. また, 細胞間シグナル分子として, *Vibrio fischeri*のAcyl-homoserine lactone (AHL)<sup>13)</sup>を採用した. 相互抑制機構は, 二つの抑制タンパク質の生産速度の時定数が近い値の場合は一方の抑制タンパク質が優位に生産される安定状態が二つ存在(双安定)し, 値に差がある場合は時定数の値が大きい方の抑制タンパク質が優位に生産される状態のみが安定になる, という性質を持つ. 我々はこの性質に着目し, LacI-Clts相互抑制機構のうちClts生産の時定数がAHL濃度依存になるような人工遺伝子回路として多様化回路を設計した.

多様化回路は, 相互抑制構造のために $P_{L-lcon}$ プロモーターと $P_{luxlac}$ プロモーターを持つ. この中で $P_{L-lcon}$ は $P_{luxlac}$ が発現をつかさどるCltsによって転写抑制される一方で,  $P_{luxlac}$ は $P_{L-lcon}$ が発現をつかさどるLacIにより転写抑制される. 多様化回路では, 抑制タンパク質以外に, AHL合成酵素LuxIと細胞種の認識のためのレポータータンパク質GFP (green fluorescent protein)がそれぞれ $P_{L-lcon}$ と $P_{luxlac}$ によって発現される. 本研究では, 細胞間シグナリング分子AHLの合成酵素LuxIとLacIとが多く発現している状態をHigh状態, GFPとCltsとが多く発現する状態をLow状態と定義する(図1C).

相互抑制構造の構成要素であるClts生産の時定数が細胞間シグナル濃度依存になるように,  $P_{luxlac}$ はその転写活性がAHL濃度依存になるように設計されている. よって多様化回路は, 低AHL濃度下では $P_{luxlac}$ の下流の遺伝子はごく微量発現するのみでHigh状態だけが安定である. 一方で, この回路は高AHL濃度下で双安定になる. この仕組みにより, 回路が導入された大腸菌の集団がLow状態へ誘導されると, 誘導解除後にLow状態とHigh状態に細胞種多様化するという挙動が実現できる(図1A).

3. 計算機シミュレーション

多様化回路の設計が妥当かどうかを調べるために、多様化回路を導入した大腸菌集団の挙動を数理モデル化し、計算機シミュレーションを行った。筆者らは、大腸菌集団において各細胞内の遺伝子発現にノイズを入れるため、決定論的シミュレーションではなく、ポアソン  $\tau$ -leap 法<sup>14)</sup>で確率シミュレーションを行うことにした。このシミュレーションのため、我々は以下の簡略化した生化学反応をもとに数理モデルをたてた。



ここで、 $x_i$  と  $y_i$  ( $i=1, 2, \dots, N$ ) は、それぞれ  $i$  番目の細胞内の LacI および CI<sub>*i*</sub> 分子の数を表している。また、 $z$  は培養液内の AHL 分子の数を表している。我々は数理モデルをたてる上で以下の四つの仮定をおいた。(1) 各細胞内に存在する LuxR 分子の数は十分に多い。AHL は LuxR と LuxR-AHL 複合体を作り、P<sub>luxlac</sub> プロモーターからの転写を活性化する。LuxR 分子が十分に多い場合は、LuxR-AHL 複合体の数は AHL 濃度のみの関数と近似できるので、P<sub>luxlac</sub> プロモーターからの転写は AHL 濃度のみの関数とした。(2) 細胞内で生産される AHL 分子は即座に細胞壁を通過し、培養液内に均等に拡散する。AHL 分子が細胞壁を即座に通過することは先行研究<sup>13)</sup>で示されているのに加え、想定する実験系では培養液が常に攪拌されている状況なので、妥当な仮定である。(3)  $V_m$  (リットル, L) の培養液に存在する細胞数  $N_{tot}$  は指数的に増加する。この仮定は、実際の実験で対数増殖期と呼ばれる低い細胞密度の範囲で培養する場合に限って合理的である。(4) 簡単のために、増加する  $N_{tot}$  個の細胞のうち、 $N$  個の細胞を代表者として注目し、これらの細胞集団を AHL のみが入り出可能な  $N$  個の化学反応槽としてとらえる。上記の各反応の propensity function  $k_i^\gamma$  ( $\gamma = +, -$  および  $\mu = x, y, z$ ) は、以下の一般的なヒル式をもとにした数式で表される。

$$k_x^+(y_i) = \frac{\alpha_x}{1 + \left(\frac{y_i}{\Omega_m K_y}\right)^{n_y}}, \tag{1}$$

$$k_y^+(x_i, z) = \frac{\left(\frac{z}{\Omega_m K_z}\right)^{n_z}}{1 + \left(\frac{z}{\Omega_m K_z}\right)^{n_z}} \frac{\alpha_y}{1 + \left(\frac{x_i}{\Omega_m K_x}\right)^{n_x}}, \tag{2}$$

$$k_z^+(x_1, \dots, x_N, N_{tot}) = \frac{N_{tot}}{N} \left( \lambda \sum_{i=1}^N x_i \right), \tag{3}$$

$$k_x^-(x_i) = d_x x_i, \tag{4}$$

$$k_y^-(y_i) = d_y y_i, \tag{5}$$

$$k_z^-(z) = d_z z, \tag{6}$$

$$N_{tot} = N_{ini} 2^T. \tag{7}$$

ここで、 $\alpha_x$  と  $\alpha_y$  はそれぞれ LacI と CI<sub>*i*</sub> の最大生産速度で、 $\lambda$  は AHL 生産の時定数を表している。 $K_x, K_y, K_z$  は、それぞれ LacI, CI<sub>*i*</sub>, AHL の対応するプロモーターへの解離定数を表している。そして  $d_x, d_y, d_z$  は、それぞれ LacI, CI<sub>*i*</sub>, AHL の分解率を表している。我々は分子数から濃度に変換するための定数を二つ導入した。一つ目の定数は、細胞内の分子数を濃度に変換する定数  $\Omega_c = 1.66 \times 10^{-15}$  (L)  $\times 6.02 \times 10^{23}$  (mol<sup>-1</sup>)  $\approx 1.0 \times 10^3$  (分子/ $\mu$ M) である。二つ目の定数は、 $V_m$  (L) の培養液内の分子数を濃度に変換する定数  $\Omega_m = V_m$  (L)  $\times 6.02 \times 10^{23}$  (mol<sup>-1</sup>)  $\approx 6.0 \times V_m \times 10^{17}$  (分子/ $\mu$ M) である。また、細胞数の初期値  $N_{ini}$  は、初期菌密度  $OD_{ini}$  を使って、 $N_{ini} = OD_{ini} \times V_m \times 10^{12}$  と計算できる。

(1) 式は、LacI の生産が CI<sub>*i*</sub> によって抑制されていることを表現している。(2) 式は、CI<sub>*i*</sub> の生産が LacI によって抑制され、AHL によって活性化されていることを表現している。(2) 式が AHL による活性化のヒル式と LacI による抑制のヒル式の掛け算で与えられることは、類似のプロモーターを使った先行研究<sup>2)</sup>で示されている。本数理モデルでは、AHL 合成酵素 LuxI の数は、同じく P<sub>L<sub>1</sub>com</sub> プロモーターに発現調整されている LacI の数と比例関係にあるとしている(式3)。したがって、 $\lambda$  は LacI の数と LuxI の数の比と、LuxI の AHL 合成速度に依存した値になっている。(7) 式は、細胞数が  $T$  分で2倍に増えることを表している。我々は、上記の数理モデルに対し、 $\tau$ -leap 法を適用して確率シミュレーションをした。シミュレーションに用いたパラメータリストは表1のとおりである。なお P<sub>luxlac</sub> プロモーターの AHL に対する感度を表す  $K_z$  と  $n_z$  の

表1 シミュレーションに用いたパラメータリスト

パラメータ	パラメータ値	単位
$A_x$	$6.0 \times 10^{-2}$	$\mu\text{M}/\text{min}$
$\alpha_y$	0.10	$\mu\text{M}/\text{min}$
$n_x$	2.0	
$n_y$	2.0	
$n_z$	1.8	
$K_x$	$5.0 \times 10^{-2}$	$\mu\text{M}$
$K_y$	$5.0 \times 10^{-2}$	$\mu\text{M}$
$K_z$	$9.0 \times 10^{-3}$	$\mu\text{M}$
$d_x$	$2.3 \times 10^{-2}$	$\text{min}^{-1}$
$d_y$	$2.3 \times 10^{-2}$	$\text{min}^{-1}$
$d_z$	$1.0 \times 10^{-2}$	$\text{min}^{-1}$
$V_m$	0.10	L
$OD_{ini}$	$3.0 \times 10^{-4}$	
$\lambda$	$1.0 \times 10^2$	$\text{min}^{-1}$

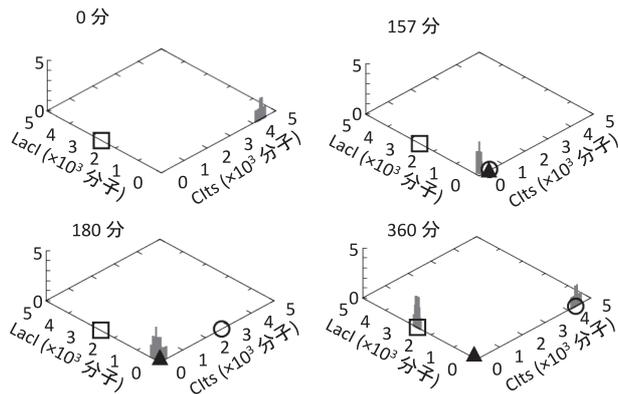


図2 多様化回路を導入した大腸菌集団の細胞種多様化の様子のシミュレーション

中抜き丸と四角はそれぞれ High 状態と Low 状態側の安定平衡点、三角は不安定平衡点を表す。

値については、あらかじめとった実験のデータに (2) 式のパラメータをフィッティングする形で得た。なお、大腸菌の遺伝子発現系において、転写因子がプロモーターへ結合するのに要する時間スケールは~1秒と、転写や翻訳の時間スケールである分に比べて短い<sup>15)</sup>。したがって、筆者らは、転写因子による転写活性や転写抑制を表す式をヒル式に近似した。

図2は、多様化回路を導入した大腸菌集団の細胞種多様化の様子を LacI-CIts 濃度空間上にヒストグラムとして記述した図である。また、安定性の時間変化を可視化するため、注目する変数の時間変化が0である点の集合であるヌルクライン、および、LacI濃度に関するヌルクラインと CIts濃度に関するヌルクラインとの交点である安定・不安定平衡点を、図に併記した。なお、図2で使われたすべてのパラメータは表1に記した。初期状態としてすべての多様化回路細胞を Low 状態に培養液の AHL 濃度をゼロにセットすると、細胞集団は High 状態に遷移し始めた(図2, 0分)。High 状態への遷移中に、細胞による AHL 生産が徐々に増加していき、AHLがある程度蓄積することで Low 状態の安定平衡点と不安定平衡点が現れる。不安定平衡点は High 状態の安定平衡点に収束する領域と Low 状態の安定平衡点に収束する領域との分水嶺上の点である(図2, 157分)。不安定平衡点の位置は、 $P_{luxlac}$  プロモーターがほぼ完全に活性化される AHL 濃度になるまで、AHLが蓄積していくに従って変化する(図2, 180分)。ここで、もし細胞集団の分布が不安定平衡点をまたいでいたら最終的に二つの細胞種に多様化する(図2, 360分)。もし AHL が蓄積する速度が早いために、不安定平衡点の位置の変化がなくなったときの細胞集団が Low 状態に収束する領域のみに分布していたら、最終的には Low 状態だけの細胞集団になる。また、High 状態についても同様である。

#### 4. 多様化回路の部分回路の構築および部分回路のシグナル依存の双安定性の確認

前節までで、多様化回路の設計の妥当性を計算機シミュレーションによって調べたので、次は多様化回路を段階的に構築する。多様化回路の設計で最も重要な要素は AHL 濃度依存の安定平衡点の数の変化である。したがって本研究では、AHL 濃度依存の安定平衡点の数の変化を確認するために、多様化回路のプロトタイプとして、*luxI* 遺伝子が入っていないプラスミド pHT toggle と LuxR を恒常発現するプラスミド pLuxR (図3A)をまず構築した。そして、pHT toggle と pLuxR を導入した大腸菌 (HT toggle 細胞)の集団に対して外部から AHL を添加した場合の Low 状態、High 状態の安定性を調べた。AHL を添加した条件下では、細胞集団の分布はどちらの細胞種に誘導した場合においてもほとんど変化がなかったので、どちらの細胞種も安定であることが確認できた。そして、AHL を添加しない条件下では、High 状態に誘導した細胞集団の分布はほとんど変化しなかったが、Low 状態に誘導した細胞集団の分布は時間とともに High 状態に遷移した。したがって、HT toggle 細胞は我々が設計したように AHL 存在下では両状態が安定 (双安定)、AHL 非存在下では High 状態のみ安定であることが確認できた(図3B)。また、この実験結果は AHL 濃度が十分に高い場合に細胞種のスイッチングが起きないことも示している。

計算機シミュレーションから、Low 状態から High 状態への遷移途中に双安定になれば細胞種多様化が実現できることが予想された。そこで本研究では HT toggle 細胞に AHL を添加するタイミングを変えて、他律的な多様化が起こることを確認した(図4A)。予想していたとおり、適切なタイミング (誘導解除から 120分) で AHL を添加すると High 状態への遷移途中の細胞集団が二つに分かれ、最終的に二つの細胞種に多様化することが確認できた(図4B)。また、添加のタイミングが早すぎる (誘導解除から 0分) 場合はすべてが Low 状態に、添加のタイミングが遅すぎる (誘導解除から 240分) 場合すべてが High 状態へ収束した。この結果は計算機シミュレーションで予測していたように、AHL 蓄積速度が細胞種多様化に重要な要素であることを示している。

#### 5. 多様化回路の構築および多様化回路を導入した細胞集団における細胞種多様化の確認

筆者らは、pHT toggle に LuxI の AHL 合成活性を適切な量に向上させた変異体 LuxII.5C をコードする DNA 配列を挿入する形で、pHT<sub>luxII.5C</sub> を調製した。多様化回路として pHT<sub>luxII.5C</sub> と pLuxR が導入された大腸菌集団は、培養時間の経過とともに細胞種多様化した(図5)。多様化回路を導入した大腸菌を Low 状態に誘導後、その

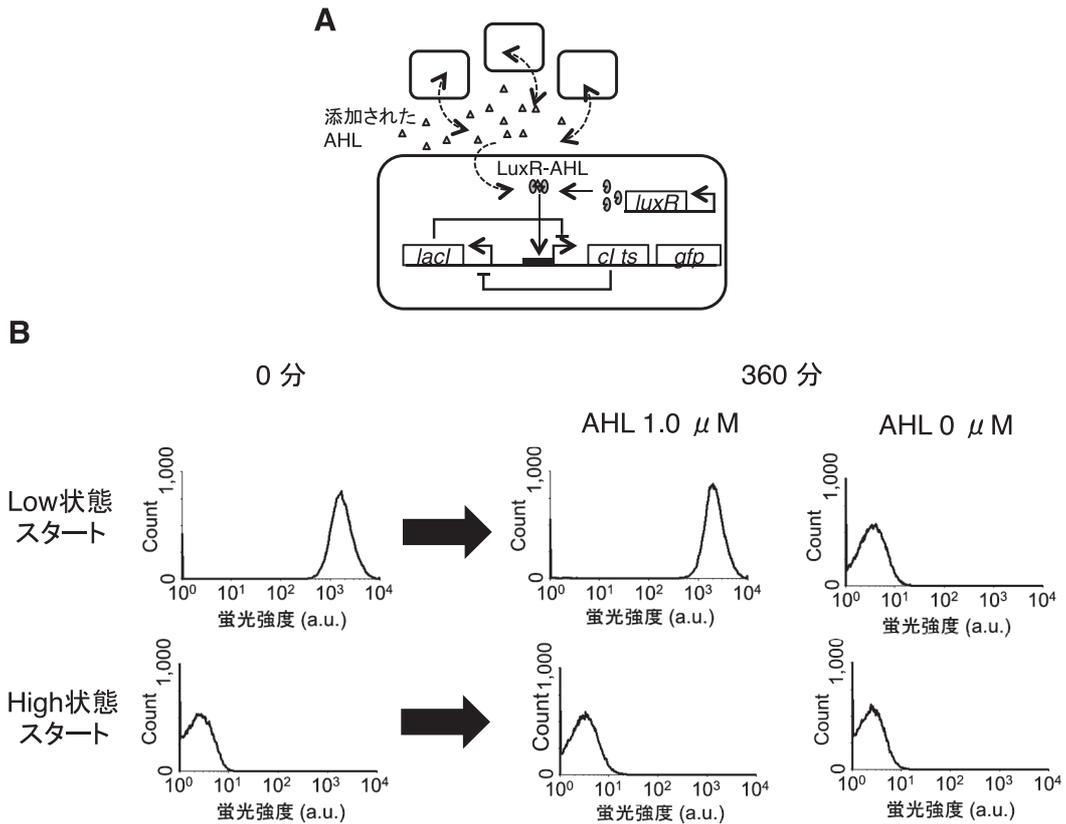


図3 多様化回路のプロトタイプ HT toggle における, AHL 濃度に依存した安定平衡点の数の変化 (A) HT toggle のネットワーク構造. (B) AHL 濃度に依存した安定平衡点の数の変化.

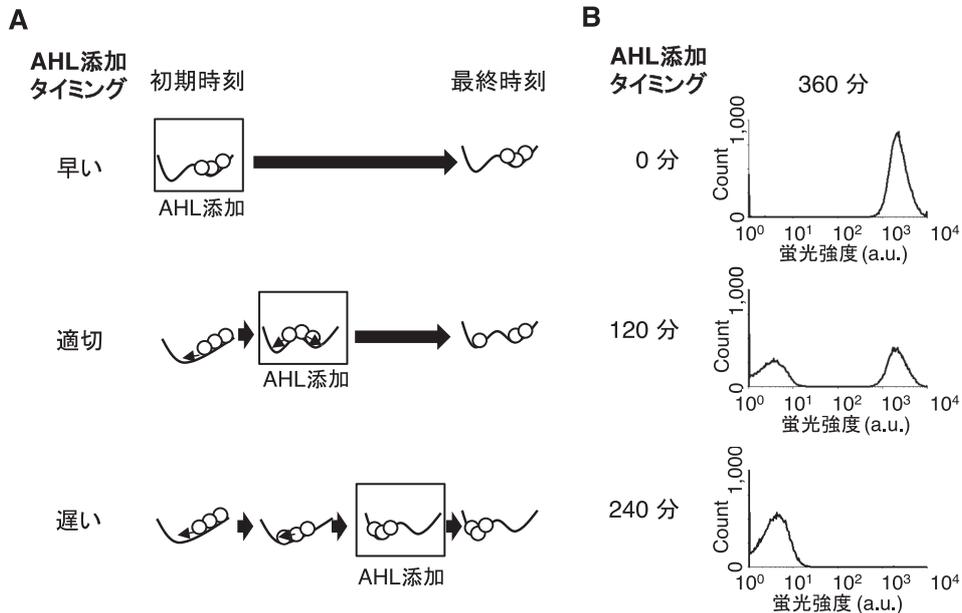


図4 HT toggle を双安定にするタイミングを変えた場合の, 細胞種多様化の様子の変化 (A) 実験の概念図. (B) 対応する実験結果.

誘導を解除すると, 大腸菌集団は AHL 濃度が低いことに起因して, High 状態に移り始める. 誘導解除から 180 分後では, 両状態の中間にまで遷移した細胞集団が二つの集団に分かれ始める. 360 分後には, さらに集団間の差が広がり, それぞれの集団の蛍光強度値がこれ以上変わらない.

### 6. 多様化回路の静的制御による分化比の調節

さらに筆者らは, 計算機シミュレーションと図4の結果とから, AHL 蓄積速度の静的制御によって最終的な細胞種の比率を調節できると予想した. AHL 蓄積速度は, 1

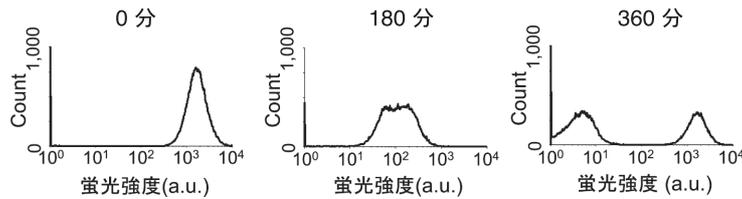


図5 多様化回路を導入した大腸菌集団の細胞種多様化

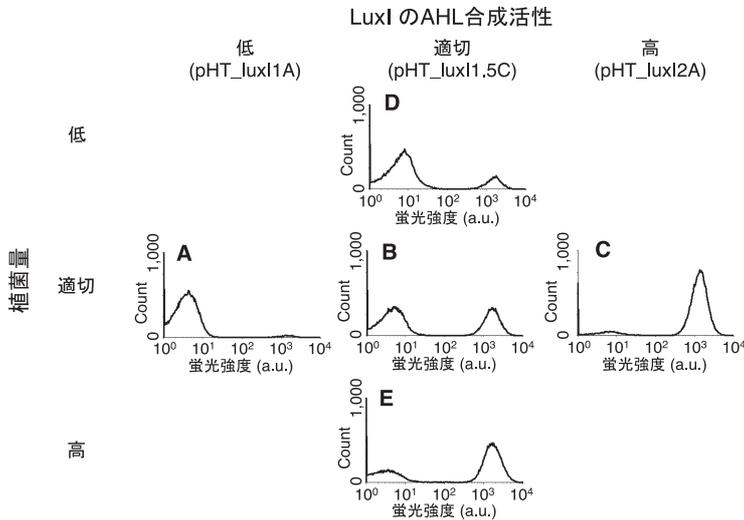


図6 AHLの蓄積速度を操作した場合の、最終時刻における細胞種比率の変化

(A, B, C) LuxIのAHL合成活性を操作した場合の変化。(D, B, E) 植菌量を操作した場合の変化。

匹あたりの生産量と細胞密度との二つの実験条件によって静的制御できる。地形の傾きを変える一つ目の実験条件である1細胞あたりのAHL生産量は、AHL合成酵素LuxIの反応速度定数に依存する。本研究では、*luxI*遺伝子の適切な点変異により、pHT\_luxI1.5CよりもAHL合成活性の低い*luxI*変異体遺伝子を持つpHT\_luxI1Aと、AHL合成活性の低い*luxI*変異体遺伝子を持つpHT\_luxI2Aとを調製した。それぞれのプラスミドを入れた大腸菌集団の多様化後のGFP蛍光強度のヒストグラムは、図6A, B, Cに示されたとおりである。pHT\_luxI2Aに関しては、AHL合成速度が大きいので、ほとんどの細胞がLow状態になった。また、pHT\_luxI1Aに関しては、AHL合成速度が小さいため、ほとんどの細胞がHigh状態になった。次に、地形の傾きを変えるもう一つの実験条件である細胞密度の操作として、誘導を解除したHT\_luxI1.5C細胞を含む菌液の添加量を変化させ、多様化後のGFP蛍光強度のヒストグラムを測定した(図6D, B, E)。使用している遺伝子配列セットが同一であるにも関わらず、初期菌密度が高いものはLow状態の比率が増え、低いものはHigh状態の比率が増えた。

## 7. 試験管内での人工遺伝子回路の構築

人工遺伝子回路の構築は、細胞内のみならず、試験管内でも進められている。試験管内の生化学反応ネットワーク

は細胞内のものよりも、内容物を研究者が完全に把握することができるため、モデル化に際しての利点大きい。たとえば、筆者らは、各種生物由来の酵素群を適切に組み合わせることで、同一試験管に加えられた分子に依存してあらかじめプログラムされた一連の反応が生じた結果として、出力RNAの転写を活性化する種々の反応モジュールを開発している<sup>16,17</sup>。その中で、2種類の入力RNAが共存した場合のみ転写が活性化される反応モジュールについては<sup>18</sup>、入力分子の量比が、転写の立ち上がりの速さや最大速度に与える影響について、モデルと実際の反応系それぞれの挙動が一致することが示されている。あるモジュールの出力RNAを次のモジュールの入力とすることも可能となっており、複数モジュールを接続したシステムのモデル化に基づいた大規模反応系の構築が目指されている。試験管内の反応系であるがゆえ、内容物がすべて判明していることに加え、天然の細胞・生体という環境の制約を超えた反応条件を用いることができる点も活用されていくことになるだろう。

## 8. 人工遺伝子回路の動的制御

細胞内の遺伝子発現における予期しない摂動や初期状態のずれが原因で、静的制御では遺伝子発現の詳細な制御に対応できない場合がある。そこで、現在の遺伝子発現量の観測値を元にして、外部刺激のオン・オフパターンまたは

大きさを逐次変える動的制御で遺伝子発現量の詳細な制御をする方法がある。人工遺伝子回路の動的制御は、回路設計や制御理論、観測装置および入力装置といった複数の要素からなる。特に、入力された外部刺激を細胞内の遺伝子発現に伝える遺伝子パーツが重要な要素である。たとえば、赤色光刺激と近赤外線刺激とで酵母における GFP の蛍光強度を制御した Miliars-Argeitis らの研究<sup>8)</sup>では、赤色光、近赤外線に応答して Gal プロモーターの転写の促進および抑制ができる素子を新たに設計、構築した。この素子は、Gal プロモーターへの結合ドメインに PhyB (フィトクロム B) が融合したタンパク質と、Gal プロモーターの転写活性化ドメインにフィトクロム相互作用因子 PIF3 が融合したタンパク質の二つからなる。PhyB は、赤色光下で PIF3 に結合する構造になり、近赤外線下で PIF3 に結合しない構造になる。したがって、赤色光下で Gal プロモーターの転写活性化ドメインが Gal プロモーターにアクセスしてプロモーターからの転写が促進される一方で、近赤外線下では転写が止まる。この研究では、このような素子を使い、モデル予測制御という制御理論を使って、フローサイトメーターで得た酵母集団における蛍光強度の平均値を目標値に追従させることに成功した。ほかには、マイクロ流体デバイスで培養している酵母の GFP の蛍光強度を蛍光顕微鏡によって 1 細胞レベルでタイムラプス観察をしながら動的制御をした Uhlendorf らの研究もある<sup>9)</sup>。この研究では、浸透圧刺激を入力とするため、浸透圧刺激によって Hog1 がリン酸化され、下流の遺伝子発現を促進する天然の HOG カスケードの下流に *yfp* 遺伝子を配置した人工遺伝子回路が構築されている。以上のように複数の要素技術の組み合わせによって、人工遺伝子回路の動的制御の方法が開発され始めている。今後は、動的制御のしやすさを指標とした人工遺伝子回路の設計、構築が進むだろう。

## 9. まとめ

本稿では、人工遺伝子回路の構築および静的・動的制御について解説をした。宿主の遺伝子発現を操るこれらの技術は、細胞工場における有用物質の生産スケジュールの最適化といった工学的な応用をはじめ、注目する遺伝子に任意の時間パターンを持つ摂動を与えて応答を調べるといっ

た理学的な応用が期待される。一方で、これらの応用には、数理モデルを使った人工遺伝子回路の機能予測が必須である。十分に精度の高い予測が可能な数理モデルへの改良が、生化学反応ネットワークがつくり出す遺伝子発現ダイナミクスに関する仮説を提唱または検証することに繋がり、生化学に新たな視点を与えることになるだろう。

## 文 献

- 1) Sekine, R., Kiga, D., & Yamamura, M. (2013) in *Natural Computing and Beyond* (Yasuhiro, S., & Toshiyuki, N. eds.), pp. 104–114, Springer, Tokyo.
- 2) Danino, T., Mondragón-Palomino, O., Tsimring, L., & Hasty, J. (2010) *Nature*, **463**, 326–330.
- 3) Basu, S., Gerchman, Y., Collins, C.H., Arnold, F.H., & Weiss, R. (2005) *Nature*, **434**, 1130–1134.
- 4) Tabor, J.J., Salis, H.M., Simpson, Z.B., Chevalier, A.A., Levskaya, A., Marcotte, E.M., Voigt, C.A., & Ellington, A.D. (2009) *Cell*, **137**, 1272–1281.
- 5) Siuti, P., Yazbek, J., & Lu, T.K. (2013) *Nat. Biotechnol.*, **31**, 448–452.
- 6) Cobb, R.E., Si, T., & Zhao, H. (2012) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 285–291.
- 7) Salis, H.M., Mirsky, E.A., & Voigt, C.A. (2009) *Nat. Biotechnol.*, **27**, 946–950.
- 8) Miliars-Argeitis, A., Summers, S., Stewart-Ornstein, J., Zuleta, I., Pincus, D., El-Samad, H., Khammash, M., & Lygeros, J. (2011) *Nat. Biotechnol.*, **29**, 1114–1116.
- 9) Uhlendorf, J., Miermont, A., Delaveau, T., Charvin, G., Fages, F., Bottani, S., Batt, G., & Hersen, P. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 14271–14276.
- 10) Sekine, R., Yamamura, M., Ayukawa, S., Ishimatsu, K., Akama, S., Takinoue, M., Hagiya, M., & Kiga, D. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17969–17973.
- 11) Waddington, C.H. (1957) *The Strategy of the Genes*, pp. 26–41, Allen & Unwin, London.
- 12) Gardner, T., Cantor, C., & Collins, J.J. (2000) *Nature*, **403**, 339–342.
- 13) Kaplan, H.B. & Greenberg, E.P. (1985) *J. Bacteriol.*, **163**, 1210–1214.
- 14) Gillespie, D. (2001) *J. Chem. Phys.*, **115**, 1716–1733.
- 15) Alon, U. (2007) *An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits*, p. 5, Chapman & Hall/CRC.
- 16) Ayukawa, S., Takinoue, M., & Kiga, D. (2011) *Acc. Chem. Res.*, **44**, 1369–1379.
- 17) Ayukawa, S., Sakai, Y., & Kiga, D. (2012) *Chem. Commun. (Camb.)*, **48**, 7556–7558.
- 18) Takinoue, M., Kiga, D., Shohda, K.-I., & Suyama, A. (2008) *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear Soft Matter Phys.*, **78**, 041921.

## 著者寸描

## ●関根亮二 (せきね りょうじ)



東京工業大学大学院総合理工学研究科知能システム科学専攻研究員、博士(工学)。

■略歴 1984年埼玉県に生る。2008年東京工業大学工学部卒業。13年同大学大学院総合理工学研究科知能システム科学専攻博士後期課程修了。13年より現職。

■研究テーマと抱負 人工遺伝子回路をツールとした高次生命現象のメカニズムの解明および動的制御。

■ホームページ <http://www.es.dis.titech.ac.jp/>

■趣味 サイクリング、ダーツ。

## ●木賀大介 (きが だいすけ)



東京工業大学大学院総合理工学研究科知能システム科学専攻・地球生命研究所准教授、博士(理学)。

■略歴 1971年生れ。94東京大学理学部卒業。99年同大学院理学系研究科生物化学専攻単位取得退学、同大博士(理学)。各所でのポストドク、東京大学大学院総合文化研究科での助手を経て、2005年より現職。

■研究テーマと抱負 生体高分子を集めたシステムをデザインして生命のありえたかたちを探る。各自のオリジナルな「生命」のデザインを志す大学院生、研究員を募集中。

■ホームページ <http://www.sb.dis.titech.ac.jp/>

■趣味 歴史。