

## 細胞内における人工遺伝子回路の構築

関根 亮二・木賀 大介\*

人工遺伝子回路は、遺伝子発現のタイミングと量とがプログラミングされた人工の遺伝子ネットワークである。人工遺伝子回路は、既知の遺伝子を適切に組み合わせることで設計・構築される。設計された人工遺伝子回路は、実際に遺伝子を組み合わせたDNAが調製される前に、この回路設計で所望の挙動が実現可能かどうかを計算機シミュレーションで評価される。このプロセスによって、実現が困難な設計を排除して無駄な実験を省くことができる。人工遺伝子回路の研究は、2000年に報告された2つの人工遺伝子回路<sup>1,2)</sup>から始まり、模様形成<sup>3-5)</sup>や周期振動<sup>1,6-8)</sup>など、遺伝子発現のさまざまな時間空間パターンが実現されている。

人工遺伝子回路は、理学および工学へ貢献するツールとなりうる。多数の遺伝子によって構成される複雑ネットワークからなる生命について、特定の現象に関わる部分を抽出・純化した人工遺伝子回路は、対象とする生命現象に対する仮説の検証に役立つ<sup>9)</sup>。また、人工遺伝子回路は、遺伝子発現のタイミングと量とをプログラミングできるので、有用物質の生産スケジュールの自律的な管理に応用できる。

本稿では、細胞内における人工遺伝子回路の構築について筆者の研究グループが行った、細胞間シグナリングを介した細胞種多様化のプログラミング<sup>10)</sup>を例にして解説する。さらに、本研究で設計・構築した人工遺伝子回路について、生命現象を知るツールとしての有用性、および有用物質生産における有用性の両面から議論する。

## 細胞間シグナリングを介した調節可能な細胞種多様化

発生現象や再生の過程における細胞種多様化は、Waddington地形を転がる玉の運動として抽象的に解釈されている<sup>11)</sup>。Waddington地形は、上の方では一つだった谷が、鉛直方向に下がると分岐しながら複数の谷へと増えていくシンプルな地形で、これらの谷一つひとつが細胞種を表している。分化済みの細胞がiPS細胞化できることから、Waddington地形の鉛直方向成分は時間という操作不可能なものではなく、細胞における遺伝子の発現状況という操作可能なものであることがわかってきた<sup>12)</sup>。この発現状況を変えられるのは、物理的な刺激や培養環境に含まれる化学物質などさまざまであるが、細

胞が集団で存在する以上、細胞が生産する分子による細胞間シグナリングも無視できない要因である。

本研究では、細胞間シグナリングを介した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を、Waddington地形の性質を参考にして設計し、続いて遺伝子を組み合わせたDNAを調製した(図1A)。Waddington地形は、発現状況を決める因子の濃度や強度によって安定平衡点の数が変わる地形だといえる。これに対応して、本研究では、細胞によって自律的に生産される細胞間シグナ

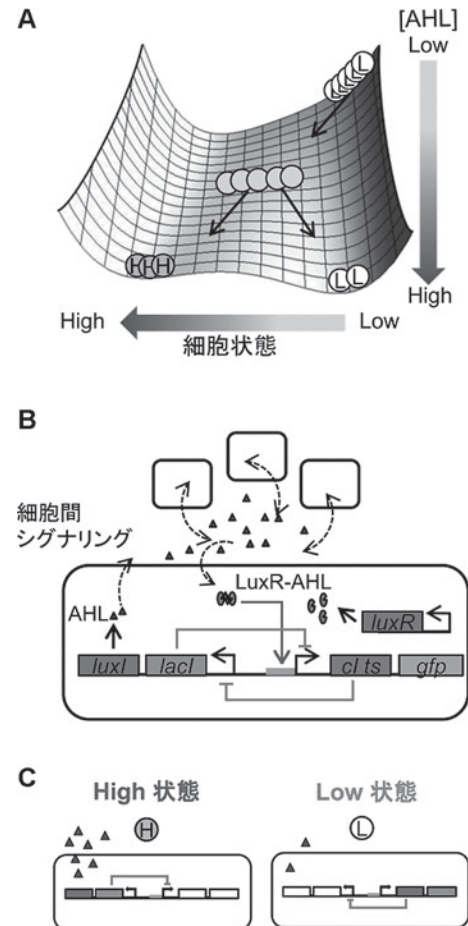


図1. Waddington地形の考えを参考にしたDiversity generatorの設計. A Waddington地形上での細胞種多様化の模式図. B Diversity generatorの人工遺伝子回路図. C High状態とLow状態の定義. Sekine, R. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **108**, 17969 (2011) より改変.

\* 著者紹介 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 (准教授) E-mail: kiga@dis.titech.ac.jp

ル分子濃度の増加によって、安定に存在する細胞状態の数がえるような人工遺伝子回路である、「Diversity generator」を設計した(図1B)。

### Diversity generatorの設計および設計の評価

Diversity generatorは細胞間シグナリング機構と細胞内の双安定性機構を組み合わせで設計された(図1B)。本研究では、細胞間シグナリング機構として、*Vibrio fischeri*が使っているAcyl-homoserine lactone (AHL)を介したクオラムセンシング機構<sup>13)</sup>を採用した。また、双安定性機構には、CI-LacIトグルスイッチがもつLacIとCIIsとの相互抑制構造<sup>2)</sup>を利用した。Diversity generatorは相互抑制のためにP<sub>L-1con</sub>プロモーターとP<sub>luxlac</sub>プロモーターという二つの重要なプロモーターをもつ。P<sub>L-1con</sub>はP<sub>luxlac</sub>が発現を司るCIIsによって転写抑制される。一方で、P<sub>luxlac</sub>はP<sub>L-1con</sub>が発現を司るLacIによって転写抑制される。Diversity generatorでは、抑制タンパク質以外に、AHL合成酵素LuxIとGFPmut3がそれぞれP<sub>L-1con</sub>とP<sub>luxlac</sub>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およびLacIが多く発現している状態をHigh状態、GFPmut3とCIIsとが多く発現している状態をLow状態と定義する(図1C)。ところで、P<sub>luxlac</sub>はAHL非存在下ではほとんど動かないようにつくられている。したがってDiversity generatorは、AHL濃度が低い場合はP<sub>luxlac</sub>の下流の遺伝子のごく微量漏れて発現するのみであるためにHigh状態だけが安定である一方で、AHL濃度が高い場合はCI-LacIトグルスイッチと同様に双安定になるように設計されている。

本研究では、Diversity generatorを導入した大腸菌集団が所望の挙動をするかどうかを、簡略化した生化学反応を基にたてた数理モデルを使って計算機シミュレーションした。図2は、大腸菌集団の挙動をLacI-CIIs濃度平面上に細胞の数のヒストグラムとして記述した図である。また、各時刻の細胞状態の安定性を可視化するため、それぞれLow状態とHigh状態の細胞におけるLacI-CIIsの定常濃度を図に併記した。初期状態として、すべての細胞をLow状態で、AHL濃度を0にセットすると、細胞集団はHigh状態へ遷移しはじめる。細胞集団は、High状態に近づくにしたがって、LuxI生産が増加し、結果としてAHLの生産が増加していく。AHLが十分に溜まると双安定になり、最終的にLowとHighの二つの細胞種に多様化することが示された。以上から、Diversity generatorの回路設計が妥当であることを示すことができた。

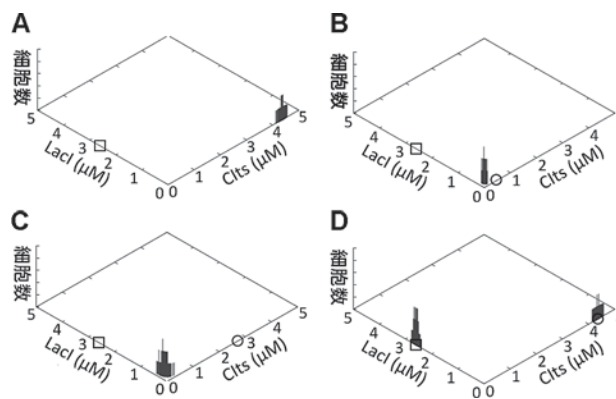


図2. Diversity generatorを導入した大腸菌集団における細胞種多様化の数値シミュレーションによる確認。中抜きの中角と丸はそれぞれHigh状態とLow状態細胞におけるLacI, CIIsの定常濃度を表す。A Low状態から始めた細胞集団はAHLを生産しながらHigh状態に向かう。B AHLがある程度蓄積するとLow状態にもなれるようになる。C AHLが十分に蓄積するとLow状態の定常濃度がこれ以上変わらなくなる。Dそして、最終的に多様化する。

### AHL生産能をもたないサブ回路の安定性のAHL濃度依存性の確認

人工遺伝子回路を完成させるまでには、通常その前段階として、回路のサブセットを導入した細胞を用いた培養実験を行い、段階的に機能確認をする。Diversity generatorは、AHLを送信する機能と、AHLを受信して細胞状態の安定性が変わる機能の二つを含む。本研究では、後者の機能の確認を目的として、Diversity generatorのAHL生産能をもたないサブ回路をつくるために、二つのプラスミドを調製した。一つ目のプラスミドは、CI-LacIトグルスイッチプラスミドのP<sub>trc2</sub>プロモーターをP<sub>luxlac</sub>プロモーターに取り換えたpHT\_toggleである。もう一つのプラスミドとして、AHLがP<sub>luxlac</sub>からの転写を活性化するために必要なタンパク質LuxRを恒常発現するpLuxRを調製した。LuxRはAHLと複合体を形成することでDNAに結合し、P<sub>luxlac</sub>からの転写を活性化する。

AHLの添加により、High状態の安定性は変わらずLow状態の安定性のみが変化することを、サブ回路の動作を通じて確認するために、pHT\_toggleとpLuxRを導入した大腸菌の集団を用いた。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ため、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

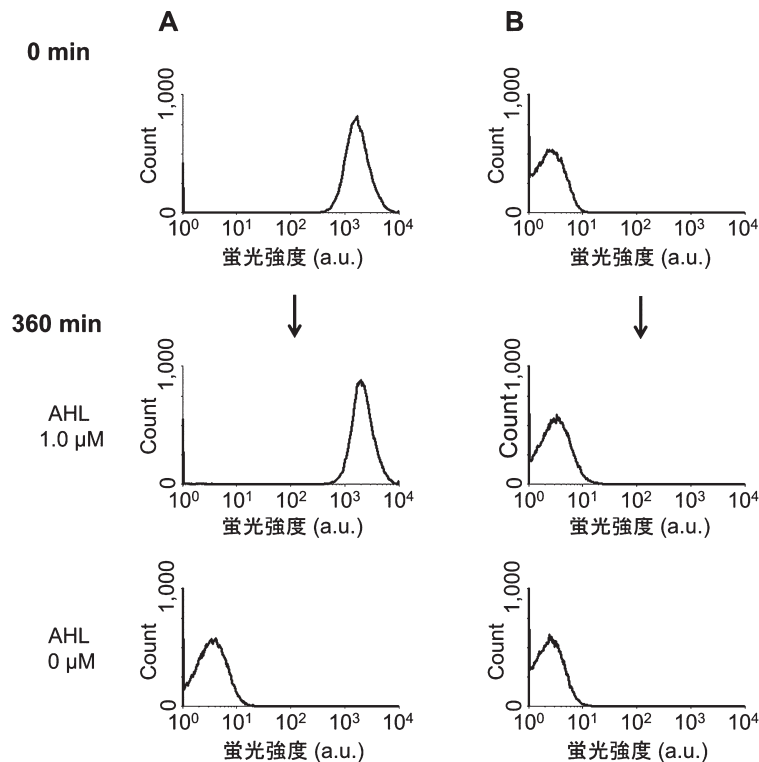


図3. Diversity generatorのサブ回路におけるAHL濃度依存の双安定性の確認. A Low状態からスタートした場合, AHL存在下では状態を維持するが, AHL非存在下ではHigh状態に遷移する. B High状態からスタートした場合は, AHLの有無に関わらず状態を維持する. Sekine, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17969 (2011) より改変.

た(図3). したがって, Diversity generatorのサブ回路は, 私たちが設計したように, AHL存在下では双安定, 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. またこの実験は, AHL濃度が十分に高い場合にHigh状態とLow状態間のスイッチングがほとんど起きないことも示している.

#### Diversity generatorの構築と動作確認

$P_{luxlac}$ をもつトグルスイッチにAHL生産機能を追加して最終目的のDiversity generatorを構築するために, pHT-toggleのlacI遺伝子の下流にluxI遺伝子変異体luxI1.5Cを挿入し, プラスミドpHT\_luxI1.5Cを調製した. HT\_toggle細胞と同様に, pHT\_luxI1.5CとpLuxRを導入した大腸菌 (HT\_luxI1.5C細胞)もHigh状態, Low状態にそれぞれ誘導することができた. Low状態に誘導し, その誘導を解除したHT\_luxI1.5C細胞は, はじめAHL濃度が薄いことに起因してLow状態が安定ではないため, High状態に遷移しようとする. その後, 誘導解除から180分後では, High状態とLow状態どちらも安定となるため, 両状態の中間くらいにまで遷移した細胞集団が二つに分かれ始める. 続いて誘導解除から240分後で,

完全に二つの集団に分かれる. そして, 誘導解除から360分後には, さらに集団間の差が広がり, それぞれの集団のピークの蛍光強度値がこれ以上変わらなくなる(図4). 以上から, Diversity generatorを導入した大腸菌集団が細胞種の多様化をすることを, 培養実験で示せた.

地形を考えると, 図の鉛直方向の傾きを変えることで, 大腸菌集団の多様化後のHigh状態とLow状態の細胞種比率が変わることが推測される. そこで実際に, Diversity generatorを導入した大腸菌集団の多様化後のHigh状態とLow状態の細胞種比率を, 培養条件の操作によって調節できることを確認した. 図1Aの地形に着目すると, AHL蓄積速度はWaddington地形上の玉が転がる速度の鉛直方向成分の大きさに相当する. したがって, AHL蓄積速度を高めればLow状態の比率が, AHL蓄積速度を低めればHigh状態の比率が上がるのが, それぞれ予想される. AHL蓄積速度は, 一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操作できる.

地形の傾きを変える一つ目の実験条件である一匹あたりのAHL生産量は, AHL合成酵素LuxIの活性に依存する. 本研究では, pHT\_luxI1.5CよりもAHL合成能の低いpHT\_luxI1Aと, AHL合成能の高いpHT\_luxI2Aを



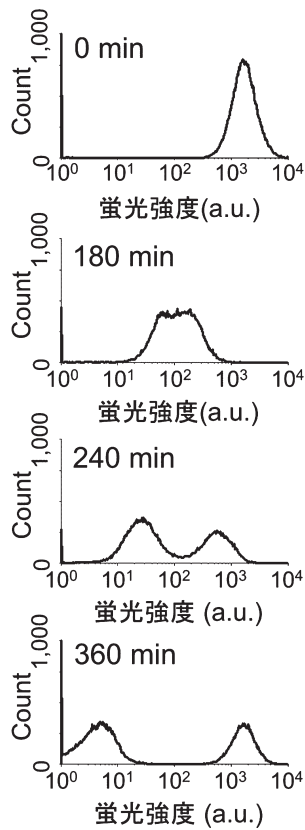


図4. Diversity generatorを導入した大腸菌, HT\_luxI1.5C細胞の細胞種多様化の確認. Sekine, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17969 (2011) より改変.

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5A-Cに示された通りである. pHT\_luxI2Aに関しては, AHL合成能が高いため, ほとんどの細胞がLow状態になった(図5A). また, pHT\_luxI1Aに関しては, AHL合成能が低いため, ほとんどの細胞がHigh状態になった(図5C).

次に, 地形の傾きを変えるもう一つの実験条件である初期菌密度の操作として, 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. 使用している遺伝子配列セットが同一であるにもかかわらず, 予測通り, 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(図5D, E).

### 生命を知り次世代の工学の基礎となるツールとしての Diversity generator

近年, 発生学と再生工学におけるさまざまなレビューにおいて, Waddington地形の概念が頻繁に参照されている<sup>12,15,16</sup>. Waddington地形上の玉の運動のような細胞種多様化の過程を司るコアな遺伝子ネットワークについて, 候補となる遺伝子の数が膨大でネットワーク構造も複雑なため, 培養実験による検証がされてきていなかった. そのようななかで, 本研究はWaddington地形に対応する人工遺伝子回路を実現できることを示したこ

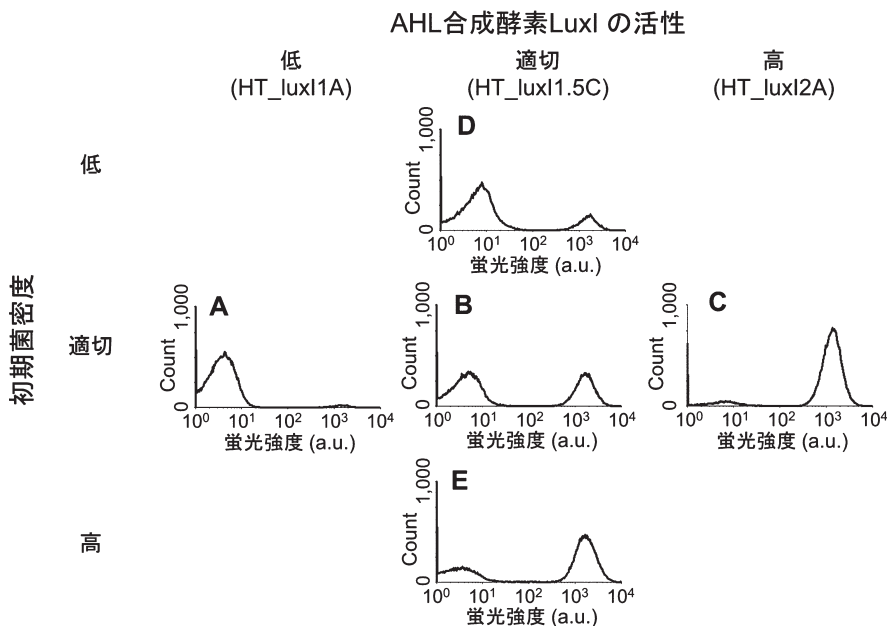


図5. AHL蓄積速度の操作による多様化後の細胞種比率の調節. (A-C) LuxIのAHL合成活性が高い, 適切, 低い場合の最終時刻におけるGFP蛍光強度のヒストグラム. (D, B, E) 初期菌密度が高い, 適切, 低い場合の最終時刻におけるGFP蛍光強度のヒストグラム. Sekine, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17969 (2011) より改変.

とに意義がある。実際、この人工遺伝子回路を持つ細胞を培養することで、細胞は地形を転がるように多様化することを示した。さらに、多様化後の細胞種比率が一匹あたりのシグナル生産量や初期菌密度に依存することを示した。

本研究で示された、細胞種比率の細胞密度への依存性は、Gurdonによる胚の操作によって示されたコミュニティーエフェクトという現象<sup>17,18)</sup>によく似ている。また近年では、ES細胞の集団サイズが分化運命に影響を与えるという結果が報告されている<sup>19)</sup>。一方で、一つの細胞種が二つに多様化するという挙動に着目すると、近年報告された膵組織におけるα細胞からβ細胞への分化転換<sup>20)</sup>によく似ている。膵組織にあるα細胞とβ細胞からなる細胞集団からβ細胞を選択的に取り除くと、α細胞の一部がβ細胞に分化転換するという挙動が、Diversity generatorを導入した細胞集団の細胞種の変化の仕方によく似ている。このように、相互抑制で二つとシグナル送受信で二つの計たった四つの遺伝子からなるネットワークで実現したDiversity generatorの細胞種多様化は、発生・再生過程に見られる現象に似た性質をもつ。これらの現象を司る遺伝子ネットワークに、Diversity generatorと同様のネットワーク構造をもつサブネットワークが含まれるかどうか調べることで、発生・再生過程の本質を知り、続いて発生・再生工学を進展させるための手助けになるかもしれない。

人工遺伝子回路は、天然の生命現象を司る遺伝子ネットワークの設計原理に関する仮説を確かめ、そして洗練化するための、操作可能でシンプルなテストベッドとして使われる<sup>9)</sup>。人工遺伝子回路を構成する遺伝子パーツとして注目する天然の生命現象で使われているタンパク質そのものをコードするDNAを使った再構成の例としては、天然の概日時計を司る遺伝子ネットワークの構成要素であるCry1に焦点を当てた研究がある。この研究では、Cry1の振動的な発現パターンが概日時計に重要であるということ、この遺伝子がゲノムからは発現していない細胞内にCry1タンパク質コード配列を含んだ人工遺伝子回路を導入し、結果として生じる概日時計の挙動の変化を調べる実験で示したものである<sup>14)</sup>。一方で、ネットワーク構造のみに着目する場合は、構造が同一であれば、人工遺伝子回路を構成する遺伝子パーツが生命現象で実際に使っているものでなくてもテストベッドとしての利用が可能である。たとえば、λファージによる大腸菌の溶菌化を司るλリプレッサーとCroタンパク質の相互抑制を模倣したトグルスイッチ<sup>2)</sup>では、誘導剤で活性を操作しやすく天然には相互抑制関係にな

い二つの抑制タンパク質を組み合わせた、人工的な相互抑制系を構築した。結果として、トグルスイッチは誘導剤による初期状態の設定が可能である。設定した初期状態が培養中に変化するか否かを観る実験を通じて、二つの抑制タンパク質の生産レートのバランスがとれている場合は双安定であるということ、理論と実験双方を対応づけて示した。同一ネットワーク構造に当てはまる機能を持つ別分子でも構わないということは、特定の細胞で特定の分子を使えないときに同一機能の別分子で代用できる、または、同一構造の二種類のネットワークを一つの細胞内で併用できる、など工学的意義が大きい。

### Diversity generatorの有用物質生産への応用

微生物による有用物質生産における有用物質の収量を増やすには、単に物質の微生物一匹あたりの生産量を上げるだけでは不十分で、微生物が集団として物質を生産し続けられることも必要である。微生物を用いて有用物質の生産を試みる場合、その物質の持つ細胞毒性が細胞の増殖を阻害することがある。そのため、目的の有用物質を生産し続けられないという問題が起こりうる。この問題の解決へのアプローチとして、個々の細胞を細胞毒性に対して強くすることが注目されている<sup>21)</sup>。この一方で、同一遺伝子ネットワークを持ちながらその発現状態の多様性を生じさせ、さらにその多様性を維持することで、細胞個々ではなく、細胞集団として細胞毒性に対して強くするというアプローチも考えられる。Diversity generatorはこのアプローチでの解決法のための鍵となるツールになる。Diversity generatorは、シグナル分子濃度が低いとLow状態が不安定化する。したがって、

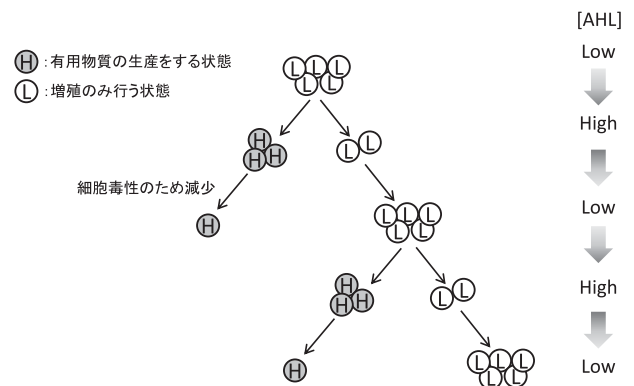


図6. Diversity generatorを用いた繰り返し多様化システム。High状態を物質生産状態に、Low状態を増殖のみを行う状態にする。High状態はAHLを多く生産する状態でもあるので、自身の生産する物質による細胞毒性によってHigh状態の数が減ると、AHL濃度が減少していく。AHLの減少によってLow状態が不安定化し、再度多様化を始める。

High状態が、自身の生産する物質による毒性で死滅し、その結果シグナル分子濃度が低くなることで、Low状態の細胞集団を再度多様化させることができると考えられる(図6)。この繰り返し多様化システムを応用することで、有用物質を生産する対価としてその後死滅するHigh状態と増殖のみを行うLow状態とからなる細胞集団の多様性を維持するシステムを、構築できるだろう。このシステムを用いると、たとえ細胞毒性のために有用物質を生産する細胞集団が減少したとしても、細胞の増殖のみを行う細胞集団が一部残っているので、再び増殖し、有用物質を生産できる細胞を生み出し、持続的に物質生産ができるようになると考えられる。

### おわりに

現在の合成生物学の工学応用においては、目的とする有用物質の生産量の最適化が着目されている。しかし、このような細胞工場をつくる合成生物工学では今後、有用物質の生産スケジュールの最適化という問題にぶつかることが予測される。この問題に対して、さまざまな時空間パターンを実現してきた人工遺伝子回路の設計・構築のノウハウの蓄積が役に立つだろう。

### 文 献

- 1) Elowitz, M. B. and Leibler, S.: *Nature*, **403**, 335 (2000).
- 2) Gardner, T. S. *et al.*: *Nature*, **403**, 339 (2000).
- 3) Basu, S. *et al.*: *Nature*, **434**, 1130 (2005).
- 4) Tabor, J. J. *et al.*: *Cell*, **137**, 1272 (2009).
- 5) Liu, C. *et al.*: *Science*, **334**, 238 (2011).
- 6) Stricker, J. *et al.*: *Nature*, **456**, 516 (2008).
- 7) Tiggles, M. *et al.*: *Nature*, **457**, 309 (2009).
- 8) Danino, T. *et al.*: *Nature*, **463**, 326 (2010).
- 9) Mukherji, S. and van Oudenaarden, A.: *Nature Reviews Genetics*, **10**, 859 (2009).
- 10) Sekine, R. *et al.*: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 17969 (2011).
- 11) Waddington, C. H.: *The Strategy of the Genes*, **26**, George Allen & Unwin, London (1957).
- 12) Mohammad, H. P. and Baylin, S. B.: *Nature Biotechnology*, **28**, 1033 (2010).
- 13) Dunlap, P. V. and Greenberg, E. P.: *Journal of Bacteriology*, **164**, 45 (1985).
- 14) Ukai-Tadenuma, M. *et al.*: *Cell*, **144**, 268 (2011).
- 15) Goldberg, A. D. *et al.*: *Cell*, **128**, 635 (2007).
- 16) Yamanaka, S.: *Nature*, **460**, 49 (2009).
- 17) Gurdon, J. B.: *Nature*, **336**, 772 (1988).
- 18) Gurdon, J. B. *et al.*: *Current Opinion in Genetics and Development*, **3**, 662 (1993).
- 19) Hwang, Y. S. *et al.*: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 16978 (2009).
- 20) Thorel, F. *et al.*: *Nature*, **464**, 1149 (2010).
- 21) Dunlop, M. J.: *Biotechnol Biofuels*, **4**, 32 (2011).