

代謝経路と制御ネットワークの組織的な進化工学技術

梅野 太輔*・富永 将大・吉林真衣子・池 紘平

生命現象はどれも、数多くの分子の協働によって実現する分子「システム」の機能である。そして合成生物学がめざすのは、生体分子の「協働」のあり方をDNA配列に書き込む技術体系を確立することである。遺伝子情報の質と量は日々向上しており、さまざまなソースから遺伝子を集めて代謝経路や転写制御ネットワークなどを気軽に設計できるようになった。その気になれば、その遺伝子「スクリプト」を何万塩基もの長さで合成し、細胞に導入できる。しかし、現在の合成生物学者がデザインしたDNA配列が、そのまま最初から思い描いた通りの機能を示すことは、ほぼないといってよい。知り尽くされた遺伝子をいくつか組み合わせた単純な遺伝子ネットワークですら、細胞内で機能するかたちでつくるのはいまだに困難である。本稿では、遺伝子機能の集積化において生じ得る課題と、それに対する処方箋について議論したい。

分子システムは、すべての遺伝子（産物）が適切に協調してはじめて、正しい機能を発揮する。代謝経路をつくるときは、その経路をなすすべての酵素の発現レベルとタイミングを適切化しなければ、効率が悪くなるどころか、機能そのものが検出できることさえしばしばである。情報処理経路や転写制御ネットワークが適切に働くためには、それに関わる分子すべてが、適切な強度とタイミングで相互作用しなければならない。一つ二つの相互作用ならば、実施者が勝手に最適化しなさい、といわれてしまいそうであるが、何ダースもの要素の相互作用や量的関係の適正化とともに、話は別である。「パラメータマッチング」を組織的に実現すること、これは、合成生物学プロジェクトの核心をなす技術課題である。

また「分子システム」を構成する遺伝子機能は、細胞という夾雑系のなかで高い精度で働く必要がある。一般に酵素反応やタンパク質間相互作用は特異的であると云われる。しかしその特異性は、細胞の中の数千種の分子とまったく相互作用せずにデザイン通りの働きをしてくれるほどのものではない。特異的にみえる代謝経路から酵素を取り出して異なるコンテキストに置いてみると、さまざまな副産物が観察されることが多くある¹⁾。最近の報告によれば、大腸菌の代謝反応の6割が、「Generalist酵素」（2役以上をこなせる酵素）によって担当されているという²⁾。転写制御タンパク質の標的配列への特異性や、シグナル伝達タンパク質のパートナー特異性など

は、むしろ積極的にクロストークしながら働いている。これらに見かけ上の作業精度を与えてるのは、個々の部品の忠実度ではなく、むしろ作業環境や、システムの成り立ちである。これらを認めるならば、「個々の部品の不完全性をどうデザインで補完すべきか」は、合成生物学の本質的な課題と認定できるだろう。

遺伝子機能のPlug and Playをめざして

制御機能のラインナップ化 2005年当時の合成生物学コミュニティが目指したのは、規格化された遺伝子パーツやその集積物（遺伝子デバイス）を自由に組み合わせ、複雑なシステム機能が楽々と制作できる未来である³⁾。しかし、2013年現在、これがきわめて実現困難な目標であると多くの研究者が感じ始めている。たとえば、ひとつのデバイスの出力シグナルが、それを受け下流デバイスの入力感度を下回れば、システム機能は不全に陥る。このような「短絡」を起こさずに遺伝子機能を「Plug and Play」するためには、一つひとつの部品に適切な物性（転写調節タンパク質ならば、結合配列への特異性と結合強度、S/N比、応答感度、安定性など）が求められる。そして個々に要求される物性は、プロジェクトごとに異なるだろう。これでは、あらゆる回路の建設に対応するためには、無限のパーツラインナップ⁴⁾を揃えなければならないことになってしまう。

そこで、より現実的なワークフロー⁵⁾が提案され賛同を集めつつある。ここでは鍵となる部品のスペックを「その場で」多様化し、その中から、製作中の遺伝子集積機能のコンテキストに一番望ましいものを選ぶという工法である。Ellisら⁵⁾は、GALプロモータに制御タンパク質TetRのオペレータを融合した複合プロモータを作成した。このとき、プロモータ/オペレータ間のスペーサー配列をランダム化⇒機能スクリーニングすることによって、基本機能が同じながら応答時の出力強度の異なるさまざまなプロモータを手早く揃えてみせた（図1a）。このラインナップの中から適切なスペックのものを選び取ることによって、望む遅延時間を持つタイマー回路やfeed-forward回路を手早く建設してみせた。

この「その場で」スペックの多様化をはかるうえで重要なのは、①いかに広いスペックレンジを、②いかに網羅的に、③いかに迅速に取り揃えられるか、にある。プロモータ強度や翻訳開始配列の場合、そのスペックは一

*著者紹介 千葉大学大学院工学研究科共生応用化学専攻（准教授） E-mail: umeno@faculty.chiba-u.jp

義的なものであるため、チューニングは容易である。しかし、シグナル分子への応答感度やタンパク質/タンパク質複合体の結合強度、相互作用や半減期など、タンパク質の物性レベルにおけるラインナップ化となると、事情はまったく異なる。あらゆるスペックに対して適用可能な普遍的な進化工学ツールの開発が必要となるだろう。

酵素機能のラインナップ化 代謝経路を自在に建設するためにも、スペックの定まった生合成遺伝子のペアを取り揃えておくことが望ましい。しかし発現レベルのダウンチューニングはプロモータ工学などで簡単に見えることを考えれば、酵素活性においては、可能な限り高活性なものを一つ用意すれば用が済むように思える。一方で、反応特異性のラインナップ化は非常に重要であり、かつ、一筋縄ではいかない問題である。

我々は最近、非天然C₅₀骨格を持つカロテノイド色素であるC₅₀アスタキサンチン生合成経路の構築に成功した(図1b)。このプロジェクトの最大の山場は、特異的にC₅₀骨格のみをつくる経路の構築にあった。C₅₀骨格は、前駆体となるC₂₅PPを合成し、さらにそれを二分子縮合することによってつくられる。この2つの機能は、それぞれC₁₅PP合成酵素(FDS)とC₃₀骨格合成酵素(CrtM)のサイズ特異性の適切な変換によってつくりだせる。この先に続く12ステップは、担当する酵素のサイズ特異性が見られないため、そのまま無改造で使えると期待された。しかしこのサイズ特異性の欠如は、C₅₀骨格以外のカロテノイド骨格が蓄積すると、それらをもとに膨大な(理論的には600を超える)副産物が生まれうることをも意味している。さらに、骨格合成反応のC₅₀特異性

を直接スクリーニングする手法も思いつかない。この状況において我々は、以下の手順をとった。

まず、FDSとCrtMのサイズ特異性を、それぞれ「進化」させた。ここで我々がめざしたのは、目的とする機能(それぞれ、C₂₅PP合成能とC₅₀合成能)の獲得ではなく、それぞれのサイズ特異性に影響を与えるアミノ酸変異の組織的な洗い出しである。FDSとCrtMの特異性に特に影響を与える3つの変異をそれぞれ選出し、それらの全組み合わせ($2^3 = 8$ 通り)を試作した。こうして、反応化学は同じであるが、サイズ特異性が少しずつ異なるFDSとCrtMのラインナップが揃った。これら $8 \times 8 = 64$ 通りの「かけあわせ」を試し、特異的にC₅₀骨格だけをつくるペアを選び取った(図1)。

このわずか 8×8 の変異体ラインナップの中には、C₅₀のほかにも、C₃₀、C₃₅、C₄₀骨格カロテノイドをほぼ単一産物として与えるペアが見つかった(古林ら、未発表)。興味深いことに、ここで使われた酵素変異体には、一つとして、それ単独で十分特異的なものは存在しなかった。ここで作られた人工代謝経路の特異性は、単独では不完全な2酵素の特異性の「かけあわせ」によって実現したものである。この戦略でつくった特異的なC₅₀骨格カロテノイド経路に、のこる12ステップを足し合わせたところ、めざすC₅₀アスタキサンチンをほぼ唯一の生成物とする、効率の良い代謝経路が完成した。

遺伝子ネットワークの進化デザイン

複数の分子が協働してつくるネットワーク機能の振る舞いは、わずかなパラメータ変化に鋭敏に応答し、大変

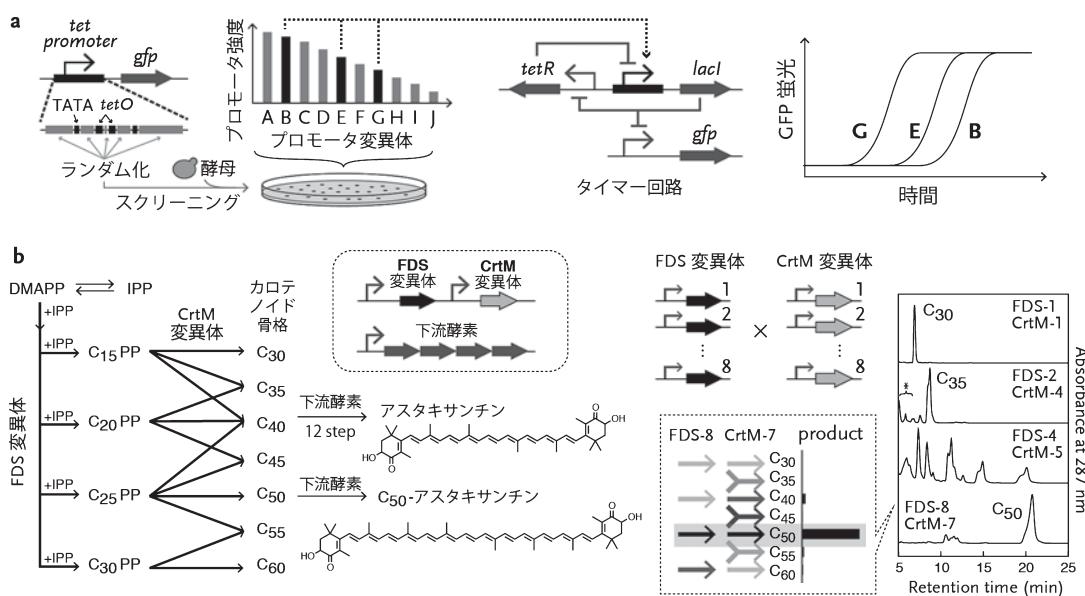


図1. 多様なスペックを「その場で」つくる。 (a) プロモータ强度のラインナップ化と回路建設への応用, (b) 酵素の特異性ラインナップ化と、非天然化合物への特異的な経路建設への応用。

化する⁶⁾。逆にこのことは、最初は期待通り動かなかつた遺伝子回路も、パラメータの再調整によってデザインどおりの機能を回復させうことを示しているとも云える。まずはプロトタイプの遺伝子回路を作製し、各所のパラメータをランダム化した「回路ライブラリ」の中から、ただしく振る舞うものを選抜すれば、望む振る舞いを示す遺伝子回路が歩留まりよく得られるかもしれない。この「進化デザイン」が遺伝子回路建設に有用であることを最初に示したのは、横林らである⁷⁾。彼らは、著者のひとり (R. Weiss) が何ヶ月もかけて修理に取り組んでいたIMPLYゲート回路の進化工学を試みた。具体的には、回路の遺伝子配列のごく一部をランダム化して回路ライブラリをつくり、真理値表にしたがって条件を変えながらON/OFFスクリーニングを繰り返した。ただそれだけの作業で、正しく機能する回路を迅速に拾いだしてみせた。

我々も、独自に開発したデュアルセレクション系⁸⁾を用いて、さまざまなタイプの遺伝子回路の進化デザインに取り組んでいる。十分な多様性を内包するライブラリならば、セレクションの条件を変えるだけで、ひとつのライブラリからでも、NAND回路やNOT回路など、異なる機能を持つ遺伝子回路が多数得られる(図2)。それだけではない。得られた回路の組織的な配列解析によって、それぞれの振る舞いを実現するために、どのパラメータがどの値の範囲にあればよいか、その「正解」セットの組織的なサンプリングが可能となる。うまく働くための「十分条件」を先に得て、それを調べる。先駆的な知識ぬきでサイエンスが始められるのは、進化デザイナーの特権といえよう。

どんなに複雑で多層な制御ネットワークも、それが遺伝子発現を制御している限りは、正しい条件あるいはタイミングで遺伝子発現をon/offする「スイッチ」にすぎない。つまり遺伝子発現のon状態およびoff状態をそれぞれ選抜する技術さえあれば、どんな制御ネットワークも、進化デザインの対象にできるはずである。我々は、

遺伝子回路の進化工学の高速化、並列化、効率化に取り組んでいる。

遺伝子機能の隔離技術

我々のつくる遺伝子機能は、幾千もの「似て異なる」分子が共存する細胞の中で働くなければならない。細胞の中では、導入したシステムの構成要素ひとつひとつが、既知/未知の細胞成分との予期せぬ相互作用によって、その実効濃度やみかけの物性を大きく変える。このため、宿主として使う株の変更や共存するネットワークの変更だけでも、システム機能は不全となる。つくる遺伝子ネットワークの機能は、実際に使われるコンテキストの中で直接建設するべきである。ただし、もし我々のつくる遺伝子機能が宿主細胞の代謝ネットワークから十分隔離できるのならば、事情は少しは改善されるかもしれない。

物理的な隔離技術 機能隔離のもっとも直接的な方法は、「物理的封じ込め」である。たとえば足場となる超構造(タンパク質やDNA, RNAなど)に、関連する酵素などをグルーピングして集積し、一緒に働くかせる技術が精力的に研究されている⁹⁾。これらの分子は細胞の代謝ネットワークから隔離されているわけではないが、空間的にまとめて局在しているため、上下流の酵素間の基質/生産物の受け渡しは大いに効率化される。特にK_mの高い酵素反応過程にとっては、宿主のもつ競合経路の影響を大きく軽減できる有効な戦略となる。この人工「チャネリング」の効用は、リン酸化を介したシグナル伝達系など、情報伝達経路の構築において大変有効である。たとえば、異なる二成分シグナル伝達系から取ってきた無関係のセンサタンパク質/伝達タンパク質を考えよう。これらは、そのままでは連絡がないが、それぞれに別々のアフィニティタグを結合し、そのどちらとも親和性を持つ融合タンパク質を追加発現すると、この分子を「仲介」とした二者の近接化が起こり、両者の連絡が成立する¹⁰⁾。この相互作用タグをつかった「近接化」によって、さまざまな情報伝達システムを、高い自由度と

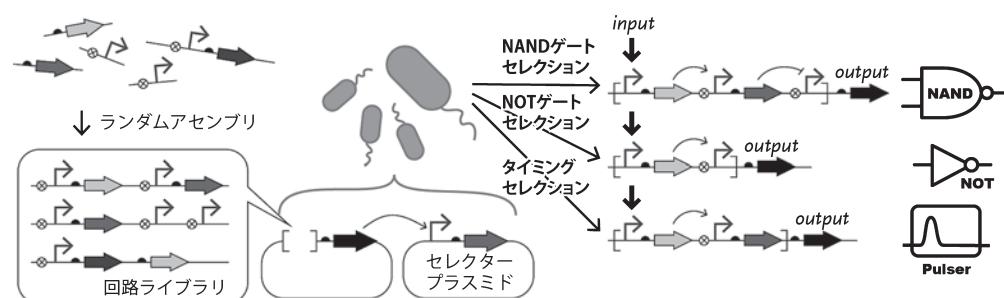


図2. 遺伝子回路の進化デザイン

特異性をもって建設できる。

つくった代謝ネットワークを袋の中に綴じ込めてしまえば、ほかの経路と隔離され、クロストークは生じえない。たとえば、サルモネラ菌の持つタンパク質性コンパートメントを大腸菌に発現させ、その中に酵素を閉じ込める技術¹¹⁾などが検討され始めている。ファージ粒子や繊毛/べん毛なども、適切な工学さえ行われれば、原核細胞内で使える隔離区画として機能するかもしれない。物理的な隔離は、我々がつくる遺伝子回路の集積化にも便利である。集積度が高い遺伝子回路は、いくつかのサブ回路に分割し、それぞれを別々の細胞に導入するのがよい^{12,13)}。ここで、サブ回路の出力をシグナル分子の分泌としておけば、化学通信を通して細胞「コンソーシアム」で全体機能が実現するしくみである。

情報レベルの隔離技術 遺伝子機能の情報フォーマットの工夫によっても、宿主の代謝ネットワークからの独立性は高めることができる。たとえば、遺伝子機能をT7などのファージ由来の転写装置によって駆動されるフォーマットに書き直せば、転写制御レベルにおける宿主からの干渉はかなり低減できる。我々は、複雑な代謝ネットワークを自由度高く構築できるようにするために、上項の遺伝子スイッチ/回路の進化工学法を用いて、T7プロモータの機能/スペックの組織的な多様化を行っている。

遺伝子の全合成も、遺伝子機能に対する想定外の干渉を低減する重要な効果がある。遺伝子の発現向上をめざしたコドン最適化はよく行われるが、ここでの目標はむしろ、内在する制御標的部位（高次構造の形成部位や調節機構との相互作用点）、偽プロモータ/偽翻訳開始配列などを消し去ることにある。Voigtらは、*Kelbsiella oxytoca*の持つ窒素固定遺伝子クラスターの機能を完全に人工のフォーマットで再構築（Refactoring）することに成功した¹⁴⁾が、その成功には、もとの配列から最遠の、そして高次構造形成を極力排した配列のデザインが欠かせなかった。

さいごに

現在の合成生物学者は、集積度の高い遺伝子機能をいかに細胞にインストールするか、に注力している。さまざまな努力によって、細胞の中に導入できる遺伝子機能の集積度は、じわじわと向上している。たとえば、Zhangらは、土壤放線菌のエリスロマイシン生合成経路（20酵素ステップ）を人工オペロンのかたちで大腸菌に再構築した¹⁵⁾が、その遺伝子サイズは、制御ユニットも含めると55 kbに及ぶ。上述した窒素固定クラスター¹⁴⁾も、20のタンパク質遺伝子に69の人工制御配列を加え、合計89パート/24 kbのかたちで再構成されている。我々

は進化工学でつくった非天然酵素機能をつなげて、各種カロテノイドやテルペン、コレステロール様化合物群への代謝経路を構築してきた¹⁶⁾。今日現在、正しく「つながった」非天然経路の反応ステップ数は、最高17に達している（古林ら、未発表）。転写制御回路における集積度においては、2013年現在、49個の遺伝子パート（11の制御タンパク質と38の遺伝子エレメント）¹⁷⁾からなる4入力型ANDゲートがレコードホールダーである。

一方、これらの成功は、宿主の代謝ネットワークとのクロストークや、サブ回路間で起こる予期せぬ相互作用を減らすための壮絶な努力の結晶である。しかも、せっかく作った代謝ネットワークも、そのパフォーマンスは自然界のそれに比べるとはるかに貧弱で、そして壊れやすい。おもえば、どんな機能をつくるにせよ、デザインされる遺伝子機能は、すべて建材とエネルギーを宿主細胞から供給されるわけである。このことを考えれば、システムを宿主の代謝ネットワークから完全な隔離を目指すこと自体が、正しい方向かどうか疑問に思えてくる。また、我々のつくる遺伝子機能がより堅牢に、そしてより高いパフォーマンスを発揮するためには、宿主のもつ代謝ネットワークとのより良き関係を、積極的に（再）構築していくほかないのではないか。合成生物学者が「機能」の構築ではなく、「高機能な機能」の構築をめざす局面に達するのはもうすぐであろうが、そのときは、育種や進化デザインが本分野の基幹技術となるのではないか。

文 献

- 1) Umeno, D. et al.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 51 (2005).
- 2) Nam, H. et al.: *Science*, **337**, 1101 (2012).
- 3) Endy, D.: *Nature*, **438**, 449 (2005).
- 4) Canton, B. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **26**, 787 (2008).
- 5) Ellis, T. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **27**, 465 (2009).
- 6) Guet, C. C. et al.: *Science*, **296**, 1466 (2002).
- 7) Yokobayashi, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16587 (2002).
- 8) Tashiro, Y. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **39**, e12 (2011).
- 9) Conrado, R. J. et al.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 492 (2008).
- 10) Whitaker, W. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 18090 (2012).
- 11) Choudhary, S. et al.: *PLoS One*, **7**, e33342 (2012).
- 12) Tamsir, A. et al.: *Nature*, **469**, 212 (2011).
- 13) Regot, S. et al.: *Nature*, **469**, 207 (2011).
- 14) Temme, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7085 (2012).
- 15) Zhang, H. et al.: *Chem. Biol.*, **17**, 1232 (2010).
- 16) 梅野太輔：実験医学増刊『細胞を創る・生命システムを創る』, **29**, 1049 (2011).
- 17) Moon, T. S. et al.: *Nature*, **491**, 249 (2012).