

試験管内で自律的に動作する人工遺伝子回路の構築による synthetic biology

木賀大介

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

近年、細胞内に人工的な遺伝子回路を構築することを手段とする synthetic biology が興隆している。その成果として、細胞内の遺伝子回路の振る舞いについて興味深い知見も得られつつあるが、細胞というブラックボックスに対して解析を行うことの問題点は避けることができなかった。これに対し本発表では、各種生体分子を調製して混合することで人工的な遺伝子回路を試験管内に構築する我々の戦略について報告する。とくに本研究が、情報科学と生命科学の共同研究として始まった DNA コンピュータ開発の流れを受け、どのように進展してきたかについて紹介する。

De novo construction of an *in vitro* artificial genetic circuit in Synthetic biology field

Daisuke Kiga

Department of computational intelligence and systems science,
Interdisciplinary graduate school of science and engineering, Tokyo Institute of Technology

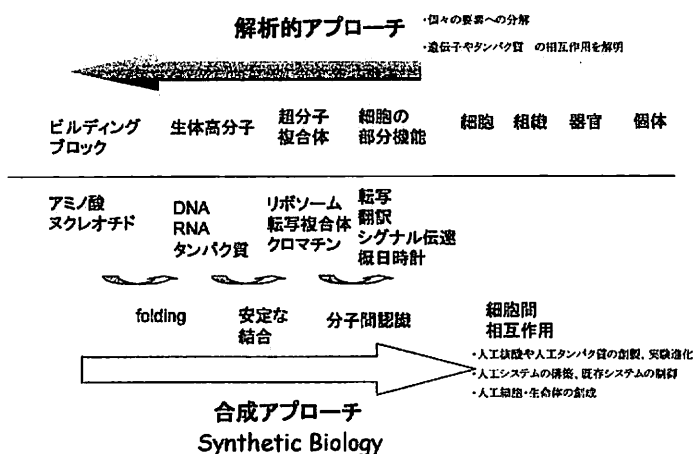
Recently, artificial genetic circuits are constructed in cells not only to produce useful compounds but also to analyze fundamental property of cellular system. However, we have not identified functions of many proteins even in *E. coli* though its genome sequence is known. Thus *in vitro* construction of artificial genetic circuits composed by known DNAs, RNAs and proteins is an effective approach to describe system behavior of life. Here I report construction of such system originated from the DNA computing field where researchers in information science and biology have been collaborated.

生命は複数種類の生体高分子が組み合わさって自律的に動作する、階層を持ったシステムである。その構成要素である DNA、タンパク質はそれぞれ生命に必要な遺伝情報、酵素活性を持つ高分子であるということが生物学者共通の認識であった。生命をよりよく知るため、もしくは生命に関わる物質を生産するために、これらの分子をツールとして使用することもあった。しかし、DNA に生物とは無関係な情報をエンコードし、これらに対して生物学者の良く知る実験操作を加えることによって、分子ライブラリの中から情報を指標として分子が単離され、超並列演算となる、という DNA コンピュータの実演は、非常に驚きの対象であった。と同時に、生命科学を学ぶ学生としては、天然の生命が産生する物質を直接取り扱うことができるはずである DNA コンピュータが、情報科学の例題にのみ適用されていた事はもどかしくもある

日々であった。

また、DNA コンピュータが進歩してきたこの 15 年間は、ゲノムプロジェクトなどの網羅的解析により、これまでの一つの分子に着目することしかできなかった生物学から、自律的に振舞うシステムとしての生命に着目した生物学へと移行しつつある時代でもあった。生命という、分子によって構成され微小環境内で動作するシステムを記述するための情報論の確立を、多くの研究者が夢見る時代でもある。さらに最近では本稿の後半で詳述するように、システムを記述するだけでなく、遺伝子を組み合わせることで生命システムの階層を登り、システムの理解を検証すると同時に工学的な活用を目指す Synthetic biology (合成生物学、構成的生物学) という研究分野が興隆しつつある(1, 2)。

生命システムの階層と研究における2つのアプローチ



これまでの生命の階層を登る諸研究：理学と工学

実は、遺伝子を組み合わせることで階層を登るといふ現在の流れ以前にも、部品を組み合わせることで階層を登る、という研究は存在していた。それが、アミノ酸、ヌクレオチドを組み合わせることで新たな生体高分子を創製する試験管内進化の研究である。生きた細胞を活用せずとも生体高分子の進化に特化した実験系を試験管内に構築できた意義は大きく、結果として、天然の進化とは異なるルーツを持つ機能性 RNA やタンパク質が数多く創出されてきた。異なるルーツとは、例えば、200 アミノ酸によって構成される比較的小型のタンパク質を想定してみる。その長さのアミノ酸配列が持ちうる場合の数は 10 の 260 乗であり、これは宇宙に存在する素粒子の数に宇宙が始まってからの秒数をかけたものよりもさらに大きな数である。この意味することは、我々が自然界で目にしていたタンパク質は、「ありうるタンパク質」のうちごく一部が地球上での進化によって生き残ってきた結果に過ぎない、ということである。実際、試験管内進化で創出された ATP 結合タンパク質は、天然のどの ATP 結合タンパク質ファミリーとも異なる立体構造を持つものであった。このような試験管内進化の研究では、10 の 15 乗ほどのサイズのランダム分子ライブラリの中から機能を指標として活性型の分子が単離され、さらにこれに変異を導入することで進化サイクルが進行する

(3)。論旨が多少脇にそれるが、日本においては私を含め、進化分子工学の研究者がライブラリからの分子の単離、ということに着目して DNA 計算の分野に参入し、情報科学研究者との学際研究を進展してきている。

さて、試験管内進化に見られるような、ありえた生命を追求する構築型の研究が Synthetic biology の理学的な面白みである。上記は、天然の生体高分子の構成単位の並べ方を変更するものであった。さらには、現在の遺伝暗号表におけるアミノ酸の配置の改変や、そもそもなぜ 4 種類の核酸塩基、20 種類のアミノ酸が現在の生命で採用されたのか、という疑問に答えるべく、6 種類の核酸塩基による複製・転写・翻訳や(4)、21 種類のアミノ酸を組み込んだ遺伝暗号システムの構築までもが行われ(5)、天然の生命との比較対象となる「ありえた生命」の構築が追求されてきている。

生命の階層を人工的に登ることには、このような理学的な意味合いだけではなく、工学的な活用がなされることもある。人工的に創出された RNA 酵素によって通常のタンパク質合成には用いられない非天然アミノ酸を tRNA に結合し、さらにはタンパク質に取り込ませる研究も行われている(6)。また、生体高分子を活用するためには、一から新たなものを造らなくとも、天然のタンパク質を改変する、という意味でタンパク質工学ということがこの数十年間行われてきてもいる。

人工遺伝子回路：工学と科学

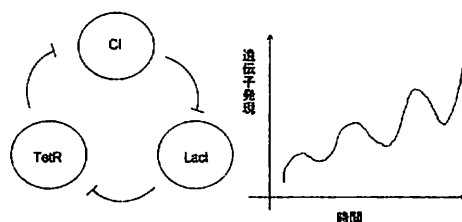
それでも、天然の生命が一つだけの遺伝子によって構成されているものではなく、複数の遺伝子が協調して構成しているシステムであることを考慮すれば、工学的に生命を活用するためには複数の遺伝子を同時に活用することが望ましい、という考えに至る。最近では、植物から労力を要する操作を経て抽出するしかなかった抗マalaria薬の前駆体を、酵母に複数の遺伝子を導入することで簡便に生産できるようになった、という論文が、この研究者にゲイツ財団の出資があったという話題と共に誌上を賑わせている(7)。このように、遺伝子を組み合わせる「代謝工学」ということが試みられるようになってきているが、どのように遺伝子を組み合わせ、さらにそれぞれの遺伝子の発現制御関係をプログラムするか、ということに関しては試行錯誤の段階で、数理モデルに基づく設計が広く望まれている。

このような応用サイドからの要請と、生物をモデル化して理解したいという流れが結びついた分野が人工遺伝子回路を作成する Synthetic Biology である。そのためには、即応用可能な回路を作成するだけでなく、面白く、または、モデル化の妥当性の解析に有用な回路を作成することが行われている。とくに、MIT のグループは設計を支援するために、部品の標準化とオープンソース化を強く主張している(8)。さらには、若手人材発掘のために、人工遺伝子回路版の「ロボコン」である iGEM (http://parts2.mit.edu/wiki/index.php/Main_Page)までもが国際規模で開催されていて、本年は分子コンピューティングの分野を基盤として日本からも参加している。以下で、即応用に結びついてはいないものの有用な人工遺伝子回路の作成について紹介したい。

例えば、概日周期など、自律的なリズムを持った遺伝子発現を行う生物は多々存在するが、大腸菌にそのような遺伝子回路が存在するかについては深く調べられてはいなかった。一方、インパーターを奇数個直列に組み合わせると、リングオシレーター

が構築され、振動が生まれることは制御理論で広く知られていたことであろう。そこで、ラクトースリプレッサーなど、有名ではあっても生物時計とは関わりのない転写抑制タンパク質を3つ組み合わせ、そのうちのひとつと蛍光タンパク質の発現を同一の制御下に置くことで「大腸菌ホタル」も作成されている(8)。

大腸菌内に構築された 発現の振動を行う人工遺伝子回路



また、バクテリアが小分子を放出して拡散させ、互いに自己の存在を伝達しているメカニズムを応用し、この小分子が予めプログラムされた濃度範囲でのみ目的遺伝子が活性化されるようなバンドパスフィルターも作成されている(9)。遺伝子発現制御の強弱関係を操作することで、このフィルターの特性は変化させることが可能であった。結果として、それぞれ固有の特性を持つ2種類のバクテリアを混在させ、培養プレートの中央にこの小分子を放出するように操作した別の大腸菌を配置することで、射的的状のパターンが構築された。

人工遺伝子回路版のロボコン、iGEM ではさらに面白みのある回路が追求されている。ある日、大腸菌を一面に生やした寒天培地を覗いてみたときに、そこに自分の顔が刻まれていたらあなたは思うだろうか？学生たちは、光によって色素を着色させる遺伝子の発現制御を行う人工遺伝子回路を大腸菌の中に構築し、大腸菌フォトリスグラフィを完成させている。この回路の作成のために、バクテリアに幅広く分布する2 component system がキメラ化して活用されている。藍藻の膜貫通タンパク質である光受容体の細胞外ドメインと、大腸菌の浸透圧感知系の細胞内リン酸化ドメインのキメラタンパク質を作成し、浸透圧によって制御されるプロモーターの下流に色素の着色を行う *lacZ* 遺伝子を配置することでこの回路が完成している。また、光受容体に組み込まれる吸光物質生産系も同時に導入されている。

これらの、遺伝子回路設計の基盤確立を目指した諸研究では、同時に、システムモデリングが重視されている。例えば、リングオシレーター作成では、遺伝子発現制御に関わる種々のパラメーターのうち、タンパク質の速い分解速度が重要であることが予測され、そのための分解タグが導入されたタンパク質が使用されている。

このように、生物学における構成的アプローチにおいては、生物学のみを学んできた人材だけでなく、幅広い分野をバックグラウンドとする研究者、学生が融合的な研究を行うことが必要とされている。実際、iGEM ロボコンの運営には Lisp マシンの構築に貢献のあった Tom Knight 博士が深く関わっている。このため、iGEM チーム

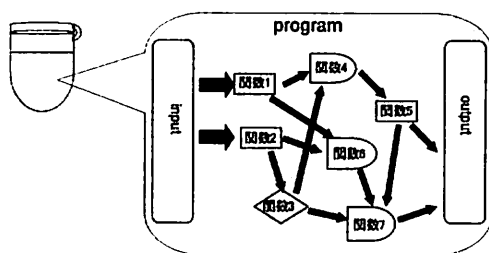
の構成にも生物学と情報科学それぞれをバックグラウンドとする学生の混合チームが強く推奨されているが、日本の分子コンピューティング分野から参加しているチームの様にこういった融合を果たしているグループは、まだまだ少ない。

ブラックボックス無しの人工遺伝子回路の構築

さて、回路設計を目指して人工遺伝子回路が細胞内に構築され、数理モデルと合わせて研究されているのだが、ここに何か落とし穴は無いだろうか？ 実際、大腸菌ホタルを構成するリングオシレーターは、細胞分裂後、それぞれの細胞で異なる周期で振動してしまっている。このような想定外のことが起きるのも当然で、それは、大腸菌のようなゲノム情報が判明したモデル生物であっても、その遺伝子産物の4分の1程度の機能がわかっていないことに由来する。つまり、細胞がブラックボックス、ということである。

であるならば、内容物が全て判明している系を、生命の部品を一つ一つ組み合わせる方式で構成するアプローチが重要となるのではないだろうか。もちろん、生命全体を再構成することは現時点では不可能である。それでも、自律的な生命システム全体を構築するというゴールに向かい、生命の特定の機能に着目してこれに相当するシステムを構築することならば可能なのではなかろうか。例えば、この数年の間に、概日周期はたった3つのタンパク質により試験管内に再構築され(10)、また、数十の生体高分子の共同作業である翻訳過程までもが試験管内に再構成されている(11)。そして、生命は餌、仲間などの外的環境からの情報を受容、処理し、行動する。その意味で、生体高分子を用いて情報処理を行うDNAコンピュータも、生命システムの再構成につながる研究であり、実際、情報科学者と生命科学者の共同研究としてスタートした日本におけるDNAコンピュータの研究分野の進展方向の一つは、生体高分子が本来持つ自律性を活かすことで実験操作量のオーダーを減らすものであった(12-14)。

分子関数のネットワークとして試験管内に構成される自律型DNAコンピュータ=人工遺伝子回路



- ・配列変換関数、論理演算関数
- ・個々の関数の引数、戻り値は固有のRNA分子
- ・ある分子関数の戻り値として生産されたRNAが次のステップの関数の引数となる
- ・反応溶液の調製後は自律的に反応ネットワークが進行する

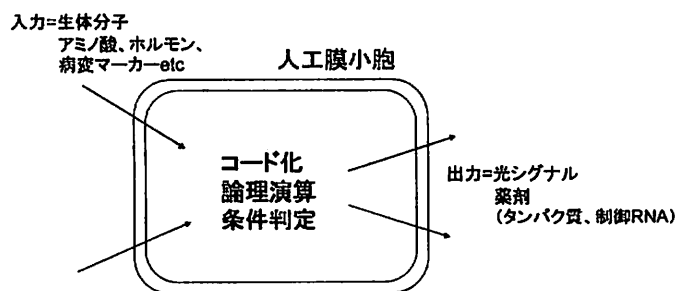
DNA コンピュータにおける反応の自律性を高める研究の流れを受け、最近、東京

大学の陶山明教授と私は、1つの演算が自律的に動作するだけでなく、複数の関数の間で入出力のやりとりが自律的に進行する分子コンピュータを構築した。関数としては、(1) **配列変換関数**: 特定の配列を持った RNA 分子が試験管内にある場合に、この分子を受理・消去し、かつ予めプログラムされた配列を持つ RNA 分子を出力する、(2) **AND 演算関数**: それぞれ特定の配列を持った2種類の RNA 分子が共に存在した場合にプログラムされていた配列の RNA 分子を出力する、が具現化されている。さらに、これらの反応は同一の反応条件・酵素セットによって進行するため、ある関数の出力分子は次の関数の入力分子となることができる。実際、我々は、2種類の配列変換関数と、1つの AND 演算関数とを組み合わせることで、遺伝子発現パターン判定システムを一本の試験管内で動作するように構築した。さらに、最終出力 RNA 分子を自律的に検知して蛍光を発する分子と組み合わせることで、分子コンピュータの出力を可視化している。

実は、この DNA コンピュータの開発はそのまま、自律的に動作する人工遺伝子回路の構築でもある。つまり、各関数は、特定の RNA 分子の存在によって遺伝子からの転写が活性化することを意味している。さらに、RNA を入出力とすることの利点は、これが天然の生命との親和性を持つことにある。直近の応用としては、本研究の成果を活かして、「個の医療」に重要な遺伝子型判定キットの構築が期待され、プロジェクトが進行している。分子反応ネットワークが一本の試験管内で自律的に動作する本反応系は、簡便かつ低コストに使用するキットとすることが容易である。

さらに、RNA を活用することで、より生命に近づくことが志向されている。例えば、出力となる RNA を用いた翻訳反応によってタンパク質を生産することが可能である。また、小分子を認識して構造変化を生じ、一本鎖を露出する RNA、リボスイッチを人工的にデザインすることができるため(15)、本研究の人工遺伝子回路の入力は RNA だけでなく、小分子とすることも可能である。さらには、本システムを細胞サイズの人工膜小胞に封じ込めて反応を行う研究も進んでいる。これらの研究を統合することで、情報処理に特化した人工細胞が数年内に構築されることが期待される。

分子コンピュータ(=人工細胞)の将来像



ブラックボックス無しのシステム
→ 一連の反応を情報科学的に記述可能

本研究の大きな目的は、頑強でない人工システムから頑強な人工システムを創りあ

げることによって、生物に見られる頑強性の本質について理解を深めることにある。これまでの、天然の生物からシステムの構成要素である遺伝子や化合物を同定する解析的アプローチとは逆の路線を取る本研究には、ブレイクスルーを生む大きな可能性がある。そして、システムを作り上げる過程には数理的なモデリングが有効であり、このモデル化は理学的な成果のみならず、有用な人工遺伝子回路を構築することでバイオテクノロジー全般に資するものとなることは間違いない。

謝辞：DNA コンピュータの共同研究を行っている東京大学総合文化研究科の陶山明教授に感謝します。DNA コンピュータに関わる諸研究は、科研費若手(B)、特定領域（分子プログラミング）、独立行政法人科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業、また、遺伝暗号表の操作に関する研究については、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構の産業技術研究助成事業の資金によって行われています。

参考文献

1. 木賀大介 & 菅裕明 (2006) *バイオニクス* 3, 28-31.
2. 木賀大介 & 山村雅幸 (2005) *人工知能学会誌* 20, 715-721.
3. Kiga, D., Futamura, Y., Sakamoto, K. & Yokoyama, S. (1998) *Nucleic Acids Res* 26, 1755-60.
4. Mitsui, T., Kimoto, M., Harada, Y., Yokoyama, S. & Hirao, I. (2005) *J Am Chem Soc* 127, 8652-8.
5. Kiga, D., Sakamoto, K., Kodama, K., Kigawa, T., Matsuda, T., Yabuki, T., Shirouzu, M., Harada, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hasegawa, Y., Endo, Y., Hirao, I. & Yokoyama, S. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9715-20.
6. Murakami, H., Ohta, A., Ashigai, H. & Suga, H. (2006) *Nat Methods* 3, 357-9.
7. Ro, D. K., Paradise, E. M., Ouellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A., Eachus, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., Chang, M. C., Withers, S. T., Shiba, Y., Sarpong, R. & Keasling, J. D. (2006) *Nature* 440, 940-3.
8. Endy, D. (2005) *Nature* 438, 449-53.
9. Basu, S., Gerchman, Y., Collins, C. H., Arnold, F. H. & Weiss, R. (2005) *Nature* 434, 1130-4.
10. Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T. & Kondo, T. (2005) *Science* 308, 414-5.
11. Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Ueda, T. (2001) *Nat Biotechnol* 19, 751-5.
12. Sakamoto, K., Gouzu, H., Komiya, K., Kiga, D., Yokoyama, S., Yokomori, T. & Hagiya, M. (2000) *Science* 288, 1223-6.
13. Chan, L. Y., Kosuri, S. & Endy, D. (2005) *Mol Syst Biol* 1, 2005 0018.
14. Komiya, K., Sakamoto, K., Kameda, A., Yamamoto, M., Ohuchi, A., Kiga, D., Yokoyama, S. & Hagiya, M. (2006) *Biosystems* 83, 18-25.
15. Bayer, T. S. & Smolke, C. D. (2005) *Nat Biotechnol* 23, 337-43.