

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

Development of *S*-adenosylmethionine (SAM)-responsive synthetic gene circuits in budding yeast and their application to screening for SAM overproducers

(出芽酵母における *S*-adenosylmethionine (SAM) 応答性人工遺伝子回路の開発と SAM 高生産株のスクリーニングへの応用)

氏 名 梅山 大地

## [目的・背景]

### 合成生物学の目的

合成生物学の研究手法の特徴は DNA や蛋白質などの生命システムを構成している要素に着目し、それらを組み合わせて生命現象の再現や創出を行う構成的なアプローチに見出すことができる。このようなアプローチを通じて、生命システムに対する理解度を検証することや有用物質生産のための生物を作出することは合成生物学の目的の一つである。そのため代謝物などの生体内で機能する分子によって駆動する生命システムを再構成することは、代謝制御の理解や代謝物の高生産株の作出といった合成生物学の目的に対する直接的な取り組みといえる。

### 技術的な進歩により人工遺伝子回路の設計の自由度は増加する

構成的なアプローチは DNA 配列の解析手法や合成手法の技術的な進歩を背景にその重要性を増している。特に遺伝子制御機構の設計を行う人工遺伝子回路の研究に対する直接的な推進力といえる。その理由の一つは飛躍的に増大しているゲノム配列情報により、潜在的に利用可能な生命システムを構成する部品点数が増加していることである。もう一つの理由は DNA 合成技術の進歩により遺伝子制御機構の作製における配列長や配列パターンへの制約が少なくなり、時間的・金銭的コストが低下していることである。そのため生物種の垣根を乗り越えて転写因子等の部品を自由に組み合わせることができれば、今後様々な研究への人工遺伝子回路の応用が期待できる。

### *S*-adenosylmethionine(SAM)応答性人工遺伝子回路

このような合成生物学研究の目的と近年の技術的な進歩から、代謝物応答性の人工遺伝子回路を異種生物由来の転写因子を用いて設計することが重要であると考えた。特に様々な代謝反応に

関与するキイ代謝物であり、DNA やヒストンへのメチル基ドナーとしてエピジェネティックな制御にも関わる *S*-adenosylmethionine(SAM)に着目した。そこで本研究では出芽酵母において SAM と結合する大腸菌の転写因子 MetJ を利用して人工遺伝子回路の作製に取り組んだ。さらにこの回路の応用研究として SAM 高生産遺伝子のスクリーニングを行い、本手法の実用性を示した。

## [結果・考察]

### 1. 人工遺伝子回路を用いた *S*-adenosylmethionine(SAM)のモニタリング

SAM と結合する大腸菌の転写因子 MetJ に B42 転写活性化ドメインを融合した人工転写活性化因子 (MetJ-B42) をデザインした。MetJ の結合配列である *met* オペレーターの下流に蛍光レポーターを挿入することで、SAM-MetJ-B42 複合体が蛍光レポーターの発現を誘導するように設計を行った。この人工遺伝子回路を組み込んだ出芽酵母の蛍光強度は、培地に添加した SAM に対して濃度依存的に増大した。これは培地から取り込まれた SAM が回路の入力に用いられた結果と考えられる。そこで SAM トランスポーターの破壊株(*sam3Δ* 株)を用いて回路応答を解析した。その結果、*sam3Δ* 株は培地に添加した SAM に対して応答を示さなかったが、SAM の前駆体であるメチオニンに対しては応答を示した(図 1a)。これは培地から取り込まれたメチオニンが細胞内で代謝され、生成した SAM が回路の入力に用いられた結果と考えられる。これらの結果は人工遺伝子回路が SAM に応答したことを示している。次に回路の出力レベルが細胞内の SAM 濃度を反映していることを示すために、HPLC 法により SAM 濃度を測定し、蛍光強度と比較した。その結果、メチオニン刺激による細胞内 SAM 濃度の上昇と蛍光強度は概ね合致した(図 1b)。さらに SAM 代謝に関与する *SAM1* や *CYS4* を破壊した株においても、細胞内 SAM 濃度の値と細胞の蛍光強度は合致した。これらの結果は SAM 応答性人工遺伝子回路を用いることで細胞内の SAM 濃度をモニタリングできることを示している。解析対象を網羅的遺伝子破壊株コレクションに拡張すれば SAM 濃度の変動に関与する遺伝子の網羅的スクリーニングも可能であると考えられる。

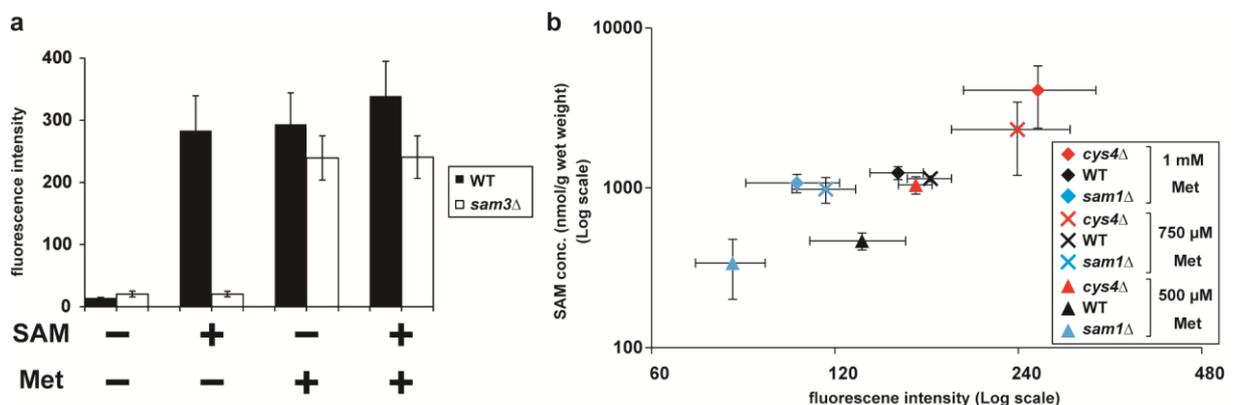


図 1. 人工遺伝子回路の応答の解析

(a) 野生株と *sam3Δ* 株を用いた SAM と methionine に対する応答の解析

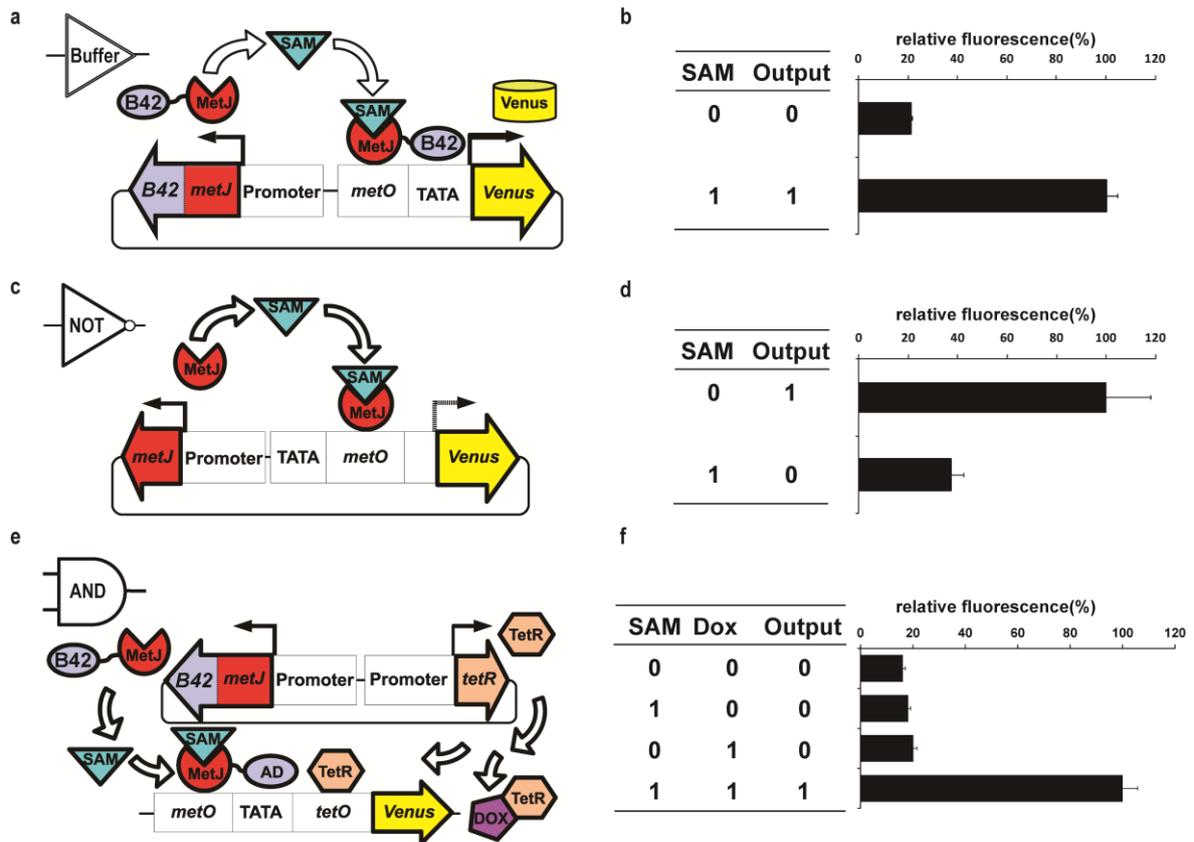
(b) 人工遺伝子回路の応答値と HPLC 法による SAM 濃度測定値の比較

### 2. SAM 応答性論理ゲートの構築：ゲノムライブラリーからの SAM 高生産遺伝子のスクリーニング

#### 論理ゲートの作製と評価

生物が本来備えている代謝物応答性の遺伝子制御機構には転写活性化だけでなく転写抑制や複

数の入力を備えた転写制御機構が存在する。このような様々な入出力パターンを人工遺伝子回路で実装可能であることを示すために、既に作製した MetJ-B42 を利用した転写活性化機構(Buffer ゲート)に加えて(図 2a,b)、SAM 応答性の転写抑制機構(NOT ゲート)と SAM と doxycycline(Dox)の共存下でのみ出力する転写制御機構(AND ゲート)を作製した。



**図 2. SAM 応答性人工遺伝子回路の設計とその入出力パターン**  
 (a) Buffer ゲートのデザイン (b) Buffer ゲートの入出力パターン (c) NOT ゲートのデザイン  
 (d) NOT ゲートの入出力パターン (e) AND ゲートのデザイン (f) AND ゲートの入出力パターン

NOT ゲートを作製するために恒常的なプロモーター内部に *met* オペレーターを挿入した (図 2c)。これにより SAM-MetJ 複合体が *met* オペレーターに結合することでプロモーター活性が低下すると考えた。蛍光レポーターを用いて解析したところ、NOT ゲートを組み込んだ細胞の蛍光強度はメチオニン依存的に低下していた (図 2d)。メチオニン濃度依存性を検討したところ、NOT ゲートは Buffer ゲートのグラフとは対称的なメチオニン濃度依存性を示し、いずれもメチオニン濃度 500  $\mu$ M 以下の培養条件下で蛍光強度が大きく変化していた。この濃度範囲では SAM 濃度を HPLC 法により検出することは難しい。そのため SAM 応答性人工遺伝子回路を利用することで、HPLC 法では検出が難しい低濃度における細胞内 SAM 濃度の変動を解析できると考えられる。特筆すべきは Buffer ゲートや NOT ゲートを用いることにより細胞が生きたままの状態でも簡便に計測できることである。そのため本手法を用いることで SAM のハイスループットな動態解析を行うことも可能であると考えられる。

SAM と Dox に応答する AND ゲートは Dox と結合する転写因子 TetR を利用して作製した。Buffer ゲートで用いたコンストラクトを改変し *met* オペレーターの下流に TetR の結合配列である *tet* オペレーターを挿入した (図 2e)。作製した AND ゲートの入出力パターンを、蛍光レポーターを用いて解析したところ、SAM と Dox の共存下でのみ細胞の蛍光強度が上昇していることを確認した (図 2f)。

## 出芽酵母マルチコピーゲノムライブラリーからの SAM 高生産遺伝子のスクリーニング

この回路の実用性を示すことを目的として SAM 高生産遺伝子のスクリーニングに取り組んだ。AND ゲートの出力に栄養要求性レポーターを接続すれば、SAM 濃度依存的な増殖速度を Dox で調節できるはずである。この AND ゲートを組み込んで作製したスクリーニング宿主株を用いることで、最適な選択圧を加えてスクリーニングを行うことができると考えた。出芽酵母マルチコピーゲノムライブラリーを作製し、スクリーニング宿主株に導入した。栄養要求性を利用して SAM 高生産株の濃縮を試み、シングルクローンを単離した。得られたクローンの SAM 濃度を HPLC 法により測定した。細胞内 SAM 濃度が上昇しているクローンからプラスミドを回収してシーケンス解析を行ったところ、得られたプラスミドには転写メディエーター複合体の tail サブユニットのコンポーネントの一つである Gal11 をコードする遺伝子が挿入されていた。転写メディエーター複合体は転写活性化因子と結合し RNA ポリメラーゼ II のリクルートを行っている。そのため GAL11 の過剰発現は転写状況のグローバルな変化を引き起こしている可能性がある。そこで GAL11 過剰発現株の RNA-Seq を行った。その結果、有意に発現変動している遺伝子を見出すことができた(図 3a)。GO 解析の結果、発現が上昇している遺伝子群には heme binding や plasma membrane に含まれる遺伝子が濃縮され、発現が低下している遺伝子群には iron ion homeostasis に含まれる遺伝子が濃縮されていた(図 3b)。これらの遺伝子群の発現変動と SAM の高生産については直接的な因果関係は見いだせない。また SAM やメチオニンの生合成系の遺伝子群や SAM を基質とするメチルトランスフェラーゼの遺伝子群は顕著な発現の変動を示していなかった。よって GAL11 過剰発現株における SAM 高生産は単純なメカニズムで引き起こされているのではないと考えられる。

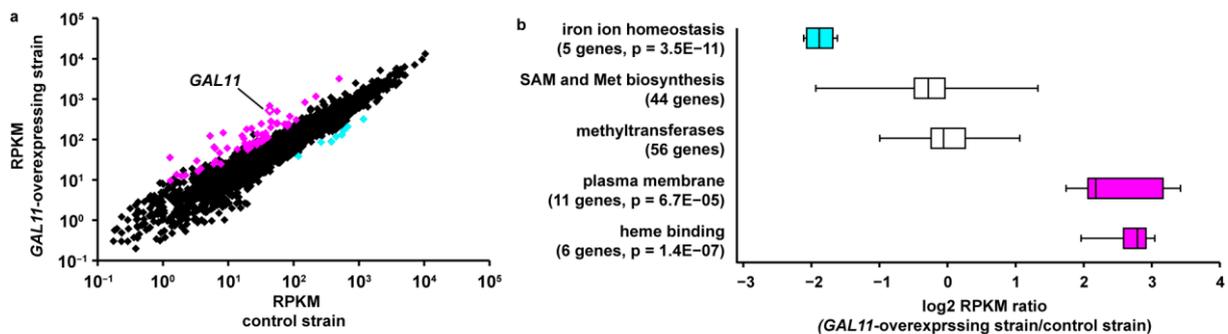


図 3. GAL11 過剰発現株のトランスクリプトーム解析

(a) RNA-Seq による GAL11 過剰発現株と野生株のトランスクリプトームの比較

(b) 発現変動遺伝子の GO 解析

### 【結論】

本研究では出芽酵母を宿主として用いて、大腸菌由来の転写因子 MetJ を利用した SAM 応答性人工遺伝子回路の作製を行った。この人工遺伝子回路を利用することで生細胞において簡便に細胞内 SAM 濃度のモニタリングが可能であることを示した。この回路の出力レベルを Dox で制御できるように改変することで、SAM と Dox の共存下でのみ出力が上昇する AND ゲートを作製した。この AND ゲートをゲノムライブラリーからの SAM 高生産遺伝子のスクリーニングに応用し、新規の SAM 高生産遺伝子として GAL11 を同定することに成功した。