

検出素子としての転写因子と遺伝子回路構築による応答調節



木村 友紀

1 はじめに

センサといえば、電子部品を組み合わせて温度や湿度などの信号を検出し、人間の認識しやすいフォーマットに出力する装置を思い浮かべる。我々生物は、電子部品を用いることなく、様々な生理情報や環境情報を的確に検知し、うまく応答している。生物がもつこうした「検出素子」を取り出して改良し、「色の変化」といった人間や機械の解析しやすい出力へ対応づけることによって、望みの分子を特異的に検出するセンサを開発することができる。本稿では、遺伝子発現の第一段階である転写を調節する蛋白質、転写因子に注目し、これを用いたバイオセンサの構築とスペック改良方法の基本について整理する。

2 転写因子を用いたバイオセンサの構成

2.1 転写因子の生体内での役割

センサ応用可能な転写因子は、リガンド結合ドメイン (LBD) および DNA 結合ドメイン (DBD) をもつ蛋白質であり、多くの場合、二量体を形成している。転写因子が特異的に結合する DNA 配列はオペレータと呼ばれ、転写が開始される DNA 領域 (プロモータ) の近傍に位置している。生体内において、転写因子が制御する遺伝子は、自身のリガンドとなる分子を合成したり、分解したりする酵素の遺伝子であることが多い。

細胞内のリガンド濃度が高まって LBD がリガンドと結合すると、転写因子の構造が変化し、オペレータとの結合親和性が変化する。これに伴い、制御遺伝子の転写レベルが変動する (図 1 a)。リガンド結合によって転写因子とオペレータとの結合が強まるか弱まるか、また、転写が亢進されるか抑制されるかは、転写因子に本来備わった機能によって決まる。

2.2 転写因子のバイオセンサ構築への転用

分子生物学技術の成熟により、遺伝子組換えは安価かつ簡便に実施できるようになった。転写因子が制御する遺伝子を、たとえば緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) や発光酵素 (ルシフェラーゼ) へと組換

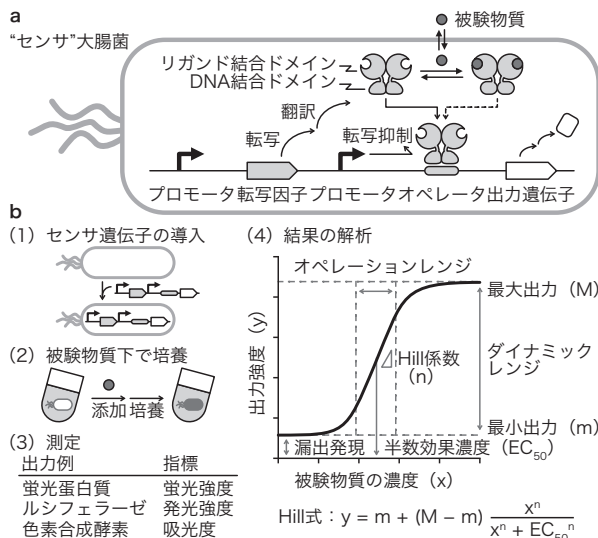


図 1 (a) 抑制型転写因子を用いたバイオセンサの大腸菌内での構築例; (b) バイオセンサを用いた被験物質の一般的な検出方法と解析。

えることによって、転写およびそれに伴う翻訳レベルを蛍光強度や発光強度として読み出すことができるようになる。この出力強度はリガンド濃度依存的に変化する転写因子の構造変化効率と対応するため、蛍光や発光の強さからリガンド濃度を決定できるのである。

こうした構成をもつ DNA を、大腸菌などの取り扱いの容易な微生物に導入し、リガンド分子 (被験物質) とともに培養すると、リガンド濃度に応じてセンサによる転写調節がなされ、最終的な出力強度が変化する (図 1 b)。転写因子とリガンドの結合は化学平衡に基づくため、リガンド濃度と出力強度の関係は非線形的である。得られる関係すなわち用量応答の解析は、半数効果濃度 (EC_{50}) および傾き (Hill 係数) を決定できることから、シグモイド関数のひとつである Hill 式へとフィッティングすることが通例である。

3 新規センサの探索および開発

生物は遺伝子の宝庫である。測定したい被験物質に応答する転写因子を微生物が有している可能性があるため、自然界からの遺伝子スクリーニングやデータベースの活用によって、バイオセンサとして利用できる転写因子を同定できることがある。また、興味深いことに、転写因子へアミノ酸変異を導入することによってリガンド特異性を変えることができる。進化学やコンピュータ支援デザインにより、センサ開発事例は年々増えてきた。たとえば、ラクトース応答転写因子 LacI への変異導入によって、ラクチトールをはじめ種々の糖に応答するセンサが開発された¹⁾。また、アラビノース応答転写因子 AraC からは、サリチル酸やバニリンなどに応答する変異体が報告されている²⁾。さらに、多剤耐性に関与する転写因子 RamR からは、5 種類のアルカロイドを特異的に検出する変異体が取得されている³⁾。センサとして利用できるように転写因子を改変するためには、ただ結合界面をデザインすれば良いわけではなく、オペレータとの結合親和性変化をも考慮する必要がある。こうした変異体を峻別するためのスクリーニング技術の開発や

知見もまた課題となっている。

4 遺伝子回路構築による高性能化

転写因子、とりわけ自然界から得た転写因子は、生物自身が環境変化に应答できれば良い程度のスペックしか持ち合わせておらず、バイオセンサとして利用するためには性能不足であることも多い。検出素子として転写因子を用いることの利点は、制御する遺伝子を任意に設定できることにある。ここまで紹介してきたように、転写因子が出力蛋白質の発現を直接制御するのではなく、他の要素を仲介する遺伝子“回路”を微生物内に構築することによって、センサ性能を高めることができる。本節では、回路構築による(1)線形応答範囲の向上および(2)ダイナミックレンジの向上に向けた最初の実践について紹介する。

4.1 回路構築による線形応答範囲の向上

転写因子のオペレータに対する結合親和性がリガンドとの結合によって変化するため、リガンド濃度が一定以上となった際に急峻な応答を見せることが多い。したがって、得られた出力強度からリガンド濃度を見積もることができる範囲は、せいぜい1桁程度である。

Nevozhayらは、センサとして働く転写因子 TetR の発現を、TetR 自身が負に制御する遺伝子回路を構築した(図2a)⁴⁾。リガンドであるテトラサイクリン(抗菌薬の1種)が低濃度のとき、TetR 自身の発現量が低いため、極微量の添加量であっても蛍光出力が検出される。テトラサイクリンの濃度が高まるにつれて出力が高まってゆくが、TetR 自身の発現量も増えてゆくと、TetR がオペレータ(*tetO*)から完全に解離するために要求されるテトラサイクリン濃度が高くなる。結果として、0.1~60 ng/mL の範囲で線形的な応答を示すテトラサイクリン検出システムが構築された。

4.2 回路構築によるダイナミックレンジの向上

転写因子による転写変動は生物が環境変化に対応できる程度に調節されれば良いため、そのダイナミックレンジ

はたかだか数倍しかないことも珍しくはない。有意差をもって標的分子を検知するためには、微弱な入力信号を増強するための増幅器が遺伝子回路でも必要となる。

環境シグナルのひとつであるヒ素を検出するために、Wangらは転写因子 ArsR を用いたバイオセンサを構築した。そして、植物病原細菌の一種である *Pseudomonas syringae* の持つ転写亢進活性の高い転写活性化因子 HrpRS (HrpR および HrpS の複合体) およびその制御プロモータ P_{hrpL} に彼らは注目し、ArsR の制御遺伝子を *hrpRS* に、HrpRS の制御遺伝子を *gfp* とした(図2b)⁵⁾。ヒ素結合に連動した ArsR によるわずかな転写変動を HrpRS が増幅することによって、ヒ素応答を最大で20倍に拡大することに成功した。これに留まらず、彼らは、HrpS と結合して HrpR との複合体形成を阻害する蛋白質 HrpV の発現ユニットも回路に付け加えることによって、増幅度合いを0.5から21倍の範囲で任意に調節できることも示している。

5 おわりに

元来、特異的な応答を示す生体システムを抽出し、改良することによって、人間や装置と親和性の高いセンサを開発することができる。やや古典的な回路構築例をここでは取り上げたが、こうした基本構成を発展させることで、特異性を保ちながら高感度検出を実現するセンサおよび遺伝子回路の設計が試みられている。高い特異性、簡便な使用感、および実地利用可能性といった観点から、ニーズに合う転写因子を迅速に開発する技術、そして検出範囲に合う回路設計の自動化は、今後益々重要になってゆくであろう。

文 献

- 1) N. Taylor, A. Garruss, R. Moretti, S. Chan, M. Arbing, D. Cascio, J. Rogers, F. Isaacs, S. Kosuri, D. Baker, S. Fields, G. Church, S. Raman : *Nat. Methods*, **13**, 177 (2016).
- 2) C. Frei, S. Qian, P. Cirino : *Protein Eng. Des. Sel.*, **31**, 213 (2018).
- 3) S. d'Oelsnitz, W. Kim, N. Burkholder, K. Javanmardi, R. Thyer, Y. Zhang, H. Alper, A. Ellington : *Nat. Chem. Biol.*, **18**, 981 (2022).
- 4) D. Nevozhay, R. Adams, K. Murphy, K. Josić, G. Balázs : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 5123 (2009).
- 5) B. Wang, M. Barahona, M. Buck : *Nucleic Acids Res.*, **42**, 9484 (2014).

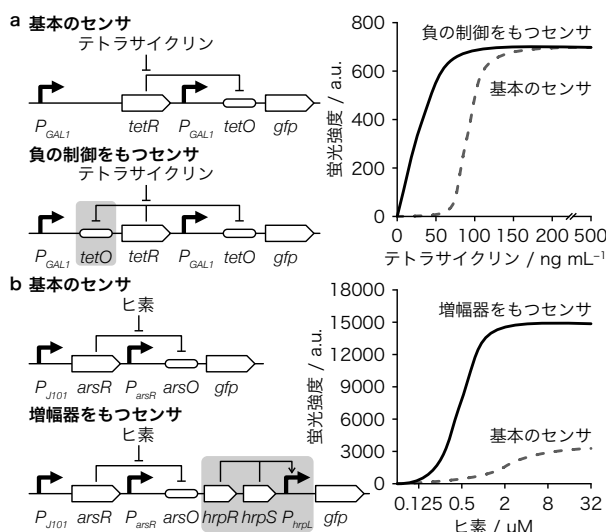


図2 (a) 負の制御の導入による線形応答範囲の拡大⁴⁾; (b) 増幅器の導入によるダイナミックレンジの拡大⁴⁾



木村 友紀 (KIMURA Yuki)

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 (〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1) ; Imperial College London, Department of Life Sciences (Exhibition Rd, South Kensington, London, SW7 2AZ). 千葉大学大学院融合理工学府博士後期課程修了。博士(工学)。《現在の研究テーマ》チューリングパターンを大腸菌で構築すること。《主な著書》“スマートセルインダストリー—微生物細胞を用いた物質生産の展望—”, (シーエムシー出版), 分担執筆。《趣味》一見合理的に思えて実は非合理的なものの探し。