

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		合成クオラムセンシングの実験室進化における表現型遷移の定量評価			
研究テーマ (欧文) AZ		Adaptive Laboratory Evolution of Synthetic Quorum Sensing Bacteria			
研究氏 代表 者	カナ CC	姓)	名)	研究期間 B	2016 ~ 2018 年
	漢字 CB	相馬	悠希	報告年度 YR	2018 年
	ローマ字 CZ	SOMA	YUKI	研究機関名	九州大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		九州大学 生体防御医学研究所・助教			
<p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>本研究では、自己抑制的な集団制御を担う人工的なクオラムセンシング系を構築し、継代培養による実験室進化を実施することで、資源枯渇回避を目的とした協調的な集団調整系が微生物集団の進化過程において保持可能であるかを検証した。<i>V. fischeri</i> 由来の <i>lux</i> システムでは、LuxI によって合成される 3-oxo-C6-AHL と受容体タンパク質 LuxR が複合体を形成し、<i>luxI</i> を含む P_{lux} プロモーター下流の遺伝子発現を活性化する。この P_{lux} の両端に lacO 配列を導入することで、AHL-LuxR 複合体との結合を LacI リプレッサーの立体障害で制限できる $P_{lux}lacO$ プロモーターを構築した。これにより、$P_{lux}lacO$ プロモーターの対シグナル感度を IPTG 濃度依存的に変化させ、QS 依存的な遺伝子発現誘導が開始される菌体密度 (閾値菌体密度) を調整した。構築した合成 <i>lux</i> システムでは、TCA 回路の初発反応を担う酵素遺伝子 (<i>gltA</i>) の発現を $PL_{tet}O_1$ プロモーターによって制御し、そのプロモーター活性を阻害する TetR リプレッサーの発現を $P_{lux}lacO$ によって制御することで、閾値菌体密度に達すると <i>gltA</i> の発現が抑制されて TCA 回路が遮断される。また、$P_{lux}lacO$ 下流にレポーターとして GFP を導入することで、QS 依存的な遺伝子発現誘導の強度をモニタリングした。メタボローム解析によって設計どおりに TCA 回路が QS 依存的に遮断されたことを確認した。これと同時に LuxR の発現も TetR によって抑制させると、<i>lux</i> システムによるシグナル伝達は負のフィードバック制御を受ける。このスキームを導入することによって、QS シグナル伝達におけるアウトプットシグナルの強度が一定に保たれた。また、IPTG 濃度を変動させることでこれらの応答の加速・遅延が調整可能であることを確認した。この大腸菌株をさまざまな自己選択圧を実験室進化に用いた結果、継代数の増大に伴って大腸菌の増殖速度の増大がみられる一方で、GFP の発現強度は落ちるものの、遺伝子回路は大腸菌に保持されていることが確認された。このことから TCA 回路遮断への適応として、増殖への必須遺伝となる <i>gltA</i> は保持しながら QS のシグナル伝達速度・感度に影響する進化が生じたことが示唆された。現在、遺伝子変異解析とメタボローム解析によってこれらの現象のメカニズム解明に取り組んでいる。</p>					
キーワード FA	合成生物学	人工遺伝子回路	クオラムセンシング	実験室進化	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

In this study, we construct a synthetic quorum sensing systems in *E. coli* that could exert the self-restraint population control though metabolic flux regulation. They were implemented to the adaptive laboratory evolution (ALE) to investigate whether a coordinated population adjustment system for resource depletion avoidance could be sustained in microbial society or not. With the *lux* system derived from *V. fischeri*, 3-oxo-C6-AHL (AHL) synthesized by enzyme LuxI, and the receptor protein LuxR form a complex with AHL to activate gene expression downstream of the P_{lux} promoter including *luxI*. By introducing *lacO* sequences at both upstream and downstream of P_{lux} , $P_{lux}lacO$ promoter was designed to be capable of restricting the binding to the AHL-LuxR complex by the steric hindrance of the LacI repressor was constructed. Thus, the pair signal sensitivity of the $P_{lux}lacO$ promoter was changed depending on exogenous IPTG concentration, and the cell density (threshold cell density) at which QS-dependent gene expression induction was initiated could be adjusted. In this synthetic *lux* system, the expression of the enzyme gene (*gltA*) responsible for the initial reaction of the TCA cycle is controlled by the $P_{tet}O1$ promoter, and the expression of the TetR repressor that inhibits the promoter activity is controlled by $P_{lux}lacO$. When the population reached to the threshold cell density, the expression of *gltA* was suppressed and the TCA cycle was blocked. At the same time, the expression of LuxR was also suppressed by TetR, and the signal transduction by the *lux* system was negatively feedback-controlled. As the result, the intensity of QS-dependent gene expression was kept constant, which was monitored by introducing GFP as a reporter downstream of $P_{lux}lacO$. With the ALE of synthetic QS strain, the growth rate of *E. coli* increased as the passage number increased, while the expression of GFP decreased. On the other hand, the gene circuit constructs was maintained in *E. coli*. From these results, it was suggested that as adaptation to TCA circuit blockade, evolution occurred that affected the signal transduction rate and sensitivity of QS while retaining *gltA*, which is an essential inheritance for proliferation. Currently, we are working on elucidation of the mechanism of these phenomena by gene mutation analysis and metabolome analysis.