

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	遺伝子ネットワーク下流の遺伝子が全体に与える影響についての研究
Title(English)	
著者(和文)	森谷孟史
Author(English)	Takefumi Moriya
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11220号, 授与年月日:2019年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山村 雅幸,小長谷 明彦,小野 功,青西 亨,瀧ノ上 正浩,木賀 大介
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11220号, Conferred date:2019/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

遺伝子ネットワーク下流の遺伝子が
全体に与える影響についての研究

平成三十年三月博士（理学）申請

指導教員 山村 雅幸 教授

氏名 森谷 孟史

論文要旨

細胞に内在の遺伝子や外来から導入した遺伝子が細胞内で機能していることを確認・利用するためには、それらの上流遺伝子に対応した下流遺伝子が必須となる。下流遺伝子は、上流遺伝子と同様の細胞内リソースを利用している。また下流遺伝子は1細胞内で数の限られた上流遺伝子と結合している。

本研究では、数理モデル化・シミュレーション・生物実験を組み合わせた合成生物学的手法により下流遺伝子が上流遺伝子に与える影響を評価した。その結果、細胞内の様々な分子競合が上流遺伝子の挙動に影響を与えていることを示した。

本研究は内在の遺伝子ネットワークやレポーター遺伝子を導入したときの遺伝子の動態を制御するために重要である。そのため本研究は広く分子生物学・細胞生物学に影響する研究となる。

目次

第一章：序章と現状分析	4
1.1 背景	4
1.1.1 レポーター遺伝子の発展	4
1.1.2 レポーター遺伝子の弊害	4
1.1.3 レポーター遺伝子を用いた合成生物学	5
1.2 研究目的と論文の構成	6
図表	7
第二章：人工遺伝子回路に下流遺伝子を付加した場合の数理モデル化・シミュレーション	9
2.1 導入	9
2.2 下流遺伝子を付加した人工遺伝子回路の設計・構築	10
2.3 材料と方法	10
2.3.1 数理モデリングおよび数値シミュレーション	10
2.4 結果	44
2.4.1 下流遺伝子によるDNA結合サイトの奪い合い効果	44
2.4.2 下流遺伝子によるタンパク質分解酵素の奪い合い効果	45
2.5 結果のまとめと考察	46
図表	49
第三章：人工遺伝子回路に様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した場合の数理モデル化・シミュレーション・生物実験	63
3.1 導入	63
3.2 様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した人工遺伝子回路の設計・構築	64

3.3 材料と方法	64
3.3.1 数理モデリングおよび数値シミュレーション	64
3.3.2 フローサイトメーターによるGFP蛍光強度測定	85
3.3.3 人工遺伝子回路を導入した大腸菌の顕微鏡観察	86
3.3.4 大腸菌コロニーを観察するための画像解析	86
3.4 結果	90
3.4.1 数理モデル化・シミュレーションによる、様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した場合の振動子遺伝子の挙動変化	90
3.4.2 顕微鏡観察による、様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した場合の振動子遺伝子の挙動変化	90
3.4.3 奪い合い効果を考慮した数理モデル化・シミュレーションによる、様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した場合の振動子遺伝子の挙動変化	92
3.5 結果のまとめと考察	95
図表	98
第四章：総合討論	134
4.1 結果のまとめ	134
4.2 考察	135
4.2.1 人工遺伝子回路への遡及性の大きい遺伝子導入	135
4.2.2 天然遺伝子回路への遡及性の小さい遺伝子導入	135
4.3 展望	136
図表	137
付録	139
公表論文	147
参考文献	151
謝辞	159

第一章：

序章と現状分析

1.1 背景

1.1.1 レポーター遺伝子の利用

分子生物学・細胞生物学の発展において、細胞内の制御ネットワークにおける遺伝子発現の機能を測定するためにレポーター遺伝子は必須のものとなっている[1-3]。上流制御遺伝子に結合した下流レポーター遺伝子は、上流の標的遺伝子の活性を定量することができる。レポーター遺伝子は二つの部位に分けられる。一つ目の部位は上流制御遺伝子タンパク質と結合・認識するプロモーター部位である。二つ目の部位は上流制御遺伝子を定量するコーディング部位である。レポーター遺伝子は制御遺伝子活性の測定しやすさや細胞毒性が少ないことが要求される。これらの理由から、一般的なレポーター遺伝子としては、酵素活性測定を行うための lacZ [4, 5]、薬剤耐性測定を行うための CAT [6, 7]、蛍光活性測定を行うための GFP [8, 9] が利用されている。特に他分子を必要せずに光を吸収することから、GFP は多種多様な変異体が作られレポーター遺伝子として利用されている [10, 11]。コーディング部位として有用な遺伝子の探求は進められており、近年になり上流遺伝子へのプロモーター部位が与える影響について検証され始められている。

1.1.2 レポーター遺伝子の弊害

レポーター遺伝子による定量は遺伝子動態を制御するのに重要となるが、レトロアクティビティと呼ばれる下流遺伝子が上流遺伝子の動態に影響を与える現象が起きる(図 1-1) [12-16]。レトロアクティビティを引き起こす主要原因としては DNA 結合サイトの奪い合いとタンパク質分解酵素の奪い合いの 2 種類がある(図 1-2)。

DNA 結合サイトの奪い合いは、上流遺伝子タンパク質が上流遺伝子と下流遺伝子のプロモーター内の DNA 結合サイトに結合・分配されてしまうために、上流遺伝子の挙動の変化を生じさせる [12-19]。レポーター遺伝子を付加することにより、1 細胞内における制御タンパク質結合サイトの数が増加する。そのよ

うな増加は制御タンパク質が1つあたりのDNA結合サイトに結合する確率を減少させる。その減少した結合確率は上流遺伝子が制御するネットワークを摂動させる。そしてレポーター遺伝子も摂動した上流遺伝子の影響を受けて摂動する。

タンパク質合成過程におけるDNA結合サイトの奪い合いと同様に、タンパク質除去過程におけるタンパク質分解酵素の奪い合いもまた上流制御遺伝子の動態に影響を与える[16, 20-22]。特に配列認識型プロテアーゼはタグ付きタンパク質を認識・分解する。そのためプロテアーゼは、タンパク質タグ付き制御遺伝子タンパク質とタグ付きレポータータンパク質を、限られた数で分解する。タンパク質除去過程では希釈と同様に、プロテアーゼによる分解が細胞の動態や生育に影響を与えている[23, 24]。

1.1.3 レポーター遺伝子を用いた合成生物学

合成生物学の研究はレポーター遺伝子の測定を通して、人工遺伝子回路の性能確認を行っている[25-30]。合成生物学では、以下の3つのプロセスを繰り返すことにより所望の機能の実装が行われている(図1-3)[31]。1) 実装したい遺伝子回路を設計し、数理モデルを構築する。2) 構築した数理モデルを基に、計算機による数値シミュレーションを行う。3) 数値シミュレーションにより実装可能な値であれば、実際の生物への実装を行う。もし所望の挙動を示さないようであれば、1)の工程からやり直す。そうした過程を経て、これまでの合成生物学では、抑制型振動子[25]、トグルスイッチ[26]、遺伝子大量発現による細胞リプログラミング[27]、ワディントン地形[28]、エッジ検出[30]といった機能の実装が行われている。その中でも人工遺伝子回路は外来の機能既知の遺伝子から成るネットワークを設計するため、数理モデル・シミュレーションによる機能予測がしやすいという利点がある。

1.2 研究目的と論文の構成

本研究では、一連の合成生物学的手法により下流レポーター遺伝子が上流遺伝子に与える影響を評価した。その結果、細胞内の様々な分子競合が上流遺伝子の挙動に影響を与えていることを示した。本論文は四章で構成され、第一章では、序章として、分子生物学・細胞生物学の発展におけるレポーター遺伝子の貢献と合成生物学におけるレポーター遺伝子の貢献をそれぞれ述べた。第二章、第三章では実験の結果と考察を、第四章では総合討論に加え、今後の展望について論ずる。

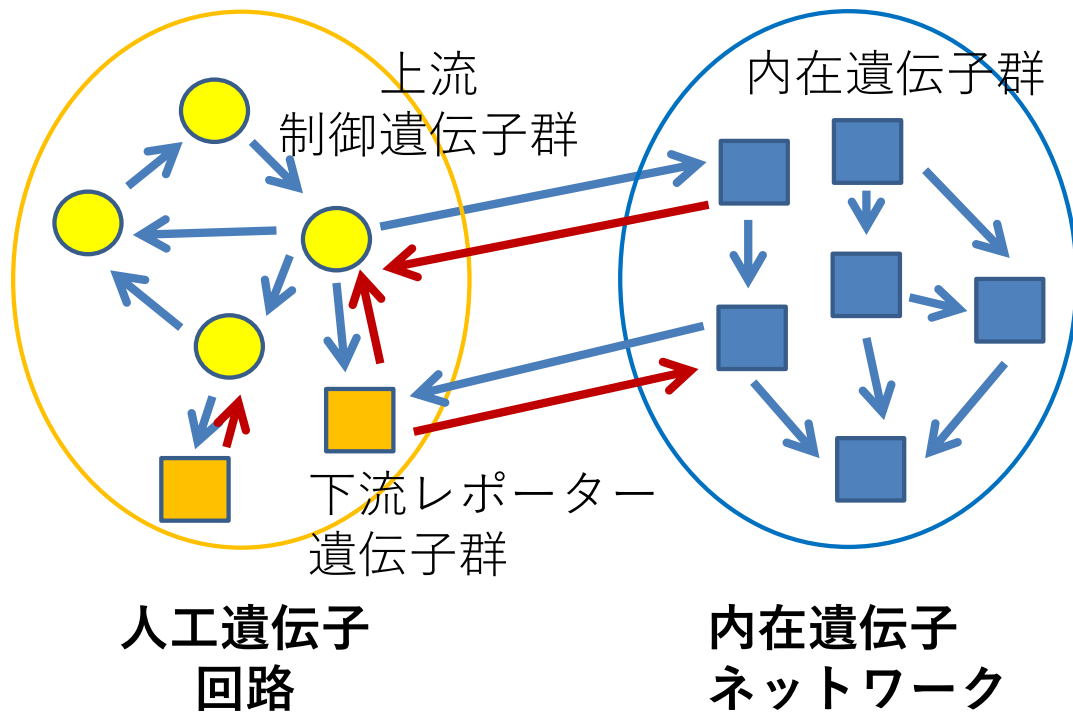


図 1-1 細胞内における人工遺伝子回路

人工遺伝子回路内の制御遺伝子群が下流レポーター遺伝子群や下流内在遺伝子群に影響を与えると同時に、下流レポーター遺伝子群や下流内在遺伝子群が上流制御遺伝子群に影響を与えている。

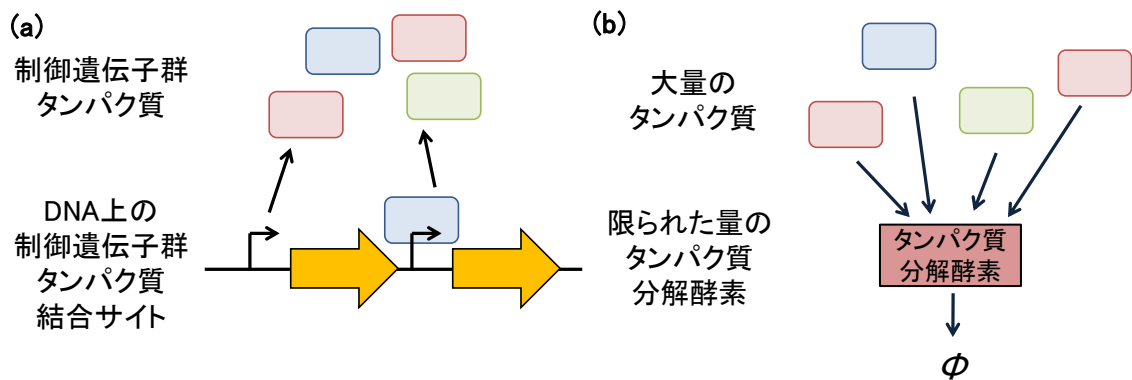


図 1-2 人工遺伝子回路における制御遺伝子に下流遺伝子を与える影響

(a)プロモーター内における制御遺伝子群タンパク質結合サイトが制御遺伝子群タンパク質を奪い合う効果 (b)大量のタンパク質が限られた数のタンパク質分解酵素を奪い合う効果

第二章：

人工遺伝子回路に下流遺伝子を付加した場合の数理モデル化・シミュレーション

2.1 導入

合成生物学では数理モデル化・シミュレーションを通して、生命現象を理解することに貢献している[25-28, 32]。細胞を自由自在に制御するためには、*in silico* 実験と *in vivo* 実験での動態を対応づけることが重要となる。数理モデル化・シミュレーションをするとき、人工遺伝子回路は上流の制御遺伝子群のみをモデル化することが多い。しかし、実際の生命に人工遺伝子回路を導入するときには、レポーター遺伝子や内在の遺伝子回路といった下流遺伝子を含むことにより人工遺伝子回路として機能している（図 2-1）。特にレポーター遺伝子といった下流遺伝子は、生細胞内で人工遺伝子回路を観察・分析・活用するときに必須となる。

外来のレポーター遺伝子は上流の制御遺伝子に以下の 2 つの奪い合いにより影響を与えている。一つ目の奪い合い効果は、制御遺伝子タンパク質をめぐって各プロモーター内の DNA 結合サイトが奪い合う効果である（図 2-2）[19]。DNA 結合サイトがデコイサイトとして機能する例はウイルス、原核生物、真核生物へと広範にみられる[33-35]。二つ目の奪い合いは、基質タンパク質がタンパク質分解酵素を奪い合う効果である。生命のタンパク質分解機構はユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー系、カスパーゼ系、 γ -セクレターゼ系、カルパイン系に分けられる[36-40]。そして上流制御遺伝子と下流レポーター遺伝子が同一のタンパク質分解機構により分解されるとき、タンパク質分解酵素の奪い合いが生じる。これらの 2 種類の奪い合い効果は下流レポーター遺伝子を付加したときの重要な効果である。

本項目では、上流制御遺伝子へ下流遺伝子を付加したときの、上流制御遺伝子の動態の変化を示した。そのために私は Smolen 振動子の人工遺伝子回路[32]に下流レポーター遺伝子を結合したときの動態を評価した。

2.2 下流遺伝子を付加した人工遺伝子回路の設計・構築

本項目ではまず上記の設計方針により、2つの下流遺伝子の効果を観察するための振動子モデルを構築した(図2-3)。1つ目は既知のSmolen振動子モデル[32, 41, 42]である。そしてSmolen振動子に下流レポーター遺伝子GFPを結合したときのlac/ara-reporter circuitモデルとした。

この系に用いている振動子はSmolen振動子と呼ばれ、タンパク質分解とタンパク質合成のフィードバックにより挙動する振動子である。Smolen振動子はロバスト性と調節性が高いことで知られている。Smolen振動子は、AraCとLacIがそれぞれポジティブフィードバックループとネガティブフィードバックループを形成している。AraCはアラビノース存在下で活性化されるタンパク質である。またLacIは β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)の非存在下で働く抑制タンパク質である。上記のSmolen振動子モデルとlac/ara-reporter circuitモデルでは、AraC, LacI, GFP配列にssrAペプチドタグをC末端に付加することによりClpXPプロテアーゼにより特異的に分解されるようにしている[43, 44]。

lac/ara-reporter circuitモデルでは、最も単純な下流遺伝子としてGFPを採用した。下流遺伝子は生細胞内でかなり複雑であるが、単純化のためにGFPを結合させた。

そしてSmolen振動子モデルとlac/ara-reporter circuitモデルでのシミュレーション結果を比較した。その結果、制御タンパク質のプロモーター内のDNA結合サイトの奪い合いとタンパク質分解酵素の奪い合いが下流遺伝子を加えたときの影響として現れることを示した。本項目において、私は振動子においてタンパク質合成と同様に、タンパク質分解が重要な役割を果たしていることを示した。

2.3 材料と方法

2.3.1 数理モデリングとシミュレーション

人工遺伝子回路の動態を予測するために、私はプロモーター間の遷移、タンパク質合成、タンパク質の分解の動態の化学反応式を基にした数理モデルを構築した。この数理モデルはStricker氏らの論文[32, 41, 42]を基にしたものである。なお公表論文発表時[16]から新たな知見として、LacI四量体二分子がDNAのループ構造を形成するのではなく、LacI四量体一分子がDNAのループ構造を形成することが判明した[45-47]。またループ構造を形成するときにAraCが

遊離するとしていたが、実際には今回の実験での 458bp のループ構造を形成するときには AraC の遊離は生じづらいことが判明した[48]。そのため公表論文公開時と新たな知見を踏まえた上での数理モデル、シミュレーション結果の両方を記述する (図 2-4)。そのためこの章では、公表論文発表時のモデルをそれぞれ公表時 Smolen 振動子モデル、公表時 lac/ara-reporter circuit モデルと記述し、新たな知見を踏まえて改良したモデルをそれぞれ新規 Smolen 振動子モデル、新規 lac/ara-reporter circuit モデルと記述した。また数理モデルに関するパラメータは表 2-1 に記載した。

本章で扱う 4 つのモデルでは、LacI 四量体の DNA への結合・解離反応速度係数は k_r と k_{-r} で表す。同様に AraC 二量体の DNA への結合・解離反応速度係数は k_a と k_{-a} で表す。過去のルシフェラーゼアッセイの結果や数理モデルからの解離反応速度係数 k_{-r} と k_{-a} から結合反応速度係数 k_r と k_a を導出した[32, 49]。タンパク質の DNA への結合は以下の(2-1-1), (2-1-2)式で表す。そのときの最大結合係数と最小結合係数はそれぞれ($C_r^{max} = 0.2 \text{ molecules}^{-1}$ and $C_a^{max} = 1 \text{ molecules}^{-1}$)と($C_r^{min} = 0.01 \text{ molecules}^{-1}$ and $C_a^{min} = 0 \text{ molecules}^{-1}$)とする。そのとき k_r と k_a の式は以下のように表す。

$$k_r = k_{-r} \left((C_r^{max} - C_r^{min}) \frac{1}{1 + \left(\frac{[IPTG]}{k_{r1}}\right)^{b_1}} + C_r^{min} \right) \quad (2-1-1)$$

$$k_a = k_{-a} \left((C_a^{max} - C_a^{min}) \frac{[ara]^{c_1}}{k_{a1}^{c_1} + [ara]^{c_1}} \frac{1}{1 + \left(\frac{[IPTG]}{k_{r1}}\right)^{b_1}} + C_a^{min} \right) \quad (2-1-2)$$

AraC や LacI をコードする lac/ara プロモーターにおける状態遷移は、AraC 二量体分子の DNA への結合・解離、LacI 四量体分子の DNA への結合・解離、および DNA のループ構造の形成を基に決定した。プロモーター間の遷移の動態は以下のような化学反応式により決定した。プロモーター内のタンパク質結合サイトの相互作用の動態は、 $P_{j,k,l}^i$ に従って決定した。この式において P はプロモーターを表す。 i はどのタンパク質を発現するかを表し、 a のときはアクチベータタンパク質を、 r のときはリプレッサータンパク質を発現している。 j と k はプロモ-

ターに結合したアクチベータタンパク質とリプレッサータンパク質の個数を表し、それぞれアクチベータタンパク質の数 $j \in \{0, 1\}$ 、リプレッサータンパク質の数 $k \in \{0, 1, 2\}$ となっている。 l はプロモーターがループ構造をとっているかを表し、 $P_{j,k,L}^i$ ではループ構造を形成していることを $P_{j,k,0}^i$ では非ループ構造となっていることを表す。また新規 Smolen 振動子モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モデルではプロモーターにおける状態遷移の動態を (2-1-3) - (2-1-8) 式で表した (図 2-4)。新規 Smolen 振動子モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モデルではプロモーターにおける状態遷移の動態を (2-1-6) - (2-1-11) 式で表した (図 2-4)。

$$P_{0,2,0}^i \xrightarrow{k_l} P_{0,2,L}^i \quad i \in \{a, r\} \quad (2-1-3)$$

$$P_{1,2,0}^i \xrightarrow{k_l} P_{0,2,L}^i + a_2 \quad i \in \{a, r\} \quad (2-1-4)$$

$$P_{0,0,L}^i \xrightarrow{k_{ul}} P_{0,0,0}^i \quad i \in \{a, r\} \quad (2-1-5)$$

$$P_{j,0,0}^i + r_4 \xrightleftharpoons[k_{-r}]{2k_r} P_{j,1,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (2-1-6)$$

$$P_{j,1,0}^i + r_4 \xrightleftharpoons[2k_{-r}]{k_r} P_{j,2,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (2-1-7)$$

$$P_{0,k,0}^i + a_2 \xrightleftharpoons[k_{-a}]{k_a} P_{1,k,0}^i \quad i \in \{a, r\}, k \in \{0, 1, 2\} \quad (2-1-8)$$

$$P_{j,1,0}^i \xrightleftharpoons[k_{-l}]{k_l} P_{j,1,L}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (2-1-9)$$

$$P_{0,k,L}^i + a_2 \xrightleftharpoons[k_{-a}]{k_a} P_{1,k,L}^i \quad i \in \{a, r\}, k \in \{0, 1\} \quad (2-1-10)$$

$$P_{j,0,L}^i \xrightarrow{k_{ul}} P_{j,0,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (2-1-11)$$

加えて公表時 lac/ara-reporter circuit モデルでは動態を(2-1-12) – (2-1-17)式で表した。また新規 lac/ara-reporter circuit モデルでは動態を(2-1-15) – (2-1-20)式で表した。

$$P_{0,2,0}^d \xrightarrow{k_l} P_{0,2,L}^d \quad (2-1-12)$$

$$P_{1,2,0}^d \xrightarrow{k_l} P_{0,2,L}^d + a_2 \quad (2-1-13)$$

$$P_{0,0,L}^d \xrightarrow{k_{ul}} P_{0,0,0}^d \quad (2-1-14)$$

$$P_{j,0,0}^d + r_4 \xrightleftharpoons[k_{-r}]{2k_r} P_{j,1,0}^d \quad j \in \{0, 1\} \quad (2-1-15)$$

$$P_{j,1,0}^d + r_4 \xrightleftharpoons[2k_{-r}]{k_r} P_{j,2,0}^d \quad j \in \{0, 1\} \quad (2-1-16)$$

$$P_{0,k,0}^d + a_2 \xrightleftharpoons[k_{-a}]{k_a} P_{1,k,0}^d \quad k \in \{0, 1, 2\} \quad (2-1-17)$$

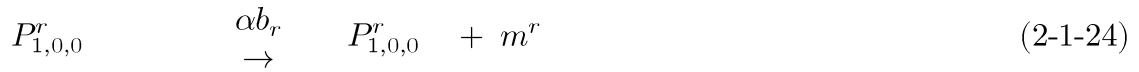
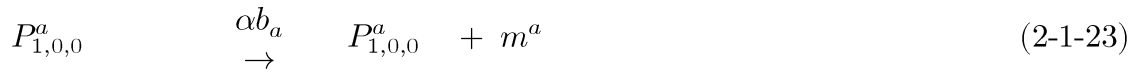
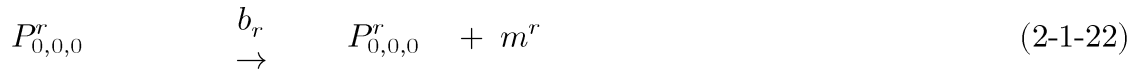
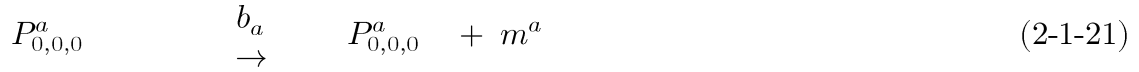
$$P_{j,1,0}^d \xrightleftharpoons[k_{-l}]{k_l} P_{j,1,L}^d \quad j \in \{0, 1\} \quad (2-1-18)$$

$$P_{0,k,L}^d + a_2 \xrightleftharpoons[k_{-a}]{k_a} P_{1,k,L}^d \quad k \in \{0, 1\} \quad (2-1-19)$$

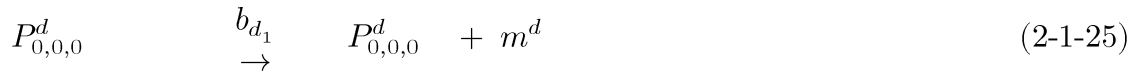
$$P_{j,0,L}^d \xrightarrow{k_{ul}} P_{j,0,0}^d \quad j \in \{0, 1\} \quad (2-1-20)$$

mRNA 転写の動態は以下の式により決定した。4つのモデルでは、mRNA の転

写の動態を(2-1-21) – (2-1-24)式で表した。このとき m^i はアクチベータ、リプレッサー、下流の mRNA の数を表し、 i はそれぞれアクチベータ(a : AraC)、リプレッサー(r : LacI)、下流タンパク質(d : GFP)を発現するプロモーターであることを表している。



加えて公表時 lac/ara-reporter circuit モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モデルでは以下の(2-1-25) – (2-1-26)式により mRNA の転写の動態を表した。



4つのモデルでは mRNA から多量体タンパク質の合成は以下の化学反応式 (2-1-27) – (2-1-33)により表した。このとき m^i はアクチベータ、リプレッサー、下流の mRNA の数を表し、 i はそれぞれアクチベータ (a : AraC)、リプレッサー (r : LacI)、下流タンパク質 (d : GFP) を発現するプロモーターを表している。 X_{uf} はアクチベータ、リプレッサー、下流のアンフォールドタンパク質の数を表し、 X はそれぞれアクチベータ (a_{uf} : AraC)、リプレッサー (r_{uf} : LacI)、下流タンパク質 (d_{uf} : GFP) のアンフォールドタンパク質を表している。 a 、 r 、 d はそれぞれフォールドされた一量体タンパク質を表している。 a_2 と r_2 はそれぞれフォールドされた二量体タンパク質を表している。 r_4 はフォールドされた四量体タンパク質を表している。





加えて公表時 lac/ara-reporter circuit モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モデルでは以下の化学反応式(2-1-34) – (2-1-35)によりタンパク質の合成を表した。



各分子の分解の動態は標的タンパク質となる AraC, LacI, GFP の総量により決定される。

このとき公表時 Smolen 振動子モデルと新規 Smolen 振動子モデルでは(2-1-36) – (2-1-38)の式を用いる。

$$f(X) = \frac{\gamma}{c_e + \omega_a X_a + \omega_r X_r} \quad (2-1-36)$$

$$X_a = a_{uf} + a + 2a_2 + 2\sum_{i=1}^2 \sum_{k=0}^2 \sum_{l=0}^1 P_{1,k,l}^i$$

$$i \in \{a, r\}, k \in \{0, 1, 2\}, l \in \{0, L\} \quad (2-1-37)$$

$$X_r = r_{uf} + r + 2r_2 + 4r_4 + 4\sum_{i=1}^2 \sum_{j=0}^1 \sum_{l=0}^1 P_{j,1,l}^i + 8\sum_{i=0}^2 \sum_{j=0}^1 P_{j,2,0}^i$$

$$i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\}, l \in \{0, L\} \quad (2-1-38)$$

となり、公表時 lac/ara-reporter circuit モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モデルでは以下の(2-1-39) – (2-1-42)を用いた。

$$f(X) = \frac{\gamma}{c_e + \omega_a X_a + \omega_r X_r + \omega_d X_d} \quad (2-1-39)$$

$$X_a = a_{uf} + a + 2a_2 + 2\sum_{i=1}^3 \sum_{k=0}^2 \sum_{l=0}^1 P_{1,k,l}^i$$

$$i \in \{a, r, d\}, k \in \{0, 1, 2\}, l \in \{0, L\} \quad (2-1-40)$$

$$X_r = r_{uf} + r + 2r_2 + 4r_4 + 4\sum_{i=1}^3 \sum_{j=0}^1 \sum_{l=0}^1 P_{j,1,l}^i + 8\sum_{i=0}^2 \sum_{j=0}^1 P_{j,2,0}^i$$

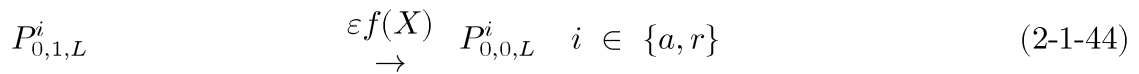
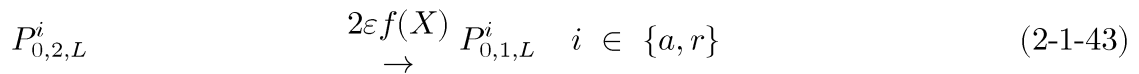
$$i \in \{a, r, d\}, j \in \{0, 1\}, l \in \{0, L\} \quad (2-1-41)$$

$$X_d = d_{uf} + d \quad (2-1-42)$$

とした。

公表時 Smolen 振動子モデルと公表時 lac/ara-reporter circuit モデルでは各分子の分解の動態は以下の化学反応式(2-1-43) – (2-1-56)により表した。

また新規 Smolen 振動子モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モデルでは各分子の分解の動態は以下の化学反応式(2-1-45) – (2-1-58)により表した。



$$m^a \quad \begin{array}{c} d_a \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-45)$$

$$m^r \quad \begin{array}{c} d_r \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-46)$$

$$a_{uf} \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-47)$$

$$r_{uf} \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-48)$$

$$a \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-49)$$

$$r \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-50)$$

$$a_2 \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-51)$$

$$r_2 \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-52)$$

$$r_4 \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (2-1-53)$$

$$P_{j,1,0}^i \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad P_{j,0,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (2-1-54)$$

$$P_{j,2,0}^i \quad \begin{array}{c} 2f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad P_{j,1,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (2-1-55)$$

$$P_{1,k,0}^i \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad P_{0,k,0}^i \quad i \in \{a, r\}, k \in \{0, 1, 2\} \quad (2-1-56)$$

$$P_{j,1,L}^i \quad \begin{array}{c} \varepsilon f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad P_{j,0,L}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (2-1-57)$$

$$P_{1,k,L}^i \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad P_{0,k,L}^i \quad i \in \{a, r\}, k \in \{0, 1\} \quad (2-1-58)$$

加えて、公表時 lac/ara-reporter circuit モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モ

デルではそれぞれ(2-1-59) - (2-1-66)式、(2-1-61) - (2-1-68)式を導入した。

$$P_{0,2,L}^d \xrightarrow{2\varepsilon f(X)} P_{0,1,L}^d \quad i \in \{a, r\} \quad (2-1-59)$$

$$P_{0,1,L}^d \xrightarrow{\varepsilon f(X)} P_{0,0,L}^d \quad i \in \{a, r\} \quad (2-1-60)$$

$$m^d \xrightarrow{d_d} \emptyset \quad (2-1-61)$$

$$d_{u,f} \xrightarrow{\lambda f(X)} \emptyset \quad (2-1-62)$$

$$d \xrightarrow{\lambda f(X)} \emptyset \quad (2-1-63)$$

$$P_{j,1,0}^d \xrightarrow{f(X)} P_{j,0,0}^d \quad j \in \{0, 1\} \quad (2-1-64)$$

$$P_{j,2,0}^d \xrightarrow{2f(X)} P_{j,1,0}^d \quad j \in \{0, 1\} \quad (2-1-65)$$

$$P_{1,k,0}^d \xrightarrow{\lambda f(X)} P_{0,k,0}^d \quad k \in \{0, 1, 2\} \quad (2-1-66)$$

$$P_{j,1,L}^d \xrightarrow{\varepsilon f(X)} P_{j,0,L}^d \quad j \in \{0, 1\} \quad (2-1-67)$$

$$P_{1,k,L}^d \xrightarrow{\lambda f(X)} P_{0,k,L}^d \quad k \in \{0, 1\} \quad (2-1-68)$$

とした。

導入した DNA のコピー数(N_i , $i = a, r, d$)は、以下の式により表した。

そのとき公表時 Smolen 振動子モデルでは以下の(2-1-69) – (2-1-70)式に従う。
公表時 lac/ara-reporter circuit モデルでは(2-1-69) – (2-1-71)式に従う。

$$P_{0,0,L}^a = N_a - (P_{0,0,0}^a + P_{0,1,0}^a + P_{0,2,0}^a + P_{1,0,0}^a + P_{1,1,0}^a + P_{1,2,0}^a + P_{0,1,L}^a) \quad (2-1-69)$$

$$P_{0,0,L}^r = N_r - (P_{0,0,0}^r + P_{0,1,0}^r + P_{0,2,0}^r + P_{1,0,0}^r + P_{1,1,0}^r + P_{1,2,0}^r + P_{0,1,L}^r) \quad (2-1-70)$$

$$P_{0,0,L}^d = N_d - (P_{0,0,0}^d + P_{0,1,0}^d + P_{0,2,0}^d + P_{1,0,0}^d + P_{1,1,0}^d + P_{1,2,0}^d + P_{0,1,L}^d) \quad (2-1-71)$$

また新規 Smolen 振動子モデルでは以下の(2-1-72) – (2-1-73)式に従う。新規

lac/ara circuit モデルでは(2-1-72) – (2-1-74)式に従う。

$$\begin{aligned}
P_{0,0,L}^a &= N_a - (P_{0,0,0}^a + P_{0,1,0}^a + P_{0,2,0}^a + P_{1,0,0}^a + P_{1,1,0}^a + P_{1,2,0}^a + P_{0,1,L}^a \\
&\quad + P_{1,0,L}^a + P_{1,1,L}^a)
\end{aligned} \tag{2-1-72}$$

$$\begin{aligned}
P_{0,0,L}^r &= N_r - (P_{0,0,0}^r + P_{0,1,0}^r + P_{0,2,0}^r + P_{1,0,0}^r + P_{1,1,0}^r + P_{1,2,0}^r + P_{0,1,L}^r \\
&\quad + P_{1,0,L}^r + P_{1,1,L}^r)
\end{aligned} \tag{2-1-73}$$

$$\begin{aligned}
P_{0,0,L}^d &= N_d - (P_{0,0,0}^d + P_{0,1,0}^d + P_{0,2,0}^d + P_{1,0,0}^d + P_{1,1,0}^d + P_{1,2,0}^d + P_{0,1,L}^d \\
&\quad + P_{1,0,L}^d + P_{1,1,L}^d)
\end{aligned} \tag{2-1-74}$$

微分方程式で公表時 Smolen 振動子モデルを表した場合、下記の(2-2-1) – (2-2-25)となる。

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,0,0}^a &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^a + k_{-a} P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a + k_{-r} P_{0,1,0}^a + k_{ul} P_{0,0,L}^a \\
&\quad + \lambda f(X) P_{1,0,0}^a + f(X) P_{0,1,0}^a
\end{aligned} \tag{2-2-1}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,0}^a &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a - k_{-r} P_{0,1,0}^a - k_a a_2 P_{0,1,0}^a + k_{-a} P_{1,1,0}^a - k_r r_4 P_{0,1,0}^a \\
&\quad + 2k_{-r} P_{0,2,0}^a + \lambda f(X) P_{1,1,0}^a - f(X) P_{0,1,0}^a + 2f(X) P_{0,2,0}^a
\end{aligned} \tag{2-2-2}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,2,0}^a &= k_r r_4 P_{0,1,0}^a - 2k_{-r} P_{0,2,0}^a - k_a a_2 P_{0,2,0}^a + k_{-a} P_{1,2,0}^a + \lambda f(X) P_{1,2,0}^a \\
&\quad - 2f(X) P_{0,2,0}^a - k_l P_{0,2,0}^a
\end{aligned} \tag{2-2-3}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,0,0}^r &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^r + k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r + k_{-r} P_{0,1,0}^r + k_{ul} P_{0,0,L}^r \\
&\quad + \lambda f(X) P_{1,0,0}^r + f(X) P_{0,1,0}^r
\end{aligned} \tag{2-2-4}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,0}^r &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r - k_{-r} P_{0,1,0}^r - k_a a_2 P_{0,1,0}^r + k_{-a} P_{1,1,0}^r - k_r r_4 P_{0,1,0}^r \\
&\quad + 2k_r P_{0,2,0}^r + \lambda f(X) P_{1,1,0}^r - f(X) P_{0,1,0}^r + 2f(X) P_{0,2,0}^r
\end{aligned} \tag{2-2-5}$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,2,0}^r &= k_r r_4 P_{0,1,0}^r - 2k_{-r} P_{0,2,0}^r - k_a a_2 P_{0,2,0}^r + k_{-a} P_{1,2,0}^r + \lambda f(X) P_{1,2,0}^r \\ &\quad - 2f(X) P_{0,2,0}^r - k_{l2} P_{0,2,0}^r \end{aligned} \quad (2-2-6)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,0}^a &= k_a a_2 P_{0,0,0}^a - k_a P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a + k_{-r} P_{1,1,0}^a - \lambda f(X) P_{1,0,0}^a \\ &\quad + f(X) P_{1,1,0}^a + k_{ul} P_{1,0,L}^a \end{aligned} \quad (2-2-7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,0}^a &= k_a a_2 P_{0,1,0}^a - k_{-a} P_{1,1,0}^a + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a - k_{-r} P_{1,1,0}^a - k_r r_4 P_{1,1,0}^a \\ &\quad + 2k_{-r} P_{1,2,0}^a - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^a + 2f(X) P_{1,2,0}^a \end{aligned} \quad (2-2-8)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,2,0}^a &= k_a a_2 P_{0,2,0}^a - k_{-a} P_{1,2,0}^a + k_r r_4 P_{1,1,0}^a - 2k_r P_{1,2,0}^a - 2k_l P_{1,2,0}^a \\ &\quad - (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^a \end{aligned} \quad (2-2-9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,0}^r &= k_a a_2 P_{0,0,0}^r - k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r + k_{-r} P_{1,1,0}^r - \lambda f(X) P_{1,0,0}^r \\ &\quad + f(X) P_{1,1,0}^r + k_{ul} P_{1,0,L}^r \end{aligned} \quad (2-2-10)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,0}^r &= k_a a_2 P_{0,1,0}^r - k_{-a} P_{1,1,0}^r + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r - k_{-r} P_{1,1,0}^r - k_r r_4 P_{1,1,0}^r \\ &\quad + 2k_{-r} P_{1,2,0}^r - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^r + 2f(X) P_{1,2,0}^r \end{aligned} \quad (2-2-11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,2,0}^r &= k_a a_2 P_{0,2,0}^r - k_a P_{1,2,0}^r + k_r r_4 P_{1,1,0}^r - 2k_r P_{1,2,0}^r - 2k_l P_{1,2,0}^r \\ &\quad - (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^r \end{aligned} \quad (2-2-12)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,L}^a &= 2\varepsilon f(X) P_{0,2,L}^a - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^a \end{aligned} \quad (2-2-13)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^r = 2\varepsilon f(X) P_{0,1,L}^r - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^r \quad (2-2-14)$$

$$\frac{d}{dx} m^a = b_a P_{0,0,0}^a + \alpha b_a P_{1,0,0}^a - d_a m^a \quad (2-2-15)$$

$$\frac{d}{dx} m^r = b_r P_{0,0,0}^r + \alpha b_r P_{1,0,0}^r - d_r m^r \quad (2-2-16)$$

$$\frac{d}{dx} a_{uf} = t_a m^a - k_{fa} a_{uf} - \lambda f(X) a_{uf} \quad (2-2-17)$$

$$\frac{d}{dx} r_{uf} = t_r m^r - k_{fr} r_{uf} - f(X) r_{uf} \quad (2-2-18)$$

$$\frac{d}{dx} a = k_{fa} a_{uf} - 2k_{da} a^2 + 2k_{-da} a_2 - \lambda f(X) a \quad (2-2-19)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} a_2 = & -k_a a_2 (P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r) + k_{-a} (P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r) + k_{-a} (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r) + k_{-a} (P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r) \\ & + k_l (P_{1,2,L}^a + P_{1,2,L}^r) + k_{da} a^2 - k_{da} a_2 - \lambda f(X) a_2 \end{aligned} \quad (2-2-20)$$

$$\frac{d}{dx} r = k_{fr} r_{uf} - 2k_{dr} r^2 + 2k_{-dr} r_2 - f(X) r \quad (2-2-21)$$

$$\frac{d}{dx}r_2 = k_{dr}r^2 - k_{-dr}r_2 - 2k_t r_2^2 + 2k_{-t}r_4 - f(X)r_2 \quad (2-2-22)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}r_4 = & -2k_r r_4(P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r) + k_{-r}(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r) \\ & - k_r r_4(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r) + 2k_{-r}(P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r) \\ & - 2k_r r_4(P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r) + k_{-r}(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) \\ & - k_r r_4(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) + 2k_{-r}(P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r) \\ & + k_t r_2^2 - k_{-t}r_4 - f(X)r_4 \end{aligned} \quad (2-2-23)$$

$$\frac{d}{dx}P_{0,2,L}^a = k_l P_{1,2,0}^a + k_l P_{0,2,0}^a - 2\varepsilon f(X)P_{0,2,L}^a \quad (2-2-24)$$

$$\frac{d}{dx}P_{0,2,L}^r = k_l P_{1,2,0}^r + k_l P_{0,2,0}^r - 2\varepsilon f(X)P_{0,2,L}^r \quad (2-2-25)$$

微分方程式で公表時 lac/ara-reporter circuit モデルを表した場合、下記の(2-3-1) - (2-3-36)となる。

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{0,0,0}^a = & -k_a a_2 P_{0,0,0}^a + k_{-a} P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a + k_{-r} P_{0,1,0}^a + k_{ul} P_{0,0,L}^a \\ & + \lambda f(X)P_{1,0,0}^a + f(X)P_{0,1,0}^a \end{aligned} \quad (2-3-1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{0,1,0}^a = & 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a - k_{-r} P_{0,1,0}^a - k_a a_2 P_{0,1,0}^a + k_{-a} P_{1,1,0}^a - k_r r_4 P_{0,1,0}^a \\ & + 2k_{-r} P_{0,2,0}^a + \lambda f(X)P_{1,1,0}^a - f(X)P_{0,1,0}^a + 2f(X)P_{0,2,0}^a \end{aligned} \quad (2-3-2)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{0,2,0}^a = & k_r r_4 P_{0,1,0}^a - 2k_{-r} P_{0,2,0}^a - k_a a_2 P_{0,2,0}^a + k_{-a} P_{1,2,0}^a + \lambda f(X)P_{1,2,0}^a \\ & - 2f(X)P_{0,2,0}^a - k_l P_{0,2,0}^a \end{aligned} \quad (2-3-3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,0,0}^r &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^r + k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r + k_{-r} P_{0,1,0}^r + k_{ul} P_{0,0,L}^r \\ &+ \lambda f(X) P_{1,0,0}^r + f(X) P_{0,1,0}^r \end{aligned} \quad (2-3-4)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,0}^r &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r - k_{-r} P_{0,1,0}^r - k_a a_2 P_{0,1,0}^r + k_{-a} P_{1,1,0}^r - k_r r_4 P_{0,1,0}^r \\ &+ 2k_r P_{0,2,0}^r + \lambda f(X) P_{1,1,0}^r - f(X) P_{0,1,0}^r + 2f(X) P_{0,2,0}^r \end{aligned} \quad (2-3-5)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,2,0}^r &= k_r r_4 P_{0,1,0}^r - 2k_{-r} P_{0,2,0}^r - k_a a_2 P_{0,2,0}^r + k_{-a} P_{1,2,0}^r + \lambda f(X) P_{1,2,0}^r \\ &- 2f(X) P_{0,2,0}^r - k_{l2} P_{0,2,0}^r \end{aligned} \quad (2-3-6)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,0,0}^d &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^d + k_{-a} P_{1,0,0}^d - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^d + k_{-r} P_{0,1,0}^d + k_{ul} P_{0,0,L}^d \\ &+ \lambda f(X) P_{1,0,0}^d + f(X) P_{0,1,0}^d \end{aligned} \quad (2-3-7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,0}^d &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^d - k_{-r} P_{0,1,0}^d - k_a a_2 P_{0,1,0}^d + k_{-a} P_{1,1,0}^d - k_r r_4 P_{0,1,0}^d \\ &+ 2k_r P_{0,2,0}^d + \lambda f(X) P_{1,1,0}^d - f(X) P_{0,1,0}^d + 2f(X) P_{0,2,0}^d \end{aligned} \quad (2-3-8)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,2,0}^d &= k_r r_4 P_{0,1,0}^d - 2k_{-r} P_{0,2,0}^d - k_a a_2 P_{0,2,0}^d + k_{-a} P_{1,2,0}^d + \lambda f(X) P_{1,2,0}^d \\ &- 2f(X) P_{0,2,0}^d - k_{l2} P_{0,2,0}^d \end{aligned} \quad (2-3-9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,0}^a &= k_a a_2 P_{0,0,0}^a - k_a P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a + k_{-r} P_{1,1,0}^a - \lambda f(X) P_{1,0,0}^a \\ &+ f(X) P_{1,1,0}^a + k_{ul} P_{1,0,L}^a \end{aligned} \quad (2-3-10)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,0}^a &= k_a a_2 P_{0,1,0}^a - k_{-a} P_{1,1,0}^a + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a - k_{-r} P_{1,1,0}^a - k_r r_4 P_{1,1,0}^a \\ &+ 2k_{-r} P_{1,2,0}^a - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^a + 2f(X) P_{1,2,0}^a \end{aligned} \quad (2-3-11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,2,0}^a &= k_a a_2 P_{0,2,0}^a - k_{-a} P_{1,2,0}^a + k_r r_4 P_{1,1,0}^a - 2k_r P_{1,2,0}^a - 2k_l P_{1,2,0}^a \\ &- (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^a \end{aligned} \quad (2-3-12)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,0}^r &= k_a a_2 P_{0,0,0}^r - k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r + k_{-r} P_{1,1,0}^r - \lambda f(X) P_{1,0,0}^r \\ &+ f(X) P_{1,1,0}^r + k_{ul} P_{1,0,L}^r \end{aligned} \quad (2-3-13)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,0}^r &= k_a a_2 P_{0,1,0}^r - k_{-a} P_{1,1,0}^r + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r - k_{-r} P_{1,1,0}^r - k_r r_4 P_{1,1,0}^r \\ &+ 2k_{-r} P_{1,2,0}^r - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^r + 2f(X) P_{1,2,0}^r \end{aligned} \quad (2-3-14)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,2,0}^r &= k_a a_2 P_{0,2,0}^r - k_a P_{1,2,0}^r + k_r r_4 P_{1,1,0}^r - 2k_r P_{1,2,0}^r - 2k_l P_{1,2,0}^r \\ &- (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^r \end{aligned} \quad (2-3-15)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,0}^d &= k_a a_2 P_{0,0,0}^d - k_{-a} P_{1,0,0}^d - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^d + k_{-r} P_{1,1,0}^d - \lambda f(X) P_{1,0,0}^d \\ &+ f(X) P_{1,1,0}^d + k_{ul} P_{1,0,L}^d \end{aligned} \quad (2-3-16)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,0}^d &= k_a a_2 P_{0,1,0}^d - k_{-a} P_{1,1,0}^d + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^d - k_{-r} P_{1,1,0}^d - k_r r_4 P_{1,1,0}^d \\ &+ 2k_{-r} P_{1,2,0}^d - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^d + 2f(X) P_{1,2,0}^d \end{aligned} \quad (2-3-17)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,2,0}^d &= k_a a_2 P_{0,2,0}^d - k_a P_{1,2,0}^d + k_r r_4 P_{1,1,0}^d - 2k_r P_{1,2,0}^d - 2k_l P_{1,2,0}^d \\ &- (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^d \end{aligned} \quad (2-3-18)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^a = 2\varepsilon f(X) P_{0,2,L}^a - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^a \quad (2-3-19)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^r = 2\varepsilon f(X) P_{0,1,L}^r - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^r \quad (2-3-20)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^d = 2\varepsilon f(X) P_{0,1,L}^d - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^d \quad (2-3-21)$$

$$\frac{d}{dx}m^a = b_a P_{0,0,0}^a + \alpha b_a P_{1,0,0}^a - d_a m^a \quad (2-3-22)$$

$$\frac{d}{dx}m^r = b_r P_{0,0,0}^r + \alpha b_r P_{1,0,0}^r - d_r m^r \quad (2-3-23)$$

$$\frac{d}{dx}m^d = b_d P_{0,0,0}^d + \alpha b_d P_{1,0,0}^d - d_d m^d \quad (2-3-24)$$

$$\frac{d}{dx}a_{uf} = t_a m^a - k_{fa} a_{uf} - \lambda f(X) a_{uf} \quad (2-3-25)$$

$$\frac{d}{dx}r_{uf} = t_r m^r - k_{fr} r_{uf} - f(X) r_{uf} \quad (2-3-26)$$

$$\frac{d}{dx}d_{uf} = t_d m^d - k_{fd} d_{uf} - \lambda f(X) d_{uf} \quad (2-3-27)$$

$$\frac{d}{dx}a = k_{fa} a_{uf} - 2k_{da} a^2 + 2k_{-da} a_2 - \lambda f(X) a \quad (2-3-28)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}a_2 = & -k_a a_2 (P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r + P_{0,0,0}^d) + k_{-a} (P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r + P_{1,0,0}^d) \\ & - k_a a_2 (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) + k_{-a} (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r + P_{1,1,0}^d) \\ & - k_a a_2 (P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r + P_{0,2,0}^d) + k_{-a} (P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r + P_{1,2,0}^d) \\ & + k_l (P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r + P_{1,2,0}^d) + k_{da} a^2 - k_{da} a_2 - \lambda f(X) a_2 \end{aligned} \quad (2-3-29)$$

$$\frac{d}{dx}r = k_{fr}r_{uf} - 2k_{dr}r^2 + 2k_{-dr}r_2 - f(X)r \quad (2-3-30)$$

$$\frac{d}{dx}r_2 = k_{dr}r^2 - k_{-dr}r_2 - 2k_t r_2^2 + 2k_{-t}r_4 - f(X)r_2 \quad (2-3-31)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}r_4 = & -2k_r r_4(P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r + P_{0,0,0}^d) + k_{-r}(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) \\ & - k_r r_4(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) + 2k_{-r}(P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r + P_{0,2,0}^d) \\ & - 2k_r r_4(P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r + P_{1,0,0}^d) + k_{-r}(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r + P_{1,1,0}^d) \\ & - k_r r_4(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r + P_{1,1,0}^d) + 2k_{-r}(P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r + P_{1,2,0}^d) \\ & + k_t r_2^2 - k_{-t}r_4 - f(X)r_4 \end{aligned} \quad (2-3-32)$$

$$\frac{d}{dx}d = k_{fd}d_{uf} - \lambda f(X)d \quad (2-3-33)$$

$$\frac{d}{dx}P_{0,2,L}^a = k_l P_{1,2,0}^a + k_l P_{0,2,0}^a - 2\varepsilon f(X)P_{0,2,L}^a \quad (2-3-34)$$

$$\frac{d}{dx}P_{0,2,L}^r = k_l P_{1,2,0}^r + k_l P_{0,2,0}^r - 2\varepsilon f(X)P_{0,2,L}^r \quad (2-3-35)$$

$$\frac{d}{dx}P_{0,2,L}^d = k_l P_{1,2,0}^d + k_l P_{0,2,0}^d - 2\varepsilon f(X)P_{0,2,L}^d \quad (2-3-36)$$

微分方程式で新規 Smolen 振動子モデルを表した場合、下記の(2-4-1) – (2-4-27)となる。

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,0,0}^a &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^a + k_{-a} P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a + k_{-r} P_{0,1,0}^a + k_{ul} P_{0,0,L}^a \\
&+ \lambda f(X) P_{1,0,0}^a + f(X) P_{0,1,0}^a
\end{aligned} \tag{2-4-1}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,0}^a &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a - k_{-r} P_{0,1,0}^a - k_a a_2 P_{0,1,0}^a + k_{-a} P_{1,1,0}^a - k_l P_{0,1,0}^a \\
&+ k_{-l} P_{0,1,L}^a - k_r r_4 P_{0,1,0}^a + 2k_{-r} P_{0,2,0}^a + \lambda f(X) P_{1,1,0}^a - f(X) P_{0,1,0}^a \\
&+ 2f(X) P_{0,2,0}^a
\end{aligned} \tag{2-4-2}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,2,0}^a &= k_r r_4 P_{0,1,0}^a - 2k_{-r} P_{0,2,0}^a - k_a a_2 P_{0,2,0}^a + k_{-a} P_{1,2,0}^a + \lambda f(X) P_{1,2,0}^a \\
&- 2f(X) P_{0,2,0}^a
\end{aligned} \tag{2-4-3}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,0,0}^r &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^r + k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r + k_{-r} P_{0,1,0}^r + k_{ul} P_{0,0,L}^r \\
&+ \lambda f(X) P_{1,0,0}^r + f(X) P_{0,1,0}^r
\end{aligned} \tag{2-4-4}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,0}^r &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r - k_{-r} P_{0,1,0}^r - k_a a_2 P_{0,1,0}^r + k_{-a} P_{1,1,0}^r - k_l P_{0,1,0}^r \\
&+ k_{-l} P_{0,1,L}^r - k_r r_4 P_{0,1,0}^r + 2k_{-r} P_{0,2,0}^r + \lambda f(X) P_{1,1,0}^r - f(X) P_{0,1,0}^r \\
&+ 2f(X) P_{0,2,0}^r
\end{aligned} \tag{2-4-5}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,2,0}^r &= k_r r_4 P_{0,1,0}^r - 2k_{-r} P_{0,2,0}^r - k_a a_2 P_{0,2,0}^r + k_{-a} P_{1,2,0}^r + \lambda f(X) P_{1,2,0}^r \\
&- 2f(X) P_{0,2,0}^r
\end{aligned} \tag{2-4-6}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,0,0}^a &= k_a a_2 P_{0,0,0}^a - k_{-a} P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a + k_{-r} P_{1,1,0}^a - \lambda f(X) P_{1,0,0}^a \\
&+ f(X) P_{1,1,0}^a + k_{ul} P_{1,0,L}^a
\end{aligned} \tag{2-4-7}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,1,0}^a &= k_a a_2 P_{0,1,0}^a - k_{-a} P_{1,1,0}^a + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a - k_{-r} P_{1,1,0}^a - k_l P_{1,1,0}^a \\
&- k_r r_4 P_{1,1,0}^a + 2k_r P_{1,2,0}^a - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^a + 2f(X) P_{1,2,0}^a
\end{aligned}$$

$$+ k_{-l}P_{1,1,L}^a \quad (2-4-8)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,2,0}^a &= k_a a_2 P_{0,2,0}^a - k_a P_{1,2,0}^a + k_r r_4 P_{1,1,0}^a - 2k_r P_{1,2,0}^a \\ &- (\lambda + 2)f(X)P_{1,2,0}^a \end{aligned} \quad (2-4-9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,0,0}^r &= k_a a_2 P_{0,0,0}^r - k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r + k_{-r} P_{1,1,0}^r - \lambda f(X)P_{1,0,0}^r \\ &+ f(X)P_{1,1,0}^r + k_{ul} P_{1,0,L}^r \end{aligned} \quad (2-4-10)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,1,0}^r &= k_a a_2 P_{0,1,0}^r - k_{-a} P_{1,1,0}^r + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r - k_{-r} P_{1,1,0}^r - k_l P_{1,1,0}^r \\ &- k_r r_4 P_{1,1,0}^r + 2k_{-r} P_{1,2,0}^r - (\lambda + 1)f(X)P_{1,1,0}^r + 2f(X)P_{1,2,0}^r \\ &+ k_{-l} P_{1,1,L}^r \end{aligned} \quad (2-4-11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,2,0}^r &= k_a a_2 P_{0,2,0}^r - k_a P_{1,2,0}^r + k_r r_4 P_{1,1,0}^r - 2k_r P_{1,2,0}^r \\ &- (\lambda + 2)f(X)P_{1,2,0}^r \end{aligned} \quad (2-4-12)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{0,1,L}^a &= k_l P_{0,1,0}^a - k_{-l} P_{0,1,L}^a + \lambda f(X)P_{1,1,L}^a - \varepsilon f(X)P_{0,1,L}^a - k_a a_2 P_{0,1,L}^a \\ &+ k_a P_{1,1,L}^a \end{aligned} \quad (2-4-13)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{0,1,L}^r &= k_l P_{0,1,0}^r - k_{-l} P_{0,1,L}^r + \lambda f(X)P_{1,1,L}^r - \varepsilon f(X)P_{0,1,L}^r - k_a a_2 P_{0,1,L}^r \\ &+ k_a P_{1,1,L}^r \end{aligned} \quad (2-4-14)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}m^a &= b_a P_{0,0,0}^a + \alpha b_a P_{1,0,0}^a - d_a m^a \end{aligned} \quad (2-4-15)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}m^r &= b_r P_{0,0,0}^r + \alpha b_r P_{1,0,0}^r - d_r m^r \end{aligned} \quad (2-4-16)$$

$$\frac{d}{dx}a_{uf} = t_a m^a - k_{fa} a_{uf} - \lambda f(X) a_{uf} \quad (2-4-17)$$

$$\frac{d}{dx}r_{uf} = t_r m^r - k_{fr} r_{uf} - f(X) r_{uf} \quad (2-4-18)$$

$$\frac{d}{dx}a = k_{fa} a_{uf} - 2k_{da} a^2 + 2k_{-da} a_2 - \lambda f(X) a \quad (2-4-19)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}a_2 = & -k_a a_2 (P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r) + k_{-a} (P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r) + k_{-a} (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r) + k_{-a} (P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,0,L}^a + P_{0,0,L}^r) + k_{-a} (P_{1,0,L}^a + P_{1,0,L}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,1,L}^a + P_{0,1,L}^r) + k_{-a} (P_{1,1,L}^a + P_{1,1,L}^r) \\ & + k_{da} a^2 - k_{da} a_2 - \lambda f(X) a_2 \end{aligned} \quad (2-4-20)$$

$$\frac{d}{dx}r = k_{fr} r_{uf} - 2k_{dr} r^2 + 2k_{-dr} r_2 - f(X) r \quad (2-4-21)$$

$$\frac{d}{dx}r_2 = k_{dr} r^2 - k_{-dr} r_2 - 2k_t r_2^2 + 2k_{-t} r_4 - f(X) r_2 \quad (2-4-22)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}r_4 = & -2k_r r_4 (P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r) + k_{-r} (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r) \\ & - k_r r_4 (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r) + 2k_{-r} (P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& - 2k_r r_4 (P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r) + k_{-r} (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) \\
& - k_r r_4 (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) + 2k_{-r} (P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r) \\
& + k_t r_2^2 - k_{-t} r_4 - f(X) r_4
\end{aligned} \tag{2-4-23}$$

$$\frac{d}{dx} P_{1,0,L}^a = \varepsilon f(X) P_{1,1,L}^a - \lambda f(X) P_{1,0,L}^a - k_{ul} P_{1,0,L}^a + k_a a_2 P_{0,0,L}^a - k_{-a} P_{1,0,L}^a \tag{2-4-24}$$

$$\frac{d}{dx} P_{1,0,L}^r = \varepsilon f(X) P_{1,1,L}^r - \lambda f(X) P_{1,0,L}^r - k_{ul} P_{1,0,L}^r + k_a a_2 P_{0,0,L}^r - k_{-a} P_{1,0,L}^r \tag{2-4-25}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,1,L}^a &= k_l P_{1,1,0}^a - \varepsilon f(X) P_{1,1,L}^a - \lambda f(X) P_{1,1,L}^a - k_{-l} P_{1,1,L}^a - k_{-a} P_{1,1,L}^a \\
&+ k_a a_2 P_{0,1,L}^a
\end{aligned} \tag{2-4-26}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,1,L}^r &= k_l P_{1,1,0}^r - \varepsilon f(X) P_{1,1,L}^r - \lambda f(X) P_{1,1,L}^r - k_{-l} P_{1,1,L}^r - k_{-a} P_{1,1,L}^r \\
&+ k_a a_2 P_{0,1,L}^r
\end{aligned} \tag{2-4-27}$$

微分方程式で新規 lac/ara-reporter circuit モデルを表した場合、下記の(2-5-1) – (2-5-39)となる。

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,0,0}^a &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^a + k_{-a} P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a + k_{-r} P_{0,1,0}^a + k_{ul} P_{0,0,0}^a \\
&+ \lambda f(X) P_{1,0,0}^a + f(X) P_{0,1,0}^a
\end{aligned} \tag{2-5-1}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,0}^a &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a - k_{-r} P_{0,1,0}^a - k_a a_2 P_{0,1,0}^a + k_{-a} P_{1,1,0}^a - k_l P_{0,1,0}^a \\
&+ k_{-l} P_{0,1,L}^a - k_r r_4 P_{0,1,0}^a + 2k_{-r} P_{0,2,0}^a + \lambda f(X) P_{1,1,0}^a - f(X) P_{0,1,0}^a \\
&+ 2f(X) P_{0,2,0}^a
\end{aligned} \tag{2-5-2}$$

$$\begin{aligned}\frac{d}{dx}P_{0,2,0}^a &= k_r r_4 P_{0,1,0}^a - 2k_{-r}P_{0,2,0}^a - k_a a_2 P_{0,2,0}^a + k_{-a}P_{1,2,0}^a + \lambda f(X)P_{1,2,0}^a \\ &\quad - 2f(X)P_{0,2,0}^a\end{aligned}\quad (2-5-3)$$

$$\begin{aligned}\frac{d}{dx}P_{0,0,0}^r &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^r + k_{-a}P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r + k_{-r}P_{0,1,0}^r + k_{ul}P_{0,0,L}^r \\ &\quad + \lambda f(X)P_{1,0,0}^r + f(X)P_{0,1,0}^r\end{aligned}\quad (2-5-4)$$

$$\begin{aligned}\frac{d}{dx}P_{0,1,0}^r &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r - k_{-r}P_{0,1,0}^r - k_a a_2 P_{0,1,0}^r + k_{-a}P_{1,1,0}^r - k_l P_{0,1,0}^r \\ &\quad + k_{-l}P_{0,1,L}^r - k_r r_4 P_{0,1,0}^r + 2k_{-r}P_{0,2,0}^r + \lambda f(X)P_{1,1,0}^r - f(X)P_{0,1,0}^r \\ &\quad + 2f(X)P_{0,2,0}^r\end{aligned}\quad (2-5-5)$$

$$\begin{aligned}\frac{d}{dx}P_{0,2,0}^r &= k_r r_4 P_{0,1,0}^r - 2k_{-r}P_{0,2,0}^r - k_a a_2 P_{0,2,0}^r + k_{-a}P_{1,2,0}^r + \lambda f(X)P_{1,2,0}^r \\ &\quad - 2f(X)P_{0,2,0}^r\end{aligned}\quad (2-5-6)$$

$$\begin{aligned}\frac{d}{dx}P_{1,0,0}^a &= k_a a_2 P_{0,0,0}^a - k_{-a}P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a + k_{-r}P_{1,1,0}^a - \lambda f(X)P_{1,0,0}^a \\ &\quad + f(X)P_{1,1,0}^a + k_{ul}P_{1,0,L}^a\end{aligned}\quad (2-5-7)$$

$$\begin{aligned}\frac{d}{dx}P_{1,1,0}^a &= k_a a_2 P_{0,1,0}^a - k_{-a}P_{1,1,0}^a + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a - k_{-r}P_{1,1,0}^a - k_l P_{1,1,0}^a \\ &\quad - k_r r_4 P_{1,1,0}^a + 2k_{-r}P_{1,2,0}^a - (\lambda + 1)f(X)P_{1,1,0}^a + 2f(X)P_{1,2,0}^a \\ &\quad + k_{-l}P_{1,1,L}^a\end{aligned}\quad (2-5-8)$$

$$\begin{aligned}\frac{d}{dx}P_{1,2,0}^a &= k_a a_2 P_{0,2,0}^a - k_{-a}P_{1,2,0}^a + k_r r_4 P_{1,1,0}^a - 2k_{-r}P_{1,2,0}^a \\ &\quad - (\lambda + 2)f(X)P_{1,2,0}^a\end{aligned}\quad (2-5-9)$$

$$\begin{aligned}\frac{d}{dx}P_{1,0,0}^r &= k_a a_2 P_{0,0,0}^r - k_{-a}P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r + k_{-r}P_{1,1,0}^r - \lambda f(X)P_{1,0,0}^r \\ &\quad + f(X)P_{1,1,0}^r + k_{ul}P_{1,0,L}^r\end{aligned}\quad (2-5-10)$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,1,0}^r &= k_a a_2 P_{0,1,0}^r - k_{-a} P_{1,1,0}^r + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r - k_{-r} P_{1,1,0}^r - k_l P_{1,1,0}^r \\
&\quad - k_r r_4 P_{1,1,0}^r + 2k_{-r} P_{1,2,0}^r - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^r + 2f(X) P_{1,2,0}^r \\
&\quad + k_{-l} P_{1,1,L}^r
\end{aligned} \tag{2-5-11}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,2,0}^r &= k_a a_2 P_{0,2,0}^r - k_{-a} P_{1,2,0}^r + k_r r_4 P_{1,1,0}^r - 2k_{-r} P_{1,2,0}^r \\
&\quad - (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^r
\end{aligned} \tag{2-5-12}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^a &= k_l P_{0,1,0}^a - k_{-l} P_{0,1,L}^a + \lambda f(X) P_{1,1,L}^a - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^a - k_a a_2 P_{0,1,L}^a \\
&\quad + k_a P_{1,1,L}^a
\end{aligned} \tag{2-5-13}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^r &= k_l P_{0,1,0}^r - k_{-l} P_{0,1,L}^r + \lambda f(X) P_{1,1,L}^r - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^r - k_a a_2 P_{0,1,L}^r \\
&\quad + k_a P_{1,1,L}^r
\end{aligned} \tag{2-5-14}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} m^a &= b_a P_{0,0,0}^a + \alpha b_a P_{1,0,0}^a - d_a m^a
\end{aligned} \tag{2-5-15}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} m^r &= b_r P_{0,0,0}^r + \alpha b_r P_{1,0,0}^r - d_r m^r
\end{aligned} \tag{2-5-16}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} a_{uf} &= t_a m^a - k_{fa} a_{uf} - \lambda f(X) a_{uf}
\end{aligned} \tag{2-5-17}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} a_{uf} &= t_r m^r - k_{fr} r_{uf} - f(X) r_{uf}
\end{aligned} \tag{2-5-18}$$

$$\frac{d}{dx} a = k_{fa} a_{uf} - 2a^2 + 2k_{-da} a_2 - \lambda f(X) a$$

(2-5-19)

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}a_2 = & -k_a a_2(P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r + P_{0,0,0}^d) + k_{-a}(P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r + P_{1,0,0}^d) \\
& -k_a a_2(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) + k_{-a}(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r + P_{1,1,0}^d) \\
& -k_a a_2(P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r + P_{0,2,0}^d) + k_{-a}(P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r + P_{1,2,0}^d) \\
& -k_a a_2(P_{0,0,L}^a + P_{0,0,L}^r + P_{0,0,L}^d) + k_{-a}(P_{1,0,L}^a + P_{1,0,L}^r + P_{1,0,L}^d) \\
& -k_a a_2(P_{0,1,L}^a + P_{0,1,L}^r + P_{0,1,L}^d) + k_{-a}(P_{1,1,L}^a + P_{1,1,L}^r + P_{1,1,L}^d) \\
& + k_{da}a^2 - k_{da}a_2 - \lambda f(X)a_2
\end{aligned} \tag{2-5-20}$$

$$\frac{d}{dx}r = k_{fr}r_{uf} - 2k_{dr}r^2 + 2k_{-dr}r_2 - f(X)r \tag{2-5-21}$$

$$\frac{d}{dx}r_2 = k_{dr}r^2 - k_{-dr}r_2 - 2k_t r_2^2 + 2k_{-t}r_4 - f(X)r_2 \tag{2-5-22}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}r_4 = & -2k_r r_4(P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r + P_{0,0,0}^d) + k_{-r}(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) \\
& -k_r r_4(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) + 2k_{-r}(P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r + P_{0,2,0}^d) \\
& -2k_r r_4(P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r + P_{1,0,0}^d) + k_{-r}(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r + P_{1,1,0}^d) \\
& -k_r r_4(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r + P_{1,1,0}^d) + 2k_{-r}(P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r + P_{1,2,0}^d) \\
& + k_t r_2^2 - k_{-t}r_4 - f(X)r_4
\end{aligned} \tag{2-5-23}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}P_{0,0,0}^d = & -k_a a_2 P_{0,0,0}^d + k_{-a} P_{1,0,0}^d - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^d + k_{-r} P_{0,1,0}^d + k_{ul} P_{0,0,L}^d \\
& + \lambda f(X)P_{1,0,0}^d + f(X)P_{0,1,0}^d
\end{aligned} \tag{2-5-24}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,0}^d &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^d - k_{-r} P_{0,1,0}^d - k_a a_2 P_{0,1,0}^d + k_{-a} P_{1,1,0}^d - k_l P_{0,1,0}^d \\
&+ k_{-l} P_{0,1,L}^d - k_r r_4 P_{0,1,0}^d + 2k_{-r} P_{0,2,0}^d + \lambda f(X) P_{1,1,0}^d - f(X) P_{0,1,0}^d \\
&+ 2f(X) P_{0,2,0}^d
\end{aligned} \tag{2-5-25}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,2,0}^d &= k_r r_4 P_{0,1,0}^d - 2k_{-r} P_{0,2,0}^d - k_a a_2 P_{0,2,0}^d + k_{-a} P_{1,2,0}^d + \lambda f(X) P_{1,2,0}^d \\
&- 2f(X) P_{0,2,0}^d
\end{aligned} \tag{2-5-26}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,0,0}^d &= k_a a_2 P_{0,0,0}^d - k_{-a} P_{1,0,0}^d - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^d + k_{-r} P_{1,1,0}^d - \lambda f(X) P_{1,0,0}^d \\
&+ f(X) P_{1,1,0}^d + k_{ul} P_{1,0,L}^d
\end{aligned} \tag{2-5-27}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,1,0}^d &= k_a a_2 P_{0,1,0}^d - k_{-a} P_{1,1,0}^d + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^d - k_{-r} P_{1,1,0}^d - k_l P_{1,1,0}^d \\
&- k_r r_4 P_{1,1,0}^d + 2k_r P_{1,2,0}^d - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^d + 2f(X) P_{1,2,0}^d \\
&+ k_{-l} P_{1,1,L}^d
\end{aligned} \tag{2-5-28}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{1,2,0}^d &= k_a a_2 P_{0,2,0}^d - k_{-a} P_{1,2,0}^d + k_r r_4 P_{1,1,0}^d - 2k_{-r} P_{1,2,0}^d \\
&- (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^d
\end{aligned} \tag{2-5-29}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^d &= k_l P_{0,1,0}^d - k_{-l} P_{0,1,L}^d + \lambda f(X) P_{1,1,L}^d - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^d - k_a a_2 P_{0,1,L}^d \\
&+ k_{-a} P_{1,1,L}^d
\end{aligned} \tag{2-5-30}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} m^d &= b_d P_{0,0,0}^d + \alpha b_d P_{1,0,0}^d - d_d m^d
\end{aligned} \tag{2-5-31}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx} d_{uf} &= t_d m^d - k_{fg} d_{uf} - \beta f(X) d_{uf}
\end{aligned} \tag{2-5-32}$$

$$\frac{d}{dx}d = k_{fg}d_{uf} - \beta f(X)d \quad (2-5-33)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,0,L}^a &= \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^a - \lambda f(X)P_{1,0,L}^a - k_{ul}P_{1,0,L}^a + k_a a_2 P_{0,0,L}^a \\ &\quad - k_{-a}P_{1,0,L}^a \end{aligned} \quad (2-5-34)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,0,L}^r &= \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^r - \lambda f(X)P_{1,0,L}^r - k_{ul}P_{1,0,L}^r + k_a a_2 P_{0,0,L}^r \\ &\quad - k_{-a}P_{1,0,L}^r \end{aligned} \quad (2-5-35)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,0,L}^d &= \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^d - \lambda f(X)P_{1,0,L}^d - k_{ul}P_{1,0,L}^d + k_a a_2 P_{0,0,L}^d \\ &\quad - k_{-a}P_{1,0,L}^d \end{aligned} \quad (2-5-36)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,1,L}^a &= k_l P_{1,1,0}^a - \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^a - \lambda f(X)P_{1,1,L}^a - k_l P_{1,1,L}^a - k_a P_{1,1,L}^a \\ &\quad + k_a a_2 P_{0,1,L}^a \end{aligned} \quad (2-5-37)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,1,L}^r &= k_l P_{1,1,0}^r - \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^r - \lambda f(X)P_{1,1,L}^r - k_l P_{1,1,L}^r - k_a P_{1,1,L}^r \\ &\quad + k_a a_2 P_{0,1,L}^r \end{aligned} \quad (2-5-38)$$

$$\frac{d}{dx}P_{1,1,L}^d = k_l P_{1,1,0}^d - \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^d - \lambda f(X)P_{1,1,L}^d - k_l P_{1,1,L}^d - k_a P_{1,1,L}^d$$

$$+ k_a a_2 P_{0,1,L}^d$$

(2-5-39)

上記の数理モデルから数値解析ソフトウェア MATLAB(MathWorks)による ode45 ソルバーを用いた決定論による数値シミュレーションを行った[50]。公表時 Smolen oscillator モデルの初期値は、

$$[P_{0,0,0}^a, P_{0,1,0}^a, P_{0,2,0}^a, P_{1,0,0}^a, P_{1,1,0}^a, P_{1,2,0}^a, P_{0,1,L}^a, P_{0,2,L}^a, P_{0,0,0}^r, P_{0,1,0}^r, P_{0,2,0}^r,$$

$$P_{1,0,0}^r, P_{1,1,0}^r, P_{1,2,0}^r, P_{0,1,L}^r, P_{0,2,L}^r, m^a, m^r, a_{uf}, r_{uf}, a, r, a_2, r_2, r_4 = 0, 0, 0,$$

$$0, 0 \text{ (molecules)}]$$

とした。

新規 Smolen oscillator モデルの初期値は、

$$[P_{0,0,0}^a, P_{0,1,0}^a, P_{0,2,0}^a, P_{1,0,0}^a, P_{1,1,0}^a, P_{1,2,0}^a, P_{0,1,L}^a, P_{1,0,L}^a, P_{1,1,L}^a, P_{0,0,0}^r, P_{0,1,0}^r,$$

$$P_{0,2,0}^r, P_{1,0,0}^r, P_{1,1,0}^r, P_{1,2,0}^r, P_{0,1,L}^r, P_{1,0,L}^r, P_{1,1,L}^r, P_{0,0,0}^d, P_{0,1,0}^d, P_{0,2,0}^d, P_{1,0,0}^d,$$

$$P_{1,1,0}^d, P_{1,2,0}^d, P_{0,1,L}^d, P_{1,0,L}^d, P_{1,1,L}^d, m^a, m^r, m^d, a_{uf}, r_{uf}, d_{uf}, a, r, d, a_2, r_2,$$

$$r_4 = 0,$$

$$0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 \text{ (molecules)}$$

とした。

公表時 lac/ara-reporter circuit モデルの初期値は、

$$[P_{0,0,0}^a, P_{0,1,0}^a, P_{0,2,0}^a, P_{1,0,0}^a, P_{1,1,0}^a, P_{1,2,0}^a, P_{0,1,L}^a, P_{0,2,L}^a, P_{0,0,0}^r, P_{0,1,0}^r, P_{0,2,0}^r,$$

$$P_{1,0,0}^r, P_{1,1,0}^r, P_{1,2,0}^r, P_{0,1,L}^r, P_{0,2,L}^r, P_{0,0,0}^d, P_{0,1,0}^d, P_{0,2,0}^d, P_{1,0,0}^d, P_{1,1,0}^d, P_{1,2,0}^d,$$

$$P_{0,1,L}^d, P_{0,2,L}^d, m^a, m^r, m^d, a_{uf}, r_{uf}, d_{uf}, a, r, d, a_2, r_2, r_4 = 0, 0, 0, 0, 0, 0,$$

$$0, 0,$$

(molecules)]

新規 lac/ara-reporter circuit モデルの初期値は、

$[P_{0,0,0}^a, P_{0,1,0}^a, P_{0,2,0}^a, P_{1,0,0}^a, P_{1,1,0}^a, P_{1,2,0}^a, P_{0,1,L}^a, P_{1,0,L}^a, P_{1,1,L}^a, P_{0,0,0}^r, P_{0,1,0}^r,$

$P_{0,2,0}^r, P_{1,0,0}^r, P_{1,1,0}^r, P_{1,2,0}^r, P_{0,1,L}^r, P_{1,0,L}^r, P_{1,1,L}^r, P_{0,0,0}^d, P_{0,1,0}^d, P_{0,2,0}^d, P_{1,0,0}^d,$

$P_{1,1,0}^d, P_{1,2,0}^d, P_{0,1,L}^d, P_{1,0,L}^d, P_{1,1,L}^d, m^a, m_r^r, m^d, a_{uf}, r_{uf}, d_{uf}, a, r, d, a_2,$

$r_2, r_4 = 0,$

$0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0$ (molecules)]

とした。

そして以下の手順により線形安定性解析を行い平衡点の安定性を求めた。まず上記の4つの微分方程式を、Newton-Raphson法で線形近似することにより平衡点を求めた。そして平衡点でのヤコビ行列内の全ての固有値が負の実部を持つとき、その平衡点は安定であるとした。全ての固有値が負の実部を持つことを確認するためには、ラウスの方法を用いた。

そして arabinose、IPTG 濃度の対数グラフにおいて、MATLAB の ODE シミュレーションでの各分子の振幅を MATLAB の疑似カラー“jet”によってプロットした。特に線形安定性解析から安定固定点としたところは黒色でプロットした。

2.4 結果

2.4.1 下流遺伝子によるDNA結合サイトの奪い合い効果

新規 Smolen 振動子モデルは、arabinose と IPTG の濃度パラメータースペースにおいて、新規 lac/ara-reporter circuit モデルよりも広い振動領域を示した(図 2-5)。下流遺伝子の影響を調べるために、私はまず新規 Smolen 振動子モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モデルの間の arabinose と IPTG の濃度パラメータースペースを比較した。そして、制御遺伝子とレポーター遺伝子のプロモーター内の AraC 結合サイトと LacI 結合サイト間の AraC と LacI 制御タンパク質の奪い合いを決定するために、私は新規 lac/ara-reporter circuit モデルにおいて GFP 遺伝子のコピー数(N_d)の数を増加したときの濃度パラメータースペースの変化を比較した(図 2-5 (b)-(d))。このとき制御遺伝子のコピー数は固定している。結果として、新規 Smolen 振動子モデルは濃度パラメータースペースにおいて広い振動領域を示した(図 2-5(a))。同様に、新規 lac/ara-reporter circuit モデルにおいて $N_d=0$ のときにも、広い振動領域を示した(図 2-5 (b))。そして GFP 遺伝子のコピー数を大きくするにつれて安定固定点が徐々に広がっていった(図 2-5 (c)-(d))。このとき振動の振幅はコピー数を大きくするにつれて、徐々に小さくなっていった。これらの図 2-5 の結果は、プロモーター内の DNA 結合サイトが制御タンパク質を奪い合う結果を示唆するもので、同様のことが遺伝子回路におけるデコイサイトの数を増加したときに起きている[19]。

本項目と既知の[19]の研究ではプロモーターといったゲノム・プラスミド内の制御タンパク質結合サイトの奪い合いを調べたものである。既知の研究のポジティブフィードバックの系では、多数の繰り返しのデコイサイトの DNA 配列を酵母内に導入することで発現を減らし、アクチベータタンパク質における小分子の抑制効果を変えることを示した[19]。また他のグループではレトロアクティビティという下流システムから上流システムへと情報を受け取る効果を示した。一般的にレトロアクティビティとは上流システムの情報伝達の遅れをもたらすと言われている[12-14]。特に私の研究では振動子の周期の違いを下流遺伝子のコピー数の違いにより変わることを示している。更に私の研究では下流遺伝子のコピー数の増加が濃度パラメータースペースにおける振動領域を狭くする効果をもたらすことを示した。

2.4.2 下流遺伝子によるタンパク質分解酵素の奪い合い効果

同一の arabinose と IPTG の濃度パラメーターセットにおいて、Smolen 振動子モデルと lac/ara-reporter circuit モデルがともに振動するときに、lac/ara-reporter circuit モデルは Smolen 振動子モデルよりも長い周期を示した (図 2-6)。

本項目により、lac/ara-reporter circuit モデルにおける長い周期はタンパク質合成よりもタンパク質分解に由来することを示した。私は AraC 二量体の経時変化において rising subphase, falling subphase, action phase, resting phase を定義した (図 2-6 (a)-(d))。振動周期の総長は action phase と resting phase の和と同じである。Resting phase は AraC 二量体が 10 分子以下存在するときと定義した。Action phase は rising subphase と falling subphase の和と同じである。rising subphase はタンパク質合成がタンパク質分解を上回っているときと定義した。一方、falling subphase はタンパク質分解がタンパク質合成を上回っているときと定義した。振動周期において決定論シミュレーションにより、Smolen 振動子モデルと lac/ara-reporter circuit モデルを比較した場合、振動周期の長さを決めるのは rising subphase や resting subphase ではなく、falling subphase に依存して長さが決まっていた (表 2-2)。同様に LacI 四量体の振動周期の長さにおいても falling subphase に依存して振動周期の長さが決まっていた。

Smolen 振動子モデルよりも lac/ara-reporter circuit モデルにおいて長い周期 falling subphase は小さい分解速度係数によるものである。公表時 Smolen 振動子モデルにおけるタンパク質合成は公表時 lac/ara-reporter circuit モデルよりもわずかに大きい (図 2-6 (e)-(f)) (表 2-3)。公表時 Smolen 振動子モデルにおける AraC mRNA の振動周期における面積は 330 であるのに対して、公表時 lac/ara-reporter circuit モデルにおける AraC mRNA の振動周期における面積は 310 である。一方、最終産物である AraC 二量体の振動周期における面積を比較したところ、公表時 Smolen 振動子モデルでは 43,000 となり、公表時 lac/ara-reporter circuit モデルでは 74,000 となった。新規 Smolen 振動子モデルにおけるタンパク質合成は lac/ara-reporter circuit モデルよりもわずかに大きい (図 2-6 (g)-(h)) (表 2-3)。また新規 Smolen 振動子モデルにおける AraC mRNA の振動周期における面積は 650 であるのに対して、公表時 lac/ara-reporter circuit モデルにおける AraC mRNA の振動周期における面積は 240 である。一方、最終産物である AraC 二量体の振動周期における面積を比較したところ、

公表時 Smolen 振動子モデルでは 89,000 となり、公表時 lac/ara-reporter circuit モデルでは 50,000 となった。

これらの面積値の違いは lac/ara-reporter circuit モデルにおける分解が小さいことによるものである。特に両者のモデルでは AraC, LacI, GFP の 3 種類のタンパク質が同じタンパク質分解機構を共有していることを想定している。Smolen 振動子モデルでは GFP を含まないため AraC と LacI タンパク質が早く分解される。

2.5 結果のまとめと考察

本項目での結果は人工遺伝子回路設計における制御遺伝子へと下流レポーター遺伝子が与える影響を示した。本項目の数理モデルとシミュレーション結果は、生細胞内における下流遺伝子のプロモーター内の制御遺伝子タンパク質結合サイトが制御遺伝子の制御遺伝子タンパク質結合サイトと奪い合う効果、およびタンパク質分解機構の奪い合いという2種類の奪い合い効果が生じることを示した。これらの奪い合い機構はプロテアーゼだけでなく、RNAポリメラーゼ、リボソーム、シャペロンといったタンパク質合成系や他の生体分子にもみられると考えられる[51]。そのため生体分子を自身の想定した濃度で加えた *in vitro* の系においても同様に生体分子の奪い合いによる効果が生じる[52, 53]。

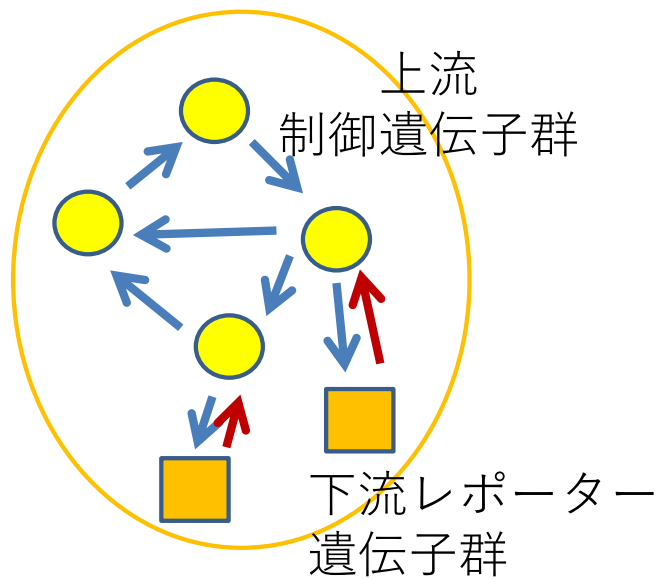
合成生物学では下流遺伝子が与える影響としては、内在の遺伝子回路との結合が考えられる(図2-1)[54-56]。下流遺伝子との結合を通して、人工遺伝子回路はしばしば細胞の生育や動態に悪影響を及ぼすことがある[57, 58]。人工遺伝子回路は生育速度に影響を受けている[57]。生育速度が速くなるにつれて、リプリシレーターでは安定固定点が増加し、振動の振幅は減少し、振動周期が短くなることが知られている。他の例としては、生育速度もまた人工遺伝子回路の挙動に影響を与えることも知られている[58]。チロシン代謝を行うトリプトファン感受性株とトリプトファン代謝を行うチロシン感受性株の共生系では、それぞれのアミノ酸代謝はそれぞれの感受性株の生育に依存していた。更に下流遺伝子だけでなく、お互いが直接制御しているわけではない代謝物もいくつかの機構において競合することがわかった。本項目では独立した制御タンパク質とタンパク質分解機構の奪い合いの効果を示したけども、今後の *in vivo* での実験では ChIP(Chromatin Immunoprecipitation)を行うことにより本研究の効果が示されると考えられる[19]。顕微鏡実験によるタンパク質分解もまた *in silico* によるアプローチにより評価することができる[22]。

本項目の数理モデル化・シミュレーション結果からも下流遺伝子の結合が分岐図における振動領域を変化させたり制御遺伝子の振動周期を変化させたりしていた(図2-5, 2-6)。電気回路では、電気素子間の結合による摂動を出力インピーダンスと入力インピーダンスで表す(図2-7(a))。電気回路は多数の素子から構成されている。制御素子は定電流源により構築されている。電圧は制御素子の出力インピーダンスと入力インピーダンスにより定義される。下流素子は入力インピーダンスにより下流の入力で消費される電圧として出力する。制御

素子の動態は、制御素子における高出力インピーダンスや下流素子における低入力インピーダンスといった、下流素子との結合により変化する。

遺伝子回路も制御タンパク質の数を電圧として扱うことにより、同様の素子から構成されていると言える。インピーダンスの概念を遺伝子回路に適用すると、本項目と同様の構成の遺伝子回路を改良するときに、上流 Smolen 振動子の制御遺伝子の低出力インピーダンスと下流レポーター遺伝子の高入力インピーダンスを想定することができる (図 2-7 (b)-(e))。下流遺伝子との結合による制御遺伝子の攪乱を減らすために、既知の研究では上流制御遺伝子と下流遺伝子間にインスレーターという素子を導入している [12]。インスレーターは制御遺伝子からの高出力インピーダンスを減らし、下流遺伝子からの低入力インピーダンスを増やすデバイスである。しかし、そのようなデバイスは時間遅れを生じてしまう。出力インピーダンスを減らすために、私の研究では制御遺伝子のコピー数や発現量を増やすことを提案する (図 2-7 (b))。制御遺伝子のコピー数や発現量を変化させることは制御遺伝子間の動態を変化させうるので考慮する必要はある。また入力インピーダンスを増加させるためには下流遺伝子プロモーターの DNA 結合サイトの数を減らすことを提案する (図 2-7 (e))。特に下流遺伝子の S/N 比が減ってしまうことが想定されるために考慮が必要ではある。S/N 比の減少を解決するためには -35, -10 配列や RBS 配列を高活性の配列にすることや、計測デバイスの感度を上げることを考えるべきである。下流遺伝子は制御遺伝子の数に正の相関を持ち発現する。また下流コーディング配列も更に別の下流遺伝子を結合することも考えうる。

本項目の結果は下流遺伝子が制御遺伝子に与える効果を示しており、システム生物学や合成生物学の領域に貢献するものである。



人工遺伝子 回路

図 2-1 本章で用いる人工遺伝子回路

人工遺伝子回路内の制御遺伝子群が下流レポーター遺伝子群に影響を与えると同時に、下流レポーター遺伝子群が上流制御遺伝子群に影響を与えている。本章で用いる人工遺伝子回路は外来の遺伝子を用いているため、細胞の内在の遺伝子ネットワークには影響を与えていない。

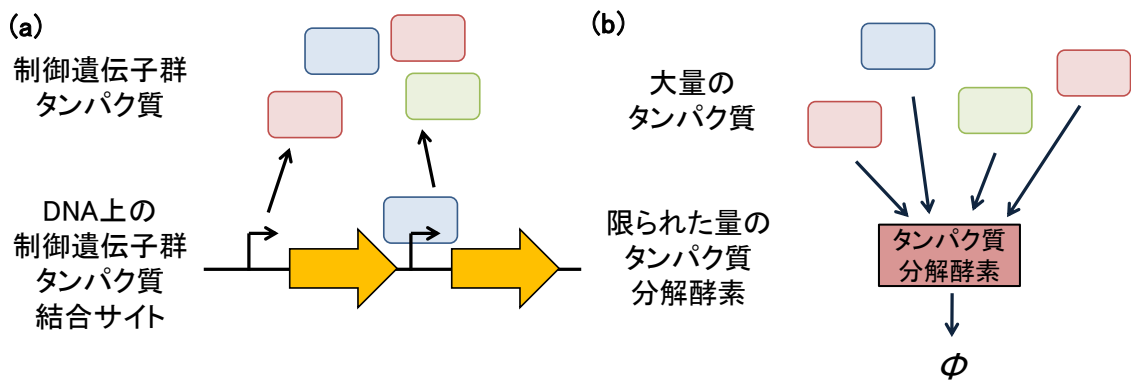


図 2-2 人工遺伝子回路における制御遺伝子に下流遺伝子を与える影響

(a)プロモーター内における制御遺伝子群タンパク質結合サイトが制御遺伝子群タンパク質を奪い合う効果 (b)大量のタンパク質が限られた数のタンパク質分解酵素を奪い合う効果

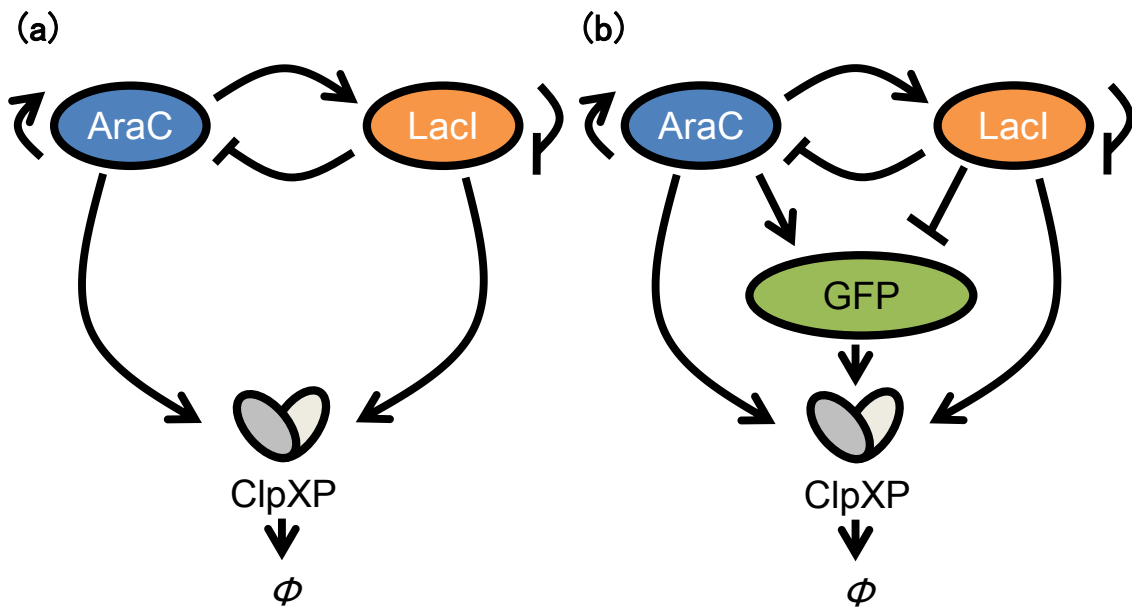


図 2-3 下流遺伝子の影響を調べるための人工遺伝子回路モデル

(a) Smolen 振動子モデル (b) lac/ara-reporter circuit モデル AraC と LacI は Smolen はポジティブフィードバックとネガティブフィードバックのループを形成している。GFP はこの振動子の下流遺伝子である。ClpXP は *ssrA* でタグ付けされたタンパク質(AraC, LacI, GFP)を特異的に認識して分解する。

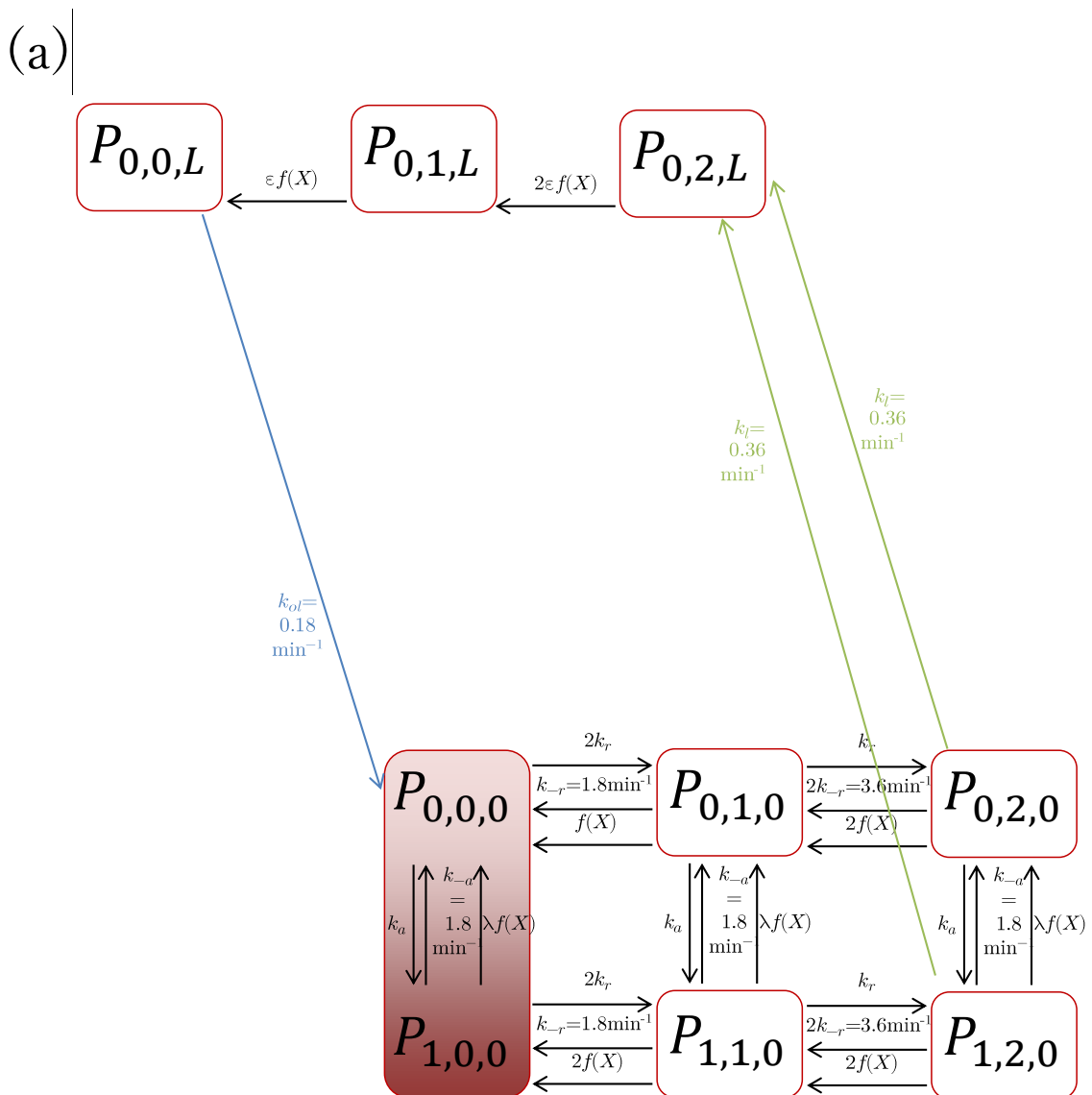
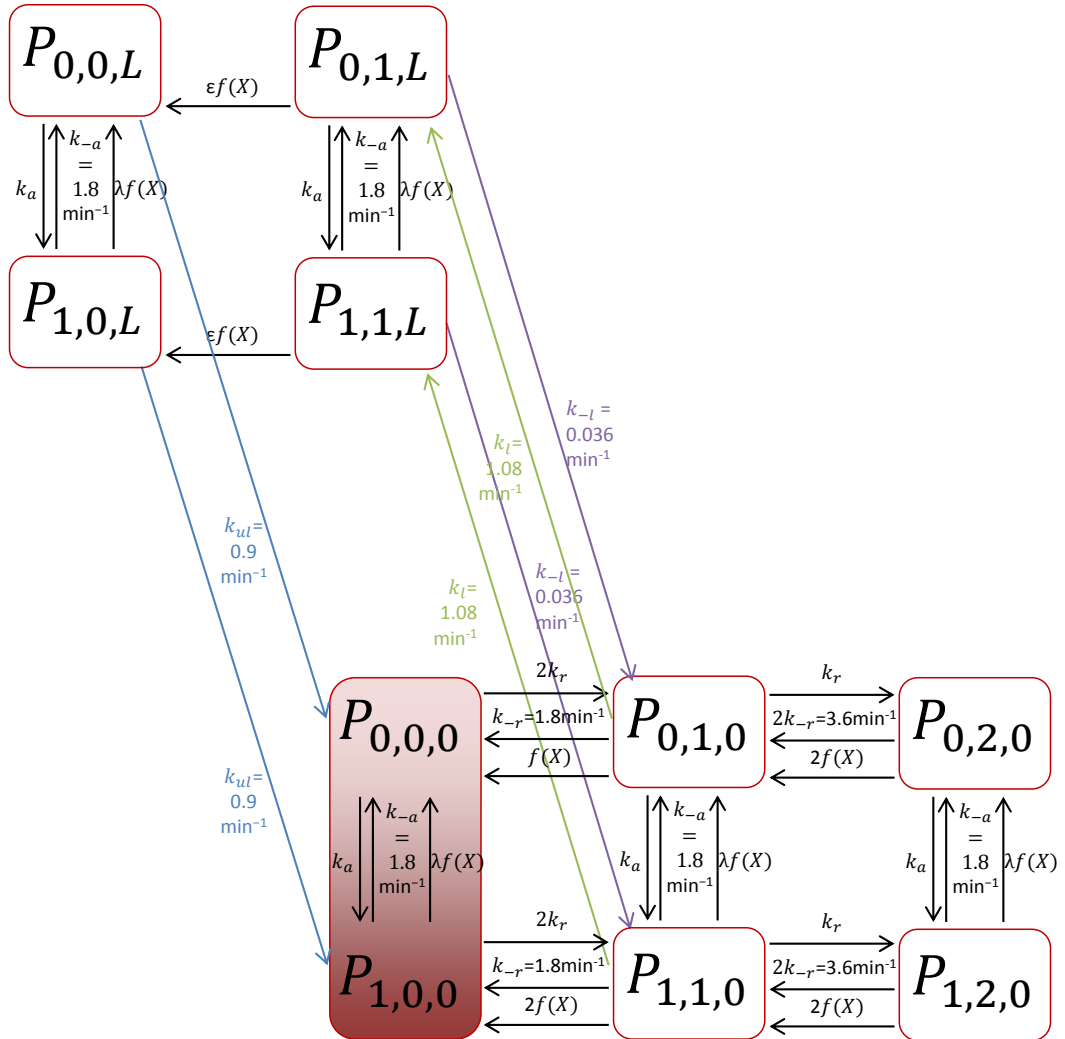


図 2-4 人工遺伝子回路内のプロモーター遷移図

(a) 公表時 Smolen 振動子モデル、公表時 lac/ara-reporter circuit モデル内のプロモーター遷移図。公表時 Smolen 振動子モデル内の *araC* コーディングプロモーター、*lacI* コーディングプロモーター、および公表時 lac/ara-reporter circuit モデル内の *araC* コーディングプロモーター、*lacI* コーディングプロモーター、*gfp* コーディングプロモーターに適用される。

(b) 新規 Smolen 振動子モデル、新規 lac/ara-reporter circuit モデル内のプロモーター遷移図。新規 Smolen 振動子モデル内の *araC* コーディングプロモーター、*lacI* コーディングプロモーター、および新規 lac/ara-reporter circuit モデル内の *araC* コーディングプロモーター、*lacI* コーディングプロモーター、*gfp* コーディングプロモーターに適用される。

(b)



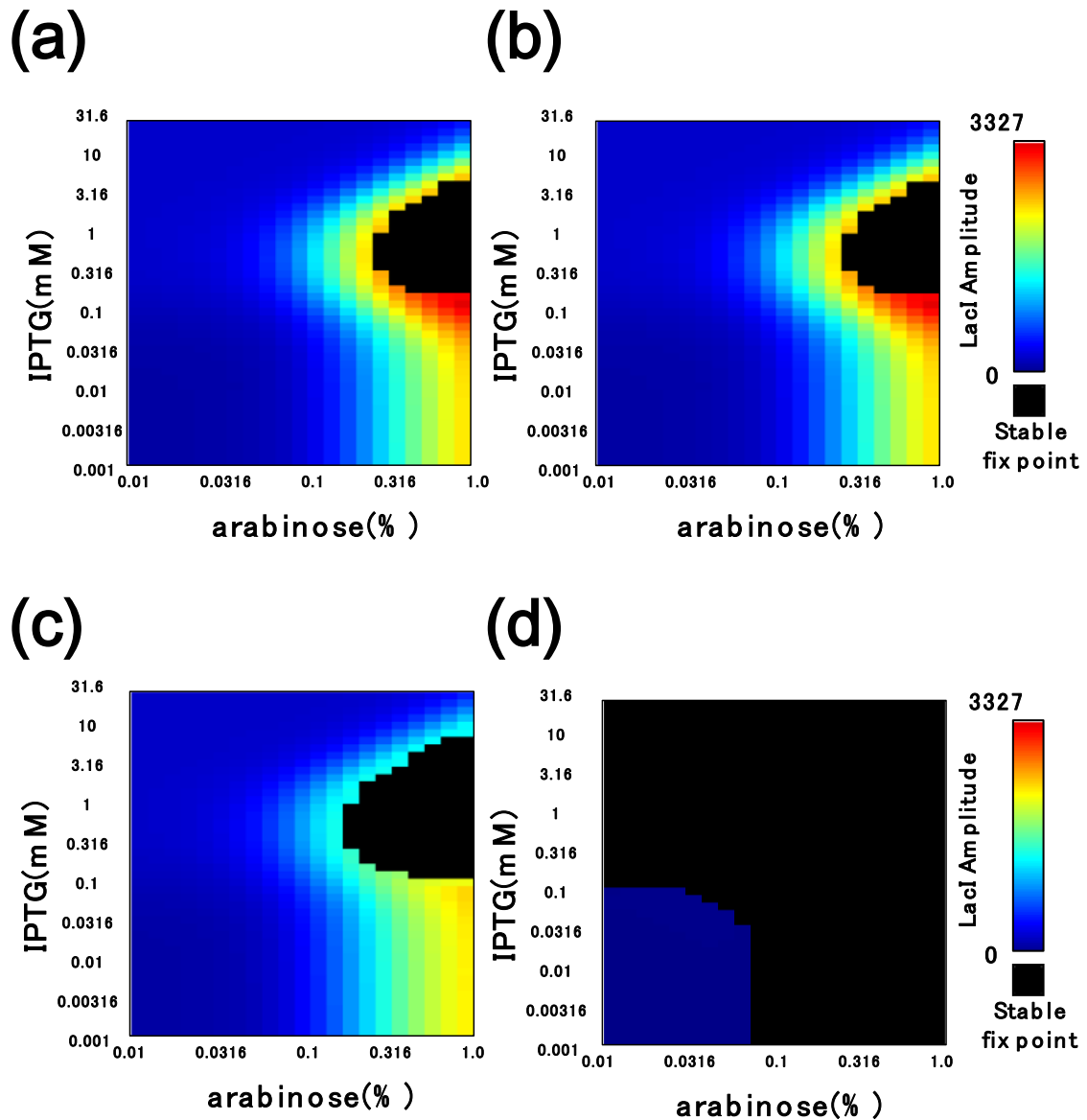


図 2-5 新規 Smolen 振動子モデルと新規 lac/ara-reporter circuit モデルにおける誘導剤分岐図

(a)新規 Smolen 振動子モデル

(b)新規 lac/ara-reporter circuit モデル (GFP 遺伝子のコピー数: $N_d = 0$)

(c)新規 lac/ara-reporter circuit モデル (GFP 遺伝子のコピー数: $N_d = 50$)

(d)新規 lac/ara-reporter circuit モデル (GFP 遺伝子のコピー数: $N_d = 500$)

X 軸 : アラビノース濃度、Y 軸 : IPTG 濃度、黒色 : 安定固定点

全てのモデルにおいて AraC 遺伝子のコピー数 $N_a = 50$ 、

LacI 遺伝子のコピー数 $N_r = 25$

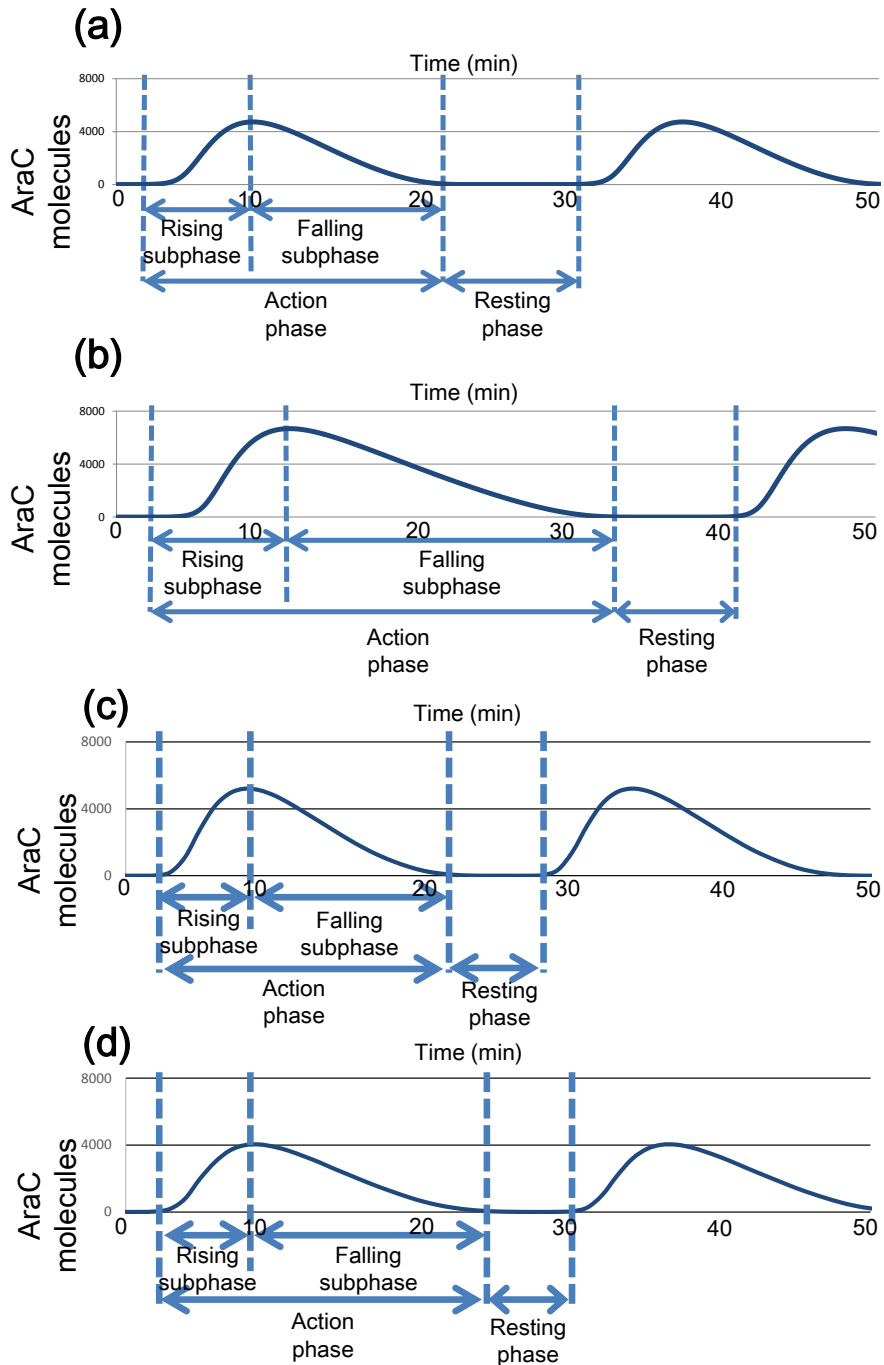


図 2-6 Smolen 振動子モデルと Smolen Plac/ara モデルにおける決定論シミュレーションによる各成分の経時変化

両モデルにおけるアラビノース濃度 1.0% IPTG 10 mM での AraC 二量体の経時変化。

- (a) 公表時 Smolen 振動子モデル
- (b) 公表時 lac/ara-reporter circuit モデル
- (c) 新規 Smolen 振動子モデル
- (d) 新規 lac/ara-reporter circuit モデル

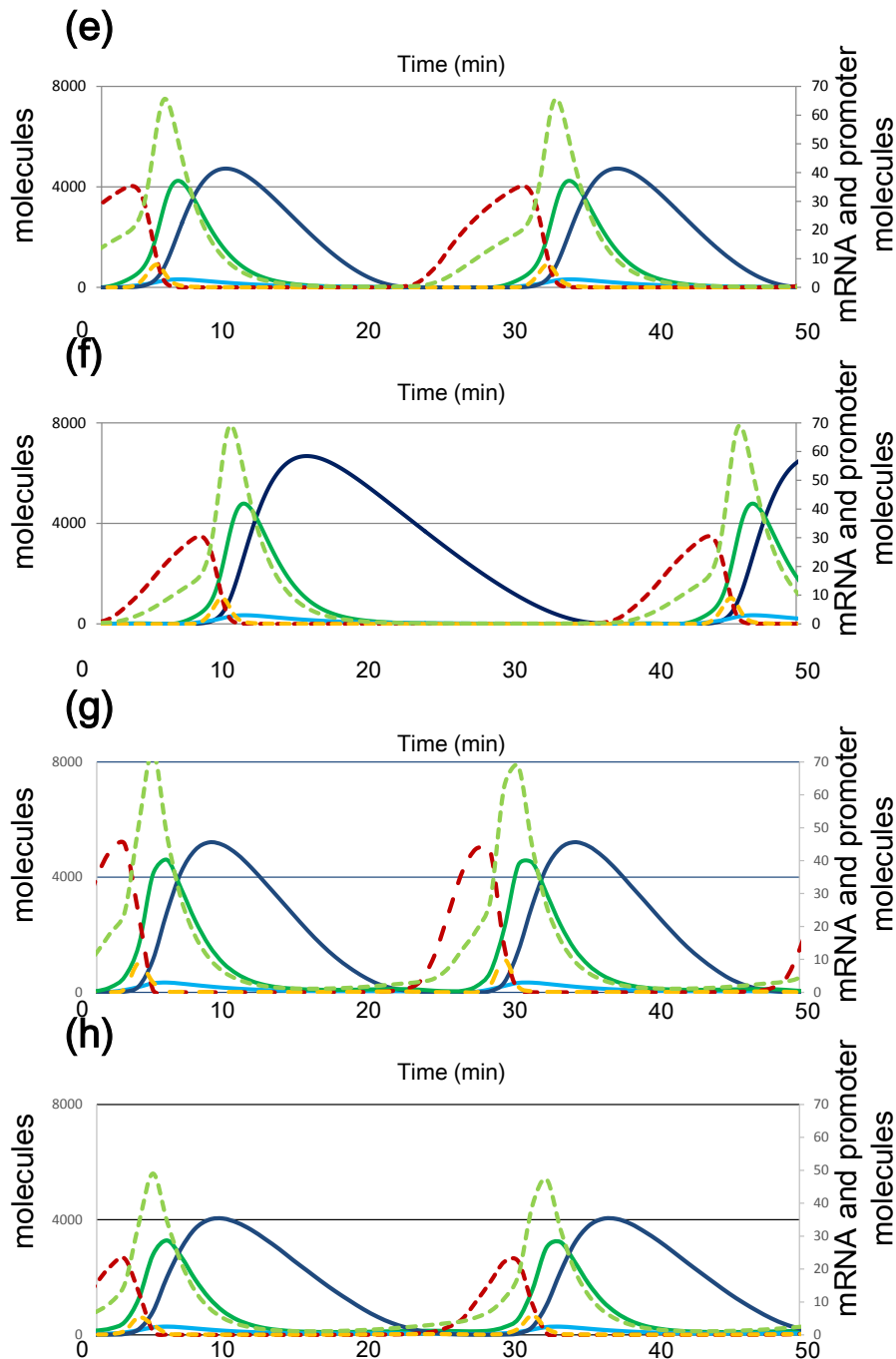


図 2-6(続き) Smolen 振動子モデルと Smolen Plac/ara モデルにおける決定論シミュレーションによる各成分の経時変化

両モデルにおけるアラビノース濃度 1.0% IPTG 10mM での各成分の経時変化。
 濃青：AraC 二量体、淡緑：AraC mRNA、濃緑：AraC アンフォールドポリペプチド、淡青：AraC 一量体、赤： $P_{0,0,0}$ *araC* プロモーター、橙： $P_{1,0,0}$ *araC* プロモーター

- (e) 公表時 Smolen 振動子モデル (f) 公表時 lac/ara-reporter circuit モデル
 (g) 新規 Smolen 振動子モデル (h) 新規 lac/ara-reporter circuit モデル

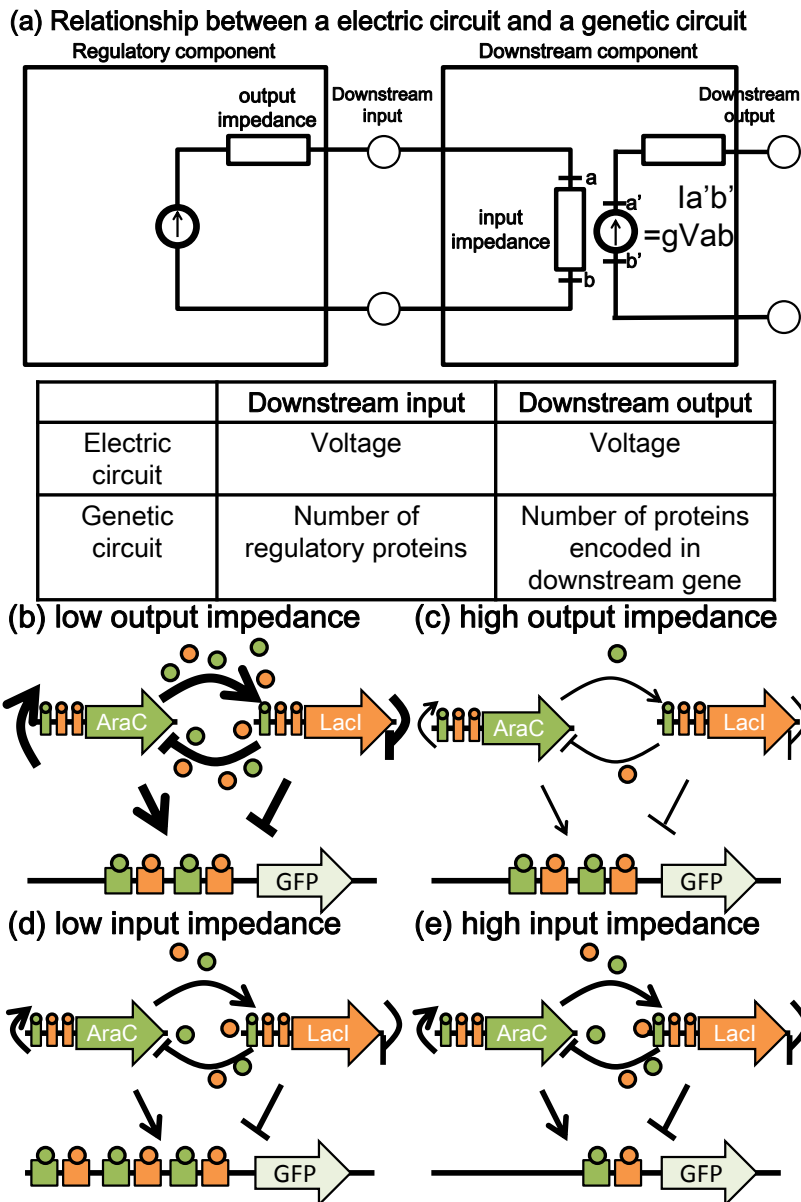


図 2-7 電気回路と遺伝子回路の間のインピーダンスの関係

(a)電気回路と遺伝子回路の間のインピーダンスの関係。電気回路では下流の入力インピーダンスにより電圧を出力する。(b-e)遺伝子回路におけるインピーダンスのモデル。(b)低出力インピーダンスモデル。(c)高出力インピーダンスモデル。(d)低入力インピーダンスモデル。(e)高入力インピーダンスモデル。AraC と LacI は制御遺伝子を表している。GFP は下流レポーター遺伝子を表している。AraC タンパク質と LacI タンパク質は GFP のプロモーターの結合サイトに結合する。また各タンパク質の数は制御タンパク質の濃度を表している。このとき低出力インピーダンス高入力インピーダンスの場合が制御遺伝子と下流遺伝子の結合が安定する。

表 2-1 本章のシミュレーションに用いたパラメーター

Parameter name	Parameter value	Description	Units	Source
b_a, b_r, b_{d1}	0.36	transcription rate of lac/ara promoter	min^{-1}	[32]
b_{d2}	7.2 ($=\alpha b_{d1}$)	transcription rate of lac promoter	min^{-1}	This study
α	20	coefficient of active promoter		[32]
k_{-a}, k_{-r}	1.8	Protein and its protein-binding site dissociation rate	min^{-1}	[32]
t_a, t_r, t_d	90	translation rate	min^{-1}	[32]
d_a, d_r, d_d	0.54	mRNA degradation rate	min^{-1}	[32]
k_{fa}, k_{fr}, k_{fd}	0.9	folding rate	min^{-1}	[32]
k_{da}, k_{dr}, k_t	0.018	multimerization rate	$\text{min}^{-1} \text{molecules}^{-1}$	[32]
k_{-da}, k_{-dr}, k_{-t}	0.00018	multimer dissociation rate	min^{-1}	[32]
k_l	1.08	loop forming rate in new circuit	min^{-1}	[59]

k_{-l}	0.036	loop unforming rate in new circuit	min^{-1}	[59]
k_{ul}	0.90	loop dissociation rate in new circuit	min^{-1}	[60]
k_l	0.36	loop forming rate in published circuit	min^{-1}	[32]
k_{ul}	0.18	loop dissociation rate in published circuit	min^{-1}	[32]
γ	1080	maximum degradation rate	$\text{molecules} \cdot \text{min}^{-1}$	[32]
c_e	0.1	dissociation constant	molecules	[32]
λ	2.5	coefficient of degradation rate of AraC and downstream free molecule		[32]
ε	0.2	coefficient of degradation rate in loop promoter		[32]
$\omega_1, \omega_2, \omega_3$	1	coefficient of tagged degradation rate		This study
N_a	50	copy number of activator gene		[49] [32]
N_r	25	copy number of repressor gene		[49] [32]
N_d	50	copy number of downstream gene		[49] [16]
N_{decoy}	50	copy number of downstream decoy site		[49]
C_r^{max}	0.2	maximum affinity of LacI for the	molecules^{-1}	[32]

		protein-binding site	
C_r^{min}	0.01	minimum affinity of molecules ⁻¹ LacI for the protein-binding site	[32]
$[IPTG]$	0–10	IPTG concentration	mM [32]
k_{r1}	0.035	correction constant of IPTG	mM [32]
b_1	2	Hill coefficient of inhibition by LacI	[32]
C_a^{max}	1	maximum affinity of molecules ⁻¹ AraC for the promoter	[32]
C_a^{min}	0	minimum affinity of molecules ⁻¹ AraC for the promoter	[32]
$[ara]$	0–2	arabinose concentration	% (w/v) [32]
k_{a1}	2.5	correction constant of arabinose	% (w/v) [32]
c_1	2	Hill coefficient of activation by AraC	[32]
b_2	2	Hill coefficient of inhibition by LacI	[32]

表 2-2 決定論シミュレーションによる Smolen 振動子モデルと lac/ara-reporter circuit モデルにおける経時変化

	公表時 Smolen 振動子モデル	公表時 lac/ara-reporter circuit モデル
Rising subphase	8.0 min	10.0 min
Falling subphase	16.0 min	27.0 min
Resting phase	4.0 min	1.0 min
Total oscillation period	28.0 min	38.0 min

	新規 Smolen 振動子モデル	新規 lac/ara-reporter circuit モデル
Rising subphase	7.0 min	8.0 min
Falling subphase	15.0 min	17.0 min
Resting phase	4.0 min	3.0 min
Total oscillation period	26.0 min	28.0 min

上記の数値はアラビノース濃度 1.0% IPTG 濃度 10 mM の場合のシミュレーション結果を反映している。

表 2-3 決定論シミュレーションによる Smolen 振動子モデルと lac/ara-reporter circuit モデルにおける経時変化内の各分子の面積値

	公表時 Smolen 振動子モデル	公表時 lac/ara-reporter circuit モデル
$P_{0,0,0}^a$ promoter	2.1×10^2	1.1×10^2
$P_{1,0,0}^a$ promoter	1.4×10	2.2×10
AraC transcription rate ($P_{0,0,0}^a + P_{1,0,0}^a$)	4.9×10^2	5.5×10^2
AraC mRNA	3.3×10^2	3.1×10^2
AraC unfolding	2.1×10^4	2.1×10^4
AraC monomer	2.4×10^3	2.7×10^3
AraC dimer	4.3×10^4	7.4×10^4

	新規 Smolen 振動子モデル	新規 lac/ara-reporter circuit モデル
$P_{0,0,0}^a$ promoter	3.5×10^2	9.0×10
$P_{1,0,0}^a$ promoter	3.1×10	1.3×10
AraC transcription rate ($P_{0,0,0}^a + P_{1,0,0}^a$)	9.8×10^2	3.5×10^2
AraC mRNA	6.5×10^2	2.4×10^2
AraC unfolding	4.5×10^4	1.8×10^4
AraC monomer	5.0×10^3	2.5×10^3
AraC dimer	8.9×10^4	5.0×10^4

上記の数値はアラビノース濃度 1.0% IPTG 濃度 10 mM の場合のシミュレーション結果を反映している。

第三章：

人工遺伝子回路に様々なプロモーターの下流レポーター遺伝子を付加した場合の数理モデル化・シミュレーション・生物実験

3.1 導入

レポーター遺伝子は遺伝子発現を測定するために重要であり、分子生物学・合成生物学の発展に重要な役割を果たしている[1-3]。第一章ではこれまでの分子生物学や合成生物学におけるレポーター遺伝子の貢献を示した。第二章では人工遺伝子回路において下流遺伝子の有無により様々な分子競合が生じた結果、上流の制御遺伝子の挙動が変化することを示した。今後の合成生物学では複雑な人工遺伝子回路設計が[61, 62]、また分子生物学・細胞生物学では多種多様なレポーター遺伝子の利用が進展していくことが予想される[63, 64]。そのため本章ではレポーター遺伝子のプロモーター領域の設計が、生物実験の過程において重要な役割を果たすことを示す。

本章における数理モデルとシミュレーションから、制御タンパク質結合サイトから制御タンパク質への分子競合とペプチドタグ配列特異的プロテアーゼから標的タンパク質への分子競合が、レトロアクティビティ[12-14]と待ち行列効果[20, 22]を生じた結果、細胞内のシステムの動態を攪乱させることを示す。私はこのとき下流レポーター遺伝子における制御タンパク質結合サイト数が異なる2種類の人工遺伝子回路を実装した大腸菌株を、シミュレーション実験とともに、顕微鏡により観察した(図3-1(i)-(ii))。そして同数の制御タンパク質結合サイト数を持つが配置の異なる別の人工遺伝子回路をモデル化した(図3-1(i), (iii))。しかし同一の制御タンパク質結合サイト数を持つのかかわらず、上流の制御遺伝子の挙動が異なる「連続的レトロアクティビティ」という現象を私は発見した。この結果は、遺伝子回路の設計において最適なプロモーター領域の選択が重要であることを示す結果となる。

3.2 様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した人工遺伝子回路の設計・構築

下流遺伝子に様々なプロモーターを結合したときの挙動を調べるために、私は上流部分にポジティブフィードバックとネガティブフィードバックループが結合した Smolen 振動子と、下流部分に lac/ara プロモーターに GFP 配列が結合した lac/ara-reporter circuit モデルを用いた (2 章における新規 lac/ara-reporter circuit モデルと同一の数理モデル) (図 3-2(a)) [29, 41, 42]。上流制御遺伝子として lac/ara プロモーターにより駆動するアクチベーターである araC とリプレッサーである lacI 遺伝子を用いた。このとき 1 分子の lac/ara プロモーターは 1 分子の AraC タンパク質と 2 分子の LacI タンパク質と結合することにより駆動する (図 3-3) [49] (Lutz & Bujard, 1997)。この lac/ara プロモーターは誘導剤であるアラビノースとイソプロピルチオガラクトピラノシド (IPTG) により、表 3-1 のように ON 状態と OFF 状態が遷移する。2 章での人工遺伝子回路内の上流制御遺伝子群に下流レポーター遺伝子を付加した研究のように [16]、本章では下流レポーター遺伝子領域の 1 カ所を置換した人工遺伝子回路を比較した (図 3-2)。本章では下流遺伝子として lac/ara プロモーターにより駆動する *gfp* 遺伝子を付加した lac/ara-reporter circuit モデルを用いた (図 3-2(a)) [29]。そして本章では、あらたに lac プロモーターにより駆動する *gfp* 遺伝子を付加した lac-reporter circuit モデルを用いた (図 3-2(b))。

3.3 材料と方法

3.3.1 数理モデリングとシミュレーション

人工遺伝子回路の動態を予測するために、私はプロモーター間の遷移、タンパク質合成、タンパク質の分解の動態の化学反応式を基にした数理モデルを構築した。この数理モデルは Stricker 氏らの論文 [32, 41, 42] を基にしたものである。なお上記参考文献に加えて、LacI 四量体二分子が DNA のループ構造を形成するのではなく、LacI 四量体一分子が DNA のループ構造を形成することが判明した [45-47]。また今回の実験での 458bp のループ構造を形成するときに AraC の遊離は生じづらいことが判明した [48]。そのため上記の知見を踏まえた上での数理モデル、シミュレーションを構築した (図 3-3)。この章では、lac/ara-reporter circuit モデル (前章で用いた新規 lac/ara-reporter circuit モデル) に加えて新たに lac-reporter circuit モデルと lac-reporter + AraC decoy circuit モデルを導入した。また数理モデルに関するパラメーターは表 3-2 に記載した。

本章で扱う3つのモデルでは、LacI 四量体の DNA への結合・解離反応速度係数は k_r と k_{-r} で表す。同様に AraC 二量体の DNA への結合・解離反応速度係数は k_a と k_{-a} で表す。過去のルシフェラーゼアッセイの結果や数理モデルからの解離反応速度係数 k_{-r} と k_{-a} から結合反応速度係数 k_r と k_a を導出した [32, 49]。タンパク質の DNA への結合は以下の (3-1), (3-2) 式で表す。そのときの最大結合係数と最小結合係数はそれぞれ ($C_r^{max} = 0.2 \text{ molecules}^{-1}$ and $C_a^{max} = 1 \text{ molecules}^{-1}$) と ($C_r^{min} = 0.01 \text{ molecules}^{-1}$ and $C_a^{min} = 0 \text{ molecules}^{-1}$) とする。そのとき k_r と k_a の式は以下のように表す。

$$k_r = k_{-r} \left((C_r^{max} - C_r^{min}) \frac{1}{1 + \left(\frac{[IPTG]}{k_{r1}}\right)^{b_1}} + C_r^{min} \right) \quad (3-1-1)$$

$$k_a = k_{-a} \left((C_a^{max} - C_a^{min}) \frac{[ara]^{c_1}}{k_{a1}^{c_1} + [ara]^{c_1}} \frac{1}{1 + \left(\frac{[IPTG]}{k_{r1}}\right)^{b_1}} + C_a^{min} \right) \quad (3-1-2)$$

AraC や LacI をコードする lac/ara プロモーターにおける状態遷移は、AraC 二量体分子の DNA への結合・解離、LacI 四量体分子の DNA への結合・解離、および DNA のループ構造の形成を基に決定した。プロモーター間の遷移の動態は以下のような化学反応式により決定した。プロモーター内のタンパク質結合サイトの相互作用の動態は、 $P_{j,k,l}^i$ に従って決定した。この式において P はプロモーターを表す。 i はどのタンパク質を発現するかを表し、 a のときはアクチベータタンパク質を、 r のときはリプレッサータンパク質を発現している。 j と k はプロモーターに結合したアクチベータタンパク質とリプレッサータンパク質の個数を表し、それぞれアクチベータタンパク質の数 $j \in \{0, 1\}$ 、リプレッサータンパク質の数 $k \in \{0, 1, 2\}$ となっている。 l はプロモーターがループ構造をとっているかを表し、 $P_{j,k,l}^i$ ではループ構造を形成していることを $P_{j,k,0}^i$ では非ループ構造となっていることを表す。この章で導入した2つのモデルではプロモーターにおける状態遷移の動態を (3-1-3) - (3-1-11) 式で表した (図 3-3)。

$$P_{j,1,0}^i + r_4 \begin{array}{c} \xrightarrow{k_r} \\ \xleftrightarrow{\quad} \\ \xleftarrow{2k_{-r}} \end{array} P_{j,2,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (3-1-3)$$

$$P_{j,1,0}^i \begin{array}{c} \xrightarrow{k_l} \\ \xleftrightarrow{\quad} \\ \xleftarrow{k_{-l}} \end{array} P_{j,1,L}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (3-1-4)$$

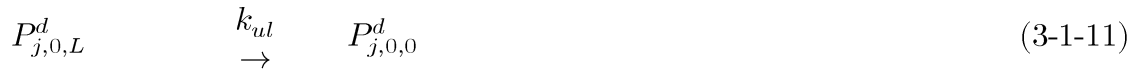
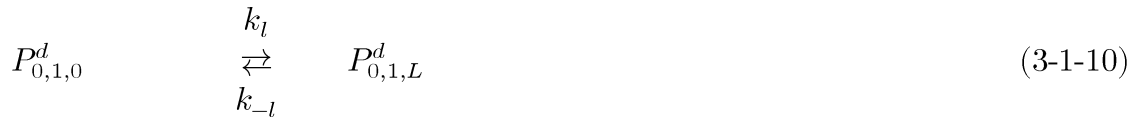
$$P_{j,0,L}^i \begin{array}{c} \xrightarrow{k_{ul}} \\ \rightarrow \end{array} P_{j,0,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (3-1-5)$$

$$P_{0,k,0}^i + a_2 \begin{array}{c} \xrightarrow{k_a} \\ \xleftrightarrow{\quad} \\ \xleftarrow{k_{-a}} \end{array} P_{1,k,0}^i \quad i \in \{a, r\}, k \in \{0, 1, 2\} \quad (3-1-6)$$

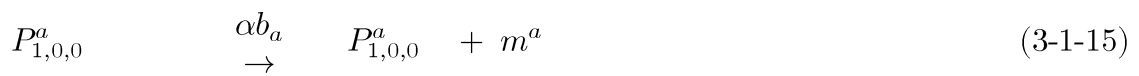
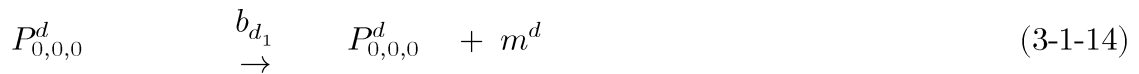
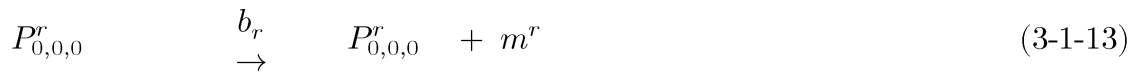
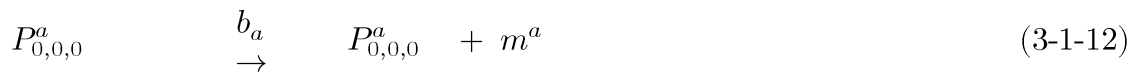
$$P_{0,k,L}^i + a_2 \begin{array}{c} \xrightarrow{k_a} \\ \xleftrightarrow{\quad} \\ \xleftarrow{k_{-a}} \end{array} P_{1,k,L}^i \quad i \in \{a, r\}, k \in \{0, 1\} \quad (3-1-7)$$

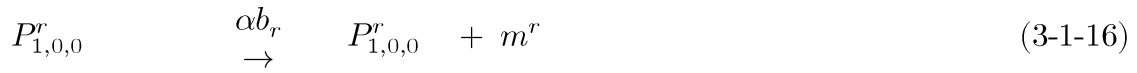
$$P_{0,0,0}^d + r_4 \begin{array}{c} \xrightarrow{2k_r} \\ \xleftrightarrow{\quad} \\ \xleftarrow{k_{-r}} \end{array} P_{0,1,0}^d \quad (3-1-8)$$

$$P_{0,1,0}^d + r_4 \begin{array}{c} \xrightarrow{k_r} \\ \xleftrightarrow{\quad} \\ \xleftarrow{2k_{-r}} \end{array} P_{0,2,0}^d \quad (3-1-9)$$



mRNA 転写の動態は以下の式により決定した。この章で導入した2つのモデルでは、mRNA の転写の動態を(3-1-12) – (3-1-16)式で表した。このとき m^i はアクチベータ、リプレッサー、下流の mRNA の数を表し、 i はそれぞれアクチベータ (a : AraC)、リプレッサー (r : LacI)、下流タンパク質 (d : GFP) を発現するプロモーターであることを表している。





この章で導入した2つのモデルでは mRNA から多量体タンパク質の合成は以下の化学反応式(3-1-17) – (3-1-25)により表した。このとき m^i はアクチベータ、リプレッサー、下流の mRNA の数を表し、 i はそれぞれアクチベータ (a : AraC)、リプレッサー (r : LacI)、下流タンパク質 (d : GFP) を発現するプロモーターを表している。 X_{uf} はアクチベータ、リプレッサー、下流のアンフォールドタンパク質の数を表し、 X はそれぞれアクチベータ (a_{uf} : AraC)、リプレッサー (r_{uf} : LacI)、下流タンパク質 (d_{uf} : GFP) のアンフォールドタンパク質を表している。 a 、 r 、 d はそれぞれフォールドされた一量体タンパク質を表している。 a_2 と r_2 はそれぞれフォールドされた二量体タンパク質を表している。 r_4 はフォールドされた四量体タンパク質を表している。





各分子の分解の動態は標的タンパク質となる AraC, LacI, GFP の総量により決定される。このとき lac-reporter circuit モデルでは(3-1-26) – (3-1-29)の式を用いる。また lac-reporter + AraC decoy circuit モデルでは(3-1-26)と(3-1-28) – (3-1-30)の式を用いる。

$$f(X) = \frac{\gamma}{c_e + \omega_a X_a + \omega_r X_r + \omega_d X_d} \quad (3-1-26)$$

$$X_a = a_{uf} + a + 2a_2 + 2 \sum_{i=1}^3 \sum_{k=0}^2 \sum_{l=0}^1 P_{1,k,l}^i$$

$$i \in \{a, r, d\}, k \in \{0, 1, 2\}, l \in \{0, L\} \quad (3-1-27)$$

$$X_r = r_{uf} + r + 2r_2 + 4r_4 + 4 \sum_{i=1}^3 \sum_{j=0}^1 \sum_{l=0}^1 P_{j,1,l}^i + 8 \sum_{i=1}^3 \sum_{j=0}^1 P_{j,2,0}^i$$

$$i \in \{a, r, d\}, j \in \{0, 1\}, l \in \{0, L\} \quad (3-1-28)$$

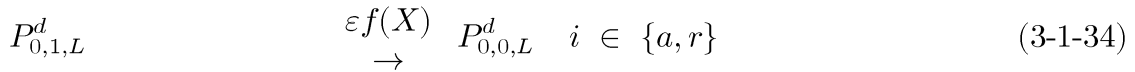
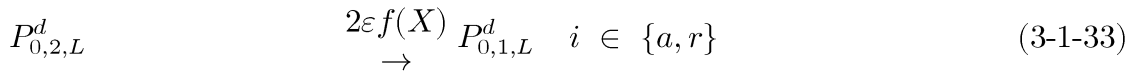
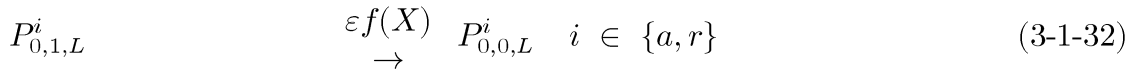
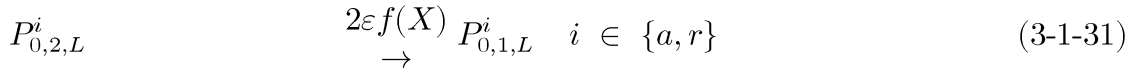
$$X_d = d_{u,f} + d \quad l \in \{0, L\} \quad (3-1-29)$$

$$X_a = a_{u,f} + a + 2a_2 + 2D_1 + 2 \sum_{i=1}^3 \sum_{k=0}^2 \sum_{l=0}^1 P_{1,k,l}^i$$

$$i \in \{a, r, d\}, k \in \{0, 1, 2\}, l \in \{0, L\} \quad (3-1-30)$$

とした。

この章で導入した2つのモデルでは各分子の分解の動態は以下の化学反応式(3-1-31) – (3-1-54)により表した。



$$m^r \quad \begin{array}{c} d_r \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-36)$$

$$m^d \quad \begin{array}{c} d_d \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-37)$$

$$a_{uf} \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-38)$$

$$r_{uf} \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-39)$$

$$d_{uf} \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-40)$$

$$a \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-41)$$

$$r \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-42)$$

$$d \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-43)$$

$$a_2 \quad \begin{array}{c} \lambda f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-44)$$

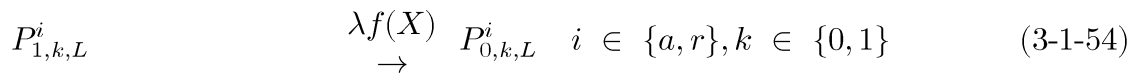
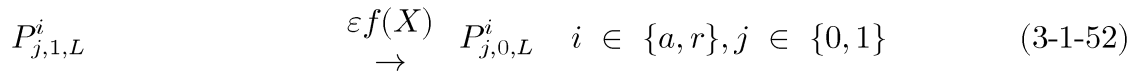
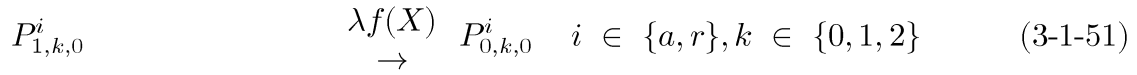
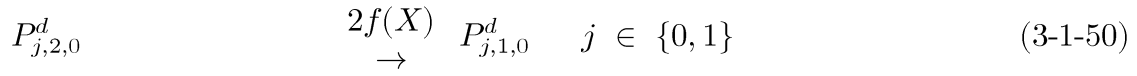
$$r_2 \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-45)$$

$$r_4 \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad \emptyset \quad (3-1-46)$$

$$P_{j,1,0}^i \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad P_{j,0,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (3-1-47)$$

$$P_{j,2,0}^i \quad \begin{array}{c} 2f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad P_{j,1,0}^i \quad i \in \{a, r\}, j \in \{0, 1\} \quad (3-1-48)$$

$$P_{j,1,0}^d \quad \begin{array}{c} f(X) \\ \rightarrow \end{array} \quad P_{j,0,0}^d \quad j \in \{0, 1\} \quad (3-1-49)$$



とした。

また lac-reporter + AraC decoy circuit モデルでの AraC デコイサイトにおける AraC 二量体タンパク質の結合・解離、及び分解は以下の化学反応式(3-1-55) – (3-1-56)により表した。



$$D_1 \xrightarrow{\lambda f(X)} D_0 \quad (3-1-56)$$

導入したDNAのコピー数(N_i , $i = a, r, d, decoy$)は、以下の式により表した。

このとき lac-reporter circuit モデルでは以下の(3-1-57) – (3-1-59)式に従う。また lac-reporter + AraC decoy circuit モデルでは(3-1-57) – (3-1-60)式に従う。

$$P_{0,0,L}^a = N_a - (P_{0,0,0}^a + P_{0,1,0}^a + P_{0,2,0}^a + P_{1,0,0}^a + P_{1,1,0}^a + P_{1,2,0}^a + P_{0,1,L}^a + P_{1,0,L}^a + P_{1,1,L}^a) \quad (3-1-57)$$

$$P_{0,0,L}^r = N_r - (P_{0,0,0}^r + P_{0,1,0}^r + P_{0,2,0}^r + P_{1,0,0}^r + P_{1,1,0}^r + P_{1,2,0}^r + P_{0,1,L}^r + P_{1,0,L}^r + P_{1,1,L}^r) \quad (3-1-58)$$

$$P_{0,0,L}^d = N_d - (P_{0,0,0}^d + P_{0,1,0}^d + P_{0,2,0}^d + P_{0,1,L}^d) \quad (3-1-59)$$

$$D_0 = N_{decoy} - D_1 \quad (3-1-60)$$

微分方程式で lac-reporter circuit モデルを表した場合、下記の(3-2-1) – (3-2-34)となる。

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,0,0}^a &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^a + k_{-a} P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a + k_{-r} P_{0,1,0}^a + k_{ul} P_{0,0,L}^a \\ &+ \lambda f(X) P_{1,0,0}^a + f(X) P_{0,1,0}^a \end{aligned} \quad (3-2-1)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,1,0}^a = 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a - k_{-r} P_{0,1,0}^a - k_a a_2 P_{0,1,0}^a + k_{-a} P_{1,1,0}^a - k_l P_{0,1,0}^a$$

$$\begin{aligned}
& + k_{-l}P_{0,1,L}^a - k_r r_4 P_{0,1,0}^a + 2k_{-r}P_{0,2,0}^a + \lambda f(X)P_{1,1,0}^a - f(X)P_{0,1,0}^a \\
& + 2f(X)P_{0,2,0}^a
\end{aligned} \tag{3-2-2}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}P_{0,2,0}^a & = k_r r_4 P_{0,1,0}^a - 2k_{-r}P_{0,2,0}^a - k_a a_2 P_{0,2,0}^a + k_{-a}P_{1,2,0}^a + \lambda f(X)P_{1,2,0}^a \\
& - 2f(X)P_{0,2,0}^a
\end{aligned} \tag{3-2-3}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}P_{0,0,0}^r & = -k_a a_2 P_{0,0,0}^r + k_{-a}P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r + k_{-r}P_{0,1,0}^r + k_{ul}P_{0,0,L}^r \\
& + \lambda f(X)P_{1,0,0}^r + f(X)P_{0,1,0}^r
\end{aligned} \tag{3-2-4}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}P_{0,1,0}^r & = 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r - k_{-r}P_{0,1,0}^r - k_a a_2 P_{0,1,0}^r + k_{-a}P_{1,1,0}^r - k_l P_{0,1,0}^r \\
& + k_{-l}P_{0,1,L}^r - k_r r_4 P_{0,1,0}^r + 2k_{-r}P_{0,2,0}^r + \lambda f(X)P_{1,1,0}^r - f(X)P_{0,1,0}^r \\
& + 2f(X)P_{0,2,0}^r
\end{aligned} \tag{3-2-5}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}P_{0,2,0}^r & = k_r r_4 P_{0,1,0}^r - 2k_{-r}P_{0,2,0}^r - k_a a_2 P_{0,2,0}^r + k_{-a}P_{1,2,0}^r + \lambda f(X)P_{1,2,0}^r \\
& - 2f(X)P_{0,2,0}^r
\end{aligned} \tag{3-2-6}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}P_{1,0,0}^a & = k_a a_2 P_{0,0,0}^a - k_{-a}P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a + k_{-r}P_{1,1,0}^a - \lambda f(X)P_{1,0,0}^a \\
& + f(X)P_{1,1,0}^a + k_{ul}P_{1,0,L}^a
\end{aligned} \tag{3-2-7}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}P_{1,1,0}^a & = k_a a_2 P_{0,1,0}^a - k_{-a}P_{1,1,0}^a + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a - k_{-r}P_{1,1,0}^a - k_l P_{1,1,0}^a \\
& - k_r r_4 P_{1,1,0}^a + 2k_{-r}P_{1,2,0}^a - (\lambda + 1)f(X)P_{1,1,0}^a + 2f(X)P_{1,2,0}^a \\
& + k_{-l}P_{1,1,L}^a
\end{aligned} \tag{3-2-8}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dx}P_{1,2,0}^a & = k_a a_2 P_{0,2,0}^a - k_{-a}P_{1,2,0}^a + k_r r_4 P_{1,1,0}^a - 2k_{-r}P_{1,2,0}^a \\
& - (\lambda + 2)f(X)P_{1,2,0}^a
\end{aligned} \tag{3-2-9}$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,0}^r &= k_a a_2 P_{0,0,0}^r - k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r + k_{-r} P_{1,1,0}^r - \lambda f(X) P_{1,0,0}^r \\ &+ f(X) P_{1,1,0}^r + k_{ul} P_{1,0,L}^r \end{aligned} \quad (3-2-10)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,0}^r &= k_a a_2 P_{0,1,0}^r - k_{-a} P_{1,1,0}^r + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r - k_{-r} P_{1,1,0}^r - k_l P_{1,1,0}^r \\ &- k_r r_4 P_{1,1,0}^r + 2k_{-r} P_{1,2,0}^r - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^r + 2f(X) P_{1,2,0}^r \\ &+ k_{-l} P_{1,1,L}^r \end{aligned} \quad (3-2-11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,2,0}^r &= k_a a_2 P_{0,2,0}^r - k_{-a} P_{1,2,0}^r + k_r r_4 P_{1,1,0}^r - 2k_{-r} P_{1,2,0}^r \\ &- (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^r \end{aligned} \quad (3-2-12)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,L}^a &= k_l P_{0,1,0}^a - k_{-l} P_{0,1,L}^a + \lambda f(X) P_{1,1,L}^a - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^a - k_a a_2 P_{0,1,L}^a \\ &+ k_a P_{1,1,L}^a \end{aligned} \quad (3-2-13)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,L}^r &= k_l P_{0,1,0}^r - k_{-l} P_{0,1,L}^r + \lambda f(X) P_{1,1,L}^r - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^r - k_a a_2 P_{0,1,L}^r \\ &+ k_a P_{1,1,L}^r \end{aligned} \quad (3-2-14)$$

$$\frac{d}{dx} m^a = b_a P_{0,0,0}^a + \alpha b_a P_{1,0,0}^a - d_a m^a \quad (3-2-15)$$

$$\frac{d}{dx} m^r = b_r P_{0,0,0}^r + \alpha b_r P_{1,0,0}^r - d_r m^r \quad (3-2-16)$$

$$\frac{d}{dx} a_{uf} = t_a m^a - k_{fa} a_{uf} - \lambda f(X) a_{uf} \quad (3-2-17)$$

$$\frac{d}{dx} a_{uf} = t_r m^r - k_{fr} r_{uf} - f(X) r_{uf}$$

(3-2-18)

$$\frac{d}{dx}a = k_{fa}a_{uf} - 2a^2 + 2k_{-da}a_2 - \lambda f(X)a$$

(3-2-19)

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}a_2 = & -k_a a_2 (P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r + P_{0,0,0}^d) + k_{-a} (P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) + k_{-a} (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r + P_{0,2,0}^d) + k_{-a} (P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,0,L}^a + P_{0,0,L}^r + P_{0,0,L}^d) + k_{-a} (P_{1,0,L}^a + P_{1,0,L}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,1,L}^a + P_{0,1,L}^r + P_{0,1,L}^d) + k_{-a} (P_{1,1,L}^a + P_{1,1,L}^r) \\ & + k_{da}a^2 - k_{da}a_2 - \lambda f(X)a_2 \end{aligned}$$

(3-2-20)

$$\frac{d}{dx}r = k_{fr}r_{uf} - 2k_{dr}r^2 + 2k_{-dr}r_2 - f(X)r$$

(3-2-21)

$$\frac{d}{dx}r_2 = k_{dr}r^2 - k_{-dr}r_2 - 2k_t r_2^2 + 2k_{-t}r_4 - f(X)r_2$$

(3-2-22)

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}r_4 = & -2k_r r_4 (P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r + P_{0,0,0}^d) + k_{-r} (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) \\ & - k_r r_4 (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) + 2k_{-r} (P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r + P_{0,2,0}^d) \\ & - 2k_r r_4 (P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r) + k_{-r} (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) \\ & - k_r r_4 (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) + 2k_{-r} (P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r) \\ & + k_t r_2^2 - k_{-t}r_4 - f(X)r_4 \end{aligned}$$

(3-2-23)

$$\frac{d}{dx} P_{0,0,0}^d = -2k_r r_4 P_{0,0,0}^d + k_{-r} P_{0,1,0}^d + k_{ul} P_{0,0,L}^d + f(X) P_{0,1,0}^d \quad (3-2-24)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,0}^d &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^d - k_{-r} P_{0,1,0}^d - k_l P_{0,1,0}^d + k_{-l} P_{0,1,L}^d - k_r r_4 P_{0,1,0}^d \\ &+ 2k_{-r} P_{0,2,0}^d - f(X) P_{0,1,0}^d + 2f(X) P_{0,2,0}^d \end{aligned} \quad (3-2-25)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,2,0}^d = k_r r_4 P_{0,1,0}^d - 2k_{-r} P_{0,2,0}^d - 2f(X) P_{0,2,0}^d \quad (3-2-26)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^d = k_l P_{0,1,0}^d - k_{-l} P_{0,1,L}^d + \lambda f(X) P_{1,1,L}^d - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^d \quad (3-2-27)$$

$$\frac{d}{dx} m^d = b_d P_{0,0,0}^d + \alpha b_d P_{1,0,0}^d - d_d m^d \quad (3-2-28)$$

$$\frac{d}{dx} d_{uf} = t_d m^d - k_{fg} d_{uf} - \beta f(X) d_{uf} \quad (3-2-29)$$

$$\frac{d}{dx} d = k_{fg} d_{uf} - \beta f(X) d \quad (3-2-30)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,L}^a &= \varepsilon f(X) P_{1,1,L}^a - \lambda f(X) P_{1,0,L}^a - k_{ul} P_{1,0,L}^a + k_a a_2 P_{0,0,L}^a \\ &- k_{-a} P_{1,0,L}^a \end{aligned} \quad (3-2-31)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,L}^r &= \varepsilon f(X) P_{1,1,L}^r - \lambda f(X) P_{1,0,L}^r - k_{ul} P_{1,0,L}^r + k_a a_2 P_{0,0,L}^r \\ &- k_{-a} P_{1,0,L}^r \end{aligned} \quad (3-2-32)$$

$$\frac{d}{dx} P_{1,1,L}^a = k_l P_{1,1,0}^a - \varepsilon f(X) P_{1,1,L}^a - \lambda f(X) P_{1,1,L}^a - k_l P_{1,1,L}^a - k_a P_{1,1,L}^a$$

$$+ k_a a_2 P_{0,1,L}^a \quad (3-2-33)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,L}^r &= k_l P_{1,1,0}^r - \varepsilon f(X) P_{1,1,L}^r - \lambda f(X) P_{1,1,L}^r - k_l P_{1,1,L}^r - k_a P_{1,1,L}^r \\ &+ k_a a_2 P_{0,1,L}^r \end{aligned} \quad (3-2-34)$$

微分方程式で lac-reporter + AraC decoy circuit モデルを表した場合、下記の (3-3-1) – (3-3-35) となる。

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,0,0}^a &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^a + k_{-a} P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a + k_{-r} P_{0,1,0}^a + k_{ul} P_{0,0,L}^a \\ &+ \lambda f(X) P_{1,0,0}^a + f(X) P_{0,1,0}^a \end{aligned} \quad (3-3-1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,0}^a &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^a - k_{-r} P_{0,1,0}^a - k_a a_2 P_{0,1,0}^a + k_{-a} P_{1,1,0}^a - k_l P_{0,1,0}^a \\ &+ k_{-l} P_{0,1,L}^a - k_r r_4 P_{0,1,0}^a + 2k_{-r} P_{0,2,0}^a + \lambda f(X) P_{1,1,0}^a - f(X) P_{0,1,0}^a \\ &+ 2f(X) P_{0,2,0}^a \end{aligned} \quad (3-3-2)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,2,0}^a &= k_r r_4 P_{0,1,0}^a - 2k_{-r} P_{0,2,0}^a - k_a a_2 P_{0,2,0}^a + k_{-a} P_{1,2,0}^a + \lambda f(X) P_{1,2,0}^a \\ &- 2f(X) P_{0,2,0}^a \end{aligned} \quad (3-3-3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,0,0}^r &= -k_a a_2 P_{0,0,0}^r + k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r + k_{-r} P_{0,1,0}^r + k_{ul} P_{0,0,L}^r \\ &+ \lambda f(X) P_{1,0,0}^r + f(X) P_{0,1,0}^r \end{aligned} \quad (3-3-4)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,0}^r &= 2k_r r_4 P_{0,0,0}^r - k_{-r} P_{0,1,0}^r - k_a a_2 P_{0,1,0}^r + k_{-a} P_{1,1,0}^r - k_l P_{0,1,0}^r \\ &+ k_{-l} P_{0,1,L}^r - k_r r_4 P_{0,1,0}^r + 2k_{-r} P_{0,2,0}^r + \lambda f(X) P_{1,1,0}^r - f(X) P_{0,1,0}^r \\ &+ 2f(X) P_{0,2,0}^r \end{aligned} \quad (3-3-5)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,2,0}^r = k_r r_4 P_{0,1,0}^r - 2k_{-r} P_{0,2,0}^r - k_a a_2 P_{0,2,0}^r + k_{-a} P_{1,2,0}^r + \lambda f(X) P_{1,2,0}^r$$

$$- 2f(X)P_{0,2,0}^r \quad (3-3-6)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,0}^a &= k_a a_2 P_{0,0,0}^a - k_{-a} P_{1,0,0}^a - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a + k_{-r} P_{1,1,0}^a - \lambda f(X) P_{1,0,0}^a \\ &+ f(X) P_{1,1,0}^a + k_{ul} P_{1,0,L}^a \end{aligned} \quad (3-3-7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,0}^a &= k_a a_2 P_{0,1,0}^a - k_{-a} P_{1,1,0}^a + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^a - k_{-r} P_{1,1,0}^a - k_l P_{1,1,0}^a \\ &- k_r r_4 P_{1,1,0}^a + 2k_{-r} P_{1,2,0}^a - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^a + 2f(X) P_{1,2,0}^a \\ &+ k_{-l} P_{1,1,L}^a \end{aligned} \quad (3-3-8)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,2,0}^a &= k_a a_2 P_{0,2,0}^a - k_{-a} P_{1,2,0}^a + k_r r_4 P_{1,1,0}^a - 2k_{-r} P_{1,2,0}^a \\ &- (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^a \end{aligned} \quad (3-3-9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,0,0}^r &= k_a a_2 P_{0,0,0}^r - k_{-a} P_{1,0,0}^r - 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r + k_{-r} P_{1,1,0}^r - \lambda f(X) P_{1,0,0}^r \\ &+ f(X) P_{1,1,0}^r + k_{ul} P_{1,0,L}^r \end{aligned} \quad (3-3-10)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,1,0}^r &= k_a a_2 P_{0,1,0}^r - k_{-a} P_{1,1,0}^r + 2k_r r_4 P_{1,0,0}^r - k_{-r} P_{1,1,0}^r - k_l P_{1,1,0}^r \\ &- k_r r_4 P_{1,1,0}^r + 2k_{-r} P_{1,2,0}^r - (\lambda + 1) f(X) P_{1,1,0}^r + 2f(X) P_{1,2,0}^r \\ &+ k_{-l} P_{1,1,L}^r \end{aligned} \quad (3-3-11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{1,2,0}^r &= k_a a_2 P_{0,2,0}^r - k_{-a} P_{1,2,0}^r + k_r r_4 P_{1,1,0}^r - 2k_{-r} P_{1,2,0}^r \\ &- (\lambda + 2) f(X) P_{1,2,0}^r \end{aligned} \quad (3-3-12)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} P_{0,1,L}^a &= k_l P_{0,1,0}^a - k_{-l} P_{0,1,L}^a + \lambda f(X) P_{1,1,L}^a - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^a - k_a a_2 P_{0,1,L}^a \\ &+ k_a P_{1,1,L}^a \end{aligned} \quad (3-3-13)$$

$$\frac{d}{dx} P_{0,1,L}^r = k_l P_{0,1,0}^r - k_{-l} P_{0,1,L}^r + \lambda f(X) P_{1,1,L}^r - \varepsilon f(X) P_{0,1,L}^r - k_a a_2 P_{0,1,L}^r$$

$$+ k_a P_{1,1,L}^r \quad (3-3-14)$$

$$\frac{d}{dx} m^a = b_a P_{0,0,0}^a + \alpha b_a P_{1,0,0}^a - d_a m^a \quad (3-3-15)$$

$$\frac{d}{dx} m^r = b_r P_{0,0,0}^r + \alpha b_r P_{1,0,0}^r - d_r m^r \quad (3-3-16)$$

$$\frac{d}{dx} a_{uf} = t_a m^a - k_{fa} a_{uf} - \lambda f(X) a_{uf} \quad (3-3-17)$$

$$\frac{d}{dx} a_{ur} = t_r m^r - k_{fr} a_{ur} - f(X) a_{ur} \quad (3-3-18)$$

$$\frac{d}{dx} a = k_{fa} a_{uf} - 2a^2 + 2k_{-da} a_2 - \lambda f(X) a \quad (3-3-19)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx} a_2 = & -k_a a_2 (P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r + P_{0,0,0}^d) + k_{-a} (P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) + k_{-a} (P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r + P_{0,2,0}^d) + k_{-a} (P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,0,L}^a + P_{0,0,L}^r + P_{0,0,L}^d) + k_{-a} (P_{1,0,L}^a + P_{1,0,L}^r) \\ & - k_a a_2 (P_{0,1,L}^a + P_{0,1,L}^r + P_{0,1,L}^d) + k_{-a} (P_{1,1,L}^a + P_{1,1,L}^r) \\ & + k_{da} a^2 - k_{da} a_2 - \lambda f(X) a_2 - k_a a_2 D_0 + k_{-a} D_1 \end{aligned} \quad (3-3-20)$$

$$\frac{d}{dx} r = k_{fr} a_{ur} - 2k_{dr} r^2 + 2k_{-dr} r_2 - f(X) r$$

(3-3-21)

$$\frac{d}{dx}r_2 = k_{dr}r_2^2 - k_{-dr}r_2 - 2k_t r_2^2 + 2k_{-t}r_4 - f(X)r_2$$

(3-3-22)

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}r_4 = & -2k_r r_4(P_{0,0,0}^a + P_{0,0,0}^r + P_{0,0,0}^d) + k_{-r}(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) \\ & - k_r r_4(P_{0,1,0}^a + P_{0,1,0}^r + P_{0,1,0}^d) + 2k_{-r}(P_{0,2,0}^a + P_{0,2,0}^r + P_{0,2,0}^d) \\ & - 2k_r r_4(P_{1,0,0}^a + P_{1,0,0}^r) + k_{-r}(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) \\ & - k_r r_4(P_{1,1,0}^a + P_{1,1,0}^r) + 2k_{-r}(P_{1,2,0}^a + P_{1,2,0}^r) \\ & + k_t r_2^2 - k_{-t}r_4 - f(X)r_4 \end{aligned}$$

(3-3-23)

$$\frac{d}{dx}P_{0,0,0}^d = -2k_r r_4 P_{0,0,0}^d + k_{-r}P_{0,1,0}^d + k_{ul}P_{0,0,L}^d + f(X)P_{0,1,0}^d$$

(3-3-24)

$$\frac{d}{dx}P_{0,1,0}^d = 2k_r r_4 P_{0,0,0}^d - k_{-r}P_{0,1,0}^d - k_l P_{0,1,0}^d + k_{-l}P_{0,1,L}^d - k_r r_4 P_{0,1,0}^d$$

$$+ 2k_{-r}P_{0,2,0}^d - f(X)P_{0,1,0}^d + 2f(X)P_{0,2,0}^d \quad (3-3-25)$$

$$\frac{d}{dx}P_{0,2,0}^d = k_r r_4 P_{0,1,0}^d - 2k_{-r}P_{0,2,0}^d - 2f(X)P_{0,2,0}^d$$

(3-3-26)

$$\frac{d}{dx}P_{0,1,L}^d = k_l P_{0,1,0}^d - k_{-l}P_{0,1,L}^d + \lambda f(X)P_{1,1,L}^d - \varepsilon f(X)P_{0,1,L}^d$$

(3-3-27)

$$\frac{d}{dx}m^d = b_d P_{0,0,0}^d + \alpha b_d P_{1,0,0}^d - d_d m^d$$

(3-3-28)

$$\frac{d}{dx}d_{uf} = t_d m^d - k_{fg}d_{uf} - \beta f(X)d_{uf}$$

(3-3-29)

$$\frac{d}{dx}d = k_{fg}d_{uf} - \beta f(X)d$$

(3-3-30)

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,0,L}^a &= \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^a - \lambda f(X)P_{1,0,L}^a - k_{ul}P_{1,0,L}^a + k_a a_2 P_{0,0,L}^a \\ &\quad - k_{-a}P_{1,0,L}^a \end{aligned}$$

(3-3-31)

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,0,L}^r &= \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^r - \lambda f(X)P_{1,0,L}^r - k_{ul}P_{1,0,L}^r + k_a a_2 P_{0,0,L}^r \\ &\quad - k_{-a}P_{1,0,L}^r \end{aligned}$$

(3-3-32)

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,1,L}^a &= k_l P_{1,1,0}^a - \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^a - \lambda f(X)P_{1,1,L}^a - k_l P_{1,1,L}^a - k_a P_{1,1,L}^a \\ &\quad + k_a a_2 P_{0,1,L}^a \end{aligned}$$

(3-3-33)

$$\begin{aligned} \frac{d}{dx}P_{1,1,L}^r &= k_l P_{1,1,0}^r - \varepsilon f(X)P_{1,1,L}^r - \lambda f(X)P_{1,1,L}^r - k_l P_{1,1,L}^r - k_a P_{1,1,L}^r \\ &\quad + k_a a_2 P_{0,1,L}^r \end{aligned}$$

(3-3-34)

$$\frac{d}{dx}D_1 = k_a D_0 - k_{-a} D_1 - \lambda f(X) D_1$$

(3-3-35)

上記の数理モデルから数値解析ソフトウェア MATLAB(MathWorks)による ode45 ソルバーを用いた決定論による数値シミュレーションを行った[50]。

lac/ara-reporter circuit モデルの初期値は、

$$[P_{0,0,0}^a, P_{0,1,0}^a, P_{0,2,0}^a, P_{1,0,0}^a, P_{1,1,0}^a, P_{1,2,0}^a, P_{0,1,L}^a, P_{1,0,L}^a, P_{1,1,L}^a, P_{0,0,0}^r, P_{0,1,0}^r,$$

$$P_{0,2,0}^r, P_{1,0,0}^r, P_{1,1,0}^r, P_{1,2,0}^r, P_{0,1,L}^r, P_{1,0,L}^r, P_{1,1,L}^r, P_{0,0,0}^d, P_{0,1,0}^d, P_{0,2,0}^d, P_{1,0,0}^d,$$

$$P_{1,1,0}^d, P_{1,2,0}^d, P_{0,1,L}^d, P_{1,0,L}^d, P_{1,1,L}^d, m^a, m^r, m^d, a_{uf}, r_{uf}, d_{uf}, a, r, d, a_2, r_2,$$

$$r_4 = 0,$$

$$0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 \text{ (molecules)}$$

とした。

lac -reporter circuit モデルの初期値は、

$$[P_{0,0,0}^a, P_{0,1,0}^a, P_{0,2,0}^a, P_{0,1,L}^a, P_{0,0,0}^r, P_{0,1,0}^r, P_{0,2,0}^r, P_{0,1,L}^r, P_{0,0,0}^d, P_{0,1,0}^d, P_{0,2,0}^d,$$

$$P_{0,1,L}^d, m^a, m^r, m^d, a_{uf}, r_{uf}, d_{uf}, a, r, d, a_2, r_2, r_4 = 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,$$

$$0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 \text{ (molecules)}$$

とした。

lac-reporter + AraC decoy circuit モデルの初期値は、

$$[P_{0,0,0}^a, P_{0,1,0}^a, P_{0,2,0}^a, P_{0,1,L}^a, P_{0,0,0}^r, P_{0,1,0}^r, P_{0,2,0}^r, P_{0,1,L}^r, P_{0,0,0}^d, P_{0,1,0}^d, P_{0,2,0}^d,$$

$$P_{0,1,L}^d, m^a, m^r, m^d, a_{uf}, r_{uf}, d_{uf}, a, r, d, a_2, r_2, r_4, D_1 = 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,$$

$$0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 \text{ (molecules)}]$$

とした。

そして以下の手順により線形安定性解析を行い平衡点の安定性を求めた。まず上記の4つの微分方程式を、Newton-Raphson法で線形近似することにより平衡点を求めた。そして平衡点でのヤコビ行列内の全ての固有値が負の実部を持つとき、その平衡点は安定であるとした。全ての固有値が負の実部を持つことを確認するためには、ラウスの方法を用いた。

そして arabinose、IPTG 濃度の対数グラフにおいて、MATLAB の ODE シミュレーションでの各分子の振幅を MATLAB の疑似カラー“jet”によってプロットした。特に線形安定性解析から安定固定点としたところは黒色でプロットした。

3.3.2 フローサイトメーターによるGFP蛍光強度測定

GFP の蛍光強度測定は Stricker 氏らの手法[29]にわずかに変更を加えて行った。まず抗生物質を加えた LB 培地に $OD_{590} = 0.1$ になるように菌体を希釈し、 37°C で一晩培養した。そして LB で 100 倍希釈のちに誘導剤である 0.1%のアラビノースを添加した場合としない場合で、 37°C で 2 時間培養した。培養後、培養液を 1 mL ずつ遠心分離機で遠心し、LB 培地をリン酸緩衝生理食塩水へと置換した。そして吸収波長 488nm, 励起波長 515–545 nm でのフローサイトメーターでの測定を行った(FACSCalibur; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)。GFP の蛍光強度測定にはポジティブコントロールとして、GFP が恒常

発現する Ptet-*gfp* プラスミドのみを導入した大腸菌株を用いた。またネガティブコントロールとして、GFP が発現しない PBAD/*ara* プラスミドのみを導入した大腸菌株を用いた。

3.3.3 人工遺伝子回路を導入した大腸菌の顕微鏡観察

人工遺伝子回路を導入した大腸菌の観察した画像は全て対物レンズ(CFI Plan Apo 40x objective lens; Nikon Instruments Inc.)と EMCCD カメラ(iXon3 897; Andor Technology Ltd., Belfast, Northern Ireland)を装着した Eclipse Ti-E 顕微鏡 Eclipse Ti-E inverted microscope (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan)を用いて撮影した。顕微鏡画像は NIS-Elements ソフトウェア(Nikon Instruments Inc.)を用いて解析した。微分干渉画像はハロゲンランプ(HLL 12V 100W; Nikon Instruments Inc.)を用いて撮影し、蛍光画像は水銀ランプ(Intensilight C-HGFIE; Nikon Instruments Inc.)と GFP 用のフィルターキューブ(GFP-HQ filter cube, EX455-485, DM495, BA500-545; Nikon Instruments Inc.)を用いて撮影した。

撮影する菌体は以下の手順により取得した。まず一晩 LB 培地で培養した大腸菌を、抗生物質濃度(50 μ g/mL ampicillin and 30 μ g/mL kanamycin)の新たな LB 培地 3 mL へと 100 倍希釈で添加した。そして 37°C で大腸菌の濁度が OD590 = 0.2 になるように培養した (およそ 30~60 分程度)。そして 1 mL の培養液へ至適の濃度の誘導剤アラビノースと IPTG を加える。そして培養液 400 μ L を、ガラスプレートと 2%のアガロースパッド (直径 12 mm、厚さ 3 mm 程度、至適濃度の誘導剤を添加している) の間に添加する。顕微鏡用の培養器(Thermo Plate; Tokai Hit Co., Ltd, Shizuoka, Japan)で 37°C 30 分の培養の後に、顕微鏡で微分干渉像と GFP 蛍光像を、37°C でそれぞれ 3 分毎に計 3 時間の撮影をした。

3.3.4 大腸菌コロニーを観察するための画像解析

大腸菌マイクロコロニーから導入した遺伝子の振動の動態を解析するために、私は MATLAB ソフトウェア(MathWorks, Natick, MA, USA)と ImageJ [65, 66]を用いて、大腸菌マイクロコロニーの認識、背景除去、蛍光の定量を行った (図 3-5)。そして結果として 310 個のマイクロコロニーからヒートマップを取得し、プロットすることができた。それぞれのマイクロコロニーは数個の大腸菌から増殖した結果、3 時間の測定で最終的に数百細胞の大腸菌を含んでいた。この画

像解析では、一つの視野においてそれぞれ1~3個のマイクロコロニーを含んだ微分干渉像を利用した。大腸菌マイクロコロニーの認識では、3つのフィルター処理と一つの二値化処理を行った。大腸菌マイクロコロニー領域とその近隣領域間の認識を行う背景除去では、画像の背景にポアソン分布で存在する光子ノイズを除去する目的で行う[67-69]。

大腸菌マイクロコロニーの認識の過程では、まず微分干渉像(512 × 512 pixel, 16-bit)をImageJ上でコントラストを増加させることにより細部を強調するシャープネスフィルターをかけた。このとき各ピクセルを周囲3 × 3の $[-1 -1 -1; -1 +12 -1; -1 -1 -1]$ で重み付けした平均値で置き換えた。そして次にカーネル $[-1 -1 -1 -1 -1; -1 -1 -1 -1 -1; -1 -1 24 -1 -1; -1 -1 -1 -1 -1; -1 -1 -1 -1 -1]$ 上で空間的な畳み込みを行った。そして畳み込みを行った画像に対してガウスフィルターによりぼかしを行った。そして最終的に大津の二値化法[70]により微分干渉像からマイクロコロニーの形の認識を行った。なおもし大腸菌マイクロコロニー同士が衝突することがあれば、そのマイクロコロニーは以下の過程で利用するマイクロコロニーからは除外した。画像内の二値化したマイクロコロニーの面積は最終的に1,000~100,000 pixels程度となった。

背景除去においては、背景の輝度は元画像から二値化されたマイクロコロニーの形を除去することにより行う。このときSternberg氏の方法に変更を加えて行った[67]。マイクロコロニー内の背景における蛍光強度を除去するために、私は二値化したマイクロコロニー領域から20 pixelほど広げた「ドーナツ状」領域を定義した。マイクロコロニーの蛍光強度は隣接した「ドーナツ状」領域の平均蛍光強度を減算することにより求めることとした。次に蛍光画像全体に4回のメディアンフィルター(50, 50, 50, 10 pixels)をかけて各々のマイクロコロニーの背景における蛍光強度を求めた。この背景における蛍光強度を元々の蛍光画像から減算することにより、マイクロコロニー内の細胞の蛍光強度を算出した。

蛍光強度の定量においては、まずマイクロコロニー内における細胞の増殖に合わせた時系列ごとの蛍光強度の測定を行った。その結果、以下の過程から最終的に273個のマイクロコロニーから計15,768の時系列を得た。蛍光強度の定量は、マイクロコロニーの生育に合わせたトラッキング過程と時系列決定過程により構成されている(図3-4-1)。トラッキング過程においては画像間での共

通常のマイクロコロニーを認識するために、ImageJ のプラグインである MTrackJ を用いた手動でのバックトラッキングを行った[71]。特にこの方法は一つの画像に多数のマイクロコロニーが存在する場合やマイクロコロニーが移動する場合に有効である。マイクロコロニーの生育に合わせた時系列決定の過程においては、マイクロコロニーの面積と重心座標の変化を記録して、細胞の時系列系譜を決めた。細胞の時系列系譜をバックトラックする最初の座標を得るために、二値化した微分干渉像の最終時間の画像へとランダムな XY 座標と角度を決めた 3×2 pixel の長方形を配置した。この長方形は大腸菌の一つの細胞の大きさに対応するものである。もしこのランダムに配置した長方形が少しでも二値化されたマイクロコロニー領域から外れた場合、その長方形はその後の解析からは除外した。もし長方形が二値化されたマイクロコロニー領域内に入っていた場合、マイクロコロニーの重心座標と長方形の重心座標から距離ベクトルを定義した。

$$\overrightarrow{x_{t=n}} = \overrightarrow{c_{t=n}} + \overrightarrow{L_{t=n}}$$

(x :長方形の重心、 c :マイクロコロニーの重心、 L :距離ベクトル、 n :フレーム番号) バックトラックによる長方形の移動は、マイクロコロニーの生育に合わせた現在のフレームと直前のフレーム間の情報による以下の式により求めた。

$$\begin{aligned} \overrightarrow{x_{t=n-1}} &= \overrightarrow{c_{t=n-1}} + \overrightarrow{L_{t=n-1}} = \overrightarrow{c_{t=n-1}} + \overrightarrow{L_{t=n}} \frac{S_n}{S_{n-1}} \\ &= \overrightarrow{c_{t=n-1}} + (\overrightarrow{x_{t=n}} - \overrightarrow{c_{t=n}}) \frac{S_n}{S_{n-1}} \end{aligned}$$

(S : マイクロコロニーの面積)

もしバックトラックした長方形が同一時系列の同一のマイクロコロニー内になれば、その長方形は解析から除外した。上記のバックトラックアルゴリズムにより、最終的に 2 種類の大腸菌株から全ての誘導剤条件において、15,768 の時系列データ、そのうち総計で 961,848 の座標データを得て解析を行った。そしてその座標データを基に蛍光画像から蛍光強度を得て、バックグラウンドを差し引くことにより各軌道の蛍光強度の時系列データを算出した。

蛍光強度の定量における第二の過程は、先の過程において得た蛍光強度の時系列データから振動の”底”となる点の回数の決定である (図 3-4-2)。まず細胞内でのタンパク質発現のノイズと振動を区別するために、3 分毎計 180 分の 1 つの時系列において、12 分での移動平均を求めた。そしてその 12 分での移動平

均から振動の底となる点の回数を数えた。振動の底となる部分を求めるために、まず一時的な底となる点を、直前と直後の蛍光強度よりも小さくなる点として定義した。同様に一時的な頂点を、直前と直後の蛍光強度よりも大きくなる点として定義した。そして、隣接する一時的な頂点の間にある一時的な底となる点の振動強度が隣接する一時的な頂点の蛍光強度の 0.2 倍以上の場合、振動の底となる点から除外した (図 3-4-2)。

蛍光強度の定量における第三の過程は、とある誘導剤条件における振動の底となる点の回数の累積相対度数の集積・プロットである (図 3-4-3)。時系列間の振動の底となる点の回数は降順に並べ、累積度数分布図においてプロットした。そしてとある誘導剤条件における累積度数分布図から、3 回以上振動の底となる点が観察される時系列データの割合を算出した。

蛍光強度の定量における最後の過程は、誘導剤条件ごとに 3 回以上振動の底となる点が観察される時系列データの割合をカラーマップ上での表示である (図 3-4-4)。誘導剤条件は(アラビノース: 0.01%, 0.1% or 1.0%; IPTG: 0, 0.01, 0.1, 1.0 or 10 mM)の組み合わせの計 15 条件である。なお疑似カラーとして MATLAB の組み込みカラーである”jet”を利用して表示した。

3.4 結果

3.4.1 数理モデル化・シミュレーションによる、様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した場合の振動子遺伝子の挙動変化

下流レポーター遺伝子から AraC タンパク質結合サイトを取り除いた lac-reporter circuit モデルのシミュレーションは、lac/ara-reporter circuit モデルよりも、アラビノースと IPTG の誘導剤濃度のパラメーター領域において狭い振動領域を示した(図 3-5)。このとき両モデルにおいて、lac/ara プロモーターと lac プロモーターは同じ最大転写効率になるようにパラメーターを定めた。そして私は高アラビノース濃度条件での、lac/ara-reporter circuit モデルと lac-reporter circuit モデルの ODE(Ordinary Differential Equations) シミュレーションの比較を行った(図 3-5(a)-(d))。またアラビノースと IPTG の誘導剤濃度のパラメーター領域における線形安定性解析から、lac-reporter circuit モデルのシミュレーションは、lac/ara-reporter circuit モデルよりも、狭い振動領域を示した(図 3-5(e)-(f))。特に高アラビノース低 IPTG 濃度条件において、lac-reporter circuit モデルは lac/ara-reporter circuit モデルよりも短い周期の振動を示した(図 3-5(b), (d), (e), (f))。また高アラビノース高 IPTG 濃度条件において、lac-reporter circuit モデルにおいては振動しなかったのに対して lac/ara-reporter circuit モデルにおいては振動していることが確認された(図 3-5(a), (c), (e), (f))。したがって同じ構成の上流制御遺伝子群と同じ最大転写効率の下流レポーター遺伝子群を持つのに関わらず、lac/ara-reporter circuit モデルと lac-reporter circuit モデルでは違う挙動を示した。これは *in silico* でのレトロアクティビティの例である[12-14]。

3.4.2 顕微鏡観察による、様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した場合の振動子遺伝子の挙動変化

顕微鏡実験における GFP 観察において、同じ上流制御遺伝子を持っているのに関わらず、とある誘導剤条件では lac/ara-reporter circuit を導入した大腸菌は振動しているのにも関わらず、lac-reporter circuit を導入した大腸菌は振動しなかった(図 3-6(a), (c))。言い換えるのならば、顕微鏡観察からは下流回路の DNA 上のタンパク質結合サイトのコピー数が異なっているときに上流の回路の挙動が変化するというレトロアクティビティを示したと言える[13, 19, 53]。

lac/ara-reporter circuit を導入した大腸菌ではとある 2 箇所のアラビノース-IPTG 条件において振動していたのに関わらず(図 3-6(a), (b))、lac-reporter circuit を導入した大腸菌ではその 1 つの条件では振動していたが(図 3-6(d))、別の条件では振動しなくなっていた(図 3-6(c))。

顕微鏡観察の詳細な解析を行う前に、私は lac/ara プロモーターと lac プロモーターの最大転写効率が同一であることを確認した。lac/ara プロモーターは過去の研究で報告された既知の配列のものであり [49]、lac プロモーターは lac/ara プロモーターを改変して作成した(図 3-7、付録 1)。lac/ara プロモーターから AraC タンパク質結合サイトを除き、-35, -10 配列を変更することに作成した。アクチベーターである AraC タンパク質結合サイトがなくなるために、lac プロモーターは-35, -10 配列を変更することにより転写効率を上げるようにした。なお転写効率を上昇させるための-35, -10 配列は過去の知見を基にデザインした [72]。そして作成した lac プロモーターと lac/ara プロモーターの GFP 蛍光強度測定を行い、蛍光強度の違いが 1.3 倍程度であることを確認した(図 3-8)。特に下流レポーター遺伝子の転写効率を変えたときのシミュレーション結果から(図 3-9(a), (b))、lac/ara プロモーターと lac プロモーターの最大転写効率の 1.3 倍の違いは、アラビノース IPTG のパラメーター領域においては振動する領域にあまり違いは出ないことから、今回ではこの 1.3 倍の違いは無視できる。また lac プロモーターにおける 1.3 倍以上の最大転写効率についても誘導剤濃度領域において振動する領域にほとんど違いは見られなかった(図 3-9(b)-(d))。以上の結果から今回作成した lac/ara プロモーターと lac プロモーターは同等の最大転写効率を持つ。また lac/ara-reporter circuit モデルを導入した大腸菌と lac-reporter circuit モデルを導入した大腸菌ではシミュレーション結果とも対応していると考えられる。

そして前項目でのシミュレーション結果から予測されるように顕微鏡実験と画像解析の結果から、lac/ara-reporter circuit モデルを導入した大腸菌と lac-reporter circuit モデルを導入した大腸菌はアラビノース IPTG パラメーター領域において異なる振動の挙動を示した(図 3-6, 3-10, 3-11)。振動の挙動を比較するためにはノイズと振動を区別する必要がある。GFP の定常発現株ではわずかに GFP の発現量の変動する(図 3-12)[73]。そのため図 3-4 と上述の画像解析の手法により、振動の底となる点の回数を数えることにより振動の評価を行った。そして数百から数千の時系列データから(図 3-13)、私は 3 分毎計 180 分の

顕微鏡タイムラプス画像から3回以上振動の底を数えた割合を比較した。GFP定常発現株である *Ptet-gfp* を導入した大腸菌と既知の論文において振動が観察される株・条件(*lac/ara-circuit* を導入した大腸菌、0.7% アラビノース、2 mM IPTG)[29]において、3回以上振動の底を数えた割合はそれぞれ0.089と0.318と顕著な違いが見られた。上記のGFP定常発現株と振動株の結果を基に、*lac/ara-reporter circuit* を導入した株と *lac-reporter circuit* を導入した株を様々な誘導剤条件において撮影した顕微鏡タイムラプス画像から振動の動態を評価した(図3-6, 3-10, 3-11)。

興味深いことにシミュレーションの結果と顕微鏡実験の結果は一致しており(図3-5, 3-6)、振動における誘導剤の効果は同等であると言える。高アラビノース低IPTG濃度でのシミュレーションと顕微鏡実験において、*lac/ara-reporter circuit* と *lac-reporter circuit* は共に振動していた(図3-5(b), (d)-(f), 3-6(b), (d), (f), (h)-(j), 3-10, 3-11)。そして低アラビノース濃度でのシミュレーションと顕微鏡実験において、両株は遺伝子発現のノイズによる変動と区別できないほどの低振幅で振動しているか、振動していないままであった(図3-5(e), (f), 3-6(i), (j), 3-10, 3-11)。一方高アラビノース高IPTG濃度でのシミュレーションと顕微鏡実験において(図3-5(e), (f), 3-6(i), (j), 3-10, 3-11)、*lac/ara-reporter circuit* を導入した大腸菌では明らかな振動が観察されたのに対して(図3-5(a), 3-6(a), (e), 3-10, 3-11)、*lac-reporter circuit* を導入した大腸菌では振動しなかった(図3-5(c), 3-6(c), (g), 3-10, 3-11)。

3.4.3 奪い合い効果を考慮した数理モデル化・シミュレーションによる、様々なプロモーターの下流遺伝子を付加した場合の振動子遺伝子の挙動変化

レトロアクティビティと関連して、DNA上の多数のタンパク質結合サイトの構造を持った遺伝子回路をシミュレーションや顕微鏡で観察した結果、下流の遺伝子回路において同一数だが異なった構造を持つタンパク質結合サイトを持つときに上流の遺伝子回路の挙動が変化する連続的レトロアクティビティという現象を数理モデル化・シミュレーションすることができた(図3-14, 3-15, 3-16, 3-17)。*lac/ara-reporter circuit* と *lac-reporter circuit* の間で異なる振動の動態を示した理由として、細胞内におけるAraCタンパク質結合サイトのコピー数が異なることが上げられる(図3-1(a)-(i), (ii))。そのため私は *lac-reporter circuit* にAraCデコイサイトを加えることにより細胞内におけるAraCタンパク

質結合サイトのコピー数を同一にした lac-reporter + AraC decoy circuit モデルを新たに数理モデルとして用いて解析した(図 3-1(a)-(iii))。しかし、lac/ara-reporter circuit モデルと lac-reporter + AraC decoy circuit モデルは同一の AraC 結合サイトのコピー数を持つのに関わらず(図 3-1(a)-(i), (iii))、(図 3-14(a), (c))。言い換えると、lac/ara-reporter circuit モデルと lac-reporter circuit モデルの間の振動の動態の違いは(図 3-14 (a), (b))、遺伝子回路で異なっているタンパク質結合サイトのコピー数の違いは解消されたのに関わらず、デコイサイトを付加したあとでも残ったままであった(図 3-14, (a), (c))。

そのため上流制御タンパク質からタンパク質結合サイトへの競合(図 3-1(a))と標的タンパク質からタンパク質分解酵素への競合(図 3-1(b))の 2 種類の分子競合のうちの 1 つずつを除外したときの振動を比較することにより、連続的レトロアクティビティの原因を探った(図 3-14, 3-15, 3-16, 3-17)。下流の遺伝子回路から 2 種類の競合を両方取り除いた場合、3 種類の人工遺伝子回路全ては同じ振動領域と振幅を示した(図 3-14)。下流の人工遺伝子回路から標的タンパク質からタンパク質分解酵素への競合のみを加えた場合、連続的レトロアクティビティが起きることがわかった(図 3-14(d)-(f))。つまり lac/ara-reporter circuit モデルと lac-reporter + AraC decoy circuit モデルで同じコピー数の AraC 結合サイトを持つのに関わらず、これらの二つの回路が異なる振動領域を示した。また下流の人工遺伝子回路における上流制御タンパク質からタンパク質結合サイトへの競合のみを加えた場合、振動する領域と振幅にわずかに違いが見られた(図 3-14(g)-(l))。lac/ara-reporter circuit モデルから AraC タンパク質結合サイトの数を減らしたときに lac-reporter circuit モデルにおいて安定固定点が変わらずに変化したのに関わらず(図 3-14(g), (h))、lac-reporter circuit モデルからデコイサイトとして AraC 結合サイトを復帰させた lac-reporter + AraC decoy circuit モデルは lac/ara-reporter circuit モデルと同じ安定固定点を示した。この復帰はタンパク質結合サイトとそこへ結合するタンパク質間での遷移図から説明することができる(図 3-1(a), 3-3)。下流レポータータンパク質である GFP 生産における lac/ara プロモーターと lac プロモーターの違いはタンパク質分解酵素の奪い合いの効果で説明することができる(図 3-16(d),(j); (e), (k); (f), (l))。下流におけるタンパク質結合サイトの奪い合いとタンパク質分解酵素の奪い合いの両方がないときに 3 つの回路は同じ挙動を示すが、タンパク質分解酵素の奪い合いから解放されているために lac-reporter circuit モデルと

lac-reporter + AraC decoy circuit モデルにおける GFP 生産は(図 3-16(k), (l))、lac/ara-reporter circuit モデルよりも(図 3-16(j))高い生産量を示した。以上のシミュレーション結果から既存のレトロアクティビティに加えて連続的レトロアクティビティの存在を示すことができた(図 3-1)。

3.5 結果のまとめと考察

この章における2つの発見は、制御遺伝子回路と下流レポーター遺伝子や代謝回路から構成される遺伝子回路設計における、将来の正確な設計への知見となりうる。第一の発見として、同一の上流制御遺伝子をもつ遺伝子回路において下流レポーター遺伝子が異なるタンパク質結合サイトを持つときに、*in vivo*において異なる挙動をすることを示した。第二の発見として、同一の上流制御遺伝子回路に同数のタンパク質結合サイトを持つ下流レポーター遺伝子を持つ場合では異なる挙動をするという連続的レトロアクティビティの存在を示した。

上記の発見を示すために、生体を用いた二次元上の状態遷移図において(図3-5, 3-6)、AraCアクチベータタンパク質とLacIリプレッサータンパク質の2種類の制御タンパク質から構成される上流制御回路をもつ人工遺伝子回路を構築した。過去の*in silico*での研究[12, 13]や*in vivo*の研究では[14]、単一の制御タンパク質を用いてレトロアクティビティの存在を示していた。それらの*in silico*や*in vivo*での結果は、遺伝子回路の動態を観察するためには必須でない制御遺伝子タンパク質やそれらの結合サイトの数を増減させることによりレトロアクティビティの示している[19, 74, 75]。本章での結果は、遺伝子回路の挙動を示すために必要なレポーター遺伝子による*in vivo*と*in silico*のレトロアクティビティの存在を示した。本章で示したレトロアクティビティは、2章での*in silico*での多種類の制御タンパク質によるレトロアクティビティから発展したものである[16]。2章では制御遺伝子にlac/araプロモーターで駆動するレポーター遺伝子の有無を比較することにより、制御遺伝子の動態が変化することを示した。更に本章では、lac/araプロモーターやlacプロモーターといった様々なプロモーターを付加した下流レポーター遺伝子において、2次元の状態遷移図の基*in silico*と*in vivo*でのレトロアクティビティを示した。

本章の数値モデルでは同一数の制御タンパク質結合サイトを持つのに関わらず上流制御遺伝子の挙動が変化するという、連続的レトロアクティビティがタンパク質分解酵素の奪い合いにより生じることを初めて明らかにした(図3-14)。本章での場合、タンパク質分解酵素の奪い合いは振動における振幅に影響を与えており振動周期を短くするという効果を与えている(図3-14(d), (j); (e), (k); (f), (l), 3-17)。本章での数値モデルはタンパク質結合サイトの奪い合いとタンパク質分解酵素の奪い合いの両方の効果が存在しているが(図3-14(d)-(f))、連続的レトロアクティビティはタンパク質分解酵素の奪い合いに

よるものである。タンパク質分解酵素の奪い合いは、タンパク質分解酵素の標的となる分解タグ付けされた制御タンパク質の分解速度定数に、直接影響を与えている。またタンパク質分解酵素の奪い合いは、ON-OFF間のプロモーター遷移の調整に影響を与えており、間接的には振動の動態に影響を与えている(図 3-14(a)-(c))。この間接的効果は、細胞内における AraC の自由分子の数の違いによるものである(図 3-15)。タンパク質分解酵素の奪い合いによる同様の効果は、過去の知見では直接的な影響や間接的な影響を区別していないが、タンパク質分解酵素の標的となる分子を他の遺伝子回路から供給された場合にも生じることが知られている[20-22, 75]。

本章で示した上流と下流の部位を結合した遺伝子回路における分子競合は、同じ直流電源を共有する上流と下流の部位が結合した電気電子回路における電圧の競合に関連付いている(図 3-18(a))。第二章では上流と下流の部位の結合により、制御タンパク質から DNA 上のタンパク質結合部位の奪い合いによるレトロアクティビティが振動子の動態を変化させることを見いだした[16]。同様に遺伝子回路におけるインピーダンスを見いだした。本章ではタグ特異的タンパク質分解酵素といった細胞における広範にわたる材料もインピーダンスに関連付いていることを示す。タンパク質分解酵素の濃度の上昇は標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いを回避する(図 3-18(b))。電気電子回路において直流電流からシグナル増幅回路への十分な電圧供給は、下流の部位が接続されていても、両方の回路が駆動することを保証する。そして高濃度のタンパク質分解酵素は生きた細胞におけるタンパク質生産の低いコストでの生産があったとしても、直流電流からの低出力インピーダンスでの電圧供給に関連している。一方、タンパク質分解酵素の濃度の減少は直流電源における出力インピーダンスの上昇と関連している(図 3-18(c))。電気電子回路におけるインピーダンス整合のトレードオフと同様に、生きた細胞内の遺伝子回路におけるこれらのトレードオフは、合成生物学における大規模な遺伝子回路の設計において重要である。生きた細胞における代謝系のような他の生体分子の共有は電気電子回路における電源の共有と似ていると言える。

本章におけるシミュレーションと顕微鏡観察の結果から、レポーター遺伝子設計において、同一のコーディング配列を持つ場合が異なるプロモーター領域を持つ場合に上流制御遺伝子の挙動が変化しうることを示した。特に下流レポーター遺伝子は、制御タンパク質からその結合サイトへの奪い合いと標的タン

パク質からそのタグ特異的タンパク質分解酵素への奪い合いの混合により、上流制御遺伝子ネットワークの動態へと影響を与えることを示した。また本章の結果は、合成生物学だけでなく生物プロセスの分析においてレポーター遺伝子におけるプロモーター領域の選択が重要な留意点となることを示している。例えば、高レトロアクティビティは内在の遺伝子ネットワークを攪乱するため、低レトロアクティビティは内在の遺伝子ネットワークを観察するのに適していると考えられる。分子生物学における低レトロアクティビティの有用性と同様に、合成生物学を含んだ遺伝子工学での高レトロアクティビティでの設計は自身の所望の特性を振る舞わせるために重要になると考えられる。

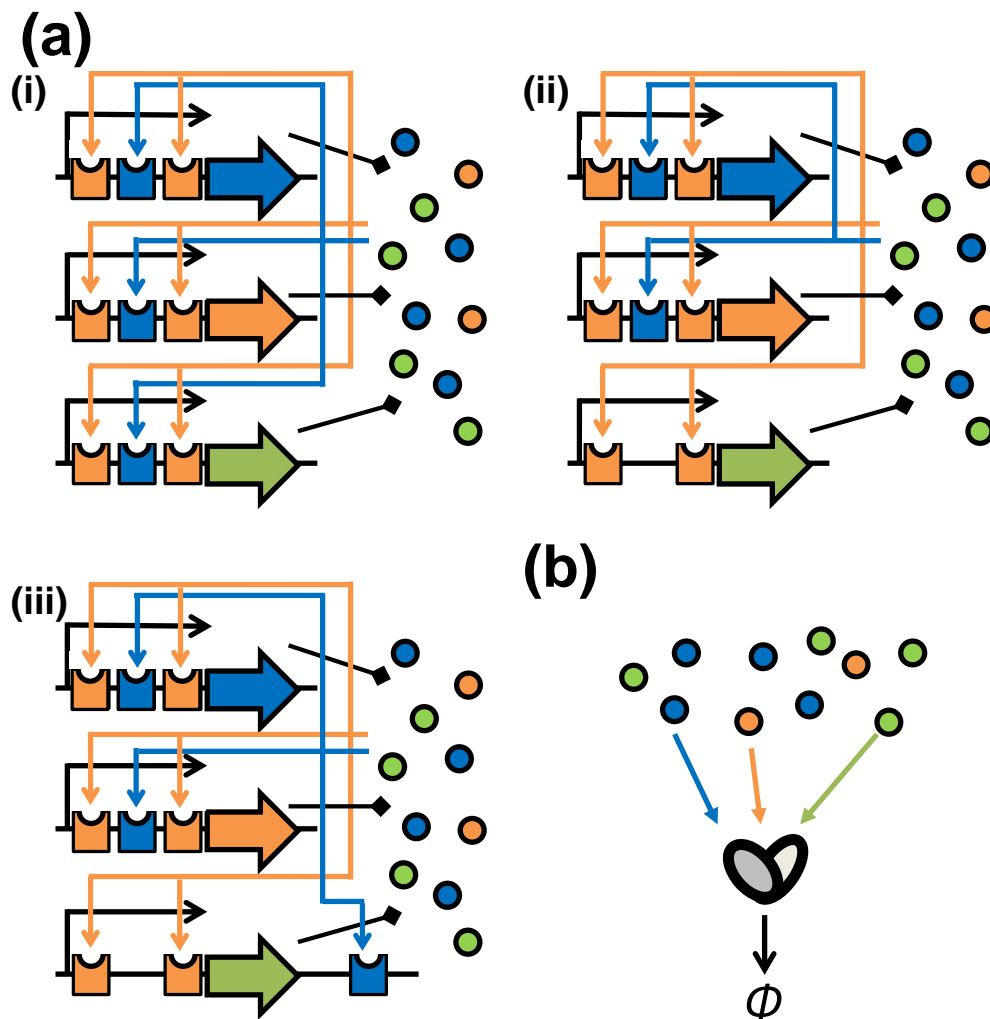


図 3-1 人工遺伝子回路における制御遺伝子到下流遺伝子が与える影響

(a)プロモーター内における制御遺伝子群タンパク質結合サイトが制御遺伝子群タンパク質を奪い合う効果 (b)大量のタンパク質が限られた数のタンパク質分解酵素を奪い合う効果

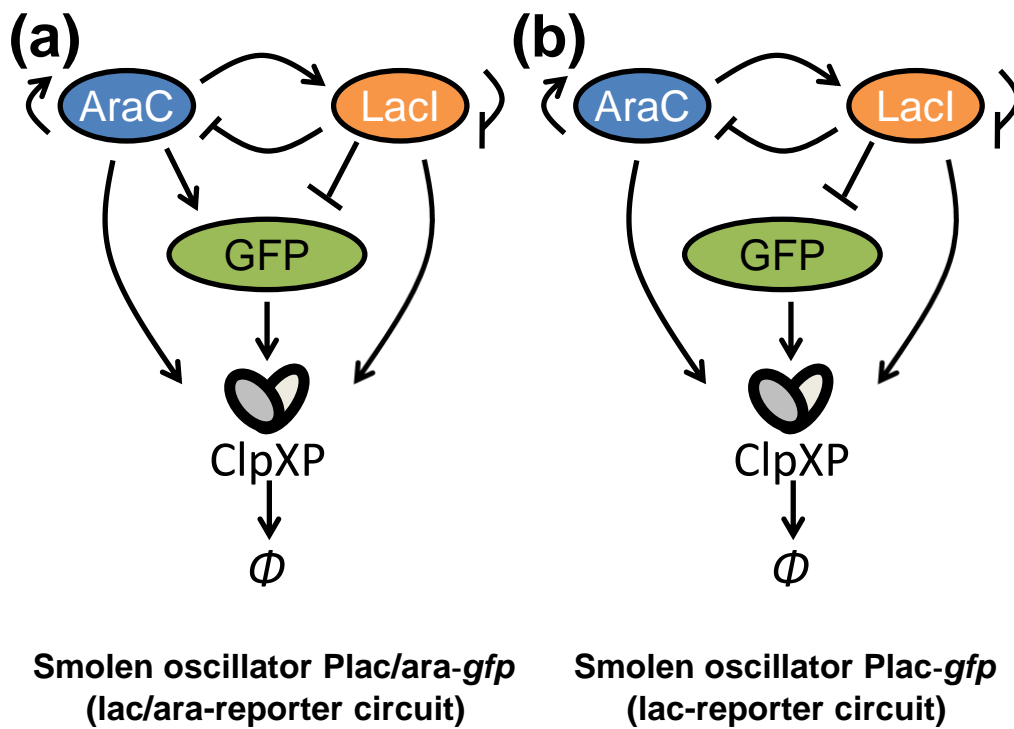


図 3-2 下流遺伝子プロモーターの変化を調べるための人工遺伝子回路モデル

(a) lac/ara-reporter circuit モデル (b) lac-reporter circuit モデル

AraC と LacI は Smolen はポジティブフィードバックとネガティブフィードバックのループを形成している。GFP はこの振動子の下流遺伝子である。ClpXP は ssrA でタグ付けされたタンパク質(AraC, LacI, GFP)を特異的に認識して分解する。

(a)

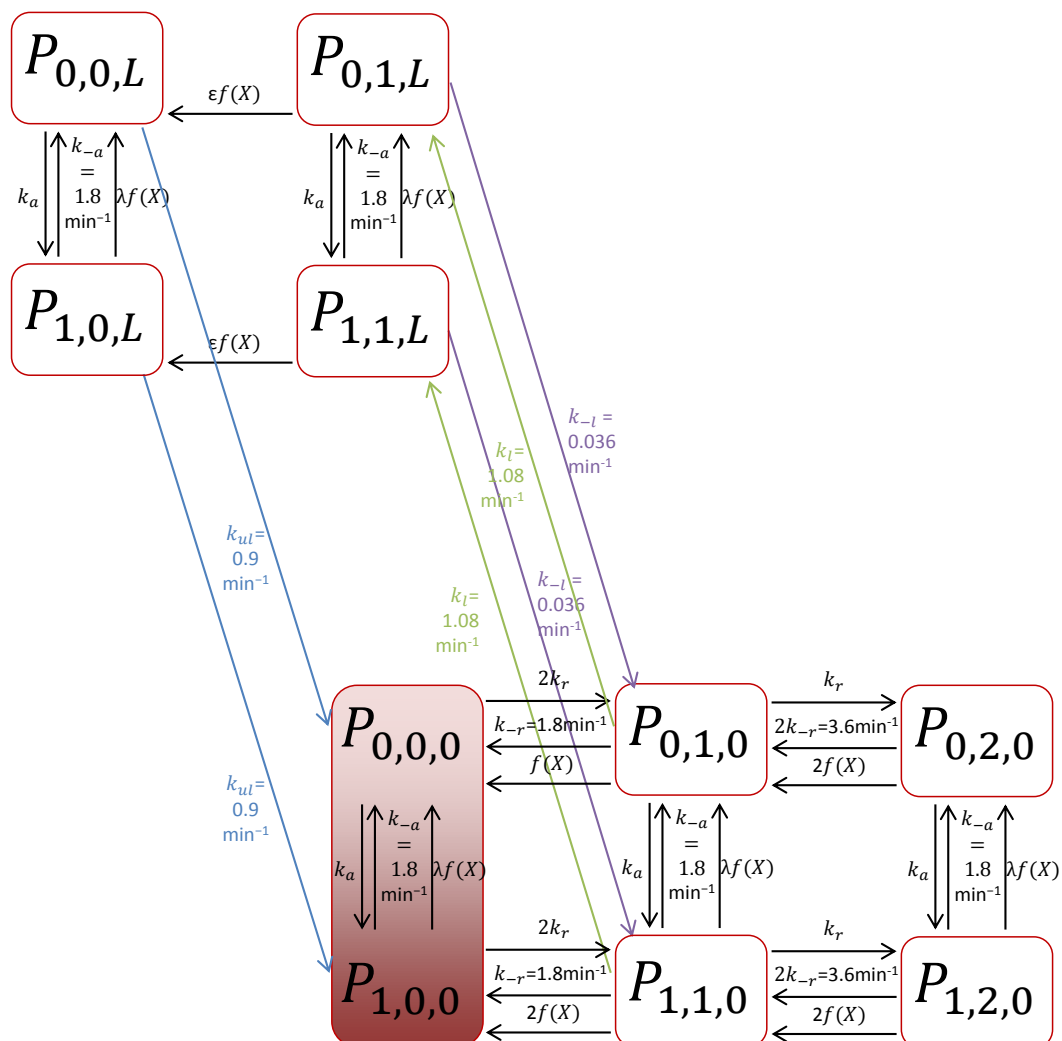


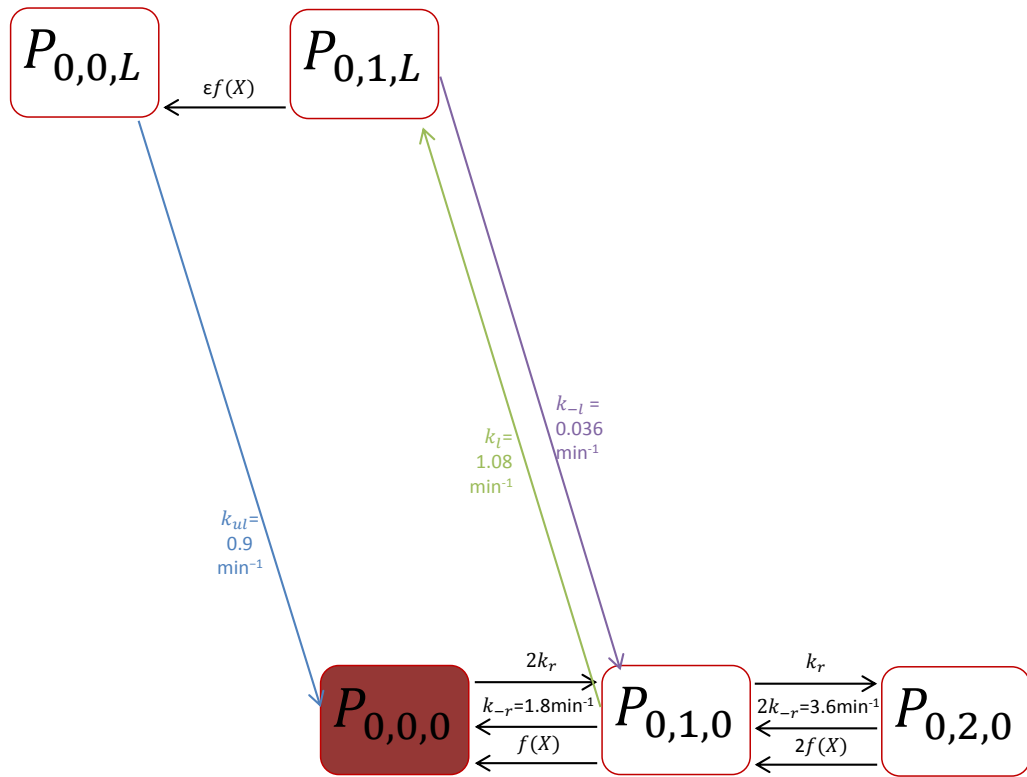
図 3-3 人工遺伝子回路内のプロモーター遷移図

(a) lac/ara プロモーター遷移図。lac/ara-reporter circuit モデル内の *araC* コーディングプロモーター、*lacI* コーディングプロモーター、*gfp* コーディングプロモーター、lac-reporter circuit モデル内の *araC* コーディングプロモーター、*lacI* コーディングプロモーターに適用される。

(b) lac プロモーター遷移図。lac-reporter circuit モデル内の *gfp* コーディングプロモーターに適用される。

(c) lac プロモーター+AraC デコイ遷移図。lac-reporter + AraC decoy circuit モデル内の *gfp* コーディングプロモーターと AraC デコイに適用される。

(b)



(c)

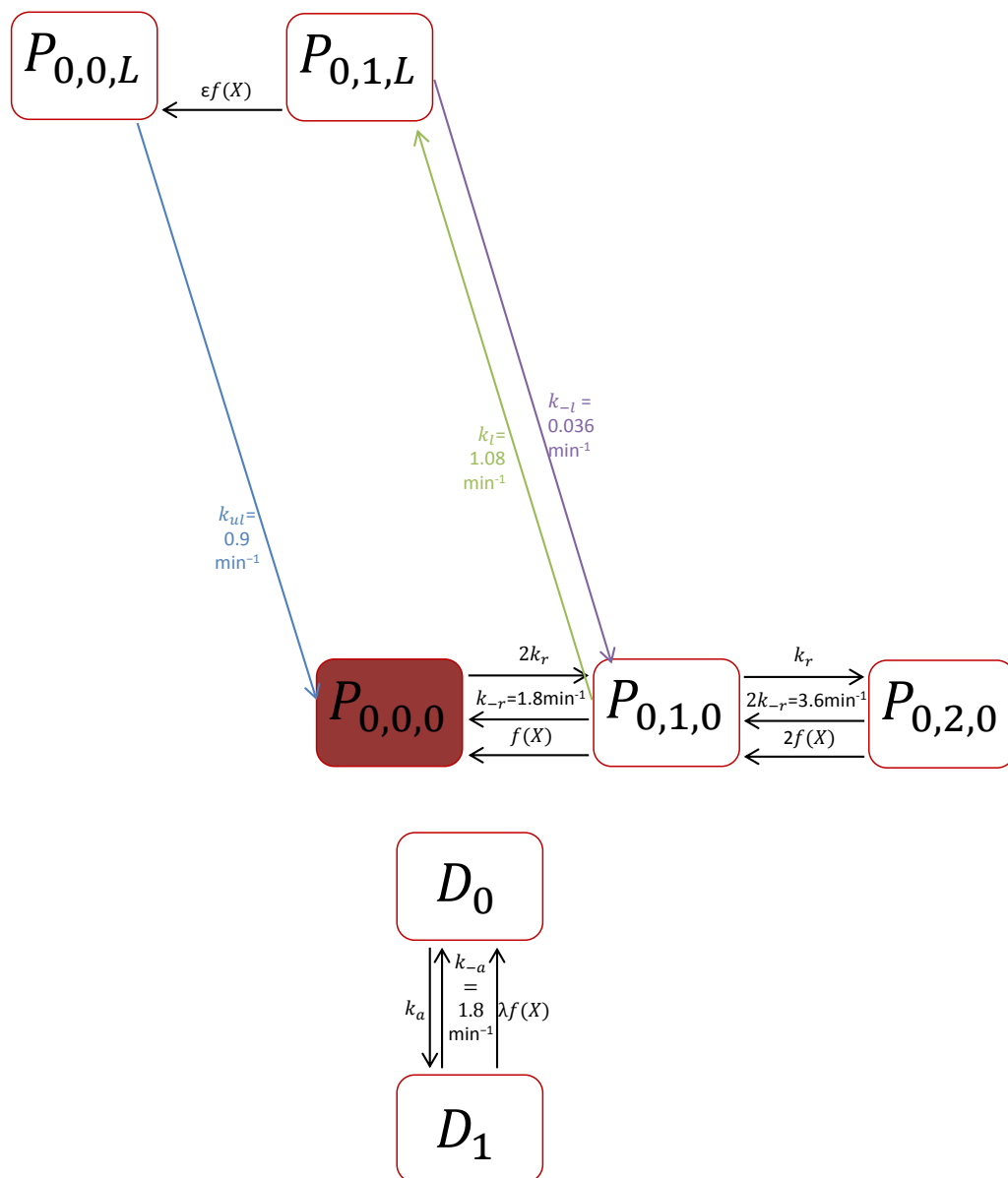


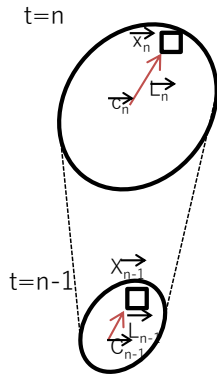
図 3-4 蛍光の定量から振動における底の回数を数えるための画像解析の過程

ノイズが存在している状況で振動の強さを確認するために、以下の4つのステップを経てパラメーター領域ごとの顕微鏡画像から振動の強さを評価した。蛍光強度の経時変化は1つの誘導剤条件で少なくとも4つのマイクロコロニーから測定した。詳細な画像解析の過程は、材料と方法に記述している。

1. マイクロコロニーの生育に合わせた細胞のバックトラック。
2. とある誘導剤条件における各時系列の振動の底の回数の測定。
3. とある誘導剤条件における振動の底の回数の相対度数の累計度数分布のプロット。X軸：降順に並べたときの振動の底の回数の割合。Y軸：振動の底を数えた回数。
4. 全ての誘導剤条件における3回以上の振動の底を数えた割合のプロット。

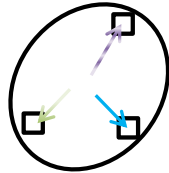
1

マイクロコロニーの生育に合わせたバクトラッキング

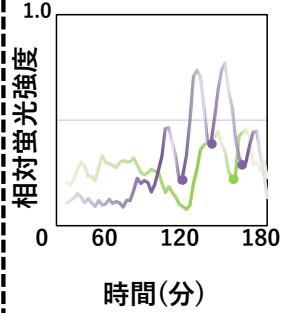


2

とある誘導剤条件における各時系列の振動の底の回数の測定

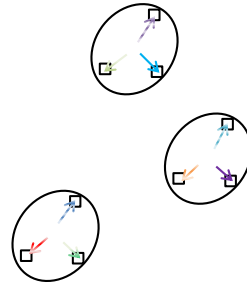


- A: 三回振動の底を数えた時系列
- B: 一回振動の底を数えた時系列

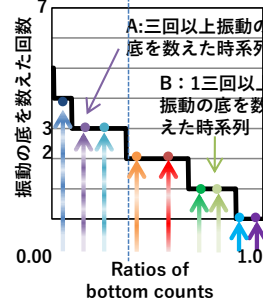


3

とある誘導剤条件における振動の底の回数の相対累積度数分布のプロット

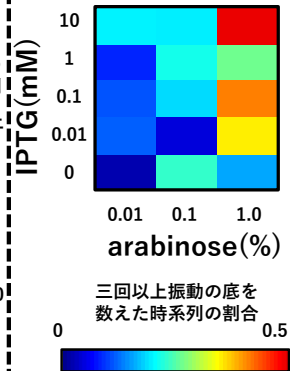
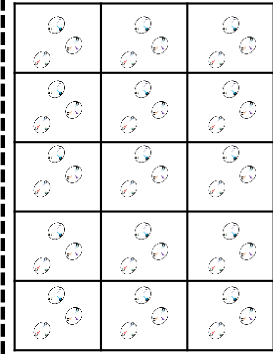


三回以上振動の底を数えた時系列の割合 = 0.354



4

全ての誘導剤条件における3回以上振動の底を数えた割合のプロット



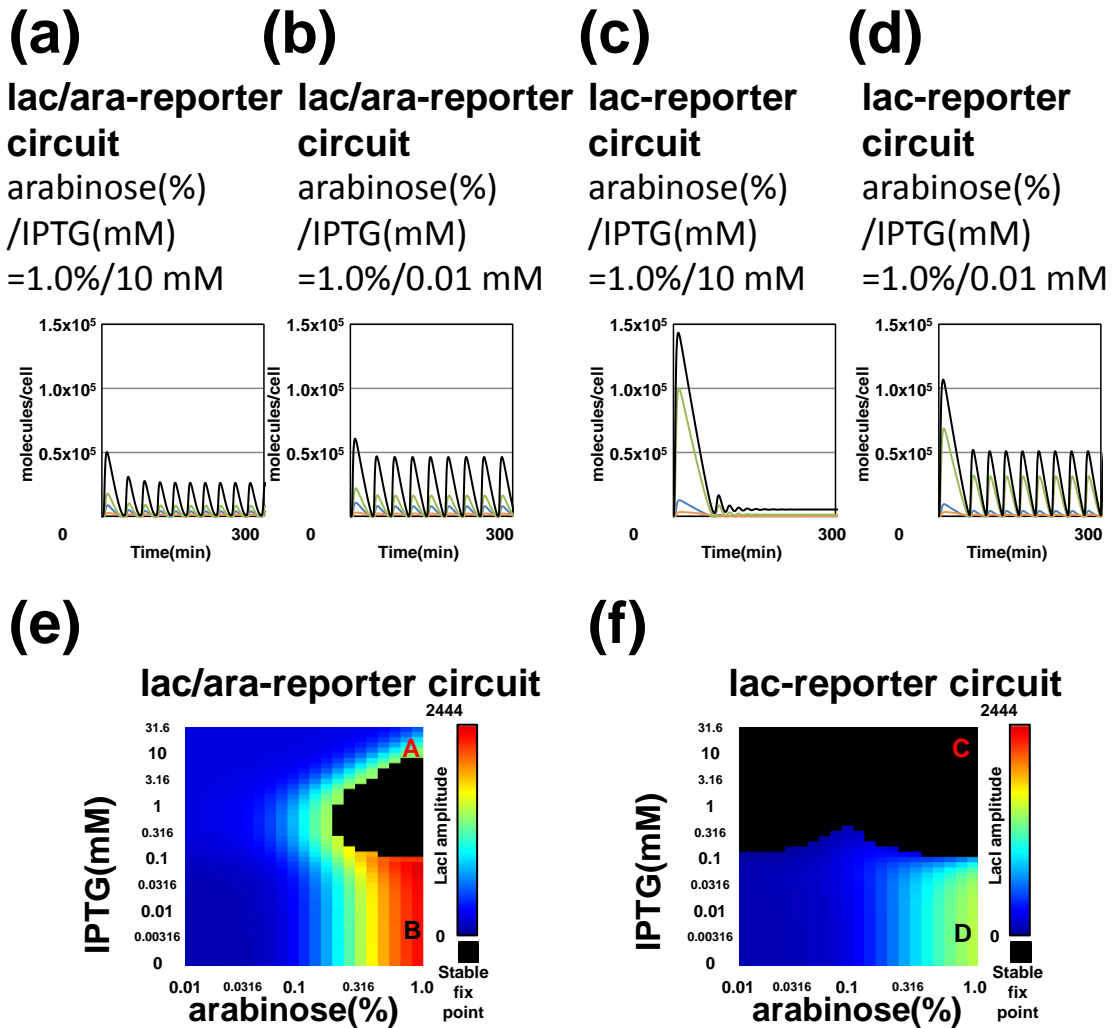


図 3-5 様々なプロモーターを持つレポーター遺伝子を付加した振動子の人工遺伝子回路の数理モデル化・シミュレーション

(a)-(d) 決定論シミュレーションでの経時変化。深緑：AraC 二量体タンパク質自由分子。橙：LacI 四量体タンパク質自由分子。薄緑：GFP 一量体タンパク質自由分子。黒：SsrA タグ付けされたポリペプチドの総量。

(a) lac/ara-reporter circuit モデル、アラビノース(%) / IPTG(mM) = 1.0%/10 mM。

(b) lac/ara-reporter circuit モデル、アラビノース(%) / IPTG(mM) = 1.0%/0.01 mM。

(c) lac-reporter circuit モデル、アラビノース(%) / IPTG(mM) = 1.0%/10 mM。

(d) lac-reporter circuit モデル、アラビノース(%) / IPTG (mM) = 1.0%/0.01 mM。

(e)-(f) 決定論シミュレーションでの振動における LacI の振幅のヒートマップ。

X 軸: アラビノース濃度。Y 軸: IPTG 濃度。黒: 安定固定点。

(e) lac/ara-reporter circuit モデル。

(f) lac-reporter circuit モデル。

図 3-6 様々なプロモーターを持つレポーター遺伝子を付加した振動子の人工遺伝子回路の顕微鏡観察の結果

(a)-(d)顕微鏡観察での代表的な経時変化。黒：GFP 蛍光強度の元々の経時変化。

赤：GFP 蛍光強度の 12 分移動平均の経時変化。青点：振動の底。

(a) lac/ara-reporter circuit モデルを導入した大腸菌、アラビノース (%) / IPTG (mM) = 1.0% / 10 mM。

(b) lac/ara-reporter circuit モデルを導入した大腸菌、アラビノース (%) / IPTG (mM) = 1.0% / 0.01 mM。

(c) lac -reporter circuit モデルを導入した大腸菌、アラビノース (%) / IPTG (mM) = 1.0% / 10 mM。

(d) lac -reporter circuit モデルを導入した大腸菌、アラビノース (%) / IPTG (mM) = 1.0% / 0.01 mM。

(e)-(f)振動の底の回数をプロットした累積度数分布図。X 軸：経時変化から記録した振動の底の回数を降順に並べたときの割合。Y 軸：振動の底の回数。特に図の下部に 3 回以上振動したときの経時変化の割合を記述した。

(e) lac/ara-reporter circuit モデルを導入した大腸菌、アラビノース (%) / IPTG (mM) = 1.0% / 10 mM。

(f) lac/ara-reporter circuit モデルを導入した大腸菌、アラビノース (%) / IPTG (mM) = 1.0% / 0.01 mM。

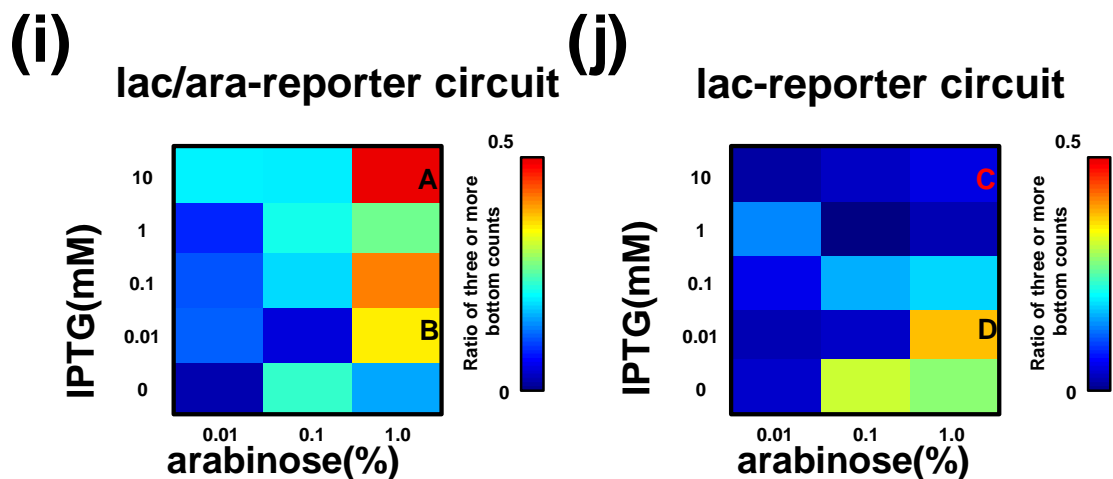
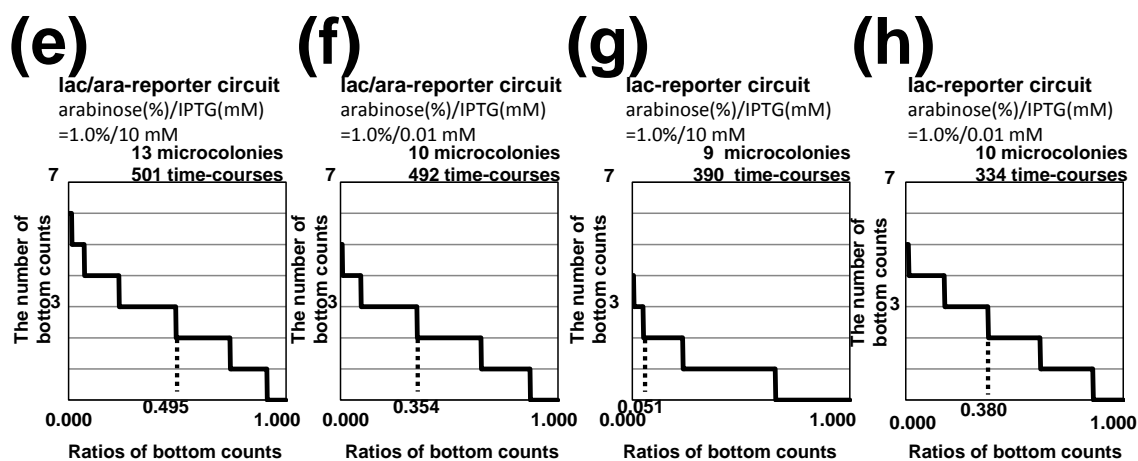
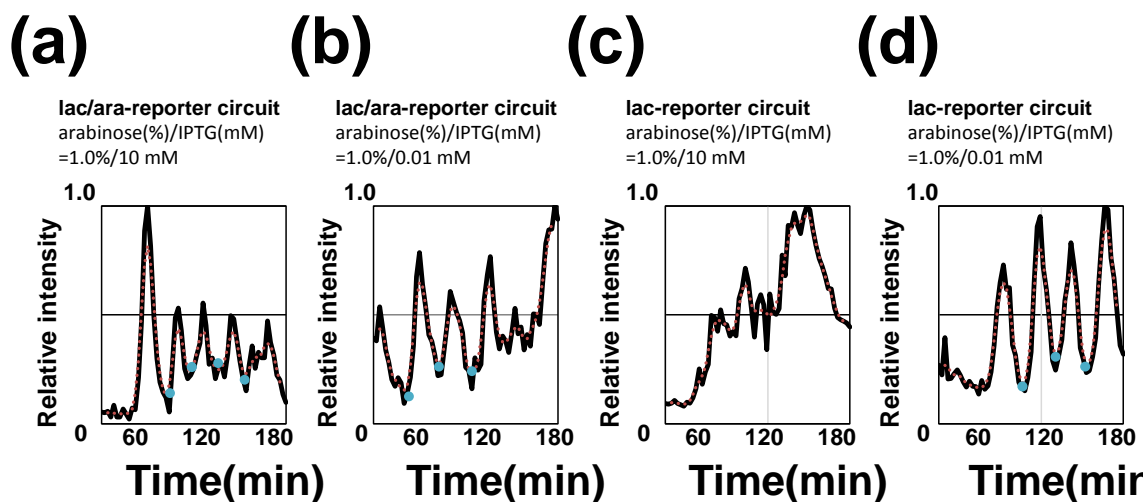
(g) lac -reporter circuit モデルを導入した大腸菌、アラビノース (%) / IPTG (mM) = 1.0% / 10 mM。

(h) lac -reporter circuit モデルを導入した大腸菌、アラビノース (%) / IPTG (mM) = 1.0% / 0.01 mM。

(i)-(j)各誘導剤濃度における 3 回以上振動の底を数えた場合のヒートマップ。X 軸：アラビノース濃度。Y 軸：IPTG 濃度。詳細な相対的な振動の底の回数の決定方法は図 3-4 および材料と方法に記載している。

(i) lac/ara-reporter circuit モデルを導入した大腸菌。

(j) lac -reporter circuit モデルを導入した大腸菌。



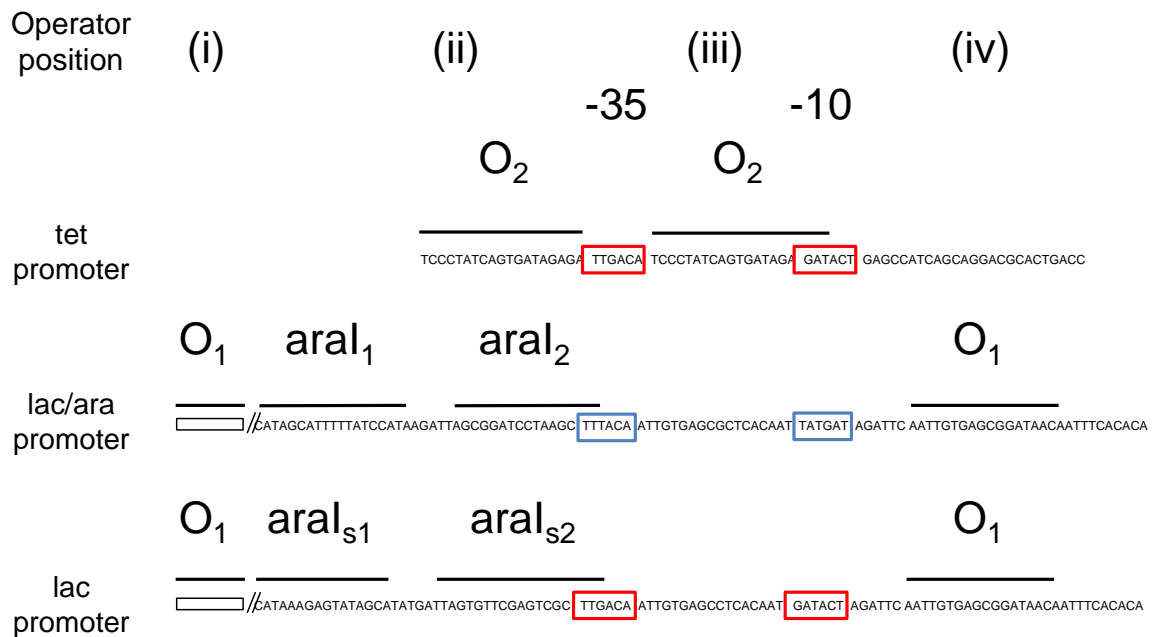


図 3-7 lac プロモーターの設計方法

長方形：-35, -10 塩基配列。赤色長方形：転写効率の高い-35, -10 塩基配列。赤色長方形：転写効率の低い-35, -10 塩基配列。O₁, O₂:LacI 四量体タンパク質が結合するオペレーター配列。araI₁, araI₂:AraC 二量体タンパク質が結合するオペレーター配列。araI_{s1}, araI_{s2}:スペーサー配列。araI₁ ならびに araI₂ と同じ G/C 含有率かつ同一塩基数で設計している。

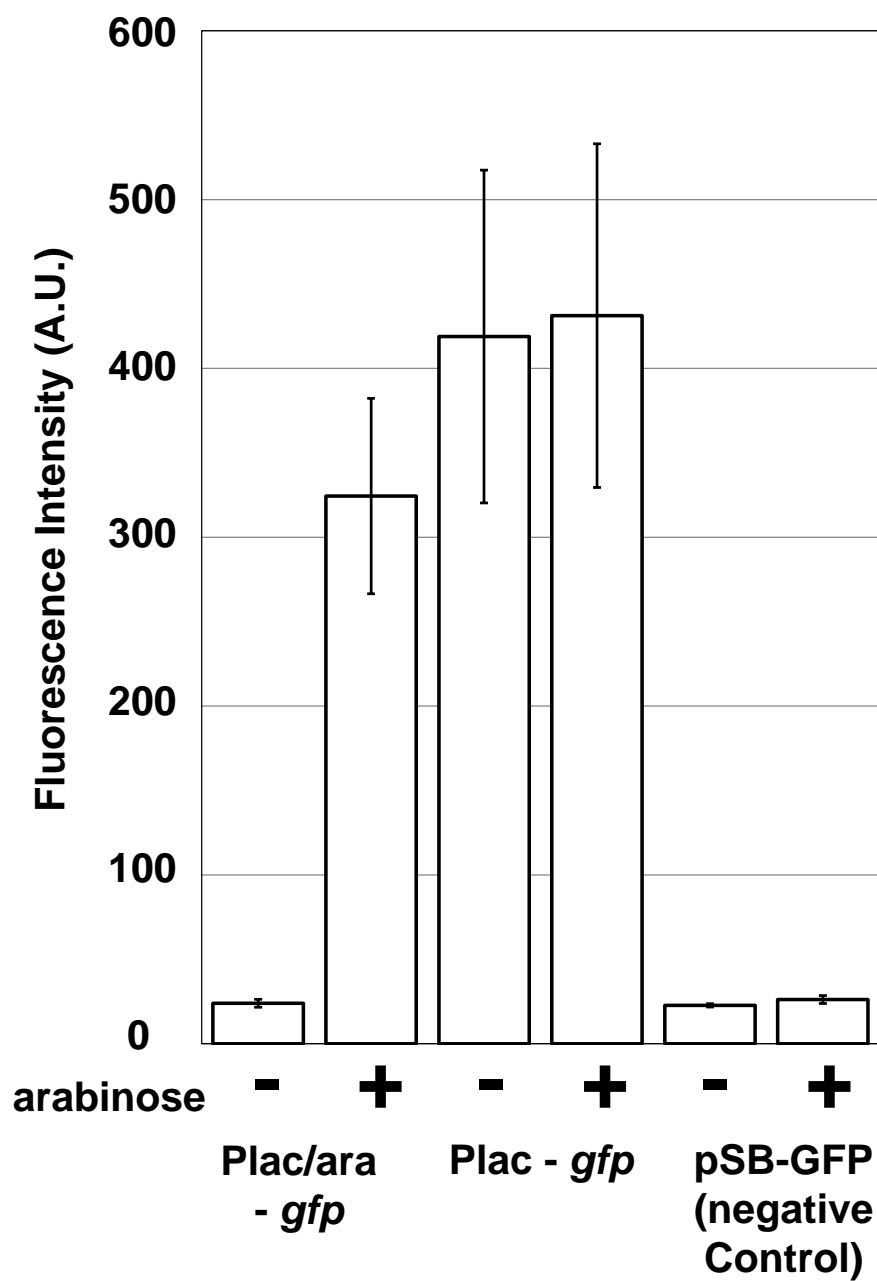


図 3-8 プロモーター強度の測定

AraC 定常発現下における lac/ara プロモーターと lac プロモーターの蛍光強度の測定。ポジティブコントロールとしての Ptet-*gfp* 株はアラビノースありなしの条件において、1000 以上の値を示している。本実験は独立して 4 回以上行い、エラーバーは標準偏差を示している。

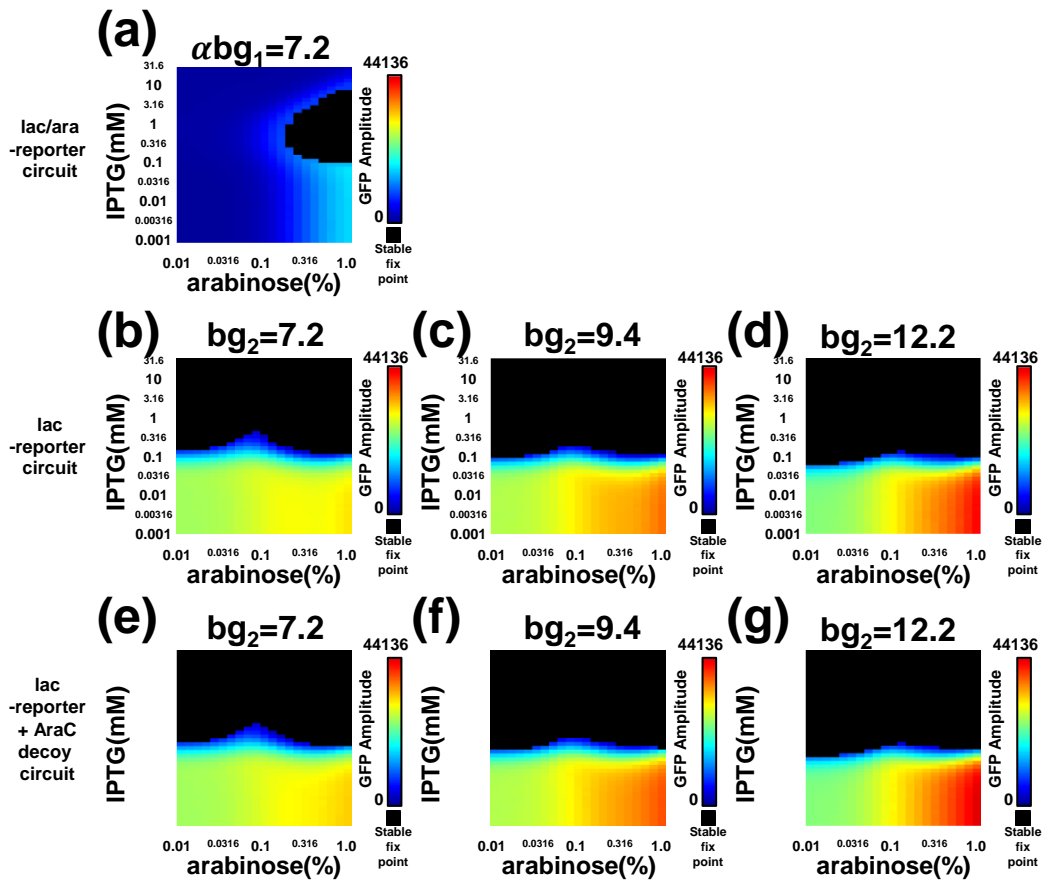


図 3-9 下流レポーター遺伝子の転写効率を変えた場合のシミュレーション結果
 決定論シミュレーションでの振動における GFP の振幅のヒートマップ。X 軸：
 アラビノース濃度。Y 軸：IPTG 濃度。黒：安定固定点。

(a) lac/ara-reporter circuit モデル。下流 lac/ara プロモーターの転写効率 $\alpha bg_1 = 7.2 \text{ min}^{-1}$

(b) lac-reporter circuit モデル。下流 lac プロモーターの転写効率 $bg_2 = 7.2 \text{ min}^{-1}$

(c) lac-reporter circuit モデル。下流 lac プロモーターの転写効率 $bg_2 = 9.4 \text{ min}^{-1}$

(d) lac-reporter circuit モデル。下流 lac プロモーターの転写効率 $bg_2 = 12.2 \text{ min}^{-1}$

(e) lac-reporter + AraC decoy circuit モデル。下流 lac プロモーターの転写効率 $bg_2 = 7.2 \text{ min}^{-1}$

(f) lac-reporter + AraC decoy circuit モデル。下流 lac プロモーターの転写効率 $bg_2 = 9.4 \text{ min}^{-1}$

(g) lac-reporter + AraC decoy circuit モデル。下流 lac プロモーターの転写効率 $bg_2 = 12.2 \text{ min}^{-1}$

図 3-10 lac/ara-reporter circuit を導入した大腸菌の振動の底の回数を数えた累積度数分布図。

全誘導剤条件(アラビノース濃度:0.01, 0.1, 1.0%, IPTG 濃度: 0.0, 0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 mM)における lac/ara-reporter circuit を導入した大腸菌の振動の底の回数を数えた累積度数分布図。X 軸: 経時変化から記録した振動の底の回数を降順に並べたときの割合。Y 軸: 振動の底の回数。特に図の下部に 3 回以上振動したときの経時変化の割合を記述した。

lac/ara-reporter circuit strain

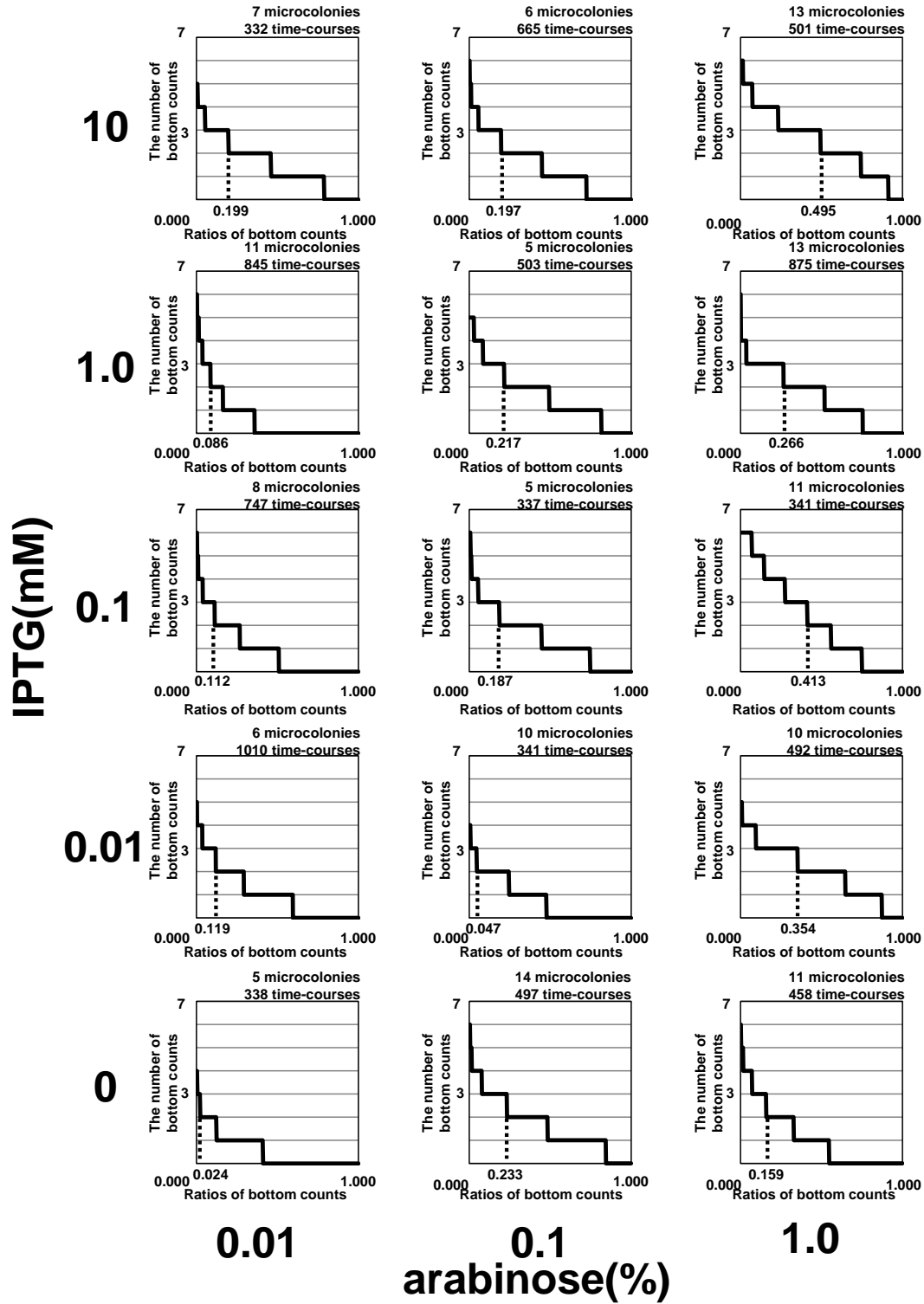
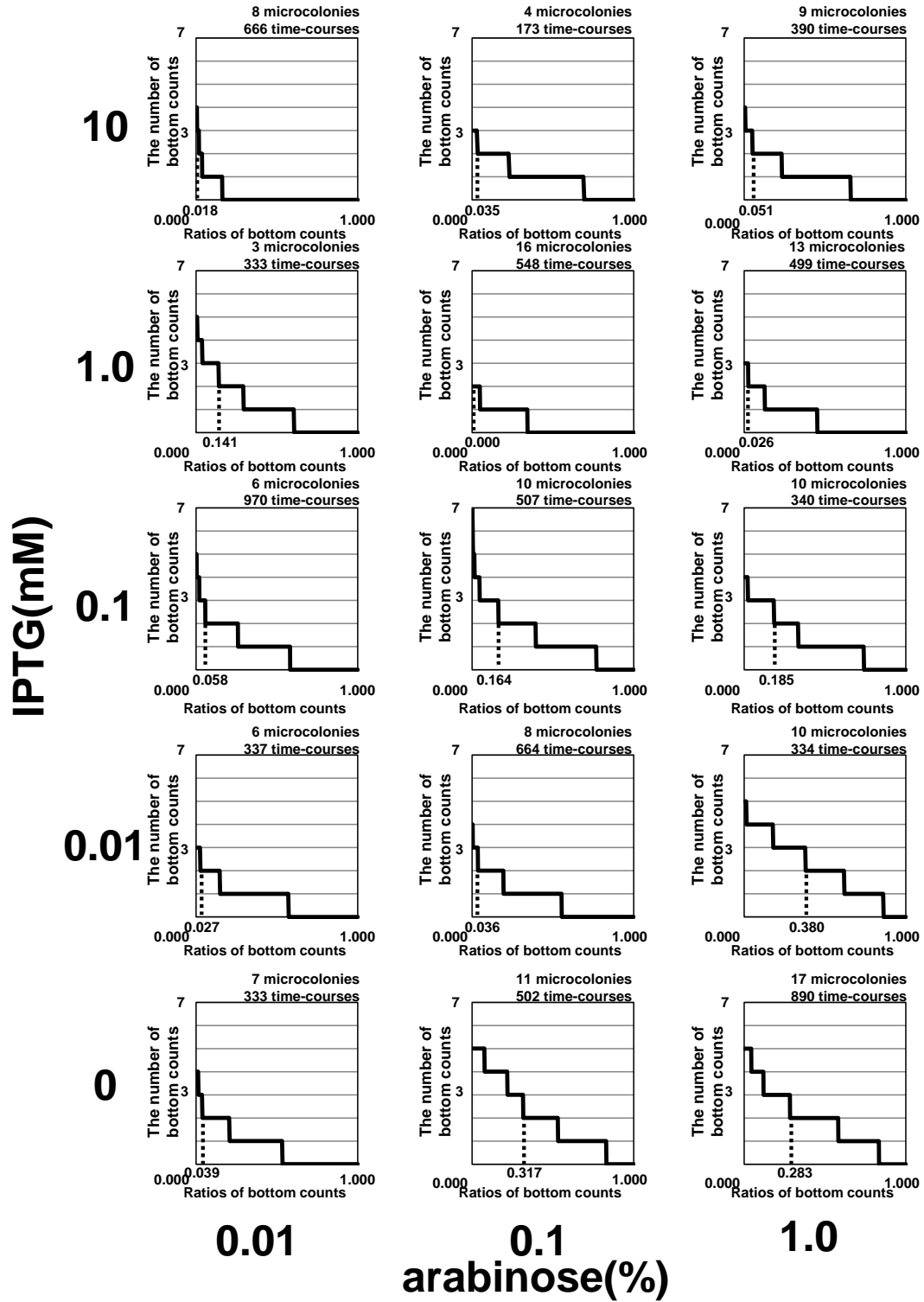
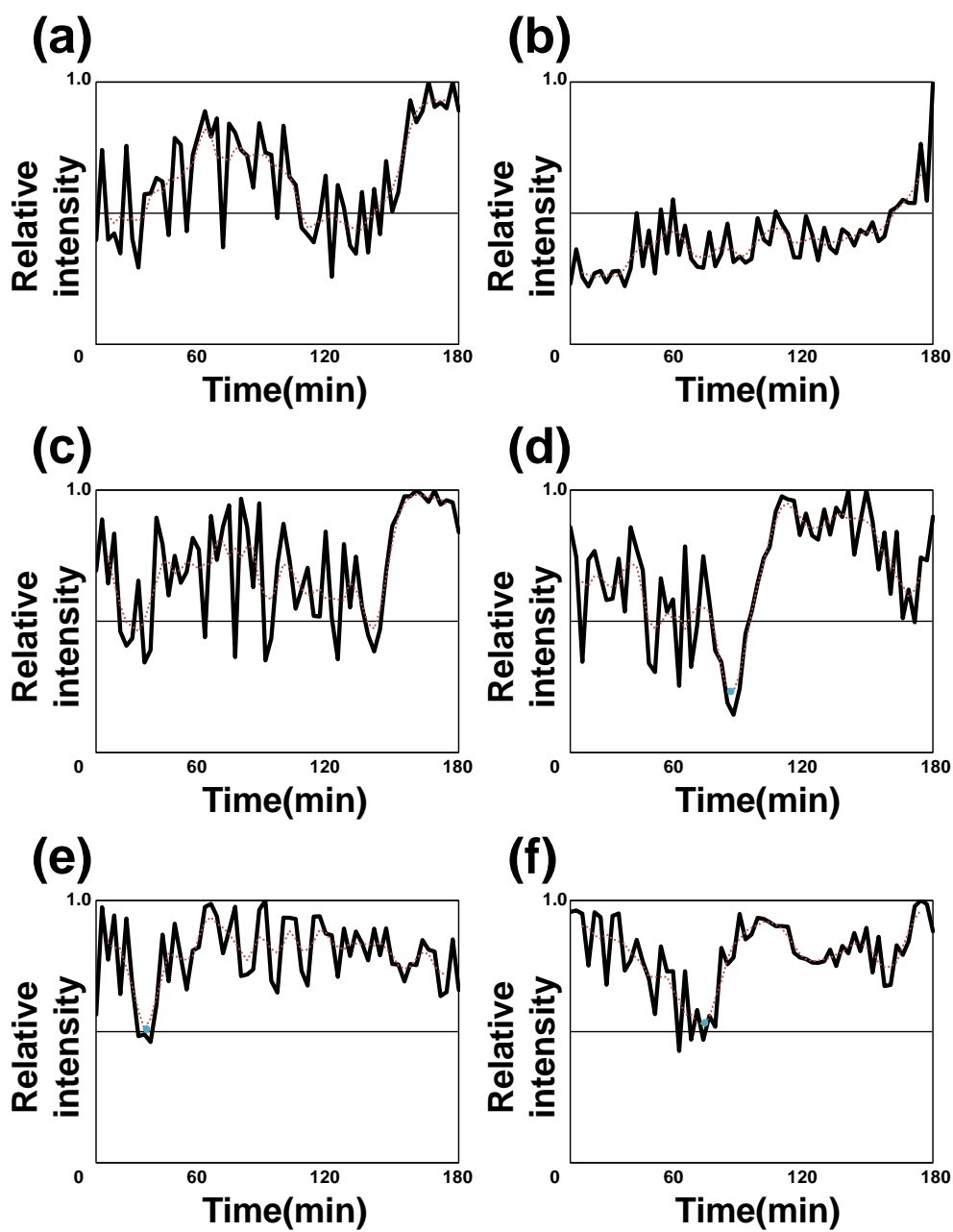


図 3-11 lac-reporter circuit を導入した大腸菌の振動の底の回数を数えた累積度数分布図。

全誘導剤条件(アラビノース濃度:0.01, 0.1, 1.0%, IPTG 濃度: 0.0, 0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 mM)における lac-reporter circuit を導入した大腸菌の振動の底の回数を数えた累積度数分布図。X 軸: 経時変化から記録した振動の底の回数を降順に並べたときの割合。Y 軸: 振動の底の回数。特に図の下部に 3 回以上振動したときの経時変化の割合を記述した。

lac-reporter circuit strain





GFP intensity of Ptet-gfp microscopy experiment

図 3-12 GFP 定常発現株での顕微鏡観察での経時変化

Ptet-gfp 株の顕微鏡観察。黒：GFP 蛍光強度の元々の経時変化。赤：GFP 蛍光強度の 12 分移動平均の経時変化。青点：振動の底。

- Oscillation condition
(lac/ara-reporter circuit strain in arabinose(%)/IPTG(mM) =0.7% / 2 mM)
26 microcolonies, 3108 time-courses
- Constitutive condition
(Ptet - *gfp* strain)
11 microcolonies, 996 time-courses

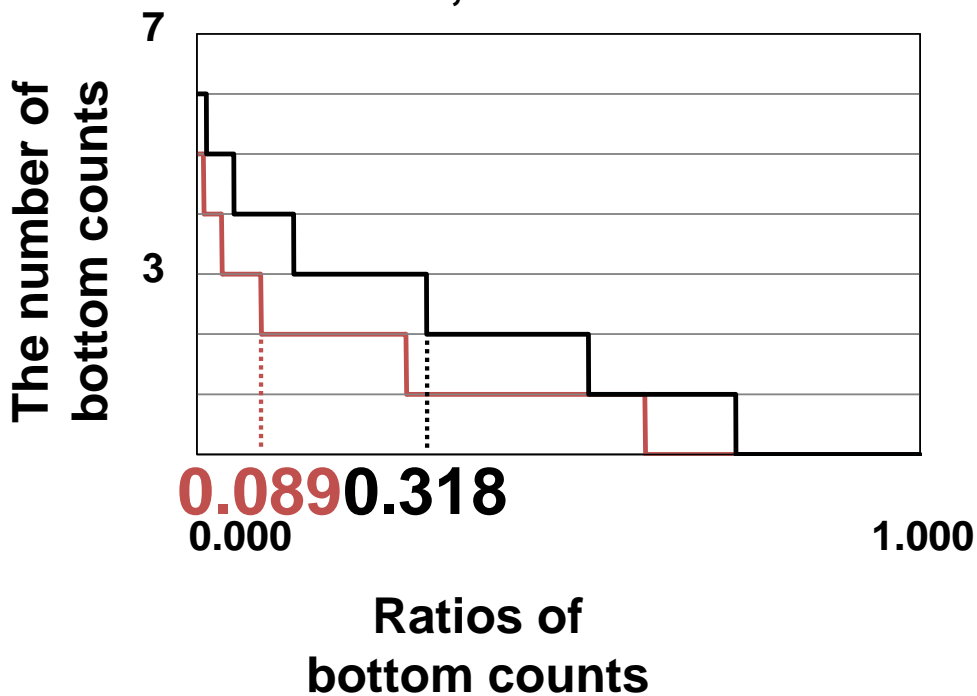


図 3-13 GFP が振動する条件と定常発現する条件での振動の底の回数をプロットした累積度数分布図

赤線：振動条件(lac/ara-reporter circuit を導入した大腸菌、アラビノース 0.7%, IPTG 2mM)。黒線：定常発現条件(Ptet-*gfp* を導入した大腸菌)。X 軸：経時変化から記録した振動の底の回数を降順に並べたときの割合。Y 軸：振動の底の回数。特に図の下部に 3 回以上振動したときの経時変化の割合を記述した。

図 3-14 分子の奪い合いあるなしでの LacI 四量体の振動動態のシミュレーション

(a)-(l)決定論シミュレーションでの振動における LacI の振幅のヒートマップ。

X 軸:アラビノース濃度。Y 軸: IPTG 濃度。黒:安定固定点。

(a)lac/ara-reporter circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(b)lac -reporter circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(c)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(d)lac/ara-reporter circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(e)lac -reporter circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(f)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(g)lac/ara-reporter circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(h)lac -reporter circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(i)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(j)lac/ara-reporter circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(k)lac -reporter circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(l)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける LacI 四量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

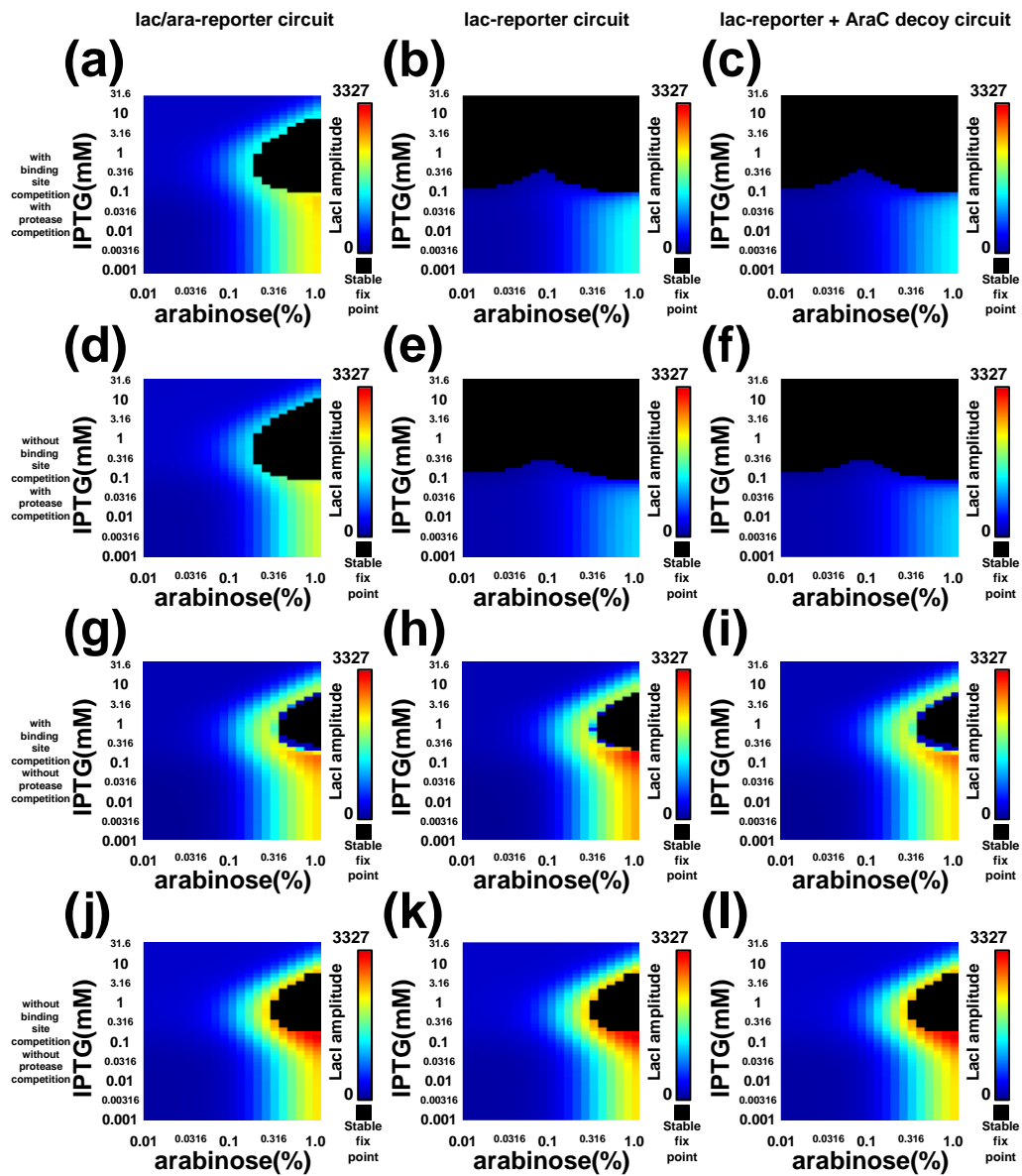


図3-15 分子の奪い合いあるなしでのAraC二量体の振動動態のシミュレーション

(a)-(l)決定論シミュレーションでの振動における AraC の振幅のヒートマップ。
X 軸:アラビノース濃度。Y 軸: IPTG 濃度。黒:安定固定点。

(a)lac/ara-reporter circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(b)lac -reporter circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(c)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(d)lac/ara-reporter circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(e)lac -reporter circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(f)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(g)lac/ara-reporter circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(h)lac -reporter circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(i)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(j)lac/ara-reporter circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(k)lac -reporter circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(l)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける AraC 二量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

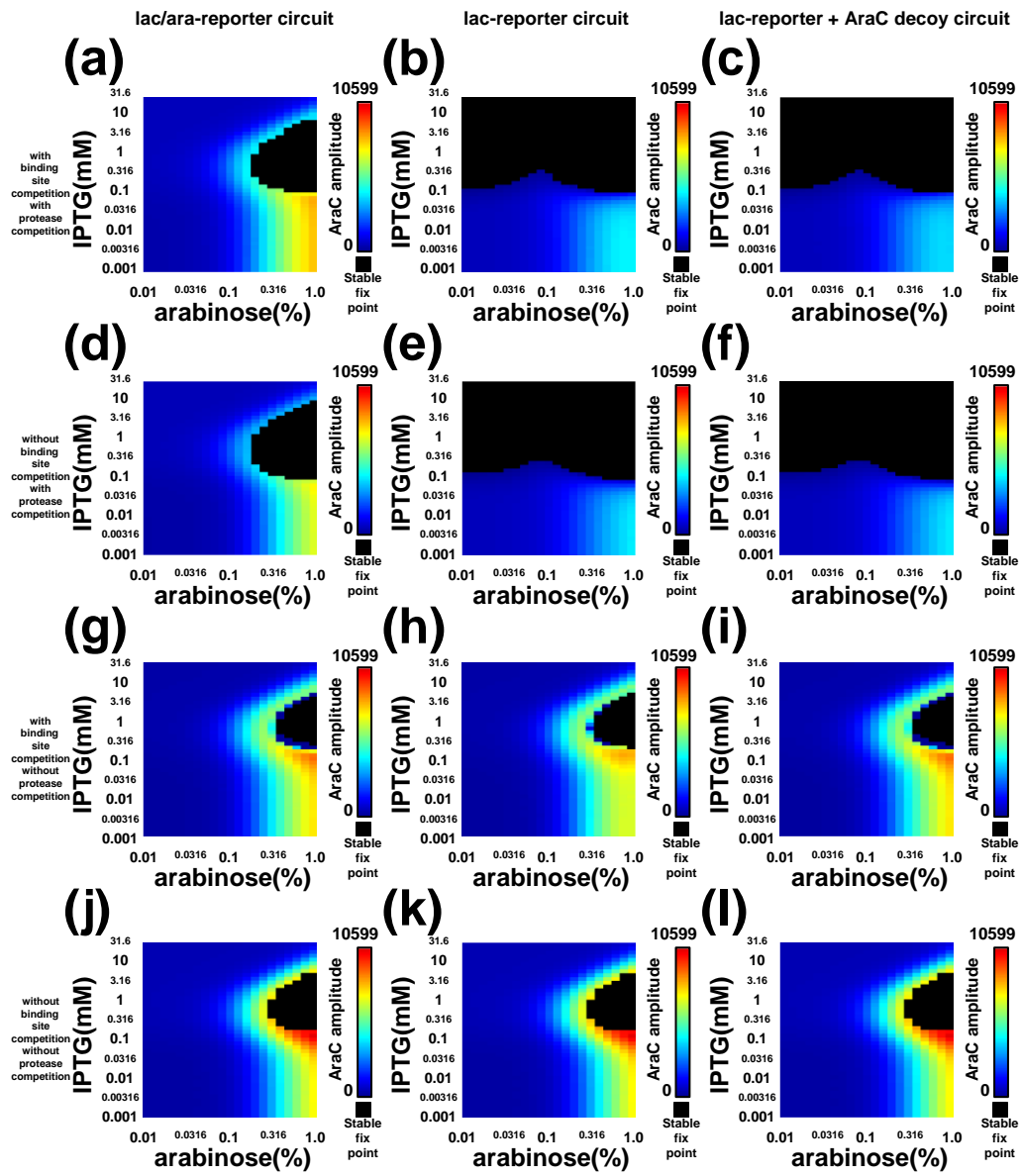


図 3-16 分子の奪い合いあるなしでの GFP 一量体の振動動態のシミュレーション

(a)-(l)決定論シミュレーションでの振動における GFP の振幅のヒートマップ。
X 軸:アラビノース濃度。Y 軸: IPTG 濃度。黒:安定固定点。

(a)lac/ara-reporter circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(b)lac -reporter circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(c)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(d)lac/ara-reporter circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(e)lac -reporter circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(f)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(g)lac/ara-reporter circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(h)lac -reporter circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(i)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(j)lac/ara-reporter circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(k)lac -reporter circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(l)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける GFP 一量体タンパク質の振動動態。
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

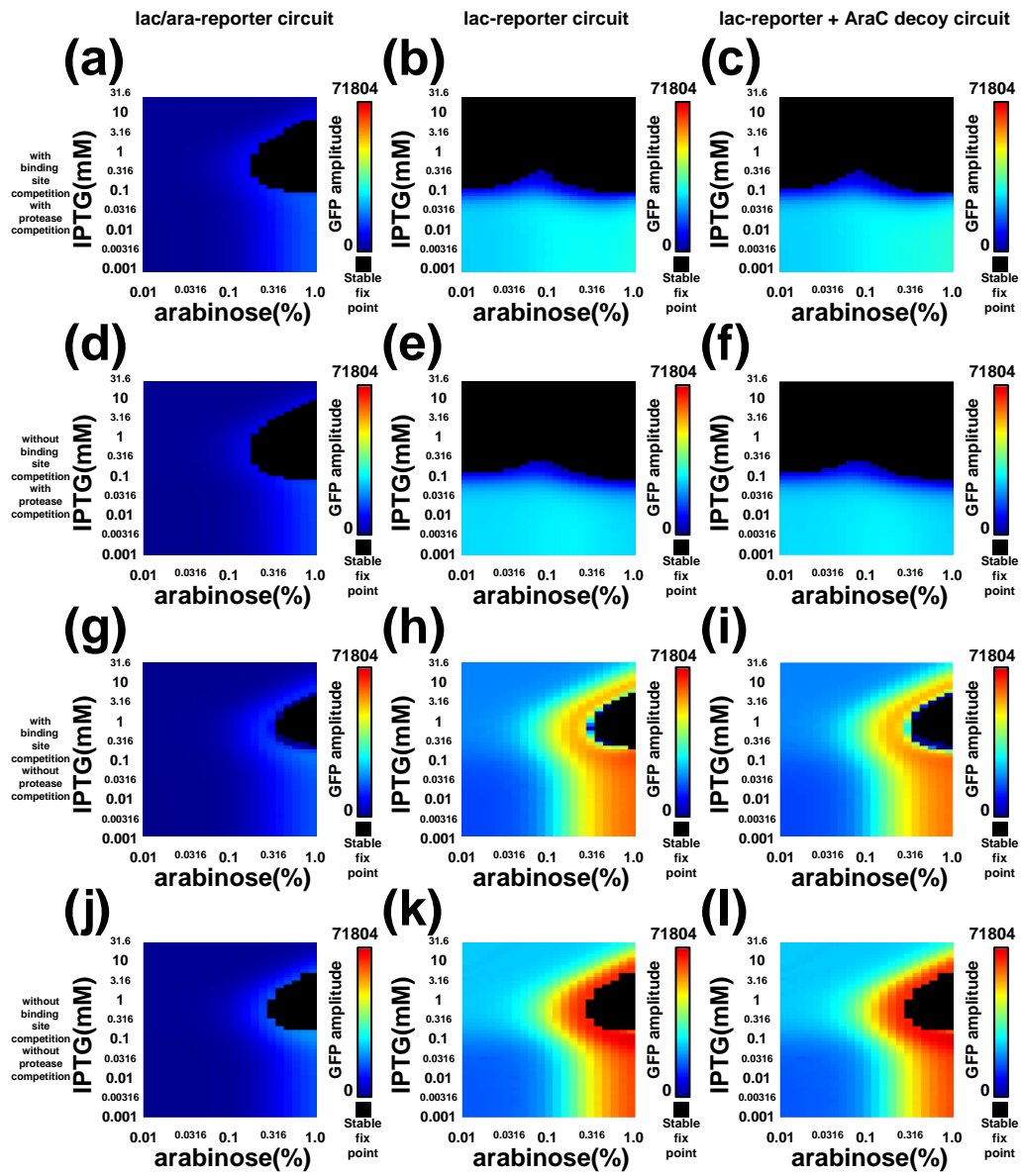


図 3-17 分子の奪い合いあるなしでの振動における振動周期のシミュレーション

(a)-(l)決定論シミュレーションでの振動における振動周期のヒートマップ。X 軸:アラビノース濃度。Y 軸: IPTG 濃度。黒:安定固定点。

(a)lac/ara-reporter circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(b)lac -reporter circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(c)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(d)lac/ara-reporter circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(e)lac -reporter circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(f)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いあり。

(g)lac/ara-reporter circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(h)lac -reporter circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(i)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いあり。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(j)lac/ara-reporter circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(k)lac -reporter circuit モデルにおける振動周期の動態。

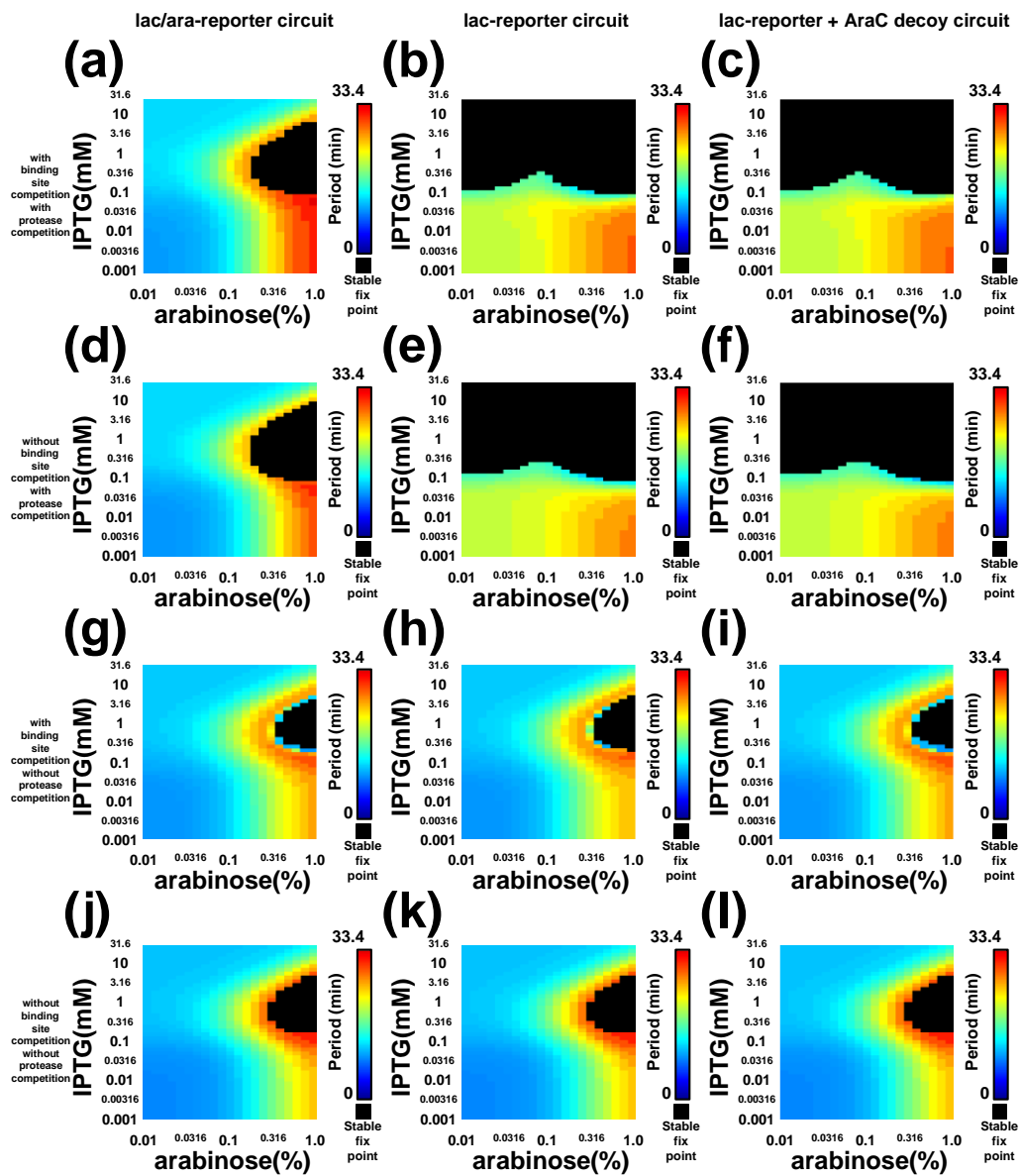
下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

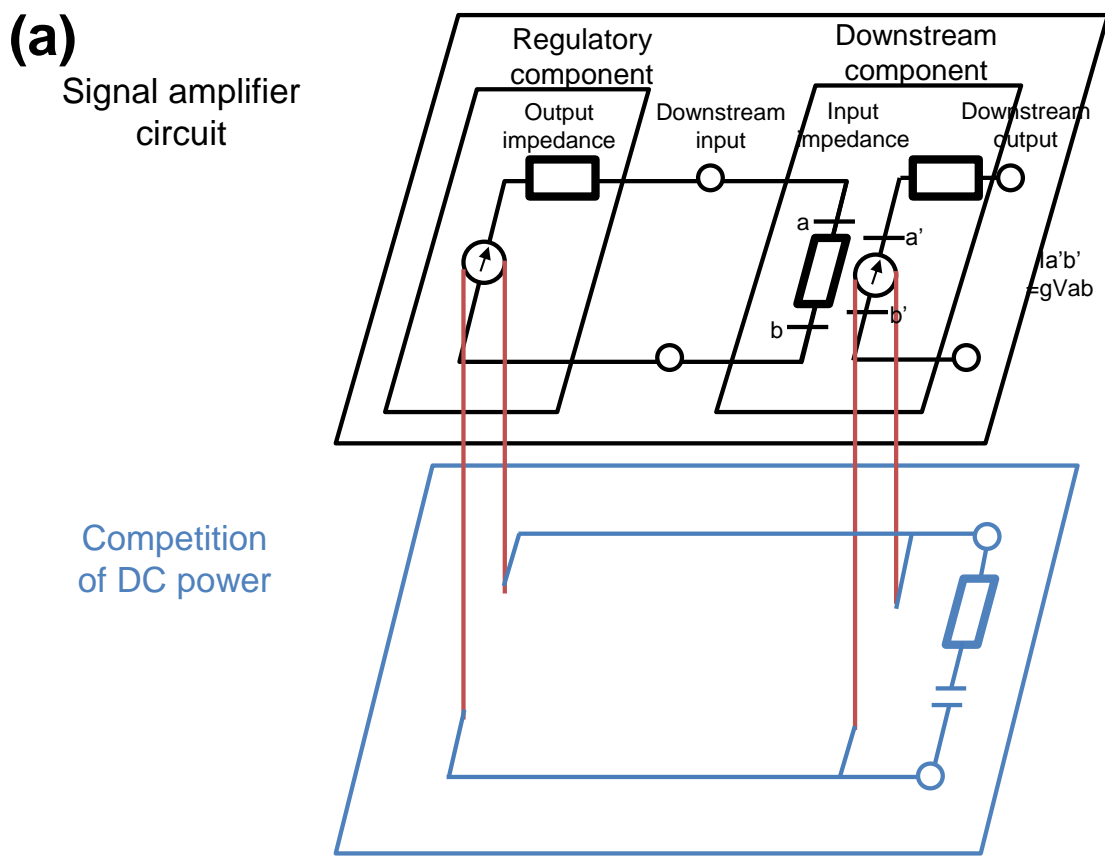
下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。

(l)lac -reporter + AraC decoy circuit モデルにおける振動周期の動態。

下流における制御タンパク質から DNA 結合サイトの奪い合いなし。

下流における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いなし。





(b) low output impedance **(c)** high output impedance



図 3-18 本研究で示す電気電子回路と遺伝子回路の関係

(a)人工遺伝子回路を導入した細胞は電気電子回路のように振る舞う。上層では、人工遺伝子回路における制御タンパク質から結合サイトへの奪い合いは、電気電子回路におけるシグナル増幅回路のインピーダンス整合の効果のように振る舞っている。下層での人工遺伝子回路における標的タンパク質からタンパク質分解酵素への奪い合いは、直流電源における出力インピーダンスのように振る舞っている。

(b)直流電源における低出力インピーダンス。

(c)直流電源における高出力インピーダンス。

表 3-1 本章で用いられているプロモーターの ON/OFF 状態の遷移

lac/ara プロモーター

		IPTG(+ LacI)	
		+	-
アラビノース (+ AraC)	+	ON state	OFF state
	-	ON state	OFF state

lac プロモーター

		IPTG(+ LacI)	
		+	-
アラビノース (+ AraC)	+	ON state	OFF state
	-	ON state	OFF state

表 3-2 本章のシミュレーションで用いたパラメーター

Parameter name	Parameter value	Description	Units	Source
b_a, b_r, b_{d1}	0.36	transcription rate of lac/ara promoter	min^{-1}	[32]
b_{d2}	7.2 ($=\alpha b_{d1}$)	transcription rate of lac promoter	min^{-1}	This study
α	20	coefficient of active promoter		[32]
k_{-a}, k_{-r}	1.8	Protein and its protein-binding site dissociation rate	min^{-1}	[32]
t_a, t_r, t_d	90	translation rate	min^{-1}	[32]
d_a, d_r, d_d	0.54	mRNA degradation rate	min^{-1}	[32]
k_{fa}, k_{fr}, k_{fd}	0.9	folding rate	min^{-1}	[32]
k_{da}, k_{dr}, k_t	0.018	multimerization rate	$\text{min}^{-1}\text{molecules}^{-1}$	[32]
k_{-da}, k_{-dr}, k_{-t}	0.00018	multimer dissociation rate	min^{-1}	[32]

k_l	1.08	loop forming rate	min^{-1}	[59]
k_{-l}	0.036	loop unforming rate	min^{-1}	[59]
k_{ul}^s	0.90	loop dissociation rate	min^{-1}	[60]
γ	1080	maximum degradation rate	$\text{molecules} \cdot \text{min}^{-1}$	[32]
c_e	0.1	dissociation constant	molecules	[32]
λ	2.5	coefficient of degradation rate of AraC and downstream free molecule		[32]
ε	0.2	coefficient of degradation rate in loop promoter		[32]
$\omega_1, \omega_2, \omega_3$	1	coefficient of tagged degradation rate		This study
N_a	50	copy number of activator gene		[49] [32]
N_r	25	copy number of repressor gene		[49] [32]
N_d	50	copy number of downstream gene		[49] [16]
N_{decoy}	50	copy number of downstream decoy site		[49]
C_r^{max}	0.2	maximum affinity of LacI for the protein-binding site	molecules^{-1}	[32]
C_r^{min}	0.01	minimum affinity of LacI for the protein-binding site	molecules^{-1}	[32]
[IPTG]	0–10	IPTG concentration	mM	[32]
k_{r1}	0.035	correction constant of IPTG	mM	[32]

b_1	2	Hill coefficient of inhibition by LacI	[32]
C_a^{max}	1	maximum affinity of AraC for the promoter	[32]
C_a^{min}	0	minimum affinity of AraC for the promoter	[32]
$[ara]$	0–2	arabinose concentration	% (w/v) [32]
k_{a1}	2.5	correction constant of arabinose	% (w/v) [32]
c_1	2	Hill coefficient of activation by AraC	[32]
b_2	2	Hill coefficient of inhibition by LacI	[32]

第四章： 総合討論

4.1 結果のまとめ

本研究では数理モデル・シミュレーション・顕微鏡実験の結果から、多種類の分子の奪い合いにより誘導剤二次元パラメータスペース上で多種類の振動子の人工遺伝子回路の動態が変化することを示した。既存の研究では *in silico* と *in vivo* の動態が関連付いていなかったが[29]、本研究では *in silico* と *in vivo* の動態を関連付けて説明することができた(表 4-1)。

本論文は四章で構成され、第一章では、序章として、分子生物学・細胞生物学の発展におけるレポーター遺伝子の貢献と合成生物学におけるレポーター遺伝子の貢献をそれぞれ述べた。

第二章では、数理モデルとシミュレーション結果から下流レポーター遺伝子の有無を比較することにより、人工遺伝子回路設計における制御遺伝子へと下流レポーター遺伝子が与える影響を示した。そして制御タンパク質結合サイトから制御タンパク質への分子の奪い合い、およびペプチドタグ配列特異的プロテアーゼから標的タンパク質への分子の奪い合いという 2 種類の奪い合い効果が生じることを示した。

第三章では、数理モデル・シミュレーション・顕微鏡観察の結果から下流レポーター遺伝子に様々なプロモーターを付加した場合における、人工遺伝子回路設計での制御遺伝子へと下流レポーター遺伝子が与える影響を示した。更に、同数の制御タンパク質結合サイト数を持つが配置の異なる別の人工遺伝子回路をモデル化した。その結果、同一の制御タンパク質結合サイト数を持つのかかわらず、上流の制御遺伝子の挙動が異なる「連続的レトロアクティビティ」という現象を見いだした。この章の結果は、遺伝子回路の設計において最適なプロモーター領域の選択が重要であることを示した。

4.2 考察

4.2.1 人工遺伝子回路への遡及性の大きい遺伝子導入

人工遺伝子回路設計においてレトロアクティビティを増大させるためには、本研究で示したようにタンパク質分解酵素の数を増やすことにより制御することができる。本研究では標的タンパクに対するタンパク質分解酵素の特異的で早い分解が、合成生物学における回路の改良に貢献することを示した[25, 76]。早い分解はタグ特異的タンパク質分解酵素に依存しているが、それらのタンパク質の細胞内におけるコピー数は数が限られている(ClpA:単一の大腸菌の細胞において 40-50 分子, ClpP: 単一の大腸菌の細胞において 100 分子, ClpX: 単一の大腸菌の細胞において 75-100 分子, Lon: 単一の大腸菌の細胞において 160 分子)[77, 78]。合成生物学の研究において標的タンパク質の過剰な生産は細胞内におけるタンパク質分解酵素を枯渇させる[20-22]。同様にタンパク質分解酵素分子の増加は細胞におけるタンパク質分解酵素の枯渇を防ぐことができる[43]。そのため本研究における3つの人工遺伝子回路へのタンパク質分解酵素の追加は、連続的レトロアクティビティの効果を減らすことができると考えられる。一方で、タンパク質分解酵素やこれらに対応する標的タグ配列の欠損は、振動子の人工遺伝子回路における不均一性を減少させ、振動の維持にもつながる[75]。

4.2.2 天然遺伝子回路への遡及性の小さい遺伝子導入

内在の生体分子への影響をできるだけ少なくすることにより、低レトロアクティビティでの内在の遺伝子ネットワークの観察が可能となる。DNA上のタンパク質結合サイトの奪い合いによるレトロアクティビティと同様に、遺伝子発現におけるレトロアクティビティはmRNAやポリペプチドの合成において他の生体分子の奪い合いが生じている[79]。マイナーコドンを使うことによる翻訳速度の低下を考慮すると[80-82]、本研究での *araC* と *lacI* は大腸菌でのマイナーコドンである AGA コドンをもつ一方、*gfp* 遺伝子は酵母の発現に最適化されているために連続的レトロアクティビティを生じさせる可能性がある(表 4-2)。また別の側面からは、リボソームや RNA ポリメラーゼのコピー数もまたレトロアクティビティを生じさせる生体分子となりうる[79, 83]。転写や翻訳の過程におけるレトロアクティビティは、根源的には窒素やリン酸が不足することに由来すると考えられる[84]。将来の合成生物学において、細

胞内の生体分子や環境資源の不足によるレトロアクティビティを考慮した遺伝子回路設計が物質生産をより効率化できると考えられる。

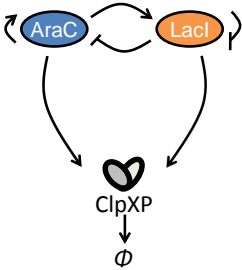
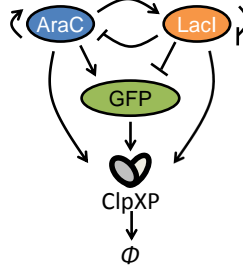
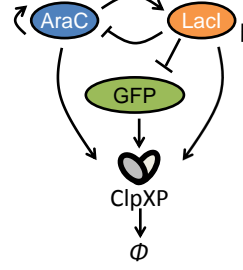
4.3 展望

今後の分子生物学や細胞生物学においては多種多色のレポーター遺伝子を導入することが考えられ、レトロアクティビティの影響を考慮する必要がある。多色のレポーター遺伝子を導入することによる各細胞周期の観察や[64, 85]、脳内における神経細胞を赤・緑・青の蛍光タンパク質の比率を変えることにより100種類を区別することができている。そうした細胞に対する負荷をなるべく減らして細胞内在の挙動を観察するために、本研究で示したレトロアクティビティの影響を減らすことが有用であると考えられる。

第四章の考察で示したように合成生物学ではレトロアクティビティを増大することにより細胞内の動態を制御することが進められてきた。遺伝子ネットワーク内のレトロアクティビティを制御することにより[75, 86]、分子レベルでの振動子を制御できることが知られている。生命はミリ秒から年以上の幅広い周期のリズム[87-90]を活用し、自身の恒常性を保っている。そうした様々な周期のリズムを活用するためには、生命における様々な階層間をつなぐ振動子が複数存在する必要がある。実際に細胞は、2時間の細胞周期を司る p53[91]や24時間の概日周期を司る Per2[92]といった、様々な周期のリズムを司る振動子遺伝子の発現を共存させ、個体レベルでの恒常性を保っている。そのため個体レベルでの振動子の制御を行う上でレトロアクティビティの制御が重要になると考えられる。レトロアクティビティを時空間的に制御するためには、タンパク質分解酵素の発現量を、マイクロ流体デバイス[93]やオプトジェネティクス[94, 95]により自在に制御することが考えられる。

本章で示したように本研究は分子生物学といった理学的な研究への貢献だけでなく、合成生物学という応用研究にも活かされる研究であると位置づけることができる。

表 4-1 本論文で明らかにした対応関係

	 Smolen oscillator	 Smolen oscillator Plac/ara-gfp (lac/ara-reporter circuit)	 Smolen oscillator Plac-gfp (lac-reporter circuit)
既知の研究 (Stricker, <i>et al.</i> 2008)	<i>in silico</i> : ○ <i>in vivo</i> : ×	 <i>in silico</i>: × <i>in vivo</i>: ○ 	<i>in silico</i> : × <i>in vivo</i> : ×
本論文の第二章	<i>in silico</i> : ○ <i>in vivo</i> : ×	<i>in silico</i> : ○ <i>in vivo</i> : ×	<i>in silico</i> : × <i>in vivo</i> : ×
本論文の第三章	<i>in silico</i> : × <i>in vivo</i> : ×	<i>in silico</i> : ○ <i>in vivo</i> : ○	<i>in silico</i> : ○ <i>in vivo</i> : ○

↔ : 対応付いている関係

✖ : 対応付いていない関係

表 4-2 本研究で用いた遺伝子のマイナーコドンの使用数

(aa)	<i>araC</i>	<i>lacI</i>	<i>gfp</i>
AGG	0	0	0
AGA	0	1	5
ATA	2	1	0
CTA	0	0	0
GGA	4	1	0
CCC	1	6	0
total	291	356	197

付録

付録 1 使用した DNA のシーケンス情報

DNA sequence of pPlac-*gfp*_partial

gfp N-terminal partial sequence 507 bp (green)

RBS (blue)

lac promoter (red)

```
CCCGTGTA AACGACGGCCAGTTTATCTAGTCAGCTTGATTCTAGCTGATCGTGGA
CCGGAAGGTGAGCCAGTGAGTTGATTGCAGTCCAGTTACGCTGGAGTCTGAGGCT
CGTCCTGAATGATATGCGACCGCCGGAGGGTTGCGTTTGAGACGGGCGACAGATC
CAGTCGCGCTGCTCTCGTCGATCCgtgtctaattttgaagttaactttgataccattctttgtttgtcagcca
tgatgtaaacattgtgagagttatagttgtattccaattttgtgacctaaaatgttaccatctctttaaaatcaataccttttaat
tcgattctattaactaaggtateacctcaaacttgacttcagctetgggttttagttaccgtcatctttgaaaaaaatagttct
ttcttgaacataaccttctggcatggcagacttgaaaaagtcattgttttcatatgatctgggtatctagaaaaacattgaac
accataagttaaagtagtgactaaggttggccatggaactggcaatttaccagtagtacaataaattttaaggtaattta
ccgtaagtagcateaccttcaccttcaccggagacagaaaattttgtgaccattaacatcaccatetaatteaaccaaaattgg
gacaacaccagtgaataattcttcacctttagacatgggtacctttctctctttaagaattctgtgtgaaattgttatccgctca
caattgaatctagtatcattgtgaggctcacaattgtcaagcgactcgaacactaatcatatgctatactctttatggctcgagt
cgacagttcataggtgattgctcaggacatttctgttagaaggaatcgttttcttacttttcttaacgcacaagagttccgtag
ctgttcaagtttgtgttcaactgttctcgtctttccgcaacaagtcctcttcagaaatgagcttttgcctctgcttggacgga
caggatgtatgctgtggcttttttaaggataactaccttggggccttttcattgttttccaactcgggatctggtaacgcagg
gcaaaaaagctccgttttagctcgttctctctctggcgctccaagacgttgtgtgttcgctcttgacattctctcgggtgccgag
ggcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacagctagccctagggcggggatGGTGCGAGCGGATCG
AGCAGTGTTCGATCAGTTCTGGACGAGCGAGCTGTCGTCCGACCCGTGATCTTACG
GCATTATACGTATGATCGGTCCACGATCAGCTAGATTATCTAGTCAGCTTGATGTCA
TAGCTGTTTCCTGAGGCTCAATACTGACCATTAAATCATACTGACCTCCATAGCA
GAAAGTCAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTGACTTGATCGGCACGTAAGAGGTT
CCAACTTTCACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTTGAGTTATCGA
GATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTA
TTCCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGA
AAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGAT
CTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTACGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGAT
GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC
```

AAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCA
CCAGTACAGAAAAGCATCTCACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGC
TGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGGCAACGATCGGAG
GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCA
CGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACGGCGAACTACTT
ACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGG
ATCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAG
CCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC
CTCCCGCATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAA
ATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGAGGGCCC
AAATGTAATCACCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTTGAGGACCTAAATGTAA
TCACCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGC
TCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGATGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCT
CTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGA
AGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGT
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCC
TTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACT
GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTAT
CTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG
CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGC
GCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATTTTCTACCGAAGAAAGGCCCA

DNA sequence of pJS171

araC constitutive expression region (purple)

gfp (green)

RBS (blue)

lac/ara promoter (red)

AATTCGCGGCCGCTTCTAGAGttatgacaacttgacggctacatcattcactttttttcacaaccggcaccgga
actcgtcggggtggccccggtgcatttttaataaccgcgagaaatagagttgatcgtcaaaaccaacattgcgaccgacg
gtggcgataggcatccgggtggtgctcaaaagcagcttcgctggctgatacgttggctcctcgcgccagcttaagacgctaac

cctaactgctggcgaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacatgctgtgacgctggcgatatcaaaattg
ctgtctgccagtgatcgctgatgtactgacaagcctcgctaccgattatccatcggtggatggagcgactcgtaatcgctt
ccatgcgcccagtaacaattgctcaagcagattatcgccagcagctccgaatagcgccttccccttccccggcgtaatga
tttcccaaacaggtcgctgaaatgcggctggtgagcttcatccggcgaaagaaccccgtattggcaaatattgacggccag
ttaagccattcatgccagtaggcgcgaggacgaaagtaaacccactgggtgataaccattcgcgagcctccggatgacgaccgt
agtgatgaatctctctggcggaacagcaaaatatacccccgtcgcaaaacaaattctgctccctgattttaccaccacct
gaccgcaatggtgagattgagaatataaccttcatccagcggctcggtcgataaaaaaatcgagataaccgttggcctc
aatcgggcgttaaacccgccaccagatgggcattaaacaggtatccggcgagcaggggatcattttgagcttaccatacttt
catactcactagtagcggcgccatggttttctgcttataccctgattctgtgataaccgtattaccgctttgagtgagct
gataccgctcgccgagccgaacgccctaggtctagggcggggatttgcctactcaggagagcgttaccgacaaacaac
agataaacgaaaggccagcttttcgactgagccttctgttttattgatgctctagcagcgtctagatcagctaattaag
ctttacgctgcaagggcgtaattttcgtcgttcgctgactagttttgacaattcatccataccatgggtaataaccagcagca
gtaacaaatttaacaagaccatggtgtctcttttctgtttggatctttggataatttagattgagtggataagtaatggttgt
ctggtacaagactggaccatcaccaattggagatttttgttgataatggtcagctaattgaacagaaccatcttcaatgttgt
gtctaattttgaagttaactttgataccattctttgtttgcagccatgatgtaaacattgtgagagttatagttgtattccaat
ttgtgacctaaaatgttaccatctcttttaaatcaataaccttttaattcgattctattaactaaggtatcaccttcaaaactgac
ttcagctctggcttctgttagttaccgtcatctttgaaaaaatagttcttttgaacataaccttctggcatggcagacttga
aagtcagttgtttcatatgatctgggtatctagaaaaacattgaacaccataagttaaagtagtgactaaggttggccatgg
aactggcaatttaccagtagtacaataaaatttaaggtaatttaccgtaagtagcatcaccttacccttaccggagacag
aaaatttgtgaccattaacatccatctaatcaacaaaattgggacaacaccagtaataattcttaccctttagacatg
gtacccttctcttttaagaattctgtgtgaaattgttatccgctcacaattgaatctagtatcattgtgaggetcacaattgtc
aagcgaactgaacactaatcatatgctatacttttatggctcgagtcgacagttcataggtgattgctcaggacatttctgta
gaaggaatcgttttcttacttttcttaccgacacaagattccgtagctgttcaagtttgtgttcaactgttctcgtcttccgc
aacaagtcctctcagaaatgagcttttctcctctgcttggacggacaggatgtatgctgtggcttttttaaggataactac
tgggggccttttcatgttttcaactccgggatctggtcacgcagggcaaaaaagctccgttttagctcgttctcctctggcgc
tccaagcgttgtgttcgctcttgacattctcctcggtgctcgaggccctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccaca
caCCTAGGTCTAGGTCCGGCAAAAAACGGGCAAGGTGTCACCACCCTGCCCTTTT
TCTTTAAAACCGAAAAGATTACTTCGCGTTATGCAGGCTTCCTCGCTCACTGACTC
GCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA
ATCTCGAGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
AATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCA
GGATTATCAATAACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCA
CCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGA
GAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTT
CTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCA

TCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATC
GCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACT
GCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAAT
GCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGAT
AAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCA
TCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTG
GCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTGCGCACCTGATTGCCCGACATTAT
CGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCC
TCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTA
TGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACA
TCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGT
TGAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCGGTGGCAAAGCA
AAAGTTCAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCT
CCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTACAGGCCCTGGTATGAGTCAGCAACA
CCTTCTTACGAGGCAGACCTCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACTATGTT
GGCACTGATGAGGGTGTGAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGGCTGC
ACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCGGCTTCCTCGCTCACTG
ACTCGCTACGCTCGGTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGG
CGGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCG
CGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGA
CGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCC
CCTGGCGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTTCTGCTTTTCGGTTTACCGGTGTCAT
TCCGCTGTTATGGCCGCGTTTTGTCTCATTCCACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAG
GCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCCGTTCAGTCCGACCGCT
GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGAAAGACATGCAAAAGCA
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCG
CCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCA
GTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCA
AGGCGGTTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAA
GAAGATCATCTTATTAAGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGG
GATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA
ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCA
ATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGT
TGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCC
CCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCG

CCTCCATCCAGTCTATTCCATGGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCAT
GACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTCAGATAAAAAAATC
CTTAGCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGG

DNA sequence of pJS261

araC constitutive expression region (purple)

gfp (green)

RBS (blue)

lac promoter (red)

aattecggcccgttctagagttatgacaacttgacggctacatcattcactttttcttcacaaccggcaacggaactcgtcggg
ctggeccccggtgcatttttaataaccgcgagaaatagagttgatcgtcaaaaccaacattgcgaccgacgggtggcgatagg
catccgggtggtgctcaaaagcagcttcgctggctgatacgttggtcctcgcgccagcttaagacgctaatacctaactcgtg
gcgaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacatgctgtgacgctggcgatatcaaaattgctgtctgccag
gtgatcgtgatgtactgacaagcctcgcgtaccgattatccatcgggtggatggagcgcactcgttaatcgttccatgcgcc
cagtaacaattgctcaagcagatztatcggcagcagctccgaatagcgccttccccttgcgggcttaatgatttgeccaaac
aggctcgtgaaatgcggctggtgcgcttcacggggcgaagaaccccgattggcaaatattgacggccagttaagccatc
atgccagtaggcgcgaggacgaaagtaaaccactggtgataccattcgcgagcctccggatgacgaccgtagtgatgaatc
tctctggcggggaacagcaaaatatacccggtcgcaaaacaattctcgtccctgattttaccacccccgaccgcgaatg
gtgagattgagaatataaccttcatcccagcggctcggtcgataaaaaatcgagataaccgttggcctcaatcggcgtaa
accgccaccagatgggcattaaacgagtatccggcagcaggggatcattttgcgcttcagccatactttcatactcaactag
tagcggcgccatgttcttctcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataaccgctgcc
gcagccgaacgccctaggtctagggcggggatttgcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataaaacgaa
aggccccagtcttgcactgagccttctgtttatgtatgcctctagcacgcgtctagatcagctaattaagctttcagctgcaa
ggcgctaaatctcgtcgttcgctgcaactagttttgtacaattcatccataccatgggtaataaccagcagcagtaacaaattctaa
caagaccatgtggtctctcttttctgtttggatctttggataattagattgagtgagataagtaatggttgctgtaacaagact
ggaccatcaccaattggagatatttgttgataatggtcagctaattgaacagaaccatcttcaatggttgcttaatgtgaagt
taactttgataaccattcttttgttgcagccatgatgtaaaccattgtgagagttatagttgtattccaatgttgacctaaaatg
ttaccatcttctttaaatacaataccttttaattcgattctattaactaaggtatcaccttcaaacttgacttcagctctggtcttg
tagttaccgctcatctttgaaaaaatagttcttcttgaacataaccttctggcatggcagacttgaaaaagtcagttgtttca
tatgatctgggtatctagaaaaacattgaacaccataagttaaagtagtgactaagggtggccatggaactggcaatttacc
agtagtacaataaattttaaggtaatttaccgtaagtagcatcaccttcaccttcaccggagacagaaaatgttgacct
taacatccatctaatcaacaaaaattgggacaacaccagtgaataattcttcaccttagacatggtagctttctctcttt
aatgaattctgtgtgaaattgttatccgctcacaattgaatctagatcattgtgaggctcacaattgtcaagcagctcgaaca
ctaatcatatgctatactctttatggctcgagtcgacagttcataggtgattgctcaggacatttctgtagaaggaatcgttt

ccttacttttcttacgcacaagagtccgtagctgttcaagtttggtttcaactgttctcgctgttccgcaacaagtctcttca
gaaatgagcttttctctctgcttggacggacaggatgtatgctgtggcttttttaaggataactaccttggggccttttcatt
gtttccaactccgggatctggtcacgcaggcagcaaaaaagctccgttttagctcgttctctctctggcgtccaagacggtgtgt
gttcgctcttgacattctctcggtgtccgagggcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacacctaggtctaggt
ccggcaaaaaaacgggcaaggtgtcaccacctgccctttttttaaacegaaaagattacttcgcgttatgcaggttctct
cgctcactgactcgctcgctcggtcgttcggctgcccgcagcggatcagctcactcaaaggcggtaatctcgagtcccgtca
agtcagegtaatgctctgccagtgttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgca
atattcatatcaggattacaataccatatttttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgagcagttcc
ataggatggcaagatcctggtatcggctcgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaattcccctcgtcaaaaa
taaggttatcaagtgagaaatcaccatgagtgcgactgaatccggtgagaatggcaaaaagcttatgcatttcttccagact
tgttcaacagggccagccattacgctcgtcatcaaaaactcgcacatcaacaaaccgttattcattcgtgattgcgctgagcg
agacgaaatacgcgatcgtgtttaaaggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagegc
atcaacaatattttacctgaatcaggatattcttctaataacctggaatgctgtttcccgggatcgcagtggtgagtaacct
gcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaaaggcataaaatccgctcagccagtttagtctgaccatctcacc
tgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaaacaactctggcgcacccggcttccatacaatcgatagattgct
gcacctgattcccgcacattatcgcgagccattatacccatataaatcagcatccatgttggaaatataatcgcggcctcgagc
aagacgtttcccgttgaatatggtcataacacccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgat
atttttatcttgtcaatgtaacatcagagatgttgagacacaacgtggctttgttgaataaaatcgaacttttctgagttgaa
ggatcagatcacgcatcttccgacaacgcagaccgttccgtggcaaaagcaaaaagttcaaaaatcaccactggtccacctac
aacaagctctcatcaaccgtggctccctcactttctggctggatgatggggcgattcaggcctggtatgagtcagecaaacct
tcttccagagcagacctcagcgtcagcggagtgtatactggcttactatgttggcactgatgagggtgtcagtgaaagtgettc
atgtggcaggagaaaaaaggctgcaccggtgcgtcagcagaatatgtgatacaggatataatccgcttctcgtcactgact
cgctacgctcggctcgttcgactcggcgagcggaaatggcttacgaacggggcggagatttcttggaaagatgccaggaagat
acttaacagggaaagtgagagggccgcgcaaaagccgtttttccataggctccgccccctgacaagcatcacgaaatctgac
gctcaaatcagtggtggcgaaccgcagagactataaagataaccaggcgtttcccctggcggctccctcgtgcgtctctctgt
tctgcttccggtttaccgggtgctattccgctgttatggccgcgtttgtctcattccacgctgacactcagttccgggttaggag
ttcgtccaagctggactgtatgcacgaacccccgttcagtcgaccgctgcgcttatccggttaactatcgtctttagtccaa
cccggaaagacatgcaaaaagcaccactggcagcagccactggttaattgatttagaggagttagcttgaagtcacgcccgg
ttaaggctaaaactgaaaggacaagttttggtgactgcgctcctcaagccagttacctcggttcaaaagagttggtagctcaga
gaaccttcgaaaaaccgacctgcaaggcgggtttttcgttttcagagcaagagattacgcccagacaaaaacgatctcaaga
agatcatcttattaaggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatgttggctcatgagattatcaaaaagg
atcttccactagatccttttaaattaaatgaagttttaaataatcaatcaaaagtataatgagtaaacttggctgacagttac
caatgcttaatcagtgaggcaacctatctcagcagatctgtctatttcttccatagttgctgactccccgctgtgtagataac
tacgataccggagggttaccatctggccccagtgtgcaatgataccgagaccacgctcaccggtccagatttatcag
caataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgctccatccagctctatccatggtgc
cacctgacgtetaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgagggcagaatttcagataaaa

aaaatccttagcttgcgctaaggatgattctgg

First In-Fusion pJS167 forward primer

AAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAAC

First In-Fusion pJS167 reverse primer

GTCCTGAATGATATGGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC

First In-Fusion pPlac-gfp_partial forward primer

GTTAACTTTGATACCATTCTTTTGTGTCAGCCATG

First In-Fusion pPlac-gfp_partial reverse primer

CATATCATTGAGGACGAGCCTCAGAC

Second In-Fusion forward primer

ACCCTTAGTGACTCCCTAGACCTAGGTGTGTGGAATTG

Second In-Fusion reverse primer

ACTAGTAGCGGCCGCCATGTTCTTTCCTGCGTTATCC

Deletion forward primer

ACTAGTAGCGGCCGCCATGTTCTTTCCTGCGTTATCC

Deletion reverse primer

GAGTATGAAAAGTATGGCTGAAGCG

Third In-Fusion forward primer

AAGGATGATTTCTGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGT

Third In-Fusion reverse primer

GTTTTTTTTGCCGACCTAGACCTAGGTGTGTGGAATTG

公表論文

A. 学術論文

(査読付)

1. ○Takefumi Moriya, Tomohiro Yamaoka, Yuki Wakayama, Shotaro Ayukawa, Zicong Zhang, Masayuki Yamamura, Shinji Wakao, and Daisuke Kiga.
“Molecular competition by downstream reporter genes in synthetic genetic circuits”
Cell Systems, 09 Jan 2018 投稿中.

B. 口頭発表

(査読付・国際学会)

1. ○Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga
"Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits"
InCoB2014 The 13th International Conference on Bioinformatics, Sydney, Australia, 31 July-2 August, 2014, 10-4. (Full paper, Oral)

(査読無・国際学会)

2. ○Takefumi Moriya, Zicong Zhang, Shotaro Ayukawa, Masayuki Yamamura, and Daisuke Kiga.
“Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits”
The Third Annual winter q-bio meeting, Hawaii, U.S.A, Feb 17-20, 2015.
3. ○Takefumi Moriya, Shohei Kitano, Yumiko Kinoshita, Yusuke Kaneta, Mitsuhiko Odera, Shoya Hirose, Eriko Uchikoshi, T. Nakamura, Thiprampai Thamamongood, Ali Motazedian, Misaki Kaneko, Toshitaka Matsubara, Kazuaki Amikura, Shotaro Ayukawa, Masami Hagiya, Masayuki Yamamura and Daisuke Kiga.
“Material fabrication with BioBrick standardized genetic parts”
InCoB2010 The 9th International Conference on Bioinformatics, Tokyo, Japan, Sep 26-28, 2010.

C. ポスター発表

(査読無)

1. ○Takefumi Moriya, Tomohiro Yamaoka, Yuki Wakayama, Shotaro Ayukawa, Zicong Zhang, Masayuki Yamamura, Shinji Wakao, and Daisuke Kiga.
“Molecular competition by downstream reporter genes in synthetic genetic circuits”

The 16th Annual Meeting of Japanese society for Bacteria,
Kanagawa, Japan, Nov 18, 2017.

2. ○Takefumi Moriya, Tomohiro Yamaoka, Yuki Wakayama, Shotaro Ayukawa, Zicong Zhang, Masayuki Yamamura, Shinji Wakao, and Daisuke Kiga.
“Molecular competition by downstream reporter genes in synthetic genetic circuits”

The 10th Annual Meeting of Japanese Society for Cell Synthesis Research,
Kyoto, Japan, Oct 19 - Oct 20, 2017.

3. ○Takefumi Moriya, Zicong Zhang, Shotaro Ayukawa, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga.

"Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits"

The 1st annual meeting of the Japanese Society for Living Systems Design Research, Kanagawa, Japan, Mar 8, 2016, P-020.

4. ○Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga.

"Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits"

生命動態の分子メカニズムと数理 生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO 合同シンポジウム, Kyoto, Japan, Mar 16 - Mar 17, 2015, P-013.

5. ○Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga.

"Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits"

The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan,
Yokohama, Japan, Nov 25 - Nov 27, 2014, 2P-0982.

6. Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga.
"Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits"
The 7th Annual Meeting of Japanese Society for Cell Synthesis Research,
Tokyo, Japan, Nov 13 - Nov 14, 2014, P-2.

7. Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga.
"Effects of downstream reporter genes on synthetic genetic circuits"
The 52th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan,
Yokohama, Japan, Sep 25 - Sep 27, 2014, 2P-280.

8. Yuko Higurashi, Alejandro Tsai, Tomoyuki Ohno, Seohyun Kim, Natsuki Kubo, Goshi Sugano, Yuto Sugiuchi, Takuya Tsubaki, Maiko Hayashi, Yumiko Haruhara, Hiroki Yoshise, Liu Tianai, Takashi Kitajima, Kazuaki Amikura, Shotaro Ayukawa, Ryoji Sekine, Takefumi Moriya, Takashi Hata, Masayuki Yamamura, Akihiko Konagaya, Kana Ishimatsu, Yoichi Tagawa, Takeharu Tsuge, Daisuke Kiga.
"Let's play Rock-Paper-Scissors (RPS) game with E. coli !! "
The 4th Annual Meeting of Japanese Society for Cell Synthesis Research,
Ohsaka, Japan, Oct 26 - Oct 28, 2011.

9. Shoya Hirose, Ali Motazedian, Eriko Uchikoshi, Misaki Kaneko, Mitsuhiko Odera, Shohei Kitano, Taichi Nakamura, Thiprampai Thamamongood, Toshitaka Matsubara, Yumiko Kinoshita, Yusuke Kaneta, Takefumi Moriya, Shotaro Ayukawa, Kazuaki Amikura, Masayuki Yamamura, D. Kiga.
"*E. coli* with "Humanity" "
The 63rd Annual Meeting of The Society for Biotechnology, Japan,
Tokyo, Japan, Sep 26 – Sep 28, 2011.

10. ○Takefumi Moriya, Shohei Kitano, Yumiko Kinoshita, Yusuke Kaneta, Mitsuhiko Odera, Shoya Hirose, Eriko Uchikoshi, Taichi Nakamura, Thiprampai Thamamongood, Ali Motazedian, Misaki Kaneko, Toshitaka Matsubara, Kazuaki Amikura, Shotaro Ayukawa, Masami Hagiya, Masayuki Yamamura and Daisuke Kiga.

“*E. coli* with “Humanity” ”

The 3th Annual Meeting of Japanese Society for Cell Synthesis Research,
Tokyo, Japan, Nov 12 - Nov 13, 2010, P-39.

参考文献

1. Kaulen H, Schell J, Kreuzaler F: **Light-induced expression of the chimeric chalcone synthase-NPTII gene in tobacco cells.** *EMBO J* 1986, **5**(1):1-8.
2. Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH: **Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**(18):6682-6686.
3. Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM, Moore DD: **Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression.** *Mol Cell Biol* 1986, **6**(9):3173-3179.
4. Brasier AR, Tate JE, Habener JF: **Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines.** *Biotechniques* 1989, **7**(10):1116-1122.
5. Nordeen SK: **Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers.** *Biotechniques* 1988, **6**(5):454-458.
6. Gorman CM, Moffat LF, Howard BH: **Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells.** *Mol Cell Biol* 1982, **2**(9):1044-1051.
7. Topfer R, Prols M, Schell J, Steinbiss HH: **Transient gene expression in tobacco protoplasts: II. Comparison of the reporter gene systems for CAT, NPT II, and GUS.** *Plant Cell Rep* 1988, **7**(4):225-228.
8. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science* 1994, **263**(5148):802-805.
9. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: **Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.** *J Cell Comp Physiol* 1962, **59**:223-239.
10. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY: **Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(22):11984-11989.
11. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY: **Improved green fluorescence.** *Nature* 1995, **373**(6516):663-664.
12. Del Vecchio D, Ninfa AJ, Sontag ED: **Modular cell biology: retroactivity and insulation.** *Mol Syst Biol* 2008, **4**:161.

13. Gyorgy A, Del Vecchio D: **Modular composition of gene transcription networks.** *PLoS Comput Biol* 2014, **10**(3):e1003486.
14. Jayanthi S, Nilgiriwala KS, Del Vecchio D: **Retroactivity controls the temporal dynamics of gene transcription.** *ACS Synth Biol* 2013, **2**(8):431-441.
15. Kim KH, Sauro HM: **Measuring retroactivity from noise in gene regulatory networks.** *Biophys J* 2011, **100**(5):1167-1177.
16. Moriya T, Yamamura M, Kiga D: **Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits.** *BMC Syst Biol* 2014, **8 Suppl 4**:S4.
17. Hsu C, Scherrer S, Buetti-Dinh A, Ratna P, Pizzolato J, Jaquet V, Becskei A: **Stochastic signalling rewires the interaction map of a multiple feedback network during yeast evolution.** *Nat Commun* 2012, **3**:682.
18. Kaplan T, Li XY, Sabo PJ, Thomas S, Stamatoyannopoulos JA, Biggin MD, Eisen MB: **Quantitative models of the mechanisms that control genome-wide patterns of transcription factor binding during early Drosophila development.** *PLoS Genet* 2011, **7**(2):e1001290.
19. Lee TH, Maheshri N: **A regulatory role for repeated decoy transcription factor binding sites in target gene expression.** *Mol Syst Biol* 2012, **8**:576.
20. Cookson NA, Mather WH, Danino T, Mondragon-Palomino O, Williams RJ, Tsimring LS, Hasty J: **Queueing up for enzymatic processing: correlated signaling through coupled degradation.** *Mol Syst Biol* 2011, **7**:561.
21. Mather WH, Cookson NA, Hasty J, Tsimring LS, Williams RJ: **Correlation resonance generated by coupled enzymatic processing.** *Biophys J* 2010, **99**(10):3172-3181.
22. Prindle A, Selimkhanov J, Li H, Razinkov I, Tsimring LS, Hasty J: **Rapid and tunable post-translational coupling of genetic circuits.** *Nature* 2014, **508**(7496):387-391.
23. Eden E, Geva-Zatorsky N, Issaeva I, Cohen A, Dekel E, Danon T, Cohen L, Mayo A, Alon U: **Proteome half-life dynamics in living human cells.** *Science* 2011, **331**(6018):764-768.
24. Monod J, Pappenheimer AM, Jr., Cohen-Bazire G: **[The kinetics of the biosynthesis of beta-galactosidase in Escherichia coli as a function of growth].** *Biochim Biophys Acta* 1952, **9**(6):648-660.

25. Elowitz MB, Leibler S: **A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators.** *Nature* 2000, **403**(6767):335-338.
26. Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ: **Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*.** *Nature* 2000, **403**(6767):339-342.
27. Ishimatsu K, Hata T, Mochizuki A, Sekine R, Yamamura M, Kiga D: **General Applicability of Synthetic Gene-Overexpression for Cell-Type Ratio Control via Reprogramming.** *ACS Synth Biol* 2013.
28. Sekine R, Yamamura M, Ayukawa S, Ishimatsu K, Akama S, Takinoue M, Hagiya M, Kiga D: **Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(44):17969-17973.
29. Stricker J, Cookson S, Bennett MR, Mather WH, Tsimring LS, Hasty J: **A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator.** *Nature* 2008, **456**(7221):516-519.
30. Tabor JJ, Salis HM, Simpson ZB, Chevalier AA, Levskaya A, Marcotte EM, Voigt CA, Ellington AD: **A synthetic genetic edge detection program.** *Cell* 2009, **137**(7):1272-1281.
31. Sekine R, Kiga D, Yamamura M: **Design strategy for an initial state-independent diversity generator.** *Chem-Bio Informatics Journal* 2012, **12**:39-49.
32. Stricker J, Cookson S, Bennett MR, Mather WH, Tsimring LS, Hasty J: **A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator.** *Nature* 2008, **456**(7221):516-519.
33. Horng JT, Lin FM, Lin JH, Huang HD, Liu BJ: **Database of repetitive elements in complete genomes and data mining using transcription factor binding sites.** *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 2003, **7**(2):93-100.
34. Burger A, Walczak AM, Wolynes PG: **Influence of decoys on the noise and dynamics of gene expression.** *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2012, **86**(4 Pt 1):041920.
35. Kaplan T, Biggin MD: **Quantitative models of the mechanisms that control genome-wide patterns of animal transcription factor binding.** *Methods Cell Biol* 2012, **110**:263-283.
36. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A: **Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown.** *J Biol Chem* 1983, **258**(13):8206-8214.

37. De Duve C, Wattiaux R: **Functions of lysosomes.** *Annu Rev Physiol* 1966, **28**:435-492.
38. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: **The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.** *Cell* 1993, **75**(4):641-652.
39. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y: **Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43).** *Neuron* 1994, **13**(1):45-53.
40. Guroff G: **A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain.** *J Biol Chem* 1964, **239**:149-155.
41. Hasty J, Dolnik M, Rottschäfer V, Collins J: **Synthetic Gene Network for Entraining and Amplifying Cellular Oscillations.** *Physical Review Letters* 2002, **88**(14).
42. Smolen P, Baxter DA, Byrne JH: **Frequency selectivity, multistability, and oscillations emerge from models of genetic regulatory systems.** *Am J Physiol* 1998, **274**(2 Pt 1):C531-542.
43. Grilly C, Stricker J, Pang WL, Bennett MR, Hasty J: **A synthetic gene network for tuning protein degradation in Saccharomyces cerevisiae.** *Mol Syst Biol* 2007, **3**:127.
44. Gottesman S, Roche E, Zhou Y, Sauer RT: **The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system.** *Genes Dev* 1998, **12**(9):1338-1347.
45. Vanzi F, Broggio C, Sacconi L, Pavone FS: **Lac repressor hinge flexibility and DNA looping: single molecule kinetics by tethered particle motion.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(12):3409-3420.
46. Wong WW, Tsai TY, Liao JC: **Single-cell zeroth-order protein degradation enhances the robustness of synthetic oscillator.** *Mol Syst Biol* 2007, **3**:130.
47. Chen YJ, Johnson S, Mulligan P, Spakowitz AJ, Phillips R: **Modulation of DNA loop lifetimes by the free energy of loop formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(49):17396-17401.
48. Lee DH, Schleif RF: **In vivo DNA loops in araCBAD: size limits and helical repeat.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**(2):476-480.
49. Lutz R, Bujard H: **Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2**

- regulatory elements.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(6):1203-1210.
50. Shampine LF, Reichelt MW: **The matlab ode suite.** *SIAM J Sci Comput* 1997, **18**(1):1-22.
 51. Rondelez Y: **Competition for catalytic resources alters biological network dynamics.** *Phys Rev Lett* 2012, **108**(1):018102.
 52. Takinoue M, Kiga D, Shohda K, Suyama A: **Experiments and simulation models of a basic computation element of an autonomous molecular computing system.** *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2008, **78**(4 Pt 1):041921.
 53. Franco E, Friedrichs E, Kim J, Jungmann R, Murray R, Winfree E, Simmel FC: **Timing molecular motion and production with a synthetic transcriptional clock.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(40):E784-793.
 54. Chen YY, Jensen MC, Smolke CD: **Genetic control of mammalian T-cell proliferation with synthetic RNA regulatory systems.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(19):8531-8536.
 55. Galloway KE, Franco E, Smolke CD: **Dynamically reshaping signaling networks to program cell fate via genetic controllers.** *Science* 2013, **341**(6152):1235005.
 56. Ye H, Baba MDE, Peng RW, Fussenegger M: **A Synthetic Optogenetic Transcription Device Enhances Blood-Glucose Homeostasis in Mice.** *Science* 2011, **332**(6037):1565-1568.
 57. Osella M, Lagomarsino MC: **Growth-rate-dependent dynamics of a bacterial genetic oscillator.** *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2013, **87**(1):012726.
 58. Kerner A, Park J, Williams A, Lin XN: **A programmable Escherichia coli consortium via tunable symbiosis.** *PLoS ONE* 2012, **7**(3):e34032.
 59. Wong OK, Guthold M, Erie DA, Gelles J: **Interconvertible Lac Repressor–DNA Loops Revealed by Single-Molecule Experiments.** *PLOS Biology* 2008, **6**(9):e232.
 60. Le TT, Kim HD: **Probing the elastic limit of DNA bending.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**(16):10786-10794.
 61. Guet C, a, l C: **Combinatorial Synthesis of Genetic Networks.** *Science* 2002, **296**(5572):1466-1470.
 62. Rinaudo K, Bleris L, Maddamsetti R, Subramanian S, Weiss R, Benenson Y: **A universal RNAi-based logic evaluator that operates in**

- mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2007, **25**(7):795-801.
63. Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW: **Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system.** *Nature* 2007, **450**(7166):56-62.
64. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H *et al*: **Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression.** *Cell* 2008, **132**(3):487-498.
65. Rasband W: **ImageJ.** In., 1.49v edn. MD, USA; 1997-2016.
66. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** *Nat Methods* 2012, **9**(7):671-675.
67. Sternberg SR: **Biomedical image processing.** *Computer* 1983, **16**(1):22-34.
68. Waters JC: **Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy.** *J Cell Biol* 2009, **185**(7):1135-1148.
69. Jezierska A, Talbot H, Chaux C, Pesquet J-C, Engler G: **Poisson-Gaussian noise parameter estimation in fluorescence microscopy imaging.** In: *Biomedical Imaging (ISBI), 2012 9th IEEE International Symposium on: 2012.* IEEE: 1663-1666.
70. Otsu N: **Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms.** *Ieee T Syst Man Cyb* 1979, **9**(1):62-66.
71. Meijering E, Dzyubachyk O, Smal I: **Methods for cell and particle tracking.** *Methods Enzymol* 2012, **504**:183-200.
72. Deuschle U, Kammerer W, Gentz R, Bujard H: **Promoters of Escherichia coli: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures.** *EMBO J* 1986, **5**(11):2987-2994.
73. Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS: **Stochastic gene expression in a single cell.** *Science* 2002, **297**(5584):1183-1186.
74. Brewster RC, Weinert FM, Garcia HG, Song D, Rydenfelt M, Phillips R: **The transcription factor titration effect dictates level of gene expression.** *Cell* 2014, **156**(6):1312-1323.
75. Potvin-Trottier L, Lord ND, Vinnicombe G, Paulsson J: **Synchronous long-term oscillations in a synthetic gene circuit.** *Nature* 2016, **538**(7626):514-517.
76. Huang D, Holtz WJ, Maharbiz MM: **A genetic bistable switch utilizing**

- nonlinear protein degradation. *J Biol Eng* 2012, **6**(1):9.
77. Farrell CM, Grossman AD, Sauer RT: **Cytoplasmic degradation of ssrA-tagged proteins.** *Mol Microbiol* 2005, **57**(6):1750-1761.
78. Taniguchi Y, Choi PJ, Li GW, Chen H, Babu M, Hearn J, Emili A, Xie XS: **Quantifying E. coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells.** *Science* 2010, **329**(5991):533-538.
79. Qian Y, Huang HH, Jimenez JI, Del Vecchio D: **Resource Competition Shapes the Response of Genetic Circuits.** *ACS Synth Biol* 2017, **6**(7):1263-1272.
80. Chumpolkulwong N, Sakamoto K, Hayashi A, Iraha F, Shinya N, Matsuda N, Kiga D, Urushibata A, Shirouzu M, Oki K *et al*: **Translation of 'rare' codons in a cell-free protein synthesis system from Escherichia coli.** *J Struct Funct Genomics* 2006, **7**(1):31-36.
81. Yu CH, Dang Y, Zhou Z, Wu C, Zhao F, Sachs MS, Liu Y: **Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding.** *Mol Cell* 2015, **59**(5):744-754.
82. Chadani Y, Niwa T, Chiba S, Taguchi H, Ito K: **Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, **113**(7):E829-838.
83. Mather WH, Hasty J, Tsimring LS, Williams RJ: **Translational cross talk in gene networks.** *Biophys J* 2013, **104**(11):2564-2572.
84. Kafri M, Metzler-Raz E, Jona G, Barkai N: **The Cost of Protein Production.** *Cell Rep* 2016, **14**(1):22-31.
85. Sakaue-Sawano A, Yo M, Komatsu N, Hiratsuka T, Kogure T, Hoshida T, Goshima N, Matsuda M, Miyoshi H, Miyawaki A: **Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle.** *Mol Cell* 2017.
86. Tomazou M, Barahona M, Polizzi KM, Stan G-BV: **Computational Re-Design of Synthetic Genetic Oscillators for Independent Amplitude and Frequency Modulation.** *bioRxiv* 2017.
87. Klimesch W: **EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis.** *Brain Res Brain Res Rev* 1999, **29**(2-3):169-195.
88. Hodgkin AL, Huxley AF: **A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.** *J*

- Physiol* 1952, **117**(4):500-544.
89. Konopka RJ, Benzer S: **Clock mutants of *Drosophila melanogaster***. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971, **68**(9):2112-2116.
 90. Pengelley ET, Fisher KC: **Onset and cessation of hibernation under constant temperature and light in the golden-mantled ground squirrel (*Citellus lateralis*)**. *Nature* 1957, **180**(4598):1371-1372.
 91. Lev Bar-Or R, Maya R, Segel LA, Alon U, Levine AJ, Oren M: **Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(21):11250-11255.
 92. Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K *et al*: **Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain**. *J Biol Chem* 1998, **273**(42):27039-27042.
 93. Cookson S, Ostroff N, Pang WL, Volfson D, Hasty J: **Monitoring dynamics of single-cell gene expression over multiple cell cycles**. *Mol Syst Biol* 2005, **1**:2005 0024.
 94. Wu YI, Frey D, Lungu OI, Jaehrig A, Schlichting I, Kuhlman B, Hahn KM: **A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells**. *Nature* 2009, **461**(7260):104-108.
 95. Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenbock G, Ting A, Schnitzer MJ: **Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits**. *J Neurosci* 2006, **26**(41):10380-10386.

謝辞

本研究は、木賀大介教授のご指導と励ましのもとに行われました。先生には多大なるご苦勞をおかけしました。心から感謝いたします。

山村雅幸教授、鮎川翔太郎助教、小宮健助教、瀧ノ上正浩准教授、小長谷明彦教授、若尾真治教授、小林徹也准教授、長橋宏教授には貴重なご指導とご助言をいただきました。ありがとうございます。

研究を進めるにあたって、東京工業大学山村・木賀研究室のメンバーには大変お世話になりました。石松愛博士、犬飼直人さん、河原晃大さん、関根亮二さん、網蔵和晃さん、畑敬士さん、西田暁史さん、鈴木健太さん、藤本智大さん、佐々木彰吾さん、立花俊之さん、席与築さん、鶴間章典さん、一柳光弘さん、榎本輝也さん、浅見加菜子さん、斎藤ひろ子さん、坂元優歩さんには有意義なディスカッションをさせていただいただけではなく、日々励ましの言葉も頂き感謝しております。吉田美智子さん、西文恵さん、平野明子には秘書業務でお世話になりました。ありがとうございます。また早稲田大学の山岡智浩さん、若山裕綺さんには線形安定性解析に関して様々な意見をいただきありがとうございました。現職場である東京工業大学環境・社会理工学院の日高一義教授、錦織聡一博士、安藤玲子さんには様々なご助言をいただきました。

上記の皆様を含む、現在および過去に研究室で一緒にさせていただきました皆様には公私に渡り、本当にお世話になりました。ありがとうございます。最後に、温かく見守り、励まし、支えてくれた家族に感謝いたします。