

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23119008

研究課題名(和文) 数理モデルを用いた動的な人工遺伝子回路の設計と解析

研究課題名(英文) Design and Analysis for Dynamical Genetic Circuits based on various Mathematical Models

研究代表者

山村 雅幸(YAMAMURA, Masayuki)

東京工業大学・総合理工学研究科・教授

研究者番号：00220442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,800,000円

研究成果の概要(和文)：5つのサブテーマに沿って研究を進めた。(1)基本素子のモデル化では、木賀班と連携して最も基本的な転写回路と細胞間通信を対象とした。(2)複雑な人工遺伝子回路のデザインでは、与えられた振動パターンを実現する発振回路をベンチマーク題材とした。(3)大規模な人口代謝経路システムの制御では、基本素子の接続についての解析に焦点を絞った。(4)細胞群システムのデザインと制御では、当初計画の多細胞生物の臓器に替えて、複数種からなる微生物マットを題材とした。(5)共通モデリングベンチの開発では、非線形微分方程式システム、確率過程システム、セル構造ダイナミックシステムなどの個別のモデル化手法を実装した。

研究成果の概要(英文)：The research plan is divided into following five subgoals. (1) We achieved to model fundamental processes such as gene regulation and inter cellular communication, collaborating with Kiga-project. (2) We achieved to design oscillating artificial genetic circuits by using genetic algorithms with frequency characteristics as the fitness evaluation. (3) We analyzed cascading two artificial genetic circuit from the viewpoint of impedance matching. (4) We proposed a multicellular development model for multi layered bacterial sheet in hot fountain. (5) In order to build common modeling bench for Synthetic Biology, we collect necessary mathematical methodology such as non-linear differential equation system, stochastic process system, cellular automata system, and so on.

研究分野：システム科学

キーワード：人工遺伝子回路 非線形力学 確率過程 複雑ネットワーク 並列シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の先駆的研究では非線形システム解析の常套手段が援用されてきた。

[1] Becksel ら[Nature 405, 590-593, 2000]は単純なフィードバックによる安定化 (=ゆらぎの低減)を示すために、非線形微分方程式にノイズ項を加えたモデルでシミュレーションした。

[2] Gardner ら[Nature 405, 339-342, 2000]は遺伝子トグルスイッチ回路の実現可能性を非線形微分方程式の分岐 (bifurcation) 分析で確かめた。

[3] Elowitz ら[Nature 405, 335-338, 2000]は発振回路の発振条件を非線形微分方程式の分岐分析で調べ、微生物による実現のパラメータ設計に利用した。

これらの発展研究、例えば Donino ら[Nature 463, 327-330, 2010]は発振回路の細胞間同期を実現したが、基本となるモデルは非線形微分方程式とその数値シミュレーションである。そこでは十分多くの分子が関与し、均一系である試験管内のような単純化された状況が想定されてきた。

一方、合成生物学のターゲットは、理想化・単純化された回路から大規模・複雑・不均一なものにシフトしつつあった。そこでは分子・細胞・組織・個体といった生命の階層のすべてにまたがるマルチフィジックス、マルチレイヤーの現象を取り扱う必要があり、従来の数理モデルの予測能力は限界に達していた。新しい数理モデルの構築とシミュレーション技術が求められていた。

2. 研究の目的

およそモノづくりは、概念設計から実現に至るまで系統的なアプローチをとるべきである。分子や細胞のように手に取って調べられない対象に対しては、各段階での分析・設計、試行からのフィードバックに、適切な数理モデリングと、パラメータ最適化、シミュレーション、システム構造解析等のコンピュータの利用が欠かせない。本研究の目的は、これら合成生物学を支える情報科学的基盤技術の開発にある。

3. 研究の方法

合成生物学を支える情報科学的基盤技術の開発を次の5つのサブテーマに分ける。

- (1) 基本素子の動的プロセスのモデル化
- (2) 複雑な機能を持った人工遺伝子回路のデザイン
- (3) 大規模な人工代謝経路システムの制御
- (4) 細胞群システムのデザインと制御
- (5) 共通モデリングベンチの開発

4. 研究成果

当初計画に従って5つのサブテーマに分けて研究を進めた。(1)基本素子の動的プロセスのモデル化では、B01 木賀班と連携して最も基本的な転写回路と細胞間通信を対象

とした。非線形微分方程式と確率過程の2通りのモデル化手法を、分子数による揺らぎの大小によって使い分けた。ここで開発したモデル化技法は、ダイバーシティ・ジェネレータ[Sekine 2011, 2012, 2013]の設計・解析・実験に役立った。(2)複雑な機能を持った人工遺伝子回路のデザインでは、当初計画の論理回路に替えて、与えられた振動パターンを実現する発振回路をベンチマーク題材とした。3遺伝子および4遺伝子による発振回路のネットワークポロジータとパラメータの同時最適化に成功した。(3)大規模な人口代謝経路システムの制御では、大規模システムの構築に必要な基本素子の接続についての解析に焦点を絞った。直列接続では電気回路等と同様に高い入力インピーダンスと低い出力インピーダンスに留意する必要があることを示した。(4)細胞群システムのデザインと制御では、当初計画の多細胞生物の臓器に替えて、複数種からなる微生物マットを題材とした。2次元セル構造をベースにした予備的シミュレーションに成功した。(5)共通モデリングベンチの開発では、非線形微分方程式システム、確率過程システム、セル構造ダイナミックシステムなどの個別のモデル化手法は実装されたが、全体をまとめて共通システムとするレベルには至らなかった。サブテーマ毎に進捗に差はあるが、設定目的は概ね達成できたと考える。

次に、最も重要な研究成果として、上記サブテーマの(1)と(2)について詳細を述べる。

(1) ダイバーシティ・ジェネレータ

ダイバーシティ・ジェネレータはGardner[2]のトグルスイッチをもとに作られた回路である。トグルスイッチの回路は、個々の細胞のなかで独立して機能するため、原理としては面白いが、それだけでは実用に結び付けるのは困難である。トグルスイッチ回路を組み込んだ大腸菌を培養しているところは、例えば、電気パーツのスイッチがたくさんバケツに入っている状況に近い。スイッチはそれぞればらばらな状態になっていて、全体としては何もしていない。この状況に何かの意味付けを行うためには、何らかの付加的要素が必要である。我々は社会性昆虫(アリ、ハチ)の分業をヒントに細胞間通信を付加することで発想を始めたが、多細胞生物における細胞の分化のコントロールのモデルとなることに気が付いた。

多細胞生物において、膵臓や肝臓といった臓器は、よく知られるように異なる機能を持った複数種類の細胞群が、ある比率で混ざり合ったような構造をしている。この比率はいつも一定になるように何らかの方法で維持されている。例えば、特定の種類の細胞が死滅したとしても、何日かすると元の比率に回復することが知られている。このようにスイッチのON/OFF状態(分化)の比率を維持するしくみを、合成生物学の新しい基本回路と

して設計し、その特性を検討することとした。細胞の種類の多様性を生み出すしくみ、という意味で「ダイバーシティ・ジェネレータ」と呼ぶ。

図1にダイバーシティ・ジェネレータの人工遺伝子回路を示す。回路の骨格はトグルスイッチそのものである。ただし、細胞集団全体としてのスイッチの ON/OFF 比を知るために細胞間通信を加えてある。スイッチの ON/OFF による2つの安定状態を、図の上下にかき分けてある。で示しているのが、スイッチ間の「配線」に相当するシグナル小分子 AHL である。遺伝子調整領域には特別なシグナル分子依存性プロモータを用いて、論理演算 AND ゲートを実現している。

図1上側の大腸菌では、スイッチは右側に ON になっている。リプレッサー R1 が生産されて、左側の転写を抑制している。それと同時にシグナル小分子 AHL を合成するタンパク質も生産している。下の大腸菌では、スイッチは左側に ON になっている。リプレッサー R2 が生産され、右側の転写を抑制している。ここで、GFP と mCherry はスイッチの状態の観察に用いるレポーター蛍光タンパク質である。

シグナル分子依存性プロモータは、リプレッサー R1 とシグナル小分子 AHL が同時に存在するときだけ機能するようになっている。シグナル小分子 AHL の濃度が高いときにはリプレッサーによる抑制が確実に働くため、トグルスイッチの状態はより安定になる。一方、AHL の濃度が低くなるとリプレッサーによる抑制が働かなくなるため、トグルスイッチの状態は不安定になり、変動しやすくなる。したがって、大腸菌の集団全体としては、AHL の濃度とスイッチの ON/OFF の比とがともある一定の値になるあたりで安定する。

ダイバーシティ・ジェネレータの数理モデルは、トグルスイッチの数理モデルに、シグナル小分子 AHL の濃度の変化項を付け加えただけのシンプルなものである。解析の方法は、トグルスイッチと同様に、各微分値が0となるヌルクライン曲線を用いる。ダイバーシティ・ジェネレータでは、安定点の数が AHL の濃度によってコントロールされるようなグラフが得られる。本研究では数理モデル解析から予想されるとおりに、ダイバーシティ・ジェネレータが分化比を維持できることを生物学実験によって示した。

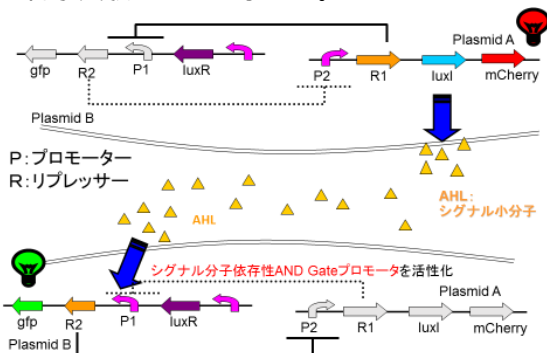


図1 ダイバーシティ・ジェネレータ

(2) 人工遺伝子回路の自動設計

従来実装されてきた人工遺伝子回路において、プリミティブな要素回路のバリエーションがそれほど大きくない。アナログ系の増幅回路、反転回路、発振回路、デジタル系の ON/OFF 回路、論理回路程度でしかない。さらに複雑な要素回路を開発するためには自動設計の助けを借りる必要がある。およそ人間のアイデアだけに依存したデザインでは、バリエーションが簡単に尽きてしまうからである。図2に回路の自動設計の考え方を示す。

人工遺伝子回路の自動設計では、ネットワークの構造と、パラメータとを同時に最適化することは困難な課題である。既存研究では、ネットワーク構造とパラメータのどちらかを固定するアプローチが多い。我々は発振動作する人工遺伝子回路の設計を対象として、ネットワーク構造とパラメータを同時に自動設計することを試みた。数理モデルは酵素反応の方程式の一般形である「他の分子との関連である分子の生産速度と分解速度が決まる」という意味をストレートに表現した方程式を用いた。最適化問題としての決定変数には、アナログ量となる速度変数の他に、アナログ量ではないネットワークの構造については、0、1、-1のデジタルな値を取る特別なパラメータを用意してネットワークの接続関係を表し、まとめて行列とし、これをひとつのパラメータセットとして、遺伝的アルゴリズムによって最適化した。

回路の自動設計を最適化問題として見たときに、通常は「欲しい挙動を時間に対するタイムコースとして与えられたときに、これにぴったりフィットして誤差が小さくなる」という誤差を評価関数とする。振動する遺伝子回路を対象とするとき、単なる誤差では問題が生じることが知られている。2つの振動を比較したときに、同じ振動数で振動しているという意味では正しい動作をしているものであっても、位相が半周期ずれている時には誤差が最大になる。これと、値が平均値にとどまったままで全然振動しない動作を比較すると、誤差の最小化だけを考えたのでは振動しない方が高い評価となることがある。

そこで、我々は振動する回路を設計するのであれば、振動しているという特徴を表現するような評価関数にすべきだと考えて、周波数特性を考慮することとした。ターゲットの挙動と設計対象の挙動をフーリエ変換したときの周波数成分を比較して、その差を取る項を単純に追加した。

計算機実験によって自動設計手法の効果を確認した。まず、遺伝子を3つだけ使ってよいという制約条件の下に発振回路を自動設計したところ、すべての試行で発振解のみを得ることができた。これと比べて評価関数に周波数特性を使わない場合には、発振しない回路が多数設計される。次に、4遺伝子で自動設計を試みたところ、やはりすべての試

行で発振解を得ることができた。回路の規模は大きくないが、スケールアップに関する計算量の増大も見積ることができた。

自動設計された回路の構造を分析すると、3 遺伝子のもは Elowitz[3] のリプリッシャーを必ず 1 個含んでいる。4 遺伝子のもは、一見複雑に見えるが、複数個のリプリッシャーの重ね合わせになっていて、そこに自己フィードバック回路が挿入されている。自己フィードバックは、当初予想になかった負荷要素であるが、天然の細胞に存在する遺伝子回路にもよく見られる構造である。自己フィードバックの機能としては、振動の立ち上がりのスピードアップに貢献しており、ターゲットへの位相の同調に貢献していることが分かった。

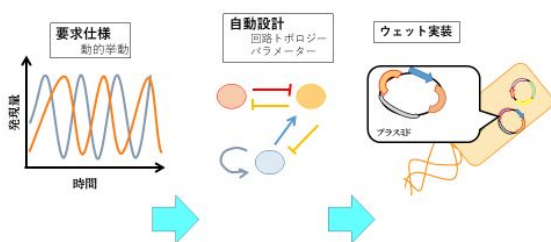


図2 人工遺伝子回路の自動設計

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 31 件)

Takefumi Moriya, Masayuki Yamamura, Daisuke Kiga, Effects of downstream genes on synthetic genetic circuits, BMC Systems Biology, 査読有、8 巻、2014
DOI: 10.1186/1752-0509-8-S4-S4

Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Design and Control of Synthetic Biological Systems, Natural Computing and Beyond, 査読有、6 巻、2013、104 - 114
DOI:10.1007/978-4-431-54394-7_9

林 孝文、周波数特性を用いた振動する人工遺伝子回路の自動設計、計測自動制御学会 第 40 回知能システムシンポジウム資料集、査読無、2013、211 - 216

Ryoji Sekine, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, Design strategy for an initial state-independent diversity generator, Chem-Bio Informatics Journal, 査読有、12 巻、2012、39 - 49

Satoru Akama, Masayuki Yamamura, Takanori Kigawa, A Multiphysics Model of In Vitro Transcription Coupling Enzymatic Reaction and Precipitation

Formation, Biophysical Journal, 査読有、102 巻、2012、221 - 230
DOI:10.1016/j.bpj.2011.12.014

Satoru Akama, Masayuki Yamamura, Takanori Kigawa, Multi-Objective Robust Optimization for In Vitro RNA Synthesis, The Sixth IASTED International Conference on Computational Intelligence and Bioinformatics (CBI 2011), 査読有、2011、74 - 80

Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Shotaro Ayukawa, Kana Ishimatsu, Satoru Akama, Masahiro Takinoue, Masami Hagiya, Daisuke Kiga, Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 査読有、108 巻、2011、17969 - 17973
DOI:10.1073/pnas.1105901108

[図書](計 1 件)

山村 雅幸 他、近代科学社、第 2 章 合成生物学(萩谷 昌巳、横森 貴編 ナチュラルコンピューティングシリーズ「第 0 巻 自然計算へのいざない」)、2015、45 - 72

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 雅幸 (YAMAMURA, Masayuki)
東京工業大学・総合理工学研究科・教授
研究者番号: 0 0 2 2 0 4 4 2

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小長谷 明彦 (KONAGAYA, Akihiko)
東京工業大学・総合理工学研究科・教授
研究者番号: 0 0 3 0 1 2 0 0

鈴木 泰博 (SUZUKI, Yasuhiro)
名古屋大学・情報科学研究科・准教授
研究者番号: 5 0 2 9 2 9 8 3

小林 徹也 (KOBAYASHI, Tetsuya)
東京大学・生産技術研究所・准教授
研究者番号: 9 0 5 1 3 3 5 9

望月 敦史 (MOCHIZUKI, Atsushi)
理化学研究所・望月理論生物学研究室・主任研究員
研究者番号: 1 0 3 0 4 7 2 6

高安 美佐子 (TAKAYASU, Misako)
東京工業大学・総合理工学研究科・准教授

研究者番号：20296776

小野 功 (ONO, Isao)
東京工業大学・総合理工学研究科・准教授
研究者番号：20078166

伊藤 浩史 (ITO, Hiroshi)
九州大学・芸術工学研究院・助教
研究者番号：20512627

関根 亮二 (SEKINE, Ryoji)
理化学研究所・生命システム研究センター・研究員
研究者番号：70730232