

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20672

研究課題名（和文）非定常環境下の細胞集団動態と世代時間ゆらぎの関係

研究課題名（英文）Relations between cell population dynamics in non-stationary environment and generation time fluctuation

研究代表者

野添 嵩 (Nooe, Takashi)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：30910533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：1細胞レベルの成長動態と多数の細胞集団の動態を接続する理論的な枠組みの構築を目指し、変動環境下における集団動態と1細胞レベルの世代時間ゆらぎの関係性を明らかにする研究を進めてきた。細胞の排除や死亡を含む個体群動態において世代時間を含む1細胞の表現型の多様性と集団増殖の関係を解析する理論的枠組みを提案し、本手法をシミュレーションと実験データへ適用その妥当性を検証した。さらに変動環境下での細胞系譜測定とその将来的発展を見据えた実験・理論の基盤整備を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロ流体デバイスを用いた1細胞計測技術は大きく進展している一方で、1細胞レベルの状態変化と細胞集団の増殖過程を直接結びつける方向の観察や解析は発展途上である。今後の応用可能性を考えると、一般性の高い細胞系譜解析手法を確立する必要がある。本研究で提案された手法は、細胞の表現型の統計に影響する増殖・生存が与えるバイアスを適切に評価しようとするものであり、系譜データの持つ生物学的意義を明らかにするという基礎科学的重要性を持つことに加え、発生過程の細胞系譜や進化系統樹といった、分岐構造をもつ他の生物データを含む広範な系譜様データへ応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：To construct a theoretical framework connecting single-cell-level growth dynamics and population dynamics, we have proceeded with a project to reveal the relationship between the single-cell-level fluctuation of generation time and population dynamics in fluctuating environments. We suggested theoretical frameworks to analyze the relationship between the heterogeneity of phenotypic traits, including generation time and population growth. We tested their validity by applying the methods to the simulated and experimental data. We also prepared experimental and theoretical fundamentals for measuring single-cell lineage trees in fluctuating environments.

研究分野：生物物理学

キーワード：1細胞計測 細胞系譜 表現型ゆらぎ 個体群動態 変動環境

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年進展する顕微鏡タイムラプスによる1細胞計測技術は細胞の成長動態を1細胞レベルで定量し、何世代にも渡る細胞時系列を取得することを可能とする(図1左)。たとえ時間的に変動しない定常環境下で遺伝的に均一な細胞集団を観察したとしても1つ1つの細胞の動態は多様である。このような1細胞レベルで観察される「表現型ゆらぎ」が細胞集団全体の成長速度をどのように決めているのか、という問いは顕微鏡下で観察される1細胞の動態と、通常実験室で行われる培養条件下や自然界で見られる密な育成条件下での集団の動態とを結びつける上で基本的かつ重要な問いである。増殖する細胞集団の親子関係を記録したものは一般に細胞系譜と呼ばれ(図1)、原核細胞から真核細胞に至るまで様々な種類の細胞で細胞系譜が得られてきているが、表現型ゆらぎと集団適応度対応の関係に迫る細胞系譜手法が十分に整備されていない。

(2) そこで本研究課題ではより具体的な問いとして世代時間のゆらぎと集団動態の関係に焦点を当てた。世代時間とは分裂から次の分裂までの時間間隔として定義され、1細胞の表現型として測定可能かつ集団動態を考える上でも重要な定量的形質である。定常環境下での世代時間分布と集団増殖率の関係については、集団サイズ無限大で一定の増殖率で増えるという理想極限で成立する関係式が知られているが、生物学的、生態学的に興味深いのは、時間変動する環境下での集団動態の変化は集団内のどのような構造変化と連関するだろうか。さらに集団サイズの有限性と環境の非定常性を考慮したときに1細胞レベルの世代時間ゆらぎの測定から集団動態についてどのような予言を与えることができるだろうか。

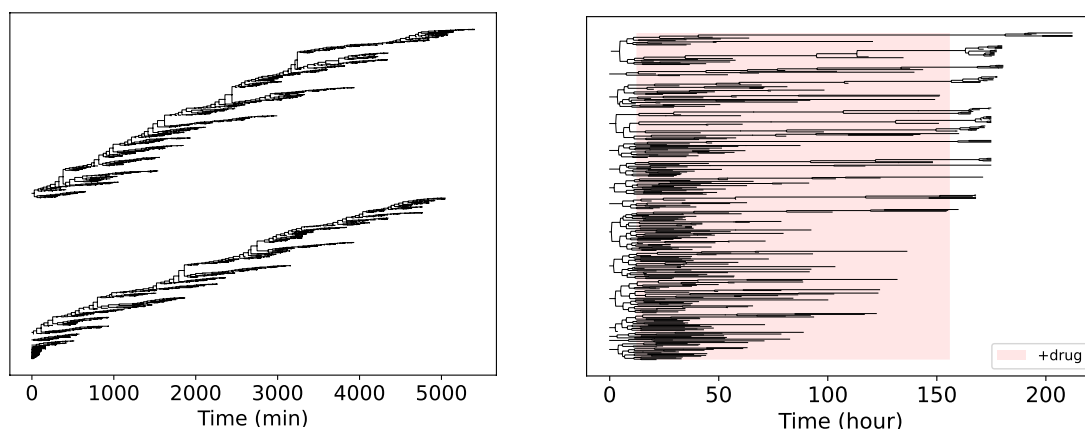


図1 本研究課題で解析した細胞系譜の例。左図は文献[1]のデータを使って作成した、定常環境における大腸菌の増殖過程を記録したもの。マイクロ流体デバイスの観察領域に存在する細胞を追跡しているため、観察領域の外に流れ出た細胞の系列はそこで途絶えている。右図は文献[2]のデータを使って作成した、薬剤投与による死亡を伴う細胞系譜の例。影は薬剤暴露期間を表す。

### 2. 研究の目的

上述の問題意識のもと、1細胞レベルの成長動態と多数の細胞集団の動態を接続する理論的な枠組みの構築を目指し、特に変動環境における集団動態と1細胞レベルの世代時間ゆらぎの関係性を明らかにすることが本研究の目的である。実験で得られる細胞系譜に適用可能な理論的手法の開発をし、特に有限集団及び非定常環境下での世代時間ゆらぎと集団動態をつなぐ関係式を確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

上記目的達成のため、(1)-(3)の手法による研究を計画した。また新たに(4)を実施した。

- (1) 定常データに適用可能な既存の手法の妥当性及び限界を確認するため、定常性を仮定して短期の世代時間分布からの集団の長期増殖率の推定を数値シミュレーションで生成したデータと既存の実験データに対して行う。
- (2) 集団サイズの有限性や、観察時間の有限性、さらには一般に非定常な環境下でも適用可能な関係式を理論的に確立し、数値シミュレーションで検証する。
- (3) 変動環境での細胞系譜を実験で取得し、手法(1)と手法(2)をそれぞれ適用し実用性を評価する。特に細胞の内在的な表現型ゆらぎと環境変化に起因する外在的なゆらぎを定量的に区別する手法を確立する。具体的な実験方法として、蛍光タンパク質を発現する大腸菌細胞株をマイクロ流体デバイスに封入し、異なる炭素源の培地を交互に流したり、抗生物質を周期的に投与し

たりすることを想定した。

(4) 将来的な 1 細胞計測への応用を目指し、既存のデータセットで観察される細胞ラマンスペクトルと絶対定量プロテオームの対応関係の数理的背景を整理し、細胞ラマンスペクトルから表現型の変化を捉えるための理論的基盤の開発を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 有限集団の定常データに適用可能な既存の手法の妥当性及び限界を確認するため、定常性を仮定して短期の世代時間分布からの集団の長期増殖率の推定を、数値シミュレーションで生成したデータと既存の実験データに対して実施した。また集団サイズの有限性を考慮した集団増殖率の補正方法を見出し、数値シミュレーションによる検証を行った。さらに細胞の排除や死亡を含む系譜における世代時間の確率分布と集団の増殖動態を接続する関係式を理論的に導出し、理論モデルや数値シミュレーションによって有限集団データに適用することの有用性を確認した。これまでのマイクロ流体デバイスを用いた細胞時系列の長期計測においてはデバイスの形状に基づき妥当な仮定をおいて解析を行う必要があったが、この結果はより一般性の高い方法論を示唆し、非定常環境下の細胞集団動態への応用が期待される。以上の成果について投稿準備を進めている。また論文[3]では 2 種類の選択強度の指標は定常性の高い環境ではほぼ同じ値をとる傾向を示す一方で、定常性の低い細胞系譜ではその傾向から大きく外れること示されたが、研究代表者は一部のデータ解析を行うと共に世代時間がゆらぐ増殖モデルでの理論計算を行った。これらの結果も本研究課題を進める上で重要な基礎となり、特に選択強度という指標が環境の定常性・非定常性を判別する上で有用であることが期待される。

(2) 細胞の排除や死亡を含む個体群動態において細胞の定量的形質の違いによる選択がどの程度起きるのかを定量的に評価する方法を考案した。この手法は細胞の排除や死亡が起こらない細胞系譜を対象とした従来の解析の枠組み[3, 4]の拡張となっている。我々の手法では、細胞の増えやすさや生き残りやすさの定量的な指標である「適応度」を細胞系譜から測れるものとして再定義しており、細胞 1 つ 1 つの形質の違いがどの程度適応度の差異に結びつくかを表現するものを「適応度地形」と呼んでいる。図 2 は死亡を含む細胞系譜から計算された適応度地形の一例であり、死亡する系統を含む細胞系譜全体から計算される適応度地形  $h(x)$  と、生存する系統のみに着目して計算された適応度地形  $h^*(x)$  の差として、適応度地形の「生存バイアス」を評価することができる(図 2)。成長を持続する細菌集団に対し致死濃度の抗生物質を投与する中での生死を追跡した細胞系譜(図 1 右)を対象とした解析や、増えた細胞を排除しながら一定数の細胞集団を維持するような増殖系の実験データ(図 1 左)を対象にした解析を行い、本手法の実験データへ適用可能性を評価したほか、数値シミュレーションで生成したデータに適用し、手法の妥当性と適用限界を議論した(図 3)。研究代表者はこれらのデータ解析手法の提案と実際のデータ解析を行い、海外の理論グループとの共著で成果を発表した[5]。この成果は、世代時間のみならずより広範な細胞の形質の統計的な性質に増殖や生存を与えるバイアスを定量的に評価する統一的な手法を確立する上で重要な成果である。

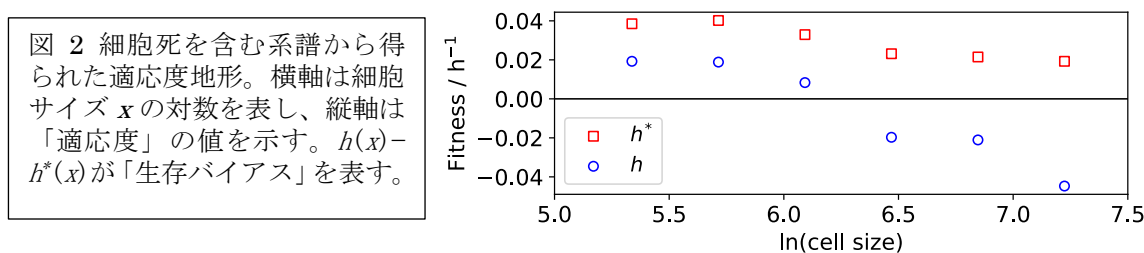


図 2 細胞死を含む系譜から得られた適応度地形。横軸は細胞サイズ  $x$  の対数を表し、縦軸は「適応度」の値を示す。 $h(x) - h^*(x)$  が「生存バイアス」を表す。

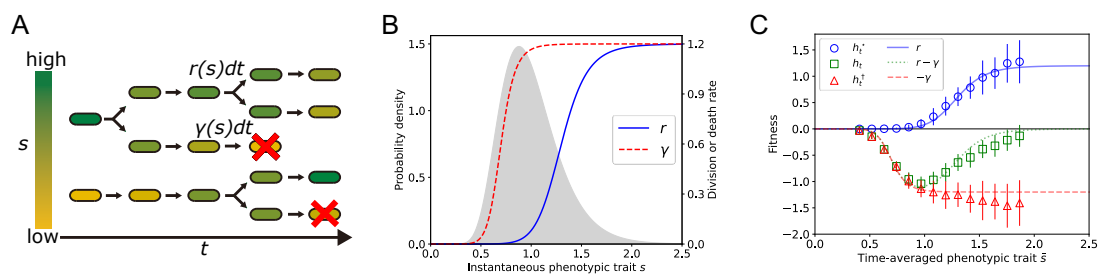


図 3 数値シミュレーションによる適応度地形評価方法の検証。A. 各時刻の形質  $s$  の値に応じて分裂したり死亡したりする様子。このスキームで個体群動態の数値シミュレーションを行った。B. シミュレーションで与えた分裂率  $r(s)$  と死亡  $\gamma(s)$  の形、および細胞の形質  $s$  の(増殖や生存のバイアスがない場合の)確率分布。C. 形質の時間平均に対する適応度地形。 $h^{\dagger} = h - h^*$  は生存バイアスを表し、 $h^*$  が分裂率  $r$  を、 $-h^{\dagger}$  が死亡率  $\gamma$  を再現する。

(3) 文献[6]ではラマン顕微鏡で測定される細胞ラマンスペクトルを線形判別分析 (LDA) することにより、大腸菌の細胞状態の環境条件による違いを判別することができるのみならず、各環境条件で得られる絶対定量プロテオームとよく対応しており、その背景には遺伝子発現の量比保存構造と呼ばれる性質があることが示唆されている。研究代表者はこのような細胞ラマンスペクトルと遺伝子発現状態の対応関係とそこで見られる低次元性に注目し、その数理的な背景を理論的に整理した。この整理により、プロテオームとラマンスペクトルの低次元性を比較する改良された手法を提案し (図 4)、投稿準備を進めると共に学会発表を行った。環境変動による細胞の状態変化を、非侵襲的に測定するラマン顕微鏡技術を用いて 1 細胞レベルで定量することができるようになれば、系譜解析と組み合わせることでより深く細胞状態のゆらぎと成長動態の関係を理解することが可能になると期待される。

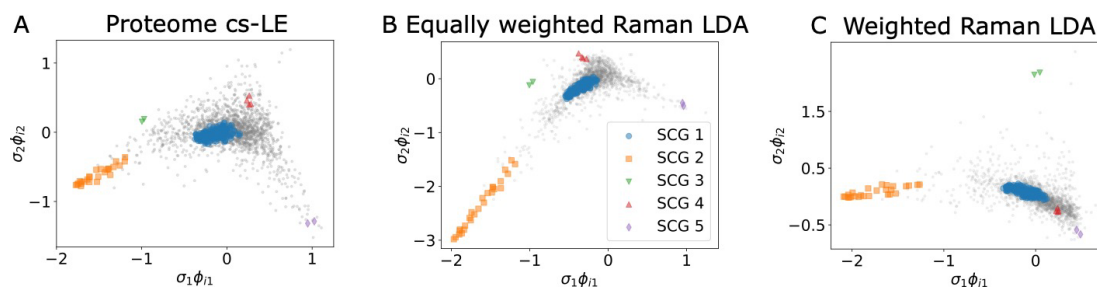


図 4 プロテオームの低次元化 (2次元)。A. プロテオームの量比保存構造に基づく低次元化。1点1点は遺伝子 (タンパク質) を表す。B. 単純な LDA により低次元化されたラマンスペクトルを使ったプロテオームの低次元化。C. A と B の構造の類似性を厳密に議論するために B で用いた低次元化法を改良した手法を適用したもの。

(4) 当初の計画にある環境変動下での細胞系譜測定に関しても、実験で使用するマイクロ流体デバイスの開発とテスト計測は既の実施しており、また文献[7]につながった共同研究を通して、多様な環境における細胞集団の増殖パラメータを計算する解析や顕微鏡画像解析といった基礎的なデータ解析技術にも進展が見られた。

(5) 今後、細胞の表現型の統計に影響する増殖・生存が与えるバイアスを適切に評価するという系譜データの持つ生物学的意義を明らかにする手法をベースとして、1 細胞や集団の動態を計測する技術を進展させつつ、分岐構造をもつ他の生物データを含む広範な系譜様データへ応用を目指した分野横断型の研究を展開することが期待される。

## 引用文献

- [1] Hashimoto, M. *et al.*, Noise-driven growth rate gain in clonal cellular populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 3251-3256 (2016).
- [2] Wakamoto, Y. *et al.*, Dynamic Persistence of Antibiotic-stressed Mycobacteria. *Science* **339**, 91-95 (2013).
- [3] Yamauchi, S. *et al.*, A unified framework for measuring selection on cellular lineages and traits. *Elife* **11**, e72299 (2022).
- [4] Nozoe, T. *et al.* Inferring fitness landscapes and selection on phenotypic states from single-cell genealogical data. *Plos Genet* **13**, e1006653 (2017).
- [5] Genthon, A. *et al.* Cell Lineage Statistics with Incomplete Population Trees. *PRX Life* **1**, 013014 (2023).
- [6] Kamei, K. F. *et al.* Revealing global stoichiometry conservation architecture in cells from Raman spectral patterns. *bioRxiv* 2023.05.09.539921 (2024).
- [7] Pollack, D., Nozoe, T. & Kussell, E. Proteolytic stability and aggregation in a key metabolic enzyme of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **121**, e2301458121 (2024).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Genthon Arthur, Nozoe Takashi, Peliti Luca, Lacoste David	4. 巻 1
2. 論文標題 Cell Lineage Statistics with Incomplete Population Trees	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PRX Life	6. 最初と最後の頁 13014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/prxlife.1.013014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Pollack Dan, Nozoe Takashi, Kussell Edo	4. 巻 121
2. 論文標題 Proteolytic stability and aggregation in a key metabolic enzyme of bacteria	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2301458121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2301458121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamauchi Shunpei, Nozoe Takashi, Okura Reiko, Kussell Edo, Wakamoto Yuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 A unified framework for measuring selection on cellular lineages and traits	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e72299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/elife.72299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Nozoe, Shunpei Yamauchi, Reiko Okura, Edo Kussell, Yuichi Wakamoto
2. 発表標題 A unified framework linking cumulants of growth heterogeneity and population growth rates
3. 学会等名 Statphys28（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takashi Nozoe, Ken-ichiro .F Kamei
2. 発表標題 Maximizing the potential of cellular Raman spectra as a proxy of the stoichiometry conservation structure of gene expression
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野添 高
2. 発表標題 遺伝子発現の量比保存性に基づく細胞ラマンスペクトルの次元性の解析
3. 学会等名 定量生物学の会 第11回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 野添 高
2. 発表標題 細胞集団内の選択の強さを測る細胞系譜解析手法
3. 学会等名 生物の基礎探究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【研究成果】細胞運命の不平等さを定量化する 細胞系譜情報を利用した統計解析手法を構築  <a href="https://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/20221206170000.html">https://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/20221206170000.html</a></p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ニューヨーク大学			
フランス	ESPCI Paris			
ドイツ	マックスプランク研究所			