

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02895

研究課題名(和文)細胞集団内で遺伝子発現が空間分布により多様化されるための諸要素の相関の解明

研究課題名(英文)What determines diversifications of spatial pattern in gene expression among cell populations

研究代表者

木賀 大介 (KIGA, Daisuke)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：30376587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：一つの細胞が増殖し内部状態を多様化することに伴って形成される細胞集団の空間パターンについて、本研究により、数理モデルと実際の細胞の挙動の双方を解析する合成生物学アプローチによる理解を深めることができた。数理モデルについては、(1)細胞間通信分子の拡散、および、細胞の内部状態に依存した成長速度の変化を取り込んだコロニー形成や、(2)カタストロフィー理論に基づく分岐現象の一般化を扱った。さらに、それぞれについて、実際の生きた細胞集団の挙動として具現化することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成生物学では、生体高分子を組み合わせた人工生命システムを数理モデルに基づいて構築する。システムのパラメータを変化させた際のモデルの挙動の変化が、ナマの生命システムの挙動の変化に反映するならば、その数理モデルによる生命システムの把握は成功している。この意味で、合成生物学は、博物学に重きを置いていた伝統的な生物学と相補的なアプローチにあり、生物学を自然科学一般の文脈でとらえる運動と言える。本研究では、細胞集団における空間パターンの形成に対してこの合成生物学アプローチを適用するものであり、多細胞生物を含めた生命に対する新たな理解や、数理モデルを活用した工学手法による医薬品開発にも資するものである。

研究成果の概要(英文)：By using synthetic biology to analyze both the mathematical model and the behavior of actual living cells, this study allowed a better understanding for formation of cell populations' spatial pattern started from a single cell which diversify its gene expression pattern autonomously. One mathematical model we have developed here for colony formation includes the diffusion of intercellular communication molecules and the cell growth rate depending on the internal state of the cell. Another models describes generalization of bifurcation phenomena based on catastrophe theory. Furthermore, for each model, we achieved realization of them as the behavior of an actual living cell population.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 遺伝子ネットワーク 空間パターン 細胞間通信 人工生命システム 人工遺伝子回路

1. 研究開始当初の背景

複数種類の細胞によって形成される空間パターンの形成は、多細胞生物の発生や微生物コロニーの発達の両方において共通してみられる本質的な生命現象である。例えば多細胞生物では、パターン形成を通じて得られる精密な位置情報に沿って正確に形態形成が行われ、それぞれの機能に分化した細胞が空間上に配置される。(Petersenら Cell 2009)。微生物でもパターン形成によって微生物間で分業がなされ、バイオフィームなどの大規模なコンソーシアムが作られる(Daviesら Science 1998)。

一方、細胞集団での空間パターン形成を支配する因子の相関関係を解明することは、多要素が複雑に絡み合っているがために困難な状況が続いている。細胞内部状態の多様化は、力学系の観点からは分岐点周辺での細胞群の内部状態の位置とばらつきによって支配されるため、試行ごとに空間パターンの差異が生じる。そして、自然界で見られるパターンを生み出す天然の遺伝子回路は膨大な数の遺伝子からなり、各遺伝子のパターン形成への寄与の度合いを特定するのは困難である。さらには、非常に研究が進んでいた枯草菌についてすら、ごく最近になって(Liuら Nature 2015)、コロニー成長とバイオフィーム形成に際してのコロニー内の栄養の奪い合いという、新たな観点からの理解が必要である、ということが示されてもいる。

近年の合成生物学アプローチにより、多要素が複雑に相関する生命現象の本質を抽出するために、研究者が遺伝子を指定した様式で組み合わせる人工遺伝子回路を用いて純化した系を生きた細胞内に構築し、この挙動と数理モデルの挙動とを比較することで、生命現象の構造的な理解が可能になっている。そのアプローチの適用は、2つのタンパク質が互いの生産を抑制するトグルスイッチの構築とその力学系の観点からの理解に始まった(Gardnerら, Nature 2000)。続いて、細胞密度の増加を人工的な細胞間通信によって検知して増殖抑制がかかる系を構築することで、環境条件に応じた一定の細胞密度に収束する培養系の構築が行われた(Youら, Nature 2004)。また、最近では、複数種類の細胞と通信分子を活用した多段階論理回路の構築までもが行われている(Moonら, Nature 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、細胞一個が増殖し各細胞の内部状態が多様化した結果としての空間パターンの形成について、安定性の分岐を起こすために各種パラメタを操作可能な人工遺伝子回路を持った大腸菌を構築し、その顕微鏡経時観察を行う。細胞間相互作用、栄養の取り込み、細胞集団内での位置とその遺伝子発現状態の安定性が、パターン形成の再現性や時間安定性にどのように関わるかを、モデルの解析結果と生物実験結果の比較を通じて理解することを目的とした。

3. 研究の方法

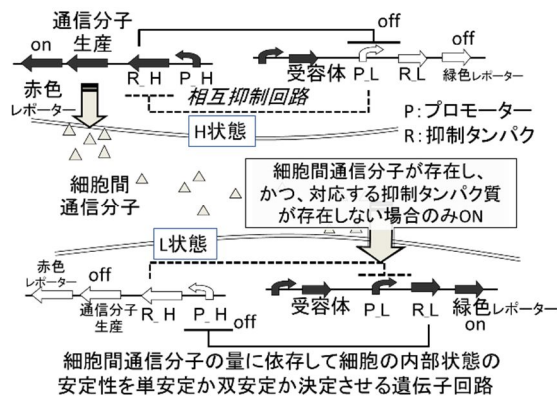
これまでに我々の研究室で実績のある、細胞間通信分子の濃度に依存して内部状態の安定性が決定される人工遺伝子回路を持つ細胞について、空間パターンの形成を顕微鏡により経時観察した。また、各細胞について、内部状態の運命決定を行うタンパク質濃度の時間変化および各時間でのコロニー内での細胞位置情報がパターン形成に与える寄与を、コロニー形成物理シミュレーションにより解析した。さらに、この人工遺伝子回路について、プロモーター強度の調節によって分岐の様相を変化させることで、カタストロフィー理論一般の状況を具現化できるかに

ついて、安定数の数を、数値計算と培養実験それぞれから求めた。

コロニーパターン形成に与える種々の影響を評価するためのコロニー形成の物理シミュレーションには、文献で報告されている CellModeller を改良した[Rudgeら ACS SynBio 2012, 2013]。このプログラムは、1つの細胞が細胞分裂を繰り返してコロニーを形成していく様子を、大腸菌の空間配置と細胞分裂を陽に示してシミュレーションすることができる。また、遺伝子発現制御タンパク質や細胞間通信分子による遺伝子発現の ON・OFF を、数式で規定することができる。CellModeller のパラメタとこれまでの計算機実験や生物実験での速度定数を統一的に扱うため、予備的な計算機実験によって、以下2系統の定数を定めた。(1)単なる細胞分裂を行わせることで、CellModeller の1ステップが現実時間の何分に相当するかを求めた。(2)この時定数を取り込んで、シミュレーションにおける細胞間通信分子の拡散係数を、細胞の長さと同程度の小分子の拡散係数から求めた。

4. 研究成果

本研究の回路は、下図左のように、同一の遺伝子回路が H 状態、L 状態、2つの安定した遺伝子発現状態を持ちうる。そのための主要素が、2つのリプレッサー R_H と R_L による相互抑制系となっている(下記式では i 番目の細胞でのそれぞれ濃度を、 x_i, y_i としている)それぞれのリプレッサーは、互いの発現を抑制する。また、リプレッサー R_L の発現には、リプレッサー R_H と同時に発現する酵素から生産される細胞間通信分子が要求される。この分子は、迅速に細胞膜を透過し、培地中の拡散を介して、細胞間で共有される(下記式で、培地のある部分での濃度を z_{out} と示した)この状態変化を、下記のように定式化した。



$$\frac{dx_i}{dt} = \frac{\alpha_x}{1 + \left(\frac{x_i}{K_y}\right)^{n_y}} - d_x \cdot x_i$$

$$\frac{dy_i}{dt} = \frac{\alpha_y}{1 + \left(\frac{x_i}{K_x}\right)^{n_x}} \frac{z_{in_i}^{n_z}}{K_z z_{in_i}^{n_z}} - d_y \cdot y_i$$

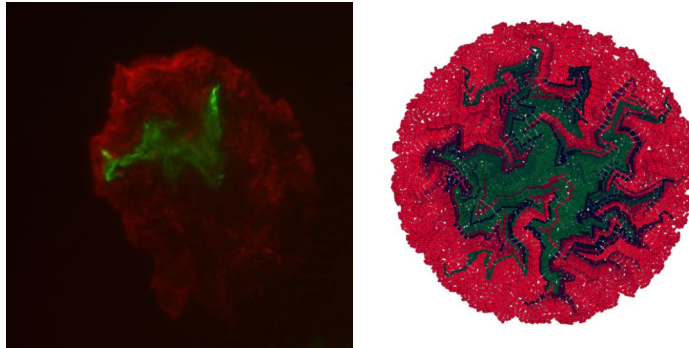
$$\frac{dz_{in_i}}{dt} = \lambda x_i + b \cdot (z_{out_i} - z_{in_i}) \cdot \frac{area_i}{volume_i} - d_z \cdot z_{in_i}$$

$$\frac{dz_{out_i}}{dt} = -b \cdot (z_{out_i} - z_{in_i}) \cdot \frac{area_i}{gridVolume} - d_z \cdot z_{out_i}$$

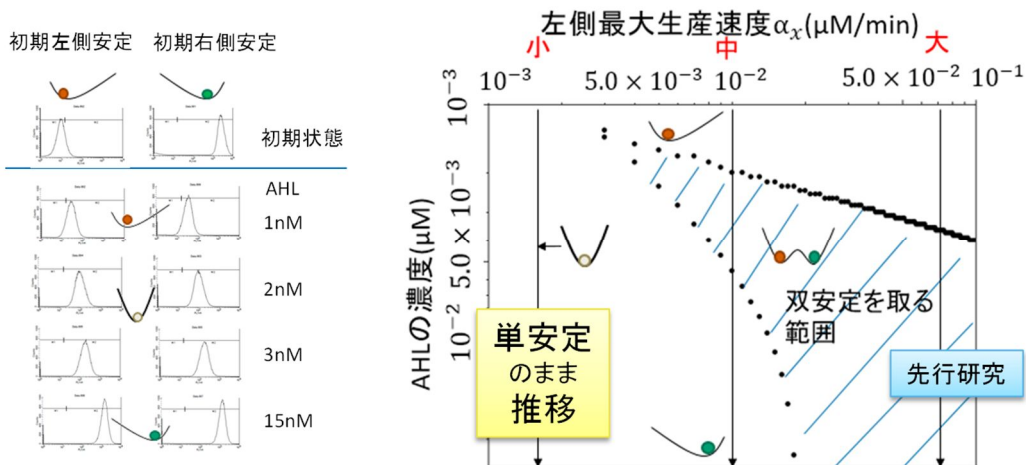
本研究では CellModeller を改良することによって、コロニーの各所に位置する細胞ごとに、内部状態の変化および成長速度の変化も計算に取り込み、成長速度の違いがパターン形成に与える寄与を検証することを試みた。原核細胞においてタンパク質濃度の減少速度は、細胞が伸長する局面では主に成長速度に依存し、成長が遅くなるにつれて、タンパク質分解速度に依存するようになる。伸長速度については、CellModeller の関数を使用した。これは、コロニー内部の細胞が栄養の取り込みに不利なことから増殖が遅くなることを模擬したもので、近傍の細胞数に依存し伸長速度が遅くなる様式になっている。

本研究では、通信分子の拡散の様式を、寒天培地でのコロニー形成に合わせることにした。オリジナルのプログラムでは、寒天培地表面でのコロニー形成を模して菌の成長を二次元方向に限定するモードでも、通信小分子は培地が存在しない上方向を含む三次元方向に拡散する仕様になっていた。そこで、このコロニー形成に対応するように、シミュレーション空間上での菌体の位置と、拡散の境界条件を変更した。

本研究の改良によりにより、現実に即したパラメタと通信分子の拡散条件を使用することが可能になった結果、培養実験におけるコロニー形成中に顕微鏡観察で見られたパターン(下図左)と同等のものが、計算機中に再現した(下図右)。



本研究で用いた人工遺伝子回路による細胞内部状態の多様化は、秩序パラメタの変化によって、システムの安定性が単安定から双安定に切り替わる、カタストロフィー理論の典型例の1局面に立脚している。本研究では、秩序パラメタが、細胞が生産する通信分子であった。カタストロフィー理論の一般例の見地から予見できることは、パラメタセットによっては、通信分子の濃度が上昇すると、単安定から双安定に切り替わったのち、さらに逆側の単安定になる、ということである。そこで、パラメタを振った数値計算を行ったところ、プロモーター強度を適切に弱めることで、実際にそのような相転移が起きることが確認できた(下右図の中央)。さらにプロモーター強度を弱めると、単安定のまま、安定状態の位置が推移ししていくことも確認できた(下右図の左)。そこで、弱いプロモーターをいくつかデザインして人工遺伝子回路に組み込み培養実験を行ったところ、実際に、単安定のまま、安定状態の位置が推移ししていくことを確認できた(下左図)。これは、遺伝子発現の初期状態が左右どちらが優勢であっても、細胞間通信分子の濃度が規定する発現状態に収束し、その収束位置が細胞間通信濃度の変化に応じて移動していくことからわかった。



本研究において人工遺伝子回路のパラメタ変更を行ったことで、この回路がカタストロフィー理論一般に合致することを示すことができた。この人工遺伝子回路を持つ細胞集団の空間構造の形成をシュミレーションすることが可能になったことと合わせ、この人工遺伝子回路を使用した微生物の種々の応用や、細胞集団の挙動のさらなる理解が、今後期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takefumi Moriya, Tomohiro Yamaoka, Yuki Wakayama, Shotaro Ayukawa, Zicong Zhang, Masayuki Yamamura, Shinji Wakao and Daisuke Kiga*	4. 巻 9
2. 論文標題 Comparison between Effects of Retroactivity and Resource Competition upon Change in Downstream Reporter Genes of Synthetic Genetic Circuits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life9010030	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 -

1. 著者名 Jacob Beal, Natalie G Farny, Traci Haddock-Angelli, Vinoo Selvarajah, Geoff S Baldwin, Russell Buckley-Taylor, Markus Gershater, Daisuke Kiga, John Marken, Vishal Sanchania, Abigail Sison, Christopher T Workman	4. 巻 -
2. 論文標題 Robust Estimation of Bacterial Cell Count from Optical Density	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1101/803239	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16件（うち招待講演 5件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 橋本真奈、鮎川翔太郎、木賀大介
2. 発表標題 細胞間通信に依存した細胞種多様化における細胞種比率の頑健性に与えるフィードバックの影響
3. 学会等名 「細胞をつくる」研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 Artificial cell-cell communication and symbiosis designed by synthetic biology
3. 学会等名 ADVANCED TECHNIQUES TO STUDY AND EXPLOIT THE SPONGE AND CORAL MICROBIOMES WORKSHOP（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木賀 大介
2. 発表標題 合成生物学: 生命システムを数理モデルに 基づいて設計・実装して理解する
3. 学会等名 理研 「物質階層の原理を探究する統合的実験研究」第1回春合宿(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shotaro Ayukawa, Takashi Hata, Daisuke Kiga
2. 発表標題 Repeated diversification on Waddington Landscape realized with synthesized genetic circuit
3. 学会等名 SB7.0(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 Synthetic Biology: Engineering of genetic codes and genetic circuits
3. 学会等名 19th German-Japanese Joint Symposium between the University of Bonn and Waseda University(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木賀 大介
2. 発表標題 合成生物学が拓く生物工学の限りない可能性
3. 学会等名 生物工学会 賀詞交換会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森谷孟史、山岡智浩、若山裕綺、鮎川翔太郎、張子聡、山村雅幸、若尾真治、○木賀大介
2. 発表標題 人工遺伝子回路設計における下流レポーター遺伝子が与える影響
3. 学会等名 デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木賀大介
2. 発表標題 合成生物学の学部教育
3. 学会等名 遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Syotaro Ayukawa, Daisuke Kiga
2. 発表標題 Design and construction of a synthetic microbial community by combining synthetic biological subsystems
3. 学会等名 生物物理学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Syotaro Ayukawa, Daisuke Kiga
2. 発表標題 Design strategy to construct synthetic gene circuits working in living cells
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 Systems biology : Synthetic biology = Systems chemistry : ???
3. 学会等名 ELSI symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木賀大介
2. 発表標題 設計生物学 博物学ではない生物学の構築
3. 学会等名 デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Kiga
2. 発表標題 Cell-cell communication dependent bifurcation of stability in genetic circuit
3. 学会等名 Asian Synthetic Biology Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畑敬士、中川絵理子、橋本真奈、西田暁史、関根亮二、山村雅幸、木賀大介
2. 発表標題 細胞間通信を介して自律的に多様化を行う人工遺伝子回路の挙動拡張
3. 学会等名 生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川一輝、西田暁史、太田裕作、青木一洋、木賀大介
2. 発表標題 シミュレーションによるコロニーパターン形成を支配する因子の解明
3. 学会等名 生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田大悟、西田暁史、高橋義一、田中大器、関口哲志、木賀大介
2. 発表標題 流体デバイスを用いた一細胞経時観察による制御遺伝子回路へのretroactivityの解析
3. 学会等名 生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木賀大介著 植田充美監修	4. 発行年 2017年
2. 出版社 CMC出版	5. 総ページ数 12
3. 書名 〔設計生物学〕 人工細胞の創製とその応用 内	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	西田 暁史 (Nishida Takashi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中川 絵理子 (Nakagawa Eriko)		
研究協力者	橋本 真奈 (Hashimoto Mana)		
研究協力者	北川 一輝 (Kitagawa Kazuki)		
研究協力者	池田 大悟 (Ikeda Daigo)		