

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657059

研究課題名（和文） 単細胞を用いた細胞分化の恒常性モデルの構築

研究課題名（英文） Construction of cell differentiation model by bacterial cells

研究代表者

イン ベイウェン (YING BEIWEN)

大阪大学・大学院情報科学研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：90422401

研究成果の概要（和文）：細胞分化のプロセスにおいては確率的であるが、集団レベルでは恒常的に維持される。本研究は、相互抑制する 2 つオペロンを大腸菌のゲノム上に設計し、二者択一的に発現して、二つの表現型であるロイシンまたイソロイシン生産能を確率的に作り出した。さらに、表現型間相互作用であるアミノ酸要求性を組み込んでおり、細胞間相互作用を利用した安定な集団割合の形成が確認された。“分化する大腸菌”の創出に成功した。

研究成果の概要（英文）：Cell differentiation is a process of stochasticity in phenotypic differentiation but shows the high homeostasis at the population level, *i. e.*, the composition of varied differentiated cell types. A mutually inhibitory genetic circuit was designed and integrated into the *E. coli* genome. Also, the requirements for the amino acids (leucine and isoleucine) were introduced into the genetic circuit. The *E. coli* cells carrying this genetic circuit were used to mimic the cell differentiation successfully, based on the cell-to-cell communication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	0	2,000,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：発生、分化、進化、発現制御、大腸菌、遺伝子、細胞間相互作用、微生物

1. 研究開始当初の背景

細胞分化に関しては、特異的遺伝子発現またエピジェネティックな制御が知られているが、これらの分子機構の実行は個々の細胞では確率的である。たとえば、幹細胞の不均衡分裂現象のように、分化因子があってもすべての細胞が分化するのではない。数の少ないシグナル分子による分化誘導では、分子拡散によるので、いつ、どれだけの数の細胞が

分化するかは確率的になるためである。個々の細胞の表現型の変化が確率的であるにも関わらず、なぜ細胞集団中の分化した各表現型の割合がほぼ一定に保たれるのか？各表現型が一定に保たれること（恒常性）を説明する細胞間相互作用による分化決定の戦略が提唱され、真核細胞を用いた研究が行われている。しかし、すでに細胞分化する細胞を用いているために、確率性と恒常性を持った

細胞分化の誕生に必須である普遍的ルールの解明には至っていない。そこで、分化能をもたない大腸菌に確率的な表現型の変化と細胞間相互作用の基本ステップだけを含んだ実験系を構築し、定量的に細胞間相互作用の効果を明らかにすることを目的とする。

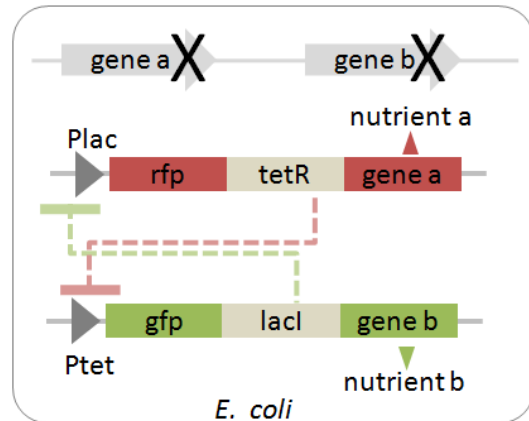
本来分化しない細胞を用いて、安定な細胞分化を引き起こすルールを導く。細胞分化の研究においては、既存の分化細胞（真核細胞）を研究対象とした分析的なアプローチが主流である。しかし、分化能をもつ細胞では、様々な分子メカニズムと複雑な相互作用が関わっている可能性があるため、必要最小限の基礎的なルールを解明することが難しい。ここで、単細胞（大腸菌）を用いて、構成的な研究アプローチを試みる。真核細胞の表現型分化スイッチ機構は、二重フィードバック制御であることが提案されている。二重フィードバック制御を組み込んだ大腸菌は、同一遺伝型だが二つの表現型は確率的であることは、異なる複製能と分化能どちらかしか持たない前駆細胞と幹細胞を疑似する。このシンプルな実験系を用いて、定量的に細胞分化の恒常性を明らかにする。

2. 研究の目的

細胞分化は、一様な遺伝型を持つ細胞が多様な表現型を示す細胞への転換である。そのプロセスにおいては、個々の細胞の表現型は比較的少数の誘導分子によって遺伝的に制御されているため、その変化、つまり分化は確率的である。一方で、細胞の集団レベルでは、様々な分化した細胞がある一定の割合に到達し、恒常的に維持される。この細胞分化の恒常性が細胞表現型の確率性と細胞間の相互作用によって創りだされることを実験と理論の両面で示す。細胞の種類によらない分化モデルから、多細胞の誕生に関する基本的ルールを明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

まず、分化する大腸菌細胞を構築する(図)。確率的な分化現象を創り出すには、遺伝子発現制御のPositive Feedback系を用いる。CMP (common myeloid progenitor) がマイクロファージと好中球に分化するには、細胞内Positive Feedback系のスイッチの働きが知られている。Positive Feedbackの物理的性質としては、過去の状態(履歴)によって現在の細胞状態が規定されることである。そのため、過去に異なるシグナルを受けていれば、細胞が同じ環境下に置かれたとしても異なる表現型を示すことが可能である。



このような複数の表現型が現れることはCMPの分化スイッチや、Lacオペロンのスイッチオン・オフや、さらにLacIとTetRを導入した二重フィードバック制御が類似している。ここで、LacIとTetRからなる二重フィードバック回路(図)を大腸菌ゲノム上に構築し、表現型の多様性を作り出し、個々の細胞の確率的な表現型の変化を模倣する。

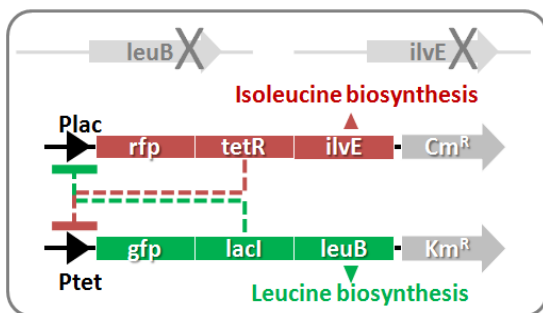
そして、恒常性をもつ分化集団を形成させるのに、アミノ酸栄養要求性を相互作用として用いる。大腸菌生存に必要な二種類の栄養素aとbによって相互作用を作り出す。アミノ酸合成に関わる遺伝子(gene a, gene b)を本来のオペロンから二重フィードバック回路に組み込み、ゲノム再編する。図に示した設計のRFP-TetR-gene a-GFP-LacI-gene b回路をもつ大腸菌は、生存にはアミノ酸両方が必須であるが、遺伝子回路の性質(TetRとLacIにより抑え合う)によりaまたbのどちらかしか作れない(例えば、RFP-tetR-gene aがたまたま少し多く発現されると、GFP-lacI-gene bの発現が抑制され、gene a側の発現がますます促進され、栄養素aしか作れなくなる。)。このように、栄養要求性の表現型が確率的に変化すれば、栄養を通じた細胞間相互作用が生存に必須となる。つまり、gene aを発現する(栄養素aを生産する)細胞から漏れ出したaがa要求性を示すgene bを発現する細胞(栄養素bを生産する)に供給され、栄養素bにも逆向きの場合には両細胞は増殖可能となる。このような相互作用により、二種類の細胞集団がある割合で安定し、機能的に分化した細胞が共存することが可能である。

次に、細胞間相互作用による細胞分化モデルを提示する。構築した大腸菌が分化する条件を見つけ出し、細胞間相互作用による分化モデルを提案する。安定な細胞分化系の判断基準は、異なる初期分布からスタートしてもある同一な最終分布になるとの実験結果である。フローサイトメトリーによる一細胞レ

ベルの観測を主に用いる。遺伝子 a と b の代わりに、*leuB* と *ilvE* を例として説明すると、ロイシンとイソロイシン存在下では、細胞集団の初期状態によって最終的集団割合が変わってくるのに対して、飢餓条件下では、どんな初期状態におかれても、必ず二種類の細胞 (*ilvE* 発現細胞と *leuB* 発現細胞) に分かれ、最終的集団割合が一定となる。これは、飢餓状態の場合のみ、細胞が生存するため機能 (ロイシンまたイソロイシンを作る) の異なる集団に分化する必要性があり、二集団細胞の相互作用すること (ロイシンとイソロイシンの交換) によって増殖するのである。細胞分化の恒常性と相互作用との相関を、単独栄養条件下でアミノ酸濃度を定量的に変化させることによって実験的に明らかにする。確率的な遺伝子機構によって表現型が変化しても相互作用によって安定化することが証明できる。分化前後の集団ポピュレーション遷移のダイナミクスを解析し分化モデルを提案する。確率的に起こる細胞分化の恒常性を定量的に説明する。

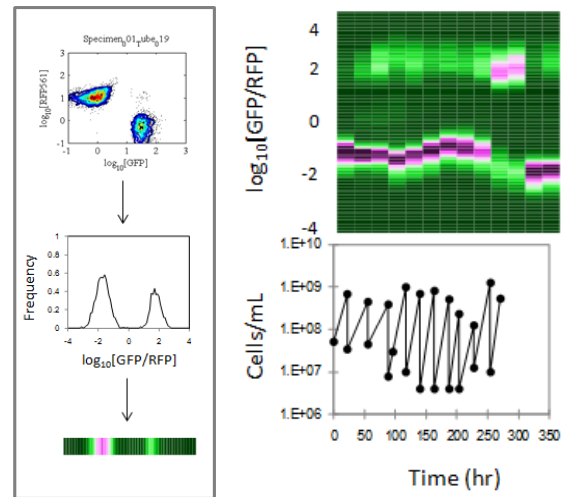
4. 研究成果

二重フィードバック回路 (相互抑制するオペロン) を大腸菌のゲノム上に設計した。この細胞は、其々のオペロンが二者択一的に発現して二つの表現型であるロイシン生産能 (緑色細胞) またイソロイシン生産能 (赤色細胞) を確率的に作り出すことができた (下図)。さらに、この二つのオペロン内に表現型間相互作用をする仕組みを組み込んだ。要するに、それぞれアミノ酸要求性を組み込んでおり、緑色細胞はイソロイシン要求性を示し、赤色細胞はロイシン要求性がある。確率的分化と細胞間相互作用をもったこのシンプルな分化モデル実験系を用いて、細胞間相互作用を利用して、分化した細胞集団が安定な割合で維持されることを実験的に証明した。



MDS42ΔleuBΔilvE
 $\Delta galK::Plac-rfp-tetR-ilvE-(P)cat$
 $\Delta glnA::Ptet-gfp-lacI-leuB-(P)kan$

このように“分化する大腸菌”を創りだすことが初めて成功した。同じ遺伝型を持つ表現型の異なる大腸菌の初期分布が確率的に乱れても、恒常的に同一な分化状態 (二つの細胞集団の割合) が到達できることを証明した (下図)。この確率的な乱れに対する恒常性は分化する高等生物細胞に見られる普遍的特徴であるため、細胞分化の特徴がいかに作り出されるかを定量的に明らかにし、多細胞誕生の普遍的ルールを示唆した。



以上のように、複雑で未知な部分の多い真核生物の細胞間相互作用の代わりに、表現型の異なる細胞から作り出される必須栄養素ロイシンとイソロイシンによる相互作用を用いる。*leuB* と *ilvE* はそれぞれロイシンかイソロイシンしか生産できないため、生存するための栄養素のやり取りが必要である。たとえば、*leuB* 集団の数が何らかの理由で減らされれば、ロイシンの生産能が下がるので、*ilvE* の増殖に提供できるロイシンの量が減少し、*ilvE* 集団の数が減っていく。一方でイソロイシンに必要な *leuB* は余るので、*leuB* が増殖しやすくなり、*leuB* 集団の数が元に戻ろうとする。このようにロイシンとイソロイシンによる細胞間相互作用によって、最終的に *leuB* と *ilvE* がある比率に落ち着き、細胞分化の恒常性を創り出された。このことにより、細胞内部の細かな分子機構を問わず、細胞分化の恒常性えられることが証明された。

今後、実験室内進化系を構築し、この細胞間相互作用をさらに強くして、より安定な細胞分化モデルの確立を目指す。そして、モデル構築過程において、確率的に誕生する変異株を調べて、iPS など誘導の癌化の解消に役に立つ情報を提供する。

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4件)

[1] Y Matsumoto, Y Ito, S Tsuru, BW Ying & T Yomo (2011) Bacterial cells carrying synthetic dual-function operon survived starvation. J Biomed Biotechnol 2011: e489265.

[2] Y Shimizu, S Tsuru, Y Ito, BW Ying & T Yomo (2011) Stochastic switching induced adaptation in a starved Escherichia coli population. PLoS ONE 6: e23953.

[3] S Tsuru, N Yasuda, Y Murakami, J Ushioda, A Kashiwagi, S Suzuki, K Mori, BW Ying & T Yomo (2011) Adaptation by stochastic switching of a monostable genetic circuit in Escherichia coli. Mol Syst Biol 7: e493.

[4] BW Ying, Y Ito, Y Shimizu & T Yomo (2010) Refined method for the genomic integration of complex synthetic circuits. J Biosci Bioeng 110: 529-536.

[学会発表] (計6件)

[1] BW Ying, S Tsuru & T Yomo Synthetic proto-operons for stochastic adaptation. The 17th International Biophysics Conference, 2011年11月3日, Beijing, China.

[2] Y Murakami, S Tsuru, BW Ying & T Yomo Adaptive response of rewired Escherichia coli strains in response to starvation. International Symposium on Synthesizing life and biological systems, 2011年10月25日-26日, Osaka, Japan.

[3] BW Ying, S Tsuru & T Yomo Stochastic adaptation mediated by synthetic proto-operons. Bioinspired Materials and Functionalities, 2011年6月21日-22日 Groningen, The Netherlands.

[4] S Tsuru, N Yasuda, BW Ying, A Kashiwagi & T Yomo Flexible Gene Expression to Starvation out of Native Regulatory Mechanisms. The 11th International Conference on Systems Biology, 2010年10月11日, Edinburgh, UK.

[5] Y Matsumoto, Y Ito, BW Ying & T Yomo Synthetic toggle switch for selective gene

expression in bacteria. IBI02010, 2010年7月27日, Dalian, China.

[6] BW Ying, S Tsuru, Y Matsumoto, Y Shimizu, Y Ito & T Yomo Biological Noise Induced Gene Production in Bacteria—a Universal Principle in the Adaptive Response to Starvation. IBI02010, 2010年7月25日, Dalian, China.

[図書] (計2件)

[1] BW Ying, Y Akeno & T Yomo (in press) Construction of synthetic gene circuits in the Escherichia coli genome. Methods in Molecular Biology (eds. K Polizzi & C Kontoravdi), Springer.

[2] BW Ying & T Yomo (2012) Built-in synthetic gene circuits in Escherichia coli - methodology and applications. Advances in Applied Biotechnology I (ed. M Petre), p195-208, InTech, Rijeka.

[その他]

総説

[1] 應蓓文、津留三良、四方哲也 (2011) 細胞の個性による運命の決定 細胞工学 30: 1078-1083.

[2] 津留三良、應蓓文、四方哲也 (2010) 遺伝子発現ゆらぎの解析と応用 実験医学 28: 7-11.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

イン ベイウエン (YING BEIWEN)

大阪大学大学院・情報科学研究科・特任准教授 (常勤)

研究者番号: 90422401