

研究報告書

「細胞間相互作用により双安定状態を維持する人工遺伝子回路の解析」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：木賀 大介

1, 研究のねらい

細胞間シグナルに依存した細胞の分化など、動的で複雑な生命現象の本質を知るためには、モデル化が重要となる局面があります。本研究では、数理的なモデル化を進めるとともに、モデルに基づいた遺伝子人工ネットワークを生きた細胞の中に構築して、細胞を人工的に多様化させる「分化」過程を解析する、合成生物学アプローチを推進します。このようなドライとウェット両面の実験的検証を通じて、多様化の基本原理の追及を目指しました。とくに、発生過程をモデル化した、「地形」上でボールが転がっていく過程を規定する遺伝子ネットワークを題材として、細胞の数に依存した多様化の変化を明らかにしました。

2, 研究成果

生命の発生や再生プロセスにおいて重要な、細胞内・細胞間の遺伝子相互作用によって生じる細胞種の多様化は、下に行くほど溝の数が増えていく坂道を玉が転がる様子で抽象的に解釈されている。この坂道は「ワディントン地形」(Waddington's landscape)と呼ばれ、最上部が受精卵、最下部のそれぞれの溝が、筋肉や神経など安定な細胞状態に対応している(図1)。京都大学の山中伸弥教授は iPS 細胞の概念を説明するために、この地形上を玉が登っていく図を示している。

地形モデルは、複雑な生命現象を把握するために有用であるが、実態は解明されていなかった。「地形」の単純な概念に対して、天然の細胞種の多様化に関わる遺伝子数は膨大で、細胞種の多様化に関わる遺伝子ネットワークのうちどこがコアな部分なのかを調べるのは困難である。このため、細胞の状態変化をデザインすることも難しかった。

近年進展している合成生物学という研究手法は、自然現象を司る遺伝子ネットワークのコアな相互作用を調べるための有力な手法であり、その研究過程で、自然現象における相互作用を再構成した規模の小さいシステムである人工遺伝子ネットワークが構築される。本研究では、細胞間の相互作用を変化させる実験操作が「地形」に与える影響を考慮することで、細胞集団の運命をデザインどおりに変化させることができた。

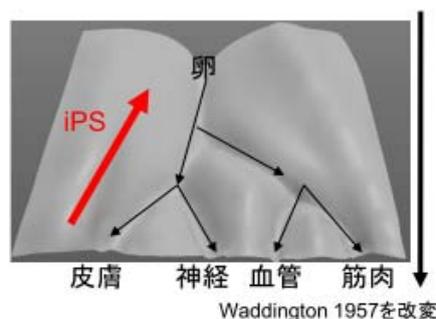


図1 Waddington's landscape. 1つの細胞から、神経細胞、筋細胞など多様な安定状態へと細胞が分化する過程を示す。細胞の分化は、下るほど溝の数が増えてゆく地形の上を玉が転がることで表現されてきた。この図において、細胞のiPS化とは、山を下りきった(分化しきった)細胞がもう一度上に登ることに相当する。

今回の研究では、均一な細胞集団が「ワディントン地形」上を転がる玉のように2つの細胞種に多様化する機能を、4つの遺伝子からなるシンプルな人工遺伝子ネットワークを設計し、これを生きた細胞に導入することで実装した(図2)。転がる過程で、細胞同士は自らが生産する細胞間通信分子(AHL)によって相互作用を行うように設計した。この人工ネットワークの機能は、図3で表わされるように、2つの遺伝子を利用した細胞間通信と、さらに別の2種類の遺伝子(LacI、Clts)による細胞内での相互抑制とからなる。

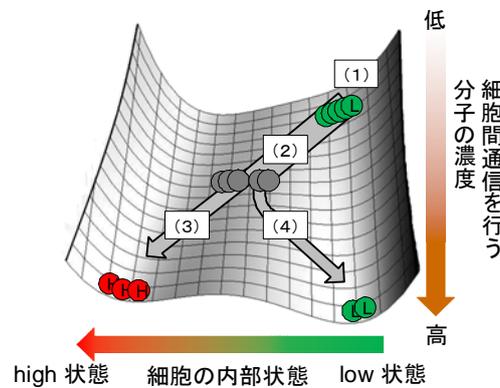


図2 Waddington's landscape 上を転がる玉のように、同一の細胞集団が2つの安定状態に多様化する挙動の概念図。開発した人工遺伝子ネットワークを持った大腸菌を、(1)通信分子が少ない環境で low 状態のみにすると、(2)わずかに細胞間通信分子を生産しながら high 状態に近づく。じゅうぶんに細胞間通信分子の濃度が高まると、両方の状態が安定となるので、(3)細胞集団の分布の一部が high 状態に向かい、(4)残りが low 状態に戻る。そして、最終的に2つの細胞種が混ざった状態として安定する。

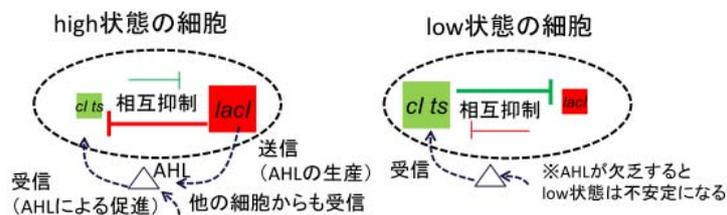


図3 high 状態、low 状態の細胞における遺伝子の相互作用の様子。今回開発された人工遺伝子ネットワークは、LacIとCltsの細胞内相互抑制と、通信分子AHLによる細胞間相互作用からなる。AHLがじゅうぶん存在するとLacIとCltsの細胞内相互抑制の効果によりどちらの状態も安定であるが、AHLが欠乏するとlow状態は不安定になる。(左)high状態の細胞内では、LacI生産が優勢になっている。また、この

状態の細胞は AHL を多く生産する。(右)low 状態の細胞内では、Clts 生産が優勢となっている。Clts は、LacI と同時に AHL を生産するための酵素をコードする遺伝子も抑制するため、この状態では AHL の生産はわずかである。

この結果、同一の遺伝子セットを持つ細胞が、細胞間通信分子を生産する「high 状態」と、わずかしか生産しない「low 状態」の2つの細胞種に多様化できる。今回は、各細胞種の認識のために、low 状態の細胞が緑色蛍光タンパク質(GFP)を生産するように人工遺伝子ネットワークを設計した。本細胞集団について、low 状態だけであったのが、high 状態と low 状態という2つの細胞種を含む集団へ変化することを実験で確認した(図 4)。

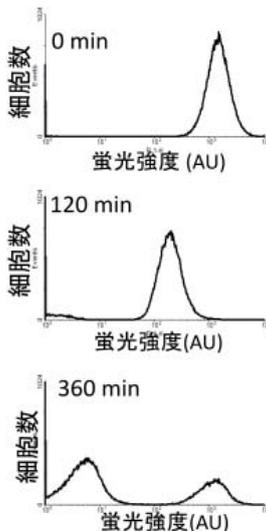


図 4 実験による多様化の確認。今回開発された人工遺伝子ネットワークは low 状態の細胞が GFP を生産するように設計されている。low 状態にリセットされた細胞集団は設計通り GFP を多く生産した。その後、中間状態を経て、low 状態と、GFP をほとんど生産しない high 状態とに多様化した。

また、同様の相互抑制回路を用いることで、遺伝子大量発現が iPS 細胞の確立に及ぼす影響を考察することができた。

本研究で構築した人工遺伝子ネットワークを持つ細胞でみられた、多様化後の細胞種の比率が細胞数に依存するという相関は、発生中の胚におけるコミュニティー・エフェクト (Community effect) でもみられる。近年では、ES 細胞の分化比率も、細胞数に依存してしまうことが発見されている。本研究の人工遺伝子ネットワークは4つという少ない数の遺伝子からなるので、同じネットワーク構造を、発生や再生過程で働いている遺伝子群の中から見つけたことができるだろう。その結果、発生や再生過程での細胞数に依存した現象に関する新たな知見を得ることと、この知見を活用して細胞の分化比率の操作が可能になることが期待される。

3. 今後の展開

合成生物学での人工遺伝子ネットワークの構築によって、細胞内・細胞間の相互作用をプログラミングすることにより、微生物を用いた有用物質生産や、再生医療や iPS 細胞の活用に向けた幹細胞の分化誘導などが可能になると期待されている。本研究で開発した人工遺伝子ネットワークでは、遺伝子型が同一な細胞集団における細胞種の比率を制御することができる。このような集団レベルでの挙動制御を伴う分業システムを実現することで、産業・医療応用における重要な役割を果たすことが予想される。例えば、薬剤や燃料などを微生物で作成するには、複

数段階の反応が必要となる。このような場合、1つの細胞で全ての反応を行うよりも、複数種類の細胞で分業を行うことが望ましいと考えられている。また、薬物動態予測のために、iPS 細胞から試験管内で微小肝組織を作成する際にも、細胞種の比率制御が重要になってくる。さらに、「地形」に基づいたプログラミングの考え方を、ES 細胞や iPS 細胞を助ける細胞のデザインに活かすことで、再生医療に貢献すると期待される。

4. 自己評価

本研究では、当初想定した、細胞間相互作用により双安定状態を維持する人工遺伝子回路を、数理モデルに基づいて作製し、研究期間内に論文を公表することができた。この論文で用いた成果の説明方法は、領域会議などで、研究総括、アドバイザー、同僚研究者の助言によって改善されたものである。その結果、新聞全国紙などでも紹介される論文となったことは、若手研究者を育成するさがけ制度の恩恵を私が受けたことによる。

現在論文執筆中であり、公表することができないもうひとつの成果は、数理モデルに基づいて生きた細胞を操作するという方針をさらに展開したものであり、想定以上の成果であるといえる。この研究についても、実験の結果を一般化して説明する過程で、領域の皆様からいただいた助言、ディスカッションが極めて重要であった。

一方、計画書に記した、ゆらぎの大きさを変化させる実験によってゆらぎの意義を追及することについては、細胞への実装が中途段階にとどまってしまった。現時点でも、このテーマの重要性は明らかであるので、研究を継続していきたい。

予期しなかった私に関する変化として、直接の研究の進展ではないものの、モデルに基づいて遺伝子ネットワークを構築することの意義が、工学一般や異分野で注目されようになったことを挙げたい。この原因には、さがけ制度のネームバリューによる寄与も大きいと思われる。結果として、私が学際的なシンポジウムに招かれることが増えた。また、優秀な学生がこの分野に集まることとなり、合成生物学の学部生国際コンテストで私が監督するチームが、Best Information processing 賞や Best Modeling 賞を獲得し、これらに基づいて審査教員による投票で総合 top10%や、学生投票世界一を獲得することとなった。

5. 研究総括の見解

細胞分化は細胞集団の状態が多様化する事であると捉え、細胞を人工的に多様化させる人工遺伝子ネットワークを、数理モデルを介してデザインするという、ユニークな課題に取り組んだ。具体的には、Hybrid toggle switch を構成する4つの遺伝子を挿入した均一なバクテリア集団が、自らが生産する通信分子を介して細胞内・細胞間相互作用する結果、双安定な異なる二つの集団に分岐する可能性を理論的および実証的に明らかにした。これは、Waddington の隠喩として知られる epigenetic landscape を彷彿させるもので独創的かつ興味深い成果である。今後は、実際的な多細胞生物の複雑な遺伝子ネットワークにおいて、本研究で示唆された多様化のメカニズムがどのように具現化しているかが明らかにされる事を期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ryoji Sekine, Masayuki Yamamura, Shotaro Ayukawa, Kana Ishimatsu, Satoru Akama, Masahiro Takinoue, Masami Hagiya, <u>Daisuke Kiga</u> , "Tunable synthetic phenotypic diversification on Waddington's landscape through autonomous signaling" <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> , 108 , 17969–17973, (2011)
2. Shotaro Ayukawa, Akio Kobayashi, Yusaku Nakashima, Hidemasa Takagi, Shogo Hamada, Masahiko Uchiyama, Katsuyuki Yugi, Satoshi Murata, Yasubumi Sakakibara, Masami Hagiya, Masayuki Yamamura, and Daisuke Kiga. "Construction of a genetic AND gate under a new standard for assembly of genetic parts" <i>BMC Genomics</i> , 2010; vol 11 Suppl 4:S16

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

英文総説(査読つき)

Shotaro Ayukawa, Masahiro Takinoue, and Daisuke Kiga, "RTRACS: A Modularized RNA-Dependent RNA Transcription System with High Programmability", *ACS Acc. Chem. Res.*, 2011, 44 (12), pp 1369–1379

日本語総説

「人工遺伝子回路を設計する」実験医学増刊 2011 vol29 細胞を創る・生命システムを創る p 1134–1139

CMC 合成生物学の隆起 植田充美編、「細胞内に人工遺伝子回路をつくる」木賀大介印刷中

学会セッションオーガナイズ

Constructive studies on gene networks and their fundamental technologies towards synthesis of cells

第 33 回日本分子生物学会年会 指定シンポジウム パシフィコ横浜メインホール 2011年12月14日

国際シンポジウム発表

Japanese-French Frontier Science Symposium (日仏先端科学シンポジウム)、ニース "Synthetic Biology" Chair 2012 年1月21日(招待)

学際的な研究会での発表(招待講演)

講演「合成生物学でできること、目指されていること」およびパネルディスカッション

2011年3月8日

公開シンポジウム「合成生物学と社会ー先端科学研究の進め方を考えるー」

京都大学人文科学研究所 京都大学東京オフィス

講演「合成生物学と機微技術管理」

2010年12月18日

慶應義塾大学グローバルセキュリティ研究所 バイオセキュリティワークショップ

科学・技術の倫理と機微技術のリスク管理

科学コミュニケーション

東工大サイエンスカフェ「夢をかなえるサイキン」木賀大介 2012年2月25日

サイエンスアゴラ 2011: ワークショップ「世界を救う?救わない?新しい生き物を創るということ」

2011年11月19日 岩崎秀雄、木賀大介、瀧ノ上正浩、橋本裕子(前3者は全てさきがけ研究者)

サイエンスカフェ「人工生命・人工細胞 ～合成生物学が拓く未来～」AAAS_Science/日本科学未来館 木賀大介 2010年10月11日

サイエンスカフェ「異端児の見る生命・生命合成」主催 武田先端知財団、大島泰郎 木賀大介
2010年8月30日