

# 研究報告書

## 「細胞間フィードバック回路による細胞運命の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 4 月～平成 28 年 3 月

研究者: 戎家 美紀

### 1. 研究のねらい

本研究を開始するにあたって、多細胞生物の発生原理の再構成を目指した。発生生物学や分子生物学の発展によって、発生に必要な遺伝子群の同定は大きく進んだが、実際にそれらの遺伝子を組み合わせれば機能を再現できるかはわからないからである。さらには、作ることで見えてくる発見や新たな疑問があると期待した。再構成する対象としては、発生生物学の最重要原理の一つである、自発的細胞分化を選んだ。つまり、元は同じ種類の細胞からひとりで異なる種類の細胞が生じるしくみの再構成である。具体的には、Delta-Notch シグナルの側方抑制機構を模した人工遺伝子回路を哺乳類培養細胞上に作製し、隣接細胞間に違いを作り出せるか検討することにした。またその際、側方抑制機構によって作り出される2種類の細胞の比率がどのように決まるのか調べた。さらに、側方抑制機構は生体内で細胞の空間パターンを形成できることが知られているため、細胞パターンの再構成にも取り組んだ。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

Delta-Notch シグナルの側方抑制機構を模した最小限の人工遺伝子回路を、こういったしくみを持たない哺乳類培養細胞上に再構成した。その結果、遺伝的に均質な隣接細胞を、異なる2種類の細胞(Delta 陽性細胞と Notch 活性細胞)へ非対称化することに成功した。この再構成によって、側方抑制機構が、非対称分裂などの助けがなくても細胞間に一から違い作りだすのに十分なほど強力なしくみであることを実証した。また予想外の発見として、側方抑制遺伝子回路に *Lfng* 遺伝子を含むサブ回路を加えると、2種類の細胞の比率が変化することを、シミュレーションから発見し実験的にも証明した。以上の結果は、2015 年に *Nat Commun* 誌上で発表した(成果論文1)。また本研究を通じて、今後発生のしくみをどんどん作っていくための基礎技術やプロトコルを確立できた。

次に、側方抑制機構を用いて細胞パターンの再構成を目指した。細胞集団中で Delta 陽性細胞と Notch 活性細胞が約 1 対 2 の比率で交互に現れるところまでは達成できたが、明確に空間パターンと呼べるものは形成できなかった。パターン形成も発生生物学の最重要原理の一つであるので、引き続き再構成に挑戦する予定である。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマA「隣接細胞間に違いを生むしくみの再構成」

多細胞生物の発生の基本原理の一つは、自発的な細胞分化である。均質な細胞間に違いを生むしくみとして最も有名なものが、Delta-Notch シグナルによる側方抑制機構である(図1A)。側方抑制とは、隣り合う細胞間で Delta の転写を抑え合うことであり、これが細胞間の(ダブル

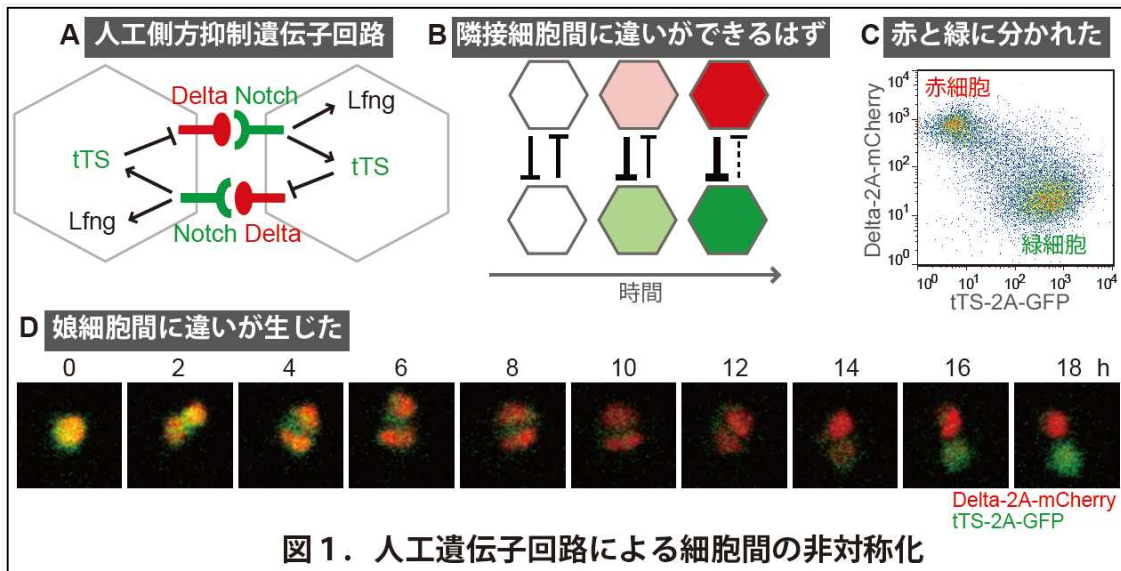


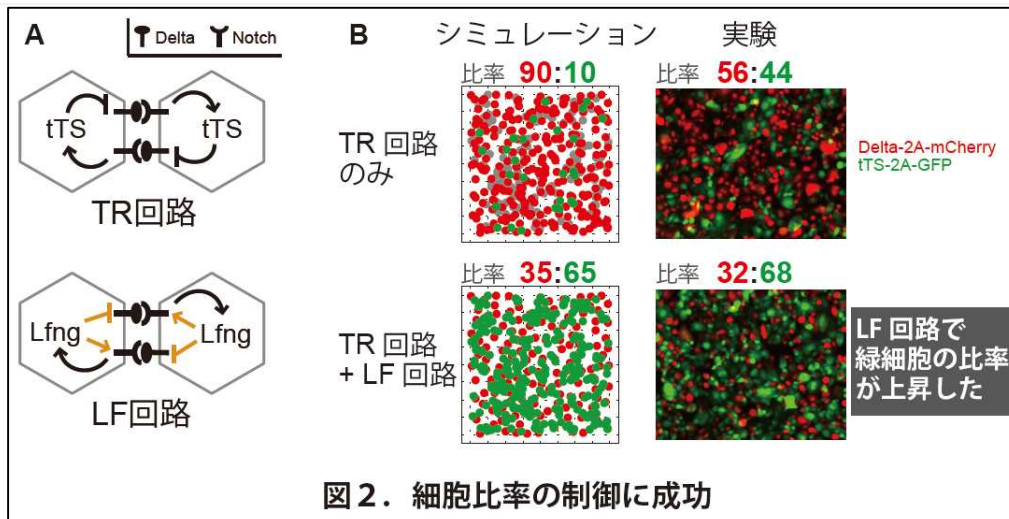
図1. 人工遺伝子回路による細胞間の非対称化

ネガティブ) ポジティブフィードバックループとして働く。ポジティブフィードバックによって、細胞間の偶然の小さな差を増幅していき、隣接細胞間に安定な差を作りだせると考えられている(図1B)。しかし、側方抑制機構だけで細胞間の非対称化に十分なものは作ってみなければわからない。特に、細胞分裂時に特定の因子が非対称に娘細胞間に分配されるという、非対称分裂の助けなどがなくても十分な違いを作りだせるのかが不明であった。

そこで、側方抑制機構を持たない哺乳類培養細胞である CHO 細胞上に、側方抑制機構を模した人工遺伝子回路を作製した(図1A)。この人工側方抑制遺伝子回路は、Delta(リガンド)、Notch(受容体)、tTS(人工的な転写抑制因子)、Lfng(Notch の糖鎖修飾酵素)という、たった4つの遺伝子部品からできている。すると人工側方抑制遺伝子回路を導入した細胞は、二峰性の分布を示した(図1C)。つまり、再構成した側方抑制機構によって、遺伝的に均質な細胞集団が、赤細胞(Delta 陽性細胞)集団と緑細胞(Notch 活性細胞)集団に分かれた。さらに、1つの細胞が分裂してできた2つの娘細胞間でも、片方の細胞が赤色になり、もう片方が緑色になる過程を捉えることができた(図1D)。これらの結果から、最小限の側方抑制遺伝子回路が細胞間の非対称化に十分であることが示された(成果論文1)。

また再構成を行う中で予想外の発見もあった。人工側方抑制遺伝子回路に用いた Lfng 遺伝子は、Notch の糖鎖修飾酵素であり、Notch が活性化すると Lfng の発現が誘導されることが知られている。私達はこの Lfng に、赤細胞と緑細胞の比率を変化させる役割があることを発見した。私達の実験系において Lfng は、Notch に対しては正の効果を示し、Delta に対しては負の効果を示した(図2A)。すなわち、今回の人工側方抑制遺伝子回路では2つのサブ回路が同時に働いており、ひとつが転写抑制因子 tTS を介した Delta の転写抑制回路(TR 回路)、もうひとつが Lfng を介したフィードバック回路(LF 回路)である。そこで TR 回路と LF 回路を組み合わせさせてシミュレーションを行ったところ、LF 回路の存在によって、緑細胞(Notch 活性細胞)の比率が上昇すると予測された(図2B、シミュレーション)。実際の細胞を用いて実験を行ったところ、TR 回路だけを用いた細胞では赤 56: 緑 44 だった比率が、TR 回路と LF 回路の両方を用いた細胞では赤 32: 緑 68 に変化し、予測が確認された(図2B、実験)。

さらに LF 回路の能力を調べるため、doxycycline という薬剤で TR 回路を特異的に阻害したところ、LF 回路単体でも赤細胞と緑細胞を生じさせることができた。これまで側方抑制といえば

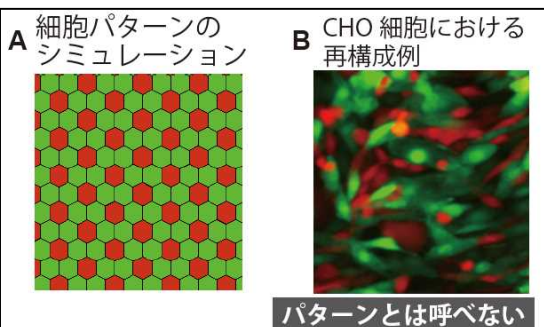


細胞間での Delta の転写抑制、すなわち TR 回路のことだと考えられてきたが、本研究で Lfng という糖鎖修飾酵素のフィードバック回路にも細胞間を非対称化させる能力があることが示された。

### 研究テーマB「細胞パターンの再構成」

多細胞生物の発生の特徴の一つは、細胞集団が自己組織化で空間パターンを形成することである。側方抑制機構も2次元の細胞集団上に構築した場合には、Salt-and-pepper パターンを形成すると考えられており(図3A)、こういった Salt-and-pepper 細胞パターンは内耳の有毛細胞と支持細胞のパターンなど自然界にも観察される。そこで第2の目標として、Salt-and-pepper 細胞パターンの再構成に取り組んだ。

まず CHO 細胞上に、様々なバージョンの人工側方抑制遺伝子回路を作製し検討した。もっとも Salt-and-pepper 細胞パターンに近いものでは、赤細胞と緑細胞が理論値の1対2に近い比率で交互に出現した(図3B)。しかし、2種の細胞の空間配置は規則的ではなく、空間パターンと呼べるものは形成されなかった。これは主に、CHO 細胞は細胞の形が不規則できれいに並ばないためと考えられた。そこで、より規則的な形を持つ哺乳類培養細胞を用いて細胞パターンの形成を目指した。MDCK 細胞など複数種類の上皮細胞を試したが、どれも CHO 細胞に比べて Delta-Notch シグナルの伝達効率が悪く、細胞間の非対称化が起こらなかった。次に、ES 細胞上に人工側方抑制遺伝子回路を作製し、適切な細胞種へ分化させることを試みた。しかし、ES 細胞においては Delta-Notch シグナルの伝達がほとんど起こらず、人工遺伝子回路の作製ができなかった。



**図3. 細胞パターンの作製に向けて**

以上のように Salt-and-pepper 細胞パターンの再構成は本研究期間中に達成することはできなかった。しかしパターン形成は発生の最重要原理の一つであり、今後私達がより高次のしくみを作るためにも必要である。よって、側方抑制機構とは別の原理を用いた細胞パターンの再構成にも取り組み始めた。さきがけ期間終了後も継続して挑戦する予定である。



### 3. 今後の展開

上述のように、悲願である細胞パターンの作製に取り組む。また本さがけ研究において、人工遺伝子回路を作製し解析する基礎技術やプロトコルを確立できたので、今後は発生の他の重要原理もどんどん再構成していく。具体的には現在、細胞パターンに加えて遺伝子発現の同調振動や組織の変形機構の再構成も行っている。最終的には人工組織や人工多細胞生物と呼べるものの再構成が可能であるのか、挑戦したい。

再構成をどんどん進める一方で、多細胞生物の発生に関する新たな発見や予想外の展開も目指している。そのためには再構成系と比較できる vivo の実験系を持つべきだと、本さがけ領域において多くの助言をいただいた。よって、現在行っている再構成プロジェクト達から得られた知見を検証できるような vivo の実験系を、共同研究を中心に習得中あるいは摸索中である。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究開始時に目標に挙げていた、Delta-Notch シグナルの側方抑制機構を再構成し細胞間の非対称化を起こすという課題は、完全に達成できた。LF 回路による細胞比率の制御や、LF 回路だけで非対称化に十分など、作中での発見があったのもよかった。これらは、私が合成生物学分野への転向を決めて初めて取り組んだプロジェクトの集大成であり、そこで得られた基礎技術やプロトコルはこれから再構成研究を行っていく上で大きな財産になると思う。細胞パターンが再構成できなかったのは残念であるが、これは近い将来に実現させたい。また私は、本さがけ期間中に理化学研究所にユニットリーダーとして着任し、ラボのセットアップを行った。特に、良いラボメンバーをリクルートできたのは幸運であった。

本さがけ領域には、多様な分野の研究者が揃っていたのと、交流しやすい雰囲気が意図的にうまく作られていたので、非常に多様な助言やマテリアルをいただけた。特に、細胞の機械的な制御や個体の操作は、今後自分達の再構成研究と組み合わせたいと思っていた分野であり、専門家に相談できたのは貴重な機会だった。加えて、構成的理解を目標とする研究者が集まる珍しい領域だったので、作ることの意義やどうすれば発見に結びつきやすいかなどについて議論できたのも有意義だった。今後は本さがけ期間で得られた経験をもとに、発生原理の再構成と発見を目指した研究を進めていきたい。

#### (2) 研究総括評価

発生生物学の自発的細胞分化の仕組み、つまり、同じ種類の細胞からひとりで異なる種類の細胞が生じるしくみに焦点を当て、Delta-Notchシグナルの側方抑制機構を哺乳類培養細胞上に再構成したことは、数理モデルの実証として科学的な意義が高いと思います。この人工側方抑制遺伝子回路を導入した細胞集団は、Delta陽性細胞とNotch活性細胞に自発的に分離して、元は均一な細胞間に違い(非対称性)を作り出すことに成功したことを高く評価します。当初目標を達成し、論文としても高い評価を得ています。

文部科学大臣表彰若手科学者賞(2013)を受賞し、国内外からの招待講演を受けるなど、

今後、この分野の第一人者としての活躍を期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Matsuda M, Koga M, Woltjen K, Nishida E & **Ebisuya M.**  
Synthetic lateral inhibition governs cell-type bifurcation with robust ratios.  
**Nat. Commun.**, 6, 6195, doi:10.1038/ncomms7195 (2015).
2. Koga M, Matsuda M, Kawamura T, Sogo T, Shigeno A, Nishida E & **Ebisuya M.**  
Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process.  
**Nat. Commun.**, 5, 3197, doi:10.1038/ncomms4197 (2014).

### (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、プレスリリース等)

#### <主要な学会発表>

1. Quan Tissue meeting “Computational approaches to networks, cells and tissues”  
スペイン バルセロナ、2013 年 4 月 10 日、招待講演
2. The 61st NIBB Conference “Cellular Community in Mammalian Embryogenesis”  
岡崎カンファレンスセンター、2013 年 7 月 10 日、招待講演
3. 日米数理生物学会合同大会  
大阪国際会議場、2014 年 7 月 31 日、招待講演
4. JSPS Japan-China Scientific Cooperation Program China-Japan-Korea Joint Symposium on  
Developmental Biology  
中国 北京、2014 年 10 月 22 日、招待講演
5. The 29th Annual Symposium of the Protein Society  
スペイン バルセロナ、2015 年 7 月 22 日、招待講演

#### <受賞>

「文部科学大臣表彰 若手科学者賞」(2013)

#### <プレスリリース>

文献1に関して、理化学研究所のプレスリリース(2015 年 2 月)

「均一な細胞集団に自発的に違いを生み出す仕組みを再構成—隣り合う細胞がひとりで異なる種類の細胞へ—」

[http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150205\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150205_1/)

また、化学工業日報 2015 年 2 月 6 日朝刊に掲載