トピックス

Waddington地形に沿った細胞種多様化のモデル実験

関根亮二, 木賀大介 東京工業大学大学院総合理工学研究科知能システム科学専攻

1. はじめに

多細胞生物の発生過程における細胞分化や細胞種多様化は、Waddington 地形¹⁾を転がる玉の動きで説明される。この地形は、1 つだった谷の数が奥から手前に向かって増えるポテンシャルマップ様の概念図で、それぞれの谷が個々の細胞種を表す。この地形の分岐点付近の奥行き方向成分は、細胞間相互作用の強さなど、細胞分化に関わる因子の状態量を表す²⁾。よって、因子の状態量がこの地形の分岐パラメータだといえる。

近年、発生学や再生工学における様々な総説で、細胞分化に関して Waddington 地形を使った説明がされている²⁾。ところが、この地形の本質を遺伝子ネットワークで表せるかどうか、また、その遺伝子ネットワークで地形に沿った細胞分化が起こるかどうかは、検証されていない。その理由の 1 つは、天然の細胞分化を司る遺伝子ネットワークは、構成要素となる遺伝子の数が膨大で、構造も複雑なことである。そこで我々は、生きた細胞集団の中で動作する人工遺伝子回路を少数の遺伝子を組み合わせることで設計・構築する合成生物学的方法をとった。この方法で、細胞内・細胞間相互作用の地形に沿った変化(図 1a)を細胞集団に起こせることと、この変化には発生学で示されたコミュニティエフェクトが見られることを示した³⁾。本稿ではこの研究の結果について紹介する。

2. Waddington 地形に基づいた多様化回路の設計

本研究では、細胞間シグナル分子濃度の増加に伴い、安定平衡点が 1 つから 2 つに分岐する人工遺伝子回路である「多様化回路」(図 1b)を設計・構築した。多様化回路は相互抑制機構と細胞間シグナリング機構とからなる。双安定性機構には、LacI と CIIs との相互抑制構造⁴⁾を利用した。また、細胞間シグナル分子として、*Vibrio fischeri* の Acyl-homoserine lactone (AHL) を採用した。相互抑制構造のために、多様化回路は P_{L-1con}

プロモーターと P_{luxlac} プロモーターを持つ。この中で P_{L-1con} は P_{luxlac} が発現を司る CIIs によって転写抑制される一方で、 P_{luxlac} は P_{L-1con} が発現を司る LacI により転写抑制される。多様化回路では、抑制タンパク質以外に、AHL 合成酵素 LuxI と細胞種の認識のためのレポータータンパク GFP がそれぞれ P_{L-1con} と P_{luxlac} によって発現される。本研究では、細胞間シグナリング分子 AHL の合成酵素 LuxI と LacI とが多く発現している状態を High 状態、GFP と CIIs とが多く発現する状態を Low 状態と定義する。

P_{luxlac} は AHL 非存在下ではほとんど転写活性を持たない。よって多様化回路は、低 AHL 濃度下では P_{luxlac} の下流の遺伝子はごく微量発現するのみで High 状態だけが安定である。一方で、この回路は高 AHL 濃度下で双安定になる。我々は、この回路が導入された大腸菌集団が Low 状態へ誘導されると、誘導解除後に細胞種多様化すると予想した(図 1a)。

人工遺伝子回路の設計では、計算機シミュレーションを用いて目的挙動のパラメータ依存性を調べる。依存性の低い回路の方が、挙動の頑健性の観点から生物学的な意義が大きく、また、構築が容易であるためである。本研究では、地形を表す回路として、多様化回路以外にもう 1 つ、LuxI 生産が CIIs に抑制されず恒常的である AHL 恒常生産多様化回路も設計した。いずれの回路に関しても細胞種多様化が可能なパラメー

図 1 (a) 多様化回路による細胞種多様化の概念図. (b) 多様化回路は、CIIs と LacI との相互抑制と、LuxI で生産される AHL による細胞間シグナリングとからなる。

Waddington Landscape Based Experimental Model of Phenotypic Diversification

Ryoji SEKINE and Daisuke KIGA

Department of Computational Intelligence and Systems Science, Tokyo Institute of Technology

図2 多様化回路と AHL 恒常生産多様化回路それぞれの、多様化終了時における細胞種比率の LuxI 活性依存性の解析。各パラメータで 10 回確率シミュレーションした結果をプロットした。

図3 (a) 多様化回路を導入した大腸菌集団の細胞種多様化。(b) AHL 蓄積速度の操作による細胞種比率の変化の概念図と実験データ。文献3の図を改変。

タ範囲を見出せるが、両者を比較すると後者に比べ多様化回路の方が、LuxI 活性上昇に対する High 状態の比率の減少が少ないことがわかった (図2)。

3. 多様化回路の構築および多様化実験

我々は、設計した多様化回路の配列を持った DNA を実際に調製し、回路を導入された大腸菌集団が培養時間の経過とともに細胞種の多様化を示すことを確認した。多様化回路を導入した大腸菌を Low 状態に誘導後、その誘導を解除すると、大腸菌集団は AHL 濃度が低いことに起因して、High 状態に遷移し始める。誘導解除から 180 分後では、両状態の中間にまで遷移した細胞集団が 2 つの集団に分かれ始める。360 分後には、さらに集団間の差が広がり、それぞれの集団の蛍光強度値がこれ以上変わらなくなる (図 3a)。

さらに我々は、多様化回路が Waddington 地形に沿った状態変化を起こしているならば、AHL の蓄積速度で表わされる地形の傾きを変えることで、最終的な細胞種の比率を変えられると予想した (図 3b)。実

際に AHL の蓄積速度を、植菌量や LuxI 活性の改変による 1 匹あたりの AHL 生産量の操作によって変化させ、細胞種の比率を変えることに成功した。

4. おわりに

本研究で示された、細胞種比率の植菌量への依存性は、Gurdon による胚の操作によって示されたコミュニティエフェクトという現象⁵⁾に似ている。また近年では、ES 細胞の集団サイズが分化運命に影響を与えるという結果⁶⁾が報告されている。このように、相互抑制で 2 つとシグナル送受信で 2 つ、合計 4 つのみの遺伝子からなる人工遺伝子回路で、発生や再生の過程に見られる現象に似た性質が観測できた。これらの現象を司る遺伝子ネットワークから、多様化回路と同型なネットワーク構造を探索し、その特性を調べることは、発生・再生過程の本質を知り、続いて発生学や再生工学を進展させるための手助けになるだろう。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、山村雅幸教授、萩谷昌己教授、瀧ノ上正浩講師、石松愛博士、鮎川翔太郎博士、赤間悟博士のご協力を得てなされたものです。ここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) Waddington, C. H. (1957) George Allen & Unwin, London.
- 2) Mohammad, H. P., Baylin, S. B. (2010) Nat. Biotechnol. **28**, 1033-1038.
- 3) Sekine, R. *et al.* (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**, 17969-17973.
- 4) Gardner, T. S. *et al.* (2000) Nature **403**, 339-342.
- 5) Gurdon, J. B. (1988) Nature **336**, 772-774.
- 6) Hwang, Y. S. *et al.* (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 16978-16983.

関根 亮二

関根 亮二 (せきね りょうじ)

東京工業大学総合理工学研究科研究員
2013 年東京工業大学総合理工学研究科博士課程修了。同年博士 (工学) 取得。
研究内容: 制御工学と合成生物学の融合
連絡先: 〒226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

E-mail: green-dolphin@es.dis.titech.ac.jp
URL: <http://www.es.dis.titech.ac.jp/index.html>

木賀 大介

木賀 大介 (きが だいすけ)

東京工業大学総合理工学研究科准教授
1999 年東京大学理学系研究科単位取得退学、同年博士 (理学) 取得。理化学研究所、東京大学での博士研究員、東京大学での助手を経て、2005 年より現職。

研究内容: 生体高分子を組み合わせて「人工生命」システムを創る
連絡先: 同上
E-mail: kiga@dis.titech.ac.jp
URL: <http://www.sb.dis.titech.ac.jp/>