
修士論文 (2004年度)

遺伝子ネットワーク再構成による 遺伝子発現ダイナミクスの定量的解析

東京大学大学院 理学系研究科 物理学専攻

前多 裕介¹

目次

1	序論	686
1.1	本論分の目的	686
1.2	本論文の構成	687
2	ポジティブフィードバックによる遺伝子発現の履歴現象	688
2.1	研究背景・目的	688
2.2	方法	689
2.3	結果と考察	694
3	リアルタイム測定による熱応答のシステム同定とその動的特性	706
3.1	研究背景・目的	706
3.2	生細胞の熱応答システムについて	706
3.3	方法	708
3.4	結果と考察	710
4	結論と展望	715
4.1	結論	715
4.2	展望	716

¹Yusuke T. MAEDA: y-maeda@daisy.phys.s.u-tokyo.ac.jp

第1章 序論

世界は成立していることがらの総体である。

世界は事実の総体であり、ものの総体ではない。

成立していることがら、すなわち事実とは、諸事態の成立である。

事態とはものの結合である。

—Ludwig Wittgenstein [1]

1.1 本論分の目的

1953年4月、ワトソンとクリックがDNAの立体構造モデルとして二重らせん構造を提唱した。DNA構造の発見は、科学研究において、実用的・知的に前例がないほど重要な発見であった。この発見は、遺伝の仕組みやダーウィンの遺伝学の変則性の起源を理解させるだけでなく、あらゆる生命の仕組みを分子とその構造から解明することが可能であると思わせるに十分であった。その後大腸菌からヒトにいたるいくつかの生物において、生命現象を分子に還元し、そのメカニズムの解明が行われてきた[2]。下等生物から高等動物にいたるまで、DNA, RNA, タンパク質の生化学[3], 遺伝子の転写・翻訳システム[4,5]がおおまかに保存されていること、発生のようなダイナミックな現象の分子メカニズム[6], 免疫[7]や記憶[8]のような高次の生命機能までもが分子によって要素還元的に記述され、分子集合体としての生命が定着した。

しかしながら生物は、分子という「部品」によって構成された「システム」*の総体であり、その本質はシステムのネットワーク構造と動的な振る舞いにある。ところが、分子レベルの知見が明らかになればなるほど、生命像が複雑化・細分化され、全体的な理解が困難になってしまっている。その困難を克服するために今、分子という構成要素を越えてネットワーク・システムのレベルで生命現象を理解する必要性が高まりつつある[9]。

本論文にある一連の研究は、「生命を力学系(システム)の観点から理解する」ことを目的に、遺伝子ネットワークの設計原理の解明を目指したものである。

*本研究で述べているシステムとは、「様々な構成要素からなり、それらの要素間には何らかの関係があり、一つの全体をなすもの」を意味する。

1.2 本論文の構成

本論文は二つの内容から構成されている。

第二章 ポジティブフィードバックによる遺伝子発現の履歴現象 近年の研究により、大腸菌や酵母の遺伝子ネットワークには、ネットワークモチーフとよばれる特徴的な制御様式が共通して現れることが示唆されている [10-12]。ネットワークモチーフの機能解明は、複雑なネットワークに備わる共通原理の理解につながると考えられる。特に、発生・分化という生命にとって本質的な現象を司るネットワークにはポジティブフィードバックが頻出することが知られている。

そこで本研究では、ネットワークモチーフの一つであるポジティブフィードバックの機能特性の解明を行った。ポジティブフィードバックを人工遺伝子ネットワークとして再構築し、その機能特性を実験と理論両面から解析した。この詳細を第二章で論じる。

第三章 リアルタイム測定による熱応答システムの同定とその動的特性 近年、Genechip の出現により転写ネットワークの包括的解析がさかんに行われ、ネットワーク構造が日々同定されている。しかし、その多くは時間分解能と定量性に優れているとは言えず、破壊的な解析であるため、生きた細胞のシステム特性を知るという目的に対しては適用しがたい。また、外部からの熱や光といったシグナルに応答するため、ネットワークがモジュール化されていることが明らかとされつつあるが、個々のモジュールにどのような動的特性が備わるかー熱や光に特化したシステムは何か？ーはまだ明らかではない。

そこで我々は、従来の破壊的な方法と相補しうる、非破壊的なダイナミクスのリアルタイム測定が必要であると考えた。マルチウェルプレートリーダーシステムを用い、トップダウン的に内部ネットワーク構造同定を行い、

(1) 遺伝子発現ダイナミクスの相似性というシステムレベルでの共通性が、分子レベルでどのような共通構造に由来するのか。

(2) 熱応答に特化するためにどのような特性が備わるか。

これらの課題に関して新しい知見を得た。詳細を第三章で議論する。

第2章 ポジティブフィードバックによる遺伝子発現の履歴現象

2.1 研究背景・目的

分子生物学による分子レベルでの知見の蓄積、遺伝子発現の包括的解析により生体分子が織りなすネットワーク構造が明らかとなりつつある。しかし、生命が分子からなるネットワークシステムである以上、そのダイナミクスの本質は、システムのレベルにあると考えられる。したがって、分子レベルを越え、ネットワーク構造に着目したシステムレベルの研究が生命の理解に必要不可欠である。

近年、大腸菌や酵母の遺伝子ネットワークのいたるところで、ネットワークモチーフとよばれる遺伝子間での特徴的な制御パターンが存在することが明らかとなってきた(図 2.1) [10-12]。ネットワークモチーフは数種の遺伝子から構成される機能的ネットワークの単位構造と考えることができる。本研究では、遺伝子ネットワークの共通特性を理解しシステムレベルでの生命の共通原理を探索することを目的に、ネットワークモチーフの機能特性解明を試みた。特に、大腸菌からショウジョウバエにいたるまで、発生・分化をつかさどる遺伝子ネットワークに頻出するポジティブフィードバックに着目し、システムレベルでの機能解明を行った。これまでに、いくつかのネットワークモチーフの特性が研究されている。振動を生み出すループ [13], フィードバック [14-17], フィードフォワード [18-22], トグルスイッチ [23-26] などがあげられる。これらの研究はネットワークの再構成を行い、システム特性を再現したという点で優れた研究であるが、ダイナミクスの量的情報—DNA と制御タンパク質の実効的な親和性, タンパク質分解速度など—は任意である。量的情報とネットワークの構造, システムの本質を知るためには両者は欠かすことが出来ない。本研究では、まず初めに遺伝子発現のダイナミクスの定量的測定を行い、ポジティブフィードバックシステムの量的情報の抽出を行った。ダイナミクスを定性的・定量的に再現する数理モデルを用いて解析を行い、機能特性の予測を行った。再構成したポジティブフィードバックは多重安定性を生むこと, そのため遺伝子発現にヒステリシスが備わることが予測された。理論的予測の基に実験を行ったところ、あたかも過去の遺伝子発現状態を記憶したかのようなヒステリシスが見出された。そして、このようなヒステリシスが生命現象にどのような役割を果たしうるかを考察する。

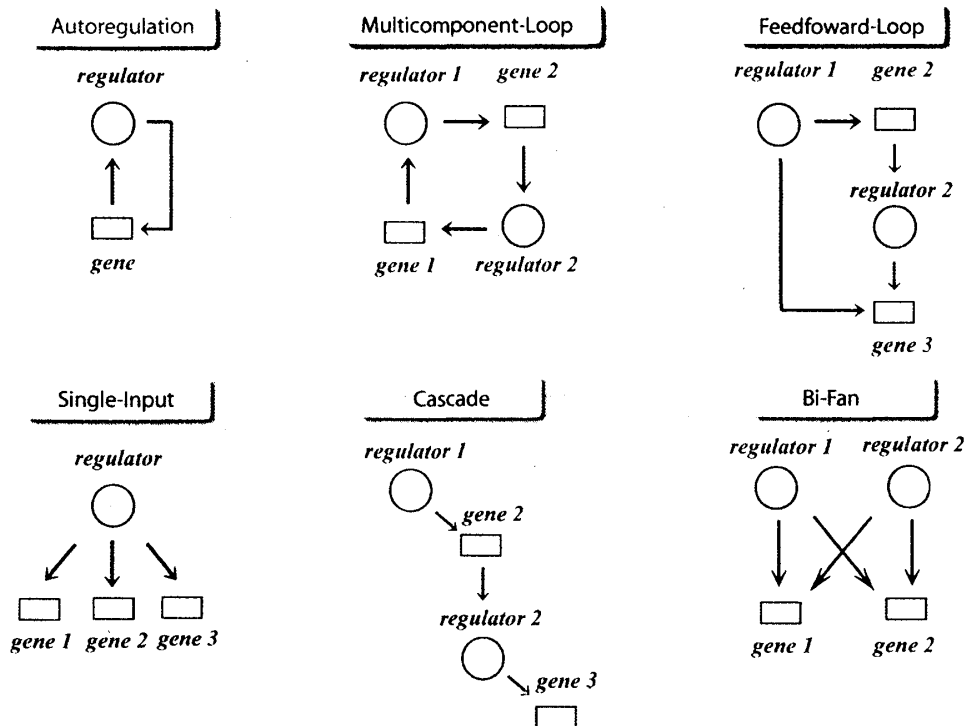


図 2.1: ネットワークモチーフ 大規模なネットワークもこのような単位構造に分解することができる。大腸菌ではフィードフォワードモチーフが多く存在している。

2.2 方法

遺伝子ネットワークの再構築

生体内におけるポジティブフィードバックシステムの解明のために、

1. *in vivo**でダイナミクスを定量的に測定可能であること
2. 他の経路やネットワークモチーフと干渉を避けること

という二つの条件を実験系に課した。細胞内ネットワークのサブシステムとしてポジティブフィードバックを扱うためには自律的に生命が営まれている *in vivo* において実験を行わなくてはならない。また、他のモチーフとの干渉があっては、ポジティブフィードバックシステムを抽出しているといえない。これら二つの条件を克服するために、人工遺伝子ネットワークの構築を行った [13,23]。

*「生体内」という意味。 *in vitro* という「ガラス器内で」というラテン語に比して用いられている。

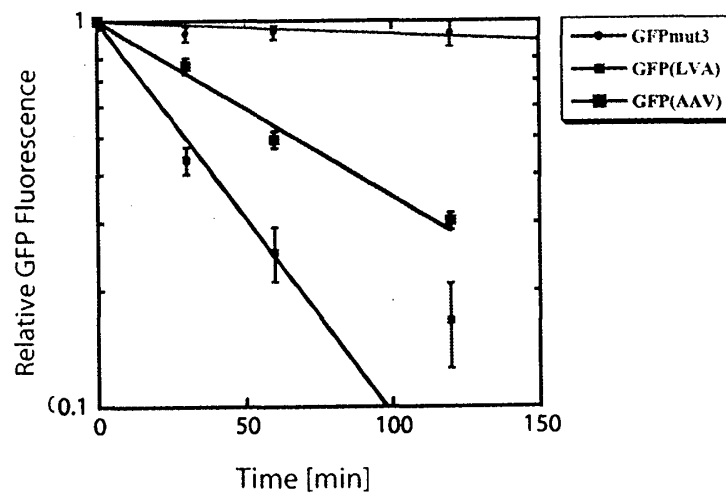


図 2.2: 不安定型 GFP の分解速度 GFPmut3 は半減期が 24 時間以上であるが、GFP(AAV), GFP(LVA) は分解速度が上昇し、半減期が 60 分, 30 分となっている。

第一の条件について *in vivo* でダイナミクスを定量的に解析するために、緑色蛍光タンパク質 Green Fluorescent Protein (GFP) という蛍光タンパク質を用いた。GFP は 475nm 付近の光によって励起され、508nm 付近の蛍光を発するタンパク質である。毒性が低く、発光のために基質を必要としないため、細胞が生きたままの状態でも細胞内タンパク質の動きや濃度を定量的に測定することができる。

また、GFP には実に様々な改変型 GFP が存在する。本研究ではダイナミクスの測定に有効な、分解速度の速い不安定型 GFP を採用した。この不安定型 GFP は、GFPmut3 という改変型 GFP の C 末端に *ssrA* タグとよばれる 10 アミノ酸のオリゴペプチドが付加されている。GFPmut3 それ自身はタンパク質分解酵素によっては分解されにくく、非常に安定なタンパク質である。しかし、*ssrA* タグを付加することによってタンパク質分解酵素に感受性が高くなり、不安定なタンパク質になる。特に、*ssrA* タグ C 末側 3 アミノ酸の配列によって感受性が大きく変化し、例えば AAV というアミノ酸配列を GFP(AAV) はとっている [27]

本研究で採用した不安定型 GFP の半減期を以下の実験で定量した。安定型 GFPmut3, 不安定型 GFP(AAV), 不安定型 GFP(LVA) を大腸菌内で発現させておく。ある瞬間にその発現を止め、更に細胞の増殖も止めておく。この状態で次第に分解されてゆく様子を GFP の蛍光値を測定し、分解の半減期を求めた。その結果、安定型 GFP は 24 時間たっても半減しないのに対し、GFP(AAV) は半減期が 60 分、GFP(LVA) は 30 分であることがわかった (図 2.2)。このことから、*ssrA* タグを付加することで元来安定な GFP がタンパク質分解酵素によって分解されやすくなることが明らかとなった。

以上を基に、*in vivo* において遺伝子発現のダイナミクスを定量的に測定可能な実験

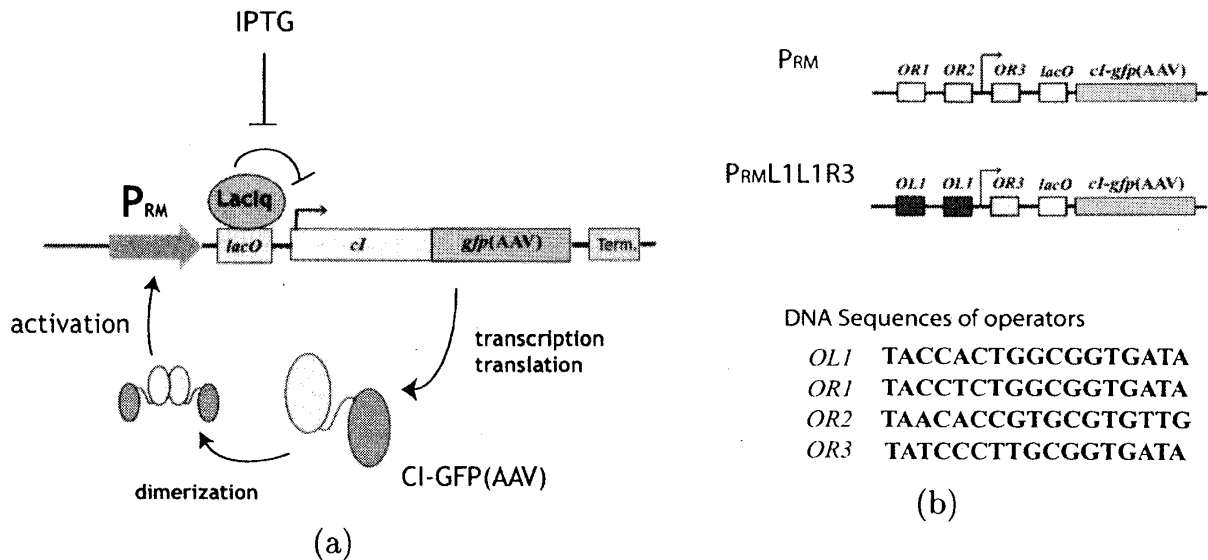


図 2.3: 再構成ポジティブフィードバックシステム (a) ポジティブフィードバックシステム CI 二量体によって自己の発現を誘導させることでポジティブフィードバックを再構成している。IPTG で制御可能にするために *lacO* をプロモーター下流に挿入している。CI タンパク質の濃度は GFP の蛍光を通して測定できる。遺伝子の転写は T1 ターミネーターで停止する。 (b) P_{RM} プロモーター野生型と変異型 L1L1R3 変異型 P_{RM} プロモーター L1L1R3 は、野生型 P_{RM} プロモーターの *OR1*, *OR2* オペレーターを各々 *OL1* オペレーターへと改変したものである。*OL1* は *OR1*, *OR2* よりも CI 二量体に対する親和性が強いので、 P_{RM} L1L1R3 は野生型プロモーターよりも CI-GFP(AAV) に対する親和性が強い。

系を構築した。

第二の条件について 具体的には、 λ ファージの溶菌、溶原経路への分化にかかわる P_{RM} プロモーターと、*cI* 遺伝子からポジティブフィードバックを再構成した (図 2.3(a))。

pBR322 プラスミド[†]に P_{RM} プロモーター[‡]をサブクローニングし[§]、その下流に *cI* を挿入した[¶]。このプラスミド DNA を大腸菌 JM109 内に導入することで他のネットワークと独立したポジティブフィードバックシステムが構築される。

本研究においては、*cI* 遺伝子の終止コドン除去し、リンカー配列を経て *gfp*(AAV) 遺伝子を融合させることによって、CI-GFP(AAV) 融合タンパク質が発現するように

[†]プラスミド DNA: 細菌の染色体外 DNA の一つで、宿主の染色体とは独立して自律増殖できる DNA。

[‡]プロモーター: RNA ポリメラーゼによる転写開始反応の効率に関与する DNA 側の領域。狭義には転写開始反応そのものに関与する DNA 領域。

[§]特定の DNA 配列を目的に応じた plasmid DNA のようなベクター内に単離すること。

[¶] P_{RM} プロモーター、*cI* 遺伝子は溶原化された大腸菌 W3110 λ ind-株のゲノム DNA を鋳型鎖として、PCR によってサブクローニングした。

遺伝子を組み換えた。

P_{RM} プロモーターは元来、遺伝子の発現をわずかにしか誘導しない。しかし、わずかな *cI-gfp*(AAV) 遺伝子発現産物 CI-GFP(AAV) が細胞内で二量体を形成し、 P_{RM} プロモーターのオペレーター *OR1*, *OR2* に結合する。この結合によって、 P_{RM} プロモーターからの転写能が活性化され、下流遺伝子の転写が促進される [4]。CI-GFP(AAV) 二量体が蓄積することで更に P_{RM} プロモーターの活性が高くなる。このような分子メカニズムから、ポジティブフィードバックが再構成される。また、CI-GFP(AAV) が過剰に蓄積すると、 P_{RM} プロモーターの *OR3* オペレーターに二量体が結合し、転写が起こらなくなる。この抑制機構によってフィードバックが過度に作用することが抑えられている。

本研究では更に、 P_{RM} プロモーターに変異を導入し、より CI-GFP(AAV) との親和性が高く結合しやすい $P_{RM}L1L1R3$ プロモーターによるポジティブフィードバックシステムも構築した。野生型とこの改変型ポジティブフィードバックシステムを比較することによって、DNA-タンパク質親和性のような生化学的パラメータに対してシステムがどのような影響を受けるのかを検証することが出来ると考えた (図 2.3(b))。

最後に、遺伝子発現を自由に ON/OFF 切り換えできるような制御機構を人工遺伝子ネットワークに導入した。 P_{RM} プロモーター下流、*cI* 遺伝子上流にラクトースオペレーター *lacO* を挿入した。大腸菌染色体 DNA から発現されるラクトースリプレッサー (LacIq) が多量体を形成してラクトースオペレーター (*lacO*) に結合し、 P_{RM} からの *cI-gfp*(AAV) 遺伝子の発現を抑制する (遺伝子発現 OFF)。遺伝子発現が OFF になっている状態で、IPTG という薬剤を加えると、LacIq の抑制が解除される (遺伝子発現 ON)。この性質を利用し、IPTG の濃度によって遺伝子発現の ON と OFF を制御することができる。この性質を用いて、ポジティブフィードバックシステムの遺伝子発現を IPTG 濃度によって制御可能にした (図 2.4)。

対照として、フィードバックのない人工遺伝子ネットワークも構築した (図 2.5)。pBR322 プラスミド DNA に P_{trc2} プロモーターをサブクローニングし、その下流に *gfp*(AAV) 遺伝子を挿入した。 P_{trc2} プロモーターは *lacO* オペレーターを備えており、ポジティブフィードバックの人工遺伝子ネットワークと同様に、遺伝子発現を IPTG 濃度で制御することができる (図 2.4)。このコンストラクトから発現する GFP(AAV) は P_{trc2} プロモーターに作用しないため、フィードバックは形成されない。

大腸菌 W3110 λ ind-株のゲノム DNA は GEN とるくん酵母用 (TaKaRa) を用いて抽出、精製を行った。本研究で用いたオリゴヌクレオチドプライマーは全て Invitrogen 社から購入した。PCR は TaKaRa 社の Pyrobest DNA polymerase を使用した。DNA 鎖を切断する制限酵素は全て TOYOBO 社の製品を使用した。DNA 鎖を連結する Ligase は TOYOBO 社の Ligation High を使用した。DNA の精製は QIAquick PCR purification Kit(QIAGEN) を用いた。その他の実験材料は一般的な分子生物学実験で用いられているものを使用した [28]。

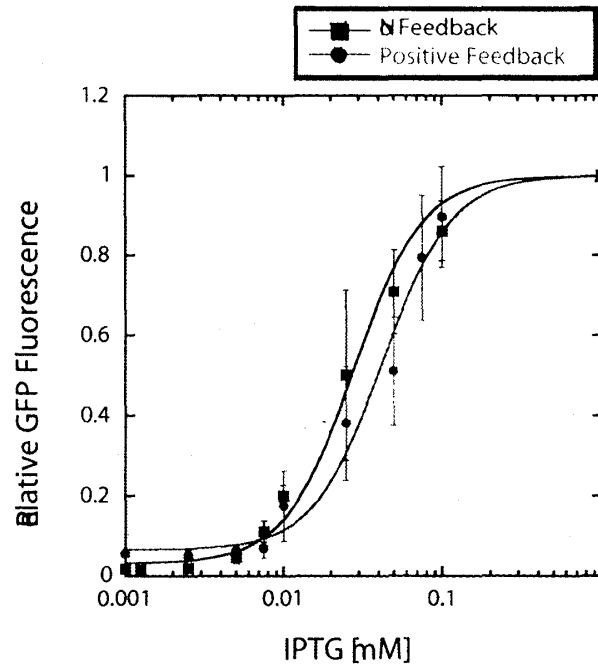


図 2.4: IPTG による遺伝子発現の調節 IPTG によってプロモーターの実効的な転写能が調節されている。Square: フィードバックなし, Circle: ポジティブフィードバック

遺伝子発現ダイナミクスの定量的測定

遺伝子発現のダイナミクスの測定には、Arvo FX マルチウェルプレートリーダー (Perkin-Elmer) を用いた (図 2.6) [17,18]。このプレートリーダーは、蛍光値と吸光値を同時測定することが可能であり、大腸菌を 96-ウェルプレートで培養しながら吸光度でその細胞密度を測定し、蛍光値で遺伝子の発現量を測定することが可能である。大腸菌一細胞あたりの遺伝子発現量は、式 (2.1) にしたがって求めた。GFP 遺伝子発現のバックグラウンドノイズは、GFP をコードする遺伝子をもたない pBR322 プラスミド DNA で形質転換した大腸菌から求め、各時間点における値からノイズを引いた。

$$x(t) = \frac{GFP(t) - GFP_{medium}(t)}{A(t) - A_{medium}(t)} - \frac{GFP_{NegCon}(t) - GFP_{medium}(t)}{A_{NegCon}(t) - A_{medium}(t)} \quad (2.1)$$

測定の際にまず、遺伝子ネットワークを備えたプラスミド DNA で形質転換した大腸菌のコロニーを LB(+Amp) プレートからピックアップし、LB(+Amp) 液体培地 1.5ml に植菌する。これを一晩 37℃ で培養する。

この一晩培養液 200μl を 10ml の ABT 最小培地に加えて 50 分の 1 に薄め、37℃ で 6 時間、前培養する。この前培養液 10μl に最小培地を加えて 20 分の 1 に薄め、最終量

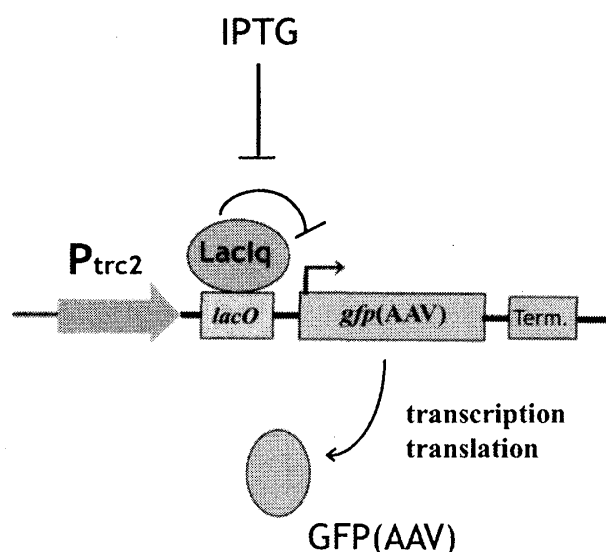


図 2.5: フィードバックなしの遺伝子ネットワーク IPTG 制御可能で、かつフィードバックがかかっていない。GFP(AAV) によって遺伝子発現のダイナミクスを測定することができる。

200 μ l にする。これを 96 ウェルプレート各ウェルにのせ、上から 100 μ l のミネラルオイルを加えて培地の蒸発を防ぐ。96 ウェルプレートをマルチプレートリーダーにセットし、更に 37 $^{\circ}$ C で 1.5 時間前培養する。これを 4 分の 1 にうすめ、IPTG を加えてプロモーターの遺伝子発現能を解除し、遺伝子発現のダイナミクスの測定を開始した。1 分おきに 96 ウェルプレートを回して (diameter=2mm, double orbit) 培養液をかき混ぜ、5 分置きに蛍光値 (485nm 励起, 535nm 蛍光, 0.5s) と吸光度 (600nm, 0.1s) を測定した。

蛍光値と吸光度の再現性を確かめたところ、誤差は 10 % 以下であることがわかった (図 2.6)。更に、大腸菌は対数増殖期で培養しながら測定を行っており、細胞分裂の周期はおよそ 90 分である。96 ウェルプレートは Corning 96 well-plate black plate clear bottom を用いた。ミネラルオイルは Sigma 社の製品を使用した。

2.3 結果と考察

遺伝子発現の時間発展ダイナミクス

はじめに、各ネットワークシステムの遺伝子発現ダイナミクスを測定した。IPTG を加え、プロモーターからの遺伝子発現を解除した時間を $t=0$ とし、5 分おきに蛍光値と吸光度の同時測定を行った。各ネットワークシステムを備えた大腸菌の遺伝子発現ダイナミクスを示す (図 2.8(a), (b))。図 2.8(b) では時間発展を最大遺伝子発現量で

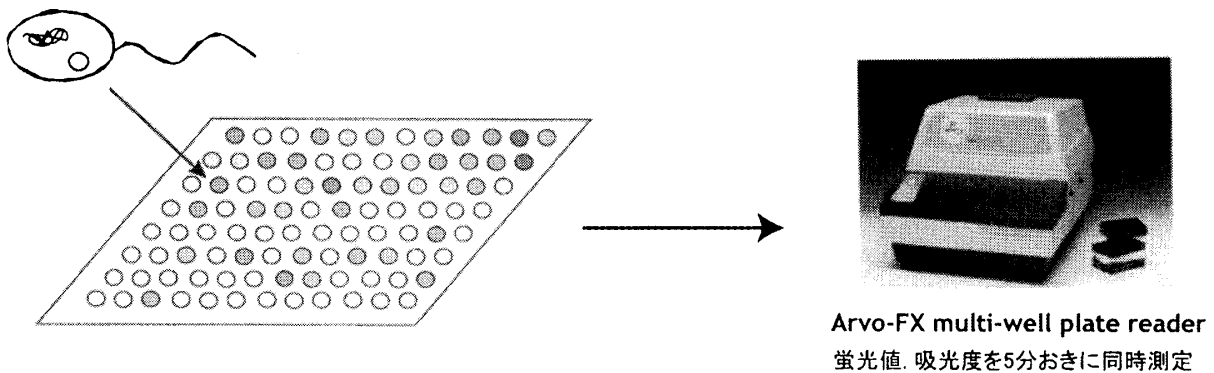


図 2.6: Arvo-FX (Perkin-Elmer) を用いた測定 LB 培地で培養した大腸菌を ABT 最小培地でうすめ、96 ウェルプレートにうつす。この 96 ウェルプレートを Arvo-FX マルチプレートリーダーで培養しながら蛍光値と吸光度を 5 分おきに測定する。

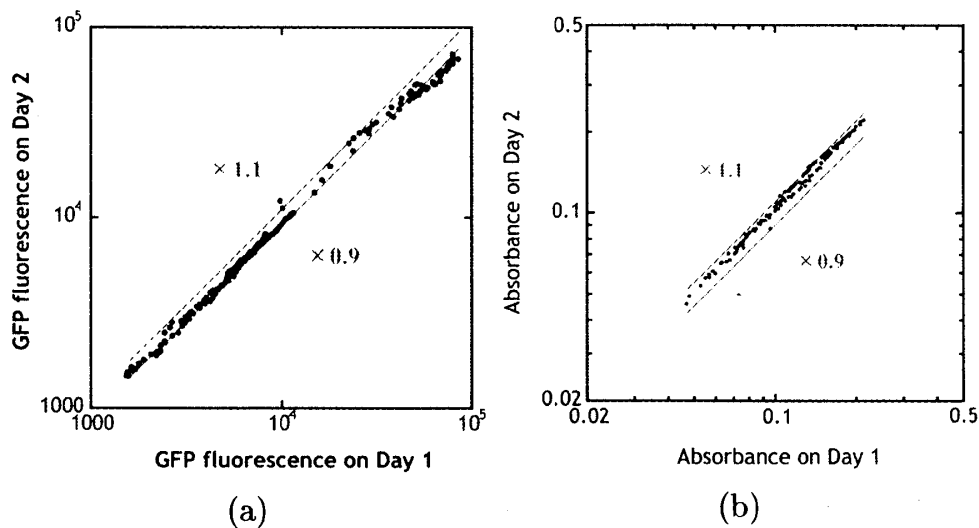


図 2.7: 測定の再現性 (a) 蛍光値の再現性 (b) 吸光度の再現性 異なった測定における同時刻点の値をプロットしている。誤差は 10 % 以下である。

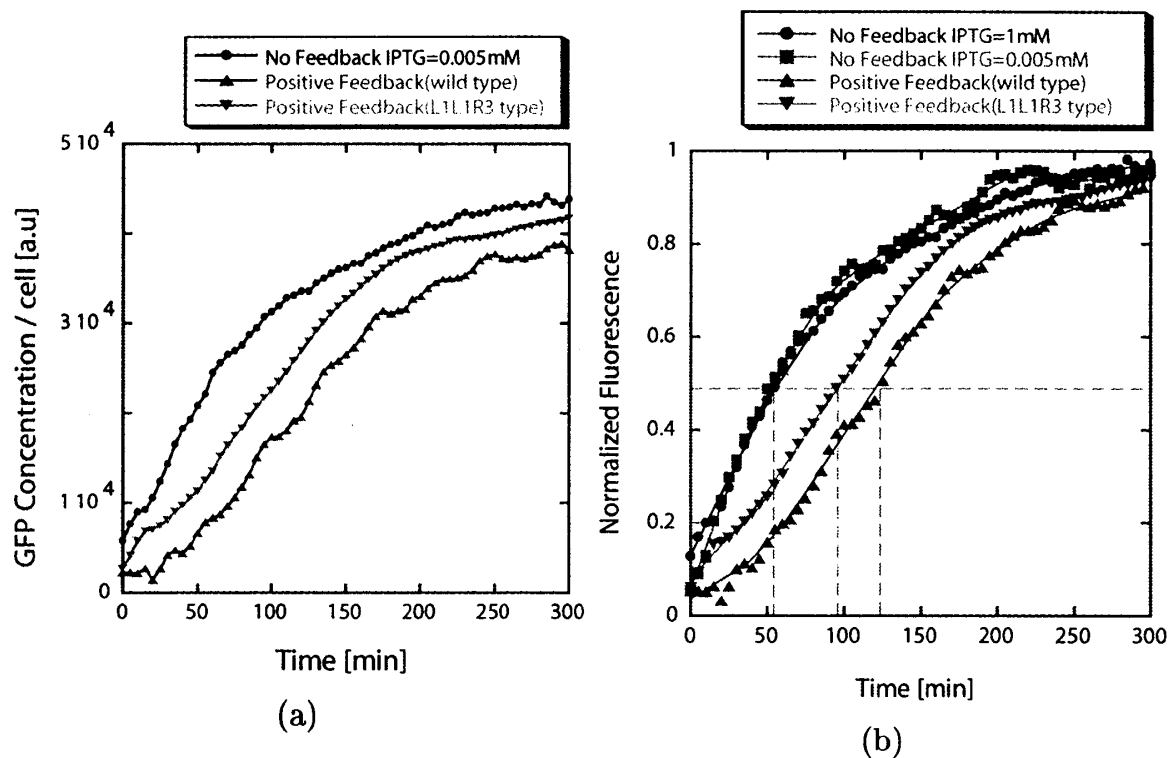


図 2.8: 各遺伝子ネットワークシステムの遺伝子発現ダイナミクス (a) 遺伝子発現ダイナミクス Circle: フィードバックなし (0.005mM IPTG), Triangle: ポジティブフィードバック (wild type), Inverted-triangle: ポジティブフィードバック (L1L1R3 type) (b) 規格化された遺伝子発現ダイナミクス 破線は $x(\tau)=0.5$ の線を表しており、各ネットワークの rise-time を指している。

規格化し、時間的応答性の違いを比較している。各点は 3 つのデータ系列の平均値である。

各ネットワークシステムの時間的特徴を比較するため、遺伝子の発現量が定常状態の半分の値に達した時刻を rise-time τ として定め、これを比較した。

$$x(\tau) = \frac{x_{steady}}{2} \quad (2.2)$$

各ネットワークの rise-time を求めたところ、フィードバックなしのコントロールは 55 分、野生型のポジティブフィードバックシステムは 115 分であった。変異型ポジティブフィードバック L1L1R3 システムの rise-time は 85 分であった。このように、ポジティブフィードバックの遺伝子発現は、フィードバックがない場合に比べて時間遅れを伴うこと、その遅れは野生型と変異型を比較してわかるように、プロモーターとアクチベーター間の親和性という生化学的パラメーターに左右されることが実験的にはじめて明らかとなった [29]。また、1mM と 0.005mM IPTG 濃度で遺伝子発現を誘導したフィードバックなしのシステム間で、rise-time はそれぞれ 55 分であった。このことは、ポジティブフィードバックシステムの時間遅れは、遺伝子発現量に依存し

て変化するようなものではなく、フィードバックシステムによって生じるということの意味している。

ポジティブフィードバックで時間遅れが生じるメカニズムを考える。元来プロモーターの転写活性が低いために、急速に遺伝子が発現することではなく、徐々にアクチベーターが発現して細胞内に蓄積してゆく。そして、蓄積したアクチベーターが二量体を形成してプロモーターの転写活性を上昇させる。徐々にアクチベーターが細胞内に蓄積され、定常値に近くなってようやくプロモーターの転写活性が最大になる。このようにプロモーター活性が最大値に達するまでの時間遅れから、フィードバックのないネットワークと比較して、遺伝子発現の rise-time が大きくなってしまおうと考えられる。アクチベーターとオペレーターとの親和性を変化させた変異型ポジティブフィードバック L1L1R3 では、rise-time に変化が現れ、時間遅れがより小さくなっている。これは親和性の増大によりアクチベーターがプロモーターに結合しやすくなり、細胞内での蓄積速度が速くなったため、プロモーター活性が最大になるまでの時間が早まり、結果 rise-time が小さくなったのだと考えられる。

数理モデル

次に、数理モデルを用いて機能特性の予測を行った。実験でみられた遺伝子発現のダイナミクスを再現する数理モデルを考案した。本研究では、構成要素が全てわかっている人工遺伝子ネットワークであるので、反応にかかわる主たる分子をモデルに含めることができる。更に、 P_{RM} プロモーターと CI タンパク質は分子生物学において最も解析された分子であり、モデル化の際に無理な仮定をおく必要がない。このような利点を活かし、遺伝子発現のダイナミクスから実効的パラメータが定量可能な数理モデルの構築を行った [30]。

まず、コントロールであるフィードバックなしのネットワークシステムのモデル化をおこなった。

$$\frac{dx_1}{dt} = \alpha_1(I) - \gamma \cdot x_1 + s \quad (2.3)$$

変数 x_1 は GFP をあらわしている。右辺第一項 α_1 はプロモーターからの遺伝子発現産物の合成量を、第二項はタンパク質分解酵素による分解の効果を、第三項は IPTG 制御による遺伝子発現制御が完全でないためにおこるプロモーターからのリークを表している。

次に、ポジティブフィードバックのモデル化を行った。

$$\frac{dx_2}{dt} = \alpha_2(I) \cdot \frac{x_2^4}{K + x_2^4} - \gamma \cdot x_2 + s_2 \quad (2.4)$$

変数 x_2 は CI-GFP 融合タンパク質を表している。第一項がフィードバックの効果を表しており、第二項はタンパク質分解酵素による分解の効果を表している。第三項はリークの効果を表している。

また、どちらのネットワークシステムも IPTG によってプロモーター活性 $\alpha(I)$ が制御可能である。IPTG によって全く抑制されていない転写活性に対する相対プロモーター活性を R_α として、IPTG 濃度と R_α の関係式を式 (3.6) のように定めた。

$$\alpha(I) = \alpha \frac{I^2}{K_I^2 + I^2} \quad (2.5)$$

この式に基づいて、 K_I をフィッティングにより求めると、 2.6×10^{-2} mM となった。また、タンパク質の半減期 τ_{half} は 60 分であることが図 2.2 に示される実験からもとまっており、分解を表すパラメーター γ は 0.012 である。

フィードバックのないシステムで、IPTG を加えない状態（遺伝子発現 OFF）では遺伝子発現量は、最大値の 20 分の 1 以下であり、リークの項は非常に小さい。ポジティブフィードバックシステムでも遺伝子発現量の初期値は最大値の 20 分の 1 程度であり、リークの効果は最大値の 1/20 とすることができる。更に、ポジティブフィードバックシステムの転写のリークを見積もるために、 $P_{RM-lacO-gfp}(AAV)$ というネットワークを作成した。このネットワークには cI 遺伝子が含まれないため、 P_{RM} の活性化が起こらない。GFP の発現量を測定したところ、GFP の発現がみられなかった。

未知パラメータ α , K をフィッティングで求め、構成した数理モデルから計算した遺伝子発現ダイナミクスが実験結果と一致していることを確認した (図 2.9)。定量したパラメータは本章の最後で、表 2.1 にまとめる^{||}。しかし、ポジティブフィードバックシステムにおいて、 $t=0$ から 60 分までの範囲でモデルと実験の誤差が大きい。これは、分子メカニズムから次のように考えられる。CI 二量体の濃度が小さい範囲では、ポジティブフィードバックはオペレーターサイト OR1 を占める CI 二量体のみによって駆動される。この領域ではモデルのように二つのオペレーターサイトによる反応を考慮した 4 次の非線形性ではなく、2 次の非線形性に近い応答を示すと考えられる。実際、2 次の非線形性を仮定してフィットするとよく合致してくる。

数理モデルによる予測：遺伝子発現の多重安定性

実験から実効的パラメータを定量した数理モデルを更に解析した結果、ポジティブフィードバックの遺伝子発現にヒステリシスが現れることが予測された (図 2.10)。 P_{RM} プロモーターの活性を表すパラメータ $\alpha_2(I)$ の値を IPTG 濃度を徐々に増加させ、遺伝子を発現していない状態 (Low State) から遺伝子発現が最大となる状態 (High State) へと誘導し (Going UP)、IPTG 濃度を減らして High State から Low State へと誘導シグナルを減じてゆく (Coming Down) という操作を行う。

^{||}ただし、一細胞の体積を 3.8fl として濃度を計算している。

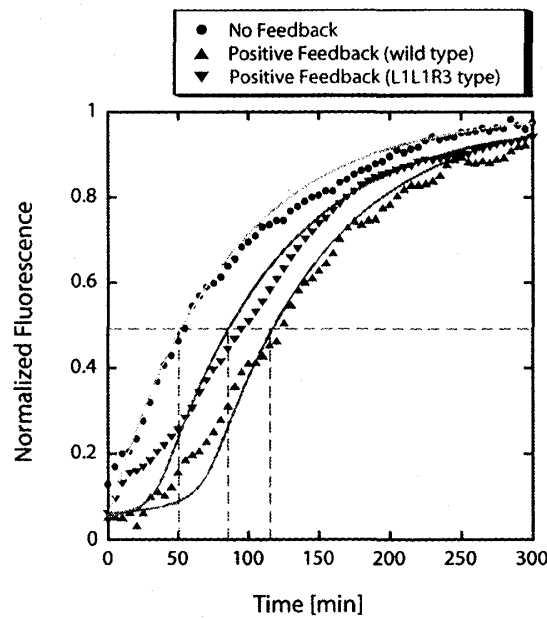


図 2.9: 遺伝子発現ダイナミクスの数理モデルと実験結果の比較 各線は各遺伝子ネットワークシステムに関する数理モデルから計算される遺伝子発現ダイナミクス。点は実験結果。Circle: フィードバックなし, Triangle: ポジティブフィードバック (wild type), Inverted-triangle: ポジティブフィードバック (L1L1R3 type)。破線は rise-time に対応する時間点を指している。

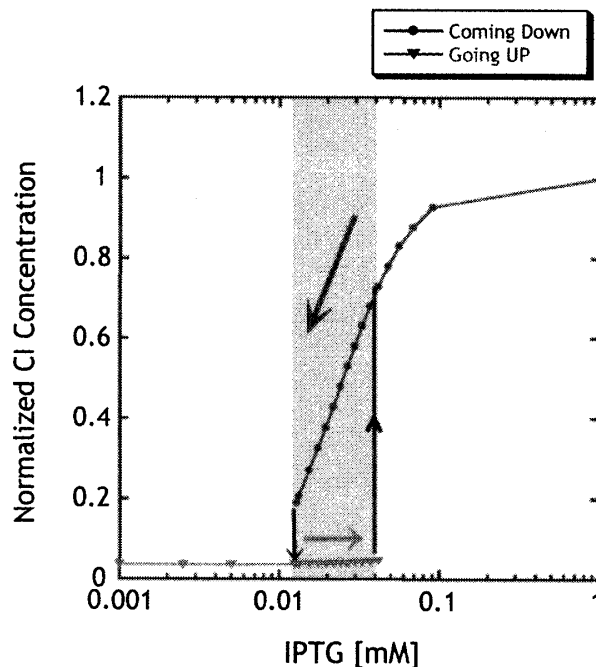


図 2.10: 数理モデルによる遺伝子発現の履歴依存性の予測 1mM IPTG 条件下における高発現安定状態の値で規格化している。0.014mM $\leq$ [IPTG] $\leq$ 0.047mM の範囲で Coming Down と Going Up で遺伝子発現の定常値に差が現れている。これをヒステリシスという。

その結果、IPTG 濃度が $0.014 \text{ mM} \leq [\text{IPTG}] \leq 0.047 \text{ mM}$ の領域では Low State から High State に向かう Going Up の遺伝子発現は低い状態で安定しているにも関わらず、Coming Down では高発現状態が保たれており、あたかも High State にいたことを記憶しているかのような履歴依存性がみられている。

これは、ポジティブフィードバックシステムが二つの安定した遺伝子発現状態を生み出すためと考えられる。化学反応が非線形で、パラメータが特定の範囲内にあると、ポジティブフィードバックのモデルで $dx/dt = 0$ をみたす実数 x が三つ存在することがある。これは多重安定性をもつことを意味する (図 2.11)。Going Up は元々遺伝子が発現していない Low State から出発しているため、多重安定状態では低発現の安定固定点に落ち着く。それに対し Coming Down では、一度遺伝子発現が高い状態へと誘導されているため、多重安定領域に達すると、高発現状態の安定固定点に落ち着く。

このように、多重安定性をもつシステムでは初期条件つまり過去の履歴に依存してあたかも記憶を生じたかのようなヒステリシスが備わると考えられる。そして、実験的に求めたパラメータでこのような多重安定性が生じるという解析結果は、再構成した人工遺伝子ネットワークが遺伝子発現にヒステリシスを備えるという予測につながる。そこで次に、このような特性が実際の実験系に備わっているかを検証した。

遺伝子発現のヒステリシス

理論的に予測されたヒステリシスを次の方法で検証を行った (図 2.12)。

まず、ポジティブフィードバックシステムを導入した大腸菌を一晩 37°C で培養する。培養液を 1/100 にうすまるようにして最小培地にうつす。その際、 1 mM IPTG の最小培地と IPTG を含まない 0 mM IPTG 最小培地の二種の培地にうつす。IPTG の有無によって、Low State と High State 二通りの状態へと大腸菌を誘導する。

37°C で 6 時間 ($\text{O.D}_{600}=0.4$)、前培養し High State の大腸菌が十分 CI-GFP を発現していること、Low State の大腸菌が非発現状態にあることを確認した後、 $1 \times \text{PBS}$ バッファーで 3 回洗い、IPTG を一旦洗い流す。すぐに様々な IPTG 濃度の最小培地に High, Low State それぞれの大腸菌を 1/20 に薄まるようにしてうつす。更に培養し、 $\text{O.D}_{600}=0.4$ 付近の対数増殖期に達するまで 6 時間培養する。その間、遺伝子発現量を測定し発現量が変化しなくなったときの蛍光量を、安定状態の発現量とみなす。

実験の結果、野生型のポジティブフィードバックシステムは、 $0.0025 \text{ mM} \leq [\text{IPTG}] \leq 0.05 \text{ mM}$ の範囲において Going Up と Coming Down の二つの軌跡で遺伝子発現の発現量に顕著な差が見られた** (図 2.13)。

**LacIq の抑制を解除することによる遺伝子発現の誘導には注意しなくてはならない点がある。大腸菌の lactose オペロンという内在システムには元々ポジティブフィードバックが備わっており、遺伝子発現にヒステリシスが現れることが昔から知られている。これは、LacIq と LacIq を阻害する天然物質の選択的取り込みに関わるタンパク質が lactose operon にあるためにおこる。TMG とよばれる天然の LacIq 阻害剤で誘導すると、lactose operon 内の *lacY* 遺伝子が発現し、LacY は TMG の選択的取り込みを行い、一旦 TMG を取り込んだ細胞はポジティブフィードバックがかかってしまう。その結果フィード

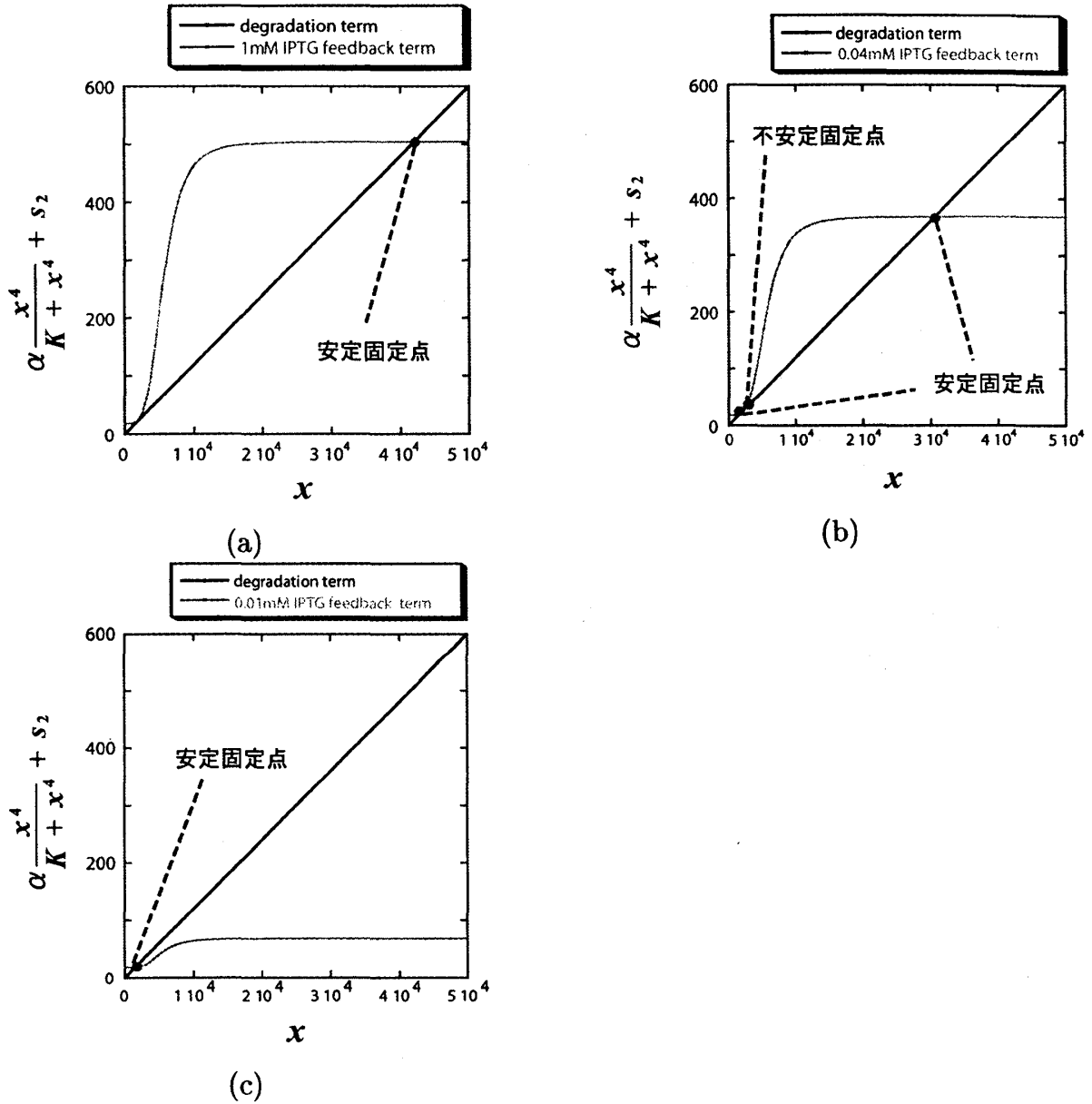


図 2.11: ポジティブフィードバックシステムにおける遺伝子発現の双安定性
 (a)IPTG=1mM (b)IPTG=0.04mM (c)IPTG=0.01mM 交点がシステムの固定点を意味する。1mM IPTG では高発現安定固定点のみが, 0.01mM IPTG では低発現安定固定点のみがそれぞれ存在する。0.04mM IPTG では二つの安定固定点が存在し、双安定となっている。

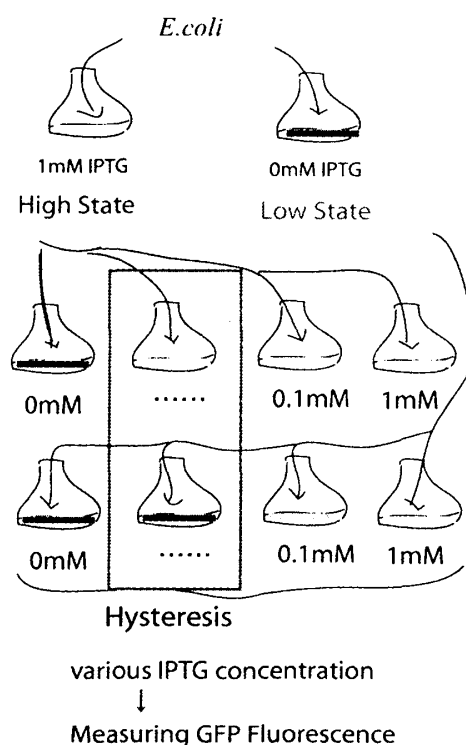


図 2.12: 遺伝子発現のヒステリシスの検証法 予め 1mM IPTG を加えて CI-GFP(AAV) を発現した大腸菌を High State, IPTG を加えず CI-GFP(AAV) を発現させない大腸菌を Low State と定め、二種類用意する。その後 PBS で Wash して IPTG を一旦洗い流し、High, Low State の大腸菌を様々な IPTG 濃度の培地に移す。長時間培養後、CI-GFP(AAV) の定常状態の発現量を測定し、High, Low State 由来の細胞間で遺伝子の発現量に差がないかを調べる。差が現れた領域にはヒステリシスが現れている。

それに対して、フィードバックのないコントロールシステムでは、Going Up と Coming Down で同じ軌跡をとり、履歴依存性はみられなかった (図 2.14)。二つの結果を比較し、再構築したポジティブフィードバックを備えた人工遺伝子ネットワークには、遺伝子発現にヒステリシスが現れることが明らかとなった。

しかし、数理モデルによる予測よりも広い領域でヒステリシスが見られている。この原因は、IPTG によってプロモーター活性を完全に OFF にはできないためであると考えられる。IPTG を加えなくとも、アクチベーターは最大値 (1mM IPTG の定常

バックのない外来遺伝子でもヒステリシスが現れてしまう [31]。しかし、本研究で用いた IPTG は LacY の選択的取り込みの影響を受けず、膜を通過して細胞内に入ってくるため、内在性のポジティブフィードバックの影響を受けない [32]。また、Glucose は LacY の機能を阻害することが知られており、本研究で用いた最小培地には glucose が適量含まれている。以上のことから、内在性のポジティブフィードバックの影響は無視でき、人工遺伝子ネットワークのポジティブフィードバックによるヒステリシスがみられているのだと考えられる。

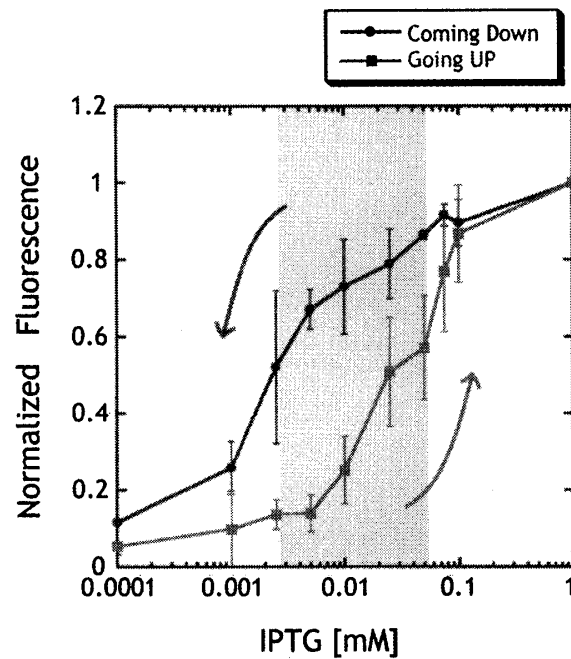


図 2.13: ポジティブフィードバックシステムにおける遺伝子発現のヒステリシス
Coming Down と Going Up の遺伝子発現で、 $0.0025\text{mM} \leq [\text{IPTG}] \leq 0.05\text{mM}$ の範囲でヒステリシスがみられている。

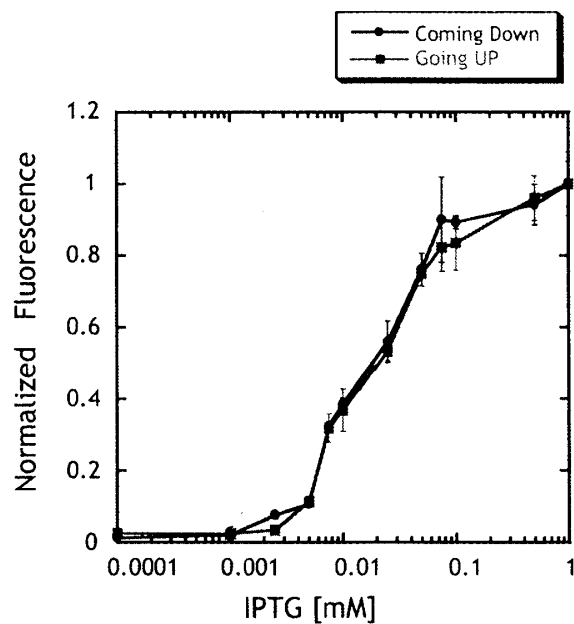


図 2.14: フィードバックなしのシステムではヒステリシスは存在しない 対照となるフィードバックなしの遺伝子ネットワークシステムでは、ポジティブフィードバックシステムのような遺伝子発現のヒステリシスはみられなかった。

値) の 3-5 % ほど発現してしまう。実際には、このようなプロモーター活性のリークがプロモーター活性が上増しされ、履歴現象が尾を引いているのだと考えられる。理想的なスイッチ制御を仮定する数理解析では、このような効果を考えていないため、IPTG 濃度が低い領域で差が生じると考えられる。

以上のことから、ポジティブフィードバックを備えた遺伝子ネットワークには遺伝子発現にヒステリシスが備わり、記憶素子としての機能特性を持つ、という結果が導かれる。

最後に、ヒステリシスが生物にとってどのような役割を果たすかを考察する。ポジティブフィードバックのヒステリシスは、遺伝子発現に「不可逆性」を与える。この不可逆性によって、例えば突発的なシグナル因子の減少によらず、特定の遺伝子を安定に発現し続けることができると考えられる。

生物は様々な揺動にさらされる。外部からの刺激に応答してプログラムを進行させている時に、外界の環境が変動して刺激が急激に減少することも大いにありえる。もしその刺激が、発生や分化のように重要な変化を誘導するものであった場合、シグナルの減少によって分化プログラムが停止し、生命にとって明らかな危険をもたらすことが予想できる。そのような危機に予め対応するために、シグナルに応答する分子が多重安定性を備えるようにネットワークを設計しておくことで、安定したシグナル伝達を実現し、発生や分化のプログラムを正常に進行させることができると考えられる。発生や分化の遺伝子ネットワークでポジティブフィードバックが頻出するのは、多重安定性による危機管理を行うためではないかと推測できるが、不可逆性と分化現象の因果関係は今後の課題である。

これまでに、アフリカツメガエルの発生を司る MAPK カスケードにポジティブフィードバックが備わり、誘導刺激に一旦さらされると刺激を除去しても MAPK のリン酸化が保たれているという報告がある [33]。これと同様に、不可逆的な反応の報告が JNK cascade [34]、細胞周期 [35,36] でもなされている。また、外部からの TMG 分子刺激によって大腸菌の lactose operon の作動が誘導されると、operon にコードされた *lacY* 遺伝子の発現産物 LacY がますます TMG を取り込むようになり、ポジティブフィードバックが形成される。この系においても、*lacY* 遺伝子発現にヒステリシスが備わっていることが報告されている [31]。これらの例は遺伝子ネットワークではなく、むしろタンパク質のネットワークの階層での機能特性である。しかしながら、双方のネットワークで同じ制御が存在し、同様の機能特性を果たしている。このことは、生命が各階層で同じ設計原理を利用していることを推測できる。今後の研究によって遺伝子ネットワークとタンパク質のネットワークの相同性を比較し、システムレベルでの設計原理の保存性を検討したい。

表 2.1: モデル内のパラメーター 実験によりパラメータを定量している。

Symbol	Parameter
x_1^{max} (IPTG=0.005mM) [molecules/cell]	$9.3 \pm 1.0 \times 10^3$
x_2^{max} [molecules/cell]	$9.0 \pm 0.8 \times 10^3$
x_2^{*max} [molecules/cell]	$9.9 \pm 0.8 \times 10^3$
α_1 ($I=0.005$ mM) [molecules/cell/min]	$1.1 \pm 0.1 \times 10^2$
α_1^{max} [molecules/cell/min]	$1.0 \pm 0.1 \times 10^3$
γ [1/min]	0.012
α_2^{max} [molecules/cell/min]	$1.0 \pm 0.1 \times 10^2$
α_2^{*max} [molecules/cell/min]	$1.2 \pm 0.1 \times 10^2$
K [nM]	$1.4 \pm 0.3 \times 10^{-1}$ $x_2^{max}=2.0 \pm 0.5 \times 10^2$
K^* [nM]	$1.1 \pm 0.2 \times 10^{-1}$ $x_2^{*max}=1.7 \pm 0.4 \times 10^2$
K_I [mM]	$2.6 \pm 1.0 \times 10^{-2}$
s_1 [molecules/cell/min]	$1.8 \pm 0.6 \times 10^{-4}$ x_1^{max}
s_2 [molecules/cell/min]	$6.0 \pm 0.6 \times 10^{-4}$ x_2^{max}

x_1^{max} : maximal level of GFP(IPTG=0.005mM)

x_2^{max} : maximal level of CI-GFP(P_{RM})

x_2^{*max} : maximal level of CI-GFP($P_{RM}L1L1R3$)

I : IPTG

α_1 : the rate of synthesis of P_{trc2} ($I=0.005$ mM)

α_1^{max} : the maximal rate of synthesis of P_{trc-2} ($I=1$ mM)

γ : the degradation rate of GFP(AAV) and CI-GFP(AAV)

α_2 : the maximal rate of synthesis of the P_{RM} wild type (P_{RM})

α_2^* : the maximal rate of synthesis of the P_{RM} mutated type($P_{RM}L1L1R3$)

K : the dissociation constant of the P_{RM} wild type(P_{RM})

K^* : the dissociation constant of the P_{RM} mutated type($P_{RM}L1L1R3$)

K_I : IPTG concentration required for half the maximal level of gene expression

s_1 : the basal synthesis of P_{trc-2}

s_2 : the basal synthesis of P_{RM}

第3章 リアルタイム測定による熱応答システムの同定とその動的特性

3.1 研究背景・目的

生物は外界からの熱や光といった物理的変化をタンパク質濃度などの化学的シグナルへと変換し、応答する。分子生物学によって紫外光, 熱, pH など様々な変化に対する応答システムが同定されてきた [37]。従来は遺伝子に変異を導入して機能性タンパク質を欠損させ、分子同士の相互作用が同定されてきた。この相互作用を逐次明らかにすることでネットワークが形成されていることがわかってきた。そして近年 Genechip を用いた解析によって、これらの応答システムが高度にモジュール化されていることも明らかとなりつつあり、熱応答システムは熱に特化したネットワークが形成されていると考えられる。しかし、ボトムアップ的に構成要素の配線図を全て明らかにしたからといって、システムの動的な振る舞いがわかるとは限らない。また、モジュール間での動的システムの共通特性も構造だけから同定するのは難しい。生命のシグナル変換システムの解明には、動的な振る舞いに着目したトップダウン的な方法・概念が必要であるといえる。

本研究において我々は、非破壊的に構成要素の動的な振る舞いから内部システムを知る、トップダウン的な同定を熱応答システムに対してはじめて行った。熱応答遺伝子のプロモーターを *gfpmut3* 遺伝子上流に配置し、リアルタイムで 100 個程度の遺伝子発現のダイナミクスの測定が可能なマルチウェルプレートリーダー系を構築した。更に、遺伝子発現パターンをクラスター解析することで内部システムの分類・同定を行った。この方法はプロモーター-*gfp* 融合システムで遺伝子発現をレポートするため、熱応答システムに限らず他の外部シグナル応答システムにも適用可能であり、モジュール間に共通するシステム特性の解明に向けて強力なツールとなりえると考えられる。

3.2 生細胞の熱応答システムについて

過去、熱刺激に応答して発現する遺伝子が同定され、分子レベルでの機構が調べられてきた (図 3.1) [38,39]。

生物を通常の生育温度より高温にさらすと、熱応答タンパク質の発現量が上昇する。

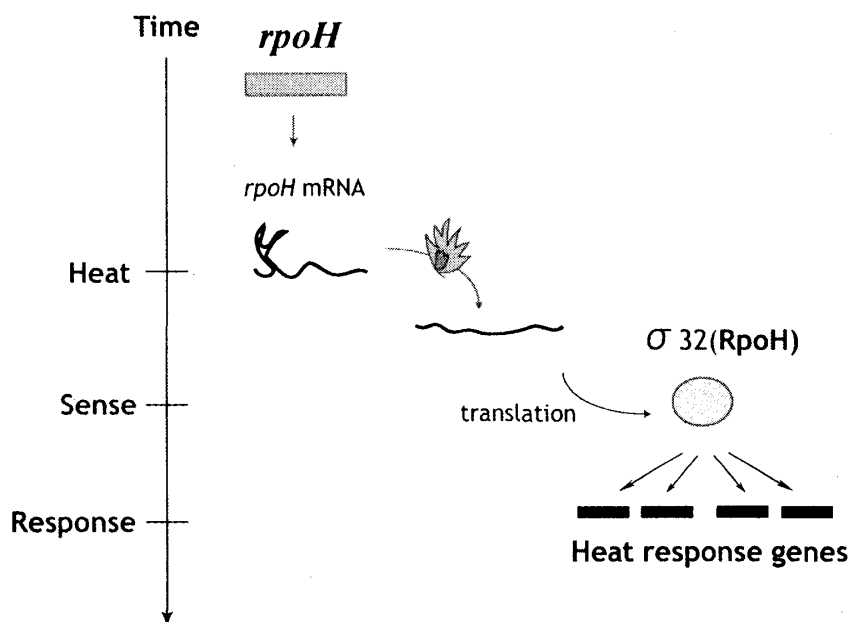


図 3.1: 大腸菌の熱応答システムの分子機構 熱刺激によって *rpoH* mRNA が翻訳され、 σ^{32} タンパク質が発現する。 σ^{32} は RNA ポリメラーゼと複合体を形成し、熱応答遺伝子を転写する。熱応答遺伝子の一つである *dnaK* は σ^{32} を安定化するタンパク質をコードしており、熱によって変性したタンパク質が修復、除去されるまで σ^{32} を細胞内で安定に保持させている。

分子シャペロンは蛋白質の折り畳みを助けたり、蛋白質の分解に間接的に関与する。このように、細胞内蛋白質の品質管理に関与する分子の合成速度を増加させることにより、生物は温度上昇という環境変化に適応する。

大腸菌は、温度刺激時に転写因子の σ^{32} が増加することで引き起こされる。この σ^{32} は *rpoH* 遺伝子にコードされているが、タンパク質量の増加は σ^{32} の翻訳段階での合成誘導と、半減期が約 1 分と非常に不安定な蛋白質である σ^{32} の一時的な安定化によることが知られている [40]。

σ^{32} 合成の誘導は主に *rpoH* mRNA の翻訳段階で調節されていることが過去の研究で示唆されており、*rpoH* mRNA の翻訳開始点近傍を含む RNA のヘアピン構造が翻訳調節に深く関わっていることが報告されている [41, 42]。具体的には、温度刺激によりヘアピン構造がほどけ、 σ^{32} と RNAPolymerase (以下 RNAP) が複合体を形成し、様々な熱応答遺伝子を転写すると考えられている。本研究で対象とする熱応答遺伝子は、過去の文献に従い熱によって発現が誘導されることが報告されている 10 遺伝子とした。それぞれの遺伝子名と機能を表 5.1 に示す。推定 Promoter 領域とは、開始コドンから上流の ORF の終止コドンまでの領域を指し、その間に熱応答遺伝子を

表 3.1: 熱応答遺伝子 数字は大腸菌 MG1655 ゲノム配列

名前	機能	推定 Promoter 領域
<i>rpoH mRNA</i>	熱センサー	3598581-3598825 (<i>rpoH</i> -loop)
<i>rpoH</i>	σ^{32} (σ ファクター)	3598807-3599051
<i>ibpA</i>	分子シャペロン	3864927-3865676
<i>htpG</i>	分子シャペロン	494234-494344
<i>groES</i>	分子シャペロン	4368435-4369047
<i>grpE</i>	分子シャペロン	2748731-2748852
<i>lon</i>	タンパク質分解酵素	457925-458111
<i>htrA</i>	分子シャペロン	180752-180883
<i>htrM</i>	分子シャペロン	3791724-3792009
<i>rpoE</i>	σ^E (σ ファクター)	2708035-2708441

制御するプロモーターが存在すると予測した*。

3.3 方法

レポーター細胞の構築

非破壊的に、リアルタイムで遺伝子発現を測定するためには、レポーター細胞の構築が必要である。そこでわれわれは、第二章と同様に GFP を用いたレポーター細胞の構築を行った。熱刺激の感知は *rpoH* mRNA のアンフォールディングによって翻訳が始まることによる。このアンフォールディングを生細胞内でモニターするために、次の様なコンストラクトを作成した [42]。

rpoH mRNA の ribosome binding site を含む sensor domain(以下:*rpoH* loop) をコードした配列を *gfpmut3* 遺伝子に融合させ、pLtetO-1 プロモーター下流に挿入した。pLtetO-1 プロモーターから *rpoH* loop-*gfpmut3* fusion mRNA が発現するが、低温環境では mRNA に Ribosome が結合できないために翻訳が起こらない。外部温度が上昇し、熱刺激がもたらされると *rpoH* loop がアンフォールディングし、*gfpmut3* mRNA の翻訳が始まり、GFPmut3 が発現する。GFPmut3 の蛍光値を測定することで、熱センサーの感知過程をリアルタイムでモニターする。

rpoH の翻訳産物 σ^{32} は熱刺激によって変性したタンパク質を修理・分解する修復酵素や分解酵素をコードした熱応答遺伝子を発現させる。これら熱応答遺伝子それぞれのプロモーターを *gfpmut3* 遺伝子の上流に挿入した (図 3.2)。染色体 DNA にも同

*前の ORF 内に存在する Internal Promoter の可能性も考えられるが、本研究では考慮していない。

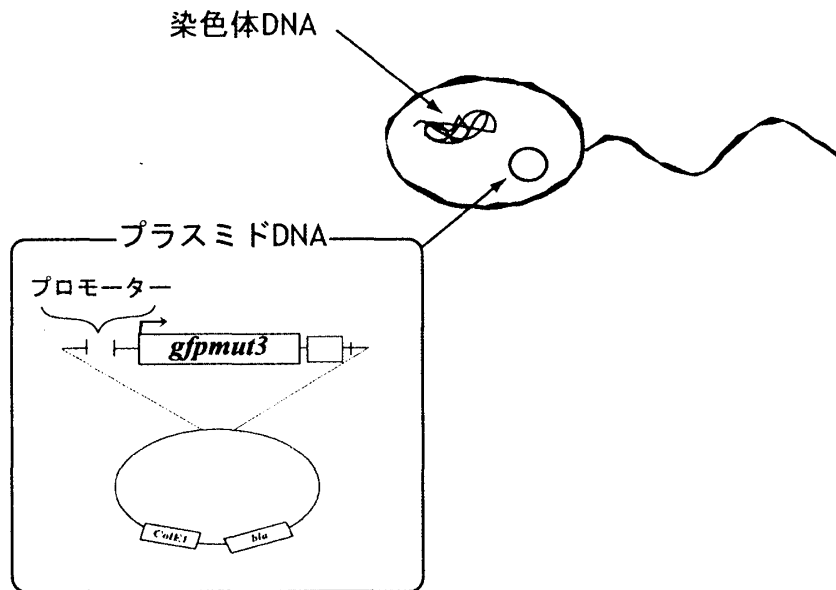


図 3.2: 熱応答遺伝子のレポーターコンストラクト *gfpmut3* 遺伝子上流に各熱応答遺伝子の推定プロモーター領域を挿入する。*gfp* が制御を受けるプロモーターは大腸菌ゲノムにも存在し、その熱応答遺伝子と *gfp* は同じ遺伝子発現ダイナミクスを示すと考えられる。

じプロモーターが存在して熱応答遺伝子を制御している。熱刺激によって遺伝子が発現すると、プラスミド DNA 上の *gfpmut3* 遺伝子も同時に発現し、遺伝子発現ダイナミクスをレポートできると考えた[†]。このプラスミド DNA が導入された大腸菌は、熱応答遺伝子の発現が GFPmut3 の蛍光でモニターできるレポーター細胞となる。そして、一つの遺伝子に対して一つのレポーター細胞を構築する。本研究で対象とする 10 遺伝子それぞれに対してレポーター細胞を構築した。構築した 10 レポーター細胞の遺伝子発現を同時に測定するため、マルチプレートリーダーを用いてリアルタイム測定を行った。

マルチウェルプレートリーダーによるリアルタイム測定

本研究で用いたマルチウェルプレートリーダーによるリアルタイム測定のスキームを説明する (図 3.3) [43-45]。30℃で一晩培養した各種大腸菌を M9 最小培地に 600 分の 1 にうすめ、100μl を 96 ウェルプレートの各ウェルに注ぎ、2 時間培養を行う。蒸発を防ぐためにミネラルオイルを 100μl のせる。吸光度が 0.01 に達し、対数増殖期に入ったときにマルチプレートリーダーの温度を高温へシフトさせる。温度が上昇し

[†]大腸菌では RNA からタンパク質への翻訳の過程でスプライシングなどの修飾が起こっていないため、プロモーターから発現した mRNA はそのままタンパク質に翻訳されていると考えられる。従って、細胞内で同じプロモーターに制御されている遺伝子は同様な遺伝子発現制御を受けると考えられる。

定となる間はプレートを30℃のインキュベータに移しておき、15分の経過によってプレートリーダーの温度が一定になったのを確認した後にプレートをセット、測定を始める。1分おきに96ウェルプレートを回して(diameter=2mm, double orbit)培養液をかき混ぜ、3分間隔で蛍光値(485nm 励起, 535nm 蛍光, 0.5s)と吸光度(600nm, 0.1s)を測定した。培養温度に寄らず、蛍光値、吸光度は10%の誤差範囲内にある(data not shown)。96ウェルプレートはFalcon社から購入した。培地の蒸発を防ぐシリコンオイルはSigma社のミネラルオイルを使用した。

続いて、遺伝子発現ダイナミクスのパターンから内部システムの分類・同定を行う。遺伝子発現量の最大値で規格化し、遺伝子発現の時系列を一つのベクトルとみなしてクラスター解析を行う。クラスター化はNearest Neighbor法で行った。

3.4 結果と考察

遺伝子発現のクラスター解析によるクラスター構造の同定

30℃から36℃までの温度で大腸菌を培養し、それぞれの温度における遺伝子発現の定常値を測定した(図3.4)。30℃に比べて高温側でプロモーター活性が上昇している。対照として、熱応答に関与しない*lacZ*遺伝子のプロモーターの各温度における発現量を測定したところ、変化は見られなかった(data not shown)。以上のことから、温度依存的なプロモーター活性の変化がレポーター細胞系で測定されているといえる。

30℃から36℃への温度シフトを与え、遺伝子発現のダイナミクスを測定した。最大値で規格化を行い、クラスター解析を行った(図3.6)。その結果、最も早く発現が早く出るのが*rpoH* mRNAの発現であることがわかった。これは分子生物学と同様であり、センサーと機能していることと一致している。さらにその後に発現してくる熱応答遺伝子は、クラスター解析の結果、二つのクラスターに分類されることがわかった。クラスター1は多くが早く発現しており、クラスター2は遅い発現パターンを見せている。

これらの発現のクラスターパターンは何が原因になっているのだろうか？クラスター1, クラスター2の熱応答遺伝子のプロモーター配列を探索したところ、クラスター1, 2それぞれで異なった共通配列がみられた(図3.7) [46]。クラスター毎の共通配列の存在は分子生物学の結果と一致している。また、*rpoH*は複数のプロモーター配列を持っており、その中にクラスター1, 2両方の共通配列を見出した[47]。樹形図においては、*rpoH*はクラスター1, 2の境界に位置している。これはプロモーター配列が二つのクラスターから独立しているのではなくどちらのクラスターにも属するため、遺伝子発現ダイナミクスにおいても境界領域に分類されたのだと考えられる。以上のことから、遺伝子発現のダイナミクスから、熱応答システムのクラスター構造を同定することができたといえる。

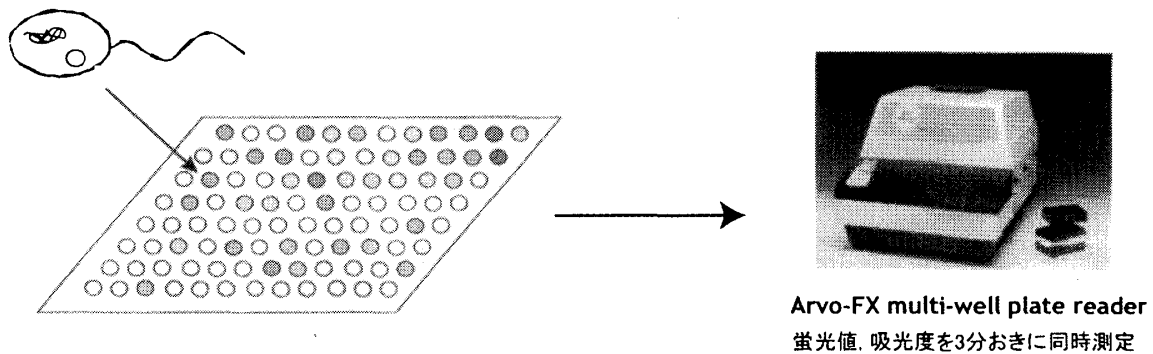


図 3.3: 96 ウェルプレートリーダーを用いた遺伝子発現ダイナミクス測定 96 ウェルプレートでレポーター細胞を培養し、蛍光値と吸光度を3分おきに測定する。

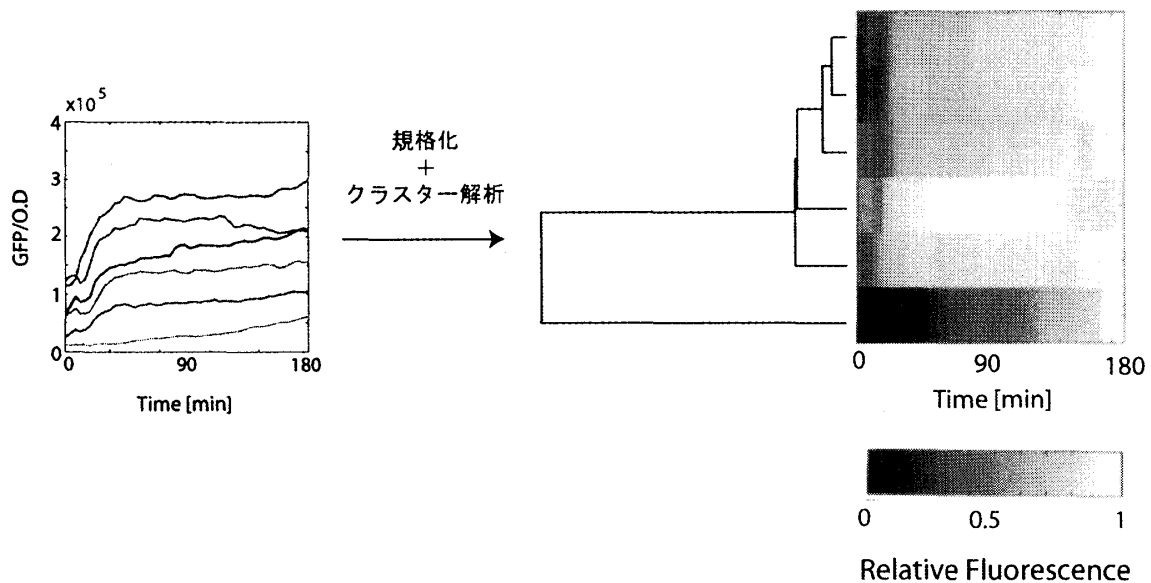


図 3.4: 遺伝子発現ダイナミクスのクラスター解析 測定した遺伝子発現ダイナミクスを最大値で規格化し、クラスター解析を行う。クラスター間の距離は樹形図の距離に表される。

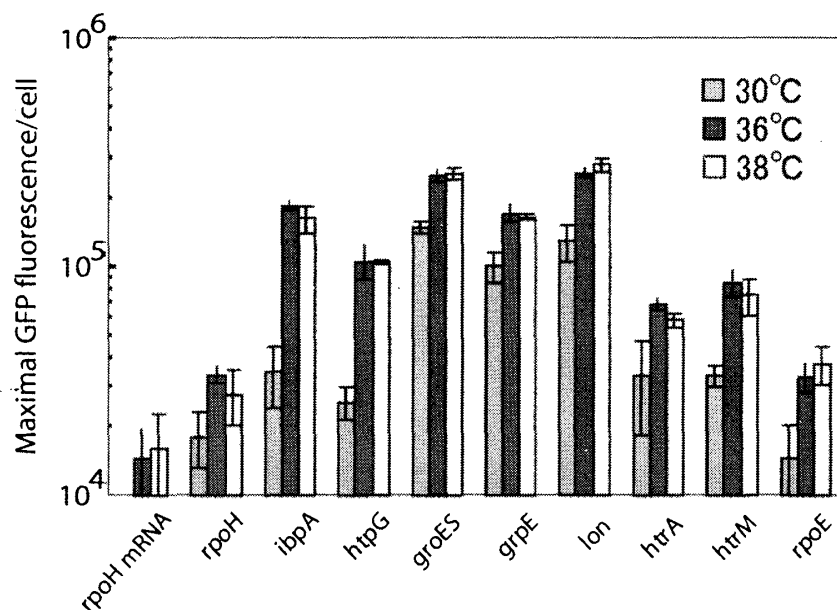


図 3.5: 熱応答遺伝子の温度依存的な発現 30, 36, 38 °C における各熱応答遺伝子の最大発現量を比較している。30 °C における発現量に比べ、36, 38 °C の発現量が大きくなっていることがわかる。

熱応答システムの時間的特徴

本研究で開発したトップダウン的な同定法が従来の変異体解析, ボトムアップ的な同定法に比べて秀でている点は何であろうか? 従来の変異体解析ではダイナミクスを見ることが難しく、また Genechip などの包括的な解析ではダイナミクスをみとしても時間分解能が「hour」のオーダーである。これに対し、本研究で用いたマルチプレートリーダーは時間分解能が秒から分のオーダーである。この特性を生かすことによって、熱応答システムの時間的特性を評価することができる。そこで次に、遺伝子発現のダイナミクスの発現タイミングから熱応答システムの時間的特性を検証した。対照として、glucose など糖分の取り込みにかかわる *lacZ* オペロンを用い、熱応答と栄養分取り込みの二つのモジュールでの特性の違いを比較した。発現のタイミングを評価するために、response-time τ を次の様に定義した。

$$x(\tau) = \frac{x_{max} - x_{min}}{2} \quad (3.1)$$

つまり、最大変化量の半分値に達した時を response-time τ と定める。この response-time の大小で応答の早さを評価したところ、熱応答システムは *rpoH* mRNA センサーの response-time は 15 分と *lacZ* システムに比べて 45 分も早い。その後の response genes も 60 分ほどに集中しており、その全てがクラスター 1 に属する熱応答遺伝子であり、クラスター 2 は 120-180 分程度の時間に response-time がある。これに対し、

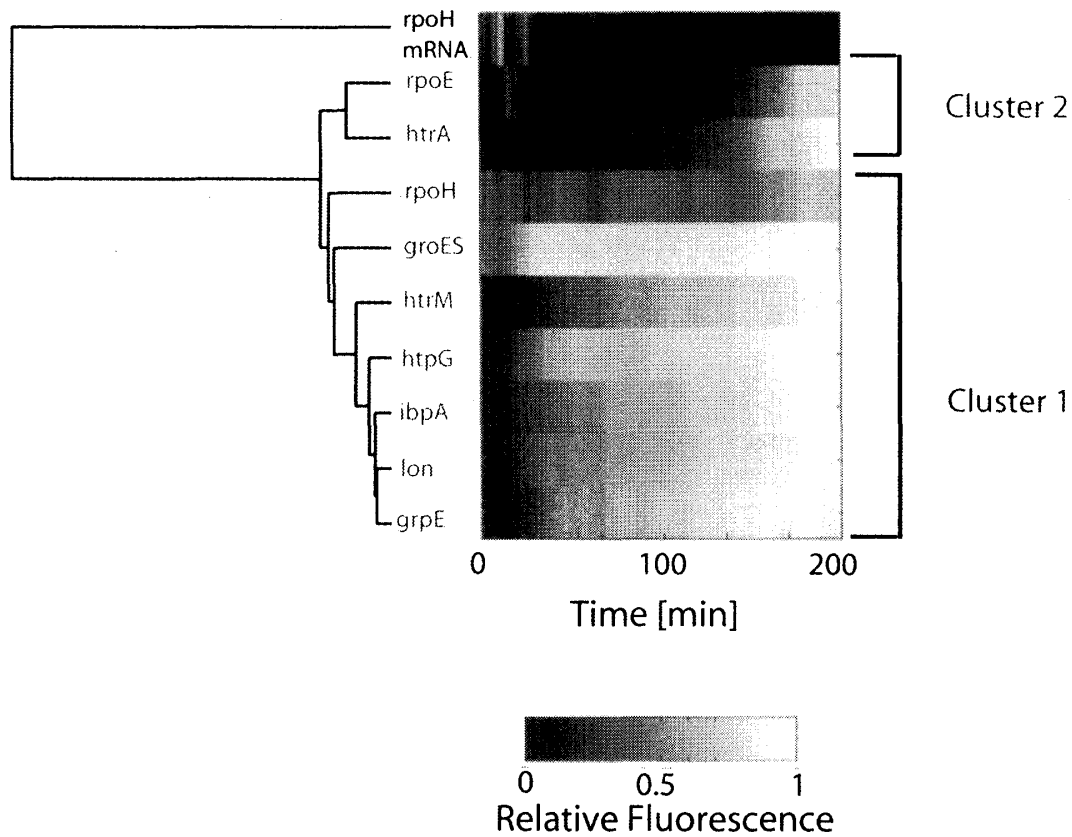


図 3.6: 熱応答遺伝子発現ダイナミクスの測定とクラスター構造 30℃から36℃へ温度刺激を与え、熱応答遺伝子の発現を測定した。最も早い応答を示すのは *rpoH* mRNA の翻訳過程であった。その後発現する熱応答遺伝子はクラスター解析の結果、2つのクラスターに分けられることがわかった。

Cluster 1

consensus	ttgaa.....ccccat
lon	gttgaa.....ccccat
groE	cttgaa.....ccccat
htpG	cttgaa.....ccccat
ibpA	cttgaa.....acccat
htrM	catgaa.....ccccaa
grpE	cttgaa.....ccccat
rpoH	attgaa.....cacggt

Cluster 2

consensus	gaactt.....tctga
htrA	gaactt.....tctga
rpoH	gaactt.....tctga
rpoE	gaactt.....tctaa

図 3.7: 熱応答遺伝子のプロモーターに見出された共通配列 クラスター1, 2それぞれで異なった共通配列がプロモーター内に見出された。この結果は過去の分子生物学の結果と矛盾しない。また、*rpoH* は複数のプロモーター配列を持っており、クラスター1, 2両方の共通配列を持っていた。

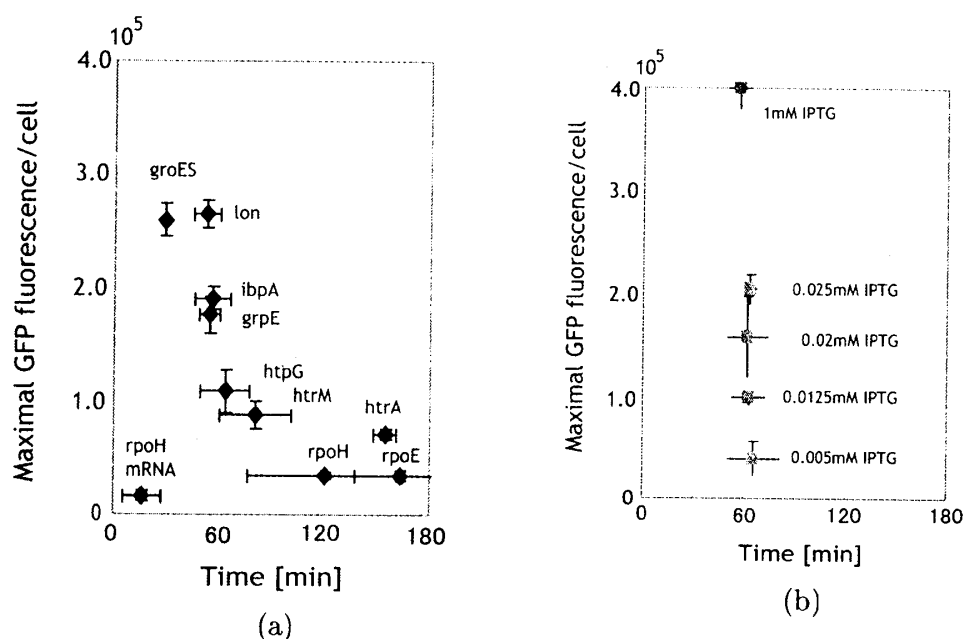


図 3.8: 熱応答システムの応答時間-発現量の特性 (a) 熱応答遺伝子群の response-time (b) *lacZ* 遺伝子の response-time 熱応答遺伝子群は *rpoH* mRNA の翻訳過程が最も早く、15 分の response-time を示す。そのうちクラスター1 の遺伝子群は 45-70 分の、クラスター2 の遺伝子群はおおよそ 120-180 分の response-time を示す (a)。これに対し、栄養源の代謝に関わる遺伝子 *lacZ* は、その発現量の大きさに関わらず response-time は 60 分を示す。二つの異なるシステムを比較すると、熱応答システムは時間的応答性が早く、更にクラスターごとに応答の早さが違うことがわかる。

lacZ は IPTG の投与量で最大発現量を変化させても response-time が 60 分と変化せず、response-time が発現量に依存しないシステムになっていることがわかる。*rpoH* mRNA センサー分子の response-time が早いのは、転写が行われなためと考えられる。熱応答遺伝子群のセンサー分子が転写を行わずに早く応答できるようにネットワークシステムが設計されているのはなぜか。また最大発現量と response-time が逆比例的な関係にあるのはなぜだろうか。これは、外界の急激な環境変動に素早く応答し致命的な損傷を避けるために、ステップ的な刺激に対して応答しやすいような時定数が小さいネットワークになっているのではないかと考えられる。調査の段階であるが、温度刺激を段階的に上げてゆくなどしたときに response-time と最大発現量の変化を調べることで理解が深まると考えている。

本研究により、遺伝子発現のダイナミクスから、promoter の共通配列に代表されるネットワークシステムを破壊的ではなく、非破壊的、トップダウン的に同定しうることが示された。更に、熱応答システムが代謝酵素のシステムに比べてステップ応答に早く応答することがわかった。今後、温度刺激の与え方を変化させることで熱応答特性を調べるとともに、光応答など他のシステムに対しても同方法を適用し、ネットワークの種によらない設計原理を明らかにしてゆきたい。

第4章 結論と展望

4.1 結論

各章で明らかとなったことをここでまとめる。

第二章：ポジティブフィードバックによる遺伝子発現の履歴現象 第二章において、発生・分化ネットワークに頻出するネットワークモチーフのポジティブフィードバックシステムの機能解明を行った。人工的にポジティブフィードバックを構成した遺伝子ネットワークを再構築した。そのネットワークを大腸菌に導入し、*in vivo*において *cI* 遺伝子の発現を GFP(AAV) によってレポートした。遺伝子発現ダイナミクスの定量的解析から、

1. ポジティブフィードバック制御をうける遺伝子は、フィードバック制御のない遺伝子に比べて遺伝子発現に時間遅れを伴うことを見出した。
2. ダイナミクス測定と数理モデルを組み合わせる量的情報を抽出、再構成したポジティブフィードバックシステムが多重安定性を持つことを予測した。
3. 多重安定性からヒステリシスが生まれるという理論的予測の通り、*cI* 遺伝子の発現にヒステリシスを見出した。

本研究で見出したポジティブフィードバックシステムによる不可逆的な遺伝子発現が、分化のような不可逆的な現象にどのように関与するのか、今後の研究で証明してゆきたい。

第三章：リアルタイム測定による熱応答システムの同定とその動的特性 第三章では、大腸菌の熱応答システムの設計原理を明らかにすることを目的に、熱応答遺伝子発現のダイナミクスを非破壊的かつリアルタイムで測定、クラスター解析を行った。その結果、

1. 遺伝子発現のリアルタイム測定から熱応答システムのクラスター構造の同定に成功した。
2. 熱応答遺伝子群の発現を司る *rpoH* mRNA の response-time が *lacZ* システム (栄養源の取り込み) に比べて早いことを見出した。



図 4.1: 一細胞レベルでのダイナミクス測定 細胞集団の平均的ダイナミクスを測定してきたこれまでの研究を越えて、一細胞レベルでのダイナミクスを顕微鏡を用いて測定してゆきたい。生命は揺らぎを利用しているだろうか？

従来の変異体解析と異なり、非破壊的に内部システムのクラスター構造を同定できたことは特筆すべきである。また、熱応答遺伝子のセンサー分子がなぜ転写段階を省略して早い応答を示すように設計がなされているのかは未だ明らかではない。これはセンサー分子の時間的な応答性を様々に変化させることによる表現型の変化で理解できる課題であり、今後の研究によって明らかにしたい。更に、本研究で用いたトップダウン的な方法は他のシグナル変換システムにも適用可能である。熱応答だけに限らず、光応答、pH 応答など構成分子が異なるモジュール間でどのような共通特性が備わっているかを理解することは、ネットワークがどのようにして形成されてきたかというシステムレベルでの進化論にもつながると考えられる。

4.2 展望

最後に、「揺らぎ」について述べたい。細胞のように小さな空間では物質の濃度揺らぎ、時間揺らぎが無視できない場合がある。とりわけ、少数で機能するタンパク質種では、細胞間での濃度揺らぎが表現型の変動を引き起こしてしまうと考えられる。そのような揺らぎは生命にとってどのような意味をもつのだろうか。生命は揺らぎを抑えつつも利用するようなシステムを設計してはいないだろうか。近年、一細胞レベルで遺伝子発現を測定し揺らぎを考慮した研究が行われている [47-49]。それによると、細胞集団でみられたダイナミクスが、一細胞レベルではより確率的になり、揺らぎが本質的に生命活動に影響を及ぼしていることが明らかとなりつつある (図 6.1)。

我々は、遺伝子ネットワークにおいて Input となる分子の濃度揺らぎと Output となる分子の濃度揺らぎの時系列を測定し、その相関からシステム関数を求め、内在システムの動的性質を理解することが出来るのと考えられる。これはスペクトル解析とよばれ、学問としては新規性のない枯れた学問である。しかしながら、「揺らぎから生命システムを探る」という観点は生物学としては新しい問題である。今後、細胞集団の平均的ダイナミクスだけでなく、揺らぎも含めた一細胞レベルでのダイナミクス測定を行ってゆきたい。

謝辞

本論文に記載された全ての研究は東京大学大学院理学系研究科の佐野雅己教授の指導の下に行われたものです。多くのご指導に対し感謝いたします。

佐野研究室助手の村山能宏博士には研究を進める上で数多くのアドバイスをいただきました。ありがとうございました。

また、日々刺激を与えてくださった佐野研究室のみなさまに感謝いたします。

1. 第二章

東京大学大学院理学系研究科の高須悦子博士、稲木美紀子博士はDNA Sequence Analyserの実験的指導、佐伯公子博士にはタンパク質精製に関してご指導いただきました。北京大学のQi Ouyang博士には数理モデルに関する助言をいただきました。Weizmann Institute of ScienceのUri Alon博士とRon Milo氏には時間遅れに関する助言をいただきました。

2. 第三章

第三章は、広島大学大学院数理生命科学研究科の柴田達夫博士ならびに山本卓教授、東京大学大学院総合文化研究科の藤本仰一博士に助言を頂きました。

ありがとうございます。

以下私的ではありますが、中央大学総合政策学部の鈴木英恵さんには日常生活面で世話になりました。今後は自分で雑用をこなせるようにがんばります。

藤田P.T.Cの藤田裕俊氏には中学生の頃から現在まで12年間お世話になりました。今後とも人生指南よろしく願いいたします。

最後に、僕の夢を根底から支えてくれる家族に心から感謝します。生命原理の探求という夢の原点は幼少の頃の母との自由研究であります。人生の目標を与えてくれた両親には感謝の言葉を言い尽くすことはできません。言葉では足りないので、夢をかなえることで恩を返してゆきたいと考えています。そのためにも、今後努力に努力を重ね、研究者（のたまご）として成長していきます。

参考文献

1. L. Wittgenstein, 野矢 茂樹 訳, 論理哲学論考, (岩波書店 2003)
2. B. Alberts, et.al, The Molecular Biology of the Cell 4th edition. (New York, Garland Science, 2002)
3. J.M. Berg, J.L. Tymoczko and L. Stryer, Biochemistry 5th edition. (New York, W.H. Freeman and Company, 2002)
4. M. Ptashne, Genetic Switch: Phage Lambda and Higher Organisms. (Oxford, Blackwell Science, 1992)
5. B.M. Turner, Chromatin and Gene Regulation: Molecular Mechanisms in Epigenetics. (Oxford, Blackwell Science, 2001)
6. S.F. Gilbert, Developmental Biology 6th edition. (Sunderland, Sinauer, 2000)
7. C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik, Immuno Biology 5th edition. (New York, Garland Publishing, 2001)
8. E.R. Kandel, J.H. Schwartz and T.M. Jessell, Principles of Neural Science 4th edition. (USA, McGraw-Hill, 2000)
9. 北野宏明, システムバイオロジー ―生命をシステムとして理解する― (秀潤社, 2001)
10. S.S. Shen-Orr, R. Milo, S. Mangan and U. Alon, Nat. Genet. **31** (2002), 64-68
11. R. Milo, S. Shen-Orr, S. Itzkovitz, N. Kashtan, D. Chklovskii and U. Alon, Science **298** (2002), 824-827
12. T.I. Lee, *et. al.*, Science **298** (2002), 799-804
13. M.B. Elowitz and S. Leibler, Nature **403** (2000) 335-338
14. A. Becskei and L. Serrano, Nature **405** (2000), 590-593

15. A. Becskei, B. Seraphin and L. Serrano, *EMBO. J* **20** (2001), 2528-2535
16. F.J. Isaacs, J. Hasty, C.R. Cantor and J.J. Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003), 7714-7719
17. N. Rosenfeld, M.B. Elowitz and U. Alon, *J. Mol. Biol* **323** (2002), 785-793
18. S. Mangan, A. Zaslaver and U. Alon, *J. Mol. Biol* **334** (2003), 197-204
19. S. Basu, R. Mehreja, S. Thiberge, M-T. Chen and R. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004), 6355-6360
20. V. Noireaux, R. Bar-Ziv and A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003), 12672-12677
21. S. Mangan and U. Alon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (2003), 11980-11985
22. S. Ishihara, K. Fujimoto and T. Shibata, to be appeared in *Genes to Cells*
23. T.S. Gardner, C.R. Cantor and J.J. Collins, *Nature* **403** (2000), 339-342
24. M.R. Atkinson, M.A. Savageau, J.T. Myers and A.J. Ninfa, *Cell* **113** (2003), 597-607
25. H. Kobayashi, M. Kaern, M. Araki, K. Chung, T.S. Gardner, C.R. Cantor and J.J. Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8414-8419
26. B.P. Kramer, A.U. Viretta, M.D-E. Baba, D. Aubel, W. Weber and M. Fussenegger, *Nat. Biotech.* **22** (2004), 867-870
27. J.B. Andersen, C. Sternberg, L.K. Paulsen, S.P. Bjorn, M. Givskov and S. Molin, *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (1998), 2240-2246
28. Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3rd Edition. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)
29. M.A. Savageau, *Nature* **252**, (1974), 546-549
30. P. Smolen, D.A. Baxter and J.H. Byrne, *Neuron* **26** (2000), 567-580
31. E.M. Ozbudak, M. Thattai, H.N. Lim, B.I. Shraiman and A. van Oudenaarden, *Nature* **427** (2004), 737-740
32. A. Khlebnikov and J.D. Keasling, *Biotechnol. Prog.* **18** (2002), 672-674
33. W. Xiong and J.E. Ferrell Jr., *Nature* **426** (2003), 460-464

34. C.P. Bagowski and J.E. Ferrell Jr, *Curr. Biol.* **11**, 1176-1182
35. W. Sha, J. Moore, K. Chen, A.D. Lassaletta, C-S. Yi, J.J. Tyson and J.C. Sible, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003), 975-980
36. J.R. Pomerening, E.D. Sontag and J.E. Ferrell Jr., *Nat. Cell. Biol* **5** (2003), 346-351
37. C.S. Richmond, J.D. Glasner, R. Mau, H. Jin and F.R. Blattner, *Nucleic Acids Res.* **27** (1999), 3821-3825
38. T. Yura, *Genes. Cells.* **1** (1996), 277-284
39. T. Yura and K. Nagahigashi, *Curr. Opin. Microbiol.* **2** (1999), 153-158
40. K.B. Arnvig, S. Pedersen and K. Sneppen, *Phys. Rev. Lett.* **84** (2000), 3005-3009
41. K. Tilly, J. Erickson, S. Sharma and C. Georgopoulos, *J. Bacteriol.* **86** (1986), 1155-1158
42. M-T. Morita, Y. Tanala, T.S. Kodama, Y. Kyogoku, H. Yanagi and T. Yura, *Genes and Development* **13** (1999), 655-665
43. S. Kalir, J. McK. Pabbaraju, C. Southward, M. Ronen, S. Leibler, M.G. Surrete and U. Alon, *Science* **292** (2001), 2080-2083
44. A. Zaslaver, A.E. Mayo, R. Rosenberg, P. Bashkin, H. Sberro, M. Tsalyuk, M.B. Elowitz and U. Alon, *Nat. Genet.* **36** (2004), 486-491
45. S. Kalir and U. Alon, *Cell* **117** (2004), 713-720
46. D.W. Cowing, J.C.A. Bardwell, E.A. Craig, C. Woolford, R.W. Hendrix and C.A. Gross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985), 2679-2683
47. E.M. Ozbudak, M. Thattai, I. Kurtser, A.D. Grossman and A. van Oudenaarden, *Nat. Genet.* **31** (2002), 69-73
48. M.B. Elowitz, A.J. Levine, E.D. Siggia and P.S. Swain, *Science* **297** (2002), 1183-1186
49. G. Lahav, N. Rosenfeld, A. Sigal, N. Geva-Zatorsky, A.J. Levine, M.B. Elowitz and U. Alon, *Nat. Genet.* **36** (2004), 147-150