

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命動態の理解と制御のための
基盤技術の創出」
研究課題「ネットワーク構造とダイナミクスを結ぶ
理論に基づく生命システムの解明」

研究終了報告書

※1年追加支援での実施分を赤字で追加※
研究期間 2013年10月～2020年3月

研究代表者：望月 敦史
(京都大学ウイルス・再生医科学
研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

生命科学が発展する過程で、遺伝子やタンパク質などの生体分子間の相互作用に関する知見は増大し、ネットワークを構築するほどに複雑化した。相互作用ネットワークに基づき、生体分子活性のダイナミクスが動き、そのダイナミクスこそが生命現象の本質なのだと考えられている。実験的に得られたネットワーク情報を元に、ダイナミクスを議論することが、重要な課題となっている一方で、ネットワークは相互作用の骨格にすぎず、数理的には関数やパラメータを仮定しなければダイナミクスを決定できない、とされてきた。この問題に対し本プロジェクトでは、ネットワーク情報だけからシステムの動的性質を決定する数理理論“**構造理論**”を構築することで、問題解決にあたった。理論の構築と展開に加え、それらを実際の生命システムに適用する方法を開発することで、具体的な生命システムの動態の解明に挑んだ。

5 年間の研究活動を通じて、理論の展開は大幅に進み、複数の成果が得られた。研究開始当初のアイデアが数理理論として結実しただけではなく、予期していなかった 2 次 3 次の新しい数理理論が生まれた。一方で実験への取り組みについては、3 つの課題の内 1 つでは画期的な成果が得られた。2 つの課題では技術的な困難により予想以上に時間がかかったが、技術資源を集中するなどの工夫により、現在では実現に向けて順調に進んでいる。

理論的成果(D. 構造理論の展開)

ネットワーク構造と力学的振る舞いを結びつける数理理論を開発し、生命システムの振る舞いの様々な側面がネットワーク構造だけから決定できることを明らかにした。研究開始時点で、**制御ネットワークの構造だけから、重要なノード“FVS 分子”を決定できる理論“Linkage logic”**を我々は擁していた。この理論を主に用いて実験システムの解明を進めた一方で、反応ネットワークに対する新しい構造理論が大きく進展した。

(I) 化学反応系において、**酵素の活性や濃度が変化したときの化学物質の濃度の定性的応答を、ネットワークの構造だけから決定できる**ことを初めて発見し、“**Structural sensitivity analysis**”として確立した。(Mochizuki & Fiedler, 2015)

(II) Structural sensitivity の展開により、酵素変化に対する化学反応系の応答が、ネットワーク上の一部の分子の濃度変化に留まることを発見していた。この応答パターンをネットワークの形だけから説明する、新規の数理法則“**限局則**”を発見した。ネットワークの任意の部分構造があるトポロジカルな基準を満たしているとき、その構造内の反応に与えられた変動の影響は内部のみにとどまり、外部の濃度や反応速度には全く影響を与えない。本研究により初めて明らかとなった法則であるが、適応や恒常性と呼ばれる生命現象の多くが、この法則により統一的に理解できると考えられる。(Okada & Mochizuki, 2016)

さらに、(3) ネットワークの構造情報だけから、化学反応システムの定常解の分岐の基本性質を決定できることを発見し、“**Structural Bifurcation Analysis**”と名付けた。外的環境の変化に対して細胞挙動が質的に不連続に変化する現象は分岐と捉えられるが、**分岐が起こり得るか否かをネットワークの形だけから決定可能である**ことを初めて示した。(Okada *et al.*, 2018)

一年追加支援期間においては、構造分岐解析の非定常解への拡張を進めた。また、**双安定性を示す化学合成回路、交通流ネットワークなど、非生物システムへの構造理論の適用を進めた。**さらに複雑システムから部分系を取り出して解析することへの数学的保証など、様々な理論的展開を行った。

実験生物学的成果

上述の数理理論を適用することで、三つの生命システムの動態解明に取り組んだ。

A. ホヤの細胞分化を司る遺伝子ネットワークの解明

(I) ホヤの初期発生で 7 種類の細胞状態の運命が決定される際に働く、92 の遺伝子と 382 の

制御を含む遺伝子制御ネットワークに対し、Linkage Logic を用いて解析したところ、5 つの因子の活性状態によりシステム全体が捉えられ制御できることが予測された。これを受けて 5 つの遺伝子について過剰発現とノックダウンの網羅的操作実験を行い、細胞分化マーカーの発現を計測した。その結果、多くの操作からそれぞれ一通りの細胞状態が作り出され、操作全体として筋肉を除いた 6 種類の組織の分化状態を再現できた。これにより **Linkage Logic の予測通り、一部の遺伝子の活性を操作することで細胞分化のシステムが制御でき、ほぼ全ての細胞運命を再現できる**ことを実証した。(Kobayashi *et al.*, 2018)

複雑なネットワークの動態の計測・操作は、生命をシステムとして理解していく上で基本的で必須の課題である。ネットワーク構造のみから導き出された少数の分子による動態の操作が、理論だけでなく実証されたことは、今後のこの分野の進展の重要な基礎となるだろう。

(II) 筋肉の細胞状態が実現できなかった理由についてさらに研究を進め、筋肉細胞の分化に関わることが知られている *Tbx6-r.b* と *Mrf* の間に制御関係のループが存在していることを新たに突き止めた。この結果を加えて Linkage Logic を使ってネットワークを解析したところ、(1) で述べた 5 つの因子に加えて *Tbx6-r.b* も同様の因子として同定され、**6 つの因子の操作で筋肉を含めた細胞の運命決定が制御できる**ことが理論的に予測された。

一年追加支援期間においては、6 つの因子の操作による細胞運命システムの制御を試みた。その結果、7 つ全ての組織の誘導に成功し、FVS によるホヤ遺伝子ネットワークの完全操作が可能であることを実証した。以上の実験は、分裂しない細胞での実験であったが、細胞間相互作用を考慮することで多細胞系に FVS 理論を拡張できる、という理論的な結果を踏まえて、より現実の動物胚の状態に近い多細胞環境での細胞運命システムの制御を試みた。多細胞環境でも同様に FVS 理論に基づく細胞運命システムの制御が可能であることを実証した。これらの結果をまとめて学術雑誌に投稿した。また、これまでの結果に基づき、ヒトの遺伝子制御ネットワークに基づき、初期分化過程を制御するプロジェクトを新たに開始した。

B. シグナル伝達系の動態多様性の解明

細胞外シグナルを細胞の応答へ伝える ErbB シグナル伝達系に対して、(I) システムの入力に相当する ErbB 受容体のリン酸化動態、(II) ErbB を含むシグナル伝達系全体、の二つの階層に分け、数理理論と高解像定量計測の組み合わせにより、動態の解明を行った。

(I) リガンド刺激後の 4 つの ErbB のリン酸化動態が、リガンドや培養細胞系に依存して、大きく異なることを明らかにし、この動態を説明する数理モデルと反応パラメータを決定した。理論に基づき ErbB 発現量を実験的に操作し、**発現量の違いがリン酸化応答の多様性を作り出していることを証明した**。また、理論解析から、ErbB の発現量の違いがリン酸化応答の多様性を生むには、反応定数の多様性が必要であることを明らかにした。

一年追加支援期間において、さらに数理解析とモデルの精緻化を進め、論文執筆を進めた。近日中に学術雑誌に投稿する予定である。

(II) ErbB シグナル伝達系に対して Linkage Logic 理論を適用したところ、113 種の分子種を含むシステム全体の振る舞いが、4 つのグループ 7 種の分子の動態に帰着されることが予測された。これを検証するために、リン酸化プロテオームを用いて、システム中の 17 種の分子 (35 種の制御) の活性を同時に捉えるシステムを確立した。様々な環境や刺激に対する細胞の応答を、17 種の分子の活性で計測し、それらの多様性が 7 種の分子の動態で捉えられるか検証を進めている。

一年追加支援期間においては、リン酸化プロテオームを用いて 17 種の分子の活性検出が可能であることを確認した。これに基づきシグナル伝達系動態の多様性の計測を開始した。

C. 中心代謝系の力学的理解と解明

中心代謝系の挙動を計測するために、プロテオミクス解析とメタボロミクス解析を高精度で実現する新しい方法を開発した。

(I) 従来の 100 万倍以上の圧倒的な効率と正確性をもったタンパク質の網羅的絶対定量技術 (iMPAQT) 法を開発し、ヒトの中心代謝系の精密定量マップを世界で初めて完成させた。従

来の代表的な 2 つの代謝物測定法の欠点を克服した、IC-MS 法を新規開発した。
(Matsumoto *et al.*, 2017)

(II) これらを用いて実際の中心代謝系を解析した。その結果、培養条件などのわずかな違いで酵素摂動に対する応答が大きく異なることが分かった。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:

生体内において化学反応が連鎖的につながって構成される反応ネットワークは、個々の反応を司る酵素の活性や量によって、全体の振る舞いが調整されると考えられている。酵素の活性や量が増減したときのシステムの定性的応答、すなわち酵素変動に対する各物質濃度や各反応速度の増加、減少、或いは変化なし、をネットワークの形だけから決定できる理論“Structural sensitivity”を構築した。様々な仮想的ネットワークに対して解析を行った結果、これまでに知られていなかった化学反応系の振る舞い、つまりネットワークの形と摂動を与える反応に依存して応答が大きく変化し、特徴的なパターンを示すことが分かった。(Mochizuki & Fiedler, 2015)

2.

概要:

酵素変動に対する化学反応系の応答パターンを支配する数理法則“限局則”を明らかにした。ネットワークの任意の部分構造が、次のトポロジカルな条件を満たしているとする： $(\text{分子種の数}) - (\text{反応の数}) + (\text{ループ構造の数}) = 0$ 。この時、この部分構造は“緩衝構造”となる。すなわち、構造内の反応に与えられた変動の影響は、内部のみにとどまり、外部の濃度や反応には全く影響を与えない。緩衝構造は様々な化学反応系に存在することから、適応や恒常性といった生命の振る舞いの多くが、限局則によって理解されると考えられる。(Okada & Mochizuki, 2016)

3.

概要:

動的システムの振る舞いが不連続に変化する際には、解の分岐が起こるとされている。その数理的重要性は良く認識されてきた一方で、複雑な反応ネットワークの分岐解析は大変困難な問題であった。これに対し我々は、ネットワークの構造情報だけから、化学反応システムの定常解の分岐解析が可能であることを明らかにした。具体的には、(1)反応ネットワーク全体が分岐を生じる条件を、部分構造の条件に分けて考えることができる、(2)各部分構造に対し、分岐を誘発する反応パラメータを、ネットワーク上で特定できる、(3)各部分構造に対し、分岐挙動を示す物質をネットワーク上で特定できる。この理論により、複雑な化学反応系の振る舞いの解明が急速に進むと期待される。(Okada *et al.*, 2018)

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要:

細胞の状態を人工的に変化させることは、発生生物学・再生生物学・再生医学など幅広い分野における重要課題となっている。実際に遺伝子操作や薬剤処理によって細胞の運命転換が行われてきたが、これまでは、研究者の経験や大規模スクリーニングを経て、運命転換に必要な因子が同定されてきた。課題 A において、細胞運命を決定する遺伝子ネットワークシステ

ムが、Linkage logicにより数理的に決定された少数の遺伝子により制御できることを、ホヤ胚を用いて実験的に実証した。この成果は、合理的基準に基づく細胞運命操作を実現した初めての研究成果であると同時に、遺伝子ネットワークを操作する一般的方法を示している。すなわち、ネットワーク構造を決定、Linkage Logicによって解析、同定された因子の活性操作、という方法により、種を問わずに運命操作が可能になると期待される(Kobayashi *et al.*, 2018)。

2.

概要:

生物学における遺伝子ネットワークの解析では、完全なネットワーク情報を得ることは極めて難しい。Linkage logicに基づく遺伝子ネットワークの操作により、期待する結果が完全に再現されない場合には、その時点のネットワーク情報に不足があることが示唆される。Linkage logic理論に基づき、未発見の制御の候補を予測し、実験的に検証することで、情報を更新し正しいネットワークに近づける、という方法が有効であることを実証した。

3.

概要:

シグナル伝達系のインプットにあたる ErbB のリン酸化の多様な振る舞いを、定量計測と数理モデルを組み合わせて解明した。特に、数理モデルの予測に従って、ErbB 発現量を操作することでリン酸化動態を制御できたことは、将来シグナル伝達系の振る舞いを人為的に操作できる技術へと結びつく可能性がある。

4.

概要:

酵素と代謝物の相互作用によって作り出される中心代謝系の挙動を計測するために、従来の100万倍以上の圧倒的な効率と正確性をもったタンパク質の網羅的絶対定量技術(iMPAQT)法を開発し、ヒトの中心代謝系の精密定量マップを世界で初めて完成させた。(Matsumoto *et al.*, 2017)

<代表的な論文>

Okada T. and Mochizuki A. (2016) Law of Localization in Chemical Reaction Networks. *Phys. Rev. Lett.* **117**, 048101.

Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, Goshima N, Mori M, Kawamura Y, Ogawa K, Fukuda E, Nakatsumi H, Natsume T, Fukui K, Horimoto K, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakayama KI. (2017) A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nature Methods* **14(3)**: 251-258.

Kobayashi K., Maeda K., Tokuoka M. Mochizuki A. and Satou Y. (2018) Controlling Cell Fate Specification System by Key Genes Determined from Network Structure. *iScience* **4**, 281-293.

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「望月」グループ

研究代表者: 望月 敦史 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授)

研究項目

- ・関数フリー理論の展開と実用化

② 「佐藤」グループ

主たる共同研究者: 佐藤 ゆたか (京都大学大学院理学研究科 准教授)

研究項目 (箇条書きの簡単なものでかまいません)

- ・ホヤの細胞分化を司る遺伝子ネットワークの解明

③ 「広島」グループ

主たる共同研究者: 広島 通夫 (理化学研究所 研究員)

研究項目 (箇条書きの簡単なものでかまいません)

- ・シグナル伝達系の動態多様性の解明

④ 「松本」グループ

主たる共同研究者: 松本 雅記 (九州大学生体防御医学研究所 准教授)

研究項目 (箇条書きの簡単なものでかまいません)

- ・中心代謝系の動態の解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

構造理論を用いた生命システムの解析を、研究チーム内に限らず国内の生物学者と共同研究で進めてきた。例えば東京大学大学院理学研究科の塚谷裕一教授、学芸大の Ali Ferjani 准教授らと、植物スクロス合成系を対象に、計測と数理解析を組み合わせた研究を行い、未知の反応の存在を予測した (Ferjani *et al.* 2018)。また、国立遺伝学研究所の小田祥久准教授と、植物導管細胞表面でみられる周期パターン形成について共同研究を行い、自己組織的周期パターンが形成されるための分子間相互作用構造の条件を決定した。予測された分子制御は実際に実験的に確認された (Nagashima *et al.* 2018)。これらの研究は、いずれも論文業績として 2018 年に発表された。

一年追加支援期間において、さらに共同研究のネットワークが広がった。大阪大学の今西周次教授との間で、化学合成系ホルモース反応に対する構造的解明を行っている。名古屋大学の東俊一教授とは、交通流ネットワークへの適用を目指して理論の拡張を進めている。

また構造理論の数学的展開の可能性について、国内外の数学者と議論を続けている。例えば、台湾国立精華大学数学科の蔡志強教授との共同研究により、化学反応系の分岐過程を反応ネットワークの構造だけから解析する構造分岐論を打ち立てることができた (Okada *et al.* 2018)。さらに東京大学大学院数理科学研究科の古田幹雄教授とは、この理論を非定常解に拡張するための議論を続けている。その他、京都大学大学院理学研究科数学教室の国府寛司教授と、時系列から大域解を再構成する共同研究を進めている。その他、米国 University of Wisconsin-Madison、数学科の Gheorghe Craciun 教授、Pennsylvania State University、物理学科の Reka Albert 教授らと、理論の発展に向けた議論を続けている。