

**「生命現象の革新モデルと展開」研究領域 領域活動・評価報告書**  
**－平成24年度終了研究課題－**

研究総括 重定 南奈子

1. 研究領域の概要

本研究領域は、多様な生命現象に潜むメカニズムの解明に資する斬新なモデルの構築を目指す研究であつて、治療、防疫、環境保全などに貢献できる予測力や発展性に富む研究を対象とする。

具体的には、環境へ適応しつつ合目的に機能していると見られる生命システムの、遺伝子発現、細胞の機能と動き、発生・形態生成、免疫、脳の高次機能、生物社会の形成、生態系などの制御機構や、老化や疫病などのメカニズムに対して統合的かつ数理科学的な理解を可能にするモデルの構築を通じて、課題解決への手がかりを与える革新的で基盤的な研究を対象とする。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：14 件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「生命現象の革新モデルと展開」領域に設けた選考委員 10 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さがしげ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryoku4.html>) の他、以下の点を重視した。
  - ① 査読選考にあたっては、独創的な数理モデルの提案であること、どのような数理モデルを用いて何をどこまでしようとしているかが明確に提案されているか。
  - ② 書類および面接選考にあたっては、ミクロからマクロまでの様々なレベルの生命現象に対する研究課題を可能な範囲でバランスよく選考し、同レベルの評価を得た提案については、若い人や女性のピックアップと、研究機関・地域のバランスに配慮する。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

| 選 考 | 書類選考  | 面接選考 | 採択数  |        |      |            |
|-----|-------|------|------|--------|------|------------|
|     |       |      | 14 件 | 内<br>訳 | 3 年型 | 14 件 (0 件) |
| 対象数 | 176 件 | 25 件 |      |        | 5 年型 | 0 件 (0 件)  |

( )内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1) 平成 21 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
  - ・沓掛 展之研究者  
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。
- 2) 平成 20 年度採択課題のうち、以下を今年度の事後評価対象とする。
  - ・野々村 真規子研究者  
ライフイベントによって研究を一時中断したため。

5. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

## 6. 領域の活動状況

領域会議： 領域開始以降 11 回

研究報告会： 領域開始以降 3 回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問：

研究開始時に、研究総括と技術参事、事務参事が研究現場を訪問し、研究状況の把握と研究環境、設備等の確認、並びに研究者の上司への協力依頼を行った。本人からは、研究内容、設備、施設の状況の説明を受け、研究総括からは研究の方向づけや進め方についてアドバイスした。

その後は、研究進捗状況のフォローアップ、研究実施場所移動時の研究環境確認、物品確認、特許出願や個別相談などで、技術参事、事務参事が適宜訪問し、各研究者の個別問題把握とそれに対する支援を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

|             |             |
|-------------|-------------|
| 平成 25 年 1 月 | 研究報告書提出     |
| 平成 25 年 2 月 | 研究報告会開催     |
| 平成 25 年 2 月 | 研究総括による事後評価 |
| 平成 25 年 2 月 | 被評価者への結果通知  |

## 8. 事後評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献
- (3) 研究計画提案書の目標に対する研究課題の達成度

## 9. 事後評価

平成 21 年度に採択した第 3 期生 13 名(ライフイベントによる研究期間延長者 1 名を除く)、および平成 20 年度に採択したがライフイベントで研究期間を延長した研究者 1 名(野々村真規子)の計 14 名が今年度で研究を修了した。14 名の研究分野は、遺伝子発現や細胞の機能と働きに関する研究が 5 名、発生・形態形成や脳の高次機能を対象とする研究が 4 名、生物社会・生態・進化などの研究が 5 名であった。このように研究対象はミクロからマクロまで多岐にわたっているが、数理モデルという共通のツールを使用することで相互の理解が生まれ、領域会議をきっかけとして分野横断型の研究者交流が積極的に行われた。

平成 25 年 2 月に実施した今年度修了者の研究報告会には、領域の関係者以外に外部から 80 名を超える参加者があった。当日行われたアンケート調査では、“研究のレベルが高い”、“良い成果を上げている”、“女性研究者のライフイベント制度が良い”、“若手研究者にエールを送りたい”等の感想が寄せられ、革新的な数理モデル構築を軸にして広い範囲の若手研究者からなる研究領域にしたいとの当初の狙いが、外部の方にもある程度理解して頂けたと受けとめている。

本研究の開始当初は、分野もバックグラウンドも様々に違う 14 名の研究者の間で、当然のことながら科学的な成熟度に温度差がみられたが、それぞれが自ら掲げた高い研究目標に向かって切磋琢磨した3年半の努力とアドバイザーの先生方の熱心なご指導が相まって、修了時には全員がそれぞれに大きな飛躍を遂げたことは、研究総括として特に喜ばしいことであった。

以下に、分野ごとに各研究者が行った研究結果を要約する。なお、評価については各研究者ごとの研究報告中の「研究総括の見解」で付記する。

### <遺伝子発現・細胞機能>

#### ○青木一洋研究者「細胞内シグナル伝達の定量的数理モデリング」

FRET イメージングによる実験観察と数理モデルの両面から、細胞の癌化に深く関与する細胞内シグナル伝達系の研究を進め、特に ERK リン酸化の反応機構において、実験で取得したパラメータと分子混み合い効果を組み込んだ新規な反応速度論モデルを構築した。

#### ○小林徹也研究者「情報処理の最適性からとらえる分子・細胞・発生現象」

逐次ベイズ推定理論や階層的推定理論を用いて、不確定性・確率性が存在する環境下にある生体の情報処



理機構に関する理論を構築した。一例として、最も基本的な細胞のシグナル伝達系では最適情報復元が自己触媒的な修飾反応サイクルにより生化学的に実現されている事を示した。

○竹本和広研究者「環境適応から解き明かす代謝ネットワークの設計原理」

代謝物の種間分布構造の特徴的なパターンに注目して代謝ネットワークの形成機構を記述する簡潔なモデルを構築した。次いでアーキアでは既存の「環境変動性仮説」が適用できないことを発見し、上記のモデルを拡張した進化モデルを用いて説明することに成功した。

○宮下脩平研究者「数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解と応用」

植物ウイルスは、あえて少ない数で細胞に感染することで適応的なゲノム選択を可能にしているという仮説の下に感染実験を行い、数理モデルを用いてその妥当性を実証した。さらに、感染ゲノム数の操作を植物ウイルスの防除や有用物質産生に応用する可能性を示唆した。

○若本祐一研究者「バクテリアのパーシスタンス現象と原始的な表現型適応」

微生物のクローン集団を1細胞レベルで連続観察できるマイクロ流体デバイスを開発して、マイコバクテリアのパーシスタンス現象を解析し、従来のドーマント仮説の代わりに抗生物質活性化酵素の発現揺らぎが原因であることを、実験と数理モデルの両面からつきとめた。

<発生・形態形成・脳の高次機能>

○野々村真規子研究者「化学反応から細胞集団までをつなげる数理モデルの構築と応用」

細胞集団の振舞いを体系的に扱うことができる新規なモデルをフェーズフィールドモデルを基盤にして構築した。これにより、細胞の再配置、形態変化、セルソーティング、細胞接着、細胞分裂、走化性などの現象が自発的に再現できることを示した。

○岩見真吾研究者「AIDSワクチン開発への理論的介入-SHIV感染実験と数理モデル-」

AIDS ワクチン開発への理論的介入を視野に、まず、SHIV のアカゲザル培養細胞への感染実験を行い、ウイルス感染ダイナミクスを定量的に再現できる数理モデルを構築した。また、アカゲザル生体内での感染実験からSHIV 株の高病原性と低病原性を区別する指標を得た。

○岸本直子研究者「有殻原生生物骨格の力学特性解明とモジュラー構造物への展開」

水中で浮力によって重力から解放される有殻原生生物の構造研究において、従来の2次元手法によるのではなく、新たに3次元画像による手法を開発して構造情報取得と力学解析を行い、有殻原生生物の構造が応力集中のない合理的なモジュール構造になっていることを理論的につきとめた。

○福田弘和研究者「体内時計に見る植物システムの創発原理」

植物の体内時計による自己組織化現象に着目した研究を進め、シロイヌナズナの根の先端における時計遺伝子の発現解析から特異的な脱同期現象を見出してそれを再現する数理モデルを構築した。さらに、環境摂動による体内時計の制御法を開発して大阪府大の植物工場に応用した。

<生物社会・生態・進化>

○印南秀樹研究者「遺伝子重複による生命システム複雑化の進化モデル」

生命システムの進化における遺伝子重複の役割に注目して、マイクロRNAが主導する遺伝子発現制御システムやゲノム上に並ぶ遺伝子と転写因子からなる共発現システムの進化モデルを構築し、それぞれアラビドプシスとパン酵母ゲノムで見られる特徴的なパターンを再現することに成功した。

○西浦博研究者「歴史統計を活用した非特異的感染症対策の予防効果推定」

検疫、隔離、疫学的調査のような非特異的感染症対策の定量的効果を推定するという課題に取組み、歴史統計資料を利用して効果推定の分析手法を開発した。また、期間中に発生した新型インフルエンザに対してリアルタイムの分析を行い政策判断への貢献も行った。

○向草世香研究者「サンゴメタ集団の存続可能性と環境変動への応答予測」

サンゴの生活史を組み入れた個体ベースモデルを作成してサンゴ幼生の分散ネットワークの違いによるメタ個体群の存続可能性を推定した。また、珊瑚礁回復に向けた最適な移植方法の提案や、台風、白化、海洋酸性化による環境攪乱がサンゴ群集に与える効果の評価などを行った。

○吉田丈人研究者「生態と適応のフィードバック関係における新たな展開」

捕食者-被食者系において被食者の防衛形質のばらつきを遺伝的多様性で表したモデルと、可塑性で表したモデルを構築して、それぞれの個体群動態の特徴を明らかにした。また、両モデルを組み込んだ系では、間欠性のある個体数振動や進化動態が出現することを見出した。

○若野友一郎研究者「生物進化の2大理論の統一的理解」

包括適応度理論 (IFT) と Adaptive Dynamics 理論 (ADT) の長所を組み合わせた統一的理解を念頭におき、IFT

の数学的記述をより明快にすることや、ADT の進化的分岐に集団サイズや突然変異が与える影響を導出することに成功し、両理論を任意の空間構造を持つ集団に適用できるレベルに到達させた。

## 10. 評価者

研究総括 重定 南奈子 奈良女子大学 名誉教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 24 年 3 月末現在)

|       |                              |
|-------|------------------------------|
| 合原 一幸 | 東京大学 生産技術研究所 教授              |
| 有田 正規 | 東京大学大学院 理学系研究科 准教授           |
| 巖佐 庸  | 九州大学大学院 理学院 教授               |
| 岡田 清孝 | 自然科学研究機構 基礎生物学研究所 所長         |
| 岸野 洋久 | 東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授         |
| 郷 信広  | 京都大学 名誉教授                    |
| 嶋田 正和 | 東京大学大学院 総合文化研究科 教授           |
| 本多 久夫 | 兵庫大学 健康科学部 教授                |
| 三村 昌泰 | 明治大学大学院 先端数理科学研究科 教授・MIMS 所長 |
| 山口 陽子 | 理化学研究所 脳科学総合研究センター チームリーダー   |

(参考)

件数はいずれも、平成25年3月末現在。

### (1) 外部発表件数

|     | 国 内 | 国 際 | 計   |
|-----|-----|-----|-----|
| 論 文 | 8   | 138 | 146 |
| 口 頭 | 132 | 64  | 196 |
| その他 | 21  | 4   | 25  |
| 合 計 | 161 | 206 | 367 |

### (2) 特許出願件数

| 国 内 | 国 際 | 計 |
|-----|-----|---|
| 3   | 2   | 5 |

### (3) 受賞等

- ・岩見 真吾
  - 日本数理生物学会 奨励賞(H22.9)
  - 日本応用数理学会 論文賞(H22.9)
- ・沓掛 展之(H21 採択者:今年度の事後評価対象外)
  - 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H22.4)
- ・竹本 和広
  - The 8th Asia Pacific Bioinformatics Conference Best Poster Award(H22.1)
- ・西浦 博
  - 第 21 回武見奨励賞(H23.12)
- ・福田 弘和
  - 日本生物環境工学会 論文賞(H23.9)
  - 計測自動制御学会 優秀講演賞(H23.12)

### (4) 招待講演

国際 18 件  
国内 34 件

## 「生命現象の革新モデルと展開」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

| 研究者氏名<br>(参加形態) | 研究課題名<br>(研究実施場所)                                    | 現職(平成25年3月末現在)<br>(応募時所属)                             | 研究費<br>(百万円) |
|-----------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------|
| 野々村 真規子<br>(兼任) | 化学反応から細胞集団までをつなげる数理モデルの構築と応用<br>(日本大学 生産工学部)         | 日本大学 生産工学部 助教<br>(広島大学大学院<br>理学研究科 助教)                | 28           |
| 青木 一洋<br>(兼任)   | 細胞内シグナル伝達の定量的数理モデリング<br>(京都大学大学院生命科学研究科)             | 京都大学大学院<br>生命科学研究科 講師<br>(同上 助教)                      | 39           |
| 岩見 真吾<br>(兼任)   | AIDSワクチン開発への理論的介入-SHIV感染実験と数理モデル-<br>(九州大学大学院 理学研究院) | 九州大学大学院<br>理学研究院 准教授<br>(東京大学<br>日本学術振興会特別研究員)        | 41           |
| 印南 秀樹<br>(兼任)   | 遺伝子重複による生命システム複雑化の進化モデル<br>(総合研究大学院大学<br>先導科学研究科)    | 総合研究大学院大学<br>先導科学研究科 准教授<br>(同上)                      | 39           |
| 岸本 直子<br>(兼任)   | 有殻原生生物骨格の力学特性解明とモジュラー構造物への展開<br>(摂南大学 理工学部)          | 摂南大学 理工学部 講師<br>(宇宙航空研究開発機構<br>招聘開発員)                 | 36           |
| 小林 徹也<br>(兼任)   | 情報処理の最適性からとらえる分子・細胞・発生現象<br>(東京大学 生産技術研究所)           | 東京大学 生産技術研究所<br>准教授<br>(同上 講師)                        | 30           |
| 竹本 和広<br>(兼任)   | 環境適応から解き明かす代謝ネットワークの設計原理<br>(九州工業大学大学院<br>情報工学研究科)   | 九州工業大学大学院<br>情報工学研究科 助教<br>(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 特任研究員) | 18           |
| 西浦 博<br>(兼任)    | 歴史統計を活用した非特異的感染症対策の予防効果推定<br>(香港大学 李嘉誠医学院)           | 香港大学 李嘉誠医学院 助理教授<br>(ユトレヒト大学 獣医学部<br>博士研究員)           | 27           |
| 福田 弘和<br>(兼任)   | 体内時計に見る植物システムの創発原理<br>(大阪府立大学大学院<br>工学研究科)           | 大阪府立大学大学院<br>工学研究科 助教<br>(同上 生命環境科学研究科 助教)            | 40           |
| 宮下 脩平<br>(専任)   | 数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解と応用<br>(農業生物資源研究所)              | 科学技術振興機構 さきがけ研究者<br>(東京大学大学院<br>日本学術振興会特別研究員)         | 29           |

|                |                                                           |                                                              |    |
|----------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----|
| 向 草世香<br>(専任)  | サンゴメタ集団の存続可能性と環境<br>変動への応答予測<br><br>(長崎大学大学院 水産学部)        | 科学技術振興機構 さきがけ研究者<br><br>(九州大学大学院<br>日本学術振興会特別研究員)            | 29 |
| 吉田 丈人<br>(兼任)  | 生態と適応のフィードバック関係にお<br>ける新たな展開<br><br>(東京大学大学院<br>総合文化研究科)  | 東京大学大学院<br>総合文化研究科 准教授<br><br>(同上)                           | 39 |
| 若野 友一郎<br>(兼任) | 生物進化の2大理論の統一的理解<br><br>(明治大学大学院<br>先端数理科学研究科)             | 明治大学大学院<br>先端数理科学研究科 准教授<br><br>(同上 先端数理科学<br>インスティテュート 准教授) | 21 |
| 若本 祐一<br>(兼任)  | バクテリアのパーシスタンス現象と原<br>始的な表現型適応<br><br>(東京大学大学院<br>総合文化研究科) | 東京大学大学院<br>総合文化研究科 准教授<br><br>(同上)                           | 45 |

## 研究報告書

### 「化学反応から細胞集団までをつなげる数理モデルの構築と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 20 年 10 月～平成 24 年 9 月

研究者: 野々村 真規子

#### 1. 研究のねらい

近年の計測・分析技術の進歩とともに、細胞内の一分子測定から細胞位置の統計量など様々な階層での実験データが蓄積され、それらを説明するための理論的研究も盛んに行われている。本研究では、階層の枠を超えて現象をとらえるための数理的手法の開発を目指して、細胞内外の化学反応から細胞集団までをつなげる細胞集団の数理モデルを構築する。さらに、このモデルを用いて数値計算を行うことで、細胞の集団的挙動を明らかにしていく。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では、細胞集団を体系的に研究するための数理的手法の開発を目指して、細胞の変形と細胞内外の化学反応を同時に扱うことができる細胞集団のフェーズフィールドモデルを構築した。フェーズフィールドモデルのアイデアをもとにしたのは、化学反応を表す反応拡散方程式と相性もよく、個々の細胞の性質や細胞膜の位置も容易に表すことができると考えたためである。フェーズフィールドモデルは、元来、結晶成長のモデルとして考案され、合金やマルテンサイト変態や強磁性体などの研究に用いられてきたが、細胞等の柔らかい物質の記述に用いられることはあまりなく、細胞集団への応用というのは他に例をみない。考案した細胞集団の数理モデルでは、細胞接着、細胞分裂、細胞死、細胞成長、細胞分化、細胞運動等の形態形成で必要となる事象を表現することができている。細胞間相互作用を表す項の形式を工夫することで、計算メモリの増加という実装上の問題を解決し、多数の細胞での数値計算も可能としている。このモデルを用いて、細胞の変形や再配置、走化性、セルソーティングなどの空間2次元及び空間3次元の数値計算を行っている。

##### (2) 詳細

###### (1) 細胞集団を表す数理モデルの提案

「フェーズフィールドと呼ばれる変数の値により物質の内と外を表す」というフェーズフィールドモデルのアイデアに基づいて、多種類の細胞からなる細胞集団を表す数理モデルを考案した。つまり、フェーズフィールドを細胞数  $M$  だけ用意し、それらの時間発展を表す偏微分方程式を連立させることにより細胞集団を表現することを考えた。

図1にフェーズフィールド $u_i$ で表現された1個の細胞の形状を示す。 $u_i$ がある値より大きい領域を細胞内、それ以外を細胞外とみなす。それらの領域の境界が有限の厚みをもつため、細胞の形と同時に、細胞膜の位置も表現することができるという特徴をもつ。

細胞一つ一つの時間発展を偏微分方程式でそれぞれ与えるということは、細胞膜の位置、細胞の変形、細胞の種類、細胞接着力、細胞時計などの細胞の個性を容易に表すことができるという利点と、計算メモリの制約から細胞数をあまり増やすことができないという欠点の両方を持つことを意味する。そこで、この欠点を解決するために、個々の細胞形状を表す変数( $u_1, u_2, \dots, u_M$ )とは別に、同じ種類の細胞で占められる領域を示す変数( $\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_L$ )の導入を行った(図2)。この変数の導入により、他の細胞の情報を使わず細胞間相互作用の計算が可能となり、計算メモリの節約はもちろん、並列計算にも適したモデルとすることができた。

変数 $\phi_i (i=1, \dots, L)$ を導入して表現した細胞間相互作用は、細胞の排除体積効果と細胞間接着の二つである。細胞間接着と同様の方法で、細胞の基板への付着も表した。また、化学物質の濃度勾配に依存して動く細胞の走化性や、細胞のランダム運動なども表現するために、時間発展方程式に新しく項を加えることも試している。数理モデルと以下に示す数値計算結果はPLos ONE[1]に掲載されている。

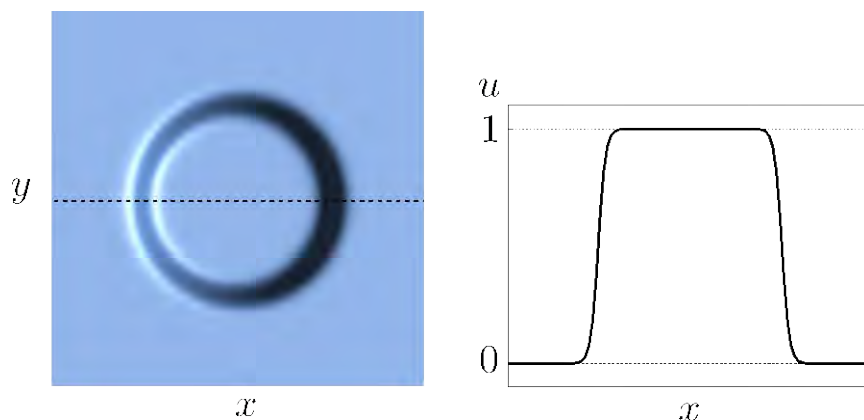


図1 フェーズフィールドモデルによる1個細胞の計算結果。左のパネルは真上から見たフェーズフィールド $u_i$ の鳥瞰図、右のパネルは左のパネルの点線でのフェーズフィールド $u_i$ のプロファイル。

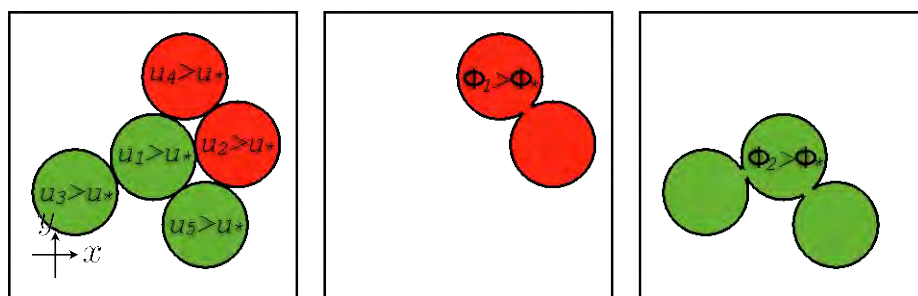


図2 フェーズフィールド $u_m(m=1,\dots,5)$ と変数 $\phi(l=1,2)$ のイメージ図。  
ただし、 $u_*$ と $\phi_*$ は0から1の間の定数。赤と緑は細胞の種類を示す。

## (2)細胞間接着や細胞の基板への付着に関する数値計算

細胞間接着と基板への細胞付着の効果に関して数値計算を行った結果を、図3と図4に示す。

図3は、同種の2個細胞の数値計算結果である。一番左のパネルは接着なし、右のパネルほど接着を強くした結果を示す。図3の上段は $u_m(m=1,2)$ の等高線(細胞内はオレンジで塗りつぶした)、図3の下段は上段の図の点線における $u_m(m=1,2)$ のプロファイルを表す。

図4は、2種類の細胞からなる8個の細胞の集団を考え、付着している壁の移動に伴って再配置する数値計算結果である。細胞集団が付着している壁の占める領域を灰色で示す。各細胞の形を変数 $u_m(m=1,\dots,8)$ の等高線で表し、細胞種類によってその内部を赤と緑に塗り分けた。図4の上段は同種間の接着が異種間の接着より弱く、図4の下段は同種間の接着が異種間の接着より強いとして計算した結果である。細胞の初期配置が同じでも、時間がたつにつれて、接着力の違いによる配置の違いが顕著になっていくことがわかる。

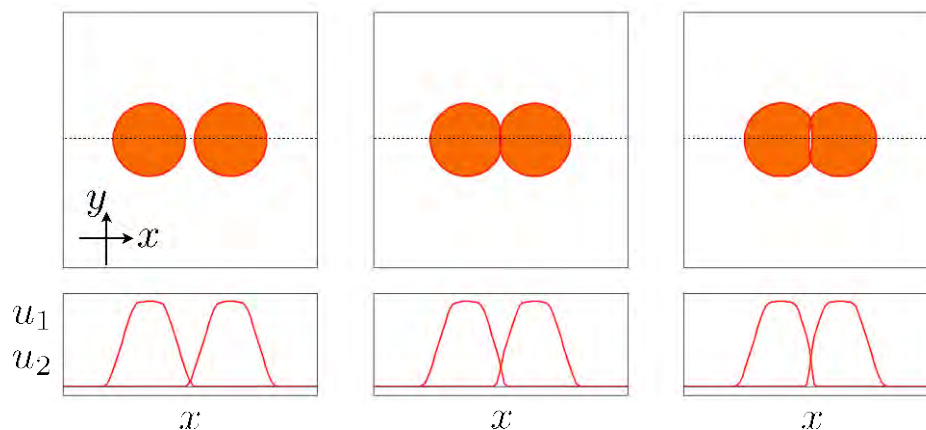


図3 細胞接着の空間2次元の数値計算。

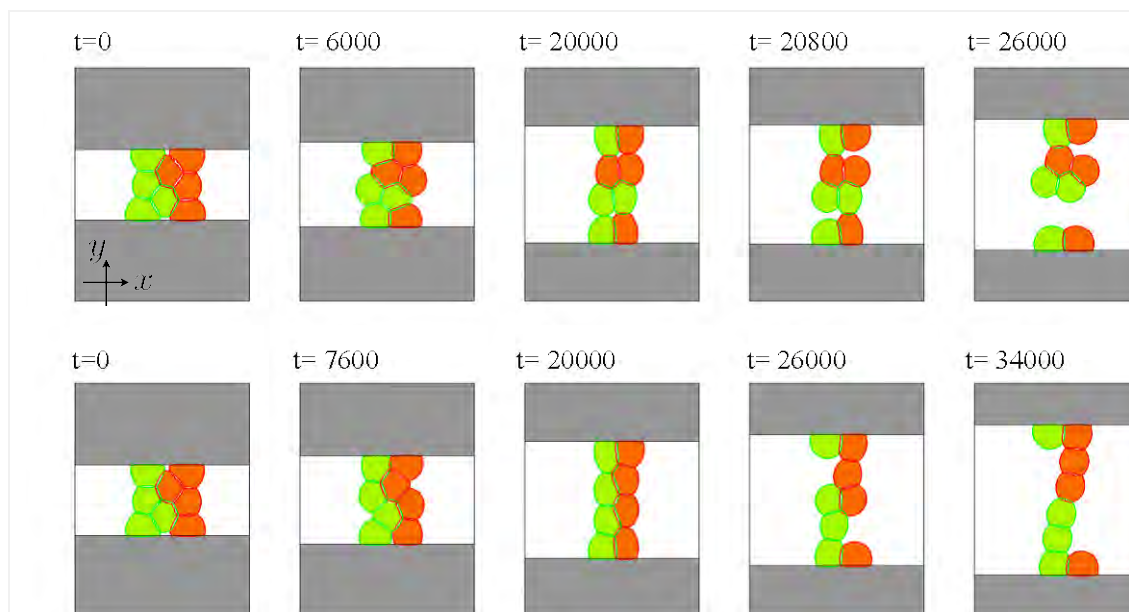


図4 細胞接着と壁への付着を考慮した空間2次元の数値計算。

### (3)細胞運動に関する数値計算

細胞運動として、濃度場という外部の情報を使って細胞が動く走化性と、個々の細胞がランダムに動く運動の二つを考えた。それらの運動を表現する項をそれぞれモデルに組み込んで、数値計算を行った結果を、図5と図6を示す。

図5は細胞の走化性を取り入れたモデルの数値計算結果である。化学物質の濃度が左から右に向かって高くなるように勾配をつけている。空間2次元に配置された2種類の細胞のうち、黒で示されている細胞のみがこの化学物質に対する走化性を持っている場合、黒い細胞が灰色の細胞を押しながら、化学物質の濃度が高い右へと向かって動いていく。

図6は、個々の細胞がランダムに動き回る効果を入れた結果である。同種間の細胞のみが接着するとした。細胞が動き回りながら、時間とともに同じ種類の細胞が集まってくるという結果が得られた。

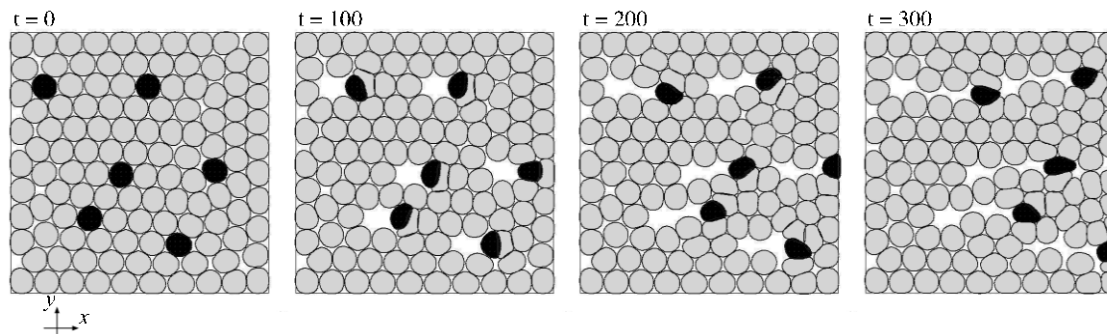


図5 走化性の数値計算結果。走化性を持つ細胞を黒で、それ以外を灰色で示す。

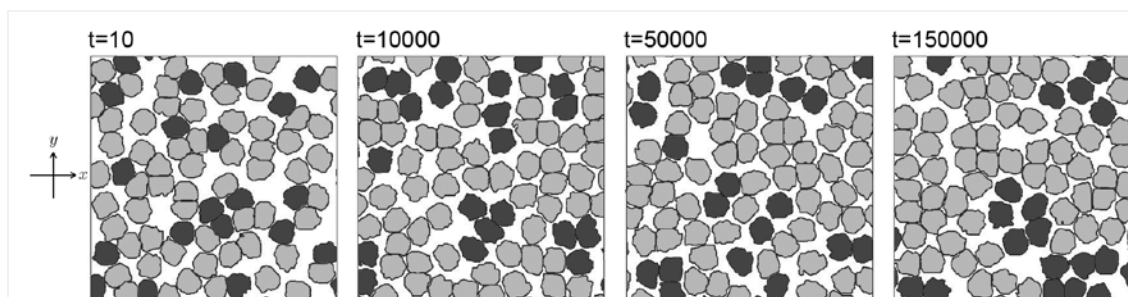


図6 セルソーティングの数値計算結果。細胞がランダムに動き回る効果をいれた。灰色と黒色で示した2種類の細胞を考えた。

### 3. 今後の展開

現在、北海道大学の秋山氏、九州大学の手老氏、広島大学の小林氏と共同で、細胞分裂面の決定法について、モデルの改良を試みている。また、千葉大学の菅原氏の協力の下、実際の細胞の集団的振る舞いについての実験も行っている。これらの研究を通して、基板や流体という外場の影響、細胞分裂、細胞移動等を組み込む手法をさらに確固たるものとし、細胞の集団的挙動を数理的に明らかにしていきたいと考えている。

### 4. 自己評価

本研究での主たる成果は、細胞接着、細胞分裂、細胞死、細胞成長、細胞分化、細胞運動など、細胞集団を扱う上で必要な事象を表現できる数理モデルを構築したことである。これは、本研究のねらいの前半部分にあたる。今後は、実験も力をいれて行い、モデルに含まれる係数の意味付け、実験との比較、実際の系への応用へと研究を発展させていきたいと考えている。

### 5. 研究総括の見解

本研究では、細胞集団において、細胞間相互作用による細胞の再配置、形態変化、セルソーティング、細胞接着、細胞分裂、走化性などを同時に組み込んで体系的に扱うことができる新規な数理モデルをフェーズフィールドモデルを基盤にして構築することを目指した。モデルの骨子として、まず、各細胞の形と位置を表す偏微分方程式を連立させて多細胞系を表現する。各細胞は、基本的に体積を一定に保ちつつ表面積を減らす方向で変化し、また、細胞間では、系のフリーエネルギーが減少する方向に排除体積効果や細胞間接着、走化性運動などが進行するよう反応項の設定が行われている。これにより、形態形成の基本となる様々な細胞配置パターンの自発的再現に成功したことは高く評価される。また、シミュレーション時間を大幅に節約できるアルゴリズムを提案したことも優れている。今後は、モデルに含まれるパラメータを実際の系と対応させながら、さらにモデルの汎用性・普遍性に磨きをかけてほしい。

### 6. 主な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

1. 1. Makiko Nonomura, " Study on Multicellular Systems Using a Phase Field Model ", PLoS

ONE, 7, e33501, (2012)

(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)

“フェーズフィールドによる細胞接着のモデリング

Phase field modelling of cell adhesion”

野々村真規子

日本数理生物学会 東京2009年9月10日

“フェーズフィールドによる多細胞モデル

Phase field approach to multicellular systems”

野々村真規子

第 21 回計算力学講演会 沖縄 2008 年 11 月 3 日

# 研 究 報 告 書

## 「細胞内シグナル伝達の定量的数理モデリング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 青木 一洋

### 1. 研究のねらい

我々のからだを構成する細胞は、成長因子やホルモンといった様々な入力刺激を受容体で感知し、細胞内へと入力する。その入力刺激は「細胞内シグナル伝達系」と呼ばれる分子反応のネットワークにより処理され、最終的には表現型として出力される。生化学や分子生物学の発展に伴って、細胞内シグナル伝達の研究は急速に進展した。しかしながら、これまでの膨大な研究結果の大半は新規の情報伝達分子・系の同定であり、システムとしての細胞内シグナル伝達の統合的な理解にはほど遠いと言わざるを得ない。一方、細胞内シグナル伝達は、極論すると、生体物質の物理化学的な法則に従った拡散や化学反応の連鎖である。従って、要素間の反応や拡散等のパラメーターを指定することで、細胞内シグナル伝達をコンピュータ上でシミュレートすることができる。本研究では、細胞内シグナル伝達をイメージングにより可視化、定量化し、細胞内シグナル伝達が持つネットワークの時間的、空間的なシステム特性とその機能的、生物学的な意義を数理モデル構築を通して明らかにすることを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究課題では、細胞癌化に深く関与するシグナル伝達ネットワークの反応素過程をバイオイメージングにより可視化し、定量的な時空間パラメーター測定、数値解析を行うことで、入力と出力の時間的・空間的システム構造の関係を、数理モデルとして記述することを目指す。具体的な研究項目として、以下の3つの階層立てたテーマを中心に研究を進めていく。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A「細胞内反応素過程の数理モデル」

EGF シグナル伝達ネットワークの主要な出力である ERK MAP キナーゼは細胞増殖に関与する。先行研究から、MAP キナーゼは分配的(Distributive)リン酸化モデルに従ってリン酸化されることでスイッチ様(switch-like)応答を示すということが報告されてきた。しかしながら、予備研究から、哺乳類細胞の EGF-ERK MAP キナーゼシグナル伝達カスケードは、入力刺激に対し段階的(graded)応答を示すことが分かったが、その分子機構が不明である。本研究テーマでは、ERK リン酸化に関連する定量的なシグナル伝達モデルを構築し、この分子機構の解明を目的とした。

まず、ERK リン酸化反応に関連する 30 以上の反応パラメーターを全て実験により取得した。さらにこれらの反応パラメーターを用いてシグナル伝達モデルを作成し、数値シミュレーションしたみたところ、ERK 分子はこれまで言われてきた分配的 (Distributive) リン酸化モデルではなく、一連 (Processive) リン酸化モデルに従ってリン酸化されることが明らかになった。さらに、細胞内の微小環境である分子混み合い (molecular crowding) がこの一連リン酸化モデルにとって十分であることを見出した (図1) (Aoki et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011 に掲載)。

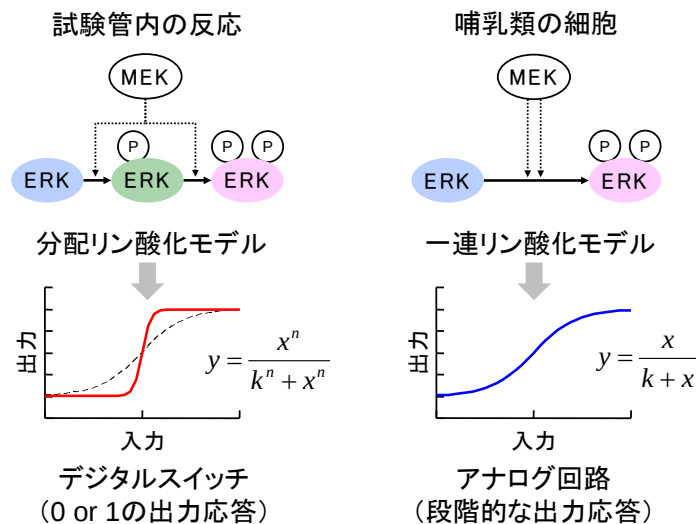


図1 ERK リン酸化モデルと入出力応答の関係性

そこで、分子混み合いを考慮することで創発される準一連 (quasi-processive) 反応に焦点を当てて研究を進めた。まず、in vitro の ERK リン酸化反応に異なる濃度のポリエチレングリコール (PEG-6000) を加えて、分子混み合い環境を段階的に変化させ、ERK の二重リン酸化反応の反応速度と Processivity に与える影響を定量化した。その結果、反応速度に関しては、PEG の濃度が 6% までは上昇するのに対し、PEG が 6% 以上になると反応速度が遅くなる、二相性の応答を示した。また Processivity に関しては、PEG の濃度が 8% 近くまではほとんど上昇しないが、それを超えると急激に上昇することが分かった。

次に、これらの実験結果を再現する反応速度論モデルを構築することを試みた。反応速度の二相性の応答は、これまでに分子混み合い分子の排除体積効果に起因する活量の上昇と粘性の上昇で説明されていたが、定式化はされていなかった。そこでこれらの二因子を含む形で数理モデルを構築した。さらに、Processivity に関しては、一つリン酸化された ERK 分子がもう一つリン酸化されるまでに到達する確率分布を積分することで計算し、分子混み合いによる拡散速度の減少によって Processivity が急激に上昇することが分かった。これら二つの数理モデルは実験結果を非常に合理的に説明することが分かった。これらの数理モデルは、これまでほとんど省みられてこなかった細胞内の分子混み合い環境によって、シグナル伝達の応答性が変化することを示していた。

## 研究テーマ B「細胞増殖の数理モデル構築」

ERK MAP キナーゼ系が制御する細胞の機能としては細胞増殖（細胞分裂、細胞周期の進行）が知られており、阻害薬や優勢劣性変異体の解析から、ERK が細胞増殖に必要であることが分かっている。しかしながら、ERK 分子が細胞周期のどの時期に、どれくらい活性化して、細胞増殖を促進しているかという定量的な関係を数理モデルとして表現することを目的として研究した。

まず、ERK 活性を生きた細胞で長期間観察するために、高感度 ERK FRET バイオセンサーとその FRET バイオセンサーを安定的に発現させるための手法を開発した（Komatsu et al., Molecular Biology of the Cell, 2011 に掲載）。次に、この手法を用いて、上皮細胞の細胞増殖条件下での ERK 活性を長期間にわたり可視化したところ、予期せず ERK 活性が細胞ごとに確率的に振動していることが観察された（図2）。また、この ERK 活性の確率的な振動は細胞増殖速度と相関していることを見出した。

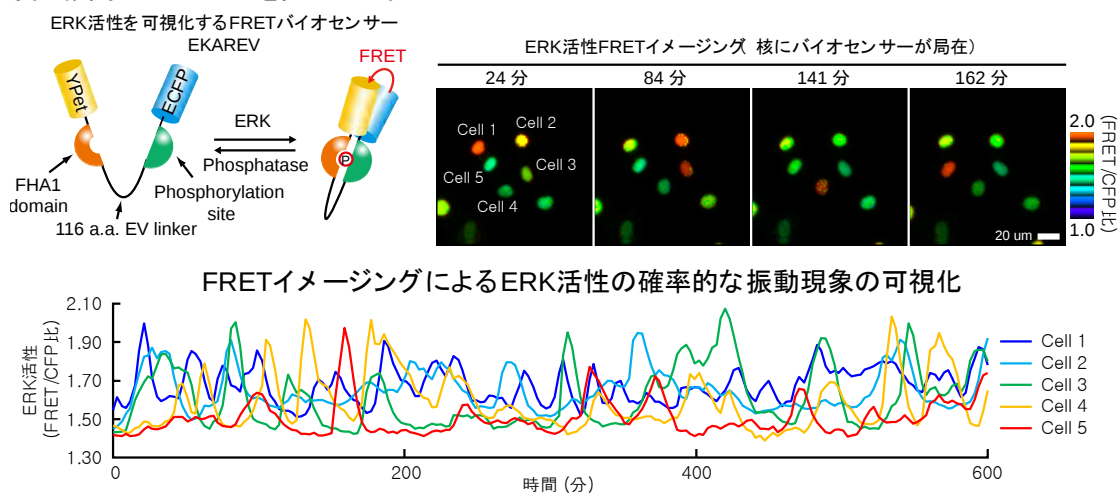


図2 ERK 活性の可視化と定量化

次に、これらの現象を説明する数理モデルの構築に取り組んだ。まず、ERK 活性の確率的な振動を再現するために、Raf、ERK の二分子の興奮系の数理モデルを作った。反応パラメータは実験から直接、もしくは実験結果から推定して求めた。さらに、細胞間の影響を考慮した結合振動子モデルを採用し、実験結果を再現するような数理モデルを探索した。その結果、確率的なパルスの発生頻度、すなわちノイズの強さが細胞密度に応じて増加していることが推測された。この予測は、イメージング結果を画像処理し、ノイズ依存性のパルスとそうでないものを分離し定量することで検証することができた。

これらの結果は、これまで生化学的な手法では見つけることができなかった ERK 活性の多細胞動態がその表現型に少なからず影響を及ぼしていることを示しており、イメージングと数理モデルの強みを存分に活かした結果である。

## 研究テーマ C「細胞遊走の数理モデル構築」

細胞の運動は、胚発生や創傷治癒、癌細胞の浸潤などに見られる重要な細胞機能の1つである。細胞運動は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質によってアクチン細胞骨格が時間的

に、かつ空間的に適切に制御されて引き起こされると考えられている。しかし、Rho ファミリーG タンパク質が細胞内でいつ、どこで、どのようにして活性化されるのかについては未だ議論の余地が残っている。そこで本研究では、Rho ファミリーG タンパク質を細胞の形の変化を定量的に関連付ける数理モデルを提案することを目的として研究を行った。

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の一種である Rac1 分子の細胞内活性を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理に基づくバイオセンサーにより可視化し、さらに画像処理、統計処理を施し、Rac1 分子活性と細胞形態の時間的・空間的な自己相互相関、及び相互相関関係を定量化した。その結果、外部刺激がない状態にもかかわらず、細胞は自発的に秩序だった形態変化をしていることを見出した(図3)。さらにさまざまな阻害薬を添加したときの Rho ファミリーG タンパク質の活性の摂動結果を得ることができた。この解析から、(a)アクチン細胞骨格から Rac1 へのポジティブフィードバック経路が存在すること、(b)PI3K 活性を阻害すると、Rac1 活性が一過的に減少し、basalレベルに落ち着くadaptation現象が起こること、(c)実験結果を再現する反応モデルとして負のフィードバックの存在が示唆されたこと、さらに(d)ミオシン軽鎖キナーゼが adaptation 現象の負のフィードバックの node であることを見出した(Kunida et al., Journal of Cell Science, 2012 に掲載)。

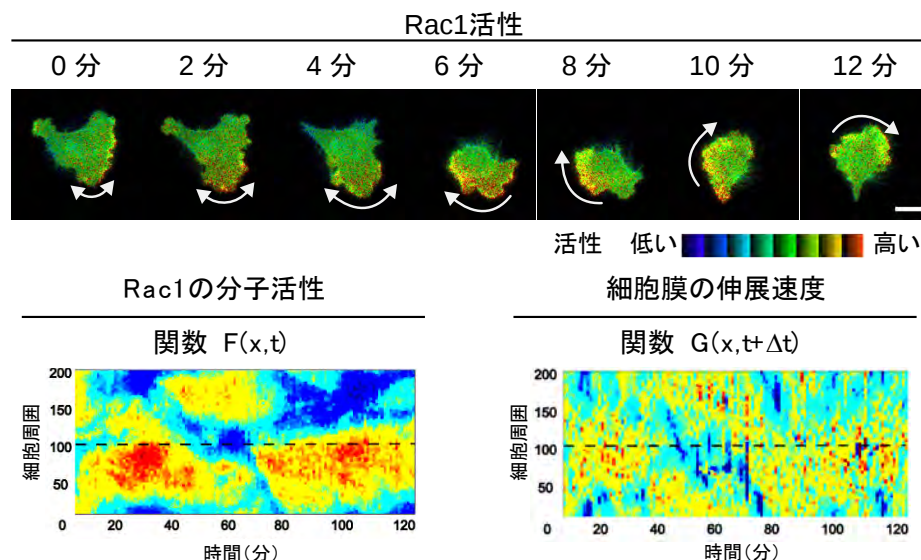


図3 Rac1 活性と細胞膜進展速度の可視化と定量化

### 3. 今後の展開

このさきがけ研究で、実験データから定量的なデータを取得し、それらを使って数理モデルを構築していく、という手法を確立、実践することができたと考えている。今後は、この手法を使って、より詳細でより予測可能ながん細胞モデルを作りたい。そして将来的には、がんの征圧に向けて少しでも貢献できるような定量的な数理モデルを構築したいと考えている。

具体的には、①(テーマ A に関連して)Ras-ERK シグナル伝達経路以外にも、PI3K-Akt 経路などがんに関連するシグナル伝達経路の定量的なシミュレーションモデルを構築すること、②(テーマ B に関連して)シグナル伝達経路と表現型(細胞増殖だけでなく、アポトーシスや癌化など)の数理モデル化をより進めること、③(テーマ C に関連して)より生体に近い三次元培養下やマウスを用いた生体イメージングにより、シグナル伝達と三次元環境下での細胞運動の相関解

析などを進めていきたい。

#### 4. 自己評価

研究面に関しては、3つの研究テーマともに満足のいく結果を得ることができた。研究テーマ A に関しては、システム生物学の教科書にも載っている「分配(distributive)リン酸化モデル」が哺乳類の細胞には適用できず、「一連(processive)リン酸化モデル」が妥当であることを見出したことが大きな成果であった。さらに分子混み合いというこれまで省みられてこなかった細胞内の環境を加味した新しい数理モデルを構築し、実験データから検証することができたことは大きい。また、研究テーマ B に関しても、興味深い実験結果を幸運にも得ることができ、また数理モデルに関しても、領域内の多くの方から貴重なアドバイスをいただいた。このアドバイスがなければ、数理モデルはここまで進まなかったと思われる。研究テーマ C に関しても、これまでの自身の研究で取り組んでこなかった画像解析や統計処理を組み込み、細胞遊走の数理モデルを提案できた。これも領域内に専門家がおり、いつも相談させていただいた。反省点は、これらの結果の一部をさきがけ期間内に論文発表することができなかったことである。研究テーマ A に関しては理論部の論文を、研究テーマ B に関しては実験と理論を合わせた論文が残っており、これらを論文という形できちんと発表したい。

おそらく、私がこの研究領域で最も実験(ウェット)よりであり、理論(ドライ)とは遠い研究者であると思う。にもかかわらずこの研究課題に応募したのは、自分自身を成長させるためという意味も含んでいた。期待通り、これまであまり馴染みのなかった数理モデルやシミュレーションにどっぷりつかることができ、かえがたい経験を得ることができた。今後は、このさきがけ期間に得られた経験を基に、研究をさらに進めていきたい。

#### 5. 研究総括の見解

細胞内シグナル伝達系の研究は近年急速に進展したものの、これまでの研究の大半は、精密パラメーター値の欠如によって実際の観察と乖離していることに問題意識をもち、イメージング計測によって実験的に求めた定量的なパラメーター値をもとに、システムとしての細胞内シグナル伝達の統合的理解を目指すというスケールの大きい研究課題であった。提案で掲げた3つの研究テーマはいずれも極めて難度の高いものであったが、本人が保有する卓越したイメージングの実験技術をベースに、専門外であった数理生物学分野にも情熱を持って取り組み、見事に目標を達成したことは高く評価できる。特に ERK リン酸化の反応機構において、分子混み合いを考慮して新規な反応速度論モデルを構築し、従来のシステム生物学の教科書に記載されている定説が哺乳類の細胞には適用できないことを明らかにしたことは特筆に価する。本人が記述しているように、本領域の研究者との積極的な交流が本人の資質とあいまって良い成果を生んだと感じている。

#### 6. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Aoki K, Yamada M, Kunida K, Yasuda S, Matsuda M. Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the

|                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| United States of America. 2011, 108, 12675–126800.                                                                                                                                                                                             |
| 2. Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, Matsuda M. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. Molecular Biology of the Cell, 2011, 22 4647–46561                                |
| 3. Kunida K, Matsuda M, Aoki K. FRET imaging and statistical signal processing reveal positive and negative feedback loops regulating the morphology of randomly migrating HT-1080 cells. Journal of Cell Science, 2012, 125, 2381–2392        |
| 4. Matsunaga-Udagawa R, Fujita Y, Yoshiki S, Terai K, Kamioka Y, Kiyokawa E, Yugi K, Aoki K, Matsuda M. The scaffold protein Shoc2/SUR-8 accelerates the interaction of Ras and Raf. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285, 7818–7826 |
| 5. Aoki K, Komatsu N, Hirata E, Kamioka Y, Matsuda M. Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research. Cancer science, 2012, 103 614–619                                                                                  |

## (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)

### <主な学会発表・招待講演>

1. Aoki K. Stochastic oscillation of ERK MAPK activity induced cell proliferation. 2nd Japanese–French Cancer Workshop, 2012 年 11 月 28 日
2. Aoki K. FRET imaging revealed a functional link between frequency of ERK oscillation and cell growth control. Joint symposium by JST/BBSRC (UK) Molecular Imaging and Systems Biology, 2012 年 1 月 30 日
3. 青木 一洋、分子混み合いの影響を加味した反応速度論モデルの導出と検証、第 1 回「細胞環境の測定とモデリング」ワークショップ 2011 年 11 月 7 日 第四回 JSBi 応用システムバイオロジー研究会
4. 青木一洋、松田道行, FRET イメージング による ERK 活性の細胞増殖制御機構の定量解析, 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21 日 日本生化学会
5. 青木 一洋, がんの制御に向けたシステムのなアプローチ, 公開シンポジウム「日本のライフ研究開発を元気にする“夢”と“攻め” ～バイオ研究と計算・情報科学の次世代型融合を促す～」, 2011 年 1 月 22 日

### <プレスリリース>

文献1. 京都新聞(7 月 20 日 23 面)および日刊工業新聞(7 月 20 日 29 面)に掲載。

# 研究報告書

## 「AIDSワクチン開発への理論的介入-SHIV感染実験と数理モデル-」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 岩見 真吾

### 1. 研究のねらい

HIV感染症は、世界的に流行している最も重要な感染症の一つであり、極めて長い経過をたどる慢性感染症である。この特性のため、HIV感染症の拡大阻止には、長期効果を有するAIDSワクチンの開発が不可欠である。1983年のHIVの単離からすでに30年たった今でも、効果的なワクチンは開発されていない。本研究では、数理モデルと培養細胞・動物実験を用いる事で、HIV・SIV・SHIV感染アカゲザル生体内での病態・免疫反応を実験的・理論的に理解・整備し、次世代改良型ワクチン開発の手がかりを数理科学的な立場から探索してきた。特に、数理モデルを用いて経時的な実験データを解析し、複雑で動的なウイルス感染を定量的に理解するための実験と理論の融合系の確立に注力した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

SHIV-KS661 とSHIV-#64 は、アカゲザルに対して高病原性及び低病原性を示す代表的な2株である\*。これまでの蓄積した知見から、アカゲザルに対する病態の違いは、免疫システムで中心的な役割を果たすCD4T細胞の数が感染初期にどの程度減少するかに関連していると考えられている。劇的にCD4T細胞数が減少した場合、宿主はウイルスと闘うための獲得免疫を誘導する事が困難となり、AIDS様症状(CD4T細胞の枯渇)を呈する。一方、CD4T細胞数の減少が緩やかな場合は、獲得免疫が誘導される事でウイルス量が低く維持され、持続感染を示すようになる。これらの理解は、様々なウイルス株を用いた感染実験の断片的な結果から経験的に得られたものであり、体系的に整備されていたものではなかった。さきがけ研究では、以下の研究成果を通じて、SHIV-KS661 とSHIV-#64 を含む様々なCXCR4 指向性SHIVによる感染実験データを数理科学的な手法で解析・整備し、定量的な観点からCXCR4 指向性SHIV病原性を説明した。

\* 本研究でいう高病原性、及び、低病原性とは、末梢血中のCD4T細胞の動態に基づいた定義とする。末梢血中のCD4T細胞数が非常に少ない状態まで非可逆的に減少した状態を「CD4T細胞の枯渇」と考え、CD4T細胞を枯渇させるウイルスを高病原性、そうでないウイルスを低病原性と定義する(図3a 赤:高病原性、青:低病原性)。

#### (2) 詳細

##### (1) 培養細胞を用いたウイルス感染ダイナミクスの定量化系の開発

1995年以降、多くの臨床データや感染実験データが数理モデルを用いて解析され、様々なウイルス学的発見がなされてきた。本研究では、まず、様々な種類の実験データを高頻度で

計測する事が可能な培養細胞を用いた感染実験から、ウイルス感染ダイナミクスを定量化し、ウイルスが持つ特徴を詳細に解析するための数理科学と実験科学の融合系を開発した(Retrovirology, Front. Microbiol.に掲載)。図1に示すように、試験管内で繰り広げられるウイルス感染を殆ど完璧に再現し得る数理モデルを開発する事が出来た。すなわち、ウイルス感染に関連するパラメーターの推定が可能になり、数理モデルにより特徴づけられるウイルス感染に関連する様々な量(感染細胞の半減期・ウイルスバーストサイズ・基本再生産数等)が計算出来るようになった。また、本融合系を応用してエンテロウイルスの感染ダイナミクスの定量化研究も行った(J. Virol. に掲載)。まだ、論文として報告はできていないが、同様の系を用いて、肝炎ウイルス、免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルスの感染ダイナミクス定量化の共同研究を国内外の実験グループと実施している。

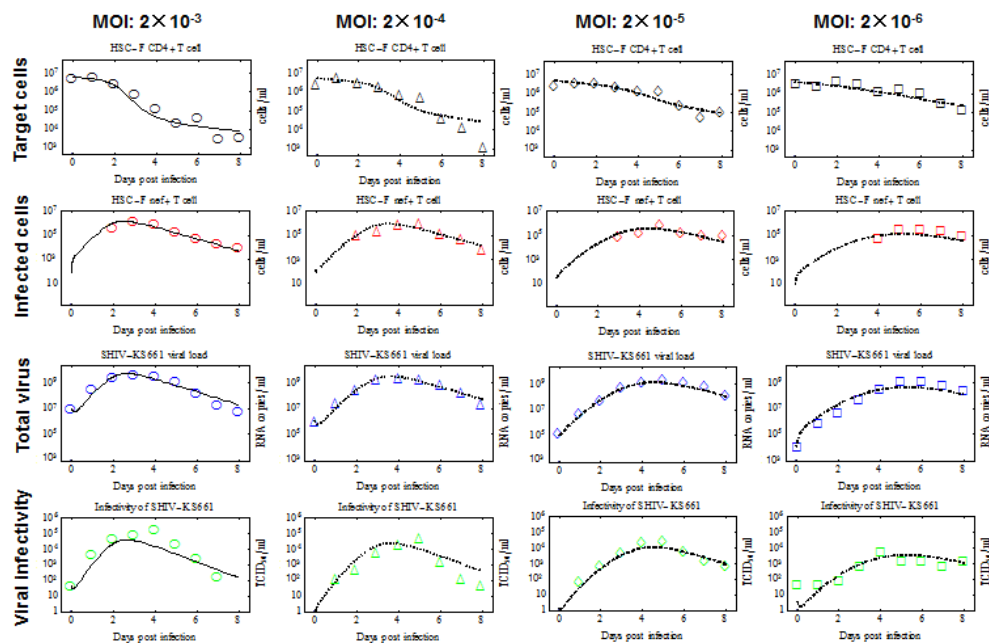


図1 培養細胞内の SHIV 感染実験データ(印)と数理モデルによる予測(点線)

(2) 試験管内の SHIV-KS661 (高病原性株) と SHIV-#64 (低病原性株) の感染ダイナミクスの違い

アカゲザルを用いた感染実験において高病原性を示す SHIV-KS661 株と低病原性を示す SHIV-#64 株の感染ダイナミクスの違いを(1)で開発した融合系を用いて定量的に明らかにした。解析の結果、2株間の決定的な違いは“感染性ウイルス(TCID<sub>50</sub>)の産生率”である事が分かった。興味深い事に、総ウイルス(感染性ウイルス+非感染性ウイルス:RNA copies)の産生率や感染細胞の死亡率には大きな違いが見られなかった。ここで、感染性ウイルスの産生率が異なる理由は、特に、ウイルスタンパク質のEnv領域において2株の配列が違う事から SHIV-#64 は SHIV-KS661 と比較して、細胞に効率良く侵入できないためであると考えている。

(3) 生体内におけるウイルス増殖率と標的細胞減少率の定量化系の開発

培養細胞を用いた実験と異なり、動物実験では、十分量の時系列データを得る事が困難である。また、低頻度な時系列データを既存の解析手法で分析したとしても、詳細にウイルス感

感染ダイナミクスを定量化する事は難しかった。しかし、動物実験は、ヒト生体内で起こるであろうウイルス感染の経過を最も模倣していると考えられ、そこから得られる知見は、極めて貴重である。従って、利用可能なデータから可能な限り正確にウイルス感染ダイナミクスを定量化する手法の開発が望まれていた。そこで、さきがけ研究期間中に、ウイルス量とウイルスの標的細胞数の時系列データより“単位標的細胞あたりのウイルス増殖率”と“標的細胞減少率”を定量化する手法を開発した。このウイルス増殖率及び標的細胞減少率は、様々なウイルスの生体内での感染現象を特徴づける指標になる。本手法を用いて、SHIV-KS661・SHIV-#64を含む様々な SHIV 感染アカゲザル生体内におけるウイルス増殖率及び標的細胞減少率を推定した(図2)。また、HIV-1 感染ヒト化マウス生体内のウイルス増殖率及び標的細胞減少率も推定した。

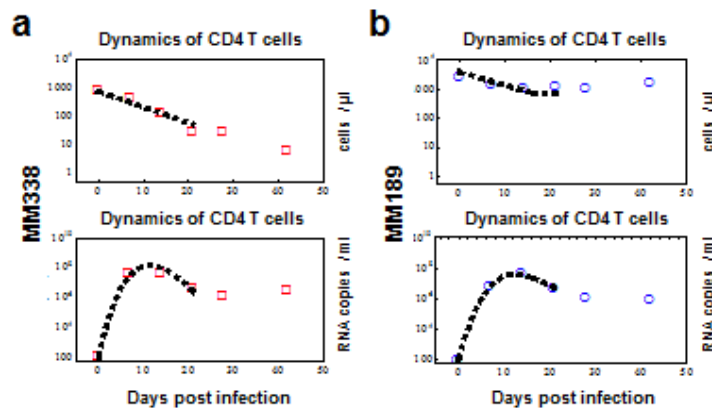


図2 アカゲザルを用いた感染実験データ(a: KS661、b: #64)と数理モデルによる予測(点線)

#### (4) アカゲザルに対する SHIV-KS661、SHIV-#64 及びその他の SHIV 株の病原性の理解

合計57頭のアカゲザルへのウイルス接種後約21日目までの感染初期のウイルス量と標的細胞である CD4T 細胞数の時系列データを用いて、ウイルス増殖率及び標的細胞減少率を推定した。これらの推定値を用いて、図3a に示されている CXCR4 指向性 SHIV の病原性(赤: 高病原性、青: 低病原性)を定量的に説明する事ができる(ただし、CCR5 指向性の HIV-1 とは異なる病態を示す事を注意しておく)。すなわち、感染初期のデータ解析から、長期のウイルス病原性が CD4T 細胞の減少パターンに依存して(b: 感染後すぐに CD4T 細胞が減少し始める

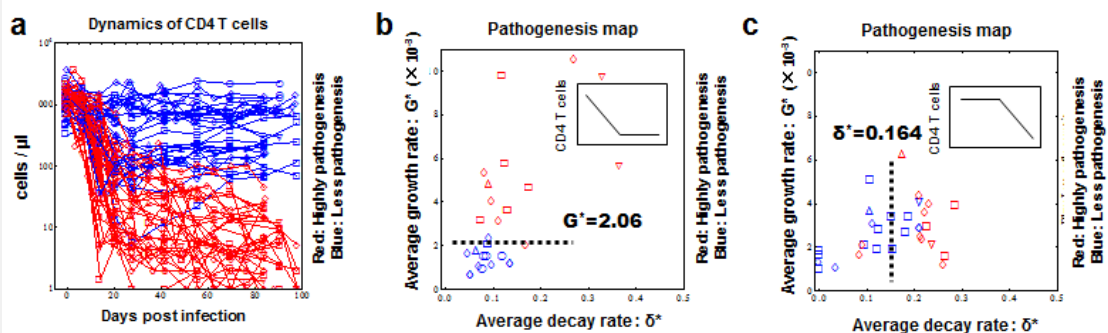


図3 CXCR4 指向性 SHIV の病原性を決定づける要因

c: 感染後しばらくCD4T細胞の減少が無い)ウイルス増殖率及び標的細胞減少率の値から予測されるのである。図3bのとき、マハラノビス距離の観点よりウイルス増殖率が $G^*=2.06$ が、図3cのとき、標的細胞減少率 $\delta^*=0.164$ が高病原性と低病原性の閾値になる事が示唆された。

### 3. 今後の展開

さきがけ研究では、まず、培養細胞感染実験と数理モデルを用いた解析から、SHIV-KS661 と SHIV-#64 の主な違いが感染性を保持するウイルス産生率である事を示した(図1)。そして、この感染性ウイルス産生率が決定的に異なるという事実と蓄積されていた知見より、感染初期のウイルス感染ダイナミクスを正確に定量化する事が可能になれば、CXCR4 指向性 SHIV の病原性メカニズムを体系的に理解できるのではないかという発想に至った。そこで、生体内でのウイルス感染ダイナミクスを定量できる手法を開発し、SHIV-KS661、及び、SHIV-#64 接種アカゲザルの感染初期の時系列データより、ウイルス増殖率及び標的細胞減少率を推定した(図2)。興味深い事に、高病原性を示すグループと低病原性を示すグループから推定したウイルス増殖率及び標的細胞減少率において、明らかな差異がある事が分かった。この事実は、ごく初期における SHIV の感染ダイナミクスの違いがウイルス病原性に関連が深い事を示唆している。さらに、この考えがその他の CXCR4 指向性 SHIV に対しても一般的に成立するか否かを調べるために、SHIV-KS689、SHIV-KS705、SHIV-DH12R についても感染初期の時系列データを用いて同様の解析を行った(図3)。合計57頭にも及ぶ感染アカゲザルの実験データから得られた結果を整備する事より、長期のウイルス病原性が CD4T 細胞の減少パターンに依存してウイルス増殖率及び標的細胞減少率の値から予測される、即ち、病原性を特徴づける閾値が存在する事を明らかにした。

重要な事は、閾値の存在を示せた事より、CD4T 細胞の減少パターンに依存こそするものの、感染初期においてウイルス増殖率を約 57%もしくは標的細胞減少率を約 28%阻害する事が出来れば、本来高病原性を示すウイルスに感染した個体が低病原性になると示唆できた事である。つまり、非常に高い病原性を示す CXCR4 指向性 SHIV であっても病原性をコントロールする事はそれほど困難ではなく、これらのウイルス株は AIDS ワクチン開発の重要なステップである霊長類を用いたワクチン試験においては不向きな系である事を意味しているのである(何故ならば、防御効果の弱いワクチンを過大評価する可能性があるからである)。これは、多くのウイルス学者が様々な感染実験の断片的な結果から経験的(あるいは、直感的)に考えていた事であるが、今回の研究を通して理論的かつ定量的に説明する事が可能になった。この様な定量的な考えは、今後のワクチン開発研究を進めていくうえで極めて重要な役割を果たしていく事になり、さきがけ研究を通して行った様々な場面で時系列データからウイルス感染ダイナミクスを定量化する手法を開発する事が今後希求される事は論を俟たないと考えている(Virology, 応用数理に掲載)。

### 4. 自己評価

数理モデルと培養細胞・動物実験を用いる事で、SHIV-KS661 と SHIV-#64 の病原性を定量的な観点から理解する事が出来たと考えている。数理モデルを用いた定量的解析と非常に相性が良かった事と相まって、SHIV-KS661 と SHIV-#64 以外のウイルス株に対しても同様の結果が得られた。すなわち、CXCR4 指向性 SHIV の病原性に対する定量的な一般理論を作る事に成功した。しかし、残念ながら実際にヒトの世界で流行している HIV-1 のほとんどが CCR5 指向性ウイルスである事より、今回のさきがけ研究で得られた成果がすぐに、ワクチン開発の手がかりになるとは限らない。今後は、CCR5 指向性ウイルスに対しても、その病原性を感染実験データから定量化するための手法を開発し、病原性を理解する事が重要である。

一方、3年半のさきがけ研究期間を通じて、数理モデルを用いて経時的な実験データを解析し、

ウイルス感染を定量的に理解するための実験と理論の融合系を複数個確立できた事は特筆すべき成果である。これらの融合系を用いて、免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、エンテロウイルス、リンパ腫を対象に、国内では7つの実験研究グループと国外では2つの実験研究グループと具体的な共同研究を行う事ができ、いくつかの研究成果は論文として発表する事ができた(国内外で6つの理論研究グループとの共同研究も行っている)。また、さきがけの研究成果を土台に、現在、国内の優秀な若手の実験ウイルス学者と数理科学者を組織して「計算ウイルス学・免疫学」という新たな融合研究分野を展開し始めている。さきがけ研究に応募した当初、国内では、実験ウイルス学研究を対象とした数理モデルを用いた研究がほとんど行われていなかった事を考えると、本さきがけ研究は、数理モデルを日本のウイルス学の中に広める事に大きく貢献し、自身の研究スタイルを確立する事にも繋がったと確信している。

## 5. 研究総括の見解

HIV 感染症の拡大阻止には効率的な AIDS ワクチンが望まれるが HIV の単離後 30 年経過した現在も効果的なワクチンは開発されていない。本研究では、体内における HIV の動的振舞いを数理モデルを用いて解析し、それによってワクチン開発への手がかりを得ることを目指した。HIV のモデルとなる SHIV をアカゲザルの CD4T 細胞(T helper cell)に感染させる in vitro 実験の結果に基づいて、ウイルス感染ダイナミクスを高精度に再現する数理モデルの構築に成功したことは高く評価できる。この手法はエンテロウイルスを始め他の幾つかのウイルスにも応用されて有効であることが示された。さらに、アカゲザルの生体内における感染時系列データを解析し、SHIV 株の高病原性と低病原性を区別する指標を見いだした。ただし、SHIV とヒト HIV は、感染動態が異なるため、本研究の結果を直ちに HIV に応用できないのは残念である。今後、さらに、この手法やアイデアを発展させて究極目標である AIDS ワクチンの開発へ繋げて行くことを期待する。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. M. Fukuhara<sup>†</sup>, S. Iwami<sup>†</sup>, K. Sato<sup>†</sup>, Y. Nishimura, H. Shimizu, K. Aihara, and Y. Koyanagi. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation, *Journal of Virology*. 87:1(2013). (<sup>†</sup> Equal contribution)
2. S. Iwami, B.P. Holder, C.A. Beauchemin, S. Morita, T. Tada, K. Sato, T. Igarashi, and T. Miura. Quantification system for the viral dynamics of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus based on an in vitro experiment and a mathematical model, *Retrovirology*. 9: 18 (2012).
3. S. Iwami, K. Sato, R. J. De Boer, K. Aihara, T. Miura, and Y. Koyanagi. Identifying viral parameters from in vitro cell cultures, *Frontiers in Microbiology*. 3:319 (2012).
4. S. Iwami<sup>†</sup>, H. Haeno<sup>†</sup> and F. Michor. A race between tumor immunoescape and genome maintenance selects for optimum levels of (epi)genetic instability, *PLoS Computational Biology*. 8: e1002370 (2012). (<sup>†</sup> Equal contribution)
5. M. Horiike, S. Iwami, M. Kodama, A. Sato, Y. Watanabe, M. Yasui, Y. Ishida, T. Kobayashi, T.

Miura and T. Igarashi. Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy, *Virology*. 423: 107–118 (2012).

(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)

招待講演

- [1] S. Iwami, Identifying viral parameters from *in vitro* cell culture, OSID 2012, September 25–26, 2012, Korea.
- [2] S. Iwami, Mathematical modeling and *in vitro* experiments in virology, KSMB 2011, August 25–26, 2011, Korea.
- [3] S. Iwami, Estimate of viral productivity and infectivity *in vitro*, KSIAM 2010 Spring Conference, April 24–25, 2010, Korea.
- [4] S. Iwami, Theoretical prediction of SHIV pathogenesis, 1<sup>st</sup> joint meetings of KMS and AMS, December 16–20, 2009, Korea.
- [5] S. Iwami, Mathematical frameworks for HIV infection, The 5<sup>th</sup> TEPHINET, November 2–6, 2009, Korea.

受賞

- [1] 岩見真吾, 研究奨励賞, 数理生物学会, 2010 年 9 月.
- [2] 鈴木崇文, 岩見真吾, 竹内康博, 論文賞, 日本応用数理学会, 2010 年 9 月.

## 研究報告書

### 「遺伝子重複による生命システム複雑化の進化モデル」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 印南 秀樹

#### 1. 研究のねらい

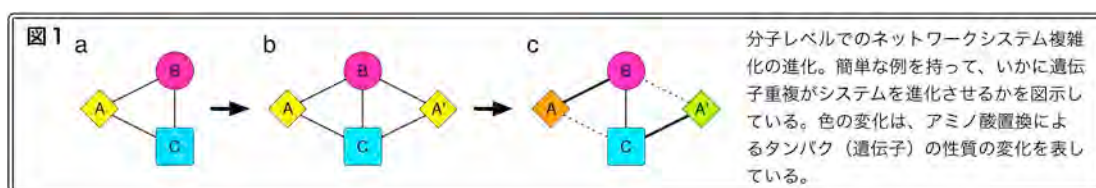
我々の生命というものは、非常に複雑なシステムが相互作用することによって存在している。本研究のねらいは、そのような生命システムの形成メカニズムを理解するためのモデル構築にある。一見捉えようもなく複雑で巨大なシステムも、分解すればそれは小さなシステムの集合体であり、そのひとつひとつはモデリングの対象となりうる。そして、分子生物学の飛躍的進歩により、様々なシステムに関して分子レベルでの相互関係のメカニズムが解明されつつある。そのような、最先端の分子生物学の知識を取り入れることによって、今までにない型のモデル理論を開発する。本研究は、より複雑な生命システムのモデリングの基盤を提供するものと位置づけられる。

モデリングにおいては、分子同士の横の関係だけでなく、進化という時間軸にそった縦の関係も取り入れる。すべての設計図であるゲノムの進化と、システム複雑化の進化をリンクさせるなかで、複雑化の原動力となっている遺伝子重複に特に注目する。遺伝子重複と適応選択を通して、システムが複雑に進化していくプロセスを理論的に考えることによって、現在ある生命システムが如何に形成され維持されているかを解明する。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

すべての生命システムの中では、無数のタンパクなどの分子がネットワークとして繋がり複雑な相互関係をなしている。生命システムが複雑化するとき、遺伝子重複と適応選択が原動力となっていることが解ってきた(図1参照)。本研究では、初期の生命システムがより複雑な物に進化する過程を理解するために、以下のような一連の研究のデザインをした。まず、システム的一端を担うある遺伝子が重複したときに、どのような自然選択の力がかかるか、結果、その遺伝子は如何なる運命を辿るかを理論的に理解するために、過去の文献をサーチし、それらをひとつのフレームワークの上で体系づける(研究テーマ A)。その上で、さらなる理論モデルを構築し、実際の生命システムに応用する。その例として、マイクロRNAが主導する遺伝子発現制御システム(研究テーマ B)と、ゲノム上に並ぶ遺伝子と転写因子からなる共発現システム(研究テーマ C)を考えた。



## (2) 詳細

### 研究テーマ A「重複遺伝子の進化モデルの体系化」

一般的に遺伝子が重複すると、それによってできた新規のコピーは自然選択の力にさらされる。もし、その遺伝子がふたつ存在することが有益ならば、自然選択はその新規コピーをゲノム中に維持しようとする。一方、それが有害ならば、ほぼ確実に排除される。また、適応度に影響を及ぼさない進化的に中立な場合もある。その場合は、特に必要とされていない新規コピーは、いずれはゲノム中から消失していく。このように、基本的なパターンは単純で、それに沿った理論モデルは完成している。しかしながら、実際はそう単純ではない。なぜなら、新規コピーも変化するからである。例えば、重複した時点では中立であった物が、突然変異によって有益になったりする。このような可能性を考えると、その組み合わせで無数のパターンが存在する。そして、過去の文献をたどると、あるものについては理論モデルが有り、あるものに関しては、それを示唆する実験データがあるだけであったり、また、いっさい言及されてないものもあったりとまちまちであることが分った。これは、理論研究の初期的フェーズで起こりがちな状態である。

本研究では、これらのモデルや議論を体系的に分類し、基本的なフレームワークを作った。まず新規重複遺伝子が生まれた直後、それが集団中に固定する過程、そして、固定した遺伝子が長期にわたって維持される過程の三つの期間を考えた。そして、それぞれの期間における自然選択のかかり方によって、パターンを分類した。そこから、現在の理論研究の足りない部分、これから考えなくてはならない部分、そして今後の発展の方向性などが明確になった。この結果は、2010年に Nature Reviews Genetics 誌に掲載され、以降3年間で約200回引用されている。

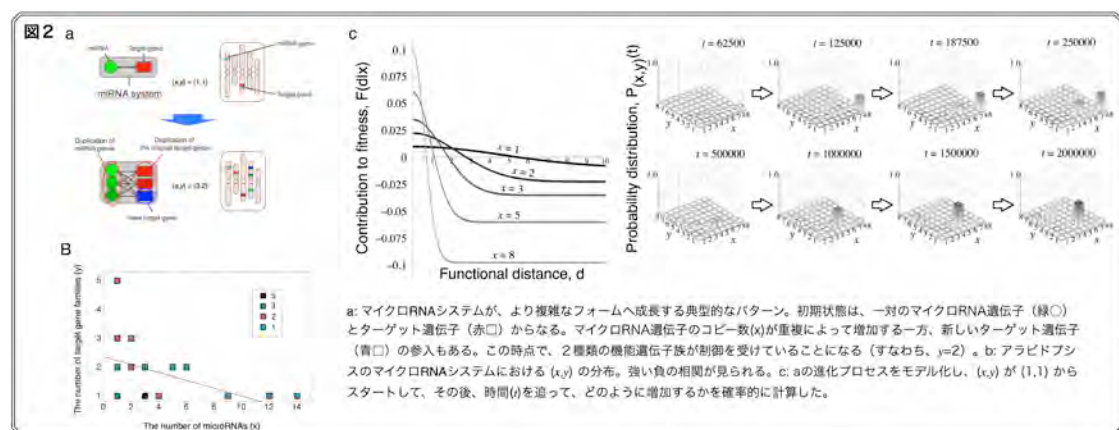
### 研究テーマ B「マイクロ RNA が主導する遺伝子発現制御システムの進化」

研究テーマ A で扱ったのは、ひとつの遺伝子がふたつになるという最も単純なケースであった。しかし実際は、その遺伝子を取り巻く環境が有り、その最も大きなものが、他の遺伝子との相互作用である。たとえば、図1a のような3つのタンパク A, B, C からなる非常にシンプルなシステムを考える。A, B, C はそれぞれ遺伝子 A, B, C にコードされている。A, B, C はお互いなんらかの生理的な相互関係にあり、三角形のネットワークをなしているとする。ここで、図1b のように、遺伝子 A が重複し遺伝子 A' が現れたとする。この時点では、タンパク A と A' は同一のものであり、両者とも B と C とリンクしている。しかし、時間が経つにつれ A' は進化し、そのタンパクの性質は、C とのリンクをより強くするものになったとする。そうすると、A は C との関係を保つ重要性が減り、その結果として B との関係を重視した形へと進化することができる(図1c)。このように、複雑な生命システムが進化する背景には、遺伝子重複と突然変異による DNA レベルの適応進化があるのである。

研究テーマ B では、RNA 干渉という遺伝子の発現制御システムを、理論的研究の対象に選んだ。この RNA 干渉システム複雑化の進化には、遺伝子重複と適応選択が大きく関与したことが知られている。図2のように、このシステムはタンパクではなくマイクロ RNA という RNA のレベルでネットワークをなす。マイクロ RNA は 20 程度の塩基からなる小さな RNA 分子で、ゲノム中ではマイクロ RNA 遺伝子という遺伝子領域にコードされている。マイクロ RNA は特定の

遺伝子をターゲットとして、そのメッセンジャーRNA の認識部位に張り付いて発現を抑制する。図2には、そのシステム複雑化の典型的なパターンを示す。まず、もっとも単純なシステム、すなわちマイクロ RNA とそのターゲット遺伝子が1対1のものから考える。そこから、マイクロ RNA 遺伝子とターゲット遺伝子が重複を繰り返し、それぞれの塩基配列が点突然変異によって進化する。マイクロ RNA とその認識部位の配列が変化すると、マイクロ RNA とターゲット遺伝子の特異性(干渉の度合い)が変わる。そして、ターゲット遺伝子のなかにはマイクロ RNA の干渉を完全に逃れるものが出てくる。一方、突然変異によって、新しくマイクロ RNA 認識部位を得て、このシステムに参入してくる遺伝子も出てくる。このプロセスには、図1にあるようなシンプルなモデルを応用することができる。

まず、マイクロ RNA とそのターゲット遺伝子、1対1の状態から、どのように進化するかをモデルする。図1aのように、マイクロ RNA 遺伝子のコピー数を  $x$  とおく。 $x$  はマイクロ RNA 遺伝子の重複によって増える。一方、 $y$  は、このマイクロ RNA の制御下にある機能遺伝子群の数であり、新規の遺伝子がシステムに加わることによって増える(図1a)。図1b は、植物のアラビドプシスのマイクロ RNA システムにおける $(x,y)$ の分布である。 $x$  と  $y$  との間には、強い負の相関が見られる。そこで、どのような進化的な力が加わると、図1b のような観察パターンが期待出来るかを、理論的に考えた。図1a のようなプロセスのもと  $x$  が増加すると、どのような機能遺伝子(機能は  $d$  というパラメータで表現)にとって、進化的にどのくらい有利か不利か(適応度  $F$  で表現)を設定し(図1c 左)、時間軸( $t$ )に沿って $(x,y)$ の変化を追った(図1c 右)。その結果、 $x$  が増え、制御システムはある特定の機能遺伝子群に特定されるというモデルで観察パターンがよく説明された。

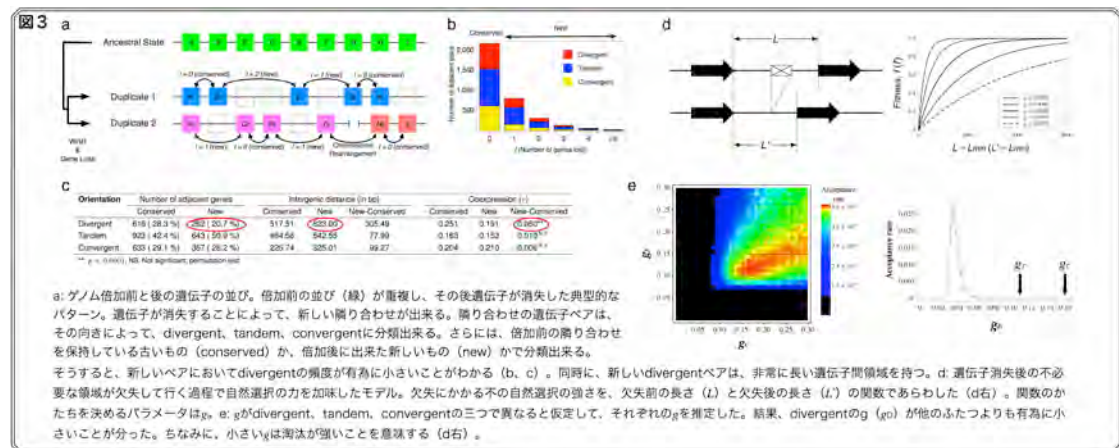


## 研究テーマ C「ゲノム上に並ぶ遺伝子と転写因子からなる共発現システムの進化」

研究テーマAで概要を説明したように、遺伝子は重複すると、ほとんどのケースでどちらか一方を捨ててしまう。機能的に無駄だからである。これが短時間に複数回起これば、ゲノム中で整然と並ぶ遺伝子の秩序を乱すことになる。なぜなら、遺伝子の並びには意味が有り、一連の遺伝子は発現制御という意味でシステムを形成しているからである。研究テーマCでは、遺伝子重複がこのシステムの秩序を乱したとき、遺伝子の並びはどう変化するか、そして新しい順序はどのような要素が決めるかを解析した。

すべての遺伝子は、それぞれ適材適所で発現を制御されており、その制御は5' 調節領域が担う。その5' 調節領域のnucleosome free region (NFR)からmRNAの転写は始まり、酵母では基本的に転写が両方向に同時に起こることが知られている。これを考えると、頭と頭を合わせたdivergentの向きの隣同士の遺伝子は、必然的に調節領域を共有することになり、同時発現を強制される危険性が出てくる。これは実際、その調節領域にNFRがひとつだけ有るときに起こりやすい。従って、新しい遺伝子の並びが出来たときに自然選択が働くなら、(i) divergentの向きは嫌われるであろうし、(ii)もし出来てしまった場合は、最低2つのNFRを維持できるように遺伝子間領域を長く持つはずである。

本研究では、このふたつの仮説をパン酵母のゲノムデータを証明した(図3)。まず(i)については、ゲノム倍加後に出来た新しい隣り合わせの遺伝子ペアに関して、divergentの向きが有為に少ないことを示した(図3a, b)。(ii)同時に、新しいdivergentのペアは、古いものに対して圧倒的に長い遺伝子間領域を持つことも示された(図3c)。そこで、特に(ii)の結果に注目し、遺伝子間領域の長さの進化の過程をモデル化し(図3d)、その長さを保つために、どれくらいの強さの自然選択が働いているかを近似最尤法で推定した。その結果、遺伝子間領域が短くなることに対する自然淘汰の力が、新しいdivergentペアでは非常に大きいことが分った(図3e)。すなわち、新しいdivergentペアは、なるべく共発現をさけるような進化的圧力がかかり、お互いの物理的距離を保つように進化してきたということである。具体的に言うと、本来なら不必要で除去されるべき遺伝子間領域も、除去されないで残ってきたということである。長い遺伝子間領域があれば、そこには二つ以上のNFRを配置することができ、二つの遺伝子はそれぞれ別の調節領域を使えるのである。



### 3. 今後の展開

本研究ではまず、数ある遺伝重複の進化理論の整理、分類そして体系化を行った(研究テーマA)。これは、更なる理論研究を行う上での基礎的なフレームワークとなりうる。その上で、以下のようなふたつの具体的なテーマに取り組んだ。ひとつは、マイクロRNAが主導する遺伝子発現制御システムのモデリング(研究テーマB)、もうひとつは、ゲノム上に並ぶ遺伝子と転写因子からなる共発現システムの進化(研究テーマC)である。この一連の研究で学んだことは、重複遺伝子の進化的運命を決めるのに重要な働きをするのは、その遺伝子を取り巻く分子レベルの環境であるということである。具体的には、その遺伝子が、どの遺伝子に制御され、どの遺伝子に影響を与え

るかという流れである。それは、研究テーマBではtransの関係にある発現制御であり、研究テーマCではcisの発現コントロールであった。このように、それぞれの遺伝子を単体で考えるのではなく、一連のシステムとして進化を考える重要性を示すことが出来た。今後も、このような遺伝子間の関係を重視した理論的研究を続けて行く過程で、そこにある一般法則のようなものを解明していけばいいと考えている。

#### 4. 自己評価

数多くの遺伝子産物が複雑なシステムを形成することによって営まれている生命体、その進化のメカニズムを分子レベルで理解したいという究極の目標のもと、その基礎の基礎になる部分にたいして、自分なりに小さな一歩を踏み出せたと思う。

#### 5. 研究総括の見解

生命システムが複雑化していく進化のプロセスを、遺伝子重複と適応選択を通して理論的に理解することにより、現在ある生命システムがいかに形成され維持されているかを明らかにするという極めてスケールの大きい課題に挑戦した。まず、過去に発表された遺伝子重複の進化理論を分類して体系化し今後の理論の方向付けを行った。これはNature Reviews Genetics誌に掲載され、3年間で約200回引用されるほどの大きなインパクトを与えた。さらに、マイクロRNAによる遺伝子発現制御システムの遺伝子重複を介する進化についてのモデル構築や、遺伝子重複によって引き起こされる遺伝子配置の変化に関する基本ルールの提起等を行い、具体的な例でその正当性を検証した。この様に、ゲノム進化における遺伝子重複の重要性に焦点を当てた新規なモデルを構築して、ゲノム配列の特徴的なパターンがどのように形成されてきたかを明らかにしたことは、ゲノム時代に相応しい優れた業績として高く評価される。

#### 6. 主な研究成果リスト

##### (1)論文(原著論文)発表

1. Hideki Innan, Fedya Kondrashov. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. Nature Reviews Genetics. 2010, 11, 97-106,
2. Kosuke Teshima, Hideki Innan. The coalescent with selection on copy number variants. Genetics. 2012. 190. 1077-1086.
3. Ryuichi Sugino, Hideki Innan. Natural selection on gene order in the genome re-organization process after whole genome duplication of yeast. Molecular Biology and Evolution. 2012. 29. 71-79.
4. Tetsuya Akita, Shohei Takuno, Hideki Innan. Modeling evolutionary growth of a microRNA-mediated regulation system. Journal of Theoretical Biology. 2012. 311. 54-65.
5. Shohei Takuno, Hideki Innan. Selection fine tunes the expression of microRNA target genes in Arabidopsis thaliana. Molecular Biology and Evolution. 2012, 28. 2429-2434.

##### (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)

出版物

*Gene conversion in duplicated genes*, Special issue of Genes. Edited by Hideki Innan

# 研 究 報 告 書

## 「有殻原生生物骨格の力学特性解明とモジュラー構造物への展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研 究 者: 岸 本 直 子

### 1. 研究のねらい

宇宙構造物は、重力や空気力から解放され、地上の構造物に比べて機能や力学的合理性に重点をおいた自由なデザインが可能となる。支持点のない宇宙空間では、幾何学的対称性など力学的平衡を保つ形状が望まれるとともに、軽量化やモジュール化、自律性なども要求される。空気力に対しては高真空な環境を再現できる試験装置が存在するが、空間的・時間的に十分な無重力環境を再現できる試験装置は存在しないため、どのような構造物システムが無重量環境下で最適かを実際に確かめることは非常に難しい。

一方、水中で浮遊して生息する生物である有殻原生生物は、浮力によって重力から解放され、単純なユニットの繰り返しによる幾何学的対称性の高い多様な形態が認められる。また、膜や繊維といった張力部材と骨格などの圧縮部材のバランスによって軽量化を達成し、5億年以上にわたって環境変化に適応しながら進化し続けている。

本研究では、このような有殻原生生物骨格のかたちや機能を調べることで、どのような構造物が無重力環境下で最適なのかを明らかにして、宇宙構造物の設計に応用することを目指してきた。特に有殻原生生物骨格の多様かつ複雑で美しいかたちが、成長過程でどのように形成されるのかを数理モデル化することで、実際の3次元的な骨格形態を定量的に評価するとともに、有限要素法によって力学的合理性を示して、人工構造物の設計につながる設計原理を探索することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

宇宙構造物は、重力や空気力から解放され、地上の構造物に比べて機能や力学的合理性に重点をおいた自由なデザインが可能になる。また、軽量化や自律性などとともに、空間的に限られた宇宙機での運搬や軌道上組立に適したモジュール化が要求される。一方、水中で浮遊して生息する有殻原生生物は、浮力によって疑似的に微小重力下にあるとともに、単純なユニットの繰り返しによる幾何学的対称性の高い多様な形態をもっており、5億年以上にわたって環境変化に適応しながら進化し続けている。本研究は、このような有殻原生生物骨格のかたちや機能を調べることで、どのような構造物が微小重力下の軽量自律構造物として最適かを明らかにして、宇宙構造物の設計に応用することを目指した。研究期間内に得られた成果は、以下の4点である。A) 有殻原生生物のうち有孔虫と放散虫骨格の化石ならびに現生種の3次元形態をマイクロCTで取得できるようになった。B) 有孔虫と放散虫のいくつかの種類について、骨格形態の数理モデルを提案した。C) マイクロCTを使って取得した実際の3次元形態や機能を数理モデルに基づいて定量的に評価した。D) マイクロCTを使って取得した実際の3次元形態を使って有限要素解析を実施し、力学的特性を明らかにした。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「マイクロ CT を使った有殻原生生物骨格の 3 次元形態取得」

有殻原生生物には石灰質の殻をもつ有孔虫(動物プランクトン)と円石藻(植物プランクトン)、主に珪酸質の殻をもつ放散虫(動物プランクトン)と珪藻(植物プランクトン)の4種類があり、それぞれ多様な形態を示している。ここで取り上げた有孔虫と放散虫は、100 $\mu\text{m}$ ～数 mm の大きさを持ち、微化石として岩石中に残ったものは示準化石や示相化石として重視される。骨格の形態の変遷や分布、殻の機能を詳細に分析するためには、これらの骨格の 3 次元形態が必要であるが、これらの骨格の直径や厚みは数  $\mu\text{m}$  以下、サブミクロンオーダーの部分もあり、約 5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$  の解像度しかない従来の汎用マイクロ X 線 CT では観測できない。そこで、電子顕微鏡に取り付けるタイプのマイクロ CT を導入し、骨格の 3 次元形態取得に取り組んだ。サンプルのマウント方法を考案し、金属ホルダの形状を工夫するなどして、最終的に最高解像度 0.3 $\mu\text{m}/\text{pixel}$  で 3 次元形態を取得することに成功した。図1に全長約 200 $\mu\text{m}$  の放散虫骨格の X 線透過像と 410 枚の透過像から再構成した断層図を示す。非破壊で内部構造を含む 3 次元構造が取得できていることがわかる。

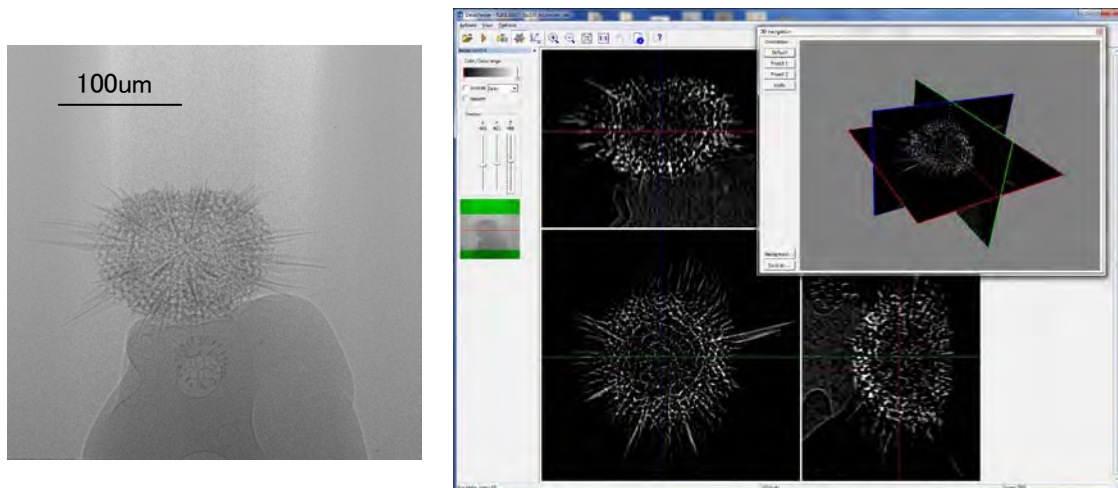


図1 放散虫 *Spumellaria* の X 線透過像(左)と再構成像(右)(解像度:0.33 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ )

### 研究テーマ B「有殻原生生物骨格形態の数値モデルの提案」

有殻原生生物骨格の形態について深く理解するために、骨格形態の数値モデル化に取り組んだ。まず、有孔虫は基本的に球形のチェンバー(室)を追加して成長するため、どのようなチェンバー球をどこに追加するかを規定することで、有孔虫の形態数値モデルを構築した。この手法で原生有孔虫のほとんどすべての形態をモデル化し、形態を数値パラメータ化して表現できることを確認した(文献1)。この数値パラメータは次項(3)での実際の形態の評価に用いた。

有孔虫に比べて放散虫には非常に多様な形態があるため、個別のケースについて数値モデル化に取り組んだ。代表的な2種について説明する。まず、球形放散虫について、球面上にランダムに配置した点群を基にした Voronoi 分割を初期値として、フレームの総量と包絡域体積を目的関数とする最適化をおこない、実際の放散虫骨格とよく似た形態を創出することができた(文献2)。次に図2(左)に示す中生代の *Pantanellium* 属は、形態のバリエーションが多く、電

子顕微鏡写真による分類が非常に複雑になってしまっている。そこで、成長や変形の影響を受けにくいと考えられる幾何学的特徴である殻孔の形と数に着目し、マイクロ CT で得られた 3 次元情報を基に製作した石膏製実体模型(図2(中))や平面グラフ(図2(右))を使って分析を進めている(文献3)。



図2 放散虫 *Pantanellium* 属の電子顕微鏡写真(左), 石膏製実体模型(中), 平面グラフ(右)

#### 研究テーマ C「数理モデルに基づいた実際の形態と機能の評価」

これまで形態の数理モデル化にはさまざまなアプローチがあったが、実際の形態と比較してその妥当性を評価する手法は、実際の詳細な 3 次元形態がわからないことから極めて限定的であった。本研究では、研究テーマ A に示したようにマイクロ CT を使って個々の詳細な 3 次元形態が取得できるので、そのデータを使って数理モデルの検証を行った。対象として使ったのは、連結球モデルで示される有孔虫で、実際の 3 次元形状から近似連結球モデルを導出し、提案した数理モデルの妥当性を評価した。図3に実際の 3 次元形態の 3 次元 CG と、導出した近似連結球モデルを示す。

実際の形態から得られた近似連結球モデルを使って「かたち」に関する定量的分析をおこなった。これは、近似連結球モデルが形態の数値化であることを利用した分析であり、熱帯から亜熱帯の海洋表層に生息する浮遊性有孔虫である *Globigerinoides ruber* の形態比較を行った。*G. ruber* には一部にピンク色の色素(カロチノイド)が沈着している *G. ruber*(Pink)と色素沈着のない *G. ruber*(White)の 2 種があり、色以外の形態はよく似ている。現生の Pink の生息域は非常に限られており(大西洋夏期の熱帯域)、他の地域の海底コア試料から産出した場合は、示準化石として用いられる。近年の遺伝子時計の手法による解析では、pink は white から約 630 万年前に分岐したことがわかっている。地層中で年代をさかのぼるとピンク色は退色してしまうため、この 2 つが形態のみから区別できないか、近似連結球モデルで得られた数値パラメータを比較することで評価した。

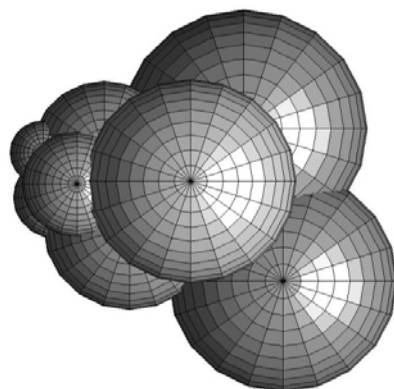


図3 Globinoides ruber(Pink)の実際の骨格の 3 次元 CG(左)と近似連結球モデル(右)

#### 研究テーマ D「実際の 3 次元形態情報を使った力学解析」

研究テーマ A で取得した 3 次元形態情報から、直接ボクセル有限要素モデルを作成して、構造力学解析を実施することができる。図4に、放散虫 *Diymocyrtis tetrathalamus*(Haeckel) の実際の形態情報から作成した 3 次元 CG(左)とボクセル有限要素解析ソフト「Voxelcom」を使ってボクセル有限要素モデルを作成して実施した解析の結果を示す。境界条件は、自由—自由で水圧を模擬した荷重を負荷している。カラーバーは、Mises 応力を示しているが、特に応力集中している箇所がない理想的な形態であることがわかる。

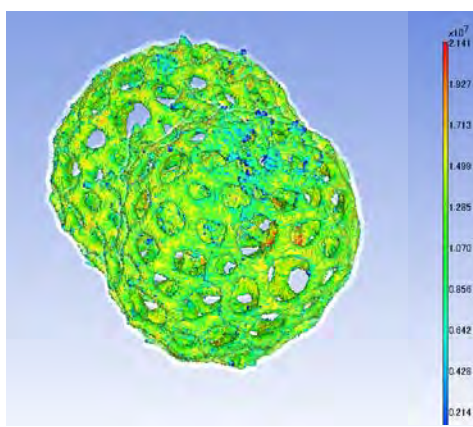
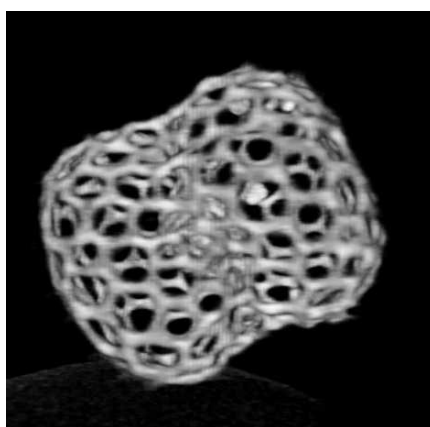


図4 放散虫 *Diymocyrtis tetrathalamus*(Haeckel) の 3 次元 CG(左)と有限要素解析結果(右)

### 3. 今後の展開

本研究では、電子顕微鏡に取り付けるタイプのマイクロ X 線 CT を導入しました。仕様では、据え置き型のマイクロ X 線 CT を超えるサブミクロンオーダー( $0.3 \mu\text{m}/\text{pixel}$ )の解像度が実現できる装置でしたが、据え置き型に比べて、マニュアル操作の部分が多く、サンプルのマウント方法開発や撮影条件の調整などにほとんどの研究期間を費やしてしまいました。しかし、その結果、価格的には 5 倍以上の据え置き型 CT を超える解像度とコントラストで放散虫や有孔虫の骨格を安定して撮影することが可能となりました。この分野の研究は、電子顕微鏡での 2 次元画像による分類や分析に基づいており、非破壊による内部構造の解明や 3 次元情報による分類や分析は新たな手法を提供しつつあると思います。例えば、有孔虫では、従来の CT では撮影が困難であったサブミ

クロンサイズの棘やチェンバー内側のカルサイト層の撮影に成功しており、現在どのように評価していくか有孔虫研究者と検討中です。

また私自身が構造工学を専門とすることから、マイクロ CT を使って 3 次元形態さえ得られてしまえば、ボクセル有限要素を使った有限要素法による構造解析や、流体/構造連成問題を強連成のまま解くことができるマルチフィジックス有限要素解析を使って、有殻原生生物骨内の応力・ひずみ分布や流れとの相互作用を明らかにすることができます。今後骨格の 3 次元形態のデータは次々と蓄積していくので、5 億年の進化の過程の中で骨格形態の力学的合理性がどう追及されていったのか解明してく予定です。

有殻原生生物には、(1)で述べたように骨格材料(珪酸質と石灰質)、動物/植物プランクトンの組み合わせで、4つの大きなグループがあります。本研究でとりあげた放散虫(珪酸質)や有孔虫(石灰質)は、いずれも動物プランクトンです。残りの植物プランクトングループ、珪藻(珪酸質)と円石藻(石灰質)は、サイズが 10 分の 1 以下となり、現有のマイクロ CT の解像度では撮影できません。4つのグループは、進化の過程で環境変動や食物連鎖に適応してそれぞれ相互作用しながら形態や機能、分布域を変化させてきたと思われます。今後、動物プランクトン骨格のデータを蓄積しながら、是非さらなる高解像度の装置を入手して残る植物プランクトングループの 3 次元骨格形態を撮影し、大きな進化の流れを解明していきたいと考えています。

このように、宇宙構造物の設計まではなかなか到達しませんが、生物のかたちの不思議さと設計の巧妙さが少しでも解明できたら、人工物システムへの応用もできると考えています。

#### 4. 自己評価

5 億年以上にわたって環境変動に適応し進化し続けてきた有殻原生生物骨格のかたちと機能を分析することで、微小重量環境下での最適構造物のかたちを探索するという目的の下に研究を進めてきました。結局、マイクロ CT を使いこなすことに研究期間のほとんどを費やしてしまい、なかなかその先に進むことができませんでした。しかし、一旦詳細な 3 次元形態が得られてしまえば、ボクセル有限要素解析やマルチフィジックス有限要素解析などのツールを使って、応力/ひずみ分布などの力学特性や周囲の流体との相互作用などを解析することは比較的容易ですので、今後、次々と得られる成果から人工構造物の設計へとつなげていく所存です。ただし、得られた画像は、従来の CT では得られなかった高解像度かつ高コントラストな 3 次元情報であり、古生物学や生物学においても意味のあるデータであると考えています。こちらは古生物学者や生物学者と共同で研究を始めていますので、一定の成果はあったと評価しています。また、殻の厚みや個体差などを含む実際の 3 次元形態を数値モデルを使って定量的に評価する手法は、従来の形態解析にない包括的な手法であり、進化過程における形態の変遷や空間的な分布を定量的に示すのに有効であると考えています。

#### 5. 研究総括の見解

重力や空気抵抗から解放される宇宙構造物の設計には、幾何学的対称性やモジュール化、自立性等が要請される。本研究では水中で浮力によって重力から解放される環境下で 5 億年以上も進化してきた有殻原生生物の構造特性や力学特性の解明を行って得られる知見を宇宙構造物の設計に応用するという、非常にユニークな発想にもとづく課題に挑戦した。従来は 2 次元情報しかなかった有殻原生生物の構造研究の分野に、新しくマイクロ CT により 3 次元高解像度画

像を取得する手法を開発して、この分野で注目を集めたことは評価できる。さらに得られた 3 次元情報から力学解析を行い、有殻原生生物の構造が応力集中のない合理的な構造になっていることを理論的に突き止めた点は優れている。宇宙構造物の設計指針を得るまでには至らなかったが、3 次元形態を数値モデルを使って定量的に評価する手法の基盤ができたので、当初目標に向けた更なる発展を期待したい。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yoshino, T., Matsuoka, A., Kurihara, T., Ishida, N., Kishimoto, N., Kimoto, K., Matsuura, S., Application of Voronoi tessellation of spherical surface to geometrical models of skeleton forms of spherical radiolarian, Forma, 2012, Vol. 27, 45-53.
2. Matsuoka, A., Yoshino, T., Kishimoto, N., Ishida, N., Kurihara, T., Kimoto, K., Matsuura, S., Exact Number of pore frames and their configuration in the Mesozoic radiolarian Pantanellium: An application of X-ray micro-CT and layered manufacturing technology to micropaleontology, Marine Micropaleontology, 2012, Vol.88-89, 36-40.
3. Yoshino, T., Kimoto, K., Kishimoto, N., Matsuoka, A., Kurihara, T., Ishida, N., Matsuura, S., A simple model for chamber arrangement of planktic foraminifera, Forma, 2009, Vol. 24, 87-92.

### (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)

岸本直子, 松岡篤, 吉野隆, 石田直人, 栗原敏之, 5章 微化石研究の最前線 5. 5宇宙プランクトン, 微化石の世界—プランクトン化石と過去の地球環境の多様性—, 国立科学博物館叢書, 2012.

Kishimoto, N., Ishida, N., Kurihara, T., Kimoto, K., Matsuoka, A., Yoshino, T., Matsuura, S., Acquisition of three dimensional shape of Radiolaria using micro X-ray computer tomography, 13th International Conference on Fossil and Recent Radiolarians, 2012.March, Cadiz, Spain.

Kishimoto N., Three dimensional structure of Radiolarian skeleton in terms of optimal structural design and beyond, Mini-symposium Future Direction of Biological and Paleontological Radiolarian Studies between Japan and France, 2011, Dec., Okinawa.

岸本直子, プラントンのかたちと機能~宇宙工学者からのアプローチ~(招待講演), 微古生物学リファレンスセンター(MRC)研究集会 2011, 2011, March, 仙台

岸本直子, 宇宙プランクトン活動の経緯と成果について(招待講演), 日本地質学会第 119 回学術大会, 2012, Sept., 大阪.

# 研究報告書

## 「情報処理の最適性からとらえる分子・細胞・発生現象」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

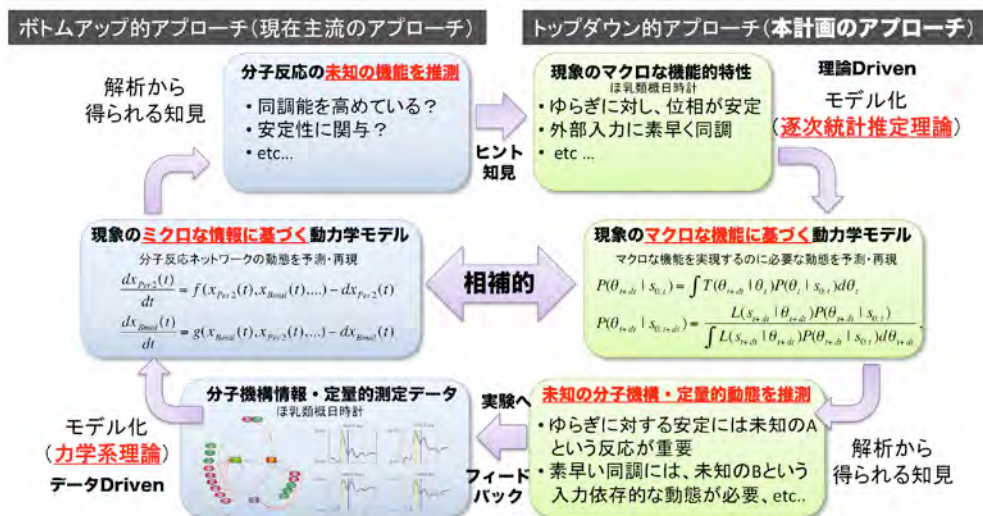
研究者: 小林 徹也

### 1. 研究のねらい

環境や細胞内の素過程にゆらぎや不確実性が存在するにも関わらず、細胞は環境からのシグナルを巧みに処理し、ゆらぐ環境変動に対して適応的・合目的に振舞う。分子応答反応・細胞走性・概日リズム・極性形成・細胞分化・形態形成など様々な現象に共通してみられるこの振る舞いは、様々な生命現象が情報処理という側面から統一的かつ理論的に扱いうること示唆する。

このような生命現象のもつ巧みさに共通して見られる数理的構造を捉えるためには、複雑な分子機構を元に複雑なモデルを作り上げ、そこから現象の機能を個別に推測する現在主流のボトムアップ的アプローチだけでなく、マクロに共通して見られる適応性・合目的性という機能を元に、それを実現するために必要な分子機構や動態を理論を駆使して導き、分子生物学的アプローチだけでは得られない視点や予測を導き出すトップダウン的アプローチが必要である。

本研究課題では統計推定・学習理論を元に、多様な生命現象に通底する共通の機構を情報処理の側面から扱う理論的な枠組みを構築する。これまで神経細胞による確率的情報処理という限定された対象に用いられてきたこの手法を、分子・細胞・発生現象に拡張・改良することによって、ミクロな生命現象の情報処理機能を統一的に扱いうる理論を構築する。さらに、細胞間の相互作用による自己組織的振る舞いや細胞の自律的応答性制御など、既存の統計推定・学習理論には収まらないが生命現象特有の特性を理論に取り込むことにより独自の理論的深化を目指す。そして、個別実験系に対して、情報処理の最適性の観点から未知の分子機構や細胞動態の予測を行って理論を検証・改良する。さらに知見を再び統合して、生物が多細胞化などの革新的な過程によって、情報処理的な巧妙さと分子機構の複雑さとのトレードオフをいかに解消してきたか？などの生物的問題や、生命の持つ情報処理機構を数理的に見た場合の新規性などより分野横断的な問題を探求する。



## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究課題では、不確定性の存在下で適応性を実現するためには、情報の適切な伝達と処理が不可欠である点に着眼し、情報処理の最適性という側面から、そのメカニズムの普遍的特性を扱う理論を構築することを行った。具体的には、不確定性と確率性の存在下における生体情報処理を、シャノン情報理論における情報伝達の問題として統一的に捉え、ベイズ推定による逐次的情報復号や動的な情報符号化の観点から、確率的シグナルを介しながらも恒常性と適応性が実現される動的なメカニズムを探索した。また、既存の情報理論の応用にとどまらず、実験的に知られている生体情報処理の分子機構や、細胞間の相互作用による自己組織的振る舞い、細胞の自律的応答性制御、そしてノイズを活用した情報処理など、既存の情報理論の枠組みには一見収まらないが生命現象特有の特性を取り込み「生体システムの情報理論」の創りあげること目指した。そして、生体システムの情報処理から学んだ理論を基に、新たな工学的なシステム構築の提案を行った。

### (2) 詳細

#### (研究成果1) 確率的シグナルから情報を復元する反応機構の解明

環境中における分子濃度変化をシグナル伝達系の確率的応答から同定し、濃度変動に適切に応答する細胞の運命決定は、不確定性と確率性の存在下における適応を反映する最も基本的な現象である。この現象における環境変動と確率的シグナル伝達をそれぞれ隠れマルコフ過程とポアソン点過程を用いて定式化した。情報理論の枠組みでは、環境変動が伝達すべき情報、確率的なシグナル伝達系がノイズなチャンネルに対応する。そこで逐次ベイズ推定の理論を用いることによって、環境変動の情報をノイズなシグナル伝達の下流で最適に復元(復号)するダイナミクスを確率微分方程式の形で理論的に導いた。その方程式の力学的構造を解析することにより、自己触媒的な構造を有する修飾反応サイクルによって、情報理論の意味で最適な復号が生化学的に実現できることを初めて示した。さらに自己の有する情報の不確定性に基づき外部情報への感受性を動的に制御することが、確率的なシグナルから情報を復号する上で本質的な原理であることを見出し、復号される情報の上限値が時系列の情報量で規定されることも示した(Phys. Rev. Lett. 2010 掲載)。この結果は最も基本的な仮定に基づくため、本課題において続く研究のスタート地点であると同時に、続く研究の本質的部分を最も簡潔に表したミニマルモデルとなっている。

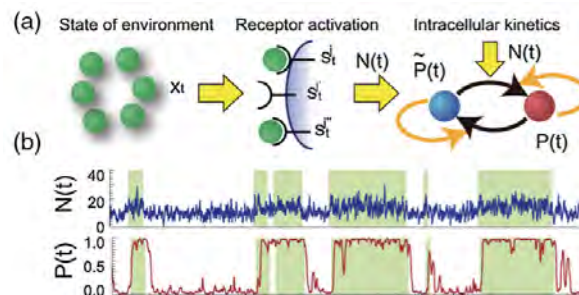


図1 ノイジーなセンシング系で得られた情報  $N(t)$  から背後の環境変動情報(緑背景)を復号する自己触媒化学反応系(a)と、その振る舞い(b)

### (研究成果2) 確率シグナルからの環境分子の勾配方向推定

環境中の分子濃度勾配を見分ける勾配感知は、分子濃度の変化を同定し応答する運命決定に次いで基本的であり、かつ発生・免疫・神経と多くの高次生命現象に現れる生体情報処理の基本プロセスである。また、非常にノージーなレセプターシグナルから細胞が勾配感知を実現していることも定量的な実験に基づき明らかにされており、理論と実験との間をつなぐ上でも重要な位置を占める。確率的なシグナルからの勾配感知の問題を扱うため、研究成果(1)における結果を拡張し、細胞膜上の異なる位置に分散したレセプターから情報を統合して勾配情報の復号を行う空間センシングの動態を導き出した。さらに極性形成に基づく多種レセプターシグナルの統合反応により、この最適な勾配情報復号が比較的単純なフィードバック構造で生化学的に実現できることを示した(Phys. Rev. Lett. 2011 掲載)。また、勾配認知には細胞自身の運動によるレセプター応答の時間変動を微分し、勾配の存在を演算する時間センシングも存在する。動的ベイズネットワーク理論や階層的推定理論を活用することにより、確率的シグナルからの時間センシングをも理論的に扱うことに成功した。そこから得られた最適な情報復号の構造と、大腸菌などで実際に観測されたシグナル伝達構造を比較することにより、生体システムはフィードバックを用いた情報の動的な符号化を積極的に活用していることが示唆された。また、センサーの空間的配置や動的符号化の帰結として復号過程の複雑性が大幅に簡略化されることが明らかになった(論文準備中)。確率的シグナルの時間微分的な情報処理は、大腸菌の勾配センシングだけではなく、高等生物の視覚系や触覚系を始めとした、様々な生体センシング機構に共通して見られる普遍的な情報処理戦略であり、その理論化に成功したことの波及効果は大きいと考えられる。

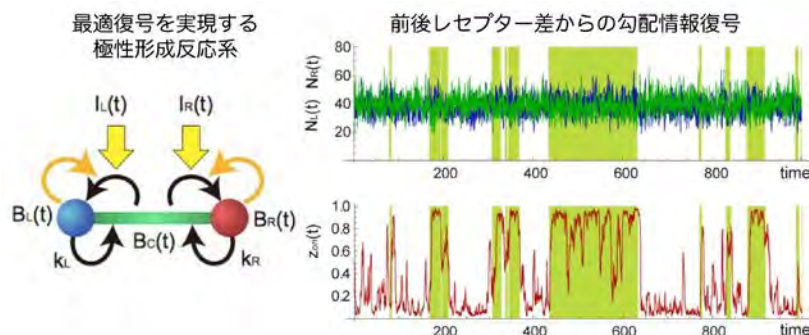


図2: 最適復号を実現できる細胞内極性形成反応系(左)と  
両端の膜からの確率的シグナルからの情報復号の振る舞い(右)

### (研究成果3) ノイズ励起現象と最適情報復号動態との双対性

生体情報処理の中には、通常の情報理論の枠組みでは捉え切れない様々な特性がある。細胞集団による情報処理(Front. Syst. Physiol. 2011 掲載)は代表的なものであるが、確率性やノイズを積極的に活用したノイズ援用の情報処理は、いわゆるノイズや確率性を最大限抑制する工学的な情報処理と対極に位置する生体特有の戦略として認知されている。ノイズを援用した情報処理と本研究の関連を明らかにするため、研究成果(1)で得られた確率微分方程式の力学的構造を精査することにより、ノイズを抑制し情報を最適に復号するダイナミクスが、ノイズによって対称性の破れを生み出すノイズ励起転移(noise-induced transition)の構造を有する

ことを見出した(Phys. Rev. Lett 2011 掲載)。ノイズ励起転移はノイズによりマクロな対称性の破れが引き出されるため、その振る舞いはノイズによって情報が増幅されるととらえることもできる。この結果は、ノイズを最大限抑制する工学的な情報処理の戦略と、ノイズを活用して情報を増幅する(ように見える)生体システムの情報処理戦略とは、必ずしも背反するものではなく、同じ現象の別の側面に対応する双対的關係があることを初めて明らかにしている。成果(2)における動的な情報符号化と、このノイズ励起現象と最適復号との双対關係は、生体システム特有の動的情報理論の基礎となる重要な進展であると言える。

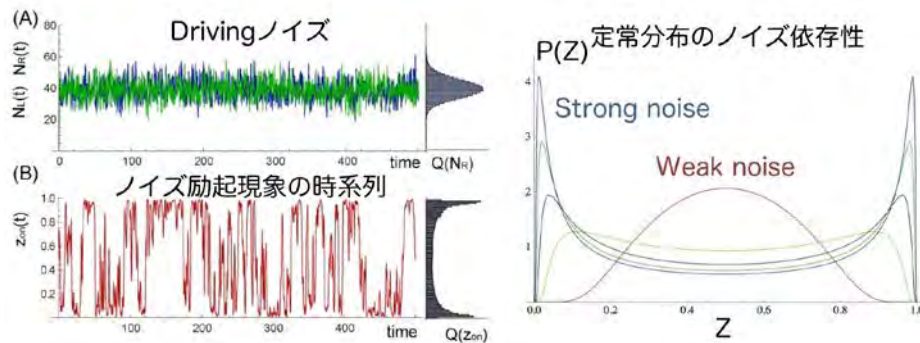


図3 最適復号ダイナミクスにみられるノイズ励起による対称性の破れの時系列(左)とノイズ強度依存的な定常分布の変化(右)

#### (研究成果4) 情報埋め込みによるロバストな確率的信息処理の実現とその工学応用

本研究では主にシャノンの情報理論の枠組みを生体システムの情報処理に対応させ、不確定性・確率性の存在下で適応性を実現する機構を探索してきた。そこから一見ノイジーなシグナルからでも情報を複合することが可能であることが明らかにされた(成果(1))。そして、時系列情報理論の手法を用いて情報の流れを解析することにより、その原理は情報がシグナルの瞬間的な状態にではなく、時系列全体に埋め込まれ、したがってシグナルに一見情報が存在しないように見えていることが明らかになった。このメカニズムは、生体システムにおいて、確率的な素過程からシステム全体の安定性やロバスト性を作り出す原理の一つであると考えている。

と同時に、生体システムの情報処理は、通常のシャノン情報理論の情報伝送の枠組みだけに収まらない側面もある。その一つは、細胞内システムでは工学システムとは異なり情報の伝送と演算は明確に分離されておらず、この両者が確率性を有する細胞内反応で同時に実現されているという事実である。この差異と時系列の情報埋め込みに着想を得て、これまでの研究成果を応用し、ノイジーな環境下で論理演算を実現する物理機構を提案した(論文投稿中)。比較的単純な構造でシステムに内在する確率性にロバストな演算が実現でき、かつこれまでの確率共振などに基づいたノイズ援用型の演算システムよりも、シグナルノイズへのロバスト性だけではなく、パラメータ不定性へのロバスト性など応用面で大きな優位性を持ちうることを明らかにした。実際の物理実装の問題などを解決する必要があるものの、生体システムの情報処理を野横断的に応用する一つの方向性を示す結果であると考えられる。

### 3. 今後の展開

本研究で構築された理論は既存の実験データや分子生物学的知見と整合することが示されたが、直接的な実験検証にまでは至っていない。細胞走性などの定量解析が可能な系を対象とし

た検証が次の課題である。また更に踏み込んで、情報の埋め込みによって生体システムが確率的環境下においてロバスト性実現している、という仮説の実証を目指したい。

本研究では理論の基礎を作るため、細胞の運命決定や走化性など基礎生物学的現象を具体的対象として理論を作り上げた。しかし、このアプローチは他の系にも適応できる。免疫系やエピジェネティクス、神経系などは応用性もありかつ、生命現象として情報処理という側面が強く影響することから、今後これらの複雑生体现象への本理論の発展も期待できる。

数理的側面から見ると、今回はおもに確率環境下における情報の伝達を中心に理論を発展させた。しかし、実際の生体现象はその情報を用いて自己の状態を制御する恒常性の問題もある。制御と情報の循環関係から数理的扱いは格段に難しいものの、今後、生体システムにおける情報の流れと制御の関係も取り組む必要がある。このような制御と情報の関係の重要性は近年非平衡力学の分野において、確率熱力学、情報熱力学として別の側面から理論が進んできている。本研究の理論とこれら非平衡理論との融合により、情報処理や制御に加え、情報処理や制御に必要とされる(自由)エネルギー的な物理量との関係や物理限界も明らかになるとと思われる。生体システムは人工システムと比較しエネルギーを効率的に利用しているとしばしば言われるが、その機構について厳密な理論はない。本研究の理論などを土台に生体システムの動的情報処理の理解が進展すれば、その知見を工学的に応用する方向性も開かれると期待できる。

#### 4. 自己評価

本研究課題は、適応性・合目的性という生体システムに共通して見られる機能性、特に情報処理の最適性に注目することにより、分子生物学的アプローチだけでは得られない視点や予測を理論的に導き出す試みである。したがって、研究は「生体システムは最適もしくは最適に近い状態で情報処理を行なっている」という仮定に立脚しており、推定理論などを活用して本研究で理論的に得られた結果が、実際の生命現象に対応する保証は研究開始時点では全くの未知数であった。しかしながら、成果 1～3 で明らかになったように、本理論で導かれる結果は、当初の予想以上によく既存の分子生物学的知見と対応し、また物理パラメータなどの定量的な情報との整合性も高いことがわかった。この結果は、全てではないにしろ、生体システムの情報処理機構は進化の過程で最適化されており、情報処理の最適性という側面から理論的に豊富な知見が得られうることを例証することができたと考えている。

また、研究後半の課題としていた生体システム特有の情報処理機構を理論に取り込むステップにおいても、想定していた以上に既存の情報理論と生体情報処理が融和し、双方に発展的な知見が得られた(成果 3,4) ことは期待以上であった。特に、ノイズ励起現象と情報理論に基づく最適情報処理との関連は全く想定外の結果である。そして、これら研究の一つの帰結として、なぜ生体システムは不確定性と確率性の中で巧みに振る舞うことができるのか? という茫漠とした問いを、時系列などの高次元空間に情報を埋め込むことを活用している、という具体的な作業仮説に落としこむことができたことは、今後この問題を理論的・実験的に解決・検証してゆく上で、決定的なステップであったと思っている。

情報理論の分野から見ると、情報の高次元空間への埋め込み自体は必ずしも新しい概念ではない。しかし、時間因果性やリアルタイム性、動的なセンシング、確率シグナルを用いた情報演算など、情報理論では掘り下げられていない生命情報処理特有の特性が加わることにより、新たな発展の可能性が見出された。そして、それをもとにしてノイズにロバストな論理演算系を提案

できたことは、生体情報理論が生物現象の理解や制御だけではなく、他の分野にも貢献しうる可能性を示せたと考えている。

集団情報処理など既存の情報理論との乖離が大きい問題について、本研究課題期間中に具体的な成果に至らなかったことは残念に思っている点である。しなしながら、解決すべきポイントは研究期間中に見出すことができているため、今後の課題としたい。理論の実験検証についても研究期間中には具体的に手が付けられなかった。しかしむしろ、理論面に集中したおかげで、独自のアプローチとして確立する程度に深い部分まで研究を進展させることができたと思っている。実験検証もこれからの課題と位置づけたいと思っている。

## 5. 研究総括の見解

本研究では、環境や細胞内の素過程にはゆらぎや不確定性が存在するにも関わらず、細胞は環境からのシグナルを巧みに処理しゆらぐ環境変動に対して適応的・合目的に振る舞っていることに注目し、統計推定と学習理論を元に情報処理の観点からトップダウン的に捉える理論的枠組みを構築することを目的とした。まず、ノイズを含むシグナルから細胞外の環境情報を復元する基本的な反応機構に狙いを定め、逐次ベイズ推定理論を用いてシグナルを最適に処理する力学系を導出した。この力学系は自己触媒的な化学反応式の形をしており、最適ナリガンド情報の復元が生化学的に実現できることを示唆した。さらに、他の様々な情報伝達系を対象として理論を発展させ、処理機構が進化の過程で最適化されているという仮説を例証した。これら一連の研究は世界的にも先例のない独創的な試みであり高く評価できる。また、「定量生物学の会」を創り若手研究者の間で積極的な情報発信や相互研鑽を行っており、この分野のリーダ的存在として活躍していることも特記される。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. T.J. Kobayashi, " Implementation of Dynamic Bayesian Decision Making by Intracellular Kinetics " Physical Review Letters (2010), 104, 0228104                                       |
| 2. T.J. Kobayashi, " Connection between noise-induced symmetry breaking and an information-decoding function for intracellular networks " Physical Review Letters, (2011) 105, 0228101 |
| 3. T.J. Kobayashi & A. Kamimura " Dynamics of Intracellular Information Decoding " Physical Biology, (2011) 8, 55007                                                                   |
| 4. T.J. Kobayashi & A. Kamimura " Theoretical aspect of cellular decision-making and information processing " Advances in Experimental Medicine and Biology, (2011) 736, 275-291,      |
| 5. 小林 徹也、上村 淳,「確率的細胞システムにおけるベイズ情報処理」 生物物理 印刷中                                                                                                                                          |

### (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)

- Tetsuya J. Kobayashi, “Implementation of Bayesian Decision-Making by Intracellular Kinetics”, International Conference of Systems Biology 2010, 2010, Edinburgh, UK , 10/11-14
- Tetsuya J. Kobayashi, “Bayesian information decoding by a cell”, International Conference of Noise and Fluctuation 2011(ICNF2011), 2010, Ryerson University, Toronto, Canada 6/12-6/16
- Tetsuya J. Kobayashi, “Noise-Induced Symmetry-Breaking Underlies Reliable and Flexible Cellular Decision-Making”, European Conference on Mathematical and Theoretical Biology(ECMTB2011), 2011, Jagiellonian University, Kraków, Poland, 6/28-7/2
- Tetsuya J. Kobayashi, “Bayesian Approach for Cellular Information Processing”, Dynamic Days Asia Pacific 7, 2012, Taipei, Taiwan, 8/5-9
- 小林徹也, ポスター賞, 独)科学技術振興機構 CREST「生命システムの動作原理と基盤技術」, 2010, 6/1.

# 研 究 報 告 書

## 「環境適応から解き明かす代謝ネットワークの設計原理」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: 竹本 和広

### 1. 研究のねらい

代謝とは生体内で行われる一連の化学反応であり、それはしばしばネットワーク(代謝ネットワーク)として表現されます。生物は、長い進化過程において代謝系を変化させることで様々な代謝物を合成し、環境に適応してきました。このような代謝物組成の決定や代謝ネットワークの形成に働く原理を明らかにすることは、適応進化の理解や生命現象の制御において重要です。しかしながら、その設計原理は代謝ネットワークの複雑性のため依然として不明瞭です。本研究では、代謝ネットワークを定量的に再現する単純な数理モデルを構築し、データ解析を通して代謝ネットワークの形成機構や環境との相互作用に関する様々な知見を抽出することを目指しました。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

代謝ネットワークは酵素による化合物の変換をモデル化したものであり、様々な側面から代謝を解析・モデル化することができます。本研究では代謝の形成と適応に注目し、いくつか課題に分割して解析・モデル化に取り組みました。

まず化合物に注目し、「どの生物がどの代謝物をもつのか」という代謝物種間分布の構造を明らかに、その構造の獲得機構をモデル化しました。

次に酵素に注目し、熱ショックタンパク質のひとつである GroEL の要求性と代謝ネットワークの位置には特徴的な分布パターンがあることを見出しました。比較ゲノム解析も併せると、GroEL が代謝ネットワークを拡張させるという興味深い仮説を得ることができました。

最後に、代謝ネットワーク全体に注目し、環境との相互作用を議論しました。このために生育環境の多様なアーキアの代謝情報と生態情報を収集・整理しました。このデータを用いて、広く支持されるモジュール性の環境変動性仮説に例外があることをデータ解析から示しました。これと並行して、代謝ネットワーク構造を記述する数理モデルを構築し、環境変動性を仮定しない場合でもモジュール性が再現されうること示しました。これらの結果は環境変動性仮説に疑問を投げかけます。そこで本研究で得られた最新の代謝情報を用いて、この仮説を再検証しました。結果として、環境変動性仮説は結論づけられず、環境相互作用のひとつのパラダイムに再考の余地があることを示しました。

#### (2)詳細

研究テーマ A「代謝物種間分布における特徴的なパタンの発見とそれを記述する数理モデルの構築」

代謝物種間分布とは「どの生物がどの代謝物を持つか」を記述し、一般に二部グラフとして

表現されます。生物は環境に応じて特異的な代謝物を利用・合成していると考えられているため、この分布を考えることは重要です。ここでは例として、植物における二次代謝物の一種であるフラボノイドに注目しました。これらの代謝物は例えば昆虫の誘引と防御に関連しており、結果として、植物は環境に応じて特異なフラボノイドを持つと考えられています。

データ解析の結果、代謝物種間分布には、不均一性（生物がもつ代謝物の数や、代謝物の種間での保存度は正規分布で記述できない）、入れ子構造（ある生物の代謝物組成は他の代謝物の部分集合である傾向）やモジュール構造（特定の代謝物をもつ生物種がいくつかのグループに分けられる傾向）といった特徴的なパターンがあることを見出しました。この構造パターンの起源を説明するための簡潔なモデルを与えました。形質（この場合、代謝物組成）の継承と分岐といった一般的な進化過程から、不可避免的にこのような不均一な分布パターンが生成されていることを示しました（論文 1）。

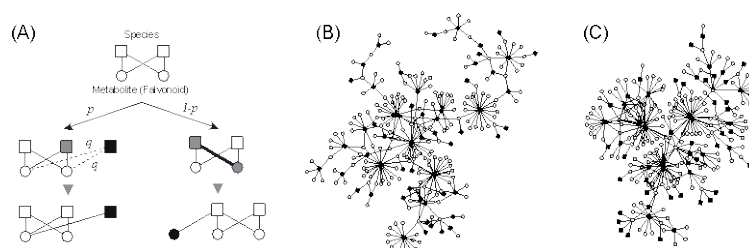


図1 モデルの概念図(A)、実データ(B)とモデル(C)における代謝物種間分布の比較

#### 研究テーマ B「シャペロニン GroEL を介した代謝ネットワーク拡張仮説の提唱」

シャペロニンとはタンパク質の折り畳みを手助けするタンパク質（シャペロン）の一種で、大腸菌由来の GroEL がよく調査されています。近年、この GroEL によって折り畳みが手助けされるタンパク質（GroEL 基質）が網羅的に同定され、それらの多くは代謝酵素です。これは GroEL が代謝系において重要な意味を持つことを示唆しますが、その詳細は不明でした。

そこで、代謝系における GroEL の役割を考察する第一歩として、GroEL 基質の代謝ネットワーク上での分布を調査しました。すると、折り畳みに GroEL を必要とする酵素（タンパク質）は GroEL を全く必要としないそれに比べて、代謝ネットワークの周辺（外側）に分布することが分かりました（図2A）。この分布傾向はタンパク質存在量など、タンパク質固有の性質から単純に説明することができないため、別の解釈が必要となります。

比較ゲノム解析から、GroEL を必要とする酵素は（必要としないそれに比べ）種間での保存度が低く、それらは比較的最近になって獲得された（進化的に新しい）ことが示唆されました。これらの結果から、GroEL によって酵素の多様性が促進され、結果として代謝ネットワークが拡張されたという仮説が導かれます。この GroEL によるネットワーク拡張を考えると先の GroEL 基質分布傾向は簡単に説明できます（図2B）。

GroEL を含むシャペロンが進化を促進させる（多様性をもたらす）役割を果たすという仮説は幾つかの先行研究によって実験的に示されています。今回提案した仮説はこれらの実験結果によって支持され、これはシャペロンが代謝の進化に関与するより具体的な形になります。

研究成果は論文 2 で報告しました。

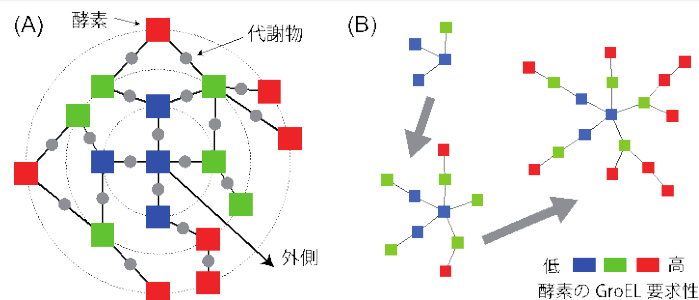


図2 大腸菌の代謝ネットワークにおける GroEL 基質酵素の特徴的な分布パタン概念図 (A)とその獲得メカニズムの仮説(B)。

研究テーマ C「代謝ネットワーク構造を記述する数理モデルの構築と環境相互作用理解への応用」

環境適応を考える場合、アーキアはとても興味深いドメインです。なぜなら生育環境とても多様だからです。例えば、生育温度に注目すると、多くの生物は常温で最もよく成育しますが、アーキアには 100℃以上の極限環境で最もよく成育する生物が多く存在します。

これまで、アーキアはその特殊性からその生体情報は未知でしたが、近年遺伝子操作系が確立したことにより、飛躍的に理解が進んでいます。そこで、文献調査から、アーキアの代謝経路を整理し、代謝情報を大幅にアップデートしました。加えて、生育条件(生育温度、生育 pH、酸素要求性など)についても整理を行いました。

これらのデータを用いて、代謝ネットワークと環境の相互作用におけるある仮説について議論しました。

一般に「生育環境の広さ(環境変動性)は代謝ネットワークのモジュール性を増加する」という仮説が広く支持されています。これは「システムの目的の変化(つまり生育環境の広さ)がモジュール性をもたらす」という先行する理論研究に触発されています。更に、バクテリアの代謝ネットワークのデータ解析からもそれを支持する先行研究も存在します。

しかしながら、アーキアにおいては環境変動性が低い(限定された場所でしか生きることができない)ため、上記の仮説は適用できないことを見出し、むしろ生育温度や栄養要求性などの単純な生育条件によって説明できることを明らかにしました(論文 3; 図3A も参照)。

この結果はシステムの目的の変化(ある生物の生育環境の広さ)がモジュール性の獲得に必要な場合があることを示唆しています。そこで、システムの目的の変化の仮定しない(中立に成長する)ネットワークモデルを提案し、様々な生物種(アーキア、バクテリア、真核生物)の代謝ネットワークのモジュール性が単純な進化過程からも再現されうることを実証的に示しました(論文 6; 図3B も参照)。

これらふたつの結果は、広く支持されている「環境変動性が生体分子ネットワークのモジュール性を増加させる」という仮説に疑問を投げかけます。そこで、整理した代謝情報を用いて、この仮説を再検証しました(投稿中)。結果として、環境変動性と代謝ネットワークの間に正の相関は結論づけられず、上記の仮説を支持することは難しいことを示しました。更に、先行研究で報告された正の相関は利用可能な代謝情報の欠損(データの精度)に由来することを示し、代謝ネットワークと環境の相互作用についてはより慎重な議論が必要であることを主張

しました。

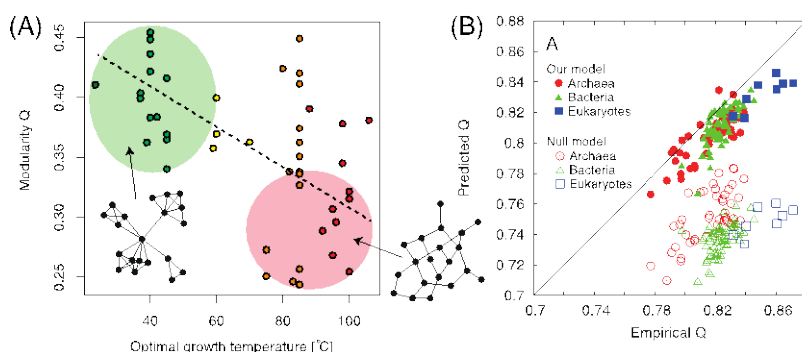


図3 (A)最適生育温度と代謝ネットワークのモジュール性スコア(Q 値)の負の相関、(B)モデルと実ネットワークにおけるQ 値の比較

### 3. 今後の展開

代謝ネットワークの形成と環境相互作用について、数理モデルとデータ解析の側面から取り組んできました。上記の成果については個別の論文の他に総説(論文4)や書籍の中(論文6)で周辺研究と共にまとめ、今後いくつかの展開を考えています。

研究テーマ A におけるモデルは様々な二部関係に応用できる可能性があります。KNAPSAcK Family では化合物とその生理活性など、様々な階層での二部関係が利用可能です。これらの二部関係の構造を調査し、その形成メカニズムを記述することで、遺伝型から表現型までをつなぐ数理モデルの構築を目指したいと考えています。

研究テーマ B においては、シャペロニン GroEL の基質に関する新たな仮説を導くことができました。この仮説を確かめるための実験が開始されており、実験的な側面からも GroEL(加えて、より一般的なシャペロン)の生体システムにおける役割をより明確にする予定です。

研究テーマ C に関しては、未発表の結果を発表した後、開発した手法を発展させ、更に広義の生物-環境相互作用についても研究を行います。代謝ネットワークの形成や適応、そして動態を理解するためには、生育環境だけではなく、種間の相互作用も考える必要があるからです。特に、多様な生物種の代謝ネットワーク膨大な情報から、生物-環境相互作用を理解しやすいかたちで抽出・定量化するための解析基盤の確立し、環境・医学分野でのより現実的な応用につなげたいと考えています。

### 4. 自己評価

生体分子ネットワークと環境の相互作用について議論してきました。兼ねてから指摘されていた代謝データ(特にアーキアの)の不備を改善することで、その理解が一層進みました。「モジュール性の環境変動性仮説」を適用例にして議論を進め、データ解析の側面からも数理モデルの側面からも興味深い結果を得ることができました。特に、環境変動性仮説に対して建設的に問題提起できたことは大きな成果であると考えています。それというのも、代謝ネットワークの環境変動性仮説は広く支持され、それに基づいて環境相互作用が議論されているからです。この結果は、多くの先行研究に再考を迫る成果です。

代謝物種間分布に関しては、他の階層における二部関係にも応用が可能であると考えています。事実、送粉系ネットワークにも適用可能であることを示しており、様々な階層における二

部関係(例えば、薬剤-標的タンパク質、化合物-生理活性)に応用できる数理モデルを構築できたと考えています。

更に、予想外の発展もあり、研究テーマ B が加わりました。環境適応のひとつである熱ショック応答の関連から、シャペロニン GroEL(熱ショックタンパク質のひとつ)と代謝ネットワークの進化について、新しい視点から仮説を導くことができました。この結果から、実験グループに新しい方向性を示すことができ、実験検証にもつながりました。実験的な証拠が得られれば更にインパクトのある成果につながります。

## 5. 研究総括の見解

適応進化の痕跡が深く刻まれている代謝ネットワークは、遺伝子、酵素、化合物が複雑に絡み合って構成されているが、その設計原理は未だ明らかになっていない。本研究は、代謝ネットワークの形成機構や環境との相互作用を生命情報学と数理モデルを駆使して解明することを目指した。まず、代謝物の種間分布に注目して、入れ子構造やモジュール構造などの特徴的なパターンを見出し、それを説明する有用なモデルを構築した。次いで、代謝ネットワークにおいて広く支持されてきた環境変動性仮説に対し、アーキアにおいてはその仮説が適用できないことを明らかにした。さらに、様々な生物種の代謝ネットワークのモジュール性が環境変動によらない単純な進化過程を記述する数理モデルを用いて定量的に説明できることを示したことは優れた成果であり高く評価できる。また、環境適応の一つである熱ショックタンパク質シャペロニン GroELに関心を広げ、これが代謝ネットワークの進化に積極的に寄与することを明らかにしたことも評価できる。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Takemoto, K. Global architecture of metabolite distributions across species and its formation mechanisms. *Biosystems*. 2010, 100, 8-13
2. Takemoto, K., Niwa, T. and Taguchi, H. Difference in the distribution pattern of substrate enzymes in the metabolic network of *Escherichia coli*, according to chaperonin requirement. *BMC Systems Biology*. 2011, 5, 98.
3. Takemoto, K. and Borjigin, S. Metabolic network modularity in Archaea depends on growth conditions. *PLoS ONE*. 2011, 6, e25874
4. Takemoto, K. Current understanding of the formation and adaptation of metabolic systems based on network theory. *Metabolites*. 2012, 2, 429-457
5. Takemoto, K. and Oosawa, C. Modeling for evolving biological networks. In *Statistical and Machine Learning Approaches for Network Analysis* (eds. Dehmer, M. and Basak, S.C.), John Wiley & Sons, 77-108 (2012)
6. Takemoto, K. Metabolic network modularity arising from simple growth processes. *Physical Review E*. 2012, 86, 036107

### (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)

学会発表(口頭)

Takemoto, K. The effect of growth conditions on metabolic network modularity in prokaryotes. The 13th International Conference on Systems Biology (ICSB2012), 34 (20 August 2012, Toronto, Canada).

受賞

The Eighth Asia Pacific Bioinformatics Conference Best Poster Award (2010 年 1 月)

## 研究報告書

### 「歴史統計を活用した非特異的感染症対策の予防効果推定」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 西浦 博

#### 1. 研究のねらい

20 世紀以降、世界中の先進国で感染症による死亡者数に激減を認めてきた。その背景要因には、衛生状態や栄養状態の改善や医療の充実が挙げられることが多い。また、より頻繁に言及される理由として、ワクチンや抗菌薬の開発など病原体に特異的な予防・治療法の発展が挙げられる。天然痘根絶計画やポリオ根絶活動・麻疹撲滅運動に代表されるように、予防接種はそれが対象とする感染症の罹患リスクを劇的に減らしめることが知られている。特異的な感染症対策に万全を期すため、これまでに様々な疫学的研究を通じてワクチン効果が推定され、さらに、数理モデルを利用した最適な予防接種計画の構築が行われてきた。また、予防接種に関連する数々の理論的問題の数理的定式化は、これまでに感染症数理モデルが広く公衆衛生の現場で活用される素地を形成することに役立てられた。

予防接種のような特異的対策に関する実用的な理論研究が充実を極める一方、非特異的な感染症対策（検疫や隔離などの公衆衛生対策）については未解決の理論的課題が山積している。例えば、ワクチンは「どの程度、効くのか」について数値で回答することが可能である案件が多いが、こと隔離について考えたとき、特定の条件下で「隔離がどれくらいの 2 次感染を防げるのか」という点について全く定量的に明らかにされてこなかった。予防接種は感染症対策の核の 1 つではあるが、これまでに見られたことのない新たな感染症の流行拡大を防ぐためには、検疫や隔離、接触者を追跡する疫学的調査などといった非特異的な（非医学的な）公衆衛生対策を駆使することが求められる。そこで、本研究は、過去の膨大な感染症流行の統計資料を利用して、個々の非特異的対策の有効性を定量的に明らかにすることを第一の目的として実施された。観察されたデータの疫学的生成過程に基づいて数理的定式化を行いつつモデルを構築し、予防効果の統計学的推定はもちろんのこと、推定作業や流行予測に必要な観察データの種類と特性（データギャップを含む）について分析・研究を行ってきた。また、インフルエンザパンデミック（H1N1-2009）が研究途中で大規模に拡大したため、そのリアルタイム研究もさきがけ研究の一環で実施した。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

数理モデルを利用した非特異的対策の効果推定のために、研究を次の 3 点に段階的に分けて検討した。1 つ目は研究手法にこだわらず、目の前にある観察データの統計学的分析を行ない、データ生成過程を捉えたモデリングをする時のパラメータ推定値を提供する段階である。この際、単純な確率過程や推定モデルだけでなく、発見的な（heuristic な）モデル構築に基づくシミュレーションによって、特定の流行対策（例、渡航禁止によるパンデミックの地理的拡大防止）の効果検討を行なった。2 つ目は、家庭内伝播や集

団災害など特別な伝播条件に着目した数理モデリング及び非特異的対策の効果を検討する段階である。ある個体の感染症のリスクはその個体が所属する集団の他の個体のリスクに依存しており、伝播に強い異質性を認めるときはヒト集団全体のリスクの統計学的分布を定量化することに困難を伴う。そのため、初感染者の侵入に条件付けした上で感染リスクを検討することができる家庭内データなどは非常に特異的であり、様々な統計学的分析が可能となることを実践的研究を通じて示した。3つ目は、非特異的対策の評価を目的とする数理モデルを利用した研究デザインの最適化および最小サンプルサイズの推定を行なう段階である。確率モデルを用いることにより、集団全体で1つの流行を通じて感染するリスクの分布および実験動物における伝播実験での感染リスクの分布を解析的に明らかにし、それを基に伝播能力（基本再生産数）の比較のために必要なサンプルサイズの推定の枠組みを提案した。再生産数の差の仮説検定が可能なサンプルサイズは、非特異的対策によって2次感染者数がどの程度だけ相対的に減少したのかを明示的に推定することに役立てることができる。

## （２）詳細

研究テーマ A「非特異的対策の効果推定のための定量的データ分析とシミュレーション」

パンデミック 2009 流行途中に収集されたデータの統計学的分析を行なった。非特異的対策の対象として、検疫に含まれる国境検査（Border screening）を第1に検討した。日本では、機内検疫や停留をはじめ、パンデミック封じ込め期に国境での感染者探しとその対応が行なわれた。特に、発熱者のスクリーニングにサーモスキャナが用いられた。図1は成田空港検疫所によって収集された流行中の成田空港使用旅客者中の体温を検討した結果である（ $n=1049$ ）。発熱者を探知するためのサーモスキャナの感度と特異度は、それぞれ50.8–70.4%および63.6–81.7%と推定された。全旅客中の発熱患者が少ないため、サーモスキャナの発熱陽性的中率は37.3–68.0%と低く推定された。結果として、サーモスキャナに依存した発熱スクリーニングのみによってインフルエンザ感染者の入国検査に効果を期待することが困難であることが示された（BMC Infect. Dis.に掲載）。

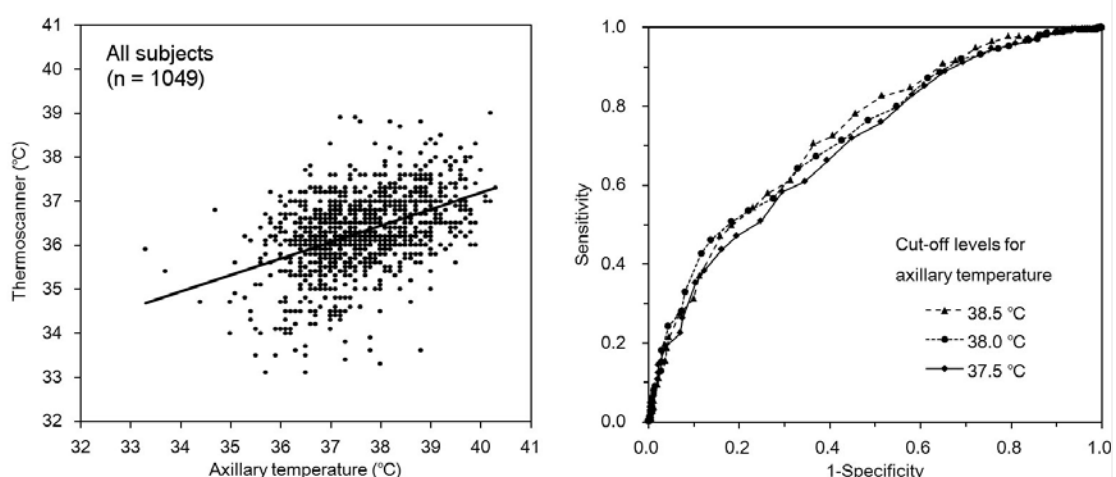


図1 パンデミック 2009 中の成田空港使用旅客の体温. (左) 腋下体温とサーモスキャナ推定体温の比較, (右) サーモスキャナによる発熱予測の Receiver Operating Characteristic 曲線

同様の定量的研究を積み重ね、空間的な伝播の拡大に関する疫学的メカニズム詳細とそれに対応する個々の流行対策の効果を推定した。得られたパラメータ推定値を利用し、確率モデル（出生死亡過程）を利用した侵入モデルを構築し、それを基に渡航抑制の政策オプションについて期待される人口レベルの効果を描写した。図 2 に、渡航抑制の効果に関する研究成果の一部を示す。インフルエンザ流行を理由に渡航抑制（例、渡航禁止勧告）を実施するためにはその効果が明確であることが政策決定に必須である。これまでに渡航抑制によって流行の遅れ効果を期待するためには渡航者の 9 割 9 分以上を抑制することが必須であると知られてきた。しかし、同知見はランダムな接触を想定したモデルに基づく。インフルエンザの伝播は年齢に強く依存するため、伝播頻度の高い子どもの渡航を禁止した方が成人の渡航を禁止するよりも効果的であると期待される。そこで、多変量出生死亡過程を利用して、流行の遅れ効果をランダムな渡航抑制の場合と子どもを優先的に渡航抑制した場合とで比較した。子どもを優先的に抑制すると、数日だけランダムな場合より遅れ効果が長いと考えられたが、成人間の伝播頻度が無視できない限り流行抑止は期待できず、子どもの渡航を完全に抑制してもパンデミックは不可避であると考えられた。

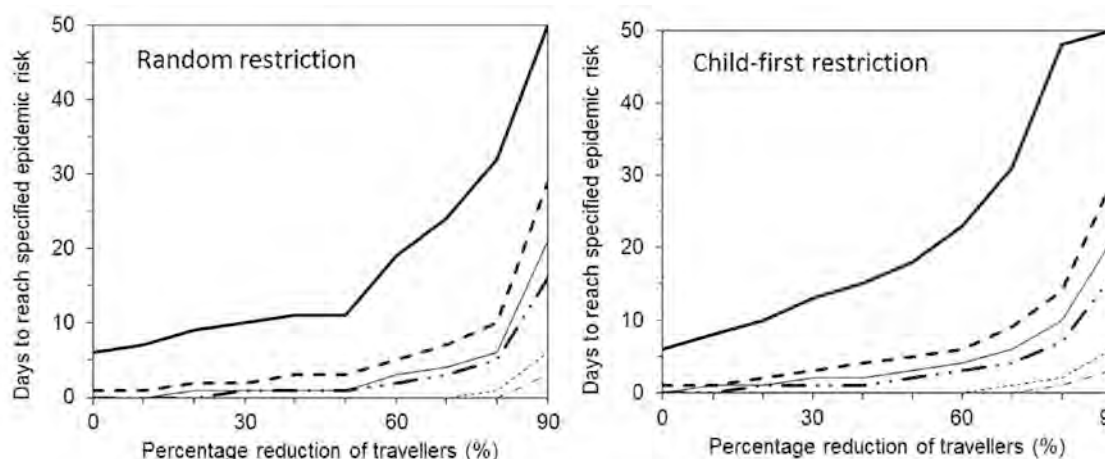


図 2 渡航抑制による流行発生の遅れ効果の比較. (左) ランダムな旅客の抑制, (右) 子どもの国際渡航の優先的な抑制.

研究テーマ B「家庭内や集団災害など特別な伝播条件を考慮した非特異的対策の分析と数理モデル化」

感染症流行データの観察には従属性現象の問題が付きまとうため、伝播に強い異質性を認める場合は大規模な集団のリスクを統計学的に描写することに困難を認める。そのため、集団全体の中で、家庭内伝播や学校内伝播およびコンサートやデモのような個体密集地域での伝播など、特定の伝播条件に注目して伝播動態を定量化し、ひいては、非特異的対策による伝播の相対的減少を分析することが可能である。家庭内伝播のデータは暴露に条件付けした感染リスクを議論することを可能にするため、ワクチン効果推定

など頻繁に統計学的推定に利用されてきた。

本研究プロジェクトにおける歴史統計のメタデータ収集と分析の一環として、インフルエンザの家庭内伝播に関するメタ分析を行なった（図3）。その結果、インフルエンザの家庭内2次感染割合の推定値は3–38%と広く分布し、相当の異質性を認めた。メタ回帰分析に基づく系統的な発見として、異質性の一部は年齢別の感受性の差異に特徴付けられ、さらに、診断バイアスと研究デザインの違いによっても推定値が左右することが明らかにされた（Epidemiologyに掲載）。

また、シミュレーションによって家庭内伝播のデータに基づく非特異的対策の疫学的評価を目的とする研究デザインの最適化およびサンプルサイズの推定研究を行なった。インフルエンザの非特異的対策の観察においては、家庭内で最初の感染者が診断されてから家族構成員を追跡する診断ベース方法(ascertainment based method)がコホート調査よりも少ないサンプルサイズと研究資金で観察が可能であることを示した。また、集団災害を想定した観察データの分析手法と非特異的対策のモデリングについて総説を報告した（BMC Medicineに掲載）。

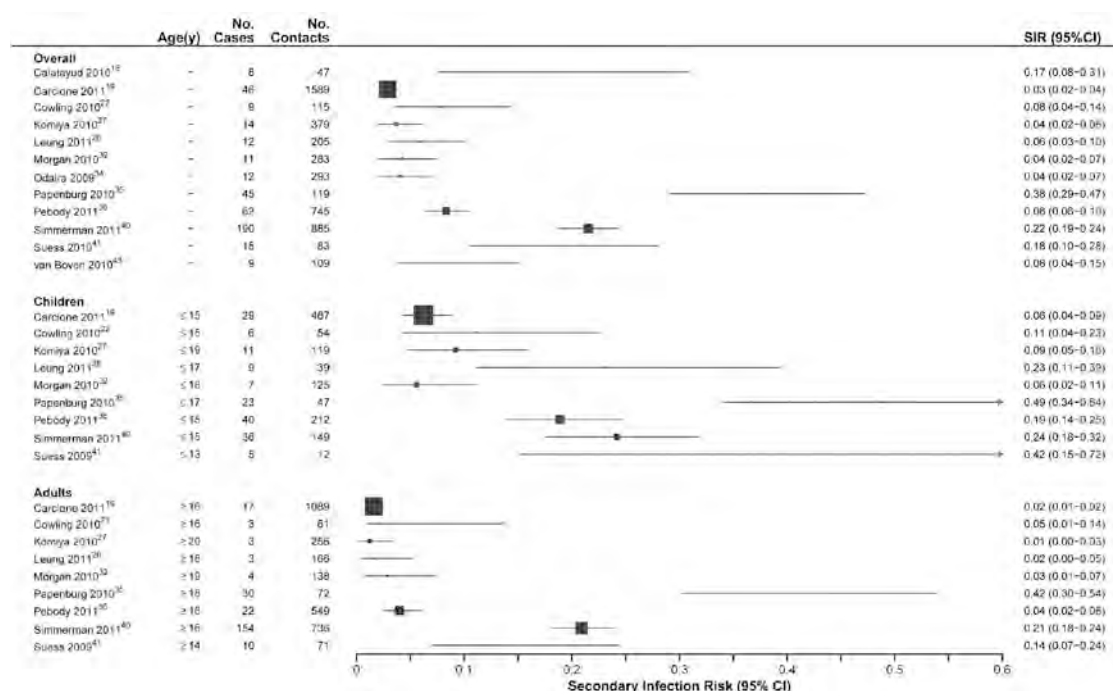


図3 インフルエンザH1N1-2009の家庭内伝播リスクに関するフォレストプロット  
(Epidemiologyの図を改変して使用)

研究テーマ C「非特異的対策評価を目的とする数理モデルを利用した研究デザイン及びサンプル数の推定」

観察データに基づいて非特異的対策の効果を推定する際、2つの観察問題に注意しなければならない。1つ目は、感染症を予防する上では感染というリスクを取り扱うことが不可避であるが、1人の個体における感染リスクが他の個体のリスクに依存しているという

ことである（従属性現象）。そのために、個体の属性や接触などを明らかにした上で伝播過程を正確に捉えた数理モデルが必要となる。2つ目は、同特徴があるために、感染リスク、或いは人口中の感染者割合の分布は従属性現象を明示的に加味したモデルによって与えられるということである。言い換えるならば、小規模な人口中の感染者割合は2項分布によって近似され難い。

2つ目の問題に対処するために、2つの確率モデルを用いた研究を行なった。1つは、集団全体で1つの流行を通じて感染するリスク（最終規模）が従う分布を利用した最小サンプルサイズの推定である（図4）。例えば、特定の流行対策を実施した集団とそうでない集団の最終規模を比較するために、同推定手法を利用することが可能である。もう1つは、実験動物を利用した伝播実験に必要なサンプルサイズの推定である。特定の伝播能力の下で、1サンプルあるいは2サンプル実験において特定の基本再生産数よりも当該病原体のそれが大きいのか否かを仮説検定によって比較するためには確率モデルを解析的に解くことによって同問題に対処することが必要である。集団全体のサンプルサイズ推定をインフルエンザ H1N1-2009 に応用した結果、これまでに行なわれてきた血清疫学的調査に基づく研究の最終規模は95%信頼区間が相当に広く推定され、基本再生産数の精緻な比較ができないことを明らかにした。同様に、小規模流行のデータ生成過程を分岐過程を利用してモデル化し、クラスター分布に基づく再生産数の推定手法を提案した。同モデルを肺ペストの歴史統計に応用した結果、基本再生産数が他の手法を利用した推定値と同程度の1.1-1.4の範囲で推定されることを明らかにした（J. Theor. Biol.に掲載）。また、インフルエンザに特徴的な患者発見の診断バイアス（Ascertainment bias）と推定モデルの構築のあり方について、致命割合（case fatality）の推定問題を課題に議論した（Lancet Infect. Dis.に掲載）。

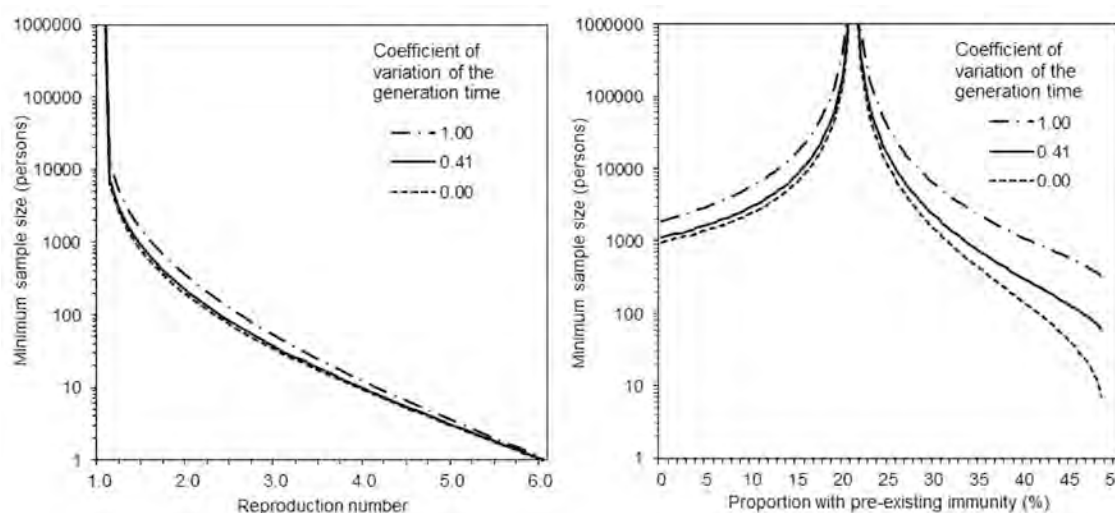


図4 血清疫学的調査によって伝播能力の有意差を示すために必須となる最小サンプルサイズ。(左) 特定の基本再生産数との有意な差を証明するためのサンプルサイズ。(右) 基本再生産数が1.4のときに流行前の免疫保持者の割合の関数として最小サンプルサイズを検討した結果。

### 3. 今後の展開

非特異的対策の範囲が膨大なため、研究期間中に予定していた(i) 隔離の効果を推定するモデルと(ii) 非特異的対策の数値モデリングの総説が完了しなかった。しかし、その他の課題はパンデミックの発生・対応にも関わらず概ね計画通りに論文として報告することができた。残った細目課題については一日も早く報告ができるよう優先項目として近未来に取り組む予定である。

また、私的には、データ生成過程に基づいた感染症流行データのモデリングと定量的研究について概説的にまとめた入門書をさきがけ研究期間中に出版する予定であったが、原著研究で多忙を極めたために教育的価値のある満足のいく書を期間中に出すことができなかった。これも喫緊の課題として研究修了後に検討しているところである。さらに、有用なデータで公開可能なものは今後公開データベースとして専門家間で共有することを予定している。

今後もデータ生成過程に基づく研究アイデアの発掘とモデル構築、および数値モデルを利用した感染症流行データの定量的分析に取り組む予定である。感染症流行対策の政策決定に資する研究成果をリアルタイムで提供できるよう系統的な研究体制を日本国内に整えたい。

### 4. 自己評価

さきがけ研究の目的は、これまでに定量化されたことのない非特異的な感染症対策のモデル化を行い、歴史統計データを有用な資料として使用しつつ、個々の対策の効果を具体的な数値として記述し、それら過程を通じてデータギャップを特定しつつ今後の研究デザインに役立てるということであった。本研究内容には先行研究がほとんど存在しなかったため、研究手法・方法論を抜本的に自身だけで構築する段階から研究を開始した。特に、既存のデータや流行途中のパンデミック H1N1-2009 のデータとにらみ合いながら、データ生成過程と既存の数値モデルの間のギャップを何度も考え、明示的なものも発見的なものも含めて数値モデル・統計モデルを具体的に記述していく原始的な過程を繰り返す根気との戦いが研究時間の大半を占めた。特に、2009-11 年前半までの間は、毎夜インフルエンザ流行中のためにリアルタイムで分析結果を提供する必要に迫られ、眠れない夜中に入国検査 (entry screening) の効果について言語で描写・分類し、その後すぐにそれらを数式で置き換え、最後にシミュレーションや統計学的推定を施す、というような作業をルーチン化・確立し、繰り返してできたことは今後の人生の糧となる独自の研究スタイルの構築に役立てられたと考えている。原著論文の報告に多忙を極めたために、非特異的対策のモデリングに関する総説や定量的な感染症流行データの分析手法に関する入門書の執筆をさきがけ研究期間中に完了することができなかったが、今後それら作業を継続し、新たな研究フィールドとして開拓することによって感染症対策の核を成す政策判断の一助にする疫学的基礎を提供したいと考える。

### 5. 研究総括の見解

医学的知見にもとづく予防接種のような特異的感染症対策はその効果推定や政策策定が基本的に可能であるが、新興の感染症では検疫、隔離、接触者追跡等の非特異的な公衆衛生対

策に頼らざるを得ない場合が多い。そのような非特異的感染症対策の効果を定量的に推定するという、社会的にも極めて重要であるがほとんど先行研究のない課題に挑戦した。その手法として過去の膨大な感染症流行の歴史統計を利用することを発想し、そのため統計資料が豊富な欧州で研究を開始し、その後この分野の研究の世界的拠点である香港に移った。その過程で2009年の新型インフルエンザの世界的流行があり、リアルタイムの分析により政策判断への貢献も行いながら、さきがけ期間中に60件という膨大な論文を執筆刊行した実績は、驚異的な努力と集中力の証といえる。先行研究がなく自ら研究をデザインして、独自の研究スタイルを確立して成果を上げたことは高く評価できる。世界を対象に新たな研究分野を切り開こうという、日本の研究者に望まれているたくましさをもった研究者であり、一層の活躍が期待できる。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Nishiura H, Kamiya K. Fever screening during the influenza (H1N1-2009) pandemic at Narita International Airport, Japan. *BMC Infectious Diseases* 2011;11:111.
2. Nishiura H, Chowell G, Castillo-Chavez C. Did modeling overestimate the transmission potential of pandemic (H1N1-2009)? Sample size estimation for post-epidemic seroepidemiological studies. *PLoS One*. 2011;6(3):e17908.
3. Nishiura H, Yan P, Sleeman CK, Mode CJ. Estimating the transmission potential of supercritical processes based on the final size distribution of minor outbreaks. *Journal of Theoretical Biology* 2012;294:48-55.
4. Lau LL, Nishiura H, Kelly H, Ip DK, Leung GM, Cowling BJ. Household transmission of 2009 pandemic influenza A (H1N1): a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*. 2012;23(4):531-42.
5. Nishiura H, Yen HL, Cowling BJ. Sample size considerations for one-to-one animal transmission studies of the influenza A viruses. *PLoS One* 2013; in press.

### (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)

受賞

第21回 武見奨励賞(公益信託武見記念生存科学研究基金)

# 研究報告書

## 「体内時計に見る植物システムの創発原理」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 福田 弘和

### 1. 研究のねらい

21世紀は植物利用が広まると予想されている。農作物としての植物はこれまでも重要視されてきたが、今後は環境保全のための緑化植物、医薬用原材料となる有用遺伝子導入植物、セラピー用植物、環境浄化植物、代替エネルギーとしてのバイオマス、さらには植物システムの工学的模倣(プラント・ミメティックス)など、多くの植物利用が期待されている。これらにおいて植物システムの数理科学的解明、特に「植物システムの動作原理の数理科学的解明」は、植物生産技術の発展に貢献し、工学応用に対する基盤となり重要である。また、植物は地球上で最も繁栄している種の一つであり、山岳、海辺、砂漠、熱帯雨林など、環境条件が大きく異なっても植物システムの基本構造は変わらない。この構造普遍性は、植物システムが多様な環境適応機能を発するシステムとして理想的であることを意味している。理想的なシステムである植物システムは、独自の創発原理に基づいた自己組織化現象を利用しながら、情報を処理し、環境適応していると思われる。その創発原理を見出すことは、生物の基本原理の解明に貢献すると考えられる。しかしながら、植物特有の自己組織化現象やそれを司る原理(創発原理)を探索する研究はほとんどない。

過去に植物の自己組織化現象がほとんど研究されてこなかった原因は、実験方法が充分でなかったことにある。しかし最近では、植物分子生物学の進展や計測システムの発達の結果、特に体内時計に関わる自己組織化現象が明らかにされつつある。例えば、葉におけるスパイラル波の解析の結果、細胞間の長距離結合を担う葉脈ネットワークの特徴が明らかにされ、また根の先端における縞状の時空間パターンの観察から根端における時計細胞増殖過程について新たな知見が得られている。現在のところ、器官レベルにおける断片的な知見しか得られていないが、断片的な知見を数理モデル用いて繋ぎ合わせ、コンピュータ・シミュレーションを利用することで、個体統合レベルにおける創発現象の発見とメカニズムの解明が可能になると考えられる。

そこで本研究では、体内時計の結合振動子モデルを構築することで、植物特有のネットワーク構造を数理モデル化し、その数理モデルの中に植物特有の創発原理を見出すことを試みる。また、応用研究を積極的に行い、産業利用への可能性を探索する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

植物システムに特有の自己組織化現象やそれを司る創発原理の解明は、植物の高度な環境適応機能の解明とその工学的応用、ならびに植物生産技術イノベーションの視点から重要である。特に、分子機構が解明されその生理的重要性が指摘されている体内時計に着目することは、応用面で大きな利点がある。本研究では、一つ一つの細胞に備わった体内時計が近

接・長距離の相互作用を通じて様々な時空間パターンを形成する様子を解析し、その形成機構を数理モデル化することを目指した。また、外部摂動に対する概日リズムの位相応答に着目し、時空間パターンの制御法についても研究を行った。これにより、植物システムがもつ特有の創発原理を明らかにしつつ、産業利用への可能性を探索した。

## (2) 詳細

### 1) 成長点が生み出す特異的な脱同期パターンの発見

胚や成長点など、形成されたばかりの細胞集団において、「体内時計」はどのように振舞っているのか？「多細胞生物の器官発生」におけるこの基本課題は、最近、ES 細胞や iPS 細胞を用いた研究によって解明の糸口が見出されつつあるが、器官形成過程における時空間ダイナミクスの精密な観察データは得られていなかった。そこで、本研究では植物の根が成長点を半永久的に維持できる「無限成長器官」であることに着目し、器官形成過程における体内時計の振る舞いを明らかにすることを試みた。ルシフェラーゼ遺伝子を用いた時計遺伝子の時空間的な発現解析を行った結果、①根の先端における成長点の体内時計は常に位相のリセットを受けていること、そして驚くべきことに、②その位相リセットの効果は根全体に波及し2階層の“脱”同期パターンを自発形成することが分かった(H. Fukuda, et al., Phys. Rev. E, 2012) (図1)。一つは、根全体の位相がストライプ状に脱同期した「マクロな脱同期パターン(ストライプ波)」であり、もう一つは根の断面内の細胞集団が脱同期する「ミクロな脱同期パターン(シンギュラリティ現象)」である。さらに、その脱同期パターンと根の形態形成(側根の成長点の発生)には明確な関係があることも判明した。

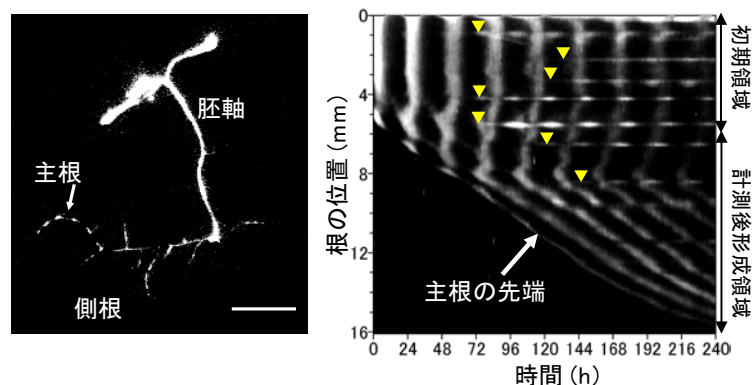


図1 連続暗条件下で成長するシロイヌナズナにおけるルシフェラーゼ発光。時計遺伝子 *CCA1* の発現 LUC 発光解析(左)とその時空間プロット(右)

### 2) 個体レベルの体内時計の挙動解明

本研究者は、さきがけ研究以前に、器官レベル(葉)における体内時計の時空間ダイナミクスの解析に成功していた。そこでは、原形質連絡による細胞間の近接相互作用と維管束系を利用した長距離の相互作用を数理モデルに取り込み、器官レベルでのモデリングにも成功していた。しかしながら、器官同士の同期現象については観察できていなかった。今回、*in situ*における概日リズムの時空間計測に成功し、器官間の同期が自身では維持できないことを示した。

つまり維管束を介した長距離の相互作用が個体全体を同期させるほど強くないことを明らかにした。この実験事実は、個体全体のモデル構築において重要な知見となっている。

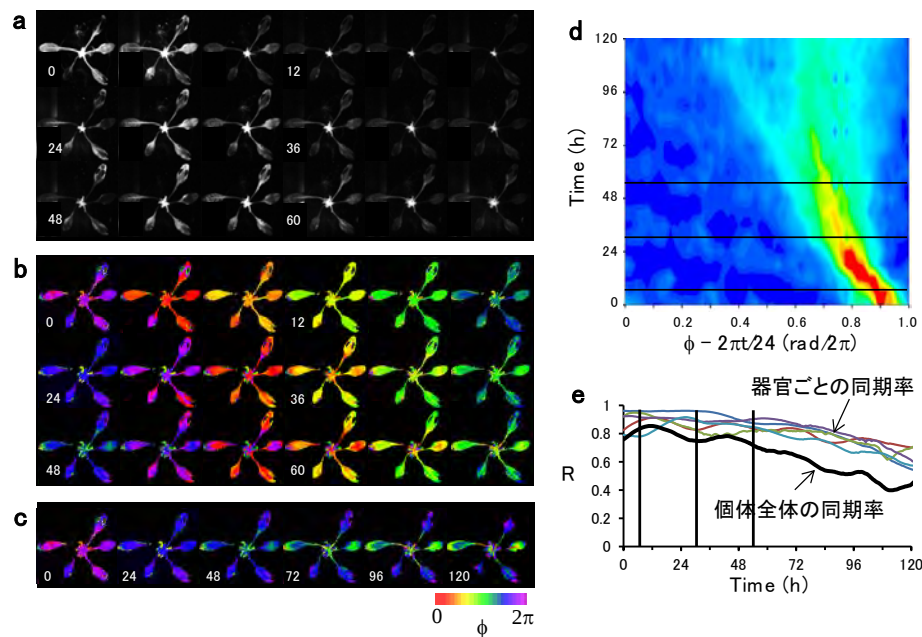


図2 個体レベルにおける *CCA1* の発現レポーター発光と位相イメージ。*CCA1::LUC* 発光(a)と位相(b,c)のスナップショット。(d)位相分布の時間変化。(e)同期率  $R$  の時間変化。

### 3) 環境摂動による体内時計の制御法の開発

植物の体内時計システムが無数の細胞レベルの振動子の集団で構成されていることから、その同期制御によって個体レベルのリズム制御が可能であると期待される。まず短時間の暗期(ダークパルス)に対する位相応答関数(図3b)と位相振動子モデルを利用して数値シミュレーションによって細胞集団の同期応答を予測した(図3d)。また複数回ダークパルスによる、リズムの消失(シンギュラリティー現象)、リズムの減衰と回復、短周期(長周期)外力による引き込み現象を予測した。次にその予測に基づいて、シロイヌナズナ *CCA1::LUC* を用いた実験を行い、理論の精度が高いことを実証した。これらの成果は、人工光を用いた植物栽培における高度な体内時計制御の基礎として重要となっている。

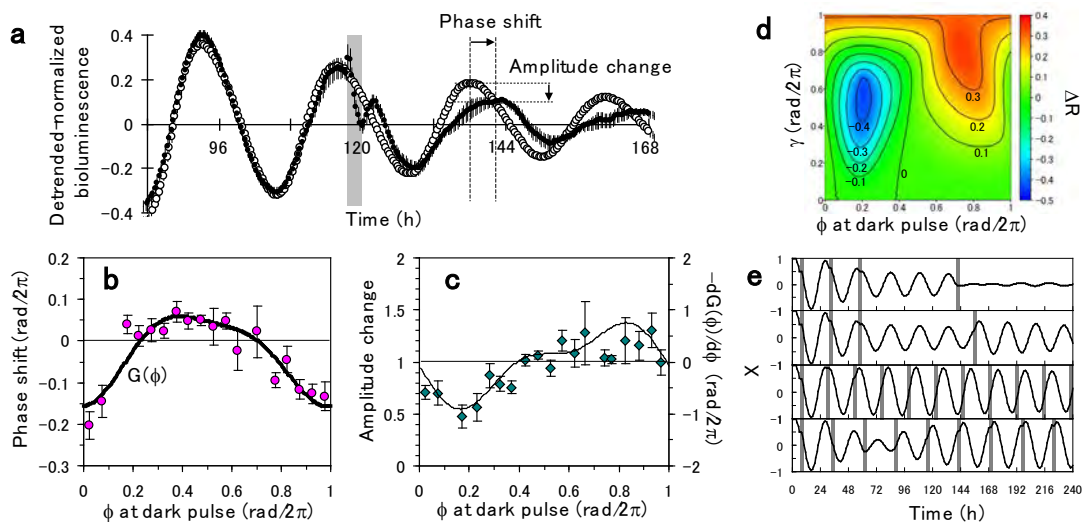


図3 ダークパルスによる概日リズムの制御。(a)ダークパルスによる位相シフトと振幅変化。(b)位相応答曲線。(c)振幅応答曲線。(d)ダークパルスが細胞集団の同期率  $R$  に与える影響をシミュレーションした結果。(e)複数回のダークパルスによる、リズムの消失(シンギュラリティー現象)、リズムの減衰と回復、短周期(長周期)外力による引き込み、の数値シミュレーションの結果。

#### 4) 体内時計の制御理論を実践するための基礎研究と制御機器開発

農産業イノベーションとして注目されている植物工場を念頭に、商業用として普及しているレタスに着目した研究を行った。まず、レタスの体内時計を計測しシステム同定するためにレポーター遺伝子 *LUC* を導入した遺伝子組換えレタス *AtCCA1::LUC* を作出し、これまでシロイヌナズナで明らかにしてきた時空間ダイナミクス(葉における位相波や根におけるストライプ波)がレタスにおいても同様に生じることを示した(図4a)。次に、レタスはシロイヌナズナと比べサイズが大きく専用計測機器を必要としたため、レタス用の特殊計測システムを開発した(図4b)。これによって、3)で開発した環境摂動による体内時計の制御法を応用する研究を行うことができた。

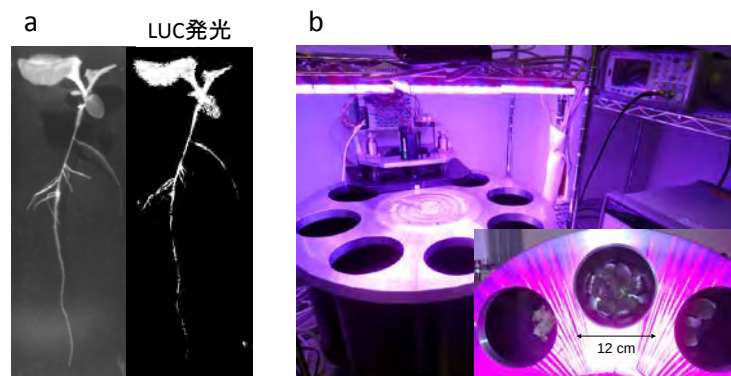


図4 *AtCCA1::LUC* レタスのルシフェラーゼ発光に見られるストライプパターン(a)とレタス用概日リズム計測システム(b)

### 3. 今後の展開

さきがけ研究の成果を利用し、農産業イノベーションの一つとして注目されている植物工場に特化した研究を推進する。特に、細胞から個体レベルに渡って植物の生理代謝を包括的に制御することを目指し、新規の学術体系である「体内時計制御工学」を創生していく。ここでは最新鋭の研究システム(研究装置)を独自に開発しながら、「数万の遺伝子や数千の代謝情報を包括的に扱うための理論基盤・技術の創出」と「細胞から個体レベルまでの全階層を繋ぎ、全体として制御するための理論基盤・技術の創出」を目的に行う。最終的には、膨大な分子診断データから細胞間・器官間の相互作用までを記述できる複合的な数理モデルを開発し、植物生産を最適化する代謝制御のための全階層型で包括的な理論体系を構築していく。体内時計制御工学の理論体系として、3つのモデルを想定している。①Clock Cells Network (CCN)モデル、②Clock Genes Network (CGN)モデル、③Omics in Dynamic Multi-Environment (ODME)モデルである。本さきがけ研究では、①に関する研究を世界に先駆けて展開した。今後、②と③のモデル構築ならびに、その実用化に向けた研究を推進する。

このような基礎研究を推進することで、植物工場の作物対象として近年急速に拡大傾向にある高機能植物(ハーブ類や薬用植物)の2次代謝産物も取扱い可能な技術開発を目指す。ここ数年は、レタスとシソをモデル作物として研究を進める。

### 4. 自己評価

本研究では、分子機構が解明されその生理的重要性が指摘されている体内時計に着目し、植物システムに特有の自己組織化現象やそれを司る創発原理の解明、ならびにその応用研究を実施した。この研究テーマは基礎と応用の両方において一体となった発展が期待できるにもかかわらず、それを示す研究例がないという状況があった。つまり、さきがけ研究の後に継続して発展させることができるかどうか不安を抱えた出発であった。そこで本研究では、研究テーマの全体像を浮き上がらせ、研究テーマの意義を広く説明できるように、基礎から応用までの幅広い取り組みを行った。

本研究の成果、①【新規現象の発見と数理モデル構築】根の成長点が自発形成するストライプ波(Phys.Rev.E 2012)、②【制御のための数理モデル開発と実証実験】環境摂動による概日リズム制御(submitted)、③【応用のための基盤的研究】商用植物レタスにおける時空間パターンの観察(Environ. Control Biol. 2012)、④【基礎と応用の展開】現在研究中である非公開の成果は、どれも先進的であり当該研究分野の歴史に残る業績となると考えている。

体内時計の数理モデルという一つの研究アイデアを、生命科学の根本課題(成長点における体内時計の挙動解明など)や産業イノベーション(植物工場における体内時計制御)へ展開できた点は、評価できる一歩であったと考えている。

### 5. 研究総括の見解

植物は独自の創発原理にもとづいた自己組織化現象により多様な環境への適応機能を有しているという認識のもとに、植物の体内時計に関する自己組織化現象に着目して、細胞を自立振動子として捉えて数理モデル化することによりその創発原理の解明に挑戦した。まず、シロイヌナズナの根の先端における時計遺伝子の発現解析から、根の成長点における特異的な脱同期現象を見出し、それを数理モデルを用いて再現するという興味深い基礎的な研究成果をあげた。さ

らに環境摂動による体内時計の制御法も開発して、人工光を用いてレタス等の植物を水耕栽培する植物工場での応用に結び付けるなど、実用への道を開拓した。なお、本人の属する大阪府立大学では植物工場が目玉プロジェクトになっており、そのキーマンとしても活動中で、これらさがけ研究の成果を大阪府立大学から植物工場の特許として、国内2件、海外1件の特許出願を行ったことも特筆される。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kazuya Ukai, Kouji Inai, Norihito Nakamichi, Hiroki Ashida, Akiho Yokota, Yusuf Hendrawan, Haruhiko Murase, Hirokazu Fukuda\* “Traveling waves of circadian gene expression in lettuce” *Environ. Control Biol.*, vol. 50, 237–246 (2012).
2. Hirokazu Fukuda, Kazuya Ukai, Tokitaka Oyama “Self-arrangement of Cellular Circadian Rhythms Through Phase Resetting in Plant Roots” *Physical Review E* 86, 041917(1–5) (2012).
3. Hirokazu Fukuda, Isao Tokuda, Seiichi Hashimoto, Naoto Hayasaka “Quantitative Analysis of Phase Wave of Gene Expression in the Mammalian Central Circadian Clock Network” *PloS one*, 6, e23568(1–8) (2011).
4. Hirokazu Fukuda, Haruhiko Murase, Isao Tokuda “Controlling Circadian Rhythms by Dark-Pulse Perturbations in *Arabidopsis thaliana*”, submitted.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 3 件

1.

発 明 者: 福田 弘和、山川 浩延

発明の名称: 植物栽培方法及び体内時計最適化植物栽培装置

出 願 人: 公立大学法人大阪府立大学、三洋電機株式会社

出 願 日: 2011/1/27

出 願 番 号: 特願2011-44317

2.

発 明 者: 福田 弘和、山川 浩延

発明の名称: 分子診断型植物工場及び分子診断方法

出 願 人: 公立大学法人大阪府立大学、三洋電機株式会社

出 願 日: 2011/3/1

出 願 番 号: 特願2011-14721

3.

発 明 者: 福田 弘和

発明の名称: 植物栽培装置

出 願 人: 公立大学法人大阪府立大学

出 願 日: 2012/1/27

出 願 番 号: PCT/JP2012/51784



(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. ゴードン会議(化学反応系における振動と動的不安定性)(ルッカ、イタリア)

Spiral waves in two-dimensional circadian oscillator networks in plant leaf. 2010/7/2

2. 欧州時間生物学会 short communication にて依頼講演(オックスフォード、イギリス)

Striped moving pattern of circadian rhythm in plant roots. 2011/8/19

3. ゴードン会議(化学反応系における振動と動的不安定性)(ウォータービル、アメリカ)

Striped moving pattern and self-desynchronization of circadian rhythms in plant roots.  
2012/7/15

受賞

1. 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 SI2011 優秀講演賞, 計測自動制御学会, 2011/12/25

2. 日本生物環境工学会 論文賞「時計遺伝子の発現解析による早期苗診断法」, 日本生物環境工学会, 2012/9/6

著作物

1. 福田弘和、「多振動子系としてみた植物の概日時計システム」時間生物学, vol. 17, pp. 75-81 (2011).

2. 福田弘和, 鵜飼和也、「植物工場における体内時計の制御技術」化学工学, vol.75, pp. 802-806 (2011).

3. 福田弘和、「体内時計制御の植物工場への応用」体内時計の科学と産業応用, シーエムシー, (2011).

4. 岡山毅、福田弘和\*, 村瀬治比古

「植物工場のシステム制御」太陽光型植物工場(第3章), 養賢堂 (2012).

プレスリリース等

1. BS ジャパン・地球アステク(テレビ放送) #67 「植物工場の最新技術に迫る!」/大阪府立大学 植物工場研究センター2012/7/12(出演時間約10分)

2. NHK・あほやねんすきやねん(テレビ放送)

大阪府立大学バイオプロダクション工学研究室 2012/12/12(出演時間約40分)

# 研究報告書

## 「数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 宮下 脩平

### 1. 研究のねらい

ウイルスは複製時の高い変異率により、宿主の交替や温度の変化、抗ウイルス剤の投与といった環境の変化に適応した変異体を生み出している。しかし一方で、ランダムに生じる変異のほとんどはウイルスにとって不利な変異であることが知られている。そのため、適応的なゲノムを選択し適応的でないゲノムを集団から迅速に排除することは、ウイルスの生存戦略上非常に重要な課題であるといえる。本研究で特に注目したのは、細胞内のウイルス集団に共有利用されるウイルス遺伝子や因子の選択である。ウイルスは宿主の細胞内で増殖するため、一部の遺伝子産物や因子は細胞内ウイルス集団に共有利用される。そのため、変異により生じた適応的でないウイルスゲノムが他のウイルスゲノムの遺伝子産物や因子を利用して生き残る状況や、適応的な変異をもつウイルスゲノムがその変異による利益を受けられず選択されない状況が生じる可能性がある。これに対してウイルスはあえて少ない数で細胞に感染することで適応的なゲノムと適応的でないゲノムを確率的に分離し、細胞内集団単位での選択を可能にしているという仮説を立て、これを示すことを目指した。さらに、細胞に感染するゲノム数が決定する仕組みを、数理モデルを用いて明らかにし、その結果に基づいてウイルスの進化機構を操作する手法を確立することで、ウイルスの防除や利用に有効な手段を提案することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

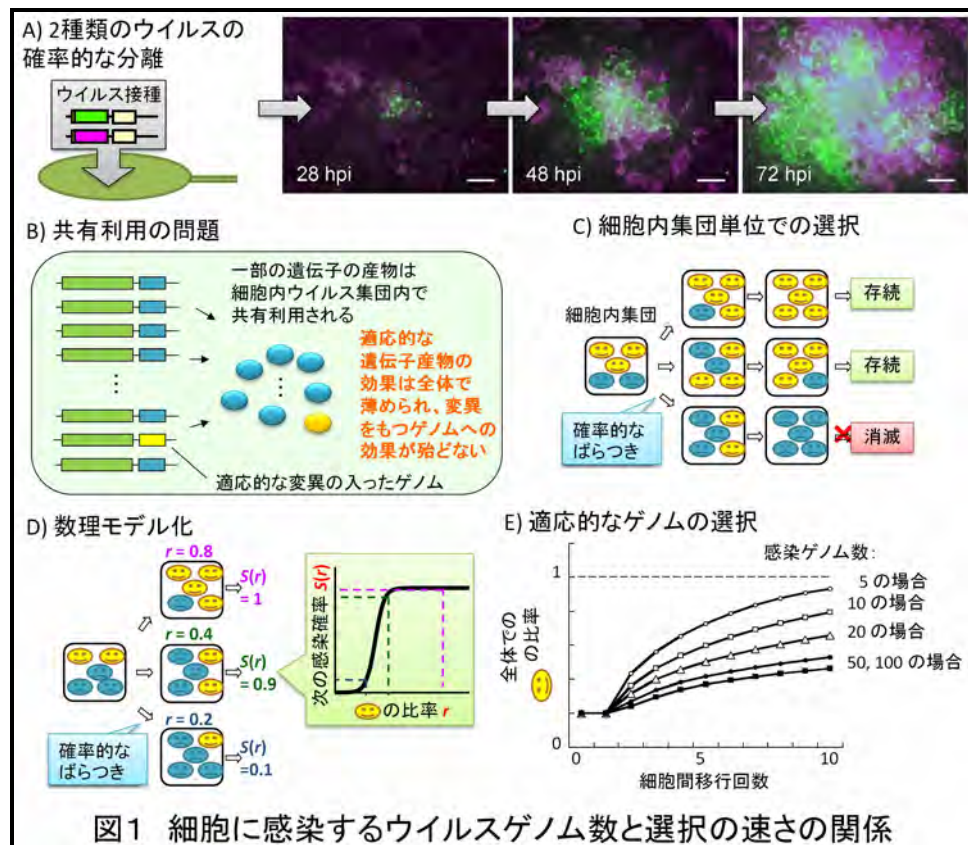
植物 RNA ウイルスが細胞間移行後に細胞に感染するゲノム数は平均で 5～6 と少ない数であることを実験により示し、この現象がウイルスの適応の実現に不可欠である可能性を数理モデルにより示した。次に細胞感染成立過程の数理モデルを作成し、感染ゲノム数が決定する仕組みを提案した。さらにこのモデルから、適応を促進する2つの重要な現象が予測されたため、実験によりそれらが実際の細胞感染で起こることを示した。また、宿主植物の生育温度を下げることや RNA サイレンシングに関わる宿主因子のノックダウンにより感染ゲノム数を大きくすることができる可能性を明らかにし、感染ゲノム数操作によるウイルス進化機構の操作につながる手がかりを得た。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマA 「細胞間移行後の感染ゲノム数とウイルスの適応戦略における意義」

植物RNAウイルスの一つであるムギ類萎縮ウイルスのRNA2を2種類の蛍光タンパク質遺伝子(YFP遺伝子およびCFP遺伝子)でラベルし、これらを *Chenopodium quinoa* の葉にRNA1とともに混合接種した。その結果、最初の細胞が混合感染した箇所でも細胞間移行を繰り返して感染域が広がるに従い2種類のRNA2が分離して、YFPあるいはCFPの蛍光だけが観察される細胞が増えてくることが分かった(図 1A)。この現象は、細胞間移行後に細胞に感染する

ゲノム数(感染ゲノム数)が小さいことにより確率的に起こるものと考えられ、観察結果の解析から感染ゲノム数は平均で 5~6と推定された。ウイルスはあえて少ない数で細胞に感染することにより、確率的に適応的なゲノムと適応的でないゲノムを分離して共有利用の問題(図 1B)を解決し、適応を実現している可能性が考えられた(図 1C)。そこで、簡単な数理モデルを用いてこれを検討した(図 1D)。その結果、感染ゲノム数が 5 であれば 10 回の細胞間移行の間に適応的なゲノムの選択が起こるのに対し、感染ゲノム数が 50 や 100 であればほとんど選択が起こらないことが示唆された(図 1E)。(原著論文1、総説1)



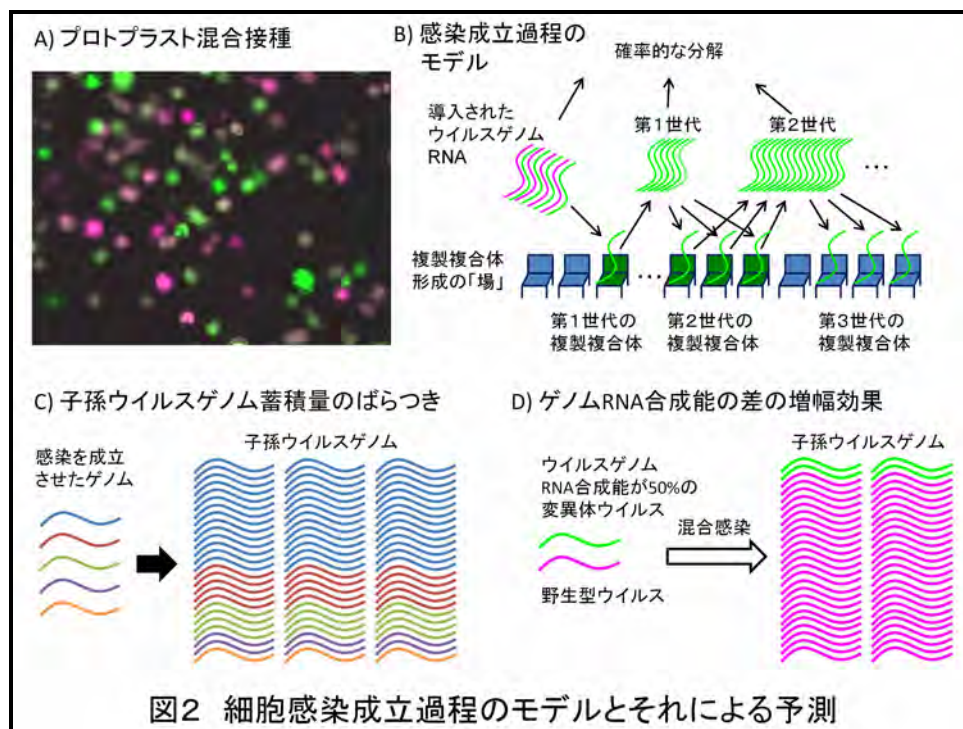
## 研究テーマB「感染ゲノム数が決定する機構」

感染ゲノム数が平均で 5~6 程度になる仕組みについて、ムギ類萎縮ウイルスと同じ科に属するトマトモザイクウイルス(ToMV)とタバコプロトプラスト(単離した細胞)を使った実験で検討した。タバコプロトプラストにYFPまたはCFP遺伝子でラベルしたToMVをエレクトロポレーションにより混合接種すると、細胞間移行の場合と同様に確率的な単独感染が観察された(図 2A)。また、接種に使用するウイルスゲノム量の調整により感染ゲノム数を5程度とすることができることが分かった。放射性同位体でラベルしたウイルスゲノムRNAを接種する実験で、この接種条件では1細胞あたり7,200程度のウイルスゲノムRNAが導入されることが分かった。また、ウイルスゲノムRNAを鋳型として合成される相補鎖RNAの数は一細胞あたり10,000程度であることが実験により示された。近縁のウイルスに関する研究によりウイルスの複製複合体(ウイルス複製タンパク質などからなる複合体で、ウイルスゲノムRNAを合成する)1つあたり1分子の相補鎖RNAが含まれると考えられることから、細胞内では複製複合体が10,000程度作られており、複製複合体が形成されるための場の数が感染ゲノム数を直接

的に決定するわけではない、ということが分かった。これらの結果から、細胞には  $10^3$  オーダーのウイルスゲノムRNAが入るが、そのほとんどは複製を始める前に分解され、平均で 5~6 だけが複製複合体を形成して複製を開始し、複製複合体で作られた子孫ウイルスゲノムRNAが細胞内で第 2 世代以降の複製複合体を形成し、複製複合体形成の場が全て占められるまでこれを繰り返すものと考えられた(図 2B)。そこで、単位時間に各々のウイルスゲノムRNAが分解される確率、複製複合体形成の場に複製複合体を形成する確率をパラメータに加え、細胞感染成立過程を再現する数理モデルを作成した。この数理モデルにより、今回の実験系のように導入されるウイルスゲノムRNAの数や複製複合体形成の場数が十分に大きい場合、ウイルスゲノムRNAが分解される確率と複製複合体形成の場に複製複合体を形成する確率の比が感染ゲノム数を決定する可能性が明らかになった。さらにこの数理モデルを用いたシミュレーションから、二つの重要な現象が予測された:

- 1) 感染を成立させたゲノム間で、ウイルスゲノムRNA合成能に違いがなくても、細胞内での子孫ウイルスゲノムRNAの蓄積量が確率的に大きくばらつく
- 2) ウイルスゲノムRNA合成能の差がある場合、複数サイクルの複製複合体形成の効果でその差が増幅され、最終的な子孫ウイルスゲノムRNAの蓄積量では大きな差となる

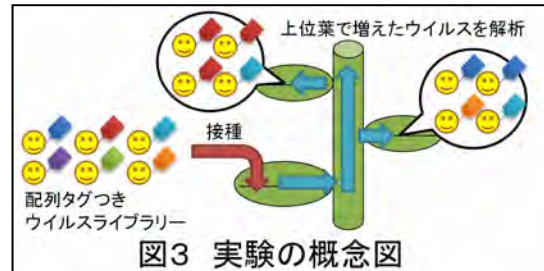
という現象である(図 2C, D)。これらの予測に対応する実験としてそれぞれ、ランダムな 10 塩基の配列タグを挿入したウイルスライブラリーを接種して感染細胞で蓄積したウイルスのタグ配列を検出する実験と、ウイルスゲノム RNA 合成能が野生型の 0.5 倍程度になる変異を 5' UTR にもつウイルスと野生型 5' UTR をもつウイルスの混合接種実験を行い、予測された現象が実際の細胞感染においても起こることを示した。(1)(2)の現象はそれぞれ、細胞内ウイルス集団に共有利用される遺伝子・因子と共有利用されない遺伝子・因子について、適応的なゲノムの選択を促進する。そのため、ウイルスがこのような感染様態を採ることは適応戦略上非常に合理的であると考えられた。また、複製複合体形成の場数や細胞に侵入するウイ



ルスゲノム数、あるいはウイルスゲノム RNA 分解効率の値がある程度変わった場合でも、複製複合体形成効率を調節することで同様の感染様態を作り出せることから、ToMV と類似の複製機構を持つウイルスは適切な複製複合体形成効率を採ることでそれぞれの宿主や環境に適応できている可能性が考えられた。(論文投稿準備中； 主要な学会発表 1,2)

### 研究テーマC「感染ゲノム数の操作」

感染ゲノム数を操作することでウイルスの適応戦略を制御できる可能性がある。そのため、本研究では次に、感染ゲノム数の操作に取り組んだ。10 塩基の配列タグを挿入した ToMV ライブラリーをタバコ植物体に接種した。感染した植物の葉や根からウイルス RNA を回収して配列タグを次世代シーケンサーで



検出した(図 3)。その結果、接種葉で検出される配列タグのうち一部だけが上位葉で検出されること、上位葉の間で検出される配列タグは異なることなどが分かった。この結果は、葉に感染するゲノム数が小さいことにより生じているものと考えられた。さらに、タバコの生育温度を通常の 25℃より低い 15℃にして同様の実験を行うと、接種葉および上位葉で検出される配列タグの種類が増え、葉に感染するゲノム数が大きくなっていることが分かった。また、RNA サイレncingに関与する宿主遺伝子 RDR1、RDR6 をそれぞれノックダウンした植物体においても同様の傾向がみられたことから、温度や RNA サイレncing関連の宿主遺伝子の発現量で葉に感染するゲノム数を制御できる可能性が明らかになった。ただし葉に感染するゲノム数は細胞に感染するウイルスゲノム数だけでなく、葉での感染箇所数によっても変化するものと考えられ、この両者を切り分けることはできていない。今後新しい実験系を作って検討したいと考えている。

### 共同研究テーマ「ウイルスと宿主植物の共進化」

農業生物資源研究所の石橋和大博士らは ToMV 抵抗性遺伝子 *Tm-1*に関する研究で、従来知られていた *Tm-1* 抵抗性打破ウイルス株にも抵抗性を示す新たな *Tm-1* アリル群をトマト野生種から見出した。しかしこの *Tm-1* アリルによる抵抗性も、新しいウイルス変異株の出現により打破されることが分かった。宮下は、石橋博士による実験結果に基づき、抵抗性を持たない植物体(感受性植物体)におけるそれぞれのウイルス株の相対的な適応度を、簡単な数理モデルを用いて推定した。その結果、いずれの抵抗性打破株も野生型ウイルスに比べて適応度が低いこと、抵抗性打破できる範囲が広がった新規ウイルス株で特に適応度が低いことが示された。したがって、ToMVによる *Tm-1* 抵抗性の打破は元の宿主における適応度の低下というコスト(代償)を伴うプロセスであり、これが実際の自然環境において感受性を含む複数の *Tm-1* アリルが共存する原因である可能性が示唆された。(原著論文 2)

### 3. 今後の展開

本研究では、細胞感染レベル、細胞間移行レベルでの数理モデルを作成して植物ウイルス

生態を表現し、その適応における合理性を明らかにした。また、葉への感染ゲノムが小さい現象は、全身感染レベルでの適応機構として機能している可能性があり、これについても数理モデルを作成して検討を行いたい。さらに、細胞・接種葉・植物体での変異の蓄積を調べることで、それぞれのレベルの適応機構の寄与を数量的に明らかにしたい。これにより数理モデルを統合して、植物 RNA ウイルスの適応機構の全容を明らかにすることができると考えている。また、感染ゲノム数を操作した条件でも同様の変異蓄積の解析を行い、ウイルスの適応機構が攪乱されているかどうかを確認したい。感染ゲノム数を操作することでウイルスにとって不利な変異体を集団内に増やすことができれば、弱毒ウイルス(変異により病原性が低くなったウイルスで、これを予め植物に接種しておくことで野生型ウイルスによる感染を防ぐことができる)の効率的な作出や、ウイルスベクターによる植物体内での安定的なタンパク質発現系の開発といった応用研究につながる。これに向けた試験も行っていきたい。

#### 4. 自己評価

研究テーマ A はさがけ研究開始以前から継続してきた課題であるが、さがけ研究のおかげで良い形でまとめることができた。研究テーマ B では(+)鎖 RNA ウイルスの細胞感染を再現する数理モデルを作成した。この数理モデルからは、ウイルスの適応戦略の重要な側面を明らかにすることができ、予想以上の成果が得られたと考えている。一方で多様な実験を必要とする内容であり、新しい実験系の確立に予想以上の時間がかかってしまった。研究テーマ C では宿主の生育温度や RNA サイレンシング関連遺伝子の発現制御により感染ゲノム数が制御できる可能性が示唆されたが、研究テーマ B の内容を生かした研究(複製複合体形成や RNA 分解に関与する宿主遺伝子の発現制御による感染ゲノム数制御)や応用に向けての検討が間に合わず残念である。また、共同研究テーマでは実験を中心に構成された研究の中で数理モデルを有効に利用することができたと考えている。

#### 5. 研究総括の見解

ウイルスは宿主細胞内で増殖するため、一部の遺伝子産物や因子は細胞内のウイルス集団に共有利用されることから、不利な変異ゲノムも適応度を下げないと考えられるが、実際にはウイルスは非常に早く進化することがよく知られている。この謎を解くために、ウイルスはあえて少ない数で細胞に感染することで適応的なゲノムと適応的でないゲノムを確率的に分離し細胞内集団単位での選択を可能にしているという仮説を立て、それを検証することを目指した。まず、植物 RNA ウイルスを用いた感染実験の結果から、細胞間移行後の感染ゲノム数は 5、6 個であることを統計的に推定した。このボトルネック効果と細胞内ウイルス集団間の競争を組み入れた数理モデルを用いて、感染ゲノム数が 5-10 であれば 10 回程度の細胞間移行の間に適応的でないゲノムは排除されることを示し上記の仮説の妥当性を確認した。さらにこのボトルネックの原因は細胞内に入ったウイルスゲノムのほとんどが分解され、ごく少数のみが複製開始に至るためであることを突き止めた。このようにウイルスの進化機構について新規な問題を発掘し、独創的なアプローチで実験と理論の両側面から解明したことは高く評価できる。

#### 6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表



1. Miyashita, S and Kishino, H. “Estimation of the Size of Genetic Bottlenecks in Cell-to-Cell Movement of *Soil-Borne Wheat Mosaic Virus* and the Possible Role of the Bottlenecks in Speeding Up Selection of Variations in *trans*-Acting Genes or Elements”, *Journal of Virology*, 2010, 84(4), 1828–1837

2. Ishibashi, K, Mawatari, N, Miyashita, S, Kishino, H, Meshi, T, and Ishikawa, M. “Coevolution and hierarchical interactions of *Tomato mosaic virus* and the resistance gene *Tm-1*”, *PLoS Pathogens*, 2012, 8(10), e1002975

(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. Miyashita, S, Ishibashi, K, Kishino, H, and Ishikawa, M. “Detailed analysis of the genetic bottlenecks in single-cell infections of Tomato mosaic virus”, *International Congress of Virology*, September 2011

2. Miyashita, S, Ishibashi, K, Kishino, H, and Ishikawa, M. “A model for the course of establishment of single-cell infections by an RNA virus”, *American Society for Virology Meeting*, July 2012

**招待講演**

1. 宮下脩平 「Modeling dynamics of plant RNA viral population in a host plant」、明治大学 MEEセミナー、2010 年 5 月

2. Miyashita, S, Ishibashi, K, Kishino, H, and Ishikawa, M. “Genetic bottlenecks in cell-to-cell movements and single-cell infections of plant RNA viruses”, *日本進化学会*, 2012 年 8 月

3. 宮下脩平 「数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解」、植物ウイルス病研究会、2013 年 3 月(予定)

**総説**

1. 宮下脩平 「植物RNAウイルスの進化機構の数理モデル」、*応用数理*、2012 年 6 月

2. Ishibashi, K, Miyashita, S, Katoh, E, and Ishikawa, M. “Host membrane proteins involved in the replication of tobamovirus RNA”, *Current Opinion in Virology*, 2012, 2(6), 699–704

3. 宮下脩平 「数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解」、植物ウイルス病研究会レポート、2013 年 3 月(予定)

**科学コミュニケーション活動**

1. 宮下脩平、「進化のスピードの速いやつ～ウイルスの進化のしくみ～」、農業生物資源研究所 サイエンスカフェ、2012 年 4 月

## 研究報告書

### 「サンゴメタ集団の存続可能性と環境変動への応答予測」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 向 草世香

#### 1. 研究のねらい

サンゴ礁は、地球温暖化に伴う海水温の上昇や海洋酸性化など、地球規模の環境変動にさらされている。この 20 年間に世界各地で、サンゴ群集の減退とそれに伴うサンゴ礁生態系の崩壊が報告されている。しかも富栄養化などの地域的な環境悪化によってサンゴ群集の復元力が低下しており、サンゴ礁生態系は気候変動に対してより脆弱化していると懸念されている。

1998 年の夏、高水温によるサンゴ白化現象で、沖縄本島のサンゴ礁はほとんどが裸地となった。一方、沖縄本島の 30km 南西に位置する慶良間諸島では、白化は起こったもののサンゴの 80% 以上が生存した。沖縄本島のサンゴ群集は、従来の海産生物と同様に、慶良間など他地域から浮遊幼生が供給されることでいずれ回復すると思われていた。しかし 2001 年から慶良間諸島でサンゴ捕食者のオニヒトデが大発生し、残っていたサンゴの多くが捕食された。その結果、沖縄本島への幼生供給量が激減し、沖縄・慶良間海域のサンゴメタ集団全体が存続の危機に陥った。現在は、両地域でサンゴ群集の局所的な回復が観察されている。本研究では、幼生の分散能力の異なる 2 タイプのサンゴに着目し、メタ個体群の存続可能性を推定するとともに、デモグラフィーの変化が存続可能性に与える影響を明らかにする。この解析により、どのような状況がメタ個体群の存続に望ましいのか指針を得ることが可能になる。

また、サンゴ群集の再生を促すため、裸地へサンゴ片を移植する人為的修復が現在さかんに進められている。港湾工事などでサンゴ群集が破壊される場合は、群集の移転が望まれる。移植技術の確立が進む中、移植がサンゴ群集のダイナミクスにどのような影響を与えるかについては議論されていない。本研究では、移植サンゴのデモグラフィーや移植労力を考慮し、有効な移植計画の策定を目指す。

さらに、今後悪化すると予想されている地球温暖化にともない、サンゴ群集がどのように変遷するかを予測する。高水温によってサンゴは白化や病気、海洋酸性化によって繁殖率や成長率の低下など、様々な悪影響を受けるが、その影響は種によって異なると考えられている。本研究では、環境変動がもたらすデモグラフィーの変化が群集構造に及ぼす影響を予測する。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

幼生の分散距離が短いハナヤサイサンゴ科トゲサンゴについて、個体の生活史を再現する個体ベースモデルを作成し、野外観測データからパラメータを推定、数値計算を行ったところ、今も残る慶良間個体群は幼生の自己加入率が高い場合はやがて消滅することが示された。また、裸地から個体群が回復するためには継続的な幼生供給が必要であったことから、局所絶滅の危機にある沖縄個体群の自然回復は望めないと考えられた。一方、幼生の分散距離が長

ミドリイシ科サンゴは沖縄本島でも幼生加入が観測されたが、同じ地域内でも加入量の地点差が大きかった。地域の孤立度が高い、あるいは近隣生息地との交流度が低い幼生分散ネットワークをもつメタ個体群では、局所個体群が攪乱から回復しにくいことを理論解析から明らかにした。

移植計画については、被度の早期回復を目標とする場合は成長の早い種を、種多様性を維持する場合は分散距離が短いもしくは成長の遅い種が望ましいことがメタ個体群モデルの解析から明らかとなった。また、破壊される群集を限られた労力のもとで移転させる最適計画は、移転先被度を最大にする場合は移植効率(被度増加量/移植労力)が高い種とサイズクラスから順に移植すること、被度と種多様性を考慮した森下の繁栄指数を最大化する場合は各種の生存率や移植コストの比に応じて計画が異なることが分かった。

環境変動に対する応答については、長期野外観測データの解析から、群集の優占種である樹枝状ミドリイシとテーブル状ミドリイシは台風によって成長が阻害されること、樹枝状ミドリイシは台風の翌年が最も生存率が低かった一方で、テーブル状ミドリイシは白化によって生存率が著しく低下すること、しかし生存個体の成長率は白化時ほど減少しないことが明らかとなった。この結果をもとに個体ベースモデルで白化、台風、海洋酸性化(成長率が2%減と仮定)の影響を評価したところ、樹枝状では高頻度で台風が発生する場合もともと被度が減少したのに対し、テーブル状では3つの影響に顕著な差は見られなかった。また、被覆状コモンサンゴや塊状サンゴは台風や白化の影響はほとんど受けないこと、藻類は攪乱によって増加することが明らかとなった。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「沖縄・慶良間海域のサンゴメタ個体群の存続可能性」

海洋生物の大半は、生活史の初期を浮遊幼生として過ごし、海流に乗って別の生息地へと分散する。沖縄・慶良間海域を7地域×各3~7地点に分けた階層的調査法によって2003年~05年に調べられた幼生加入量を階層的ベイズ法により解析したところ、幼生の分散距離が長いミドリイシ科サンゴは沖縄本島でも慶良間と同程度の加入があるものの、地点差が大きく、同じ地域内でも数km離れると加入量に違いがあることが示唆された。一方、幼生の分散距離が短いハナヤサイサンゴ科サンゴは慶良間の加入量は多い一方で、沖縄本島の加入量はごく僅かであった。

そこで、とくに分散距離が短いハナヤサイサンゴ科トゲサンゴについて、現在も残る慶良間個体群の存続可能性と、局所絶滅の危機にある沖縄個体群の回復可能性を検討した。慶良間座間味島に設置した定点方形区の画像データを解析し、トゲサンゴ個体の生存率や成長率、部分死亡率、幼生と破片の加入量を推定した。得られた結果にもとづいて、幼生着底から生存、部分死亡、成長、幼生生産という個体の生活史を再現する個体ベースモデルを構築し(図1a)、トゲサンゴ個体群の動態を予測した。2010年の個体群構造を初期値とすると、幼生の外部からの供給率が高ければ個体群は維持されるが(図1b  $r=0$  or  $r=0.5$ )、自己加入率が高い場合はやがて消滅することが明らかとなった(図1b  $r=1.0$ )。また、裸地から個体群が回復するためには継続的な幼生供給が必要であったことから(図1c)、沖縄本島では今後もトゲサンゴの回復は望めないと考えられた(投稿中)。

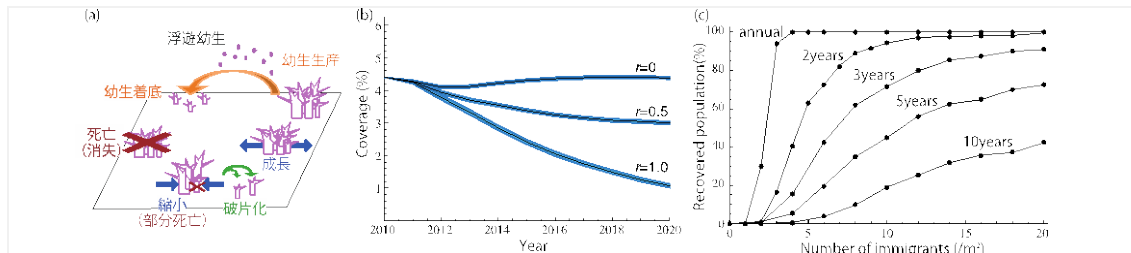


図1 (a)トゲサンゴの生活史(b)2010年個体群の時間変化と幼生の自己加入率  $r$ 。平均値と95%信頼区間を表示(c)平均的に数年に1度幼生が供給されときの個体群の回復可能性(回復は10年後の被度>0.44%と定義)。

現在、沖縄本島北部ではミドリイシ属サンゴの回復が観測されているが、一部の地点に限られている(Cabitan et al. in press)。これは、本研究で明らかとなった比較的小さな空間スケールの幼生動態が関係しているかもしれない。また、メタ個体群モデルの理論的解析から、地域の孤立度が高い、あるいは近隣生息地との交流度が低い幼生分散ネットワークをもつメタ個体群では、局所個体群が攪乱から回復しにくいことを明らかにしている。今後は、実際の海水流動にもとづく幼生分散ダイナミクスと生活史特性を考慮した数理モデルを立案し、ミドリイシ属サンゴのメタ個体群存続可能性解析に取り組む予定である。

#### 研究テーマ B「サンゴ群集の回復を促進する有効なサンゴ移植方法」

サンゴ群集の人為的回復の手段としてサンゴ移植が注目されている。移植が群集遷移に与える影響を検討するために、生息空間を巡って競争する局所群集が幼生分散によって結ばれるメタ個体群モデルを作成し、沖縄を代表する4属のサンゴを想定して数値計算を行った。移植による群集修復の目標を(1)被度の早期回復とした場合は成長の速いミドリイシやハナヤサイサンゴが望ましい、(2)メタ個体群の種多様性を考えた場合は幼生の分散距離が短いハナヤサイサンゴや成長の遅いキクメイシが良く、ミドリイシは種多様性を著しく低下させる、(3)1998年の白化以降局所絶滅が危ぶまれるハナヤサイサンゴの自然回復はミドリイシやハマサンゴの移植によって妨げられる、ことが明らかとなった。本研究から、移植作業を始める前に修復目標を十分議論し、それに応じた移植種を選定する必要があることが示された(Muko and Iwasa 2011a)。

岩盤に固着するサンゴの場合、人為的開発によって破壊される群集を救うためには安全な場所へ移転させるしかない。そこで、移転労力が限られているとき、どのような種をどれだけ移転すれば良いのか最適計画を求めた。移植片が大きいほど移植後の生存率は高くなる一方で、移植の手間は増大する。サンゴのサイズと生存率、移植コストを考慮したサイズクラスモデルを解析したところ、移転先の被度を最大にする場合は、移植効率(被度増加量/移植労力)の高い種とサイズクラスから順に労力が尽きるまで移植することが最適となった。これは移植効率が悪い種は選ばれず、消失することを意味する。一方、種多様性と被度を考慮した森下の繁栄指数を最大化する場合は、各種のパラメータの比に応じて最適計画が異なった(図2)。本研究から、移植サンゴの生存率を高くするために群体全体の移植が望まれること、移植コストの点からやむを得ず破片化する場合はいくらでも損傷をおさえ、大きい移植片を用いること、など移転事業に関する指針が得られた(Muko and Iwasa 2011b)。

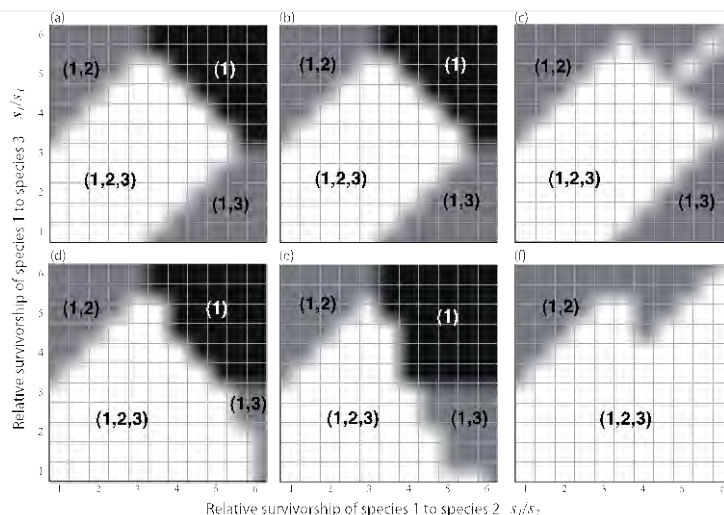


図 2 生存率の比に対応した 3 種の最適移転計画 (括弧内の数字は選択される種を示す)。個体数が同じ場合 (a) 移植労力が少ない (b) 中程度 (c) 多いとき。種 3 の個体数が少ない場合 (d) 移植労力少ない (e) 中程度 (f) 多いとき。

#### 研究テーマ C「今後予想される環境変動へのサンゴ群集の応答」

地球温暖化に伴う環境変動によってサンゴ群集が今後どのように変化するかを予測するためには、白化や台風といった攪乱に対する群集の応答を解明する必要がある。そこで、生息地の攪乱履歴や生物間相互作用がサンゴ群集のダイナミクスに与える影響を推定した。西表島の攪乱履歴の異なる 4 地点に設置された定点方形区で、2005 年～2008 年にとられた画像データの解析を行った。調査期間中、2006 年に地点 1 で台風の直撃、2007 年に地点 2 で白化現象が観察された。一方、地点 3、地点 4 では目立った攪乱は見られなかった。

まず、群集の優占種であるミドリイシ属サンゴについて、群体形状 (樹枝状、テーブル状、コリンボース状、指状) に応じて生活史特性を解析した。出現したサンゴを個体識別し、投影面積の変化から成長率を、個体の消失から生存率を一般化線形モデルで推定した。ここで、赤池情報量基準 (AIC) によるモデル選択から、もっとも観察データを説明する調査地点と調査年の組み合わせを求めた。テーブル状ミドリイシの成長率は最も高い値だったが、2006 年地点 1 では著しく低くなった。また、樹枝状ミドリイシの成長率も 2006 年地点 1 で低かったことから、両形状ともに台風による波浪の影響を受けやすいことが示唆された。また、樹枝状ミドリイシの生存率は台風の翌年が最も低く (図 3a)、これは波浪によって損壊した枝がやがて消失したことによると考えられる。一方、テーブル状ミドリイシの生存率は 2007 年地点 2 で著しく低く、白化によって多くの群体が死亡したことが分かった (図 3b)。しかし、生残個体の成長率は台風後ほど減少しなかった。このように、ミドリイシ属サンゴでは、白化と台風に対する応答は群体形によって大きく異なることが明らかとなった (Muko et al. 2012)。

この結果をもとに、白化、台風、海洋酸性化という環境変動に対するミドリイシの応答を、個体ベースモデルを用いて検討した。酸性化はサンゴの石灰化を妨げると言われており、成長率が 2% 減退すると仮定した (De' ath 2009 より推定)。環境変動がランダムに生じるシミュレーションを繰り返して 100 年後の個体群被度の平均値を求めたところ、白化もしくは台風の発生頻度が少ない場合は酸性化が最も被度を減少させた。樹枝状ミドリイシの場合、100 年間に 6 回以上の台風が起これば、他の環境変動よりも顕著に被度が減少した (図 3c)。一方、テーブル状ミドリイシでは、100 年に 10 回の高頻度でも白化、台風、酸性化の影響に顕著な差は見られなかった (図 3d)。今後は、環境変動のより現実的なシナリオを想定し、その影響を検討することが必要だと考えている。

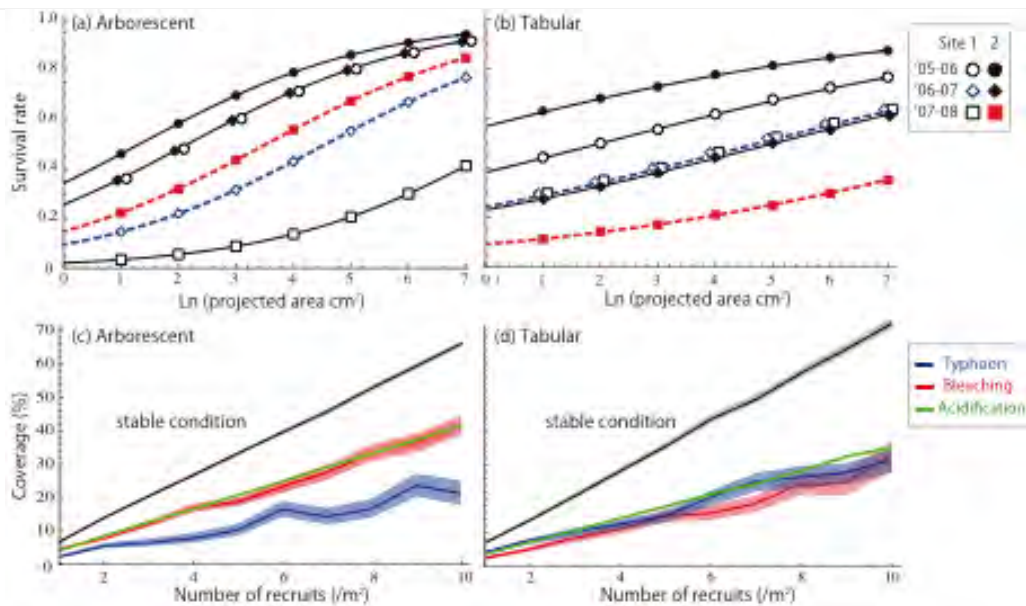


図3 生存率(a)樹枝状(b)テーブル状、および100年に10回の台風／白化が発生したときの平均被度と95%信頼区間(c)樹枝状(d)テーブル状。青は台風、赤は白化、緑は酸性化を示す。

次に、サンゴ群集全体の動態を知るために指状をのぞくミドリイシ3タイプと、被覆状コモンサンゴ、塊状サンゴ(ハマサンゴとキクメイシ)、藻類、空地を対象に、方形区を複数の格子に区切って在／不在を記録する解析を行った。動的占有モデル(Dynamic occupancy model)を用いた階層的ベイズ法により、コモンサンゴ、塊状サンゴの生残率と増加率は地点毎の違いはあるが撓乱の影響はほとんど受けないこと、藻類は撓乱によって増加することが明らかとなった。また、いずれのグループでも、生残率と増加率は周囲の格子の同じグループに強い正の影響を受け、とくにミドリイシや藻類は周囲の空地にも影響を受けた。一方で、同一格子内の他グループの有無は、コモンサンゴではミドリイシ全般が負、藻類は空地が正の顕著な影響を示したものの、ミドリイシや塊状サンゴは目立った影響は受けなかった(投稿準備中)。

一連の研究から、ミドリイシはサンゴ群集の主要な構成種群だが環境変動にともなう撓乱の影響を受けやすいこと、ミドリイシの死亡後生じた空地では藻類が急速に増加し、次いで周辺空間からミドリイシが成長する、という群集動態が明らかとなった。

### 3. 今後の展開

本研究課題では、長期野外観測データの解析と得られた結果にもとづいた数理モデルの構築から、より現実的なテーマに対して研究を進めることができた。メタ集団を考える際は、幼生の分散ダイナミクスをより現実的に即したものとして取り入れる必要がある。近年盛んに行われている、海水流動にもとづいて推定された幼生分散ネットワーク解析を石西礁湖で始めた。今後は、実際の幼生分散ダイナミクスを考慮したメタ集団モデルを構築し、存続可能性解析や複合的な環境変動へのサンゴ群集の応答を引き続き検討していく予定である。

野外のサンゴ群集を解析して、その時空間変動の大きさを改めて感じた。環境変動の影響のみならず、サンゴの種や個体によってもその応答はさまざまであり、まさに「ダイナミック」にダイナミクスは決定される。この変動や不確実性をどのように取り入れて数理モデルを立案するの

か、新たな研究課題として取り組んでいきたいと考えている。

#### 4. 自己評価

長期野外観測データの解析と得られた結果にもとづいた数理モデルの構築から、より現実的なテーマに対して研究を進めることができた。とくに、沖縄本島で局所絶滅が危ぶまれているトゲサンゴ個体群の存続可能性解析や、台風と白化という異なる攪乱がサンゴ群集に与える影響の統一的評価などは、野外データと数理モデルの統合が成功した研究例だと考えている。その一方で、幼生の分散ダイナミクスをより現実的に即したものとして取り入れる試みは、ターゲットとしていた沖縄・慶良間海域については十分な解析ができなかった。今後、海水流動にもとづいて推定された幼生分散ネットワークと生活史特性を考慮したモデルを立案し、メタ集団の存続可能性解析を引き続き進める予定である。また、サンゴ移植に関しては、魚類などの捕食による移植片の死亡が問題視されている。当初の計画では、捕食回避の効果をあげる移植量やコストを考慮した最適移植方法の提案を予定していたが、研究期間内では解析が出来なかった。今後、可能であれば実際の移植計画と連携し、具体的な事業提案ができることを願っている。

#### 5. 研究総括の見解

海水温上昇や海洋酸性化等の環境変動にさらされているサンゴ礁の存続可能性や効率的な移植計画、さらには高水温化や台風等の環境攪乱に対する応答について、長期野外観察データの収集とその解析結果にもとづいた数理モデルの構築によって、理論的予測や提言を行うという社会的にも意義のある研究課題に取り組んだ。サンゴの生活史を再現する個体ベースモデルを作成して野外観測データを取り込み、幼生分散ネットワークの違いによるメタ個体群の存続可能性を推定した結果や、台風、白化、海洋酸性化等の環境攪乱がサンゴ群集に与える影響を統一的に評価した結果は、野外データと数理モデルの統合を行った好例として評価できる。理論研究者ではあるが、野外データの取得に当たっては、期間中に本人自身も潜水士の資格を取り、実際に潜水して意欲的にデータ採取を行ったことも特記できる。

#### 6. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Soyoka Muko, and Yoh Iwasa. Optimal choice of species and size class for transplant coral community. *Journal of Theoretical Biology*. 2011, 273, 130-137.
2. Soyoka Muko, and Yoh Iwasa. Long-term effect of coral transplantation: Restoration goal and the choice of species. *Journal of Theoretical Biology*. 2011, 280, 127-138.
3. Soyoka Muko, Seiji Arakaki, Masayuki Nagao, Kazuhiko Sakai. Growth form-dependent response to physical disturbance and thermal stress in *Acropora* corals. *Coral Reefs*. 2011. Published online.

##### (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)

1. 向草世香、巖佐庸. 群集修復の目標にあわせたサンゴ移植種選定の重要性. 第 57 回 日本生態学会大会. 2010.3.18.
2. 向草世香、巖佐庸. サンゴ群集の最適移転計画. 日本サンゴ礁学会第13回大会. 2010.12.3.
3. 向草世香,新垣誠司,玉井玲子,酒井一彦. トゲサンゴ個体群の存続可能性解析、幼生保育型サンゴ個体群の存続可能性: 野外データの解析と数理モデルによる将来予測. 日本生態学会第58回大会. 2011.3.9.
4. 向 草世香. 島嶼域サンゴ礁の幼生分散動態とメタ個体群モデルによる存続可能性解析. 日本生態学会第 59 回大会・第 5 回 EAFES(東アジア生態学会連合)大会 企画シポジウム「Seascape Ecology: 海の景観生態学への挑戦」. 2012.3.18.
5. Soyoka Muko, Seiji Arakaki, Reiko Tamai, Kazuhiko Sakai. Population viability analysis of the short dispersal coral *Seriatopora hystrix* in Okinawa. 12th International Coral Reef Symposium. 2012.7.11.

# 研究報告書

## 「生態と適応のフィードバック関係における新たな展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 吉田 丈人

### 1. 研究のねらい

個体群や群集レベルの現象を扱う「生態学」と、生物の適応現象の解明に取り組んできた「進化学」の統合が、新たな課題として近年認識されている。本研究では、代表的な生態現象である生物の数の変化(個体群動態)と、進化や表現型可塑性といった適応現象の関係の解明に取り組んだ。この課題に取り組むため、生物学的メカニズムに基づいた数理モデルを用いて、現実の生物で観測される現象を再現して理解するという研究アプローチを採用し、理論研究と実証研究を密接に連携させた。

進化と表現型可塑性は、進化学者が長年その理解を進めてきた適応現象である。どのような性質をもつ生物がより多くの繁殖成功をもたらすか(適応度が高いか)は、生態学的な条件により決定され、生態現象が適応に決定的な影響を及ぼすと理解されている。一方、適応現象も生態に影響すると予想されるが、相互に密接な関係を持つ可能性はこれまで十分に検証されてこなかった。具体的には、以下の2つの課題について取り組んだ。

① 進化と表現型可塑性という2つの重要な適応現象が、個体群動態という生態現象との関係において、同じ役割をもつのか、それとも異なる役割を持つのか: これまでの研究では進化と表現型可塑性はそれぞれ別々に研究されてきたが、進化と表現型可塑性という種類の異なる適応が、個体群動態などの生態現象との関係において、同等であるのか異なる役割をもつのかは未知の重要な課題であった。

② 局所集団における適応現象(進化動態)と生態現象(個体群動態)の関係に対して、他の集団からの移動分散や遺伝子流動はどのように影響するか: 局所的な集団の適応進化は、空間的なつながりをもつ他の集団からの移動分散や遺伝子流動の影響を強く受けると考えられている。しかし、先行する理論研究の予測はほとんど検証されたことがないほか、生物群集の構造と局所適応の関係など理論研究に残された課題も多い。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

進化と表現型可塑性という異なる適応現象が個体群動態に及ぼす影響を比較するため、最初に理論研究を実施した。捕食者-被食者系において、被食者による防衛には、遺伝的多様性による進化的なメカニズムもあるし、表現型可塑性によるメカニズムもある。そこで、被食者の防衛形質を、遺伝的多様性で表したモデルと可塑性で表したモデルを構築し、捕食者-被食者系の個体群動態を比較した。その結果、進化による適応の方が、より広いパラメータ領域で不安定な動態(個体数振動)を見せることが明らかとなった。さらに、進化と表現型可塑性の両方を組込んだモデルでは、間欠性のある個体数振動と進化動態という興味深い現象も予測された。これらの理論予測を実証することを検討したが、理想の実験系を構築するこ

とができなかった。そのため、実証研究では、進化と表現型可塑性を別々に扱った。

表現型可塑性と個体群動態の関係については、より多くの生物が関係する生物群集においての可塑性の実態やその影響は、これまで検討が進んでいなかった。そこで、防衛において表現型可塑性のある被食者となない被食者の2種と、捕食者1種からなる、3種系の長期培養実験を実施した。被食者による表現型可塑性は、捕食者との密接な関連が予測通りに見られた。また、3種の個体数が交代で振動する興味深い個体群動態が観察された。

進化と個体群動態の関係については、遺伝的多様性とそれに関するトレードオフが重要だと指摘されているが、実際のトレードオフの形については十分な検討が進んでいなかった。そこで、被食防衛と競争能力のトレードオフ関係が微妙に異なる被食者を用いて、捕食者-被食者系の長期培養実験を実施した。その結果、トレードオフのわずかな違いが、個体群動態や進化動態に大きな影響を与えることがわかった。トレードオフの違いを組み込んだ数理モデルにより、観察された個体群動態と進化動態を、少なくとも定性的には説明することができた。

移動分散と遺伝子流動が個体群動態と進化動態に与える影響を評価するため、最初に、移動分散でつながる群集の個体群動態を数理モデルにより評価した。その結果、群集のどの栄養段階が移動分散するかによって、個体群動態への影響が大きく異なること、移動分散の影響は群集がおかれた環境条件にも依存することが明らかとなった。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「異なる適応過程(表現型可塑性と進化)が個体群動態に及ぼす影響の比較」

進化と表現型可塑性という異なる適応現象が個体群動態に及ぼす影響を比較する理論研究を行った。捕食者-被食者系において、被食者による被食防衛には、遺伝的多様性をもちいた進化的なメカニズムも存在するし、表現型可塑性によるメカニズムもある。そこで、被食者の防衛形質のばらつきを、遺伝的多様性で表したモデルと可塑性で表したモデルを構築して、捕食者-被食者系の個体群動態を検討した。その結果、進化による適応の方が、より広いパラメータ領域で不安定な動態(個体数振動)を見せることが明らかとなった(図1)。さらに、遺伝的多様性と表現型可塑性の両方を組み込んだモデルでは、間欠性のある個体数振動と進化動態という興味深い現象も予測された。成果は、Yamamichi, Yoshida and Sasaki (2011)として公表した。

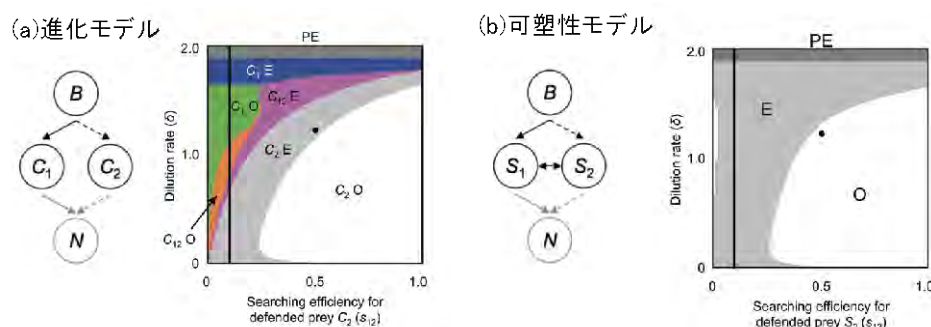


図1. 進化と表現型可塑性は異なる個体群動態をつくる。(a)進化モデルでは、餌種Cに遺伝的多様性( $C_1$ と $C_2$ )が仮定されている。この場合、捕食者-被食者系の希釈率と $C_2$ の防衛形質に対する相図において、より広い領域( $C_1 O$ と $C_2 O$ )で、個体数振動が予測される。(b)可塑性モデルでは、餌種Sに表現型可塑性( $S_1 \sim S_2$ )が仮定されている。この場合、進化モデルに比べて、個体数振動が予測される相図の領域は狭く、平衡状態が予測される領域が広い。

上記の理論予測を、実際の生物を用いて検証することを検討したが、進化と表現型可塑性の影響のみを比較できるような理想の実験系を構築することができなかった。そのため、実験研究では、進化と表現型可塑性の具体的影響を別々に扱った。

表現型可塑性の個体群動態への影響については、より多くの生物が関係する生物群集においての可塑性の実態やその個体群動態への影響は、これまで検討が進んでいなかった。そこで、表現型可塑性のある被食者とない被食者の2種と捕食者1種からなる3種系の長期培養実験を実施した。被食者による被食防衛の表現型可塑性は、予測通りに捕食者と密接な関連が見られた。また、可塑性をもつ被食者は可塑性をもたない被食者に比べて、栄養塩をめぐる競争に劣っていた。さらに、3種の個体数が交代で振動する興味深い動態が観察された(図2)。3種間の相互作用など生物学的メカニズムを組み込んだ数理モデルにより、観察された適応現象と生態現象を説明しようと試みたが、未知のメカニズムの影響があることがわかり、完全な説明には未だ至っていない。成果の一部は、学会発表 1-4 として公表した。

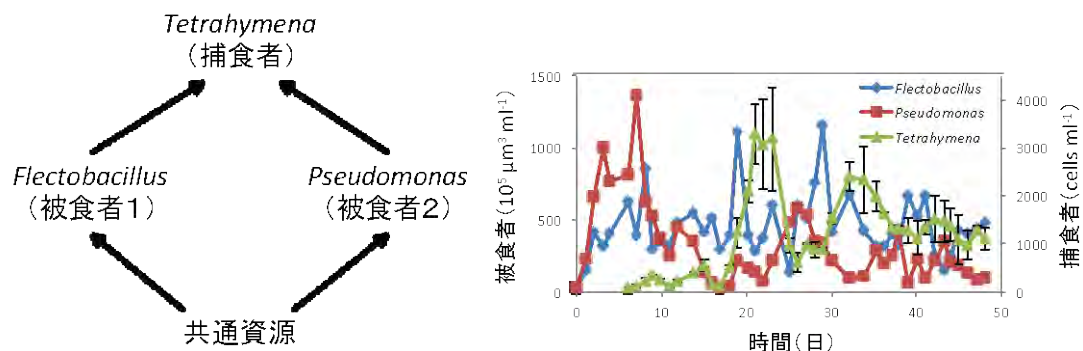


図2. 表現型可塑性が群集の動態に及ぼす影響. *Flectobacillus* は *Tetrahymena* の存在下で細胞を伸長し防衛形態を可塑的にもつが、*Pseudomonas* はそのような可塑性をもたない。3種系では、*Pseudomonas*→*Flectobacillus*→*Tetrahymena* の順番で交代振動が観測された。

進化の個体群動態への影響については、遺伝的多様性とそれに関するトレードオフが重要だと指摘されている。しかし、実際のトレードオフの「形」については、理論的に重要性が指摘されているものの、現実の生物での検証は進んでいなかった。そこで、被食防衛と競争能力のトレードオフ関係が微妙に異なる被食者の遺伝的組合せを用いて、捕食者-被食者系の長期培養実験を実施した(図3)。その結果、トレードオフの形の違いが、個体群動態や進化動態に大きな影響を与えることが明らかとなった。トレードオフの違いを組み込んだ数理モデルにより、観察された個体群動態と進化動態を、少なくとも定性的には説明することができた。成果は、学会発表 1-4 として公表し、投稿論文を執筆中である。

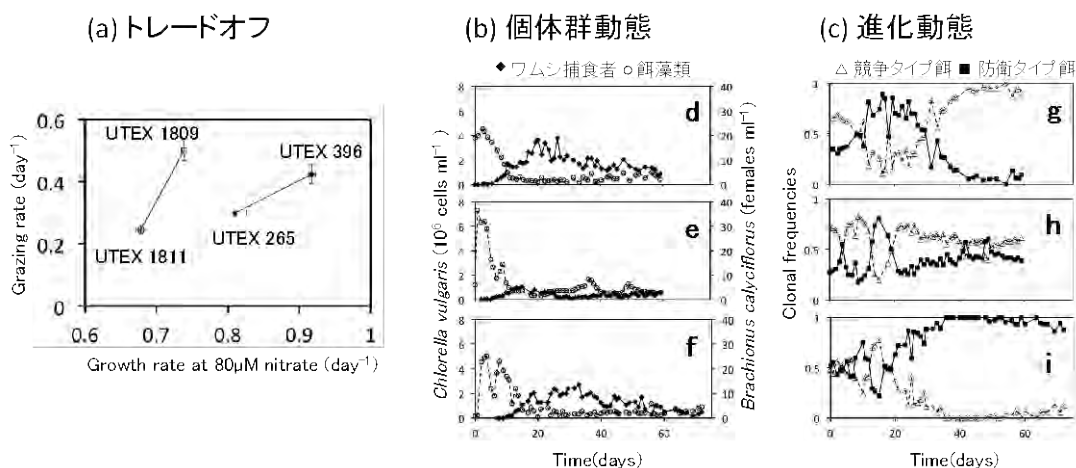


図3. 異なる遺伝的トレードオフによる進化が個体群動態と進化動態に及ぼす影響. (a)捕食者に対する抵抗性と栄養塩をめぐる競争能力の間にトレードオフがあるが、餌藻類のペアによってその「形」が異なる。(b, c)トレードオフの違いは、捕食者-被食者(ワムシー藻類)系の個体群動態や、藻類個体群の進化動態に違いをもたらす。d, g は、UTEX1809とUTEX1811の場合であり、e, g, h, i は、UTEX396とUTEX265の場合である。

#### 研究テーマB「移動分散と遺伝子流動が個体群動態と進化動態に与える影響の評価」

移動分散が個体群動態に与える影響について、移動分散によりつながる2つの群集の個体群動態を数理モデルにより評価した。その結果、群集のどの栄養段階が移動分散するかによって、個体群動態への影響が大きくことなること、移動分散の影響は群集がおかれた環境条件にも依存することが明らかとなった(図4)。成果は、Suzuki and Yoshida (2012)として公表した。また、この研究で見つかった多重安定な個体群動態について研究を進め、一般のレジームシフト理論に貢献するような成果も得られた。

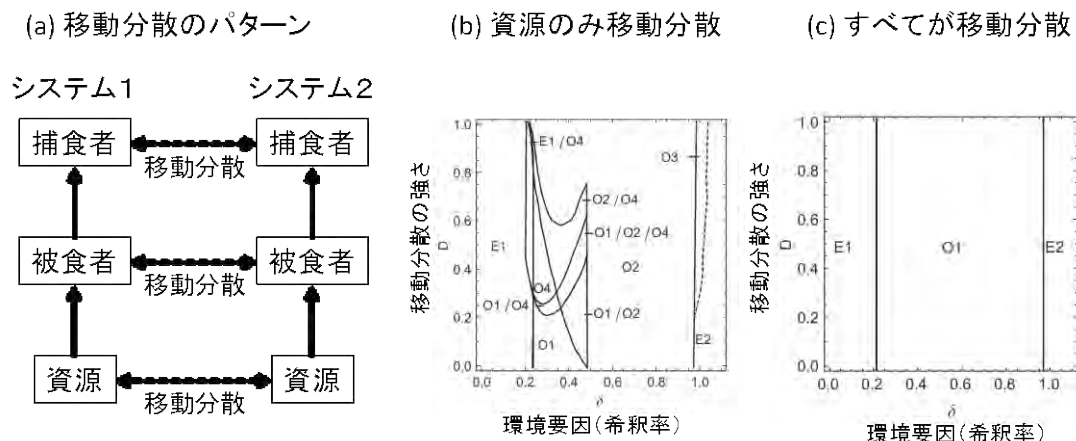


図4. 移動分散が個体群動態に及ぼす影響. (a)2つの群集が、それぞれの栄養段階の移動分散によりつながるが、(b)最も下位の栄養段階(資源)のみが移動分散し、他の栄養段階は移動分散しない場合は、移動分散の強さや環境要因に応じてさまざまな個体群動態が複雑に現れる。一方、(c)すべての栄養段階が移動分散する場合や、被食者と資源が移動分散する場合は、個体群動態は環境要因には影響を受けるものの、移動分散には影響を受けない。E1,E2:平衡状態, O1:空間同調した振動, O2:システム1と2で逆位相の非同調振動, O3:間欠性カオスによる非同調, O4: カオス的な非同調。

### 3. 今後の展開

数理モデルにより興味深い適応現象と生態現象の関連が新しく予測され、一方で、長期培養実験により過去の理論では説明できない適応現象や生態現象も見つかった。理論予測の実証や観測された現象の理論的な説明が残る研究課題もあり、今後も継続して取り組む。理論と実証のすりあわせにより最終的に理解できた適応現象と生態現象の関係について、順次、論文として成果を公表していく。

適応と生態のフィードバック関係は、ゲノム～表現型～個体群～群集という生物学的階層をまたぐ中で見えてくる現象である。近年の分子生物学は、表現型に大きな影響を及ぼす遺伝子とその働きを特定しつつ、膨大な数の遺伝子の動態を観測できるまでに発展した。一方、近年の生態学は、生物間相互作用に関わる重要な生物形質を特定し、その遺伝的背景を観測できるまでに発展した。しかし、ミクロな視点とマクロな視点が統合された生物の全体的な理解には至っておらず、新しい時代の生理生態学(エコフィジオロジー)が求められる。自然環境での生態現象を支える生理メカニズムの理解や、表現型をつくる生理現象の自然環境における実態など、今回のさがけ研究により、今後目指すべき研究課題が明確になった(図5)。

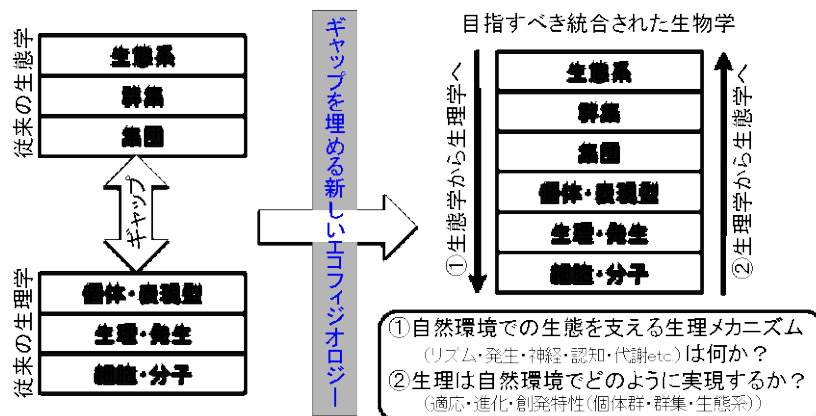


図5. 従来の生態学と生理学のギャップを埋める新しい時代の生理生態学。生物学的階層をまたいだ課題の解決により、生物の全体的な理解が進むと期待される。

### 4. 自己評価

研究テーマ A・B とともに、当初予定していた計画通りに進めることはできなかったが、研究方向の修正を経て、上述のような新しい成果を得ることができた。また、現在進行中の研究を継続することにより、研究期間中に得られた成果を投稿論文としてまとめ、近いうちに公表することを予定している。研究テーマ A では、当初は進化と表現型可塑性の影響を直接比較できるような実験系の構築をねらっていたが、対象に予定していた生物の特性を評価した結果、理想とする実験系を構築することが困難であることが判明した。そのため、進化と表現型可塑性の影響を別々に評価し、上述のような成果を得ることができた。研究テーマ B では、当初の計画通りに移動分散の効果を理論予測することができたが、実験による理論予測の検証は実験操作手法の開発が思うように進展せず、研究期間中には実施できなかった。一方、理論研究の結果から派生して、生態学的に重要な多重安定性に関する新しい研究を進めることができた。当初の予定通りに研究が進められなかったものの、今後さらに発展させる研究の芽を複数つくれたことに満足している。

また、さがけ研究により、独立した研究室のスタートアップを完了できたことにも感謝したい。大講座に所属する小さな独立研究室であるものの、そのスタートアップには所属機関から十分な支援がなく、外部資金により新しい研究室の構築を進めざるを得ない。研究室構築のための十分な経済的支援とともに、領域会議などでの交流を通してバーチャル研究所(領域)で得られた研究刺激は、今後の研究の大切な糧となった。

## 5. 研究総括の見解

近年、個体群や群集を扱う「生態学」と生物の適応を扱う「進化学」の統合が新たな重要課題として認識されつつある中で、進化と表現型可塑性という適応現象が個体群動態に及ぼす影響と、他の集団からの移動分散や遺伝子流動が個体群動態と進化動態に与える影響を、理論と実証を連携させて解明するという挑戦的な課題に取り組んだ。まず捕食者－被食者系において被食者の防衛形質の違いが遺伝的多様性により生じるモデルと可塑性で生じるモデルを構築して、それぞれの個体群動態の特徴や、両方のモデルを組み込んだときの動態の変化について理論予測を行いさらにそれを実証する実験を進めた。実証実験は難航したが、3 者の個体数が交代で振動する動態の知見や、多重安定な個体群動態の発見など興味深い結果を得たことは評価できる。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yamamichi M, Yoshida T, Sasaki A. Comparing the effects of rapid evolution and phenotypic plasticity on predator-prey dynamics. *The American Naturalist*. 2011, 178, 287-304.
2. Suzuki K, Yoshida T. Non-random spatial coupling induces desynchronization, chaos and multistability in a predator-prey-resource system. *Journal of Theoretical Biology*. 2012, 300, 81-90.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (2) 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・招待講演 >

1. Takehito Yoshida "Rapid adaptation and its effect on predator-prey interaction." International Society for Microbial Ecology 13th meeting, シアトル、2010 年 8 月 24 日、招待講演
2. 吉田丈人「捕食者－被食者系における迅速な適応とその影響」第 26 回微生物生態学会大会、筑波大学、2010 年 11 月 26 日、招待講演
3. 山内悠司・鈴木健大・吉田丈人「生物群集の生態－適応フィードバック: 表現型可塑性と群集動態の関係」日本陸水学会第 76 回大会、島根大学、2011 年 9 月 23 日
4. Takehito Yoshida "Feedback between ecological and adaptive dynamics: experimental study using plankton" 日本生態学会第 59 回大会、龍谷大学、2012 年 3 月 18 日

#### < 著作物 >

1. 吉田丈人・鏡味麻衣子・加藤元海（編著） シリーズ現代の生態学9「淡水生態学のフロンティア」、共立出版、2012 年

# 研究報告書

## 「生物進化の2大理論の統一的理解」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 若野 友一郎

### 1. 研究のねらい

生物社会にみられる協力行動など、さまざまな生物行動の進化のモデルとして、包括適応度理論 (IFT) と Adaptive Dynamics 理論 (ADT) が用いられています。この2大理論は、それぞれ別々の研究者グループによって研究・活用されていますが、両者の関係についてはまだ完全には解明されていません。両理論の長所を組み合わせた統一進化理論が構築できれば理想的です。本研究では、両理論に含まれる暗黙の前提の部分を数学的に表現し、基礎構造をモデル化することで、生物進化の2大理論の統一的理解を目指しました。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

包括適応度理論 (IFT) を、系図の実現確率から構成されるマルコフ連鎖における定常分布の性質という形でモデル化しました。その結果、任意の空間構造のもとで、包括適応度が進化の方向を正しく近似するための十分条件を明らかにしました。次に、IFT では従来扱えなかった Adaptive Dynamics 理論 (ADT) の進化的分岐現象について、研究しました。特に、有限集団における進化的分岐について新しいモデルを解析することで、集団サイズや突然変異の効果が進化的分岐に与える影響を導出しました。ここまでの結果から、IFT と ADT の両方が必要と考えられる、空間構造を持つ集団における進化的分岐の条件を扱う準備が整いました。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A 「包括適応度理論 (IFT) の数学的基礎付けと一般化」

IFT は、血縁選択説の数学的表現です。血縁選択説では、相互作用する個体間に何らかの血縁関係がある場合に、遺伝子頻度の変化がどのようになるかを記述します。例えば、子や兄弟に対する利他行動の進化などを扱います。空間構造 (島モデル、格子モデル、ネットワークモデルなど) を持つ進化モデルでは、相互作用や繁殖が局所的に行われます。局所集団の有限性から、空間的に近い (同じ島、隣のノード) 個体は、似た遺伝形質を持つ傾向があります。このような相関も、血縁とみなすことができ、血縁度が計算できます。

従来の IFT の記述では、自然選択が存在しない中立過程をあまり詳細に記述することはせず、適応度関数のみから包括適応度を計算していました。本研究では、中立過程の詳細な記述も含めた進化モデルの完全な数学的記述を行いました。特に、「次世代を構築するとき、個体  $i$  の親として個体  $j$  が選ばれる確率」に着目し、これを系図の実現確率と呼ぶことにしました (図1)。すると、系図の実現確率はモデルを記述するのに必要な情報をすべて含み、モデルはそこから構成されるマルコフ連鎖として記述できます。包括適応度は

$$(\text{包括適応度}) = (\text{血縁度}) \times (\text{適応度関数の微分})$$

の形で記述されますが、旧来の IFT では別個に導出されていた血縁度の計算と、適応度関数の計算が、系図の実現確率というただ一つ(の関数の集合)から統一的に導出できることを示しました (Wakano, Ohtsuki and Kobayashi, in press)。また、血縁度を計算する際には、すべての個体が等しい形質を持つ中立過程における値で計算しますが、そのような近似が Taylor の定理の意味で妥当な近似であることを証明しました。微分可能な任意の系図の実現確率において包括適応度が計算できることから、今回の結果は、任意の空間構造をもつ集団において、IFT が適用できる十分条件を明らかにしたことに対応します。

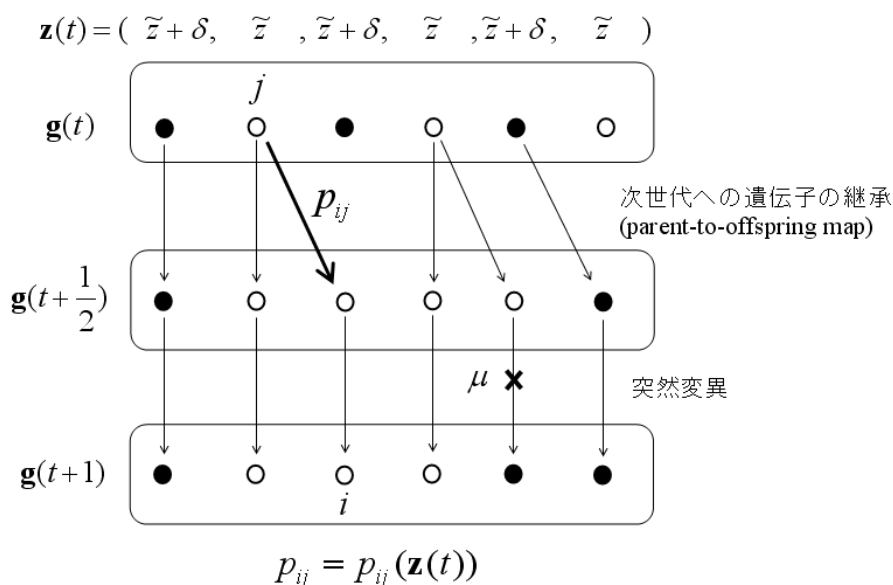


図1 包括適応度理論の数学的基礎付けと一般化のためのフレームワーク

#### 研究テーマ B-1 「有限集団における Adaptive Dynamics: 2形質近似」

Adaptive Dynamics 理論 (ADT) は、自然選択によって遺伝形質の分布が自発的に多様化するという進化的分岐を予測することができます。ADT の通常の説明では、集団中の多数派である resident に、極少量の mutant が侵入した場合を考え、mutant が得る侵入適応度を微分することで選択勾配を考察します。選択勾配の傾きが 0 となる値が進化的特異点で、進化的特異点における選択勾配の 2 次の項の符号 (ES 条件) で、進化的分岐が予測されます。

現実の生物集団は有限サイズですから、ADT をより精緻にするためには、固定確率や、そこから計算される遺伝子頻度の長時間平均を考察する必要があります。集団が resident と mutant の 2 形質だけから構成される resident-mutant 系における固定確率を計算し、とくに進化的特異点における自然選択の 2 次の項に着目して解析を行いました。

本来目指していたのは、有限集団では ES 条件がどのように変化するのかを調べることでしたが、解析の結果、resident-mutant 系の振る舞いは、ある量によってほぼ特徴付けられることが分かりました。その量は従来理論における ES 条件とは無関係で、CS 条件 (に有限集団サイズによる補正がかかったもの) と一致することが分かりました (Wakano and Lehmann 2012)。

突然変異によって遺伝形質はどのような連続値も取りえるものの、各瞬間においては、集団中にはたかだか2種類の遺伝形質しか存在しない、という resident-mutant 系は、集団サイズまたは突然変異率が十分小さい場合は現実に近い状況であり、実際の個体ベースシミュレーションでも再現できます。シミュレーションの結果そのような系では、CS 条件だけがすべてを決めており、ES 条件は無関係で、進化的分岐も起きないことを確認しました。また、各瞬間に共存する遺伝形質の種類数が、厳密に2ではなく、10程度の場合でも、進化的分岐がみられないことをシミュレーションによって発見しました(図2)

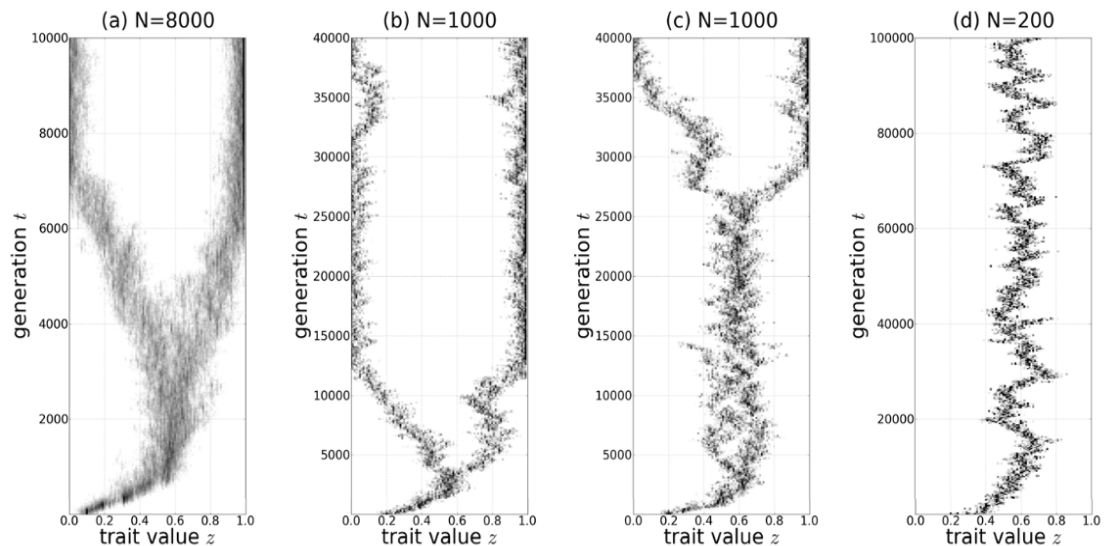


図2 個体ベースシミュレーションの結果。(b)と(c)は乱数列だけが異なる。  
指標値(本文参照)はそれぞれ、(a) 25.6 (b,c) 1.6. (d) 0.032

## 研究テーマ B-2「有限集団における Adaptive Dynamics: 正規分布近似と遺伝的浮動」

研究テーマ B-1 で得られた結果から、数学的に扱いやすい resident-mutant 系では、有限集団における進化的分岐を扱えないことが分かりました。またシミュレーションの結果から、個体数が十分大きい場合には従来の ADT を用いた ES 条件で進化的分岐が予測できるが、個体数が小さい場合には進化的分岐がまったく起きないこと、個体数が中くらいの場合には進化的分岐が起きたり起きなかったりする確率的ゆらぎがあることが分かりました。これらの結果に基づき、次の方針で新しいモデルを構築しました。まず無限集団を仮定した形質分布の発展方程式(突然変異項つきレプリケーター偏微分方程式)から、形質分布のモーメントが従う発展方程式を導出します。とくに、平均値と分散の2つの発展方程式に着目し、分布が正規分布に近いことを仮定して、高次モーメントを閉じます。次に、有限集団サイズの効果として、遺伝的浮動が働き、形質分布の分散が  $(N-1)/N$  倍される項を、分散の発展方程式に付け加えます。進化的特異点周辺に着目すれば、平均値は自然選択と遺伝的浮動のどちらによっても変化しないので、最終的に形質分散の単独発展方程式を得ます。

上のモデルで得た式から、進化的分岐が起きるためには、どのくらい大きな個体数が必要かを予測することができます。その条件は、 $w_2, \mu, \sigma, N$  をそれぞれ、分断化選択圧、突然変

異率、突然変異量の標準偏差、個体数とすると、

$$4w_2\mu\sigma^2N^2 > 1$$

と書けることが分かりました。この式はすべてのファクターの積で表現されることから、分断化選択圧の強さだけでなく、突然変異の効果や個体数などいずれの効果が弱すぎても進化的分岐は起きないことを示唆しています。

シミュレーションによって、上の条件は進化的分岐のよい指標であることを確認しました。一方で、この指標が1に近い場合は、確率的ゆらぎの効果が大きくなります。そこで、形質分散のゆらぎを計算し、分散の発展方程式を確率微分方程式に発展させたモデルを解析することで、進化的分岐が起きるまでの時間の期待値を与える公式を導出しました。シミュレーションの結果、この公式によって、個体数が中くらいの場合においても進化的分岐が起きるダイナミクスを上手くとらえられていることを確認しました(図3) (Wakano and Iwasa 2013)。

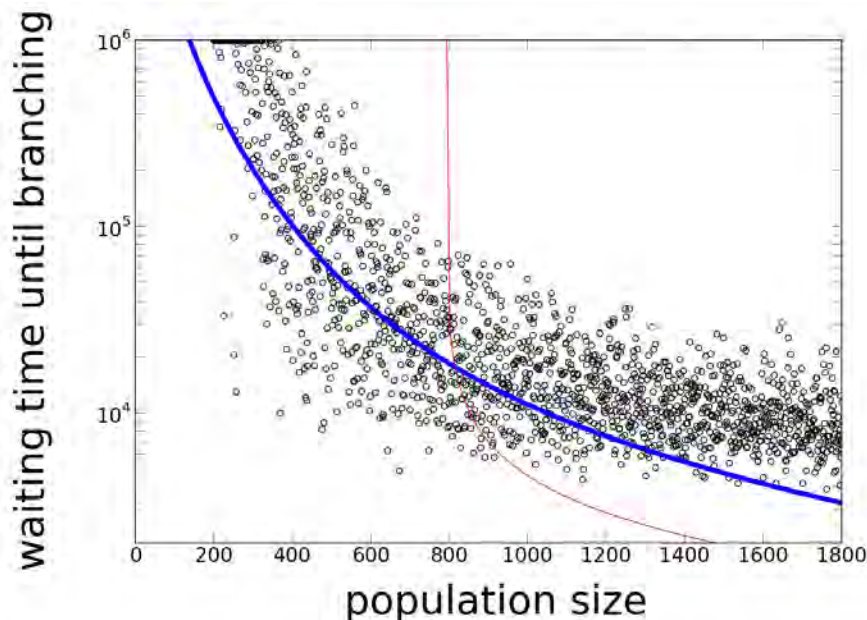


図3 中規模集団における集団サイズと進化的分岐までの待ち時間。  
赤線は常微分方程式モデル、青線は確率微分方程式モデルによる予測

### 研究テーマ B-3 「Adaptive Dynamics: 進化的分岐の数学」

通常の ADT では、シミュレーションを再現することが目標ですが、一方で個体群動態を表す偏微分方程式系そのものを出発点として、その系の振る舞いを知ること、理論の理解のために重要です。資源＝消費者系の2種偏微分方程式系を例にとり、ある条件のもとでは、一山分布が安定になることがありえない(すなわち分布が二山以上になっていく)ことを、数学者と協同で証明しました (Mirrahimi, Perthame, and Wakano 2012)。

### 3. 今後の展開

生物進化の2大理論の統一的理解を目指して、IFT と ADT のそれぞれにおいて、新しいモデリングフレームワークを提案しました。有限集団における進化的分岐を記述するモデルを構築できたので、現在は空間構造を持つ集団における進化的分岐を記述するモデルの構築・解析を行っています。より長期的には、IFT と ADT、さらにはその母体ともいえる集団遺伝学のすべてを見通せるような数理モデルを構築することで、生物学・数学・物理学の垣根を取り去ったような進化生物学の統一理論を構築することに、微力ながら貢献していきたいと考えています。

### 4. 自己評価

今回の狙いの背景として、IFT を巡る学会上の論争(多数の擁護および批判論文が出版されています)がありました。今回のさきがけ研究を通じて、IFT は暗黙の仮定を多く含む理論であるものの、その内容はとても奥深く、さまざまな進化現象を血縁選択の立場から説明しようとするのは、一つのよい視点であると感じました。IFT に対して懐疑的にその詳細を検討することで、研究テーマ A の研究ができたと思います。また ADT に関しても、IFT ほどではないものの、暗黙の仮定を含んでおり、ADT を批判する論文も出版されています。特に、ES 条件がなぜ進化的分岐の条件になるのか、そもそも進化的分岐とは何なのか、について、研究テーマ B でいくつかの成果を挙げられました。生物進化の2大理論の統一的理解のためには、両者がもつ暗黙の仮定を明らかにし、理論として見通しをよくする必要があると思います。今回のさきがけ研究は、すべてそのために行いました。完全な統一的理解ができたとはいえませんが、研究の狙いに向けてある程度の前進を果たしたと考えています。

### 5. 研究総括の見解

生物行動の進化を表す一般理論として包括適応度理論(IFT)と、Adaptive Dynamics 理論(ADT)の2大理論があるが、それぞれ得意とする対象に差があり、また、両者の数学的関係も十分明らかになっていない。本研究は両理論の数学的枠組みを明確にして、それぞれの長所を組み合わせた統一理論の構築を目指すという壮大な課題に取り組んだ。まず、IFT では、空間構造のある集団において、「系図の実現確率」と名付けた量を導入することにより、包括適応度を完全に整備された形で記述する数学的枠組みを構築した。一方 ADT では、従来無限集団を対象としてきたが、有限集団にも適用できる理論を構築した。これにより、集団サイズがある閾値より小さくなると種分化が起きないこと、また、その閾値は突然変異や分断化選択圧に依存することを明らかにした。2大理論の統合にはまだ至っていないがそれに向けた確かな一歩が踏み出されたことは高く評価できる。今後のさらなる展開を期待したい。

### 6. 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

1. Mirrahimi S, Perthame B and Wakano JY. Evolution of species trait through resource competition. *Journal of Mathematical Biology* (2012) 64:1189–1223.
2. Wakano JY and Lehmann L. Evolutionary and convergence stability for continuous phenotypes in finite populations derived from two-allele models. *Journal of Theoretical*

|                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biology (2012) 310:206–215                                                                                                                                                  |
| 3. Wakano JY and Iwasa Y. Evolutionary branching in a finite population: Deterministic branching versus stochastic branching.. Genetics (2013) 193:229–241                  |
| 4. Wakano JY, Ohstuki H and Kobayasi Y. A mathematical description of the inclusive fitness theory. Theoretical Population Biology (in press) DOI 10.1016/j.tpb.2012.11.007 |
|                                                                                                                                                                             |

(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)

受賞

明治大学創立 130 周年記念懸賞論文・自然科学分野・最優秀賞(2011 年 12 月)

# 研究報告書

## 「バクテリアのパーシスタンス現象と原始的な表現型適応」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 若本 祐一

### 1. 研究のねらい

バクテリアなどの微生物のクローン細胞集団に抗生物質などの致死的なストレスを与えると、大多数の細胞が死ぬ一方で、ごく少数の細胞が遺伝子変異を伴わない表現型的な耐性を示しながら長期間生き残ることが一般的に観察されます。この現象は「パーシスタンス」と呼ばれ、70年ほど前に発見されていますが、なぜこのような現象が起きるのか、その解明はほとんど進んでいません。その原因としては、感染症の分野などでよく研究されている、遺伝型の変化を伴う「薬剤耐性菌」とは異なり、耐性の差を遺伝型の差に還元できず、遺伝学的な理解が難しい点が挙げられます。したがって、この現象を理解するためには、同じ遺伝情報をもつクローン細胞集団のなかの、ひとつひとつの細胞の状態差とストレスへの応答の差を調べる必要があります。しかし、このような計測は技術的に難しく、研究は進んでいませんでした。

パーシスタンス現象は、与えるストレスの種類や、対象とするバクテリアの種類に依らず、一般的に起こるという特徴があります。ストレスの作用機序や、生物種ごとのストレス応答のメカニズムは大きく異なりうるにもかかわらず、なぜ一般的にパーシスタンスが起こるのか？この点についてもほとんど理解が進んでいません。

以上の背景を受け本研究では、抗生物質への応答を1細胞レベルで直接計測できる新たな技術を作製し、それを用いて、パーシスタンスを示すクローン集団の内部で実際に何が起きているのか、実験的に明らかにすることを目指しました。また、パーシスタンスが一般的に起こる背景として、細胞レベルで普遍的に観察される遺伝子発現揺らぎに着目し、これが集団の適応度に影響を与えパーシスタンスを引き起こすのに十分な性質を有しているのか、理論と実験の両面から理解することを目指しました。さらに、より一般的な見地から「個々の細胞の状態に揺らぎがある場合に細胞集団の性質はどのように決定されるのか？」という問題を設定し、これを解決するための実験技術の構築と理論モデルの検証もおこないました。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

このさがけ研究では、パーシスタンス現象が一般的に生じる原因を理解するため、クローン細胞群を1細胞レベルで解析可能な実験技術を構築し、それを用いて、細胞の抗生物質に対する応答や細胞内の生存関連因子の発現量変動の特徴を明らかにすることを目指した。また、遺伝子発現ゆらぎにもとづくパーシスタンス現象を「原始的表現型適応モデル」として理論的に表現し、その実験検証もおこなった。さらに、一般的に内部状態にばらつきをもつ細胞群によって構成されるクローン集団において、1細胞の性質と集団の性質をつなぐ関係式の解明を目指した。主要な成果は以下である：

- ①. クローン集団の抗生物質への応答を1細胞レベルで計測できる新たな技術を確立した。

- ②. マイコバクテリアを用いた 1 細胞計測を行い、ドーマント細胞の存在がパーシスタンスを引き起こすとする従来の説を否定する直接証拠を得た。
- ③. マイコバクテリアの INH に対するパーシスタンスでは、抗生物質を活性化する酵素が確率的なパルスにより発現することで、細胞ごとの生存確率の差を生み出していることを示した。これにより、確率的な遺伝子発現によりもたらされるパーシスタンス現象の存在を明らかにした。
- ④. 遺伝子の発現揺らぎ条件を改変した一連の大腸菌細胞株を構築し、これを用いて、発現ゆらぎの時間スケールが短いとパーシスタンスの効率が下がることを明らかにした。この結果は原始的表現型適応モデルの予想と一致しており、その妥当性を支持している。
- ⑤. 細胞の時系列情報や系譜を高精度に取得できる「ダイナミクス・サイトメーター」を構築した。
- ⑥. ダイナミクス・サイトメーターを用いた大腸菌の成長・分裂の解析により、大腸菌の増殖過程は Bellman-Harris 過程でモデル化できることを示した。
- ⑦. 大腸菌のクローン細胞集団は、内部の細胞の平均的成長率よりも大きな成長率で成長できることを示すとともに、1 細胞の長期系列に沿った歴史統計量を世代時間分布から予言できることを実験で示した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「1 細胞計測系の立ち上げ」

クローン集団内の細胞の様子を 1 細胞レベルで連続的に追尾観察することを可能にする、新たなマイクロ流体デバイスを開発した。今回の研究では、扱う細胞種の違いに応じて、2 種類のデバイスを作製した。ひとつは、マイコバクテリアの計測に用いるものであり、図 1AB にその概要を示している。このデバイスでは、平らなカバーガラス上に細胞が置かれ、その上部に半透膜を配置し、さらにその上部から、流路構造をもつ PDMS パッドを装着させる構造になっている。もうひとつのデバイスは、大腸菌の計測に用いるものであり、先のデバイスとの大きな違いは、カバーガラスに幅 3  $\mu\text{m}$ 、長さ 80  $\mu\text{m}$  の細い溝がエッチングにより作られており、上面をカバーする半透膜によって細胞はその内部に閉じ込められる構成となっている点である。マイコバクテリアは厚い細胞壁をもつため、直接半透膜を被せても問題なく成長できるのに対し、大腸菌は、直接半透膜とガラスの間に挟まれると、押しつぶされた異常な形状で成長する。この問題を回避するため、溝を作製した。

これらのデバイスを用いることで、抗生物質投与に対する細胞の応答を 1 細胞レベルで計測することが可能となり、また抗生物質投与下での細胞の挙動や、各種遺伝子発現の情報を取得できることを確認できた(図 1C)。

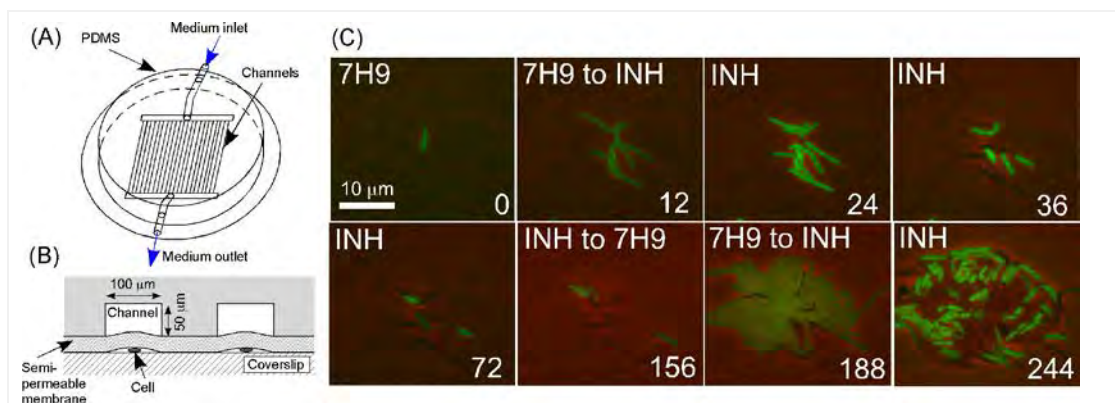


図 1. パーシスタンス現象の1細胞計測。(A) マイコバクテリアの観察に用いるマイクロ流体デバイスの概要図。(B) デバイス内部断面図。(C) パーシスタンス応答のタイムラプス計測。右下の数字は観察開始からの時間(h)。

## 研究テーマ B 「蛍光タンパク質でラベルした生存関連因子を発現する細菌細胞株の構築」

原始的表現型適応モデルを実験検証するためには、実際に細胞の適応度と相関をもつ細胞内因子の発現量と、その細胞の分裂、死亡の関係を直接計測することが必要となる。そのような計測を実現するため、ストレス環境下で細胞の適応度と相関をもつ可能性の高い因子を、蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現する一連の細胞株を作製した。

マイコバクテリアでは、抗生物質イソニアジド(INH)の活性化を触媒する酵素 KatG を蛍光タンパク質 DsRed2 との融合タンパク質として発現する細胞株を、共同研究者の Neeraj Dhar 氏が作製した。一方で、大腸菌を用いた実験では、生存関連因子の発現ゆらぎの条件を実験者側から改変し、それぞれのゆらぎ条件でのパーシスタンス応答を調べ、上記モデルを構成的に検証できる細胞株を構築した。具体的には、ストレプトマイシンを不活性化する酵素を蛍光タンパク質 Venus との融合タンパク質として発現する構成を骨格としたもので、その発現に関わる発現誘導プロモーター、リボソーム結合サイト、さらにタンパク質の分解レートに影響を与えるプロテアーゼ認識タグをそれぞれ数種類ずつ用意し、それらを組み合わせることで異なる発現ゆらぎ条件をもつ細胞株ライブラリを作製した。実際、これらの細胞株を用いることで、様々な発現ゆらぎ条件を作り出せることを確認した。特に、プロテアーゼ認識タグを用いることで、ゆらぎの時間スケールを変えられることが確認できた。理論モデルからは、ゆらぎの時間スケールが短い場合には、パーシスタンスの効率が下がることが予想されており、作製した細胞株を用いれば、これを直接検証できる。

## 研究テーマ C 「構築した細胞株を用いた 1 細胞計測の実行」

上記研究テーマ A、B で作製したデバイスと細胞株を用い、抗生物質ストレスを与えた際のパーシスタンス応答を1細胞レベルで計測した。

従来の研究では、パーシスタンスは、クローン集団内に成長も分裂もほとんどしない「ドーマント細胞」が抗生物質を投与する前から存在し、これが抗生物質投与下で生き残り続けることで生じるのではないかと考えられてきた。しかし、マイコバクテリアを用いた我々の研究の結果、抗生物質 INH 投与下での生存と、投与直前の成長率のあいだに相関はなく、この従来の説を否定する結果を得た。一方で、INH 投与下における KatG の発現と、細胞の生死の関係を調べると、KatG は通常ほとんど発現しておらず、各細胞内で確率的にパルス状の発現が起こ

ることを明らかにした。さらに KatG のパルスの発現を起こした細胞の生存確率は、起こさなかった細胞に比べ、有意に低下することも明らかにした。このように細胞内で生存に関連する因子の確率的発現が、クローン集団内の細胞群に、抗生物質に対する感受性の差をもたらしていることを突き止めた。

また、大腸菌細胞株を用いた実験では、構築した一連の細胞株が、野生株に比べストレプトマイシンに対してはるかに高い耐性を示すことを確認した。蛍光量の時間変化を 1 細胞レベルで計測できることも確認し、融合タンパク質が目的の機能を維持していることを明らかにした。さらに、構築した細胞株は典型的なパーシスタンス応答を示し、マイコバクテリアと同様、ドーマント細胞非依存的なパーシスタンスを起こすことが分かった。

#### 研究テーマ D 「1 細胞計測によるタイムラプス画像を解析するソフトウェアの開発」

研究テーマ C の計測でえられるタイムラプス画像を効率的に解析し、細胞の動態や、発現量などの定量情報を取得・解析するためのプログラムを作製した。このプログラムは ImageJ(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)のマクロとして書かれ、ImageJ の各種機能を利用しながら、タイムラプス画像から、細胞の輪郭抽出、サイズ、輝度の計測、さらに異なる時間に撮影された画像間での細胞の対応付けなどをおこない、細胞の系統関係を維持した定量データを提供する。えられたデータは別途作成したデータ解析プログラムにより解析され、下記図2で示した細胞動態の時系列情報などを得ることができる。これらを用いることで、上記研究テーマ C で述べた結果などを取得することができた。

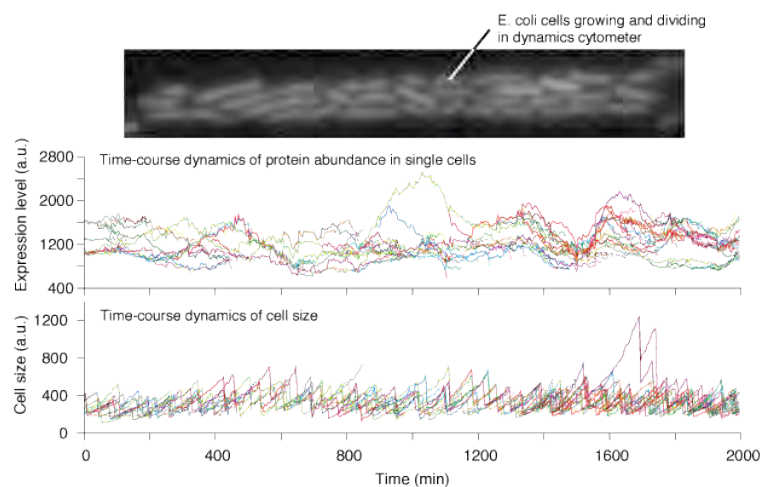


図 2. ダイナミクス・サイトメーターによる細胞動態の長期計測。

#### 研究テーマ E 「えられた結果をもとにした原始的表現型適応モデルの検証・改良」

このさがけ研究で扱う「原始的表現型適応モデル」では、細胞の適応度と相関をもつ因子の発現ゆらぎの性質がパーシスタンスの効率に影響を与え、特に、発現ゆらぎの時間スケールが短いとパーシスタンスの効率が下がることが予想される。本研究で構築した大腸菌細胞株を用いた研究テーマ C の実験結果から、プロテアーゼ認識タグを結合させ、発現ゆらぎの時間スケールを短くさせた細胞株は、耐性遺伝子の平均発現量が高くても、パーシスタンスの効率が低くなることが明らかになった。また、抗生物質環境下で、耐性遺伝子の集団発現量分布が、元の分布から新たな分布へと緩和する過程が観察されており、これも理論モデルの予想する結果と一致している。現在、各細胞の発現量と、各発現量における生存確率を計測する実験を進めており、この結果から、分布のシフトが説明できるか確認する作業を進めて

いる。この実験は原始的表現型適応モデルのより徹底した検証になると考えられる。

#### 追加研究テーマ「1 細胞系列と細胞集団をつなぐ数学関係式の解明」

このさきがけ研究は、パーシスタンスという表現型適応現象をモデルに、遺伝子発現のゆらぎと集団の適応の関係に着目し立案されたものである。しかしこの研究を進める中で、パーシスタンスという現象だけでなく、より一般的な観点から、細胞の内部状態と適応度に相関があり、内部状態にばらつきが存在する場合、細胞の内因的な性質と集団の性質には差が生じることを理解した。そこで、一般に内部状態にゆらぎをもつ細胞の性質と集団の性質はどのように関係づけられるのかを明らかにしたいという動機がうまれた。以上の背景のもとで、追加テーマを設定し、1 細胞と細胞集団の性質をつなぐ数学関係式を理論・実験の両面から検証する研究をおこなった。

この研究を遂行するために、新たな細胞計測デバイス「ダイナミクス・サイトメーター」を開発し、まず大腸菌の成長・分裂のゆらぎの性質を解析した。その結果、大腸菌の増殖過程は Bellman-Harris 過程と呼ばれる分岐過程モデルできれいに説明できることが分かり、またその帰結として、

- ① 細胞集団は、1 細胞がもつ内因的な成長率よりも大きな成長率で成長できる
- ② 世代時間の分布から、集団の成長率と年齢構成分布を予測できる
- ③ 世代時間の分布から、長時間を定常環境下で増殖する集団内で支配的になる最適細胞系列に沿った年齢構成分布を予測できる。つまり歴史統計量を予測できる。

ことを示した。

また、予期せぬ結果として、異なる環境条件下での世代時間分布の平均と分散には線形関係があることを明らかにした。この線形関係は、各細胞種があらゆる環境中でとれる最大成長率を規定しており、環境条件などの詳細に依存せず細胞の内因的な成長能力の限界を明らかにする処方箋を与えている。この結果は最大成長率など、細胞の普遍的性質を現象論的に明らかにできる重要な可能性を示唆しており、他の生物種でもこの線形関係が成立するのか、今後明らかにすることを計画している。

### 3. 今後の展開

今回の研究で、パーシスタンスはドーマント細胞が生き残ることにより引き起こされるとする従来の仮説は、必ずしも一般的に正しいわけではないことを示した。しかし、大腸菌のある変異株を用いた他の研究では、ドーマント細胞によるパーシスタンス機構を支持する結果も得られている。したがって、ドーマント細胞に依存するパーシスタンス応答と、その他のパーシスタンス応答がどのような条件下で生じるのかを明らかにすることは、重要な課題だと考えられる。ひとつには、追加研究テーマで扱った成長・分裂のゆらぎと、内部の生存関連遺伝子の発現ゆらぎとが密接に相関しており、両者の依存性にしたがって、パーシスタンスの応答モードが変化する可能性も考えられる。実際に、遺伝子の発現ゆらぎの時間スケールを異なる細胞系列ごとに調べると、成長率が大きい細胞系列ほど発現ゆらぎの時間スケールも短くなることが分かっている。これらの解析を今後進め、パーシスタンスを説明する、より一般的なフレームワークの構築に結びつけていきたいと考えている。

今回の研究で、細胞系列の歴史統計量を取得することが技術的に可能になった。実際この研

究で取得した最適細胞系列の年齢構成分布は、各年齢における選択圧の強さの指標になっていることが示される。また他の理論研究により、変動する環境下で、細胞系列にそった分裂頻度の統計を取れば、その環境変動に対し、Stochastic に応答しているか、Responsive に応答しているか区別できることも示唆されている。このように、細胞系列に沿った統計量のもつ生物学的な意義を理解することは、理論的にも重要な課題であり、開発した計測技術を用いた実験と組み合わせ、今後研究を発展させていきたいと考えている。

#### 4. 自己評価

本さがけ研究では、パーシスタンス現象が一般的に生じる背景機構の理解を目指し、特に遺伝子発現ゆらぎの果たす役割を明らかにすることを中心に研究を遂行した。その実験検証に必要となる 1 細胞測定系の確立、構築した測定系用いたマイコバクテリアのパーシスタンス現象の解析、発現ゆらぎ条件を改変した大腸菌細胞株の構築とそれを用いた原始的表現型適応モデルの検証をおこない、従来のパーシスタンスモデルであるドーマント細胞説の反証、細胞内酵素の確率的発現にもとづくパーシスタンスの実証など、当該分野において重要な結果を得ることができたと考えている。生存関連因子の発現ゆらぎの時間スケールを変化させた細胞株を用いて、パーシスタンスの効率を比較した実験では、モデルの予想と一致する結果をえており、理論の妥当性を支持しているが、確定的な結論を得るには、さらに注意深い検証が必要であり、これはまだ今後の課題として残されている。当初予想していなかった結果として、細胞の時系列や系譜を 100 世代以上にわたり計測可能なダイナミクス・サイトメーターを構築でき、さらにそれを用いて、集団と 1 細胞の成長率の差、歴史統計量と世代時間分布の関係などを明らかにできたことは、重要な成果であったと考えている。またこの研究の中で、細胞の長期時系列にそった統計量をもつ生物学的意義を明らかにするという新たな理論的課題を認識することができた。今回のさがけ研究では当初の想定を超えた理論モデルの発展をもたらすことはできなかったが、このような細胞の系譜という観点からパーシスタンス現象を捉えることで、新しい視点の獲得につながるのではないかと期待している。残された課題は、さがけ研究終了後にも引き続き研究を行っていく予定である。

#### 5. 研究総括の見解

微生物のクローン集団が抗生物質などの致死ストレスを与えられても、大多数は死滅するものの極く少数が遺伝子変異を伴わずに原始的表現型適応を示して生き残るパーシスタンス現象に関し、1 細胞レベルで直接抗生物質への応答を計測できる新たな技術を開発して、理論と実験の両面から解明するという難度の高い研究課題に挑戦した。まずマイコバクテリアにおける抗生物質存在下でのパーシスタンス現象について観察を行い、従来のドーマント仮説を否定する結果を得た。さらに、抗生物質活性化酵素の発現にパルス状の揺らぎがあり、パルス発現を起こさない細胞は生存率が高いことを見いだした。これらの観察に基づいてパーシスタンス現象は遺伝子発現の揺らぎに起因するという新しいメカニズムを提唱したことは高く評価される。この成果はサイエンス誌に掲載され、Nature Reviews 誌や一般メディアにも取り上げられて大きな注目を集めた。また、この研究の延長として、100 世代以上に渡る計測が可能な新デバイス「ダイナミクス・サイトメーター」を開発し、光学メーカーや顕微鏡グラス製造メーカーの高い評価を得たため JST から PCT 出願されたことも特筆できる。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文) 発表

|                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Tomita, T., Sugawara, T., Wakamoto, Y. Multitude of morphological dynamics of giant multilamellar vesicles in regulated nonequilibrium environments. Langmuir. 2011, 27(16), 10106-10112.    |
| 2. Wakamoto, Y., Grosberg, A. Y., Kussell, E. Optimal lineage principle for age-structured populations. Evolution. 2012. 66(1). 115-134.                                                        |
| 3. Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S., McKinney, J. D. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. Science. 2013. 339(6115). 91-95. |
|                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                 |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 2件

1.

発 明 者: 若本 祐一、橋本 幹弘

発明の名称: 細胞培養装置、細胞培養方法、および細胞培養観察装置

出 願 人: 独立行政法人科学技術振興機構

出 願 日: 2011/7/15

出 願 番 号: 特願 2011-156767

### (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)

#### 主な学会発表

1. Wakamoto, Y. Dynamic persistence against lethal antibiotic stress. Aspen Center for Physics 2010 Winter Conference on Biophysics: Populations, Evolution and Physics. Jan. 3-9, 2010, Aspen, CO, USA.

2. Wakamoto, Y. Bacterial persistence based on epigenetically correlated stochastic gene expression. 5<sup>th</sup> International Conference on Analysis of Microbial Cells at the Single Cell Level. Nov. 5-8, 2011, Carry-Le-Rouet, France.

#### プレスリリース

1. バクテリアの抗生物質適応能を高めるパーシスタンス現象の解明進む ～70年信じられた定説を覆す確率的遺伝子発現による適応～. 東京大学、科学技術振興機構.  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130104-2/index.html>