

## 6. gTOW 法によるロバストネスの測定

守屋央朗, 北野宏明

ロバストネスは、生物の多くの側面に観察される偏在的特長である。われわれは、これが生命のシステムレベルでの基本原理の中核を構成する特徴であると考え、実験と理論の両面から研究を進めてきた。本稿では、われわれが細胞の遺伝子発現の変動に対するロバストネスを網羅的かつ定量的に測定するために開発した遺伝子綱引き法 (genetic Tug-Of-War : gTOW) について解説する。この方法では、遺伝子過剰発現の上限を定量的に同定することができる。この実験によって得られるデータと分子相互作用マップや計算機モデルによるロバストネス解析の違いを比較解析することによって、ロバストネスと脆弱性のトレードオフが同定されるとともに、より精度の高い計算モデル構築への知見を得ることができる。

### 1 生命のシステムレベルの特性： ロバストネス

システムバイオロジーの研究目標は、生命のシステムレベルでの理解を目指し、その基本原理を解明することにある。ここで、「システムレベルでの理解」というのは、単に遺伝子やタンパク質などのシステムの構成部品の理解ではなく、それらの構成物のダイナミックなネットワークによって構成されるシステム自体の理解を意味する。ここではシステムレベルでの特徴

を同定し、解析することが重要になる<sup>1)</sup>。「ロバストネス (頑健性)」とは、あるシステムの有するある機能が、いろいろな外乱・内乱に対して維持される能力のことを言う。ロバストネスは淘汰圧を受けながら進化した生命システムに普遍的に見られる基本特性である<sup>2) 3)</sup>。

複雑化によって環境への適応を達成する戦略を選択した種は、制御機構の高度化によってロバストネスを獲得する。しかし、日常的な摂動に対してロバストになるように高度に適応したシステムは、適応外の摂動に対してきわめて脆弱になる。これをロバストネスと脆弱性のトレードオフと呼ぶ<sup>4)</sup>。このトレードオフは、生物システムだけではなく、工学システムにも普遍的に観察される現象であり、複雑なシステムの基本原理の反映ではないかと考えている<sup>2)</sup>。このトレードオフを理解することは、システムの不調がどのように発生しそれにどのように対処すればよいかを理解するうえで非常に重要である。これは、疾病とその対処方法

#### 【キーワード&略語】

ロバストネス (robustness), 細胞内パラメータ, ロバストネス・プロファイル, トレードオフ (tradeoff)  
**CDC 遺伝子** : cell division cycle (細胞周期関連) 遺伝子  
**gTOW** : genetic Tug-Of-War (遺伝子綱引き法)

#### Measuring robustness using gTOW Method

Hisao Moriya<sup>1) 2)</sup> / Hiroaki Kitano<sup>3)</sup> : Japan Science And Technology Agency, PRESTO<sup>1)</sup> / Department of Systems Biology, Cancer Institute<sup>2)</sup> / Sony Computer Science Laboratories, Inc.<sup>3)</sup> (独立行政法人科学技術振興機構さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」<sup>1)</sup> / 財団法人癌研究会癌研究所システムバイオロジー部<sup>2)</sup> / 株式会社ソニーコンピュータサイエンス研究所<sup>3)</sup>)

150のパラメータそれぞれの値を上げた時にどこで細胞周期が破綻するか？

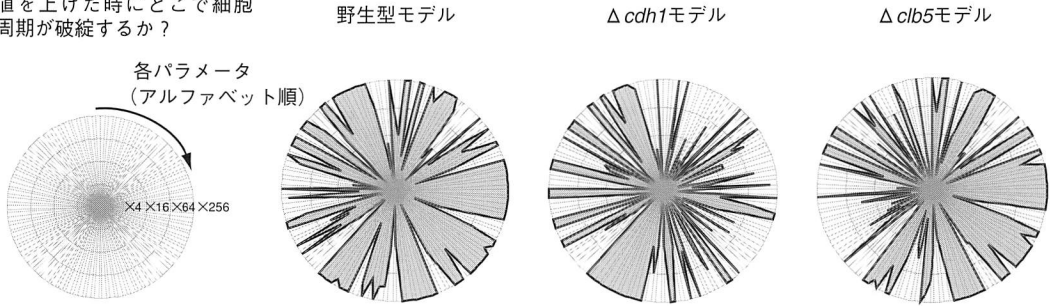


図1 Chen2004 modelのパラメータの上限  
詳細は本文を参照

のシステムの理解につながる<sup>5) 6)</sup>。

本稿では、細胞のロバストネスを測定するgTOW法について解説し、ロバストネスを測定するとはどういうことか？ロバストネスを測定することでどのようなことが明らかになるのか？といったことを解説する。

## 2 細胞内パラメータの限界値と細胞のロバストネス

生物学的ロバストネスについては、大腸菌の化学走性<sup>7)</sup>、ショウジョウバエの初期発生<sup>8)</sup>、細胞周期<sup>9)</sup>、 $\lambda$ ファージの遺伝子スイッチ<sup>10)</sup>などを対象にして、実際の生命システムでの研究が行われている。

このような研究では、細胞のもつロバストネスの一端は、細胞内パラメータの許容範囲を指標として調べられる。細胞内パラメータの変動は、突然変異やノイズといった内乱、温度変化といった外乱によって起こる。これは内的パラメータの変動に対する細胞システムのロバストネスを調べていることになる。

このような例として、米国Virginia大学のJohn Tysonらのグループが報告した出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の細胞周期モデル (Chen2004モデル) を紹介する<sup>11)</sup>。これは出芽酵母の細胞周期関連 (CDC) 遺伝子約30を含む、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) の活性制御に関するコンピュータモデルであり、これまでに調べられている131の変異株の表現型のうち、120を再現する優れたモデルである。

図1は、Chen2004モデルの150あるパラメータのそれぞれを上昇させていった時にどこで細胞周期が破

綻するかをシミュレーションしたものである。野生型の細胞周期ネットワークでは、半分以上のパラメータのそれぞれを256倍以上に上昇させても細胞周期は維持される (図1野生型モデル)。一方、 $\Delta cdh1$ 株や $\Delta clb5$ 株などの変異株モデルでは、野生型株に比べて許容範囲の広いパラメータの数が著しく減っている (図1  $\Delta cdh1$ ならびに $\Delta clb5$ モデル)。このことから野生型のネットワークは、細胞内パラメータの変動に対して高いロバストネスをもっていることがわかる。さらにそれぞれの変異型株は、上限が下がったパラメータの種類が異なることがわかる。つまりこれらの株はそれぞれ異なった摂動に対しての脆弱性をもっている。

このように、細胞内パラメータの限界を網羅的に知ることで細胞のもつロバストネスやそのロバストネスの特性 (「ロバストネス・プロファイル」と呼ぶ) を推し量ることができる。

## 3 パラメータの限界値を測定する実験系 - gTOW法

細胞内のパラメータの具体例としては、遺伝子産物の細胞内の存在量 (これは、遺伝子の転写の速度、転写産物の翻訳の速度・分解の速度、タンパク質の合成・分解速度などの、より解像度の高いパラメータによって決まる)、タンパク質の活性 (触媒活性-リン酸化やユビキチン化-などを表す反応速度) などがあ

る。しかし細胞内でのこれらの値を測定することは一般的に難しいだけでなく、限界値を網羅的に測定することは今の技術では非常に困難である。

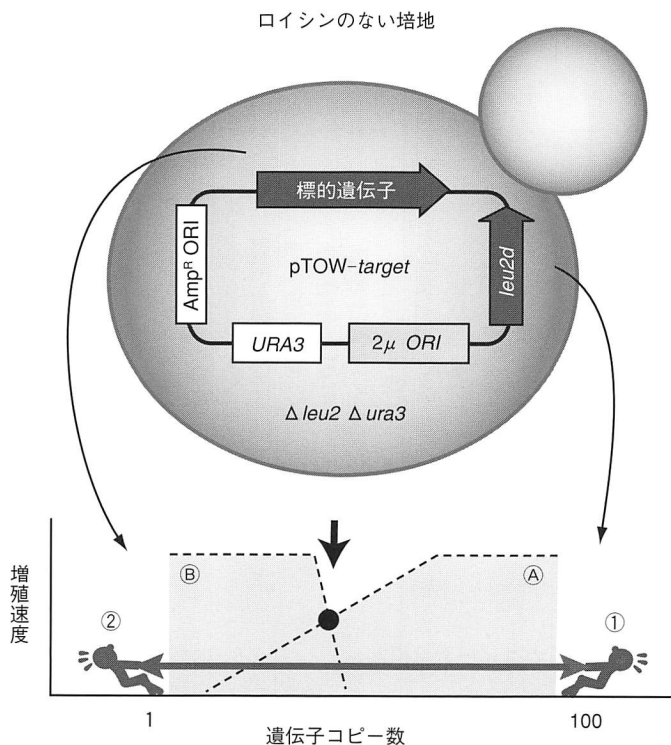


図2 gTOW法の模式図

標的遺伝子の上限に近いプラスミドコピー数(太矢印で示した黒丸)をもつ細胞が*leu2d*による高コピー選択圧と標的遺伝子による低コピー選択圧の遺伝子綱引きによって濃縮される。詳細は本文を参照

そこでわれわれは、モデル真核生物の出芽酵母細胞を利用して、標的遺伝子のコピー数の上限(増殖を阻害する直前のコピー数)を決定することができる、遺伝子綱引き(gTOW)法を考案・開発した<sup>12)</sup>。一般的に遺伝子のコピー数が上昇すると遺伝子産物の発現も上昇する。システムの中である遺伝子の関わる部分(サブシステム)がその遺伝子の発現上昇に対してロバストであれば、その遺伝子のコピー数の上限は高く、逆にその遺伝子が関わるサブシステムがその遺伝子の発現上昇に対して脆弱である場合、その遺伝子のコピー数の上限は低いことが期待される。このようなことから、システムに関わるすべての遺伝子のコピー数の上限を網羅的に測定することができれば、その生命システムの「遺伝子の過剰発現に対するロバストネスの特性(ロバストネス・プロファイル)」を知ることができる。

gTOW法では、*leu2d*(非常に活性の低いロイシン

合成酵素遺伝子)をもった多コピーのプラスミド上に、標的の遺伝子をクローニングする。このプラスミドを*leu2*遺伝子が破壊された酵母株に導入し、ロイシンのない培地で増殖させると(図2上)、より高いプラスミドコピー数をもつ細胞がより高い増殖速度をもつために濃縮され(図2下の点線のグラフA)、最終的には細胞当たり100コピー以上のプラスミドコピー数をもつ細胞が濃縮される。すなわち、*leu2d*はプラスミドコピー数を100コピー以上に上げようとする遺伝的選択圧として働く(図2矢印①)。一方、標的の遺伝子が上限をもっている場合、上限より高いプラスミドコピー数をもった細胞の増殖は阻害されるため(図2下の点線のグラフB)、標的遺伝子はプラスミドコピー数を下げる遺伝的選択圧として働く(図2矢印②)。実際のプラスミドのコピー数は、*leu2d*と標的遺伝子の選択圧の綱引き(Tug-Of-War)がつりあった数となる。*leu2d*の選択圧はどの標的遺伝子を用い

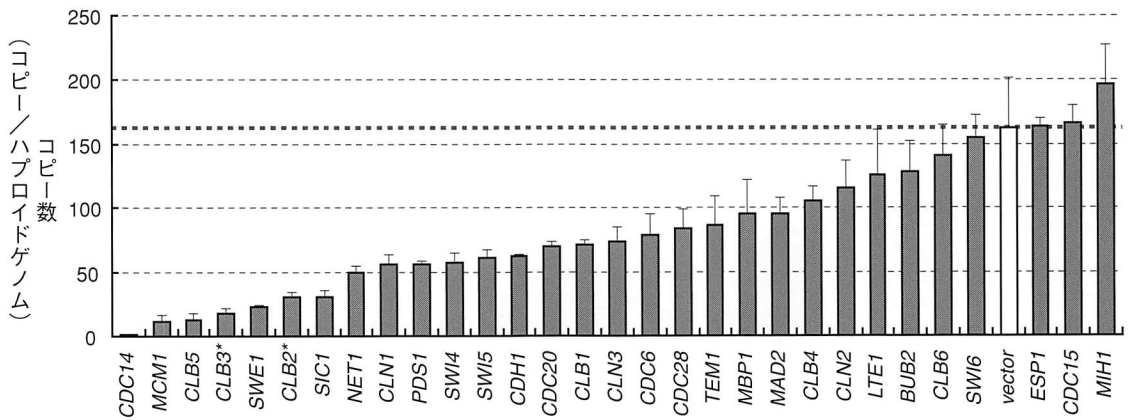


図3 gTOW実験によって決定された、CDC遺伝子のコピー数の上限

gTOW実験によって決定されたCDC遺伝子コピー数の上限は2~100コピー以上であった。このような情報は細胞のシステムレベルの特性とどのように関連しているのだろうか？

た実験でも一定であることから、このコピー数は標的遺伝子の上限に相関した数となる。

実際の細胞内でのプラスミドのコピー数はリアルタイムPCR法によってハプロイドゲノム当たりのコピー数として定量される。この手法ではネイティブなプロモーターをもった遺伝子を基本単位としており、細胞増殖阻害の限界値が「遺伝子コピー数(すなわちネイティブな状態の倍数)」という相対的な数値として得られるため、遺伝子間の比較が可能になる。これは、これまでのプロモーター置換による過剰発現系では得られなかった定量的情報である。

#### 4 細胞周期関連遺伝子のコピー数の上限

次に、gTOW法のテストケースとして30の細胞周期関連遺伝子(CDC遺伝子)について解析した事例を解説する。詳細は文献12を参考にさせていただきたい。ここで標的に選んだ遺伝子は主に前述したChen2004モデルに含まれる遺伝子である。図3は、gTOW実験によって決定された30のCDC遺伝子のコピー数を表したものである。gTOW実験で得られたコピー数は、2~100コピー以上であった。

この実験系で留意しなければならないことは、①遺伝子のコピー数、すなわちDNAそのものの量を上昇させたことが、細胞にとって摂動になりコピー数の上限を決定したのではないことを確かめること、②遺伝子コピー数の上昇がタンパク質の発現量の上昇に相関

しているかを確かめることである。①についてのコントロール実験として、われわれは30の遺伝子のすべてにフレームシフト変異を人工的に導入した。その結果、野生型遺伝子で80コピー以下のgTOWコピー数を示した遺伝子のすべてが、フレームシフトによって100コピー以上の上限を示すようになった。このことから、gTOW実験でのプラスミドコピー数は標的遺伝子から発現しているタンパク質が決定していることが裏付けられた。②について、われわれは定量的ウエスタンブロットによってタンパク質の増加量を測定している。gTOW実験の標的である30のCDC遺伝子のうち、内在性のタンパク質が測定できた12のタンパク質の中で11のタンパク質が遺伝子コピー数の上昇とタンパク質の発現上昇が高い相関をもっていた。

さらに、ここで得られたコピー数上限データは、全体として①遺伝子の必須性(破壊した時に致死になるかどうか)、②GALIプロモーターからの過剰発現によって引き起こされる増殖の遅延、③ネイティブなタンパク質の発現量などのデータ、のいずれとも高い相関を見せなかった。このように、gTOW実験で得られる定量データは細胞に関する非常にユニークな情報を提供することがわかる。

#### 5 遺伝子コピー数の上限と細胞周期システムとの関わり

それでは、このようにして得られたコピー数の上限

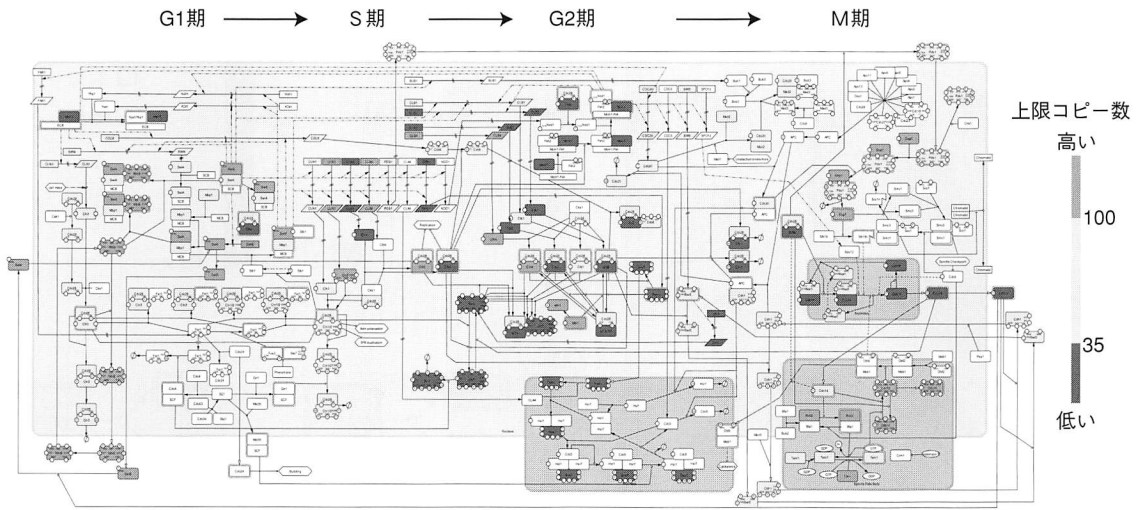


図4 出芽酵母細胞周期システムの、遺伝子の過剰発現に対するロバストネス・プロファイル (巻頭カラー図10参照)  
 遺伝子コピー数の上限を出芽酵母の分子相互作用マップ上に可視化することで、特にB型サイクリン依存性キナーゼの制御に関わる遺伝子群 (中央部分) の上限が低く、この遺伝子群を含むサブシステムの脆弱性が高いことがわかった (文献12より改変引用)

は、細胞のシステムレベルの特性とどのような関係があるのだろうか？単純にある遺伝子の上限についての知識が得られたとしても、それだけでは細胞のシステムレベルの特性は理解できない。そこでわれわれは2つのアプローチをとった。

### 1) 分子相互作用マップ上における可視化

1つ目のアプローチとして、これまでに蓄積されている知識を統合してCDC遺伝子の分子相互作用ネットワークをマップ化し、そのマップ上にgTOW実験で得られた遺伝子コピー数の上限のデータを可視化した(図4)<sup>13)</sup>。この「ロバストネス・プロファイル」で明らかになったことは、特にS/G2期を制御する遺伝子群のコピー数の上限が低いことであり、詳細に検討したところ、特に上限の低い遺伝子群は、B型サイクリンCDKの活性を制御するサブシステムを構成することが明らかになった。これは、細胞周期を不可逆的に進行させるために必要な細胞周期の根幹のサブシステムであり、そのダイナミックな性質のトレードオフとして遺伝子の過剰発現に対して高い脆弱性を見せたことが示唆された。これはロバストネスを測定することでシステムを特徴付ける部分を浮かび上がらせることができた初めての例である。

### 2) コンピュータモデルとの比較

もう1つのアプローチとして、前述したChen2004モデルとgTOW実験による遺伝子コピー数の上限の比較を行った(図5A)。一見してgTOW実験で得られた結果の方がより高い上限値をもっており、さらにコンピュータモデルでは実際の細胞で見られるような上限値の特性が再現されていない。コンピュータモデルが、細胞周期制御についてのわれわれの知識の統合であるとする、この矛盾点を詳細に検討することで、新たな制御機構を発見することができる可能性がある。以下にその一例を示す。

細胞周期制御で働くプロテインホスファターゼのCdc14と、プロテアーゼのEsp1はそれぞれNet1ならびにPds1という阻害因子によって一対一で結合し不活性化されると考えられており、Chen2004モデルではこの仮説を採用してモデルが構築されている(図5C, D)。実際、CDC14ではgTOW実験のデータとモデルの予測は非常によく一致した(図5B)。その一方で、ESPIは大きな矛盾を示した(図5B)。実験で得られたESPIは一対一の結合による阻害のみで説明するにはあまりにも上限が高い(160コピー以上)ため、その他の制御の存在が強く示唆される。例えば、文献14の知見を組み込み、図5Eのようにモデルを

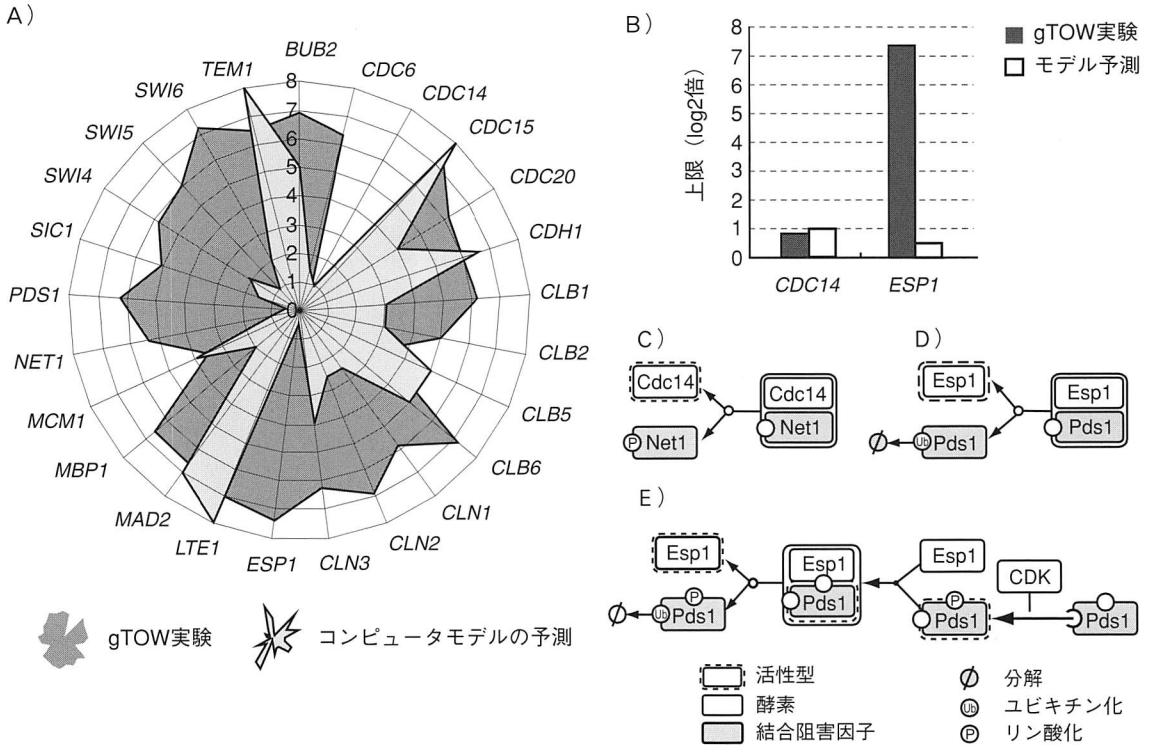


図5 gTOW法によって得られた遺伝子コピー数の上限（濃い灰色）と細胞周期コンピュータモデル（Chen2004）の予測（薄い灰色）との比較

A) コンピュータモデルは実際の細胞に比べほとんどの遺伝子の上限が低くロバストネスが低い。大きく矛盾した部分については未知の因子や制御機構の存在が予想される (B~E)。詳細は本文参照

改良すれば、このシステムはEsp1の過剰発現に対して高いロバストネスをもつことができる。

## 6 ロバストネス解析の応用例

本稿では、細胞のロバストネスの解析について、gTOW法による出芽酵母の細胞周期の解析を具体例として述べたが、一般的にはこのロバストネス・プロファイル（パラメータの限界値）を利用すれば以下のようなことが可能になる。

### 1) 細胞のロバストネス発揮の原理の解明

例えば対象のシステムがあるパラメータの変動に対して著しく脆弱な場合、それはそのパラメータが含まれるサブシステムの何らかの重要な特性のトレードオフであると考えられ、生物学的に非常に興味深い対象となる。また、あるシステムの理論的なロバストネス（コンピュータモデルで予測されるロバストネス）が

実験的に得られたものと大きく異なっている場合、それは未発見の因子や制御機構の存在を示唆しており、これを実際に調べることによって新たな生物学的知見が得られる。

### 2) 高性能細胞シミュレーターの作製

コンピュータモデルに必要な細胞内のパラメータの取得には、一般的に時系列的で精密な測定実験が必要で非常に大きなコストがかかる。パラメータの限界値がわかっている場合、モデル構築時に特定のパラメータについてのどの程度詳細に知るべきかを判断することができる。細胞のパラメータが非常に広い限界範囲をもっている場合、そのパラメータを詳細に決定するよりも、そのロバストネスを保障するメカニズムにより重点を置いた研究をするべきであり、パラメータの範囲が著しく狭い場合にはより厳密にそのパラメータの値を決めることがより重要な視点となる。

### 3) 細胞のロバストネスを指標にした新しい創薬ターゲットの探索

最後に、このようなアプローチの今後の応用面での一つの大きな展開として、健全な細胞と腫瘍細胞のロバストネス・プロファイルを取得し比較することで、腫瘍細胞のみがもつ脆弱点をあぶりだし、そこを新しい薬剤の標的とするといった、ロバストネスを指標にした新しい治療手段の構築が期待される<sup>2) 5) 6)</sup>。

### おわりに

システムバイオロジーが提唱され数年が経過し、現在では、実験と数理が密接に連動した研究が活発に行われている。しかし、実験手法の面では、従来の分子生物学実験の精度と網羅度を高める方法が主なものであり、システムの特徴を直接測定する実験手法は、これまで提案されてこなかった。本稿で議論したgTOW法は、ロバストネスというシステムレベルでの特徴を定量的に測定する手法であり、システムバイオロジーとしての実験手法の特徴を顕著に体现していると考えている。今後、gTOW法の発展とともに、ほかにもシステムの特徴を測定する実験手法が開発され、システムとしての生命の理解が推進されることを望む。

### 文献

- 1) 北野弘明：「システムバイオロジー」, 秀潤社, 2001
- 2) Kitano, H. : Nat. Rev. Genet., 5 : 826-837, 2004
- 3) Stelling, J. et al. : Cell, 118 : 675-685, 2004
- 4) Carlson, J. M. & Doyle, J. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 Suppl. 1 : 2538-2545, 2002
- 5) Kitano, H. et al. : Diabetes, 53 Suppl. 3 : S6-S15, 2004
- 6) Kitano, H. : Nat. Rev. Cancer, 4 : 227-235, 2004
- 7) Barkai, N. & Leibler, S. : Nature, 387 : 913-917, 1997
- 8) von Dassow, G. et al. : Nature, 406 : 188-192, 2000
- 9) Morohashi, M. et al. : J. Theor. Biol., 216 : 19-30, 2002
- 10) Little, J. W. et al. : EMBO J., 18 : 4299-4307, 1999
- 11) Chen, K. C. et al. : Mol. Biol. Cell, 15 : 3841-3862, 2004
- 12) Moriya, H. et al. : PLoS Genet., 2 : e111, 2006
- 13) Kitano, H. et al. : Nat. Biotechnol., 23 : 961-966, 2005
- 14) Agarwal, R. & Cohen-Fix, O. : Genes Dev., 16 : 1371-1382, 2002

### <筆頭著者プロフィール>

守屋央朗：1998年神戸大学大学院自然科学研究科修了（理学博士）、三菱化学生命科学研究所・特別研究員、Washington University School of Medicine・Research Associate, JST ERATO-SORST北野共生システムプロジェクト・研究員を経て、2006年10月からJST さきがけ「生命システムの動作原理と基盤技術」・研究者、財団法人癌研究会癌研究所（システムバイオロジー部）・嘱託研究員。細胞の分子ネットワークを統合して理解することで初めて見えてくるような現象（ダイナミクスやロバストネス）に分子遺伝学的手法とコンピュータシミュレーションで迫りたいと考えています。