

NAIST-IS-MT1651086

修士論文

体節形成時の確率性による遺伝子発現の同調の促進

野添 光

2018 年 3 月 15 日

奈良先端科学技術大学院大学
情報科学研究科 情報科学専攻

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に
修士（工学）授与の要件として提出した修士論文である。

野添 光

審査委員：

池田和司 教授（主指導教員）

金谷 重彦 教授（副指導教官）

吉本 潤一郎 准教授（副指導教員）

作村 諭一 准教授（バイオサイエンス）（副指導教官）

体節形成時の確率性による遺伝子発現の同調の促進*

野添 光

内容梗概

脊椎動物の発生過程では、頭の方から数十個の細胞が集団化し、体節と呼ばれる構造が繰り返し形成される。これを体節形成と呼ぶ。体節は身体の空間的なパターンを規定するため、その原理解明は生物の体作りを理解する上で重要である。マウスでは、Notch シグナルによって転写抑制因子 Hairy and Enhancer of Split families (以下 Hes7) が未分節中胚葉の尻尾側の細胞集団で同調的に発現し、同調した細胞が同じ体節を形成する。この Hes7 の早い同調回復は生体の発達における頑強性に寄与しているが、その数理的原理は未解明である。本研究では、従来の Hes7 発現の決定論モデルのような強い細胞間相互作用は仮定せず、Hes7 の翻訳開始・終了を確率過程としてモデル化し、弱い細胞間相互作用を導入した。結果として、全細胞が完全に同調発現することはないこと、しかし Hes7 発現量の細胞集団における中央値は周期性を持つこと、外乱によるバラついた発現状態からの速い同調回復が可能であることを確認した。

キーワード, 体節形成, Hes7, 確率過程, 遺伝子発現, 数理生物学

修士論文, 奈良先端科学技術大学院大学

*奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 情報科学専攻 修士論文, NAIST-IS-MT1651086, 2018 年 3 月 15 日.

Stochasticity Promotes Synchronized Gene Expression between Cells in Somite Segmentation*

Hikaru Nozoe

Abstract

In developing vertebrates, a spatial repetitive pattern of somite is formed along the head-to-tail axis in the presomitic mesoderm. Because somite segmentation is closely related to body structure, it is important to elucidate how the somite is formed to understand vertebrate body formation. The timing of somite segmentation in the mammals is regulated by Hes7 expression and the neighboring cells synchronize Hes7 expression to spatially aggregate cells in the same somite. This expression synchronization shows a strong robustness to disturbance. However, the mathematical mechanism is still unknown. In this work, we introduced stochasticity in transcription and translation times into the mathematical model to examine whether the somite cells can rapidly synchronize in Hes7 expression without the strong interaction between cells. By numerical simulation, our stochastic model showed the synchronized oscillation of Hes7 expression and the rapid recovery of the synchronization after desynchronization by the disturbance.

Keywords:somite segmentation, Hes7, stochastic process, gene expression, mathematical biology

Master's Thesis, NAIST

*Master's Thesis, Department of Information Science, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-MT1651086, March 15, 2018.

目次

図目次	iv
第 1 章 序論	1
第 2 章 手法	4
2.1 単一細胞	4
2.2 多細胞	8
第 3 章 結果	13
3.1 多細胞モデルの結果	13
3.2 実験事実との比較	15
第 4 章 結論	29
第 5 章 謝辞	31
参考文献	32

図目次

1.1	ゼブラフィッシュの体節形成に関する反応経路	2
1.2	マウスの単離された細胞における Hes7 発現	2
1.3	マウスの体節形成に関する反応経路	3
2.1	単一細胞内の Hes7 発現経路	4
2.2	生起率をパラメータとした指数分布	5
2.3	ポアソン過程を用いた解離が起きる時系列のモデル化	5
2.4	形状パラメータ, 生起率を分布のパラメータに持つガンマ分布	6
2.5	単一細胞内の状態遷移図	8
2.6	マウスにおける Hes7 発現の反応経路	9
2.7	多細胞間相互作用を導入した Hes7 発現モデル	11
3.1	シミュレーションの条件	14
3.2	格子状に配置した細胞内の Hes7	15
3.3	細胞集団に対する Hes7 発現の中央値	16
3.4	細胞集団における中心部分の Hes7 発現の中央値のスペクトラム . .	16
3.5	Hes7 の集団に対する中央値のコレログラム	17
3.6	格子状に配置した細胞内の NICD	18
3.7	細胞集団の中心の NICD の中央値	19
3.8	細胞集団の中心の NICD の中央値のスペクトラム	19
3.9	極大値に対する Hes7 発現のバラつき	20
3.10	極小値に対する Hes7 発現のバラつき	21
3.11	ある時点で摂動を加えた場合と摂動無しの Hes7 発現の比較	22
3.12	一定時間ノイズを加え続けた場合と摂動無しの Hes7 発現の比較 . .	23
3.13	異なる乱数による細胞集団の中心の Hes7 の中央値	23
3.14	異なる乱数による細胞集団の中心の NICD の中央値	24
3.15	異なる乱数による細胞集団の中心の Hes7 の中央値のスペクトラム .	24
3.16	Hes7 の集団に対する中央値のコレログラム	25

3.17	細異なる乱数による 細胞集団の中心の NICD の中央値のスペクトラム	26
3.18	異なる乱数による同調発現時に対する Hes7 発現のバラつき	27
3.19	異なる乱数による同調発現時に対する Hes7 発現のバラつき	28
4.1	NICD が線形に増加した場合の Hes7 発現時間	29
5.1	糖化されていない Notch と Lfng の関係	36

第 1 章 序論

脊椎動物の発生過程では、頭の方から数十個の細胞が集団化し、体節と呼ばれる構造が繰り返し形成される [1]. これを体節形成と呼ぶ. 体節は身体の空間的なパターンを規定するため、その原理解明は生物の体作りを理解する上で重要である [2]. 体節形成の時間周期は未分節中胚葉の時計遺伝子の発現に依存する [3, 4, 5]. マウスでは、Notch シグナルによって転写抑制因子 Hairy and Enhancer of Split families (以下 Hes7) が未分節中胚葉の尻尾側の細胞集団で同調的に発現し、同調した細胞が同じ体節を形成する [6, 7, 8, 9]. Notch シグナルは細胞間接触によって細胞膜上の Delta と Notch が細胞を跨ぐ形で結合するトランス型の Delta-notch 結合が行われ、Notch 細胞内ドメイン (Notch intracellular domain, 以下 NICD) が細胞内に挿入され、Hes7 の発現を開始させる [10, 11]. この発現同調は、外界からの刺激に対して頑強であり、例えば、遺伝子発現に摂動を加えると、同調性が失われ、凝集性の無い体節が一つできあがるが、次に形成される体節は発現同調を回復し、凝集性のある体節となる [12]. この Hes7 の早い同調回復は生体の発達における頑強性に寄与しているが、その数理的原理は未解明である.

ゼブラフィッシュの体節形成における周期的な遺伝子発現は mRNA の核外以降で発生する時間遅延を導入した遅延微分方程式により、決定論的にモデル化されている [14](図 1.1). この決定論モデルで、未分節中胚葉の細胞集団における時計遺伝子の早い同調を再現するには、Notch シグナルのリガンドである Delta を振動させることで、近傍の細胞とコミュニケーションを行い、時計遺伝子の同調を強い相互作用によって再現している [19]. しかし、マウスの場合、ゼブラフィッシュのように Delta の振動は確認されておらず、NICD の振動が確認されている [15, 16, 17, 18].

本研究では、0 次の ultra-sensitivity を導入し、Delta-notch 結合による離散的な NICD の入力を再現し、その結果、Hes7 の発現同調を行うモデルを構築する. また、Hes7 の翻訳開始・終了を確率的にモデル化することで、細胞群の強い相互作用を仮定せずとも Hes7 が発現同調できる可能性を検証した. 本来、遺伝子発現は確率的であり、未分節の細胞が単離されると Hes7 は確率的な発現をする [20](図 1.2).

これを細胞平均的な決定論モデルとして近似することなく、翻訳開始・終了を確率過程としてモデル化し、弱い細胞間相互作用を導入した. また、本研究では、Delta

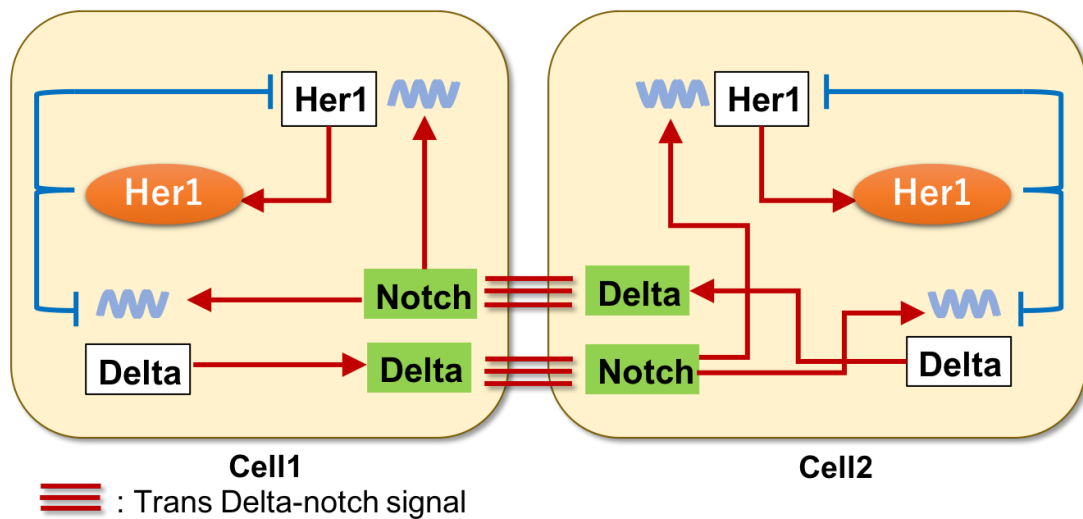


図 1.1 ゼブラフィッシュの体節形成に関する反応経路 [14]. ゼブラフィッシュの決定論モデルでは, Delta を通して点線で囲んだ Notch シグナルを振動させ, 近傍の細胞の Her1(ゼブラフィッシュの体節形成を制御する時計遺伝子) とコミュニケーションを行っている

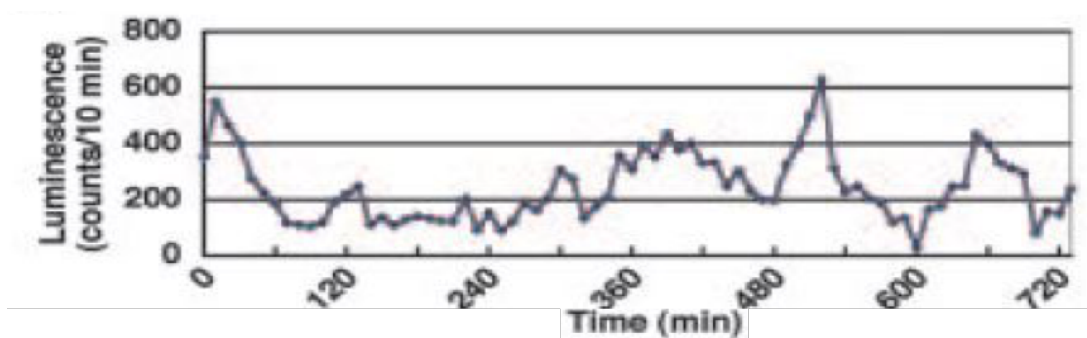


図 1.2 単離されたマウスの細胞における Hes7 発現 [20].

を振動させずに, 時計遺伝子 Lunatic Fringe(以下 Lfng) による NICD に対する抑制の効果と, 細胞膜上で行われるシス型の Delta-notch 結合を導入し, 近傍の細胞との細胞間コミュニケーションを再現した (図 1.3).

結果として, 全細胞が完全に同調発現することはないこと, しかし Hes7 発現量の細胞集団における中央値は周期性を持つこと, 外乱によるバラついた発現状

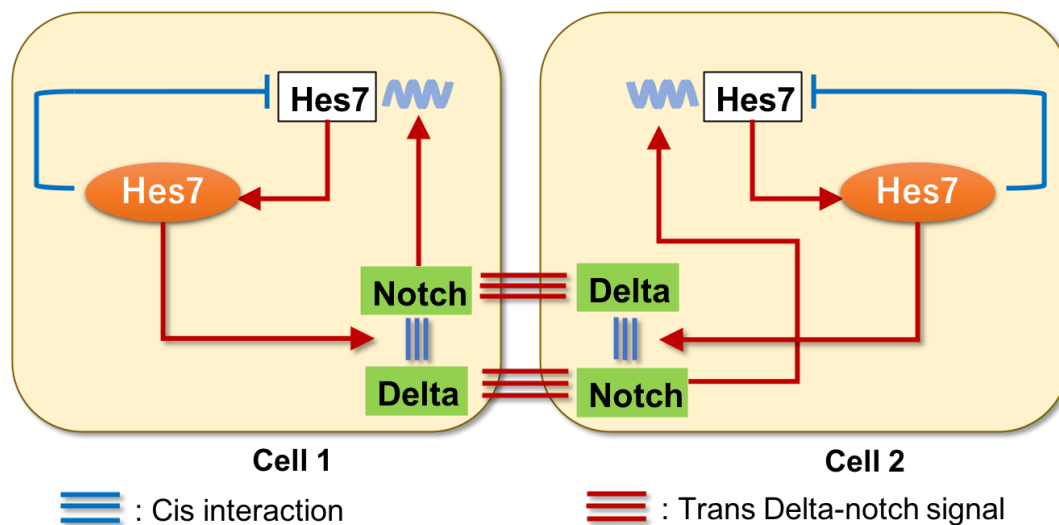


図 1.3 マウスの体節形成に関する反応経路. ゼブラフィッシュとは異なり, Notch シグナルの振動は見られない. 本研究では, 細胞膜上で行われるシス型の Delta-notch 結合を通して, 細胞間コミュニケーションが行われると仮定した (詳細を 2 章に示す).

態からの速い同調回復が可能であること. さらに, Delta を振動させず, 0 次の ultra-sensitivity を導入し, NICD を振動させることで, Hes7 の同調が行われることを確認した.

第 2 章 手法

本章では単一細胞内の Hes7 発現経路と PSM 内の細胞の相互作用の生物学的知見とモデル構築の際に導入した数学的な手法について述べる.

2.1 単一細胞

マウスにおける体節形成の時間周期をコントロールしている時計遺伝子 Hes7 は Notch シグナルによって転写が促進される. Notch シグナルは細胞間接触を通して細胞膜上の分子 Delta と Notch が細胞を跨ぐ形で結合するトランス型の Delta-notch 結合が行われ, NICD が細胞内に挿入される. 次に細胞内に挿入された NICD が DNA のアリルと結合することで mRNA の転写が開始される. さらに発現された Hes7 は自身のプロモーター領域と結合し, mRNA の転写を抑制するフィードバック回路を形成する (図 2.1).

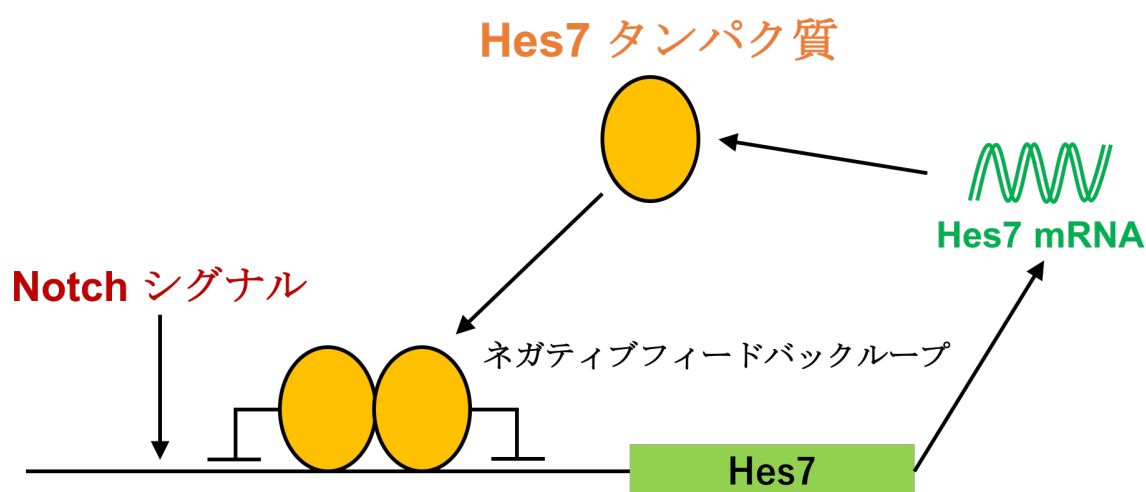


図 2.1 単一細胞内の Hes7 発現経路 [6]

本研究では, アリルと結合した Hes7, NICD が解離する場合を考慮し, 「NICD, Hes7 がアリルから解離する」というイベントが発生する時系列をポアソン過程を

用いてモデル化した。ポアソン過程は離散的なイベントが生起する時間間隔を、生起率 λ をパラメータとした指数分布 $p(t|\lambda) = \lambda e^{-\lambda t}$ (図 2.2) から確率的にサンプリングすることができる [21](図 2.3)。

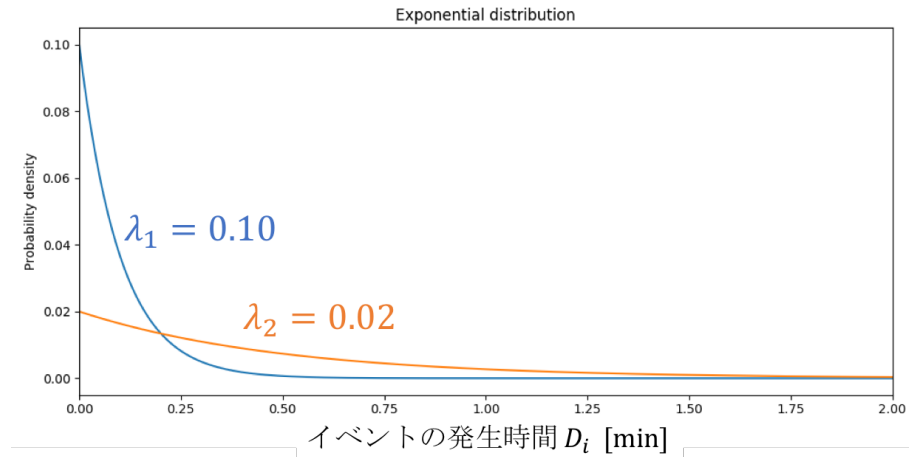


図 2.2 生起率をパラメータとした指数分布. 生起率は単位時間当たりにイベントが発生する確率密度であり, 上図に $\lambda_1 = 0.1$, $\lambda_2 = 0.02$ のときの指数分布を示す. 指数分布の特徴は, 前回のイベントが発生した直後 $t = 0$ が最も次のイベントが発生する確率が高く, $\lambda \cdot dt$ である. λ が小さいと指数分布の形状は一様分布に近くなり, 次のイベントが発生する時間が長くサンプリングされる.

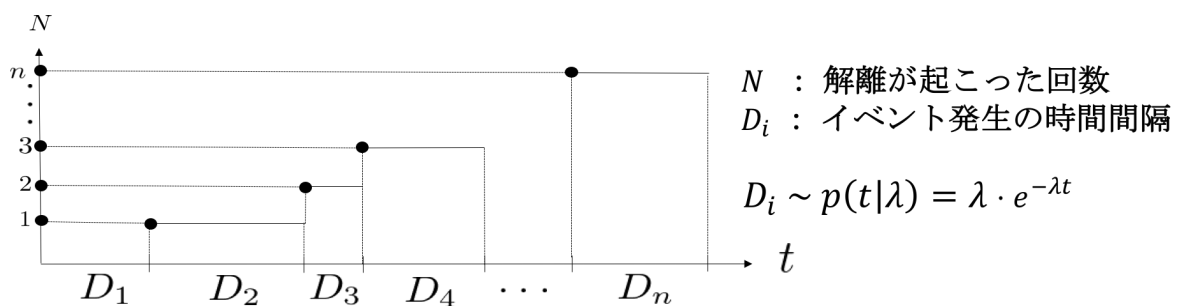


図 2.3 ポアソン過程を用いた解離が起きる時系列のモデル化. ポアソン過程は離散的なイベントが発生する時間間隔 D_i を, 生起率 λ をパラメータとした指数分布 $p(t) = \lambda e^{-\lambda t}$ からサンプリングする.

次に「細胞膜から挿入された NICD, 細胞質で生成された Hes7 がアリルと結合する」というイベントが発生する時系列のモデル化について以下で述べる. 細胞膜や細胞質に存在する分子が DNA のアリルに結合し, Hes7 の翻訳を開始または停止するまで複数のプロセスを経由する. 複数のプロセスを経由する. したがって, 本研究では, ポアソン過程の拡張であるガンマ過程を用いて, 時系列のモデリングを行った [22]. ガンマ過程は, 形状パラメータ k , 生起率 λ を分布のパラメータに持つガンマ分布 $p(t) = t^{k-1} \frac{e^{-\lambda t}}{\Gamma(k)} \lambda^k$ によってイベント発生 の時間間隔を決めることができる. ガンマ過程によって得られるイベント発生 の時系列は, ポアソン過程によって得られるイベント系列の k 回目のイベント発生 の時間間隔と対応している. よって形状パラメータ $k = 1$, 生起率 λ の時のガンマ過程は, 生起率 λ の時のポアソン過程と等しい (図 2.4).

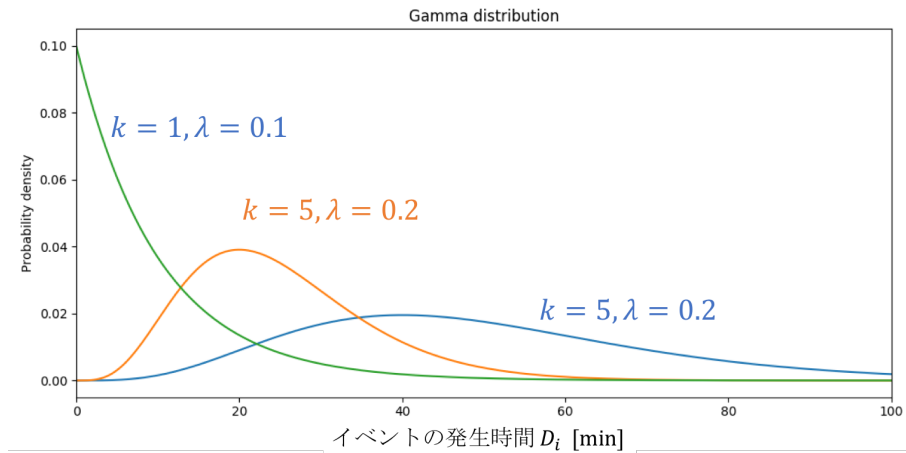


図 2.4 形状パラメータ, 生起率を分布のパラメータに持つガンマ分布. ガンマ過程によって得られるイベント発生 の時系列は, ポアソン過程によって得られるイベント発生 の時系列の k 回目のイベント発生 の時間間隔を表している. よって形状パラメータ $k = 1$, 生起率 λ の時のガンマ分布の形状は, 生起率 λ の時の指数分布の形状と等しい.

よって単一細胞における分子結合, 解離についてまとめると

- NICD とアリルが結合する時間間隔:

$$D_i \sim p(t|k_N, \lambda_N) = t^{k_N-1} \frac{e^{-\lambda_N t}}{\Gamma(k_N)} \lambda_N^{k_N}$$

$$\lambda_N : \propto [\text{NICD}]$$

$$k_N : \text{定数}$$

- Hes7 とアリルが結合する時間間隔:

$$D_i \sim p(t|k_H, \lambda_H) = t^{k_H-1} \frac{e^{-\lambda_H t}}{\Gamma(k_H)} \lambda_H^{k_H}$$

$$\lambda_H : \propto [\text{Hes7}]$$

$$k_H : \text{定数}$$

- NICD の解離が起きる時間間隔:

$$D_i \sim p(t|\lambda_n) = \lambda_N e^{-\lambda_n t}$$

$$\lambda_N : \text{定数}$$

- Hes7 の解離が起きる時間間隔:

$$D_i \sim p(t|\lambda_h) = \lambda_h e^{-\lambda_h t}$$

$$\lambda_h : \text{定数}$$

DNA の状態遷移は図 2.5 に示した状態遷移図で行われ, DNA が ON 状態の時のみ Hes7 発現が行われるようにモデルを構築した. また, 簡単化のために, 本研究では, mRNA による転写のプロセスは省略してシミュレーションを行った.

$$\frac{d}{dt}[\text{Hes7}] = I \quad \left\{ \begin{array}{ll} I = I_0 & (\text{DNA : ON}) \\ I = 0 & (\text{DNA : OFF}) \end{array} \right. \quad (2.1.1)$$

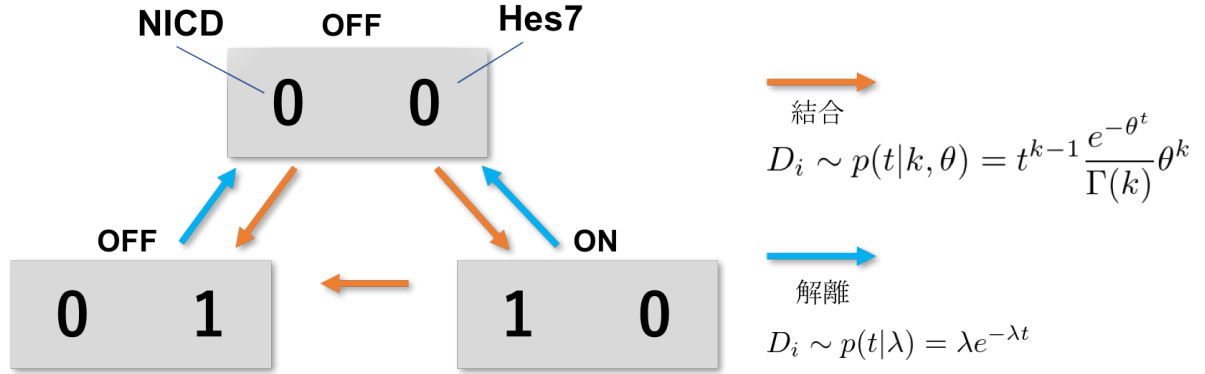


図 2.5 単一細胞内の状態遷移図. オレンジの矢印は Hes7, NICD とアリの結合を表しており, 青の矢印は分子がアリから解離を表している. また, 灰色の四角で示した図形は DNA の状態を表しており, 0 が分子が存在していない場合, 1 が分子が存在している場合を表している. また, Hes7 と NICD が同じアリに結合し, かつ Hes7 とアリ間のアフィニティの方が NICD とアリ間のアフィニティより高いので [23], 本研究では, NICD : 0, Hes7 : 1 から NICD : 1, Hes7 : 0 へ状態遷移が行われないようにモデリングを行った.

2.2 多細胞

Hes7 の転写を促進する NICD は細胞間の Delta-Notch 結合によって細胞膜を介して細胞内に挿入される [6, 7, 8]. さらに, Hes7 に加えて時計遺伝子 Lfng による NICD に対する抑制の効果も導入した. Lfng は Notch に対して酵素として作用し, 細胞内の Notch 分子に糖鎖を付与する [24, 25]. 糖鎖が付与された Notch は, 細胞膜上のトランス型の Delta-notch 結合が行われなくなり, NICD の挿入を抑制することが知られている [26]. 糖鎖が付与され, トランス型の Delta-notch 結合が行われなくなると, それぞれの細胞膜上でシス型の Delta-notch 結合が行われる (図 2.6). シス型の Delta-notch 結合では, トランス型とは異なり, 細胞内に NICD が挿入されない [27]. シス型の Delta-notch 結合が行われ, 細胞膜上の Delta が消費されると, 周辺の細胞と Lfng が発現している細胞間のトランス型の Delta-notch 結合は行われない. 結果的に Lfng 発現は自身の細胞における NICD の挿入と周辺の

細胞内の NICD の挿入も抑制する [26]. モデル構築の際, Lfng の発現と抑制の反応経路は Hes7 と同じなので, $[Lfng] = [Hes7]$ とおき, シミュレーションを行った [28]. (図 2.6)

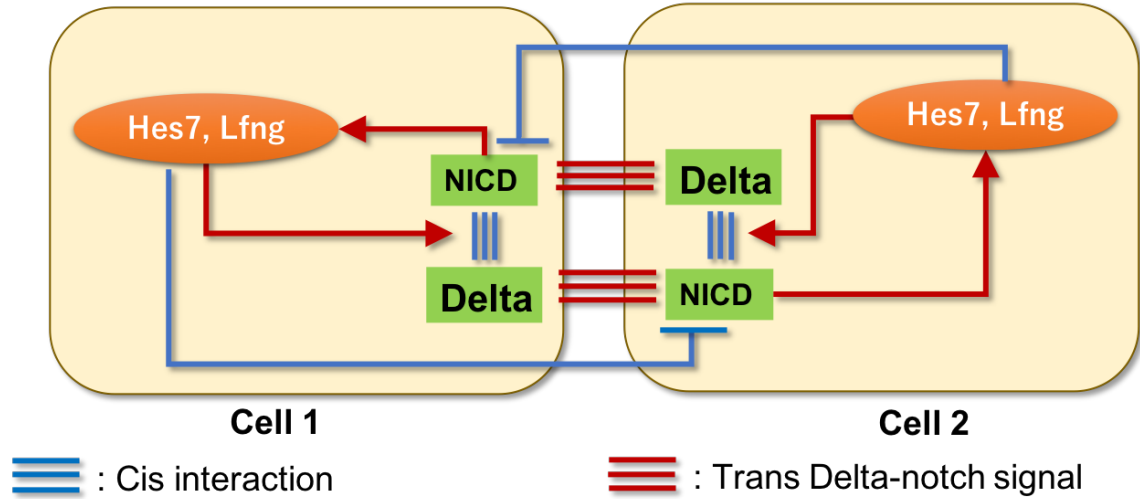


図 2.6 マウスにおける Hes7 発現の反応経路. Hes7 の転写を促進する NICD は細胞間の Delta-Notch 結合によって細胞膜を介して細胞内に挿入される. Lfng によって, シス型の Delta-notch 結合が促進され, それぞれの細胞膜上で, Delta が消費されると, 近傍の細胞が Lfng が発現している細胞とトランス型の Delta-notch 結合をすることができなくなる. 結果的に Lfng 発現は自身の細胞における NICD の挿入と周辺の細胞内の NICD の挿入も抑制する. また, シミュレーションでは, Lfng の発現は Hes7 と同じく, NICD, Hes7 によってコントロールされるので, $[Lfng] = [Hes7]$ とおいている. また, 簡単化のために, 本研究では, mRNA による転写は省略してシミュレーションを行った.

本研究では細胞同士は常に接触している状態を仮定し, シミュレーションを行った. 細胞 i における NICD と DNA のアシルが結合する生起率を λ_i , トランス型の Delta-notch 結合によって増加する NICD の量を S_j , 細胞 i と接触している細胞の集合を N , 時定数を τ , さらに, 例外で Delta-notch 結合以外で増加する NICD を β , 抑制無しの Delta-notch 結合による NICD の増加率を α とおいた. よって細胞

i の NICD とアリルが結合する生起率 λ_{N_i} は

$$\frac{d}{dt}\lambda_{N_i} = \sum_{j \in N} S_j + \beta - \frac{1}{\tau}\lambda_{N_i}$$

と表すことができる．また，生物学的な実験結果より，細胞集団における NICD は同調し，振動していることが知られているので，本研究では，トランス型の Delta-notch 結合による NICD の増加量について離散的な入力を 0 次の ultra-sensitivity

$$S_j = \alpha \cdot V(R_j)$$

を用いて再現した．

また，Lfng の抑制の総和 R_j は近傍との細胞の和

$$R_j = \frac{1}{C_L}[\text{Lfng}]_i + [\text{Lfng}]_j$$

$$[\text{Lfng}] = [\text{Hes7}]$$

で表現した．

多細胞間の相互作用

よって本研究の確率モデルをまとめると，細胞 i の NICD とアリルが結合する生起率 λ_{N_i} は図 2.7 のようにまとめることができ，

細胞 i 内の DNA の状態遷移が起きる時間間隔は以下の式によって確率的に決まる．

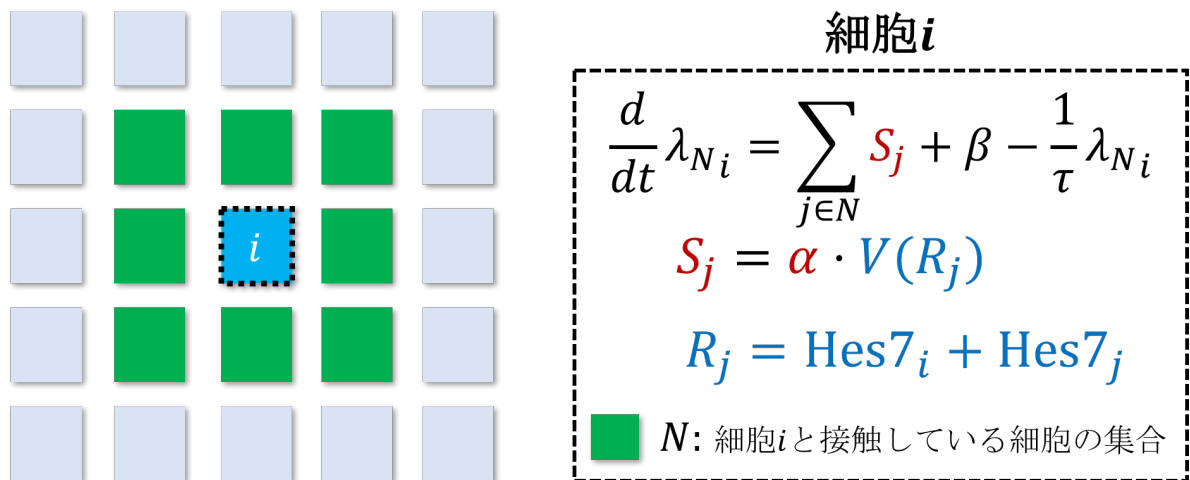


図 2.7 多細胞間相互作用を導入した Hes7 発現モデル

単一細胞内における, DNA の状態遷移

- NICD とアリルが結合する時間間隔:

$$D_i \sim p(t|k_N, \lambda_{N_i}) = t^{k_N-1} \frac{e^{-\lambda_{N_i} t}}{\Gamma(k_N)} \lambda_{N_i}^{k_N}$$

k_N : 定数

- Hes7 とアリルが結合する時間間隔

$$D_i \sim p(t|k_H, \lambda_{H_i}) = t^{k_H-1} \frac{e^{-\lambda_{H_i} t}}{\Gamma(k_H)} \lambda_{H_i}^{k_H}$$

$$\lambda_{H_i} = \frac{1}{C_H} [\text{Hes7}]_i$$

k_H : 定数

- NICD の解離が起きる時間間隔:

$$D_i \sim p(t|\lambda_n) = \lambda_n e^{-\lambda_n t}$$

λ_n : 定数

- Hes7 の解離が起きる時間間隔

$$D_i \sim p(t|\lambda_h) = \lambda_h e^{-\lambda_h t}$$

λ_h : 定数

に従い, 細胞 i における Hes7 の発現量は

$$\frac{d}{dt}[\text{Hes7}]_i = -\frac{1}{\tau}[\text{Hes7}] + I \quad \left\{ \begin{array}{ll} I = I_0 & (\text{DNA : ON}) \\ I = 0 & (\text{DNA : OFF}) \end{array} \right.$$

によって変化する.

第 3 章 結果

第 2 章で述べたモデルのシミュレーション結果を本章で示す. 3.1 章では, 本研究のモデルで Hes7 発現を計算し, 3.2 章では, シミュレーションの結果と実験結果との比較を行った. 細胞を格子状に配置し, それぞれの細胞内の Hes7 の初期値を 0~500 までの一様分布, λ_{N_i} の初期値を 0~1 までの一様分布を用いてランダムな値にした. また, その他のシミュレーションで使用した各パラメータを表 3.1 に示す.

3.1 多細胞モデルの結果

表 3.1 シミュレーションで使用したパラメータの値

パラメータ	値
行数	5
列数	5
β	2.0×10^{-4}
α	0.05
C_L	100
C_H	10
λ_n	0.1
λ_H	0.5
k_N	10
k_H	20
τ	20[1/[min]]
I_0	40

図 3.1, 表 3.1 に示した条件で, 0 から 1000 分までシミュレーションを行った. 数値計算は刻み幅 0.1 で行ったが, 生物学的な実験による Hes7 発現が 10 分ごとにサンプリングされていることから, 本研究でも同様に刻み幅 0.1 でシミュレーショ

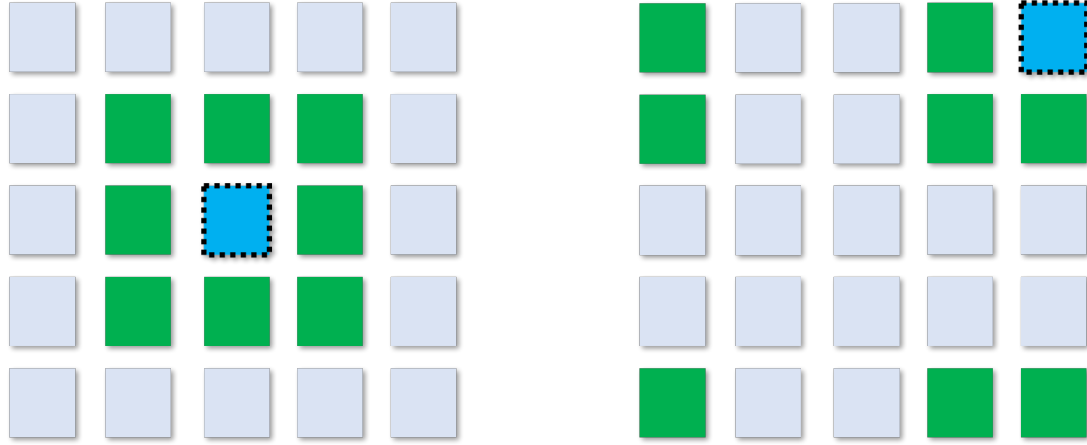


図 3.1 シミュレーションの条件. それぞれの四角の図形は細胞を表し, 青色の細胞と Delta-notch 結合する細胞を緑色で示している. 中心の細胞と Delta-notch 結合する細胞は周りの 8 近傍の細胞であり (上図 左), 境界条件は周期的境界条件に設定し, 反対側の細胞とトランス型の Delta-notch 結合をしている.(上図 右)

ンを行った後, 10 分ごとにダウンサンプリングを行った [6].

図 3.2 の Hes7 発現について細胞集団に対する Hes7 発現の中央値を図 3.3 に示す. さらに図 3.3 のグラフを実際に周波数解析を行った. 結果を図 3.5 に示す. 図 3.5 より, 細胞集団の中心部分の細胞集団における中央値は周波数 8[mHz] で強いピークを持つことがわかり, 周期性が存在していることが確認できる.

リュングボックス統計量 Q は時間 T , 自己相関係数 ρ , $m \sim \log(T)$ を用いた以下の式

$$Q(m) = T(T+2) \sum_{j=1}^h \frac{\rho^2}{n-j} \quad (3.1.1)$$

で求めることができ, 式と自由度 m のカイ二乗分布 $\chi(m)$ について

$$Q(m) > \chi(m)$$

が成り立てば, 周期が存在することを有意に示すことができる. 図 3.3 に対して, リュングボックス検定を行った結果

- p 値: 2.2×10^{-16}

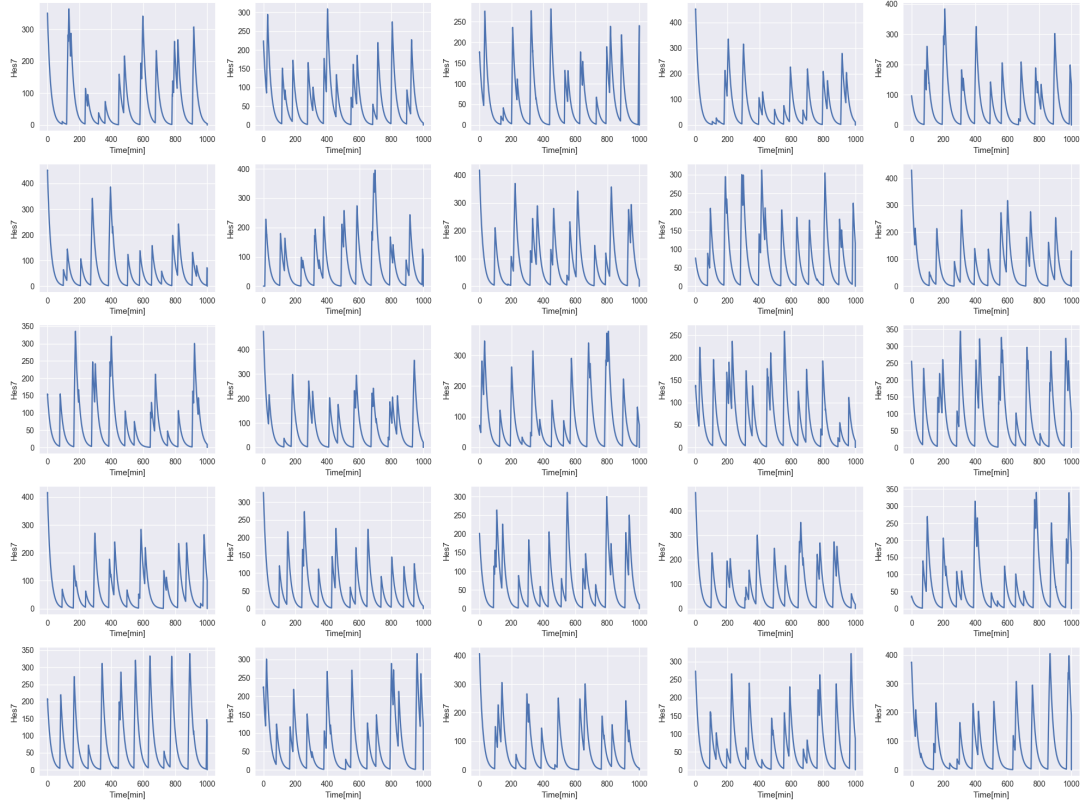


図 3.2 格子状に配置した細胞内の Hes7

- 自由度 χ^2 分布の値:135.83

が得られ, 以上より, Hes7 の中央値は周期性が存在していることがわかる.

3.2 実験事実との比較

本節では Hes7 発現に関わる体節形成の生物学的な実験事実とシミュレーションとの比較を行う.

生物学的な実験結果によると, 未分節中胚葉内の細胞について Hes7 発現と同様, Hes7, Lfng のアクティベータである NICD の時系列の振動も確認されている [15, 16, 17, 18]. 本研究でも, NICD の時系列の振動を Hes7 と同様に細胞集団に対

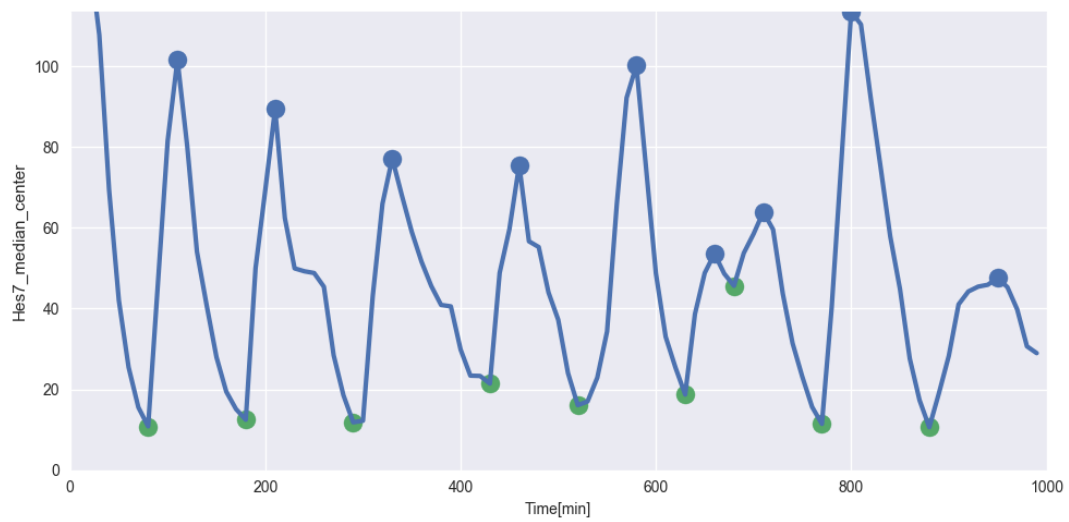


図 3.3 細胞集団に対する Hes7 発現の中央値. 図 3.2 について細胞集団の中央値を計算し, 10 分毎にダウンサンプリングした後, 平滑化した. 青い点は極大値の中で比較的 Hes7 発現量が多い点を表しており, 緑の点は極小値の中で比較的発現量が少ない点を表している. 青い点と緑の点の時刻の時刻それぞれに対して中心の 9 つの細胞のばらつきを, 図 3.9 と図 3.10 にそれぞれボックスプロットで示した.

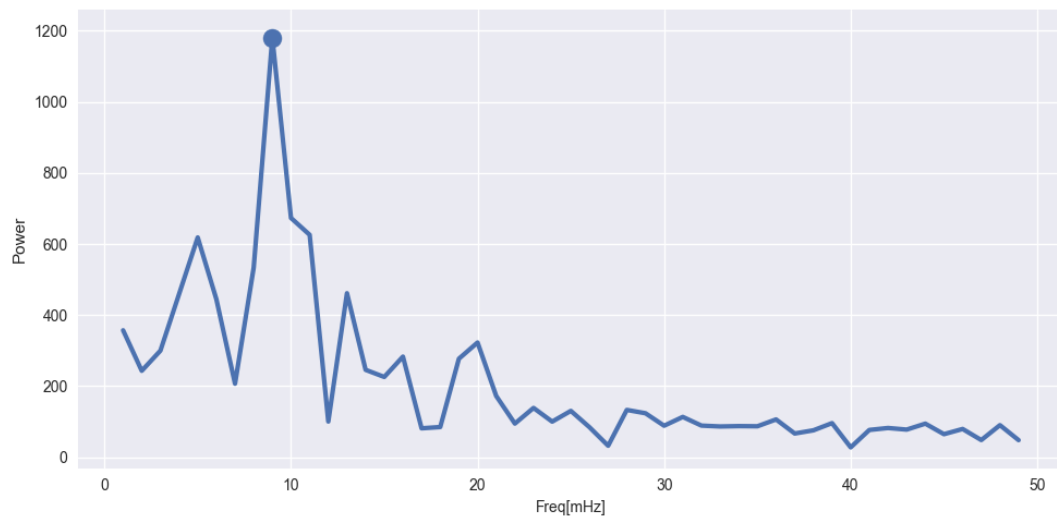


図 3.4 細胞集団における中心部分の Hes7 発現の中央値のスペクトラム.

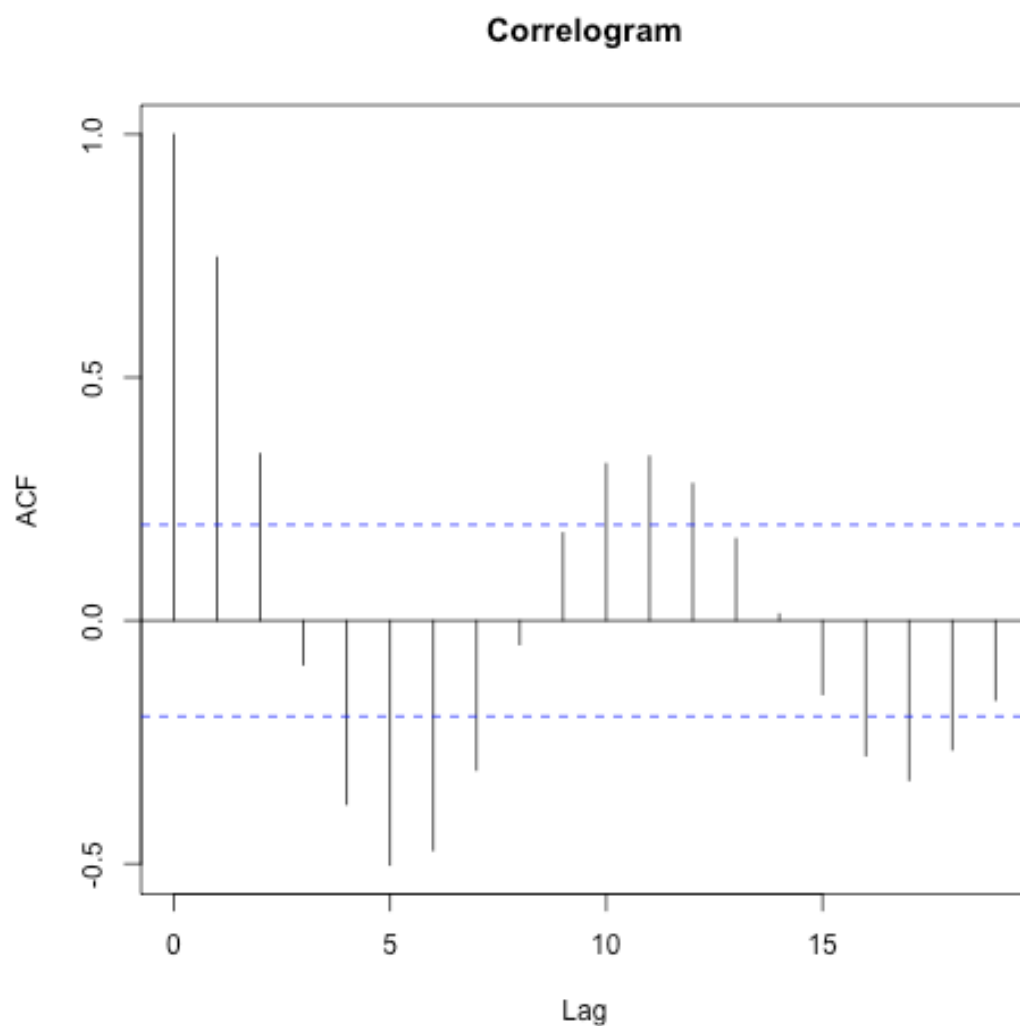


図 3.5 Hes7 の集団に対する中央値のコレログラム．上図の青色の点線は 95% 信頼区間を示している．

する中央値で確認し，その周波数解析を行った (図 3.8)．結果として，中心部分の集団における NICD の中央値も周波数 8[mHz] でピークを持つことが確認でき，周期性が存在することが確認される．

生物学的な実験結果として，マウスの未分節中胚葉内 Hes7 発現様式は同調発現時 (Hes7 発現がピークに達しており細胞間で同調している状態) と，同調静止時

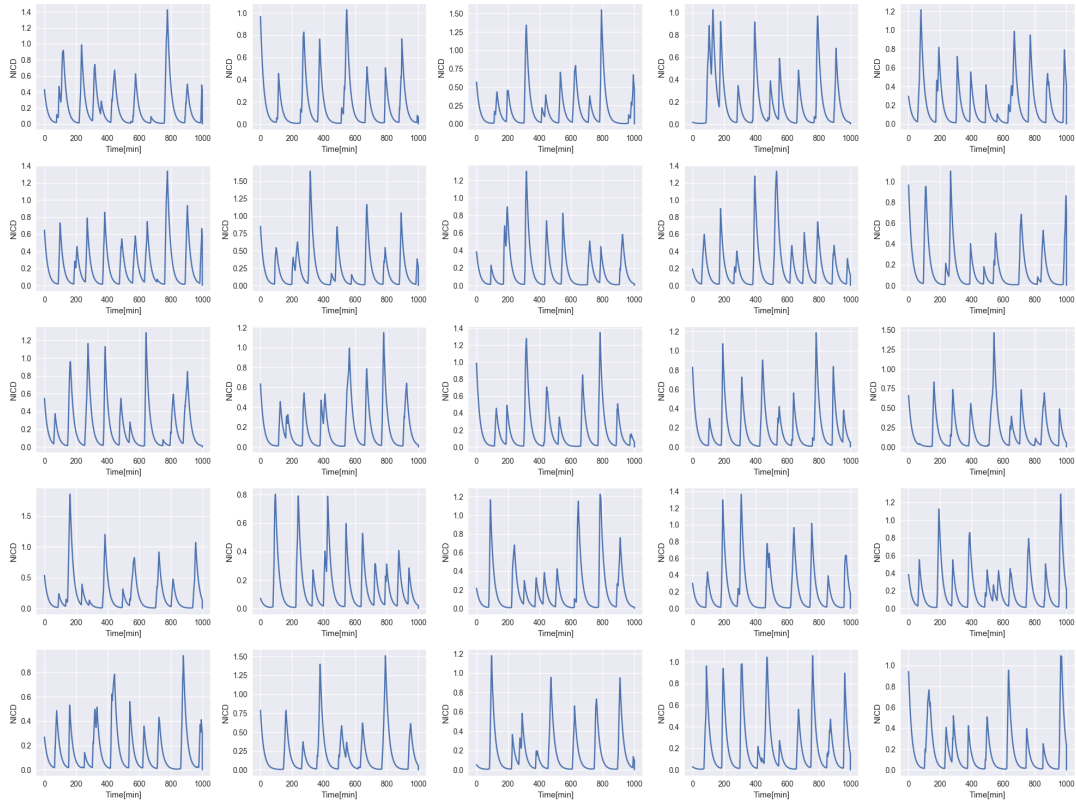


図 3.6 格子状に配置した細胞内の NICD

(Hes7 発現が細胞間で行われておらず、同調している状態) について、同調静止時の方が同調発現時に比べて比較的に全ての細胞で Hes7 が発現しておらず、分散が小さいことが知られている。本研究では同調静止時と同調発現時についてそれぞれボックスプロットを行い、細胞集団における Hes7 の発現様式を確認した。結果的に、実験結果と同様、同調静止時の方が同調発現時に比べて細胞集団間の分散は小さく、実験結果を再現していることが確認された (図 3.9, 3.10)。

マウスの未分節中胚葉内の Hes7 発現は熱摂動に対して頑強であることが実験によって確認されている。本研究では、数理的に熱摂動を再現し、実験結果を再現しているか確認した。結果的に摂動が加えられた後 (図 3.11, 3.12) でも細胞集団における中央値は本来の Hes7 発現と変わらず同調を取り戻していることが確認された。シミュレーションでは 生物学的なマウスのヒートショックの操作では、マウスの胎

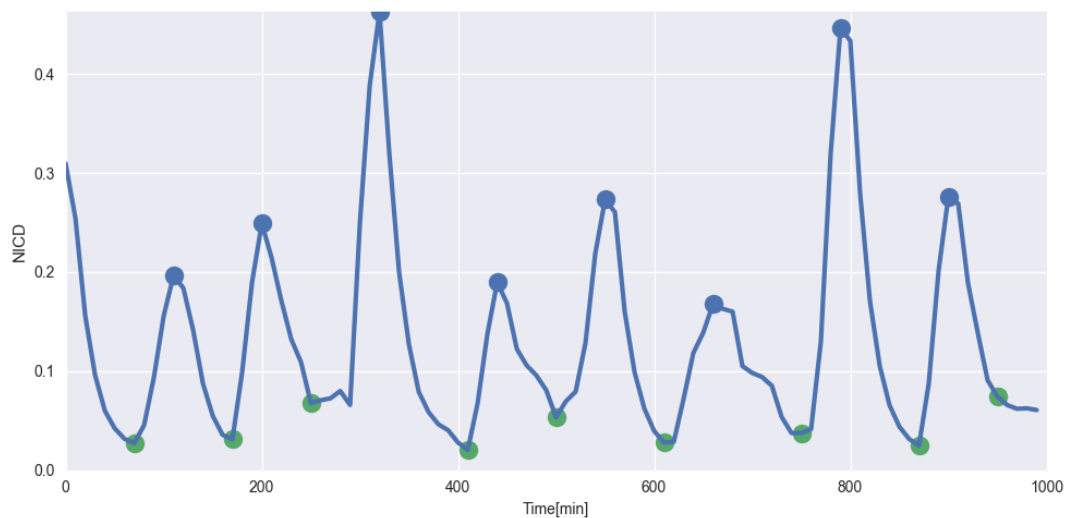


図 3.7 細胞集団の中心の NICD の中央値. 図 3.2 について細胞集団の中央値を計算し, 10 分毎にダウンサンプリングした後, 平滑化した. 青い点は極大値の中で比較的 Hes7 発現量が多い点を表しており, 緑の点は極小値の中で比較的発現量が少ない点を表している. 青い点と緑の点の時刻の時刻それぞれに対して中心 g の 9 つの細胞のばらつきを, 図 3.9 と図 3.10 にそれぞれボックスプロットで示した.

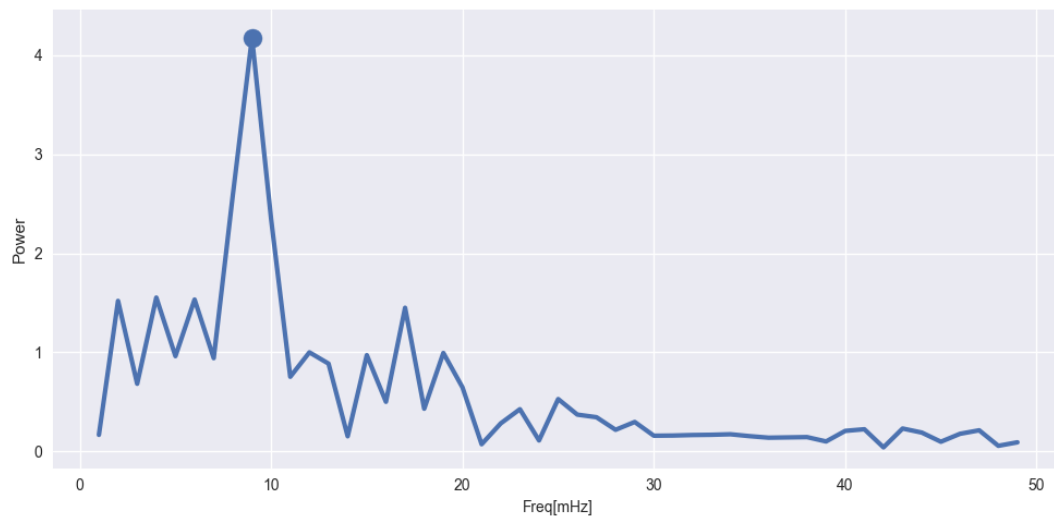


図 3.8 細胞集団の中心の NICD の中央値におけるスペクトラム.

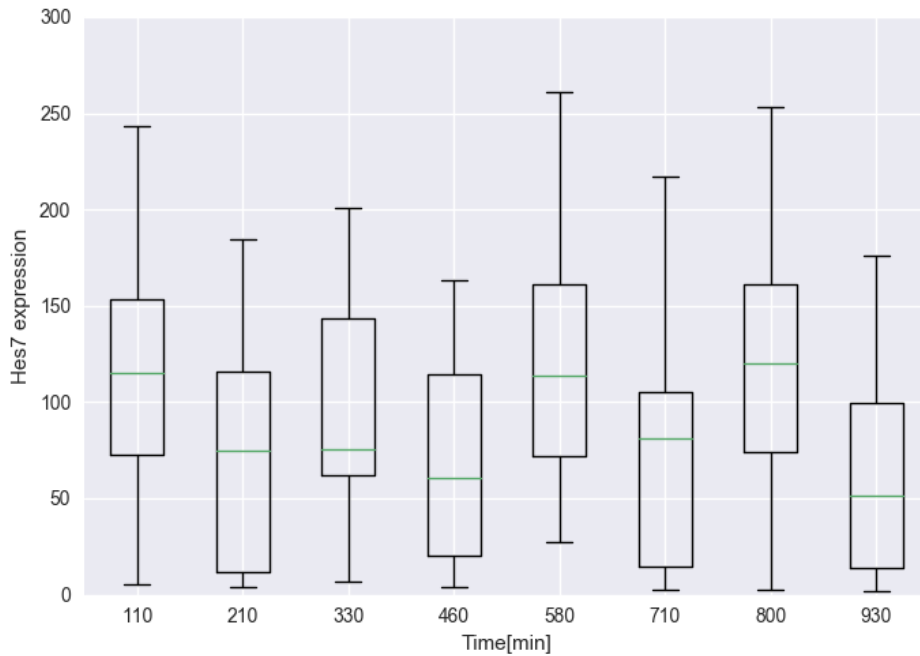


図 3.9 極大値に対する Hes7 発現のバラつき. 上図で示した 8 つのボックスは図 3.2 の青色の点に対する最小値, 第一四分位数, 第二四分位数, 第三四分位数, 最大値を示している.

児を 37°C から 43°C に浸し, タンパク質の翻訳を阻害している [29].

本研究では, 摂動の加え方を

- ある時点でタンパク質の値, DNA の状態, NICD の値をランダムな値に変える
- Hes7 の翻訳に一様分布のノイズを一定時間加える

の 2 パターンを考え, シミュレーションを行った. ヒートショックを加えた結果を以下に示す. 結果として, 上で示した 2 パターンの摂動を加えた後も, Hes7 発現様式は変化せず, 摂動に対してロバストであることがわかった.

また, 本研究の確率モデルについて, 表 3.1 と同じパラメータで異なる乱数を用いて, シミュレーションを行った. 結果として, Hes7 の中心における中央値と NICD

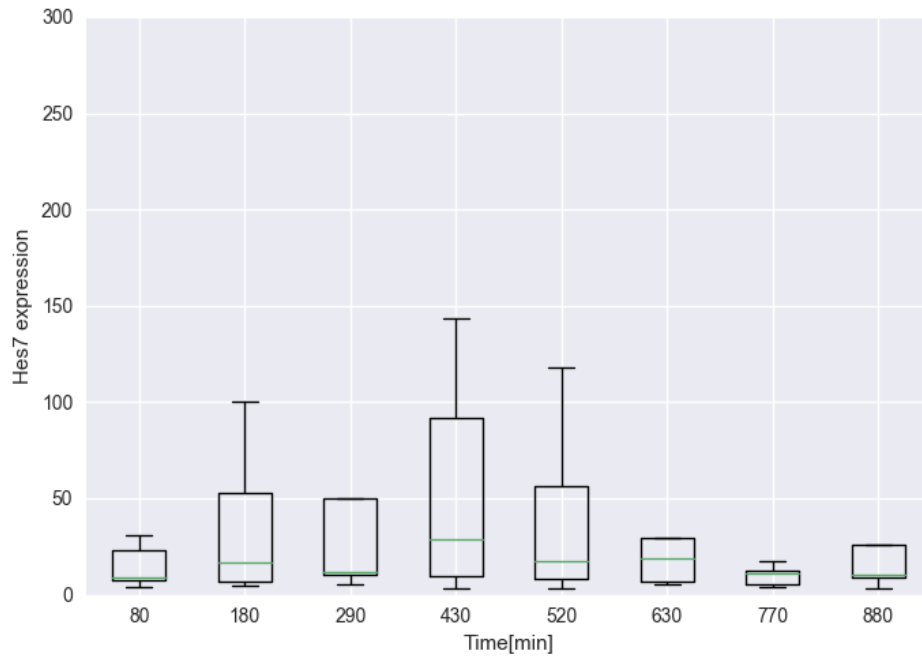


図 3.10 極小値に対する Hes7 発現のバラつき. 上図で示した 8 つのボックスは図 3.2 の緑色の点に対する最小値, 第一四分位数, 第二四分位数, 第三四分位数, 最大値を示している.

の中心における中央値はともに周波数 7[mHz] でピークを持つことが確認でき (図 3.15, 3.17), ボックスプロットの結果からも, 生物学的な実験結果を再現していることが確認された (図 3.18, 3.19).

異なる乱数の図 3.16 の Hes7 発現について, リュングボックス検定を行った. p 値, カイ二乗分布の値はそれぞれ,

- p 値: 2.291×10^{-8}
- 自由度 χ^2 分布の値: 48.76

となった. 結果より, 異なる乱数でも周期性が存在することが有意に示せた.

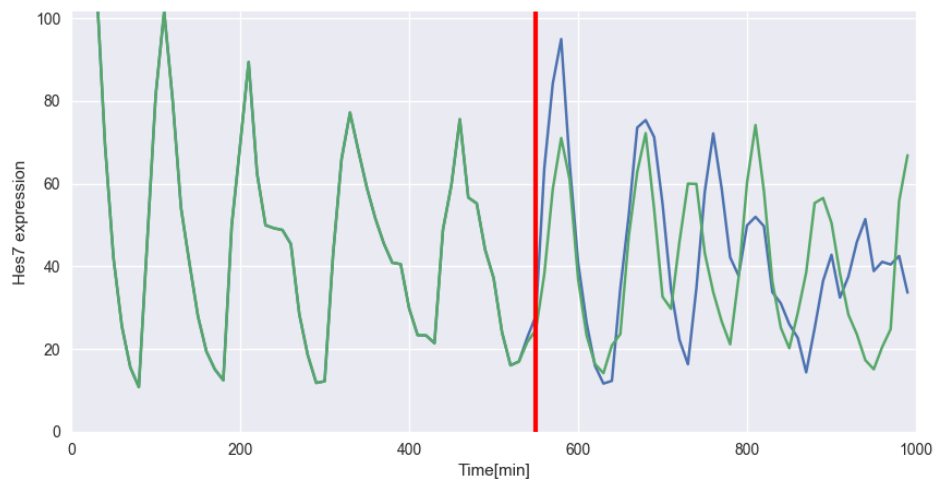


図 3.11 ある時点で摂動を加えた場合と摂動無しの Hes7 発現の比較. 摂動を加えた場合, 加えなかった場合の Hes7 の細胞集団における中央値をそれぞれ緑線, 青線で示した. 摂動を加えた時刻は赤線で示しており, 550 分の時点で摂動を加えている. 摂動の加え方は 25 個の細胞をランダムに 12 個選択し, その細胞についてさらに $Hes7, \lambda$ の値を 0 から現在の値までの一様分布から確率的に値を選択し, 変更した. さらに加えて 12 個の細胞について DNA が ON 状態になっている場合, OFF 状態にした. 摂動を加えた時間は赤線で示しており, 550 分から 30 分後に再び次の極大値に到達した.

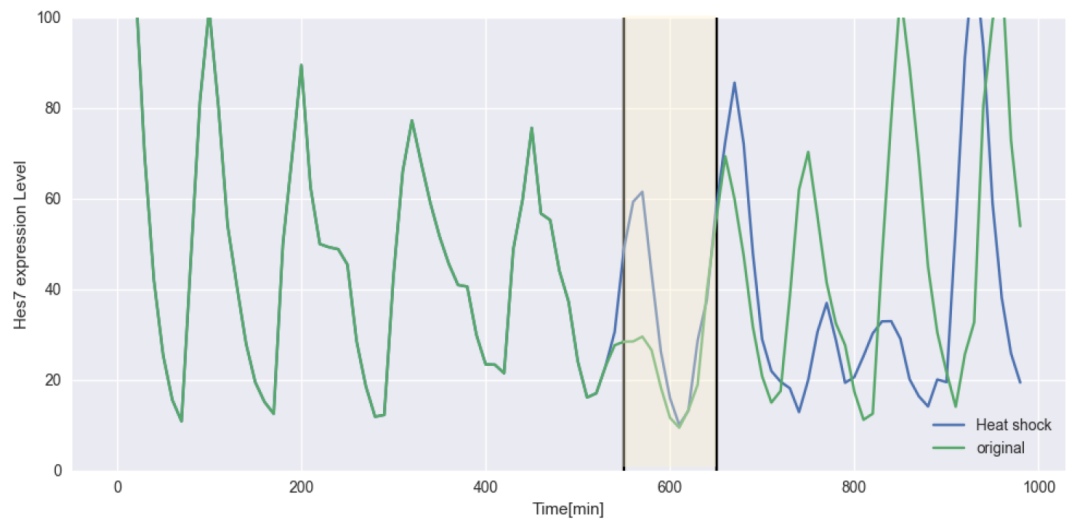


図 3.12 一定時間ノイズを加え続けたと摂動無しの Hes7 発現の比較. 摂動を加えた場合, 加えなかった場合の Hes7 の細胞集団における中央値をそれぞれ緑線, 青線で示した. ノイズは図の 550 分から 650 分の 100 分間加え続けた. ノイズは Hes7 発現量に関する I の値を 0 から 10 までの範囲で一様分布から生成される確率的な値に変更した. 上図より, 網掛けのノイズを加えた部分で細胞集団の中心部分の中央値の同調は崩れず, 周期的な発現をしていることがわかった.

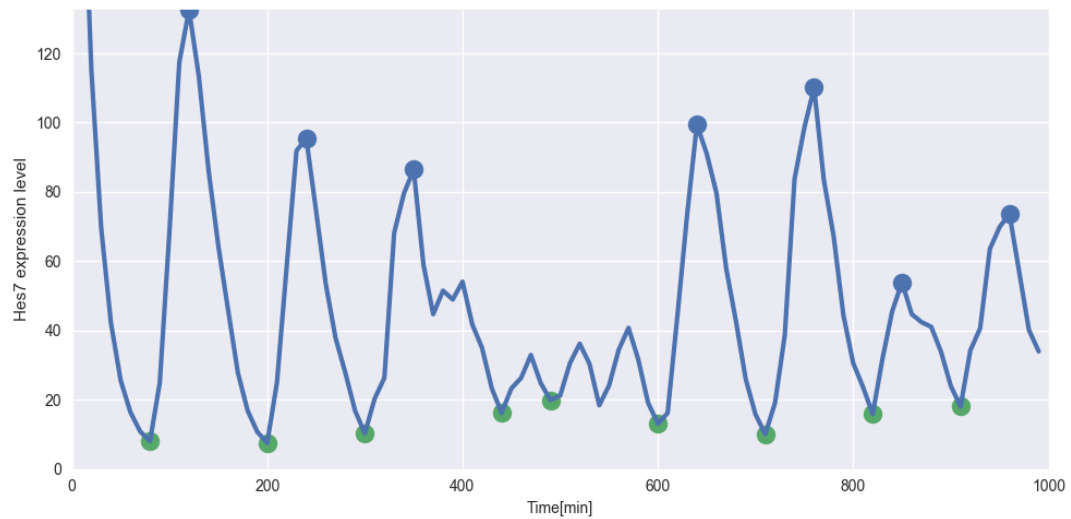


図 3.13 異なる乱数による細胞集団の中心の Hes7 の中央値

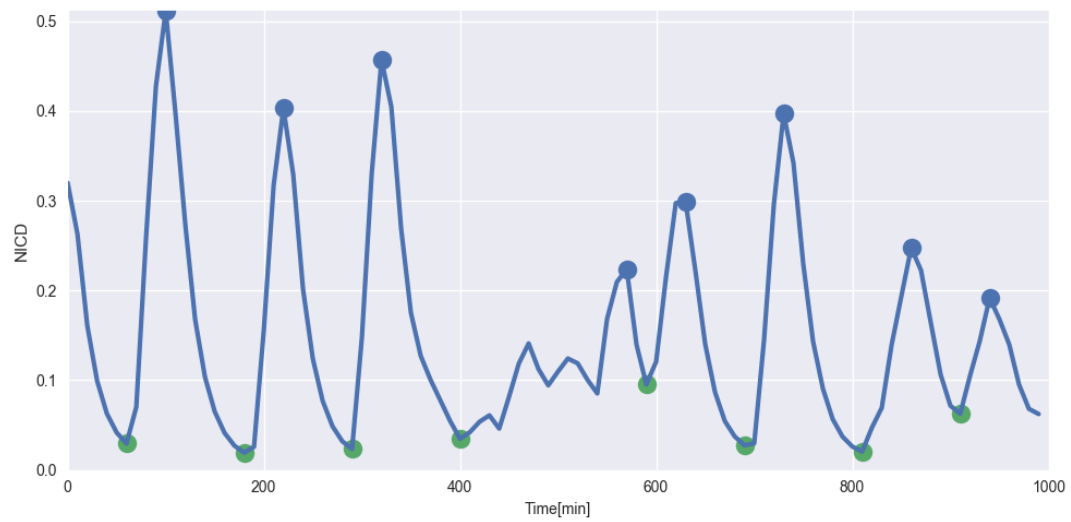


図 3.14 異なる乱数による細胞集団の中心の NICD の中央値

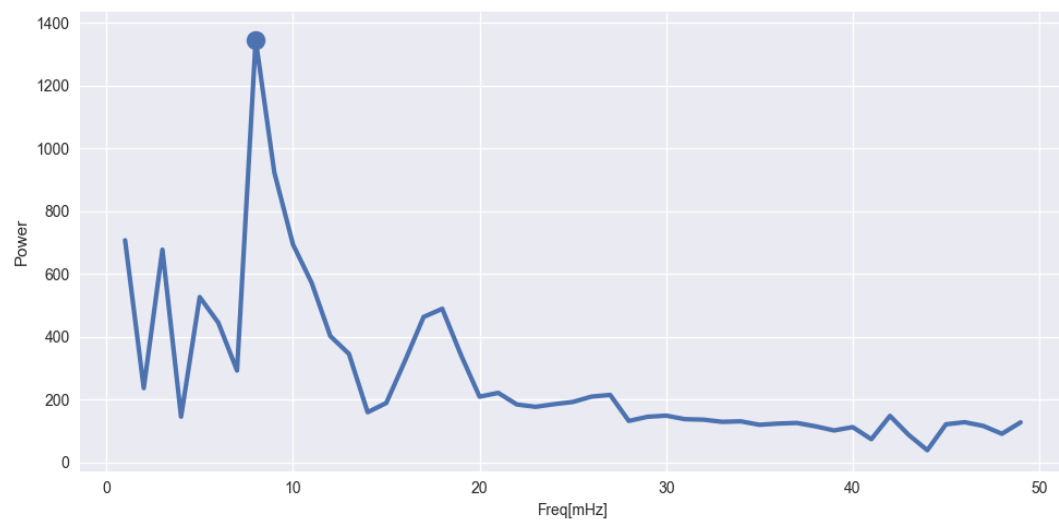


図 3.15 異なる乱数による細胞集団の中心の Hes7 の中央値のスペクトラム

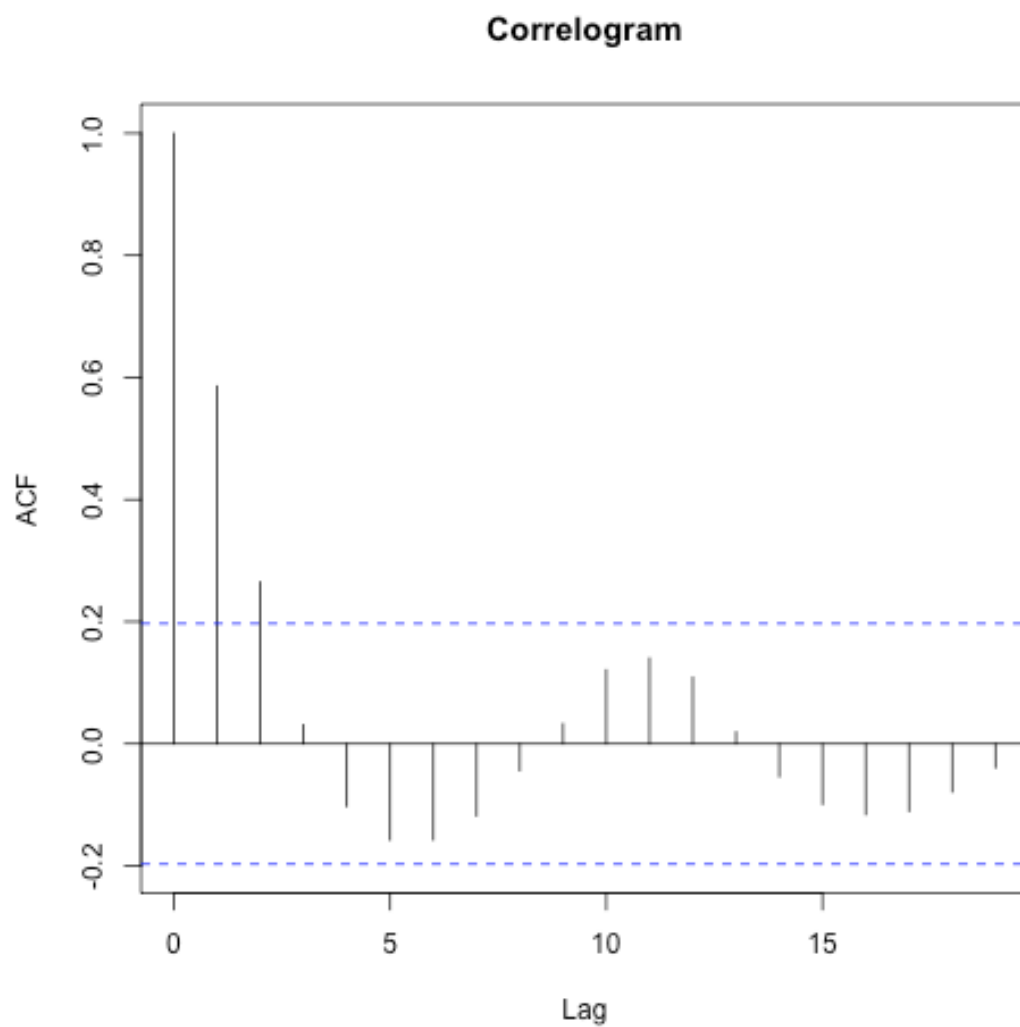


図 3.16 Hes7 の集団に対する中央値のコレログラム. 上図の青色の点線は 95% 信頼区間を示している.

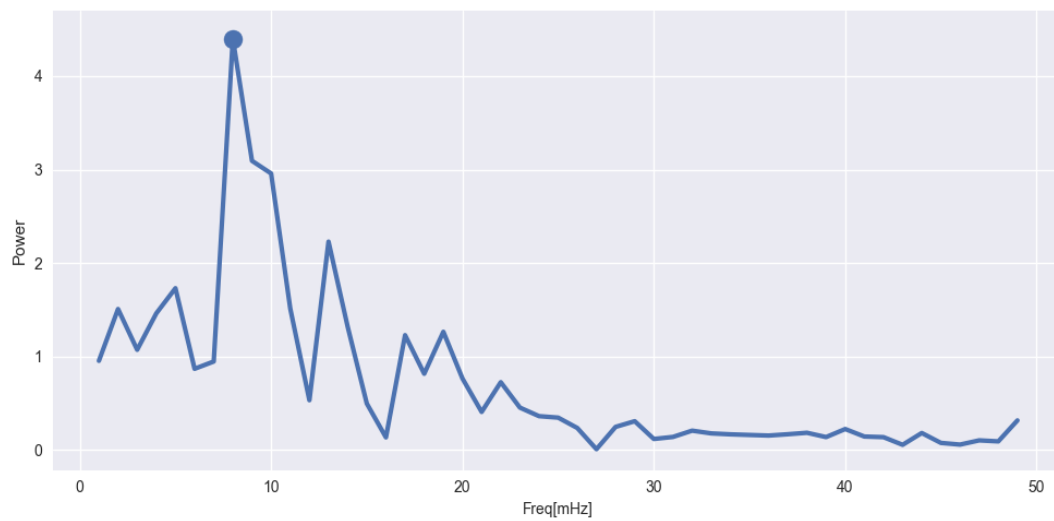


図 3.17 細異なる乱数による 細胞集団の中心の NICD の中央値のスペクトラム

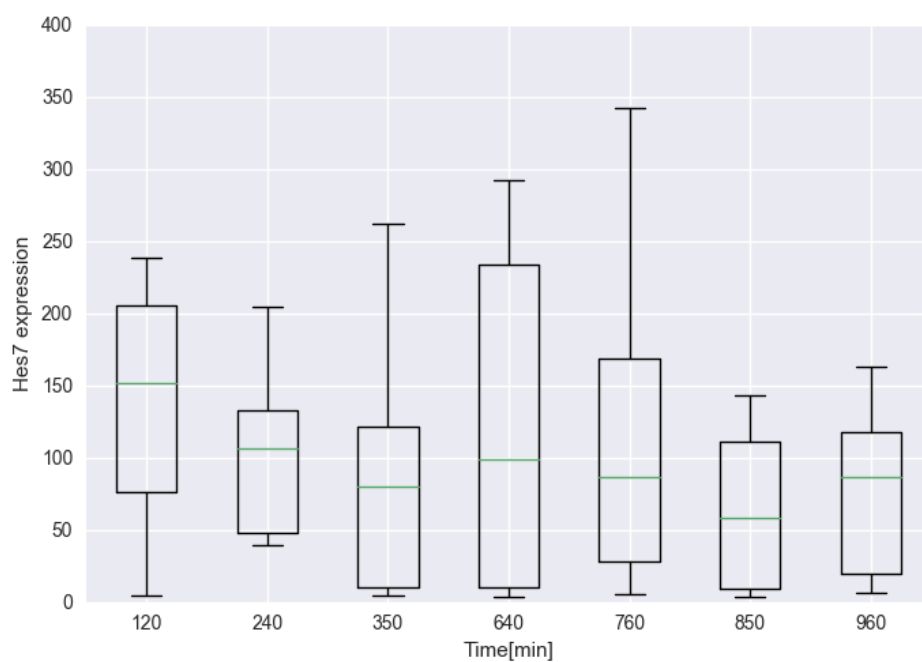


図 3.18 極大値に対する Hes7 発現のバラつき. 上図で示した 8 つのボックスは図 3.16 の青色の点に対する最小値, 第一四分位数, 第二四分位数, 第三四分位数, 最大値を示している.

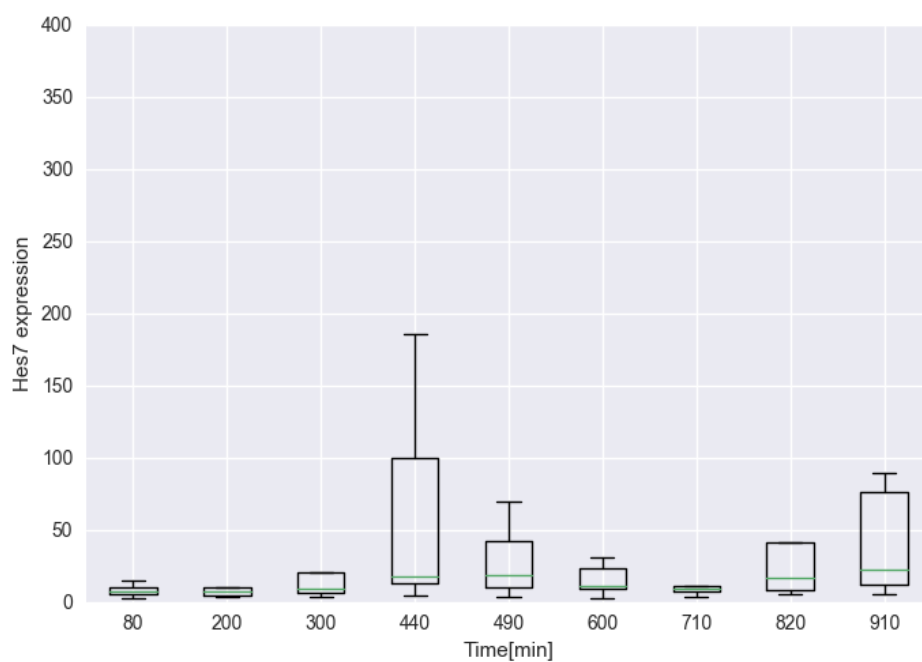


図 3.19 極大値に対する Hes7 発現のバラつき. 上図で示した 8 つのボックスは図 3.16 の青色の点に対する最小値, 第一四分位数, 第二四分位数, 第三四分位数, 最大値を示している.

第 4 章 結論

本研究では遺伝子発現を確率的にモデル化することで、細胞集団の発現同調できる可能性を検証した。結果的に、細胞集団における中央値は周期性を示し、(図 3.3, 3.5) 細胞集団において同調、振動を実現できていることが確認できた。本研究以外でも、樹木が占める領域と樹木が存在しない領域の空間的パターン形成の研究で、ある領域を占める樹木について枯れる確率を導入することで、既存の現象を説明できた例がある [30]。本研究では、遺伝子発現の反応経路を確率的にモデル化し、その結果、生物学的な実験事実を再現できた (図 3.9, 3.10, 3.11)。

既存の遅延微分方程式では、遅延が固定されているため、摂動が加えられた後も、過去の状態に依存して、Hes7 生成が行われる。本研究の確率モデルでは、Hes7 発現は現在の状態にのみ依存し、次のイベントが発生する時間間隔をサンプリングすることができる。また、イベントの発生間隔は、ガンマ分布によって決定される。一旦 Hes7 が集団で発現静止した後、Lfng の抑制が抑えられ、それぞれの細胞で、NICD の供給が始まる。NICD の供給が線形に行われた場合 (図 4.1 左) $\lambda_{N_i} = a \cdot t$, 細胞集団における Hes7 が発現する時間間隔は

$$D_i \sim p(t|k_N, \lambda_{N_i}) = t^{k_N-1} \frac{e^{-at^2}}{\Gamma(k_N)} at^{k_N}$$

k_N : 定数

によってガウス分布の形状に近い形で与えられる (図 4.1 右)。

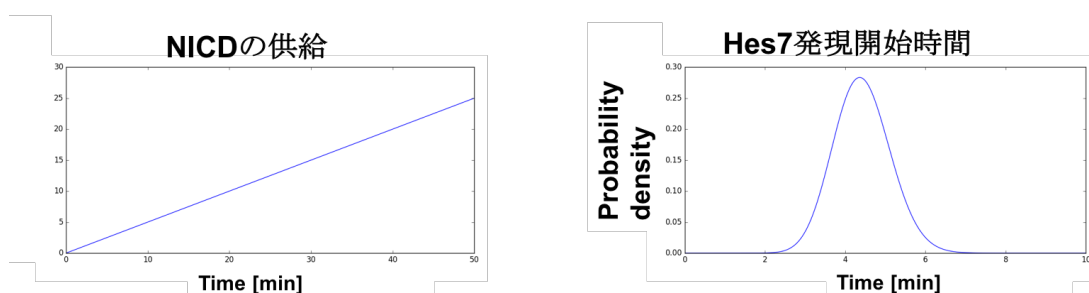


図 4.1 NICD が線形に増加した場合の Hes7 発現時間

決定論モデルとは異なり、Hes7 発現の時間間隔は確率分布で与えられるので、他

の細胞と完全に同調することはできないが、位相を急激に変化させることができる。その結果、確率性によって同調が促進されたと考える。これらの結果から、確率性が遺伝子発現の機能的な役割を有していることを示すことができた。

第 5 章 謝辞

本研究の機会を与えて下さいまして、数々の有益な御指導を与えて下さいました情報科学研究科 数理情報学研究室、池田和司教授に深甚なる謝意を表します。研究進捗の発表会等で終始暖かいご指導と貴重なご意見を頂きました、同研究室、吉本潤一郎准教授に深くお礼申し上げます。バイオサイエンス研究科 作村諭一准教授には研究に対する指導や資料作成のアドバイスなど、細部にわたって的確なアドバイスを頂きました。ありがとうございました。本研究の生物学的な知見やアドバイスについて指導して頂いた同研究科、別所 康全教授に感謝申し上げます。そして、各種事務手続きなどにおいて日頃よりご協力いただきました秘書の安木 さちこさん、谷本 史さん、技術補佐員の笹川 郁子さん、感謝を申し上げます。また、副指導教官として、的確なコメントとアドバイスをくださいました、計算システムズバイオロジーの金谷重彦教授に深く感謝申し上げます。最後に、2年間の大学院生活をさまざまな面から支えてくれた家族に深く感謝の意を表します。ありがとうございました。

参考文献

- [1] Dahmann, Christian, Andrew C. Oates, and Michael Brand. “Boundary formation and maintenance in tissue development”. *Nature Reviews Genetics* 12.1 (2011): 43.
- [2] Pourquié, Olivier. “Vertebrate segmentation: from cyclic gene networks to scoliosis.” *Cell* 145.5 (2011): 650-663.
- [3] Cooke, Jonathan. “A gene that resuscitates a theory—somitogenesis and a molecular oscillator.” *Trends in Genetics* 14.3 (1998): 85-88.
- [4] Richardson, Michael K., et al. “Somite number and vertebrate evolution.” *Development* 125.2 (1998): 151-160.
- [5] McGrew, Michael J., and Olivier Pourquié. “Somitogenesis: segmenting a vertebrate.” *Current opinion in genetics & development* 8.4 (1998): 487-493.
- [6] Kageyama, Ryoichiro, Toshiyuki Ohtsuka, and Taeko Kobayashi. “The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis.” *Development* 134.7 (2007): 1243-1251.
- [7] Bessho, Yasumasa, et al. “Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock.” *Genes & development* 17.12 (2003): 1451-1456.
- [8] Bessho, Yasumasa, et al. “Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation.” *Genes & development* 15.20 (2001): 2642-2647.
- [9] Kageyama, Ryoichiro, et al. “Oscillatory gene expression and somitogenesis.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1.5 (2012): 629-641.
- [10] Cordle, Jemima, et al. “A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition.” *Nature Structural and Molecular Biology* 15.8 (2008): 849.
- [11] Artavanis-Tsakonas, Spyros, Matthew D. Rand, and Robert J. Lake.

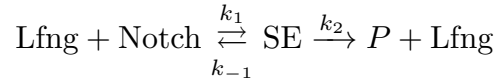
- “Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.” *Science* 284.5415 (1999): 770-776.
- [12] Gridley, Thomas. “The long and short of it: somite formation in mice.” *Developmental dynamics* 235.9 (2006): 2330-2336.
- [13] Lewis, Julian. “Autoinhibition with transcriptional delay: a simple mechanism for the zebrafish somitogenesis oscillator.” *Current Biology* 13.16 (2003): 1398-1408.
- [14] Lewis, Julian. “From signals to patterns: space, time, and mathematics in developmental biology.” *Science* 322.5900 (2008): 399-403.
- [15] Jiang, Yun-Jin, et al. “Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock.” *Nature* 408.6811 (2000): 475.
- [16] Bessho, Yasumasa, and Ryoichiro Kageyama. “Oscillations, clocks and segmentation.” *Current opinion in genetics & development* 13.4 (2003): 379-384.
- [17] Oginuma, Masayuki, et al. “The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite.” *Development* 137.9 (2010): 1515-1522.
- [18] Morimoto, Mitsuru, et al. “The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity.” *Nature* 435.7040 (2005): 354.
- [19] Horikawa, Kazuki, et al. “Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock.” *Nature* 441.7094 (2006): 719.
- [20] Masamizu, Yoshito, et al. “Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.5 (2006): 1313-1318.
- [21] Othmer, Hans G., Steven R. Dunbar, and Wolfgang Alt. “Models of dispersal in biological systems.” *Journal of mathematical biology* 26.3 (1988): 263-298.
- [22] McGill, William J., and John Gibbon. “The general-gamma distribution

- and reaction times.” *Journal of Mathematical Psychology* 2.1 (1965): 1-18.
- [23] Iso, Tatsuya, Larry Kedes, and Yasuo Hamamori. “HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway.” *Journal of cellular physiology* 194.3 (2003): 237-255.
 - [24] Rampal, Raajit, Kelvin B. Luther, and Robert S. Haltiwanger. “Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation.” *Current molecular medicine* 7.4 (2007): 427-445.
 - [25] Haltiwanger, Robert S., and Pamela Stanley. “Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose- β 1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1573.3 (2002): 328-335.
 - [26] Okubo, Yusuke, et al. “Lfng regulates the synchronized oscillation of the mouse segmentation clock via trans-repression of Notch signalling.” *Nature communications* 3 (2012): 1141.
 - [27] del Alamo, David, Hervé Rouault, and François Schweisguth. “Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling.” *Current Biology* 21.1 (2011): R40-R47.
 - [28] Evrard, Yvonne A., et al. “Lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning.” *Nature* 394.6691 (1998): 377.
 - [29] Lindquist, Susan. “The heat-shock response.” *Annual review of biochemistry* 55.1 (1986): 1151-1191.
 - [30] Satake, Akiko, Takuya Kubo, and Yoh Iwasa. “Noise-induced Regularity of Spatial Wave Patterns in Subalpine Abies Forests.” *Journal of theoretical biology* 195.4 (1998): 465-479.

Appendix

Ultra sensitivity

基質 Notch と酵素 Lfng によって複合体 SE を形成し, 糖鎖が付与された Notch と酵素 Lfng に変換される場合, 以下の反応方程式で記述することができる.



ここで, 複合体 SE の生成段階 $\text{Lfng} + \text{Notch} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} \text{SE}$ が非常に早く経過し, 平衡状態になること, 糖化された Notch と糖化されていない Notch の総和は常に一定であることと, Notch と糖化された Notch が細胞膜に挿入される速度は等しいとを仮定した. ミカエリス定数, Lfng, 糖鎖が付与された Notch をそれぞれ K_m , L , R とおくと,

$$\frac{L(1-R)}{K_m + (1-R)} = \frac{R}{0.1 + R}$$

となる. 上式より R について解くと,

$$R = \frac{(1-K_m) \cdot L - K_m - 1 + \sqrt{(L \cdot K_m - L + K_m + 1)^2 + 4L \cdot K_m(L-1)}}{2(L-1)}$$

となり, 糖化されていない Notch の割合は $1-R$, つまり

$$V(L) = 1 - R(L) = 1 - \frac{(1-K_m) \cdot L - K_m - 1 + \sqrt{(L \cdot K_m - L + K_m + 1)^2 + 4L \cdot K_m(L-1)}}{2(L-1)}$$

によって求めることができる. ここで導いた式によって, Lfng と糖化されていない Notch の関係は図 5.1 のようなシグモイド曲線に似た形になる.

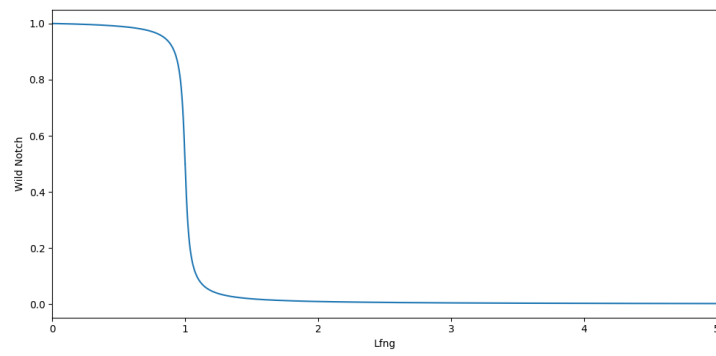


図 5.1 糖化されていない Notch と Lfng の関係. $K_m = 0.01$