

# ネガティブフィードバック構造に基づく 生物振動子の周期調節可能性の解析

前田 和勲<sup>1,2</sup> 倉田 博之<sup>2,3</sup>

**概要:** 生物には数多くの振動現象が存在する。その中でも細胞周期や心拍などでは、振動の振幅が一定のまま周期が大きく変わる。この特徴は周期調節可能性と呼ばれる。生物振動子はどのようにして周期調節可能性を実現しているのだろうか。我々は、この疑問に答えるために、様々な生化学ネットワーク構造の生物振動子のシミュレーションを行った。生物に見られる振動現象には、時間遅れを伴うネガティブフィードバックループ構造が必要であることが知られている。本発表では、このネガティブフィードバックループを延長すること、あるいは、ポジティブフィードバックループを加えることで周期調節可能性が向上することを示す。

## 1. はじめに

多くの生物において振動現象は重要な役割を担っている。例えば、細胞周期においては、細胞周期関連タンパクの活性化レベルが周期的に変化する。また、動物においては、心筋で周期的な電気パルスが起きることで拍動が生じる。細胞周期や心拍では、振動の周期が大きく変化するが、振幅はほとんど変化しない。この性質は、周期調節可能性 (period tunability あるいは単に tunability) と呼ばれる [6]。実際、細胞周期関連タンパクの活性化レベルの振幅が周期の変化に伴って変わってしまったら正常に細胞分裂を行うことは難しい。同様に、心筋の電気パルスの大きさが周期の変化とともに変わってしまったら、正常な拍動は難しい。このように周期調節可能性は生物振動子にとって非常に重要である。

生物振動子が周期調節可能性を生み出す仕組みを理解することは、合成生物学の観点からも重要である。周期を自由に換えられる合成遺伝子回路振動子が実現できれば、培養環境に応じて異なる周期で周期的に有用物質合成を行うなど、これまで以上に複雑な挙動を示す有用細胞が設計できる。これまでに多くの合成遺伝子回路振動子が作られているが ([1], [4], [5]), 周期とともに振幅も変化してしまう。

Tsai らは、ネガティブフィードバック振動子にポジティブフィードバック (あるいは正の自己制御) を組み合わせると周期調節可能性が向上することを計算機実験によって

示した [6]。一般に、周期調節可能性は、出力変数と調節パラメータの選び方に依存するが、Tsai らは特定の出力変数と調節パラメータを選んだ場合の周期調節可能性しか調べていない。また、ポジティブフィードバックの有無以外の観点から周期調節可能性について調べていない。本発表では、これらの点を考慮し、より包括的に数値解析し、周期調節可能性をもたらす仕組みを明らかにする。

## 2. 方法

### 2.1 Tsai モデル

本研究では、ダイナミックモデルのパラメータ値をランダムに与えることで、特定のパラメータ値に依存しない解析を行う。従って、解析対象のモデルは計算コストのかからない小さなモデルが好ましい。そこで、Tsai らが解析に用いたトイモデルを解析する (図 1)。図 1 の 2 つのモデルはそれぞれ  $n$  個のタンパク ( $x_i$ ) から成る。 $x_i$  は、活性型と不活性型の 2 状態を持ち、その総量  $x_i^{max}$  は保存されている。 $x_i$  は隣のタンパク  $x_{i+1}$  を不活性化する。そして、 $n$  番目のタンパク  $x_n$  が 1 番目のタンパク  $x_1$  を不活性化することでフィードバックループを形成している。 $n$  が奇数のとき、このフィードバックループはネガティブフィードバックループになる。 $n$  が 3 以上の奇数のときに振動が生じる。

Neg-only (Negative-feedback-only) モデル (図 1A) はネガティブフィードバックループだけを持つ。一方、Pos-Neg (Positive-plus-negative feedback) モデル (図 1B) には、Neg-only モデルのネガティブフィードバックループに加えて  $x_1$  のポジティブフィードバックが存在する。Tsai

<sup>1</sup> 九州工業大学 若手研究者フロンティア研究アカデミー

<sup>2</sup> 九州工業大学 情報工学部 生命情報工学科

<sup>3</sup> 九州工業大学 バイオメディカルインフォマティクス研究開発センター

## A

### Neg-only

$$\begin{aligned}\frac{dx_1}{dt} &= ks_1'(x_1^{max} - x_1) - \frac{kd_1 \cdot x_n^{h_1}}{K_1^{h_1} + x_n^{h_1}} x_1 \\ \frac{dx_2}{dt} &= ks_2'(x_2^{max} - x_2) - \frac{kd_2 \cdot x_1^{h_2}}{K_2^{h_2} + x_1^{h_2}} x_2 \\ &\vdots \\ \frac{dx_n}{dt} &= ks_n'(x_n^{max} - x_n) - \frac{kd_n \cdot x_{n-1}^{h_n}}{K_n^{h_n} + x_{n-1}^{h_n}} x_n\end{aligned}$$

$$ks_i' = ks_i / x_i^{max} \quad \text{for } i=1,2,\dots,n$$

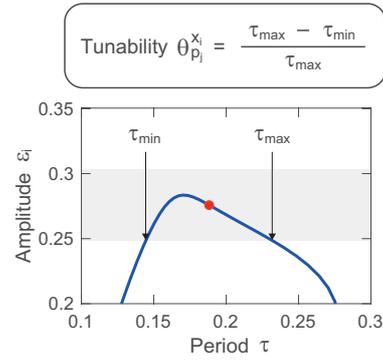
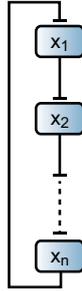


図2 周期調節可能性 (tunability) の計算方法. 赤点は基準となるパラメータ値を使ったときの周期と振幅である. そこから調節パラメータ  $p_j$  を変化させると出力変数  $x_i$  の周期  $\tau$  と振幅  $\epsilon_i$  が青線に沿って変わる. 灰色の長方形は, 基準パラメータ値を使ったときの振幅から 10% の範囲を示す. 振幅がこの範囲に入ったままで実現できる周期の最大値が  $\tau_{max}$ , 最小値が  $\tau_{min}$  である.

## B

### Pos-Neg

$$\begin{aligned}\frac{dx_1}{dt} &= ks_1'(x_1^{max} - x_1) - \frac{kd_1 \cdot x_3^{h_1}}{K_1^{h_1} + x_3^{h_1}} x_1 \\ &\quad + ks_{n+1}'(x_1^{max} - x_1) \frac{x_1^{h_{n+1}}}{K_{n+1}^{h_{n+1}} + x_1^{h_{n+1}}} \\ \frac{dx_2}{dt} &= ks_2'(x_2^{max} - x_2) - \frac{kd_2 \cdot x_1^{h_2}}{K_2^{h_2} + x_1^{h_2}} x_2 \\ &\vdots \\ \frac{dx_n}{dt} &= ks_n'(x_n^{max} - x_n) - \frac{kd_n \cdot x_{n-1}^{h_n}}{K_n^{h_n} + x_{n-1}^{h_n}} x_n\end{aligned}$$

$$ks_i' = ks_i / x_i^{max} \quad \text{for } i=1,2,\dots,n$$

$$ks_{n+1}' = ks_{n+1} / x_1^{max}$$

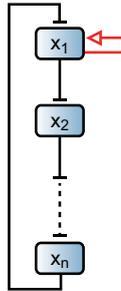


図1 微分方程式とネットワークマップ. (A) Neg-only モデル, (B) Pos-Neg モデル. Pos-Neg モデルにのみ存在する部分を赤で示した.

らは, Pos-Neg モデルの調節可能性が Neg-only モデルよりも高いことを明らかにし, ポジティブフィードバックが周期調節可能性を向上させると結論づけた [6].

### 2.2 周期, 振幅, 相対振幅

図1で与えられる微分方程式系を数値積分すると変数  $x_i$  の時間発展が得られる. そして, そこから周期や振幅など振動の特徴が求められる. 周期  $\tau$  は, 振動の頂点から次の頂点までの距離で与えられる (どの変数に着目しても同じである). 変数  $x_i$  の振幅  $\epsilon_i$  は,  $x_i$  の振動の底から頂点までの距離である. さらに,  $x_i$  の相対振幅は次のようにして求められる.

$$\rho_i = \frac{\epsilon_i}{x_i^{ub} - x_i^{lb}} \quad (1)$$

ここで,  $x_i^{lb}$  と  $x_i^{ub}$  はそれぞれ出力変数  $x_i$  がとりうる最小値と最大値である. 図1のモデルでは次のようになる.

$$x_i^{lb} = \frac{ks_i x_i^{max}}{ks_i + kd_i x_i^{max}} \quad (2)$$

$$x_i^{ub} = x_i^{max} \quad (3)$$

次の平均相対振幅は, すべての変数に関する相対振幅の平均である.

$$\text{Mean Relative Amplitude} = \frac{1}{n_x} \sum_{i=1}^{n_x} \rho_i \quad (4)$$

ここで,  $n_x$  は変数の数である.

### 2.3 周期調節可能性の定量化

Tsai らは, 視覚的な方法でモデル間の周期調節可能性を比較している ([6] の図 4F). しかし, この方法は定量性を欠くために, モデル間の周期調節可能性が統計的に有意なのか判断できない. 本研究では, 次の方法で周期調節可能性を定量化する (図 2). まず, 出力変数を  $x_i$ , 調節パラメータを  $p_j$  とする. 基準となるパラメータセットを使ってシミュレーションを行って,  $x_i$  の振動の周期と振幅を調べる (図 2 の赤点). 次に, 調節パラメータを変化させて, もとの振幅からの変化を 10% 以内に抑えたままで周期がどれだけ変化できるかを調べる. このようにして得られた周期の最大値を  $\tau_{max}$ , 最小値を  $\tau_{min}$  とする. このとき, 次のようにして求められる  $\theta_{p_j}^{x_i}$  を周期調節可能性の指標として用いる.

$$\theta_{p_j}^{x_i} = \frac{\tau_{max} - \tau_{min}}{\tau_{max}} \quad (5)$$

次に, モデル間での周期調節可能性の比較を簡単にするために, 平均周期調節可能性という指標を導入する.

$$\text{Mean Tunability} = \frac{1}{n_x n_p} \sum_{i=1}^{n_x} \sum_{j=1}^{n_p} \theta_{p_j}^{x_i} \quad (6)$$

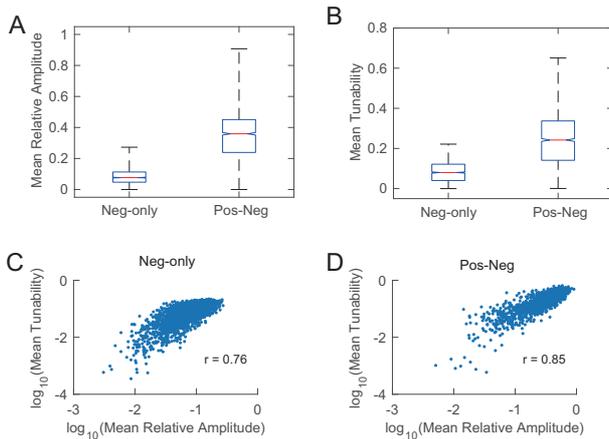


図 3 Neg-only モデルと Pos-Neg モデルの比較. (A) 平均相対振幅, (B) 平均周期調節可能性, (C,D) 平均相対振幅と平均周期調節可能性の相関. ネガティブフィードバックループを構成するタンパクの数は3とした ( $n = 3$ ).

## 2.4 パラメータランダム化に基づくモデル比較

図 1 のような微分方程式系の挙動は、式の形だけでなくパラメータ値に依存する。本研究では、特定のパラメータ値の選び方に依存しない解析を行うために、パラメータのランダム化を行う。その解析の手順は次の通りである。まず、モデルに対してパラメータ値をランダムに与えてシミュレーションを行う。そして、振動が生じたら、全ての出力変数と調節パラメータの組み合わせに関して周期調節可能性を計算する。この手順を十分なサンプル数が得られるまで繰り返す。十分なサンプル数が得られたら、周期調節可能性の分布をモデル間で比較する。

## 3. 結果

### 3.1 ポジティブフィードバックは周期調節可能性を向上させる

まず、 $n = 3$  として解析を行った。出力変数  $x_1$ 、調節パラメータ  $ks_2$  とした場合について注目してみると、Pos-Neg モデルの周期調節可能性は Neg-only モデルよりも大きかった (data not shown)。これは、Tsai らの解析結果と一致する。ここから、我々の周期調節可能性の定量化法が信用できることがわかる。Tsai らは、出力変数  $x_1$ 、調節パラメータ  $ks_2$  とした場合の周期調節可能性しか調べていないが、我々の解析の結果、出力変数と調節パラメータの 45 の組み合わせ (3 変数  $\times$  15 パラメータ) のうち 44 で Pos-Neg モデルの周期調節可能性が Neg-only モデルより高かった。従って、ポジティブフィードバックが周期調節可能性を向上させると言える。Pos-Neg モデルと Neg-only モデルの平均周期調節可能性の分布を比較してみると、やはり Pos-Neg モデルの方が平均周期調節可能性が高かった (図 3B)。また、興味深いことに、Pos-Neg モデルの方が平均相対振幅も高かった (図 3A)。

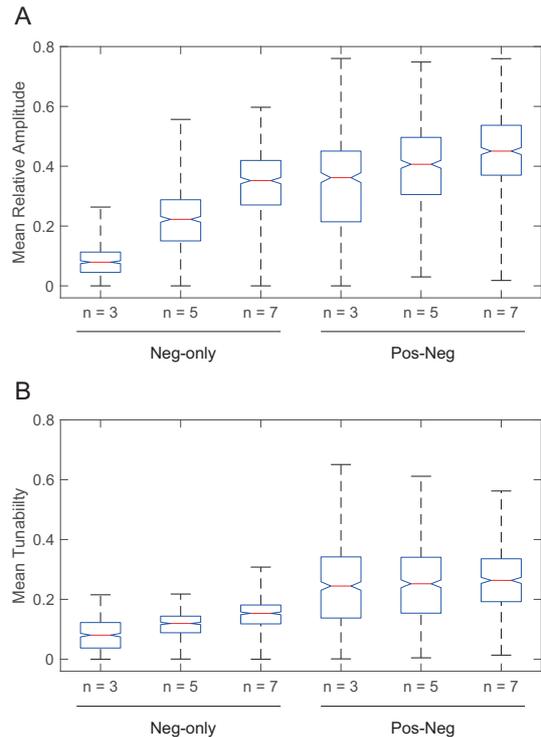


図 4 ネガティブフィードバックループの長さの影響. (A) 平均相対振幅, (B) 平均周期調節可能性.  $n$  はネガティブフィードバックループを構成するタンパクの数.

### 3.2 相対振幅の大きい振動子は周期調節可能性が高い

図 3B から分かる通り、モデル構造が同じでもパラメータ値によって平均周期調節可能性は大きく異なる。平均周期調節可能性の高い振動子にはどのような特徴があるのだろうか。これを調べるために、パラメータ値、周期、振幅、相対振幅などと平均周期調節可能性の相関を調べた。その結果、平均相対振幅と平均周期調節可能性との間に正の相関があった (図 3CD)。つまり、相対振幅の高い振動子は周期調節可能性も高い傾向にある。

### 3.3 ネガティブフィードバックループが長いほど周期調節可能性が高い

一般に、ネガティブフィードバック振動子ではネガティブフィードバックループが長いほど相対振幅が大きくなる [3]。また、すでに見たとおり、平均相対振幅と平均周期調節可能性には正の相関がある。そこで、ネガティブフィードバックループを長くすることで周期調節可能性が向上するのか調べた。予想通り、ネガティブフィードバックループが長いほど振幅が大きく、周期調節可能性が高いことがわかった (図 4)。特に、この傾向はネガティブフィードバックループが短いときに平均相対振幅と平均周期調節可能性が小さい Neg-only モデルで顕著であった。

### 3.4 高い周期調節可能性を達成する仕組み

どのような仕組みで高い周期調節可能性が実現されるの

だろうか. これを調べるために, 周期調節可能性の高い振動子と低い振動子の振動の様子を調べた (図 5). 周期調節可能な Pos-Neg モデルは  $x_1$  が双安定性を示す (図 5B). そして, 2つの平衡点を行き来することで振動が生み出されている. このとき振幅は2つの平衡点の差で決まる. 2つの平衡点を行き来するのにかかる時間が周期である. 従って, 2つの平衡点の高さを変えないパラメータを調節パラメータとすることで, 振幅を変えずに周期だけを変えることができる (図 5A). このようなヒステリシス駆動振動子 (あるいは緩和振動子) の周期調節可能性が高いことは先行研究でも報告されている [6].

長いネガティブフィードバックを持つ Neg-only モデルは高い周期調節可能性を達成できる (図 4B). しかし, Neg-only モデルは, ポジティブフィードバックを持たないのでヒステリシス駆動振動を起こすことができない. 従って, 長いネガティブフィードバックを持つ Neg-only モデルは, ヒステリシス駆動振動に依らない方法で高い周期調節可能性を実現しているはずである. 周期調節可能な長い Neg-only モデルでは, 相対振幅が大きく,  $x_1$  が, その下限 ( $x_1^b \approx 0$ ) と上限 ( $x_1^u \approx 8$ ) の間を行き来している (図 5EF). この振動の場合, 振幅は下限と上限の差で決まる. 従って, 下限と上限に影響を与えないパラメータを調節パラメータとすることで, 振幅を変えずに周期だけを変えることができる (図 5E). 相対振幅の大きい振動子はこの「振幅の飽和」によって, 高い周期調節可能性を達成していると考えられる. 長いネガティブフィードバックは相対振幅を向上させ, 振幅を飽和させることで周期調節可能性を実現できる.

周期調節可能性の低い振動子は, ヒステリシス駆動振動を起こすことができないだけでなく相対振幅が小さい (図 5CDGH).

以上をまとめると, 我々は, 振幅の飽和が周期調節可能性を向上させる上で重要であることを初めて明らかにした. 長いネガティブフィードバックは, 振幅の飽和を通して周期調節可能性を向上させる.

### 3.5 人工遺伝子回路振動子の周期調節可能性の改善

これまでの Tsai のモデルの解析で得られた結果にはどれほどの一般性があるのだろうか. また, これまでの解析結果をもとに, 周期調節可能性の低い振動子を改良して周期調節可能性を向上させることは可能だろうか. これを調べるために, 我々は, Repressilator の解析を行った. Repressilator は, 初めて人工的に合成された遺伝子回路振動子である [1]. 3つの遺伝子がリング状に隣の遺伝子の発現を抑制するような遺伝子ネットワーク構造になっており, これらの遺伝子の発現レベルが周期的に増減する. Repressilator には微分方程式モデルが存在し, このモデルの解析結果から, その周期調節可能性は低いと考えられて

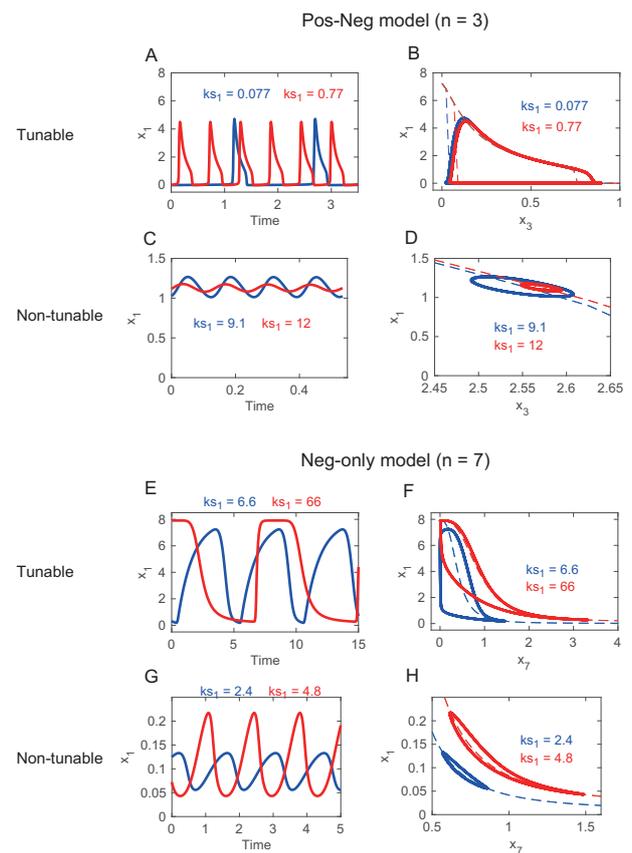


図 5 周期調節可能な振動子 (Tunable) とそうでない振動子 (Non-tunable) の違い. 実線はモデルが示す実際の軌道, 破線は平衡点.

いる [6].

我々は, Repressilator にポジティブフィードバックを加えたり, ネガティブフィードバックを長くしたりすることで Repressilator の周期調節可能性が向上できるか調べた. まず, Repressilator にポジティブフィードバックを加えたモデルを構築した. このモデルを Pos-Repressilator と呼ぶことにする. Pos-Repressilator では, 遺伝子の1つが自分自身の翻訳速度を向上させる.

Repressilator と Pos-Repressilator に対して, Tsai モデルの場合と同様に解析を行った. Pos-Repressilator は, Repressilator と比較して周期調節可能性が高い (図 6B). また, Repressilator と Pos-Repressilator の両方において, ネガティブフィードバックを長くすると, つまり, ネガティブフィードバックを構成する遺伝子数を増やすと, 平均相対振幅と平均周期調節可能性の両方が向上する (図 6). 以上の結果から, 実在する遺伝子回路振動子でもポジティブフィードバックを加えたり, ネガティブフィードバックを長くしたりすることで周期調節可能性が向上することが示唆される.

## 4. おわりに

本発表では, パラメータランダム化に基づくモデル比較

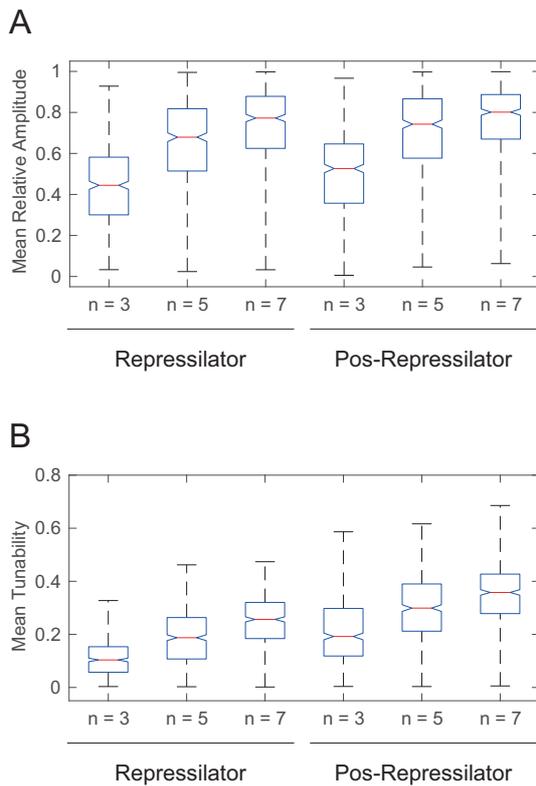


図6 ネガティブフィードバックループの長さの影響。(A) 平均相対振幅, (B) 平均周期調節可能性.  $n$  はネガティブフィードバックループを構成する遺伝子の数.

を行うことで、ネガティブフィードバック振動子が周期調節可能性をもたらす仕組みを明らかにした。これまで、ポジティブフィードバックを持つネガティブフィードバック振動子が高い周期調節可能性を示すことが知られていた。本研究では、ポジティブフィードバックなしでも、長いネガティブフィードバックループがあれば高い周期調節可能性を達成できることを明らかにした。ポジティブフィードバックを持つ振動子は、2つの定常状態を行き来するヒステリシス駆動振動によって高い周期調節可能性を達成する。一方、長いネガティブフィードバックループを持つ振動子は、振幅を飽和させることによって周期調節可能性を向上させる。最後に、これらの結果を基にして、実在する合成遺伝子回路振動子である Repressilator の周期調節可能性を改善できることを示した。

本研究では、実際に調節パラメータを変化させて、その都度周期を求めることで、周期調節可能性の定量化を行った。この方法では、微分方程式の数値積分を行う回数が多く、非常に計算コストがかかる。最近、我々は、マルチパラメータ感度 [2] と平均周期調節可能性に相関があることを見出した。今後、マルチパラメータ感度を使うことで、より大規模な振動子モデルの周期調節可能性の解析が可能になるかもしれない。また、本研究では、ポジティブフィードバックを加えたり、ネガティブフィードバックループを長くすることで Repressilator の周期調節可能性が向上す

るという予想を与えた。この予想が正しいかどうか実際の生物学実験によって検証する必要がある。

#### 参考文献

- [1] Elowitz, M. B., Leibler, S.: A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators, *Nature*, Vol.403, pp.335 (2000).
- [2] Maeda, K., Kurata, H.: Quasi-multiparameter sensitivity measure for robustness analysis of complex biochemical networks, *J Theor Biol*, Vol.272, pp.174 (2011).
- [3] Maeda, K., Kurata, H.: Analytical study of robustness of a negative feedback oscillator by multiparameter sensitivity, *BMC Syst Biol*, Vol.8 Suppl 5, S1 (2014).
- [4] O'Brien, E. L., Itallie, E. V., Bennett, M. R.: Modeling synthetic gene oscillators, *Math Biosci*, Vol.236, pp.1 (2012).
- [5] Purcell, O., Savery, N. J., Grierson, C. S., di Bernardo, M.: A comparative analysis of synthetic genetic oscillators, *J R Soc Interface*, Vol.7, pp.1503 (2010).
- [6] Tsai, T. Y., Choi, Y. S., Ma, W., Pomerening, J. R., Tang, C., Ferrell, J. E., Jr.: Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops, *Science*, Vol.321, pp.126 (2008).