慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	周波数応答に基づく遺伝子制御回路のモデル集合同定法と実験系の構築
Sub Title	Theory and experimental setup for set based model identification of genetic circuits using frequency response
Author	堀, 豊(Hori, Yutaka)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では, 微生物の細胞内で動作する人工的な反応系(遺伝子回路)のダイナミクスをシステム工学的なアプローチで数理モデル化するために必要な理論, およびモデル化に必要なデータを取得するためのマイクロ流路実験系の構築を行った。 特に, 生化学反応システムの数理モデルが計測データの少なさや反応ダイナミクスの確率ゆらぎなどの影響により大きな「不確かさ」を有することに着目し, 不確かさを定量的に扱うためのパラメタ同定法, パラメタ設計法を最適化問題として定式化した。また, 遺伝子回路に対して化学的な入力を動的に与え, 周波数応答を計測するためのマイクロリアクタおよびその制御装置を構築した。 This research project developed a combined theoretical and experimental platform for modeling synthetic biomolecular reactions (genetic circuits) in microbe cells using a systems engineering approach. The focus of the project was particularly on the quantitative characterization of the uncertainty of biomolecular reactions that comes from the sparsity of available measurements and stochastic noise in reaction dynamics. We proposed optimization-based parameter identification and design methodologies for model-based development of biomolecular systems. We also developed a microfluidic platform for actuating genetic circuits using dynamic chemical inputs. The developed platform allows for characterization of the frequency response of genetic circuits, which will be helpful to improve mathematical models.
Notes	研究種目：研究活動スタート支援 研究期間：2016～2017 課題番号：16H07175 研究分野：制御工学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16H07175seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｈ０７１７５

研究課題名（和文）周波数応答に基づく遺伝子制御回路のモデル集合同定法と実験系の構築

研究課題名（英文）Theory and Experimental Setup for Set based Model Identification of Genetic Circuits using Frequency Response

研究代表者
堀　豊（Hori, Yutaka）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・助教

研究者番号：１０７７８５９１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では，微生物の細胞内で動作する人工的な反応系（遺伝子回路）のダイナミクスをシステム工学的なアプローチで数理モデル化するために必要な理論，およびモデル化に必要なデータを取得するためのマイクロ流路実験系の構築を行った．
特に，生化学反応システムの数理モデルが計測データの少なさや反応ダイナミクスの確率ゆらぎなどの影響により大きな「不確かさ」を有することに着目し，不確かさを定量的に扱うためのパラメタ同定法，パラメタ設計法を最適化問題として定式化した．また，遺伝子回路に対して化学的な入力を動的に与え，周波数応答を計測するためのマイクロリアクタおよびその制御装置を構築した．

研究成果の概要（英文）：This research project developed a combined theoretical and experimental platform for modeling synthetic biomolecular reactions (genetic circuits) in microbe cells using a systems engineering approach. The focus of the project was particularly on the quantitative characterization of the uncertainty of biomolecular reactions that comes from the sparsity of available measurements and stochastic noise in reaction dynamics. We proposed optimization-based parameter identification and design methodologies for model-based development of biomolecular systems. We also developed a microfluidic platform for actuating genetic circuits using dynamic chemical inputs. The developed platform allows for characterization of the frequency response of genetic circuits, which will be helpful to improve mathematical models.

研究分野：制御工学

キーワード：遺伝子回路　確率システム　システム同定　凸最適化　マイクロ流路

１．研究開始当初の背景

遺伝子工学技術の発達に伴い，微生物中の生体分子反応ネットワークを遺伝子操作により人工的に設計・調整し，望みの反応を細胞中に実装することが可能となりつつある．これにより，微生物中に構築した人工的な「遺伝子回路」を用いた希少タンパク質の効率的な合成などの革新的な工学的応用が期待されている（例えば文献[1]）．2000 年代以降，合成生物学の分野では，数理モデルに基づく遺伝子回路の解析・設計手法の提案や，概念実証用の小規模な遺伝子回路の実装が行われ，数理と実験の融合的なアプローチによる遺伝子回路開発の有効性が示されてきた（例えば文献[2],[3]）．今後，より大規模で実用的な遺伝子回路の設計に向け，信頼性の高い数理モデルの構築がますます重要になると考えられる．

しかし，遺伝子回路の実験では，取得可能なデータの質と量が他の工学的な対象に比べて極めて限られており，精度の高い数理モデル化が難しい状況であった．具体的には，(1) 生体分子反応に特有の確率ノイズによる S/N 比の低さ,(2) 計測可能な状態変数（mRNA やタンパク質などの濃度）が少ないこと，および (3) 系への動的入力が，電圧や電流のように自在に制御できるわけではなく，限られた入出力応答データしか取得できないことなどが挙げられる．既存の小規模な遺伝子回路の数理モデルでは，場当たり的なチューニングにより決定された「不確かさ」の大きなパラメタが用いられることが多かったが，そのようなモデルを組み合わせて大規模な遺伝子回路の挙動を解析し，ロバストに設計することは困難であると考えられる．

２．研究の目的

そこで，本研究では，遺伝子回路の「不確かさ」をシステム論的アプローチにより定量的に扱い，設計に活かすための理論および実験系の構築を目的とした．具体的には，(1) 質や量が限られた計測データに基づいて得られたモデルの不確かさを厳密に定量化するための集合同定理論の構築，(2) 遺伝子回路に連続的に変化する動的な入力信号を与え，入出力応答を計測するためのマイクロ流路実験系の構築の 2 つを実施することを目標とした．特に，不確かさを厳密に定量するアプローチと削減するアプローチを融合することで，大規模な遺伝子回路の構築に利用可能な信頼性の高い数理モデルの構築を目指した．

３．研究の方法

(1) 集合同定理論の構築では，計測データと整合するパラメタの集合を求めるための数理最適化アルゴリズムを構築し，数値例題を用いて有用性を検証した．具体的には，まず質量作用の法則に基づく微分方程式モデルに対する集合同定法を構築し，線形化モデルを用いて有用性を検証した．つぎに，より解像度の高い確率モデル（化学マスター方程式[4]）に対して，平均や分散などの統計量の制約を満たすパラメタの集合を同定するアルゴリズムを構築した．

(2)マイクロ流路実験系の構築では，空気圧で制御可能な開閉バルブ(Quake 型バルブ[5])を持つマイクロ流路を構築した．まず，フォトレジスト SU-8 (Microchem)および AZ P4620 (Merck) を利用してガラス基板およびシリコンウエハー上に流路の鋳型を作成し，PDMS(Polydimethylsiloxane)樹脂製に転写することで，マイクロ流路を作成した．試薬の流出入量の動的制御を行うために，流路デバイス上には蠕動ポンプを設計した．蠕動ポンプを制御する空気圧を，電磁弁を用いて ON/OFF 制御を行えるように電子回路（USB リレー回路）を設計し，リレー回路を制御するための計算機プログラムを作成した．作成した流路の動作検証を行うために，蛍光試薬（フルオレセイン）の濃度を周期的に変化させる

ように入力試薬量を調整し，蛍光顕微鏡を用いて蛍光を経時観察した．

４．研究成果

(1)微分方程式モデルに対する集合同定法

インパルス応答に基づく遺伝子回路のパラメタ集合同定法[6]を発展させ，周波数応答データに対する集合同定理論への一般化を行った．構築した同定法では，まず，N4SID 法を用いて，計測データを高精度で再現可能な高次元の参照モデルを同定する．つぎに，遺伝子回路の線形化モデルと参照モデルの差が所与の誤差以下になるパラメタの集合を数値最適化により同定する計算機プログラムを構築した．

既存のパラメタフィッティング法の多くが非凸の最適化問題を解くため局所最適解に陥りやすいのに対し，本研究課題で構築した方法は，凸最適化(半正定値計画法)の反復計算によりパラメタ集合を求められるため，厳密なパラメタ集合が効率的に求められるという利点がある．なお，本研究では，この提案法を，よりクラスの広い非線形モデルのパラメタ集合同定に拡張するための検討も行った．

(2)確率モデルに対する集合同定法

上記の同定理論と並行して，微分方程式モデルよりも解像度の高い確率モデルに対するパラメタ集合同定法を構築した．また，それをベースにして遺伝子回路の設計アルゴリズムを提案した．

提案法では，遺伝子回路の分子個体数の時間変化（ダイナミクス）を記述する化学マスター方程式に基づいて，モーメント方程式の導出を行う．モーメント方程式は，方程式の数が変数の数よりも少ない劣決定の方程式となるため，分子個体数の統計量（平均や分散など）が観測された時に，観測データに整合するパラメタ集合を一意に求めることは一般には難しい問題である．そこで，本研究では「モーメント条件」（例えば[7]）として知られている代数的条件を利用することで，数理最適化（凸最適化）を用いて解の範囲を厳密に見積もることができることを示した．

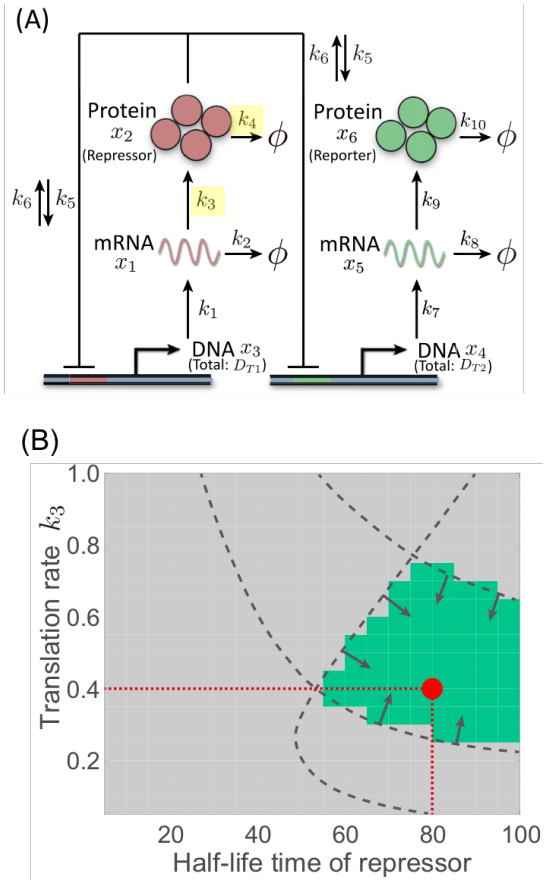

図 1:(A)同定･設計対象の遺伝子回路の例 (B)提案アルゴリズムで得られたパラメタ領域(発表論文①)

提案法を用いることで，例えば，図 1(A)に示す遺伝子回路のパラメタ同定や設計が可能であることを数値的に実証した．具体的には，例えば，定常状態における分子の個体数の平均や分散が所与の制約を満たすパラメタ領域を，図 1(B)のように集合として得る ことが可能である．提案法は，ばらつきを含む不確かな計測データからのパラメタ集合の同定に応用することが可能であるだけではなく，設計制約を満たすパラメタ集合を発見する上でも有用である．

(3)マイクロ流路実験系

「研究の方法」で述べたマイクロ流路を製作し，動作確認を行った．蠕動ポンプの動作

回数と送液量の関係をプロットすると，線形になったことから，蠕動ポンプを用いて流路への入力量を精密に制御できると結論づけた．また，試薬濃度を動的に変化させる実験では，蛍光画像から流路中の溶液濃度を目標値通りに制御できることが確認できた．以上のことから，構築した流路を用いて遺伝子発現を誘導する試薬を動的に変化させ，遺伝子回路を動的に駆動することができるようになると期待される．今後は，遺伝子回路を用いた実証実験に向けて研究を発展させていく予定である．

参考文献

[1] J. Hasty, D. McMillen, J. J. Collins, "Engineered gene circuits,"*Nature*, vol. 420, No. 6912, pp. 224-230, 2002.

[2] V. Hsiao, Y. Hori, P. W. K. Rothemund, R. M. Murray, "A population-based temporal logic gate for timing and recording chemical events," *Molecular Systems Biology*, vol. 12, No. 5, 869, 2016.

[3] T. S. Moon, C. Lou, A. Tamsir, B. C. Stanton, C. A. Voigt, "Genetic programs constructed from layered logic gates in single cells," *Nature*, vol. 491, No. 7423, pp.249-253, 2012.

[4] D. T. Gillespie, "A rigorous derivation of the chemical master equation," *Physica A*, vol. 188, No. 1-3, pp. 404-425, 1992.

[5] M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S. R. Quake, "Monolithc microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography," *Science*, vol. 288, No. 5463, pp. 113-116, 2000.

[6] Y. Hori, R. M. Murray, "A state-space realization approach to set identification of biochemical kinetic parameters," *Proceedings of European Control Conference*, pp. 2280-2285, 2015.

[7] J. A. Shohat and J. D. Tamarkin, *The Problem of Moments*, American Mathemaical Society, 1943.

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　2　件）

① Yuta Sakurai, Yutaka Hori, "Optimization-based synthesis of stochastic biocircuits with statistical specifications," *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 15, No. 138, 20170709, 2018 (査読あり)　doi: 10.1098/rsif.2017.0709

② Yuta Sakurai, Yutaka Hori, "A convex approach to steady state moment analysis for stochastic chemical reactions," *Proc. IEEE 56th Annual Conference on Decision and Control,* pp. 1206-1211, 2018. （査読あり）doi: 10.1109/CDC.2017.8263820

〔学会発表〕（計　6　件）

① 上杉周平，堀豊，ガウス過程状態空間モデルを用いたデータ駆動型の遺伝子回路モデリング，第５回計測自動制御学会制御部門マルチシンポジウム，2018 年 3 月.

② 若命彩香，堀豊，生体分子反応を動的に制御するためのマイクロアクチュエータ，第１回分子ロボティクス年次大会，2018 年 3 月.

③ 堀豊，櫻井裕大，統計的仕様に基づく遺伝子回路のロバスト設計，第60回自動制御連合講演会，2017年11月.

④ 堀豊，遺伝子回路のシステム工学:設計論と構築技術，第4回計測自動制御学会制御部門マルチシンポジウム，2017年3月.

⑤ 櫻井裕大，堀豊，凸最適化による確率的化学反応のモーメント解析，第4回計測自動制御学会制御部門マルチシンポジ

ウム, 2017年3月

⑥ 石川真菜，堀豊，遺伝子回路を動的制御するためのマイクロリアクタの構築, 第4回計測自動制御学会制御部門マルチシンポジウム, 2017年3月.

６．研究組織

(1) 研究代表者

堀　豊（Hori, Yutaka）

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：10778591