

細胞間相互作用のシステムの理解

●上田 泰己 ◆鶴飼 英樹

独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

＜研究の目的と進め方＞

動的で複雑な生命現象を理解することは一般的に難しく、その解明のための手法・研究戦略は発展途上の段階である。特に多細胞生物を多細胞生物たらしめている細胞間相互作用を担う動的で複雑なシステムを体系的・効率的に同定・解析していく手法・研究戦略については、まだ確立されているとは言えない。我々は、動的で複雑な細胞間相互作用の一つである哺乳類の概日時計における細胞間相互作用をモデル系とし、インシロコ・インビボにおいて細胞間相互作用の遺伝子ネットワークを設計・再構成することで、予測されるメカニズムの再構成的証明を行う。これらの解析を通して細胞間相互作用の設計原理を理解するとともに、細胞分化など細胞間相互作用を要とする他の生命現象にも応用可能な研究戦略を提供する。

＜2008年度の研究の当初計画＞

[2008年度までの準備状況]

遺伝子発現のダイナミクスをリアルタイムに測定するために、まず半減期の短い不安定化ルシフェラーゼ (*dLuc*) を開発した。この *dLuc* を概日時計に制御されるプロモーター下で発現させることで遺伝子の概日発現振動をリアルタイムにモニターすることが可能となった。このレポーター系を用いて、細胞間同調に必要な条件をハイスループットに検証するため、288 サンプルの細胞集団の生物発光を同時に測定可能な装置を構築した。細胞間同調をより精緻に観察・測定するためには、概日振動するレポーター遺伝子の発光を一細胞レベルでモニターすることが必要である。そこで高感度冷却 CCD カメラ付顕微鏡システムを用いて、細胞間同調を一細胞レベルで観察可能な実験系の構築を行った。概日時計の細胞間同調を観測するためには、概日振動の位相が異なる細胞間の相互作用を観察することが必要である。そこで、培養細胞集団中の特定の細胞における概日振動の位相を外からコントロールする手法の開発を行った。具体的な手法としては、光受容体を培養細胞に発現させ、培養液の温度に影響を与えない程度の光を照射することで光受容体依存的に培養細胞の概日振動の位相をシフトさせることが可能な系の構築を行った。この系を用い、ある特定のタイミングで光刺激を与えることで、同期振動している細胞集団を、個々の細胞の振動は維持したまま完全に非同同期化した細胞集団へと誘導する事が可能になった。このように、2008年度当初までに細胞間同調を観測するための基盤技術が確立された。

[任意の位相で機能する人工プロモーターの設計手法の開発]

細胞間同調の再構成を達成するためには、同調因子を任意の位相特異的に発現させる技術が必要になる。そこで、2008年度は、哺乳類概日時計に観られる様々な位相での転写出力がどの様に設

計されているのか、その設計原理を明らかにすることによって、任意の位相で機能する人工プロモーターを論理的に細胞内に再構成する系の確立を目指した。

方法としては、まず VP16 タンパクの転写活性化ドメインや Gal4 タンパクの DNA 結合ドメインを利用した人工転写制御因子 (活性化因子、抑制因子) と、それらが結合する人工プロモーターを持つルシフェラーゼ発光レポーターからなる転写回路を設計し、その転写回路を哺乳類培養細胞中に一過性に導入することにより、転写出力のダイナミクスを定量的に測定可能な系を構築する。この系を用い、人工転写制御因子 (活性化因子、抑制因子) を時計遺伝子プロモーターにより様々な位相で発現させた時の下流の人工プロモーターの転写出力を測定する。インシロコでのシミュレーションと、インセルロにおける検証を繰り返す事により、インビボにおける転写出力の設計原理を理解し、任意の位相で同調因子を発現させるための技術を開発する。

[培養細胞の概日時計の位相を制御可能なリガンドの探索]

細胞間同調機構の再構成を達成するためには、概日時計に対して位相変位を誘導可能なリガンドが必要である。そこで概日振動は示すが同調能が無い培養細胞に対し、概日時計の位相変位を誘導可能であると予測されるリガンドを外から添加し、細胞の概日振動の位相に与える影響を解析することによって、培養細胞における概日時計の同調因子として機能可能なリガンドを探索する。

＜2008年度の成果＞

[任意の位相で機能する人工プロモーターの設計手法の開発]

人工転写制御因子 (活性化因子、抑制因子) を同一細胞内で様々な位相で発現させた時の下流の人工プロモーターからの転写出力ダイナミクスを計測した結果、①朝に発現する転写活性化因子と夜に発現する転写抑制因子が、標的プロモーターからの昼の転写出力を再現するのに必要かつ十分な条件であること、②昼に発現する転写活性化因子と朝に発現する抑制因子が、夜の転写出力を再現するための必要十分条件であること、③朝、昼、夜の3つの基本位相の転写制御因子を単純に組み合わせるだけで、明け方、午後、夕方、深夜などの様々な位相の転写出力が生まれること、が判った。この結果は、*in vivo* で観察される時計関連遺伝子の一見連続的な転写出力の創出機構の理解を助け、予測した位相で機能する人工プロモーターを論理的に再構成する設計原理を明らかにした。この成果は国際誌に掲載された (*Nature Cell Biology*, 10, 1154-63 (2008))。この設計・構築技術により、任意の位相で同調因子を発現させるための基盤技術が確立された。

[培養細胞の概日時計の位相を制御可能なリガンドの探索]

マウスの中樞時計組織であるSCN内で発現するリガンドのいくつかは、SCNのスライス培養系に添加することで時計の位相変位を誘導可能な事が明らかにされている。これらのリガンドは細胞膜の受容体に結合し、細胞内のGタンパクの活性化などを介して時計の位相を変位させる。つまり、これらのリガンド(同調因子)を利用して同調機能の無い培養細胞に同調機構を再構成するためには、リガンド(同調因子)、受容体、シグナル伝達系の3者が揃う必要がある。しかしこれらの全て、特にシグナル伝達に関わる分子全てを再構成的に構築する事は容易ではない。そこで我々は同調機構を効率よく再構成可能なリガンド-受容体-シグナル伝達系のセットを予測するために、まず同調機能の無い培養細胞からRNAを抽出し、DNA解析チップ(GeneChip)を用いて培養細胞内で発現している遺伝子を包括的に解析した。その発現パターンから、培養細胞自身は発現していないが培養細胞に対して同調因子として機能しうるリガンドを予測した。このリガンドを概日振動している培養細胞の培養液中に外部より添加した結果、概日時計の位相変位を観察することに成功した。このリガンドを用いることにより、同調機構を再構成することが可能になると考えられる。現在、概日振動している培養細胞に対し様々な位相でこのリガンドを添加し、その位相応答性を詳細に解析している。

<国内外での成果の位置づけ>

細胞間相互作用の再構成研究は世界的にみても未開拓の分野である。既に一細胞レベルでの発光の長期連続モニタリングを行える系も確立しており、この技術を保有する研究室は世界的に見ても少ない。

また、概日時計の同調を観測するためには、異なる位相をもった時計細胞間の相互作用を観察することが必要であり、我々は光刺激を用いて培養細胞の概日振動の位相を外からリアルタイムにコントロールできるシステムを構築し、同期振動している培養細胞を非同期化させることに成功した。この手法は、本課題の遂行の過程で世界で初めて確立した独自技術であり、我々はこの技術と一細胞発光モニターシステムとを組み合わせて用いることが可能であるため、細胞間同調機構の再構成研究を効率よく進めるうえで優れた状況にある。光刺激は、細胞の培養環境に大きな変化を与えずに刺激可能であるとともに、時間的・空間的に分解能が高く定量的な刺激方法であり、今後の定量生物学的解析の発展においても重要な役割を果たすと期待される。実際、この光刺激により概日振動を任意に非同期化させる手法を用いて概日時計のシンギュラリティー現象を解析した成果は、国際誌に掲載され(*Nature Cell Biology*, 9, 1327 - 1334 (2007))、研究代表者の上田は時間生物学会学術奨励賞を授与された。これらは、本成果が国内外で高く評価された事を示している。

さらに本年度は、人工転写制御因子(活性化因子、抑制因子)を用いて、任意の位相で機能する人工プロモーターを論理的に再構成する設計原理を明らかにし、この成果についても査読の厳しい国際誌に掲載された(*Nature Cell Biology*, 10, 1154-63 (2008))。これは、本研究提案のような複雑なシステムを理解する手法としての再構成研究の重要性が、世界的にも認められたことを示している。

この様に、本課題では動的で複雑な細胞間相互作用の一つである哺乳類の概日時計における細胞間相互作用をモデル系として様々な研究戦略を構築・適用してきている。本戦略のこれらの基

盤技術は他の系(例えば分化のような細胞間相互作用が極めて重要な生命現象)に対しても応用可能であり、本課題の成果は国内外の生命科学研究に多大な波及効果を与えらると思われる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>
特に無し。

<今後の課題>

概日時計の細胞間同調を観察するための基盤技術、および実際に細胞間同調機能の無い培養細胞への同調システムの再構成を行うための基盤技術がほぼ整備されてきた。今後は、本年度同定されたリガンドに対する概日時計の性質(位相応答性)を詳細に解析し、この基礎データを基に実際にインシリコ・インビトロにおける同調機構の設計・再構成に着手する。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. '0811252031

Maki Ukai-Tadenuma, Takeya Kasukawa and Hiroki R. Ueda*, "Proof-by-Synthesis of the Transcriptional Logic of Mammalian Circadian Clocks", *Nature Cell Biology*, 10, 1154-1163 (2008)

2. 08012517349

Hideki Ukai, Tetsuya J. Kobayashi Mamoru Nagano, Koh-hei Masumoto Mitsugu Sujino, Takao Kondo, Kazuhiro Yagita, Yasufumi Shigeyoshi and Hiroki R. Ueda* "Melanopsin-dependent photo-perturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks", *Nature Cell Biology*, 9, 1327 - 1334 (2007).

3. 0606051548

Trey K Sato, Rikuhiko G Yamada, Hideki Ukai, Julie E Baggs, Loren J Miraglia, Tetsuya J Kobayashi, David K Welsh, Steve A Kay, Hiroki R Ueda* & John B Hogenesch, "Feedback repression is required for mammalian circadian clock function" *Nature Genetics*, 38, 312-319 (2006).

* : corresponding author

2) データベース/ソフトウェア

特に無し。