

生体における振動メカニズム

●別所 康全

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

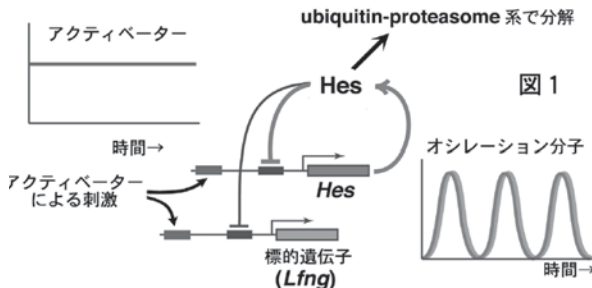
<研究の目的と進め方>

ゲノム情報の解析から、遺伝子・生体分子の相互作用は複雑なネットワークを作っていることが明らかになっている。複雑なネットワークは、振動や波などの「動的な振る舞い」を引き起こす可能性があり、それが発生や神経回路網形成などの複雑な生命現象のキーになっているという理論的な予測がある。しかし、動的な変化の実験的な観測の難しさや、振動など動的変化の理解には計算機シミュレーションなどを使わざるを得ないことなどから、依然として分子レベルでの解明に至った例は無い。

脊椎動物の体節原基では、転写因子 Hes などの遺伝子発現の振動が観察されており、その振動自体が体節の等間隔パターンの形成に必須である。分子振動が形態形成に働くことが証明された初めての例であり、その分子レベルのメカニズムに注目が集まっているが、上述の理由などのためにその全体像は未だ明らかになっていない。我々はマウスの培養細胞においても体節原基でおきているのと同じ周期の Hes の振動が起きることを発見し、さらに Hes のネガティブフィードバックループが、振動メカニズムのコアにあることを明らかにした。これらの実験系を用い数理的な解析を組み合わせることで、生体における分子振動メカニズムの全容を解明したい。さらに、その分子振動を利用して形態形成がおこなわれるメカニズムについて、同様の手法で明らかにすることを旨とする。

<2007年度の研究の当初計画>

体節原基における分子発現の振動は、転写因子 Hes7 のネガティブフィードバックループを中心的なメカニズムとしていることが、これまでの我々の研究で明らかになっている (図1)。我々はこのモデルに基づいてシミュレーションをおこない、安定的に持続する振動を得るためには、Hes7 タンパクが非常に不安定であることが必須の条件であることをコンピュータシミュレーションを使って予測し、それを遺伝子組み換えマウスを作製することによって、実験的に検証した。



本年度の当初計画では、上記のこれまでの研究結果に基づいて、a) 細胞内で分子振動が発生するメカニズム、b) 各細胞の振動が、組織全体で一貫するメカニズム、c) 分子振動が形態形成に利用されるメカニズム、を明らかにすることを目的としてい

る。具体的には以下の5点について研究をすすめることを計画した。

1) 分子振動に伴って周期的に変化する遺伝子発現およびタンパク修飾の探索すること—体節原基では FGF が濃度勾配を形成しており、これが位置情報として分節化の位置を決定している。我々は、分子振動が提供する時間情報と FGF シグナルが持つ位置情報が結びついて、体節の等間隔パターンが形成されると考え、そのメカニズムを明らかにすることを計画した。具体的には、FGF シグナルの下流因子、または FGF シグナルを修飾する分子が体節原基の分子振動に同調して振動することを予想し、発現を解析することによって候補分子を探索した。

2) 振動の周期を規定すると予想している“時間遅れ”の量を変化させ、モデルを検証すること—上記のモデルから、Hes7 プロモーターが活性化されてから転写、翻訳などを経て Hes7 タンパクが自身のプロモーターを抑制するまでの“時間遅れ”が一定以上であると安定した振動が維持されることが予測されている。“時間遅れ”が周期決定に大きく寄与するパラメーターであり、“時間遅れ”を長くすると振動周期が長くなることが予測されたので、我々はマウス個体レベルで、“時間遅れ”の延長をおこない、分子振動の周期を長くすることを計画した。

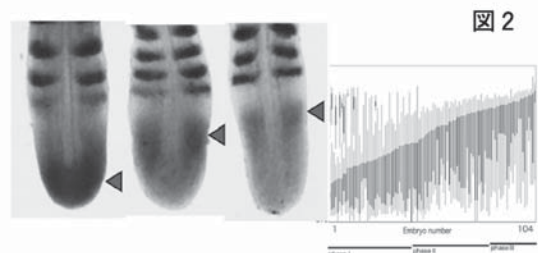
3) 分子振動に影響を与える分子の探索—Hes mRNA の局在や翻訳制御に注目し、Hes mRNA を制御する分子を探索し、その役割を解明する

4) 分子振動を可視化すること?? 振動分子である Lunatic Fringe のプロモーター制御下にレポーターを発現させるトランスジェニックマウスを作製する。

5) 隣接する細胞の分子振動が同調するために使われる細胞間シグナルの検索—同調には Notch シグナルが関与することが示唆されている。我々は Notch 修飾因子を中心に、同調に関わる分子を探索する。

<2007年度の成果>

1) FGF シグナルの下流因子であり、同時に FGF シグナルを抑制する因子の一つである *Sprouty4* の発現が振動していることを発見した (図2)。これまでに *Sprouty4* の発現の振動が、Hes の振動によって制御されていることを明らかにしている。現在、トラ



ンスジェニックマウスを用いて、その役割を解析すると同時に、計算機シミュレーションをおこなうことによってこの分子振動の予測される役割を探索中である。

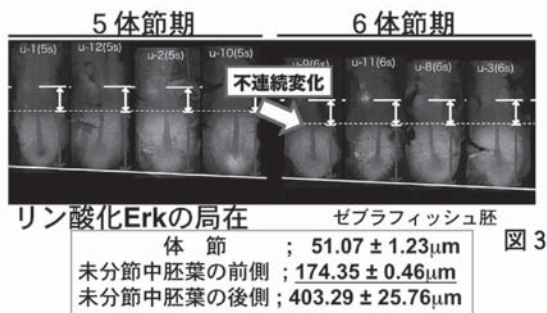


図 3

また、FGF シグナルは分子振動の時間情報に基づいて周期的に制御されていることが予想されたので、FGF シグナルの下流であるリン酸化 Erk の局在を、ゼブラフィッシュにおいて解析した。リン酸化 Erk の局在は時間軸に沿って不連続な変化を示したので (図 3)、FGF シグナルが周期的に制御されていることが示唆された。

2) *Hes7* 遺伝子の 3' -UTR に大きなイントロンを挿入することによって、*Hes7* の転写に要する時間を長くし、“時間遅れ”を延長することを試みる。*Hes7* に約 20kb のイントロンを挿入した ES 細胞得たので個体を作製している。今後、体節の大きさを測定することによって振動周期の変化を解析する。これまでに計算機シミュレーションを行い、振動周期が約 30 分延長することという結果を得ている。

3) *Hes7* mRNA に結合し、転写後調節を行う RNA 結合タンパクを探索した。弱く結合する分子は見つかったが、調節を行うことを示唆するデータは得ていない。

4) 振動分子である *Lunatic Fringe* のプロモーター制御下にレポーターを発現させるトランスジェニックマウスを作製中である。

5) Notch シグナルの抑制因子をコードする *Nrarp* のノックアウトマウスを作製したところ、軸骨格の乱れと椎骨数の減少が観察された (図 3)。このことから Notch シグナルが①振動の同調、②振動周期に関わっていることが考えられるので、今後解析をおこなう。

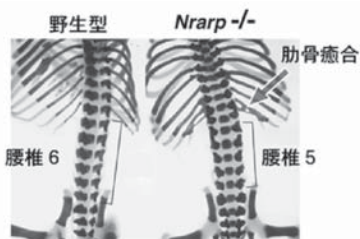


図 4

<国内外での成果の位置づけ>

1970 年代から、体節原基に振動体が存在し、それを利用して体節の等間隔パターンが形成されることが理論生物学的に予測されていたが、実体は不明であった。1997 年にフランスの Pourque らのグループによって体節原基での遺伝子発現の振動が発見され、以後、この振動現象は時空間的パターン形成のモデルとして、分子レベルでさかんに研究されるようになった。申請者らは、分子振動の中心的な分子 *Hes7* を同定し、分子振動のメカニズムを

明らかにし、さらに計算機シミュレーションと遺伝子改変マウスの作製によってそれを検証した。したがって本研究は我々の研究成果の基づく独自のものである。

ゲノム情報の解析から、本研究で扱う現象に関与する分子を網羅的に列挙し、遺伝学的解析によって実際に関与する分子を特定することが可能と考えられる。また個々の分子の相互作用も遺伝学的あるいは生化学的解析で解明可能である。しかし、本研究で扱う生命現象は、多くの分子が関与する動的な現象であるため、個々の分子の静的な相互作用を解析するだけでは解明できないものである。本研究はシミュレーションと実験を相互にフィードバックさせることによって、動的な現象をとらえることを特色とする。この手法は刻々と形態が変化する生物発生などの研究に適していると考えられるが、国内外で類似した研究はほとんどなく、本研究は独創的なものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

予想されていたことであるが、マウスを用いた遺伝子改変実験は長い研究期間を要する。解決策として、ゼブラフィッシュなど他のモデル生物を併用することは有効であると考えられる。今年度までに、ゼブラフィッシュの実験系を立ち上げ、実験環境はほぼ整った。今後これを有効に利用する計画である。

<今後の課題>

現在進行中の実験計画について迅速に研究をすすめる。

本研究はシミュレーションと実験を相互にフィードバックさせることによって、動的な現象をとらえることを特色としているが、本領域の班員である京都大学情報学研究所の石井信教授および奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科の作村論一准教授と共同研究をおこなうことによって、それを達成する。我々がおこなった実験の結果をもとにモデルをたて、それに基づいたシミュレーションをおこなう。シミュレーションは主に石井/作村グループが担当するが、完全な分業ではなく頻りに議論することによってすすめていく。特に作村論一准教授は同じ大学に所属するので緊密な連携は容易に達成できる。

シミュレーションから予想される分子系路や分子機構、遺伝子改変動物の作製などによって我々のグループが実験的に証明する。このステップにおいても、完全な分業ではなく、両グループがよく理解したうえで密な議論をしながらすすめる。これらのステップを繰り返すことによって、情報科学と実験生物学の融合を目指す。

また、分子や活性の時空間的分布を詳細に測定することが、動的な生命現象の解明には必須である。本領域の班員である京都大学医学研究科の中村岳史講師と共同研究を行い、これを達成する。現在、位置情報を規定している FGF シグナルの活性を個体レベルで可視化することによって、時空間的分布を解析することを試みている。

<成果公表リスト>

今年度に関しては該当なし。