

構成的アプローチによる概日振動ネットワークの解明

●松本 顕¹⁾ ◆岩崎 秀雄²⁾

1)九州大学高等教育開発推進センター 2)早稲田大学理工学術院

<研究の目的と進め方>

概日振動はポストゲノム解析で重要となる複数の遺伝子・タンパク質の織りなす「細胞内の分子ネットワーク」を解析する格好のモデルである。この複雑なネットワークの理解には、実験と理論両面からのアプローチが不可欠である。概日特性を成立させる原理の解明には、実際に細胞内に人工ネットワークを再構築して概日特性が見られることを確認できること、および、数理解析によって予想されるパラメータ変化を突然変異の人為導入により再構成振動の変調として誘発できることが必要である。

本研究の目的は、異種細胞で概日振動系を再構成することで『人工時計シミュレーターの遺伝学』を展開し、そこから得られた知見を再びモデル生物での解析にフィードバックすることを通じて、概日振動の安定性・周期決定機構・種を超えた振動機構の理解を推し進めることである。しかし、現在の概日振動の発振モデルには原核生物と真核生物の間で違いがあるため、両者の特徴を踏まえた上で有機的に比較検討しながら研究することが必須となる。

具体的には、シアノバクテリアについては(1)Kai時計タンパク質振動系の大腸菌への「移植」を試みる。また、(2)KaiCのリン酸化振動メカニズム解明の前提となる、リン酸化反応やタンパク質間相互作用の生化学反応定数の定量的な解析により、振動発生に不可欠な非線形過程の探索やシミュレーションを行う。

一方、真核生物では関与因子が膨大であり単純な「移植」や変異によるパラメータチューニングは容易ではない。そこで(3)概日発振モデルの基本的なネットワークを人工的に構成したキメラ遺伝子を用いてショウジョウバエの培養細胞内で再構築する。(4)概日振動がうまく構築できれば、分子遺伝学的に「振動変異株」を作製し、「人工ネットワークと相互作用する細胞内因子の探索」を行うとともに、変異操作に対するネットワークの安定性の評価も試みる。(5)以上のすべての研究過程を通じて、定量的な解析を行い、コンピューターシミュレーションや数理モデルを援用した挙動予測やパラメータ条件の探索を行う。

<2007年度の研究の当初計画>

概日リズムの基本特性の理解を目指し、概日振動系を異種細胞で再構成する。次に、素過程の精密な観測をもとに数理モデルによるシミュレーションを行う。パラメータチューニングによる影響を実際の再構成系で調べ、概日リズム機構の成立条件を探る。

1. シアノバクテリアのKai振動系を大腸菌に遺伝学的に移植し、KaiCリン酸化サイクルの構成を試みる(岩崎)。このため、発現プロモーターやオペロン構造の細かいチューニングを行う。
2. KaiCリン酸化サイクルに関する生化学的パラメータの測定・振動モデルのシミュレーションを行う(岩崎)。In vitroでの素過程の計測は一部終了し、さらに詳細な解析を行いつつある。
3. ショウジョウバエの概日発振モデルの基本構造(たとえば二重フィードバック構造)を時計関連タンパク質ではなく、人工的なキメラタンパク質の組み合わせによってショウジョウ

バエの培養細胞内に再構成し、遺伝子ネットワークの挙動を解析する。キメラ遺伝子発現に関する諸パラメータをコントロールすることで、ネットワーク挙動に関する影響を調べる(松本)

4. 得られた知見をモデル生物での概日リズム解析に還元する。

<2007年度の成果>

(真核生物型の概日振動遺伝子ネットワークの再構成)

昨年に引き続き、再構成された短周期振動に影響を与えるパラメータセットの同定を目指した。培地を高栄養なものに変え、フィードバックループを始動する際にpositive因子の発現誘導を短時間にすると、12時間を越えるような長周期振動が観察されることがわかったが、周期性の発現頻度や観察された周期長には実験間でのバラつきが大きかった。原因の解明には至っていない。

positive因子とnegative因子の挙動を波長の異なるルシフェラーゼを用いて同時モニターできる系を開発した。両者の振動は逆位相になるという予測に反し、ほぼ同位相で観察された。

懸案事項であった、周期分析に関する統計処理手法の導入を本格的に行った。4種の手法を試し、最終的にsmall shuffle surrogates法を導入したが、十分に満足できる結果は得られていない。有意水準の適用などにさらに改良が必要である。

培地へのヘミン添加により、再構成振動と周期の良く似た短周期振動が誘導されることが新たにわかってきた。プロットされた時系列パターンから、再構成振動とは性質の異なる振動と推測しており、両者を客観的に区別する統計手法を開発中である。

この他、ハイスループットな実験系の確立を目指し、96ウェルマイクロプレートリーダーの導入を行った。また、1細胞観察システムについても、現在、実験条件を整えつつある状況である。

(原核生物型の概日振動遺伝子ネットワークの再構成)

昨年度に引き続き、大腸菌へのkai遺伝子群(シアノバクテリアの時計遺伝子群)の移植実験を行った。昨年度までは、kaiAとkaiBCオペロンを、強度は異なるものと同じIPTGで誘導されるlac/trcプロモーターを使用していたが、今回はbad promoterも併用し、kaiAとkaiBCを独立に制御することで、さまざまな発現比での動態を追うことにした。その結果、培養条件(細胞増殖速度)依存的にリン酸化上昇・脱リン酸化促進ダイナミクスが得られており、条件検討によってはリン酸化振動の再構成は可能であると思われるが、実現には至っていない。

いっぽう、時刻情報を遺伝子発現に変換するSasA-RpA系の大腸菌に移植してもKaiCによるリン酸化リレーの変化は今のところ観察できておらず、出力系のデザインに工夫が必要である。ここについては、現在、RpAとヘテロダイマーを形成する別のレスポンスレギュレーターの概日遺伝子発現への関与も調べており、その成果を取り入れたデザインを考えている。以上、リズムを大腸菌内で再構成するにはもうしばらく条件検討が必要な段階ではあるが、リン酸化の一過的な変化などについては興味深い観察結果もあるため、実験の意図・概略・観察結果については、論文にまとめた(Int. J. Bioinf. Res. Appl., 印刷中)。

＜国内外での成果の位置づけ＞

近年、概日時計の分子メカニズムの研究は世界的な規模で進展しており、国内外で最も注目を集める分野のひとつになっている。その中でも、シアノバクテリアを用いた研究は、それまでに提唱されてきた、転写翻訳が必須である（真核生物型）概日振動発振機構のドグマを覆し、タンパク質間相互作用により概日振動が形成されるという新規概念を導入した点においても最も注目される分野である。この中で、分担者の岩崎の研究はさらに最先端のものであり、国内外の評価は極めて高い。

一方で、真核生物を用いた概日時計研究は、ゲノムワイドな網羅的時計遺伝子検索が一段落した数年前より爛熟期に入っており、本質的な発展が停滞している。この中で、再構成的に振動の成立原理を探る方向性は新規なものといえる。Synthetic Biology 分野の隆盛に伴い、大腸菌などを用いた遺伝子および細胞間ネットワークの構築について、近年報告される論文数が増えているが、本研究のように構成要素そのものを高度にキメラ化して人工的に作出し、各種パラメータを人為的にコントロールするという試みはない。また、真核細胞での振動の再構成例は本研究が初めてである。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

（真核生物型の概日振動遺伝子ネットワークの再構成）

1. 培養細胞レベルで得られた再構成実験の成果を、実際の生物での概日リズム研究に生かすという最終目標には、いまだ全く到達できていない。
2. 概日振動と呼べる範疇の長周期振動は、稀に観察されたものの、高頻度に再現性よく再構成するには至っていない。また、観察された短周期振動が、温度補償性を備えていることを示唆する結果は得られているが、そのメカニズムは全く解明できなかった。
3. 得られた短周期振動に対して決定的な影響を与えるパラメータセットを見つけることはまだできていない。逆に、実験開始時における positive 因子の一過的な発現誘導が強すぎるとかえって振動形成を阻害することを見出したが、理論的な原因解明には至らなかった。
4. 新規周期解析手法を導入して、データの統計的解析を試みたが、見た目と合わない周期成分が検出される場合などが多く、統計手法の適用（特に有意水準の設定）にはさらに検討を要する。
5. 1細胞レベルでの振動観察は、機材の調達、実験手法の習熟などに手間取り、実験条件を十分に整えることができなかった。
6. ハイスループットな実験系として、96 ウェルマイクロプレートリーダーによる観察を試みたが、長期観察条件を整えることが出来なかった。これまでの実験系に比べて1ウェルあたりの細胞数が少なく、ルシフェラーゼの発光が弱いこと、1ウェルあたりの培地量が極めて少なく、蒸発・劣化が激しいことが原因と考えられる。
7. 実験に使用しているヘミン溶液の添加によって、これまでに報告されていない短周期振動がショウジョウバエ培養細胞に誘導されることがわかった。本研究で目指している再構成振動とは振動パターンが異なり、新規の振動現象として興味深くはあるが、統計的な手法で両者を明瞭に区別することが極めて難しく、新たな統計手法の導入、あるいはヘミン添加に変わる実験系の開発が必要である。

（原核生物型の概日振動遺伝子ネットワークの再構成）

8. *in vitro* では比較的容易に再構成される Kai 蛋白質振動系が、大腸菌内ではまだ再構成できていない。
9. 手持ちの抗 KaiC 抗体では、大腸菌抽出液で KaiC のバンドの近傍に強い非特異的シグナルを検出してしまいうため、解析が困難なことが多かった。そこで、FLAG エピトープを付加し

たコンストラクトを作り直し、実験をやり直している。

10. *in vitro* では KaiC のリン酸化状態依存的な SasA-RpaA のリン酸化リレーが観察されているが、大腸菌内ではその変化があまり検出できないため、大腸菌内での KaiC からの遺伝子発現への出力は実現できていない。

＜今後の課題＞

（真核生物型の概日振動遺伝子ネットワークの再構成）

上記7に記載したとおり、ヘミン溶液の添加によって、これまでに報告されていない短周期振動がショウジョウバエ培養細胞に誘導されることがわかった。これと再構成振動とを客観的に区別できる統計手法の導入・適用は、上記4とも相まって、今後の必須課題である。これらをクリアした上で、周期性発現に最適な、あるいは、周期に大きな影響を与えるパラメータセットの同定とそれを利用した概日振動の再構成を目指すことが最重要な課題である。また、1細胞内での素過程観察系の確立も課題として残っている。

（原核生物型の概日振動遺伝子ネットワークの再構成）

上記8に記したように、Kai の振動系の大腸菌内での再構成には成功していない。これは、大腸菌内の環境が、*in vitro* に比べて perturbation が多いことや、シアノバクテリアとは異なるリン酸化制御環境にあることに起因している可能性がある。逆に、その原因を明らかにすることは、シアノバクテリアにおける時計機構を解明する糸口になる可能性があると思われる。KaiC からの出力経路については、再構成以前にまだ未解明の重要経路がわかっていない可能性が高い。そこで、出力部分については RpaA の制御機構など、当面シアノバクテリアでの解析を深めていくほうが、将来的な大腸菌での再構成に向けて近道である、と考えている。

＜成果公表リスト＞

1) 論文/プロシーディング（査読付きのものに限る）

1. 0708021849
Matsumoto, A., Ukai-Tadenuma, M., Yamada, R.G., Houl, J., Uno, K.D., Kasukawa, T., Dauwalder, B., Itoh, T.Q., Takahashi, K., Ueda, R., Hardin, P.E., Tanimura, T. and Ueda, H.R.: A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Gene Dev.* 21: 1687-1700 (2007).
 2. 0801232129
Tozaki, H., Kobe, T., Aihara, K. and Iwasaki, H.: An attempt to reveal a role of a transcription/translation feedback loop in the cyanobacterial KaiC protein-based circadian system by using a semi-synthetic method. *Int. J. Bioinf. Res. Appl.*(2008) in press.
 3. 0801232116
Seki, A., Hanaoka, M., Akimoto, Y., Masuda, S., Iwasaki, H. and Tanaka, K.: Induction of a group 2 sigma factor, RpoD3, by high light and the underlying mechanism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Biol. Chem.* 282: 36887-36894 (2007).
- 2) データベース/ソフトウェア
なし
- 班員間での共同研究等
- ・ Kai 振動系についての数理モデル解析（岩崎—望月敦史）
 - ・ ショウジョウバエ時計遺伝子解析（松本—上田泰己、上田龍）
 - ・ 同上（松本—程肇、上田龍）