

# 視交叉上核由来細胞を用いた哺乳類概日リズム発振システムのシミュレーション

●程 肇

三菱化学生命科学研究所

## <研究の目的と進め方>

哺乳類の遺伝的に決定された内在性の概日時計の本体は、脳視交叉上核(SCN)にある。網膜より入力した光情報が、SCNに達しその概日リズム位相を光サイクルに同調させる。SCNの自律的な概日リズム発振は、他の末梢組織の概日リズムを支配する。この階層構造は細胞レベルでも維持され、一つの視交叉上核細胞内でも特異的な分子ネットワークが共役して機能することにより、連続的な振動を形成できる。概日リズムを形成する分子ネットワークは多重フィードバックループであるとされ、この基本構造のシステムの理解には、個々の時計分子を同定する実験的手法に加えて、攪乱に対する概日リズムの振る舞いからモデルを構築するトップダウンの方法論も必要である。即ち、時計中枢細胞の培養系と、そのリズム位相を細胞レベルで特定する方法や、最先端の数理科学分野の解析技術に基づくモデル化とシミュレーションが必要である。程は *Per1::luc* 導入動物より SCN 由来細胞を樹立して、リズム位相を時間分解能が高い発光モニタリングにより計測する系を確立した。そして、各種化合物あるいは siRNA で、この細胞の自律的な発振システムに攪乱を誘導した時のルシフェラーゼ発現リズムの位相、周期、振幅、同調性が示す反応性及び DNA チップ等で細胞内転写ネットワークに与える変化を測定した。本研究では、プロテオームやメタボロームなどの手法を用いて、先行研究をさらに発展させることで、発振および位相同調に必要な分子反応経路を明らかにすることを目的とする。これらの結果をまとめた統合的なデータベースから、概日リズム形成の分子ネットワークを推定する。さらにシミュレーションにより時計分子を抽出して、*in vivo* の機能の実験的同定を試みる。

## <2008 年度の研究の当初計画>

1. 時刻依存的な化合物刺激により位相をシフトさせた時に特異的に誘導される遺伝子のプロモータ解析
2. *Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞で時計遺伝子産物 mRNA、タンパク質が示す動的反応性の解析
3. 概日リズム同調機構の分子ネットワークモデルの作製及びシミュレーション
4. SCN 由来細胞で概日リズム発現を示す遺伝子に対する siRNA 発現ライブラリの構築

## <2008 年度の成果>

1. 時刻依存的な化合物刺激により位相をシフトさせた時に特異的に誘導される遺伝子のプロモータ解析  
SCN 由来細胞の mRNA、タンパク質、代謝物質が示す動的反

応性を包括的に解析した。特に *Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞を用いて、トランスクリプトーム解析を行い見出した概日発現振動遺伝子の機能は、細胞複製、遺伝子転写、生体物質代謝、アポトーシス等細胞活動の多岐にわたっていた。一方、化合物刺激による位相前進や後退時に特異的発現変動を示す遺伝子を抽出して、二つの結果を統合したデータベースを構築した。この中に含まれる全遺伝子 78 個について、概日リズム形成のコアフィードバックループにより支配されている遺伝子は、ロバストな振動 (48 個) と迅速な位相変化 (48 個) という特性を保持しているという仮定に基づき階層的クラスタリングを実施した。明期性の振動を示す二つのクラスターに含まれる遺伝子のプロモータ構造には CRE 及び E box が高い頻度で存在した。この結果は明期性の振動の維持と迅速な位相シフトにはこの二つのシスエレメントが機能していることを示す。さらに、化合物刺激による位相前進や後退時に特異的発現変動を示す遺伝子やタンパク質についてもトランスクリプトーム及びプロテオーム法により検索した。これらの解析により抽出した遺伝子やタンパク質の機能を、対応する siRNA や cDNA 強制発現により細胞レベルで明らかにしつつある。これら得られた結果に基づき哺乳類概日時計中枢細胞におけるリズムのロバストネスに寄与する新たな暗期性の転写フィードバックループを予測した。実際このループに含まれる 2 つの遺伝子の変異体を用いた行動解析を行ったところ、行動リズム異常という表現型が得られた。

## 2. *Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞で時計遺伝子産物 mRNA、タンパク質が示す動的反応性の解析

次に位相後退時に特異的に誘導される遺伝子群の中で SNARE 複合体に含まれる一因子を支配する *Snap25* に着目した。実際この遺伝子の変異体について調べたところ、細胞の振動体間同調異常に起因すると考えられる行動リズムの異常を示した。

## 3. 概日リズム同調機構の分子ネットワークモデルの作製及びシミュレーション

得られた結果に基づき哺乳類概日時計中枢細胞におけるリズムのロバストネスに寄与する新たな暗期性の転写フィードバックループと、細胞間同調に関する経路が予測できた。このフィードバックループと細胞間同調機構を含む概日転写リズム形成のネットワークをそれぞれモデル化した。現在このモデルに含まれる、それぞれの細胞内パラメータ (mRNA、タンパク質濃度、それぞれの合成及び分解速度) を測定して用いた詳細なシミュレーションを実施している。

### <国内外での成果の位置づけ>

概日リズムの形成には階層性が存在し、それぞれが複雑な分子ネットワークを構成しているにもかかわらず、それらを網羅的に解析する研究はまだ端緒にいたばかりである。高等生物のゲノムの塩基配列が次々に明らかにされた結果、次世代の生物学研究の焦点は遺伝子の網羅的な機能解析である。実際、国内外では国家レベルでマウスの変異誘発による大量変異体作製プロジェクトが開始されている。そして、いずれにおいても概日時計遺伝子の検索はその主要な標的となっている。本研究で提案している *Per1::luc* 導入細胞を用いた概日時計遺伝子検索法は、一次検索を細胞レベルで行うため、上述の個体レベルでの探索に比べて飛躍的に効率的である。また、通常経時的に組織を採取して行われる DNA chip 法、プロテオーム法、メタボローム法は、侵襲的に組織を採集して RNA を抽出することを前提としているため、手法の制約に起因する時間的及び空間的分解能に大きな限界がある。一方、本研究では、均一な細胞集団に対する連続的な遺伝子発現モニタリング法を用いるため、多数の転写産物、翻訳産物、そして低分子代謝物質のプロファイリングデータを、高い時間分解能で得ることができる。また、得られた時計遺伝子候補に対して RNA 干渉法や強制発現法を適用して、外部環境を急激に変化させた時の転写様式の動的特性を解析することにより、高精度な機能データの集積が可能となる。その結果、精密な概日時計中枢細胞及び末梢組織細胞で機能する概日リズム形成分子ネットワークを再構成することができる。そして、高精度な遺伝子機能及び遺伝子発現プロファイリング技術と情報科学におけるモデル化手法を融合することにより、生物科学においても定量的数理モデル構築が可能なることを、概日リズムを対象にして示すものである。実際本年度得られた結果に基づき哺乳類概日時計中枢細胞におけるリズムのロバストネスに寄与する新たなフィードバックループを予測した。さらに、このフィードバックループを構成する遺伝子変異体は、行動リズムの異常を示した。また、ほとんど解析に手がつけられていない細胞のリズム同調で誘導される一つの遺伝子の変異体も、行動リズム同調に顕著な欠損が認められた。これらの結果は、網羅的な解析により抽出された遺伝子が、実際に行動リズム形成システムにおいて重要な機能を有していることを示している。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本年度の計画の中では、特に、4. SCN 由来細胞で概日リズム発現を示す遺伝子に対する siRNA 発現ライブラリの構築の達成が不十分であった。これは、転写ネットワークや動物個体の行動リズム解析について重点的に実施した反面、siRNA を用いた細胞レベルでの解析にまで到達できなかったことが大きな原因である。いずれにしろ次年度はこれらの計画を実施して完了することを目指す。

### <今後の課題>

できるだけ多数の予測された概日リズム形成の中心的役割を担う遺伝子の機能欠損型変異体を作製準備する。すなわち、構築された哺乳類概日リズム形成の分子ネットワークモデル及びその数値シミュレーションの結果から、概日リズム形成の中心的役割を担うと遺伝子を抽出して、それらの機能欠損型及び機能亢進型変異体を作製する。これらの変異体について、電気生理学的解析や行動などの生理学的解析を行い、細胞レベル及び個体レベルでの

遺伝子機能を解明する。特に、これらの変異体の輪回し活動リズム、体温リズム、視交叉上核の神経活動リズム、視交叉上核および末梢組織での *Per* 遺伝子群発現リズムの周期および振幅への影響を調べる。さらに、これらの変異体の新しい光周期条件への光同調機構を明らかにする。

### <成果公表リスト>

#### 1) 論文

#### 1. 0901161450

Hiler, DJ., Bhattacharjee, A., Yamazaki, S., Tei, H, Geusz, ME.

Circadian mPer1 gene expression in mesencephalic trigeminal nucleus cultures.

Brain Res. 1214, 84-93 (2008).

#### 2. 0901161503

Ohta, H., Xu, S., Moriya, T., Iigo, M., Watanabe, T., Nakahata, N., Chisaka, H., Hanita, T., Matsuda, T., Ohura, T., Kimura, Y., Yaegashi, N., Tsuchiya, S., Tei, H., Okamura, K. Maternal feeding controls fetal biological clock.

PLoS ONE. 3, e2601 (2008).