

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（2005-2008年度）

金沢大学理工研究域自然システム学系（2009年度）

<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(Suprachiasmatic Nucleus; 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。入力-振動-出力という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、この複雑なネットワークの基本構造のシステムの理解のためには、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、最先端の数理工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を用いて、転写ネットワークダイナミクスの解明を試みる。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。このために、まずシミュレーションと実験的手法を融合させた研究の有効性を検討するために、哺乳類の時計遺伝子 *Period1* (*Per1*) と *Period2* (*Per2*) の転写リズム位相差形成機構に着目した。実際に細胞の中で見られる様々な位相を有する遺伝子の転写リズムの制御を、数理工学的ならびに分子生物学的に実証することを目的とする。

<研究開始時の研究計画>

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

位相の前進及び後退時特異的に誘導される遺伝子群のプロモータに共通なモチーフを同定する。すなわち誘導遺伝子群プロモータ中に有意に濃縮している転写因子結合配列を抽出する。次にゲルシフト法及びレポータアッセイにより、誘導遺伝子群の制御に関わる転写因子を決定する。並行して位相シフト時特異的誘導遺伝子群の経時的発現の相関関係に基づき、遺伝子間の制御関係を推定する。

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

転写リズムを示す遺伝子群が、化合物による摂動直後から遷移過程を経て次の定常状態まで収束していく様々な時間的ずれを含む転写応答データを、DNA chip 法により取得する。そして、クラスタリングによりその収束パターンを関係づけ、それぞれのクラスターに含まれる遺伝子の機能の共通性、ならびにプロモータ構造の共通性を、生物情報学的手法を用いて抽出する。

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

Per1 発現リズム位相の前進及び後退時における遺伝子間ネットワークモデルを作成する。具体的には対象とする各遺伝子の発現値をパラメータに用いた、微分方程式に基づく数理モデルを構築する。この数理モデルを用いたシミュレーションにより、位相同調に主要な機能をもつ遺伝子を推定する。

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

推定された遺伝子について、それぞれ対応する siRNA 発現ライブラリを構築する。それを用いて、それぞれの遺伝子が概日リズムの周期形成、位相同調にはたす機能 t について詳細に調べる。

5. *Per1* と *Per2* の転写リズム位相差形成機構の解析

時計遺伝子 *Per1* と *Per2* は、ともに Clock-Bmal1 複合体によって転写が活性化され、Cry 分子によって抑制されるという共通の転写制御機構が知られている。しかし、その転写リズムには 4-6 時間の位相差がみられる (*Per1* の方が *Per2* に先行して転写ピークを迎える)。この転写リズム位相差を維持すると考えられるパラメータを出来る限り実験的に取得する。このパラメータの位相差形成に及ぼす影響を先に作った転写リズムの数理モデルで解析する。さらに、新たな制御機構を推定する。この解析により現在見だされている少数の転写制御機構を用いて、細胞内で観察される多様な転写リズム位相差を形成する機構のモデルを提案することができると思われる。

<研究期間の成果>

1. 転写フィードバックループの数理学的特徴の解析

本研究では、概日リズムを形成する多様な分子の複雑な相互作用による分子ネットワークを明らかにする為に、概日時計細胞の概日リズムが各種試薬や siRNA に対する攪乱に対して示す反応性の網羅的な測定を進める。方法論としては、均一な SCN 由来細胞集団を用いた精度の高い概日リズム測定系の確立、及び高度

なシミュレーション技術の適用がその前提となる。この細胞では100余の遺伝子に転写リズムが見られた。この結果は、*Per1::luc* 導入 SCN 由来細胞への各種試薬や siRNA の投与実験により、この細胞が示す自律的な概日リズムに分子的攪乱を誘導でき、その動的特性をルシフェラーゼ発現リズムや、転写ネットワークの定量により正確に測定できることを示す。まず共同研究者である黒澤の初期の研究により、異なる仮定に基づく数理モデルについて、振動が起きるための数理条件を平衡状態の安定性解析により調べた。タンパク質の自己転写抑制とタンパク質の核移行における非線形性の強さ（協同性）、複数の時計遺伝子産物のヘテロダイマー形成が、それぞれ安定な振動へ及ぼす寄与を定量的に明らかにした。ついで、フィードバックループを順方向にたどる反応ステップ（インループ反応）については、未飽和であるほどリズムを形成しやすく、ループの枝にある反応ステップ（ブランチ反応）については逆に飽和状態に近いほどリズムを作りやすいことを発見した。他の文献での推定値と比較でもこの発見を確認できた。一般的に、この結果は遺伝子タンパク質ネットワークの中の反応の位置によってシステムの挙動に対する影響が正反対になるということを示唆している。本研究では両者の革新的な先端技術を融合することで、概日リズム形成の分子ネットワークについてモデル化する。構築された分子モデルの中から、数値シミュレーションにより中心的役割を担う分子を抽出し、これらの分子について、in vivo での機能の実験的同定を試みた。

2. SCN由来細胞のmRNA、タンパク質、代謝物質細胞内レベルが示す周期的振動の網羅的解析

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。一方、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、暗期性の振動を示す三つのクラスターの内、一つのクラスターの遺伝子のプロモータには高い頻度で RORE と新規配列が存在していた。現在この配列及び転写因子の概日リズム形成における機能について解析を進めている。そして、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。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網羅的に明らかにしつつある。そして、現在得られた時計遺伝子候補のノックダウンマウスは siRNA 発現ベクターを用いて作製している。

3. 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、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網羅的に明らかにしつつある。特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。

4. 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。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た。

5. *Per1*と*Per2*の転写リズム位相差形成機構の解析

そしてラット視交叉上核由来細胞株を用いて各時計遺伝子 mRNA の発現量時系列を定量し、得られた位相と発現量を同時に再現しうる制御機構の推定を行った。数理モデルを用いたシミュレーション解析の結果、*Per2* mRNA の分解速度がより遅い場合に位相遅れが生じるが、その場合同時に *Per2* の発現量も増加するため、この細胞の *Per1* と *Per2* mRNA が示す発現レベルと位相差を同時に再現することはできなかった。そこで、*Per1* のネガティブフィードバック制御、もしくは *Per2* のポジティブフィードバック制御という、新たな転写制御機構を仮定してシミュレーションを行った。その結果、導入した二つの仮説はいずれも *Per1* と *Per2* の発現位相差を生じさせることがわかった。実際、*Per1* と *Per2* のプロモータ領域をホタルルシフェラーゼにつないだレポーター遺伝子を用いて、各種時計タンパク質によるプロモータ制御強度を測定したところ、*Per2* プロモータは、PER タンパク質により強く発現が誘導される一方、自律的な抑制を受けないことが明らかとなった。従って、*Per1* と *Per2* の発現位相差の生成には、*Per2* のポジティブフィードバック制御が必要であると考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

真核生物の概日リズムは転写 - 翻訳系を中心とした多様な分子の複雑な相互作用による多重フィードバックループが共役して機能し、いわゆる非線形的リミットサイクル振動の性質をもつ。そして、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すぎないばかりである。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。さらに今回ともに共通の転写活性化と抑制機構により制御されていると考えられる、*Per1* と *Per2* の発現リズムに位相差が見られることを、数理科学的にかつ実験生物学的に実証できたことは、双方の融合研究が複雑な生命現象の理解に有効であることを示した。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

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、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することを最終目的としていた。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。そして変異体について、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予定であった。しかし、初期の解析で予測された少数の興味深い遺伝子の変異体の行動リズム解析など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。

<今後の課題、展望>

生命システムは環境変化に対して、こわれない頑丈さと、必要な応答をするしなやかさの両性質を示す。本研究では、定常状態及び遷移状態におけるトランスクリプトーム解析を実施した。その結果双方ともに有効であることがわかった。さらに、SCN 由来細胞を用いた時刻依存的誘導遺伝子のプロモータ解析で、摂動に対する転写ネットワークダイナミクスを明らかにすれば、概日振動の環境応答体制の制御予測法が確立できることが考えられた。今後はさらなる遷移状態の観測から、生命システムの構造の

全体像を捉える方法論を発展させたい、そして、生物学・情報科学的方法論を有機的に組み合わせた研究を提案する。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。そして、同調に中心的機能を果たす転写機構の同定により、概日リズム睡眠障害に対する治療につなげる。

<研究期間の全成果公表リスト>

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).

3. 0601301607

Numano, R., Yamazaki, S., Umeda, N., Samura, T., Sujino, M., Takahashi, R., Ueda, M., Mori, A., Yamada, K., Sakaki, Y., Inouye, S., Menaker, M., Tei, H., Constitutive Expression of the Period1 Gene Impairs Behavioral and Molecular Circadian Rhythms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 3716-3721 (2006).

4. 0702131604

Kojima, S., Matsumoto, K., Hirose, M., Shimada, M., Nagano, M., Shigeyoshi, Y., Hoshino, S., Green, C.B., Sakaki, Y., Tei, H., LARK activates post-transcriptional expression of an essential mammalian clock protein, PERIOD1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104,1859-1864 (2007)

5. 0702131617

Kawaguchi, S., Shinozaki, A., Obinata, M., Saigo, K., Sakaki, Y., Tei, H., Establishment of cell lines derived from the rat suprachiasmatic nucleus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 355, 555-561 (2007).

6. 0601301601

Lundkvist, GB., Kwak, Y., Davis, EK., Tei, H., Block GD. A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons. J.Neurosci. 25, 7682-7686 (2005).