

「生命システムの動作原理と基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

影山 龍一郎

(京都大学ウイルス研究所 所長)

「短周期遺伝子発現リズムの動作原理」

1. 研究実施の概要

細胞の増殖や分化過程では、多くの遺伝子群が正しいタイミングで機能するが、このタイミングを制御する生物時計の実体はよくわかっていない。最近、我々は bHLH 型転写因子 Hes1 や Hes7 が 2 時間を刻む生物時計として働くこと、特に Hes7 は 2 時間周期で進行する分節過程を制御する分節時計の本体であることを明らかにした。さらに、マイクロアレー解析から、いろいろな細胞において多くの遺伝子の発現が 2 時間周期で増減を繰り返すことがわかってきた。これらの結果から、2 時間という短周期発現リズムは普遍的な現象であることが強く示唆された。しかし、Hes1 や Hes7 による 2 時間時計の詳細な分子機構はよくわかっていない。さらに、分節過程以外での短周期発現リズムの意義はまったく不明である。本研究では、

① Hes1/Hes7 時計の数理モデルの構築と検証による全体像の理解、

② Hes とともにオシレーションを示す分子の機能解析

を行い、短周期リズムを刻む遺伝子動態の分子基盤と意義を明らかにする。

2. 研究実施内容

Hes1 オシレーションに関わる因子の探索のため、マウス線維芽細胞から血清刺激後 30 分毎に合計 4 時間にわたって RNA を調製した。これらの RNA に対して、血清刺激前に調製した RNA との発現量の変化を見るためにマイクロアレー解析を行った。その結果、2 時間周期で発現変動（オシレーション）すると思われる候補遺伝子が複数存在することがわかった。その内、Hes1 と同じ位相でオシレーションする候補遺伝子が数種類、Hes1 より 30 分遅い位相でオシレーションする候補遺伝子が 1 種類、Hes1 より 60 分遅い位相でオシレーションする候補遺伝子が 1 種類あった。

次に、Hes7 オシレーションに関わる因子の探索のため、Hes7 ノックアウトマウス、Hes7 強制発現マウスおよび野生型マウスから RNA を調製し、マイクロアレー解析を行った。その結果、Hes7 と同じ位相でオシレーションする候補遺伝子が 1 種類見つかった。

さらにノザン解析を行ったところ、マイクロアレー解析によって同定された候補遺伝子の内、

Hes1 と同じ位相でオシレーションするものが 1 種類、Hes1 より 30 分遅い位相でオシレーションする遺伝子が 1 種類、さらに Hes1 より 60 分遅い位相でオシレーションする遺伝子が 1 種類確認できた。また、上記の内、2 種類については蛋白レベルでもオシレーションすることがわかった。この中で、Hes1 と同じ位相で発現オシレーションするものは、Stat シグナル系分子であった。また、未分節中胚葉のマイクロアレー解析で同定された遺伝子について in situ hybridization を行ったところ、Hes7 とは逆の位相でオシレーションすることがわかった。

2 時間周期の発現変動が確認できた上記の遺伝子の中で 2 種類について強制発現および機能阻害実験を行った。その結果、Stat シグナル系分子は Hes1 オシレーションを制御することがわかった。Stat シグナル系分子がオシレーションしないと、Hes1 の発現もオシレーションしなくなった。現在、その詳細な分子機構をしらべているところである。

一方、2 時間周期で発現変動する遺伝子の Hes 欠損細胞における発現解析を行ったところ、未分節中胚葉で発現オシレーションする新規遺伝子が Hes7 ノックアウトマウスではオシレーションしなくなることがわかった。すなわち、この遺伝子の発現オシレーションは Hes7 の発現オシレーションに依存することが明らかになった。現在、この遺伝子の機能を解析中である。

上記の実験結果をもとに、数理モデルの構築を行った。本数理モデルにおいて、Hes1 タンパクの半減期が p-Stat3 タンパクの量によって変化するとして発現量の時間変化を計算した。この半減期の変化は、Hes1 タンパクの安定性が p-Stat3 タンパクの量により変化することから推測したものである。数値計算を行うことにより、p-Stat3 タンパクの発現量の振動が Hes1 タンパクの発現量の時間的な振動を生み出していることが明らかになった(図1)。

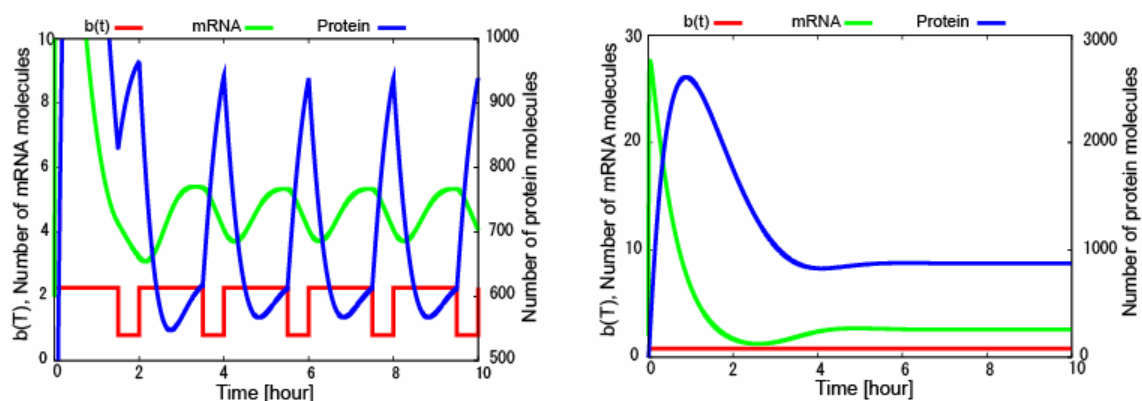


図 1: Hes1 タンパクの発現振動に関する数理モデルの計算結果。p-Stat3 タンパクの発現量(赤線)が周期的に変化することにより、Hes1 タンパクの発現量も周期的に振動する(左図)。p-Stat3 タンパクの発現量が一定であると仮定すると振動は見られない(右図)。

3. 研究実施体制

(1)「影山」グループ

①研究分担グループ長:影山 龍一郎(京都大学 教授)

②研究項目

- ・短周期遺伝子発現リズムの動作原理

(2)「吉川」グループ

①研究分担グループ長:吉川 研一(京都大学大学院 教授)

②研究項目

- ・短周期遺伝子発現リズムの数理モデル構築