

「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や分節過程以外での短周期発現リズムの意義はよくわかっていなかった。本年度は、影山グループは

- ① 分節過程における Hes7 を中心としたオシレーションネットワーク、
- ② 神経幹細胞における Hes1 を中心としたオシレーションネットワーク

の解析を行った。数理モデルにおいて、発現からネガティブフィードバックに至るまで時間の遅れが十分あることが、Hes7 の発現オシレーションの継続に重要であると予測されたが、イントロン・スプライシングがネガティブフィードバックの時間遅れを引き起こす大きな要因であることを見出した。また、神経幹細胞において、Hes1 だけでなく、プロニューラル遺伝子 Neurogenin2 および Notch リガンド Deltalike1 の発現もオシレーションすること、このオシレーションネットワークが神経幹細胞の維持に重要であることを明らかにした。一方、吉川グループは、影山グループにより収集された実験データを元に、短周期遺伝子発現リズムの数理モデルの構築を目指して研究を行った。提案するモデルは、単に現象を再現するだけでなく、本質を捕らえることができ、実験を予測可能であるようなものを目指した。今年度は、興奮性をもつ細胞集団における自発振動を発生する数理モデルを提案した。従来の結合振動子の同調による発振という仕組みとは異なるシナリオを考案した。細胞集団の個体は振動性を持たない場合でも、空間不均一性と activator による結合により発振が出現し、それを基に、多様な時空間パターンが生成することを数値計算により明らかにした。今後は、このモデルを影山グループにフィードバックさせ、実験と理論の連携によ

って、短周期遺伝子発現リズム、更に発生初期の形態形成の新しいモデルの構築を目指す。

## 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

### 影山グループ

#### ①分節過程における Hes7 を中心としたオシレーションネットワーク

今までに、分節過程において、Hes7 がネガティブフィードバックを介して発現オシレーションすることを明らかにし、この結果をもとに数理モデルを提唱した。この数理モデルから、Hes7 の遺伝子産物が十分に不安定であること、さらに Hes7 の発現からネガティブフィードバックに至るまで十分な時間の遅れがあることが、Hes7 の発現オシレーションの継続に重要であると予測された。このうち、Hes7 遺伝子産物の不安定性に関しては、既に Hes7 蛋白が少し安定になるような点変異を導入したマウスを作製し、Hes7 の発現オシレーションが継続しなくなることを報告した。さらに、Hes7 蛋白の不安定性と転写抑制活性は密接にリンクしていることがわかった[文献 4]。また本年は、もう一つの予測、すなわち Hes7 の発現からネガティブフィードバックに至るまでの時間の遅れを短くすると Hes7 の発現オシレーションにどのような影響があるのかについて検証実験を始めた。時間の遅れを引き起こす要因を明らかにするために、Hes7 遺伝子全長をもつ不安定化ルシフェラーゼ・レポーター(pHes7-luc-full)およびこのレポーターからすべてのイントロンを取り除いたレポーター(pHes7-luc-intronless)を作り、それぞれのレポーターを持つトランスジェニックマウスを作製した。その結果、pHes7-luc-full に比べて pHes7-luc-intronless からのルシフェラーゼの発現の方が約 19 分早くなることがわかった。時間遅れが 19 分短くなると、数理モデルからは Hes7 の発現オシレーションが起こらなくなることが予想されたので、Hes7 遺伝子のイントロンレスマウスを作製した。今後、このマウスの解析を進めていく予定である。

#### ②神経前駆細胞における Hes1 を中心としたオシレーションネットワーク

Hes1 の発現をリアルタイムで可視化するシステムを用いて神経前駆細胞における Hes1 の発現動態を解析したところ、ノザンやウェスタン法では一定レベルで持続発現しているように見える条件下でも、シングルセルレベルではダイナミックに発現オシレーションすることがわかった[文献 1]。Hes1 の標的遺伝子群を網羅的に探索し発現動態を解析したところ、プロニューラル遺伝子 Neurogenin2 (Ngn2)や Notch リガンド Deltalike1 (Dll1)の発現も神経前駆細胞でオシレーションすることが明らかになった。しかし、Hes1 の発現が無くなってニューロンに分化途中の細胞では、ほぼ一定レベルで発現が持続していた(図 1)[文献 1]。さらに、この発現オシレーションは、神経前駆細胞の維持に重要な役割を担うことが明らかになった[文献 1]。

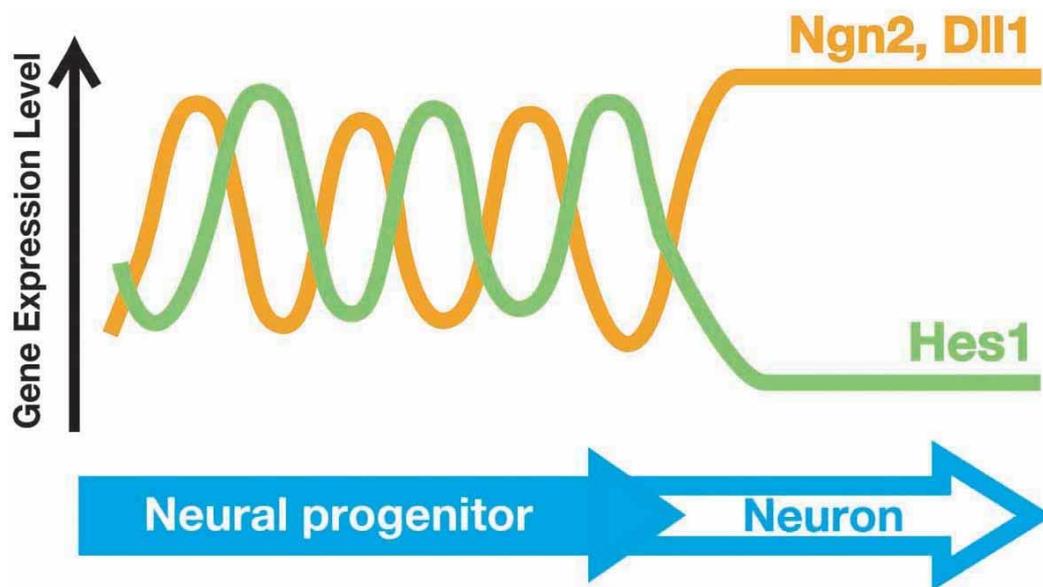


図1:神経幹細胞と分化途中のニューロンにおける Hes1, Ngn2, Dll1 の発現動態

また、脈絡叢形成における Hes1 の役割を明らかにし[文献 2]、さらに、成体脳におけるニューロン新生と神経幹細胞維持の重要性を明らかにした[文献 3]。成体脳の神経幹細胞の維持にも Hes1 が重要な役割を担うことがわかってきたが、胎児脳と成体脳で神経幹細胞の性質が大きく異なるので、Hes1 発現動態の違いと関連があるのかどうかを今後しらべる。

#### 吉川グループ

生物時計の一般的な理論として知られているのは、結合振動子の同期である。その際、数々の細胞の遺伝子発現ネットワークは負のフィードバックにより振動性を持たなければいけない。しかし、多くの細胞は振動状態より、安定状態に収束する傾向があるため、同期現象の理論は通用できない。安定な平衡点しか持たない細胞より、自発的な集団振動が生じえることを明らかにした[文献 6]。図 2 で示すように、環境パラメーターは周辺から中へ減衰的に拡散し、定常的な濃度勾配を形成するとする。境界に近い細胞は双安定であり、中央付近の細胞は単安定となる。このような（非振動性の）興奮細胞の集団に、外部刺激を与えると、進行波が発生する。濃度勾配と結合強度を制御パラメーターとすることにより、多彩な時空間パターンが発生する。図 3 はその一例である。このような計算結果は、振動性のない細胞集団が、activator 結合により、自発振動を起こし、時空間構造を形成しえることを明らかにしている。

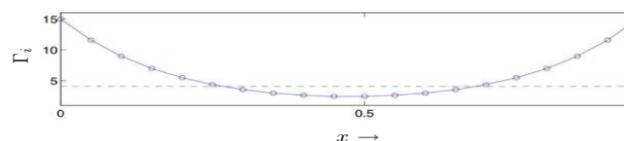


図 2. 活性を促す環境因子の空間分布。

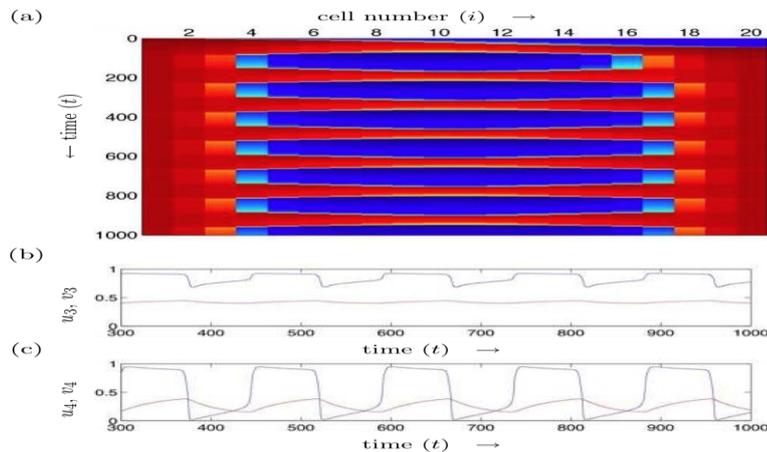


図3. 細胞列に見られる自律集団振動。  
 (a)活性因子の時空間パターン。(b, c)細胞3と4の波形。

### 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

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表 (原著論文)

1. Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58, 52-64.
2. Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development* 135, 2531-2541.
3. Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neurosci.* 11,

1153-1161.

4. Ishii, A., Kobayashi, T., and Kageyama, R. (2008) Requirement of multiple lysine residues for the transcriptional activity and the instability of Hes7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 142-146.
5. Nakayama, K., Satoh, T., Igari, A., Kageyama, R., and Nishida, E. (2008) FGF induces oscillations of Hes1 expression and Ras/ERK activation. *Curr. Biol.*, 18, R332-R334.
6. Self-Sustained Collective Oscillation Generated in an Array of Non-Oscillatory Cells, Yue Ma and Kenichi Yoshikawa (submitted to *Physical Review E*)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)