

影山 龍一郎

京都大学ウイルス研究所・教授

短周期遺伝子発現リズムの動作原理

§ 1. 研究実施の概要

これまで、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、安定な Hes7 の発現オシレーションには、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重要であると予測された。本年度は、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こと、さらに Hes7 遺伝子からイントロンを取り除いたマウスを作製したところ Hes7 の発現オシレーションが起これなくなることを見出した。イントロン除去によって Hes7 の発現レベルも低下したが、イントロンを取り除いた Hes7 トランスジーンを導入して発現量を増やしてもオシレーションが起これなかった。一方、イントロンを持つ Hes7 トランスジーンを Hes7 欠損マウスに導入すると分節異常がレスキューされた。これらの結果から、イントロンを介したネガティブフィードバックの時間の遅れが、安定な Hes7 の発現オシレーションに必須であることが示され、数理モデルの予測の正しさを検証できた。また、その他の細胞での Notch-Hes 系の発現オシレーションの意義を明らかにした。

一方、ノイズの多い生命現象で安定な発現変動を生み出す機序を理解するために、顕著なゆらぎのある少数分子数において安定(ロバスト)な反応サイクルが実現される機構に関して理論的な側面から基礎付けを行った。細胞空間内外での反応ネットワークにおいて、少数の要素と少数の分子数で如何にして細胞の反応ネットワークが示す非線形性と安定性を実現するかは、数理的に大きな問題となっている。ここで理論づけを行った数理的なモデルは協同的な遺伝子発現とサイズ効果によって安定性が高くなるというものである。

§ 2. 研究実施体制

(1)「影山」グループ(研究機関別)

① 研究分担グループ長:影山 龍一郎 (京都大学ウイルス研究所、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(研究機関別)

① 研究分担グループ長:吉川 研一 (京都大学大学院理学研究科、教授)

② 研究項目

- ・短周期遺伝子発現リズムの数理モデルの構築

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

影山グループ

これまで、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、検証実験によって数理モデルの予測が正しいことを以前示した。本年度は、もう一つの予測に関して検証することにした。そのために、イントロン・スプライシングに注目して、Hes7 遺伝子のイントロンを含むレポーターと含まないレポーターをもつ遺伝子改変マウスを作製した。Hes7 プロモーターからレポーターの発光が起こるまでのタイミングを測定したところ、イントロンの存在によって約19分の遅れが見られた。数理モデルからは、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が19分短くなると、発現がオシレーションしなくなることが予測された。そこで、Hes7 遺伝子からイントロンを取り除いて時間の遅れを短くしたマウスを作製したところ、Hes7 の発現オシレーションが起こらなくなることがわかった。その結果、このマウスの体節は癒合し、体節由来の組織である椎骨や肋骨も激しく癒合した(図 1B)。

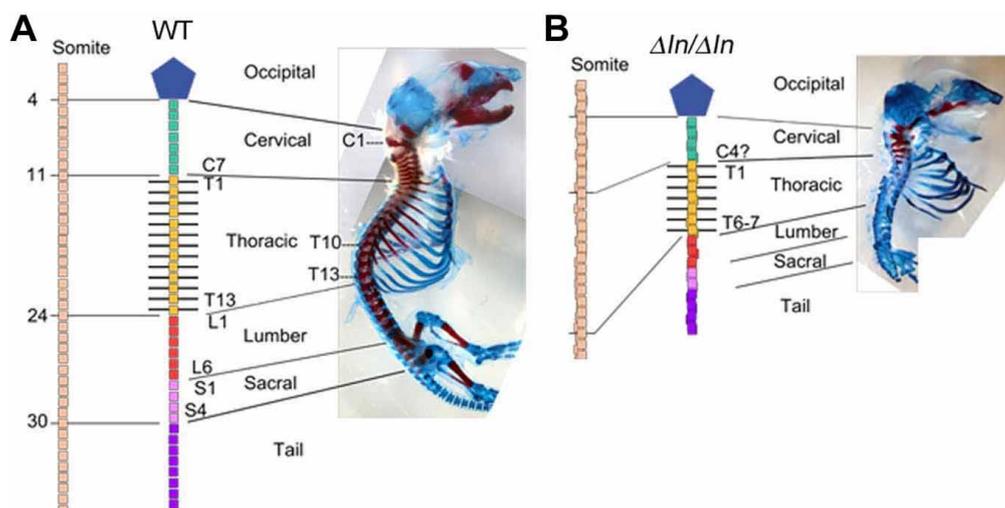


図1:(A)正常マウスの椎骨と肋骨。(B) Hes7 遺伝子からイントロンを除去したマウスの椎骨と肋骨。激しく癒合している。

しかし、イントロン除去によって Hes7 の発現レベルも低下していたので、発現量を増やしてもオシレーションが起こらなくなるかどうかを検討することにした。そのために、イントロンを持つ Hes7 トランスジーンおよびイントロンを持たない Hes7 トランスジーンを作り、これらを Hes7 欠損マウスに導入した。いずれのトランスジーンでも Hes7 の発現レベルは十分に回復した。しかし、イントロンを

持つ Hes7 トランスジーンを導入すると Hes7 の発現オシレーションも回復したのに対して、イントロンを取り除いた Hes7 トランスジーンを導入してもオシレーションは回復しなかった。これらの結果から、イントロンに依存したネガティブフィードバックの時間の遅れが、安定な Hes7 の発現オシレーションに必須であることが示され、数理モデルの予測の正しさを検証できた¹⁾。

さらに、その他の細胞での Notch-Hes 系の発現オシレーションの意義を探った。昨年度、ES 細胞では Hes1 の発現が3~5時間周期でオシレーションし、Hes1 の発現レベルが低いときには神経系に分化しやすいことを報告した。今回、Hes1 の発現レベルが高いときに ES 細胞はどの種類の細胞に分化しやすいかを解析した。その結果、中胚葉系の細胞に分化しやすいことがわかった⁶⁾。この結果から、ES 細胞では Hes1 の発現レベルが変動することによって、同じ分化シグナルに対して異なった分化応答を示すことが明らかになった。さらに、これらの分化応答は、Notch 系の活性を制御することによって変動することもわかった。以上のことから、ES 細胞は短周期の遺伝子発現変動によって細胞間で異なる状態を生み出し、同じシグナルに対して多様な反応を示すことが明らかになった。

吉川グループ

ノイズの多い生命現象で安定な発現変動を生み出す機序を理解するために、以下の解析を行った。生化学反応等のリッチな化学反応が数十 μm の細胞サイズ内で行われている場合の反応や反応速度の安定性に関して理論的な議論を行った。数十 μm サイズの空間内でシグナル等に相当する少数分子を考えた場合、大きな数揺らぎとそれに起因する非

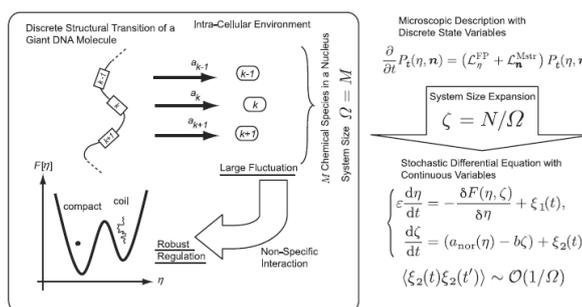


図 2

線形反応の不安定性が与える影響が数理モデルの構築の上で大きな問題となっている。しかし、実際の生物はこの問題を何らかの方法で解決する事で、一定の安定性(ロバストネス)を獲得している事は間違いないであろう。本研究では、遺伝子群等の協同的な発現が総計として速度式の中で作用する際に、その協同性の程度によってロバストネスが高くなる事を理論的に示した(図2)。これは、例えば細胞周期等に付随する多数の遺伝子の発現や多量のRNAの生成そのものが環境パラメータと出来る場合に、大きな安定性が得られる事を意味している。また、数式上の協同性は、縮約した際にまとめられる複数の因子の作用として表現される為、協同因子は必ずしも実際に相同的な物である必要は無い。体節形成等の遅いダイナミクスに対しては、断熱消去できる多数の速い因子を含める形で適切に縮約する事で、ここでいう協同性が実現できる。このような数理的アプローチはこれまでに無い斬新な物であり、より現実的なモデルの構築に寄与するものである⁸⁾。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Takashima, Y., Ohtsuka, T., González, A., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2011) Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108, 3300-3305. (DOI:○10.1073/pnas.1014418108)
2. Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Ito, J., and Kageyama, K. (2011) Cooperative functions of *Hes/Hey* genes in auditory hair cell and supporting cell development. **Dev. Biol.** 352, 329-340. (DOI:○10.1016/j.ydbio.2011.01.038)
3. Shimizu, T., Nakazawa, M., Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Kageyama, R., and Hibi, M. (2010) Zinc-finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in forebrain. **Development** 137, 1875-1885. (DOI:○10.1242/dev.047167)
4. Inoue, T., Coles, B., Dorval, K., Bremner, R., Bessho, Y., Kageyama, R., Hino, S., Matsuoka, M., Craft, C., McInnes, R., Temblay, F., Prusky, G., Tano, Y., and van der Kooy, D. (2010) Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells. **Stem Cells** 28, 489-500. (DOI:○10.1002/stem.279)
5. Karlsson, C., Brantsing, C., Kageyama, R., and Lindahl, A. (2010) HES1 and HES5 are dispensable for cartilage and endochondral bone formation. **Cells Tissue Organs** 192, 17-27. (DOI: 10.1159/000280416)
6. Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2010) Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling. **Genes to Cells** 15, 689-698. (DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01413.x)
7. Ikeda, K., Kageyama, R., Suzuki, Y., and Kawakami, K. (2010) Six1 is indispensable for production of functional apical and basal progenitors during olfactory epithelial development. **Int. J. Dev. Biol.** 54, 1453-1464. (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01413.x)
8. Nagahara, H. and Yoshikawa, K. (2010) Large system in a small cell: A hypothetical pathway from a microscopic stochastic process towards robust genetic regulation. **Chemical Physics Letters**,

494(1-3), 88-94.

9. Hörning, M., Isomura, A., Jia, Z., Entcheva, E., and Yoshikawa, K. (2010) Utilizing the eikonal relationship in strategies for reentrant wave termination in excitable media. **Physical Review E**, 81(5), 056202.

10. Matsumoto, A., Onoyama, I., Sunabori, T., Kageyama, R., Okano, H., and Nakayama, K.I. (2011) Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of stemness and neuronal-glia differentiation in neural stem cells. **J. Biol. Chem.** in press.

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)