

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560446

研究課題名(和文) 振動子ネットワークによる概日リズムの定量的数理モデルの構築とその制御への応用

研究課題名(英文) Oscillator network modeling of the circadian rhythms and its application to their control

研究代表者

徳田 功 (Tokuda, Isao)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：00261389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Cry遺伝子欠損マウスの視交叉上核(SCN)において細胞分析を行ったところ、野生型に比べて周期分布が広がり、ノイズレベルが有意に増加し、減衰振動の特性が強まることを確かめた。新生児期からの発達段階では、SCNスライス培養系における同期の様相が変わり、結合様式が変化していることが示唆された。Cry遺伝子の欠損は個々の細胞リズムを弱めるのに対して、生後数日間は結合によってスライス全体のリズムが保持されることが数理モデルによって示された。また、概日リズム制御を目標に、シロイヌナズナに対して光パルス刺激を複数回適用することにより同期および脱同期状態の制御が可能であることを実験的に示した。

研究成果の概要(英文)：Towards understanding the role of Cry genes in the mammalian circadian clock, this project attempted to construct a mathematical model of a neuronal network in the suprachiasmatic nucleus (SCN). Single cell analysis was applied to the SCN data recorded from Cry1 and Cry2 double deficient mice. Compared to the wild-type SCN, the mutant SCN neurons showed larger level of noise and more variation of the periods. The SCN slice was further analyzed. The neonate showed a clear rhythmicity with synchronized neuronal activities, whereas this rhythmicity was instantly destroyed in the adult. Our mathematical model implies that the network structure (coupling strength and phase) may change during the development, which may drastically change the network dynamics.

Next, multiple light pulses were injected to Arabidopsis thaliana to desynchronize and resynchronize the plant circadian system. Our experiment demonstrates the efficiency of using the phase response property for controlling the plant.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学，通信ネットワーク工学

キーワード：概日リズム 非線形動力学 同期 制御 視交叉上核

1. 研究開始当初の背景

約 24 時間の周期性を示す概日時計は、バクテリアからヒトまでの幅広い生物に対して高精度の日内リズムを付与している。哺乳類では、視交叉上核(SCN)に時計中枢があり、数万個の神経細胞が集団同期することにより、正確でロバスタなリズムを刻むことが知られている。一方、植物の概日リズムは自律分散型で、細胞間結合も比較的弱いとされる。近年では、分子生物学的手法と発光イメージング技術の飛躍的進歩により、時計細胞の集団動作を分子レベルで精度よく追求することが可能となった。ただし技術革新は、膨大な量の未分析の時空間データを生み出し、説明のつかない現象も蓄積してきている。特に、大きな不均一性をもったノイズな神経細胞集団が、どのようなネットワーク構造の下で、正確でロバスタな時計機能を発揮するのは長年の未解明問題となっている。概日時計の仕組みを理解し、応用に結びつけるには、以下の点に関する考慮が必要不可欠である。

- (1) コアとなる時計遺伝子、特に Cry 遺伝子の SCN 細胞における役割。
- (2) SCN 細胞ネットワークの機能、集団同期と外力に対する引込み特性。
- (3) 個体の成長段階における、細胞リズム及び行動リズムの変化。
- (4) 植物概日リズムの応答特性計測とそれに基づく最適な制御。

研究開始時において、Cry 遺伝子欠損マウス (Cry1^{-/-} Cry2^{-/-} マウス) の行動リズムやスライス分析の一部は進んでいたが、単一細胞レベルの詳細分析や、スライスおよび行動リズムの発達段階での変化についてはまったく分かっていなかった。植物リズムでは、周期的な光入力による制御が主流で、位相に応じた適応的なパルス入力による制御はほとんど手つかずの状態であった。また、波長の違いで作り出される摂動に対する植物の位相応答特性についても十分な知見が得られていなかった。

2. 研究の目的

数理モデルをベースとしたデータ分析を行い、時計細胞ネットワークの機能的理解を包括的に行う。計測データに対して、定量的にも実験系を表現可能であることを示すことによって、理論モデルの正当性を実証し、生物リズムの動作原理に迫る。さらには、得られた数理モデルを、生物リズムの制御へと応用することを目的とする。ターゲットとしては、哺乳類視交叉上核(SCN)および植物の概日リズムに焦点を絞り、以下の研究項目に取り組む。

- (1) Cry 遺伝子欠損マウス (Cry1^{-/-} Cry2^{-/-} マウス) における、視交叉上核の遺伝子発現データを計測し、固有リズムの分析と細胞間ネットワーク構造の推定を行う。変異体で観測される行動リズム

の消失をモデル化することによって、Cry 遺伝子の機能を探る。

- (2) Cry 遺伝子欠損マウスの発達段階にみられるリズム変化について計測分析する。特に、行動リズムの育成環境への依存性について調査する。
- (3) 植物のサーカディアンリズムの位相応答特性を同定し、植物時計の最適制御技術を開発する

3. 研究の方法

- (1) SCN スライス計測データの定量解析：
Cry 遺伝子欠損マウス (Cry1^{-/-} Cry2^{-/-} マウス) の SCN 分散培養データおよびスライス培養データに対して、時計遺伝子 *per2* のルシフェラーゼ発光計測を行う。計測データから自律振動パラメータを推定することによって、個々の細胞の周期分布、振幅、ノイズ等の特徴量を抽出する。野生型との比較を通して、遺伝子欠損型の特徴を明確にする。また、新生児期からの発達段階で、スライス培養データにおける細胞間同期などの様相の変化を観察し、定量化、数理モデル化を行う。
- (2) 行動リズムの定量解析：
Cry 遺伝子欠損マウス (Cry1^{-/-} Cry2^{-/-} マウス) の行動リズムを計測し、明暗サイクルへの同調性、恒暗条件での振動特性を分析し、定量化、数理モデル化を行う。また、新生児期における飼育条件が、成体のリズムに及ぼす影響についても検証する。
- (3) 植物遺伝子の定量解析：
ルシフェラーゼ発光技術に基づいてシロイヌナズナの概日リズムを計測し、位相応答特性の解析を行う。波長の異なる光を照射した場合に、位相応答曲線に及ぼす影響を調べる。得られた位相応答特性に基づいて、光パルス入力を行い、同期および脱同期の制御を試みる。また、シロイヌナズナの根においては、時計の全位相がストライプパターン状に現れる性質を利用して、一回の光照射刺激を加えるだけで、位相応答曲線を求める方法を開発する。

4. 研究成果

- (1) Cry 遺伝子欠損マウス (Cry1^{-/-} Cry2^{-/-} マウス) の SCN 分散培養データおよびスライス培養データに対して、データ解析を行い、野生型との比較を行った。特に、計測データから自律振動子のパラメータを推定することによって、個々の細胞の周期分布、振幅、ノイズ等の特徴量を抽出したところ、野生型に比べて遺伝子欠損マウスでは、周期分布が広がり、ノイズレベルが有意に増加し、減衰振動の特性が強まることを確かめた。欠損型でも細胞レベルではリズムが存在し、ただし細胞同士の同期が弱いために、スライスにおいては、出力が弱まっていることが分かった。また、新生児期から発達段

階で、SCN スライス培養データにおける同期の様相が変化し、結合様式が変化していることが示唆された。このような特性を説明するための、時計遺伝子の転写翻訳モデルを細胞毎に結合したモデルの検討を行い、結合によって、同期が引き起こされるのみならずリズム自体も強化されることが分かった。新生児期から発達段階で、同期-脱同期の間の遷移が起こるのは、結合の強さおよび結合の位相に変化が生じたためとの考察に至った。

- (2) Cry 遺伝子欠損マウス (Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}マウス) の行動リズムについては従来より研究が進められ、明暗サイクルには引き込まれるが、恒暗条件では概日リズムが消失することが報告されていた。これに対して、恒明条件で新生児期に飼育を行うと、その後、恒暗条件に暴露しても、概日リズムが見られることを実験により発見した。恒明条件下の飼育では、欠損型でも新生児期に SCN の細胞間結合が発達すると考え、バウト振動体仮説に基づいて、数理モデルを構築したところ、実験で観測された行動リズムを再現できることが示された。
- (3) シロイヌナズナに対して複数の暗期パルスを加えることによって、同期の制御を行った。特に、実験で測定された位相応答曲線を用いて、特定の位相にパルスを段階的に照射することによって、同期を効果的に崩す、あるいは回復できることを実験および数値計算で示した。位相応答曲線のみを使用するこの方法は、多様な概日リズムを制御する新しい枠組みとして期待できる。
- (4) シロイヌナズナの根においては、時計の全位相がストライプパターン状に現れる性質を利用して、一回の光照射刺激を加えるだけで、位相応答曲線を簡便に求める方法を開発し、数理モデルでその妥当性を検証した。また、シロイヌナズナに波長の異なる光を照射した場合に計測された位相応答曲線をモデル解析することにより、どのような光の組合せで位相の感度を最も上げることができるかを検討した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. T. Higashi, A. Kamitamari, N. Okamura, K. Ukai, K. Okamura, T. Tezuka, H. Fukuda, "Characterization of circadian rhythms through a bioluminescence reporter assay in *Lactuca sativa* L.," *Environmental Control in Biology*, 査読有, Vol. 52,

2014, p. 21-27

DOI: 10.2525/ecb.52.21

2. I.T. Tokuda, M. Wickramasinghe, I.Z. Kiss, "Detecting connectivity of small, dense oscillator networks from dynamical measurements based on a phase modeling approach," *Physics Letters A*, 査読有, Vol. 377, 2013, pp. 1862-1867. DOI: 10.1016/j.physleta.2013.05.016
3. I. Tokuda, H. Fukuda, N. Hayasaka, "Oscillator network modeling of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus," In *Advances in Cognitive Neurodynamics (III)*, Y. Yamaguchi ed. Springer, Tokyo, 査読無, 2013, pp.191-197. DOI: 10.1007/978-94-007-4792-0_26
4. S. Honma, D. Ono, K.-I. Honma, "Oscillator cell networks in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus, the mammalian circadian clock," In *Advances in Cognitive Neurodynamics (III)*, Y. Yamaguchi ed. Springer, Tokyo, 査読無, 2013, pp.185-190. DOI: 10.1007/978-94-007-4792-0_25
5. D. Ono, S. Honma, K.-I. Honma, "Postnatal constant light compensates Cryptochrome 1 and 2 double deficiency for disruption of circadian behavioral rhythms in mice under constant dark," *PLoS One*, 査読有, Vol. 8, 2013, e80615. DOI: 10.1371/journal.pone.0080615
6. M. Onizuka, H.T. Huu, M. Kawato, I. Tokuda, N. Schweighofer, Y. Katori, K. Aihara, E.J. Lang, K. Toyama, "Solution to the inverse problem of estimating gap-junctional and inhibitory conductance in inferior olive neurons from the spike trains by network model simulation," *Neural Networks*, 査読有, Vol. 47, 2013, pp. 51-63. DOI: 10.1016/j.neunet.2013.01.006
7. I.T. Tokuda, H. Huu, N. Schweighofer, M. Kawato, "Adaptive coupling of inferior olive neurons in cerebellar learning," *Neural Networks*, 査読有, Vol. 47, 2013, pp. 42-50. DOI: 10.1016/j.neunet.2012.12.006
8. H. Fukuda, H. Murase, I.T. Tokuda, "Controlling circadian rhythms by dark-pulse perturbations in *Arabidopsis thaliana*," *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 3, 2013, 1533. DOI: 10.1038/srep01533
9. D. Ono, S. Honma, and K.-I. Honma, "Cryptochromes are critical for the development of coherent circadian rhythms in the mouse suprachiasmatic nucleus," *Nature Communications*, 査

- 読有, Vol. 4, 2013, 1666.
DOI: 10.1038/ncomms2670
10. N.N. Takasu, G. Kurosawa, I.T. Tokuda, A. Mochizuki, T. Todo, W. Nakamura, "Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock-deficient mice," *PLoS ONE*, 査読有, Vol. 7, 2012, e48892.
DOI: 10.1371/journal.pone.0048892
 11. H. Fukuda, K. Ukai, and T. Oyama, "Self-arrangement of cellular circadian rhythms through phase-resetting in plant roots," *Phys. Rev. E*, 査読有, Vol. 86, 2012, 041917.
DOI: 10.1103/PhysRevE.86.041917
 12. R. Enoki, S. Kuroda, D. Ono, M.T. Hasan, T. Ueda, S. Honma, K.-I. Honma, "Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus," *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, Vol. 109, 2012, pp. 21498-21503.
DOI: 10.1073/pnas.1214415110
 13. C.G. Rusin, I. Tokuda, I.Z. Kiss, J.L. Hudson, "Engineering of synchronization and clustering of a population of chaotic chemical oscillators," *Angewandte Chemie*, 査読有, Vol. 50, Issue 43, 2011, pp.10212-10215.
DOI: 10.1002/anie.201008194
 14. H. Fukuda, I. Tokuda, S. Hashimoto, N. Hayasaka, "Quantitative analysis of phase wave of gene expression in the mammalian central circadian clock network," *PLoS ONE*, 査読有, Vol. 6, No. 8, 2011, e23568.
DOI:10.1371/journal.pone.0023568
 15. H. Fukuda, T. Ichino, T. Kondo, H. Murase, "Early diagnosis of productivity through a clock gene promoter activity using a Luciferase bioluminescence assay in *Arabidopsis thaliana*," *Environment Control in Biology*, 査読有, Vol. 49, 2011, pp. 51-60.
DOI: 10.2525/ecb.49.51
 16. S. Lim, H. Ashida, R. Watanabe, K. Inai, Y.-S. Kim, K. Mukougawa, H. Fukuda, K.-I. Tomizawa, K.-I. Ushiyama, H. Asao, M. Tamoi, H. Masutani, S. Shigeoka, J. Yodoi, A. Yokota, "Production of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce chloroplasts," *Plant Mol. Biol.*, 査読有, Vol. 76, 2011, pp. 335-44.
DOI: 10.1007/s11103-011-9745-5
 17. H. Fukuda, T. Ichino, T. Kondo, H. Murase, "Early diagnosis of productivity through a clock gene promoter activity using a Luciferase bioluminescence assay in *Arabidopsis thaliana*," *Environment Control in Biology*, 査読有, Vol. 49, 2011, pp. 51-60.
DOI: 10.2525/ecb.49.51
- [学会発表](計 14 件)
1. T. Ohara, I. Tokuda, S. Okamura, H. Fukuda, "Analysis of phase response of *Arabidopsis* to light pulses with different wavelength," 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18 日, 富山大学(富山県)
 2. 豊田慎五, 徳田功, 福田弘和, 早坂直人 「SCN スライスデータにおける領域分割とその細胞間結合への影響に関する研究」第 20 回日本時間生物学会学術大会, 2013 年 11 月 9 日, 近畿大学(大阪府).
 3. 大原隆之, 徳田功, 岡村信弥, 福田弘和 「波長の異なる光パルスを用いた植物概日リズムの位相応答曲線の計測と推定に関する研究」第 20 回日本時間生物学会学術大会, 2013 年 11 月 9 日, 近畿大学(大阪府).
 4. 鵜飼和也, 上山昌三, 福田弘和 「根の概日時計におけるストライプパターンを用いた位相応答関数の算出」第 20 回日本時間生物学会学術大会, 2013 年 11 月 9 日, 近畿大学(大阪府).
 5. N. Hayasaka, I. Tokuda, H. Takemori, "A role of salt-inducible kinase 3 in the central circadian pacemaker in mammals: phosphorylation-dependent degradation of the clock protein," XIII Congress of the European Biological Rhythms Society, 2013 年 8 月 20 日, Munich(Germany)
 6. I. Tokuda, H. Herzog, D. Ono, S. Honma, K.-I. Honma, "Single cell analysis and oscillator network modeling of *Cry1* and *Cry2* double deficient mice," XIII Congress of the European Biological Rhythms Society, 2013 年 8 月 19 日, Munich(Germany).
 7. N. Hayasaka, I. Tokuda, H. Takemori, "A role for Salt-inducible kinase 3 (SIK3) in the circadian rhythm regulation: phosphorylation-dependent degradation of the clock protein," 36th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2013 年 6 月 22 日, 京都国際会館(京都府).
 8. 牛田明里, 徳田功, 高須奈々, 中村渉, 「線形予測による給餌予想活動のモデル化: 制限給餌データの定量解析」電子情報通信学会総合大会, 2013 年 3 月 21 日, 岐阜大学(岐阜県)
 9. I. Tokuda, D. Ono, S. Honma, K.-I. Honma, "Oscillator network modeling of

suprachiasmatic nucleus in Cry1/Cry2 double-deficient mice," 35th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012年9月18日, 名古屋国際会議場(愛知県)

10. 豊田慎五, 徳田功, 福田弘和, 早坂直人, 「概日リズムネットワークモデルとその結合推定方法の検証」第19回日本時間生物学会学術大会, 2012年9月15日, 北海道大学(北海道)
11. 徳田功, 小野大輔, 本間さと, 本間研一, 「データ分析によるCry遺伝子欠損マウスのSCNモデル」第19回日本時間生物学会学術大会, 2012年9月15日, 北海道大学(北海道)
12. I. Tokuda, D. Ono, S. Honma, K.-I. Honma, "Oscillator network modeling of mutant SCN," Meeting Society for Research on Biological Rhythms, 2012年5月22日, Sandestin (米国)
13. I. Tokuda, H. Herzl, "Oscillator network modeling of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus," 26th Symposium on Biological and Physiological Engineering, 2011年9月22日, 立命館大学(滋賀県)
14. I. Tokuda, H. Fukuda, N. Hayasaka, "Oscillator network modeling of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus," 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics, 2011年6月12日, ヒルトンニセコビレッジ(北海道)

〔図書〕(計 5 件)

- 1.) D. Ono, H. Kori, S. Honma, S. Daan, and K. Honma, "Cellular circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus: An oscillatory or a stochastic process?" In: Honma K. (ed.) *Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN*, Hokkaido Univ. Press, Sapporo, pp.21-32, 2014
- 2.) R. Enoki, S. Honma and K. Honma, "Imaging Circadian Calcium Rhythm in the Suprachiasmatic Nucleus." In: Honma K. (ed.) *Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN*, Hokkaido Univ. Press, pp.33-45, 2014
- 3.) S. Honma, D. Ono, and K. Honma, "Cellular oscillators in the suprachiasmatic nucleus for behavior rhythm expression in the mouse lacking CRYPTOCHROME." In: Honma K. (ed.) *Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN*, Hokkaido Univ. Press, pp.79-89, 2014
- 4.) K. Honma, D. Ono, S. Honma, and I. Tokuda, "Bout Oscillator: hypothetical circadian oscillators for

activity bouts." In: Honma K. (ed.) *Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN*, Hokkaido Univ. Press, pp.91-105, 2014

- 5.) I. Tokuda, H. Herzl, D. Ono, S. Honma, and K. Honma, "Oscillator Network modeling of the suprachiasmatic nucleus in Cry1/Cry2 double deficient mice." In: Honma K. (ed.) *Dynamics of Circadian Oscillation in the SCN*, Hokkaido Univ. Press, pp.139-153, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 功 (TOKUDA ISAO)
立命館大学・理工学部・教授
研究者番号: 00261389

(2) 研究分担者

本間 さと (HONMA SATO)
北海道大学・医学研究科・特任教授
研究者番号: 20142713

(3) 研究分担者

福田 弘和 (FUKUDA HIROKAZU)
大阪府立大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 90405358