

平成30年6月9日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05326

研究課題名(和文)短周期生物時計の応答計測と再構築による制御機構の解明

研究課題名(英文)Dissection and reconstitution of ultradian genetic oscillators responsive to dynamic signaling inputs

研究代表者

磯村 彰宏 (Isomura, Akihiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・共同研究者

研究者番号：70512466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：Hes1短周期生物時計の動的応答特性を明らかにするために、光応答機能を遺伝子導入したC2C12細胞に光摂動を与え、タイムラプスイメージングによって1細胞応答を定量計測した。その結果、受信機能に関しては、Hes1の遺伝子発現リズムが様々な周期(1.8から5.5時間)の外部刺激に応答・同期できること、特にHes1リズムの自然周期(約2.6時間)に近い周期の外部刺激で最も効率的に同期できることが分かった。また、1細胞解析から、位相応答曲線を可視化することに成功し、動的応答特性を確率的位相モデルを使ったシミュレーションによって再現できた。さらに人工遺伝子回路による振動発振にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We studied dynamic responses of Hes1 genetic oscillators via optogenetic perturbation and single-cell imaging analysis. We found that Hes1 oscillators can decode dynamic signaling inputs at the single-cell level. We also succeeded in the visualization of single-cell phase response curves. Numerical simulations suggested that stochastic phase model is sufficient to explain synchronization processes of Hes1 oscillators upon external periodic perturbation.

研究分野：生物物理学

キーワード：遺伝子発現振動 光遺伝学 人工遺伝子回路 合成生物学 非線形動力学

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムの時代になり、遺伝子の同定を中心とした研究から遺伝子間の相互作用ネットワークのダイナミクスの理解が重要な研究課題となりつつある。近年、哺乳動物細胞における2~4時間周期の遺伝子発現の振動ダイナミクス(短周期生物時計)が次々と発見されてきた。例えば、 γ 線照射に伴うp53活性の4時間周期の振動、腫瘍壊死因子(TNF)の刺激に応じたNF-kBシグナル伝達経路の2時間周期の振動、Notchシグナルにตอบสนองする転写因子Hes1/7の神経発生・体節形成における2~3時間周期の振動などである。これらの短周期リズムは細胞自律的な負のフィードバックループによって駆動されており、DNA修復/アポトーシス、免疫応答/炎症反応、細胞増殖/分化などの細胞運命の決定において重要であることがわかってきた。

一方で、動物や植物などの個体の概日時計の場合、自然光への引き込み同調によって応答特性がよく調べられている。特に、朝に光を浴びると時計が進み、夜に光を浴びると時計が遅れる応答特性は位相応答関数として知られており、元来24時間と異なる周期の体内時計が朝の光で24時間に調整され、夜間の光が夜型の生活を誘導することを説明できる(図1左)。よって、位相応答関数によって応答特性を定量することは、生物時計が外部環境に応じて周期を調整する機構の解明や、生物時計を人為的に制御するために非常に重要である。しかし、短周期生物時計の場合は、計測と制御を1細胞レベルで同時に行う技術が無かった。

この問題を解決するためには、細胞に正確なタイミングで人為的な外的刺激(摂動)を与えると同時に、短周期生物時計の応答を細胞内活性を可視化することで1細胞レベルで定量計測する技術を確立することが必要である(図1右)。さらに、短周期生物時計の主要な構成要素を抽出して人工遺伝子回路をデザインし、振動ダイナミクスだけでなく応答特性も含めて再構築・比較することができれば、生物時計の一般的な設計原理を明らかにできると考えられる。

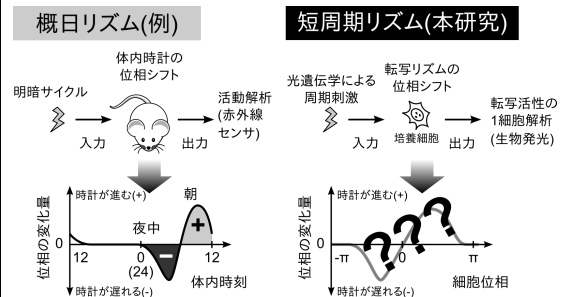


図1: 本研究の背景と目的。

2. 研究の目的

そこで本研究では、哺乳動物細胞における短周期生物時計の外部刺激に対する応答特性を、光摂動技術と転写活性の可視化技術を使って明らかにすることを試みた。

(1) 転写因子Hes1の短周期リズムの位相応答特性の定量解析

転写因子Hes1は、自己のプロモーターに結合して自らの転写を抑制することで細胞自律的な負のフィードバックループを形成する。このとき、mRNAとタンパク半減期が約20分と短く、転写・翻訳などの過程でフィードバックに時間遅れが生じるため、発現量が2~3時間周期の振動を示すことが報告されている(Hirata et al. 2002)。その後短周期リズムの生物学的意義が神経幹細胞やES細胞などで明らかとなり、周期などの特性が調べられてきた。しかし、それが動的な外部刺激に対してロバストなのかどうか、応答特性がどのようになっているのかについては未解明であった。そこでHes1短周期リズムに様々な遺伝子・周期・強度の光摂動を与えて、周期外力への同調過程と位相応答曲線を定量することを試みた。

(2) 人工遺伝子回路による短周期リズムの再構築と位相応答特性の定量計測

前項のHes1の振動ダイナミクスは、単純な負のフィードバックループだけで駆動されている。一方で、細胞周期や神経発火などの振動回路は、正と負のフィードバックループの組み合わせによって成り立っており、正のフィードバックが振動の安定性に貢献していると考えられている。しかし、Hes1、p53、NF-kBなどの短周期生物時計においては正のフィードバックが見つかっておらず、振動の安定

性や外部刺激に対するロバスト性にどのように寄与しているのかは全くわかっていない。そこで、人工遺伝子回路をデザイン・再構築して応答特性を定量計測することを目的とした再構成実験を行った

3. 研究の方法

(1) 転写因子Hes1の短周期リズムの位相応答特性の定量解析

既にHes1短周期リズムが報告されているマウス筋芽細胞株のC2C12に、Hes1プロモーターによって不安定化ルシフェラーゼが発現するレポーターモジュールを遺伝子導入した。また、光によってHes1タンパク質を誘導するために、青色光感受性人工転写因子のhGAVPOの発現カセットと、UASプロモーターによってHes1が発現する光制御モジュールを導入した(図2)。さらに、生細胞イメージングにおいて細胞核の位置を効率的に追跡するために、H2B-mCherryの発現カセットも導入した。これらの遺伝子モジュールはプラスミドDNA上にコーディングし、トランスポゾン酵素のTol2を用いた遺伝子導入によってC2C12細胞のゲノム上に挿入し、安定発現株のクローン株を樹立した。

上記の細胞を使って-90°Cの冷却CCDを使った発光・蛍光タイムラプスイメージングを行った。発光シグナルは長時間露光(約5分)によって取得した。また、mCherryの蛍光は緑色光によって励起し、シグナルは短時間露光(400ミリ秒)で取得した。青色光刺激は、GFP励起用の470nm光源とフィルタキューブによって導入した。

得られた時系列シグナルはJavaプログラム及びPythonスクリプトを使って平滑化やトレンド除去な

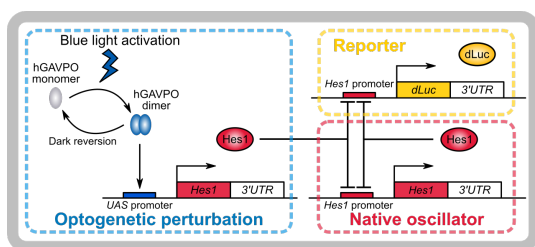


Photo-sensitive oscillator cell

図 2: Hes1 短周期リズムの動的特性を調べるための光感受性細胞の遺伝子回路の模式図。

どの信号処理を行い、Hilbert変換によって振動の位相情報を抽出した。

(2) 人工遺伝子回路による短周期リズムの再構築と位相応答特性の定量計測

人工遺伝子回路を使った実験では、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞を用いた振動発振型の人工遺伝子回路(発光レポーターを含む)を搭載したプラスミドベクターと、細胞追跡用の蛍光タンパク質マーカーを搭載したプラスミドベクターを前項(1)と同様にTol2を用いた遺伝子導入によってゲノム上に挿入し、安定発現株を樹立した。発光・蛍光タイムラプスイメージングは、前項(1)と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 転写因子Hes1の短周期リズムの位相応答特性の定量解析

光摂動に対する細胞の動的応答を、光応答性のC2C12細胞を使った1細胞経時イメージングによって定量計測した。その結果、受信機能に関しては通常2~3時間周期で振動しているHes1の遺伝子発現リズムが様々な周期(1.8~5.5時間)の外部刺激に応答・同期できること、特にHes1リズムの自然周期(約2.6時間)に近い周期の外部刺激で最も効率的に同期できることが分かった。さらに、1細胞解析から、位相応答曲線を可視化することに成功した(図3)。そして、動的応答が位相情報だけを

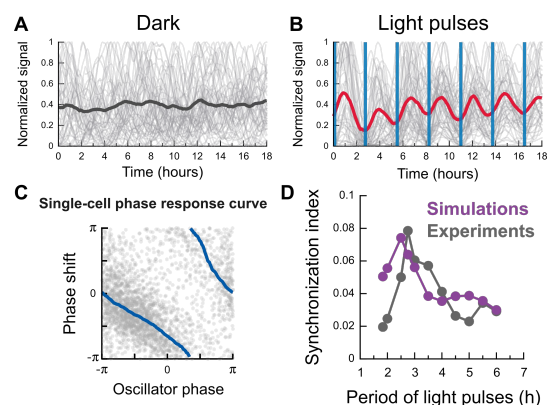


図 3: Hes1 短周期リズムの光同調。暗条件では集団レベルで同調していないが(A)、周期的な光入力によって同調した(B)。(C)1細胞位相応答曲線。(D)Hes1 振動子の引き込み同調効率の外部周期依存性。確率的位相モデルによって実験を再現できた。

考慮した確率的位相モデルを使った数値シミュレーションによって再現可能であることが明らかになった。以上のことから、Hes1短周期リズムは概日時計などで知られている位相応答特性を1細胞レベルで有しており、位相情報を元に外部環境への同調を実現していることが分かった。以上の成果は学術誌に掲載された(雑誌論文④)。

(2) 人工遺伝子回路による短周期リズムの再構築と位相応答特性の定量計測

Hes7遺伝子の振動回路における時間遅延成分はイントロン配列のスプライシング所要時間が担っていると考えられている。そこで、イントロン配列を発光タンパク質のコーディング領域へ挿入し、光遺伝制御と光計測によっての時間遅延を定量・比較した(図4A)。その結果、ヒトHes7イントロン配列の場合で長い時間遅延が実現された(図4B,C)。

そこで、時間遅延イントロン配列を含んだ発光タンパク質ドメインを、バクテリア由来の転写抑制因子およびタンパク質不安定化配列と融合し、さらにmRNA不安定化配列も組み合わせるとリズム発振

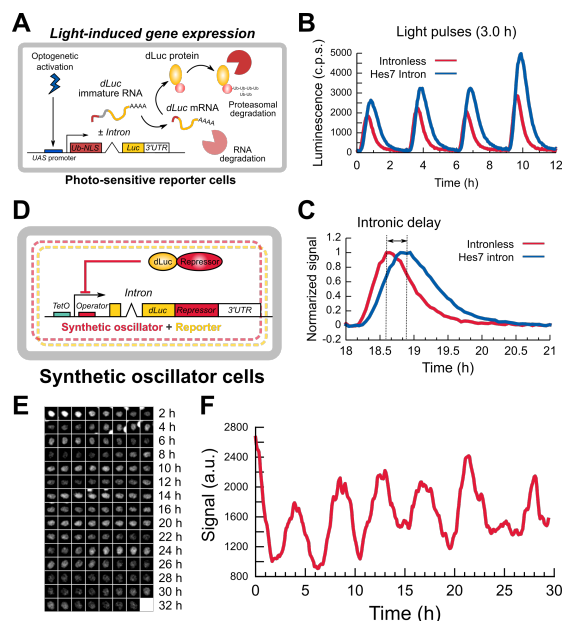


図 4: 人工遺伝子回路による遺伝子発現のリズム発振(未発表データ)。(A-C)光遺伝学技術によるイントロン配列の時間遅延機能の直接計測・検証。(D-F) 新規人工遺伝子回路による遺伝子発現リズム。1細胞発光イメージングの結果、約4.5時間周期の安定な遺伝子発現リズムの発振を確認できた(E,F)。細胞はハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞株を使用した。

を試みた。その際、リズム発振の駆動を外部制御できるように、転写抑制因子の応答配列に加えて、プロモーター配列にTet活性化因子の応答配列を付加した(図4D)。その結果、Tet因子による回路の外部制御機能が確認できた。そして、活性化条件下において、1細胞発光イメージングによって、約4.5時間周期の安定な遺伝子発現リズムの発振を検出することに成功した(図4E,F)。さらに、イントロンを除いた回路では振動発振機能が減弱することがわかった。さらに、正のフィードバック回路をさらに導入することを試みたが、振動発振機能が失われてしまった。現在は、構築した人工遺伝子回路の光制御を試みているところである。

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7件)

① “Deubiquitinating enzymes regulate Hes1 stability and neuronal differentiation”, *T. Kobayashi, Y. Iwamoto, K. Takashima, A. Isomura, Y. Kosodo, K. Kawakami, T. Nishioka, K. Kaibuchi, *R. Kageyama, *FEBS J.* **282**, 2411-2423 (2015).

doi:10.1111/febs.13290

② “Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis”, H. Shimojo, A. Isomura, and T. Ohtsuka, H. Kori, H. Miyachi and R. Kageyama

Genes. Dev. **30**, 102 (2016).

doi:10.1101/gad.270785.115

③ “遺伝子発現ダイナミクスの人工光制御とその応用”, *磯村 彰宏 *生物工程* **94**, 20-23 (2017).

④ “Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information”, *A. Isomura, and F. Ogushi, H. Kori and *R. Kageyama

Genes. Dev. **31**, 524-535 (2017).

doi:10.1101/gad.294546.116

⑤ “Illuminating information transfer in signal-

ing dynamics by optogenetics”,
*A. Isomura, *R. Kageyama,
Curr. Opin. Cell Biol. **49**, 9-15 (2017).
doi:10.1016/j.ceb.2017.11.002

⑥ “An Optogenetic Method to Control and Analyze Gene Expression Patterns in Cell-to-cell Interactions”, *A. Isomura, *R. Kageyama
Journal of visualized experiments: JoVE 57149 (2018).
doi:10.3791/57149

⑦ “Reconstitution of an ultradian oscillator in mammalian cells by a synthetic biology approach” M. Santorelli, †D. Perna, †A. Isomura, I. Garzilli, F. Annunziata, L. Postiglione, B. Tumaini, R. Kageyama, *D. di Bernardo *ACS synth. biol.* **7**, 1447 (2018). (†: equal contribution)
doi:10.1021/acssynbio.8b00083

[学会発表](計 4 件)

① “遺伝子回路の信号パターンの光操作と光測定”, 磯村 彰宏

応用物理学会・量子エレクトロニクス研究会「光操作の最前線」、2017年12月14-16日、自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター上智大学軽井沢セミナーハウス (長野県北佐久郡)

② “遺伝子発現リズムの細胞間位同期の再構成”, 磯村 彰宏

定量生物の会 第8回年会、2017年1月8-9日、自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター (岡崎)

③ “光遺伝学による遺伝子発現リズムの細胞間情報伝達機構の解明”, 磯村 彰宏

第39回日本分子生物学会年会 2AS15「シグナル伝達における時間情報のコーディングシステム」、2016年12月1日 (パシフィコ横浜)

④ “Interrogating oscillatory gene expression by optogenetics”, Akihiro Isomura

International Symposium on Synthetic Systems Biology Joint 14th Symposium of Biochemical Systems Theory (BST2015) Sep. 17th, 2015 (Fukuoka).

[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

磯村 彰宏 (ISOMURA, Akihiro)

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

共同研究者

研究者番号: 70512466