

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23115006

研究課題名（和文）生体リズムの少数性生物学 - 生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性 -

研究課題名（英文）Small-number issues in biological rhythms: regulation of oscillation system with low-abundant proteins through tuning turnover rate

研究代表者

上田 泰己 (UEDA, Hiroki)

東京大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20373277

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 74,300,000 円

研究成果の概要（和文）：これまでに、概日時計振動子を構成する主要な転写因子の細胞内発現量がかなり少ないことが示唆されてきた。本研究では、超高感度質量分析により、主要な概日時計タンパク質の発現量変動を絶対定量することに成功し、一細胞あたり1,000～20,000分子の発現量で変動することを明らかにした。一般的なタンパク質の発現量に比べてかなり少ない濃度範囲で、正確な周期長で発現振動が生じるメカニズムを、特に概日時計振動子の中核となるCRYタンパク質について検証した。その結果、CRYはタンパク質安定性制御に依存する量的な制御機構と、リン酸化状態に依存する状態制御機構の双方で概日周期長を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Previous studies suggest that the expression level of circadian core factors, most of them work as transcription regulators are generally low. In this project, we carried out absolute quantification of circadian core transcription factors throughout the various circadian time points, and revealed that the expression amount varies between 1,000～20,000 molecules / cell, the concentration range lower than the expression level of most proteins in cell. We then asked the mechanism, by which circadian transcription factors at low expression level ensures rhythmic transcription oscillation with precise 24 hour period. We found that CRY, a core component of circadian transcription factors regulates circadian period through amount regulation depending on the turnover rate of CRY protein and state regulation depending on the phosphorylation status of the protein.

研究分野：システム生物学

キーワード：概日時計 質量分析 絶対定量 ターンオーバーレート 分子少数性

## 1. 研究開始当初の背景

生命における計時機構である概日時計により生み出されるリズム(概日リズム)の周期は、構成分子の少数性に比して正確である。また外部環境の温度変化に対して頑健である一方で、外部環境の照度変化や急激な温度変化に対しては柔軟に適應する。概日時計の構成分子(遺伝子、タンパク質)についての多くの分子生物学および細胞生物学的知見の蓄積にもかかわらず、概日時計の正確性・頑強性・適應性をもたらす分子・ネットワーク機構については完全には理解されていない。本提案ではこれまでのシステム科学研究を踏まえて、未解明である哺乳類概日時計の正確性・頑強性・適應性をもたらす分子機構・ネットワーク機構について、ネットワーク構成要素の少数性に着目し、ターンオーバー制御による周期の正確性、タンパク質間相互作用および酵素反応特性による周期の頑強性・適應性の2つの問題に対するアプローチを通じて解明することを目指す。

## 2. 研究の目的

生命における計時機構である概日時計は、生命活動に約1日周期の変動を生み出すことにより、地球の自転に伴う約1日周期の外部環境の変動に生命を積極的に適應させている。概日時計により生み出されるリズム(概日リズム)の周期は正確であり、その誤差は、1%程度(10分程度)である。この概日リズムの周期は生理的温度範囲内で不変である(温度補償性)など、外部環境の温度変化に対して頑健である一方で、照度変化や急激な温度変化に対して鋭敏に反応するなど適應性も有している。これらのマクロな挙動の正確性の一方で、分子レベルにおいては哺乳類概日時計で中心的な役割を担うPERIODの細胞内分子数が少数(数十分子~数千分子:大腸菌に換算すると1細胞あたり1分子以下)である可能性が示唆されている(Lee et al., Cell, 2001, Forger et al., PNAS, 2005)。これらの分子少数性に関する知見にもかかわらず、概日時計の正確性・頑強性・適應性をもたらす分子機構についての報告は極めて少なく、理解は不十分である。

我々は、これまで哺乳類概日時計を対象として、概日時計を構成する時計タンパク質の動的性質、および時計遺伝子の転写ネットワーク構造やその動的挙動についてのシステム科学的な研究を行ってきた。解析的なアプローチを用いて朝・昼・夜の転写制御配列を同定し、時計関連遺伝子が構成する転写ネットワークの全体像を明らかにした(Nature, 2002; Nat. Genet., 2005, 2006; Cell, 2011)。また構成的なアプローチを用いて、哺乳類概日時計の転写ネットワークが基本的に2つのネガティブフィードバックループにより構成されることを明らかにしてきた(Nat. Cell Biol., 2008; Cell, 2011)。これまでに明らかにした知見をもとに数理的なモデリング研究

と実験的な検証とを密にあわせることができ、哺乳類概日時計の周期の正確性についての仕組みを系統的に解析することが可能であると考えている。また、我々は哺乳類概日時計における外部環境の温度変化に対する頑強性と、急激な外部環境変化に対する適應性について調べるために、約1200の化合物をもちいて化合物スクリーニングをおこなったところ、非常に強い周期延長効果をもつ10個の化合物を見出し、そのうち9個の化合物がCKI $\epsilon$ およびCKI $\delta$ を強力に阻害し、高濃度の条件では周期を通常の約24時間から48時間以上に延長させることを見出した(PNAS, 2009)。このことはCKI $\epsilon/\delta$ はPER-CRY複合体をリン酸することが知られており、それらのリン酸化反応が概日時計の周期決定機構に対して決定的な役割を果たしていることを示唆する。さらに我々は、この酵素反応の速さが、温度変化に対する非依存性を有することを示した(PNAS, 2009)。これらの知見は、概日時計に關与する酵素反応が温度には頑健である一方で、化合物の濃度のような他の条件に關して鋭敏に反應する適應性を併せ持つことを意味する。このことは、正確性・頑強性や適應性といった概日時計のシステム特性がネットワーク構造だけではなく、構成分子の特性に起因することを示唆する。概日時計周期長制御において、CKI $\epsilon/\delta$ はPER-CRY複合体の安定性(ターンオーバーレート)を制御すると考えられており、このターンオーバーレート制御が、どのようにして24時間という、リン酸化等のシンプルな生化学反応と比べれば比較的長い時間スケールを正確に規定するかは、大きな問題である。これを踏まえて、概日時計周期長の正確性が少数分子によっていかに担保されているのかを調べる。

## 3. 研究の方法

概日時計タンパク質発現量の絶対量を知るために、超高感度質量分析計による、タンパク質絶対定量系を構築する。

さらに、特に周期長制御に重要と考えられるタンパク質についてマウス由来時計遺伝子破壊細胞株を用いた相補実験系を構築する。この系を用いてタンパク質改変によってタンパク質の発現量や合成・分解速度を制御し、概日時計周期の正確性への影響を評価する。特に、細胞のみならず、概日時計が制御する最終的な表現型であるマウス個体の行動リズムへの影響を評価する。

これらの結果と、生化学的な反応を表現した数理モデル解析から、正確な周期長を有する生体内振動子の構築原理を考察する。

## 4. 研究成果

### (1) 少数分子の取り合いによる自律的時空間パターン生成機構の数理的解明

分子間の協同的状態遷移を考えるモデルケースとして、ミカエリス-メンテン型の酵素

反応のみで記述される可逆的リン酸化過程が時空間パターンを自律的に生成する条件を数理的に探索し、分子状態遷移を担う複数の連続したリン酸化が時間振動の周期長を決め、少数分子との相互作用が分子状態の同期を担うことが明らかになった(発表論文)。分子の量変動によらない、修飾状態変動を基盤とするこの機構は、分子数を減らした場合でも比較的安定に時空間パターン形成が可能であることを確率的シミュレーションから見出した。さらに、同様のメカニズムによって、可逆的リン酸化反応のみから空間パターンの自律的形成も可能であることを明らかにした(投稿準備中)。リン酸化振動子モデルは、ミカエリスメンテン式で記述される可逆的なタンパク質修飾反応であればどのような系にも適用可能であり、概日時計を超えて広く数理生物学分野への訴求力を持っている。

#### (2) 概日時計タンパク質の絶対定量の成功

質量分析計による超高感度分子絶対定量に必須となる、濃度既知の同位体ラベルペプチドを多種並列的に作成する新規手法を開発した。これにより、哺乳類概日時計発振子を構成する主要な因子のほぼ全ての継時的な絶対定量に成功した。その結果、概日時計振動体の中核を担う転写因子群が一細胞あたり 1,000~20,000 分子の範囲で概日変動することが明らかとなった(発表論文)。この数は、真核生物の細胞サイズを考慮に入れば少数分子といえる範囲と考えている。

#### (3) 少数発現タンパク質機能解析のための発生工学基盤技術の開発

少数分子の振る舞いを観測するための遺伝学的ツールを導入するために、ひいてはその振る舞いが階層を超えて個体レベルの生理機能に与える影響を検証するために、TALEN や CRISPR/Cas9 を用いた高効率なゲノム編集技術や(発表論文)、組織透明化を用いた全身・一細胞レベルでの蛍光分子観察系を確立した(発表論文)。

#### (4) 少数発現概日時計因子による周期長・振幅制御機構の解明

絶対定量によって少数発現分子であることが測定され、かつ、哺乳類概日時計発振子の中核をなす CRY および PER タンパク質について、概日周期制御機構を解析した。開発した発生工学技術を用いて CRY の連続したリン酸化サイトが CRY 分子の安定性制御とは異なる機構で周期長の決定に重要であること、および、CRY と PER の相互作用が個体レベルでの安定した周期長維持に重要であることを見出した(投稿準備中)。これは、安定した振動周期長を担保するためには分子の量的変動(ターンオーバー制御)よりも、むしろ分子(リン酸化)状態の変動が重要であることを示唆している。これまで哺乳類概日時計研究は、生理学あるいは神経科学に端を発し、近年遺伝学的な解析が精力的になされてきた。本研究では、生体分子振動子とし

ての原理的な特性、すなわち分子の協同的振る舞いを担う生化学的特性の厳密な理解を志向し、生化学的・構造生物学的に哺乳類概日時計タンパク質中に周期長決定ドメインを見出し、その機能をマウス個体行動レベルで評価するとともに、分子状態遷移とその同期機構についての予測と解釈を数理的に行う、分野横断的な研究を展開した。その結果、哺乳類概日時計は細胞内に少量しか存在せず、正確な概日周期長は、それらの量変動(ターンオーバー)制御だけではなく、分子状態(リン酸化修飾)変動が重要であることを提唱するに至った。

#### <引用文献>

Lee et. al., Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock, *Cell* **107**, 855-867 (2001)

Forger and Peskin, Stochastic simulation of the mammalian circadian clock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 321-324 (2005)

Ueda et. al., A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* **418**, 534-539 (2002)

Ueda et. al., System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat. Genetics* **37**, 187-192 (2005)

Sato et. al., Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat. Genetics* **38**, 312-319 (2006)

Ukai-Tadenuma et. al., Proof-by-Synthesis of the Transcriptional Logic of Mammalian Circadian Clocks *Nat. Cell Biol.* **10**, 1154-1163 (2008)

Ukai-Tadenuma et. al., Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function. *Cell* **144**, 268-281 (2011)

Isojima et al., CKIε/δ-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15744-15749 (2009)

#### 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 27 件)

Narumi, R., \*Shimizu, Y., Ukai-Tadenuma, M., Ode, K.L., Kanda, G.N., Shinohara Y., Sato

A., Matsumoto K., and [Ueda, H.R.](#)  
Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, advanced online publication, doi: 10.1073/pnas.1603799113  
[査読有](#)

Tatsuki, F., Sunagawa, G.A., Shi, S., Susaki, E.A., Yukinaga, H., Perrin, D., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Fujishima, H., Ohno, R., Tone, D., [Ode, K.L.](#), Matsumoto, K., and [Ueda, H.R.](#)  
Involvement of Ca<sup>2+</sup>-dependent hyperpolarization in sleep duration in mammals.  
*Neuron* **90**, 70-85 (2016)  
doi:10.1016/j.neuron.2016.02.032  
[査読有](#)

Sunagawa, G.A., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Perrin, D., Fujishima, H., [Ukai, H.](#), Nishimura, O., Shi, S., Ohno, R., Narumi, R., Shimizu, Y., Tone, D., [Ode, K.L.](#), Kuraku, S., and [Ueda, H.R.](#)  
Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene.  
*Cell Reports* **14**, 662-677 (2016)  
doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.052  
[査読有](#)

Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., [Ukai, H.](#), and [Ueda, H.R.](#)  
Whole-Body Imaging with Single-Cell Resolution by Tissue Decolorization.  
*Cell* **159**, 911-924 (2014)  
doi: 10.1016/j.cell.2014.10.034.  
[査読有](#)

Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H., and [Ueda, H.R.](#)  
Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis.  
*Cell* **157**, 726-739 (2014)  
doi: 10.1016/j.cell.2014.03.042  
[査読有](#)

Jolley, C.C., [Ode, K.L.](#), and [Ueda, H.R.](#)  
A design principle for a posttranslational biochemical oscillator.  
*Cell Reports* **2**, 938-950 (2012)  
doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.006  
[査読有](#)

他 21 件

〔学会発表〕(計 58 件)

[Ueda H.R.](#)  
Towards Organism-level Systems Biology  
Pacificchem2015, 2015 年 12 月 14 日-21 日,  
Hawaii (USA)

[Ode K.L.](#)  
Mammalian cryptochrome I regulates circadian period through its co-factor pocket  
XIV EBRs and IV WCC, 2015 年 8 月 2 日-8 月 6 日, Manchester (UK)

[Ueda H.R.](#)  
Systems biology of circadian clocks  
16<sup>th</sup> IGIS Symposium, 2015 年 4 月 9 日-12 日,  
Nice (France)

[Ode K.L.](#)  
Autonomous Spatio-Temporal Pattern Arising from Reversible Multisite Phosphorylation  
JSMB/SMB 2014, 2014 年 7 月 31 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

[Ueda H.R.](#)  
Systems and Synthetic Biology of Circadian Clocks  
Belistein Bozen Symposium 2014, 2014 年 5 月 19 日, Prien (Germany)

[Ueda H.R.](#)  
Biological Timekeeping by Circadian Clocks: Systems and Synthetic Biology of Mammals  
Analytica Conference 2014, 2014 年 4 月 2 日,  
Munich (Germany)

[Ueda H.R.](#)  
Systems and synthetic biology of biological timings  
EMBO conference series: from functional genomics to systems biology, 2012 年 11 月 9 日,  
Heidelberg (Germany)

[Ueda H.R.](#)  
Systems and synthetic biology of mammalian circadian clocks  
The 2012 Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms, 2012 年 6 月 23 日, Destin (USA)

他 50 件

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://sys-pharm.m.u-tokyo.ac.jp/>  
<http://www.qbic.riken.jp/syn-bio/jpn/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 泰己 (UEDA, Hiroki)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
理化学研究所・生命システム研究センター・グループディレクター  
研究者番号：20373277

### (2) 研究分担者

H25 – H27 年度  
大出 晃士 (ODE, Koji)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40612122

H23 – H24 年度  
鵜飼 英樹 (UKAI, Hideki)  
理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員  
研究者番号：70391878

H23 – H24 年度  
中嶋 正人 (NAKAJIMA, Masato)  
近畿大学・医学部・助教  
研究者番号：50432232

### (3) 研究協力者

H25 – H27 年度  
鵜飼 英樹 (UKAI, Hideki)  
理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員  
研究者番号：70391878