

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2009

課題番号：18016031

研究課題名（和文）

細胞間相互作用のシステムの理解

研究課題名（英文）

System-level Understanding of Intercellular Interactions

研究代表者

上田 泰己

独立行政法人理化学研究所・システムバイオロジー研究チーム・チームリーダー

研究者番号：20373277

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：体内時計、細胞間相互作用、再構成、転写制御、位相、哺乳類

1. 研究計画の概要

動的で複雑な生命現象を理解することは一般的に難しく、その解明のための手法・研究戦略は発展途上の段階である。特に多細胞生物を多細胞生物たらしめている細胞間相互作用を担う動的で複雑なシステムを体系的・効率的に同定・解析していく手法・研究戦略については、まだ確立されているとは言えない。我々は、動的で複雑な細胞間相互作用の一つである哺乳類の概日時計における細胞間相互作用をモデル系とし、インシリコ・インビボにおいて細胞間相互作用の遺伝子ネットワークを設計・再構成することで、予測されるメカニズムの再構成的証明を行う。これらの解析を通して細胞間相互作用の設計原理を理解するとともに、細胞分化など細胞間相互作用を要とする他の生命現象にも応用可能な研究戦略を提供する。

2. 研究の進捗状況

(1) 細胞間同調を観測するための基盤技術の確立

概日時計に制御されるプロモーター下で半減期の短い不安定化ルシフェラーゼ (*dLuc*) を発現させることにより、細胞集団の遺伝子の概日発現振動をリアルタイムに測定する系を構築した。このレポーター系を用いて細胞間同調に必要な条件をハイスループットに検証するために、288 サンプルの細胞集団の発光を同時に測定可能な装置を構築した。次に細胞間同調を精緻に観察・測定するために、高感度冷却 CCD カメラ付顕微鏡システムを用い、概日振動

するレポーター遺伝子の発光を一細胞レベルで観察可能な実験系を構築した (*Nature Genetics*, 38, 312-319 (2006))。概日時計の細胞間同調を観測するためには、概日振動の位相が異なる細胞間の相互作用を観察することが必要である。そこで、光受容体を培養細胞に導入し、培養細胞集団中の特定の細胞における概日振動の位相を光刺激によってコントロールする手法の開発を行った。この系を用い、ある特定のタイミングで光刺激を与えることで、同期振動している細胞集団を個々の細胞の振動は維持したまま完全に非同期化した細胞集団へと誘導する事が可能になった (*Nature Cell Biology*, 9, 1327-1334 (2007))。このように、細胞間同調を観測するための基盤技術が確立された。

(2) 同調因子を任意の位相で発現させるための基盤技術の確立

細胞間同調の再構成を達成するためには、同調因子を任意の位相特異的に発現させる技術が必要である。そこで、任意の位相で機能する人工プロモーターを論理的に細胞内に再構成する系の確立を目指した。まず VP16 タンパクの転写活性化ドメインや Gal4 タンパクの DNA 結合ドメインを利用した人工転写制御因子（活性化因子、抑制因子）と、それらが結合する人工プロモーターを持つルシフェラーゼ発光レポーターからなる転写回路を設計し、その転写回路を哺乳類培養細胞中に一過性に導入することにより、転写出力のダイナミクスを定量的に測定可能な系を構築した。人工転写制御因子を同一細胞内で様々な位相で発現させた時

の下流の人工プロモーターからの転写出力ダイナミクスを計測した結果、朝、昼、夜の3つの基本位相の転写制御因子を組み合わせる事により、明け方、午後、夕方、深夜などの様々な位相の転写出力が生まれることが判った。この結果は、*in vivo*で観察される時計関連遺伝子の一見連続的な転写出力の創出機構の理解を助け、予測した位相で機能する人工プロモーターを論理的に再構成する設計原理を明らかにした (*Nature Cell Biology*, 10, 1154-63 (2008))。この設計・構築技術により、任意の位相で同調因子を発現させるための基盤技術が確立された

(3) 位相同期化可能因子の探索

細胞間同調機構の再構成を達成するためには、概日時計に対して位相変位を誘導可能な同調因子や、その受容体、シグナル伝達系の3者が揃う事が必要である。そこで培養時計細胞において同調機構を効率よく再構成可能なリガンド-受容体-シグナル伝達系のセットを予測するために、まず同調機能の無い培養細胞から RNA を抽出し、DNA 解析チップ (GeneChip) を用いて培養細胞内で発現している遺伝子を包括的に解析した。その発現パターンから、培養細胞自身は発現していないが培養細胞に対して同調因子として機能しうるリガンドを予測した。このリガンドを概日振動している培養細胞の培養液中に外部より添加した結果、概日時計の位相変位を観察することに成功した。このリガンドを用いることにより、同調機構を再構成することが可能になると考えられる。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

予定通り概日時計の細胞間同調を観察するための基盤技術、および実際に細胞間同調能の無い培養細胞への同調システムの再構成を行うための基盤技術がほぼ整備されてきており、実際に細胞に同調機構を再構成する段階に到達している。

4. 今後の研究の推進方策

まず前年度までに予測した同調因子として機能しうるリガンドを、時計培養細胞に対し様々な位相で添加し、時計細胞の位相応答性を詳細に解析する。次にこの基礎データを基に実際にインシリコ・インピトロにおける同調機構の設計・再構成を行う。同調が達成されている事を確認するためには、光摂動を用いて細胞集団を非同期化させ、その後集団として同期した振動が回復する事を確認する。

5. 代表的な研究成果

(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3件)

1. 0811252031

Ukai-Tadenuma, M., Kasukawa, T. and Ueda, H.R.*, "Proof-by-Synthesis of the Transcriptional Logic of Mammalian Circadian Clocks", *Nature Cell Biology*, 10, 1154-1163 (2008). 査読有り

2. 08012517349

Ukai, H., Kobayashi, T.J., Nagano, M., Masumoto, K., Sujino, M., Kondo, T., Yagita K., Shigeyoshi, Y. and Ueda, H.R.*, "Melanopsin-dependent photo-perturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks", *Nature Cell Biology*, 9, 1327 - 1334 (2007). 査読有り

3. 0606051548

Sato, T.K., Yamada, R.G., Ukai, H., Baggs, J.E., Miraglia, L.J., Kobayashi, T.J., Welsh, D.K., Kay, S.A., Ueda, H.R.* and Hogenesch, J.B.*, "Feedback repression is required for mammalian circadian clock function" *Nature Genetics*, 38, 312-319 (2006). 査読有り

*: corresponding author

[学会発表](計17件)

上田泰己、「哺乳類体内時計の制御と設計」、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007.12、横浜

上田泰己、「細胞集団の振る舞いとして理解する概日時計」、第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会、2006.5、福岡

上田泰己、「Analysis and synthesis of circadian clocks」、第13回日本時間生物学会学術大会、2006.12、東京

他

[図書](計4件)

上田泰己、「体内時計のシンギュラリティ現象の解明」、時間生物学会、時間生物学, Vol.14, No.1, 2-8, 2008

他