

平成 22 年 05 月 31 日現在

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 (Ueda Hiroki)  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

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同調をモデル系とし、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、予測される同調メカニズムを再構成的に証明することを目指した。その過程で、細胞間同調を再構成する為の基盤技術として、[任意の位相で同調因子を発現させる技術][同調シグナル伝達経路の再構築技術]を確立し、また、再構成した細胞間同調の検証技術として、[一細胞レベルでの概日振動観察技術][光刺激を用いた非同期化技術]等の基盤技術を整備した。

## 研究成果の概要（英文）：

Central clock (the suprachiasmatic nucleus; SCN) of mammal produces robust oscillation even in the presence of internal noise without referring to external time cues. Ueda et al proposed stochastic model of intercellular coupling mechanism, and theoretically indicated that the robustness of central clock is caused by intercellular interaction of clock cells (J. Theor. Biol. (2002) 216, 501-512). In this project, we tried to physically simulate the model by synthesis of intercellular interaction mechanism in peripheral clock cells in order to proof the model.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	24,300,000	0	24,300,000
2007 年度	13,200,000	0	13,200,000
2008 年度	13,300,000	0	13,300,000
2009 年度	13,400,000	0	13,400,000
総計	64,200,000	0	64,200,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：システムバイオロジー、再構成、体内時計、細胞間情報伝達、一細胞イメージング、シンギュラリティー、光制御、位相制御

## 1. 研究開始当初の背景

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、確立されていなかった。

## 2. 研究の目的

生命システムを再構成することで理解する手法は、注目するシステムを他の不確定要素から隔絶して解析できることから数理モデルの構築・検証と相性が良い。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。

## 3. 研究の方法

以下のように、同調現象のモニター系の開発、同調因子の同定、再構成による同調機構の証明、を行う。

### [細胞間同調のモニター系の確立]

生物発光を用いた遺伝子発現ダイナミクスの実時間モニター系の開発と、CCDカメラを用いた一細胞レベルでの発光ダイナミクス測定法の確立により、細胞間同調の有無を直接観察できる実験系を構築する。

### [遺伝子構造・発現情報を利用した同調因子遺伝子の同定]

細胞間同調を制御する因子（同調因子）は、概日時計によって制御され（条件A：概日時計の下流にある遺伝子）、細胞外にシグナルを伝え（条件B：細胞間相互作用を担う遺伝子）、概日時計を制御する（条件C：概日時計の上流にある遺伝子）ことが想定される。そこでまず時計中枢（視交叉上核）における包括的な発現データとプロモータ・エンハンサの解析から、朝・昼・夜特異的なDNA配列を持ち、直接概日時計によって制御されている概日振動遺伝子を抽出する。次にこれら概日振動遺伝子の中から細胞間相互作用に関与しうる分子構造を持つ遺伝子を抽出する。さらに、これらの遺伝子が中枢時計を直接制御できるかどうかを実験により検証する。

### [同調機構の再構成的証明]

*in silico*において細胞間相互作用の遺伝子

ネットワークを設計・再構成するとともに、上記で同定・推定された細胞間同調因子を、同調機構を持たない時計細胞に人工的に組み込み、予測される同調メカニズムを再構成的に証明する。

## 4. 研究成果

不安定化ルシフェラーゼ (*dLuc*) を用いて遺伝子発現のダイナミクスをリアルタイムに測定するレポーター系と、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。また細胞間同調をより精緻に観察・測定するために、細胞間同調を一細胞レベルで観察可能な実験系の構築を行った (*Nature Genetics*, 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、細胞に対し光を照射することで光受容体依存的に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外からコントロール可能な系の構築を行った。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*, 2007)。このように、細胞間同調を観測するための基盤技術をまず確立した。

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。人工転写制御因子(活性化因子、抑制因子)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解析した。この結果から、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ことにより、明け方、午後、夕方、深夜などの様々な位相の転写出力を任意に生み出す事が可能となった (*Nature Cell Biology*, 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。

同調機能の無い培養細胞に同調機構を再構成するためには、概日時計に対して位相変位を誘導可能なペプチドリガンド(同調因子)、受容体、シグナル伝達系の3者が揃う必要がある。我々はまず、化合物ライブラリーを細胞に添加し、各化合物が細胞の概日振動の位相に与える影響を解析することによって、培養細胞において概日時計の同調シグナルとして機能可能なシグナル経路を複数見出した。次にこれらの同調シグナル経路を活性化可能な受容体を培養細胞に強制発現させ、対応するペプチドリガンドを外部から投与し、細胞の位相を同期させることに成功した。上記検討ではペプチドリガンドを外部から添加したが、実際に細胞間同調の再構成を達成するためには、細胞自身が分泌したペプチドリガン

ドによって位相変化が誘導されなくてはならない。そこで細胞自身が分泌したペプチドリガンドによっても位相変化が誘導される事を検証するために、受容体遺伝子とともにドキシサイクリン依存的に発現誘導されるペプチドリガンド発現遺伝子を導入し、任意のタイミングで培養液中にドキシサイクリンを穏やかに添加した。その結果、ドキシサイクリン濃度依存的に細胞自身が分泌したペプチドリガンドにより、受容体とそのシグナル伝達経路を活性化し、細胞の位相を変化させることに成功した。このようにして細胞は細胞間同調を達成していると考えている。

## 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 5 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)

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)

3. 0708081419

Matsumoto, A., Ukai-Tadenuma, M., Yamada, R.G., Houl, J., Uno, D.K., Kasukawa, T., Dauwalder, B., Itoh, T., Takahashi, K., Ueda, R., Hardin, P., Tanimura, T and \* Ueda, H.R. “A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock.” *Genes & Development*, 21(13):1687-700 (2007) (査読有)

\*: Co-corresponding authors

4. 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)

\*: corresponding author

5. 0602211754

Ueda, H.R., Hayashi, S., Chen, W.B., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M. and Hashimoto, S. “System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks.” *Nature Genetics*, 37(2):187-192 (2005) (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

1. 0912011623

Ueda, H.R., “光と体内時計” 太陽紫外線防御研究会, 2009/03/27, メルパルク京都 (京都)

2. 0904081913

Ueda, H.R., “生物発光で紐解く哺乳類の概日時計の分子・細胞ネットワーク MOLECULAR AND CELLULAR NETWORKS OF MAMMALIAN CIRCADIAN CLOCK REVEALED BY BIOLUMINESCENCE. MOLECULAR AND CELLULAR NETWORKS OF MAMMALIAN CIRCADIAN CLOCK REVEALED BY BIOLUMINESCENCE.” 第 46 回日本生物物理学会年会, 2008/12/03, 福岡国際会議場 (福岡)

3. 0904081910

Ueda, H.R., “Systems Biology of Mammalian Circadian Clocks” 上原記念生命科学財団 国際シンポジウム” システムズバイオロジーによる、複雑な生命システム理解への挑戦” 2008/06/30, ハイアットリージェンシー東京 (東京)

4. 0904081903

Ueda, H.R., “SYSTEMS BIOLOGY OF MAMMALIAN CIRCADIAN CLOCKS” SRBR 2008 (20th Anniversary Meeting Society for Research on Biological Rhythms) 2008/05/11, Florida, USA

5. 0903111844

Ueda, H.R., “SYSTEMS BIOLOGY OF MAMMALIAN CIRCADIAN CLOCKS” ESF-UB conference in Biomedicine “SYSTEMS BIOLOGY” 2008/04/12 Sant Feliu de Guixols, Spain

6. 0904081930

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) 2007/12/11 パシフィコ横浜 (横浜)

7. 0904081929

上田泰己「動的で複雑な生命システム理解のための機能ゲノミクス」第 19 回分子糖尿病学シンポジウム 2007/12/08, 神戸国際会議場 (神戸)

8. 0904081927

Ueda, H.R. “Control and Design of Mammalian Circadian Clocks” Pasteur CDB joint meeting, 2007/11/28 Paris, France

9. 0904081925

Ueda, H.R. “Identify, Control and Design Cellular Clocks” Indo-JSPS-CDB Joint Meeting. 2007/10/23 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (神戸)

10. 0904081924

Hiroki R. Ueda “CONTROL AND DESIGN OF MAMMALIAN CLOCKS” 9th Functional Genomics:

Synthetic Biology. 2007/08/27 Göteborg, Sweden

11. 0708071626

Ueda, H.R. "The Underlying Mechanism for Singularity Behavior of Circadian Clock" KITP Program: Biological Switches and Clocks. 2007/07/10 Santa Barbara, USA

12. 0708071625

Ueda, H.R. "CONTROL AND DESIGN OF MAMMALIAN CLOCKS" Synthetic Biology 3.0 " Conference 2007/06/26 Zurich, Switzerland

13. 0708071534

Ueda, H.R. "CONTROL AND DESIGN OF MAMMALIAN CLOCKS" Cold Spring Harbor Laboratory 72nd Symposium: Clocks & Rhythms meeting. 2007/05/30, New York, USA

14. 0904081917

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 2007/05/29, 福岡国際会議場 (福岡)

15. 0708071532

Ueda, H.R. "Analysis and Synthesis of Circadian Clock" International Conference on Systems Biology (ICSB). 2006/10/09, Yokohama, Japan

16. 0708071619

Ueda, H.R. "Circadian rhythm" Asia/Pacific Summer School on Computational Biology. 2006/07/08, Pohang, Korea

17. 0708071454

Ueda, H.R. "From Analysis to Synthesis of Mammalian Circadian Clocks" SRBR (Society for Research on Biological Rhythms) 10th Biennial Meeting. 2006/05/22, Florida, USA

18. 0912011628

鵜飼英樹「中枢時計を創る」細胞を創る研究会 2.0 2009/10/02, 東京大学医学部鉄門記念講堂 (東京)

19. 0912011633

鵜飼英樹「融合型研究による概日リズム Singularity現象の動作機構解明」第一回定量生物学の会年会 2009/1/11, 東京大学生産技術研究所 (東京)

20. 0912011636

鵜飼英樹「概日リズムモニターの現状とリズム測定におけるニーズ」第壱回「先進ものづくり技術によるアナライザーキーコンポーネント開発基盤の構築状況」 2008/8/7, 理化学研究所 和光本所 (埼玉)

21. 0912011639

鵜飼英樹「中枢時計を創る」「細胞を創

る」研究会0.0 2007/11/25, 日本科学未来館 (東京)

22. 0912011644

鵜飼英樹 "Desynchronization Underlying the Singularity of Mammalian Circadian Clocks" 第14回日本時間生物学会学術大会 2007/11/7, 京王プラザホテル (東京)

23. 0708061631

鵜飼英樹「細胞集団の振る舞いとして理解する概日時計」第59回細胞生物学会・第40回発生生物学会合同大会 007/05/29, 福岡国際会議場 (福岡)

24. 0708061628

「一細胞発光測定で見えてきたもの～概日時計システムの例～」分子細胞イメージングと疾患・創薬研究セミナーin神戸, 2006/10/20, ニチイ学館 神戸ポートアイランドセンター (神戸)

[図書] (計3件)

1. 0903111902

上田泰己、時間生物学会、2008. 7頁

2. 0904082000

Ukai, H., Kobayashi, T.J., Ueda, H.R., 医学書院 生体の科学 2008. 2頁

3. 0904082002

Ukai, H., Kobayashi, T.J., Ueda, H.R., (財)バイオインダストリー協会「バイオサイエンスとインダストリー」2008. 7頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 泰己 (Ueda Hiroki)

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

### (2) 研究分担者

鵜飼 英樹(Ukai Hideki)

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・研究員

研究者番号: 70391878