

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 短周期遺伝子発現リズムの動作原理
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

影山 龍一郎 (京都大学ウイルス研究所 教授)

主たる共同研究者

吉川 研一 (京都大学理学研究科 教授)

3. 研究実施概要

細胞の増殖や分化過程では、多くの遺伝子群が正しいタイミングで発現するが、このタイミングを制御する生物時計の実体はよくわかっていない。これまで、研究代表者らは、bHLH 型転写因子 Hes1 や Hes7 が2時間を刻む生物時計として働くことを明らかにしてきたが、その詳細な分子機構や意義は不明であった。そこで、本研究課題では、短周期リズムを刻む遺伝子発現動態の分子基盤と意義の解明を目指し、以下のことを明らかにした。

体節は未分節中胚葉の前端が周期的に分節することにより形成されるが、マウスの場合には約2時間毎に起こる。この体節形成を制御する分節時計のリズムは、Hes7 の発現がネガティブ・フィードバックによって自律的に振動(オシレーション)することによって刻まれる。この発現機構をもとに微分方程式からなる数理モデルを構築したところ、安定な Hes7 オシレーションには、Hes7 の遺伝子産物が十分に不安定であること、さらに Hes7 遺伝子の発現からネガティブ・フィードバックに至るまで十分な時間の遅れが必要であると予測された。このうち、Hes7 遺伝子産物の不安定性に関しては、以前、検証実験によって数理モデルの予測が正しいことを示した。さらに、もう一つの予測に関して検証するために、イントロン・スプライシングに注目したところ、イントロンの存在によって Hes7 の発現が約19分遅れることがわかった。数理モデルからは、ネガティブ・フィードバックにかかる時間が19分短くなると発現がオシレーションしなくなることが予測された。そこで、Hes7 遺伝子からイントロンを除去したマウスを作製したところ、Hes7 の発現がオシレーションしなくなり、体節は癒合し、体節由来の組織である椎骨や肋骨も癒合した。以上の結果から、数理モデルの予測が正しいことが示され、このモデルは分節時計の動態を正確に反映していると考えられた。

未分節中胚葉における Hes7 の上流を解析したところ、Hes7 オシレーションは Fgf シグナルによって開始され、Notch シグナルによって増幅と前側への伝搬が起こっていた。逆に、Hes7 は Fgf シグナルや Notch シグナルを周期的に抑制することによって両方のシグナル系の活性を振動させた。したがって、Hes7-Notch-Fgf 系はお互いに発現振動を制御し合うオシレーター・ネットワークを形成することが明らかになった。さらに、Notch シグナルの振動によって体節のサイズが、Fgf シグナルの振動によって体節形成の時間的周期性が制御されていた。以上の影山グループの結果をもとに、吉川グループとの共同で分節時計の中心的な役割を担う Hes7-Notch-Fgf オシレーター・ネットワークの全体を包括した数理モデルを構築した。

次に、体節形成以外での短周期遺伝子発現振動の意義を探るために、線維芽細胞を用いて2時間周期で発現変動する遺伝子を網羅的に検索した。その結果、リン酸化 Stat3 (pStat3) および Socs3 がネガティブ・フィードバックを形成して約2時間周期で発現振動すること(pStat3-Socs3 オシレーション)、この発現振動を抑制すると Hes1 の発現振動が阻害されることが明らかにされた。この影山グループの結果は、吉川グループによる数理モデルの結果とよく一致し、体節形成以外での短周期遺伝子発現振動の分子基盤が明らか

かになった。pStat3 の形成に Hes1 が必要であることから、Hes1 オシレーションおよび pStat3-Socs3 オシレーションはお互いに依存・協調していること、さらに、この発現振動は細胞増殖に非常に重要であることも示された。他にも、Smad や Fgf シグナルの因子群も発現振動を示し、短周期の発現振動は特殊なものではなく、一般的な現象であることが強く示唆された。線維芽細胞以外に神経幹細胞を解析したところ、その維持に必須な役割を持つ Hes1 の発現が2〜3時間周期で振動しており、そのためプロニューラル遺伝子 Ngn2 や Notch リガンド Dll1 の発現も振動していた。この結果から、神経幹細胞では Notch シグナルは双方向性にダイナミックに働くこと、そのため神経幹細胞同士で Notch シグナルを活性化し合って細胞集団全体の未分化性維持に働くことが明らかにされた。また、胚性幹細胞では Hes1 の発現は3〜5時間周期で振動しており、分化誘導時に Hes1 の発現が高いと中胚葉系に、低いと神経系に分化しやすかった。したがって、Hes1 の発現振動が胚性幹細胞の多様な分化応答に関わっていることが示された。

以上から、短周期リズムを刻む遺伝子動態の分子基盤と各種生命現象における意義が明らかになった。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

転写抑制因子 Hes により 2 時間周期を刻む生物時計のメカニズムと生物学的意義を分子レベルと数理モデルの両面から深く掘り下げ、顕著な成果を上げており高く評価される。特に、分節時計の研究において数理モデルから Hes7 の合成の delay および Hes7 の早い分解速度の二つが分子時計の発信に必須であることをモデルから予測する一方、この delay の仕組みが intron の splicing に依存することを予測し intron を除去する実験によってそのことを実証している。さらに、delay をコントロール出来るモデル動物を作成して、Hes7 の振動が消失すると体節の癒合が起こることを見いだしており、時計の重要性を具体的に明らかにしたことは高く評価される。

その他にも繊維芽細胞および神経幹細胞における Hes1 の発現振動ネットワークの発見は、当初予想されなかった大きな成果であり、独自性の高い先進的な研究を展開している。

Nature 関連誌、Neuron、Proc. Natl. Acad. Sci. USA などを含む27報の原著論文を国際誌に発表した。招待講演(国内会議 26 件、国際会議 35 件)や学会発表(国内会議 12 件、国際会議 5 件)、ポスター発表(国内会議 20 件、国際会議 13 件)など積極的に成果を発表していることは、高く評価され、短周期遺伝子発現リズムのメカニズムに関して、この 5 年間世界をリードする成果を挙げている。

また、基礎研究にも関わらず、その研究から見出された再生医療で注目される技術の特許出願「多能性幹細胞からの神経細胞の分化誘導方法」(国内出願(1件) 海外出願(1件)をしていることを特筆しておきたい。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

実験的計測、解析を基に、数理モデルを構築した成果は、本研究領域の目指すところそのものであり、今後、他の研究のモデルとなる。

形態形成で定常的なパターンが生じるための必要条件は、阻害因子による結合であるということが、従来の数理モデルでは常識であった。それに対して、本研究では、活性因子の結合により、多様な定常パターンの生成が可能であることを明らかにした。本研究者達の理論の本質は、生物の組織が実数の密度での連続であるとする、従来のチューリング理論の根本的な問題点を明確にした点にある。実態を踏まえた数理理論が発展するための礎石を築いたものであり、大きなインパクトを与えたと考えている。

第4回国際 bHLH シンポジウム(2007 年 5 月 京都)や 2nd International Workshop on Natural Computing(2007 年 12 月 名古屋):Special Session I "Self-organization and Computation" で、海外研究者を招聘し、この分野の第一人者として国際的に活動している。

また、社会への応用面では、心筋細胞系での低電位不整治療法の考案は、国際的にも大きな反響を呼んでおり、ヨーロッパでは、ヒトを対象とする臨床実験が計画されるに至っていることも挙げておきたい。

4-3. 総合評価

胚の分節形成の機構について、分子生物学と数理モデルの両面から解析し、一群の遺伝子の周期的発現に依ることを明確にした。これによって短周期生物時計の機構についての理解が大きく進展した。国際的な研究をリードする極めて優れた研究成果である。外部発表において、論文・口頭発表も、質、数ともに十分である。影山グループによる分子生物学解析と吉川グループによる数理モデルからの視点がうまく噛み合っており、モデルからの予測を *in vivo* 実験で証明するなど、研究体制がうまく働いた。様々な細胞の異なった遺伝子の周期的発現に一般的な意義があるのか、が次の大きな問題であるが、繊維芽細胞や神経幹細胞、胚性幹細胞など、様々な異なった細胞系における短周期遺伝子発現を見いだすなど、新規で独創的な実験系の構築を精力的に進めている点も評価できる。今後の研究展開が期待でき、概念の普遍性、生命科学における波及効果も大きい。