

研究終了報告書

「生物種間で異なる時間スケールの原因解明と操作」

研究期間：2020年11月～2023年6月

研究者：松田 充弘

1. 研究のねらい

マウスとヒトは基本的に似た仕組みを有する(マウスをモデルにヒトを理解する研究が成り立つ程度に)一方、時間やサイズのスケールが異なることが知られています。例えばマウスの胚発生はヒトに比べて速く、心拍や寿命といった現象における時間スケールもマウスが短いことが知られています。これは究極的にはゲノムの違いに由来すると考えられますが、ゲノムのどの部位やどの遺伝子がカギになるのか全く分かっていません。本研究ではマウスとヒトの体節時計をモデルにしてこの問題に取り組みました。

体節時計は発生期にみられる遺伝子発現振動で、マウスは約2時間、ヒトは約5時間周期の時計が観察されます。コアメカニズムはマウス・ヒトともに転写因子 *Hes7* の自己抑制フィードバックループであると考えられております。本研究開始時までには私は試験管内での体節時計の再現にマウス・ヒトともに成功しておりました。さらに *Hes7* の自己抑制フィードバックループを部分に分けて測定することにも成功しておりました。その結果、遺伝子発現に要する時間(スプライシング反応を含む)とタンパク質分解速度に種間の差があることを示しました。

それを受けて本研究では1つ目の目標として、これらの時間の違いを生み出すメカニズムの解明を目指しました。具体的にはどの遺伝子で種間の差が見られるのか、遺伝子発現とタンパク質分解をさらに分割して考えたときにどの過程に差があるのか、遺伝子発現とタンパク質発現の種差は共通の原理によるのか、独立なのかといった点に着目しました。

2つ目の目標として、体節時計周期の操作を目標としました。阻害剤処理や遺伝子導入によりマウスの時間をヒト程度に遅延化したり、ヒトの時間をマウス様に加速することを目指しました。この項の最終的な目標は試験管内での人工進化です。ゲノムに摂動を与え、適切なレポーターを用い選択圧を与えることで、ヒト細胞の時間をマウス様に変化させることを目標としています。

3つ目の目標として、マウスとヒトの2種に他の生物種を導入することを試みました。実際の時間の多様性がどのように生じたかという疑問に答えることを目標としつつ、比較対象が2点から増えることでどのように適切な情報を取り出せばよいのかといった方法論の樹立を見据えました。

2. 研究成果

(1) 概要

成果1: 幹細胞動物園を用いた時間研究

3つ目の目標に対応した成果です。マウス(2時間)とヒト(5時間)に加えて、ウサギ(2.5時間)・ウシ(4時間)・サイ(4時間)・マーモセット(6.5時間)の体節時計の試験管内再現に成功しました。この実験系を用いて体節時計周期はどのようにして違いを生じているかという点について解析したところ、スプライシング・タンパク質分解ともに非常に強いスケールング(ここでは体節時計周期が2倍になった時、スプライシング・タンパク質分解ともに2倍となる)を示

すことがわかりました。

成果 2: 代謝阻害剤による周期の延長はスケーリング側に反する

目標 2 に対応します。種間の違いの原因として、代謝の違いがよく上げられます。そこで解糖系と電子伝達系の代謝阻害剤で細胞を処理したところ両方の阻害剤で周期の延長が見られました。周期がどのように延長しているかを調べたところ、解糖系阻害剤ではタンパク質分解速度の遅延によって、電子伝達系の阻害剤ではスプライシング時間の延長によって周期が延長しており、それぞれの阻害剤が特異的なターゲットを持つ、つまりスケーリング側に反する時間延長であるということがわかりました。これはスプライシングとタンパク質分解が異なる機構で制御されているということを示唆しています。

成果 3: タンパク質分解速度の種差は体節時計遺伝子だけではなく幅広く観察される。

目標 1 に対応します。体節時計をモデルに研究を行っているため、良く問われた疑問にどれほど普遍的であるのかという問いがあります。そこでゲノムワイドにタンパク質分解速度の測定を行いました。その結果、Hes7 等の体節時計遺伝子だけにとどまらず幅広い遺伝子において種間の差が見られました。事前には種差を有する特別なグループ(局在・機能・ドメインなど)を期待していましたが、解析の結果、ほとんどバイアスは見られませんでした。

(2) 詳細

目標 1: 時間の違いを生み出すメカニズムの解明

どの遺伝子について種差が見られるかという疑問に答えるために、ゲノムワイドにタンパク質分解速度の測定を行いました。その結果、Hes7 等の体節時計遺伝子だけにとどまらず幅広い遺伝子において種間の差が見られました。事前には種差を有する特別なグループ(局在・機能・ドメインなど)を期待していましたが、解析の結果、ほとんどバイアスは見られませんでした。タンパク質分解はプロテアソーム系とオートファジー系の 2 つに大別されるのですがその両方ともに種差があることもデータは示唆しています。

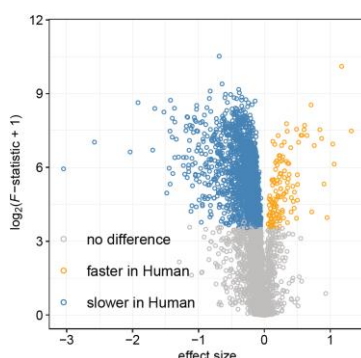


図 1. ゲノムワイドなタンパク質分解速度測定
青の点はヒト細胞でより遅い分解を示した遺伝子。黄色の点はマウス細胞で遅い分解を示した遺伝子。ヒト細胞で遅い分解を示す傾向が見られる。

どの分解プロセスにおいて種間の差が見られるのかといった疑問について、分解測定に不安定化したルシフェラーゼを用いたところ、核移行が律速になり、その移行速度に種間の差が存在することを見出しました。ここで強調しておきたいのは、核移行が特別なのではなく、反応を進める分子間の相互作用がマウスのほうが高頻度で起こっているという可能性です。

遺伝子発現に要する時間に関しては、ランダムに 10 個程度遺伝子発現コンストラクトを設計し、種間で違いが見られるかということ調べました。その結果、遺伝子間で時間は異なるものの、どの遺伝子もヒトでより長い時間を示すという結果が得られました。

目標 2: 体節時計周期の操作

代謝阻害剤を用いてマウスの時間を遅くすることができました。本研究では解糖系と電子伝達系を阻害する阻害剤がそれぞれ 1 時間程度マウスの時間を延長し、組み合わせることでヒトと同程度まで延長できることを見出しました。興味深かったのが、解糖系の阻害剤はタンパク質分解を、電子伝達系の阻害剤はスプライシング反応を遅らせた点です。さらにまた別の電子伝達系の阻害剤はタンパク質分解を遅らせました。当初はマウスとヒトの違いのように遺伝子発現と分解の両方が相似的に遅延することを予想していたのですが、実際は各阻害剤が各々の遅延対象を持つことがわかりました。これは遺伝子発現と分解時間を決定するメカニズムが異なることを示唆しています。

また、この解糖系の阻害剤存在下でタンパク質分解をゲノムワイドに測定した結果、ヒトと同程度に遅延が見られていました。興味深い点は、阻害剤下では種間の時と比べてより多くの遺伝子で遅延が起こっていた点です。マウスとヒトでは相似的な違いだけでなく、種特異的な違い(個体レベルでいえばしつぽがあったり、毛におおわれていたり)をもちます。この相似的な違いと種特異的な違いを見分けるという点で、種間比較に加えて、少ない摂動で人工的に時間スケールが改変された細胞を生み出す実験は種特異的な違いを取り除くという点で有用であると考えられます。

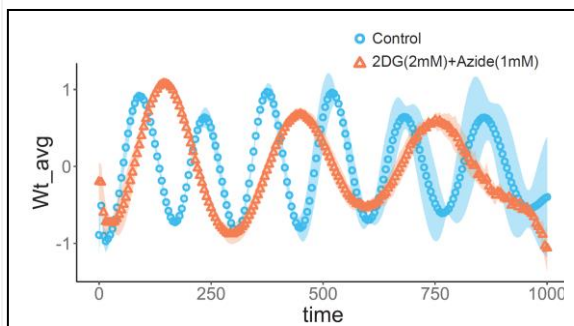


図 2. 代謝阻害剤による周期延長
解糖系阻害剤 2-DG と電子伝達系阻害剤 Azide でマウス細胞を処理することで 2.5 時間から 5 時間への周期延長が見られた。

目標 3: マウスとヒト以外の種の導入

マウス(2 時間)とヒト(5 時間)に加えて、ウサギ(2.5 時間)・ウシ(4 時間)・サイ(4 時間)・マーモセット(6.5 時間)の体節時計の試験管内再現に成功しました。体節時計を部分に分けて測定比較したところ、スプライシング・タンパク質分解ともに非常に強いスケールング(ここでは体節時計周期が 2 倍になった時、スプライシング・タンパク質分解ともに 2 倍となる)を示しました。一方、代謝を解糖系と電子伝達系に分けて測定したところこちらはスケールングを示しませんでした。マウスとヒトの 2 点だけでは代謝もスケールングしているように見えるのですが、多点で見たときにはスケールングしていませんでした。これは多点の利点といえます(半面手間は非常にかかりますが)。もう 1 つの発見は、ゲノムワイドな遺伝子発現量測定から得られました。各種の遺伝子発現を測定し、主成分分析を行ったところ、第一成分軸に各種が時間ス

ケールの順番に並びました。これが何を意味するかというと、遺伝子全体の発現量の情報があればその種の時間スケールが推定できるということです。さらに驚いた点は、この点は体節時計を有する細胞だけでなく幹細胞でも見られました。第一成分軸を構成する遺伝子群が時間を決めている要因となっているのか、進化の制約の結果であるのかは興味深い点です。

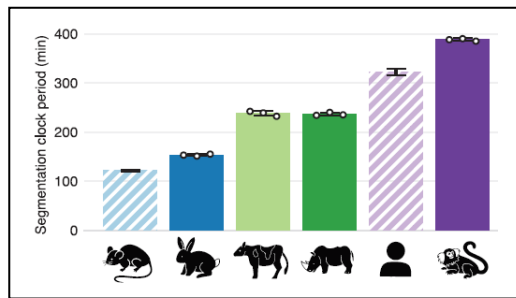


図 3. 試験管内で再現した体節時計周期

マウス、ウサギ、ウシ、サイ、ヒト、マーモセットの幹細胞から体節時計を再現した。

2～6.5 時間までの様々な時計周期が観察された。

3. 今後の展開

研究成果の概要で示した成果 2、3 に関してはできるだけ早く論文として発表したいと思います。

本領域目的と当研究を照らし合わせたところ、最大の課題は“どのゲノム領域が生物種ごとの時間を規定しているのか”というものです。当研究期間に得られた情報からの私の推測は、複数のゲノム上の違いの蓄積で種間の違いは生じたというもので、決して 1 つの遺伝子や領域では説明できないというものです。この推測が正しい場合、研究のねらいに書いた人工進化の実験が必要と考えています（もちろん地道な種間比較実験の上に成り立つものです）。これまでモデル生物を用いて行われてきた生き物の共通性・普遍性を明らかにしてきたアプローチに対して、ヒトという固有の種がどのようにして実現しているのか（体節時計に関して言うならなぜ 2 時間ではなく 5 時間なのか）を明らかにする方法論を生み出したいと考えています。そしてそれは将来、時間やサイズの操作につながる研究になると期待しています。具体的な期間として、ゲノム摂動による人工進化を 5 年程度で実装できれば良いと考えています。

4. 自己評価

研究目的の達成状況に関しては、おおむね順調に進んでいると思います。ただ、種間の反応速度差を生み出すメカニズムにもう少し迫っても良かったのではないかと思います。この点に関しては、現在計画している転写時の RNA 可視化実験で進展が見られることを期待しています。研究実施体制に対しては、私自身の実験量が少なかったと思います。研究費執行状況に関しましては、十二分な額を頂き自由にやらせていただきました。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果に関しまして。本研究計画の社会・経済への最終目標は“生物の時間やサイズを操作する”、“ゲノム配列から生物全体を予測する”の 2 点であり、その価値は大きいと思っています。問題は実現できるかであって、現在はその基礎的な部分にとどまっていると思います。この基礎的な部分は成果予測が難しく、うまくいかない実験がほとんど

ですが、しっかりとやれていると思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文) 発表

研究期間累積件数: 2件

1. *Sanaki-Matsumiya M, Matsuda M, Gritti N, Nakaki F, Sharpe J, Trivedi V & *Ebisuya M.
Periodic formation of epithelial somites from human pluripotent stem cells.
Nat. Commun., 13, 2325, doi: 10.1038/s41467-022-29967-1 (2022).

本研究計画は主に 2 次元培養での体節時計を扱っていたのですが、3 次元でのヒト体節時計の再現に取り組んだのがこの仕事です。この 3 次元での誘導系では体節時計の再現にとどまらず、さらに高次の組織誘導である体節構造の再現にも成功しました。

2. Lázaro J, Costanzo M, Sanaki-Matsumiya M, Girardot C, Hayashi M, Hayashi K, Diecke S, Hildebrandt TB, Lazzari G, Wu J, Petkov S, Behr R, *Trivedi V, *Matsuda M & *Ebisuya M.
A stem cell zoo uncovers intracellular scaling of developmental tempo across mammals.
Cell Stem Cell, 30, 938-949 (2023).

幹細胞動物園を用いた時間研究の実験系を立ち上げました。様々な生物種の幹細胞を用意し、それぞれの種で体節時計を試験管内で再現し、種間比較を行いました。その結果、種を超えて体節時計周期とスプライシング反応・タンパク質分解速度にはスケーリング側が成り立つことがわかりました。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

該当なし