

転写回路全体の構造と機能が明らかになってきた。この転写翻訳の負のフィードバックに基づく振動子形成は、数理モデルによる定量的な理解が進み、また我々は、この仕組みが哺乳類の概日時計に重要な役割を果たすことを実験により示すことに成功している。

2つめは、たんぱく質の可逆的な翻訳後修飾によるものである。このたんぱく質修飾に基づく自律振動子は、化学修飾を触媒する酵素と、修飾を受ける基質の組み合わせによって、基質の修飾の程度が時間とともに変動することで機能する。このような機構は、シアノバクテリアの概日時計で重要な役割を果たすことが示されてきたが、シアノバクテリア概日時計を担うたんぱく質には、多くの基質や酵素にはみられないいくつかの特徴的な性質があるために、たんぱく質修飾に基づく振動子が一般的な酵素や基質を用いてつくられるのか、そしてそのために必要な最低条件がなにかは、十分には理解されていなかった。しかしながら、一般的な酵素と基質の反応機構を用いた数理モデルを解析することで、たんぱく質修飾に基づく振動子をつくるための一般的に必要な条件が明らかになってきた。

そこで本論では、哺乳類概日時計でのこれまでの研究を中心に概説することで、この2つの発振原理の理解の現状を紹介する。

## 1. 概日時計

概日時計は、バクテリア、ショウジョウバエ、マウス、ヒトなど多くの生物種に存在し、哺乳類では、睡眠・覚醒、血圧、体温、ホルモン分泌などの広範な生理機能に影響を与える重要なシステムである。この概日時計は、約24時間周期で数多くの遺伝子がリズムカルに機能する複雑な遺伝子ネットワークからなる。

哺乳類概日時計の転写ネットワークについては、これまでに3つの制御DNA配列 (E/E'-box、D-box、RRE：それぞれ朝・昼・夜の基本時刻に遺伝子を発現させるゲノム上のDNA配列) と約20個の時計遺伝子が互いに制御しあうことが明らかになっている<sup>2,3)</sup>。時計遺伝子は、24時間周期で発現量が変動し、かつおのおの特定の制御DNA配列に結合して下流の時計

遺伝子の発現を制御する。さらに、どの遺伝子領域にどの制御DNA配列が存在するか、どの制御DNA配列にどの時計たんぱく質が結合するかなど、一組ずつの制御関係も明らかになっている。

我々は、これらの知見に基づき、制御DNA配列と時計遺伝子が互いに制御しあう複雑な「設計図」の全体像 (転写ネットワーク、図1) を予測した<sup>3)</sup>。しかしこの設計図は、一組ずつの制御関係を示してはいるが、この設計図の構造に沿うことで、動的な概日時計を完全に構築できるかは自明

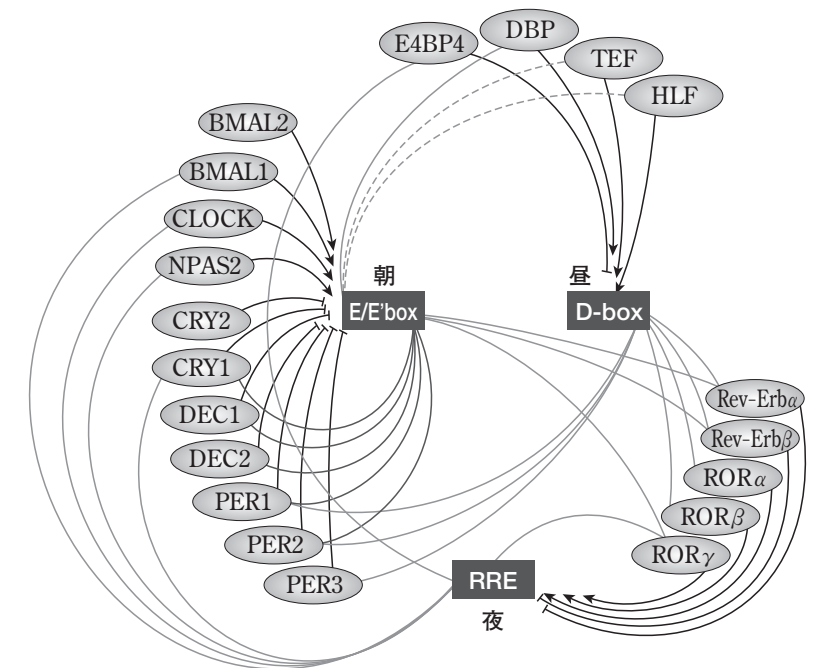


図1 哺乳類概日時計の転写ネットワークの設計図  
3つの転写制御DNA配列 (E/E'-box：朝配列、D-box：昼配列、RRE：夜配列) と約20個の時計遺伝子が互いに制御しあっている。四角形はゲノム上の転写制御DNA配列、楕円形は時計遺伝子 (転写活性化因子、転写不活性化因子)。曲線は転写因子とそれらが作用する制御DNA配列をつなぐ線 (矢印：活性化、T字：不活性化) と、各転写制御DNA配列を持つ時計遺伝子をつなぐ線 (無印)。

ではない。そこで各構成要素を人工的な部品に置き換え、人工転写ネットワークを組み上げ、設計図の設計原理の解明・証明を試みる戦略（再構成による哺乳類培養細胞中での転写制御シミュレーション）を採用することにした。

## 2. 哺乳類概日時計の転写回路

概日時計の複雑な転写ネットワーク（図1）を単純化すると、時計遺伝子（転写制御因子）と制御DNA配列を含む標的遺伝子のプロモーター（標的プロモーター）という各部品からなる基本セットに分解できる。我々は、この最小単位の基本セットを、哺乳類培養細胞・人工転写制御因子・人工標的プロモーターを用いて人工的に組み上げ、その動的な挙動を解析する実験系を立ち上げた（図2A）<sup>1)</sup>。まず、人工転写活性化因子には、酵母の転写因子GAL4のDNA結合領域とウイルスのVP16遺伝子の転写活性化領域をつないだ。人工転写不活性化因子には、GAL4のDNA結合領域のみを用いた。これら人工転写制御因子は、その上流に朝・昼・夜いずれかの制御DNA配列を配置することで任意の基本時刻に発現するように制御できる。人工標的プロモーターには、GAL4結合配列UASを配置し、人工転写活性化／不活性化因子を人工標的プロモーター上で競合的にはたらかせることで概日時計の転写制御の基本セットを模倣した。また、この人工転写ネットワークのダイナミクスの測定には、我々がこれまで構築してきた、生物発光を用いた哺乳類培養細胞における遺伝子発現変動の自動検出系を利用し<sup>2~4)</sup>、たんぱく質分解シグナルPEST配列を付加して半減期を短くしたルシフェラーゼ（dLuc）レポーターの発光活性をモニタリングすることで、上流の人工標的プロモーターの活性を測定した（図2A）。細胞はマウス由来の概日時計を持つ培養細胞NIH3T3<sup>5,6)</sup>を用いた。ここでは人工転写制御因子のプロモーター領域を細胞の概日時計の制御下に置くことで、人工転写制御因子がはたらく時刻を既定している。したがって、この実験系では、人工転写制御因子がはたらく時刻と、それによって人工標的プロモーターが活性化する時刻の関係を知らることができる。概日時計の基本セ

ットを構成する転写制御因子が発現する時刻がかわったときに、それらの標的プロモーターの転写出力が示す時刻がどう変化するかを細胞内でシミュレーションする実験系といえる。

## 3. 設計図から予測された転写制御機構の証明

概日時計の転写ネットワーク（図1）を、ひとつずつの単純な制御に分解すると、

- ① 朝に発現する転写活性化因子*Dbp*と、夜に発現する転写不活性化因子*E4bp4*が、昼の転写出力を制御
- ② 昼に発現する転写活性化因子*Rora*と、朝に発現する転写不活性化因子*Rev-Erba*が、夜の転写出力を制御

という構造が浮かび上がった。そこで、前述の人工転写制御ネットワークを用いて、人工転写活性化因子と人工転写不活性化因子をそれぞれの時刻（朝・昼・夜）で発現させた。人工標的プロモーターからの転写出力のピーク時刻を解析した結果、

- ① 人工転写活性化因子を朝、人工転写不活性化因子を夜に発現させると、人工標的プロモーターからの転写出力は昼に現れた（図2B）。
- ② 人工転写活性化因子を昼、人工転写不活性化因子を朝に発現させると、人工標的プロモーターからの転写出力は夜に現れた（図2B）。

このことから、①朝の転写活性化因子と夜の転写不活性化因子が、昼の転写出力を再現できること、②昼の転写活性化因子と朝の転写不活性化因子が、夜の転写出力を再現できること、が明らかになった<sup>1)</sup>。これらは、冒頭的设计図から予測した構造による制御と一致した。このように再構成系を用いた細胞内シミュレーションにより、生体内での動的な制御から生まれる動的な出力を再現できたことで、概日時計の基本時刻である「昼」と「夜」をつくる設計原理を初めて証明することができた<sup>1)</sup>。

さらに、朝・昼・夜の基本時刻の人工転写制御因子を組み合わせただけで、明け方、午後、夕方、深夜に発現のピークを示す転写出力を創出できた（図2B）<sup>1)</sup>。哺乳類の体内では、多くの遺伝子の発現が24時間周期で振

動し、発現のピーク時刻は基本時刻以外にもさまざまなものが24時間にわたり存在する。本実験系でさまざまな転写出力を創出できたことは、これら多くの遺伝子の転写制御を理解する助けとなる。

## 4. 朝と夕方の転写制御

### 4-1 再構成できていない位相一朝

しかしながら上述の実験では、さまざまな時刻を再現できたにもかかわらず、基本時刻のなかでもっとも重要とされる<sup>4,7)</sup>「朝」をつくりだせな

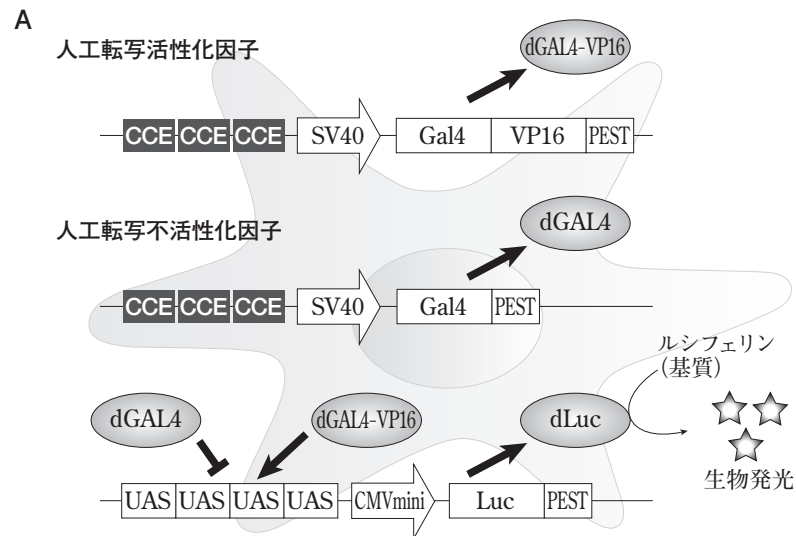


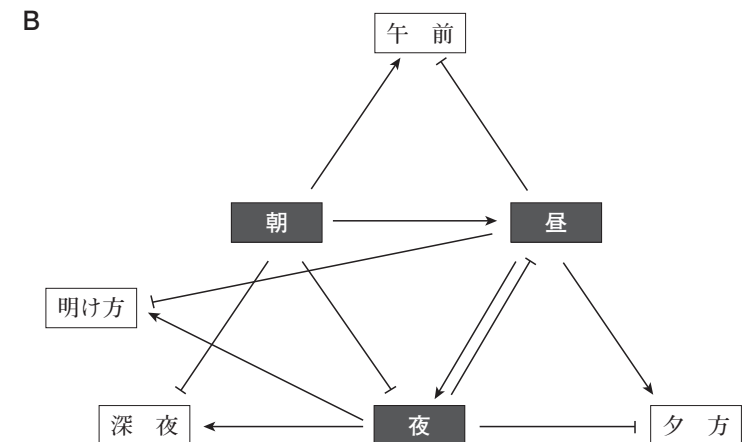
図2 人工転写制御ネットワーク

3つの転写制御DNA配列 (E/E'-box: 朝配列、D-box: 昼配列、RRE: 夜配列)  
 A: 概日時計の最小単位の基本セットを模して設計した人工転写制御ネットワーク。哺乳類培養細胞NIH3T3に導入した人工転写活性化/不活性化因子の発現は、細胞内在性の概日時計により転写制御DNA配列 (CCE; Clock Controlled Element, E/E'-box, D-box, RREのいずれか) を介して制御される。人工標的プロモーターからの転写発現は細胞内在性の時計システムには直接的には制御されず、GAL4結合配列であるUASを介して人工転写活性化/不活性化因子によって制御される。人工ネットワークの転写出力は、dLucの発現を生物発光を指標に検出する。

かった。再構成実験は、事前に同定した「部品」を、想定した構造に組み上げることで「システム」を再現できるか検証する手法である。再現できなければ、想定した構造になにか理解が不十分な部分が残されているということに気づくこともできる。

概日時計の転写ネットワーク上の朝の制御について、なにを理解していないのか？

転写ネットワークの設計図 (図1) に立ち返り検討し、*Cry1*という転写抑制因子に注目した。*Cry1*は夕方に発現し<sup>2,3)</sup>、朝の制御DNA配列E/E'-boxの活性を抑制する<sup>8-12)</sup>。つまり、夕方の抑制によって、その反対側の「朝」の活性をつくりだす構造が考えられる。しかし、*Cry1*を夕方という基本時刻からはずれた時刻に発現させる制御メカニズムは未解明であった。また、朝の制御DNA配列を強く抑制する*Cry1*が夕方に発現することで形成される「遅れを持った負のフィードバック」が概日時計の動作原理であると考



B: 人工転写制御ネットワークで観察した人工転写制御因子と人工標的プロモーターの転写出力の時間的關係。3つの基本位相からさまざまな時刻の遺伝子発現を創出した。四角形は人工転写制御因子の発現時刻、または人工標的プロモーターの転写出力の時間。直線は、人工転写制御因子の発現時刻と人工標的プロモーターの転写出力の時間をつなぐ (矢印: 活性化、T字: 不活性化)。