

2008年9月16日

独立行政法人 理化学研究所

## ゲノムにある「朝」・「昼」・「夜」の3種のスイッチを網羅、データベース化

- 「朝」・「昼」・「夜」のスイッチの人工的な作成も可能に -

精神不安や体の不調を訴える人には、生体内でリズムを刻んでいる体内時計の働きが狂っていることが原因となっている場合が多くあります。ヒトをはじめとする哺乳類のゲノム上には、体内時計によって発現が制御される遺伝子が数百個もあることや、朝・昼・夜に遺伝子の発現をスイッチのように切り替える3種類の制御DNA配列が、体内時計の制御に中心的な役割を担っていることなどが知られてきています。しかし、これら3種類の制御DNA配列の作用を受けている遺伝子は、一部しか明らかではありませんでした。近年、生物のゲノム配列の解読が進み、複数の生物種のゲノム配列の比較ができ、哺乳類の間で共通に存在する配列を網羅的に解析することが可能となりました。

発生・再生科学総合研究センターシステムバイオロジー研究チームは、インテックシステム研究所らとともに、ヒトとマウスのゲノムにある朝・昼・夜のスイッチとなる体内時計の制御DNA配列を網羅的に解析し、データベース化することに成功しました。また、生命現象の新たな解析手法であるシステムバイオロジーを駆使したデータベースを活用し、このスイッチの役割を果たす制御DNA配列を、コンピューターを使って人工的に作成することにも成功しました。さらに、朝・昼・夜のスイッチが、転写制御因子によってどのように制御されているかも明らかにしました。

ゲノム上にある体内時計に制御されるスイッチが網羅できたことで、体内時計による遺伝子制御機構の理解が急速に進むと考えられます。今後、体内時計とさまざまな疾患との関係を解明し、薬が効く時間、副作用が起こる時間の予測などへ応用することが期待できます。

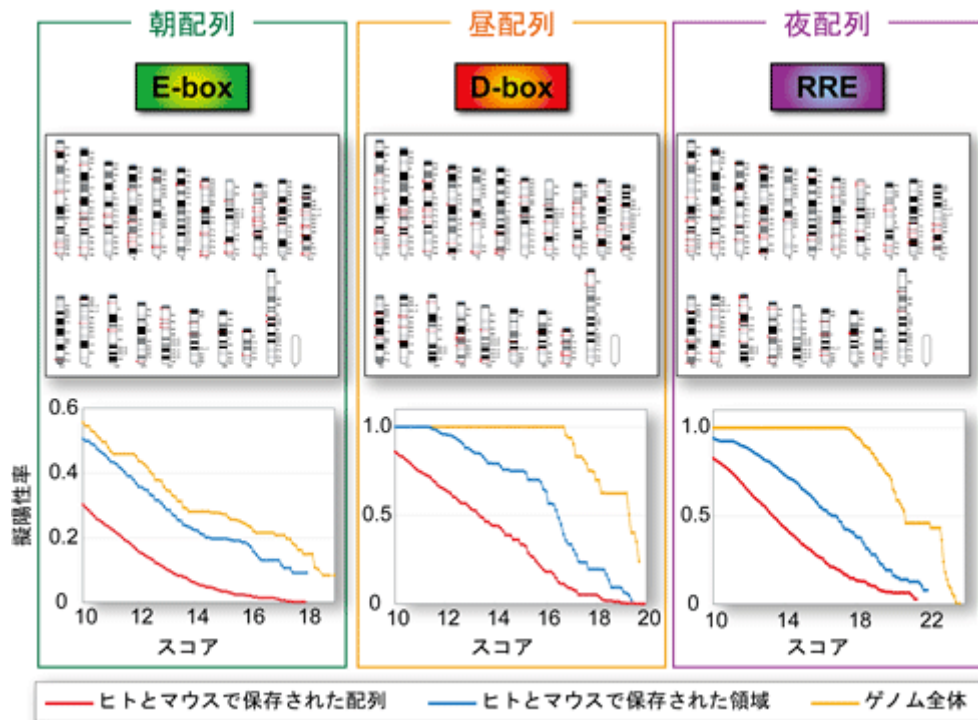


図 ゲノムに存在する「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」を網羅

2008年9月16日  
独立行政法人 理化学研究所

## ゲノムにある「朝」・「昼」・「夜」の3種のスイッチを網羅、データベース化

- 「朝」・「昼」・「夜」のスイッチの人工的な作成も可能に -

### ◇ポイント◇

- ・ゲノム上の「朝」・「昼」・「夜」のスイッチとなる制御 DNA 配列を網羅
- ・コンピューターを用いて、体内時計のスイッチとなる制御 DNA 配列の作成に成功
- ・病気が起こる時間・薬が効く時間・副作用が起こる時間の予測への応用も視野に

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、ヒトとマウスのゲノムにある「朝」・「昼」・「夜」のスイッチとなる体内時計の制御 DNA 配列を網羅し、データベース化することに成功しました。これは理研発生・再生科学総合研究センター（竹市雅俊センター長）システムバイオロジー研究チーム 上田泰己チームリーダーらと、株式会社インテックシステム研究所、近畿大学の重吉康史教授、ペンシルバニア大学のジョン・ホゲネシュ（John B. Hogenesch）准教授らのチームとの共同研究による成果です。

ヒト・マウスなどの哺乳類の体内時計では、3種類の制御 DNA 配列が「朝」・「昼」・「夜」の遺伝子発現のスイッチの役割を果たしています。しかし、ゲノム上に存在するこの3種類の制御 DNA 配列は、それぞれ一部の配列だけしか明らかになっていませんでした。研究グループは、さまざまな実験技術とコンピューターによる解析を組み合わせた、生命現象の新たな解析方法であるシステムバイオロジーを駆使し、ゲノム上の制御 DNA 配列を網羅したデータベースを構築しました。さらに、「朝」・「昼」・「夜」のスイッチの役割を果たすことができる制御 DNA 配列を、コンピューターを用いて人工的に作成することに成功しました。同時に、この人工的な配列を、実験とコンピューターシミュレーションによって解析することで、「朝」・「昼」・「夜」のスイッチが、どのように時計遺伝子（転写制御因子）によって制御されているのかを明らかにしました。体内時計は、ヒトの健康や病気の治療に影響を与える重要な生体システムです。今回、ゲノムにある体内時計のスイッチを網羅することに成功したことで、今後、さまざまな疾患と体内時計との関連性の解明や、薬が効く時間・副作用が起こる時間の予測への応用が期待されます。

本研究は、理研の「産業界連携制度」、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）産業技術研究助成事業、文部科学省「ゲノムネットワークプロジェクト」による助成により進められました。本研究成果は、米国科学アカデミー紀要『*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: PNAS*』9月15日の週に、オンライン掲載されます。

### 1. 背景

体内時計は、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する生命システムで、ヒトなどの哺乳類の場合には、睡眠・覚醒、血圧・体温、

ホルモン分泌といった広範な生理機能に影響を与えていると考えられています。また、体内時計と投薬における薬効の関係などから、さまざまな疾患への影響も明らかになりつつあります。研究グループはこれまでに、哺乳類のゲノム上に体内時計によって発現制御を受ける遺伝子が数百個も存在することや(図1)、「朝」・「昼」・「夜」にスイッチのように遺伝子発現を切り替えるゲノム上の3種類の制御DNA配列(朝配列: E-box、昼配列: D-box、夜配列: RRE)が、その制御の中心的な役割を果たしていることを明らかにしてきました(図2)。しかし、哺乳類のゲノム上に存在する遺伝子のうち、どの遺伝子がこれらの3種類の制御DNA配列によって制御を受けているかについては、網羅できていませんでした。一方、近年、ヒトを代表とするさまざまな生物種のゲノム配列の解読が進み、ゲノム配列の包括的な解析が可能になるとともに、ヒトとマウスといった複数の生物種のゲノム配列を比較することで、長年の進化の過程において生物種間で保存されている、生物にとって重要な制御DNA配列を調べることも可能になりました。同じ哺乳類であるヒトとマウスの間で多くの遺伝子が共通して存在しているのと同様に、その遺伝子の発現を制御している制御DNA配列も哺乳類の間で同じように存在しています。

そこで、研究グループは、ヒトとマウスのゲノムを比較するとともに、統計的なモデルを組み合わせ、ゲノム上に存在する「朝」・「昼」・「夜」の制御DNA配列について網羅しました。

制御DNA配列の役割を詳細に明らかにしていくためには、実際の生物のゲノム上に存在する配列を網羅してその機能を調べることに加え、実際に働く制御DNA配列を人工的に作成することも重要です。人工的に配列を作成することができると、その制御DNA配列の特徴を理解し、その機能について詳細な解析が可能になります。

そこで、研究グループでは「朝」・「昼」・「夜」のスイッチとなる制御DNA配列を人工的に作成し、詳細な解析を行いました。

## 2. 研究手法と成果

### (1) コンピューターでのデータベース構築と制御DNA配列の検索、実験による検証

研究グループではこれまでに、約20個の時計遺伝子(転写制御因子を含む)が、「朝」・「昼」・「夜」の3種類の制御DNA配列によって制御されていることを明らかにしました。具体的には、ヒトとマウスのゲノム配列を比較することで探索し、哺乳類の培養細胞系での体内時計システムの観察手法を用いて実験を行い、検証してきました(*Nature*, Ueda *et al* 2002, *Nature genetics*, Ueda *et al* 2005)。今回の研究では、このヒトとマウスのゲノム配列を比較する方法を発展させ、長年の進化の過程でヒトとマウスの間で保存されている、生物にとって重要な制御DNA配列を、コンピュータープログラムを用いて探索してデータベース化し、遺伝子の発現の制御領域である「プロモーター\*1」と「エンハンサー\*1」を網羅した「哺乳類 プロモーター・エンハンサー データベース」を構築しました(図3)。このコンピューターを用いた解析は、研究グループの熊木勇一客員研究員(本務:株式会社インテックシステム研究所)らが行いました。このデータベース(<http://promoter.cdb.riken.jp/>)は理研から公開しており、非営利の研究目的に無料で使用できます。

次にこのデータベースを利用して、「朝」・「昼」・「夜」の制御DNA配列についてゲノムから探索を行いました。その探索の方法として、「隠れマルコフモデル」という方法を用いました。この「隠れマルコフモデル」は、人間の喋る言葉の音声認識の分野でも用いられている統計的な方法で、声やDNA配列の特徴を抽出したモデルをコンピューター内に構築するのに優れています。この方法でモデルを構築するためには、正解となる配列や声の「見本」となるデータ（トレーニングデータ）が必要です。

そこで、これまでに研究グループが同定し、実際に細胞内で体内時計の制御DNA配列として働くことを示した、いくつかの朝配列 (E-box)、昼配列 (D-box)、夜配列 (RRE) を見本とし、これらの配列の特徴を抽出したモデルを構築しました。そして、同じような特徴を持つ配列をコンピューターで検索した結果、1,108 の朝配列 (E-box)、2,314 の昼配列 (D-box)、3,288 の夜配列 (RRE) の制御DNA配列の候補を探索することができました。これらの配列

(<http://promoter.cdb.riken.jp/circadian.html>) についても理研から公開しています (図 4)。

また、検索した制御DNA配列が、細胞内や生体内で実際に働いているのかどうかを、哺乳類の培養細胞系での体内時計システムの観察手法と定量的PCR法<sup>\*2</sup>を用いた実験で検証しました。探索した「朝」・「昼」・「夜」の制御DNA配列のうち各 10 個を実験で検証した結果、それぞれ 4 個、7 個、6 個のDNA配列が「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」として、培養細胞中で働くことが明らかになりました (図 5A)。さらに、これらの培養細胞中で働く 17 個の制御DNA配列が発現制御する 17 個の遺伝子は、すべてマウスの生体内でも体内時計に制御されていることがわかりました (図 5B)。この結果は、研究で構築した「哺乳類 プロモーター・エンハンサー データベース」の有用性と、作成した「隠れマルコフモデル」の妥当性を示したことになります。以上の生物学的実験による解析は、研究グループの鶴飼(蓼沼)磨貴テクニカルスタッフ I らによって行いました。

## (2) コンピューターでの人工的な配列の作成、実験による検証と解析

コンピューター内に構築したモデルを用いることで、「朝」・「昼」・「夜」の 3 種類の配列について、それぞれ制御 DNA 配列として「働きそう」な配列と「働かなさそう」な配列を人工的に作成しました。この人工的な「朝」・「昼」・「夜」の配列が、実際に働くかどうかを実験により検証した結果、培養細胞の中で予測通りに働くことを示しました (図 6)。それでは、これらの人工的な「働く」配列と「働かない」配列は、どのように制御されているのでしょうか？これまでの研究から、「朝」・「昼」・「夜」配列には、遺伝子の発現を促進するタンパク質 (転写活性化因子) と抑制するタンパク質 (転写不活性化因子) の 2 種類の転写制御因子が、時間をずらして結合し、機能を発揮することで、体内時計によって制御される遺伝子発現が生み出されることがわかっていました。そこで、研究グループは、「働く」配列では転写制御因子が強く結合し、「働かない」タンパク質では転写制御因子が弱く結合しているのではないかと予想し、実際に配列と転写制御因子の結合の強さを測定しました。その結果、昼配列 (D-box) と夜配列 (RRE) については、予想通り「働く」配列では強く結合し、「働か

ない」配列では弱く結合していることを示すことができました。ところが驚いたことに、朝配列(E-box)では、転写活性化因子が「働かない」配列に「働く」配列よりも強く結合するという結果になりました(図7)。

### (3) コンピューターでのシミュレーションでの実験結果の解析

前述のような意外な結果がどうして起きているのかを解釈するために、転写活性化因子と転写不活性化因子が、配列にどのように結合して制御を行っているかについて、コンピューターによるシミュレーションを行いました。その結果、制御 DNA 配列への転写制御因子の結合が弱すぎてもだめ、強すぎてもだめで、転写活性化因子と転写不活性化因子が、ほどよく同じ程度に DNA 配列に結合することが、制御 DNA 配列がよく「働く」ために重要という原理を明らかにしました。

今回、ゲノム上で「朝」・「昼」・「夜」のスイッチとして働く「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」について網羅し、データベース化することに成功しました。また、「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」について、その制御 DNA 配列を人工的に作成することができました。そして、これらの人工的な配列について詳細な解析を行うことで、ゲノム上の体内時計のスイッチを制御する機構の原理を明らかにしました。

今回の研究では、コンピューターと実験によるさまざまな解析方法を組み合わせています。この新しい生命現象の解析法であるシステムバイオロジーによる研究手法は、体内時計を含む動的で複雑な生命システムの研究において、有用な戦略となり得ます。今回の研究により、生体内で体内時計が及ぼす影響の理解について重要な一歩を進めることができました。

## 3. 今後の期待

体内時計を含む生命システムの仕組みを解明するには、今後もさらに研究を重ねる必要がありますが、今回の研究により、ゲノムにある体内時計を制御するスイッチが網羅されたことで、体内時計による生体内での遺伝子の制御機構の理解が急速に進むと考えられます。今後、体内時計とさまざまな疾患との関連性を解明し、薬が効く時間・副作用が起こる時間の予測への応用が期待されます。

さらに、今回構築した「哺乳類 プロモーター・エンハンサー データベース」や、人工的な制御 DNA 配列を作成するアプローチが、体内時計を含むさまざまな遺伝子発現のネットワークや生命現象の解析に役立つことが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

発生・再生科学総合研究センター

システムバイオロジー研究チーム

チームリーダー 上田 泰己 (うへだ ひろき)

Tel : 078-306-3190 / Fax : 078-306-3194

神戸研究推進部企画課

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

## <補足説明>

### ※1 プロモーター、エンハンサー

遺伝子の発現を調節するような DNA 領域。この領域に転写因子などのタンパク質が結合することで、遺伝子の発現が調節される。遺伝子の転写開始点から近い転写調節 DNA 領域がプロモーター領域で、転写開始点からは隔たっている転写調節 DNA 領域がエンハンサー。

### ※2 定量的 PCR 法

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を応用した実験方法で、高感度・正確に遺伝子の発現を測定することが可能である。

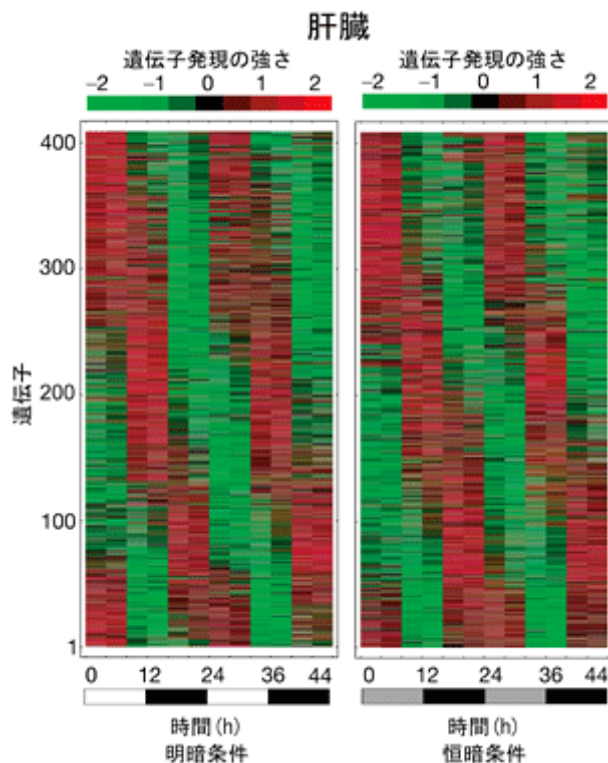


図 1 哺乳類体内時計によって制御される遺伝子群

マウスの肝臓において体内時計依存的に遺伝子の発現が変化する遺伝子の同定。研究グループはこれまでに、DNA チップを用いてマウスの遺伝子の発現を包括的に解析

するととともに、コンピューターを用いて体内時計依存的な遺伝子を同定する手法を開発している。その技術を用いて、マウスの肝臓などで数百の遺伝子が体内時計依存的に、さまざまな位相で発現している（さまざまな時間に遺伝子発現の強さのピークが来る）ことを明らかにした。

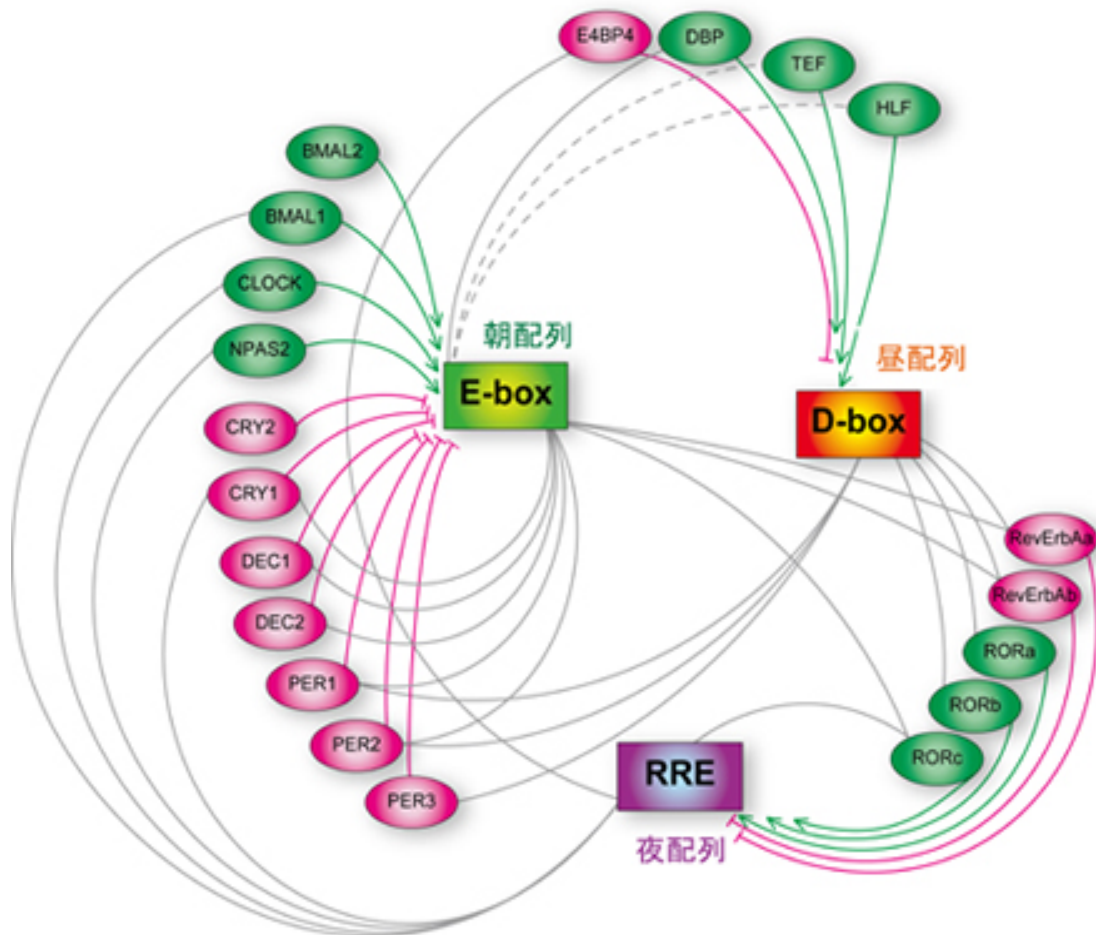


図2 「朝」・「昼」・「夜」の遺伝子ネットワーク

「朝」・「昼」・「夜」の3つの制御DNA配列と、これらの制御配列をコントロールする転写制御因子によるネットワーク。研究グループはこれまでに、「朝」・「昼」・「夜」の3つの配列が、体内時計による遺伝子発現の制御において中心的な役割を果たしていることを明らかにし、これらの3つの配列を制御している約20個の転写制御因子により、複雑な制御ネットワークが形成されていることを明らかにしてきた。



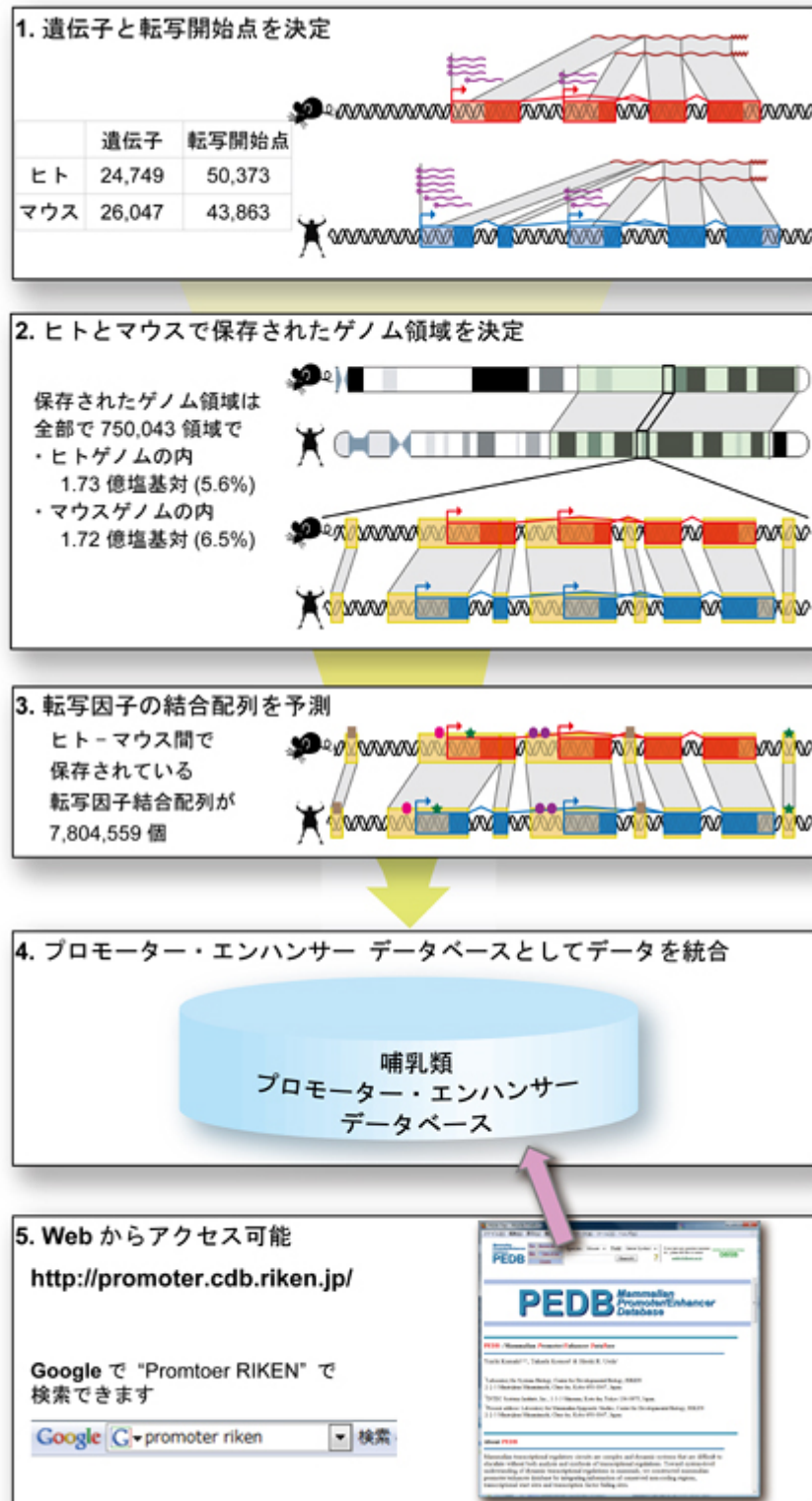


図 3 哺乳類 プロモーター・エンハンサー データベース

哺乳類 プロモーター・エンハンサー データベースの構築の概要。1. 遺伝子から転写された配列をゲノム配列に対して位置決めすることで、遺伝子および遺伝子の転写の開始部位を同定した。2. ヒトとマウスのゲノム配列を比較することで、ヒトとマウスの間で、進化の過程で保存されてきたゲノム領域の同定を行った。3. ヒトとマ

ウスの間で保存されているゲノム領域において、ヒトとマウスの両方で存在している転写因子の結合配列の予測同定を行った。4. これらの情報を遺伝子の機能の情報などと統合することで、哺乳類 プロモーター・エンハンサー データベースを構築した。5. このデータベースは Web からのアクセスが可能であり、世界の非営利目的の研究者に無料で公開 (<http://promoter.cdb.riken.jp/>) されている。

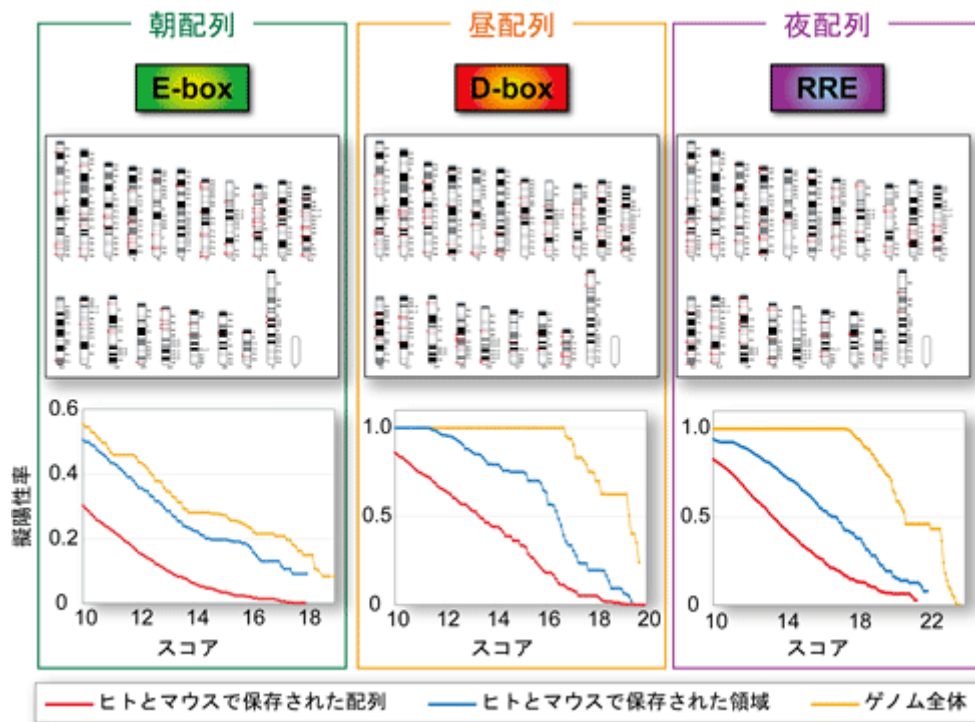


図4 ゲノムに存在する「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」を網羅

哺乳類ゲノムに存在する「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」を探索、網羅した。哺乳類プロモーター・エンハンサー データベースと「隠れマルコフモデル」を組み合わせることで、ゲノム上の各制御 DNA 配列の探索を行った。検出された配列はマウスゲノム上に偏りなく分布していた (図上)。また、探索を行う範囲が、①「ゲノム全体の場合」②「ヒトとマウスで保存された領域である場合 (領域としては保存されていても制御 DNA 配列がヒトとマウスの両方に存在しているとは限らない)」③「探索された制御 DNA 配列がヒトとマウスの両方に保存されて存在している場合」の3通りの方法で検索した結果、③の検索結果で、統計的に計算した擬陽性率 (間違いの確率) が最も低かった (図下)。この結果は、哺乳類 プロモーター・エンハンサー データベースを用いて探索を行うことにより、より確からしい制御 DNA 配列を検索可能であることを意味している。この方法により網羅した「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」は哺乳類 プロモーター・エンハンサー データベースの Web サイトにおいて全世界に公開されている。

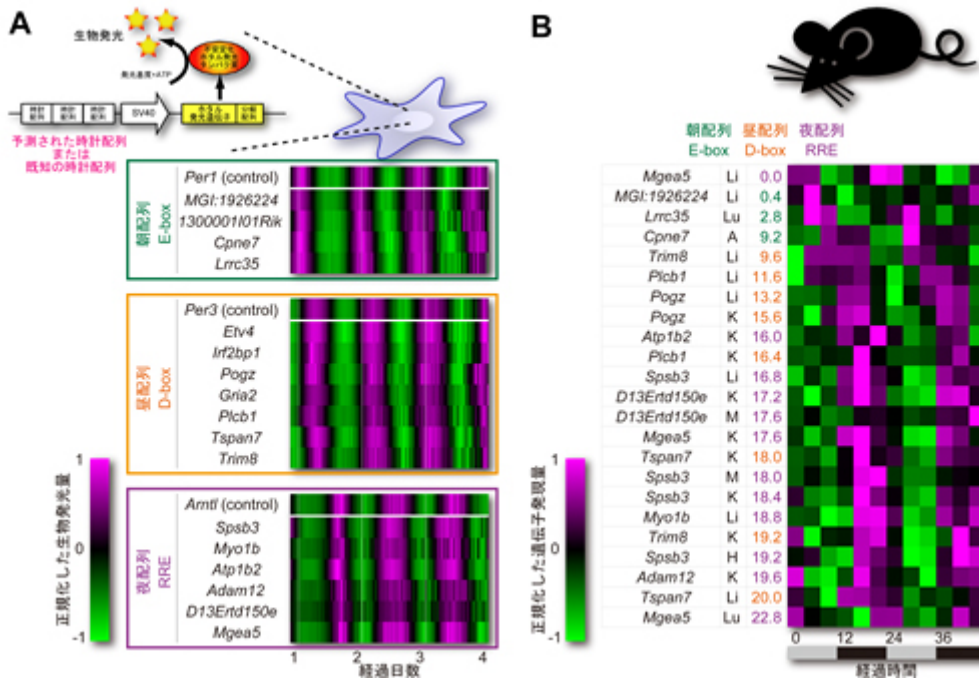


図5 「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」の機能の検証

コンピューターを用いて探索・網羅した「朝」・「昼」・「夜」の各制御 DNA 配列を実験により検証した。

(A) 各 10 配列の「朝」・「昼」・「夜」について、哺乳類培養細胞を用いた体内時計システムの観察手法を用いることで、これらの制御 DNA 配列が細胞内でそれぞれ「朝配列」・「昼配列」・「夜配列」として働くかどうかを調べた。その結果、朝配列の 4 個、昼配列の 7 個、夜配列の 6 個が、細胞内で体内時計依存的に 24 時間周期の遺伝子が発現していることが確認できた。これらの遺伝子は、制御 DNA 配列の種類に応じたタイミングでの振動を示し、制御 DNA 配列として機能することを検証できた。

(B) 次にこれらの 17 個の制御 DNA 配列によって制御される 17 個の遺伝子が、実際のマウスの生体内で、体内時計によって制御されているかどうかを、定量的 PCR 法を用いて検証した。その結果、13 個の遺伝子が、調べた 7 つの組織（大動脈、骨、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉：それぞれ図中で A, B, H, K, Li, Lu, M で表している）のいずれかで、体内時計依存的に遺伝子が発現していることが確認できた。これらの遺伝子は、それぞれの制御 DNA 配列に応じたタイミングで発現していた（図中の数字は発現が最も強い時刻で、数字の色は制御 DNA 配列の種類を示す）。

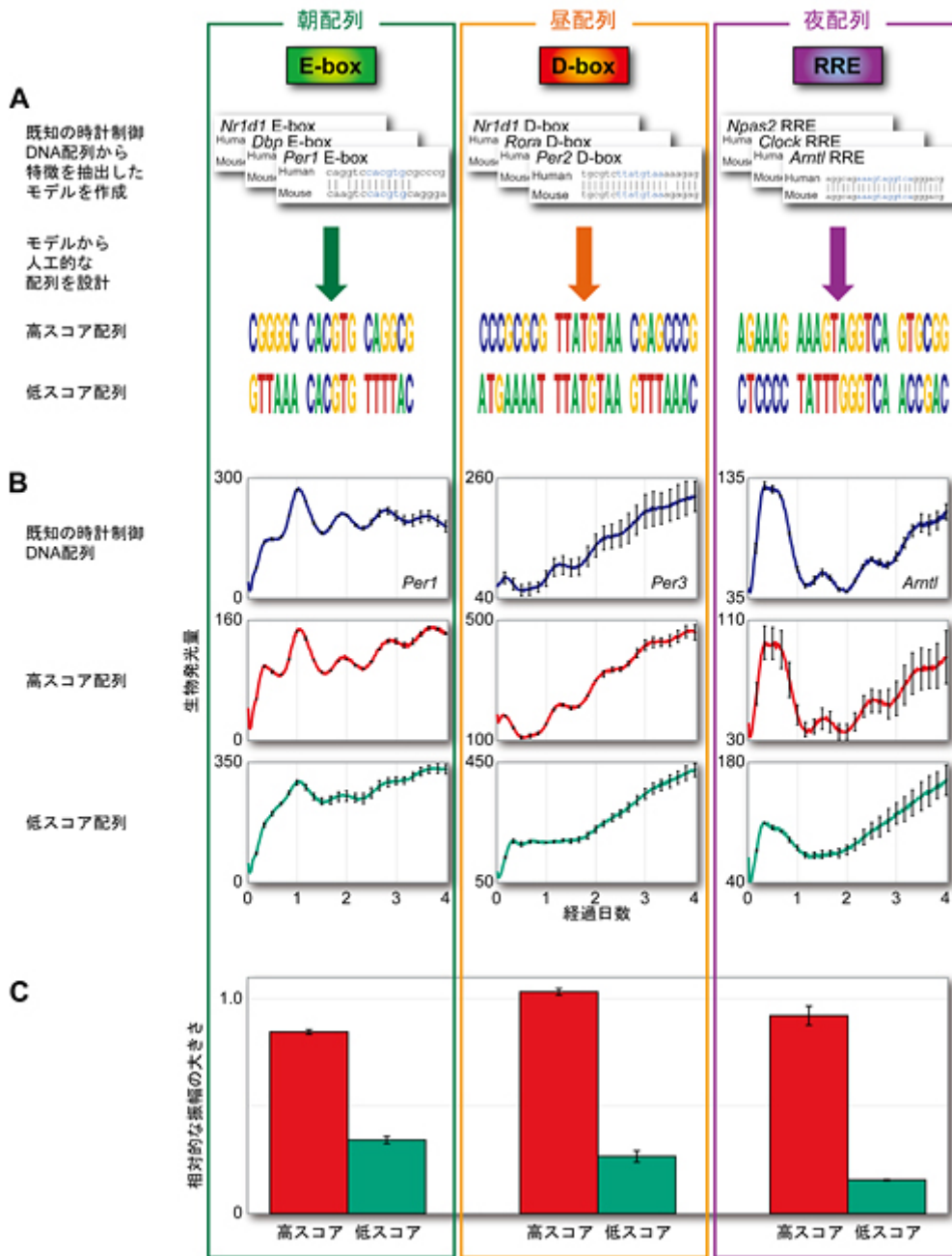


図 6 人工配列の設計と検証

人工的な「朝」・「昼」・「夜」の制御 DNA 配列を設計し、その機能を実験により検証した。(A) 既知の時計制御 DNA 配列を「見本 (トレーニングデータ)」として構築した「隠れマルコフモデル」を用いて、人工的な「働きそうな配列」(高スコア)と「働かなさそうな配列」(低スコア)を設計した。(B) これらの配列について、哺乳類培養細胞を用いた体内時計システムの観察手法を用いることで、「働きそうな配列」が「働く」ことと、「働かなさそうな配列」が「働かない」ことを確認した。つまり、予測した通りの人工的な制御 DNA 配列を設計することに成功した。(C) は生物発光、(B) の振動の振幅を数値化したもの。

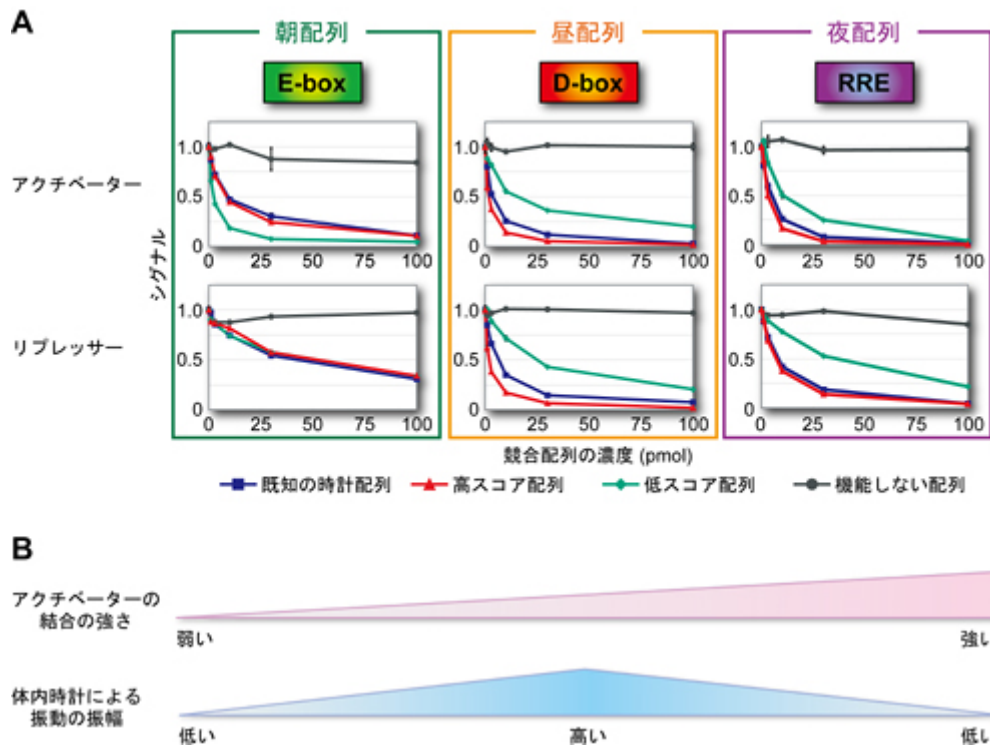


図 7 人工配列の機能解析

人工的な「朝」・「昼」・「夜」の制御 DNA 配列の機能を、実験とコンピューターシミュレーションにより解析した。

- (A) 人工的に設計した制御 DNA 配列と、転写活性化因子（アクチベーター）および転写不活性化因子（リプレッサー）との結合の強さを実験により測定した。「昼配列」と「夜配列」では、「働く配列」（高スコア配列）に「働かない配列」（低スコア配列）よりも強くアクチベーターとリプレッサーが結合した。しかし、「朝配列」ではリプレッサーは「働く配列」と「働かない配列」両方に同程度の強さで結合し、アクチベーターは「働く配列」よりも「働かない配列」により強く結合した。
- (B) 実験による結果を理論的に解釈するため、コンピューターによるシミュレーションを行った。その結果、①アクチベーターの制御 DNA 配列への結合が弱すぎる場合も強すぎる場合も、ともに「働かない」（体内時計による振動の低い振幅を示す）ことがわかった。つまり、「ちょうどいい強さ」でアクチベーターが結合することが、体内時計による振動の高い振幅を生み出す「働く」制御 DNA 配列に必要な条件であることを明らかにした。