

ゆらぎの増幅による概日リズムの破綻 ～細胞ゆらぎの実験と数理～

東京大学生産技術研究所：小林徹也

Institute for Industrial Science,
the University of Tokyo

近年、分子生物学・細胞生物学・発生生物学・免疫学など、これまでの理論研究と無縁に思われていた生物分野において、数理モデルや数理解析の手法を実験的研究に組み合わせる試みが活発になってきている（参考文献）。この背後にあるのがここ 10 年で分子生物学的な手法を補完する形で発展してきたバイオイメージング技術の存在である。

理論研究と親和性があまりなかった従来の分子生物学的研究は、生命現象とそれを司る物質の実態、具体的には主に対応する遺伝子の存在を同定することによって生命現象を記述しようとしてきた。このような方法論において現象の理解とは現象に対応する遺伝子を発見することであり、その応用とはその遺伝子を巧みに改変し、その結果として現れる生命現象の機能を制御することであった。もちろん、この時代にも理論生物学の分野からは「遺伝子のような静的な要素だけを見ても動的な生命を理解できるわけではない」という至極真実な指摘がされてはきた。しかし実際に遺伝子以外の何を調べられるか？という技術的な問題なると汎用的な方法論は存在せず、必然的に職人芸的な側面の強い研究が行われるか、大腸菌のような単純がゆえに遺伝子的な情報が最も早く解明されてしまった生物分野において研究が進められるだけであり、生命科学分野全体を巻き込むような流れにはなり得なかった。

このような状況を一変させたのが、前述の蛍光タンパク質と顕微鏡測定を組み合わせたバイオイメージング技術の発展である。遺伝子が同定された蛍光タンパク質は他の遺伝子と同様分子生物学的な方法論によって、生きた生体内に自在に導入することが可能であって、分子生物学的な方法論が通じるほとんどの現象をその適用範囲に含む非常に汎用的なものであった。この汎用性に加え

様々な新規蛍光タンパク質と新規測定方法とが爆発的に開発されたおかげで、わずか数年で生物分野の方法論を大きく変えることになったのである。

目的が方法を制約するのと等しく、方法が目的を制約することは科学の世界で往々にして起こっている。バイオイメーjing技術の出現は生命現象におけるより定量的な差異、そしてより動的な側面へと分野の方向性を向けさせる外力となってきた。またその結果として、動的な現象を定量的に記述し解析するための方法論として物理・工学などで活用されてきた数理的な技術が注目を今集めているわけである([1])。

ではバイオイメーjing技術を取り入れたことによって新しくみえてきたことはなんだろうか？新しい技術は新しい発見と必ずしも等しくはなく、事実何をするべきか、という問題の方が技術に遅れてついてきている感がある。しかしその中でも細胞のゆらぎの問題は、かなり初期の段階から定量的な解析によってのみ初めて捉えられる生命の側面として注目を集めてきた([2])。細胞ゆらぎの定義というものは厳密には存在しないがここでは細胞が遺伝子によらず示す個別性、多様性を指すとする。その存在は古くは分子生物学の黎明期において、バクテリアファージの再生産数([3])や Lac オペロンの応答性([4])などに関して古典的に確認されており、さらには 1 細胞の細胞運動の多様性([5])や分裂周期のばらつきとして表現型レベルでは比較的広く認知されていた現象である。ではこの古典的な問題がなぜ注目を集めたのかというと、表現型レベルで見られるゆらぎに対し、その素過程である遺伝子発現や細胞内分子反応のレベルでのゆらぎがイメーjingにより定量化できるようになったためである。特に Elowitz らによる 2002 年の遺伝子発現に起因するゆらぎの定量化の研究は([6])、素過程レベルで非常に大きなゆらぎ存在することを巧妙な実験デザインで示すことにより、「ここまでゆらぎの大きい素過程の組み合わせによって、どうして細胞全体・細胞集団全体の表現型レベルでの機能が破綻せず実現されているのか？」という問題を明確に浮かび上がらせることとなった。その結果として、いかに細胞内の素過程においてゆらぎのようなものを抑制・制御するのかという問題に関し、非常に活発な実験的・理論的研究が 2002 年以後行われてきた([2])。しかし他方で、生体システムというものはミクロからマクロの広いスケールで様々な頑健性を有しているがゆえに、実際ゆらぎのせいでシステムが破綻しうる現象はあまり知られておらず、「本当にゆらぎである種の生体機能が破綻するのか？」というそもそもの問題の大前提とされている仮定にはあまり注目が集

まっていなかったように思われる。この点に関し、我々が概日リズム現象の Singularity 現象をもとに明らかにした結果は、ゆらぎで生体機能が破綻することを明確に示した例として捉えることができる。以下では我々が行った研究についてその内容とゆらぎによる機能の破綻との関係性を概説する([7])。

概日リズムは様々な種に広く見られる 24 時間周期の生体内自励振動現象である。その特性は様々な環境的な要因に対しても頑健であり、環境要因による位相のズレや温度変化・栄養状況の変化などに起因する周期のずれなども巧みに補償する機構を有している([8])。しかしこのロバストな概日リズムが破綻してしまう現象として Singularity 現象というものが古くから実験的に確認されている([9])。

Singularity 現象は、特定強さを持つ光を主観的真夜中にあたるタイミングで与えることにより、ロバストな概日リズム振動が停止してしまう現象であり、非遺伝的な要因でシステムが破綻するという点で非常に特徴的なものである。また広い生物種（藍藻、カビ、ハエ、植物、人）において共通して見られることから、システムに不可避に内在する特性であか、または進化的に保存された特性であると考えられる。この現象自体は概日リズムの実験・理論研究のパイオニアである A. T. Winfree によって、ある特定の外部刺激により振動がリミットサイクルの不安定平衡点に落ち込み、止まってしまう現象として理論的に予測され、その後 Winfree 本人によりその現象が実際に起こりうることがハエを用いた実験で証明されたという経緯を持ち([9])、概日リズムの分野では比較的よく知られていた。しかし実験的に観測された振動の停止が、理論予測のように本当にリミットサイクルの不安定状態への落ち込みであるかいないか？という点は実は決着がついていなかった。事実 Winfree 自身、Singularity 現象の観測後さらなる定量的かつ網羅的な実験を行い、振動状態が不安定状態の近傍に摂動された場合、リミットサイクルに期待されるようなもとの軌道への速やかな復帰が観測されないなどという特性を見出していた([10])。また振動停止のメカニズムが本当に不安定平衡点への落ち込みであるのかどうかは、不安定平衡点の相空間内の体積が 0 であることから、特に理論方面からも疑問が投げかけられていた。しかし 1970 年代の当時だけでなく現代の技術を持ってしても、個体の概日リズム状態を細胞レベルで観測することはほとんど不可能であり、Singularity のメカニズムには踏み込めていなかった。

このような歴史的背景とはほぼ独立に我々は、光応答レセプターを活用して光摂動に対する応答性を付加した哺乳類細胞の光応答性の定量的な解析研究を進めていた。このシステムは、細胞レベルでの概日リズム振動をモニターできる NIH3T3 という細胞系に光応答レセプターを遺伝的に導入したもので、概日リズムの光応答性を細胞集団のレベルで測定することが出来る非常に独自性のシステムである([7] 図 1 参照)。

このシステムの持つ光応答性が実際に個体で見られる概日リズムの光応答性と共通性を持つのか、ということを確認するために、我々は定量的な概日リズム測定装置とそこから得られたデータのデータ解析によって、光パルスのタイミングに依存して生じる位相のずれを定量化した位相応答曲線を求めた([7] 図 2 参照)。その結果、位相に注目した場合のこのシステムの持つ光応答性は個体で普遍的に見られている振る舞いとほぼ同じであり、リミットサイクルのような抽象的なモデルによる光応答性の定性的理解が、個体のみならず細胞集団レベルでの振動にも問題なく拡張可能であることが確認された。

また同時に、光パルスのタイミングに依存した振幅変動を定量化した振幅応答曲線も定量化することにも成功した([7] 図 3 参照)。その結果、振幅応答曲線から光パルス細胞集団の主観的夜中に与えることにより、大幅に振幅が減少することがわかった。このタイミング周辺でさらに詳細な実験を行うことにより、我々は光パルスによって振動が完全に止まってしまう **Singularity** 現象までもが我々のシステムにおいて保存されていることがわかった([7] 図 4 a 参照)。また振動停止後再び光パルスを与えることにより振動が回復することから、この現象が細胞死などの概日リズム非依存の現象でないことも確かめられた。数理的に考えれば **Singularity** が仮にリミットサイクルの不安定平衡点への落ち込み（もしくはそれに類するもの）であれば、振動という機能に不可避に伴う特性であるがゆえに不思議はない。しかし **Singularity** の多様な種での共通性は生物学的には何らかの進化的淘汰圧の結果、進化的に保存されているという可能性も十分考えられる。その場合、我々のような細胞系において **Singularity** 現象が観測される必然性は全く無く、したがって我々の結果は概日リズムの **Singularity** 現象がシステム自身が不可避に伴う特性である、という前者の仮説を大きく支持する実験的証拠になっている。

では **Singularity** はなぜ生じるのか？この細胞系を用いれば個体では扱い切れなかったメカニズムの問題をより深く調べることができる。その際我々は振

幅応答曲線の連続性に注目をした。仮に Singularity 現象がリミットサイクルの有する不安定平衡点もしくはそれが分岐した小さいアトラクターをもつ安定平衡点である場合、ちょうどそこに振動の状態を誘導する以外の刺激に対する応答はリミットサイクルの安定な軌道への復帰と予測される。したがって、振幅応答曲線のこのような連続性は見られないはずである。このような問題に対し我々が考えた仮説は、不安定平衡点周りでのゆらぎの増幅による脱同調である([7] 図 4 b 参照)。我々が観測していた細胞の概日リズムは細胞集団の平均的な振動である。別の言い方をすると振動子集団のオーダーパラメータを観測していたことになる。したがって、個々の細胞が停止しなくても細胞の位相が完全にバラけてしまえば細胞集団としては振動が止まって見えることになる。またばらけ、という定量的な要素を考えることによって、振動子集団の振幅の連続性も容易に説明がつく。しかしこれはあくまで仮説であり、直接的な証拠ではない。

そこで我々は 1 細胞概日リズム測定系を構築することによって、Singularity 状態にある細胞の状態を直接的に観測し、仮説を検証することとした。その結果 Singularity 現象を起こす主観的真夜中付近の光刺激によって、1 細胞レベルでの振動の位相が完全に脱同調してしまうことが確認できた([7] 図 4 c, d 参照)。また逆に細胞集団レベルでの振幅応答性が最も高くなる主観的昼の刺激によって、1 細胞レベルでの振動の位相が同調することも実験的に確認することができた([7] 図 S5 b, c 参照)。このような刺激による脱同調の可能性は、これまでも神経系などを含め理論的には示唆されてきたわけであるが、我々が知る限り、実際に生体系で脱同調が直接観測されたのはこれが初めての例である。

しかしこのたった 2 点だけの観測から得られた結果はどれだけ細胞集団レベルで見られた位相応答性や振幅応答性の特徴と定量的に整合しているのだろうか？特に光刺激のタイミングを真夜中から順に昼までずらした場合や、光刺激の強度（長さ）を変化させていった場合に本当に振幅は実験で観測されたような形で連続的に変化しうるのだろうか？そしてそれは位相の応答とどれだけ整合するのであるだろうか？この問題に対し我々は、実験的事実を活用して非常にシンプルな数理モデルを立て、そのモデルがどれだけ細胞集団としての応答性を定量的に再現出来るのか？を検証してみた([7] Supplementary material 参照)。具体的に我々が考えたことは、①個々の細胞の振動はリミットサイクルで

ある、②リミットサイクルは1つの不安定平衡点を相空間の中に有する、③その振る舞いは2次元への射影で記述可能である、④細胞集団内の個々の細胞の位相は完全に同一ではなく小さなばらつきを持つ、の4点である。①と④に関してはほぼ実験的に確かである。また②、③については数学的な簡略化であるがかなり広いクラスの振動現象に適用できるゆるい仮定である。これらをもとに数理モデルを構築した結果、非常に高い精度で実験的に測定された細胞集団の位相・振幅応答性を説明できることが明らかになった([7] 図 2, 3 参照)。特にこのモデルは非常にシンプルなため、光摂動の強度と細胞集団の光摂動前のばらつきの2つのパラメータしか有していないにも関わらず、データとの整合が高いことは実際にこのようなメカニズムで真夜中もしくは真昼以外の光に対しても細胞集団が応答していることを強く示唆している。

これらの結果から我々は実際に概日リズム現象において脱同調によって Singularity 現象が生じうることを実験・理論を組み合わせ実証することに成功した。しかし我々のシステムは細胞を用いたものであり、この結果と同じことが必ずしも個体のなかで起こっている必然性はない。実際、我々のシステムでは細胞間の結合がほとんど存在しないが、個体内の細胞集団では結合が存在する実験的事実は多数存在する。しかし私自身（必ずしも共著者全員が合意しているわけでは無いことに注意）は仮に個体内で結合が存在したとしても、個々の細胞がすべて止まってしまうような状況よりは、今回のように細胞が脱同調することによって止まって見えるメカニズムの方が様々な要因に対してロバストであり、個体でも十分ありえると考えている。また Winfree がハエの個体で観測していた、Singularity 近傍のパラメータで概日リズムを摂動した際、振動の復帰が非常に遅い、もしくはほとんど見られない、といった振る舞いについても脱同調のほうが自然に説明できる。この実験的結果に対し、Winfree 自身も Clock shop 仮説という名前で脱同調の可能性を提唱していたが([11])、結局それを実証するだけでなく実際に生体内でそのような脱同調が生じうることを示すこともできなかった。その意味で、本研究では少なくとも後者が確実に示されたわけであり、今後更なる技術の進歩によって Singularity 現象のメカニズムが個体レベルで実証されることが期待される([12])。

さてここまでは Singularity 現象についての我々の研究を概日リズムの観点から概説したわけであるが、この研究はゆらぎの研究から見たときにも非常に

大きな意味を持っていると考えている。というのも、この Singularity 現象の研究は、個々の細胞が持つゆらぎが不安定平衡点という力学的構造によって増幅された結果、全体としての振動が破綻しうるということを実証しているからに他ならない。リミットサイクルのもつ相空間構造は例えば摂動が主観的朝から夕方にかけて導入された場合には、周期のばらつきから自律的にばらつく細胞集団の位相を同調させ、かつ平均的な時間を調整するという適応機能を実現している。しかし真夜中の光のように非常な特殊な条件ではこのような適応機構が逆に作用し、抑えられるはずのゆらぎが逆に増幅され全体としての破綻につながる。系の持つ力学系的機構とゆらぎとの関係性がここまで明確に現れている系は他に類が無く、この Singularity の研究は今後、概日リズムのみならずゆらぎ研究にも大きな影響を持って行くであろうことが期待される。

- [1] B. Novak, & J.J. Tyson, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 981-991, 2008.
- [2] J. M. Raser & E.K. O'Shea, *Science*, **309**, 2010-2013, (2005)
- [3] M Delbrück, *J. Bact.*, **50**, 131-135, (1945)
- [4] A. Novick, M. Weiner, *Proc Natl Acad Sci U S A* **43**, 553-566, (1957)
- [5] J. L. Spudich & D. E. Koshland, *Nature*. 262, 467-471, (5568)
- [6] M.B.Elowitz, *et al.*, *Science*, **297**:1183-1186, 2002.
- [7] H. Ukai, T.J.Kobayashi *et al.* *Nat.Cell.Biol*, **3**, 130-156 (2008)
- [8] J.C. Dunlap *et al.*, eds., "Chronobiology: Biological Timekeeping", Sunderland, Massachusetts, U.S.A: Sinauer Associates, Inc., 2004.
- [9] A.T.Winfrey, *J. Theor. Biol.*, **28**, 327-374 (1970)
- [10] A.T.Winfrey, *J. Comp. Physiol.*, **85**, 105-140 (1973)
- [11] A.T.Winfrey, *Nature*, **253**, 315-319 (1975)
- [12] M.Baker, *Nature*, **463**, 977-980 (2010)