

概日リズムのインターロックフィードバックの ロバストネス解析

前田 和 勲^{†1} 倉田 博 之^{†2}

概日リズムは地球上の多くの生物が持つ約 24 時間周期の発振機構である。この発振機構の核はネガティブフィードバックループである。本来 1 つのネガティブフィードバックループで発振可能だが、ショウジョウバエの発振機構はインターロックされた 2 つのネガティブフィードバックループから成る。なぜこのような複雑な発振機構を採用しているのだろうか。本報告では、インターロックフィードバックがもたらす概日リズムのロバストネスとそのトレードオフの関係を数理モデルを用いて解明する。

Robustness Analysis of Interlocked Feedbacks of Circadian Rhythm

KAZUHIRO MAEDA^{†1} and HIROYUKI KURATA^{†2}

The circadian clock refers to the oscillator that most organisms on the earth have and its period is about 24 hours. Negative feedback loops play an important role in the oscillator. While only one negative feedback loop can produce an oscillating behavior, the circadian oscillator in *Drosophila* has two interlocked negative feedback loops. Why does *Drosophila* have such a complex mechanism? In this report, we elucidate the mechanism of how the *Drosophila* circadian rhythm generates robustness and trade-off by using mathematical models.

^{†1} 九州工業大学大学院 情報工学府

Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology

^{†2} 九州工業大学大学院 情報工学研究院

Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology

1. はじめに

シアノバクテリアからヒトに至るまで、地球上の多くの生物は体内に約 24 時間周期の発振機構を内在している⁴⁾。概日リズムは恒暗条件下でも安定して維持される。他にも光による環境との同調や温度補償性という興味深い特徴を持つ。発振機構の鍵はあるタンパク質が自身の発現を抑制するというネガティブフィードバックループである¹³⁾。本来 1 つのネガティブフィードバックループで十分に発振することができるが、多くの生物の概日リズム発振機構では複数のフィードバックループが複雑に組み合わさっている^{5),6),11),15)}。ショウジョウバエの場合、発振機構はインターロックされた 2 つのネガティブフィードバックループから成る^{6),15)}。なぜショウジョウバエはこのような複雑な機構を採用しているのだろうか。2 つのネガティブフィードバックループを持つこと、そしてそれらを接続することは概日リズムにどのような利点をもたらすのか。本報告では、ショウジョウバエのインターロックフィードバックがもたらす概日リズムのロバストネスとそのトレードオフの関係を数理モデルを用いて解明する。

2. 方 法

2.1 インターロックフィードバックモデル

ショウジョウバエ概日リズムの発振システムは *per-tim* フィードバックループと *dclk* フィードバックループという 2 つのネガティブフィードバックループから成る^{6),15)}(図 1)。タンパク質 PER と TIM は細胞質でヘテロダイマーを形成し核へ運ばれる。そして、自身の遺伝子 *per* と *tim* の発現を抑制、*dclk* の発現を促進する。同様にタンパク質 dCLK と CYC も細胞質でヘテロダイマーを形成し核に運ばれる。そして、自身の遺伝子 *dclk* の発現を抑制、*per* と *tim* の発現を促進する。このように 2 つのフィードバックループは互いにインターロックしている。CYC は概日振動せずに細胞内に一定の濃度で存在する。*per-tim* フィードバックループと *dclk* フィードバックループは逆位相で振動する(図 1)。*per* と *tim* の mRNA 濃度は早晩に最大となるのに対し、*dclk* の mRNA 濃度は深夜から早朝に最大になる。1 つのネガティブフィードバックループを 1 つの振動子とみなすとインターロックフィードバックモデルは 2 つの振動子が互いに接続しているモデルであると言える。本研究では PER と dCLK の個々の振動を振幅と周期によって、また PER と dCLK の振動の関係を周期差と位相差によって特徴付ける。本研究では上田ら¹⁵⁾ が提案した数学モデルを用いている。

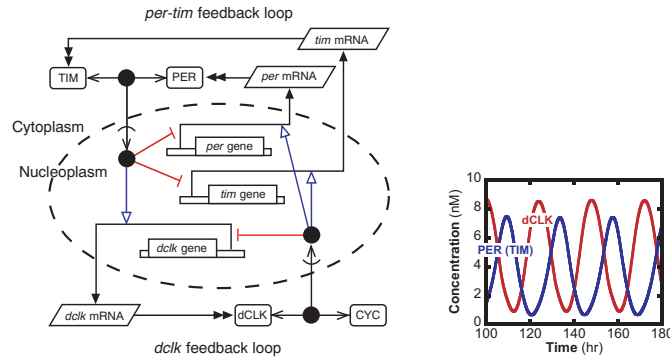


図1 インターロックフィードバックモデルのネットワークマップとシミュレーション結果。簡略化のためネットワークマップの表記法には CADLIVE 表記^{(7)–(9)}を使用。
Fig.1 A network map of the interlocked feedback model and the simulation result. The notation of CADLIVE^{(7)–(9)} is used for simplifying the diagram.

2.2 Two-phase search (TPS) 法

速度パラメータの正確な測定は困難であるので、特定のパラメータ値に依存するのではなく、パラメータ値の変化が与える影響を考慮した解析が必要である^{(1)–(3), (10), (14)}。これを可能にするためには細胞内の挙動を再現しうる全ての速度パラメータセットを広い探索空間から探し出す必要がある。

偏りなく高速なパラメータ探索を実現するために、我々はこれまでに Two-phase search 法を開発している⁽¹²⁾。TPS 法は一樣乱数と遺伝的アルゴリズムによる探索から成る。まず、一樣乱数による探索で広大なパラメータ空間を偏りなく探索し、細胞内の挙動をある程度再現できる速度パラメータベクトルを探し出す。そして、その周りに初期集団を生成し、遺伝的アルゴリズムによって集中的な探索を行う。細胞内の挙動を再現できる速度パラメータベクトルを任意の個数 (N_s) 得られるまで探索を繰り返す。

細胞内の挙動を再現できる i 番目の速度パラメータベクトルを次のように示す。

$$\mathbf{p}(i) = (p(i, 1), p(i, 2), \dots, p(i, N_p)), \quad i = 1, 2, \dots, N_s \quad (1)$$

ここで N_p は速度パラメータの数である。また本報告における細胞内の挙動とは PER と dCLK が概日振動する挙動のことである。

2.3 Multiple Parameter Perturbation (MPP) 解析

細胞内の環境は外界からのストレスによって常に変化している。これに伴って、速度パラ

メータの値も絶えず変化している。すべての速度パラメータが同時に変化した時のシステムの挙動の変化を調べることを考える。速度パラメータベクトル $\mathbf{p}(i)$ をある範囲内でランダムに変化させ、それを用いてシミュレーションを行うことでターゲットとなる挙動 $Target(\mathbf{p}_r(i))$ を求める。ここで、 $\mathbf{p}_r(i) = (p_r(i, 1), p_r(i, 2), \dots, p_r(i, N_p))$ ($r = 1, 2, \dots, N_r$) はランダムに摂動を与えられた速度パラメータベクトル、 N_r はランダムに摂動を与えてシミュレーションを行う回数である。また本報告におけるターゲットとなる挙動とは PER と dCLK の振動の周期と振幅、それらの周期差と位相差である。 $\mathbf{p}_r(i)$ の各成分は次のようにして与えられる。

$$p_r(i, k) = \gamma(r, i, k) \cdot p(i, k), \quad k = 1, 2, \dots, N_p \quad (2)$$

ここで、 $\gamma(r, i, k)$ は ρ によって決められる範囲の一樣乱数である。

$$\frac{1}{1 + \rho} < \gamma(r, i, k) < 1 + \rho \quad (3)$$

さらに $Target(\mathbf{p}_r(i))$ の分布を特徴付けるために次のように平均 $MeanTarget(i)$ と標準偏差 $SdTarget(i)$ 、変動係数 $CvTarget(i)$ を定義する。

$$MeanTarget(i) = \frac{1}{N_r} \sum_{r=1}^{N_r} Target(\mathbf{p}_r(i)) \quad (4)$$

$$SdTarget(i) = \sqrt{\frac{\sum_{r=1}^{N_r} (Target(\mathbf{p}_r(i)) - MeanTarget(i))^2}{N_r - 1}} \quad (5)$$

$$CvTarget(i) = \frac{SdTarget(i)}{MeanTarget(i)} \quad (6)$$

$SdTarget(i)$ と $CvTarget(i)$ が小さいということは $Target(\mathbf{p}_r(i))$ の分布のばらつきが小さく、全ての速度パラメータの同時変動に対してロバストであることを意味する⁽¹⁰⁾。

3. 結果と考察

3.1 計算機実験

インターロックがロバストネスに寄与するかどうかを調べるために、インターロックを削除した変異型モデルを作成した。dCLK:CYC ヘテロダイマーによる *per* と *tim* の発現の活性化を削除した *per-tim* 活性化削除モデル、PER:TIM ヘテロダイマーによる *dclk* 発現の活性化を削除した *dclk* 活性化削除モデル、その両方を削除した二重活性化削除モデルを作成した(図2)。これらに対して元のモデルのことを以下では野生型モデルと呼ぶことに



図 2 トポロジーマップ . A: 野生型モデル , B: *per-tim* 活性化削除モデル , C: *dclk* 活性化削除モデル , D: 二重活性化削除モデル .

Fig. 2 Topology maps for wild type model (A), *per-tim* activation deletion model (B), *dclk* activation deletion model (C), and double activation deletion model (D).

する .

ランダムに摂動を加えた速度パラメータベクトルによる PER と dCLK の振幅と周期の分布の変動係数をそれぞれ $CvPerAmplitude(i)$, $CvPerPeriod(i)$, $CvClkAmplitude(i)$, $CvClkPeriod(i)$ とする . また周期差と位相差の分布の標準偏差をそれぞれ $SdPeriodDiff(i)$, $SdPhaseDiff(i)$ とする .

野生型モデルと 3 つの変異型モデルの各モデルに対して TPS 法を適用し , PER と dCLK が十分な振幅 , 約 24 時間周期 , 逆位相で振動する速度パラメータベクトルを 1,000 個得られるまで探索を行った ($N_s = 1,000$) . そして , 野生型モデルと 3 つの変異型モデルの各 1,000 個の速度パラメータベクトルに対して MPP 解析を行って $CvPerAmplitude(i)$, $CvPerPeriod(i)$, $CvClkAmplitude(i)$, $CvClkPeriod(i)$, $SdPeriodDiff(i)$, $SdPhaseDiff(i)$ を求めた . 摂動は 1/1.1 倍から 1.1 倍 ($\rho = 0.1$) , 摂動を与えてシミュレーションを行う回数は 1,000 回 ($N_r = 1,000$) とした .

3.2 実験結果

$CvPerAmplitude(i)$, $CvPerPeriod(i)$, $CvClkAmplitude(i)$, $CvClkPeriod(i)$, $SdPeriodDiff(i)$, $SdPhaseDiff(i)$ の分布を図 3 に示した . 二重活性化削除モデルの $CvPerAmplitude(i)$ は 0.2-0.6 に分布しているのに対して $CvClkAmplitude(i)$ は 0.1-0.3 に分布している (図 3A, C) . また , $CvPerPeriod(i)$ は 0.05-0.25 に分布しているのに対して $CvClkPeriod(i)$ は 0.03-0.1 に分布している (図 3B, D) . 二重活性化削除モデルでは *per-tim* フィードバックループと *dclk* フィードバックループが独立していることを考えると , これらの結果から振幅と周期の両方において *per-tim* フィードバックループよりも *dclk* フィードバックループの方が複数パラメータ変動に対してロバストであることがわかる .

dclk 活性化削除モデルは二重活性化削除モデルよりも $CvPerAmplitude(i)$ と $CvPerPeriod(i)$ が小さい傾向にある (図 3A, B) . 特に $CvPerPeriod(i)$ で顕著である . これは dCLK:CYC による *per* と *tim* の活性化が PER 振動のロバストネスに寄与している

ことを示す . しかし , その効果は PER:TIM による *dclk* 活性化を加えると弱められる (野生型モデル) .

dclk 活性化削除モデルと二重活性化削除モデルでは $CvClkAmplitude(i)$ が 0.1-0.3 , $CvClkPeriod(i)$ が 0.03-0.1 に分布している . 一方 , 野生型モデルと *per-tim* 活性化削除モデルでは $CvClkAmplitude(i)$ が 0.1-0.5 , $CvClkPeriod(i)$ が 0.05-0.25 に分布している (図 3C, D) . これらの結果から PER:TIM による *dclk* 活性化は dCLK 振動のロバストネスを弱めると考えられる . 野生型モデルは *per-tim* 活性化削除モデルよりも $CvClkAmplitude(i)$ と $CvClkPeriod(i)$ が僅かながら低い傾向がある . 従って , dCLK:CYC による *per* と *tim* の活性化は PER:TIM による *dclk* 活性化が低下させた dCLK 振動のロバストネスを回復させるようである .

インターロックを持たない二重活性化削除モデルでは $SdPeriodDiff(i)$ を 2 よりも小さくすることはできない . その他の 3 モデルでは 0-0.1 に強いピークを持つ (図 3E) . そのピークの大きさは大きい方から *dclk* 活性化削除モデル , 野生型モデル , *per-tim* 活性化削除モデルである . dCLK:CYC による *per* と *tim* の活性化と PER:TIM による *dclk* 活性化の両方とも周期差のロバストネスを向上させると言える .

二重活性化削除モデルでは $SdPhaseDiff(i)$ が 0-3 という広い範囲に分布している . 一方 , その他の 3 モデルでは 0-1 に分布している . その中でも野生型モデルでは *per-tim* 活性化削除モデルと *dclk* 活性化削除モデルよりも $SdPhaseDiff(i)$ が若干小さい傾向がある (図 3F) . 従って , 位相差に関しては dCLK:CYC による *per* と *tim* の活性化と PER:TIM による *dclk* 活性化の両方ともロバストネスに寄与していると考えられる .

3.3 総括

dclk 活性化削除モデルは PER と dCLK の個々の振動が 4 モデル中で最もロバストであった . 野生型モデルが唯一 *dclk* 活性化削除モデルよりも優れている点は位相差のロバストネスが高いことであった . PER:TIM による *dclk* 活性化は dCLK 振動のロバストネスを低下させるが , 位相差のロバストネスを向上させる . 従って , dCLK 振動のロバストネスと位相差のロバストネスはトレードオフの関係になっていると言える .

dCLK 振動は PER 振動よりも複数の速度パラメータの同時変動に対してロバストであった . 従って , dCLK:CYC による *per* と *tim* の活性化はロバストでない振動子をロバストな振動子に同期させ , 逆に PER:TIM による *dclk* 活性化はロバストな振動子をロバストでない振動子に同期させると言える . 前者のインターロックは 2 つの振動子のロバストネスを向上させるが , 後者は低下させる方向に働く . これによって , *dclk* 活性化削除モデルの

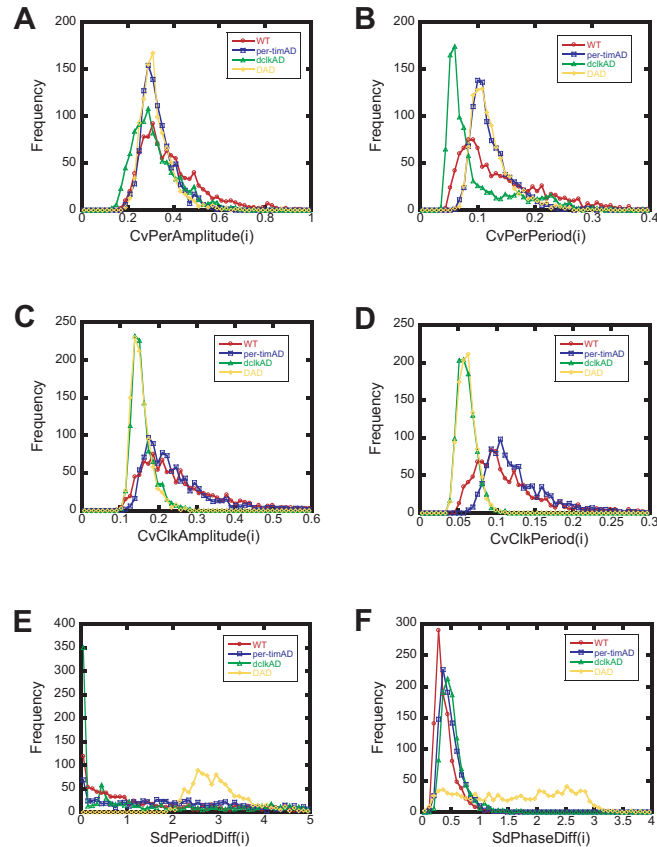


図3 $CvTarget(i)$ 及び $SdTarget(i)$ の頻度分布．赤: 野生型モデル, 青: *per-tim* 活性化削除モデル, 緑: *dclk* 活性化削除モデル, 黄: 二重活性化削除モデル.

Fig. 3 Frequency of $CvTarget(i)$ and $SdTarget(i)$ distributions for wild type model (red), *per-tim* activation deletion model (blue), *dclk* activation deletion model (green), and double activation deletion model (yellow).

PER と dCLK の個々の振動が高いロバストネスを示したことを説明できる.

4. おわりに

本報告では, dCLK の振動のロバストネスと位相差のロバストネスがトレードオフの関係

になっていることを明らかにした. この原因は PER:TIM による *dclk* 活性化が dCLK 振動のロバストネスを低下させるが, 位相差のロバストネスを向上させることであった. さらに今回の解析によって, dCLK の振動は PER の振動よりもロバストであることがわかった.

なぜショウジョウバエ概日リズムは dCLK の振動のロバストネスを犠牲にしてまで *per-tim* フィードバックループを接続しているのだろうか. そもそも *per-tim* フィードバックループがなければ位相差のロバストネスを問題にする必要はないはずである. ロバストな *dclk* フィードバックループだけで発振機構として十分ではないのか. *per-tim* フィードバックループは光による環境との同調と温度補償性に関わると言われている. ショウジョウバエが 2 つのネガティブフィードバックループを持つ理由はロバストネス向上が目的ではなく, *per-tim* フィードバックループは調節, *dclk* フィードバックループは正確さ (ロバストネス) を担うという役割分担が目的なのかもしれない.

参考文献

- 1) Alves, R. and Savageau, M.A.: Comparing systemic properties of ensembles of biological networks by graphical and statistical methods, *Bioinformatics*, Vol.16, No.6, pp.527–533 (2000).
- 2) Alves, R. and Savageau, M.A.: Extending the method of mathematically controlled comparison to include numerical comparisons, *Bioinformatics*, Vol.16, No.9, pp.786–798 (2000).
- 3) Alves, R. and Savageau, M.A.: Systemic properties of ensembles of metabolic networks: application of graphical and statistical methods to simple unbranched pathways, *Bioinformatics*, Vol.16, No.6, pp.534–547 (2000).
- 4) Dunlap, J.C.: Molecular bases for circadian clocks, *Cell*, Vol.96, pp.271–290 (1999).
- 5) Dunlap, J.C. and Loros, J.J.: The *Neurospora* circadian system, *Journal of Biological Rhythms*, Vol.19, No.5, pp.414–424 (2004).
- 6) Glossop, N. R.J., Lyons, L.C. and Hardin, P.E.: Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator, *Science*, Vol.286, pp.766–768 (1999).
- 7) Kurata, H., Inoue, K., Maeda, K., Masaki, K., Shimokawa, Y. and Zhao, Q.: Extended CADLIVE: A novel graphical notation for design of biochemical network maps and computational pathway analysis, *Nucleic Acids Research*, Vol.35, No.20, p.e134 (2007).
- 8) Kurata, H., Masaki, K., Sumida, Y. and Iwasaki, R.: CADLIVE dynamic simulator: Direct link of biochemical networks to dynamic models, *Genome Research*, Vol.15, No.4, pp.590–600 (2005).
- 9) Kurata, H., Matoba, N. and Shimizu, N.: CADLIVE for constructing a large-scale

- biochemical network based on a simulation-directed notation and its application to yeast cell cycle, *Nucleic Acids Research*, Vol.31, No.14, pp.4071–4084 (2003).
- 10) Kurata, H., Tanaka, T. and Ohnishi, F.: Mathematical identification of critical reactions in the interlocked feedback model, *PLoS ONE*, Vol.2, No.10, p.e1103 (2007).
 - 11) Leloup, J.-C. and Goldbeter, A.: Modeling the mammalian circadian clock: Sensitivity analysis and multiplicity of oscillatory mechanisms, *Journal of Theoretical Biology*, Vol.230, No.4, pp.541–562 (2004).
 - 12) Maeda, K. and Kurata, H.: Two-phase search (TPS) method: Nonbiased and high-speed parameter search for dynamic models of biochemical networks, *IPPSJ Transactions on Bioinformatics*, Vol.2, pp.2–14 (2009).
 - 13) Novák, B. and Tyson, J.J.: Design principles of biochemical oscillators, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol.9, pp.981–991 (2008).
 - 14) Stelling, J., Gilles, E.D. and Doyle, F.J.3rd: Robustness properties of circadian clock architectures, *PNAS*, Vol.101, No.36, pp.13210–13215 (2004).
 - 15) Ueda, H.R., Hagiwara, M. and Kitano, H.: Robust oscillations within the interlocked feedback model of *Drosophila* circadian rhythm, *Journal of Theoretical Biology*, Vol.210, pp.401–406 (2001).