

概日リズムのフィードバックシステムの ロバストネス解析

前田 和 勲^{†1} 倉田 博 之^{†2}

ロバストネスとは、内的または外的な変動に対して機能を維持し続ける性質のことである。生物がロバストネスを生み出す機構を明らかにすることはシステム生物学の重要な課題である。多くの生物は概日リズムと呼ばれる約 24 時間周期の生理的リズムを示す。概日リズム発振機構は、細胞内外の様々な変動に対して振動を維持できるロバストなシステムである。最近、我々は Two-phase search 法と疑似マルチパラメータ感度を用いて生化学システムのロバストネスを定量化する手法を開発した。本稿では、この手法を概日リズムの様々なフィードバックシステムに適用する。そして、デュアルフィードバック構造が最もロバストな振動を生み出すことを明らかにする。

Robustness Analysis of Feedback Systems of Circadian Rhythm

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

Systems biology aims at a coherent understanding of the mechanisms of how the integration of molecular components generates robust systems. Robustness is the ability to resume reliable operation in the face of different types of perturbations. The genetic oscillator responsible for generating circadian rhythms is one of the robust systems. The circadian clock refers to the oscillator that most organisms on the earth have and its period is about 24 hours. We developed the novel method that consists of the two-phase search method and quasi-multiparameter sensitivity in order to quantify the robustness of biochemical systems. In this report, we apply the method to various types of feedback systems derived from circadian clocks and reveal that the dual feedback model possessing two identical feedbacks can be the most robust oscillator.

1. はじめに

ロバストネスとは、内的または外的な変動に対して機能を維持し続ける性質のことである^{4),6),8),13)}。生物は環境変化や遺伝的变化に常に曝されているので、ロバストネスは生物の生存と繁殖に不可欠である。このように、ロバストネスをもたらす機構を明らかにすることはシステム生物学における重要な課題である⁴⁾。本稿では、特に、動力学パラメータの変動に対するロバストネスに焦点を当てる。

多くの生物は概日リズムと呼ばれる約 24 時間周期の生理的リズムを示す。概日リズムは、細胞内の特定の生化学システムによって生み出されている。ここでは、時計タンパク質と呼ばれる一群のタンパク質の発現が増減を繰り返している。時計タンパク質は様々な修飾を受けた後、自身の発現を抑制する。この転写翻訳フィードバックと呼ばれる機構が全ての生物に共通する概日リズム発生の基本構造である。細胞内には様々な不確実性があるにも関わらず、外部シグナルなしでも概日リズムは安定して維持される。従って、概日リズム発振機構はロバストなシステムであると言える。振動を起こすにはたった 1 つの単純な転写翻訳フィードバックがあれば良いが、実際の生物の概日リズム発振機構は非常に複雑である^{8),13),14)}。複雑なシステムが必要とされる理由の 1 つは、ロバストな振動を達成するためであると考えられている。

我々は Two-phase search (TPS) 法と疑似マルチパラメータ感度 (QMPS) を用いたロバストネス定量化手法を開発した¹⁰⁾。これにより、動力学パラメータの変動に対するロバストネスを定量化し、複数の競合モデル間のロバストネスを比較することが可能になった。さらに、この手法を用いて、多数のリン酸化反応から成る長いフィードバックループがロバストな振動を生み出すことを明らかにした¹⁰⁾。フィードバックループの長さだけでなく、冗長性や接続様式もロバストネスに影響を与えると予想される。本稿では、どのような構造のフィードバックループがどのような条件でロバストな振動子となるのか明らかにする。そして、デュアルフィードバック構造が最もロバストな振動を生み出すことを示す。

^{†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

2. 方法

2.1 疑似マルチパラメータ感度 (QMPS)

一般に、生化学システムのダイナミックモデルは次のような微分方程式で表される。

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{F}(t, \mathbf{x}, \mathbf{p}) \quad (1)$$

ここで、 t は時間、 \mathbf{x} は状態変数、 $\mathbf{p} = (p_1, \dots, p_n)$ は動力学パラメータ、 n は動力学パラメータの数である。 $q(\mathbf{p})$ をシステムの特定の機能あるいは出力とすると、 i 番目のパラメータの変動に対する出力 $q(\mathbf{p})$ のシングルパラメータ感度は次のように表される。

$$s_i(q, \mathbf{p}) = \frac{\partial q(\mathbf{p})}{\partial p_i} \frac{p_i}{q(\mathbf{p})} = \frac{\partial \ln q(\mathbf{p})}{\partial \ln p_i} \quad (2)$$

シングルパラメータ感度を求めることで、出力に大きな影響を与える反応ステップを特定できる。しかし、システム全体のロバストネスを知ることはできない。そこで、マルチパラメータ感度 (Multiparameter Sensitivity: MPS) をシステム全体のロバストネスの指標として用いる。出力 $q(\mathbf{p})$ の MPS は次のように表される。

$$|MPS(q, \mathbf{p})|^2 = \sum_{i=1}^n s_i(q, \mathbf{p})^2 \quad (3)$$

複雑なモデルの MPS を解析的に求めることは難しい。この場合、動力学パラメータの値を少し変化させて数値的に MPS を求める方法が実用的である。このようにして求めた MPS を特に QMPS (Quasi-MPS) と呼ぶ¹⁰⁾。これまで、全パラメータ変動に対するロバストネスの定量化手法としては、モンテカルロ法が広く用いられてきた^{8),13)}。QMPS は摂動が小さい場合のモンテカルロ法と同じ結果を与える。さらに、モンテカルロ法よりも少ない計算コストでロバストネスを定量化できる¹⁰⁾。

2.2 生化学モデル

本稿で解析対象とするモデルは、シングル、セミデュアル、デュアル、リダンダントフィードバックモデルの4つである(図1)。これらのロバストネスを比較することで、ロバストな概日リズムを生み出す機構を明らかにする。

2.2.1 シングルフィードバックモデル

シングルフィードバックモデル(図1A)は、概日リズムを生み出す最小のモデルである。このモデルでは、時計タンパク質 X が自身の発現を抑制する。時計タンパク質がシステム外の遺伝子の発現を制御することで細胞全体が概日リズムを示す。従って、このモデルの出

力を核内の X とする。

2.2.2 セミデュアルフィードバックモデル

セミデュアルフィードバックモデル(図1B)は、ショウジョウバエ概日リズムの dCLK-CYC フィードバック、哺乳類概日リズムの BMAL1-CLK フィードバックから導かれたモデルである。このモデルは、 X と Y という2種類の時計タンパク質を持つ。 X と Y は、ショウジョウバエではそれぞれ dCLK と CYC に対応している。哺乳類では BMAL1 と CLK にそれぞれ対応している。セミデュアルフィードバックモデルでは、 X と Y の複合体 ($X:Y$) が核内に移行し、 X の発現を抑制する。一方、 Y は $X:Y$ の制御を受けずに恒常的に発現する。セミデュアルフィードバックモデルの出力は核内 $X:Y$ である。このモデルでは Y の発現量が振動のロバストネスに影響を与えると予想される。

2.2.3 デュアルフィードバックモデル

デュアルフィードバックモデル(図1C)は、ショウジョウバエ概日リズムの PER-TIM フィードバック、哺乳類概日リズムの PER-CRY フィードバックから導かれたモデルである。従って、このモデルの X と Y は、ショウジョウバエの PER と TIM、哺乳類の PER と CRY に対応する。デュアルフィードバックモデルでは、 X と Y の両方の発現が $X:Y$ に制御される。このモデルでは核内 $X:Y$ が出力である。先行研究では、デュアルフィードバックは最もロバストネスの低い構造であると報告されている¹³⁾。

デュアルフィードバックモデルは X と Y に関して対称的な構造である。 X と Y の同じ反応プロセスの動力学パラメータに同じ値を与えることで、完全に対称なデュアルフィードバックを得ることができる。 X と Y の同じ反応プロセスが同じ動力学パラメータの値を持つとき、このデュアルフィードバックは動学的に対称であると言う。動学的対称性は振動のロバストネスに影響を与えると予想される。本稿では、 ρ ($0 \leq \rho \leq \infty$) というパラメータを導入することで動学的対称性を調節する。 Y に関する動力学パラメータ p_j の取りうる値は次の通りである。

$$p_i(1 + \rho)^{-1} \leq p_j \leq p_i(1 + \rho) \quad (4)$$

ここで、 p_i は X に関する動力学パラメータである。 ρ が小さくなるに従って p_j の値は p_i に近い値をとる。そして $\rho = 0$ のとき $p_j = p_i$ となる。このとき2つのフィードバックループは動学的に対称である。

2.2.4 リダンダントフィードバックモデル

リダンダントフィードバックモデル(図1D)では、 X と Y は結合せずに独立して X と Y の発現を制御する。このモデルの出力は、核内 X と核内 Y である。リダンダントフィード

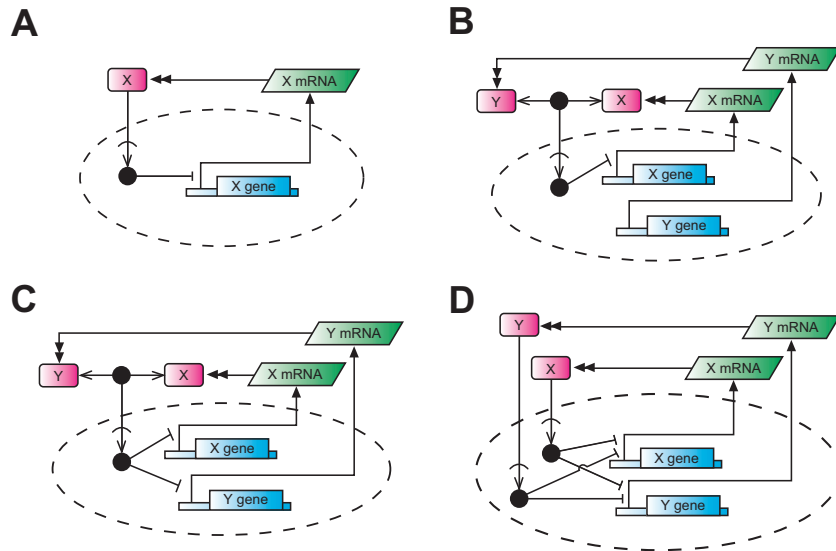


図1 生化学モデルのネットワークマップ。A: シングル, B: セミデュアル, C: デュアル, D: リダンダントフィードバックモデル。簡略化のためネットワークマップの表記法には CADLIVE 表記⁷⁾ を使用している。
Fig. 1 Network maps of (A) the single, (B) semi-dual, (C) dual, (D) redundant feedback models. The notation of CADLIVE⁷⁾ is used for simplifying the diagrams.

バックは生物では見られない構造である。しかし、先行研究は、ロバストな振動を生み出す構造であると報告している¹³⁾。リダンダントフィードバックモデルは、デュアルフィードバックモデルと同様に X と Y に関して対称的な構造である。従って、このモデルにおいても動力的対称性が振動のロバストネスに影響を与えると予想される。

2.3 生化学システムの数学的制御比較

ロバストネスはシステム構造だけでなく動力学パラメータの値にも依存する^{2),8),13),14)}。従って、システムの構造とロバストネスの関係を明らかにするには、動力学パラメータの選び方の影響を排除する必要がある^{1),2)}。本研究では、概日リズムを生み出す動力学パラメータの値をパラメータ空間から網羅的に見つけ出し、それら全てを解析に用いる。これによって特定の動力学パラメータの値に依存しない、ある程度一般化された解析結果を得ることができる。パラメータ探索には Two-phase search (TPS) 法⁹⁾ を用いる。TPS 法はランダム探索と遺伝的アルゴリズムから成るパラメータ探索法である。

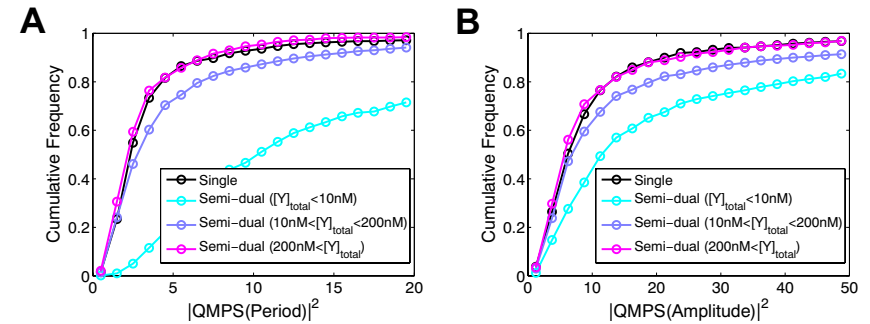


図2 セミデュアルフィードバックモデルの QMPS の累積頻度分布。A: 周期, B: 振幅。
Fig. 2 The cumulative frequency distribution of QMPS for the semi-dual feedback model. A: period, B: amplitude.

3. 結果と考察

本章では、まず各モデルの解析結果について述べ、最後にモデル間の比較について述べる。

3.1 セミデュアルフィードバックモデル

Y 発現量の異なる 3 つの場合において、典型的な概日振動を生み出す動力学パラメータセットを探索した。そして、それら全てに対して周期と振幅の QMPS を算出した。QMPS の累積頻度分布を図 2 に示す。周期と振幅の両方に関して、Y 濃度が十分に高いとき、セミデュアルフィードバックモデルはシングルフィードバックモデルとほぼ同じ QMPS の分布を示す。つまり、Y の発現量が多いとき、セミデュアルフィードバックモデルの振動のロバストネスはシングルフィードバックモデルと同程度である。Y の濃度が減少するに従って QMPS は大きくなる傾向にある。セミデュアルフィードバックモデルがロバストな概日リズムを生み出すためには Y 濃度は高くなければならない。

既に述べたように、ショウジョウバエ dCLK-CYC フィードバックと哺乳類 BMAL1-CLK フィードバックはセミデュアルフィードバック構造である。Y に対応する時計タンパク質であるショウジョウバエ CYC と哺乳類 CLK は高い濃度で発現していることが実験で示されている^{3),11),12)}。従って、Y 発現量を増すことで、生物はロバストな振動を実現していると考えられる。

3.2 デュアルフィードバックモデル

ρ の異なる 5 つの場合に分けて、典型的な概日振動を生み出す動力学パラメータセットを

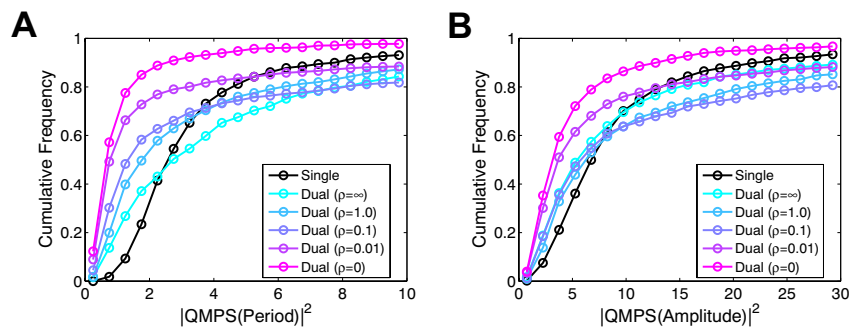


図 3 デュアルフィードバックモデルの QMPS の累積頻度分布 . A: 周期, B: 振幅 .

Fig. 3 The cumulative frequency distribution of QMPS for the dual feedback model. A: period, B: amplitude.

探索した . そして , それら全てに対して周期と振幅の QMPS を算出した . QMPS の累積頻度分布を図 3 に示す . 周期と振幅の両方に関して , ρ が小さくなるに従って QMPS は小さくなる . これは , 動力学的対称性が振動のロバストネスを向上させることを示す . X と Y に関する動力学パラメータが同じ値をとるとき ($\rho = 0$) , デュアルフィードバックモデルはシングルフィードバックモデルよりもロバストな振動子になる .

生化学システムがロバストネスを最大化するように進化すると仮定するならば , 実際の生物のデュアルフィードバック構造も動力学的に対称になっていると予想される . ショウジョウバエ PER-TIM フィードバックはデュアルフィードバック構造である . PER と TIM は転写と分解に関して同じ制御を受けており , その発現傾向もよく似ている . そのため PER と TIM の対応する反応ステップはほぼ同じ動力学パラメータの値をとると考えられている¹⁴⁾ .

3.3 リダントフィードバックモデル

ρ の異なる 5 つの場合に分けて , 典型的な概日振動を生み出す動力学パラメータセットを探索した . そして , それら全てに対して周期と振幅の QMPS を算出した . QMPS の累積頻度分布を図 4 に示す . Y に関する動力学パラメータの範囲が制限されていないとき ($\rho = \infty$) , QMPS の分布はシングルフィードバックモデルとほぼ同じである . 詳細に調べた結果 , この条件では X と Y の 2 つのフィードバックのうち 1 つだけが機能しており , リダントフィードバックモデルは事実上シングルフィードバックモデルとして振舞っていた . ρ の値が比較的大きいとき ($\rho > 0.1$) , ρ の減少とともに QMPS は大きくなる . 一方 , ρ の値が小さいとき ($\rho < 0.1$) , ρ の減少とともに QMPS は小さくなる . $\rho = 0$ のとき QMPS が最も

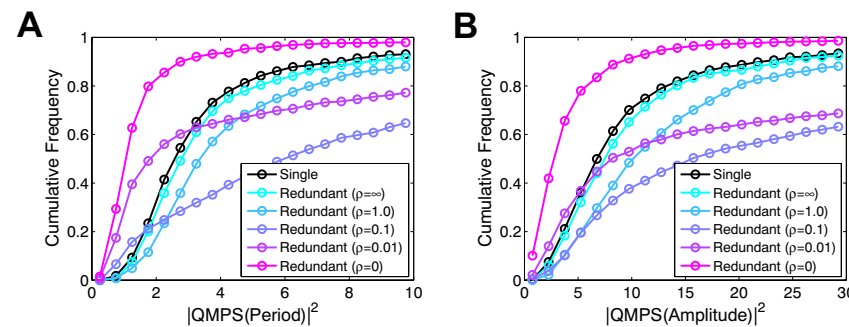


図 4 リダントフィードバックモデルの QMPS の累積頻度分布 . A: 周期, B: 振幅 .

Fig. 4 The cumulative frequency distribution of QMPS for the redundant feedback model. A: period, B: amplitude.

小さくなり , シングルフィードバックモデルよりも QMPS が小さくなる . つまり , リダントフィードバックモデルにおいて , 完全な動力学的対称性 ($\rho = 0$) はロバストネスを向上させるが , 不完全な動力学的対称性 ($\rho = 0.1$) はロバストネスを著しく低下させる .

3.4 モデル間の比較

最もロバストになる条件における各モデルの QMPS の累積頻度分布を図 5 に示す . 周期と振幅に関して , デュアルフィードバックモデルとリダントフィードバックモデルの QMPS はほぼ同じであり , シングルフィードバックモデルよりも小さい . これはデュアルフィードバックモデルとリダントフィードバックモデルがシングルフィードバックモデルよりもロバストな振動子に成り得ることを示す . しかし , 既に述べたように , リダントフィードバックモデルでは , 不完全な動力学的対称性が振動のロバストネスを著しく損なう . 一方 , デュアルフィードバックモデルでは , 動力学的対称性が多少不完全でもロバストネスはそれほど低下しない . 従って , ロバストな振動を生み出す上で最も優れたモデルはデュアルフィードバックモデルである .

リダントフィードバック構造は生物では見られないにも関わらず , 先行研究では最もロバストなモデルであるとされていた¹³⁾ . 我々が先行研究と異なる結論に至った原因は次の 2 点であると考えられる . まず , 先行研究ではパラメータ探索が不十分である . 我々は , TPS 法によって広いパラメータ空間を効率的に探索した . そして , 各モデルにおいて 1,000 個の動力学パラメータセットを解析に用いた (図 2-図 5 の各線は 1,000 個の QMPS の値から成る) . 一方 , 先行研究では , 各モデルに対して数十個の動力学パラメータセットしか用

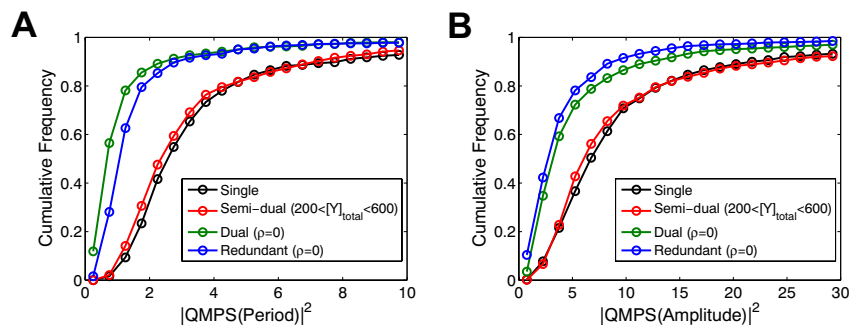


図 5 4つのフィードバックモデルの QMPS の累積頻度分布 . A: 周期, B: 振幅 .

Fig. 5 The cumulative frequency distribution of QMPS for the four feedback models. A: period, B: amplitude.

いていない . また , 先行研究では正確にロバストネスの定量化を行えていない . 我々はロバストネスの定量化に QMPS を用いた . 先行研究はモンテカルロ法でロバストネスの定量化を行っているが , この試行回数が少なすぎる . モンテカルロ法で正しい結論を得るには , 少なくとも 10,000 回程度のシミュレーションが必要である¹⁰⁾ . これに対して , 先行研究では 200 回しかシミュレーションを行っていない . このように , 生化学モデルのロバストネスを比較するには , 優れたパラメータ探索法とロバストネスの厳格な指標を用いることが重要である .

4. おわりに

本稿では , TPS 法と QMPS を用いて , ロバストな概日リズムを生み出すフィードバック構造を明らかにした . セミデュアルフィードバックモデルのロバストネスは , 概日制御を受けない時計タンパク質に依存しており , このタンパク質の濃度が上昇すると振動のロバストネスは向上する . ショウジョウバエ CYC と哺乳類 CLK が高い発現を示している事実は , この解析結果を支持している . 動的学的に対称なフィードバックを持つとき , デュアルフィードバックモデルは最もロバストな振動子になる . ショウジョウバエの PER と TIM が転写と分解に関して同じ制御を受けているという事実は , この解析結果を支持している . リダンダントフィードバックモデルも動的学的に対称なフィードバックを持つときにロバストな振動子になる . しかし , 動的学的対称性が不完全であるとき , 振動が非常に脆くなるという欠点を持つ . このような理由から , デュアルフィードバックモデルがロバストな振動を

生み出す最も優れた構造であると言える .

本稿では動力学パラメータの変動に対するロバストネスに焦点を当てた . 化学反応は確率的イベントであるので , 細胞内にはノイズが存在する⁶⁾ . 概日リズム発振機構はノイズに対してもロバストでなければならない⁵⁾ . また , 概日リズムはロバストであるだけでなく , 光や温度の周期的変化に同調する性質を持つ . 今後はこれらの点も考慮に入れ , 概日リズム発振機構の複雑性の謎に迫る必要がある .

参考文献

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) Bae, K., Lee, C., Hardin, P.E. and Edery, I.: dCLOCK Is Present in Limiting Amounts and Likely Mediates Daily Interactions between the dCLOCK-CYC Transcription Factor and the PER-TIM Complex, *The Journal of Neuroscience*, Vol.20, No.5, pp.1746–1753 (2000).
- 4) Csete, M.E. and Doyle, J.C.: Reverse engineering of biological complexity, *Science*, Vol.295, No.5560, pp.1664–1669 (2002).
- 5) Gonze, D., Halloy, J. and Goldbeter, A.: Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise, *PNAS*, Vol.99, No.2, pp.673–678 (2002).
- 6) Kurata, H., El-Samad, H., Iwasaki, R., Ohtake, H., Doyle, J.C., Grigoroava, I., Gross, C.A. and Khammash, M.: Module-based analysis of robustness tradeoffs in the heat shock response system, *PLoS Computational Biology*, Vol.2, No.7, p.e59 (2006).
- 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., Tanaka, T. and Ohnishi, F.: Mathematical identification of critical reactions in the interlocked feedback model, *PLoS ONE*, Vol.2, No.10, p.e1103 (2007).
- 9) Maeda, K. and Kurata, H.: Two-phase search (TPS) method: Nonbiased and high-speed parameter search for dynamic models of biochemical networks, *IPJS Transactions on Bioinformatics*, Vol.2, pp.2–14 (2009).

- 10) Maeda, K. and Kurata, H.: Quasi-multiparameter sensitivity measure for robustness analysis of complex biochemical networks, *Journal of Theoretical Biology*, Vol.272, No.1, pp.174–186 (2011).
- 11) Reppert, S.M. and Weaver, D.R.: Molecular analysis of mammalian circadian rhythms, *Annual Review of Physiology*, Vol.63, pp.647–676 (2001).
- 12) Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., vander Horst, G. T.J., Hastings, M.H. and Reppert, S.M.: Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock, *Science*, Vol.288, No.5468, pp.1013–1019 (2000).
- 13) Stelling, J., Gilles, E.D. and Doyle III, F.J.: Robustness properties of circadian clock architectures, *PNAS*, Vol.101, No.36, pp.13210–13215 (2004).
- 14) Xie, Z., Kulasiri, D., Samarasinghe, S. and Qian, J.: An unbiased sensitivity analysis reveals important parameters controlling periodicity of circadian clock, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.105, No.2, pp.250–259 (2010).