

位相応答曲線の数理解析

瓜生 耕一郎[✉]

金沢大学 理工研究域 生命理工学系

概日時計が明暗サイクルに同調するメカニズムの一つは、受容した光シグナルに応じてその位相を前進および後退させることである。光シグナルが概日時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループや、リン酸化などで制御されるタンパク質の活性状態に作用することで細胞レベルの位相変化が起き、多細胞生物の場合にはさらに組織および個体レベルでの位相変化が起きる。概日時計の位相応答能を調べるのに一般的に用いられるのは、恒暗条件下において短時間の光パルスを生体に投与することで得られる位相応答曲線 (PRC) である。本稿では PRC の形状に関する数理解析を紹介し、細胞内の遺伝子制御や生化学反応が PRC に及ぼす影響について議論する。初めに、複数の生物種の PRC の特徴である位相不応期 (dead zone) が、転写翻訳フィードバックループ内の飽和型の生化学反応によって形成されることを示す。次に、哺乳類の概日時計遺伝子 *Period1/2* の位相応答における役割分担について紹介する。

1. はじめに

地球上の多くの生物は、生体内の概日時計により約 24 時間周期の生理活性および行動リズムを示す。概日時計は、細胞内の遺伝子発現リズム、もしくはリン酸化状態などによって変化するタンパク質活性リズムによって構成される。発振メカニズムは、多くの生物において時計遺伝子産物のネガティブフィードバックループ (negative feedback loop; NFL) である (図 1A, B)。哺乳類では、CLOCK/BMAL1 タンパク質複合体が E-box 配列に結合することにより *Period* (*Per*) 遺伝子や *Cryptochrome* (*Cry*) 遺伝子の転写を誘導する (図 1A)。翻訳された PER と CRY は複合体を形成し、CLOCK/BMAL1 に結合することで自身の転写を抑制する。mRNA からタンパク質が合成され、複合体が転写を抑制するまでには時間がかかるため、この間に *Per* と *Cry*mRNA は十分増えることができる。増加した *Per*, *Cry*mRNA からは多くのタンパク質が合成され、タンパク質が分解されてなくなるまでの長い時間、自身の転写を抑制する。PER/CRY タンパク質がなくなると転写が再開し、この繰り返しによりリズムが生じる。ショウジョウバエでは、CLOCK/CYCLE 複合体が *timeless* (*tim*) および *per* のプロモーターに存在する E-box に結合することでこれらの遺伝子の転写を誘導する (図 1B)。TIM/PER 複合体は CLOCK/CYCLE に結合し、自身

の転写を抑制することでフィードバックループを閉じる。

概日時計の重要な性質として、明暗サイクルに対する同調能が挙げられる。様々な生物において恒常暗での概日時計の周期 (フリーラン周期) は、24 時間とはわずかに異なる。受容された光シグナルは時計遺伝子産物の発現および活性を変化させ、時刻依存的に概日時計を進めたり遅らせたりすることで概日時計の周期を明暗サイクルの周期に一致させる。光シグナルの入力によって起きる NFL 内の生化学反応は生物種によって異なる。例えば、哺乳類の場合、網膜で受容された光シグナルは時計中枢である視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) に伝わり、神経細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させる。それによりさまざまなリン酸化酵素が活性化され、CREB のリン酸化が起きる。リン酸化 CREB は *Per* 遺伝子の発現を一過的に誘導する (図 1A)^{1,2}。ショウジョウバエの場合、光シグナルにより CRY タンパク質が活性化され、TIM タンパク質の分解を促進する (図 1B)³⁻⁶。光シグナルにより細胞内の時計タンパク質の濃度が増減することで、概日時計の進み方が変化する。時計中枢の情報は末梢組織へと伝達され、各組織における概日時計の変化を導き⁷、時計中枢と末梢組織の両方のリズムの周期が明暗サイクルの周期に一致する。このように、光シグナルが NFL の生化学反応に影響

[✉] uriu@staff.kanazawa-u.ac.jp

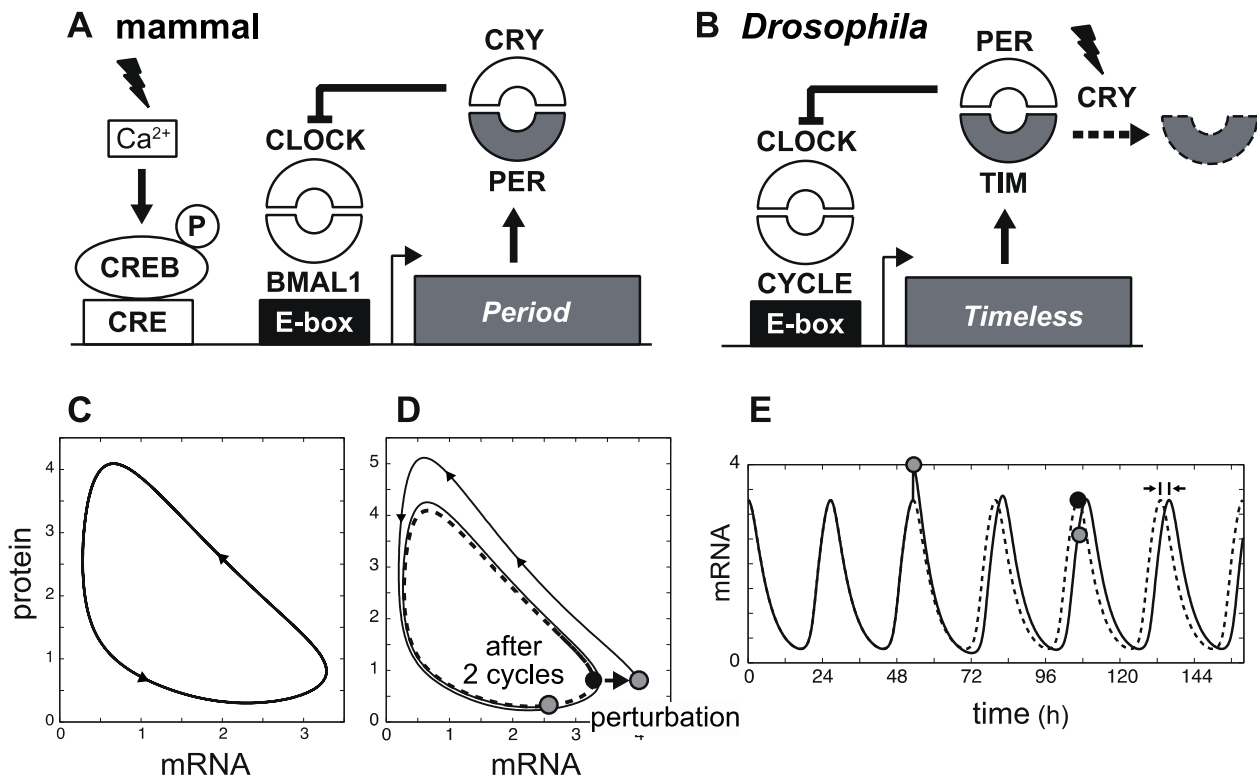


図1 概日時計への光シグナルの入力と位相変化

(A) 哺乳類の時計遺伝子 *Period* の転写調節と光シグナルによる転写誘導。光シグナルは神経細胞内の Ca^{2+} 濃度を増加させる。 Ca^{2+} 濃度の増加によりリン酸化酵素が活性化され CREB がリン酸化される。リン酸化 CREB は CRE 配列に結合し *Per* の転写を誘導する。
 (B) ショウジョウバエの *timeless* の転写制御。光シグナルは CRY によって受容され、TIM の分解を促進する。
 (C) リミットサイクル。矢印は軌道の進行方向を示す。
 (D) 黒丸のタイミングで mRNA 濃度を増加させる (矢印)。2 サイクル後に軌道はリミットサイクルに戻るが、その位相は mRNA 濃度の増加前と変化している (灰色丸)。
 (E) D の結果の時系列表示。実線は mRNA の濃度を一過的に増加させた場合を、点線は摂動がない場合のリズムを示す。ピーク時刻の時間差として位相差を測ることができる (矢印)。

を及ぼすことで、概日時計は明暗サイクルに同調することが可能となる。

概日時計の同調能を調べる方法として、恒常暗において生物に短時間の光パルスを投与し、それによる行動リズムの変化を調べる方法が用いられてきた。哺乳類の場合には、活動開始時刻や終了時刻の変化を測定することで、光パルスにより概日時計が進んだか遅れたかを判定できる。活動開始もしくは活動終了は概日時計の 1 サイクル内の決まった「時刻」で起きると考えられ、概日時計がどの「時刻」を指しているかの指標となる。概日時計によって決まる個体の主観的な「時刻」は位相とも呼ばれ、位相は概日時計が 1 サイクルのうちどの点にいるかを表す。恒常暗での光投与による位相変化は、光投与時刻を横軸に、その時刻での位相変化を縦軸にプロットした位相応答曲線 (phase response curve; PRC) として表示される^{8,9}。キイロショウジョウバエやマウスの PRC は、位相前進期、後退期、そして位相変化の起きない不応期

(dead zone) を含んだ連続的な曲線でありタイプ 1 型と呼ばれる。これまでに PRC が測定された生物において、主観的明け方の光パルスは行動リズムの位相前進を導く。主観的夕方から夜にかけて光パルスは位相後退を導く。一方、恒常暗下で主観的昼に光パルスを投与しても、位相はほとんど変化しない。この PRC の形状によって、概日時計の光サイクルに対する同調を説明することができる⁹⁻¹¹。例えば、フリーラン周期が 24 時間よりも長いハムスターでは、PRC の位相前進領域が大きく、それにより光シグナルで概日時計を進め 24 時間の光サイクルに同調できる。フリーラン周期が 24 時間に近いラットやシロアシネズミでは、位相前進領域と後退領域の大きさがほぼ同じである。一方、フリーラン周期が 24 時間よりも短いマウスでは位相後退領域が大きく、それにより概日時計を遅らせて 24 時間の明暗サイクルに同調する。

動物の行動リズムの位相変化は、細胞・中枢・末梢組織レベルのそれぞれの段階における概日時計の位相

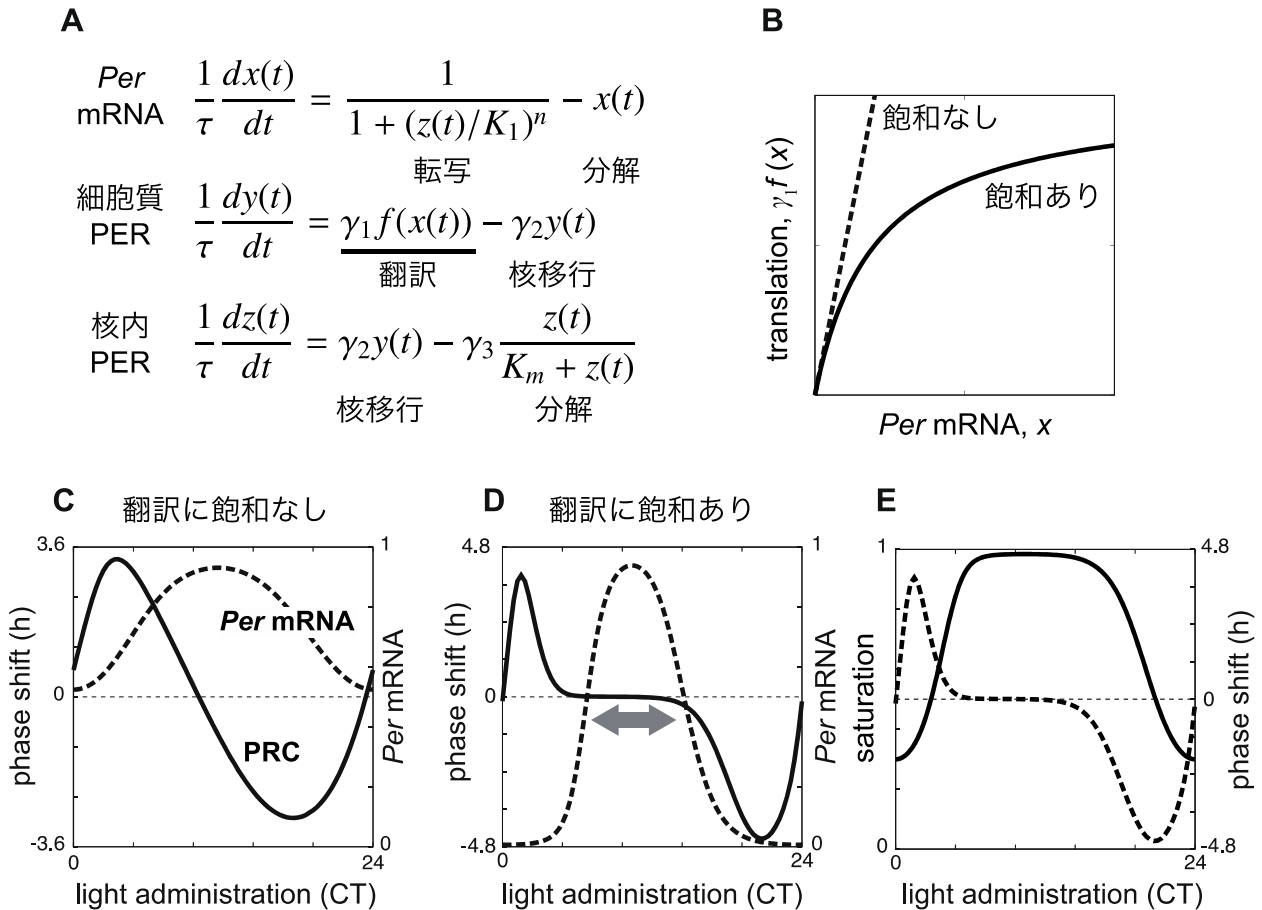


図2 哺乳類の概日時計の dead zone 形成

(A) 微分方程式モデル。翻訳は Per mRNA の濃度 x の関数。

(B) mRNA 濃度に対する翻訳率の依存性。実線は mRNA 濃度が高くなると翻訳が飽和するとした場合を、点線は mRNA 濃度に比例する場合をそれぞれ示す。

(C) 翻訳が mRNA の濃度に比例する場合 ($f(x) = x$) の PRC。

(D) 翻訳が飽和する場合 ($f(x) = x/(k + x)$, k は定数) の PRC。実線は PRC、点線は Per mRNA の濃度をそれぞれ表す。灰色矢印が dead zone を示す。

(E) 翻訳が飽和する時間帯に dead zone ができる。実線は翻訳の飽和率を表し、値が 1 に近いほど翻訳が飽和している。点線は PRC を表す。

変化によってもたらされるだろう^{7,12}。本稿では、細胞レベルの概日リズムの位相応答が個体レベルの位相応答の基盤であるという考えに基づいて、遺伝子発現レベルの位相応答について議論する。概日時計の NFL のどのような特性が、上記の PRC の形状を決めるかを紹介する。初めに連続曲線であるタイプ 1 型の PRC において dead zone が形成されるメカニズムについて議論する¹³。次に、哺乳類の位相応答における二つの Per 遺伝子 (Per1/Per2) の役割分担について紹介する¹⁴。

2. リミットサイクルと位相変化

数理モデルを使った概日時計の理論研究では、NFL に含まれる mRNA やタンパク質といった時計遺伝子産物の濃度変化を、微分方程式で表す方法がも

ちいられる¹⁵⁻²⁰。コンピュータを使い微分方程式の解を求めると、時間が経つと元の状態に戻る周期解が得られる。NFL によって生じる周期解は、微分方程式に含まれる濃度変数の初期値に対して頑健性をもち、異なる初期濃度からスタートしたとしても十分時間が経つと同じ周期軌道に収束する。このような特徴をもつ周期軌道はリミットサイクルと呼ばれる(図 1C)。リミットサイクルが約 24 時間の振動周期を示す場合、概日時計の数学的表現となる。細胞の状態がリミットサイクルのどの「場所」にあるかは、リミットサイクルの各点に数値(例えば 0 から 2π の間の数値)を割り振ることで指定することができる。このように割り振られた数値は位相とよばれる。リミットサイクルの周期が仮に 24 時間だとすると、位相が 2π 変化するのに 24 時間かかることになる。

ノイズなどの一過的な摂動により時計遺伝子産物の濃度がリミットサイクルから離れたとしても、時間が経つともとのリミットサイクルに戻る。しかし、リミットサイクル上のどの位相に戻るかは、摂動に依存する (図 1D, E)。概日時計の光シグナルに対する応答を問題とする場合、光シグナルによって誘発される生化学反応の変化を摂動としてとらえ、それによる位相変化を調べる。光パルスが加わる以前よりも進んだ位相に戻った場合は、光パルスにより概日時計が進んだことになる。逆に遅れた位相に戻った場合には、時計が遅れたことになる (図 1D, E)。摂動の前後の位相変化は $-\pi$ から π の間の数値で表すことができる。また、リミットサイクルの周期との関係から概日時計が何時間変化したかで位相変化を表すこともできる。例えばピーク時刻の差を計算することで、位相変化を時間の単位で測ることができる (図 1E 矢印)。慣習的に位相前進は正の値で位相変化量を表し、位相後退は負の値で表す。摂動が加えられた位相 (もしくは主観的時間) を横軸に、位相変化量を縦軸にプロットすることで PRC が得られる。位相変化量の大きさ (絶対値) はリミットサイクルの性質や摂動の強さに依存する。位相変化量の大きさが π (周期の 1/2) に到達する PRC はタイプ 0 型と呼ばれる。位相変化量の大きさが π よりも十分小さい場合には、PRC は 0 の周りで変化する連続した曲線になりタイプ 1 型と呼ばれる。以降ではタイプ 1 型の PRC に関して議論する。

3. Dead zone の数理解析

キイロショウジョウバエやマウスといった幅広い生物種で主観的昼の数時間のあいだは光パルスを投与しても概日時計の位相が変化しない。dead zone では光シグナルに対する概日時計の位相変化量が低下するため、日中に光照度が増加したとしても位相に大きな影響を及ぼさないことが理論研究によって報告されている²¹⁻²³。また、PRC に dead zone が含まれると、日の出 (もしくは日の入り) と概日時計の間の位相関係を日長が変化した場合でも一定に保てること、数理モデルを用いた研究によって示されている²⁴。

dead zone を作り出す機構にはどのようなものが考えられるだろうか。これまで哺乳類では、主観的明期には *Per* 遺伝子が光シグナルによって転写誘導されずそのため位相変化が起きない、と考えられてきた²⁵⁻²⁸。この概日時計への光シグナルのゲーティングの分子メカニズムは分かっていないが、光入力を遮ることにより日中の光シグナルの変動の影響を遮断するこ

とができる。しかし、細胞内の *Per* の転写量のゆらぎの影響などゲート内部で起きるノイズの影響を減少させることはできない。このような転写量のゆらぎはリミットサイクルから細胞の状態を逸脱させ、位相を変化させうる。dead zone をつくるもう一つの方法は、摂動に対するリミットサイクルの応答性自体を主観的昼に低下させることである。リミットサイクル自体の応答性が低下すれば、光照度のゆらぎだけでなく、遺伝子発現のゆらぎに起因する位相の変動も低下すると予想される。前述のように、リミットサイクルは NFL によって生じる。NFL に含まれる生化学反応によって dead zone をつくれば、光シグナルと遺伝子発現のゆらぎの両方に対応することができる。

哺乳類の NFL による dead zone 形成: 哺乳類の NFL によって dead zone をつくるには、どのような反応が必要だろうか。この問いに答えるために、光シグナルによって発現が誘導される *Per* mRNA とタンパク質のダイナミクスに着目する。*Per* mRNA 濃度、細胞質 PER タンパク質濃度、核内 PER タンパク質濃度を変数とした 3 変数微分方程式モデルを作成した (図 2A)¹³。転写された *Per* mRNA の濃度に比例して、細胞質で PER タンパク質が翻訳される (図 2B)。PER タンパク質は核内に移行し、転写を抑制する。哺乳類の時計中枢組織である SCN では、日中に *Per* mRNA 転写リズムが極大となる^{25,26,29}。そこで、*Per* mRNA 濃度が高い時間帯を、数理モデルにおける主観的明期と定義した。このモデルをシミュレーションした場合、光パルス投与により位相前進と後退は起きるが、数時間にわたる dead zone は現れなかった (図 2C)。そこで、この単純なモデルを雛形とし生化学反応を付加していくことで、dead zone が生じるメカニズムを明らかにする。

モデルに含まれる生化学反応を表す関数型をいろいろと変えていったところ、mRNA 濃度が高い場合に PER タンパク質の翻訳が飽和してしまうと、主観的明期に dead zone が形成されることが分かった (図 2B, D)。これは、*Per* mRNA 濃度が高い明期では翻訳が飽和してしまい、光パルスによって *Per* mRNA がさらに誘導されてもタンパク質濃度は変化せず、位相変化が起きないためである。一方、明け方や夕方、および夜の時間帯では *Per* mRNA 濃度が低いため、翻訳が飽和していなくその時間帯の光パルスは PER タンパク質濃度を増加させ、位相変化を導く (図 2E)。言い換えると、翻訳の飽和が NFL 内のゲートとしてはたらき、dead zone が形成される。PER タンパク質の翻訳の飽和は起きうるのだろうか。*Per* mRNA に

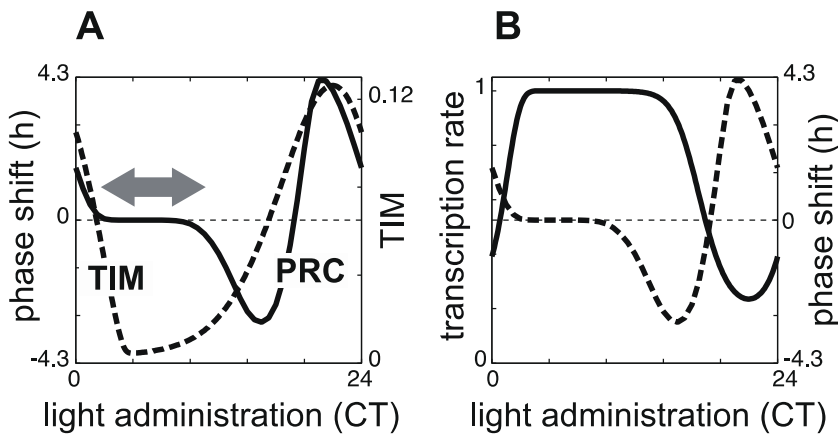


図 3 キロショウジョウバエの概日時計の dead zone 形成
 (A) PRC (実線) と TIM タンパク質の濃度 (点線)。灰色の矢印が dead zone を示す。
 (B) *tim* mRNA の転写速度 (実線) が飽和しているときに dead zone が生じる。点線は PRC を示す。

対して細胞内のリボソーム量が足りなくなるとは考えにくい。先行研究により、PER1 タンパク質の翻訳には RNA 結合タンパク質である LARK が必要となることが分かっている³⁰。これらの時計遺伝子産物の翻訳に必要なタンパク質の数が限られていれば、モデルで予測した翻訳の飽和が細胞内で起きる可能性がある。

ショウジョウバエの NFL による dead zone 形成:
 キロショウジョウバエの PRC にも哺乳類と同様に dead zone が含まれる。ショウジョウバエの場合、光シグナルは神経細胞内の CRY タンパク質によって受容される (図 1B)。CRY は時計タンパク質である TIM の分解を導き、それによって概日時計の位相変化が起きる。TIM は主観的明期に極小値をとる。シミュレーションを行うと、振動の谷の TIM 濃度が低いほど dead zone が形成されやすいことが分かった (図 3A)¹³。TIM は転写抑制因子として機能するため、その濃度が低い主観的明期には、*tim* 遺伝子の転写が最大速度で起きている。すなわち、転写量が飽和している (図 3B)。その時間に光シグナルによって TIM を分解しても、転写速度が最大値に飽和しているためそれ以上 *tim* mRNA を増やすことができない。*tim* mRNA 濃度が変化しないため TIM タンパク質濃度の変化も起きず、位相変化も起きない。実際のショウジョウバエの細胞でも、*tim* mRNA の転写速度には利用できる RNA ポリメラーゼの数などで決まる上限値が存在すると考えられる。TIM の濃度が十分低く転写速度がこの上限値に到達していれば dead zone が生じるとモデルから予測される。

まとめると、哺乳類とショウジョウバエでは光シグナルによって誘導される生化学反応は異なるが、どちらも飽和反応によって光シグナルの影響がキャンセルされる。このように、dead zone は NFL に含まれる生化学反応の飽和を利用して形成されることが、

数理モデルを用いた解析により予測された。

4. 哺乳類時計遺伝子 *Per1* と *Per2* の位相応答における役割分担

哺乳類では *Per1/2/3* の三つの *Per* 遺伝子がゲノム中に存在している。このうち *Per3* は光シグナルによって誘導されず、概日時計の位相応答に関与しないことが知られている^{11,31}。一方、*Per1/2* は光シグナルにより SCN において転写が一過的に誘導される (図 4A)。PER1 と PER2 タンパク質はアミノ酸配列がよく保存されており、共に CRY と複合体を形成し CLOCK/BMAL1 に結合することでその転写誘導能を抑制する。すなわち *Per1* と *Per2* の二重の NFL が概日リズムの発振と位相応答に関与する。恒暗条件下での mRNA のフリーランリズムを計測すると、*Per1* mRNA 濃度は主観的明期に極大となる。*Per2* mRNA 濃度は *Per1* から約 4 時間遅れて極大となる^{25,32,33}。この約 4 時間のピーク時間差をつくるには、*Per2* のプロモーターに存在する特定の塩基配列と、PER2 タンパク質自身による制御が必要であることが示唆されている^{34,35}。4 時間のピーク時間の差は *Per1* と *Per2* の間に何らかの機能的な違いをもたらすのであろうか？

この問いに答えるため、*Per1* と *Per2* の遺伝子産物の濃度変化をモデル化し数理解析を行なった¹⁴。転写・翻訳によって作られた PER1/2 タンパク質は、自身と相手の転写をプロモーターに結合することで抑制するとする。*Per1* mRNA 濃度と *Per2* mRNA 濃度のピーク時間の差をパラメタとしてその影響を調べるために、遅延型の微分方程式を解析に使用した。遅延型微分方程式では、mRNA が転写されリボソームで翻訳に利用可能となるまでにかかる時間を、時間遅れパラメタで表現する。この時間遅れの長さが *Per1*

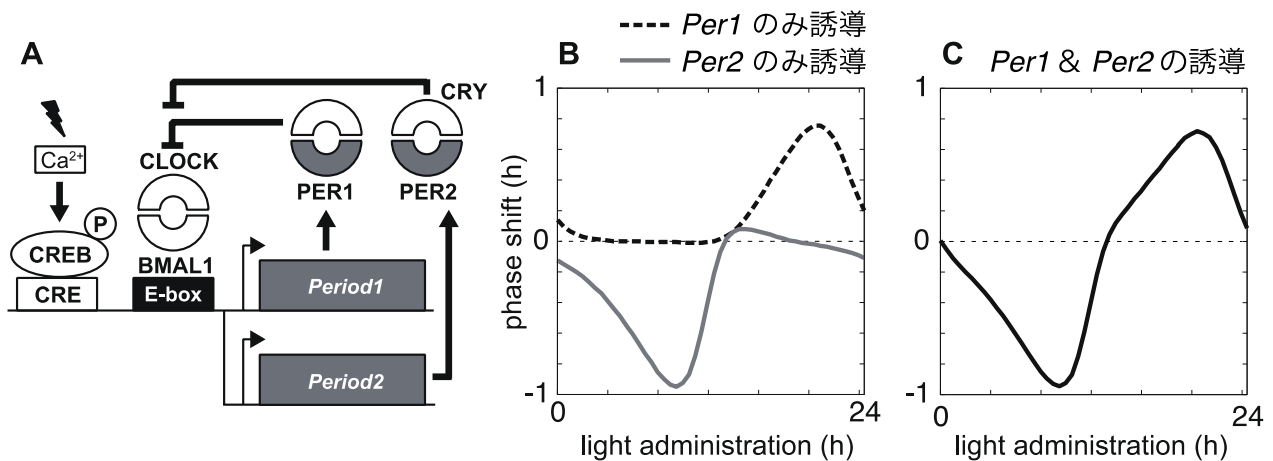


図4 哺乳類 *Period1/2* (*Per1/2*) の位相応答における役割分担

(A) *Per1/2* の転写制御。

(B) *Per1* と *Per2* のどちらか片方を短時間の光パルスで一過的に誘導した場合の PRC。点線は *Per1* のみを誘導した場合。実線は *Per2* のみを誘導した場合。

(C) *Per1* と *Per2* の両方を一過的に誘導した場合の PRC。単純化のため、このモデルには図2のモデルで仮定した翻訳の飽和が含まれていない。そのため PRC には不応期が含まれない。

と *Per2* の間で4時間異なるとすることで、詳細なメカニズムを仮定しなくともピーク時間の差を再現することができる。数理モデルの利点は、*Per1* もしくは *Per2* のどちらか片方のみを一過的に転写誘導リズムの変化を調べることで、両方の NFL の存在下(野生型条件下) で二つの機能を区別できる点にある。これは片方の NFL を欠失させる *Per1* もしくは *Per2* 遺伝子のノックアウト実験¹¹とは異なることに注意していただきたい。

シミュレーションを行ったところ、*Per1* と *Per2* の間に4時間のピーク時間差があると、光シグナルに対する位相応答において役割分担が生じることが分かった(図4B)。すなわち、光シグナルによる *Per1* の一過的な発現誘導は主に位相前進を導き、*Per2* の誘導は位相後退を導く。この分担はピークの時間差に依存しており、例えば1時間と時間差が短い場合には4時間でみられたような明確な分担は起きない。*Per1* と *Per2* のピークの時間差を1時間から徐々に大きくし *Per1* のみの発現誘導によって PRC を求めたところ、ピークの時間差とともに単調に位相後退領域が縮小し4時間付近を境に消失した。同様に *Per2* のみの発現誘導によって PRC を求めると、位相前進領域が縮小し同じくピークの時間差が4時間付近で図4Bに示すようにほぼ位相後退領域のみとなった。ピークの時間差を4時間以上にした場合でも同様の役割分担が起きる。この分担のメカニズムは次のようになる。*Per1* mRNA の増加期に光パルスによって *Per1* mRNA をさらに誘導すると、PER1 タンパク質濃度

の増加が速くなり、転写抑制が早くはたらき位相が前進する。一方、*Per1* mRNA の減少期に *Per1* mRNA を誘導しても、その時間帯には遅れて発現した PER2 タンパク質が十分量あるため、PER1 タンパク質の増加は位相に影響を及ぼすことができない。一方、*Per2* mRNA の増加期に *Per2* を一過的に誘導しても、先行して発現している PER1 タンパク質がすでに十分量あるため、PER2 タンパク質は位相に影響しない。*Per2* mRNA の減少期には、PER1 タンパク質濃度はすでに低下しているため、*Per2* を誘導すると余剰にできた PER2 タンパク質が転写抑制状態を延長し、位相後退が起きる。

実際の哺乳類の SCN では、*Per1* と *Per2* の両方が光シグナルによって転写誘導される。*Per1* と *Per2* を同時に転写誘導するシミュレーションを行ったところ、PRC の形状は *Per1* のみを転写誘導した場合の PRC と、*Per2* のみを転写誘導した場合の PRC を足し合わせたものに近くなることが分かった(図4C)。このことは、光シグナルによる *Per1* と *Per2* の転写誘導量の違いが、PRC の位相前進領域と後退領域の大きさに影響することを示唆する。PRC の形状は生物種によって異なる¹⁰。ハムスターの PRC は位相前進領域の面積が後退領域に対して大きい。反対に、マウスの PRC は後退領域の面積の方が大きい。上記の数理モデルの結果は、ハムスターでは *Per1* が光シグナルにより転写誘導されやすく、マウスでは *Per2* が転写誘導されやすい可能性を示唆している。一方で、*Per1* 欠失変異体マウスでは位相後退領域が野生型に

比べ顕著に大きくなり、*Per2* 欠失変異体マウスではわずかに前進領域が大きくなることが報告されている¹¹。そのため野生型哺乳類の PRC の形状の成り立ちを理解するには、(1)ノックアウト実験の結果と(2)*Per1*と*Per2*の二重 NFL の役割分担、の両方を考慮する必要があるだろう。

数理モデルの結果は、*Per1*もしくは*Per2*のどちらか片方のみを転写誘導できる化合物が存在すれば、その投与により位相前進もしくは後退のみが起きることを示唆している。このような化合物を単離できれば、数理モデルの予測を検証するだけでなく、効果的なリズム障害治療薬候補になるかもしれない。

5. おわりに

本稿では、PRC の形状に関する数理解析について紹介した。Dead zone の解析では、光シグナルが NFL へと入力される分子メカニズムは哺乳類とショウジョウバエで異なるが、生化学反応の飽和という共通したメカニズムで dead zone が生じる可能性を示した。このように遺伝子制御の背後にある共通性を明らかにできる点が、数理モデルを使うことの利点の一つである。また、哺乳類 *Per1/2* の解析では、どちらか片方のみを転写誘導した場合をシミュレーションすることで、それぞれの機能を切り分けることができた。野生型動物では光シグナルによって両方の *Per* 遺伝子が転写誘導されてしまうため、このような数値実験ができることも数理モデルの強みである。

紹介した数理モデルは細胞レベルでの位相変化を記述するものであった。これらの結果を基礎として、今後は組織および個体レベルでの位相応答を記述する手法を確立していく必要があるだろう。統計物理学で研究されている結合振動子集団の位相応答理論がその手助けとなるかもしれない³⁶⁻³⁸。

6. 謝辞

本稿は金沢大学 理工研究域の程 肇先生との共同研究に基づいています。UT Southwestern Medical Center の山崎 晋先生には原稿内容に関して貴重なコメントをいただきました。ここに感謝いたします。

参考文献

1. Tischkau, S. A., Mitchell, J. W., Tyan, S. H., Buchanan, G. F., & Gillette, M. U. Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of *Per1* is required for

- light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J. Biol. Chem.* **278**, 718-723 (2003).
2. Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7728-7733 (2002).
3. Ceriani, M. F. *et al.* Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* **285**, 553-556 (1999).
4. Koh, K., Zheng, X. & Sehgal, A. JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science* **312**, 1809-1812 (2006).
5. Lin, F. J., Song, W., Meyer-Bernstein, E., Naidoo, N. & Sehgal, A. Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7287-7294 (2001).
6. Naidoo, N., Song, W., Hunter-Ensor, M., & Sehgal, A. A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science* **285**, 1737-1741 (1999).
7. Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682-685 (2000).
8. Johnson, C. H. in *Circadian Clocks from Cell to Human* (eds T. Hiroshige & K. Honma) 209-249 (Hokkaido University Press, 1992).
9. 本間研一, 本間さと & 広重力. *生体リズムの研究*. (北海道大学図書刊行会, 1989).
10. Daan, S., & Pittendrigh, C. S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* **106**, 253-266 (1976).
11. Pendergast, J. S., Friday, R. C., & Yamazaki, S. Photic entrainment of period mutant mice is predicted from their phase response curves. *J. Neurosci.* **30**, 12179-12184 (2010).
12. Koinuma, S., Kori, H., Tokuda, I. T., Yagita, K., & Shigeyoshi, Y. Transition of phase response properties and singularity in the circadian limit cycle of cultured cells. *PLoS One* **12**, e0181223 (2017).

13. Uriu, K., & Tei, H. A saturated reaction in repressor synthesis creates a daytime dead zone in circadian clocks. *PLoS Comput Biol* **15**, e1006787 (2019).
14. Uriu, K., & Tei, H. Complementary phase responses via functional differentiation of dual negative feedback loops. *PLoS Comput Biol* **17**, e1008774 (2021).
15. Kurosawa, G., Mochizuki, A., & Iwasa, Y. Comparative study of circadian clock models, in search of processes promoting oscillation. *J. Theor. Biol.* **216**, 193-208 (2002).
16. Leloup, J. C., & Goldbeter, A. Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 7051-7056 (2003).
17. Novak, B., & Tyson, J. J. Design principles of biochemical oscillators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 981-991 (2008).
18. Ueda, H. R., Hagiwara, M., & Kitano, H. Robust oscillations within the interlocked feedback model of *Drosophila* circadian rhythm. *J. Theor. Biol.* **210**, 401-406 (2001).
19. Kim, J. K., & Forger, D. B. A mechanism for robust circadian timekeeping via stoichiometric balance. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 630 (2012).
20. Kurosawa, G., Fujioka, A., Koinuma, S., Mochizuki, A., & Shigeyoshi, Y. Temperature-amplitude coupling for stable biological rhythms at different temperatures. *PLoS Comp. Biol.* **13**, e1005501 (2017).
21. Hasegawa, Y., & Arita, M. Circadian clocks optimally adapt to sunlight for reliable synchronization. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20131018 (2014).
22. Hasegawa, Y., & Arita, M. Optimal implementations for reliable circadian clocks. *Phys. Rev. Lett.* **113**, 108101 (2014).
23. Pfeuty, B., Thommen, Q., & Lefranc, M. Robust entrainment of circadian oscillators requires specific phase response curves. *Biophys. J.* **100**, 2557-2565 (2011).
24. Geier, F., Becker-Weimann, S., Kramer, A., & Herzog, H. Entrainment in a model of the mammalian circadian oscillator. *J. Biol. Rhythms* **20**, 83-93 (2005).
25. Miyake, S. *et al.* Phase-dependent responses of *Per1* and *Per2* genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* **294**, 41-44 (2000).
26. Shigeyoshi, Y. *et al.* Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* **91**, 1043-1053 (1997).
27. Hamada, T. *et al.* Calbindin influences response to photic input in suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* **23**, 8820-8826 (2003).
28. Hughes, A. T., Fahey, B., Cutler, D. J., Coogan, A. N., & Piggins, H. D. Aberrant gating of photic input to the suprachiasmatic circadian pacemaker of mice lacking the VPAC2 receptor. *J. Neurosci.* **24**, 3522-3526 (2004).
29. Ueda, H. R. *et al.* System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat. Genet.* **37**, 187-192 (2005).
30. Kojima, S. *et al.* LARK activates posttranscriptional expression of an essential mammalian clock protein, PERIOD1. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1859-1864 (2007).
31. Takumi, T. *et al.* A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVL. *EMBO J.* **17**, 4753-4759 (1998).
32. Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G., & Lee, C. C. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* **91**, 1055-1064 (1997).
33. Takumi, T. *et al.* A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**, 167-176 (1998).
34. Ogawa, Y. *et al.* Positive autoregulation delays the expression phase of mammalian clock gene *Per2*. *PLoS One* **6**, e18663 (2011).
35. Yamajuku, D. *et al.* Identification of functional clock-controlled elements involved in differential timing of *Per1* and *Per2* transcription. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7964-7973 (2010).
36. Schmal, C. *et al.* Weak coupling between intracellular feedback loops explains

dissociation of clock gene dynamics. *PLoS Comp. Biol.* **15**, e1007330 (2019).

37. Kori, H., Kawamura, Y., Nakao, H., Arai, K., & Kuramoto, Y. Collective-phase description of coupled oscillators with general network structure. *Phys. Rev. E* **80**, 036207 (2009).
38. Hannay, K. M., Forger, D. B., & Booth, V. Seasonality and light phase-resetting in the mammalian circadian rhythm. *Sci. Rep.* **10**, 19506 (2020).

～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～

以下に、査読者と執筆者とのやりとりを許可を得て掲載いたしました。

(重吉)

～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～ ～

査読者 1

Q1. *timeless* の転写が飽和することは実際にありうるのでしょうか。

A1. TIM タンパク質の濃度が振動の谷でほぼゼロならば転写抑制がかからないため、*tim* mRNA の転写速度は利用できる RNA ポリメラーゼの数や RNA ポリメラーゼの DNA 上での移動速度などで決まるある上限値に到達する（つまり上限値に飽和する）と考えられます。この説明を書き加えました。実際に TIM タンパク質の濃度が低い時間帯に、光シグナルにより転写量が変化しないかどうかは、実験により検証する必要があります。

Q2. (本文)「この分担はピークの時間差に依存しており、例えば 1 時間と時間差が短い場合には 4 時間で見られたような明確な分担は起きない」。4 時間という量がどこまで特別なのか、よくわかりませんでした。ピークの時間差が 3 時間とか 8 時間でも同じことが起きるのでしょうか。

A2. *Per1* のみを誘導した場合の PRC と *Per2* のみを誘導した場合の PRC の違いは、この二つの間のピークの時間差に単調に依存します。例えば、ピークの時間差が 1 時間の場合には、*Per1* を光誘導した場合にも時間帯によって位相後退が生じます。ピークの時間差を徐々に大きくしていくと、位相後退領域が単調に減少していき、4 時間付近で図 4B 点線で示したように位相後退領域が消失し前進領域と位相変化が起きない領域のみになります。ここからピークの時間差をさらに 8 時間まで増加させても、PRC はほとんど変化しませんでした。つまり「4 時間」というのは *Per1* と *Per2* の位相応答への寄与が分離する（おおよそ）最小のピーク時間差にあたります。

Q3. 図 4 の位相応答曲線に不応期 (dead-zone) が表れていないことは、問題ないのでしょうか。不応期の出ている図 2,3 の位相応答曲線とは数値シミュレーションの設定が違うためでしょうか。

A3. 数理モデルを単純化するため、図 4 のモデルには、図 2 のモデルで仮定した翻訳の飽和を含めていません。そのため、図 4C の PRC には不応期 (dead zone) が含まれていません。図 2 と図 4 ではモデルの違いがあることを、図 4 のレジェンドに書き加えました。この *Per1/Per2* のモデルに翻訳の飽和を含めれば、dead zone が現れると考えられます。