

所属機関・職名・氏名：九州大学大学教育研究センター・助手・松本顕

研究課題名：ショウジョウバエ培養細胞を使った概日時計機構解析

米国側研究機関・共同研究者：The Rockefeller University・Michael W. Young

派遣期間：平成12年9月15日～平成12年12月11日

研究の概要：

（背景）

概日時計機構は、ある種のバクテリアから人に到る広範な生物で観察される生理現象である。この機構を基盤として、睡眠覚醒をはじめ、行動、代謝、内分泌など多くの生理現象が約1日の周期の自律的な振動を示し、体内の時間秩序が保たれている。

概日時計機構の背景には、この機構に関与する遺伝子群（時計遺伝子群）の周期的な発現があることが分かっている。ショウジョウバエでは、*period (per)*, *timeless (tim)*, *dClock (Clk)*, *cycle (cyc)*という4つの時計遺伝子が同定されており、哺乳類や鳥類、魚類でも各々の遺伝子のホモログが見つかっている。

概日時計の基本的メカニズムは、時計遺伝子産物が自身の転写に対して負のフィードバックをかけることにあると考えられている。すなわち、PERタンパク質とTIMタンパク質は結合して核移行し、自身の転写活性化因子であるCLKとCYCのヘテロダイマーに対して抑制的に働く。この結果、*per*および*tim*遺伝子からのmRNA転写量が減少する。mRNA量の低下はPERおよびTIMタンパク量の低下を誘発し、結果的に核移行するPER/TIMヘテロダイマー量の減少、CLK/CYCへの抑制作用の減少へと繋がる。結果的に、*per*および*tim*遺伝子からのmRNA転写量の増大が生じる。このように、時計遺伝子産物の自身の転写に対する負のフィードバックが24時間の周期で生じ、これが概日時計機構の中心的メカニズムを形成していると考えられている。しかし、このフィードバックループがなぜ24時間の周期で生じるのかといった基本的な問題は未解決のままである。この問題を解決する為には、生物個体そのものではなく、分子レベルでの解析がより容易で均質な実験条件が得やすい培養細胞系を用いるのが得策である。そのためには、まず、培養細胞系において概日時計遺伝子の周期的発現を得る必要がある。このために、本派遣では、概日リズムを示す培養細胞系の確立をめざした。

（結果と考察）

予備実験において、ショウジョウバエ培養細胞S2 cellでは、4つの時計遺伝子のうち、*cyc*だけが発現していることが分かっていた。そこで、まずCYCのパートナーであり、*per*, *tim*に対する正の転写因子であるCLKを強力な定常的発現プロモーターである*cytoplasmic actin*プロモーターを使って(*Act5C-clk*)培養細胞内で発現させてみた。western blotによりPERおよびTIMの発現をモニターすると、TIMの発現は誘導されるが、PERの発現は誘導されないことが判明した。S2 cellでは*per*遺伝子の近傍に染色体異常が生じている可能性があるとの情報(Young研究室Saez博士、未発表データ)を得たので、次に、*Act5C-clk*とともに*per*遺伝子のゲノム断片(*G-per*)をS2 cellにco-transfectした。使用した*per*遺伝子断片は、*per*遺伝子の転写開始点から4 kb上流お

よびpolyA付加配列から2 kb下流を含む。co-transfectionの結果、TIMのみでなくPERの発現も観察された。次に28時間に渡って、TIMおよびPERの発現量の変動のモニターを試みたが、変動は観察されなかった。これは、正の転写因子であるCLKが恒常的に供給された結果であると解釈された。

そこで、一過的な発現を誘導する*heat shock protein70*のプロモーター下流に*clk*遺伝子を連結し(*hs-clk*)、37°C30分の熱ショックにより一過的にCLKを発現させて、その後のPERおよびTIMの発現をモニターした。*hs-clk*を単独でS2 cellにtransfectした時には、熱ショックの有無にかかわらず、PERの発現は全く誘導されなかった。*G-per*単独でS2 cellにtransfectした場合は、熱ショックの有無にかかわらず、PERの発現が認められたが、発現量の変動はなく、また発現も非常に弱かったので、*per*プロモーターからの発現洩れが生じていることが推測された。*hs-clk*と*G-per*のco-transfectionを行うと、熱ショックを与えた場合にのみPERの強い発現が誘導された。この発現は約24時間後には減衰した。これは熱ショックで誘導されたCLK量の減衰を反映したものと考えられた。

PER/TIMヘテロダイマーが*dClk*遺伝子の正の転写因子として働く可能性が指摘されている(Glassopら Science 286: 766-768, 1999)ので、一旦PER/TIMの発現が誘導された後は、S2 cellゲノムからの*dClk*遺伝子発現が誘導され、これが、一旦は低レベルに減少したPER/TIMの発現を数時間後に再び上昇させる可能性が考えられた。そこで、*hs-clk*と*G-per*のco-transfectionを行い、熱ショックを与えた後、約5日間に渡って3-4時間ごとのサンプリングを行い、PERおよびTIMの発現量の変動のモニターを試みた。その結果、約26時間の周期性を持ったPER/TIM量の変動が観察された。振動は約4回繰り返された後、5日目の後半のサンプリングからは、PER/TIMの発現はほとんど観察できないレベルにまで減衰した。

再現性を確認するために、実験を繰り返した。実験毎に、周期、およびPER量のピーク位相にはズレが生ずるが、振動がほぼ一定周期で繰り返されること、数日後にはPER/TIMの発現が観察できないレベルにまで減衰することには再現性があった。

(結論と課題)

これらの結果から、以下のことが結論される。

1. ショウジョウバエ培養細胞S2 cellにおいて時計遺伝子発現に、少なくともある種の振動を形成させることに成功した
2. 形成された振動の周期は概日周期に近いものであったが、ショウジョウバエ個体の示す概日振動に比べて、周期も位相も極めて不安定であった
3. 振動は数日間で急激に減衰し、5日後にはPER/TIM発現は観察できなくなった

上記2と3に関しては、今回用いたtransfection法が一過的なものであり、実験毎に、その効率が変化しうること、またtransfectionしたplasmidは細胞内では複製されないため、徐々に分解を受けることが原因となっていることが考えられる。よって、今後の課題の第1として、*hs-clk*と*G-per*がゲノム内に挿入された安定細胞株を樹立して、同様の実験を行うことが挙げられる。現在、安定細胞株の作製中である。安定な振動を示す細胞株が樹立されれば、これを実験のプラットフォームとして、これまで動物個体を用いては不可能であった分子レベルでの概日時計機構解析を行うことが可能になると期待される。