

2種の生物発光レポーターを用いたマウス時計遺伝子発現リズムの解析

西出真也^{1), 2)}、 本間さと¹⁾、中島芳浩^{1), 3)}、池田正明^{4), 5)}、馬場謙吉¹⁾、
近江谷克裕^{1), 3), 6)}、本間研一¹⁾

1) 北大・医・統合生理、2) 北大・歯・口腔機能、3) 産総研・セルエンジニアリング
4) 埼玉医大・ゲノム医学、5) 埼玉医大・生理、6) 北大・医・先端医学

シアノバクテリアからヒトまで地上のほとんどの生物の生理機能には、内因性の生物時計に駆動される約24時間周期の（サーカディアン）リズムがある。ほ乳類における生物時計のリズム発振メカニズムは、時計遺伝子の転写と翻訳産物による転写抑制のフィードバックループにあると考えられる。転写因子 CLOCK と BMAL1 による時計遺伝子 *Per* の転写促進と、蛋白産物 PER によるその抑制が、分子時計のコアであると考えられ、*Bmal1* の転写に係わる分子ループもこのループと連動して振動している。この様に、複数の連動する分子ループからなる細胞内の振動メカニズムを、リアルタイムに生細胞内で検討するには、複数のレポーターが必要となる。しかし、これまでに単一の培養組織から複数の時計遺伝子発現を同時に測定した例はない。

本実験では、時計遺伝子 *Per1* 発現を分泌型のウミホタルルシフェラーゼ (VL)、*Bmal1* 発現を非分泌型のホタルルシフェラーゼ (FL) でレポートするトランスジェニックマウス (PVBF マウス) を作成し、哺乳類の生物時計である視交叉上核 (SCN) における両遺伝子発現リズムの同時測定を行い、本トランスジェニックマウスの有用性を検討した。また、末梢各組織における *Bmal1* 発現リズムを測定し、中枢時計による位相調節および各末梢時計間の差異を検討した。さらに、本システムを用い、新生児および成獣 SCN の培地交換に対する位相反応性を比較した。

【方法】

1、PVBF マウス SCN 前額断スライス切片を培養し、*Bmal1*-FL 活性の連続測定を行った。測定を一時中断し、培地を全量交換により採取、培地にウミホタルルシフェリンを加えて *Per1*-VL 活性を測定した。サンプリングは、培養1日目の8時から2日目の20時まで4時間間隔で行った。

2、PVBF マウスの末梢各組織（眼球、肺、心臓、大動脈、横隔膜、胃、肝臓、腎臓、精巣）および SCN の切片を作製し、*Bmal1*-FL 活性を連続測定した。また、肝臓を長期間にわたり測定し培地交換による位相反応を調べた。

3、生後6日目（新生児）および8-42週齢（成獣）の PVBF マウス SCN の *Bmal1*-FL 活性を連続測定し、培地交換による位相反応を調べた。

【結果】

- 1、SCNにおける *Per1*-VL および *Bmal1*-FL 活性はともに強いサーカディアンリズムを示し、その関係は、ほぼ逆位相であった。
- 2、測定したすべての末梢組織で明瞭なサーカディアンリズムがみられ、SCN とは異なる位相・周期を示した。さらに、末梢組織間においても、互いに位相・周期が異なることが示された。また、肝臓の *Bmal1*-FL リズムは培地交換により位相依存的に位相変位し、*Bmal1*-FL のピーク付近での交換で大きな位相前進がみられた。肝臓の測定中一例で、培地交換により約8時間周期のウルトラディアンリズムが出現した。このリズムは次の培地交換により、サーカディアンリズムに戻った。
- 3、新生児のマウス SCN は、培地交換により位相依存的に位相変位し、*Bmal1*-FL のピーク付近の培地交換により、大きな位相前進が起こることが観察された。一方、成獣の SCN は培地交換位相に関わらず、大きな位相変位はみられなかった。

【考察】

今回の同時測定で得られた *Per1* と *Bmal1* の位相関係は、過去の文献とも矛盾しなかった。したがって、本トランスジェニックマウスは、時計遺伝子 *Per1* および *Bmal1* を同時に連続測定できる、有用なモデルであると考えられる。また、末梢各組織はそれぞれ固有の位相・周期を持ち、自律的に振動することが示された。肝臓および新生児 SCN では、培地交換により *Bmal1* 振動の位相依存的な位相変位がみられたが、このことは組織間の、あるいは発達段階による、細胞間連絡の量の違いを反映しているのかも知れない。

【参考文献】

Nishide *et al.* (2006) *Genes Cells*. 11, 1173-1182.