

プロジェクト名：概日リズム分子制御機構による細胞周期制御機構の解明
プロジェクト代表者：足立明人（理工学研究科・准教授）

研究の目的

概日リズムは一日の環境サイクルに対する適応で、生物の生活リズムの根底をなす機構である。原核生物からヒトに至るあらゆる生物に見られるだけでなく、細胞周期、代謝、摂食、生殖など生物が生きる上で必須の基礎的な生命現象を制御している。

哺乳類概日リズムを制御する生物時計の分子メカニズムは **Per**、**Cry** の負の制御因子と **Bmal1**、**Clock** の正の制御因子を中心とするネガティブ・ポジティブフィードバックループにより制御され、この分子制御機構は哺乳類の中枢振動体である視交叉上核、肝臓等の末梢振動体、さらには脊椎動物やショウジョウバエを含む昆虫まで共通のメカニズムと考えられた(Young MW et al, Nat Rev Genet. 2: 702-715 (2001))。しかしながら、概日リズムの重要な特徴である温度補償性や概日リズムの関与する様々な生命現象の制御のメカニズムは不明な点が多く、新規遺伝子の関与が示唆された。

申請者は中枢振動体の視交叉上核と末梢振動体の一つ肝臓で周期的に発現する 21 遺伝子の機能解析を進めた結果、細胞周期に関与する新規遺伝子を検出し、その機能解析を行った。

研究の進め方

動物種、細胞起源が異なる C6 細胞（ラットグリオーマ由来）と NIH3T3 細胞（マウス線維芽細胞由来）に新規遺伝子を発現抑制、及び過剰発現する細胞株を作製し、その細胞増殖への影響を検討するとともに、理化学研究所、宮脇敦史先生の研究室で開発された Fucci と呼ばれる細胞周期のマーカー蛍光プローブを用いて、遺伝子の抑制や過剰発現が細胞周期に与える影響を検討した。最後に、概日リズム時計遺伝子による新規遺伝子の制御を調べるため、新規遺伝子プロモーターをクローニングし、プロモーター活性の検討を行った。

研究の成果

細胞の分裂は一日の任意の時間に起こるのではなく、特定の時間に起きていることが知られている。これら分裂は恒常条件でも概日リズムを示し、生物時計の制御下にあると考えられている。細胞周期と概日リズムがどのようなメカニズムで同期しているかは不明な点が多く、その詳細は明らかになっていない。我々は、視交叉上核と肝臓で周期的に発現する遺伝子群の機能解析を行った結果、発現抑制により細胞増殖を抑制する遺伝子を検出した。この遺伝子は多くの細胞で同様の働きを持つか検討するため、起源が異なる C6 細胞（ラットグリオーマ由来）と NIH3T3 細胞（マウス線維芽細胞由来）を用いて調べた結果、共

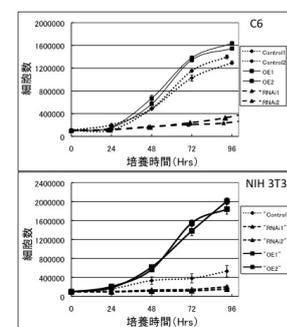


図1. Rgs16の過剰発現(OE)と発現抑制(RNAi)によるC6、及び NIH3T3細胞増殖への影響

に新規遺伝子を発現抑制することにより細胞増殖が有意に遅延し、一方、遺伝子を過剰発現することにより有意に促進することが明らかとなった（図1）。しかしながら、NIH3T3 細胞はコントロールと比較して、5倍近く速度が上昇したのに対して、C6 細胞は有意であるものの2倍に達していない。この違いは、二つの細胞の増殖速度にあると考えられる。すなわち、C6 細胞がガン化した細胞由来で、NIH3T3 細胞は不死化した細胞であり、C6 細胞の細胞増殖速度は NIH3T3 細胞より有意に早い。前述したように、生体において細胞の分裂は特定の時間に起こるが、一部のガン化した細胞は昼夜を問わず分裂が起こる。そのため、ガン化した細胞は概日リズムの制御下から外れた可能性が考えられ、その制御因子である新規遺伝子を過剰発現しても、より正常細胞に近い NIH3T3 細胞よりも変化の程度が低いと考えられた。

次に、新規遺伝子が細胞周期に与える影響を調べるために、細胞周期蛍光マーカーの Fucci を指標に実験を行った結果、両細胞において新規遺伝子の発現抑制により細胞周期が G1 期で止まっていることから、新規遺伝子は G1 から S 期のチェックポイントではたらいっていることが示唆された（図2）。

Fucci は1細胞から連続的に細胞周期の位相を検出できるため、今後は、Fucci による細胞周期の計測と時計遺伝子の発現を指標とした概日リズムの周期性を同時に、かつ、一つの生きた細胞から連続的に測定し、細胞分裂の時刻と細胞の生物時計を詳細に検討する実験系を確立が重要となる。この方法を用いて、NIH3T3 細胞と C6 細胞において両者を比較検討することにより、概日リズムによる細胞周期の制御がより詳細に検討することが可能となる。

最後に、時計遺伝子による新規遺伝子の制御を検討した。新規遺伝子の読み取り枠より上流 5Kb をクローニングし、時計遺伝子によるその活性の制御を調べた。この新規遺伝子は昼間に転写が活性化し、同じように昼間に活性を持つ多くの遺伝子は Bmal1 と Clock による E-box を介した働きが考えられた。さらに、新規遺伝子のプロモーターには2個の

E-box の存在がゲノムデータベースより明らかとなった。しかしながら、予想に反して時計遺伝子の発現ベクターを用いた活性制御では Bmal1 と Clock は活性をむしろ抑制した（図3）。すでにこのプロモーターが周期的に発現するために十分な領域であることは確認済みであるので、今後は時計遺伝子による新規遺伝子のプロモーター活性の抑制により、発現リズムの周期性が産み出された可能性も考慮に入れ、E-box に変異を入れたプロモーターを作製し、時計遺伝子による制御を比較検討するとともに、周期的な発現を示すかどうか検討し、E-box の周期的発現における役割を詳細に検討する予定である。

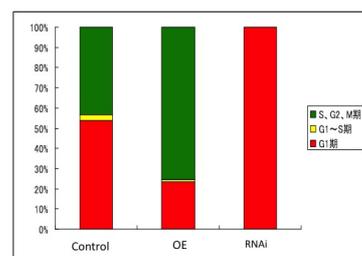


図2. Rgs16の過剰発現、及び発現抑制によるC6細胞の細胞周期への影響

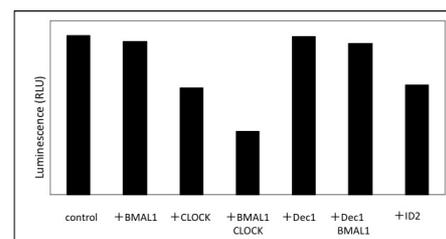


図3. 時計遺伝子によるRgs16プロモーター活性への影響