

哺乳類時計遺伝子を網羅的に同定するための概日リズム変異体大規模検索系の確立

●程 肇

東京大学・医科学研究所

〈研究の目的と進め方〉

生物には概日リズムとよばれる、行動や生化学的活動を支配する24時間に近い周期を持つ活動リズムが見い出される。これは、生物個体及び細胞に内因性の体内時計が存在するためである。この体内時計は、遺伝的に決定された生物種固有のリズムを刻むことができ、周期24+5時間の範囲内で環境の変化（特に光）に対して同調することができる。哺乳類の場合、概日時計中枢は脳視床下部の視交叉上核（SCN）に存在し、SCNの日周性を伴った神経活動出力、或いは、液性因子の分泌により末梢組織を支配して概日リズムを形成している。現在SCN概日時計からの出力が、末梢組織にも存在する計時機能の同調をはかるという仮説が提出されている。実際、マウスSCNを破壊することにより、殆どすべての観察可能な概日リズムを失う。しかし、SCN時計中枢を構成する時計遺伝子や、末梢組織のリズムの同調をはかる分子の詳細が不明ゆえに、哺乳類の中枢及び末梢時計の計時機構及びその同調機構の詳細は明らかでない。これらの分子機構の解明には、大規模なリズム変異体動物や同調分子の検索が必須である。ところが、極めて多数のマウス個体の活動リズムや薬剤投与効果の計測は、時間と経費の上からも現実的ではない。マウスリズム変異体や同調分子の大規模検索には、中枢と末梢組織の計時情報を細胞レベルで簡便に計測する方法の開発が必要であると考えられる。

我々の単離した哺乳類の時計遺伝子Per1の転写翻訳産物量は、マウスSCNで明暗及び恒暗条件下、明期で高く暗期に低い自律的な日周変動を示した。また、幾つかの末梢組織（網膜、肝臓、腎臓、筋肉）においてもその発現は約6-12時間遅れた位相で振動した。これらの結果は、Per1の発現制御機構が概日リズムと強い関連を有すること、そして、Per1の発現量の経時変化を、中枢と末梢組織それぞれの計時情報の指標として用い得ることを示す。そこで、まずPer1の転写調節機構を調べるために、Per1プロモータ領域とluciferaseの融合遺伝子をリポーターとして用いた、NIH3T3細胞発現系を構築した。そして、ClockとBmal1分子による結合及び転写誘導に必要なPer1プロモーター配列を決定した。さらに、Per1の発現を *in vivo* でモニターするために Per1::luc 融合遺伝子のトランスジェニックマウスを作製した。得られたPer1::lucマウスのSCNスライス培養系では、luciferase活性が約2ヶ月間約24時間の周期で発現振動した。また、いくつかの末梢組織（肝臓や筋肉）の培養系でも、それぞれの時計計時位相を忠実に反映したluciferase発現日周リズムが2-6周期保たれた。

これらの結果に基づき、本研究では、哺乳類の時計遺伝子の網羅的検索のために、マウスリズム変異体の大量検索系の実施を目的とする。そのためにPer1::lucマウスの生検組織を用いた計時機能測定系の多チャンネル化（24チャンネル）を図った。さらにマウスの個体変異誘発の前段階として、この装置を用いてリズム変異型SCN細胞株の樹立を目指す。本研究の提案は、煩雑な個体レベ

ルでの行動解析を、細胞レベルまで還元することで検索を簡便化かつ大規模化できる点で画期的である。また、本研究により樹立されたリズム変異SCN細胞株は、学術的に焦眉の急となっている概日時計発振及び同調機構の解析にとり重要な発見を与えるばかりでなく、リズム障害のモデル動物の構築、発症機構の解明にも役立つと予測される。

〈研究開始時の研究計画〉

1. Per1::luc動物よりSCN由来細胞株の樹立

Per1::lucラットとSV40 T抗原導入ラットをかけあわせ、得られたF1を用いて、Per1::luc発現振動を指標にSCN由来細胞株を単離する。ニューロンまたは、グリア由来について解析を進め、核型を決定する。

2. Per1::luc動物のSCN由来細胞株の変異誘発条件の設定

殆どの高等生物のリズム変異は、ヘテロ接合でもリズム異常の表現型（優性変異）を示す。即ち、細胞を変異誘発した場合、相同染色体の片方に変異が導入されても変異を検出できると考えられる。そこで、致死率等を指標に、Per1::lucラットのSCN由来細胞株に対する最適な化学変異誘発剤投与量や、トランスフェクションによる挿入変異誘発条件を見出す。

3. 多チャンネル型発光検出装置の開発

大量の生検組織標本を検索するため、以前に作製した24チャンネル型をさらに改良し、一光子レベルの信号光を計測可能な96チャンネル型発光検出装置を制作する。

4. 二次元極微弱発光画像化装置の技術研究

Per1::lucラットの視交叉上核または末梢組織を用い、単細胞での長時間発光計測を可能にする感度及び解像度を目標とした、顕微鏡と二次元極微弱発光画像化装置を組み合わせた計時機能計測器を開発する。

5. 多チャンネル型発光検出装置を用いたPer1::luc動物のSCN由来細胞株のリズム変異細胞株の検索

Per1::lucラットから樹立したSCN由来細胞株を、先に決定した条件で変異誘発する。本研究で開発した多チャンネル型発光検出装置を用いて、細胞のPer1::luc日周変動に関するあらゆるパラメータを測定する。得られたリズム変異株候補については、遺伝的解析やさらなる生理学的解析を行う。

6. Per1::luc動物の時計中枢及び末梢組織の単一細胞レベルでの計時機能測定法の検討

Per1::lucラットの視交叉上核や末梢組織を分散培養し、それぞれの細胞のluciferase活性の経時変化を測定する。より少数の細胞の計時情報の測定が可能になることにより、同調機構の解明なども含めた突然変異誘発した細胞の大規模検索が、より迅速化できると考えられる。

〈研究期間の成果〉

1. Per1::luc動物よりSCN由来細胞株の樹立 (論文1, 2)

Per1::lucラットとSV40 T抗原導入ラットをかけあわせ、得られたF1を用いて、Per1::luc発現振動を指標にSCN由来細胞株を単離した。このSCN由来細胞は、自律的なluc発現の日周リズムを維持でき、人為的な試薬投与刺激によりリズム位相を変化させられた。

2. Per1::luc動物のSCN由来細胞株の変異誘発条件の設定

変異誘発剤を用いた変異の導入は、コスト及び時間的な制限から現実的ではないことが判明した。またゲノム計画の終了によりラットやマウスなどげっ歯類の遺伝子が網羅的に明らかになった。そこで、すべての遺伝子を強制発現または、siRNAによるノックダウンを用いて網羅的に時計遺伝子の探索を実施することに計画を変更した。

3. 多チャンネル型発光検出装置の開発

大量の生検組織標本を検索するため、以前に作製した24チャンネル型をさらに改良し、感度の最適化および、CO2 incubator内での装置の安全性試験を実施し、装置を完成させることができた。

4. 二次元極微弱発光画像化装置の技術研究

Per1::lucラットの視交叉上核または末梢組織を用い、単細胞での長時間発光計測を可能にする感度及び解像度を目標とした、顕微鏡と二次元極微弱発光画像化装置を組み合わせた計時機能計測器を開発した。この装置は顕微鏡ステージ上に哺乳類培養細胞系を設置してあるため、長時間の観察を実施することが可能になった。

5. 多チャンネル型発光検出装置を用いたPer1::luc動物のSCN由来細胞株のリズム変異細胞株の探索

げっ歯類の相次ぐ塩基配列の決定により、変異剤によるランダムな遺伝子変異誘発はコスト及び時間的にあまり効率的ではないと考えられる。網羅的な遺伝子機能の解析には、遺伝子を強制発現または、siRNAによるノックダウンを用いて探索を実施することに計画を変更した。

6. Per1::luc動物の時計中枢及び末梢組織の単一細胞レベルでの計時機能測定法の検討 (論文1, 2)

1で得られたラットSCN由来細胞を、4で完成させた二次元極微弱発光画像化装置を用いて発光による概日リズムの測定を行った。その結果、一細胞レベルでのluciferase活性の経時的変化を測定できることが判明した。その上概日リズムの測定に必要な1週間以上の期間安定な培養観察が可能であった。この装置を用いて、SCN由来細胞が自律的に細胞間の同調に機能する分子を培養液に分泌して安定な振動を維持していることも明らかにすることができた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

概日リズムの形成には階層性が存在し、それぞれが複雑な分子ネットワークを構成しているにもかかわらず、それらを網羅的に解析する研究はまだ端緒についたばかりである。高等生物のゲノムの塩基配列が次々に明らかにされた結果、次世代の生物学研究の焦点は遺伝子の網羅的な機能解析である。実際、国内外では国家レベルでマウスの変異誘発による大量変異体作製プロジェクトが開始されている。そして、いずれにおいても概日時計遺伝子の探索はその主要な標的となっている。本研究で提

案しているPer1::luc導入細胞を用いた概日時計遺伝子探索法は、一次探索を細胞レベルで行うため、上述の個体レベルでの探索に比べて飛躍的に効率的である。もちろん、ラットやマウスのゲノム配列が明らかにされた現在、変異剤を用いたランダムな変異誘発は、たとえ細胞を利用したものであれ、効率性において大きな問題がある。それに代わる手段としては、ゲノム上に存在するすべての遺伝子を強制発現させたり、またはsiRNAにより機能を喪失させたりする方法が考えられる。このアプローチを用いたとして、本研究で樹立したSCN由来細胞は、初期に構想した利点を十分に発揮できる。すなわち、通常経時的に組織を採取して行われるDNA chip法、プロテオーム法、メタボローム法は、侵襲的に組織を採集してRNAを抽出することを前提としているため、手法の制約に起因する時間的及び空間的分解能に大きな限界がある。一方、本研究では、均一な細胞集団に対する連続的な遺伝子発現モニタリング法を用いるため、RNA干渉法や強制発現法を適用して、外部環境を急激に変化させた時の転写様式の動的特性を高い時間分解能で解析することにより、時計遺伝子候補に対して高精度な機能データの集積が可能となる。その結果、精密な概日時計中枢細胞及び末梢組織細胞で機能する概日リズム形成分子ネットワークを再構成することができる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本研究で予定していた計画のうち、Per1::lucラットよりSCN由来細胞の樹立、網羅的な遺伝子発現解析用の24チャンネル型培養発光検出装置の完成、および二次元極微弱発光画像化装置の作製を実施し以上については予定とおり完了した。すなわち概日リズム変異大規模探索の方法論は開発できた。しかし、この細胞を用いたランダムな変異誘発による概日時計遺伝子の探索の実施はできなかった。一番大きな理由は、哺乳類全ゲノムを対象とした網羅的な遺伝解析には、実施期間が2年というのが短すぎたことが一つの原因としてあげられる。2年では解析系の構築だけで精一杯であった。また本研究を実施している間にヒト、マウス、ラットなどの哺乳類のゲノム遺伝子配列が次々と決定されていったため、非常に大きな努力を伴う変異遺伝子座のマッピングが必要なランダム変異誘発は、もはや現実的な方法論とはいえなくなってきた。それにかわるものとしては、ゲノム上全遺伝子を対象とした機能亢進型変異、および機能喪失型変異の導入が考えられる。すなわち、Per1::luc動物由来SCN由来細胞を用いて強制発現型ベクター、またはsiRNA導入によって網羅的に遺伝子機能の解析を実施することにより、時計遺伝子の同定を進めていることが考えられる。その方法論を実施した場合でも本研究で樹立したSCN由来細胞は、遺伝子探索に非常に有用だと、考えられる。

〈今後の課題〉

哺乳類の遺伝的に決定された内在性の概日時計の本体(細胞)は、脳視交叉上核(SCN)にある。網膜より入力した光情報が、SCNに達しその概日リズム位相を光サイクルに同調させる。SCNの自律的な概日リズム発振は、他の末梢組織の概日リズムを支配する。哺乳類の概日リズム形成機構は、入力系—振動系—出力系という明確に分かれた階層構造により成立している。この階層構造は細胞レベルでも維持され、例えば一つの視交叉上核細胞内において、それぞれを担う特異的な分子ネットワークが共役して機能することにより、連続的な振動を形成でき

ることが知られている。概日リズムを形成する分子ネットワークは多重フィードバックループであるとされ、このネットワークの基本構造を理解するには、個々の時計分子を同定する実験的手法に加えて、全体を把握するシミュレーションが、概日リズムのシステム的理解には必須である。即ち、時計中枢細胞の培養系と、そのリズム位相を細胞レベルで特定する方法や、最先端の数理科学分野の解析技術に基づくモデル化とシミュレーションが必要である。本研究を実施した結果、Period1::luciferase 導入動物よりSCN由来細胞を樹立して、そのリズム位相を発光モニタリングにより計測する系を確立した。次の課題として考えられるのは以下である。まず、Per1::luc 導入SCN由来細胞をモデル系に用いて、各種化合物、あるいはsiRNAライブラリの投与により、自律的発振システムに攪乱を誘導した時のルシフェラーゼ発現リズムの位相、周期、振幅、同調性が示す反応性及びDNAチップ等で細胞内転写ネットワークに与える変化を測定する。個々の結果をまとめた統合的なデータベースから、概日リズム形成の分子ネットワークを推定する。さらに推定したネットワークを元に非線形力学モデルを構築し、シミュレーションにより時計分子を抽出して、in vivoでの機能の実験的同定を試みる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0111131507

Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. and Tei, H. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, 288, 682-685, (2000).

2. 0111131514

Stokkan K-A., Yamazaki S., Tei H., Sakaki Y., and Menaker M. Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science*, 291, 490-493, (2001).