

平成21年6月22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592055

研究課題名（和文） 唾液腺細胞における末梢時計機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the clock mechanism in salivary gland cells

研究代表者

大西 芳秋（ONISHI YOSHIAKI）

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員

研究者番号：60233219

研究成果の概要：唾液腺細胞(HSG)において末梢時計機構が存在しており、様々な遺伝子の概日リズム調節の中心をなす時計遺伝子 *Bmal1* 遺伝子は転写レベルにおいて概日リズム調節されていることが判明した。この *Bmal1* 遺伝子の転写調節は、時計遺伝子特異的なクロマチン構造をしているのみならず、唾液腺細胞(HSG)に特異的な転写調節機構を持っており、これにより様々な唾液腺特異的な生物リズム調節を行っていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能性基礎歯科学

キーワード：転写、クロマチン、生物時計

1. 研究開始当初の背景

現在、中枢および末梢組織における時計遺伝子のフィードバックループによる転写調節機構の報告は数多くあるが、転写調節因子に関する報告がほとんどである。またクロマチン構造に関してもヒストンタンパクの修飾の関与の報告があるのみである。これまで、転写調節においては転写調節因子も重要であるが、それにもましてその調節因子がいかにして標的となる遺伝子上の配列に結合するかという事が最も重要であるということ、グロビン遺伝子等をモデルにして証明してきた (Nucl. Acids Res., (2001) 29,

3448-3457, Y. Onishi and R. Kiyama; Gene, (2002) 294, 279-290, X-M. Li, Y. Onishi, K. Kuwabara, J-Y. Rho, Y. Wada-Kiyama, Y. Sakuma and R. Kiyama 等)。さらに転写調節に重要なクロマチン構造は、ヌクレオソーム単位を基本とした *in vivo*におけるクロマチン構造の動態を明らかにすることによって初めて明らかとなることを見いだした (J. Biol. Chem., (2003) 278, 8163-8171, Y. Onishi and R. Kiyama)。さらにこのクロマチン構造変化を検出するためのツールとして、モノクローナル抗体を作成し (抗 DNA モノクローナル抗体及びその産生ハイブリド

一マ (特願 2002-201064) 大西芳秋; ヒストン H3 及び H4 リンカー領域を認識するモノクローナル抗体及びその産生ハイブリドーマ (特願 2003-277250) 大西芳秋) その有用性について既に報告している (Hybridoma and Hybridomics, (2004) 23, 311-317, Y. Onishi, M. Kato and Y. Hanyu).

一方、これまで主に解析されている末梢組織も肝臓等の組織が中心であり、唾液線に関してはほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

睡眠覚醒といった生物行動や内的生理現象 (体温、ホルモン分泌、神経活動) は、概日リズムといわれる約 24 時間周期の活動リズムを示す。この 24 時間リズムを支配するマスター時計は、脳内視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在しており、時計遺伝子によるフィードバックループにより調節されている。末梢組織においては、このマスター時計の支配下のもと末梢組織自身も 24 時間リズムを刻んでいる (末梢時計)。この体内時計は医療と密接に関連しており、生体リズムの障害として睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、非 24 時間睡眠症候群、躁うつ病などを発症し、また小児自閉症、精神分裂病、老年性痴呆症は生体リズムの異常を一症状としている。また最近になり患者の管理や治療に生体リズムの概念を応用する事により、予後に改善が見られる等の報告がなされており、歯科医療現場においても非常に重要なテーマであると考えられる。唾液は生体より非侵襲的に採取でき、血液中で観察されるナトリウム、カリウム、リン酸塩といった電解質やコルチコステロイド等の 24 時間周期の変動が同様に唾液中においても観察される事が知られている。これは唾液が生体時計をモニターする上で有用な試料となりうる事を示唆している。事実、クッシング症候群の診断を唾液中コルチゾルのリズム変動を用いて行うことも試みられている。

一方唾液を産生する唾液腺細胞は、EGF、NGF、FGF、TGF といった増殖因子や CSF といったサイトカイン産生しており、これら増殖因子やサイトカインの発現は他の組織において既に概日リズムを持って調節されている事が報告されており、唾液腺細胞においても末梢時計によりこれらの因子の発現調節が行われている可能性があると考えられる。

唾液腺細胞において末梢体内時計機構が存在していることを証明し、さらにその調節機構を解明する事により、唾液による生体リズム測定の有用性が科学的に実証され、これらを応用する事が可能となる。さらにこれらの知見を歯科も含めたその他臨床に応用する事は、歯科医療ならびに臨床検査上非常に重要であると考えられる。

上述のごとく唾液腺細胞内に末梢時計機構が存在している事が示唆されているものの、その存在は明らかにされていない。そこで唾液腺細胞内に末梢時計が存在する事を明らかにするとともに、その末梢時計機構の解析を行う。これまでのところ中枢時計、末梢時計に係わらず基本的な分子メカニズムは、ポジティブ及びネガティブのフィードバックループにより調節される事が報告されている (Nat. Genet., (2005) 37, 187-192, H.R. Ueda, et al.)。このフィードバックループによる転写調節にはクロマチンのリモデリングを伴うことが中枢 (Nat. Neurosci., (2000) 3, 1241-1247, C. Crosio, et al.) ならびに末梢 (Nature, (2003) 421, 177-182, J. P. Etchegaray, et al.; J. Biol. Chem., (2004) 279, 7091-7097, A. M. Curtis, et al.; Mol. Cell. Biol., (2004) 24, 6278-6287, Y. Naruse, et al.) において報告されているが、その時の詳しいクロマチン構造の動態については明らかとなっていない。Per, Cry, Bmal1, Clock といった時計遺伝子は複数の転写開始点を持ちプロモーターに TATA box を持っていない。また時計遺伝子は、約 24 時間周期で正確に転写調節を行っていることより、時計遺伝子特異的なクロマチン構造が存在し他の一般的な遺伝子と異なる機構により転写調節されているのではないかと推察される。本研究においては、体内時計における転写調節機構を明らかにするにあたり、転写調節因子そのものではなくクロマチン構造の動態に焦点を当て解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞において生物リズムを観察するためには、まずはじめに培養ディッシュにコンフルエントになるまで培養した後、血清を含まない培養液に置換し培養を続ける。これにより細胞周期を停止させ個々の細胞内でバラバラに働いている末梢時計機構をリセットする。無血清の状態で 24 時間培養した後、高濃度血清 (50%) により細胞を刺激することにより末梢時計を働かせる。また NIH3T3 細胞等では、高濃度血清の代わりにグルココルチコイド (デキサメサゾン) による刺激がよく行われている。そこで唾液腺細胞 (HSG) を用いて上述のような生物リズムの有無を確認する。これは、HSG 細胞刺激後、経時的に mRNA を回収し、リアルタイム RT-PCR により時計遺伝子 (Bmal1 等) の発現について検討する。

(2) HSG 細胞において観察された時計遺伝子 Bmal1 遺伝子の概日リズム発現が転写レベルにおける制御であることの確認とそのメカニズムを検討するために、Bmal1 遺伝子のプロモーター領域の解析を行う。Bmal1 遺伝子

の概日リズム発現に必要なプロモーター領域を決定し、このプロモーター領域によって発現が誘導されるルシフェラーズのレポーター遺伝子プラスミドを作製する。作製したレポータープラスミドを HSG 細胞に導入し、デキサメサゾンによる概日リズム誘導をした後、ルシフェリンを含む培養液で培養を行い、プラスミド内に挿入した Bmal1 遺伝子プロモーターにより転写されたルシフェラーズ活性をルミノメーター(Kronos, ATTO 社製)でリアルタイムに測定する。これにより唾液腺細胞(HSG)に転写レベルでの末梢時計機構が存在するかの確に知ることが可能となる。

(3) 概日リズム発現の解析に汎用されている NIH3T3 細胞を用いた実験より Bmal1 遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造は非常にユニークな構造をしており、Bmal1 遺伝子 DNA は低メチル化状態にあることが示唆された。そこで、HSG 細胞を用いて Bisulfite 法により Bmal1 遺伝子プロモーター領域 DNA メチル化解析を行う。

(4) HSG 細胞における唾液腺組織特異的のクロマチン構造を明らかにし、さらにそのクロマチン構造が Bmal1 遺伝子転写調節機構に与える影響を明らかにする事を目的とし、*in vivo* における当該領域のクロマチン構造をマイクロカコックルヌクレアーゼ消化による indirect endlabeling 法により解析を行う。また概日転写調節に必要と考えられている RORE 周辺領域に関しては、LM-PCR により詳細に検討する。

(5) Bmal1 遺伝子転写調節機構を明らかにする目的で、HSG 細胞における Bmal1 遺伝子の転写調節因子群について RT-PCR 解析を行う。

4. 研究成果

(1) 唾液腺細胞(HSG)をグルココルチコイド刺激する事により Bmal1 遺伝子が概日リズムを持って発現することが RT-PCR により観察され、HSG 細胞において末梢時計機構が機能している事が示唆された。これまでのところ中枢時計、末梢時計に係わらず基本的な分子メカニズムは同一であり、ポジティブ及びネガティブのフィードバックループにより調節される事が報告されている。この時計遺伝子のフィードバックループによる転写調節は、クロマチンの構造変換を伴った調節機構であることが末梢組織においても報告されており、唾液腺細胞においても同様にクロマチン構造の変化を介した転写調節機構である可能性が示唆された。

(2) Bmal1 遺伝子プロモーター上流約 700bp に概日リズム転写に必要な調節領域が含まれていることが判明した。また本領域により転写されるルシフェラーズ遺伝子を持つプラスミドを唾液腺細胞(HSG)に導入し、リアルタイムレポーター測定を行ったところ、レ

ポーター遺伝子の概日リズム発現が観察された。これらの結果は、唾液腺細胞(HSG)における Bmal1 遺伝子の概日リズム発現は転写レベルで調節されており、その調節領域は今回用いたプロモーター領域中に存在することを示唆している。さらに本領域中には2つの RORE 配列(ROR および Rev-erb 結合配列)が存在していることが判明した。

(3) HSG 細胞においても Bmal1 遺伝子プロモーター領域は低メチル化状態であることが判明し、NIH3T3 細胞と同様に、ユニークなクロマチン構造をとっている可能性が示唆された。

(4) HSG 細胞における Bmal1 遺伝子のクロマチン構造をマイクロカコックルヌクレアーゼ消化による indirect endlabeling により解析したところ、NIH3T3 細胞と同様に RORE 周辺領域がオープンなクロマチン構造になっていることが示唆された。この様なオープンクロマチン構造は、HeLa 細胞や MCF-7 細胞においても観察されたことより、時計遺伝子 Bmal1 遺伝子に特異的な構造であることが推察された。また、LM-PCR による RORE 周辺領域の解析において、周期的なクロマチン構造の変化が観察されたことより、HSG 細胞における Bmal1 遺伝子の概日リズム転写制御にはクロマチン構造を介した調節機構が存在していることが示唆された。

(5) HSG 細胞における Bmal1 遺伝子の転写調節因子群の発現プロファイルは、NIH3T3 細胞や肝臓細胞また HeLa 細胞や MCF-7 細胞とは異なっていることが判明した。これらの結果より、HSG 細胞の Bmal1 遺伝子は時計遺伝子特異的なクロマチン構造をしているのみならず、唾液腺細胞(HSG)特異的な転写調節機構を持っており、これにより唾液腺特異的な生物リズム調節を行っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Molecular characterization of Mybbp1a as a co-repressor on the mPeriod2 promoter. (2009) Nucl. Acids Res., 37, 1115-1126, Y. Hara, Y. Onishi, K. Ohishi, K. Miyazaki, A. Fukamizu and N. Ishida、査読有
- ② Rhythmic SAF-A binding underlies circadian transcription of the Bmal1 gene. (2008) Mol. Cell. Biol., 28, 3477-3488, Y. Onishi, S. Hanai, T. Ohno, Y. Hara and N. Ishida、査読有
- ③ Identification of negative transcriptional factor E4BP4 binding

- site in the mouse circadian-regulated gene Mdr2. (2008) *Neurosci. Res.*, 60, 307-313, M. Kotaka, Y. Onishi, T. Ohno and N. Ishida、査読有
- ④ 生物の体内時計-時計遺伝子により構成される洗練された細胞の分子機械(2008) *日本機械学会誌*、111、756-757、大西芳秋、石田直理雄、査読無
- ⑤ The negative transcription factor E4BP4 is associated with circadian clock protein PERIOD2. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 1010-1015, T. Ohno, Y. Onishi and N. Ishida、査読有
- ⑥ A novel E4BP4 element drives circadian expression of mPeriod2. (2007) *Nucl. Acids Res.*, 35, 648-655, T. Ohno, Y. Onishi and N. Ishida、査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① Rhythmic SAF-A binding underlies circadian transcription of the Bmal1 gene. (2008 年 12 月 12 日) BMB 2008, 大西芳秋、花井修次、大野朋哉、原康洋、石田直理雄、神戸
- ② 時計遺伝子 Clock は肝臓でのグリコーゲン合成を制御する(2008 年 12 月 11 日) BMB 2008, 土井亮助、大石勝隆、大西芳秋、石田直理雄、神戸
- ③ 生物時計遺伝子 Bmal1 のクロマチン構造を介した概日リズム制御(2008 年 11 月 26 日) JST Innovation Bridge バイオ産業のための革新技术、大西芳秋、花井修次、石田直理雄、東京
- ④ Rhythmic SAF-A binding underlies circadian transcription of the Bmal1 gene. (2008 年 5 月 18 日) 20th Anniversary Meeting SRBR, Y. Onishi, S. Hanai, T. Ohno, Y. Hara and N. Ishida, Florida
- ⑤ Analysis of Chromatin Structure for Clock Gene, Bmal1 Promoter (2007 年 12 月 12 日) BMB 2007, Y. Onishi, T. Ohno, Y. Hara, N. Ishida、横浜
- ⑥ マウス時計遺伝子 Cryptochrome (CRY) 1 に結合する新規タンパク質の同定と機能解析(2007 年 12 月 12 日) BMB 2007, 原康洋、大西芳秋、深水昭吉、石田直理雄、横浜
- ⑦ Determination of minimal region of rat PERIOD2 interacted with CRYPTOCHROME1. (2007 年 11 月 22 日) International Symposium on Advances in Neurosciences and Silver Jubilee Conference of Indian Academy of Neurosciences, T. Tomita, Y. Onishi, K. Miyazaki, N. Ishida, Varanasi
- ⑧ The minimal amino acid sequence of rPER2 necessary to interact with CRY1. (2007 年 11 月 5 日) 2nd World Congress of Chronobiology, T. Tomita, Y. Onishi, K. Miyazaki, N. Ishida、東京
- ⑨ Identification and characterization of novel mCRY1-binding proteins. (2007 年 7 月 13 日) 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Y. Hara, Y. Onishi, N. Ishida, Melbourne
- ⑩ E4BP4 is a negative regulator of circadian clocks. (2007 年 7 月 15 日) 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Y. Onishi, T. Ohno, N. Ishida, Melbourne
- ⑪ mCRY1 との相互作用に必要な rPER2 C 末端のアミノ酸配列(2006 年 12 月 8 日) 日本分子生物学会 2006 フォーラム、富田辰之介、大西芳秋、宮崎歴、本田 真也、石田直理雄、名古屋
- ⑫ 生物時計遺伝子産物 Cryptochrome (CRY) 1 と結合するタンパク質の同定と解析(2006 年 12 月 7 日) 日本分子生物学会 2006 フォーラム、原康洋、大西芳秋、石田直理雄、名古屋
- ⑬ Mdr2 トランスポーター遺伝子の上流解析(2006 年 12 月 2 日) 第 13 回日本時間生物学会、小高真希、大西芳秋、宮崎歴、大石勝隆、石田直理雄、赤池敏宏、東京
- ⑭ 哺乳類体内時計機構における E4BP4 の役割(2006 年 12 月 2 日) 第 13 回日本時間生物学会、大野朋哉、大西芳秋、石田直理雄、東京
- ⑮ Bmal1 プロモーターにおけるクロマチン構造を介した転写調節機構(2006 年 12 月 2 日) 第 13 回日本時間生物学会、大西芳秋、原康洋、大野朋哉、石田直理雄、東京
- ⑯ Analysis of Chromatin Structure for Clock Gene, Bmal1 Promoter (2006 年 6 月 21 日) 20th IUBMB and 11th FAOBMB, Y. Onishi, T. Ohno, Y. Hara, N. Ishida、京都
- ⑰ A novel E4BP4 element is required for circadian expression of Period2 (2006 年 6 月 21 日) 20th IUBMB and 11th FAOBMB, T. Ohno, Y. Onishi, N. Ishida、京都

[図書] (計 2 件)

- ① 大西芳秋、時間生物学辞典、クロマチン、(著分担) 朝倉書店、218-219、2008
- ② 大西芳秋、時計遺伝子と環境、きちんとわかる時計遺伝子、産総研ブックス、(著分担) 白日社、75-90、2007

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)

名称：生物時計を調節するタンパク質及びその遺伝子

発明者：太西芳秋、花井修次、原康洋、石田直理雄

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2008-025966

出願年月日：2008年2月6日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 芳秋 (ONISHI YOSHIAKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員

研究者番号：60233219

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし