

#### 4) 培養細胞を用いたサーカディアンリズム調節機能の評価

(独) 農研機構 食品総合研究所 大池 秀明

##### はじめに

シアノバクテリアからヒトに至るまで、地球上のほぼすべての生物は、約 24 時間周期の体内時計である“サーカディアンリズム”を有している。この 10 年あまりで、哺乳類の時計遺伝子が次々と同定され、分子機構の解明が飛躍的に発展した。サーカディアンリズムは十数種類の時計遺伝子が転写のフィードバックループを形成することによって生み出される(図 1)。日周行動を支配する時計中枢は視床下部の視交叉上核に存在するが、肝臓や心臓、皮膚など生体を構成するほぼすべての器官や組織にもサーカディアンリズムは存在している。全遺伝子の約 10%はその発現が日周変動と言われており、それぞれの体内時計は様々な生体機能を支配している。

サーカディアンリズムは、“約 24 時間”であるが、決して正確ではない。また、昼夜時刻の季節変動や、食糧が確保できる時刻は常に変動することから、我々の体内には光や食事といった外因シグナルによって生存に適した時刻合わせがなされる仕組みが形成されている。例えば、ラットやマウスは夜行性であるが、昼間にしか食餌を与えずに飼育すると、1 週間ほどで、肝臓など末梢臓器のサーカディアンリズムは昼型に逆転してしまう。現代社会ではこの補正機構が仇となり、不規則な食生活や昼夜逆転の生活がサーカディアンリズムを乱す原因になる。その結果、脂質代謝、糖代謝、コレステロール代謝などの様々な代謝リズムが崩れ、肥満や動脈硬化を引き起こし、ひいては、がんや心臓病などさまざまな疾患のリスクも上昇する。

このようにサーカディアンリズムは、毎日、光や食事によって補正されているが、特に最近の研究により、末梢の体内時計は食事により強く補正されることが明らかになってきた。また、マウスに高脂肪食を摂取させると、サーカディアンリズムの周期が長くなることが報告され、食事成分の違いにより、生み出されるリズムにも違いが生じることが示唆される。ここでは、培養細胞を用いて、時計遺伝子の発現から細胞のサーカディアンリズムを測定し、そのリズムに変化を与える食品成分の評価法について、(1)リアルタイム PCR を用いる方法、(2)レポーター遺伝子を用いる方法、の 2 つを紹介する。

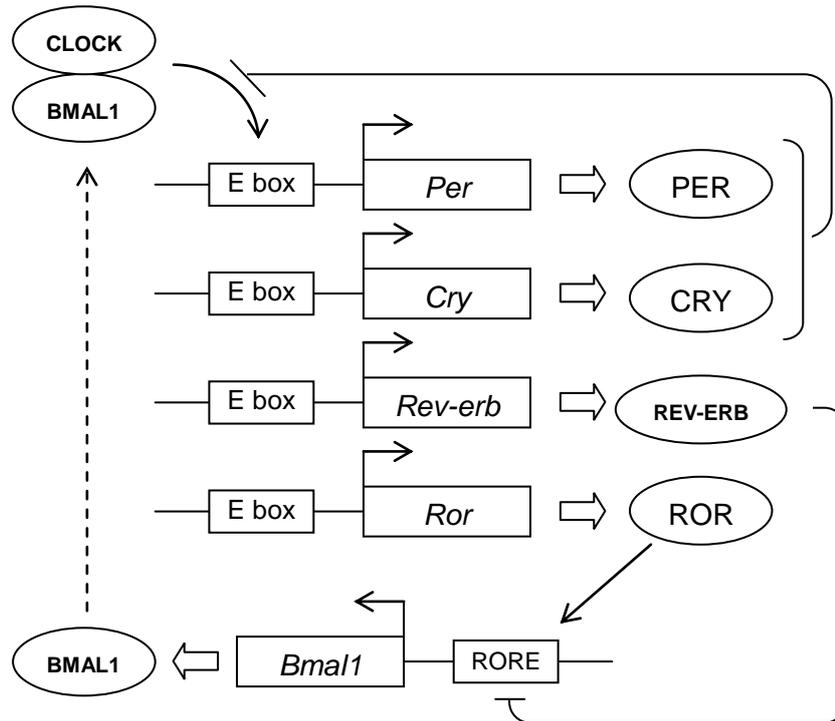


図 1 サーカディアンリズム発振の分子機構

転写因子である CLOCK と BMAL1 はヘテロダイマーを形成し、Per や Cry などの時計遺伝子プロモーターに存在する E box 配列に結合して転写を促進する。転写、翻訳された PER, CRY タンパク質は複合体を形成し、CLOCK と BMAL1 の転写活性化を抑制することにより、負のフィードバックループが構成される（これがコアループと考えられている）。一方、同様に、E box 配列を持つ Ror や Rev-erb 遺伝子のタンパク質は、RORE 配列を介する Bmal1 遺伝子の転写調節に関わり、サブループを形成している。

#### (1) リアルタイム PCR を用いる方法

多くの培養細胞も生体の細胞と同様に、約 24 時間のリズムで時計遺伝子を発現し、体内時計を刻むことができる。しかしながら、生体とは異なり、温度や培地成分が一定である培養細胞では（生体内では、血液中の多くの因子が約 24 時間の周期で変動している）、個々の細胞が時刻合わせを行うことができず、それぞれの時計がバラバラになってしまう（これを脱同調と呼ぶ）。ここでは、脱同調した細胞を利用して、個々の細胞の時刻を同調させるような食品成分の探索法を紹介する。

#### 準備するもの

##### 1. 装置

- ・クリーンベンチ、CO<sub>2</sub> インキュベーター（細胞培養用）

- ・ 倒立型顕微鏡 (細胞観察用)
  - ・ 遠心機 (1.5ml チューブ用, 10,000×g 以上)
  - ・ ヒートブロック
  - ・ 吸光光度計 (RNA 測定用)
  - ・ 核酸用電気泳動装置
  - ・ リアルタイム PCR 解析装置 (ABI PRISM 7000 等)
2. 試薬等 (メーカー, 製品名は筆者が使用している一例を示す)
- ・ 細胞 (Rat-1; RIKEN Cell Bank, RCB1830)
  - ・ 培地 (DMEM; Invitrogen, 12701-017)
  - ・ ウシ胎児血清 (FBS; MP Biomedicals, 2917354)
  - ・ トリプシン-EDTA (Invitrogen, 25200-056)
  - ・ 35mm 培養ディッシュ (IWAKI, 3000-035)
  - ・ 100mm 培養ディッシュ (BD Falcon, 353003)
  - ・ RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit; QIAGEN, 74106)
  - ・ 逆転写酵素 (Super Script II; Invitrogen, 18064-071)
  - ・ ランダムプライマー (Invitrogen, 48190-011)
  - ・ 1.0% アガロースゲル, TAE バッファー (RNA の電気泳動用)
  - ・ リアルタイム PCR 試薬 (ToYoBo, QPK-201)
  - ・ 時計遺伝子特異的プライマー (表 1)
  - ・ 試験試料: ここでは Forskolin\* (Wako, 067-02191) を使用

\*Forskolin ; アデニル酸シクラーゼの活性化剤で, 細胞内 cAMP を上昇させ, CRE 配列 (cAMP Response Element) を持つ遺伝子の発現を上昇させる.

表 1 時計遺伝子特異的プライマーの配列

Gene Name	Accession No.	Primer (5' – 3') forward	Primer (5' – 3') reverse
<b>rBmal1</b>	NM_024362	ccactgcacaggttacatcaa	tcatcatctgggagggagac
<b>rPer1</b>	NM_001034125	gtgggcttgacaccttct	tgcttagatcggcagtggt
<b>rPer2</b>	NM_031678	caaatccaccggctactgat	aatccggatctcctccagt
<b>rGAPDH</b>	NM_017008	agacagccgcattcttctgt	tgatggcaacaatgtccact

## プロトコール

### 1. 細胞の培養と試験成分の添加

1) Rat-1 細胞を凍結ストックより起こし, 100mm ディッシュで培養する.

- ・ 培地は 10%FBS を添加した DMEM を使用し, コンフルエントになる前にトリプシンで継代する (目安は 10 倍希釈で, 週 2-3 回程度). 3 代以上継代を繰り返

し、状態が安定したものを計測に使用する。20-30 代まで継代したら、新たに凍結ストックより起こし直す。

- 2) 測定用に、35mm ディッシュに  $1-3 \times 10^5$  個程度の細胞をまき、5 日以上培養する。
    - ・1-2 日でコンフルエントになる。5-7 日間以上培養することでリズムを脱同調させる。用意するディッシュの数は、サンプリング時間の数 $\times$ 2 (コントロールと試験成分)。
  - 3) 試験成分およびコントロール (溶媒) を静かに培地に添加する。
    - ・温度や pH の変化、機械刺激などはリズム同調の要因になりうるので、素早く静かに行う。
2. 細胞の回収と total RNA の抽出
    - 1) 試験成分の添加後、任意の時間に細胞を回収し、total RNA を抽出する。細胞の回収は、PBS で洗浄後、直接 RNeasy Kit の Buffer RLT 600 $\mu$ L を添加し、細胞を溶解、回収する。total RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit の製品プロトコールに従う。
      - ・サンプリングは添加後 8 時間くらいまでは細かく行うのが良い (例 0, 1, 4, 8 時間)。それ以降は、4-6 時間おきに 48 時間程度まで行う (例 14, 20, 26, 32, 38, 44 時間)。
    - 2) total RNA の吸光度を測定し、濃度と純度を確認する。また、電気泳動により品質を確認する。
  3. cDNA の合成

total RNA 3 $\mu$ g とランダムプライマー 150ng を使い、Super Script II などの逆転写酵素により、cDNA を合成する (20 $\mu$ L スケール、製品プロトコール通り)。
  4. リアルタイム PCR

SYBR Green を利用してリアルタイム PCR を行い、時計遺伝子 mRNA の発現量を定量する。

    - ・リアルタイム PCR 試薬のプロトコールに従う。cDNA は各サンプルあたり 1 $\mu$ L を使用する。それぞれの時計遺伝子に対応するプライマーは表 1 の通り。それぞれの定量値を GAPDH の値で補正し、グラフ化する (図 2)。

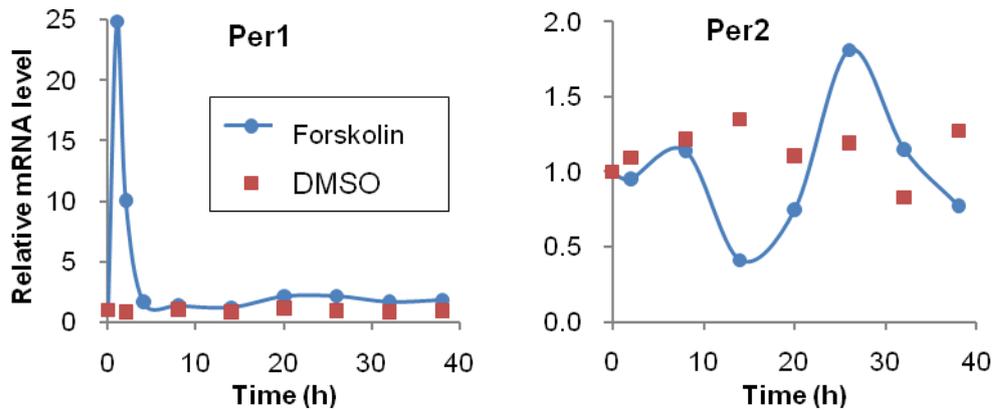


図2 Rat-1 細胞における Forskolin による時計遺伝子 Per1, Per2 のリズム同調

10 $\mu$ M Forskolin あるいは 0.1%DMSO (溶媒のみのコントロール) を培地に添加し, 0, 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38 時間後に細胞を回収し, Per1, Per2 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により定量した. Forskolin 添加により, まず, 一過的に Per1 の mRNA が発現上昇することで, 個々の細胞のリズムがそこでリセットされ, ディッシュ全体のリズムが同調する. そうすると, Per2, Bmal1 など他の時計遺伝子も培養ディッシュ全体でリズムが同調し, 約 24 時間周期の発現変動が観察できるようになる.

#### 応用例 ; リアルタイム PCR による *in vivo* 時計リズム測定

動物個体より経時的に臓器をサンプリングし, 培養細胞と同様に RNA を抽出してリアルタイム PCR を行えば, その臓器が刻む時計リズムを測定することができる (図 3).

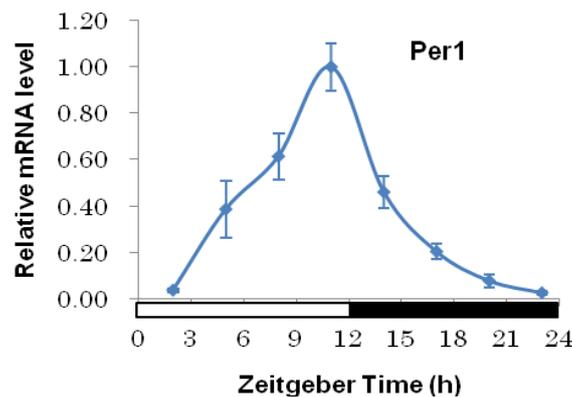


図3 マウス肝臓における Per1 遺伝子の発現リズム

3 時間毎に BALB/c マウスの肝臓を摘出し, Per1 mRNA の発現量をリアルタイム PCR により測定した. 横軸の Zeitgeber Time (ZT) は明期の開始時刻を 0 とした時刻. 白黒の棒はそれぞれ, 明期 (ZT 0-12) と暗期 (ZT 12-24) を表す. Per1 遺伝子は, 暗期の始まりにあわせてピークを迎えるように発現している. 各ポイントのデータは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 4).

## (2) レポーター遺伝子を用いる方法

ここでは、細胞を培養しながら時計遺伝子の発現をモニタリングする方法を紹介する。原理は、時計遺伝子のプロモーターにホタルの発光酵素であるルシフェラーゼをつないだベクターを細胞に導入し、培地中にルシフェリンを添加することで、時計遺伝子のプロモーター活性に合わせて発光が観察できるというシンプルなものである。

### 準備するもの

#### 1. 装置

- ・クリーンベンチ, CO<sub>2</sub> インキュベーター (細胞培養用)
- ・倒立型顕微鏡 (細胞観察用)
- ・インキュベート機能付ルミノメーター (ATTO 社の Kronos 等)

#### 2. 試薬等 (メーカー, 製品名はあくまで一例です)

- ・細胞 (NIH3T3-3-4: RIKEN Cell Bank, RCB1862)
- ・培地 (DMEM; Invitrogen, 12701-017)
- ・ウシ胎児血清 (FBS; MP Biomedicals, 2917354)
- ・ウマ血清\* (HS; Invitrogen, 16050-122)
- ・トリプシン-EDTA (Invitrogen, 25200-056)
- ・35mm 培養ディッシュ (IWAKI, 3000-035)
- ・100mm 培養ディッシュ (BD Falcon, 353003)
- ・遺伝子導入試薬 (FuGENE6; Roche, 1815091)
- ・レポーター遺伝子 (ここでは Bmal1-dLuc \*\*)
- ・ルシフェリン (Promega, E1602)

\* ウシ血清 (FS) やウシ胎児血清 (FBS), Dexamethasone でも代用可能 (後述)

\*\* Bmal1-dLuc ; mBmal1 遺伝子のプロモーター領域の一部 (転写開始点の上流約 0.6kbp) をルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL3 Basic vector (Promega, E1751) に挿入したもの。

### プロトコール

#### 1. 細胞の培養とレポーター遺伝子の導入

##### 1) NIH3T3-3-4 細胞を凍結ストックより起こし, 100mm ディッシュで培養する

- ・培地は 10%FBS を添加した, 高グルコース (4.5g/L) 含有の DMEM を使用し, コンフルエントになる前にトリプシンで継代する (目安は 10 倍希釈で, 週 2-3 回程度). 3 代以上継代を繰り返し, 状態が安定したものを使用する. 20-30 代まで継代したら, 新たに凍結ストックより起こし直す.

##### 2) 測定用に, 35mm ディッシュに $2.5 \times 10^5$ 個程度の細胞をまく.

3) 翌日, 新しい培地に交換してから, FuGENE6 によりレポーター遺伝子を導入する (FuGENE6 の製品プロトコールに従う).

- ・ 遺伝子導入前の培地交換は行わなくても良いが, 筆者の経験から培地を交換した方が, 綺麗なリズムが観察できる.

## 2. 測定と試験成分の添加

1) 遺伝子導入の翌日, 個々の細胞のリズムを同調させるため, 50%ウマ血清を添加した DMEM 培地に交換し, 2 時間インキュベートする.

- ・ 50%ウマ血清の代わりに, 他の動物の 50%血清 (FBS でも良いが高価), あるいは, 100nM Dexamethasone など, リズムの同調作用があるものであれば使用することが可能.

2) 10%FBS と 0.1mM ルシフェリンを添加した DMEM 培地に交換し, インキュベーター機能付ルミノメーター (ここでは Kronos) にセットする.

- ・ ルシフェリンは滅菌水で 100mM に溶解し, 小分けして-80℃にストックしておく. 5%CO<sub>2</sub> を供給できない測定装置を利用するときは, 終濃度が 25mM になるように HEPES (Sigma, H0887) を添加し, 培養ディッシュの周りをパラフィルムで覆ってから装置にセットすると良い.

3) 翌日, リズムが確認できたら装置を一時停止し, 試験成分を培地に添加する.

- ・ 試験成分の添加は, リズムの位相が異なる何点かで試す. 添加するときの位相により, 位相の前進作用, 後退作用が変わるものが多い. つまり運が悪いとその中間に来てしまい, 位相を変化させる能力があるにもかかわらず, 位相の変化が見られないことになる.

4) 数日間測定し, コントロールに対して, リズムの変化を見る (図 4).

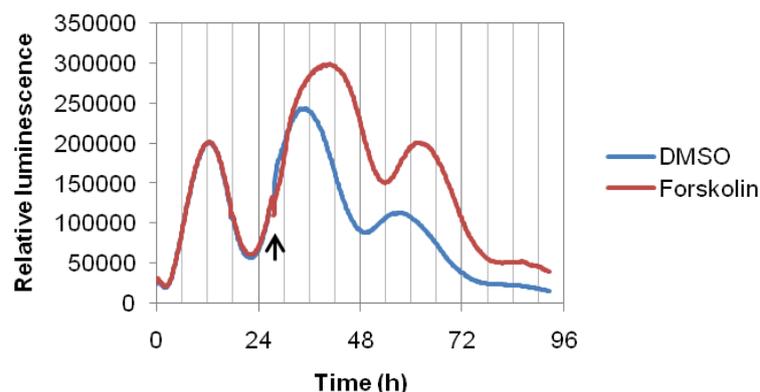


図 4 Forskolin 添加による NIH3T3-3-4 細胞のリズム変化

Bmal1-luc を発現させた NIH3T3-3-4 細胞を 50%ウマ血清でリズムを同調させた後, 28 時間のポイント (矢印) で DMSO に溶解した Forskolin (終濃度 10 $\mu$ M) もしくは DMSO のみを培地に添加した. Forskolin の添加により, リズムの位相が 5 時間程度後退しているのがわかる.

## 応用例；培養組織からのリアルタイムリズム測定

ジャクソンラボラトリーから、Per2 遺伝子にルシフェラーゼを融合させた遺伝子 (Per2::Luc) をノックインしたマウスが売られている (日本でも購入できる)。この動物より臓器や組織を取り出し、培養しながら発光を計測すれば、その時計リズムをリアルタイムで計測することができる (図 5)。

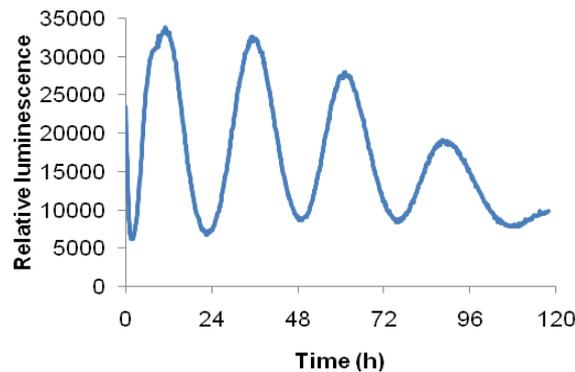


図 5 Per2::Luc ノックインマウスより取り出した肝臓組織のリズム

Per2::Luc ノックインマウスより肝臓の一部を切り出し、培養しながら発光リズムを測定した。

## おわりに

最近、サーカディアンリズムとエネルギー代謝との深い関わりが徐々に明らかになってきている。サーカディアンリズムを整えることで、脂質代謝や糖代謝のリズムが正常化し、肥満や生活習慣病などのリスクが軽減し、健康や長寿に大きな影響を与えると考えられる。夜食を減らし、朝食をしっかりと食べることがまずその第一歩となるが、機能性食品の新たな活用の道としても注目される。例えば、朝の活性化リズムを生み出す食品、夜の睡眠リズムを促す食品、時差ボケを解消する食品など、リズムを整える機能を持つ食品成分が明らかになることで、病気を予防するための食事設計も大きく変わると考えられる。さらに、これまで機能性が知られている食品に関して、どの時間帯に摂取するかで、その効果が大きく変わるということが予想される。今後は、何を“いつ”食べるかという時間栄養学の発展が期待される。

## 参考文献

- 1) Oike,H. and Kobori,M., Resveratrol Regulates Circadian Clock Genes in Rat-1 Fibroblast Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,**72**, 3038-3040 (2008).

筆者がレスベラトロール (赤ワインに含まれるポリフェノール) のリズム同調作用を示した論文