

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590236
 研究課題名（和文） トランスクリプトーム、プロテオーム解析による C6 細胞特異的概日振動機構の解明
 研究課題名（英文） The study on C6 cells specific circadian oscillatory mechanisms by transcriptome and proteome analysis
 研究代表者
 藤岡 厚子 (FUJIOKA ATSUKO)
 近畿大学・医学部・准教授
 研究者番号：30077664

研究成果の概要：生物時計の組織特異的概日リズム発振機構の分子機構を明らかにするため、C6 細胞を末梢時計モデルとして用い、組織特異的概日振動遺伝子および振動タンパクを検出した。Gene chips により約 300 の特異的振動遺伝子を、2D-DIGE により数十個の振動タンパクを認めた。転写の振動を伴わない、タンパクリン酸化による概日振動を示すものもあった。タンパクリン酸化は細胞機能に関与し、その概日リズムを知ることは、細胞のリズム発振機構解明に意義深い

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：概日時計、トランスクリプトーム、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類における概日時計の中樞は視床下部の視交叉上核に存在し、約 24 時間周期の振動を時計遺伝子とそれがコードする時計関連タンパクによるフィードバックループによって生み出している。この概日時計のシステムは末梢組織にも保存され、現在では、ほとんどの末梢組織の細胞が概日リズムを作り出すことが出来ることが明らかになっている。このような末梢組織での概日時計の意

義については、遺伝子発現解析による概日振動分子の機能から推し量られている。しかし、実際に細胞機能をなうタンパクについては概日時計との関連について解析がほとんど行われておらず、末梢時計の意義については明確になっていない。このような機能を明らかにするためにはタンパク分子に標的をあて、細胞系のモデルを用いて検討することが、最も迅速な方法であると考えられる。申請者らは株化 C6 グリオーマ細胞が、刺激後

安定して1週間あるいはそれ以上持続する振動を有することを見いだした (Fujioka et al. BBRC 2006)。C6細胞にはSCNや株化線維芽細胞で明らかにされた時計遺伝子ならびに時計関連遺伝子が発現し、振動の位相は視交叉上核や線維芽細胞で見られるのものと一致していた。C6細胞には視交叉上核と同様のリズム発振の分子機構が存在していると考えられる。C6細胞は単一の細胞から構成されており、また分子機構を検証する上で必要な遺伝子導入が容易である、一週間以上概日リズムが継続する、といった利点があり、生物時計の組織特異的概日リズム発振機構の分子機構を明らかにするための新たなツールとして用いることが出来る。

2. 研究の目的

長期間にわたって安定した概日リズムを示すC6細胞をモデルとして末梢組織における概日リズムの意義を解明したいと考えている。細胞機能に対して、概日リズムが及ぼす影響を探索する。そのために組織特異的な概日振動の転写調節機構を明らかにし、さらにタンパクの発現量、リン酸化、ユビキチン化、分解などの翻訳後に生じるタンパクの概日リズムがどのようにして概日時計によって制御されるかについて検討を加えたい。概日振動をもって発現するタンパクやタンパク修飾に着目して、体内時計がいかんして細胞機能を修飾するのかについての検討を行う。

3. 研究の方法

(1) C6細胞特異的概日振動遺伝子の検出

Affimetrix社Gene chipを用いて振動遺伝子を検出、視交叉上核や肝の振動遺伝子との比較を行い、C6細胞特異的概日振動遺伝子を選択した。

(2) C6細胞中に発現する振動タンパクを明らかにする

Dex刺激後、経時的にC6細胞可溶性タンパクを抽出し、referenceをCy3、targetをCy5で染色した2D-DIGEを行い、振動するタンパクを検出する。ついでMALDI-TOF/MS法による質量解析を行い、振動タンパクを同定する。Blottingを行い振動を確認する。またこれらのタンパクの振動が転写の振動により形成されているかどうかについてreal time PCRにより検討する。

(3) 転写の振動によらないタンパクリン酸化の振動を網羅的に検討する

タンパクの活性はリン酸化と脱リン酸化によって調節されているものもある。このような活性化と不活性化のリズムをみるために、タンパクリン酸化の変動を二次元電気泳動で検出する。リン酸化タンパクの検出には次の2つの方法を用いた。

①ProQ-Diamondによるリン酸化タンパク特異的染色：C6細胞より抽出した可溶性タンパクを二次元電気泳動する。泳動後、リン酸化タンパク検出のためにProQ-Diamond、全タンパクに対してSYPRO Rubyでゲルを染色し、typhoonで画像情報を得る。経時的に採取サンプル像を比較することによりリン酸化、脱リン酸化の振動を示すタンパクを検出、MALDI-TOF/MS法による質量解析を行い、振動タンパクを同定する。

②Phosphatase処理によるリン酸化タンパクの検出：経時的に末梢組織あるいはC6細胞より抽出した可溶性タンパクの半量をPhosphatase処理し、Cy3でラベル。残りの未処理のタンパクはCy5でラベルする。両者を混合後2次元電気泳動し、typhoonで画像情報を得る。Cy5の色調を強くとするスポットはリン酸化タンパクであることがわかる。このようにして一枚のゲル上で比較することによりリン酸化によるわずかなスポットのずれも検出可能となり、リン酸化タンパクが高い精度で検出可能となる。

(4) 免疫沈降による振動タンパク関連タンパクの検出

振動を確認したタンパクについて免疫沈降を行い、二次元泳動する。検出されたスポットの同定をMALDI-TOF/MS法で行い、振動タンパクの細胞内における機能を考察する。

4. 研究成果

(1) 組織特異的概日振動遺伝子の転写調節機構

gene chipを用いた解析からC6細胞特異的に振動する遺伝子を300以上も見つけた。それらの一つにTgf-aがある。Tgf-aは、Dex投与後C6細胞では、リズム的な発現を示した。一方rat1細胞ではリズムを示さなかった(図1)。したがってTgf-aはC6細胞特異的振動遺伝子の一つと考えられる。Tgf-aはSCNでは神経細胞ではなくアストログリアに発現する。C6細胞

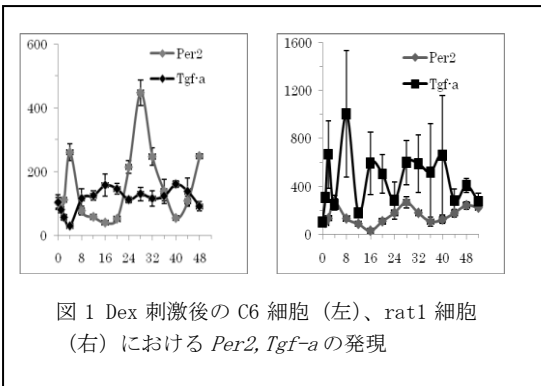


図1 Dex 刺激後の C6 細胞 (左)、rat1 細胞 (右) における *Per2*, *Tgf-a* の発現

はグリオーマ細胞であり興味深い。TGF- α タンパクは、マスキング反応との関係が示唆されている。マスキングの分子機構は不明であり、細胞特異的に発現しているC6細胞を用いることにより、マスキングに関連したTGF- α 誘導機構など、分子事象の解明をさらにすすめている。

(2) C6細胞中に発現する振動タンパク

二次元泳動によるプロテオーム解析の結果、数十個の振動タンパクが認められた。それらの振動タンパクの一つにEF2がある。EF2は2D

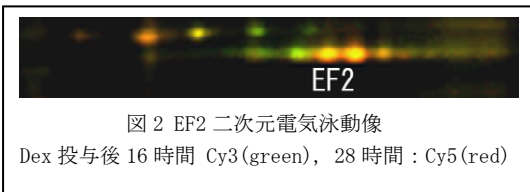


図2 EF2 二次元電気泳動像
Dex 投与後 16 時間 Cy3(green), 28 時間 : Cy5 (red)

DIGEでは塩基性側 (右) から酸性側 (左) に連続するスポットとして認められた。Dex刺激後28時間 (Cy5標識 : 赤) では塩基性側に、16時間 (Cy3標識 : 緑) で酸性側に強く発現しているのがわかる (図2)。このような酸性側へのスポットのシフトはタンパク (EF2) のリン酸化による場合が多い。すなわちEF2リン酸化の振動が示唆されるので、リン酸化EF2のSDS PAGEを行った。刺激後8~12時間および32時間で高いリン酸化EF2の発現をみた (図3)。一方

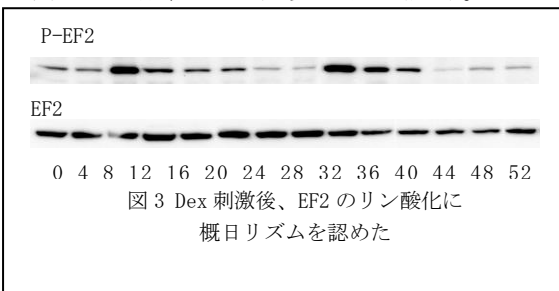


図3 Dex 刺激後、EF2 のリン酸化に概日リズムを認めた

EF2には発現量の振動を認めなかった。またEF2 の mRNA 発現レベルにも概日リズムはなかった。EF2はペプチド伸長に重要な役割を持

つタンパクで、リン酸化により不活性化することが知られている。EF2のリン酸化-脱リン酸化は、転写によらないタンパク発現の制御に関係している可能性があり、興味深い。さらにリン酸化EF2振動機構を明らかにするため、リン酸化EF2による免疫沈降を行い、関係するタンパクおよびシグナル伝達機構について解明しつつある。

(3) 転写の振動によらないタンパクリン酸化の振動

時計関連タンパクによって作られるフィードバックループでは、タンパクの核内移行時やタンパク分解の際に、リン酸化脱リン酸化のサイクルが関与している (M. Gallego et al, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2007)。細胞におけるシグナル伝達経路の多くも、リン酸化と脱リン酸化によって活性調節を受ける。このように転写のリズムに依らない、細胞の機能に直接関与するタンパクの発現量やリン酸化、脱リン酸化の概日リズムを知ることは、細胞におけるリズム発振機構を解明する上で意義深い。Dex刺激後、経時的に採取したサンプルをホスファターゼ処理あるいはリン酸化タンパク特異的染色 (ProQ-Diamond) によりリン酸化タンパクを検出、リン酸化の振動を検出した (図4)。Dex刺激後、40時間と52時間

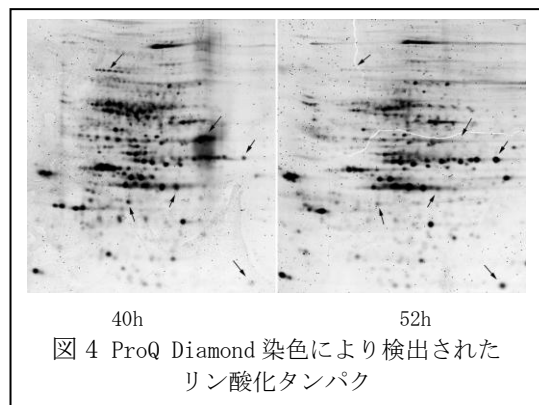


図4 ProQ Diamond 染色により検出されたリン酸化タンパク

ではリン酸化タンパクの発現に明らかな差を生じるものがいくつも認められた (矢印)。振動をしめすリン酸化タンパクを網羅的に明らかにするにはプロテオーム解析が有用である。MALDI-TOF/MS法でタンパクを同定し、末梢組織におけるリズム発振機構とシグナル伝達機構を機能するタンパクレベルで明らかにしつつある。

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 5 件)

- ① 鯉沼聡 (他 5 名、1 番目)、藤岡厚子 (他 5 名、3 番目)、重吉康史 (他 5 名、6 番目)、The resetting of the circadian rhythm by Prostaglandin J(2) is distinctly phase-dependent, FEBS Lett, 583, 413-418, 2009 年、査読有
- ② 重吉康史 (他 9 名、8 番目)、Analysis and synthesis of high-amplitude Cis-elements in the mammalian circadian clock, Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 14946~51, 2008 年、査読有
- ③ 筋野貢、長野護、藤岡厚子、重吉康史、井上慎一、Temporal profile of circadian clock gene expression in a transplanted suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues, European Journal of Neuroscience, 26, 2731~273, 2007 年、査読有
- ④ 鯉沼聡 (他 4 名、2 番目)、重吉康史 (他 4 名、3 番目)、Presence of robust circadian clock oscillation under constitutive over-expression of mCry1 in rat-1 fibroblasts, FEBS Lett, 581, 4098-102, 2007 年、査読有
- ⑤ 重吉康史 (他 11 名、6 番目)、LA activates posttranscriptional expression of an essential mammalian clock protein, PERIOD1, Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 1859-1864, 2007 年、査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 藤岡厚子、概日リズムの位相依存性にリン酸化されるタンパクの網羅的解析、時間生物学会、2008 年 11 月 8 日、岡山
- ② 鯉沼聡、ラット C6 細胞の概日リズムに対するプロスタグランジン J2(PGJ2)の影響、時間生物学会、2008 年 11 月 8 日、岡山
- ③ 藤岡厚子、プロテオーム解析による変動タンパクの検出、時間生物学会、2007 年 11 月 7 日、東京
- ④ 藤岡厚子、Glioma cell line shows circadian alteration of Tgf- α 、時間生物学会、2007 年 11 月 5 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤岡 厚子(FUJIOKA ATSUKO)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号：30077664

(2) 研究分担者

重吉 康史(SHIGEYOSHI YASUFUMI)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：20275192
鯉沼 聡(KOINUMA SATOSHI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：10340770

(3) 連携研究者