

研究者：佐藤 涼一（所属：東京歯科大学衛生学講座）

研究題目：唾液腺培養細胞の時計遺伝子発現解析

目的：

生物はその行動や血圧や体温などの生理機構に約 24 時間周期のリズムが存在している。これは概日リズムと呼ばれ、生物・細胞が内在性の体内時計を持つことに由来している。概日リズムは睡眠や生体の代謝活動に深く関わっており、リズムの異常が特定の疾患の発症を助長している。また、特定の疾患では時計遺伝子の発現リズムに異常が起こるという報告もありリズム異常と疾患には相関関係が存在していると考えられている。近年、概日リズムが時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群で構成され、ネガティブフィードバック機構によって約 24 時間の概日周期の発振を達成していることが明らかにされた。歯科の分野において唾液分泌量に概日リズムがあることは明らかにされていたが、分泌リズムの形成メカニズムや調節因子については十分な検討が行われていない。唾液腺には時計遺伝子の発現が認められ、*In situ hybridization* 法にてその発現が導管細胞に局在していることが明らかにされている。これらの結果は唾液腺導管細胞が唾液分泌の概日リズムの調節に関与していることを示唆している。本研究は唾液腺導管細胞の時計遺伝子発現を解析し、唾液分泌の概日リズム形成メカニズムを検討することを目的とした。

対象および方法：

7 日齢 Long Evans ラット顎下腺由来の唾液腺導管細胞株（SMIE）を 10% FBS 含有 DMEM 培地にてコンフルエントまで培養後 total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法にて各種時計遺伝子（*Bmal1*, *Per2*, *Clock*, *Cry1*）発現を確認した。測定は 100 nM dexamethasone 2 時間刺激にて末梢時計のリセットを行い、4 時間ごとに 48 時間連続で行った。インターナルコントロールとして β -actin を選択し、タイムポイントごとに 3 サンプルの平均値と標準偏差を求め、細胞増殖などによる影響がないかをセルカウントでモニタリングした。

さらにヒト *Bmal1* プロモーター領域配列よりラットの相同配列を検索し、プラスミド pGL3-dlluc に推定したラット *Bmal1* プロモーター領域を組み込み、レポータープラスミドを完成させた。設計したレポータープラスミドの配列はシーケンスによって一致を確認している。完成したプラスミドを 70-90% コンフルエントまで培養した SMIE にトランスフェクション後、100 nM dexamethasone 2 時間刺激にて末梢時計のリセットを行い、72 時間インキュベートしながらルシフェラーゼ発光によるリアルタイムレポーターアッセイを行った。

結果および考察：

リアルタイム RT-PCR 法により SMIE には 4 種の時計遺伝子（*Bmal1*, *Per2*, *Clock*, *Cry1*）が発現していることが明らかになった。48 時間の連続測定から *Bmal1*, *Cry1* の 2 種類の遺伝子にて計測開始後 4 時間以降に有意差を認め、*Bmal1* は測定開始 16 時間後に、*Cry1* は 8 時間後にピークを観測した。両者とも 40 時間以降に再度増加を示し発現量の日内変動が確認できた

が、その周期性までは確認できなかった (Fig. 1)。

測定間隔の短縮と手技による誤差を最小限に抑え、測定を自動化するため、ルシフェラーゼリアルタイムレポーターアッセイ法での測定を行った結果、*Bmal1* 遺伝子の約 24 時間周期の日内変動測定に成功した (Fig. 2)。本研究で作成したプラスミドは、ラット由来の細胞にトランスフェクションすることでその細胞の時計遺伝子 *Bmal1* の発現をルシフェラーゼ発光によりリアルタイムにモニタリングすることを可能にし、概日リズムを唾液腺由来細胞株で観測するアッセイ系を確立することができた。これらの結果より、唾液腺導管細胞内にて *Bmal1* 遺伝子発現に約 24 時間周期の日内変動があり、時計遺伝子のネガティブフィードバックによる抹消時計機構が存在していることを明らかにできた。

唾液腺細胞における時計遺伝子発現リズムの解析は、唾液分泌量の減少による唾液腺疾患や口腔乾燥症などの発症機構の解明、治療および予防法の開発にも大いに貢献できると考えられる。

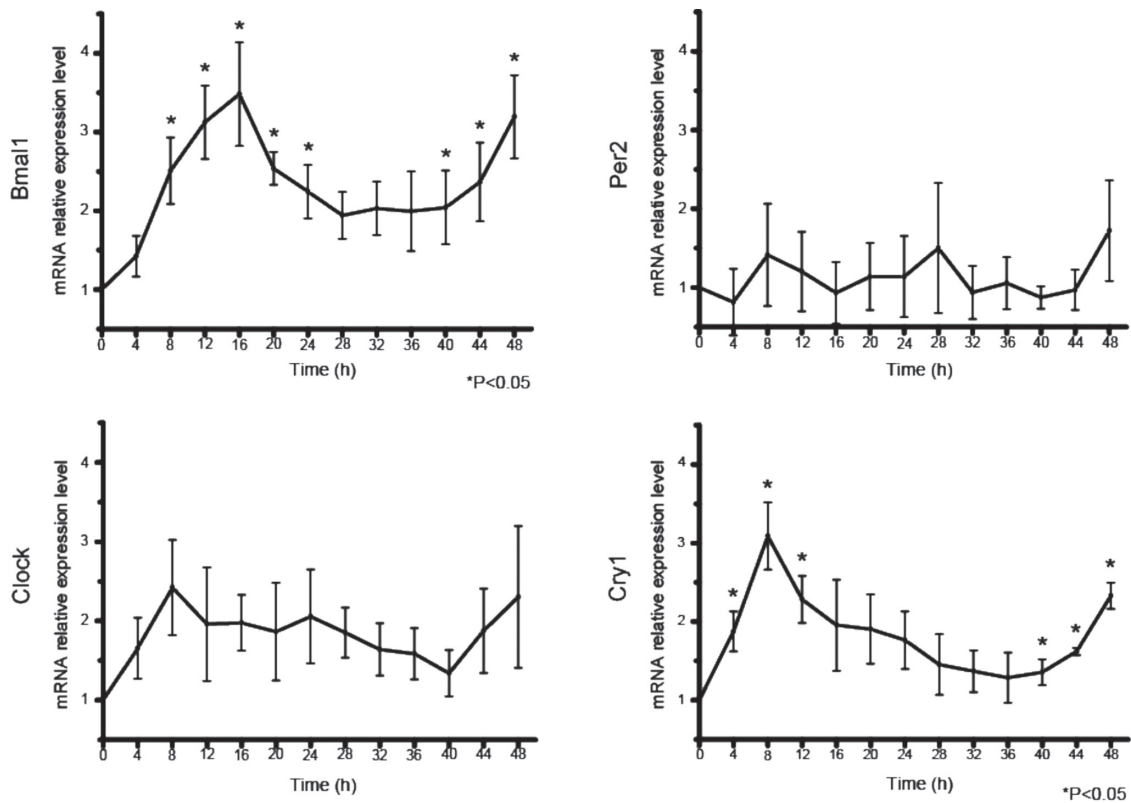


Figure 1. Circadian expression of the clock genes in SMIE cells.

Transcripts of SMIE cells stimulated with 100 nM dexamethasone were analysed by real-time RT-PCR. Levels of RNA were normalized to *Actb* expression, and the 0h value was set at 1. Values are means \pm S.D. for triplicate assays. * $P < 0.05$ (Dunnett's test)

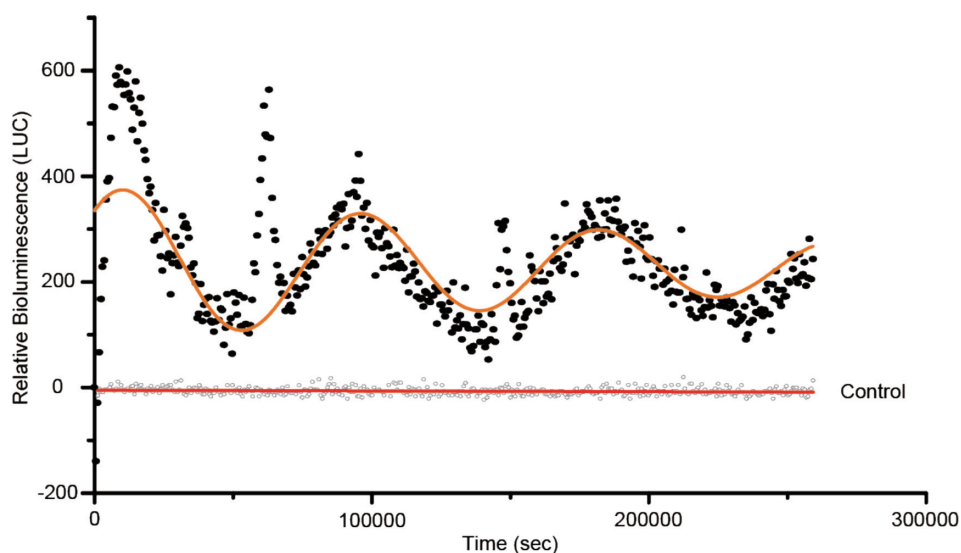


Figure 2. Circadian oscillation of the *Bmal1* promoter in SMIE cells. SMIE cells were transfected with the *Bmal1* promoter construct, stimulated with dexamethasone and analysed using a SpectraMax M5e (Molecular Devices). Bioluminescence was measured at 10 min intervals. Dots, raw values ; lines, fit curve data.

成果発表：

佐藤涼一，石塚洋一，佐藤正樹，木村麻記，澁川義幸，田崎雅和，杉原直樹

ラット顎下腺導管細胞の時計遺伝子発現解析

第 59 回日本唾液腺学会総会，平成 26 年 12 月 6 日，東京都

日本唾液腺学会誌，55：29，2014

現在，上記内容を含めて国際ジャーナルに投稿準備中。