Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Does mPER2 protein oscillate without its coding mRNAcycling? —Post-transcriptional regulation by cell clock

藤本，義人

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2006-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲3673
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003673

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 134 】

氏　　名・（本　籍）	藤本　義人	（　兵庫県　）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博い第1756号	
学位授与の　要　件	学位規則第５条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成18年3月25日	

【 学位論文題目 】

Does mPER2 protein oscillate without its coding mRNA cycling? －Post-transcriptional regulation by cell clock
（mPER2蛋白質はmRNAの変動がなくても量的変動を示すか？
－細胞時計による転写後制御）

審　査　委　員

主 査　教　授　寺島　俊雄
教　授　久野　高義
教　授　饗場　　篤

生命現象はさまざまな周期的変動を示す。そのうち２４時間を一周期とする概日リズム（circadian rhythm）は、シアノバクテリアなどの単細胞生物からヒトにいたるまで現存の大部分の生物に認められている。この概日リズムは細胞レベルで形成されており、時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群による転写翻訳のフィードバックループにより生み出される。

哺乳類、特にマウスでは、3 つの *Period* 遺伝子（*mPer1,mPer2,mPer3*）と呼ばれる時計遺伝子が見つかっており、これらの mRNA の発現は生体内で概日変動を示す。この mRNA での振動が PERIOD(PER)蛋白質の量的振動を生み出し、この蛋白質量こそが細胞内の概日時計の状態を規定していると考えられている。一方、最近になり、PER の蛋白質レベルでの変動にはリン酸化、ユビキチン化などの転写後制御が関与しているという報告がなされてきた。しかしながら、これらの制御が PER 蛋白質の概日変動にどれほど寄与しているかは明らかでない。そこで我々は、mRNA 量の変動がない状態でも細胞時計による転写後制御により mPER2 蛋白質の量に変動が生み出されるかを調べた。

まず、我々は実験系としてマウス線維芽細胞由来の培養細胞である NIH3T3 細胞を用いることにした。繊維芽細胞では、高濃度の血清刺激により時計遺伝子の mRNA の発現に概日変動が見られることが知られている。しかも、これらの発現はその細胞の遺伝子型に依存して個体レベルと同様の変動を示すため、生体内の概日振動の分子機構を検証するためのモデル系となりうることが示されている。

この NIH3T3 細胞中に N 末端を FLAG タグで標識した mPER2（FLAG-mPER2）蛋白質を発現させるため、我々は Flp-In システムを用いて FLAG-mPER2 の安定発現細胞株を作成した。この Flp-In システムでは、Flp 組み換え酵素により Flp Recombination Target（FRT）配列を持つ発現ベクターと細胞のゲノム中の FRT 配列との間で相同組み換えが起こり、細胞のゲノムに目的遺伝子の発現ベクターを導入することができる。本研究では FRT 配列を一コピーだけ導入した NIH3T3 細胞である Flp-In 3T3 細胞を用いた。Flp-In3T3 細胞のゲノム中には FRT 配列が一コピーだけ存在するため Flp-In システムでは、外来性の遺伝子はすべてゲノム上の同じ位置に一コピーだけ導入される。

Flp-In 3T3 細胞における血清刺激後の遺伝子発現を調べたところ、概日時計に制御されて発現する遺伝子（clock controlled gene; *ccg*）である *dbp* 遺伝子の mRNA の発現には明瞭な概日変動が見られた。このことは Flp-In 3T3 細胞に概日時計を駆動するために十分な分子機構が備わっていることを示唆する。

先述の方法により Flp-In 3T3 細胞に FLAG-mPER2 遺伝子を含む発現ベクターを導入した。我々は全長の mPER2（mPER2(full)）とともに C 末端側を欠損させた変異体 mPER2(1-1068)を用いた。mPER2 の C 末端は概日時計に必須の時計遺伝子であるマウス CRYPTOCHROME（mCRY）に結合するために必要な領域である。変異体 mPER2(1-1068)を解析に用いることにより、概日周期の形成における mPER2 と mCRY の結合の意義を検証することができると考えた。

我々はそれぞれ FLAG-mPER2(full)及び FLAG-mPER2(1-1068)を安定発現する細胞株を樹立した。ここで、双方の細胞株で外来性の遺伝子の mRNA の配列をより近いものとするために、FLAG-mPER2(1-1068)の発現ベクターは FLAG-mPER2(full) の発現ベクターに一塩基を挿入することで停止コドンを導入した。この事実とそれぞれの遺伝子がゲノム上の同じ位置にそれぞれ一コピーずつ導入されることと考え合わせてもそれぞれの遺伝子における転写及び転写後制御の違いは最小限にできると考えられる。

ここで得られた安定細胞株中では FLAG-mPER2(full) 及び FLAG-mPER2(1-1068)、それぞれの遺伝子の mRNA は同等の大きさを示したものの、発現する蛋白質は予想通り大きさに違いが見られた。また、mPER2 蛋白質は生体内でリン酸化を受けていることが知られており、FLAG-mPER2(full)及び FLAG-mPER2(1-1068)が同様の制御を受けているかを調べたところ、確かに細胞中で両方の蛋白質ともリン酸化されていることを確認した。

次にこの安定細胞株での血清刺激後の遺伝子発現を調べた。本研究では *FLAG-mPer2* 遺伝子の発現を一定にするために、発現制御にヒト EF-1□プロモーターを用いた。予想された通り、血清刺激後に *FLAG-mPer2(full)*及び *FLAG-mPer2(1-1068)*の mRNA に振動は見られないものの、先述の *dbp* 遺伝子の発現には顕著な概日振動が見られた。このことはこれらの安定発現細胞株が *FLAG-mPer2* 遺伝子の導入後も概日時計を駆動する能力を有していることを示している。これにより、我々は概日時計を駆動するために十分な分子機構を有し、かつ *FLAG-mPer2* 遺伝子の mRNA が一定量発現する細胞株を得た。

最後にこれらの細胞株を用いて FLAG-mPER2 蛋白質の量的変動を調べた。FLAG-mPER2(full)蛋白質は血清刺激後、その mRNA 量が振動を示さないものの量的変動を示した。FLAG-mPER2(1-1068)蛋白質においても血清刺激後に同様の量的変動が見られた。このことから、mPER2 の C 末端の欠損により蛋白質の量的変動は損なわれないことが分かった。mPER2 と mCRY の結合は

mPER2 蛋白質の量的変動に必須ではないと考えられる。

本研究により、細胞内概日時計の転写後制御により mRNA レベルでの振動がなくても mPER2 の蛋白質レベルでの振動を生み出すことができることが示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第 1757号	氏名	藤本 義人
論文題目 Title of Dissertation	**Does mPER2 protein oscillate without its coding mRNA cycling?** **— Post-transcriptional regulation by cell clock** **mPER2** 蛋白質は **mRNA** の変動がなくても量的変動を示すか？ — 細胞時計による転写後制御		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 寺島俊雄 副査 Vice-examiner 久野高義 副査 Vice-examiner 饗場篤		
審査終了日	平成 18 年 3 月 13 日		

（要旨は 1,000 字ー2,000 字程度）

２４時間を一周期とする概日リズム（circadian rhythm）は現存の大部分の生物に認められている基本的な生命現象である。この概日リズムは時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群による転写翻訳のフィードバックループにより生み出される。

哺乳類、特にマウスの概日時計では、*Period* 遺伝子（*mPer1,mPer2,mPer3*）と呼ばれる時計遺伝子が振動子であると考えられている。この mRNA の振動が PERIOD(PER)蛋白質の量的振動を生み出し、この蛋白質量こそが細胞内の概日時計の位相を規定していると考えられている。一方、最近になり、PER の蛋白質レベルでの変動にはリン酸化、ユビキチン化などの転写後制御が関与しているという報告がなされてきた。しかしながら、これらの制御が PER 蛋白質の概日変動にどれほど寄与しているかは明らかでない。本研究は mRNA 量の変動がない状態でも mPER2 蛋白質の量に変動が生み出されるかを検索したものである。

線維芽細胞では、高濃度の血清刺激により時計遺伝子の mRNA の発現に概日変動が見られることが知られている。しかも、この概日振動の分子機構は哺乳類体内時計の中枢である視交叉上核と一致し、概日時計研究のモデル系となり得ることが示されている。従って、本研究では、マウス線維芽細胞由来の培養細胞である NIH3T3 細胞を用いた。mPER2 の mRNA が一定量発現する系を確立するため、本研究では、Flp-In システムにより安定発現細胞株を作成した。

この Flp-In システムでは、Flp Recombination Target（FRT）配列を持つ発現ベクターと細胞のゲノム中の FRT 配列との間の相同組み換えにより、細胞のゲノムに目的遺伝子を導入することができる。本研究では FRT 配列を一コピーだけ導入した NIH3T3 細胞である Flp-In 3T3 細胞を用いたため、外来性の遺伝子はすべてゲノム上の同じ位置に一コピーだけ導入される。

この Flp-In 3T3 細胞における血清刺激後の遺伝子発現を調べたところ、概日時計に制御されて発現する遺伝子（clock controlled gene; *ccg*）である *dbp* 遺伝子の mRNA の発現には明瞭な概日変動が見られた。このことは Flp-In 3T3 細胞に概日時計を駆動するために十分な分子機構が備わっていることを示唆する。

先述の方法により Flp-In 3T3 細胞に FLAG タグで標識した mPER2（FLAG-mPER2）遺伝子を含む発現ベクターを導入した。本研究では全長の mPER2（mPER2(full)）とともに C 末端側を欠損させた変異体 mPER2(1-1068)を用いた。mPER2 の C 末端は概日時計に必須の時計遺伝子であるマウス CRYPTOCHROME（mCRY）に結合するために必要な領域である。細胞中での mRNA への制御を考慮し、双方の細胞株で外来性の遺伝子の mRNA の配列をより近いものとするため、FLAG-mPER2(1-1068) の発現ベクターは FLAG-mPER2(full) の発現ベクターに一塩基を挿入することで停止コドンを導入した。また、*FLAG-mPer2* 遺伝子の発現制御にはヒト EF-1α プロモーターを用いた。その結果、得られた安定発現細胞株中ではそれぞれの遺伝子の mRNA は同等の大きさを示したものの、発現する蛋白質は予測通り大きさに違いが見られた。また、内在性の mPER2 蛋白質が生体内でリン酸化を受けるという知見と同様、双方の蛋白質とも細胞中でリン酸化されていた。

次に、これらの安定細胞株での血清刺激後の遺伝子発現を検索した。予測された通り、血清刺激後に *FLAG-mPer2(full)* 及び *FLAG-mPer2(1-1068)* の mRNA に振動は見られないものの、*dbp* 遺伝子の発現には顕著な概日振動が見られた。このことはこれらの安定発現細胞株が *FLAG-mPer2* 遺伝子の導入後も概日時計を駆動する能力を有していることを示している。以上のことから、概日時計を駆動するために十分な分子機構を有し、かつ *FLAG-mPer2* 遺伝子の mRNA が一定量発現する細胞株が樹立されたことが確認された。

最後にこれらの細胞株を用いて FLAG-mPER2 蛋白質の量的変動を調べた。血清刺激後、FLAG-mPER2(full)蛋白質、FLAG-mPER2(1-1068)蛋白質双方とも、その mRNA 量が振動を示さないものの量的変動を示した。mPER2 の C 末端の欠損により蛋白質の量的変動は損なわれないことから mPER2 と mCRY の結合は mPER2 蛋白質の量的変動に必須ではないと考えられる。

本研究は、細胞内概日時計の転写後制御により mRNA レベルでの振動がなくとも mPER2 の蛋白質レベルでの振動を生み出すことができることを、一定の転写効率が期待される Flp-In 系を用いて、初めて明らかにしたものであり、時計遺伝子群によるフィードバック・システムによる時間周期生成のメカニズムについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。