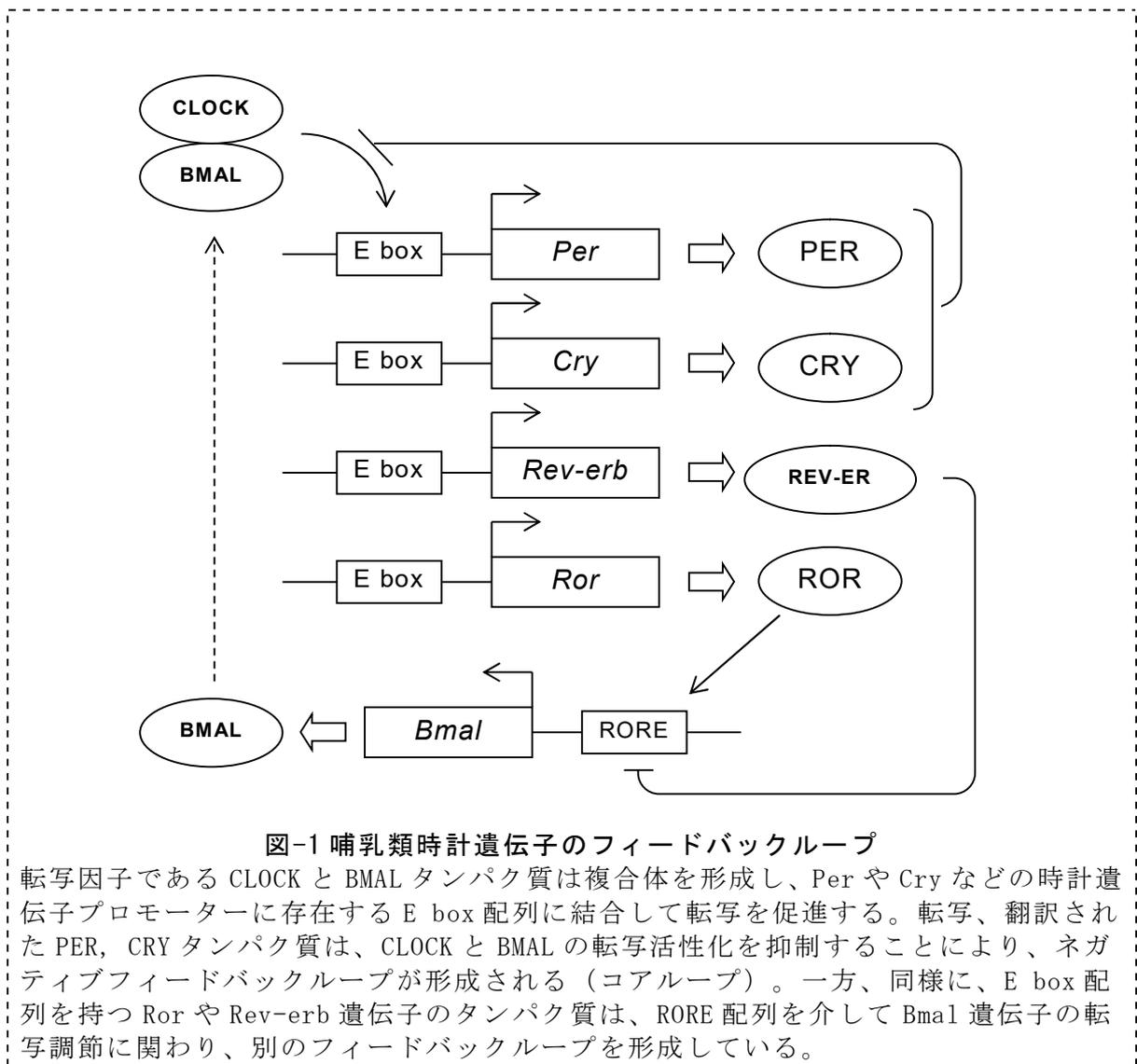


培養細胞を用いた体内時計への影響評価

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 大池 秀明

【はじめに】

光合成細菌から植物、昆虫、動物に至るまで、地球上の多くの生物には、約 24 時間周期の体内時計である“概日リズム（サーカディアンリズム）”が備わっている。体内時計と聞くと、個体で 1 つの時計をイメージする方が多いかもしれないが、実際には、1 つ 1 つの細胞のリズムとして検出可能である。すなわち、個々の細胞中に約 24 時間の自律リズムがあり、そのリズムが協調して個体全体の睡眠・覚醒、あるいは、体温、血圧、エネルギー代謝等の日周リズムを生み出している。哺乳類細胞における概日リズムの発振機構として、約 20 種類の時計遺伝子が明らかになっており、これらの遺伝子が転写のネガティブフィードバックループを形成し、約 24 時間周期の遺伝子発現の増減を繰り返す。特に、Bmal, Clock, Per, Cry の作り出すフィードバックループがコアループと呼ばれ、中心的な役割を果たしている（図 1）。このように、1 日で 1 サイクル回る遺伝子ループがリズムの基盤となり、その下流で、エネルギー代謝やホルモンの合成・分泌に関わる遺伝子などが制御され、個体全体としての 24 時間リズムが形成される。末梢組織における個々の細胞のリズムは、外界の光環境（昼夜）よりも、食事時刻の影響を大きく受け、例えば、実験的にマウスの食餌時刻を昼夜反転させると、末梢組織の概日リズムも反転する。最近では、栄養成分や食品成分によって概日リズムが変化することが明らかになってきており、ここでは、培養細胞を利用して、食品成分が体内時計に与える影響について解析する方法を紹介する。



【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- ・ CO₂ インキュベーター、クリーンベンチ、アスピレーター、パスツール、各種培養用ピペット、倒立顕微鏡（細胞培養ができる環境）
- ・ インキュベート機能付ルミノメーター（ATTO 社の Kronos、ActiMetrics 社の LumiCycle、中立電機社の高感度生物発光測定装置など）
- ・ マイクロピペット
- ・ 35 mm 培養ディッシュ（IWAKI, 3000-035）
- ・ 100 mm 培養ディッシュ（Corning, 353003）
- ・ 6 well 培養プレート（Corning, 353046）
- ・ 24 well 培養プレート（Corning, 353047）
- ・ シリコングリース（信越シリコーン, G-30M）
- ・ クローニングリング（IWAKI, 11-0163）

- 0.22 μm メンブレンフィルター (Merck Millipore, SLGV0250S)
- 解剖用具 (ハサミ、ピンセット)、ミクロスパーテル

2. 試薬等 (あくまで、筆者が利用している一例です)

- 細胞：下記 3 種類の細胞株は通常の培養条件下で安定した概日リズムを示すが、一般的によく利用されている不死化細胞株では、概日リズムを示さないものも多い。

NIH3T3 細胞 (RIKEN Cell Bank, RCB1862)、Rat-1 細胞 (RIKEN Cell Bank, RCB1830)、U2OS 細胞 (ATCC, HTB-96; 住商ファーマインターナショナルで取り扱い)

- DMEM 培地 (Sigma, D5796)
- PBS (ニッスイ, 05913)
- トリプシン-EDTA (Thermo Fisher Scientific, 25200-056)
- ウシ胎児血清 (FBS; MP Biomedicals, 2917354)
- ウマ血清 (HS; Thermo Fisher Scientific, 16050-122)
- 遺伝子導入試薬 (ここでは Polyethylenimine MAX; Polysciences, Inc., 24765-2; コスモバイオで取り扱い)
- 概日リズムレポータープラスミド (ここでは mBmal1-luc/pGL4.22 vector)
- ルシフェリン (Promega, E1602)
- ハンクス溶液 (Sigma, H6648-1L)
- ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma, P0781-100ML)
- B27 サプリメント (Thermo Fisher Scientific, 17504044)
- フォルスコリン (Sigma, Wako, 067-02191)
- DMSO (和光純薬, 048-21985; フォルスコリン溶解用)
- カフェイン (東京化成, C2042)
- CELLBANKER 1plus (日本全薬工業, CB023; タカラバイオで取り扱い)
- インスリン (和光純薬, 093-06471)

3. 調合・調整

- Polyethylenimine MAX (以下 PEI と表記)

PEI 50 mg を 45 mL 程度の水に懸濁する。10M NaOH を数十 μL 程度滴下し pH が 6.0~7.2 になるように調整して溶解する。溶液をメスシリンダーに移し、50 mL (1.0 mg/mL) となるように水を加える。孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌し、適宜分注して 4°C で保存する。

- 概日リズムレポータープラスミド

時計遺伝子のプロモーターを利用してルシフェラーゼ遺伝子 (luc) を発現させるものが主流。Bmal1-luc¹⁾, Per1-luc, Per2-luc²⁾ が良く利用される。例えば、Bmal1-luc/pGL4.22 の場合、マウスの時計遺伝子 Bmal1 のプロモーター領域の一部 (転写開始点の上流 0.6 kbp; Rev-erb α が結合する RORE 配列を含む) を哺乳類発現用プラスミドベクター pGL4.22 (Promega, E6771) のマルチクローニングサイトに挿入する。マルチクローニングサイトの下流には、ルシフェラーゼ遺伝子と分解シグナルが配置されており、発現したルシフェラーゼタンパク質は短時間で分解され、プロモーター活性の経時変化を反映する。また、Puromycin に対す

る薬剤耐性遺伝子も配置されており、安定発現細胞株を作製する場合に利用可能。

Bmal1 の代わりに、ヒトやマウスの Per2 遺伝子プロモーター (E-box 配列を含む約 0.4-1.0 kbp) も良く利用される。Bmal1 と Per2 のプロモーターに、異なる色調のルシフェラーゼをつなぎ、同時に 2 種類のプロモーター活性を見ている例もある³⁾。

- ルシフェリンは滅菌水で 100 mM に溶解し、1 回の実験で使用する分量 (16 μ L ; 35 mm dish 8 枚分で培地が 16 mL の場合) に小分けして、-80°C で保存する。
- フォルスコリンは DMSO で 10 mM に溶解し、-20°C で保存する。
- カフェインは水で 5 mM に溶解し、-20°C で保存する。

【プロトコール】

1. 概日リズムレポーターの一過的導入

- 1) 細胞を凍結ストックより起こし、100 mm 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 (4.5 g/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-EDTA を使って継代する (目安は 10 倍希釈で、週 2 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、35 mm ディッシュに $2-5 \times 10^5$ 個程度の細胞をまく (翌日、70-90% コンフルエントになる程度がちょうどよい)。35 mm dish の場合、培地量は 2 mL。
- 3) 翌日、新しい培地に交換してから、PEI によりレポーター遺伝子をトランスフェクションする。マイクロチューブに DMEM 培地 (何も添加していないもの) 100 μ L を入れ、PEI 4 μ L を添加してピペッティングする。レポーターのプラスミド DNA 1 μ g を添加して、指先でマイクロチューブをはじいてよく混和し、室温で 15 分以上 (数時間まで) 放置する。
- 4) マイクロピペットで測定用の細胞に添加して、1 晩培養する。
- 5) 下記プロトコール 2 に従って、発光リズムの計測を行う。
- 6) この実験系を利用したデータ例を図 2 に示す。

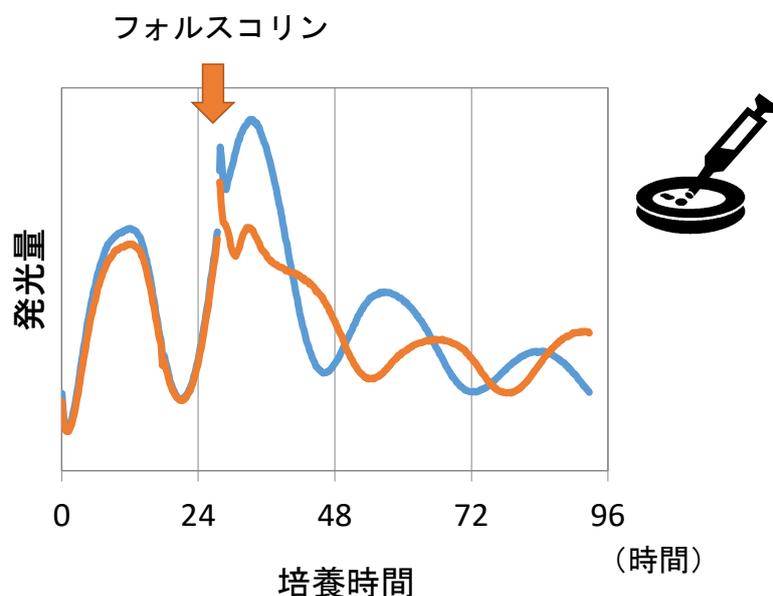


図-2 概日リズムレポーターの一過的発現系

Bmal1-luc を発現させた NIH3T3 細胞を 50% ウマ血清刺激 (2 時間) でリズム同調させた後、無血清培地で培養し、28 時間のポイント (矢印) で DMSO に溶解したフォルスコリン (終濃度 $10 \mu\text{M}$) もしくは DMSO のみを培地に添加。フォルスコリンの添加により、リズムの位相が 5 時間程度後退しているのがわかる。

2. 概日発光リズムの測定と試験成分による効果の検討
 - 1) 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。
 - 2) 0.1 mM ルシフェリンを添加した DMEM 培地 (無血清) 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) にセットし、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養する。1 枚の dish あたり 1 分間の発光を計測し、10 分毎に 1 周して同じ dish の発光を計測する。
 - 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。
 - 4) 数日間測定し、コントロールに対して、リズム位相や周期長の変化を見る。

3. 概日リズムレポーターの安定発現細胞株の作製
 - 1) プロトコル 1 の 1)~4) の手順で細胞にレポーター遺伝子を導入する。
 - 2) 導入翌日、細胞を 100 mm dish に継代する。
 - 3) その翌日、導入したプラスミドに合わせた選択薬剤 (pGL4.22 vector を使用した場合は Puromycin) を添加する。薬剤の添加濃度は、自分が利用している細胞を十分に死滅させるが高すぎない濃度を事前に検討しておく。目安としては、Puromycin の場合 $1\sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度。
 - 4) 2~3 日に一度、選択薬剤を含む新しい培地に交換しながら培養する。Puromycin の場合、2~3 日で細胞が死に始め、1 週間ほどで大部分の細胞が死ぬ (が、導

- 入遺伝子がゲノムに入り込み、薬剤耐性遺伝子を発現する細胞が生き残る)。
- 5) さらに1~2週間ほど培養を続けると、生き残った細胞がコロニーとして成長してくるので、数百個以上の細胞に増加したところで、コロニーを単離する。
 - 6) 培地を吸い取ってPBSで一度洗浄する。PBSを吸い取った後、クローニングリングにシリコングリースを付け、コロニーがすっぽり入るように置く(軽く押さえつける)。クローニングカップ中にトリプシン-EDTA溶液 100 μ L程度を入れ、数分放置する。
 - 7) 顕微鏡で観察し、クローニングカップ内の細胞が剥がれてきたら、血清入りの培地を100 μ L程度を入れ、マイクロピペットで軽くピペッティングして細胞を懸濁させ、24 well plateに移す。
 - 8) 選択薬剤入りの培地で数日間培養し、ウェルにいっぱいになったら、適宜、6 well プレート、100 mm dishへと継代して増やす。
 - 9) 細胞が十分に増えたら、CELLBANKER 1plusなどで凍結ストックを作製する。一部を継代し、プロトコル2に従って発光リズムを確認し、1週間程度の発光リズムが検出できれば、以後、これを安定発現細胞株として利用する。Per2-luc レポーターを安定発現するU2OS細胞にカフェインを添加し、細胞周期伸長作用を見た実験例を図3に示す⁴⁾。

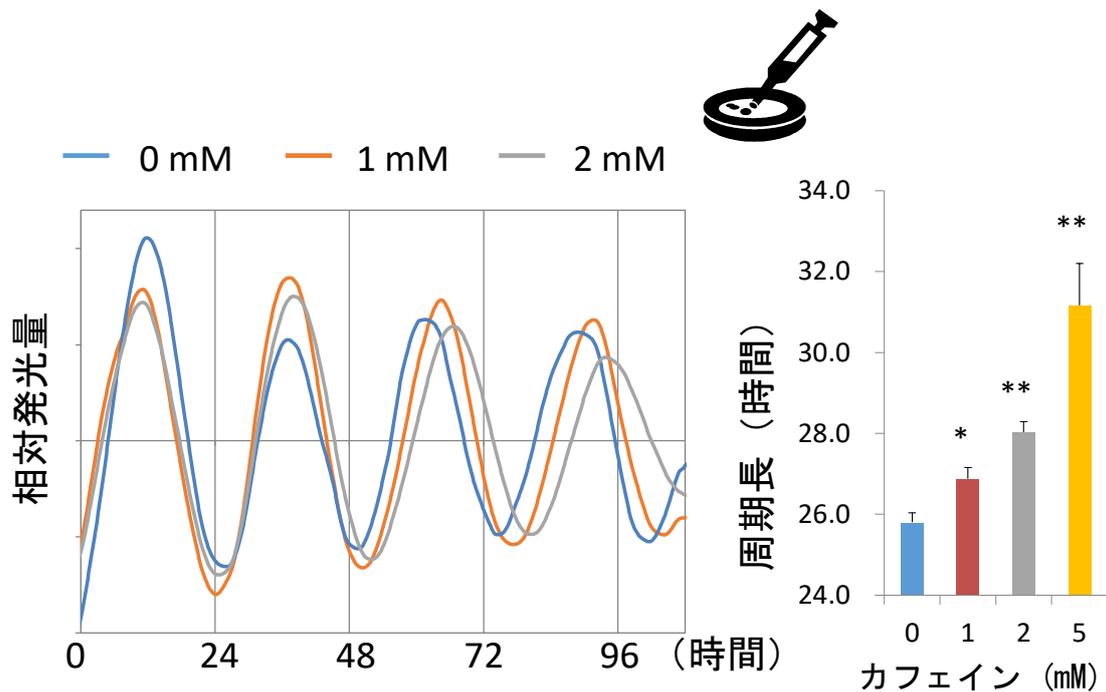


図-3 hPer2-luc レポーターを安定発現する U2OS 細胞を利用したカフェインによる概日リズム周期長延長作用の実験データ例

50% ウマ血清刺激 (2 時間) でリズム同調させた後、カフェイン (終濃度 1-5 mM) と B27 サプリメントを添加した無血清培地で培養。カフェインの添加濃度依存的に、細胞周期長が伸長しているのがわかる。

4. 概日リズムレポーター導入マウスの組織培養を利用した解析

ジャクソンラボラトリーから、PER2 タンパク質の代わりに、PER2 とルシフェラーゼの融合タンパク質 (PER2::LUCIFERASE) を発現するように Per2 遺伝子を置き換えたノックインマウス⁵⁾が売られている (B6.129S6-Per2tm1Jt/J; 以下 PER2::LUC マウスと記述)。日本チャールスリバーを介して入手が可能⁶⁾。この動物の組織片を培養することで、上述の培養細胞と同様の試験を実施することが可能である。

- 1) DMEM 培地にペニシリン-ストレプトマイシン (終濃度 1x)、B27 (終濃度 1x)、ルシフェリン (終濃度 0.1 mM) を添加し、必要量の培地を準備する (35 mm dish 1 枚につき 1 mL)。
- 2) PER2::LUC マウスを頸椎脱臼させ (各実験施設の動物実験実施手順に従って行う)、開腹し、臓器 (ここでは、肝臓) を摘出し、氷冷したハンクス溶液 (約 10 mL) に浸し、細胞培養室へ運ぶ。
- 3) 肝臓に血液が付着している場合は、新しいハンクス溶液へ移す。
- 4) 綺麗なハンクス溶液中で、よく切れるハサミを用いて、肝臓の端を三日月型に切り落とす (幅 1 mm、長さ 5 mm 程度)。
- 5) 肝臓片をマイクロスパーテルですくい、1 mL の培地が入った 35 mm dish に移す。
- 6) Kronos にセットし、培養しながら発光リズムを観察する。
- 7) 適当なタイミングで、Kronos を一時停止し、試験試料を培地に添加し、リズムの変化を観察する。白色脂肪の培養片にインスリンを添加した実験例を図 4 に示す。

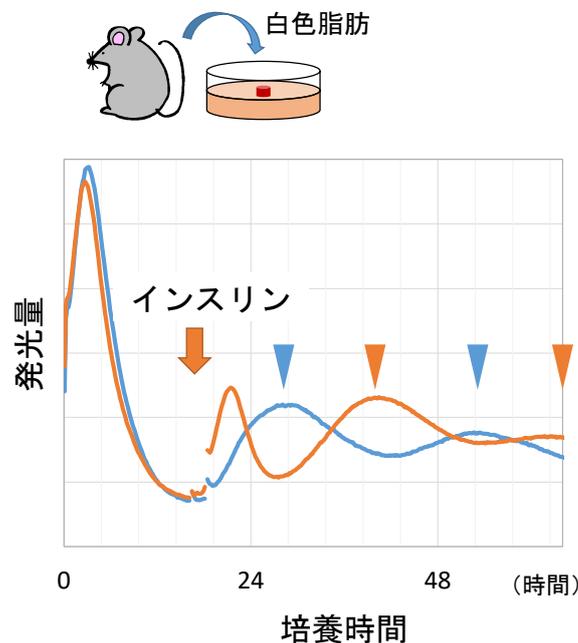


図-4 PER2::LUC マウスの白色脂肪片を培養し、インスリン添加による位相変化を見た実験データ例

培養開始後 18 時間付近で添加したインスリン (50 nM) により、位相が反転しているのがわかる。

【プロトコールのポイント・注意点】

1. 概日リズムレポーターの一過的導入
 - 1) 遺伝子導入試薬として、Lipofectamine 2000 (ThermoFisher)、ScreenFect A (和光純薬)、FuGENE 6 (Promega) など問題なく使用できることから、使い慣れたものを利用しても良い。
 - 2) 通常、3~4周期の発光リズムが観察できるが、それ以上は困難である。位相変化を見る場合はレポーターの一過的発現系でも問題ないが、周期長変化を解析したい場合は、安定発現系を利用することを勧める。

2. 概日発光リズムの測定と試験成分による効果の検討
 - 1) 同調因子として、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、100 nM Dexamethasone、10 μ M フォルスコリンなど、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) 無血清培地で細胞が死んでしまう場合は、実験に影響がない範囲で10%までのFBSを添加するか、B27 supplement (ThermoFisher)などを添加する。
 - 3) 5% CO₂を供給できない測定装置を利用するときは、培地のNaHCO₃濃度を下げ (粉末培地はNaHCO₃を後から添加するので便利; ニチレイバイオサイエンス、56499C-10Lなど)、大気圧下でpHが中性付近にくるように調節する。また、終濃度10-25 mM HEPES (Sigma, H0887)を添加すると良い。
 - 4) 発光装置内で高湿度を保てない場合は、培養中に培地が蒸散してしまわないように培養ディッシュの周りをパラフィルムで覆う。
 - 5) 試験成分の添加は、リズムの位相が異なる何点かで試す。添加後、発光が大幅に低下している場合は、細胞が死んでいる可能性やルシフェラーゼ活性に影響を与えている可能性があるので注意する。添加するタイミングにより、位相の前進作用、後退作用が変わるものが多い (位相反応曲線を描くと良くわかる)。つまり運が悪いとその中間 (不応期) 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。
 - 6) 周期長を解析する際は、培養開始時点から試験成分を添加しておき、12~36時間に現れるピークと、その次、さらに次のピークまでの時間を計測する。

3. 概日リズムレポーターの安定発現細胞株の作製
通常は、培地に選択薬剤を添加しなくても、安定発現を維持できる場合が多いが、培養しているうちに発光が弱くなってしまう場合は、選択薬剤を添加して、レポーターを高発現している細胞集団を選抜する。

4. 概日リズムレポーター導入マウスの組織培養を利用した解析
 - 1) PER2::LUCマウスは遺伝子組み換えマウスであり、入手する前に、それぞれの研究機関で必要な手続きをとる。
 - 2) 肝臓以外では、肺、白色脂肪などが比較的容易に概日発光リズムを検出できる。基本的には、メスやハサミで1~2 mm四方の小片に裁断して培養する。
 - 3) 35 mm dishにセルカルチャーインサート (ミリセル; MerckMillipore, PIHP03050)を入れて、その上で培養する方法の方が上手くいく場合もある。

【おわりに】

最近、体内時計とエネルギー代謝との深い関わりが明らかになってきている。体内時計を整えることで、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ものと考えられる。夜食を減らし、朝食をしっかり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も、どの時間帯に摂取するかで、その効果が大きく変わることが予想される。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) Rhythmic SAF-A binding underlies circadian transcription of the Bmal1 gene. Onishi Y, Hanai S, Ohno T, Hara Y, Ishida N. *Mol Cell Biol.* 28(10):3477-88 (2008)
- 2) Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals. Yamazaki S, Takahashi JS. *Methods Enzymol.* 393:288-301 (2005)
- 3) A dual-color luciferase assay system reveals circadian resetting of cultured fibroblasts by co-cultured adrenal glands. Noguchi T, Ikeda M, Ohmiya Y, Nakajima Y. *PLoS One.* 7(5):e37093 (2012)
- 4) Caffeine lengthens circadian rhythms in mice. Oike H, Kobori M, Suzuki T, Ishida N. *Biochem Biophys Res Commun.* 8;410(3):654-8. (2011)
- 5) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. Yoo SH1, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepkha SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(15):5339-46 (2004)
- 6) <http://www.crj.co.jp/product/import02>