

初期胚発生における時計遺伝子の多型と Bmal1 遺伝子導入マウスを用いた発現解析

山下司朗
家畜改良学増殖学

(目的)

地球上に生息するほぼ全ての生物は約 24 時間の概日リズムで生理活性や行動を行っている。このリズムは時計遺伝子により制御されており、Clock、Bmal1、Per および Cry などの時計遺伝子が知られている。時計遺伝子は様々な組織で 24 時間の周期を持つことが、発現様式の解析により明らかにされている。しかし、初期胚における時計遺伝子の研究は、ほとんど行われていない。AKR/N 系統由来の初期胚は、1 細胞期から体外培養すると他の系統由来のものに比べて発生速度が遅く、この発生遅延には細胞周期が関与している可能性が考えられた。また、細胞周期関連遺伝子のプロモーター領域には、時計遺伝子により制御を受ける特定配列 E-box があることが報告されている。そこで、本研究では、マウス胚発生遅延に対する時計遺伝子の多型の関与、および初期胚発生における時計遺伝子 Bmal1 の発現様式を調べることを目的とした。

(方法)

胚発生速度が遅い系統に AKR/N マウスを、胚発生速度が速い系統に C57BL/6 マウスを用いた。それぞれのマウスから抽出した total RNA およびゲノム DNA を用いて、時計遺伝子(Bmal1、Cry1、Clock) cDNA あるいは細胞周期関連遺伝子(Wee1A、Wee1B、c-Myc、Cyclin D1)プロモーター領域をクローニングし、多型解析を行った。また、プロモーター活性は、時計遺伝子 cDNA を発現ベクターに、細胞周期関連遺伝子プロモーターをレポーターベクターに挿入し、マウス 3T3 細胞に遺伝子導入後、ルシフェラーゼ活性の測定を行うことによって求めた。

Bmal1 プロモーターとルシフェラーゼ連結遺伝子導入マウスから受精卵を回収し、D-ルシフェリン添加培地にて体外培養を行い、ルシフェラーゼ活性を指標にプロモーター活性を測定した。

(結果)

時計遺伝子 Bmal1、Cry1、Clock cDNA および細胞周期関連遺伝子 Wee1A、Wee1B、c-Myc プロモーターにおいて、AKR/N と C57BL/6 マウス間で塩基置換は検出されなかった。唯一 Cyclin D1 プロモーターにおいて、1 塩基置換および 4 塩基欠損が検出された。プロモーター活性を測定した結果、Cyclin D1 プロモーターは時計遺伝子に対する応答性は検出されたが、系統間で差は認められなかった。

Bmal1 遺伝子導入マウスを用いて初期胚での Bmal1 プロモーター活性の変化を調べた結果から 2.5 日胚まで高い活性を示したが、3.5 日胚において低い活性を示した。また、着床後の胚でのプロモーター活性は上昇する傾向を示した。しかし、初期胚発生においてプロモーター活性に周期的な変化は認められなかった。

(結論)

今回、調べた時計遺伝子および細胞周期関連遺伝子に AKR/N 初期胚発生遅延に関与する知見は得られなかった。また、初期胚における Bmal1 の発現は、排卵後 2.5 日胚まで高く、3.5 日胚において減少し、着床後また発現が上昇することが示された。しかし、初期胚発生過程を通して周期性が認められなかったため、初期胚での Bmal1 の発現は体細胞とは異なる制御を受けていることが示唆された。