

ラット器官培養外皮における遺伝子発現リズム

応用生物科学専攻 食資源科学講座 副生物科学 長野恵莉子

1. 目的

生物の行動や生理現象の中には内因性の約24時間の周期を持つものがあり, それらは概日リズムと呼ばれ, 周期的な時計遺伝子の発現により与えられている。哺乳動物では体内時計の中核である視交叉上核 (SCN) によって制御されており, 全身の時計 (末梢時計) はSCNに同調している。培養細胞も時計遺伝子を発現しているが, 中枢時計の制御を受けないため, 細胞集団としては脱同調しているが, このような細胞集団にデキサメタゾン (Dex) 等で処理をすることで同調化が可能である。本研究では, 生体と培養細胞の中間形態である器官培養外皮における時計遺伝子の発現リズムとDex処理の影響を調べるとともに, 外皮の主要構成タンパク質の遺伝子発現挙動と毛周期の時期による違いも検討した。

2. 方法

毛周期が休止期から活性期への移行期 (4週齢) と活性期 (5週齢) のWistar系雄ラットから外皮を採取し直径2 mmに打ち抜き、William's E培地で器官培養し、培養開始から60時間後にDex処理 (一過性添加) を行った。経時的に外皮サンプルを回収し、凍結切片を作成すると共に、RNAを抽出し、逆転写反応後、real-time PCRにより、時計遺伝子と表皮および毛のマーカーとしてケラチン遺伝子、真皮のマーカーとしてコラーゲン遺伝子の相対発現量を解析した。

3. 結果と考察

凍結切片の観察から培養2日目までヘマトキシリンによる核染色がなされていたが、培養時間の経過とともに染色が不明瞭となり細胞死が進んでいった。培養48時間後まで4週齢, 5週齢ともに*Per2*と*Bmal1*の遺伝子発現に逆位相のパターンが見られ生体内と同様のリズムが維持されていた。また両週齢とも, Dex処理後, 培養細胞と同様に*Per2*の一過性発現増大が見られたが, *Per2*と*Bmal1*の逆位相発現や24時間周期は見られなかった。毛の*Hair Keratin1*, 表皮有棘層の*Keratin10*, 真皮の*Col1a1*と*Col3a1*の発現は培養時間の経過とともに発現量が低下しDex処理後の変化も小さかったが, 表皮基底層の*Keratin5*と基底膜の*Col4a1*の発現パターンは大きな変化が見られた。ケラチン遺伝子とコラーゲン遺伝子の発現には24時間ではないものの周期性が認められるものもあった。外皮のうち表皮基底層に存在する細胞で発現する遺伝子は他よりも長く生体内と同様の発現パターンを維持しており, 外皮の維持には基底層が重要でありその細胞の生存性が高いことが示唆された。

4. まとめ

器官培養外皮における時計遺伝子発現リズムは培養48時間後まで維持された。またDex刺激に反応するが, 周期性を再誘導することはできなかった。外皮全体としての時計機構は維持できなかったが, ケラチン遺伝子とコラーゲン遺伝子の発現から, 組織ごとには時計機構が働いている可能性が示唆された。