

研究成果報告書

研究テーマ (和文)	人工振動子と内在振動子の共役による複雑な遺伝子発現制御及びその応用		
研究テーマ (英文)	The complicated gene expression and its application by coupling of artificial oscillator and endogenous oscillator.		
研究期間	2018 年 ~ 2022 年	研究機関名 関西医科大学	
研究代表者	氏名	(漢字)	岡野(今井) 圭子
		(カタカナ)	オカノ(イマイ) ケイコ
		(英文)	Keiko Imai
	所属機関・職名	関西医科大学 生物学教室 講師	
共同研究者 (1名をこえる場合は、別紙追加用紙へ)	氏名	(漢字)	松浦 徹
		(カタカナ)	マツウラ トオル
		(英文)	Toru Matsu-ura
	所属機関・職名	関西医科大学	

概要 (600字~800字程度にまとめてください。)

我々は哺乳類細胞で働く人工振動子を作製するために、シアノバクテリアで概日周期に働く KaiA, KaiB, KaiC の3つの遺伝子を利用した。ポリシストロニックに3つの Kai タンパク質を発現させるため、3つの Kai 遺伝子の間に内部リボソーム進入配列 (IRES)、もしくは自己切断ペプチド (2A: P2A, T2A) 配列を挟み、レンチウイルスベクターに組み込んだ。これら2つの人工振動子レンチウイルスベクターを用いてヒト胎児腎細胞 293 (Hek293) に感染させ、安定発現細胞株を樹立した。

一般に培養細胞では概日周期などの振動子は各細胞を同期させないと検出することが難しい。まず我々は哺乳類細胞で概日周期を同期させる血清ショック (2時間の50%血清処理) と精製 Kai タンパク質を同期させる低温ショック (4°Cで4時間) を行った。3つの Kai タンパク質はシアノバクテリア内では周期的に会合し、KaiC タンパク質が周期的にリン酸化されることが知られるが、血清ショック、低温ショック共に KaiC タンパク質の周期的リン酸化を引き起こすに至らなかった。そこで我々は安定発現細胞にさらに KaiA を強制発現させる KaiA ショックと、15°Cで4日間の低温ショックの試験を行った。その結果どちらの処理においても、24時間周期での KaiC タンパク質の量、リン酸化増減を検出した。リン酸化状態での KaiC タンパク質の哺乳類細胞内での分解速度に違いが生じた可能性が考えられる。

このように我々は哺乳類細胞に新しい遺伝子ネットワークを導入することにより、24時間周期を持つ人工振動子を確立し、また振動子のリセットを KaiA 量コントロールにより達成できることを明らかにした。人工振動子は周期的遺伝子発現制御などに有用と考えられる。今後、人工振動子と内在時計を共役させることでリズムの強化やより複雑な遺伝子発現プログラムの作成に期待できる。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）						
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ページ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ページ	

英文抄録（100語～200語程度にまとめてください。）

Rhythmic gene expression is important for organisms to adjust their physiological functions to the Earth's rotation. Thus, synthetic oscillators with gene regulatory feedback circuits have been established to mimic, understand, and take advantage of natural oscillators. However, these oscillators have limited in shorter oscillatory frequency than the natural daily rhythm. We used KaiA, KaiB, and KaiC proteins from Cyanobacteria to develop an artificial 24 hr rhythm oscillator in mammalian cells. The circadian clock in Cyanobacteria is regulated by the three Kai proteins, and the phosphorylation of KaiC protein has 24 hr rhythms. We developed a stable cell line of the three Kai proteins in Hek293 cells to establish an artificial gene circuit. The cells were transiently transfected with KaiA protein or incubated in 15 °C for 4 days to reset the artificial circadian oscillator. We find 24 hr rhythms of KaiC phosphorylations and total KaiC amounts after these treatments. Our oscillator can be useful to the treatment of circadian dysfunctions and broad aspects of artificial gene regulations.

共同研究者	氏名	(漢字)		
		(カタカナ)		
		(英文)		
	所属機関・職名			
	氏名	(漢字)		
		(カタカナ)		
		(英文)		
	所属機関・職名			
	氏名	(漢字)		
		(カタカナ)		
		(英文)		
	所属機関・職名			
	氏名	(漢字)		
		(カタカナ)		
		(英文)		
所属機関・職名				
氏名	(漢字)			
	(カタカナ)			
	(英文)			
所属機関・職名				
氏名	(漢字)			
	(カタカナ)			
	(英文)			
所属機関・職名				
氏名	(漢字)			
	(カタカナ)			
	(英文)			
所属機関・職名				
氏名	(漢字)			
	(カタカナ)			
	(英文)			
所属機関・職名				