

平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな		ふかだ よしたか				所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院理学系研究科・教授	
研究代表者氏名		深田 吉孝							
研究課題名	和文	分子・細胞・個体レベルにおける動物の光環境応答とサーカディアンリズム							
	英文	Molecular, cellular and <i>in vivo</i> analyses of photoresponses and circadian rhythms in animals							
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計		
16年度以降は内約額 金額単位：千円		20,400	16,800	16,800	15,900	16,200	86,100		
研究組織（研究代表者及び研究分担者）									
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
深田 吉孝		東京大学・大学院理学系研究科・教授		生理生化学		研究統括			
岡野 俊行		東京大学・大学院理学系研究科・講師		生化学・分子生物学		概日リズム発振系と光入力系の生化学的・分子生物学的解析			
広田 毅		東京大学・大学院理学系研究科・研究拠点形成特任教員（常勤形態）		細胞生物化学		中枢および末梢の概日時計機能の比較解析			
和田 恭高		東京大学・大学院理学系研究科・リサーチフェロー		神経生理学		脳内光応答分子の生理生化学的解析			
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）									
<p>生物時計は、地球の自転と公転に起因する光環境の周期的変化から生まれた基本的な生命機能である。『生物がいかにして時間を計っているか』という時計発振の分子メカニズムに対するアプローチは、脳神経科学の研究分野における重要課題の一つである。本研究においては、最近明らかになってきた概日時計の発振分子モデル『時計遺伝子の転写・翻訳に基づく負のフィードバックループ』の上に立ち、ニワトリ松果体の時計細胞における計時メカニズムを遺伝子・蛋白質レベルで深く掘り下げた分子解析を行う。特に、上述のフィードバックループが約 24 時間周期のリズムを生み出すには、負の制御因子の産生から機能発現に至る過程に「時間の遅延」が要求され、この過程には制御因子の核移行や分解などの翻訳後のプロセスが重要であると考えられている。そこで本研究では、時計蛋白質のリン酸化や分解といったプロセスに焦点を絞り、蛋白質間あるいは蛋白質と DNA の相互作用の制御機構の実体を明らかにしたい。このような解析においては、時計遺伝子を培養細胞などに強制発現させて性状を調べる、といった従来型的手法には限界があり、今後は時計細胞そのものにおける時計因子の活性・性状を追跡することが必要不可欠である。この意味においてニワトリ松果体を用いた本研究は、他の実験系では成し得ない特徴を備えている。すなわち、松果体は脳内の独立した器官であり、単離が容易で大量の組織を得ることができる上に、培養が可能である。本研究においては、特に蛋白質レベルの解析に重点を置くので、大量の試料調製が可能な松果体は格好の実験材料といえる。このようなニワトリ松果体を用いた分子解析と共に、ゼブラフィッシュのトランスジェニック個体を用いた時計遺伝子の生理機能解析を行う。これまでに、ゼブラフィッシュ松果体に特異的に遺伝子発現を誘導できるプロモータを単離したので、これを用いて、私共が新たに見出した時計関連遺伝子の個体レベルでの生理的役割を明らかにしたい。本研究は、これまでの missing link である時計蛋白質の機能実体と発振系の連関を明らかにしようとするものであり、今後の時計研究へのブレークスルーをもたらすと期待される。</p>									

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

(1) 松果体の光入力系 ニワトリ松果体の光受容分子ピノプシンの生理機能を解析した結果、G 蛋白質のうち網膜桿体型トランスデュシン(Gt1)ならびに G11 がピノプシンと共役し得ること、さらに G11 を介する情報伝達経路が概日時計の位相シフトを導くことを見出した(論文 4)。一方、ピノプシン遺伝子の転写は光刺激に応答して活性化することを見出し、この光依存的転写調節に関わる遺伝子配列(光応答エレメント)を同定するため、ピノプシン遺伝子のプロモータの解析を行った。その結果、動物遺伝子としては初めて、光応答に必須の 18 塩基からなる光応答エレメント(LRE)を同定した。ゲルシフト解析の結果、この光応答エレメントに結合する因子は、肝臓などの種々の臓器に発現する転写抑制因子であることがわかった(論文 2)。

(2) マウスの視交叉上核(SCN)における MAPK のリン酸化リズム 私共は、ニワトリ松果体やカエル網膜などの時計組織において、MAP キナーゼ(MAPK)のリン酸化に伴う活性化が夜にピークを持つ概日リズムを示すことを見出していた。ところが、マウスの時計中枢である SCN における MAPK のリン酸化リズムは昼にピークを持つと報告され、見かけ上、動物(時計組織)によって MAPK の活性化リズムの位相が異なる可能性が考えられていた。そこで私共は、マウス SCN における MAPK のリン酸化(活性化)レベルの日内変動を精査した。その結果、SCN の背内側部においては明け方に一過的なピークを示し、SCN 中心部においては夜間に長時間にわたる活性化が観察された。一方、主観的にマウスに光刺激を与えると、MAPK は SCN の腹側で一過的にリン酸化されたが、SCN 中心部においてリン酸化されていた MAPK は逆に脱リン酸化された。このように、SCN 中心部の MAPK の挙動はニワトリ松果体時計細胞における挙動と酷似しており、MAPK の光依存的な不活性化は時計機構において普遍的な役割を果たす可能性が示唆された(論文 10)。

(3) 時計発振系への MAPK 入力点の解析 時計発振系における MAPK の標的分子を探索した結果、時計蛋白質 BMAL1 が MAPK によってリン酸化されることを見出した。さらに、BMAL1 の特定のアミノ酸残基(Thr534)が MAPK によってリン酸化されると、BMAL1 の転写促進活性が低下することを明らかにした(論文 1)。このことから、MAPK は時計蛋白質のリン酸化を介して時計遺伝子の転写を調節していると考えられた。一方、MAPK カスケードの上流の制御因子候補として、SCOP 蛋白質の機能解析を行った。SCOP は、ラット SCN において mRNA レベルが顕著なリズムを示す遺伝子として阪大の永井らのグループによって単離された分子で、蛋白質レベルにおいても SCN において顕著な日周リズムを示す。機能解析の結果、SCOP はラットにおいて K-Ras の活性化を抑制することが判明した。さらに、SCOP を培養細胞において過剰発現させると、刺激受容に伴う MAPK の活性化が部分的に抑制されることを見出した(論文 9)。これらの結果と、ニワトリ松果体において MAPK と上流の Ras、Raf1 および MEK の活性は互いに同じ位相で日周変動することを考え併せると、SCOP は時計細胞における MAPK カスケードの発振を Ras の上流において制御する分子である可能性が考えられる。

(4) p38 キナーゼによる時計発振の調節 ニワトリ松果体の時計細胞に発現している p38 キナーゼは、一日を通して一定の活性を示すことを見出した。p38 の特異的阻害剤を培養松果体細胞に連続投与するとメラトニン分泌リズムの周期が顕著に延長し、阻害剤をパルス投与すると昼の時間帯にのみリズム位相が後退した。さらに、松果体細胞における p38 の標的分子として MAPKAPK2 を見出した。以上の結果から、ニワトリ松果体において p38・MAPKAPK2 経路が昼に時計発振系に入力して位相前進をひき起こす可能性が示唆された(論文 11)。

(5) E4BP4 の機能解析とカゼインキナーゼ 1 ϵ によるリン酸化を介した調節 私共は、明期の延長に伴ってニワトリ松果体で mRNA 発現レベルが上昇する bZIP 型転写因子 E4BP4 を見出していた(PNAS, 2001)。そこで E4BP4 に対する抗体を作製し、松果体における蛋白質レベルの解析を行った結果、E4BP4 は時計遺伝子 *Per2* の転写抑制を介して明期延長に伴う時計位相後退を引き起こす重要因子であると考えられた。松果体において E4BP4 のリン酸化量は日周リズムを示すが、*in vitro* において E4BP4 はカゼインキナーゼ 1 ϵ (CK1 ϵ)によってリン酸化されることを発見した。さらに培養細胞において、E4BP4 は CK1 ϵ によってリン酸化された後、プロテアソームを介して分解されることを見出した。CK1 ϵ は、E4BP4 のリン酸化を介して E4BP4 レベルを減少させるだけでなく、E4BP4 と会合することによって核内の E4BP4 レベルを低下させる。この二つの作用によって、CK1 ϵ は E4BP4 による *Per2* の転写抑制を大きく低下させる。つまり、CK1 ϵ は E4BP4 の核内レベルを負に制御することによって E4BP4 の活動の時期を調節する重要因子であると考えられた(論文 18)。

(6) 末梢時計における新規のリズム誘導現象と関連遺伝子 末梢時計のモデル系として rat-1 細胞を用い、末梢時計のリセット機構を調べる過程で、rat-1 細胞をグルコース刺激すると時計遺伝子 *Per1* や *Bmal1* の発現量が緩やかに減少し、これに続いて概日リズムが誘導されることを見出した。そこで、このリズム誘導に伴って mRNA レベルが変動する「グルコース応答遺伝子」をマイクロアレイ解析により検索した。その結果、時計遺伝子の発現を調節する分子の候補として *Tieg1* と *Vdup1* 遺伝子を同定することができた(論文 5)。

(7) 松果体特異的な遺伝子発現 私共はこれまでに、ゼブラフィッシュ松果体に特異的に発現するロドプシン類似の光受容分子エクソロドプシンを同定した。その上流配列(約 1kb)に EGFP 遺伝子を連結した発現ベクターを構築し、これを用いてトランスジェニック個体を作製した結果、松果体特異的な EGFP の発現誘導が確認できた。さらに、エクソロドプシン遺伝子のプロモータ領域の欠失・変異実験を行い、松果体特異的な遺伝子発現を担う 12 塩基の新規配列を同定し、PIPE (Pineal Expression Promoting Element)と命名した(論文 6)。

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

(1) CK1 ϵ の時計発振系における役割の見直しと Priming キナーゼの重要性 ショウジョウバエやハムスターにおいて CK1 ϵ の変異が時計の発振異常を示すことが知られており、以前から CK1 ϵ の作用点である基質蛋白質が時計機能に重要な役割を担うと予想されていた。それゆえ、E4BP4 が CK1 ϵ の下流のエフェクター分子であるという発見（論文 18）は、E4BP4 の生理的な重要性を裏付けるばかりでなく、CK1 ϵ が時計発振に直接深く関わっていることを示した結果といえる。また、CK1 ϵ は時計蛋白質 PER をリン酸化してこれを分解に導く制御因子として、この研究分野では大きく注目を集めてきた。本研究において私共が得た実験結果（これまでの研究経過(5)）から、CK1 ϵ の標的は PER 蛋白質だけではなく、E4BP4 もリン酸化されて分解に導かれることが判明した。E4BP4 は *Per2* の転写抑制を介して明期延長に伴う時計位相後退に関与するので、明期延長で誘導された E4BP4 蛋白質の分解速度（寿命）は、次のサイクルの *Per2* の上昇のタイミングを決定する極めて重要な因子である。従来の研究において、CK1 ϵ の活性や発現レベルには日周変動が観察されておらず、多くの研究者は CK1 ϵ が時計細胞において恒常的な活性を保持しているのではないかと考えている。興味深いことに、E4BP4 のリン酸化反応を試験管内において再構成する過程で私共は、CK1 ϵ が作用するためには E4BP4 の特定のアミノ酸残基(Ser182)が何らかの酵素（priming キナーゼと仮称）によって予めリン酸化されている必要があるという事実を見出した。現在のところ、E4BP4 の分解という重要なプロセスの引き金をひく priming キナーゼの実体はわかっていないが、CK1 ϵ よりも深く時計発振の調節に関与している可能性があり、この分子実体の解明と性状解析は今後の飛躍的な研究の展開につながる可能性が高い。

(2) グルコースによる末梢時計の同調現象の発見 視交叉上核などの時計中枢に加え、肝臓などの末梢組織も時計機能を持ち、後者は末梢時計と呼ばれる。末梢時計は各組織における生理現象のリズム（例えば肝臓での代謝リズム）を制御しており、その同調機構を解明することは、基礎研究のみならず、応用面においても重要な知見をもたらすと考えられる。末梢時計の位相同調においては食餌のタイミングが重要な役割を果たすが、これまで同調因子の分子実体は不明であった。この理由として、摂餌によって消化器官の活性・栄養物の吸収・ホルモンレベルなど、様々な生理機能が複雑な影響を受けるため、動物の個体レベルでの同調因子の解析が困難であったことが挙げられる。これに対し、本研究において見出した「グルコースによる rat-1 培養細胞の時計同調現象」は、末梢時計の位相同調の鍵分子としてグルコースを同定したというだけにとどまらず、末梢時計の同調メカニズムの解明への突破口となるに違いない。時計遺伝子 *Per* の一過的な発現上昇を伴う中枢時計の光同調とは対照的に、グルコースによる同調においては *Per* の発現量がゆるやかに低下することが判明したため、これまでに知られていない新規の同調メカニズムが存在すると考えられる。私共はすでに、グルコース応答因子として TIEG1 と VDUP1 を見出し、その分子機能の解析を足がかりに、末梢時計の同調機構解明への道が一気に拓けると期待できる。当該研究分野においては最近、代謝と時計機構との関係が注目を集めており、グルコースによる同調経路の解明が大きなインパクトを与えることは間違いない。

(3) 松果体特異的な遺伝子発現を導く PIPE 含有プロモータの活用 松果体細胞における光情報伝達の分子メカニズムは、網膜視細胞における視興奮過程の分子メカニズムと多くの類似点を示す。しかしながら、両者の間には生理学的・生化学的に異なる部分も多く見られる。このように『似て非なる』2 種類の光受容細胞を比較解析することにより、松果体の特異性を生み出す転写調節機構や、その下流で誘導されて組織特異的な機能を果たす実働遺伝子群の実体に、非常に効果的にアプローチできると考えられる。本研究においては、私共が単離した PIPE 含有プロモータを利用し、松果体細胞に特異的に EGFP を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュ系統を樹立した。現在までに、このトランスジェニック系統を出発材料にして、蛍光セルソーティング(FACS)による松果体細胞の純粋集団を調整することに成功している。個々のゼブラフィッシュ松果体は非常に小さな器官であるが、多産で成長が早いというゼブラフィッシュの生物学的利点がこの欠点を十分にカバーする。均質な松果体細胞を調整するという技術はこれまでに例がなく、分子生物学・細胞生物学などの広い分野において新しい研究の展開を導くポテンシャルを秘めている。現在、私共はそうした展開の一つとして、上記と同様に FACS により調整した均質な網膜桿体細胞との間で発現遺伝子の示差的プロファイリングを行っている。網羅的な比較解析の結果、松果体に選択的に発現する多数の遺伝子を同定することができたが、その中には松果体細胞の分化や特異的な機能の維持に重要な役割を果たすと期待される複数の転写因子が含まれていた。私共が先に同定したシスエレメント PIPE との相互作用の解析を含め、これらの転写因子の機能解析を行うことによって、『時計中枢としての松果体』を形作る分子基盤の解明につながると期待される。広い意味では、脳の多様な機能形成に関わる分子機構にも言及できる可能性を秘めている。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

【英文原著論文・総説】

1. Sanada, K., Okano, T. & Fukada, Y. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J. Biol. Chem.*, 277, 267-271 (2002).
2. Takanaka, Y., Okano, T., Yamamoto, K. & Fukada, Y. A negative regulatory element required for light-dependent pinopsin gene expression. *J. Neurosci.*, 22, 4357-4363 (2002).
3. Doi, M., Nakajima, Y., Okano, T. & Fukada, Y. Light-dependent changes in the chick pineal temperature and the expression of *cHsp90α* gene: A potential contribution of *in vivo* temperature change to the photic-entrainment of the chick pineal circadian clock. *Zool. Sci.*, 19, 633-641 (2002).
4. Kasahara, T., Okano, T., Haga, T. & Fukada, Y. Opsin-G11-mediated signaling pathway for photic entrainment of the chicken pineal circadian clock. *J. Neurosci.*, 22, 7321-7325 (2002).
5. Hirota, T., Okano, T., Kokame, K., Shirotani-Ikejima, H., Miyata, T., & Fukada, Y. Glucose down-regulates *Per1* and *Per2* mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 277, 44244-44251 (2002).
6. Asaoka, Y., Mano, H., Kojima, D. & Fukada, Y. Pineal expression-promoting element (PIPE), a *cis*-acting element, directs pineal-specific gene expression in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 15456-15461 (2002).
7. Fukada, Y. & Okano, T. Circadian clock system in the pineal gland. *Mol. Neurobiol.*, 25, 19-30 (2002).
8. Shimizu, F., Sanada, K. & Fukada, Y. Purification and immunohistochemical analysis of calcium-binding proteins expressed in the chick pineal gland. *J. Pineal Res.*, 34, 208-216 (2003).
9. Shimizu, K., Okada, M., Nagai, K. & Fukada, Y. Suprachiasmatic nucleus circadian oscillatory protein, a novel binding partner of K-Ras in the membrane rafts, negatively regulates MAPK pathway. *J. Biol. Chem.*, 278, 14920-14925 (2003).
10. Nakaya, M., Sanada, K. & Fukada, Y. Spatial and temporal regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 494-501 (2003).
11. Hayashi, Y., Sanada, K., Hirota, T., Shimizu, F. & Fukada, Y. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates oscillation of chick pineal circadian clock. *J. Biol. Chem.*, 278, 25166-25171 (2003).
12. Haldar, C., Fukada, Y. & Araki, Y. Effects of gonadal steroids on pineal morphogenesis and cell differentiation of the embryonic quail studied under a cell culture condition. *Dev. Brain Res.*, 145, 71-79 (2003).
13. Fukada, Y. Molecular oscillation behind the clockface. *J. Biochem.*, 134, 773-775 (2003).
14. Okano, T. & Fukada, Y. Chicktacking circadian clock. *J. Biochem.*, 134, 791-797 (2003).
15. Hagiwara, K., Wada, A., Katadae, M., Ito, M., Ohya, Y., Casey, P. J. & Fukada, Y. Analysis of the molecular interaction of the farnesyl moiety of transducin through use of a photoreactive farnesyl analog. *Biochemistry* 43, 300-309 (2004).
16. Hashimoto, Y., Matsuda, T., Matsuura, Y., Haga, T. & Fukada, Y. Production of *N*-lauroylated G protein α -subunit in Sf9 insect cells: The type of *N*-acyl group of $G\alpha$ influences G protein-mediated signal transduction. *J. Biochem.*, 135, 319 - 329 (2004)
17. Hirota, T. & Fukada, Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zool. Sci.* (in press)
18. Doi, M., Okano, T., Yujnovsky, I., Sassone-Corsi, P. & Fukada, Y. Negative control of circadian clock regulator E4BP4 by casein kinase I ϵ -mediated phosphorylation. *Curr. Biol.* (in press)

【単行本】『時計遺伝子の分子生物学』(シュプリンガーフェアラーク東京)を岡村均と共編 (2004)

【日本語総説】

1. 深田吉孝、土居雅夫(2002)脳内光受容と体内時計の時刻調節.現代化学、No.370, pp.24-29,
2. 岡野俊行、深田吉孝(2002)体内時計の時刻を調節する遺伝子の発見.生物の科学 遺伝.Vol.56, No. 2, pp.26-28 .
3. 深田吉孝、原田裕子(2002)体内時計とメラトニン合成.現代医療、特集『体内時計と疾患～基礎と臨床』、Vol.34, No. 6, pp.35-40, 現代医療社.
4. 深田吉孝、浅岡洋一(2003)松果体の光受容と概日時計システム .脳と神経、特集『睡眠障害と体内時計』、Vol.55, No. 1, pp.13-24, 医学書院.
5. 深田吉孝、岡野俊行(2003)視覚異常症.図説 分子病態学 改訂3版、pp.378-384, 中外医学社.
6. 岡野俊行、深田吉孝(2004)時計遺伝子総論:脊椎動物.『時計遺伝子の分子生物学』(岡村均、深田吉孝 編) pp.41-48.
7. 小島大輔、深田吉孝(2004)概日光受容体とは何か.『時計遺伝子の分子生物学』(岡村均、深田吉孝 編) pp.111-118.

【学会発表】国際学会発表件数：計 26 件 (うち招待発表 6 件,口頭発表 7 件,ポスター発表 13 件)
国内学会発表件数：計 30 件 (うち口頭発表 17 件,ポスター発表 13 件)