

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

Molecular, cellular and *in vivo* analyses of photoresponses and circadian rhythms in animals

深田 吉孝 (Fukada Yoshitaka)
東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要

本研究課題においては、動物の光受容機能の分子的理解と、概日時計の発振と入力系の分子メカニズムの解明を目指して研究を行った。光感受性の脳内時計器官であるニワトリ松果体を研究対象の中心に据え、特に概日時計の分野で研究が遅れている蛋白質レベルでの解析に真正面から取り組み、網膜における視覚機能との比較解析を行なった。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

生物学／基礎生物学・動物生理・行動／動物生理・化学

1. 研究開始当初の背景・動機

- (1) 生物時計は、地球の光環境の周期的変化から生まれた基本的生命機能である。
- (2) 概日時計発振の分子モデルとして、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が明らかになってきた。
- (3) 24時間周期のリズムを生み出すには、制御蛋白質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。

2. 研究の目的

- (1) ニワトリ松果体・マウス視交叉上核・末梢組織・培養細胞の時計機構における計時メカニズムを遺伝子と蛋白質の両レベルで深く掘り下げた分子解析を行う。
- (2) 時計蛋白質のリン酸化や分解プロセスに焦点を絞り、蛋白質間や蛋白質とDNAの相互作用の制御機構の実体を明らかにする。
- (3) 光情報伝達の観点から時計の位相制御と視覚を比較し、光シグナリング分子の特性と生理機能の連関の基本的理解を目指す。
- (4) 遺伝子組換え動物を用い、時計遺伝子の機能、光シグナリング機構、松果体特異的な遺伝子発現制御機構を分子解剖する。

3. 研究の方法

- (1) 光感受性中枢時計であるニワトリ松果体の利点を生かし、概日時計の発振と光入力系における時計因子の機能解析を行った。
- (2) 細胞発光計測装置を用いた可視化技術や、遺伝子導入装置を用いた遺伝子ノックダウン・過剰発現により、培養細胞における時計発振と位相制御の分子解析を行った。
- (3) シグナリング分子の特性と個体の生理機能の連関を知るためマウスやゼブラフィッシュの発生工学を利用した解析を行った。

4. 研究の主な成果

- (1) 松果体の時計システムにおける光入力系と網膜における視覚系：ニワトリ松果体の光受容分子ピノプシンが2種類のG蛋白質 Gt1 ならびに G11 と共役し得ること、さらに G11 経路の活性化が概日時計の位相シフトを導くことを見出した。ピノプシン遺伝子の転写は光に応答して活性化されることを見出し、光応答に必須の18塩基の光応答エレメントを同定した。視細胞特異的なG蛋白質 (Gy1) のイソプレニル化修飾の鎖長が長くなる変異マウスを作製したところ、順応光照射に伴う Gy1 の視細胞外節から内節への細胞内移動が著しく抑制され、さらに、野生型マウスに比べて明順応が大幅に抑制されることを見出した。Gy1 のイソプレニル化修飾の鎖長は明順応という光感度調節に寄与すると考えられた。また、ゼブラフィッシュ視細胞の受容体キナーゼを同定し、錐体キナーゼ GRK7-1 が桿体キナーゼ GRK1A の数十倍も高いリン酸化活性を持つことを示した。桿体と錐体の応答特性の違いには両細胞に特異的な受容体キナーゼが重要な役割を果たすと考えられた。
- (2) 視交叉上核 (SCN) と松果体における MAP キナーゼ (MAPK) ファミリー：マウスの中枢時計 SCN の中心部における MAPK のリン酸化が夜にピークを持つ日内変動を示すことを見出した。この挙動はニワトリ松果体で見出したパターンと酷似し、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と考えられた。次に、時計発振系における MAPK の標的分子として BMAL1 および CRY 1 と 2

を見出した。各分子において MAPK がリン酸化するアミノ酸残基を同定し、そのリン酸化により転写の促進活性 (BMAL1) や抑制活性 (CRY) が減弱することを示した。また、CRY 2 はもう一つのキナーゼによって段階的にリン酸化され、プロテアソームで分解されること、さらにこの分解メカニズムは SCN など中枢時計にも共通することを明らかにした。一方、SCN において日周リズムを示す蛋白質 SCOP が K-Ras を負に制御することを見出した。SCOP は、時計細胞において日周リズムを示す MAPK カスケードの上流制御因子である可能性が示唆された。また、ニワトリ松果体に p38 キナーゼおよびその標的分子 MAPKAPK2 が存在し、この経路が昼に時計発振系に入力して位相前進を導く可能性を見出した。

(3) E4BP4 の機能解析とカゼインキナーゼ 1ε によるリン酸化を介した調節: ニワトリ松果体で時刻特異的に光誘導される転写因子 E4BP4 の蛋白質レベルでの解析を行ったところ、以下のことが明らかになった: 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。E4BP4 は CKIε によってリン酸化され、その後プロテアソームを介して分解される。CKIε はまた、E4BP4 と会合することによって核内の E4BP4 量を低下させる。これらの作用により、CKIε は E4BP4 による *Per2* の転写抑制を大きく低下させる。CKIε による E4BP4 のリン酸化には Ser182 が予めリン酸化されていることが必要であるので、Ser182 をリン酸化するプライミングキナーゼは、概日時計調節において極めて重要な因子と考えられる。

(4) 末梢時計における新規のリズムリセットメカニズム: 末梢時計のモデル細胞 Rat-1 をグルコース刺激すると概日時計がリセットされることを見出した。このリセットは *Per1* 遺伝子の誘導を伴わない新規のメカニズムを介すると推定された。グルコースによるリズム誘導と共に 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、時計遺伝子の発現制御因子の候補として *Tiegl* と *Vdup1* 遺伝子を同定した。

(5) 松果体特異的な遺伝子発現: ゼブラフィッシュ松果体に特異的に発現する光受容分子エクソロドプシン *Exo* の上流約 1kb の配列を単離した。これに EGFP 遺伝子を連結した発現ベクター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 の発現が確認された。さらに、*Exo* 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 PIPE を同定した。一方、PIPE 結合因子を明らかにし解析中である。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

- (1) これまで分子としての実体が謎であった末梢時計の食餌による位相シフトの鍵を握る分子としてグルコースを同定した。
- (2) 数種の時計蛋白質のリン酸化部位とその機能を明らかにし、さらに多段階リン酸化の重要性を時計分野で初めて示した。
- (3) 網膜と似て非なる松果体での特異的遺伝子発現メカニズムの解明に道を切拓いた。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) Wada, Y., Sugiyama, J., Okano, T. & **Fukada, Y.**: *J. Neurochem.*, 98, 824-837 (2006)
- 2) Hatori, M., Okano, T., Nakajima, Y., Doi, M. & **Fukada, Y.**: *J. Neurochem.*, 96, 1790-1800 (2006)
- 3) Kassai, H., Aiba, A., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., W. H. Xiong, K. W. Yau, Imai, H., Shichida, Y., Satomi, Y., Takao, T., Okano, T. & **Fukada, Y.**: *Neuron*, 47, 529-539 (2005)
- 4) Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T. & **Fukada, Y.**: *J. Biol. Chem.*, 280, 31714-31721 (2005)
- 5) Doi, M., Okano, T., Yujnovsky, I., Sassone-Corsi, P. & **Fukada, Y.**: *Curr. Biol.*, 14, 975-980 (2004).
- 6) Shimizu, K., Okada, M., Nagai, K. & **Fukada, Y.**: *J. Biol. Chem.*, 278, 14920-14925 (2003).
- 7) Nakaya, M., Sanada, K. & **Fukada, Y.**: *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 305, 494-501 (2003).
- 8) Hayashi, Y., Sanada, K., Hirota, T., Shimizu, F. & **Fukada, Y.**: *J. Biol. Chem.*, 278, 25166-25171 (2003).
- 9) Takanaka, Y., Okano, T., Yamamoto, K. & **Fukada, Y.**: *J. Neurosci.*, 22, 4357-4363 (2002).
- 10) Sanada, K., Okano, T. & **Fukada, Y.**: *J. Biol. Chem.*, 277, 267-271 (2002).
- 11) Kasahara, T., Okano, T., Haga, T. & **Fukada, Y.**: *J. Neurosci.*, 22, 7321-7325 (2002).
- 12) Hirota, T., Okano, T., Kokame, K., Shirogami-Ikejima, H., Miyata, T., & **Fukada, Y.**: *J. Biol. Chem.*, 277, 44244-44251 (2002)
- 13) Kasahara, T., Okano, T., Haga, T. & **Fukada, Y.**: *J. Neurosci.*, 22, 7321-7325 (2002).
- 14) Asaoka, Y., Mano, H., Kojima, D. & **Fukada, Y.**: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 15456-15461 (2002).

ホームページ:

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/>