

## 脳時計ニューロンにおける光シグナリングと 概日リズム制御の分子解析

### Molecular Analysis of Light-signaling and Circadian Rhythm in the Brain

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

本研究では、非常に短い時間スケールで空間情報を処理する「視覚」と、長い時間スケールで時刻情報を処理する「概日時計システム」を対照的な情報変換系と捉え、その光シグナリングを支える分子ダイナミズムと個体レベルでの作動原理の理解を目指す。また、光以外の因子による、いわゆる「非光」位相制御との比較解析を通して、概日時計の位相制御機構をより深く理解することを目指す。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：動物生理・化学

#### 1. 研究開始当初の背景

光受容系の発達した多くの生物は約一日周期で振動する概日時計を持ち、リズムの位相が光の制御を受けるという共通の特性を示す。これは、地球上の周期的な光サイクルの中で、光受容と概日リズムという機能が相関的に生物に獲得されたことを如実に物語っている。したがって、時計機能と光受容能の分子的な仕組みを比較解析することは、両者がどのように相互作用しながら動物に定着して進化したか、その根底の分子シナリオを理解することにつながる。

#### 2. 研究の目的

視覚における光受容能の理解を深めるために、松果体と網膜にそれぞれ存在する2種類の光受容ニューロンの特異性が、いかなる遺伝子ネットワークによって規定されているのかを明らかにする。さらに、光シグナルおよび非光シグナルによる概日時計の位相調節メカニズムを明らかにすることにより、対照的な光受容機構の類似点と相違点を浮き彫りにしたい。

#### 3. 研究の方法

one hybridスクリーニングおよび松果体と網膜の遺伝子発現プロファイリングにより、松果体光受容ニューロンの特異性を解明するとともに、グルコースなどの非光シグナルに応答する遺伝子の機能解析を通じて概日時計の位相同調メカニズムに迫る。

#### 4. これまでの成果

脊椎動物は網膜だけでなく、松果体などの脳組織においても光感受性を示す。我々は、松果体に発現するオプシン型光受容体ピノプシンを発見し、続いて脳深部や視細胞以外の網膜ニューロンに発現する種々のオプシン型分子を同定してきた。松果体の光受容ニューロンと網膜の視細胞は、形態学的・発生学的に多くの点において類似性を示す一方、両者の生理機能は大きく異なり、網膜視細胞が主として視覚を司り、松果体ニューロンは概日リズム形成と内分泌を担う。我々は、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 Exorhodopsin を同定し、*exorh*

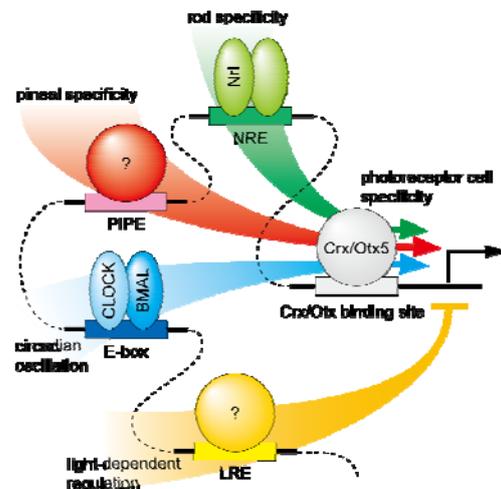


図1. 松果体と網膜の光受容細胞における遺伝子発現の制御ネットワーク

遺伝子のプロモータ解析から、松果体特異的な遺伝子発現を担うシス配列 PIPE を初めて同定した。本研究では、この成果をさらに発展させるため、one hybrid スクリーニングを行ない、PIPE に結合する転写因子を同定した。これとは別のアプローチとして我々は、松果体細胞と視細胞にそれぞれ特異的な遺伝子群のプロファイリングを行った。その結果、松果体特異的に発現する転写因子を同定し、この因子が松果体ニューロンの特異性の確立と維持に重要な役割を担っていることを証明した。

哺乳類の培養細胞は多様な刺激に応答して時計の位相がシフトする。本研究では、これまで謎に包まれていた「光以外の刺激」による位相シフトの分子基盤の解明を目指した。転写因子 TIEG1 はグルコース刺激に応答して mRNA レベルおよびタンパク質レベルが上昇し、*Bmal1* 遺伝子の転写を負に制御することを示した。さらに TIEG1 はグルコースによる同調機構だけでなく、自律的な時計発振機構においても重要な役割を担っていることを明らかにした [Hirota *et al.*, 2010]。この解析の過程で偶然、培地の pH 変化が時計の位相をリセットすることを見出した。最終的に、pH のアルカリ化が TGF- $\beta$ /ALK5/Smad シグナリングを介して、時計遺伝子 *Dec1* 遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。マウス腹腔内に TGF- $\beta$  を投与することにより観察された位相シフトは *Dec1* ノックアウトマウスにおいて完全に消失した。このように光以外の刺激による時計リセット機構の全貌解明は世界で初めての研究成果であり、生物時計の研究分野に大きなインパクトを与えた [Kon *et al.*, 2008]。

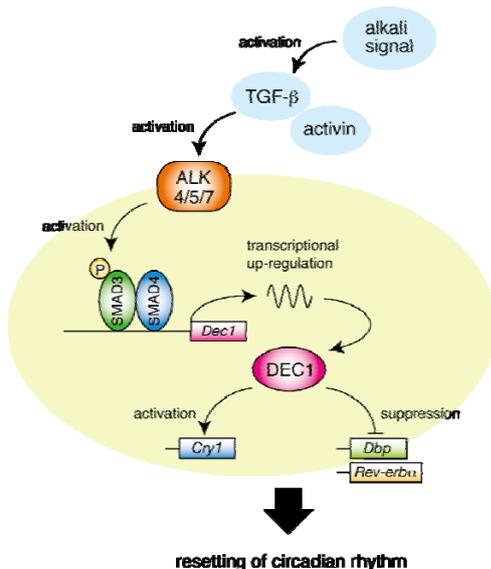


図2. TGF- $\beta$ による概日時計の位相リセット経路

## 5. 今後の計画

- (1) 概日時計の光位相制御について、より上流の光受容体からのシグナリングを分子レベルで解明する。
- (2) 光以外の刺激に対する位相シフトの解析を通して生物時計の心臓部である振動体の分子メカニズムをさらに深く理解する。
- (3) 網膜での光シグナリングにおいては、視興奮に必須な G タンパク質のファルネシ化が G タンパク質の細胞内移動を通して網膜の感度調節に寄与することを示してきた。本研究においては、受容体キナーゼと G タンパク質に焦点を絞り、これらの分子に変異を導入した個体の視機能を電気生理学的に解析し、網膜の光シグナリングの重要特性にこれらの分子がどのように寄与しているか、生理学と生化学の研究手法を織り交ぜて明らかにする。

## 6. これまでの発表論文等

- Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K. & Fukada, Y. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 1757-1768 (2010)
- Hirota, T., Kon, N., Itagaki, T., Hoshina, N., Okano, T. & Fukada, Y. *Genes Cells*, **15**, 111-121 (2010)
- Yoshitane, H., Takao, T., Satomi, Y., Du, N. H., Okano, T. & Fukada, Y. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 3675-3686 (2009)
- Sasaki, M., Yoshitane, H., Du, N. H., Okano, T. & Fukada, Y. *J. Biol. Chem.*, **284**, 25149-25159 (2009)
- Kon, N., Hirota, T., Kawamoto, T., Kato, Y., Tsubota, T. & Fukada, Y. *Nature Cell Biol.*, **10**, 1463-1469 (2008)
- Tamai, S., Sanada, K. & Fukada, Y. *PLoS One*, **3**, e3835 (2008)
- Kojima, D., Torii, M., Fukada, Y. & Dowling, J. E. *J. Neurochem.*, **104**, 1364-1371 (2008)
- Kojima, D., Dowling, J. E. & Fukada, Y. *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1011-1015 (2008)
- Katadae, M., Hagiwara, K., Wada, A., Ito, M., Umeda, M., Casey, P. J. & Fukada, Y. *Biochemistry*, **47**, 8424-8433 (2008)
- Asada, N., Sanada, K. & Fukada, Y. *J. Neurosci.*, **27**, 11769-11775 (2007)
- Tsuji, T., Hirota, T., Takemori, N., Komori, N., Yoshitane, H., Fukuda, M., Matsumoto, H. & Fukada, Y. *Proteomics*, **7**, 3500-3508 (2007)
- Shimizu, F. & Fukada, Y. *J. Neurochem.*, **103**, 1834-1842 (2007)
- Torii, M., Kojima, D., Okano, T., Nakamura, A., Terakita, A., Shichida, Y., Wada, A. & Fukada, Y. *FEBS Lett.*, **581**, 5327-5331 (2007)

ホームページ等

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