

研究課題別評価

1 研究課題名:光転写調節メカニズムと新規光センサー

2 研究者氏名:岡野 俊行

研究員:秋山 正志(平成 15 年 4 月～平成 18 年 3 月)

研究員:久保 葉子(平成 15 年 4 月～平成 18 年 3 月)

3 研究の狙い:

生命が地球上に誕生して以来数十億年にわたって、光は生物に影響を与え続けてきた。生物は、光のエネルギーを効率的に利用し、かつ紫外線等による傷害を避けるために、さまざまな光受容・光情報伝達システムを発達させている。本研究では、光が生物に与える影響を多面的に捉え、さらにそれを利用するための手がかりを得るために、光による遺伝子の制御メカニズムの解明と機能未知なる新規光センサーの探索を行った。これらの解析は、新たな光受容経路の解明という基礎的な目標と同時に、生体光センサーを利用した遺伝子の調節システムの開発に繋げるという狙いがある。

4 研究成果

上記の目標に沿いながら、具体的には鳥類および哺乳類の網膜・松果体・皮膚の光受容システムの研究を行った。以下に項目にわけて研究成果の概要を記す。

(1)松果体や網膜における光応答システムの解析

鳥類において松果体は光感受性の脳内器官であり、同時にサーカディアンリズムの中枢として機能する。したがって、松果体において光応答する遺伝子はおそらく、概日時計の光同調等に働くものと推定される。そこで、鳥類松果体に光を照射し、時刻依存的に転写が誘導される遺伝子を探索したところ、いくつかの遺伝子が光応答した。そのうち朝方および夕方に最も顕著な光誘導を受ける因子をそれぞれ1種類ずつ選んで解析した。朝方に光依存的に転写される遺伝子 *Lcg* は、中心体に発現する因子であり概日時計発振における中心体の関与が示唆された。一方、夕方に光誘導される *E4BP4* は転写抑制因子であり、時計遺伝子 *Per* の転写を抑制することが判った。タンパク質レベルにおいて *E4BP4* の挙動を調べたところ、*E4BP4* はカゼインキナーゼ $I\epsilon$ によってリン酸化されて不安定化すること等がわかった。以上のように本研究において、新規の光応答性の時計関連遺伝子の同定することができ、今後は、*Lcg* および *E4BP4* 遺伝子の光応答メカニズムのさらなる解析が重要である。これと並行して、哺乳類の網膜視細胞を研究対象として、視細胞の光感度の制御機構に関する研究も行った。具体的には、視覚に関わる GTP 結合タンパク質およびロドプシンキナーゼの研究を行い、視感度調節に果たす役割とその調節機構を明らかにした。

(2)ヒト皮膚細胞における光応答遺伝子の解析

ヒト皮膚は、紫外線に反応することは知られているが、可視光の作用は不明な点が多い。そこで本研究では、LED 光源を用いて青色ならびに近紫外光を培養したヒト皮膚細胞に照射し、マイクロアレイ解析および RT-PCR 法を用いて、光応答遺伝子を網羅的に解析した。その結果、青色および近紫外光によって、共通する一群の遺伝子が光誘導されることが判明した(図 1)。そのうち、最も顕著に光誘導される3種類の遺伝子 (Atf3, Gdf15, Hmox1) についてさらに、mRNA およびタンパク質の両面から詳細な解析を進めた。光

誘導のタイムコースおよび翻訳阻害剤を用いた実験の結果、3種類の遺伝子のうち Atf3 の転写誘導にはタンパク質合成は不要であったことから、光刺激はまず Atf3 遺伝子の転写を誘導し、その後 Hmox1 等の遺伝子を誘導すると考えられた。そこで次に、Hmox1 プロモータに対する Atf3 の効果を転写アッセイにより調べたところ、Atf3 は Hmox1 遺伝子の転写開始点付近の約 200 塩基対に作用して転写を促進する可能性が示唆された。このように、光刺激がヒトの皮膚に作用し得ること、さらに、その際の遺伝子カスケードの一端を明らかにすることができた。今後は、光刺激がどのような細胞内情報伝達経路を介して Atf3 遺伝子の転写を促進するのかが興味深い。

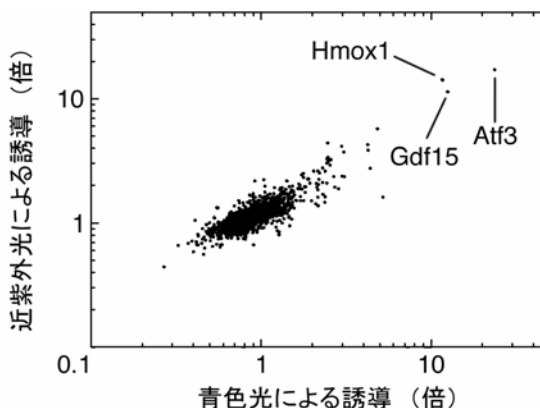


図 1. ヒト皮膚における遺伝子の光誘導
各点は各遺伝子に相当する。青色光・近紫外光のいずれによっても 10 倍以上の誘導を示す遺伝子が 3 種同定された。

(3)動物に存在する新規光センサー様分子の同定

近年、さまざまな生物の全ゲノムの遺伝子配列が解明された結果、機能未知の多くの遺伝子の存在が明らかとなった。これらの情報から、ニワトリには機能不明の新しいクリプトクローム分子(cCRY4と命名)が存在すると推定された。そこで、cCRY4 に関して(i)全 cDNA 配列の決定、(ii)mRNA 発現部位の同定、(iii)mRNA 発現の時間的変化の解析、(iv)抗体の作成とタンパク質量の変動解析、(v)タンパク質の組織局在、などの解析を行った。その結果、興味深いことに、光感受性組織である網膜、視床下部および松果体に cCRY4 が大量に発現していることが判明した(図 2)。さらに、その mRNA 量

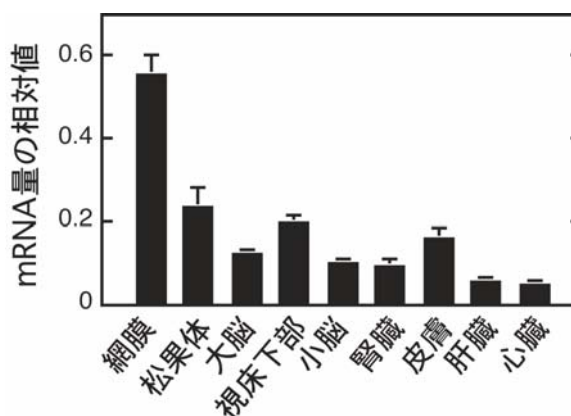


図 2. ニワトリ各組織における Cry4mRNA 発現
RT-PCR 法により mRNA レベルを測定し、Tbp の mRNA 発現に対する相対量として表した。Cry4 の mRNA は、網膜・松果体・視床下部といった光感受性の部位に多く発現している。

らびにタンパク質量は、光刺激に反応して増加することが判った。また、cCRY4 タンパク質の性状解析

の結果、細胞質部分に局在する水溶性のタンパク質であることも判明した。一次構造から類推すると、おそらく cCRY4 は青色光を受容する光センサーであると考えられるので、以上の結果を総合すると、動物の網膜や松果体には、これまでに知られていなかった新しい光情報伝達経路が存在すると思われる。今後は、cCRY4 から光情報を受け取る情報伝達タンパク質の同定、および cCRY4 の諸特性を活かした光スイッチへの応用が期待される。

5 自己評価

本研究の目標は大きく2点ある。1つめは、光による転写調節のメカニズムを明らかにすることであり(目標1)、2つめは、新しい光受容分子を発見することであった(目標2)。当初の計画では、目標1に関してはピノプシンをはじめとするニワトリ松果体における光応答遺伝子の転写機構を調べる予定であった。ところが、培養松果体細胞を用いた転写アッセイ系ならびに RNAi を利用した機能阻害実験系に問題が生じ、初年度に若干の方針変更が必要となった。細胞系を変えることが重要と考え、魚類表皮およびヒト真皮の培養細胞を試みたところ、ヒト真皮の培養細胞において遺伝子の光応答が観察された。他の動物を用いた実験に比べ、ヒト皮膚を用いた研究はさまざまな観点から重要性が高く、方向修正はあったものの、可視光に対する応答性と光応答の分子機構に迫れた点において、当初の目標を達成できたと考えている。一方、目標2に向けては、いわゆるバイオインフォマティクスから研究をスタートし、新規の光受容分子としてクリプトクロム(CRY)に着目した。タイミング良く公共データベースの整備が進んだことも相まって、新規候補分子 CRY4 の同定は順調に進んだ。この分野では一般に、データベースに存在が確認できる遺伝子であっても、機能未知遺伝子の解析には高いリスクがある。すなわち、解析が進むにしたがい、mRNA やタンパク質が発現していない、機能的な分子をコードしていないなどの問題が生じて、研究自体が頓挫することが多々あるからである。そのような状況の中で、CRY4 遺伝子の解析は例外的なほどに順調に進み、mRNA の高い発現が網膜・松果体・脳深部といった光受容組織に見出された。さらに幸運なことには、特異的な抗体も容易に得ることができ、タンパク質の発現も確認できた。光生物学分野の中では、CRY 分子の研究はまだそれほど盛んではないが、このような興味深い分子を発見でき、今後の CRY 研究、ひいては光生物学分野の文字通り「さきがけ」となる研究が出来たと満足している。

私は研究開始当初、大きな研究室に属しており、さきがけの採択を機に所属する研究室のテーマとは別に本プロジェクトを立ち上げた。研究最終年度になって異動により独立することができたが、新たな研究室の立ち上げには多くの時間と労力が必要になり、最終年度の研究遂行に影響がでてしまった。特に3年間にわたり本研究を中心的に支えてくれた2名のポスドク研究員の方々には移転に際し中心的な役割を果たしてもらったので、実験に支障が出てしまい大変申し訳なく感じている。

以上のように、研究遂行において予想外の展開があり、一部の成果に関しては論文をまとめるのに必要な最終データを得るのが研究期間終了間際になってしまった。とはいえ、得られた成果の内容に

についてはほぼ期待通りといえる。加えて、プレリナリーながら研究のさらなる発展の手がかりとなろういくつかの興味深い知見も得られている。本さきがけ研究では、他の研究プログラムでは得ることのできない有形無形の成果が得られた。この私にとってかけがえのない財産であり、強力な糧となることは間違いない。絶妙なタイミングでグループに加えて戴いたことを感謝すると同時に、今後、研究・教育を通して社会に還元してゆく責任を感じている。

6 研究総括の見解:

本研究の目標の第一は、光による遺伝子の制御(光による転写調節)メカニズムの解明であり、第二は機能未知なる新規光センサーの探索であった。第一の成果として、鳥類松果体に光を照射し、時刻依存的に転写が誘導される遺伝子を調べた。そのうち朝方に機能する遺伝子 *Lcg* は、概日時計発振における中心体の関与を示唆し、夕方に光誘導される *E4BP4* は、時計遺伝子 *Per* の転写を抑制する転写抑制因子であることを解明した。これらの機能をタンパク質レベルでも明かした。第二に、ヒト皮膚細胞における光応答遺伝子の解析では、光刺激がヒトの皮膚に作用し、その際の遺伝子カスケードの一端を明らかにした。第三に、動物に存在する新規光センサー様分子の同定にも成功した。

特にヒト皮膚における遺伝子の光誘導では、青色にも近紫外光にも10倍以上の誘導を示す遺伝子3種を同定した。これにより、光刺激がどのような細胞内情報伝達経路を介して、これらの遺伝子間の転写を促進させるのかを解明する一步を踏み出した。生物が、光のエネルギーを効率的に利用し、紫外線等による傷害を避けるための、光受容光情報伝達システムの解明は意義ある研究と思われる。

7 主な論文等

発表論文(3件、ただし投稿中を除く。この他、投稿中論文2件、投稿準備中2件あり)

1. Doi, M., Okano, T., Yujnovsky, I., Sassone-Corsi, P., and Fukada, Y.

Negative control of circadian clock regulator E4BP4 by casein kinase I ϵ -mediated phosphorylation.
Curr Biol, **14**: 975–980 (2004).

2. Kassai, H., Aiba, A., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Xiong, W.H., Yau, K. W., Imai, H., Shichida, Y., Satomi, Y., Takao, T., Okano, T., and Fukada, Y.

Farnesylation of retinal transducin underlies its translocation during light adaptation.
Neuron, **47**: 529–539 (2005).

3. Hatori, M., Okano, T., Nakajima Y., Doi, M., and Fukada, Y. *Lcg* is a light-inducible and clock-controlled gene expressed in the chicken pineal gland.

J Neurochem (2006) in press.

特許:なし

総説:(3件)

1. Okano, T. and Fukada, Y. *Chicktacking pineal clock*.
J Biochem (Tokyo) **134**:791–797 (2003).
2. 土居雅夫・岡野俊行 体内時計の時間調節を担うタンパク質リン酸化反応.
生化学 Vol.77, No.2, pp.125–129 (2005).
3. 岡野俊行・深田吉孝 光から時計遺伝子への分子機構
医学のあゆみ(2006) 印刷中.

受賞:(1件)

- 1.平成17年度 科学技術分野における文部科学大臣表彰 若手科学者賞
「生命科学分野における生体の光応答メカニズムの研究」

国際会議・招待講演(3件)

1. Okano T. : A role of the Pineal Clock in the Formation of Circadian Rhythms in Zebrafish.
International Symposium on Molecular Clock Tokyo 2004, Tokyo, February 28, 2004.
2. Okano T. : Pineal melatonin rhythm and its genetic perturbation in the zebrafish.
International Symposium on Molecular Clock Okinawa 2004, Nago, March 2, 2004.
2. Okano T. and Fukada Y. : Pineal Clock and Circadian Rhythms in the Zebrafish.
14th International Congress on Photobiology, Jeju, Korea, June 12, 2004.

国内会議・招待講演(4件)

- 1.岡野俊行・深田吉孝: 遺伝子の発現制御からみた動物の光応答.
分子科学研究所研究会「ロドプシンの分子科学」岡崎、2003年5月30日.
- 2.岡野俊行, 深田吉孝: 鳥類における概日時計の時刻あわせ: 光同調のメカニズム.
日本動物学会第75回大会シンポジウム「生物時計の時刻あわせ」神戸, 2004年9月11日.
- 3.岡野俊行, 今里和之, 池田尚正, 真野弘明, 深田吉孝: トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた概日時計の機能解析. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 2004年10月14日.
- 4.岡野俊行, 深田吉孝: ゼブラフィッシュの概日リズム形成におけるメラトニンの役割.
日本動物学会第76回大会シンポジウム「概日時計の振動機構と機能分化」
つくば, 2005年10月8日.

一般発表(招待講演以外)

国際会議 4 件、国内会議 34 件