

時刻情報の生成・制御を支える転写因子群の発現プログラム

●岡野 俊行^{1,2)}

1) 東京大学大学院理学系研究科 2) 現所属: 早稲田大学理工学術院 電気・情報生命工学科

〈研究の目的と進め方〉

概日時計は、シアノバクテリアからヒトに至るまで、生物界に広く普遍的に見られる生理機能である。特に動物においては、PER, BMAL, CLOCKという限られたタンパク質の転写と翻訳を介した複雑な遺伝子発振ループを構成していることが判ってきた。これらのタンパク質に含まれるPASドメインはPYPやフィトクロムなどバクテリアや植物の光受容タンパク質にも見出され、HIF1, ARNTなど動物の環境応答分子にも広く保存されている。また、概日時計機能は、哺乳類の培養細胞を含めて多くの細胞に内在していることも明らかになってきた。本研究では、ニワトリ松果体細胞を主に用い、さらに種々の培養細胞を利用しながら、概日時計関連タンパク質群がどのような遺伝子制御プログラムを介して約24時間という一定のリズムを創り出し、さらに周囲の明暗交代に同調するのかの解明を目指した。具体的には、(i) 光感受性をもつ概日時計細胞であるニワトリ松果体の時計遺伝子の探索と機能解析、(ii) ディファレンシャルディスプレイ解析を用いた時計関連遺伝子の網羅的スクリーニングとそこで得られた因子の詳細な機能解析、(iii) 哺乳類培養細胞における時刻同調に関わる新規カスケードの探索などを行った。これらのテーマは互いに関連し合っており、得られるデータを補完しながら効率的・統合的に研究を進めた。本研究を通して、概日時計における遺伝子転写・翻訳プログラムの解読の一端をひもとくことができた。

〈研究開始時の研究計画〉

【1】ニワトリ松果体に発現する時計遺伝子の機能解析

ニワトリ松果体細胞は、培養状態でも光受容能とメラトニン合成能をもつ時計細胞であり、概日リズム研究において長い歴史がある。にもかかわらず、遺伝子レベルからの研究は哺乳類の研究に比べて遅れていた。鳥類の時計遺伝子を調べ、哺乳類等と比較することは、概日時計システムの普遍性と多様性を知る上でも必須である。また、概日時計が遺伝子発現ループの周期的な活性化を主体とする点において、ゲノム生物学的にも遺伝子発現制御の基本原則を理解する上で極めて重要であると考えられた。そこでまず、哺乳類のゲノム配列情報等より得られた遺伝子情報を元に、ニワトリの時計遺伝子の配列を予測し、構成因子の網羅的スクリーニングを試みた。

【2】概日時計発振系の光入力系の探索

概日時計の光同調にはおそらく、光による時計遺伝子の発現調節と、それに至る生化学的プロセス（細胞内情報伝達経路）があるに違いない。そこで、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルの両面から入力系を探るためのアプローチを考えた。遺伝子レベルからのアプローチとしては、研究開始当初はニワトリゲノム配列が報告されていなかったため、ディファレンシャルディスプレイ法を使い、ニワトリ松果体において光応答する遺伝子を網羅的に探索した。一方、生化学的なアプローチとしては、ニワトリ松果体細胞において光受容タンパク質から光情報を受け取るであろうGタンパク質の解析を進めた。さ

らに、その下流にあると期待されるMAPキナーゼ経路についても詳細な解析を行った。

【3】細胞レベル・個体レベルにおける時計関連因子の機能解析

概日時計の発振プログラムは当初、遺伝子発現ループの解析によって完結するものと期待されたが、その詳細が明らかになるにつれて、細胞や個体といった高次のレベルからの研究も必須であることが判明した。そこで本研究では、哺乳類培養細胞を用いて新たな同調経路の探索を行い、個体レベルからのリズム解析として、ゼブラフィッシュの行動リズム形成における時計ホルモン（メラトニン）の役割に関する研究に着手した。

〈研究期間の成果〉

【1】ニワトリ松果体に発現する時計遺伝子の機能解析

ニワトリ松果体に発現する時計遺伝子（Bmal1, Bmal2, Clock, Per2, Cry1, Cry2）ならびにヒト、マウス、ラットのBmal2オルソログを単離し、時計タンパク質の機能解析を行った[論文1, 2, 和文解説15, 図1]。その結果、ニワトリCry1/2のmRNA量は光刺激により増大すること、BMAL2は転写の促進だけでなく抑制的作用をもつユニークな転写調節因子であることが判明した[論文1]。

【2】概日時計発振系の光入力系の探索

遺伝子レベルからの光入力系へのアプローチとして、ニワトリ松果体において光応答する遺伝子をディファレンシャルディスプレイ解析により探索した。当初、光応答性のみを指標にしてスクリーニングを開始したが、予想以上の数の遺伝子が光応答することが判明した。

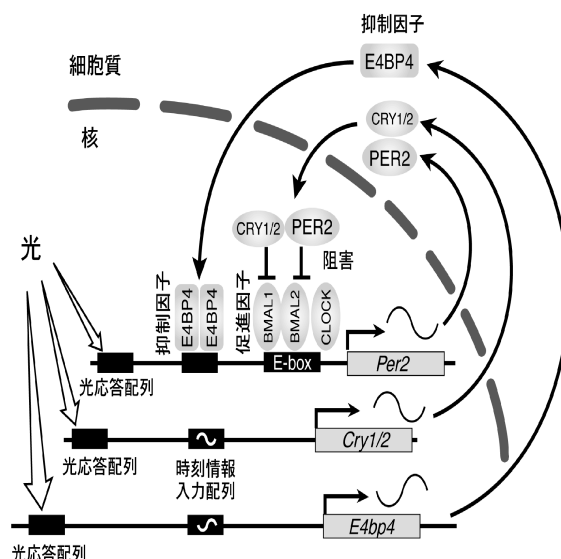


図1 ニワトリ松果体の概日時計の分子モデル
Per2をはじめとする時計遺伝子は光に反応してその転写が増大する。E4BP4は夕刻に特異的に光誘導を受け、Per2の転写を抑制することにより時計の時刻を送らせると推定された。

そこで次に、概日時計の特性を考慮して、時刻特異的に光応答する遺伝子を調べた。その結果、数種類の遺伝子だけが時刻特異性を示すことが判った。それらを詳細

に解析した結果、概日時計の位相後退を導く夕刻の光刺激によってのみ誘導される分子として、転写因子E4BP4を同定することに成功した。転写アッセイ等の結果により、E4BP4はPer2遺伝子の転写抑制を介して概日時計の位相後退（時計を遅らせる作用）に関わる新規時計関連分子であると推定された[論文3, 和文解説13, 図1]。さらに、時刻調節におけるE4BP4の役割を明確にするために、E4BP4を特異的に認識する抗体を多数作製し、リン酸化とタンパク質の消長について調べた。その結果、E4BP4は夕刻の光刺激によって、mRNAレベルに加えてE4BP4タンパク質量も増大することが判明した。さらに、時計関連キナーゼとして注目されているカゼインキナーゼIeによってE4BP4がリン酸化を受け、プロテオソーム依存的な分解が促進されることが明らかになった[論文9, 和文解説16]。

ディファレンシャルディスプレイ解析で得られた別の因子として、朝に特異的に光応答する遺伝子を同定しLcgと命名した[論文10]。興味深いことに、LCGタンパク質を培養細胞において発現させると、中心体に局在することが判った。そこで、中心体の主たる構成成分の一つである β アクチンとの関連を調べたところ、 β アクチンとLCGがニワトリ松果体において相互作用することが判明した。これまでのところ、中心体が概日時計発振に関わるといった報告も全くなく、中心体が時計の発振や時刻調節に関わる可能性を示唆する結果がはじめて得られたといえる。

E4BP4, LCGと並行して、時刻によらず光誘導を受ける遺伝子としてHsp90 α の解析も行った[論文5]。ニワトリ松果体において、光照射に伴い顕著にHsp90 α のmRNAレベルが上昇したことから、脳内の温度を測定した結果、光刺激によって脳内温度が急上昇することが判った。温度変化は、光と共に強力な時刻調節刺激となることから、生体内においては光刺激が体内のホルモン濃度変化等を介して体温を変化させ、末梢組織の概日時計を同調させている可能性が示唆された。

代表者らはこれまでに、Hsp90 α と並んで、光受容分子ピノプシンのmRNAがニワトリ松果体において光誘導されることを見出していた。そこで、ピノプシンプロモータ上の光入力シスエレメントの同定を試みた。まず、ピノプシンプロモータにルシフェラーゼ遺伝子を繋ぎ、培養した松果体細胞中での光応答性を検出する系を構築した。次に、ピノプシンプロモータのさまざまな変異体を順次作成することによって、光応答性に必要な領域を絞り込み、最終的には18塩基対の領域を光応答シスエレメントとして同定することができた[論文6, 図2]。興味深いことにこの領域には、動物において概日時計の発振に関与するE-box(CACGTG)および植物において光応答に関与するG-box(CACGTGG)が含まれており、動物の時計発振エレメントに光情報が入力する可能性や動物の光応答システムが動物にも保存されている可能性が推察された。

上記と並行して、タンパク質レベルからの光入力系へのアプローチとして、光受容タンパク質から光情報を受け取るGタンパク質、およびその下流において働く可能性のあるMAPキナーゼ (MAPK) の解析を行った。ニワトリ松果体に発現するGタンパク質を探索した結果、GtおよびG11が発現していることが判った。これまでの研究からG11が概日時計への光入力を担っている可能性が考えられたため、G11の関与の可能性を調べた。その結果、G11を活性化することによって光刺激と同様の時計の位相シフトが観察され、G11を介して光情報が時計に

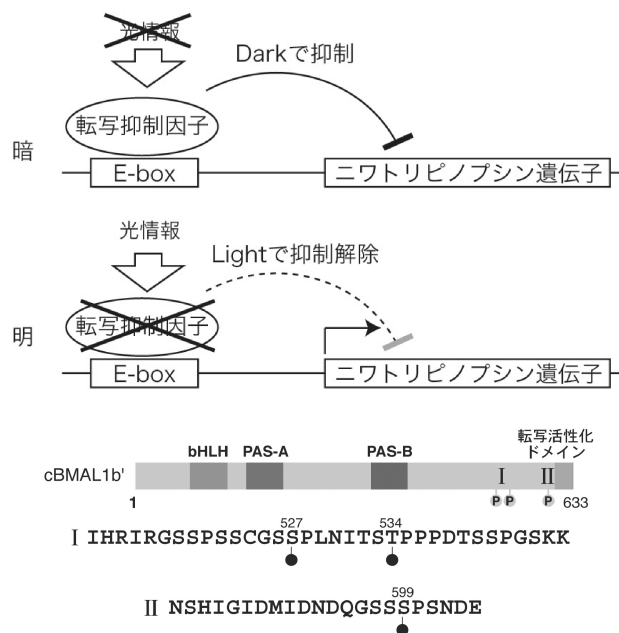


図3 MAPキナーゼによるBMAL1のリン酸化部位

MAPキナーゼは概日時計構成分子BMAL1と直接相互作用し、そのカルボキシル末端付近の複数のSerまたはThrをリン酸化することがわかった。この領域は転写活性化ドメインに近かったため、リン酸化部位の変異体を作成して転写アッセイを行った。その結果、リン酸化によってBMAL1の転写促進活性が抑制されることが判明した。質量分析によって同定された2種類のペプチド断片の配列とリン酸化部位(●)を示した。

入力していると推定された[論文7]。

以上の知見から、ピノプシンが時刻同調に関与している可能性は低いと考えられた。そこで次に、ピノプシン以外の光受容分子が松果体に発現している可能性を探索した。その結果、オプシンファミリー分子に加えて光受容分子の候補となり得る複数のクリプトクロムファミリー分子が発現していることが判った[論文2, 11]。並行して、MAPキナーゼが概日時計システムに関与する可能性を検討した。これは、松果体においてMAPキナーゼ活性が夜にピークをもつ日周変動を示し、さらに光刺激により不活性化されることを我々自身で突き止めていたからである。MAPキナーゼが時計構成分子を探索した結果、活性化型MAPKはBMAL1と会合し、その特定のアミノ酸残基(Thr534)のリン酸化を介してBMAL1の転写促進活性を抑制することが明らかになった[論文4, 図3]。

【3】細胞レベル・個体レベルにおける時計関連因子の機能解析

分子や遺伝子レベルからの概日時計発振プログラムの解析と共に、細胞・個体レベルからの解析を行った。細胞レベルの解析として、概日時計の発振機構を内包する哺乳類のrat-1培養細胞を用いて、細胞時計の発振に影響を与える新規経路の網羅的探索を行った。その結果、生体における主要なエネルギー源であるグルコースを生理的濃度で投与することによって、細胞内の概日時計を特定の時刻(位相)へ導き、さらに顕著なリズムを持続させ得ることを発見した。その後の詳細な解析の結果、この位相変化の原因は、グルコース投与による浸透圧変化などではなく、細胞内におけるグルコース代謝であることがわかった。興味深いことに、グルコースによる時計発振の際の時計遺伝子発現変化を調べてみると、従来報告されていたいかなる時計同調の様式とも異なっていることが判明した。続いて、グルコースによるリズム発振の分子メカニズムを解明するために、マイクロアレイ解

析により、グルコース投与に伴う遺伝子発現の変化を調べた。その結果、転写抑制因子の一つであるTieglがグルコース刺激により急速に誘導されることが判った[論文8]。グルコース投与に伴い、Bmal1およびPer2遺伝子の転写が抑制されることから、今後はこれら時計遺伝子プロモーターへのTieglの作用を調べることが重要と考えられる[図4]。

一方、個体レベルでの概日時計のリセットプロセスを解明するため、時計中枢の一つである松果体において時計分子BMALのドミナントネガティブ体を強制発現するゼブラフィッシュ系統を複数樹立した。さらに、生きたままのゼブラフィッシュの生体リズムを測定する方法を検討した。その結果、ごく微量のメラトニンが生体外に放出されており、その量には顕著な概日リズムが存在することが分かった。また、上記トランスジェニックゼブラフィッシュにおいてはこのリズムが消失することが判明した。このことから、松果体特異的に時計機能を破壊することができたと考えられた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

概日時計の分子機構の解析は、この10年足らずの間に急速に展開した。特に、マウスをはじめとする哺乳類の時計遺伝子および時計タンパク質の性状解析が中心に進められた。古くから研究が盛んであったショウジョウバエの成果をふまえ、おそらく動物の概日時計は同一の進化的背景を持ち、共通の遺伝子をそれぞれの生物に特有の形で利用していると推定された。しかしながら、哺乳類以外の脊椎動物の研究は大きく遅れており、時計遺伝子の発振プログラムを明らかにする上で、マウス以外の高等脊椎動物の時計発振機構を知ることは、何が共通で何がどのように多様であるのかを明らかにする上で重要であると考えられた。本研究以外に鳥類の時計遺伝子の解析を行ったグループはわずかであり、その点において国際的にも当該分野に大きく貢献でき、光応答経路の解析と併せて高い評価を受けた[2002年度米国光生物学会(American Society for Photobiology) New Investigator Award]。本研究で特筆すべき点として、鳥類の松果体の概日時計は、哺乳類の時計に比べて、光に対する応答性が高いことを見出し、光応答遺伝子と細胞内経路について詳細な解析を行ったことが挙げられる。この性質はむしろ、マウスよりもショウジョウバエやゼブラフィッシュの概日時計と共通する点であり、時計発振ループに対する光入力(リセット)経路の作用機構の共通基盤を知るために重要な手がかりを得られたといえる。

本研究では、鳥類概日時計の光特性を見出したのみならず、さらに光応答遺伝子の網羅的スクリーニングを行った。このような試みは国内外を通してほとんど前例がなく、光応答シスエレメントも初めて同定することに成功した[論文6]。また、BMAL2およびE4BP4の2つの時計因子は、代表者らが鳥類で先に発見した時計遺伝子であり、時計発振に関わるこれらの基本因子の性状解析を世界に先駆けて進められたことは意義深いと考えている。リン酸化による時計タンパク質の寿命調節は、当該分野におけるホットトピックの一つであり、E4BP4のリン酸化と分解やMAPキナーゼによるBMAL1のリン酸化と活性調節の発見はまさに、時計関連分子が「いつ、どこで、何を」しているのかという時計発振プログラムの一端を明らかにしたものだと言える。

哺乳類の概日時計分野においては、光以外の社会的・生物学的要因による概日時計の同調が一つの大きなトピックであった。なかでも、末梢臓器の個々の細胞が時計

を持つことが明らかになったため、食餌時刻等による時計の位相シフト現象について、遺伝子レベルからの研究が進んだ。この種の研究のほとんどは、個体や臓器のレベルでの研究であったのに対して、グルコースが培養細胞の時計を同調し得ることを明瞭に示すことができ、個体レベルでの現象を分子・細胞レベルから一挙に解決する大きな前進となった。この成果は、概日時計という観点に加え、代謝調節や糖尿病などの関連からも重要な研究として位置づけられた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

予想外の困難な点として、ゼブラフィッシュの個体レベルでの行動リズム測定があげられる。本研究においては、トランスジェニックゼブラフィッシュの作成に成功した。現在、それらの動物を用いて行動測定を行っているが、マウスに比べ、ゼブラフィッシュは個体間の形質の差が大きくトランスジェニック系統から得られる結果のばらつきが大きくなっている。この理由はおそらく、ゼブラフィッシュが近交系として十分に純化されていないことが考えられる。解析に供する個体数を増やす、純化系統を確立する等の対策が必要である。

〈今後の課題〉

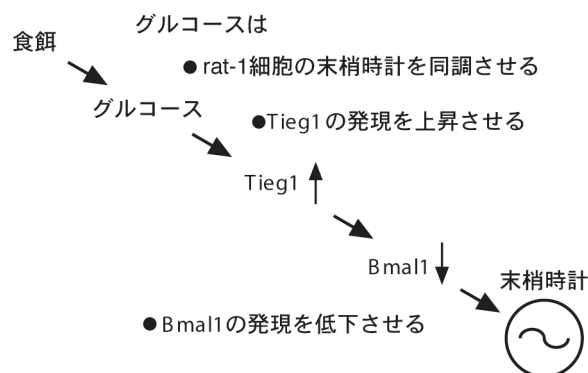


図4 グルコースによるrat-1細胞の末梢時計の同調モデル

培地中にグルコースを投与するとrat-1細胞の末梢時計が発振することを発見した。このリズム誘起に伴って、TieglのmRNA量の急激な上昇とそれに続くBmal1のmRNA量の減少が観察された。これらのことを合わせて転写抑制因子TIEG1タンパク質がBmal1の転写を抑制するというモデルが想定された。

これまでの研究から、遺伝子レベルにおける概日時計発振プログラムのフレームワークは解読の糸口が掴めてきた。一方、タンパク質レベルからの概日時計の発振プログラム解読は手つかずに近い。そこで次のステップとして、時計因子を認識する抗体を用いたアフィニティークラムクロマトグラフィーにより時計因子(転写因子)複合体を精製し、そこに含まれる分子群の網羅的解析を行うことが急務である。このような複合体構成分子のin vivoにおける実体解明に際しては特に、リン酸化などの翻訳後修飾にも重点をおき生化学的検証を行う必要がある。本研究において、時計関連分子に対する複数の抗体が完成したので、時刻情報を制御する時計因子(転写因子)複合体の状態を経時的に追跡することが可能になった。こうした解析によって、時刻生成に関わる未知の分子が同定できる可能性も期待できる。

本研究において、概日時計の入力経路の一つとしてグルコース応答経路を発見し、さらにそこに関与する候補分子を特定することができた。次のステップとしては、

TIEG1をはじめとするグルコース応答分子が、時計遺伝子の転写に関与する可能性を精査する必要がある。これと共に、個体レベルにおいても血中グルコースの濃度上昇が末梢組織の時計発振を同調させ得るかどうかの検証が望まれる。

グルコースによる末梢時計のリセットメカニズムの解明には、細胞の時刻を経時的にモニタリングするレポートシステムが強力であるが、このようなシステムを現在立ち上げている。これを利用することによって、外来刺激が時計関連分子の転写にどのように影響を与え、さらにそれに伴って細胞時計がどのように変動してゆくのかをリアルタイムで検出できるようになる。

一方、個体レベルにおいては概日時計の出力として行動リズムを測定することが重要である。ゼブラフィッシュの行動測定装置のセットアップがほぼ完了したので、メラトニンリズムが消失したトランスジェニック個体の行動パターンを早急に解析する必要がある。松果体が合成・放出するメラトニンリズムの生理的役割は未だ明確ではなく、本研究によって、行動リズムへの寄与を詳細に検討することが可能になると期待される。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1) 論文

[1] 0111062106

Okano, T., Yamamoto, K., Okano, K., Hirota, T., Kasahara, T., Sasaki, M., Takanaka, Y., Fukada, Y. Chicken pineal clock genes: implication of BMAL2 as a bidirectional regulator in the circadian clock oscillation. *Genes Cells*, 6, 825-836 (2001).

[2] 0111062110

Yamamoto K., Okano T., Fukada, Y. Chicken pineal Cry genes: light-dependent up-regulation of cCry1 and cCry2 transcripts. *Neurosci. Lett.*, 313, 13-16 (2001).

[3] 0111062108

Doi, M., Nakajima, Y., Okano, T., Fukada, Y. Light-induced phase-delay of the chicken pineal circadian clock is associated with the induction of cE4bp4, a potential transcriptional repressor of cPer2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 8089-8094 (2001).

[4] 0202051218

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).

[5] 0208131505

Doi, M., Nakajima, Y., Okano, T., and Fukada, Y. Light-dependent changes in the chick pineal temperature and the expression of cHSP90 α 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).

[6] 0208131503

Takanaka, Y., Okano, T., Yamamoto, K., and Fukada Y. A negative regulatory element required for light-dependent pinopsin gene expression. *J. Neurosci.*, 22, 4357-4363 (2002).

[7] 0211211932

Kasahara, T., Okano, T., Haga, T. and Fukada, Y. Opsin-G11-mediated signaling pathway for photic entrainment of the chicken pineal circadian clock. *J. Neurosci.*, 22, 7322-7325 (2002).

[8] 0211211933

Hirota, T., Okano, T., Kokame, K., Shirotani-Ikejima, H., Miyata, T., and 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).

[9] 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).

[10] 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.

[11] Kubo, Y., Akiyama, M., Fukada, Y., and Okano, T. Molecularcloning, mRNA expression, and immunocytochemical localization of a putative blue-light photoreceptor CRY4 in the chicken pineal gland. *J. Neurochem.* (2006) in press.

2), 3) なし

4) その他

[12] Fukada, Y. and Okano, T.

Circadian clock system in the pineal gland. *Mol. Neurobiol.*, 25: 1-12 (2002).

[13] Okano, T. and Fukada, Y. Chicktacking pineal clock. *J. Biochem. (Tokyo)*, 134:791-797 (2003).

[14] 岡野俊行・深田吉孝

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 (2002).

[15] 岡野俊行・深田吉孝 脊椎動物の時計システム、時計遺伝子の生物学、第1章（岡村均・深田吉孝編）シュプリンガーフェアラーク東京, pp.41-48 (2004).

[16] 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).

受賞など

[17] 2002年度 米国光生物学会 (American Society for Photobiology) New Investigator Award

[18] 2005年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰
若手科学者賞

[19] 新聞記事「知を創る23：体内時計の遺伝子見つける」
読売新聞2002年7月30日