

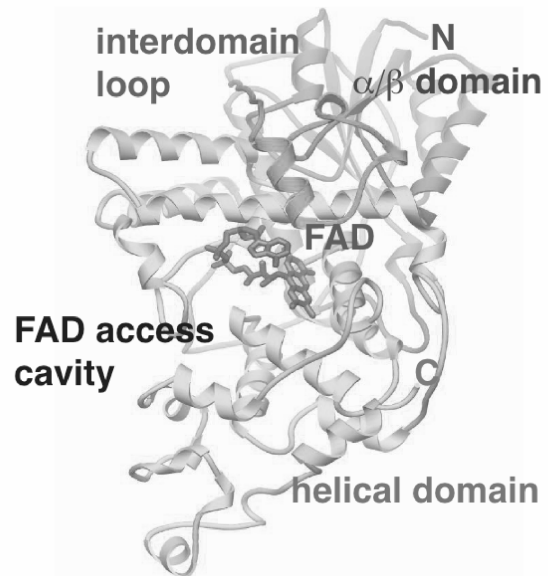
光受容及び生物時計を司る遺伝子システムの解明

●藤堂 剛

京都大学放射線生物研究センター

〈研究の目的と進め方〉

クリプトクロームは、Flavin Adenine Dinucleotide(FAD)を補酵素として持つフラボタンパクであり、バクテリアから植物、ヒトまで生物界に幅広く存在している。クリプトクロームは光回復酵素と呼ばれる光の受容に依存した酵素活性を示すDNA修復酵素に由来しており、何らかの光受容過程を含む生理機能に関与していることが示唆されていたが、高等動物においては概日リズムの制御を行っていることが明らかになった。概日リズムを作り出す生物時計は、PASドメインと呼ばれるタンパク間相互作用に関与するモチーフを持つ一群のタンパクから構成されている。クリプトクロームは、このPASドメインを持つ一群の転写因子に直接結合し、その活性を制御しており、生物時計の中心的役割を担っている。本研究の目的は、クリプトクローム及びそれと相互作用するPASドメインタンパク群の機能を、シアノバクテリア、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ(メダカ)、マウスにおいて包括的に解析しようというものである。



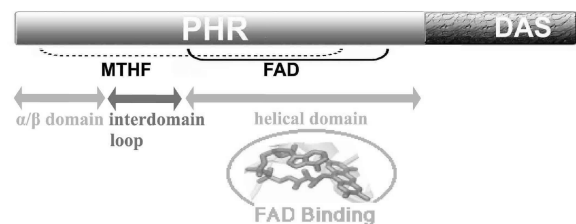
〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 光回復酵素・クリプトクロームタンパクファミリーの構造と機能の相関を明らかにする事を以下の二つの方向から目指す。一つは結晶構造の解明で、シアノバクテリア、ゼブラフィッシュ、マウスのクリプトクローム、6-4光回復酵素について試みる。二つ目は、機能ドメインを決定することである。ゼブラフィッシュのクリプトクロームは転写抑制活性を持つものと、持たないものの2種類のタイプが存在する。この機能的に異なる二種類のクリプトクローム間でキメラタンパクを作成する事により機能ドメインの同定を試みる。
- 2) 光により時計遺伝子発現の振動を誘導できるゼブラフィッシュ培養細胞に於いて、何が光受容体であり、光によりどのような遺伝子の発現が誘導されるのかを明らかにする。
- 3) メダカの概日リズムミュータントのスクリーニングを行う。

〈研究期間の成果〉

- 1) バクテリアの光回復酵素に続き、シアノバクテリアのクリプトクロームの結晶構造を決定できた。更に、シロイヌナズナのクリプトクロームの結晶構造を決定された。このタンパクファミリーは、機能的に、また一次構造上いくつかのサブファミリーに分けうるが、いずれのサブファミリーのタンパクも類似した一次構造をしているようである。C末側のCavityの底に存在するFADがクリプトクロームの機能にどのような役割を果たしているのか興味深い。(公表論文リスト。3)

- 2) 転写抑制能を持つクリプトクロームは、CLOCK/BMALと相互作用し、また高発現させたときに核に存在する。逆に、転写抑制能を持たないクリプトクロームは、CLOCK/BMALと相互作用しないし、細胞質に存在する。この二種のクリプトクローム間でキメラを作成し、CLOCK/BMALとの相互作用ドメイン、核移行に重要なドメインを決定した。(公表リスト1, 2, 4)



- 3) クリプトクロームの転写調節領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものをレポーターとして、リアルタイムで発現誘導を観る系を確立した。阻害剤を用いた実験から、この光誘導過程にはMAPK経路、PKC経路が関与していることが解った。

〈国内外での成果の位置づけ〉

クリプトクロームファミリーの構造が明らかにされたのは、国内外で初めてのことであり、注目を集めた。また、系統的にキメラタンパクを作成する事により、構造と機能の解析とを行うという手法は、当タンパクファミリーでは初めての試みであり、注目された。

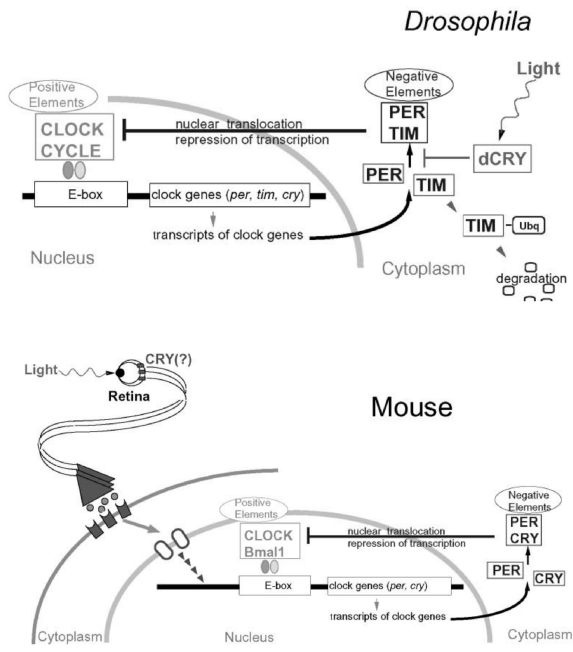
〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

メダカの概日リズムミュータントのスクリーニング

(Forward Genetics的アプローチ)については、行動測定システムの立ち上げが軌道に乗らず、予定通り進まなかった。逆遺伝学的 (Reverse Genetics) アプローチによるメダカの概日リズム mutant のスクリーニングを現在試みている。

〈今後の課題〉

ショウジョウバエでは、クリプトクロームは光受容体として機能している。一方、マウス・ヒトを含む高等脊椎動物では、クリプトクロームは光に依存しない生理活性を担っている。(下図参照)。



クリプトクロームの光に依存しない機能としては、PERとヘテロダイマーを形成して核内移行する事、核内で転写抑制活性を持つ事、が知られている。我々は、クリプトクロームのみで転写抑制が起きることを示した。この転写抑制にクリプトクロームの持つFADがどのような働きをしているのかを明らかにすることが、今後の最大の課題である。また、脊椎動物において、クリプトクロームが光に依存した機能を持っているのかどうか、光受容体として働いているのかどうか、興味深い点である。一方、これまでに明らかにされている光受容体は全て、発色団としても補酵素の光異性化が、光受容の引き金になっている。しかしながら、クリプトクロームの補酵素であるFADでは、光異性化は起こり得ない。今までに知られていない新たな光受容システムにより、光受容体として基のしていることが考えられる。この点も今後の重要な課題である。

ゲノム生物学進展により、多くの生物のゲノムが明らかにされてきている。できるだけ多くの生物種でのゲノム情報を基に、このタンパクファミリーの全体像が明らかにされ、更に構造と機能の関係が明らかにできれば、生物が進化の上で、光との接点においてどの様にこのタンパク遺伝子を変化させてきたのか、その原理を理解する興味深い問題の糸口が得られることが期待される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1.0303281607

Ishikawa, T., Hirayama, J., Kobayashi, Y. and Todo, T.: zebrafish CRY represses transcription mediated by CLOCK-BMAL heterodimer without inhibiting its

binding to DNA. *Genes to Cells*, 7, 1073-1086 (2002).
 2.0303281653
 Hirayama, J., Fukuda, I., Isikawa, T., Kobayashi, Y. and Todo, T. : New role of zCRY and zPER2 as regulators of subcellular distributions of zCLOCK and zBMAL proteins. *Nucleic Acids Res.* 31, 935-943 (2003)
 3.0305121615
 Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V., Todo, T., Tainor, J. and Getzoff, E. : Identification of a new cryptochrome class: structure, function and evolution. *Mol. Cell*, 11, 59-67 (2003)
 4. J. Hirayama, H. Nakamura, T. Ishikawa, Y. Kobayashi, T. Todo : Functional and structural analyses of Cryptochrome: Vertebrate CRY regions responsible for interaction with the CLOCK:BMAL1 heterodimer and its nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 35620-35628
 5. K. Oishi, K. Miyazaki, K. Kadota, R. Kikuno, T. Nagase, G.I. Atsumi, N. Ohkura, T. Azama, M. Mesaki, S. Yukimasa, H. Kobayashi, C. Iitaka, T. Umehara, M. Horikoshi, T. Kudo, Y. Shimizu, M. Yano, M. Monden, K. Machida, J. Matsuda, H. Shuichi, T. Todo, N. Ishida Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem.* 2003, 278, 41519-41527
 6. H. Daiyasu, T. Ishikawa, K.Kuma, S. Iwai, T. Todo, H.Toh : Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes Cells.* 2004, 9(5), 479-495
 7. T. Nakayama, T. Todo, S. Notsu , M. Nakazono, K. Zaitzu : Assay method for Escherichia coli photolyase activity using single-strand cis-syn cyclobutane pyrimidine dimer DNA as substrate. *Anal Biochem.* 2004, 329, 263-268
 8. T. Torizawa, T. Ueda, S. Kuramitsu, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, K. Morikawa, I. Shimada : Investigation of the CPD photolyase DNA recognition mechanism by NMR analyses. *J Biol Chem.* 279(31): 32950-32956. 2004
 9. D. Nozaki, T. Iwata, T. Ishikawa, T. Todo, S. Tokutomi S, H. Kandori : Role of Gln1029 in the Photoactivation Processes of the LOV2 Domain in Adiantum Phytochrome3. *Biochemistry.* 43(26): 8373-8379. 2004
 10. K. Sanada, Y. Harada, M. Sakai, T. Todo, Y. Fukada : Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes Cells.* 9, 697-708.(2004)
 11. S. Masuki, T. Todo, Y. Nakano, H. Okamura, H. Nose : Reduced a-adrenoceptor responsiveness and enhanced baroreflex sensitivity in Cry-deficient mice lacking biological clock. *J Physiol.* 566.1, 213-224 (2005)
 12. C. Lin and T. Todo: The Cryptochromes : *Genome Biol.* 2005;6(5):220