

哺乳類の概日リズム形成に関与する遺伝子システム —新規時計関連遺伝子の探索とその機能解析—

●永井克也 ◆岡田雅人

大阪大学蛋白質研究所

〈研究の目的と進め方〉

哺乳類の概日時計機能に関与する新規遺伝子の探索と機能解析を概日リズムの主時計であるラットの視床下部視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus, SCN) における変化や培養細胞での発現実験などにより行った。

〈研究開始時の研究計画〉

ラット及びマウスを用いて当研究室で発見した時計関連新規遺伝子 (casein kinase1 ϵ 、B10、scop) の機能解析と新規時計関連遺伝子の探索を行う。

〈研究期間の成果〉

1) casein kinase1 epsilonの機能解析 (論文1)

哺乳類の概日リズムの主時計であるラットの視床下部視交叉上核 (SCN) において昼夜でのmRNAの発現に差異のある遺伝子をdifferential display 解析法により探索したところ、昼夜の発現に差異はないが、ハエで概日リズム形成に関与することが明らかにされているcasein kinase1 epsilon (CK1 epsilon) 遺伝子の相同遺伝子をcloningすることが出来た。COS-7培養細胞での共発現実験などによりこの遺伝子の機能解析を行い、CK1 epsilon蛋白質は時計関連遺伝子産物Period (Per)1、Per2、Per3の全てに結合し、それらをリン酸化するが、その内Per1とPer3のみを核内へ移動させる機能を持つ事を明らかにした。ヒトに認められるper遺伝子の変異やハムスターのCK1 epsilon遺伝子の変異は概日リズム異常を引き起すので、CK1 epsilonによるPer蛋白質の核内移行もまた概日時計機構において重要であると考えられる。

2) B10 (後にPer1-Interacting Protein of the Suprachiasmatic nucleus、PIPSと改名) の機能解析 (論文2)

Yeast two-hybrid法によりPer1と結合するラット脳遺伝子を探索し、1,319個のアミノ酸からなる143kDaの蛋白質をコードする新規遺伝子を発見し、Per1-Interacting Protein of the Suprachiasmatic nucleus (pips) と命名した。PIPS蛋白質はSCNにてニューロンの細胞質と核に存在するが、COS-7培養細胞にPer1と共発現させるとPer1とPIPSが核内に共存することが免疫細胞染色により明らかになった。これらの事実はPIPSが時計関連蛋白質Per1の核移行に関与することを示唆する。

3) scopの機能解析 (論文3)

differential display法を用いてラットSCNにてそのmRNAの発現に概日リズムのある新規遺伝子を発見しSuprachiasmatic nucleus Circadian Oscillatory Protein (scop) と命名した。scopは1969個のアミノ酸からなる183kDaの蛋白質をコードする遺伝子で、この蛋白質の発現は概日時計 (SCN) では昼間に高く夜間に低い。SCOP蛋白質はLeucin-rich repeatsを含み、この部位でK-Rasと結合し得る。PC12細胞での発現実験によりSCOP蛋白質はK-Rasと結合することにより、MAPK経路の活性化を阻害するので、このおうなメカニズムにより概日時計機構に関与するものと思われる。実際、

ラットSCNではMAPK経路の指標となるErk1/2のリン酸化にSCOP蛋白質の発現とは相半的な昼間に低く、夜間に高い概日リズムが存在する事が報告されている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

Casein kinase1 epsilonによるPerのリン酸化の重要性は特にヒトでの概日リズム異常 (家族性睡眠位相前進症候群) と関連することが明らかにされており、本研究もその異常の理解の一助に貢献している。PIPSおよびSCOPの機能についても最近引用回数も増加しており、概日リズム形成機構におけるそれらの役割についても国内外での興味を呼び起こしている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本特定研究の予算が1年間で終わったことは予想外であった。このことは本研究の進展速度を遅延せしめ、更に新たな時計関連遺伝子の探索を不可能にした。

〈今後の課題〉

今後これらの遺伝子がどのように哺乳類の概日リズム形成に関与するかを明らかにすることが今後の課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

- 1) Takano A, Shimizu K, Kani S, Buijs RM, Okada M, Nagai K (2000) Cloning and characterization of rat casein kinase1 ϵ . FEBS Lett. 477: 106-112.
- 2) Matsuki T, Kiyama A, Kawabuchi M, Okada M, Nagai K (2001) A novel protein interacts with a clock related protein, rPer1. Brain Res. 916: 1-10.
- 3) Shimizu K, Okada M, Nagai K, Fukada Y (2003) Suprachiasmatic nucleus circadian oscillatory protein, a novel binding partner of K-Ras in the membrane raft, negatively regulates MAPK pathway. J. Biol. Chem. 278: 14920-14925.