

## 論文内容の要旨

論文題目     Calcium Signaling Molecules and Transcriptional Regulation  
                  in the Chick Pineal Clock Cells

(ニワトリ松果体の概日時計細胞におけるカルシウム情報伝達分子と転写制御機構)

氏名   清水   史子

約 24 時間周期の概日リズムを生み出す概日時計は、体温調節をはじめ睡眠・覚醒など多くの周期的な生理現象を支配している。概日時計のリズム発生機構として、「時計遺伝子 (*Period* など) の転写の活性化と抑制に基づく負のフィードバックループモデル」が提唱されているが、時計の位相制御を担う入力系については未だ不明な点が多い。ニワトリ松果体細胞においては時計発振系、光入力系およびメラトニン出力系が同一細胞内に局在しており、個体から単離した培養条件下でも自律的なメラトニンの分泌リズムが継続することから、概日時計研究の優れた実験材料として用いられてきた。本研究では、ニワトリの松果体における細胞内シグナル伝達機構を解析することにより、時計入力系の分子メカニズムに迫ろうと試みた。

ニワトリ松果体の培養細胞を用いた研究により、細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の動員が、光による位相同調機構に関与する可能性が示唆されている。そこで申請者はまず、ニワトリ松果体において  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの伝達を担う、 $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質の分子実体を生化学的に解析しようとした。カルシウム結合蛋白質の多くは、phenyl 基などの疎水基と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存的に結合すると考えられる。そこで、約 2,000 個のヒヨコ松果体の抽出液を  $\text{Ca}^{2+}$  依存的 phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィーに供したところ、分子量 20K, 21K, 22K, 24K, 34K および 35K の蛋白質を単離することができた。これらの蛋白質に対し、マイクロシーケンシングまたは抗体染色を行ったところ、それぞれ calmodulin (CaM), sorcin, neurocalcin,

visinin, annexin II および annexin V (いずれも  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質として知られる) と同定できた (図 1)。このなかで、CaM, sorcin および neurocalcin は、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの伝達に関わる「 $\text{Ca}^{2+}$  センサー蛋白質」として知られていたものの、松果体における発現パターンは未知であった。そこで、これら  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質の抗体を作製し、松果体切片の抗体染色を行なったところ、CaM と sorcin は松果体においてメラトニン合成を行う時計細胞に発現していた。これに対し neurocalcin は、神経細胞様の形態を示す少数の細胞においてのみ見られた。以上から CaM と sorcin が、松果体細胞において光位相制御など、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的な生理応答を担う分子の候補であると考えられた。

時計の位相制御においては、*Period* 遺伝子の転写誘導が重要な役割を果たすことが幅広い動物種において知られている。そのなかでもマウスの視交叉上核における *Period* (*Per*) の転写誘導機構については、とりわけ解析が進んでいる。視交叉上核は網膜からの神経投射を受け、神経伝達物質を介して位相同調を行う時計細胞であり、NMDA 型ならびに AMPA/KA 型グルタミン酸受容体の支配下に位相同調機構が働く。この場合、「 $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaM} \rightarrow \text{CaM}$ -dependent protein kinase  $\rightarrow$  CREB  $\rightarrow$  *Per1* の転写誘導」という経路が働くと考えられている。CREB/ATF 転写因子ファミリーは CRE ( $\text{Ca}^{2+}$ /cAMP-responsive element) 配列に結合する pZip 型転写因子群として見出され、なかでも CREB、ATF-1 および ATF-2 は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇を引き起こす外来刺激を核へ伝える転写活性化因子として知られている。CRE 配列はいくつかの時計関連遺伝子のプロモーター領域に見られ、とりわけ、*Per1* と *Per2* のプロモーター領域においては種を超えて保存されている。ニワトリにおいては、*Per1* 遺伝子は存在しないとされているが、*Per2* 遺伝子 (*cPer2*) の mRNA 量は松果体において明期に高く暗期に低いという概日リズムを示し、光によって転写が誘導されることが知られている。そこで申請者は、CREB、ATF-1 および ATF-2 が *cPer2* 遺伝子上流の CRE 配列を介して光応答

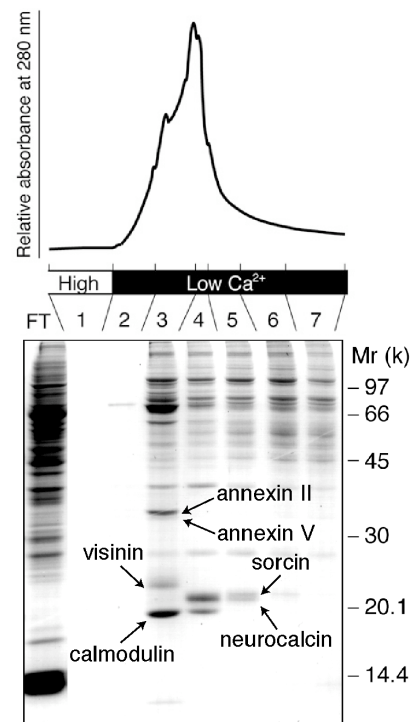


図 1 ニワトリ松果体に発現する  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質の精製

ニワトリ松果体から水溶性蛋白質を抽出し、高  $\text{Ca}^{2+}$  条件下 (白いバー) において phenyl-Sepharose カラムに吸着した。カラムをよく洗浄した後、低  $\text{Ca}^{2+}$  条件下 (黒いバー) にて蛋白質を溶出した。

や概日リズムの形成に關与する可能性を、次に検証した。

明暗周期下で飼育したヒヨコから松果体を4時間おきに摘出し、懸濁液を作製した。これら懸濁液に対し、CREBとATF-1の活性をそれぞれ反映する、リン酸化Ser133とリン酸化Ser63を特異的に認識する共通抗体を用いてイムノブロット解析を行った。その結果、CREBとATF-1のリン酸化レベルは、いずれもZT14にピークをもつ日内変動を示した。次に、ATF-2の活性を反映するリン酸化Thr53（ヒトATF-2のThr71に相当）を認識する特異的の抗体を用いてイムノブロット解析を行ったところ、ATF-2のリン酸化レベルは明期に高く暗期に低下するという日内変動を示した（図2左）。以上により、CREB、ATF-1およびATF-2のリン酸

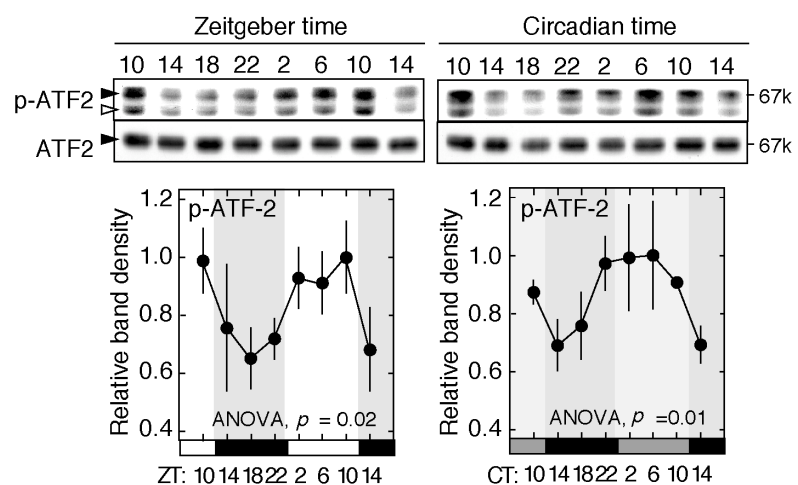


図2 ニワトリ松果体におけるATF-2 Thr53のリン酸化リズム

明暗周期下（左）および恒暗条件下（右）において、ATF-2のリン酸化レベルは、主観的夜に低く主観的昼に高いというリズムを示した。

化レベルはいずれも時刻依存的に変動することが判明した。次に、これらの変動が概日リズムであるか否かを調べるため、恒暗条件下で飼育したヒヨコから松果体を4時間おきに摘出し、同様の解析を行った。その結果、CREBとATF-1のリン酸化レベルに明確な日周変動は見られなかった。これに対し、ATF-2のリン酸化レベルのリズムは恒暗条件下においても継続したことから、概日時計の支配を受けていると考えられた（図2右）。CREBとATF-1のリン酸化リズムが明暗下においては見られたのに対し、恒暗下においては見られなかったことから、CREBとATF-1のリン酸化は外界の光に依存して変化するのではないかと考え、次に夜の時間帯に光照射を行ったヒヨコの松果体を用いて実験を行った。その結果、予想した通り、いずれの因子も光によって急速にリン酸化レベルが低下した（図3）。一方、ATF-2のリン酸化は光に対しては応答しなかった（図3）。つまり、ATF-2のリン酸化は概日時計の支配を受けているのに対し、CREBとATF-1のリン酸化は光によって制御されていることが判明した。ニワトリの松果体は内在性の時計機能と光感受性を持つが、他の組織からの時刻や光の情報が、神経や血液などを介して入力する可能性も考えられる。そこで次に、生体内において観察されたCREB、ATF-1およびATF-2のリン酸化制御が、単離培養した松果体におい

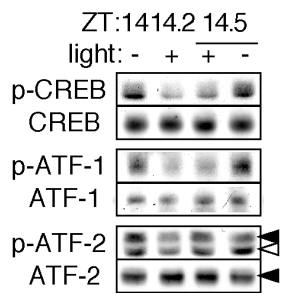


図3 ニワトリ松果体における CREB/ATF転写因子の光応答

夜の時刻 (ZT14) におけるヒヨコ個体への照射により、CREB Ser133とATF-1 Ser63のリン酸化レベルは急速に低下した。一方、ATF-2 Thr53のリン酸化レベルには光による変化は見られなかった。

て見られるか否か調べた。その結果、培養松果体に光を直接照射した場合においても CREB および ATF-1 のリン酸化レベルの低下が見られた。したがって、これらの因子のリン酸化制御は松果体に内在する光受容体の支配下に働くことがわかった。一方、興味深いことに、ATF-2 のリン酸化リズムは培養条件下では消失した。つまり、松果体における ATF-2 のリン酸化リズムは内因性のものではなく、他の時計器官からの入力に起因すると考えられた。

次に、CREB、ATF-1 および ATF-2 が松果体の時計に入力する可能性を検証するために、*cPer2* 遺伝子プロモーターに CREB/ATF-1 (CREB または ATF-1、または両者) と ATF-2 が結合するか否か、クロマチン免疫沈降法を用いて調べた。その結果、CREB/ATF-1 と ATF-2 はいずれも、生体内において *cPer2* 遺伝子プロモーターに結合することが判明した。そこで次に、CREB または ATF-2 が *cPer2* プロモーターの CRE 配列を介して転写を活性化する可能性を、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。その結果、HEK293EBNA 細胞において CREB は *cPer2* プロモーターを弱いながら活性化したものの、これと同程度の活性化は CREB のリン酸化部位に変異 (Ser133→Ala) を導入した場合、または *cPer2* プロモーターの CRE 配列に変異を導入した場合にも見られた。ATF-2 も *cPer2* プロモーターを活性化したが、この活性化は ATF-2 のリン酸化部位 (Thr69, Thr71, Ser91→Ala) および CRE 配列に依存していた。以上から、ATF-2 は CRE 配列を介して *cPer2* プロモーターを活性化できるのに対し、このプロモーターに対する CREB の効果は弱いと考えられた。

以上の解析を通じて本研究により、ニワトリ松果体において CREB Ser133 と ATF-1 Ser63 のリン酸化は光によって制御されるのに対し、ATF-2 Thr53 のリン酸化は概日時計の支配を受けることを明らかにした。また、これらの転写因子はいずれも *cPer2* プロモーターに生体内において結合していることを示した。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、ATF-2 が *cPer2* プロモーターの CRE 配列を介して転写を活性化する可能性を示すことができた。ATF-2 については時計機能への寄与はこれまで報告がなく、時計の新たなコンポーネントとして ATF-2 を本研究により始めて見出した。松果体において ATF-2 のリン酸化は外因性の時計制御を受けることから、本研究の結果は時計組織間の同調についての新たな理解につながると考えられる。