

論文の内容の要旨

論文題目 Novel photic-input pathway of the circadian clock system
in the chicken pineal gland

(ニワトリ松果体における概日時計の光入力系の分子解析)

氏名 羽鳥 恵

多くの生物は、地球の自転と公転がもたらす 24 時間周期の環境変動に適応するため、約 1 日周期の生物時計、すなわち概日時計を進化の過程において獲得し維持してきた。概日時計の周期の長さは正確には 24 時間でないため、地球上の明暗周期に対して概日時計の時刻（位相）は進みすぎたり、遅れたりする。この「ずれ」を補正するため、概日時計の位相は外界からの光刺激に応答して変化（シフト）する。この位相シフトには時刻依存性があり、本来夜にあたる時間帯（主観的夜）の前半（夜の始まり）に光刺激を受けると位相は後退し、主観的夜の後半（夜明け前）の光刺激では位相は前進する。一方、本来昼にあたる時間帯（主観的昼）に光刺激を受けても概日時計の位相は殆どシフトしない。このような時刻依存的な光位相シフトは概日時計の重要な特性の一つであるが、その分子メカニズムは未だ謎に包まれている。ニワトリの松果体は概日時計機能と共に、位相シフトに必要な内在性の光受容能を持つことから、概日時計の位相制御機構の優れた研究材料として広く用いられてきた。当研究室においては、時刻依存的な光位相シフトの分子機構を理解するために、ニワトリ松果体を実験材料に用いてディファレンシャルディスプレイ解析が行われ、主観的夜の前半もしくは後半に光誘導される遺伝子が単離された。その結果、主観的夜の前半の光刺激によって発現誘導される遺伝子の一つとして *E4bp4* が同定された (Doi M. *et al.* [2001] *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA. 98, 8089-8094)。一方、申請者は主観的夜の後半の光刺激によって発現誘導される遺伝子に注目した。そのうちの一つである A78 クローンの全コード領域の塩基配列を決定した結果、560 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていることが判明した。このタンパク質はグルタミンに富む領域を有し、さらに coiled-coil 領域と核移行シグナルをもつと予想された。

ニワトリ松果体における A78 発現量の日内変化および光誘導の時刻依存性を RT-PCR 法により解析した結果、A78 の mRNA 量は主観的夜の後半の光刺激によって顕著に増大するだけでなく、明暗周期および恒暗条件において明瞭な発現リズムを示すことが判明した。この結果から、A78 遺伝子の発現は外界からの光情報と概日時計からの時刻情報の両方に制御されていることが示唆され、この遺伝子を *Lcg* (*Light-inducible and clock-controlled gene*) と命名した。続いてタンパク質レベルでの解析を進めるために、LCG に対する特異的な抗体を作製し、様々な臓器における発現量の違いを調べたところ、LCG タンパク質はニワトリの松果体および網膜に限局して発現していた。両組織はいずれも、時計の発振系と光入力系を併せ持つ組織であり、時計機構と LCG との関連が示唆された。

概日時計の発振機構においては、時計タンパク質の細胞内での局在変化が重要なステップであることが知られている。この点に注目し、LCG タンパク質の細胞内局在を解析した。LCG と ECFP (シアン色蛍光タンパク質) との融合タンパク質を、COS7 細胞や 293EBNA 細胞などの培養細胞に強制発現させたところ、核の近傍にドット状の蛍光シグナルが観察された (図 1-i)。シグナルの位置や形態から、LCG タンパク質は中心体に局在するのではないかと推定し、中心体のマーカータンパク質である γ -tubulin に対する抗体を用いた染色を試みた。その結果、LCG タンパク質は γ -tubulin と共局在することが判明し (図 1-iii)、強制発現させた LCG タンパク質は中心体に局在することが確認された。さらに、ニワトリ松果体タンパク質を細胞内オルガネラ成分に分画し、ウェスタン

ブロット解析に供したところ、LCG と γ -tubulin の分布パターンは互いに類似していた。この両者が相互作用している可能性を探るために、松果体もしくは COS7 細胞を実験材料に用いて共免疫沈降実験を行ったところ、LCG と γ -tubulin は両細胞において共免疫沈降された。概日時計に関連する分子が中心体に局在するという報告はこれまでになく、以上の結果は、時計と中心体との関連を示唆する初めての知見といえる。

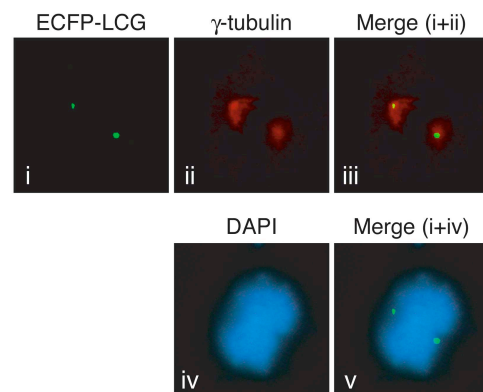


図1 LCGタンパク質の細胞内局在

COS7細胞に強制発現したLCGは γ -tubulinと共局在し、LCGは中心体に局在すると考えられる。

申請者は続いて、*E4bp4* や *Lcg* の時刻特異的な光誘導の根底にある転写調節機構を明らかにしようと考え、前述のディファレンシャルディスプレイ解析において単離された2つの遺伝子、*StarD4* および *Insig-1* に注目した。これらは *E4bp4* と同様に、主観的夜の前半の光刺激によって mRNA 量が上昇していた。興味深いことに哺乳類においては、両遺伝子は転写因子 SREBP による発現制御を受ける。SREBP はコレステロールの合成や取り込み、あるいは脂肪酸や中性脂肪の合成に関連する 30 個程度の遺伝子（図 2）の発現を調節することが報告されており（Horton J. D. *et al.* [2003] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 12027-12032）、このターゲット遺伝子群の中に *StarD4* および *Insig-1* が含まれていた。これらの知見から、主観的夜の前半の光刺激によって SREBP が活性化し、その結果、SREBP ターゲット遺伝子群の発現量が上昇するのではないかと予想した。この可能性を検証するため、光応答を示すニワトリ松果体遺伝子群を DNA マイクロアレイ（Affymetrix Chicken Genome Array; 37,703 プローブセットを含む）によって網羅的に探索した。具体的には、生後 8 日齢のヒヨコ（オス）に対して主観的昼（CT6）、主観的夜の前半（CT14）および主観的夜の後半（CT22）の3つの時間帯において1時間の光照射を行い、光照射を行わなかった対照群と松果体遺伝子の発現量を比較した。その結果、SREBP のターゲット遺伝子群のうち、コレステロール代謝に関連する遺伝子群が主観的夜の前半の光刺激によって顕著に発現上昇することが判明した（図 2）。さらに、松果体の核内における SREBP-1 のタンパク質量は、主観的夜の前半の光刺激によって顕著に増加することをウェスタンブロット解析により明らかにした。

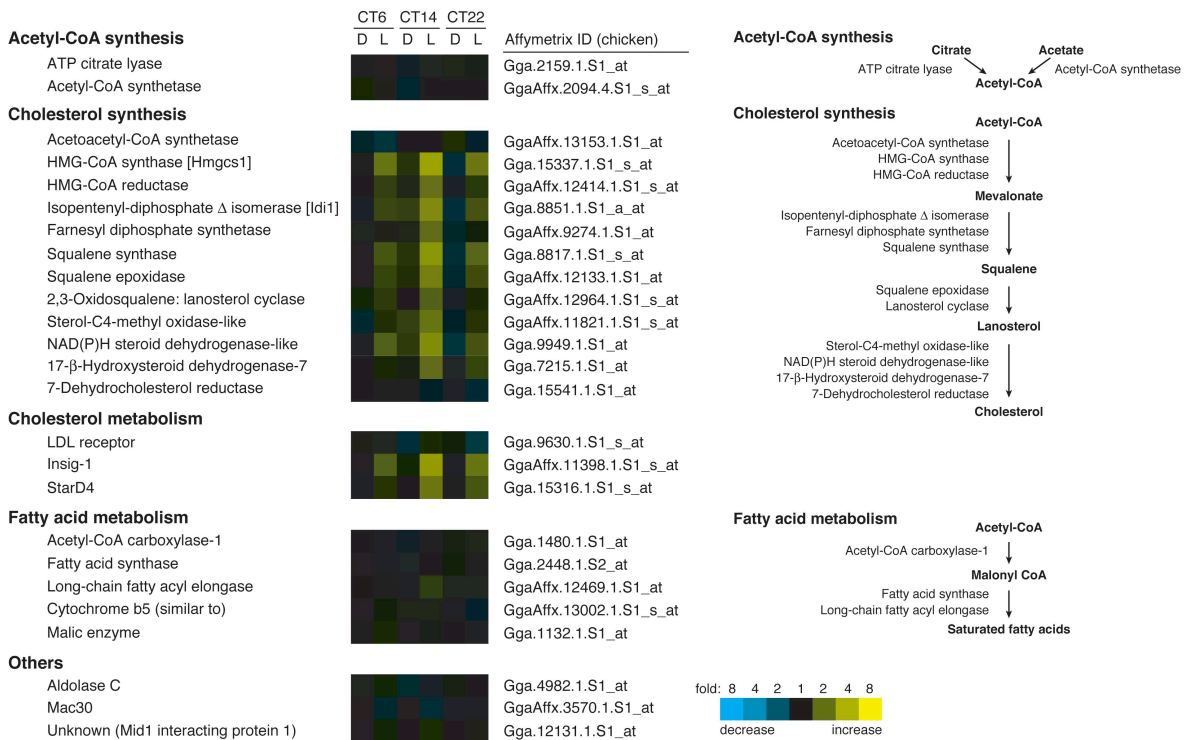


図2 SREBPのターゲット遺伝子群の光応答

遺伝子名は Horton J. D. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 12027-12032 に従った。L, 光照射あり; D, 光照射なし

このマイクロアレイ解析において、光刺激によってシグナル強度が2倍以上に上昇するプロンプセットが253個存在した。これらを発現量の変化に基づき、クラスター解析によって分類したところ、*StarD4*、*Insig-1* や *HMG-CoA synthase* などの SREBP ターゲット遺伝子が一つのクラスターの中に含まれることが判明し、さらに、このクラスターには時計遺伝子 *E4bp4* が含まれていた。つまり、SREBP ターゲット遺伝子群と *E4bp4* の光応答パターンは類似しており、SREBP が *E4bp4* の光誘導を担う重要な因子である可能性が考えられた。*E4BP4* は時計遺伝子 *Per2* の転写抑制を介して光位相シフトに関与することが示唆されているが、光による *E4bp4* の発現調節機構は不明であった。そこで、SREBP の活性化の抑制が *E4bp4* の光応答に与える影響を検証した。SREBP は小胞体に存在する膜貫通タンパク質として合成され、その後、ゴルジ体へと輸送され、S1P および S2P という2つのプロテアーゼによる段階的なプロセッシングを受けて活性化される。S1P を阻害するセリンプロテアーゼ阻害剤である AEBSF を培養松果体細胞に投与したところ、主観的夜の前半の光刺激による *StarD4* および *E4bp4* の発現上昇が抑制された。この結果は *E4bp4* の光誘導に SREBP が関与する可能性を支持している。SREBP は SRE 配列 (YCAYNICAY, Y=pyrimidine) を認識するが、ニワトリ *E4bp4* 上流配列をクローニングしたところ、この配列が存在することが明らかになった。*E4bp4* が SREBP の新たなターゲット遺伝子である可能性を検証するため、*E4bp4* 上流配列を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、活性化型 SREBP は *E4bp4* 上流配列からの転写を用量依存的に活性化することが判明した。

以上の解析を通じ、光刺激によって時刻依存的に活性化する遺伝子転写機構の存在を初めて見出すと共に、肝臓においてステロール代謝調節に関連する SREBP 経路が、松果体においては概日時計の光入力に寄与する可能性を示した (図3)。

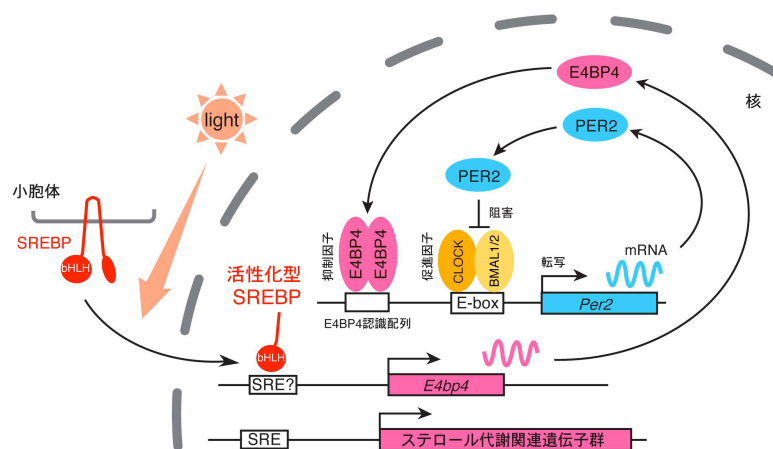


図3 ニワトリ松果体の概日時計システム