

研究課題別評価書

1. 研究課題名

光受容タンパク質を利用した新しい遺伝子機能解析法の開発

2. 氏名

岡野 俊行

3. 研究のねらい

光を情報として利用するために、生物は進化の過程で多様な光応答システムを発達させ、巧みに生体を制御する仕組みを獲得してきた。この仕組みを理解し、さらに利用することは、生命現象の把握と新たな技術の創出につながると期待できる。本研究では、他の光受容分子に比べて機能解析が進んでおらず、基礎科学的にも生物工学的にも発展が期待されるクリプトクロム分子(CRY)に着目した。脊椎動物のクリプトクロムは、概日時計の発振分子としての機能が知られていると同時に、光受容体あるいは光エネルギーを利用した磁気受容体の有力候補として注目されている。しかしながら、光や磁気受容に関する機能の詳細は不明である。そこで本研究では、光スイッチ分子として利用を視野に入れつつ、分子から個体までの幅広い次元でクリプトクロム分子の性状と動物個体の磁気受容能を解析した。

4. 研究成果

上記のねらいのもと本研究では、脊椎動物のクリプトクロム(CRY)の分子生物学的・生化学的解析と動物個体の行動生理学的実験を行った。

様々な脊椎動物において CRY の比較解析を行った結果、ウズラの CRY4、およびアフリカツメガエル(*Xenopus tropicalis*)の CRY1, CRY2, CRY4 の遺伝子を新たに同定することができた。興味深いことに、アフリカツメガエルの CRY1, CRY2 の mRNA は卵巣に非常に高く発現していることを見出した(図1, Kubo et al., in press)。また、タンパク質レベルでの機能解析に向け、ニワトリとゼブラフィッシュの CRY4 それぞれに対するモノクローナル抗体を作成した。作成した抗体を用いた組織化学的解析の結果、ゼブラフィッシュにおいては、卵巣(図2)と脳内の一部のニューロンに CRY4 が発現していることが判明した。このように、ゼブラフィッシュとアフリカツメガエル両方で、卵巣での CRY の高い発現が見られたことから、下等脊椎動物の卵巣において共通の機能を担っている可能性が示唆された。

哺乳類の CRY の解析として、CRY と時計遺伝子 PER, BMAL1/2 の相互作用を調べた。BMAL2 は我々が以前同定した時計遺伝子であり、BMAL1 との機能の違いが不明であった。転写アッセイおよび免疫沈降実験の結果、CRY は BMAL1 に強く相互作用し、一方、PER は

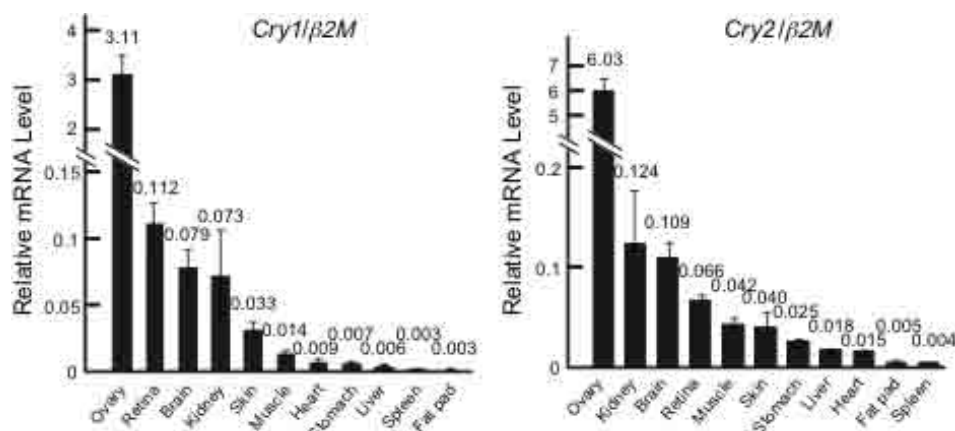


図1 アフリカツメガエル組織におけるクリプトクロム遺伝子発現
XtCRY1, XtCRY2 はいずれも卵巣(Ovary)において非常に高い mRNA 発現を示した。

BMAL2 に強く相互作用することが明らかになった[Sasaki et al., J Biol Chem (2009)]。また、哺乳類における光スイッチを構築するための基盤研究として培養細胞を用いてヒト皮膚の光応答性を調べた[Akiyama et al., FEBS Lett (2009)]。

上記の分子生物学的・生化学的解析と並行して、CRY が関わると推定される磁気受容について、動物個体を用いた実験系の確立を試みた。モデル生物としてヒヨコ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、メダカを対象とし、さまざまな刺激や指標を用いて、磁気に対する応答性を調べた。その結果、ヒヨコ、アフリカツメガエル、メダカでは磁気応答性を支持する明確な結果が得られなかったが、ゼブラフィッシュを用いた実験で有意な結果が得られた。具体的には、水槽の周囲に X-Y-Z の3軸方向にコイルを設置し、それぞれに適当な電流を流し磁場を発生させた。ここでは、磁気の大さは地磁気と同一とし、磁気ベクトルの方向のみを変化させた。ゼブラフィッシュの行動にどのような変化が現れるかを、記録した画像の解析により調べた結果、一定の磁気的方角に遊泳する傾向が見られた(図3)。ゼブラフィッシュはトランスジェニックによる遺伝子発現や、アンチセンスモルフォリノオリゴによる機能阻害が可能のため、この系を利用することによって今後、磁気受容にどのような分子・情報伝達経路が関与しているかを明らかにすることが可能と期待される。

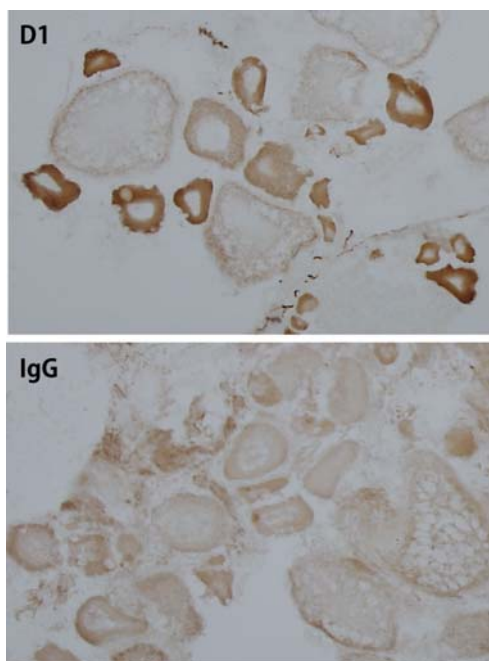


図2 ゼブラフィッシュ卵巣でのクリプトクロム4のタンパク質局在
ゼブラフィッシュ CRY4 の C 末端付近と反応するモノクローナル抗体(D1)を用いて染色した。
IgG は陰性対照実験。

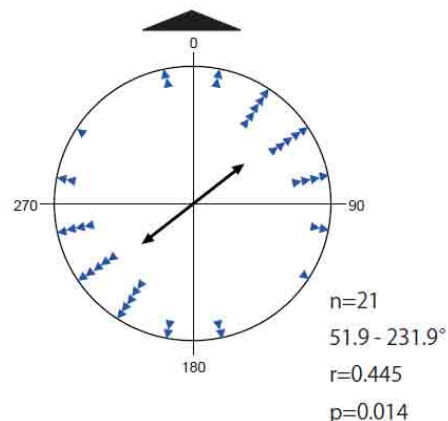


図3 ゼブラフィッシュ成体における磁気的な選好方位

上方向は磁気的な北を、円内の矢頭は個体を示す。ここでは定位の方向でなく軸(双方向性)を解析したところ、一定方向への有意な定位が観察された。

5. 自己評価

本研究では、研究者らが発見したニワトリクリプトクロムの性状解析を行い、さらにそれを光スイッチとして利用することを目標とした。特に、本研究において着目したクリプトクロム4は分子機能のみならず、生体内における局在すら明らかにされていなかったため、応用を目指した研究のための、基盤的な研究にも重点を置いた。その結果、ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルといった遺伝子操作の可能な生物においてクリプトクロムを同定し、タンパク質レベルでの発現を明らかにすることができた。同時に、クリプトクロムが神経系のみならず卵巣や腎臓などにも多く発現していることをつきとめた。このように、モデル生物におけるクリプトクロムの基本的な解析結果は、今後の遺伝学的アプローチによる機能解析のために必須の研究であると考えている。特に、これまで知られていなかった卵巣における高い発現は、クリプトクロムが光受容体や磁気受容体といった機能とは別の機能をもつ可能性を示唆しており、今後の基礎研究への分野開拓的な仕事となったと考えている。

また、本研究の遂行と並行して、永く実体が不明である磁気受容体の実体がクリプトクロムではないかという研究が報告されたこともふまえ、本研究では個体レベルにおける動物の磁気感知能の研究も開始させていただいた。測定機器の開発から実験系を構築し、ゼブラフィッシュが地磁気を感知できることを示すことができた。今後、このアッセイ系を遺伝子組み替え技術と組み合わせることによって、磁気受容の分子メカニズム解析が可能となった。このシステムはおそらくゼブラフィッシュ以外の生物では困難であり、極めてオリジナリティの高い研究に発展させることができると考えている。

本研究では当初、クリプトクロムを光による遺伝子活性の制御に利用することに重きを置いたテーマ設定を行っていた。結果として、ほ乳類細胞における光制御は課題として残すことになったが、上記のように、当該分野の進展に柔軟に対応しつつ、基盤的研究を行えたことは学術的に大変有意義であった。研究室の立ち上げとほぼ同時期に研究提案を採択いただき、研究室の整備だけでなく、上記のように今後の研究の柱となるような萌芽的な成果を挙げることができたことに心より感謝している。

6. 研究総括の見解

当研究者の見出したニワトリ由来のクリプトクロム(CRY)を光で CRIP 結合を制御して転写活性につなげたことは高く評価出来る。まだ基礎的研究の段階であるが、この系が遺伝子発現のための光スイッチに用いる制御方法としてその応用性への期待が大きい。ほ乳類での発現も目指してほしい。基礎研究としては CRY のフラビンへの光照射で CRIP が解離するメカニズムや磁気センシング機構も解明してほしい(構造生物学者、生物物理化学者と協同で)。今後の研究発展に大きな期待が持てる。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

- (1) 論文(原著論文)発表
 - 論文(国際)

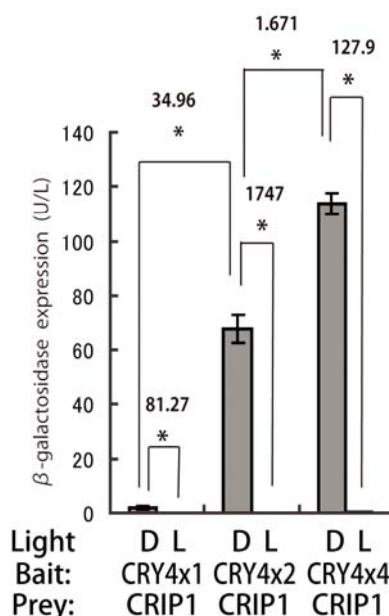


図6 クリプトクロムのタンデムリピート化による相互作用の強化

・Akiyama M., Okano K., Fukada Y., Okano T.
Macrophage inhibitory cytokine MIC-1 is upregulated by short-wavelength light in cultured normal human dermal fibroblasts.
FEBS Lett, 583, 933-937 (2009)

・Kubo Y.*, Takeuchi T. *, Okano K., Okano T. (*Equal contribution)
Cryptochrome genes are highly expressed in the ovary of the African clawed frog, *Xenopus tropicalis*.
PLoS ONE, 5(2), e9273 (2010)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件(出願公開前)

(3) 著書

・岡野俊行、深田吉孝 第6章、概日リズムの分子機構
シリーズ21世紀の動物科学、第9巻 動物の感覚とリズム
培風館, pp126-147 (2007).

・岡野俊行 クリプトクロムの光反応と生理機能
「動物の多様な生き方1 見える光、見えない光」
共立出版(編集 日本比較生理生化学会), pp.114-133 (2009).

(4) 学会発表

学会発表(国内)

・東美幸・久保葉子・岡野恵子・岡野俊行 (早大理工)
ニワトリ視細胞内節に特異的に発現する新規タンパク質 CRIP
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会、合同大会
2007年12月11日(神戸)

・竹内崇裕(早大理工)・久保葉子(早大理工)・岡野恵子(早大理工)・岡野俊行(早大理工、JST)
アフリカツメガエル(*Xenopus tropicalis*)における Cry4 遺伝子の同定と発現解析
日本動物学会第79回大会
2008年9月6日(福岡)

・武部明(早大理工)・鯉沼正美(早大理工)・久保葉子(早大理工)・岡野恵子(早大理工)・岡野俊行(早大理工、JST)
ゼブラフィッシュは光と地磁気に依存して定位する。
日本動物学会第80回大会
2009年9月19日(静岡)

・浅野友彦(早大理工)・渡隆爾(早大理工)・久保葉子(早大理工)・岡野恵子(早大理工)・岡野俊行(早大理工、JST)
ヒヨコ網膜におけるクリプトクロム相互作用分子のプロテオーム解析
第82回 日本生化学会大会
2009年10月24日(神戸)

・小林拓司(早大理工)・北原拓(早大理工)・久保葉子(早大理工)・岡野恵子(早大理工)・岡野俊行(早大理工、JST)

ゼブラフィッシュクリプトクロム 4 に対するモノクローナル抗体の作製とその性状解析
第82回日本生化学会大会
2009年10月24日(神戸)

(5)招待講演

招待講演(国内)

・岡野俊行(早大理工)・久保葉子(早大理工)・秋山正志(早大理工)・深田吉孝(東大院理)
クリプトクロムファミリー分子の多様性
日本時間生物学会、第13回学術大会
2006年11月30日(東京)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Yoshitane H., Takao T., Satomi Y., Du N.-H., Okano T., Fukada Y.

Roles of CLOCK phosphorylation in suppression of E-box-dependent transcription.
Mol Cell Biol, 29: 3675-3686 (2009).

・Sasaki M., Yoshitane H., Du NH., Okano T., Fukada Y.

Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role
and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription.
J Biol Chem, 284, 25149-25159 (2009)

・Hirota T., Kon N., Itagaki T., Hoshina N., Okano T., Fukada Y.

Transcriptional repressor TIEG1 regulates Bmal1 gene through GC box and controls
circadian clockwork.
Genes Cells, 15, 111-121 (2010).