

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14646

研究課題名(和文)哺乳類非オプシン型タンパク質による概日光受容メカニズムの解明

研究課題名(英文)Functional analysis of mammalian CRY protein in photo-reception

研究代表者

坪田 有沙(平野有沙)(Tsubota, Arisa)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60806230

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):概日時計に入力する光応答機構は視覚情報を伴わない非視覚光受容と呼ばれる。本研究計画では、哺乳類CRYの概日光応答における機能を再検証し、新規光応答メカニズムに分子レベルで迫ることを目的とした。網膜特異的にCry1を欠損したところ、マウスは10ルクスの光環境下では明暗サイクルに同調できなかった。培養細胞を用いた再構築系を用いて、CRYがOPN4光受容活性に及ぼす影響を調べたところ、Cryの発現によって光受容シグナリングの活性化が亢進する一方、機能阻害では活性化が減弱した。生体内においても眼球におけるCRYタンパク質が概日光受容に関与しており、その分子メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日時計は約1日周期の概日リズムを生み出す原動力である。24時間型社会と呼ばれる現代社会では夜間においても強い光に曝露され、体内リズムと外界の明暗サイクルとの間にズレが生じやすい。概日リズム障害の治療として光療法は安全かつ簡便で、極めて有効なツールである。そのため、概日時計に入力する光応答機構を理解することは概日リズム障害の発症機序の解明とその解決に不可欠であるが、視覚情報を伴わない非視覚光受容の分子的理解は遅れている。本研究は、哺乳類において新たにCRYタンパク質が非視覚光受容に必須であることを示し、その分子メカニズムに迫ったものであり、概日リズム障害の治療という観点でも極めて重要である。

研究成果の概要(英文):Non-visual photo-reception contributes to resetting of the circadian clock. In the modern society, the circadian disorder recognized as misalignment of body clock and environmental cycle is a serious issue. In mammals, OPN4 is known as a circadian photo-receptor, while it is still unknown whether a putative photoreceptor, CRY, functions in circadian light-resetting. To investigate the function of CRY in photo-entrainment, we generated retina-specific Cry1 conditional knockout mice. The mice showed free-running even in light-dark cycle. Jet lag experiment did not affect the free-running activity in the knockout mice, while control mice showed re-entrainment to new light-dark schedule. We also examined the effect of CRY on photo activation of OPN4 in cell culture. The expression of Cry1 increased Gq signaling mediated by OPN4. Knockdown of Cry1 and Cry2 decreased the activity of OPN4, suggesting that CRY has functional interaction of OPN4 and contributed to light-sensing.

研究分野：分子生物学

キーワード：概日時計 概日リズム CRY

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は自律的に時を刻む計時システムを内在し、外界環境へ適応する。特に、地球の自転周期にあわせた概日性の生理リズムを生み出す概日時計(サーカディアンクロック)は、下等生物から高等生物まで広く観察される。哺乳類においては、概日時計の中樞は視床下部のごく微小な神経核である視交叉上核(SCN)に存在している。SCNの概日時計は網膜を介して光情報を入力することで外界の明暗サイクルに同調し、個体としてうまく調和のとれた生理リズムを生み出す。現代社会においては、体内リズムと外界の明暗サイクルの乖離がもたらす概日リズム障害が問題視されている。一方、光による概日時計の制御は概日リズム障害の発症に関わるだけでなく、リズム障害の治療としても安全かつ簡便で、極めて有効なツールであり光療法と呼ばれる。つまり、概日時計の光同調システムの理解がリズム障害の予防と解決に極めて重要であると考えられる。しかし、分子レベルでシグナリング機構の解析が進む視覚型の光受容に比べて、概日時計制御に関わる非視覚光受容の分子メカニズムの理解は遅れている。

2. 研究の目的

概日時計や睡眠中枢に入力する光応答機構は視覚情報を伴わない非視覚光受容と呼ばれる。非視覚光受容の分子メカニズムを理解することは、概日リズム障害の発症機序の解明とその解決に不可欠である。哺乳類のCRYPTOCHROME(CRY)はハエにおける概日時計の青色光受容体CRYのホモログであり、網膜において高い発現を示す。当初はその光受容タンパク質としての役割が期待されたが、CRYが概日時計の発振系の中樞因子であることが判明した。そのため現在に至るまで光非依存性の機能ばかりがハイライトされ、哺乳類の光受容における機能は未知のままであった。しかし、視細胞(桿体と錐体)変性(*rd/rd*)マウスにおいて、*Cry*を欠損させると概日光同調の光受容体として知られているOPN4(メラノプシン)が発現する神経節細胞は正常であるにも拘わらず非視覚性の光反応が全く見られなくなる。つまり、従来提唱されてきた概日光受容体であるOPN4だけでは説明できない未同定の光受容メカニズムの存在があるはずであるが、その実態に迫った研究はなく、分子レベルでのシグナル伝達機構も謎に包まれている。そこで本研究計画では、哺乳類の非オプシン型光感受性因子であるCRYの概日光応答における機能を再検証し、哺乳類における新規光応答メカニズムに分子レベルで迫ることを目的とした。特にOPN4(メラノプシン)との機能連関を調べ、これらの因子がどのように協調的な概日光同調を担うのかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では哺乳類CRYの光シグナル伝達分子としての機能を検証し、CRYによる光依存的な行動制御を担う新規メカニズムを明らかにすることを目的とした。マウス*Cry1*遺伝子の機能解析を部位特異的に行うため、Creリコンビナーゼを発現した細胞のみで機能欠損できるようなコンディショナルノックアウトマウス(*Cry1* *fllox*マウス)を作成した。機能ドメインを含むエキソンを挟むようにloxP配列を配置したターゲティングベクターを作成し、CRISPR-Cas9システムを用いてターゲット配列をマウスゲノムにノックインした(図1, A)。このマウスの眼球にCreリコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)をインジェクションしてマウス輪回し行動を観察し、明暗サイクルへの同調性を調べた。最初に十分に強い光強度でマウスの概日時計を明暗サイクルに同調させたあと、10ルクスの弱い光条件にして6時間の位相後退を行った。10日後に元の明暗サイクルに戻し、マウスの行動リズムが再同調するかどうかを確認した。また、培養細胞を用いてOPN4に依存した光受容シグナリングを細胞内に再構築した。具体的には、NIH3T3細胞にhOPN4-mCherry発現ベクターおよびNFATプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入した発現ベクターをトランスフェクションし、Gqタンパク質シグナリングをルシフェラーゼの発光によってリアルタイムでモニタリングできるようにした。細胞に1時間の青色光(480nm)を照射し、光依存的なGqタンパク質シグナリングを評価した。この実験系を用いて様々な変異体CRYを発現させてOPN4の光活性化に対する影響を調べた。一方、shRNAによって*Cry1*と*Cry2*を機能阻害した条件でOPN4による光活性化への影響も観察した。

4. 研究成果

まずはじめに作成したコンディショナルノックアウトマウスの性状解析を行った。マウス視交叉上核 (SCN) に Cre リコンビナーゼと GFP の融合タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を導入し、SCN における CRY1 の発現を免疫組織化学により解析した。Cre を発現したマウスにおいては、CRY1 の発現が大きく減弱しており、組織特異的なノックアウトが可能であると考えた (図 1, A, B)。

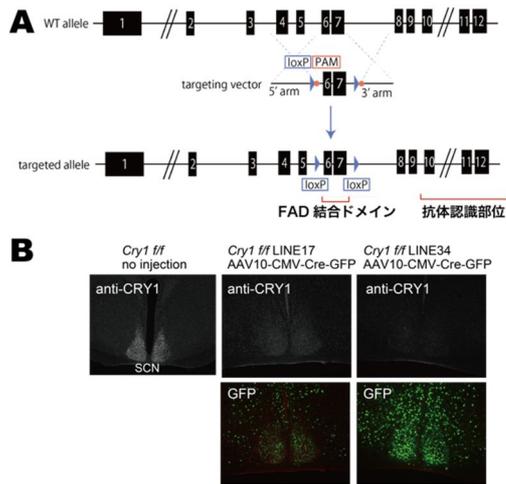


図 1, Cry1 flox マウスの作製

A. ターゲティングストラテジー。CRISPR-Cas9 を用いて機能ドメインを含むエクソンの両端に loxP 配列を挿入した。B. マウスにおける Cry1 遺伝子欠損の確認。マウス SCN に Cre を発現する AAV をインジェクションし、CRY1 の発現を免疫組織化学により確認した。

このマウスを用いて網膜特異的な *Cry1* コンディショナルノックアウトマウスを作成した。網膜特異的な *Cry1* ノックアウトマウスは、10 ルクス光環境下では明暗サイクルには同調できずフリーランすることが明らかになった (図 2)。一方、10 ルクスにおいても、GFP を発現させたコントロールのマウスでは同調可能であった。明るい条件では完全には同調が止まらなかったため、インジェクションの効率およびホモログ遺伝子である *Cry2* の寄与も考え、*Cry2* のコンディショナルノックアウトマウスの作製と OPN4 陽性細胞で Cre を発現するドライバーマウスの作製も行った。

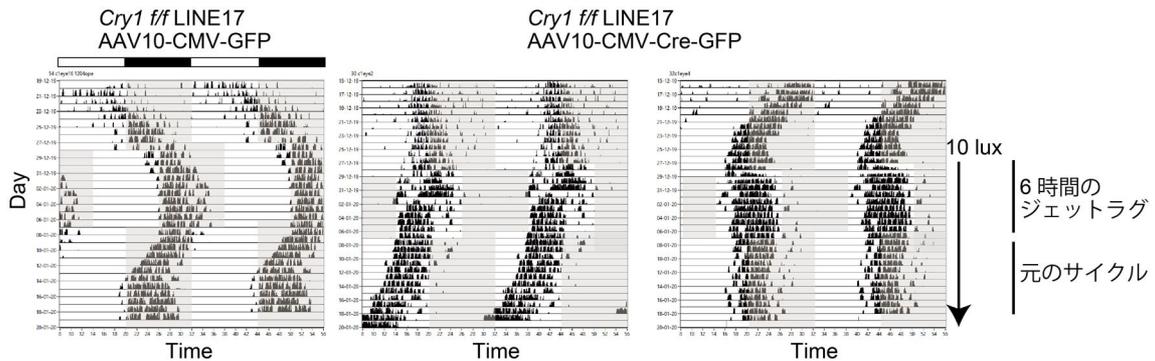


図 2. 網膜特異的 *Cry1* 欠損の効果

マウスの輪回し行動リズムをダブルプロット (横軸 48 時間) した。アクトグラム影は暗期を示す。コントロールのマウスにおいては、明暗サイクルに同調した行動リズムが観察される。一方、Cre を網膜で発現させたマウスにおいては、弱い光条件 (10 ルクス) においてはフリーランし、明暗サイクルに同調しなかった。

培養細胞を用いた再構築系を用いて、CRY タンパク質が OPN4 に依存した光受容シグナリングに及ぼす影響を調べたところ、CRY タンパク質の発現によってシグナリングが活性化することが明らかになった (図 3, AB) 一方、*Cry1* と *Cry2* の機能阻害では OPN4 に依存した光受容シグナリングの活性化が大きく減弱することを見出した (図 3, C)。さらに活性化の亢進に必要なドメインの絞り込みを行ったところ、概日時計の発振に必要なと思われる CRY1 のコイルドコイルを含む C 末端は OPN4 の機能亢進には必要ないことが明らかになった。つまり、CRY1 による OPN4 の活性化の亢進は CRY の転写抑制機能とは関係ない可能性が高い。

これらの研究成果により、生体内においても眼球における CRY タンパク質が概日光受容に関与していること、さらにその分子メカニズムの一端が明らかとなった。

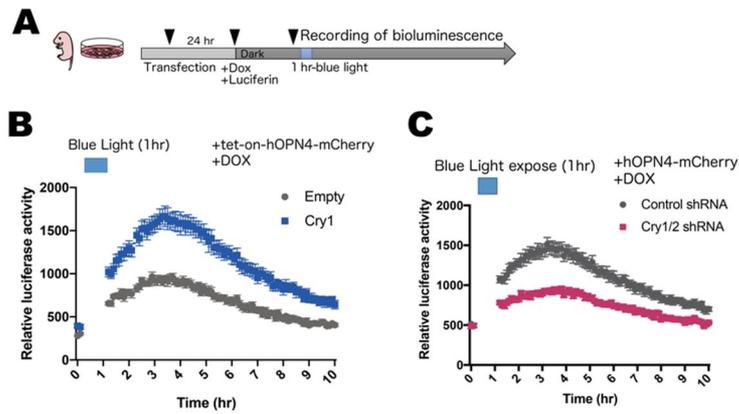


図3. OPN4 光シグナリングに対する CRY の効果。

A. 実験スケジュール。B. CRY1 を強制発現させた際の Gq シグナリングの活性化。コントロールに比べて、OPN4 に依存した光シグナリングが上昇した。C. *Cry1* と *Cry2* のノックダウンコンストラクトをトランスフェクションした際の光シグナリングへの影響。CRY を機能阻害すると光活性化が抑制される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Arisa Hirano
2. 発表標題 Function of CRY in entrainment of the circadian clock
3. 学会等名 Asian Forum on Chronobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arisa Hirano
2. 発表標題 Function of CRY in photo-sensing in mouse retina
3. 学会等名 Society for research on biological rhythms, 2020 meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野 有沙
2. 発表標題 マウスCRYの概日リズム制御における役割
3. 学会等名 第58回生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野 有沙
2. 発表標題 概日時計タンパク質Cryptochromeの制御とその破綻
3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野有沙
2. 発表標題 ヒト遺伝学を用いた睡眠パターン形成機構のアプローチ
3. 学会等名 東京都医学総合研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野有沙
2. 発表標題 A human mutation causes Advanced Sleep Phase by modulating the circadian clock in humans.
3. 学会等名 日本神経科学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野有沙
2. 発表標題 睡眠覚醒のタイミングを決定する概日時計の新規メカニズム
3. 学会等名 日本睡眠学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----