

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 月 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657042

研究課題名（和文） 光受容タンパク質を利用した遺伝子活性制御の試み

研究課題名（英文） A trial of gene-activity regulation by using photoreceptor proteins.

研究代表者

岡野 俊行（OKANO TOSHIYUKI）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40272471

研究成果の概要（和文）：

光受容タンパク質であるクリプトクロム(CRY)に着目し、CRYを利用した光による遺伝子活性制御を試みた。光センサーとしてのCRYの解析のためにまず、種々の動物に由来するCRYの解析を行った。各種動物（アフリカツメガエル、ウズラ、ゴマアイゴ等）よりクリプトクロム遺伝子の全長cDNAを単離した。これらのCRYは概日時計タンパク質であるBMALやCLOCKと相互作用する可能性が考えられるため、まず、哺乳類細胞を用いた転写アッセイによる転写制御の有無を解析した。その結果、アフリカツメガエルのCRY1、CRY2は転写を抑制したものの、アフリカツメガエルCRY4、ゴマアイゴCRY1、CRY3は転写を抑制しなかった。このことは、これらが概日時計とは異なる機能に関わる可能性を示唆している。そこで、ゴマアイゴの脳において発現を調べたところ、月周時計に関与する可能性が見いだされた。これと並行して、ニワトリのCRYと相互作用する分子をツーハイブリッドスクリーニングにより探索した。その結果、複数のCRYの相互作用分子を単離することができ、これらをCRIP1-5と命名した。CRYとCRIPの相互作用を利用し、真核細胞である酵母において任意の遺伝子のスイッチングに成功した。

上記のように本研究では、CRYの新機能の糸口をつかむと同時に、光依存的な遺伝子発現調節システムを構築し、新たにスイッチの候補となる分子を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In order to utilize cryptochrome (CRY) as a molecular light switch for regulation of gene activity, we characterize CRYs in a variety of animals. Complementary DNA encoding cryptochromes were isolated from vertebrates such as *Xenopus*, quail, goldlined spinefoot. Because these CRYs are considered to interact with circadian clock components such as CLOCK and BMALs, we investigated whether the CRY proteins could interact with and inhibit the activities of those clock proteins by transcriptional analysis. *Xenopus* CRYs (XtCRY1 and XtCRY2) inhibited the transcriptional activities, suggesting that those CRYs work as circadian clock components in *Xenopus*. Next, we investigated mRNA expression of CRYs in the goldlined spinefoot, and observed that the CRY mRNA levels showed clear lunar rhythms with their peak at the first quarter moon. This strongly suggests that CRYs function for not only circadian clock but also lunar clock.

Next, we searched putative CRY-interacting proteins by yeast two-hybrid screening. We identified several possible interactors, and interestingly, some of them showed light-dependent interaction, showing that they can be used as light-dependent switchable molecules. This system can be applied to regulation of gene activity by light at the transcription levels, and future experiments should be planned for light-dependent regulation of the protein localization, interaction, etc.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光生物

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、脊椎動物の網膜や脳を材料に、オプシンをはじめとする光センサー分子の解析を行ってきた。近年では、概日時計の発振系や光入力系に関わる分子の解析を行っている。光センサー分子CRY(クリプトクロム)は、ショウジョウバエにおいて光(青色光)を受容し、光依存的に時計遺伝子産物BMALと相互作用することが知られている。研究代表者らはこれまでに、脊椎動物において光センサーの候補分子として多数のCRY分子を同定しており[Yamamoto *et al.*, 2001, *Neuroscience Lett.* 313,13; Kubo *et al.*, 2006, *J Neurochem* 97,1155; 竹内ら, 2008, 日本動物学会年会; 小林ら, 2009, 日本動物学会年会、他多数]、さらにCRYと相互作用する分子を同定している。CRYは、光センサーとしての機能が期待されているだけでなく、磁気受容分子としても期待されており、その分子機能を明らかにすることは、電磁波や磁気のセンシングに関わる新しい分子メカニズムの解明に直結する。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者のこれまでの基礎的研究の蓄積を生かして、青色光センサー分子であるクリプトクロム(CRY)を光スイッチとして利用した新しい光生体制御系を構築することを目指している。これまでに植物のフィトクロームをはじめいくつかのタンパク質において、光シグナルによって遺伝子やタンパク質の活性や挙動を制御するシステムが報告されているが、まだまだ実用化されているものは少なく、CRYを光センサーとして利用する系の報告はない。そこで本研究ではまず、CRYとその相互作用分子を利用して、分子機能を光で制御する系の確立を目指す。

また、CRYはまだまだ機能不明な分子であるため、新規の機能を探るべく、さまざまな光応答性を示す動物種において、CRYと相互作用する分子をさらに探索し、同時に、CRYがどのような光関連機能に関わっているのかを検討する。

3. 研究の方法

CRYの新規機能の探索として、アフリカツメガエルや月齢周期に応答するゴマアイゴ、あるいは恒暗環境に棲息する深海魚のCRYの解析を行う。ゴマアイゴは琉球大学において飼育されているものを用い、まずはCRY遺伝子の単離を試みる。次に、時刻や月齢に応じて、各臓器においてCRYが変動するかどうかをRT-PCR法によって解析する。日内変動や月齢依存的な変動が見られれば、CRYの発現場所の解析結果とあわせて、概日時計や月齢認知機構との関連を考察する。

これらの研究と並行して、本研究において新たに、光による生体制御系の構築を目指す。具体的にはまず、CRYと相互作用分子の光依存的な解離会合を利用し、酵母や哺乳類培養細胞において、光による遺伝子制御技術の確立を目指す。新たなCRY相互作用分子の探索には、種々の動物に由来するCRYのcDNAを用いて、酵母のツーハイブリッド系を用いた解析を行う。つまり、CRYとDNA結合ドメインを融合させたものをBaitあるいはPreyとして用い、相互作用分子と結合して発現するレポーター遺伝子の発現に光依存性があるかどうかを検討する。ここでは、網膜・脳・皮膚などCRY発現部位のcDNAライブラリーを用いたツーハイブリッドスクリーニングを進める。光依存的な転写制御が出来た場合は、任意の遺伝子をコントロールできることを利用して、細胞が光に

よって死滅あるいは生育阻害を受けるよう設定する。つまり、光刺激の有無によって細胞の増殖をセミ *in vivo* において制御する系をつくる。たとえば緑色蛍光タンパク質 (GFP) のようなマーカータンパク質を発現させ、光による遺伝子発現制御を可視化し、任意の遺伝子の制御に利用可能であることを明確に示す。培養細胞ではさらに、タンパク質間相互作用の制御系も検討する。CRY は水溶性のタンパク質であるため、適切なシグナル配列を加えることによって、細胞膜上や核あるいはミトコンドリアなど、細胞内のさまざまな部位に局在させ、さらに光により局在の変化を制御することができると期待される。

#### 4. 研究成果

光受容タンパク質であるクリプトクロム (CRY) に着目し、CRY を利用した光による遺伝子活性制御を試みた。光センサーとしての CRY の解析のためにまず、種々の動物に由来する CRY の解析を行った。各種動物のクリプトクロム遺伝子を探索した。新規の CRY として、ウズラ CRY4, アフリカツメガエルより 3 種類の CRY (XtCRY1, XtCRY2, XtCRY4)、ゴマアイゴより 2 種類の CRY (SgCRY1, SgCRY3) 等を同定することができた。定量的 RT-PCR 解析によって、アフリカツメガエルでは、卵巣において Cry の mRNA 発現が非常に高いことが判明した。これらの CRY は概日時計タンパク質である BMAL や CLOCK と相互作用する可能性が考えられるため、まず、哺乳類細胞を用いた転写アッセイによる転写制御の有無を解析した。その結果、アフリカツメガエルの CRY1, CRY2 は転写を抑制したものの、アフリカツメガエル CRY4, ゴマアイゴ CRY1, CRY3 は転写を抑制しなかった。このことは、これらが概日時計とは異なる機能に関わる可能性を示唆している。ゴマアイゴは、月齢に応答することが知られているため、月齢認識に関連する可能性を想定し、その発現変動を調べた。その結果、卵巣においては変動しなかったものの、産卵時期にあたる上弦の月において脳の Cry mRNA 発現量がピークとなり、月周変動を示すことが判明した (図 1)。このことから、ゴマアイゴには月齢同調性の体内時計が存在し、その振動体の一部として CRY 分子が関わっている可能性が示唆された。また、深海魚として水深約 1500 m に棲息するパラビクニンを材料として CRY 遺伝子を探索した。その結果、CRY を同定することができ、転写アッセイにおいて CLOCK および BMAL の転写促進活性を阻害した。このことから光

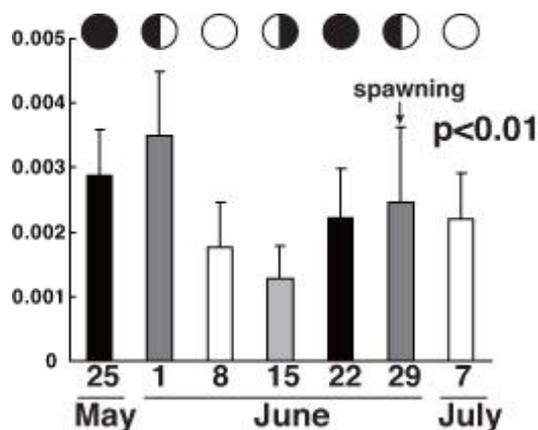


図 1 ゴマアイゴ脳における Cry3 の mRNA 発現の月周変動

のない環境に棲息する深海魚にも概日時計分子が存在することが判明した。概日時計が実際に存在するかどうかを探索することが今後の課題である。

CRY を光センサーとして用いた光制御系の構築に向けて、酵母のツーハイブリッドスクリーニングを行った。その結果、ニワトリ CRY と相互作用する複数の分子が単離され、これらを CRIP1-5 と命名した。そのうち 2 つは光依存的に相互作用した。このことを利用して光スイッチを構築することを考え、レポーターとして GFP や  $\beta$  ガラクトシダーゼを用いた検出系を酵母内で構築した。その結果、光によって酵母の発する蛍光量や  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を明確に制御することに成功した。現在さらに、光スイッチを高等真核細胞内で実現するために、光受容分子を細胞表面上に局在化させて、相互作用分子と同時に蛍光観察できる系を構築している。

以上のように本研究では、CRY の新機能の糸口をつかむと同時に、光依存的な遺伝子発現調節システムを構築し、新たにスイッチの候補となる分子を同定することに成功した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

[1] Fukushima M., Takeuchi T., Takeuchi Y., Hur S.-P., Sugama N., Takemura A., Kubo Y., Okano K. and Okano T. Lunar phase-dependent expression of cryptochrome and a photoperiodic mechanism for lunar phase-recognition in a reef fish, goldlined spinefoot. *PLoS ONE*, 6: e28643 (2011). (査読あり)

[2] 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: e9273 (2010). (査読あり)

〔学会発表〕(計 15 件)

- [1] Light-dependent structural change of chicken cryptochrome 4. H. Mitsui, R. Watari, C. Yamaguchi, T. Asano, Y. Kubo, K. Okano, and T. Okano. 第 34 回 日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 16 日, 横浜.
- [2] Overexpression and spectroscopic analysis of Chicken Cryptochrome4. C. Yamaguchi, T. Maeda, Y. Kubo, K. Okano, and T. Okano. 第 34 回 日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 16 日, 横浜.
- [3] 真核細胞を用いて発現させたニワトリクリプトクロム 4 タンパク質の性状解析. 三井広大, 前田俊徳, 久保葉子, 岡野恵子, 岡野俊行. 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 21 日, 旭川.
- [4] 深海魚バラビクニン *Careproctus rhodomelas* の時計関連分子の解析. 坂田利江, 福代真, 久保葉子, 岡野恵子, 竹村明洋, 三輪哲也, 山本啓之, 岡野俊行. 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 21 日, 旭川.
- [5] ニワトリ CRY に対するモノクローナル抗体の作製および CRY 蛋白質の解析. 金子直道, 岡野恵子, 久保葉子, 岡野俊行. 日本動物学会第 82 回大会, 2011 年 9 月 21 日, 旭川.
- [6] Cryptochromes highly expressed in the ovary of *Xenopus tropicalis*. Y. Kubo, T. Takeuchi, K. Okano, and T. Okano. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB). Jun 3, 2011, Nagoya, Japan.
- [7] Overexpression, purification and characterization of chicken cryptochrome 4. T. Maeda, Y. Kubo, K. Okano, and T. Okano. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB). Jun 2, 2011, Nagoya, Japan.
- [8] 深海魚バラビクニンにおける光受容体遺伝子の同定. 坂田利江, 福代真, 久保葉子, 岡野恵子, 竹村明洋, 三輪哲也, 山本啓之, 岡野俊行. ブルーアースシンポジウム, 2011 年 3 月 8 日, 東京.
- [9] ニワトリクリプトクロムに対するモノクローナル抗体の作製. 金子直道, 岡野恵子, 久保葉子, 岡野俊行. 日本動物学会関東支部第 63 回大会 慶應義塾大学 2011 年 3 月、横浜.
- [10] 月齢周期同調性の魚類におけるクリプトクロム遺伝子の月齢依存的な発現変動. 福代真, 竹内崇裕, 竹内悠記, 許成杓, 洲鎌望, 竹村明洋, 久保葉子, 岡野恵子, 岡野俊行. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸.

[11] 深海生物に概日時計はあるか? 深海性魚類バラビクニンにおける時計遺伝子の探索. 坂田利江, 福代真, 久保葉子, 岡野恵子, 竹村明洋, 三輪哲也, 山本啓之, 岡野俊行. 第 17 回日本時間生物学会学術大会, 2010 年 11 月 21 日, 東京.

[12] 月齢周期に応答する熱帯産魚類ゴマアイゴにおける Cry 遺伝子の解析. 福代真, 竹内崇裕, 竹内悠記, 許成杓, 洲鎌望, 竹村明洋, 久保葉子, 岡野恵子, 岡野俊行. 第 17 回日本時間生物学会学術大会, 2010 年 11 月 21 日, 東京.

[13] ネットイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) における Cry 遺伝子の同定と発現解析. 久保葉子, 竹内崇裕, 岡野恵子, 岡野俊行. 第 17 回日本時間生物学会学術大会, 2010 年 11 月 21 日, 東京.

[14] 深海性魚類バラビクニン *Careproctus rhodomelas* におけるクリプトクロム 1 遺伝子の同定と機能解析. 坂田利江, 福代真, 久保葉子, 岡野恵子, 竹村明洋, 三輪哲也, 山本啓之, 岡野俊行. 日本動物学会第 81 回大会, 2010 年 9 月 23 日, 東京.

[15] ネットイツメガエルの卵巣に高発現するクリプトクロム遺伝子群. 久保葉子, 竹内崇裕, 岡野恵子, 岡野俊行. 日本動物学会第 81 回大会, ポスター, 2010 年 9 月 23 日, 東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡野 俊行 (OKANO TOSHIYUKI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号: 40272471