

氏名	小 林 百 合 こ ばやし ゆ り 合
学位の種類	博 士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 226 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	人 間 ・ 環 境 学 研 究 科 人 間 ・ 環 境 学 専 攻
学位論文題目	概日リズム振動機構におけるゼブラフィッシュ <i>cryptochrom</i> 遺伝子の 機能解析と発現制御機構の解析
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 室 守 教 授 田 口 貞 善 教 授 五 十 棲 泰 人

### 論 文 内 容 の 要 旨

概日リズムとは自由行動やホルモン分泌等が約24時間周期で変動する生物現象であり、内在性の生物時計により形成されている。生物時計の本体は、24時間周期を持った遺伝子発現の量的変動をつくり出す転写制御機構である。この転写制御機構は転写／翻訳に依存したフィードバックループにより制御され、そのループは正の調節（転写活性）と負の調節（転写抑制）を担う時計蛋白質群により構成される。クリプトクロム（*cryptochrome*, CRY）は、負の調節因子であり、自らの転写を抑制する転写抑制因子として生物時計のフィードバックループを構成している。*cry*遺伝子の発現調節機構の解析は時計本体の解明に重要な意味を持つ。そこで、本研究では、ゼブラフィッシュ*cry*遺伝子の転写調節領域の解析をおこない、発現の概日リズムに重要な役割を果たす塩基配列を決定するとともに、ゼブラフィッシュ培養細胞において概日リズムを即時的に検出できるレポーター系を確立した。

既知の配列をもとにゼブラフィッシュcDNAをスクリーニングし、6種類の*cry*遺伝子を単離した。得られた遺伝子4個（*zcry1a*, *1b*, *2a*, *2b*）は転写抑制活性を示したが、他の2個（*zcry3*, *4*）は活性を示さなかった。また、いずれの遺伝子もリズムを持った発現パターンを示したが、朝ピークを持つものと、夕方ピークを持つものに分類された。そこで、これらの中から、同じ発現パターンを示すが、転写抑制活性を持つもの（*zcry1a*）および持たないもの（*zcry3*）の2つを選び、遺伝子発現制御領域を決定する事にした。本遺伝子の特徴は、リズムを持った発現パターンを示すという点である。従って、本遺伝子の発現制御の検討には、生物時計が機能している細胞を使用することが必須となる。ゼブラフィッシュでは、一部の末梢細組織で、光に応答し概日リズムを示すようになる細胞の存在が報告されていた。そこで、国内で得られるゼブラフィッシュ培養細胞について、光により概日リズムを持った遺伝子発現を示すようになる細胞のスクリーニングを行った。

スクリーニングの結果、BRF41細胞を得た。BRF41細胞では、光により概日リズム形成に必要な転写フィードバックループを活性化することができる。この細胞を用い、*zcry1a*, *zcry3* 両遺伝子の上流領域の転写制御領域の解析を行うことにした。まず、上流領域をクローニングし、それらを両端から欠損させた一連のDNA断片を作成した。これらのDNA断片に、レポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を結合させたものをBRF41細胞に導入し、制御領域の同定を行った。導入遺伝子の一時的発現をルシフェラーゼ活性として観察することにより、基本的なプロモーター領域を同定した。その領域内に転写開始点を確認できた。更に、同様な手法で、概日リズムを持った発現に必要な上流領域を決定した。一時的発現では、数日間にわたり安定した発現レベルを測定するのは困難であるため、導入遺伝子が安定に細胞染色体に組み込まれた細胞株を樹立し、その細胞でレポーター遺伝子発現のパターンを測定することにより、概日リズムを示すかどうかの判定を行った。クローニングした上流領域総てを含むコンストラクトでレポーター遺伝子の概日リズムを持った遺伝子発現を確認できた。そこで、欠損変異による解析を行い、*zcry1a*, *zcry3* 各々の概日リズムを持った発現に必要な最小領域を決定した。両遺伝子で同定された領域を相同性検索することにより、共通に保存されている19塩基対の塩基配列を同定することができた。更に、この配列のみで概日リズムを持った発現を誘導できることを明らかにした。興味深いことに、この配列内には、概日リ

リズム形成の正の調節因子 CLOCK/BMAL の認識配列である E-box の典型的な配列は存在しておらず、1塩基変異した E-box 様配列が存在していた。この配列は、CLOCK/BMAL と同じ bHLH 転写因子ファミリーに属する ARNT, HIF の認識配列であった。

ここで確立したルシフェラーゼ活性測定法により、生きたままの細胞で、遺伝子発現変動を観察する事が可能になった。この測定系を用い、BRF41細胞の光に対する概日リズム応答を解析した。光照射により概日リズムを誘導した後、BRF41細胞を恒暗条件に移し、様々な時間に光刺激を与えたところ、光リズムの相転移を観察できた。転移の程度は刺激を与える時間に依存していることが明らかになった。

以上の結果は、ゼブラフィッシュにおける概日リズム形成には、従来考えられていた、CLOCK/BMAL/E-box といった典型的な組み合わせのみでなく、転写因子、結合配列ともにある程度柔軟性を持つ因子・配列が関与している事を示唆している。また、BRF41細胞において光による相転移を観察できた。同様の現象は概日リズムに対する光の典型的作用の一つとして既に報告されているが、多くの場合個体レベルでの行動パターンから示されている。ここで得られた結果は、この様な個体レベルで見られる現象が、細胞レベルでも実際に起こっていることを示す初めての報告である。細胞レベルでの詳細な解析が可能となる事から、ここで確立したリズム測定細胞系は、概日リズム解析に極めて有効であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、クリプトクローム (cryptochrome, *cry*) 遺伝子の転写調節領域の解析を行い、その転写調節領域を用いた細胞レベルでの概日リズム検出系を開発することにより、ゼブラフィッシュ末梢細胞が個体レベルと同等な光応答を示すことを明らかにしたものである。

脊椎動物において、CRY は概日リズムを制御する重要な因子である。概日リズムとは約24時間を一周期とする生命活動の周期的な変動のことを指し、我々人間を含む地球上に生活する多くの生物に広く認められる生物現象である。生物が如何に巧みに地球環境に適応してきたのかを理解する上で興味深い研究対象である。様々な生命活動において概日リズムが観られるが、それらの多くは時計遺伝子のリズムを持った発現により二次的に作り出されたものであり、時計遺伝子の発現制御が概日リズム形成には本質的である。時計遺伝子のリズムを持った発現は、ネガティブフィードバックループといった自律的な転写制御機構で作られており、この機構はほとんどの生物に共通にみられる。ネガティブフィードバックループは転写を活性化する正の因子と、逆に転写を抑制する負の因子から成っている。負の因子の発現が正の因子により活性化されると、負の因子の細胞内量が時間とともに増加する。増加した負の因子は、やがて自らの発現を抑えるようになり、負の因子の細胞内量が徐々に低下していく。これらの過程を繰り返すことにより、転写量のリズムがつくりだされる。CRY 蛋白質はこの負の因子として機能している。その発現制御機構はリズム形成において本質的な部分を担っており、興味深い研究対象である。本研究では、ゼブラフィッシュの2種の *cry* 遺伝子 (*zcry1a* 及び *zcry3*) の発現制御領域を解析し、概日リズムを持った遺伝子発現に必須の領域を同定するとともに、その領域を用い細胞レベルでの概日リズム検出系を開発している。

本研究で対象としている遺伝子は、概日リズム形成に重要な機能を担っており、しかも自分自身がリズムを持った発現パターンを示すという特徴を持っている。従って、本遺伝子の発現制御の検討には、生物時計が機能している細胞を用い行うことが必須となる。そこで本研究では、概日リズムを持った遺伝子発現を示すゼブラフィッシュ細胞をスクリーニングし BRF41細胞を得ている。BRF41細胞では、光照射により概日リズム形成に必要な転写のネガティブフィードバックループが活性化され、概日リズムを持った時計遺伝子発現が誘導される。この様な細胞系を用いて、転写領域の解析をすすめているのが、本研究の特徴の一つである。クローニングした上流領域の欠損変異解析により、プロモーター領域、概日リズムに必要な配列を決定した。概日リズム形成に重要なシスエレメントとして知られている E-box 配列とは異なる、新たな配列を同定している。従来から知られている E-box を介した転写制御のみでなく、より複雑な転写制御系の存在が示唆された。

さらに、BRF41細胞を用いた解析系を利用し、生きたままの細胞で遺伝子発現変動を直接観察する系を確立している。これは、レポーターであるルシフェラーゼ遺伝子を染色体内に組み込んだ細胞株を、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを培地に加え培養することにより、レポーター活性を発光として、経時的に測定するシステムである。この測定系を利用することにより、BRF41細胞の概日リズムに関する特性の詳細な解析を行っている。その中で興味深いのは、光により

誘導されるリズムの位相変化である。光は概日リズムの位相を変化させることができる。この現象は、様々な生物で観察されているが、多くの場合個体レベルでの行動パターンなどを指標とした観察であり、転写レベルでの解析は少ない。BRF41細胞に光パルスを与えることにより、明確なリズムの位相変位を検出した。個体レベルで見られる現象が、個々の末梢細胞でも同様に起こっていることを示した初めての報告である。この結果に特徴的に示されるように、ここで確立したリズム測定細胞系は、今後、細胞レベルでの概日リズム解析に極めて有効であると考えられる。ゼブラフィッシュの特長を活かした、極めてユニークな実験系の確立の報告である。本論文は、人間と環境の問題を総合的に考察し、現在人類の直面している困難な諸問題の根本的解決に資する創造的研究を目指して創設された人間・環境学専攻分子・生命論講座にふさわしい内容を備えたものと言える。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成16年1月26日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。