

博士学位論文

Zebrafish概日時計制御における
Cryptochromeの役割

石川 智子

博士学位論文

Zebrafish 概日時計制御における
Cryptochrome の役割

石川 智子

平成 14 年 2 月

目次

はじめに	1
1.序論	2
1-1. ヒト青色光受容体遺伝子(<i>Cryptochrome(Cry)</i>)のクローニング	2
DNA 光回復酵素	2
青色光受容体	6
1-2. 概日時計における <i>Cryptochrome(CRY)</i> の役割	8
概日時計	8
光受容体としての <i>CRY</i>	10
概日時計本体としての <i>CRY</i>	12

Zebrafish 概日時計制御における *Cryptochrome* の役割

2.材料と方法	18
2-1.ゼブラフィッシュ個体及び培養細胞	18
2-2.ゼブラフィッシュ時計遺伝子のクローニング	18
2-3.Plasmid constructions	20
2-3-1.転写活性の解析	20
2-3-2.RPA(RNase protection assay) probe	23
2-3-3.タンパク発現	24
2-3-3-1.大腸菌内大量発現系	24
2-3-3-2.In vitro translation	25
2-3-4.免疫沈降法	26
2-3-5.Mammalian two-hybrid assay	28
2-4.遺伝子発現レベルの解析	30
2-4-1.明暗条件下での組織特異的発現	30
2-4-1-1.サンプルの調整	30

6. まとめ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53

7. 参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 56

8. 図

謝辞

参考文献

はじめに

生物と光の関係は多種多様である。太陽から地球に降り注ぐ光は生物にとってかけがえのないエネルギー源である。その一方、太陽光に含まれる短波長の光（紫外線や X 線）は生物に損傷を与える。生物が地球に誕生して以来、シアノバクテリアが地球上を制覇し酸素を大量に作り出すまでの数 10 億年間、現在の様に紫外線の大部分を取り除いてくれるオゾン層は存在せず、生物は日々紫外線に曝され続けていた。太陽紫外線は、進化の大きな原動力であると同時に生物が地球上で生存していく上で大きな脅威であった。生物は生き残っていくために紫外線による損傷に対抗する手段を獲得してきた。その一つが光回復酵素である。光回復酵素は紫外線による DNA 損傷を可視光のエネルギーを利用して修復する DNA 修復酵素である。その機構は効率が良く、間違いも起こさない、優れた修復機構である。単一酵素で修復反応を行いうる単純な系であることから、生物が最初に手に入れた修復機構であると考えられている。一方、光に応答する様々な生物反応に働く光受容タンパクとして、青色光受容体が知られている。この青色光受容体は、一次構造において光回復酵素と高い相同性を示すものの DNA 修復活性は持たない。系統解析の結果、光回復酵素と青色光受容体がファミリーを形成していること、このファミリーの祖先タンパクが CPD 光回復酵素であることが判り、光回復酵素が機能的にも多様な進化を遂げていることが明らかとなった。この青色光受容体は、現在では Cryptochrome(CRY)と呼ばれている。CRY は多くの動物種に幅広く存在しており概日時計の制御に関与していることが明らかになってきた。しかしながら、“概日時計“といった共通の生理機能に関与しているものの、ショウジョウバエでは概日時計の光受容体として、マウス、ヒトでは概日時計の時計本体として、といったように更に多様化していることが明らかとなってきた。

本論文では、進化学的にショウジョウバエとマウスの間に位置し、個体レベルでの遺伝子操作が比較的容易に出来る魚類ゼブラフィッシュを用いて *cry* 遺伝子の機能を分子レベルで解明することを目指した。

1.序論

1-1.ヒト青色光受容体遺伝子(Cryptochrome(Cry))の単離

DNA 光回復酵素

遺伝物質である核酸は、その塩基中に含まれるピリミジン及びプリンによって260nm付近に吸収スペクトルのピークを示す。これらの残基は光エネルギーを吸収することにより励起一重項状態に遷移する。励起状態が基底状態に戻る過程で元の状態とは違った光産物が生成される。この反応は圧倒的にピリミジン残基において起こっており主な反応生成物としては、シクロブタン型ピリ

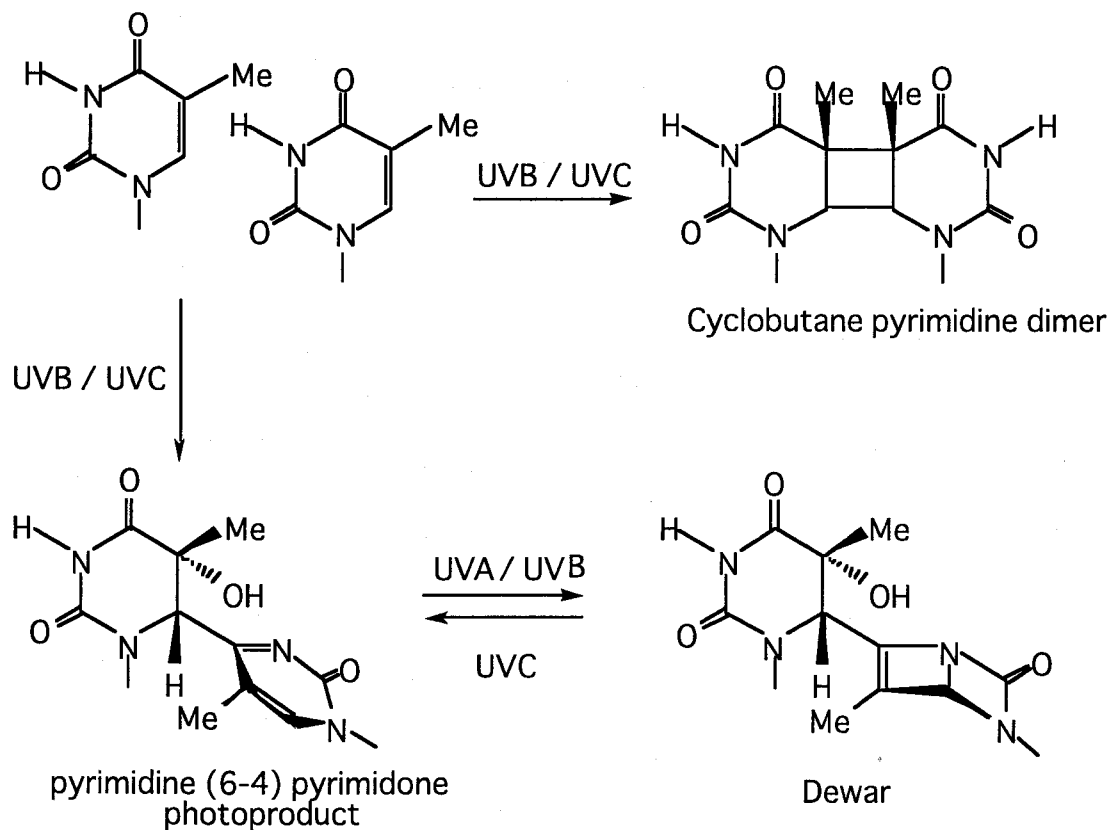


Fig.1-1 紫外線による DNA 損傷

T T 配列にできる CPD (Cyclobutane Pyrimidine Dimer)、(6-4)光産物 (pyrimidine(6-4)pyrimidon photoproduct) およびその Dewar 型光異性体 (Dewar) を示す。

ミジンダイマー(CPD)、(6-4)光産物、ピリミジン残基の水和産物などがある。前 2 者はピリミジンが隣り合っているところに、220-300 nm の紫外光が照射されることにより生じる。(6-4)光産物は CPD に比べその生成量は 1/4 程度と少ないものの突然変異原性は CPD より高いと考えられており、生物への紫外線影響を考える上で無視できない損傷である。(6-4)光産物はさらに近紫外光を吸収して Dewar 型に光異性化する(Fig.1-1)。

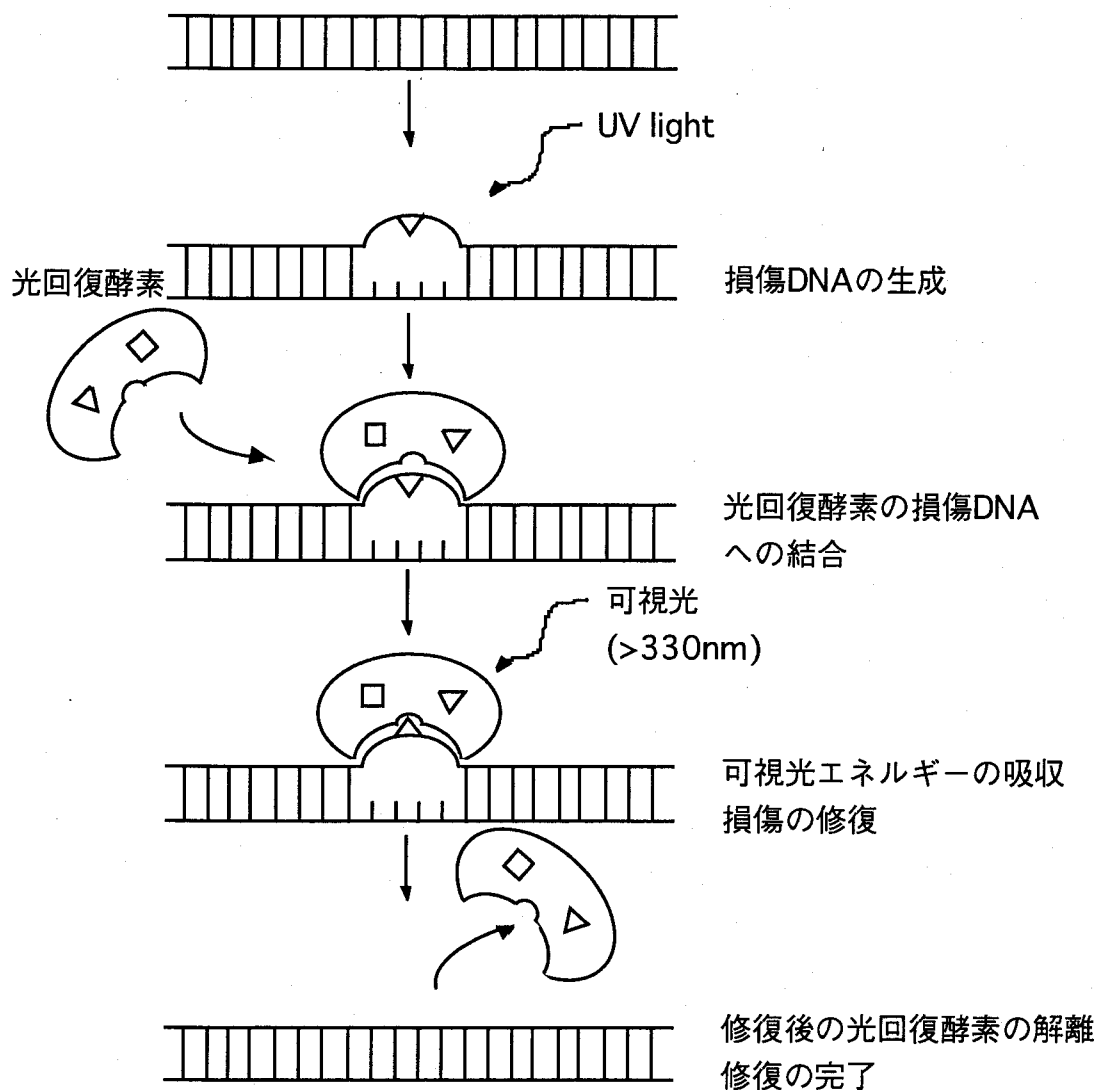


Fig.1-2 光回復酵素による損傷 DNA の修復

生物に紫外線損傷を与えた後、可視光や近紫外光を照射することによって損傷が軽減される「光回復」という現象が古くから知られていた。この反応を司る酵素が光回復酵素である。

光回復酵素はアポ酵素と、補酵素として光を吸収する2種類のクロモフォアから成っている。1つはFAD(Flavin Adenine Dinucleotide)の還元体、もう1つはセカンドクロモフォアと呼ばれているMTHF(5,10-methenyltetrahydrofolate)もしくは8-HDF(8-hydroxy-5-deazaflavin 誘導体)である。光回復酵素はまず紫外線により生じた損傷を認識し結合する。この状態で光を吸収し励起されたFADから損傷DNAに電子移動が起こることにより損傷部位を開裂、元のピリミジンの状態に戻しそこから離れる(Fig.1-2)。

最初にアポ酵素の遺伝子が単離された大腸菌の光回復酵素は紫外線損傷のうちでもCPDを特異的に修復するが、(6-4)光産物に作用しないタイプのものであった。その後、様々な生物でこの遺伝子の単離が試みられ、現在では古細菌から真核生物まで幅広い生物種からこの遺伝子が得られているが、いずれも単細胞生物からである。一方、昆虫や魚類、両生類、有袋類などの高等動物や高等植物にも光回復活性があることは知られていた。これらの生物からの同遺伝子の単離は、保存されているアミノ酸配列を利用する方法ではうまくいかなかったが、大腸菌の光回復酵素欠損株を相補するcDNAのスクリーニングにより魚類で初めて成功した(Yasuhira and Yasui, 1992)。これをきっかけにショウジョウバエ(Todo et al., 1994)、有袋類(Kato et al., 1994)からも同酵素活性を持つ遺伝子が得られた。これら高等生物の光回復酵素は、その一次構造が単細胞生物のものとは部分的には似ているものの全体としてはかなり異なっており、単細胞生物から得られたものをClass I CPD 光回復酵素、高等生物から得られたものをClass II CPD 光回復酵素と区別している(Yasui et al., 1994)。これらはいずれもCPDを修復する酵素であり、(6-4)光産物を光回復する酵素は存在しないと考えられていた。(6-4)光産物は5'側ピリミジンの5、6位の炭素と3'側の4位の間にアゼチジンリング中間体を経て形成されるが、このとき3'側4位の官能基が5'側5位へ転位する。つまり最終的に形成されている5'側6位と3'側4位の間のシグマ結合を切断するのみでは元の正常なピリミジンには回復されないわけである。そのため光回復酵素のような単純な反応系では修復できないものと考えられたからである。しかし、1993年、藤堂によってショウジョウバエの胚細胞中に(6-4)光産物を光に依存して特異的に修復

する酵素、(6-4)光回復酵素の存在が示され(Todo et al., 1993)、その遺伝子が単離された(Todo et al., 1996)。(6-4)光回復酵素の一次構造も CPD 光回復酵素のそれと相同性を持っておりその相同部分のアミノ酸配列を利用して、さらにアフリカツメガエル(Todo et al., 1997)、シロイヌナズナ (Nakajima et al., 1998)から同酵素遺伝子が単離された。現在までに単離されている 3 タイプの光回復酵素の系統樹を Fig.1-3 に示す。この図から明らかなように、これらの光回復酵素の一次構造の相同性は、各々のグループ内では比較的高いが、各グループ間では低い。特に Class II CPD 光回復酵素の一次構造はかなり異なっている。しかしながらすべての光回復酵素で保存されているアミノ酸配列が散在しており、また各グループ間でも部分的に非常に高い相同性を示す領域もある。こういった領域がこのファミリーのタンパクの活性に重要と思われる。

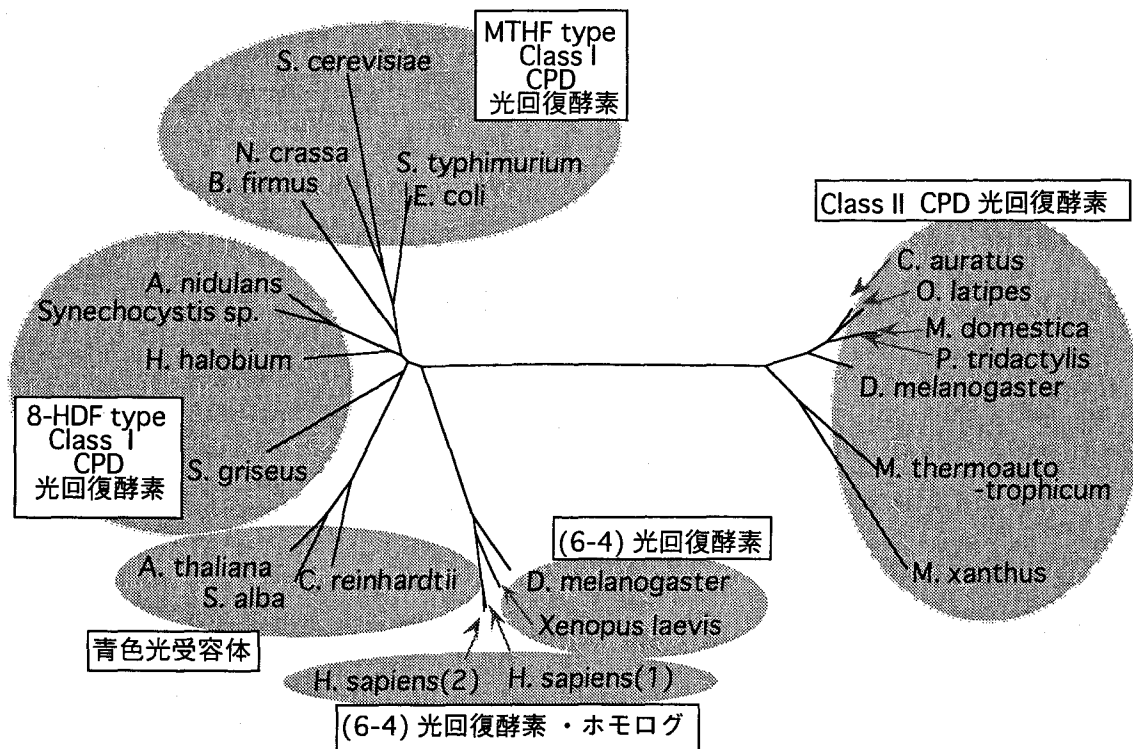


Fig.1-3 光回復酵素・青色光受容体タンパク質ファミリーの系統樹(1)
(Todo et al., 1997)

青色光受容体

青色光受容体遺伝子は、初期発生の段階で青色光に応答しなくなるシロイヌナズナの突然変異体(*hy4*)の原因遺伝子として単離されてきた(Ahmad and Cashmore, 1993)。シロイヌナズナでは通常、青色光によって芽生えの成長が阻害される。この遺伝子は、Darwin の考えた Cryptochrome に似ていることから *cry1* と名付けられたが、驚いたことにこの遺伝子産物は Class I CPD 光回復酵素と高い相同性を持っておりタンパクファミリーを形成していることが判った。更に、類似配列を持つ *cry2* 遺伝子がシロイヌナズナから単離された(Lin et al., 1996; Lin et al., 1998)。その後、これらの *cry* 遺伝子産物は芽生えの成長制御だけでなく、屈光性(Ahmad et al., 1998)や開花時期の制御(Guo et al., 1998)に関与していることが明らかとなった。シロイヌナズナは光回復酵素を別に持っており(Nakajima et al., 1998)、この遺伝子産物自体は光回復酵素活性を示さない。このタンパク質は光により電子を作り出す機能を持っており、電子の授受によるシグナル伝達を行うという、全く新しいタイプのシグナル伝達系を担っていると考えられている。

ヒトが光回復酵素を持つか否かは長く議論されてきたが、持たないということで一応決着がついていた。しかし、このショウジョウバエの(6-4)光回復酵素をコードする遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子がヒト Brain EST(Expressed Sequence Tag)データベース中に 2 つ存在することがわかった(Hsu et al., 1996; Todo et al., 1996)。この遺伝子にどのような機能があるのか、光回復酵素活性はあるのか、興味を持たれた。しかし、この遺伝子産物からは光回復酵素活性は検出されなかった。光回復酵素に由来する遺伝子であることから、また、同じタンパクファミリーに含まれる植物の CRY が明らかに光受容体であることから、何らかの光受容体として機能していると予想された。ノースカロライナ大の Aziz Sancar はこれらを植物の *cry* から *hcry1*, 2 と名付けている。

分子進化学的解析からこの光回復酵素・青色光受容体ファミリーは Class I CPD 光回復酵素を祖先タンパクとして、原核生物と真核生物が分岐する以前に何度も(最低 8 回)遺伝子重複を繰り返しそのコピー数を増やしたものであることが明らかにされた(Kanai et al., 1997)。これらの遺伝子はその後、あるものは Class II CPD 光回復酵素や(6-4)光回復酵素に、またあるものは青色光受容体やヒトホモログに進化していった(Fig.1-4)。地球上での生存を維持する

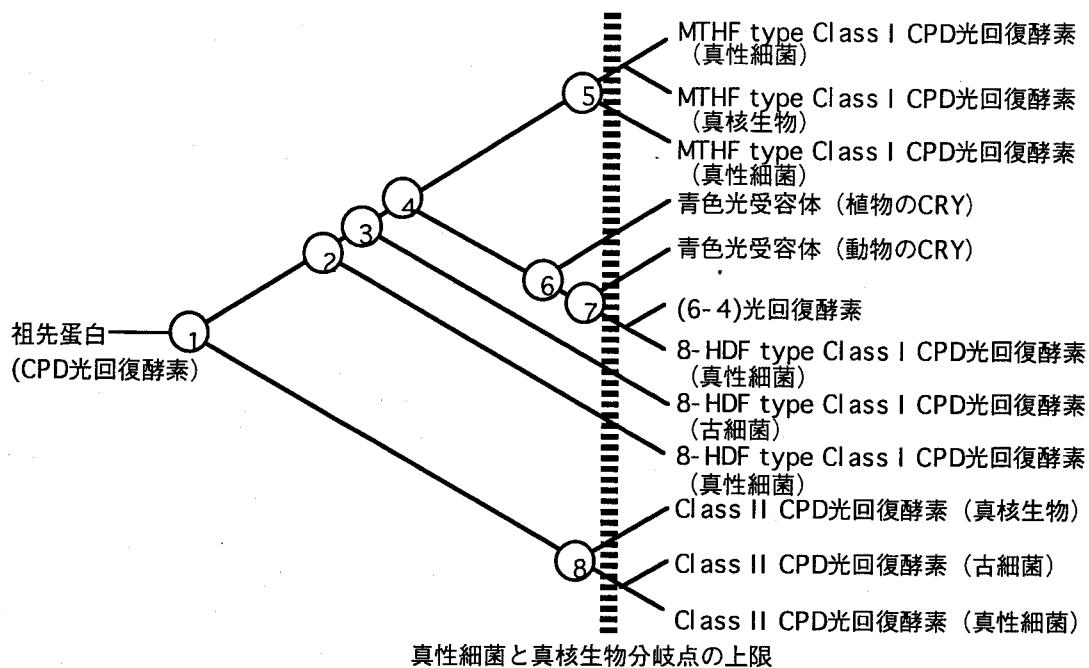


Fig.1-4 系統樹から予想される光回復酵素・青色光受容体タンパク質ファミリーの進化過程(Kanai et al., 1997)

○印は遺伝子重複を起こしたと考えられる分岐点を示す。

ために遺伝子重複を起こした DNA 修復酵素がその必要性の減少に伴い、基本的性質を利用しつつ改変し光を利用する様々な生命現象に対応できるよう進化していったものと考えられる。また、このファミリーのタンパクはいずれも FAD をクロモフォアとして持つフラボタンパクであり、その作用機序は共通であると考えられる。では、この *hcry1*、*2* がどのような生理機能を担っているのだろうか。先程も述べたようにこれらの遺伝子はその一次構造から何らかの光受容に関与しているものと考えられる。

1-2. 概日時計における Cryptochrome(CRY)の役割

概日時計

高等動物が光を巧妙に利用している生理機能の一つとして概日時計があげられる(Foster, 1998; Roenneberg and Foster, 1997)。概日時計とは原核生物からヒトに至るまでほとんどの生物でみられる、恒常環境で約 24 時間のリズムを刻む様々な生命活動の自立的振動現象のことをいう。具体的には自由行動、ホルモン分泌、植物の窒素固定などが挙げられる。この現象は環境温度の変化による影響をほとんど受けず温度補償されている。このことはリズムの発振が単なる化学反応にのみ依っているわけではないことを意味している。恒常環境下で継続するリズムを自由継続リズムというが、このリズムは通常 24 時間よりずれており、24 時間の環境サイクル（明暗など）が与えられるとそれに同調し正確に 24 時間のリズムを刻むようになる。その発生機構は約 24 時間の周期を刻む時計本体、それに光などの外部環境からのシグナルを伝える入力系、時計本体の振動を実際の生理機能などに結びつける出力系の 3 パートに分けて考えられる。このように概日時計の特性が明らかになるにつれて時計本体の解剖学的位置を決めようという動きが盛んになってきた。様々な器官の除去実験や移植実験等の結果、時計本体の構成要素として松果体、網膜、視交叉上核が存在しこれらの重要度が進化の過程で変化していったのではないかと想像される。

概日時計の分子遺伝学的研究は 1970 年代にショウジョウバエで *period(per)* 変異体が発見されて以来(Konopka and Benzer, 1971)、ショウジョウバエ(Allada et al., 1998; Bargiello et al., 1984; Gekakis et al., 1995; Kloss et al., 1998; Myers et al., 1995; Price et al., 1998; Reddy et al., 1984; Rutila et al., 1998; Zehring et al., 1984)、アカパンカビ(Crosthwaite et al., 1997; McClung et al., 1989)、シアノバクテリア(Ishiura et al., 1998)、そしてマウス(Albrecht et al., 1997; Ikeda and Nomura, 1997; King et al., 1997; Sun et al., 1997; Tei et al., 1997; Zylka et al., 1998a; Zylka et al., 1998b)から相次いで変異体の発見、遺伝子の単離がなされた。このとき単離された遺伝子の多くは時計本体を構成していることが後に判った。それらの解析の結果概日時計の発振機構の分子メカニズムは、時計本体の遺伝子とその遺

伝子産物によって自らの発現を抑制することからはじまることが明らかになった。抑制機構だけでは継続的なリズムを維持することは出来ないがここに、抑制因子の発現を促す促進因子が加わることにより閉じた経路の中でそのリズムを維持することが出来るようになる。このような経路のことを負のフィードバック機構という(Fig.1-5、1-10)。このような負のフィードバック機構を 24 時間周期で回すために、細胞レベルでは転写・翻訳の制御、核内移行の制御、リン酸化による修飾、ほかのタンパクとの相互作用等によって巧妙に抑制と促進がコントロールされている。ショウジョウバエでは PER、TIMELESS(TIM)が抑制因子として、CLOCK、CYCLE(dBMAL)が促進因子(転写因子)として負のフィードバック機構を形成しており(Fig.1-5)(Darlington et al., 1998)、これが活動のリズムを起こすのに必要であると考えられている。実際これらの遺伝子に変異のある個体では行動のリズムの周期がなくなることが知られている(Konopka and Benzer, 1971; Allada et al., 1998; Sehgal et al., 1994; Rutila et al., 1998)。また、光シグナルに同調してこれらの遺伝子の発現のリズムが位相変移を起こし、それにあわせて個体全体のリズムもずれることが知られている(Ederly et al., 1994)。またショウジョウバエではこの位相変位をいろいろな波長の光で測定してみたところ青色光が有用であることが判り(Suri et al., 1998)CRY が有力な候補となった。

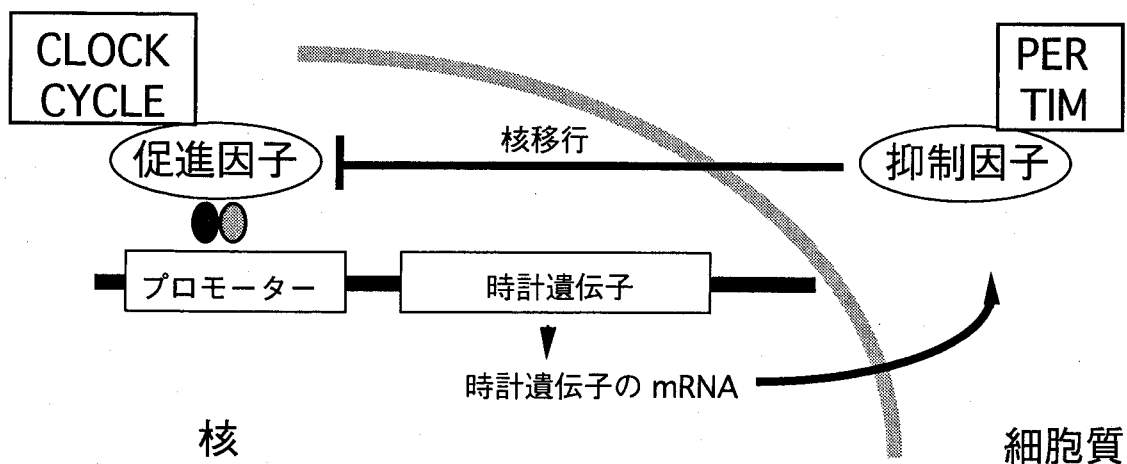


Fig.1-5 ショウジョウバエの負のフィードバックによる時計遺伝子発現の発振機構

光受容体としてのCRY

そこで *cry* 遺伝子をショウジョウバエより単離しその機能解析を行った。アクチンプロモーターで発現を制御する系統を用いて、全身で dCRY を高発現するトランスジェニックラインを作製し行動解析を行った。行動測定は 12:12 の明暗条件で同調させた後、恒暗条件下での歩行活動リズムを測定した(Fig.1-6)。解析には Fig.1-7(a)に示すように、*dcry* を野生株の 3-4 倍高発現している高発現ライン(#3、7)と、1.5 倍程度しか発現していない低発現ライン(#9)を用いた。後者をおなじ遺伝的バックグラウンドをもつコントロールとした。その結果、作製したトランスジェニックラインに歩行活動リズムの異常は見られなかった。

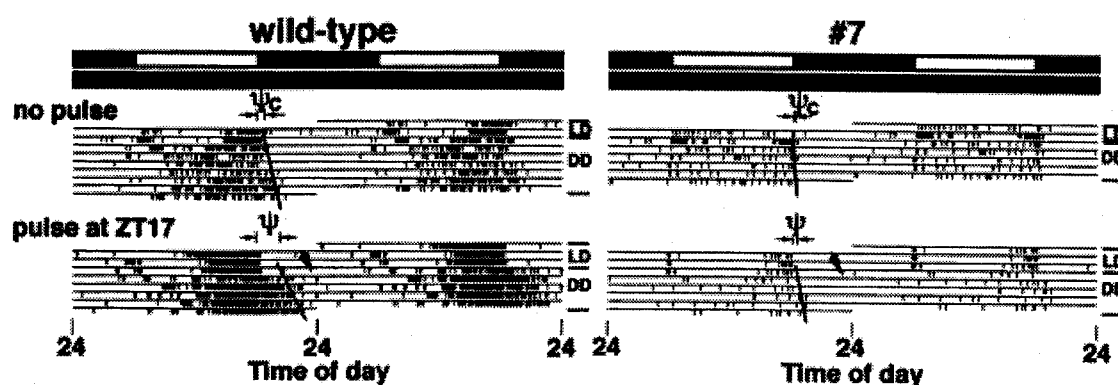


Fig.1-6 *dcry* 高発現ハエの歩行活動記録(Ishikawa et al., 1999)

一個体の歩行活動を計測した。左が野生型、右が *dcry* 高発現ハエの活動を示す。ハエが赤外線を横切った時刻に縦の刻みが付けられている。図は横軸に時刻を一段ごとに日数の経過を示す。周期が読みとりやすいように同じ図を左右に日ずらして張り合わせてある。最初の数日は 12 時間明 12 時間暗の条件 (LD: 上段の白黒バーの白が明期、黒が暗期) で同調させ、その後、恒暗条件 (DD: 黒いバー) に移したときの活動を示す。図上に引かれた直線は恒暗条件下で自由継続している歩行活動リズムの活動終了時に視察法でもって引かれた近似線である。これより位相角差(ψ_c , ψ)を求めた。

そこで次に位相角差(ψ_c)を求めた。参照位相としては恒暗条件下で自由継続している歩行活動リズムの活動終了時を用いた。その結果 *dcry* 高発現ハエで ψ_c の著しい減少が見られた(Fig.1-6)。

次に恒暗条件下で表示時間に光刺激を与えたときの自由継続リズムの位相への影響を見た(Fig.1-7(b))。このとき位相の前進を+側に後退を-側にプロットした。そうしたところ、高発現ライン#3、7(-▼-, -△-)では野生株(-●-)と比べ前進相に変化はなかったが後退相が著しく減少していた(ZT17、20 t-test、 $p < 0.01$)。また後退相から前進相に移行する時間(cross-over point)が高発現ラインで共に早くなっていることが判った。

Fig.1-7(c)では(b)でもっとも差が大きかった ZT17 に強度の異なる光刺激を与え、(b)で見られた位相変移が光の強度に依存するかを見た。強い光(50lux)では、どのラインでも大きな位相後退を示した。弱い光(0.1lux)では 50lux の時と比べ、どのラインでも後退相が小さくなったがコントロールの#9 や野生株に比べ高発現 strain の#7 では著しく後退相が小さくなった(ANOVA、 $p < 0.01$)。以上の結果、*dcry* の発現量の増加によりハエ個体の光に対する応答

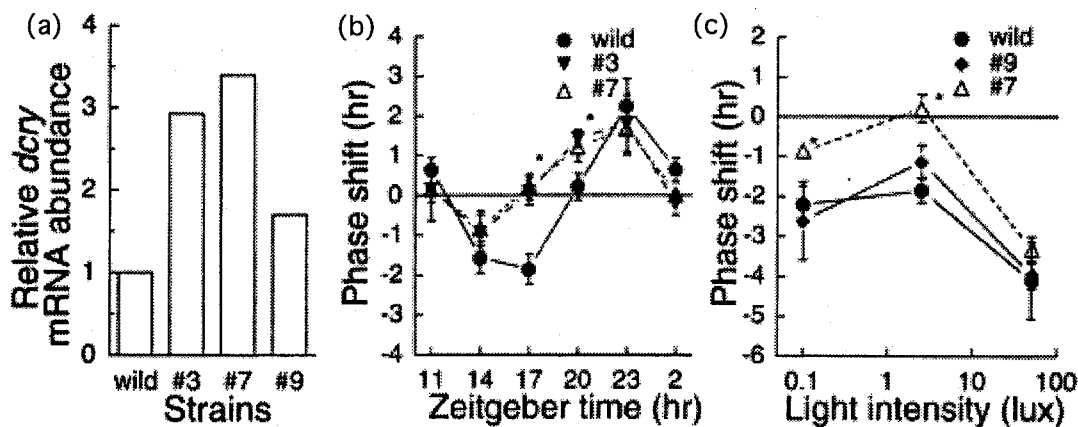


Fig.1-7 *dcry* トランスジェニックラインの解析(Ishikawa et al., 1999)

野生型と *dcry* トランスジェニックライン #3、#7、#9 の(a) *dcry* mRNA 発現量(b) 位相反応曲線(c) 位相反応の光強度依存性

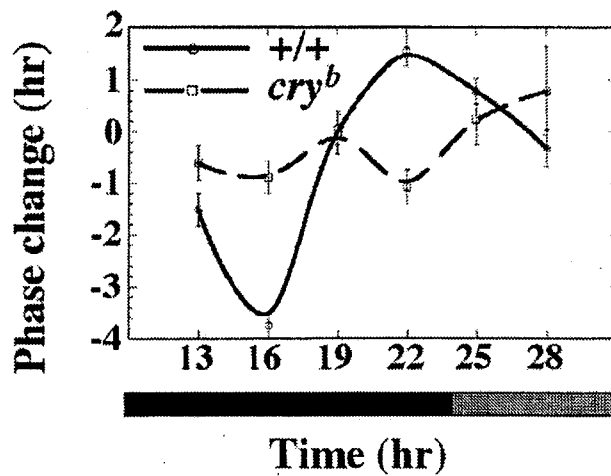


Fig.1-8 *cry^b*の位相反応曲線(Stanewsky et al., 1998)

が明らかに変化しており、dCRY が概日時計の光受容に関わっていることが示された(Ishikawa et al., 1999)。また同時期に *dCRY* に一塩基置換の突然変異を持つショウジョウバエ(*cry^b*)が発見されこの変異体では光による位相変移が全く起こらなくなっていることが明らかになった(Fig.1-8) (Stanewsky et al., 1998)。しかしながら、この変異体は短時間の光照射には反応できないものの、新しい明暗サイクルには同調できることからショウジョウバエには dCRY 以外にも概日時計の光受容体があると考えられる。またその後の解析で dCRY は光依存的に抑制因子である TIM に結合しその抑制作用を阻害することによって、光刺激による位相変移に関わっていることが明らかとなった(Ceriani et al., 1999)。つまり、dCRY はたんなる光受容体ではなく、光受容体として働くと共にそのシグナルを直接時計本体に伝える役割も担っていると考えられる。

概日時計本体としての CRY

一方、ほ乳類の CRY については、マウスで *hCRY1*、*2* の相同遺伝子を単離し、それぞれ単独のノックアウトマウス(KO マウス)及びダブルノックアウトマウス

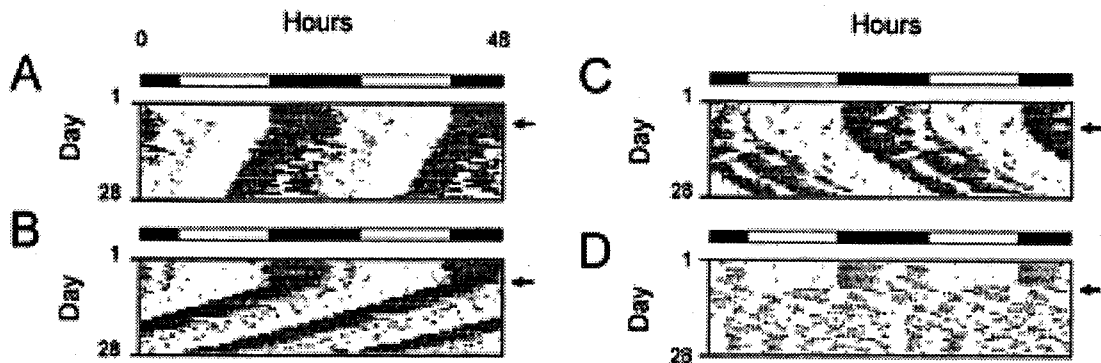


Fig.1-9 *mCRY* knockout mouse の行動活動記録(Vitaterna, Ishikawa et al., 1999)

A. 野生型、B. *mCRY1* KO マウス、C. *mCRY2* KO マウス、D. *mCRY1*、2 WKO マウスのもの。野生型のもの(A)と比較しそれぞれの KO マウスで活動周期の異常が見られる。

ス(WKO マウス)を作製した。行動解析をしてみたところ、*mCRY1* KO マウスは自由継続リズムの周期が短くなるのが、*mCRY2* KO マウスでは逆に周期が長くなるのが、驚いたことに *mCRY1*、2 の WKO マウスでは周期がなくなり、リズムがなくなることがわかった(Fig.1-9)(Thresher et al., 1998; van der Horst et al., 1999; Vitaterna, Ishikawa et al., 1999)。この結果から mCRY は光受容体としてというよりむしろ時計本体として概日時計の分子機構で中心的な役割を果たしていることが示唆された。マウスにおいてもショウジョウバエ同様 CLOCK-BMAL ヘテロ二量体が時計遺伝子の転写因子として働いていることが知られているが、実際 *in vitro* の解析で CLOCK-BMAL ヘテロ二量体の転写活性化能を強力に抑制することが示された(Kume et al., 1999)。さらにその抑制因子としての機能は mPER より遙かに高くマウスでは CRY がショウジョウバエの dPER-dTIM に代わり時計本体の抑制因子として働いていることが示唆された。このように CRY の機能は、同じ概日時計という活動の場にあってもかたや光レセプターとして、かたや時計本体として、と生物種によって多岐にわたっている。

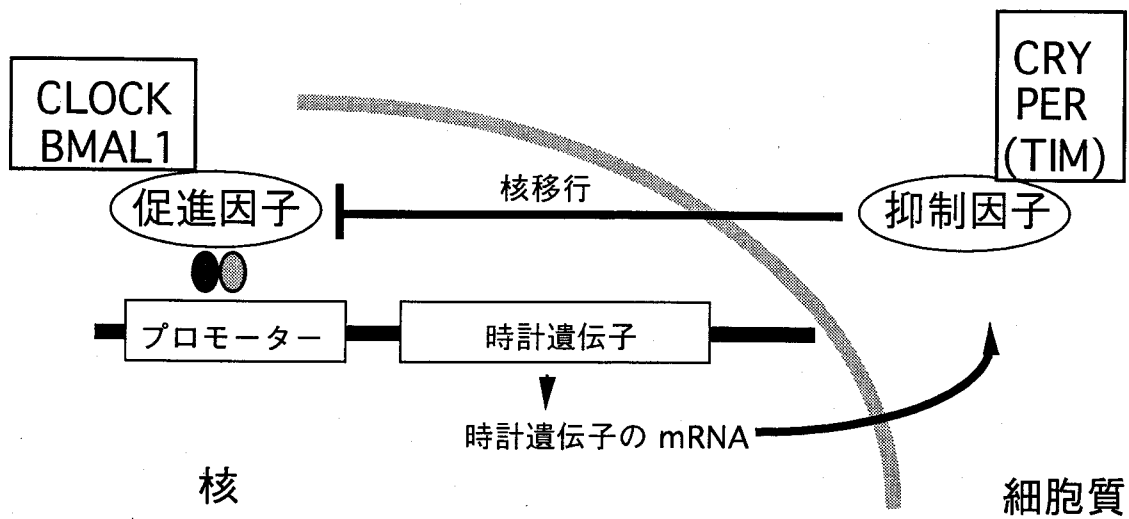
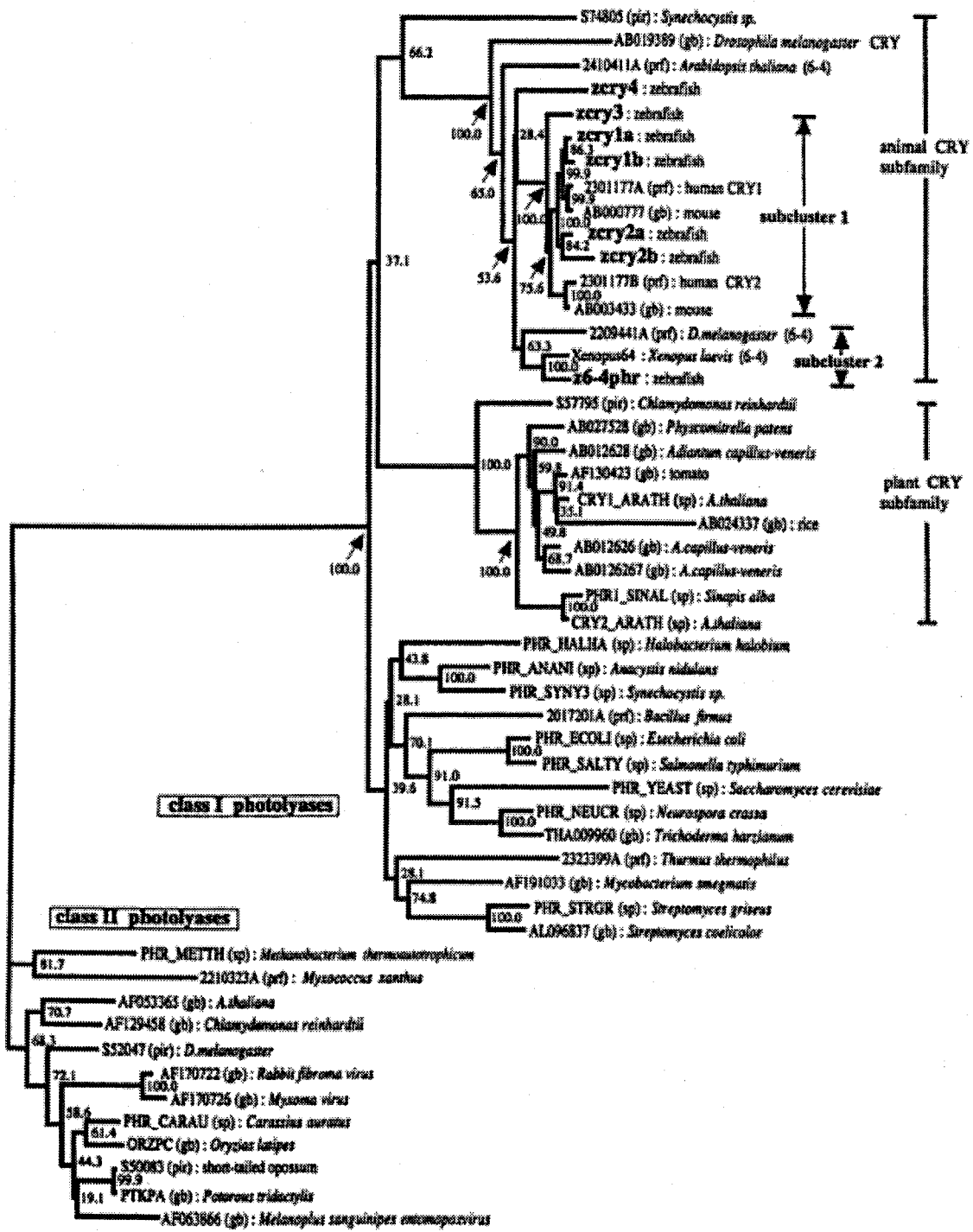


Fig.1-10 マウスの負のフィードバックによる時計遺伝子発現の
発振機構

この *cry* 遺伝子の機能解析を更に押し進めるために、進化学的にショウジョウバエとマウスの中に位置し、しかも個体レベルでの遺伝子操作が比較的容易に出来る魚類ゼブラフィッシュからこの *cry* 遺伝子を単離し機能解析を行うことにした。6 種類の *Cry*(*zCry1a*、*1b*、*2a*、*2b*、*3*、*4*) 遺伝子が単離された (Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)。これらの遺伝子とこれまでに知られている光回復酵素・青色光受容体タンパク質ファミリーの間で系統解析を行ってみると *zCRY1a*、*1b*、*2a*、*2b* がヒト、マウスの *CRY1* に似ていることが判った (Fig.1-11)。ヒト、マウスの *CRY* が *CLOCK-BMAL* の転写活性に対する抑制能を持つことから *zCRY* にも、その活性があるかどうかを *mCLOCK-mBMAL* に対する反応で確かめた。そうしたところ、*zCRY1a*、*1b*、*2a*、*2b* は強い転写抑制活性を示し *zCRY3*、*4* はその活性を示さなかった。この結果から *zCRY* を、転写活性を示す転写抑制型 (*zCRY1a*、*1b*、*2a*、*2b*) と、抑制しない非転写抑制型 (*zCRY3*、*4*) に分けることが出来た (Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)。この結果は系統解析の結果と一致する (Fig.1-11)。



D.1

Fig.1-11 光回復酵素・青色光受容体タンパク質ファミリー系統樹(2)
(Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)

概日時計の分子機構を解析するに当たって、時計本体で働いている他の因子との関わりを解析することは必須である。そこで、さらに *Clock*、*Bmal* 遺伝子をゼブラフィッシュより単離し、これら 6 種類の *zCry* 遺伝子産物との相互作用を明らかにし、CRY の機能分化の解明を目指した。

Zebrafish 概日時計制御における Cryptochrome の役割

2.材料と方法

2-1.ゼブラフィッシュ個体及び培養細胞

試料のゼブラフィッシュは、すべて市販の野生型を 26~28℃、14 時間明、10 時間暗（もしくは恒暗）条件で飼育したものをを用いた。ゼブラフィッシュの眼球及び脳はそれぞれの ZT(Zeitgeber time、点灯時を ZT0、消灯時を ZT14 とした)で解剖を行い、即座にドライアイスで凍結したものを試料として用いた。

培養細胞は、ゼブラフィッシュの尾ビレから樹立された BRF41 細胞とマウス NIH3T3 細胞を用いた。

BRF41 細胞は、10%FBS (fetal bovine serum,Hyclone) 、10mM HEPES 加 Leibovitz's L-15 medium (GIBCO BRL)にて、26℃で培養した。NIH3T3 細胞は 5%Calf serum(HyClone)を含む DMEM medium(Dulbecco's Modified Eagle's Medium(GIBCO BRL))で 37℃、5% CO₂、加湿の条件で培養した。

2-2.ゼブラフィッシュ時計遺伝子の単離

以下に示す PCR 法及び cDNA ライブラリーのスクリーニングによって、ゼブラフィッシュより時計遺伝子 *Clock* 及び *Bmal* を単離してきた。

まず、ヒト、マウス、ショウジョウバエの CLOCK、BMAL のアミノ酸配列で保存されている領域に以下に示す 6 種類の degenerate oligonucleotide を設計した。CLOCK で保存されている領域 EWKFLFLDH、TKGQQWIW

に対してそれぞれ Clk-R1 5'-GARTGGAARTTYTNTTYTNGAYCA-3'

Clk-L1 5'-CCADATCCAYTGYTGNCCYTTNGT-3'

を、BMAL で保存されている領域、VLRMAVQH、GFLFVVGCD、CLVAIGR、TGYLKSWP/TP に対してそれぞれ

Bmal-R1 5'-GTNYTNMGNATGGCNGTNCARCA-3'

Bmal-R2 5'-AGYGTNGGNTGNTGYTTNTYYTT-3'

Bmal-L1 5'-GKNACDATNGCNACNARRCA-3'

Bmal-L2 5'-GGNGKCCANSWYTTNARRTANCCNGT-3'

を合成した。

オリゴヌクレオチド中の略号は IUB(International Union of Biochemistry) code に基づいて示してある。R:Purines(A or G)、Y:Pyrimidines(C or T)、N:A or G or C or T、M:A or C、W:A or T/U

ゼブラフィッシュの眼球組織より抽出した RNA から complementary DNA (cDNA)を合成し、これを鋳型として Clk-R1 と Clk-L1、Bmal-R1 と Bmal-L1 で polymerase chain reaction(PCR)を行った。cDNA の合成には SUPER SCRIPT™ Pre-amplification System for First Strand cDNA Synthesis kit (GIBCO BRL)を用い、オリゴ dT プライマーで合成した。反応はキットのマニュアルに従って行った。得られた PCR 産物を基質に、*Clock* は再度 Clk-R1 と Clk-L1 で、*Bmal* は Bmal-R2 と Bmal-L2 でさらに PCR 反応を行い、それぞれ 400bp、200bp の DNA フラグメントが得られた。これらの PCR 産物を直接 pCR[®]2.1-TOPO(Invitrogen[®])にライゲーションし、TA クローニングを行った。得られたコロニーからプラスミド DNA を抽出し、それぞれ約 400bp、200bp の挿入断片を持つものを選び塩基配列を決定した。塩基配列の決定にはキャピラリーオートシーケンサー(ABI PRISM™310 Genetic Analyzer)を使用し、シーケンス反応は専用の DNA Sequencing Kit(Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction)を用いて行った。*Clock*、*Bmal* ともに 3 種類の異なる DNA 配列が得られた。

これらの DNA 断片の cDNA 全長を得るためにゼブラフィッシュ成魚の cDNA library (ゼブラフィッシュ 5'-STRETCH PLUS cDNA Library (CLONTECH)) のスクリーニングを行った。プラークハイブリダイゼーションは定法に従って行った(Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nded. Sambrook, Fritsch, Maniatis)。プローブは上記で得られた DNA 断片を Megaprime™ DNA labeling system (Amersham)で、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 標識して用いた。反応はそのマニュアルに従った。NAP™-5Column(Pharmacia)を用いて標識されたプローブを精製し、液体シンチレーションカウンター(Aloka LSC-5100)で ^{32}P の放射能を測定し、カウントのピーク部分を 5 分間煮沸して変性し水中で急冷しプローブとして用いた。

得られた cDNA をファージクローンから pBluescript[®]II(Stratagene)の NotI 切断部位にリクローンして、pBS-zfCLOCK1、pBS-zfCLOCK2、pBS-zfCLOCK3、pBS-zfBMAL1、pBS-zfBMAL2、pBS-zfBMAL3 を作成し、全

塩基配列を決定した。*zfClock1*、*zfClock2* は cDNA library の screening では cDNA 配列全長を得られなかった。

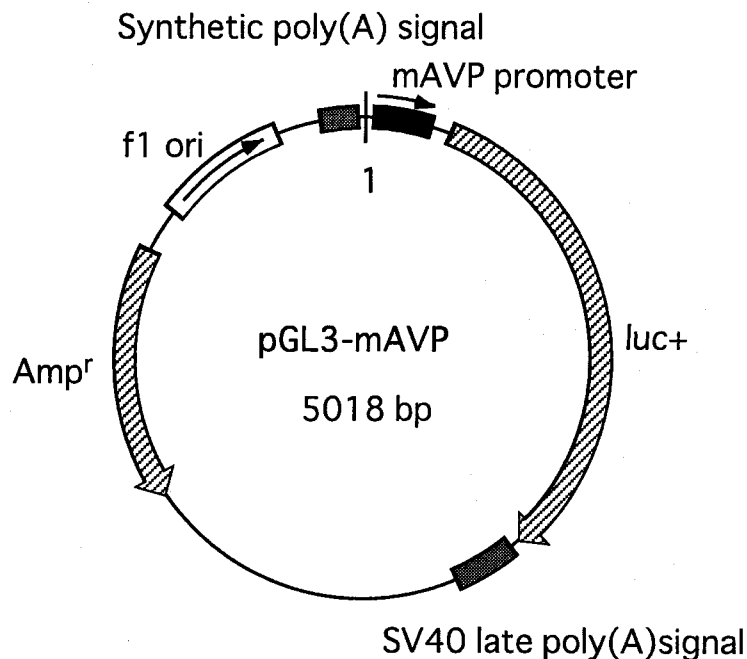
zfClock1 は、3'末が欠けていたため、その部分を cDNA library のファージ DNA を基質にファージベクター上の λ gt10 reverse プライマーと zClk-1579R(5'-CGCACACGCATGATTGAGG-3')を用いて PCR 反応をし、前述と同様の方法で PCR 産物を直接 TA クローニングした。その中から *zfClock1* の 3'端を含むクローン(pCR2.1zfCLOCK1-3')が得られた。pBS zfCLOCK1 から、*zfClock1* の 5'末を vector 中の *SacI* 切断部位と cDNA 中の *SacI* 切断部位で切り出し、pCR2.1zfCLOCK1-3'の *SacI* 切断部位 に導入して、正しい方向で導入されているものを選択して、*zfClock1* の cDNA 全長とした。

zfClock2 についても、*zfClock1* と同様の方法で単離しようと試みたが、得ることができなかった。そこで *zfClock2* の 3'側の *Bam*HI/*Sa*II 断片をプローブとしてさらに cDNA library のスクリーニングを行ったところ、*zfClock2* の 3'側を含むクローン pBS- zfCLOCK2-3'を得ることができた。pBS- zfCLOCK2 の coding region を含む *Eco*RV から *Aat*I と pBS- zfCLOCK2-3'の coding region を含む *Aat*I/*Pst*I 断片を pcDNA3.1(+)(Invitrogen)に導入し *zfClock2* の cDNA 全長とした。

2-3.Plasmid constructions

2-3-1.転写活性の解析

マウスの genomic DNA を基質にマウスアルギニン-バソプレッシン遺伝子のプロモーター配列を含む上流領域 200bp を mAVP 5' Xho 5'-AGGCTCGAGTG CATGGCTGGCTCCCCTCCT-3' (下線部 *Xho*I 切断部位) と mAVP 3' HindIII 5'-TTCAAGCTTGCCTTGGCGGGCTGGGCT-3'(下線部 *Hind*III 切断部位)で PCR 反応をし、増幅させた。この断片を、promoter を持たないホタル luciferase reporter vector である pGL3 basic(Promega)の *Xho*I-*Hind*III 切断部位にサブクローニングし、転写活性解析の reporter construct (Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)とした。



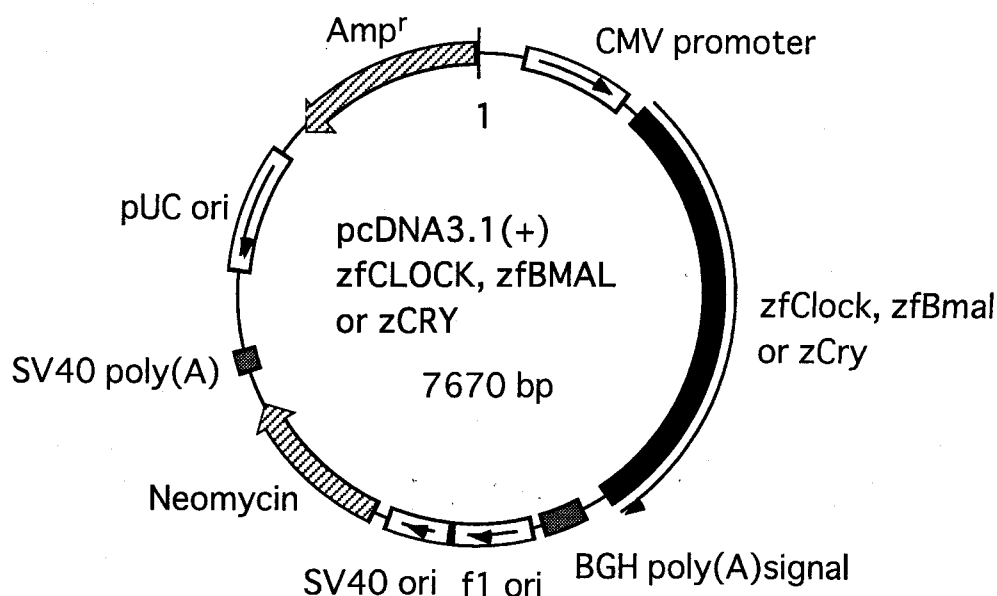
転写活性解析のために、発現ベクター-pcDNA3.1(+)(Invitrogen)に今回単離した遺伝子の cDNA 全長を以下の方法でリクローニングし pcDNA3.1(+)-zfCLOCK1、pcDNA3.1(+)-zfCLOCK2、pcDNA3.1(+)-zfCLOCK3、pcDNA3.1(+)-zfBMAL1、pcDNA3.1(+)-zfBMAL2、pcDNA3.1(+)-zfBMAL3 を作製した。

zfClock1 は、pCR2.1-zfCLOCK1 の coding region を含む *HindIII/XhoI* 断片を pcDNA3.1(+)*HindIII/XhoI* 切断部位に導入した。zfClock2 は、遺伝子を単離した時に作製した。zfClock3 は、pBS-zfCLOCK3 の coding region を含む *XhoI/Asp718* 断片をまず pcDNA3.1(+)*Asp718-XhoI* 切断部位に導入した。このままでは遺伝子の向きとプロモーターの向きが逆なので pcDNA3.1(+)*PmeI* のポリクローニングサイトの両端にある *PmeI* 切断部位で挿入断片を切り出し、pcDNA3.1(+)*PmeI* 切断部位に再度導入し、正しい方向のクローンを得た。zfBmal1 は pcDNA3.1(+)*EcoRI-XhoI* 切断部位に導入できるように、開始コドンと終止コドンのすぐ外側に制限酵素切断部位を持つように 4 種類のオリゴヌクレオチドを合成し(zBMAL1-5'RI 5'-TCGAATTCA TGGGAGAAGGAGTGAGC-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)、zBMAL1-1113L 5'-CTCCTGTGGTAAGTACGCC-3'の組み合わせと zBMAL1-970R 5'-CTGCATC

CACATATCGTCC-3'、zBMAL1-3'Xho 5'-GGACCTCGAGGAACAAAGGCCAGG GCAGG-3'(下線部 XhoI 切断部位)それぞれの PCR 産物を EcoRI/AccI、AccI/XhoI で制限酵素処理し、pcDNA3.1(+)-V5HisA の EcoRI-XhoI 切断部位に導入した。zfbmal2 は EcoRI/XhoI 断片を pBS-zfBMAL2 から切り出し、pcDNA3.1(+)-V5HisA に導入した。zfbmal3 は、pBS-zfBMAL3 の coding region を含む NotI/MunI を pcDNA3.1(+)-V5HisA の NotI-EcoRI 切断部位に導入した。

pcDNA3.1(+)-zCRY1a、3、4 については本研究室で以下の手順で作製されたものを用いた。

zCry1a は cDNA library のスクリーニングにより得られた遺伝子であるが (pCR2.1-zCRY1a)、coding region の 5'端が欠けており、欠けている部分は 5'RACE により単離されてきた (pBS-zCRY1a-5')。pCR2.1-zCRY1a と pBS-zCRY1a-5' から挿入断片を切り出して Cry1a の cDNA 全長を pcDNA3.1(+)-V5HisA にリクローニングすることが出来なかったため、まず 5'端の一部をつなぎ合わせたクローンを作製した。pBS-zCRY1a-5'には開始コドンの上流にリクローニングするのに都合の良い制限酵素切断部位がなかったため、zCRY1a5'(-174)R H3 5'-AACCAAGCTTGCAAGGCTAACTATTTTCTC-3'(下線部 HindIII 切断部位)を合成し、開始コドンの上流に HindIII 切断部位を導入した。この primer と pBS の universal primer とで PCR 反応し、その産物を HindIII と cDNA 内にある HhaI で切断したものと、pCR2.1-zCRY1a の coding region を含む HhaI/NheI 断片を pcDNA3.1(+)-V5HisA の HindIII-NheI 切断部位に導入した。このクローンから切り出した zCry1a の cDNA を含む HindIII/NheI 断片と pCR2.1-zCRY1a の coding region を含む NheI/XhoI 断片を pcDNA3.1(+)-V5HisA の HindIII-XhoI 切断部位に導入し、作製した。zCry3 は 2-3-3-1 節で述べる pGEX-zCRY3 から SmaI/NotI で切り出したものを pcDNA3.1(+)-V5HisA の EcoRV-NotI 切断部位に導入した。zCry4 も 2-3-3-1 節で述べる pGEX-zCRY4 から zCry4 の cDNA を EcoRI/NaeI、NaeI/NotI 断片として切り出し、pcDNA3.1(+)-V5HisA の EcoRI-NotI 切断部位に導入した。



2-3-2.RPA(RNase protection assay) プローブ

zfClock1 の 639 から 731 塩基、*zfClock2* の 1404 から 1527 塩基、*zfClock3* の 1301 から 1462 塩基、*zfBmal1* の 1765 から 1878 塩基、*zfBmal2* の 1756 から 1892 塩基、*zfBmal3* の 1646 から 1917 塩基を *zfClock* は PCR で両端に制限酵素切断部位を導入して、*zfBmal* はその部位にある制限酵素切断部位を利用してそれぞれ pBS-SK(-)に導入した。*zfClock* の PCR 反応に使用した primer は以下の通りである。

zClk1 5'RI 5'-CCAAGAATTCCAACACTGTGCCTAACTC-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)
zClk1 3'Bam 5'-GGTTGGATCCGCTATGAAACACACTCGG-3'(下線部 *BamHI* 切断部位)、
zClk2 5'RI 5'-TTCCGAATTCTACGTCATCCCGGCAGTC-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)
zClk2 3'Bam 5'-AACCGGATCC GGACGGAGAGAGTGACGG-3'(下線部 *BamHI* 切断部位)、
zClk3 5'RI 5'-TTCCGAATTCACACCTGCACATCAACAC-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)、
zClk3 3'Bam 5'-GGAAGGATCCGTTGGCTGATTTGGACTG-3'(下線部 *BamHI* 切断部位)。これらの PCR 産物を *EcoRI/BamHI* で処理し pBS-SK(-)の *EcoRI-BamHI* 切断部位に導入した。

zfBmal1 は *BamHI/XhoI* で *zfBmal2* は *PvuII/XhoI* で *zfBmal3* は *PstI/XhoI* で pcDNA construct から切り出し、pBS-SK(-)の *BamHI-XhoI*、*EcoRV-XhoI*、*PstI-XhoI* 切断部位にそれぞれ導入した。

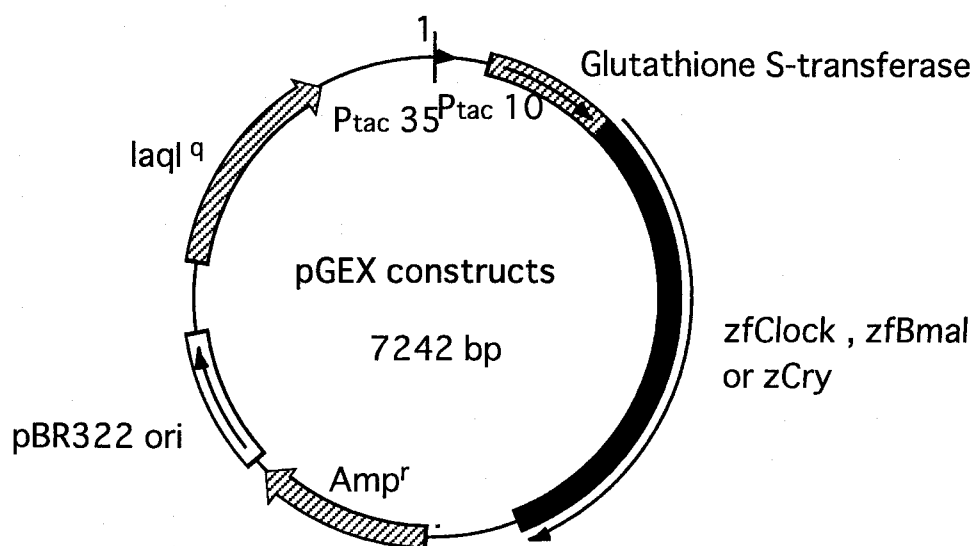
2-3-3.タンパク発現

2-3-3-1.大腸菌内大量発現系

大腸菌内で大量発現させ精製するために以下の方法で pGEX-zfCLOCK2、pGEX-zfBMAL3 を作製した。大腸菌内発現ベクターとしては Glutathion S-Transferase(GST) fusion vector である pGEX4T(Amersham)を使用した。pGEX-zfCLOCK2 は pBS-zfCLOCK2 を基質に zClk2-5'RI 5'-TCGAATTCATGGGAGAAGGAGTGAGC-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)と zClk2-606L 5'-GACGTGTGTCTCATTGCTG-3'の PCR 産物の *EcoRI/AccI* 断片と pcDNA3.1(+)-zfCLOCK2 の coding region を含む *AccI/NotI* 断片を pGEX4T-1 の *EcoRI/NotI* 切断部位に読み枠が合うように導入した。pGEX-zfBMAL3 ではまず、開始コドンのすぐ上流に *EcoRI* 切断部位を導入するために、zBMAL3-5'RI 5'-TCGAATTCATGGCAGACCAAGAATG-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)と zBMAL3-396L 5'-GTTTGCAGCACCTCGTAGAG-3'の PCR 産物を *EcoRI/NdeI* 処理したものと、pcDNA3.1(+)-zfBMAL3 の coding region を含む *NdeI/HindIII* 断片をまず His-tag protein 発現ベクターである pET28a(Novergen)の *EcoRI/HindIII* 切断部位に導入し pET-zfBMAL3 を作製した。その後、pET-zfBMAL3 の *EcoRI/XhoI* 断片を pGEX4T-1 の *EcoRI/XhoI* 切断部位に導入した。

pGEX-zCRY1a、pGEXzCRY3、pGEXzCRY4 は、以下の手順で本研究室においてすでに作製されたものを用いた。pGEX-zCRY1a は、開始コドンのすぐ上流に *EcoRI* 切断部位を導入するために zCRY1a 5'RI 5'-ACGAATTCATGGTGTC AATACAGTC-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)と zCRY1a 650L 5'-GCCTCTGTTTCTCCTCCTGG-3'で PCR 反応を行った。その PCR 産物の *EcoRI/SacI* 断片と pcDNA3.1(+)-zCRY1a の *SacI/XhoI* 断片を pGEX4T-1 の *EcoRI/XhoI* 切断部位に導入して pGEX-zCRY1a とした。pGEX-zCRY3 は単離した遺伝子の開始コドンと終止コドンのすぐ外側に制限酵素切断部位 *SalI*、*NotI* を導入するために、zCRY3 5'*SalI* 5'-CGAGGTCGACATGGTGGTGAATTCGGTG-3'(下線部 *SalI* 切断部位)と zCRY3 3'*NotI* 5'-TATTGCGGCCGCTCACTGCTTGTCATCCA-3'(下線部 *NotI* 切断部位)を合成した。ゼブラフィッシュ成魚より抽出した RNA を鋳型としてこの oligonucleotide をプライマーとして RT-PCR を行い、*SalI/NotI* 処理後、pGEX4T-3 の *SalI-NotI* 切断部位に導入した。3 つの独立し

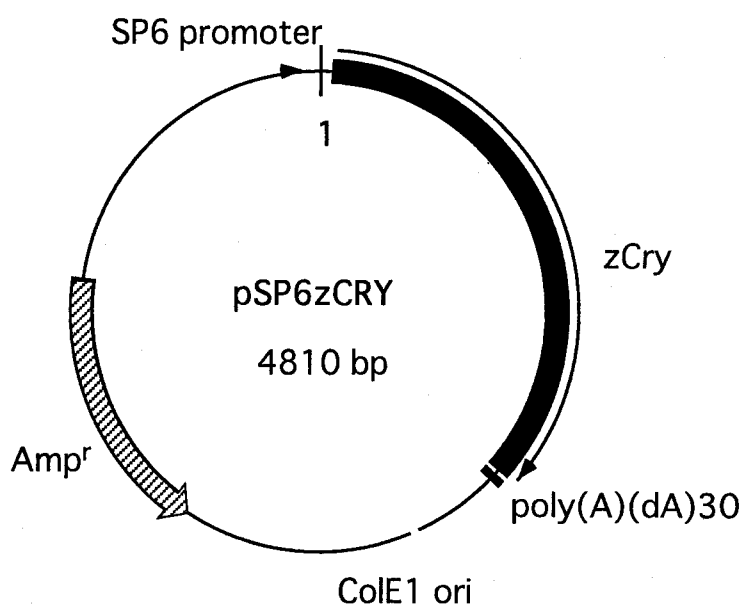
たクローンの全塩基配列を決定し、同一の塩基配列であることを確認し使用した。pGEXzCRY4 は、まず、遺伝子の開始コドンのすぐ上流に *EcoRI* 切断部位を導入するために zCRY4 5'RI 5'-AGAGGAATTCATGAGTCACCGCACCATC-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)と zCRY4 97L 5'-GATAGAGCGCGGAGGAGGAC-3'で PCR 反応をし、その産物の *EcoRI/NheI* 断片と cDNA library のスクリーニングで得られた pUC18-zCRY4 の *NheI/EcoRI* 断片を pUC18 の *EcoRI* 切断部位に導入した(pUC18-zCRY4-5')。pUC18-zCRY4 は zCry4 の cDNA 全長を含まず、3'端を欠くためこの 3'端は 3'RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)で得たクローン pBS-zCRY4-3'を使った。pUC18-zCRY4-5'の *EcoRI/NaeI* 断片と pBS-zCRY4-3'の *NaeI/NotI* 断片を pGEX4T-1 の *EcoRI-NotI* 切断部位に導入し pGEX-zCRY4 とした。



2-3-3-2. In vitro translation

In vitro translation でタンパクを合成するために、pSP6-HiszCRY1a、pSP6-HiszCRY3、pSP6-Gal4zCRY4 を作製した。pSP6-HiszCRY1a、pSP6-HiszCRY3 は、あらかじめ pSP6 vector に 6xHis を導入しておいたものに、読み枠をあわせて zCry1a、zCry3 の coding region を導入した。pSP6-HiszCRY1a

は *zCry1a* の coding region を含む pGEX-zCRY1a の *EcoRI/NheI* 断片と pcDNA3.1(+)*zCRY1a* の *NheI/XbaI* 断片を pSP6-His の *EcoRI-XbaI* 切断部位に導入した。pSP6-HiszCRY3 は pGEX-zCRY3 から *zCry3* の coding region を *BamHI/NdeI* 断片と *NdeI/NotI* 断片と分けて切り出し、pSP6-His の *BamHI-NotI* 切断部位に導入した。pSP6-Gal4zCRY4 は pSP6 に pBS-KS にリクローニングされた GAL4 DNA 結合領域の *HindIII/EcoRI* 断片と pGEX-zCRY4 の *EcoRI/XhoI* 断片を読み枠をあわせて導入した。

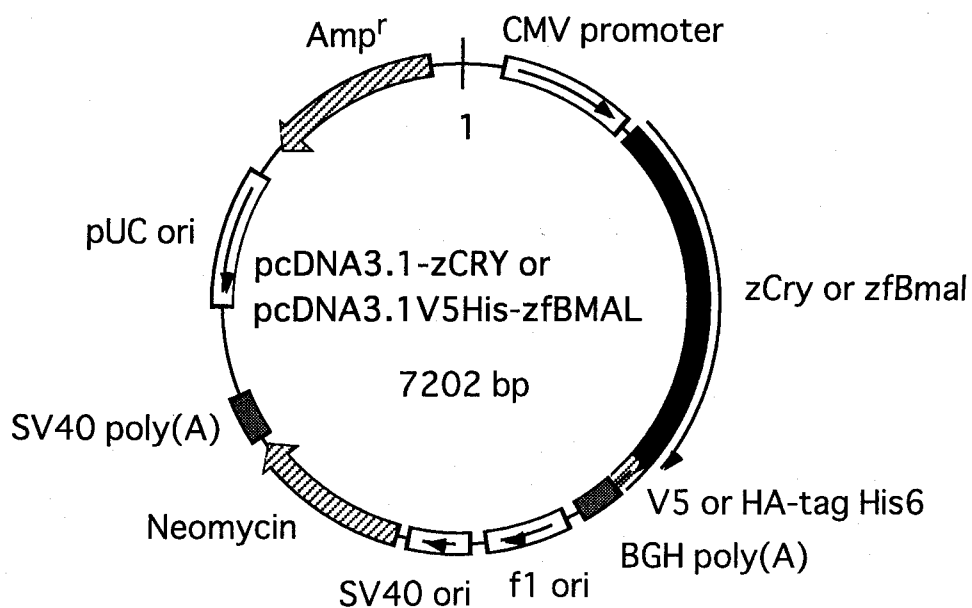


2-3-4.免疫沈降法

zCRY と *zfCLOCK*、*zfBMAL* の相互作用を見るために pcDNA3.1HA-*zCRY1a*、pcDNA3.1HA-*zCRY3*、pcDNA3.1HA-*zCRY4*、pcDNA3.1V5His-*zfBMAL3*、を作製した。まず、pcDNAV5His(Invitrogen)に V5-tag の代わりに HA-tag を導入した。HA-tag は HA 配列が組み込まれている vector、pCMV-HA を基質に HA の両端に HA 5'*Sfu* 5'-ACACTTCGAAATGGGCCGCATCTTTTA-3' (下線部 *SfuI* 切断部位)、HA 3'*Age* 5'-TCTCACCGGTCGGGCCGCACTGAGCA-3' (下線部 *AgeI* 切断部位)で *AgeI*、*SfuI* 切断部位を導入した。pcDNAV5His

から *Agel*/*SfuI* で V5 を切り出し、そこに HA を導入し pcDNA3.1HA を作製した。この plasmid は導入した遺伝子の 3'側に HA-tag が付くように作られている。そこで *zCry1a*、3、4 の開始コドンのすぐ上流にそれぞれ *SmaI*、*SmaI*、*EcoRI* 切断部位を、終止コドンの直前の配列に HA-tag と読み枠が合うようにそれぞれ *XhoI*、*SalI*、*XbaI* を *zCRY1a*5'Sma 5'-TGTCCCCGGGAATGGTGGTCAATACAGTCC-3'(下線部 *SmaI* 切断部位)、*zCRY1a* 3'Xho 5'-GTGTCTCGAGAGGAGCTGCACTGCCTCT-3'(下線部 *XhoI* 切断部位)、*zCRY35*5'Sma 5'-AGACCCCCGGGTATGGTGGTGAATTCGGTG-3'(下線部 *SmaI* 切断部位)、*zCRY33*5'Sal5'-GCGTGTCGACCCTGCTTGTCATCCATCTTC-3'(下線部 *SalI* 切断部位)、*zCRY45*RI 5'-GAGAATTCATGAGTCACCGCACCAT-3'、*zCRY43*Xba 5'-AAGGTCTAGACATGACCTCTCCGCTGA-3'(下線部 *XbaI* 切断部位)で導入し、それぞれの制限酵素で処理した後、pcDNA3.1HA の同じ切断部位に導入した。

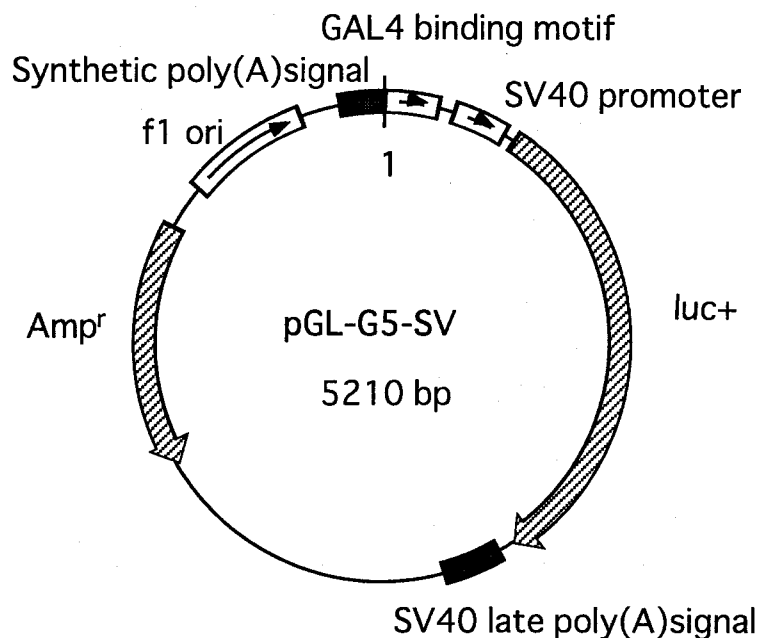
pcDNA3.1V5-zfBMAL3 も同様に開始コドンの直前に *EcoRI* 切断部位、終止コドンの直前に V5-tag と読み枠が合うように *XhoI* 切断部位を *zBMAL3* 5'RI 5'-AGGAATTCATGGCAGACCAAAGAATGGAC-3'(下線部 *EcoRI* 切断部位)と *zBMAL3* 3'Xho 5'-CCACTCGAGCCTGAGACACCTTGACTA-3'(下線部 *XhoI* 切断部位)で導入し pcDNA3.1V5His の *EcoRI*-*XhoI* 切断部位に導入した。



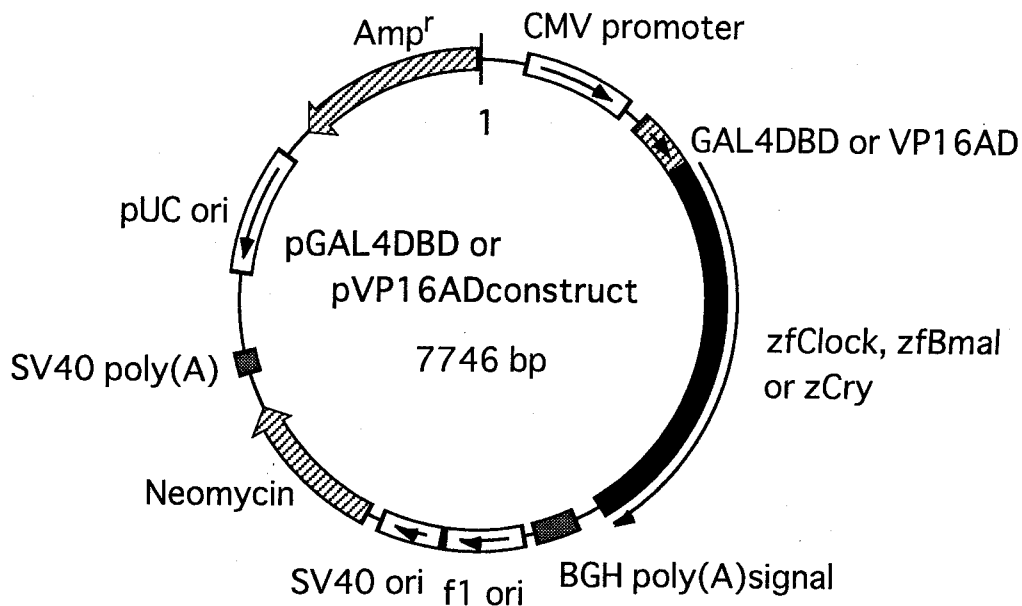
これらに加え、次の 2-3-5 節で述べる pcDNA3.1-VP16ADzfCLOCK2 (pVP16ADzfCLOCK2)を用いた。

2-3-5.Mammalian two-hybrid assay

reporter construct としては、pGL3-promoter(Promega)の SV40 promoter の上流に GAL4 binding motif を 5 回繰り返し組み込んだ、pGL-G5-SV (Agata et al., 1999)を用いた。



相互作用を見るための construct としては pGAL4DBD-zCRY1a、pGAL4DBD-zCRY3、pGAL4DBD-zCRY4、pGAL4DBD-zfCLOCK2 と pVP16ADzfCLOCK2、pVP16ADzfBMAL3 を作製した。
まず Yeast の GAL4 DNA 結合領域を含む pBS-KS(+)GAL4DBD から *HindIII*/*EcoRI* で GAL4DBD を切り出してきて、pcDNA3.1(+)に導入し pGAL4DBD とした。その下流に読み枠が合うように zCry1a、zCry3、zCry4、zfClock2 を以下の方法で導入した。



zCry1a は *zCry1a* の coding region を含む pGEX-*zCRY1a* の *EcoRI/NheI* 断片と pcDNA3.1(+)-*zCRY1a* の *NheI/XbaI* 断片を、pGAL4DBD の *EcoRI-XbaI* 切断部位に導入した。*zCry3* は pGEX*zCRY3* から *zCry3* の coding region を *SmaI/NotI* で切り出し pGAL4DBD の *EcoRV-NotI* 切断部位に導入した。*zCry4* は pGEX-*zCRY4* から coding region を含む *EcoRI* 断片を切り出し pGAL4DBD の *EcoRI* 切断部位に導入し遺伝子の方向が正しいものを選択し用いた。

zfClock2 は開始コドンのすぐ上流に GAL4DBD と読み枠が合うように *EcoRI* 切断部位を導入するために *zClk2* 5'RI 5'-

AGGGAATTCATGGACAACCTTTCGGAG-3' (下線部 *EcoRI* 切断部位) と *zClk2* 911L 5'-TACCCAATGATAGGAGAGGC-3' を合成し PCR 反応を行った。この PCR 産物を *EcoRI* で処理したものと pcDNA3.1(+)-*zfCLOCK2* の coding region を含む *EcoRI/HindIII* 断片を pGAL4DBD の *EcoRI-HindIII* 切断部位に導入し PCR 産物の *EcoRI* 断片が正しい方向で導入されているものを選択し用いた。

pVP16AD-*zfCLOCK2*、pVP16AD-*zfBMAL3* もまず pGAL4DBD と同様に、単純ヘルペスウイルスの転写活性化ドメインがサブクローニングされている pCMX-VP16N (Agata et al., 1999) から、VP16 を *HindIII*、*EcoRI* で切り出し pcDNA3.1(+)に導入し pVP16AD を作製した。*zfClock2* は pGAL4DBD-*zfCLOCK2* から、*EcoRI/BstPI*、*BstPI/NotI* 断片として *zfClock2* 全長を切り

出し pVP16AD の *EcoRI*-*NotI* 切断部位に導入した。 *zfBmal2* は 2-3-4 節で述べた pcDNA-V5-His-zfBMAL3 の coding region を含む *EcoRI*/*XbaI* 断片を pVP16AD の *EcoRI*-*XbaI* 切断部位に導入した。

すべての construct において PCR 反応を含む部位もしくは読み枠を合わせなければならない部位については、塩基配列の決定を行い変異が含まれていないことを確認し用いた。

2-4. 遺伝子発現レベルの解析

2-4-1. 明暗条件下での組織特異的発現

2-4-1-1. サンプルの調整

ゼブラフィッシュ個体の組織特異的な発現レベルの解析は、14 時間明、10 時間暗で飼育したものを、点灯時を ZT(Zeitgeber Time)0 消灯時を ZT14 としたときの ZT3 と ZT15 の時点の全身、頭部、眼球、脳について行った。頭部、眼球、脳についてはそれぞれの時点で個体を水中におき、氷麻酔にかけた後、すばやく各部を摘出しドライアイス上で凍結させた。全身については、液体窒素を用いて凍結させた。頭部はエラを目安に断頭した。

2-4-1-2. Northern blot analysis

Total RNA の調整は、セパゾール (ナカライテスク) を用いて行った。操作はマニュアルに従った。260nm の吸光度を測定し(BECKMAN)、RNA の濃度を求めた。Northern blot は、グリオキサール法で行った。

Total RNA 25 μ g を 5 μ l の水にとかし、グリオキサール 4 μ l、100mM リン酸ナトリウム (pH6.5) 3 μ l、DMSO 12 μ l をエッペンドルフチューブに入れ 50 $^{\circ}$ C で 60 分間処理し氷冷した。サイズマーカー-lambda DNA-HindIII Digest(NEB)、も同様の処理をした。loading buffer(50% グリセロール、10mM リン酸ナトリウム(pH6.5) 、0.04%BPB、0.04%XCFE)を 5 μ l 加えゲルにアプライした。

泳動槽に 10mM リン酸ナトリウム(pH6.5)を入れ、1.3%アガロースゲル中で 100V で 3~4 時間、BPB が 4/5 程度のところに来るまで泳動した。低い濃度の buffer を用いるので pH が変化しやすく、pH8.0 以上になるとグリオキサルが解離してしまうので、両極の buffer を循環させ、pH の変化を最小限に抑えた。

サイズマーカーのレーンを除き、残りのゲルをそのまま 20xSSC を用いてフィルターにブロットした。(~12 時間) メンブレンは Hybond-N (Amersham) を用いた。風乾後、UV 照射によって RNA をメンブレンに固定した。100°C の 20mM Tris-HCl(pH8.0)に 2 分間浸し、グリオキサルを除去しハイブリダイゼーションに進めた。

ハイブリダイゼーションバッファー(5xdenhardt、120µg/ml salmon sperm DNA、0.2%SDS、4xSSC、50%formamide)を用いて、42°C でプレハイブリダイゼーションを 1 時間以上行った後、新しいハイブリダイゼーションバッファーを用いて、プローブのハイブリダイゼーションを行った(42°C、~24 時間)。

今回単離した遺伝子、及び本研究室の小林によって単離された zCry1a、2a、2b、3、4 の cDNA 全長(Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)、コントロールとして β Actin をプローブとして用いた。標識プローブの作製及び精製は cDNA ライブラリーのスクリーニングの時と同様の方法で行った。2xSSC 0.1%SDS、1xSSC 0.1%SDS、0.5xSSC 0.1%SDS を用いて 15 分間ずつ 32 P のカウントを測定しながら 65°C で wash を行い、カウントが適当になったところで wash を止めて autoradiography を行った。また、バンドの定量は Bio Image Analyzer (BAS1000、Fuji)で行った。

2-4-2.経時的発現レベルの解析

2-4-2-1.サンプルの調整

明暗条件と明暗条件から恒暗条件に移したときの発現レベルを解析した。恒暗条件下における主観的明期の始まりを CT(Constant Time)0、主観的暗期の始まりを CT14 とした。個体では明暗条件下の ZT1、5、9、13、15、19、23 で恒暗条件下では CT 1、5、9、13、15、19、23、25、29、33、37、39、

43、47 で前述と同様の操作で眼球を採取した。

BRF41 細胞では明暗条件下の ZT3、9、15、21、恒暗条件下の CT3、9、15、21、27、33、39、45、49、53、57 でサンプルの回収を行った。サンプルは一点につきコンフルエントになった直径 10cm のシャーレー一枚分の細胞から回収した。回収は、メディウムを完全に除いた後、Phosphate Buffer Saline(PBS、日水製薬)を 5ml 加えて洗い、それを完全に除いた後、そこにセパゾールを加えスクレーパーで直接掻き取った。RNA の抽出は、Northern blot analysis と同様に行った。

2-4-2-2.Northern blot analysis

BRF41 細胞での経時的発現レベルの解析は Northern blot analysis で行った。方法は 4-1-2. Northern blot analysis と同様の方法で行った。

2-4-2-3.RNase protection assay (RPA)

個体の経時的発現レベルの解析は RNase protection assay(RPA)で行った。

リボプローブ合成の鋳型として Plasmid construction の項で述べた RPA プローブ construct を cDNA の 5'端側の制限酵素で切断したものを RNase free の状態でそれぞれ 1 μ g ずつ用意した。これに 10Xbuffer 2 μ l、RNase inhibitor 1 μ l、3NTP(4mM dATP、dGTP、dCTP) 1 μ l、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dUTP}$ 5 μ l、T7 もしくは T3 RNA polymerase(Boehringer Mannheim) 2 μ l 混ぜたものに滅菌水を加えて total 20 μ l にしたものを 37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間反応させ antisense リボプローブを合成した。これに DNase を 1 μ l 加えてさらに 37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間反応させ鋳型 DNA を分解した。ここからさらに、5%変性アクリルアミドゲル電気泳動で完全長のプローブを分離した。ゲルから Soak buffer(0.2M Tris-HCl(pH7.5)、0.3M NaCl、25mM EDTA、2% SDS)で一晩、プローブを溶出しフェノール/クロロホルム抽出を行った後エタノール沈殿をした。 ^{32}P のカウントを液体シンチレーションカウンターで測定し、カウントが 10^5cpm になるよう滅菌水で溶かした。

RPA には RPAIII™ Ribonuclease Protection Assay(Ambion)を用い、操作はマニュアルに従った。サンプルは各点につき 10μg の total RNA を用いた。プローブには *zfClock1* の 93(639-731)塩基、*zfClock2* の 124(1404-1527)塩基、*zfClock3* の 162(1301-1462)塩基、*zfBmal1* の 114(1765-1878)塩基、*zfBmal2* の 137(1756-1892)塩基、*zfBmal3* の 222(1646-1917)塩基を protect するものを用いた。シグナル定量のコントロールとしてゼブラフィッシュ *βActin* の 52 塩基を protect するものを用いた。

2-5.転写活性、転写抑制活性の解析

転写活性、転写抑制活性の解析は Luciferase reporter assay (Jin et al., 1999; Kume et al., 1999; Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)により行った。まず、BRF41 細胞をトランスフェクションの前日に 2×10^5 cells/well ずつ 12 穴プレートに播いた。転写活性、転写抑制活性を見たい組み合わせの発現ベクターを全量で 0.7μg(発現ベクターのみで満たない場合は pcDNA3.1(+))で調整)と reporter construct を 10ng、トランスフェクションの効率をチェックするためにコントロールとして pRL-SV40(SV40 early enhancer/promoter によってウミシイタケの luciferase を発現する vector(Promega)) 25ng をトランスフェクションした。トランスフェクションには LipofectAMINE PLUS™ Reagent(GIBCO BRL)、luciferase 活性の測定には Dual-Luciferase^R Reporter Assay System(Promega)を使用し、手順はそのマニュアルに従った。トランスフェクションの 48 時間後氷冷した PBS で細胞を 2 回洗い、キット付属の reporter lysis buffer を 50μl/well 加え掻き取った。サンプルの luciferase 活性を Lumat LB9507(EG and G BERTHOLD)で測定した。各サンプルにおいてホタル luciferase 活性をコントロールのウミシイタケ luciferase 活性で補正した。

2-6. タンパク間の相互作用の解析

2-6-1. GST Pull-down assay

タンパクの調整

1. 大腸菌内での融合タンパクの発現系

それぞれの遺伝子を Glutathion S-Transferase (GST) との融合蛋白として大腸菌内で発現させることを試みた。2-3-3-1 節で述べた、pGEX-zfCLOCK2、pGEX-zfBMAL3、pGEX-zCRY1a、pGEX-zCRY3、pGEX-zCRY4 について同様の操作を行った。pGEX-construct を大腸菌 BL21(DE3) (F_{ompThsdS_B}(r_B⁻m_B)gal dcm(DE3)) に導入した。シングルコロニーをピックアップし、50μg/ml の ampicilin を加えた LB 培地で OD₆₀₀ が 0.4 から 0.6 になるまで 26°C で培養した。次に 0.05mM の isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside(IPTG) でタンパク発現の誘導をかけ、さらにこれを 26°C で培養し、12 時間後、大腸菌を回収し phosphate buffered saline (PBS) に懸濁した。これを破碎し (氷中で 1 分を 7 回)、15000g、4°C で 60 分間遠心することで細胞抽出液を得た。GST タンパクには DnaK などの分子シャペロンが結合しやすいことが知られている。これらを除くために得られた細胞抽出液に 2mM ATP Na 3H₂O、10mM MgSO₄、5mg/ml カゼインを加え、攪拌しながら 20 分間室温で処理した。その後これを 18000g、4°C で 60 分間遠心しその上清から GST-fusion protein を Glutathion-Sepharose4B (Pharmacia) で精製した。操作は付属のマニュアルに従った。タンパクの発現及び精製度合いは SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) でチェックした。さらに精製の必要なものについては FPLC(Fine Pressure Liquid Chromatography(Pharmacia)) を用いて HiTrap Heparin(Pharmacia) column にかけて精製した。また、必要に応じて Sephadex G-25(PD10 column(Pharmacia)) で精製タンパクからのグルタチオン除去作業を行った。

2. In vitro translation

TNT reticulocyte lysate system(Promega) を用い、2-3-3-2 節で述べた pSP6-zCRY1a、pSP6-zCRY3、pSP6-zCRY4 を鋳型に Sp6RNA polymerase で zCry1a、zCry3、zCry4 の全長を転写させ、[³⁵S]メチオニンで標識を入れ

翻訳させた。操作はそのマニュアルに従った。

反応産物は SDS-PAGE を行い、autoradiography で目的の大きさのタンパクが合成されていることをチェックした。

zfCLOCK、zfBMAL と zCRY の相互作用を見るために In vitro translation で得られた zCRY に 1-5 μ g の GST-fusion protein として精製してきた zfCLOCK、zfBMAL を混ぜ、4 $^{\circ}$ C で 3 時間、転倒混和しながら Glutathion-Sepharose4B に吸着させた。その後、sepharose を wash buffer(50mM KCl、25mM DTT、10% glycerol)で 5 回洗い、elution buffer(50mM Tris-HCl (pH8.0)、50mM glutathion)10 μ l で 2 回溶出させた。それに SDS sample buffer を加えて 100 $^{\circ}$ C で 5 分間 denature し、SDS-PAGE を行った。EN³HANCE(NEN Life Science Product)で増感処理後、RI 標識されたタンパクを autoradiography で検出した。

2-6-2.免疫沈降法

まず、2-3-4 節で述べた、pVP16AD-zCLOCK2 と pcDNAHA-zCRY、pcDNAV5-zBMAL3 と pcDNAHA-zCRY の組み合わせで、2-5 節で述べたのと同様の方法で 6cm dish に 5x10⁵個播いた NIH3T3 細胞にトランスフェクションした。48 時間後、細胞を PBS で 2 回洗った後、IP-binding buffer(20mM HEPES(pH 7.5)、100mM KCl、2.5mM EDTA、5mM DTT、2.5mM PMSF、0.05% Triton-X、10% glycerol)250 μ l で細胞を回収した。BIORUPTOR(COSMO BIO)で sonicate し (30sec on ice 6times)、11000 回転で 20 分間遠心し、その上清を以後の操作に用いた。まずタンパク量を protein assay CBB 溶液 (ナカライテスク) で測定し、80 μ g 分のサンプルを Protein A/G Agarose(Santa Cruz)15 μ l に 4 $^{\circ}$ C で 1 時間振とうしながら吸着させ、Agarose に非特異的に結合するタンパクを除いた。次に、この上清に 1-2 μ g の抗体(anti-VP16(Rabbit polyclonal、CLONTECH) or anti-V5(mouse monoclonal、Invitrogen))を加え Protein A/G Agarose15 μ l に 4 $^{\circ}$ C で 3 時間振とうしながら吸着させた。11000 回転で 1 分間遠心し agarose をなるべく吸わないように上清を捨て、binding buffer 500 μ l で 2 回 wash した。(免疫沈降)そこに binding buffer と

SDS sample buffer を最終液量 30 μ l になるように加え 100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、10%ゲルで SDS-PAGE を行った。泳動終了後、ゲル及び membrane(Hybond-ECL、Amersham)を transfer buffer (48mM Tris、39mM Glycine、20% methanol(pH9.2)) で平衡化し、TRANSBLOT SD(BIO RAD)で membrane に転写し western blot を行った。Western blot は、VP16 で免疫沈降を行ったサンプルについては anti-HA mouse monoclonal 抗体 (Santa Cruz) で、V5 で免疫沈降を行ったサンプルについては anti-HA rabbit polyclonal 抗体(Santa Cruz)で行い、ECLTMWestern blotting detection reagents(Amersham)で検出した。Western blot 及びその検出反応は付属のマニュアルに従った。

2-6-3.Mammalian two-hybrid assay

Reporter construct として、pGL-SV5G plasmid を使用した。pGL-SV5G はホタル luciferase の上流に SV40 の promoter および GAL4 binding motif が 5 回繰り返し組み込まれている reporter construct である。

相互作用のみたい分子の coding region が組み込まれた pVP16AD と pGAL4DBD を用いて 2-5 節同様 luciferase reporter assay を行った。トランスフェクション前日にマウス NIH3T3 cell を 1.2X10⁵cells/well ずつ 12 穴プレートに播き、相互作用の見たい組み合わせの construct を total 0.7 μ g(満たない場合は pcDNA3.1(+)で調整)と reporter construct を 10ng、コントロールの pRL-SV40 を 25ng トランスフェクションし luciferase 活性を測定した。

2-6-4.Gel mobility shift assay

Mobility shift assay の DNA プローブには zCry3 の上流にある E-box を含む領域 86bp を用いた。この領域を増幅させるプライマー-zCRY3R2(5'-CCAATCACAGCTCGGAGGC)、zCRY3L1(5'-CGCCTCTCCCCGCGTTGATT-3')で、[α -³²P]dCTP 存在下 PCR 反応をし、RI 標識された wild type(WT)のプローブを得た。一方 mutant type(mut)のプローブは WT と同じものを基質とし、

E-box に変異が入るよう zCRY3R2 と zCRY3L2mut(5'-CGTTCATTGGCCAGC GGGCGGAAGGCTGTA-3' 下線部 mutated E-box)で同様に PCR 反応を行うことにより、WT よりも 12bp 短い 74bp の mut プローブが得られた。得られたプローブを精製するため 5%非変性アクリルアミドゲルで分離しバンドを切り出して、TE(10mM Tris-HCL(pH8.0)、1mM EDTA)で一晩ゲルから溶出し、フェノール/クロロホルム抽出を行った後エタノール沈殿をした。³²P のカウントを液体シンチレーションカウンターで測定し、 5×10^4 cpm になるよう滅菌水で溶かした。精製した GST-fusion の zfCLOCK1、zfCLOCK2、zfBMAL1、zfBMAL3、zCRY1a、zCRY3、zCRY4 タンパクを様々な組み合わせで混ぜ(0.3-0.5 μ g/1 反応)、10mM Tris-HCl(pH7.5)、2.5mM DTT、50mM KCl、10%glycerol 存在下 30 分間室温でインキュベートした。そこに poly(dl-dC) を 1 μ g と ³²P で標識した DNA プローブを 5×10^4 cpm 加えさらに 30 分間インキュベートし、5%非変性ポリアクリルアミドゲルにアプライし 1XTBE (45mM Tris-borate(pH7.5)、1mM EDTA)中で泳動、分離した。泳動終了後、autoradiography でバンドを検出した。

(1) Zebrafish CRY による CLOCK-BMAL

転写活性の抑制メカニズム

3.結果(1)

3-1.ゼブラフィッシュ *Clock*、*Bmal* 遺伝子の単離

Clock、*Bmal* 遺伝子はショウジョウバエ、マウス、ヒトで既に単離されており、それぞれの遺伝子で保存されている b-HLH、PAS 領域に degenerate oligonucleotide を 2 組ずつ設計し(Fig.3-1A、B)、ゼブラフィッシュの眼球から抽出した total RNA を基質に RT-PCR を行った。これらの PCR 産物を TA-cloning し予想されるサイズの挿入断片の入った plasmid を塩基配列決定する事により、*Clock*、*Bmal* とともに 3 種類の配列を得ることができた。このうち 1 種類の *Clock*(*zfClock*) (Whitmore et al., 1998)と 2 種類の *Bmal* (*zfBmal1*、*zfBmal2*) (Cermakian et al., 2000)は既知の配列であった。これらの配列をもとにゼブラフィッシュ成魚の cDNA library のスクリーニング、全長に満たなかったものについては 5'RACE、3'RACE、cDNA library の PCR を行うことによってそれぞれの cDNA 全長を得、全塩基配列を決定した。そこで、既知の *zfClock* を *zfClock1* 今回得られたものを *zfClock2*、*zfClock3* と、また既知の *Bmal* は 1 と 2 なので今回新しく得られたものは *zfBmal3* とした。

それぞれのアミノ酸配列を比較してみると *zfCLOCK* は *zfCLOCK1* を中心に、*zfBMAL* は *zfBMAL3* を中心に共に bHLH 領域(basic helix loop helix、DNA 結合タンパクでよく見られるモチーフ)、PAS-A、B 領域 (もともと PER、ARNT、SIM タンパクに共通のモチーフでタンパク同士の相互作用に関わるモチーフ) で高い相同性が見られた。全体を比較してみても *zfCLOCK* では 50%前後の、*zfBMAL* では 50%以上の高い相同性が見られた(Fig.3-2)。得られた遺伝子のアミノ酸配列とこれまでに知られているマウスやヒト、ショウジョウバエの *CLOCK*、*BMAL1*(*CYCLE*)のアミノ酸配列とで系統樹を作製してみた。そうしたところ *CLOCK* では既知の *zfCLOCK1* がもっともマウス、ヒトの *CLOCK* と似ているが、今回得られた 2 種類の *zfCLOCK* は *zfCLOCK3* が *zfCLOCK1* と似ておりマウス、ヒトタイプのものに近かった(Fig.3-3)。また *zfCLOCK2* はヒト *CLOCK* の相同遺伝子である *hNPAS2* に近かった。*zfBMAL* は *zfBMAL1* と 3 がよく似ており、マウス、ヒトタイプのものに近かった。*zfBMAL2* はマウスの *BMAL2* とよく似ていた(Fig.3-3)。

3-2. *zfClock*、*zfBmal* の発現パターンの解析

ほ乳類の *Bmal* 遺伝子の発現は振動するが、*Clock* 遺伝子の方は振動しない (Oishi et al., 1998; Shearman et al., 2000)。ほ乳類と異なり、ゼブラフィッシュの *zfClock1*、*zfBmal1*、*zfBmal2* は全身のあらゆる組織でその発現が振動していることが報告されている (Cermakian et al., 2000; Whitmore et al., 2000; Whitmore et al., 1998)。

そこで *zfClock*、*zfBmal* の組織特異的発現及び経時的発現を Northern blot analysis 及び RNase protection assay (RPA) で観察した。

まず組織特異的発現を成魚の全身、眼球、脳を ZT3、15 に回収し Northern blot analysis により観察した。今回新しく単離された *zfClock2*、3、*zfBmal3* は全身での発現が非常に弱いことがわかった。一方、眼球、脳では、これまでに知られている *zfClock1*、*zfBmal1*、2 同様 *zfClock2*、3、*zfBmal3* も強く発現しておりその発現が振動していることがわかった (Fig.3-4)。

次に、この振動が概日時計によるものなのか、またそうだとすればどのような振動パターンを取るのかを、詳しく見るために明暗条件、恒暗条件で経時的に成魚の眼球をサンプリングし、RPA を行った。明暗条件下ではすべての *zfClock*、*zfBmal* で ZT13 がピークとなる振動パターンを示した。さらに恒暗条件下でもその振動が続くことがわかった (Fig.3-5)。

3-3. *zfCLOCK*-*zfBMAL* ヘテロ二量体の転写活性

CLOCK、*BMAL* のヘテロ二量体が時計関連遺伝子の転写を enhancer 配列である E-box を介して活性化することは既によく知られている。そこで、luciferase reporter assay の系を用いて、すべての組み合わせで *BMAL*、*CLOCK* の転写活性を luciferase 活性として測定した。結果、*zfBMAL2*-*zfCLOCK3* の組み合わせを除き、ほかのすべての組み合わせで転写活性が見られた (Fig3-6)。どの *zfCLOCK* と組み合わせても *zfBMAL3* が最も活性が高いことがわかった。

3-4.zfCLOCK-zfBMAL 転写因子に対する zCRY の転写抑制活性

ほ乳類では CLOCK-BMAL による転写活性が CRY に抑制されることによって負のフィードバックループが形成され、それが概日時計の分子機構の中で中心的な役割を担っていることが知られている(Kume et al., 1999)。本研究室では、ゼブラフィッシュより 6 種類の *Cry* 遺伝子を単離している。それら CRY タンパクのマウス CLOCK-BMAL ヘテロ二量体の転写活性に対する抑制を NIH3T3 細胞中で見た(Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)。その結果、ゼブラフィッシュの *Cry* 遺伝子はマウスの CLOCK-BMAL に対して、強い転写抑制活性を持つもの(*zCry1a*, *1b*, *2a*, *2b*)と、転写抑制活性を示さないもの(*zCry3*, *4*)の 2 つのグループに分かれることが判った。

そこで zCRY がこのようなマウスの CLOCK-BMAL に対する抑制作用と同様の活性を zfCLOCK-zfBMAL にも示すかをゼブラフィッシュの培養細胞 BRF41 細胞で検討した。結果、マウスの CLOCK-BMAL に対するのと同様、どの CLOCK-BMAL の組み合わせに対しても zCRY1a、2b は転写抑制活性を示し、zCRY4 は転写抑制活性を示さなかった(Fig.3-7)。zCRY3 はマウスの CLOCK-BMAL に対しては全く転写抑制活性を観察できなかったが、zfCLOCK-zfBMAL に対しては弱い転写抑制活性を示した。

3-5.zfCLOCK-zfBMAL と zCRY の相互作用

マウスの CRY タンパクは mCLOCK-shBMAL に直接相互作用する事によって、その転写活性を抑制する(Griffin et al., 1999)。3-4 節で示したように、zCRY1a、2b は zfCLOCK-zfBMAL の転写活性を抑制する。そこで転写抑制活性を示す zCRY1a、2b と抑制活性の弱い zCRY3 や抑制活性を示さない zCRY4 で zfCLOCK-zfBMAL との相互作用に違いがあるのか明らかにしようと試みた。

まず、GST-pull down assay を行った。GST-pull down assay は大腸菌内で大量発現させた GST-zfCLOCK2、GST-zfBMAL3(Fig.3-8A)と in vitro translation system で³⁵S]-メチオニンで RI 標識し、合成した zCRY1a、3、4(Fig.3-8B lane1-3)との間で行った。結果、zfCLOCK2、zfBMAL3 と zCRY1a の間に強い相互作用が見られた(Fig.3-8B、lane7、10)。また、zfCLOCK2 と

zCRY3 の間にも相互作用が見られた。zCRY3 と zFBMAL3 の間にも弱いながら相互作用が見られた(lane8、11)。一方 zCRY4 との間にはどちらも相互作用を観察することが出来なかった(lane9、12)。

この結果からゼブラフィッシュの CLOCK-BMAL ヘテロ二量体も zCRY1a と直接相互作用する事によってその転写活性が抑制されることが示唆された。zCRY3 が弱く相互作用し zCRY4 が相互作用しないことから CLOCK-BMAL ヘテロ二量体との相互作用の強さが、転写抑制活性のあるなし、転写抑制活性の強さと直接関係していることが示唆された。

更に確認のため、免疫沈降法を行った。ここでは、VP16AD-zfCLOCK2、zFBMAL3-V5、zCRY-HA fusion タンパクとして細胞内で発現させ、zfCLOCK2、zFBMAL3 の tag(VP16AD、V5)に対する抗体で免疫沈降したサンプルに zCRY が含まれるかどうかを zCRY の tag(HA)に対する抗体で検出 (western blot) する事により、その相互作用を観察した。その結果、GST-pull down assay の結果同様 zfCLOCK2、zFBMAL3 と zCRY1a、3 は相互作用し(Fig.3-9 lane1、2、4、5)zCRY4 は相互作用しない(lane3、6)ことが示された。また、zfCLOCK2、zFBMAL3 両方の分子が存在するときすなわち zfCLOCK2 と zFBMAL3 がヘテロ二量体を形成しているとき、zCRY との相互作用に変化があるかどうかも同時に検討してみたが変化は見られなかった(Fig.3-9 lane7-9)。

ここまでの結果、zCRY1a が zfCLOCK2、zFBMAL3 に結合し転写を抑制することが明らかになった。では、zCRY1a がどのようにして zfCLOCK2-zFBMAL3 の転写活性を抑制しているのか?可能性として以下の3つが考えられる。1)zCRY1a が zfCLOCK2-zFBMAL3 に結合しその相互作用を壊す。2)zCRY1a が zfCLOCK2-zFBMAL3 と enhancer 配列(E-box)との結合を妨げる。3)zCRY1a が E-box に結合している zfCLOCK2-zFBMAL3 に結合し直接転写を抑制している。

まずこれまでの結果 *in vitro* で見られた zfCLOCK2、zFBMAL3 と zCRY1a、zCRY3 の相互作用が *in vivo* でも見られるかを確かめるために、タンパク間の相互作用を生理的条件下で確認できる Mammalian two-hybrid assay を行った(Fig.3-10)。Mammalian two-hybrid assay とは、出芽酵母の転写因子 GAL4 の再構成を利用してタンパク質複合体形成を検出する実験系である。GAL4 の DNA 結合領域をコードする部分(GAL4DBD)と転写活性化領域をコードする部分(GAL4AD)に分割し、複合体形成の有無をみたい2つのタンパク質をコード

する遺伝子のうち一方を前者にもう一方を後者につないだ複合遺伝子を作り、別々の plasmid に組み込む。これらの plasmid を、GAL4 タンパク質の認識配列を promoter 領域に組み込んだ reporter construct と共に培養細胞に導入する。2 つのタンパク質の間で複合体が形成されると分割されていた GAL4 転写因子が再構成され reporter 遺伝子の転写が活性化されるが、複合体が形成されない場合 GAL4 が再構成されないため reporter 遺伝子は発現しない。このように reporter 遺伝子の発現の有無によってタンパク質間の複合体形成を検出する assay 系である。今回用いた系では転写活性化領域として単純ヘルペスウイルスの VP16 活性化ドメインを、reporter 遺伝子として luciferase 遺伝子を用い、マウス培養細胞 NIH3T3 中で zfCLOCK、zfBMAL、zCRY の複合体形成を luciferase 活性として検出した。

pGAL4DBD-zCRY と pVP16AD-zfCLOCK2、もしくは pVP16AD-zfBMAL3 を同時にトランスフェクションし、その reporter 活性を見たところ GAL4DBD-zCRY1a と VP16AD-zfCLOCK2、-zfBMAL3 では reporter 遺伝子の転写の活性化が見られたが、GAL4DBD-zCRY3、4 では見られなかった (Fig.3-11)。これらの結果から zCRY1a は、zfCLOCK2、zfBMAL3 と直接相互作用して機能していることが、zCRY4 は相互作用していないことがより明確に示された。しかし zCRY3 は GST-pull down assay、IP-Western で相互作用が見られたにもかかわらず生理的条件下では相互作用を検出することが出来なかった。

次に 1) の可能性、つまり zCRY1a と zfCLOCK2、zfBMAL3 の相互作用が zfCLOCK2-zfBMAL3 間の結合を阻害しているのかを確かめた。方法としては、GAL4DBD-zfCLOCK2 と VP16ADzfBMAL3 の間で起こる two-hybrid の反応が zCRY を加えることによって変化するかどうかで検討した。その結果、zCRY1a、2b、3、4 いずれを発現させても、GAL4DBDzfCLOCK2-VP16ADzfBMAL3 の相互作用を阻害しないことが示された (Fig.3-12)。

そこで次に、2) の可能性を検証するために、zfCLOCK2-zfBMAL3 が実際に機能している状態を in vitro で再現し、そこに zCRY1a を加え、その相互作用がどうなっているかを gel mobility shift assay で検討した。DNA プローブとしては zCry3 の上流領域の E-box を含む配列を用い、大腸菌内で大量発現させ精製した GST-fusion タンパクを用いた。DNA プローブに GST-zfCLOCK2 と GST-zfBMAL3 を加えると、GST-zfCLOCK2-GST-zfBMAL3 ヘテロ二量体

が結合してバンドが shift することが示された(Fig.3-13 lane3)。GST-zfCLOCK2 のみ、GST-zfBMAL3 のみではバンドの shift は検出されなかった(lane1、2)。また E-box に塩基置換変異(CACGTG->CAGCCT)を導入した mutant プローブではバンドの shift が起きなかった(lane11)。ここで特筆すべき事は、zfCLOCK2-zfBMAL3 の DNA 結合活性は DTT の濃度に依存していることである。ここまでに示した結果はすべて高濃度の DTT(2.5mM)存在下で行われていた。これを DTT 非存在下で行うと band shift が起こらなくなることが明らかとなった(lane9)。詳しく調べてみると、最低 0.5-0.8mM の濃度の DTT がこの反応に必要なことがわかった(lane12-15)。

この反応にさらに GST-zCRY を加えることによって zfCLOCK2-zfBMAL3 が E-box に結合するのを阻害されるかどうかを検討した。すると、意外なことに zCRY1a を加えたときのみ、バンドがさらに shift するようになった。一方、zCRY3、4 を加えてもそういった変化は見られなかった(Fig.3-13 lane4、5、6)。

(2) Zebrafish 培養細胞 BRF41 を用いた

光による概日時計の発振機構

4.結果(2)

概日リズムの研究は、視交叉上核、網膜、松果体等、生物時計の存在が確認されている組織を用いて進められてきた。ところが、マウスの培養細胞などで高濃度の血清や薬剤などにより細胞を刺激すると細胞内の時計が同期して時計遺伝子の発現がリズムを刻み始めることが見いだされた(Balsalobre et al., 1998; Yagita and Okamura, 2000)。更に興味深いことに最近、ゼブラフィッシュの培養細胞において光刺激を与えると時計遺伝子の発現がリズムを刻み始めることが報告された(Pando et al., 2001)。個体、組織レベルに比べ、培養細胞は操作が容易であるため詳細なメカニズムの解析が可能となる。そこで、入手可能な魚類の培養細胞において同様の反応を示すものがあるかどうかスクリーニングを行った。メダカの尾ヒレ由来の培養細胞 OL32、ゼブラフィッシュの尾ヒレ由来の BRF41、ゼブラフィッシュの胚由来の ZF4 及び ZEM2S について調べた。

細胞を 14 時間明 10 時間暗の条件で 3 日間以上培養し、ZT7、15、23 の時点で細胞を回収し totalRNA を抽出して Northern blot analysis を行った。コントロールとして光を照射していない細胞も同時に回収し解析した。プローブとしては個体レベルで振動することが判っている *zCry2a* を用いた。

その結果、BRF41 細胞で明暗サイクルに同調させた細胞でのみ *zCry2a* の発現が振動していることが判った。OL32 と ZEM2S では *zCry2a* の発現が Northern blot で検出することが出来なかった。メダカの培養細胞である OL32 についてはゼブラフィッシュの cDNA をプローブとしたため検出できなかった可能性も考えられる。また、ZF4 は、発現は検出されたが光照射による変化は見られなかった。

次に、BRF41 細胞内で *zCry2a* 以外のどの様な時計遺伝子が振動しているかを観察した。前述同様明暗周期で同調させたものとそうでないものについて行った。その結果、*zCry1a*、*2a*、*2b*、*3*、*4*、*zfPer2*、*3*、*zfBmal1*、*2*、*3* については明暗周期に同調させた時に振動し始めることが示された(Fig.4-1A、B)。*zCry1a*、*3*、*4*、*zfPer2*、*3* は ZT3 に、また *zCry2a*、*2b*、*zfBmal1*、*2*、*3* は ZT15 にピークの周期を示した。*zfClock1*、*3* は光照射があることによって発現量は増すが振動しなかった。*zfClock2* は発現量が少なく Northern blot ではわずかにしか検出できなかった。

次にこの遺伝子発現の振動が単に光刺激に応答しているために見られるものなのか、それとも細胞内の生物時計が働くことによって起こっているものなのかを明らかにしようと試みた。前者の場合、外部刺激である光がなくなれば遺伝子発現の振動はすぐに見られなくなるが、後者であれば生物時計が働いているため、外部刺激がなくなっても振動は続くはずである。そこで、明暗周期に同調させた後、恒暗条件にした時に、この振動が続くかどうかを観察した。*zCry1a*、*2b*、*3*、*zfPer3*、*zfBmal1*、*2*、*3* は恒暗条件下にあっても、多少の振幅の減衰は見られるが振動が続くことが示された(Fig.4-2A、B)。しかし *zfPer2* は光刺激がなくなると Northern blot で検出できなくなるほど発現レベルが下がった。また *zCry4* は発現量に変化は見られないが振幅がほとんど消失してしまった。*zfClock1*、*2*、*3* については発現レベルに変化は見られなかった。

次に、光照射によりどのような様な遺伝子発現の変化が誘導されているのかを見るために、恒暗条件で培養を続けている BRF41 細胞に 1 時間の光照射の後、15、30、60 分後に細胞を回収し Northern blot を行った。その結果 *zCry1a*、*2b*、*4*、*zfPer2* で明らかに光刺激によって遺伝子発現が誘導されていることが判った(Fig.4-3)。*zfPer3* についても僅かではあるが誘導されていることが示された。*zfBmal1*、*2*、*3*、*zfClock1*、*2*、*3* については、光刺激による発現の誘導は観察されなかった。

5. 考察

5-1. Zebrafish CRY による CLOCK-BMAL 転写活性の抑制メカニズム

ショウジョウバエでは dPER、dTIM、もしくは dPER-dTIM のヘテロ二量体が dCLOCK-CYC(dBMAL1)dimer による転写活性を抑制し負のフィードバック機構を形成している。ショウジョウバエではこの機構が概日時計を起こす中心的な役割を担っている。マウスではこれら、ショウジョウバエの PER、TIM の相同遺伝子として 3 種類の *per* 遺伝子 (*mper1*, *mper2*, *mper3*) と 1 種類の *tim* 遺伝子が単離されている。ショウジョウバエでの機能から推測してこれらマウスの *per* 遺伝子も負のフィードバック機構に関与する因子であると考えられた。しかしどの mPER も *in vitro* で CLOCK-BMAL による転写活性をわずかしか抑制することが出来なかった (Jin et al., 1999; Kume et al., 1999; Sangoram et al., 1998)。一方、mCRY は 1 と 2 があるがどちらも強力に CLOCK-BMAL による転写活性を *in vitro* で抑制することが明らかになった (Griffin et al., 1999; Kume et al., 1999)。このことからマウスの負のフィードバック機構では PER は抑制因子として働いておらず (Shearman et al., 2000)、mCRY がその中心的な役割を担っていることが示唆された。

ゼブラフィッシュでは 6 つの *Cry* 遺伝子が単離されているが、これらの遺伝子はその配列と機能から 2 つのタイプに分類できる。1 つは CLOCK-BMAL による転写活性を抑制するタイプ (転写抑制型 CRY)、もう 1 つは抑制しないタイプ (非転写抑制型 CRY) である (Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)。では転写を抑制するタイプのものはどの様にして転写を抑制しているのか。今回転写抑制型の CRY、CRY1a、が zfCLOCK2-zfBMAL3 と相互作用していることが示された (Fig.3-8、3-9)。この相互作用は zfCLOCK2-zfBMAL3 ヘテロ二量体間の結合を阻害するわけでもなく (Fig.3-12)、zfCLOCK2-zfBMAL3 ヘテロ二量体と E-box との結合を阻害するわけでもないことが示された (Fig.3-13)。それどころか、zCRY1a は zfCLOCK2-zfBMAL3-E-box 複合体と安定した複合体を形成していることが示された (Fig.3-13 lane4)。非転写抑制型 CRY、zCRY4 は zfCLOCK2 と zfBMAL3 とも相互作用しないことも示された。以上の結果より、転写を抑制するタイプの zCRY は CRY-CLOCK-BMAL-E-box の安定した複合体を形成することにより転写を抑制していることが示された。この結果は

ショウジョウバエの dPER-dTIM による転写抑制の仕組みとは明らかに異なる (Lee et al., 1999)。ショウジョウバエでもやはり dPER-dTIM は dCLOCK-CYC(dBMAL)の相互作用は妨げないが、dPER-dTIM が dCLOCK-CYC(dBMAL)に結合することによって dCLOCK-CYC(dBMAL)の E-box への結合性が低下し dCLOCK-CYC(dBMAL)の転写活性が抑制されることが判っている。dPER、dCLOCK、CYC(dBMAL)はタンパク間の相互作用を担う PAS(PER-ARNT-SIM)ドメインを持つタンパクで、dTIM はそれを持たない。しかし、dTIM は dPER と PAS ドメインを介して結合していることから (Gekakis et al., 1998; Saez and Young, 1996)、PAS ドメインは dPER-dTIM-dCLOCK-CYC(dBMAL)の安定な複合体を形成し DNA(E-box)に対する結合性を低下させ転写活性を抑制するのに重要な役割を担っていることが考えられる (Lee et al., 1999)。しかし、CRY は PAS ドメインを持っておらず PAS ドメインタンパクである PER とは異なったメカニズム、例えばこのシステムでは zCRY は zfCLOCK-zfBMAL に結合することにより zfCLOCK-zfBMAL の転写活性に必要な領域や転写活性を示すために必要なほかのタンパクとの相互作用する領域を不活性化することによって、CLOCK-BMAL の転写活性を抑制しているものと考えられる。

最初に mPER が CLOCK-BMAL の転写活性を抑制する因子として機能していないのではないかと述べたが、マウスで mCRY が mPER と複合体を形成し、mPER の核移行を助けているという報告がある (Kume et al., 1999; Miyazaki et al., 2001)。すなわち、核移行シグナルを持たない mPER は核移行シグナルを持つ mCRY と結合して、核に移行し、CLOCK-BMAL の転写活性を抑制しているという考えも除外することは出来なくなる。しかしこの仮説から考えると、*per* のノックアウトマウスでは転写抑制因子としての PER がなくなるため、*cry* の発現が増加していることが予測されるが、実際には *per*、*cry* 共に発現レベルが低くなっており矛盾する (Shearman et al., 2000)。

今回の gel mobility shift assay の結果、zfCLOCK2-zfBMAL3 の DNA 結合能が反応液中の DTT の濃度に依存しているという興味深いデータが得られた (Fig.3-13)。zfCLOCK2-zfBMAL3 は DTT 非存在下では DNA と相互作用せず、DTT がある一定濃度以上存在している還元状態でないと DNA 結合能を示さないことが判った。酸化還元状態が転写因子の活性を制御している例というのはいくつか知られている (Jayaraman et al., 1997; Tell et al., 1998; Xanthoudakis and Curran, 1992)。代表的な例として、酸化ストレスなどに

即座に応答する転写因子、Activation protein-1(AP-1)が挙げられる(Angel and Herrlich, 1994)。AP-1 はその DNA 結合能、転写活性が自身の還元状態に依存しており、AP-1 の構成因子である Fos、Jun で保存されている DNA 結合ドメインのシステイン残基の酸化還元状態が重要であることが知られている(Abate et al., 1990; Nikitovic et al., 1998)。つまり、AP-1 の DNA 結合能にはこれらシステイン残基が何らかの因子によって還元状態にされることが必要である。もしかすると、CLOCK-BMAL の DNA 結合活性にもシステイン残基の還元が必要なかもしれない。しかし、zfCLOCK2-zfBMAL3 では還元剤である DTT によって DNA 結合活性が強く誘導されるが、AP-1 では DTT の有無での差は小さい(Yan et al., 2000)。また、Redox factor-1(Ref-1)によって Fos、Jun のシステイン残基が還元され DNA と結合するようになるとの報告もある(Nikitovic et al., 1998; Xanthoudakis and Curran, 1992)。従って、AP-1 の場合は化学物質による非特異的な還元作用というより、Ref-1 のような酸化還元因子との特異的な相互作用によって Fos、Jun のシステイン残基が還元されることが DNA との結合ひいては転写因子としての活性に重要であると考えられる。これらのことから、CLOCK-BMAL でも AP-1 に対する Ref-1 のように CLOCK-BMAL のシステイン残基を還元する因子が存在し、それによって CLOCK-BMAL の転写因子としての活性が左右されている可能性は大きい。今回示した gel mobility shift assay の実験は、生理的な活性状態に比べ非常に過剰量のタンパクを加えている。DTT による還元効率はそれほど良くないが、反応液中に zfCLOCK-zfBMAL が過剰量存在するためごく一部が還元され、バンドシフトが DTT に依存して起きているように見えたのかもしれない。特異的に CLOCK-BMAL のシステイン残基を還元する因子が存在すれば、システイン残基が効率よく還元されシフトするバンドの量が増加すると考えられる。

最近、PAS ドメインを持つ転写因子の活性が酸化還元状態に依存していると報告された(Rutter et al., 2001)。NPAS2(Neuronal PAS domain protein2) は CLOCK の相同遺伝子産物で BMAL1 とヘテロ二量体を形成し、E-box に結合して転写を活性化する。この筆者らはヒトの hNPAS2 の DNA 結合活性が酸化型と還元型の nicotinamide adenine dinucleotide (NAD と NADH)の比に依存していることを示した(Rutter et al., 2001)。還元型である NADH は hNPAS2-BMAL1 のヘテロ二量体を形成させ転写活性を促進するほうに、酸化型である NAD はヘテロ二量体の形成を阻害し、その結果、転写活性のない

BMAL1 の homodimer が形成されそれが E-box に結合することにより、転写活性を抑制する方に働くというものである。zfCLOCK2 は NPAS2 と高い相同性があるが、zfCLOCK2 と zfbMAL3 のヘテロ二量体形成に NAD 及び NADH はなんの影響も示さなかった。なぜ zfCLOCK2-zfbMAL3 の dimer 形成が NAD/NADH に依存しないかは現在不明である。可能性としては、報告があったのはヒトのもので今回はゼブラフィッシュと種が異なること、もしくは hNPAS2 では His-tag が使われているが、ゼブラフィッシュにおいては GST-fusion タンパクを用いており、GST が何らかの形でこの反応を妨げている可能性、などが考えられる。

CRY は光回復酵素／青色光受容体ファミリーに属するタンパクである (Cashmore et al., 1999; Kanai et al., 1997; Todo et al., 1996)。系統解析の結果 CRY の祖先タンパクだと考えられている光回復酵素は紫外線による DNA 損傷に特異的に結合し光のエネルギーを利用して修復する酵素で、補酵素として Flavin Adenine Dinucleotide(FAD)を持つフラボタンパクである (Sancar, 1994)。FAD は光子を吸収することによって励起し還元型の FADH₂になる。光回復酵素は紫外線によって DNA に出来たピリミジンダイマーに結合しこの励起状態にある FADH₂から電子を与えることによって傷を修復する (Sancar, 1994)。この反応の前後では見かけ上、正味の酸化還元状態の変化は見られませんが、光依存的な酸化還元反応が光回復酵素の修復反応に関わっていることは明らかである。CRY タンパクも FAD を持つがその転写抑制活性の機能は光に依存しない (Kume et al., 1999)。つまり、光によって励起された FADH₂からの電子の授受が転写抑制活性に関与しているわけではない。しかしながら、“FAD の酸化還元反応介在能が転写抑制反応に何らかの役割を果たしている”というの興味深い考え方である。上記の通り zfCLOCK-zfbMAL、hNPAS2-BMAL1 の DNA 結合活性は酸化還元状態に依存している。この酸化還元状態の制御に CRY が関わっているのかは興味深く、今後さらに解析を進めていきたいと考えている。

zCRY4 は転写抑制活性もなく zfCLOCK-zfbMAL とも相互作用しないことからほかの CRY とは明らかに異なり、負のフィードバック機構に関与しないものと考えられる。CRY の祖先タンパクが光回復酵素であると考えられていることから、CRY が光レセプターとして光による概日時計の位相変位に関わっていたとしても不思議ではない (Miyamoto and Sancar, 1999; Todo, 1999)。事実、

マウスでは光による行動のリズムの位相変移における光信号の伝達に CRY が関わっているという報告がある (Selby et al., 2000)。さらにショウジョウバエでは、CRY は明らかに光による位相変移に関わっており概日時計の光レセプターだと考えられている (Emery et al., 1998; Helfrich-Forster et al., 2001; Ishikawa et al., 1999; Stanewsky et al., 1998)。また系統解析の結果、zCRY4 はゼブラフィッシュの CRY の中で dCRY にもっとも近いと報告されている (Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)。従って、zCRY4 は概日時計の光レセプターの一候補である。

5-2. Zebrafish 培養細胞 BRF41 を用いた光による概日時計の発振機構

最近、ゼブラフィッシュでも末梢（培養細胞）の振動体が周囲の明暗を感知し位相変位を起こすことが明らかとなった (Pando et al., 2001; Whitmore et al., 2000)。そこで、4 種類の魚類培養細胞を調べたところそのうちの 1 種類、ゼブラフィッシュの尾ビレから樹立された BRF41 細胞が明暗周期を与えることによって時計遺伝子の発現が振動し始めることが明らかとなった。この細胞に短時間の光刺激を与えることによって時計遺伝子の発現が誘導されることが判った。

誘導される zCry1a、2b、4、zfPer2 は光が照射されることによって発現の誘導がかかることから細胞内の時計が振動し始めるのに重要であると考えらる。また zfPer2、zCry4 は光刺激がなくなると遺伝子発現のリズムがなくなることから光刺激によって時計遺伝子が振動を開始するときのみ働いているのかもしれない。また、細胞内での時計遺伝子の発現のリズムを個体内でのリズムと比較してみると zCry4 以外の遺伝子はすべて個体と同じリズムを刻んでいることが判った (Fig.3-5) (Kobayashi, Ishikawa et al., 2000; Cermakian et al., 2000)。これは、個体内で働いている概日時計と同じ機構が BRF41 細胞においても機能していることを示すと同時に zCRY4 の光受容のステップにおける特別な働きを示唆しているものと考えられる。BRF41 細胞における zCRY4 の機能を調べることにより、個体での zCRY4 の機能、ゼブラフィッシュの概日時計への光の関わりを調べる手がかりが得られると考えられる。

6.まとめ

本論文では光回復酵素・青色光受容体タンパク質ファミリーの一員である Cryptochrome(CRY)の機能解析を行った。このタンパク質ファミリーは、FAD をクロモフォアとして持つことが特徴的な点である。また、これまでに機能のわかっているものについては、光を利用するという共通の性質がある。つまりこのタンパク質ファミリーは FAD を介在させることにより光エネルギー/シグナルを酸化還元 (redox) 反応に変換して生理機能を果たしている一群のタンパクであると総括することが可能である。では、CRY はどの様に光と関わり、その機能における FAD の役割は何であるのか?このような疑問の答えを最終目標としている。

光回復酵素や、植物の CRY の相同遺伝子であることから動物の CRY も光を利用している生命現象に関わっていると考えられた。実際、光刺激を時間の「手がかり」として利用している概日時計に関わりがあることが判った。実際、ショウジョウバエの CRY は、その変異体や過剰発現させた個体で光刺激に対する反応がおかしくなることから光受容体として機能していることがわかった。しかしながら、マウス、ヒトでの機能はショウジョウバエとは異なっていた。mCRY1、2 両方のノックアウトマウスを作製しその行動を解析したところ、行動のリズムがなくなることから時計の本体として機能していることが予測された。実際、分子生物学的解析の結果、時計本体の負のフィードバック機構を構成する抑制因子としての活性を担っており、しかもその反応は、光に依存しないことが明らかとなった。この反応にどう FAD が関与してくるのか興味深い点である。本論文で zCRY1a が zCLOCK2-zfBMAL3 の転写活性を抑制する際、CLOCK-BMAL ヘテロ二量体の形成も、CLOCK-BMAL ヘテロ二量体の E-box への結合も阻害せず、E-box-CLOCK-BMAL-CRY 複合体を形成することが示された。また、CLOCK-BMAL の E-box への結合が還元剤の有無に依存することが示されたことから、考察にも述べたが、転写因子 AP-1 同様、CLOCK-BMAL の転写活性も酸化還元状態に依存していると考えられる。また AP-1 は還元剤による影響はあまり受けず、Ref-1 によって DNA binding に必要なシステイン残基の還元が行われ転写活性を示すことが知られている。よって、AP-1 における Ref-1 のような因子が、CLOCK-BMAL の酸化還元を行っている可能性も考えられる。CRY はこの Ref-1 のような酸化還元因子と相互作用

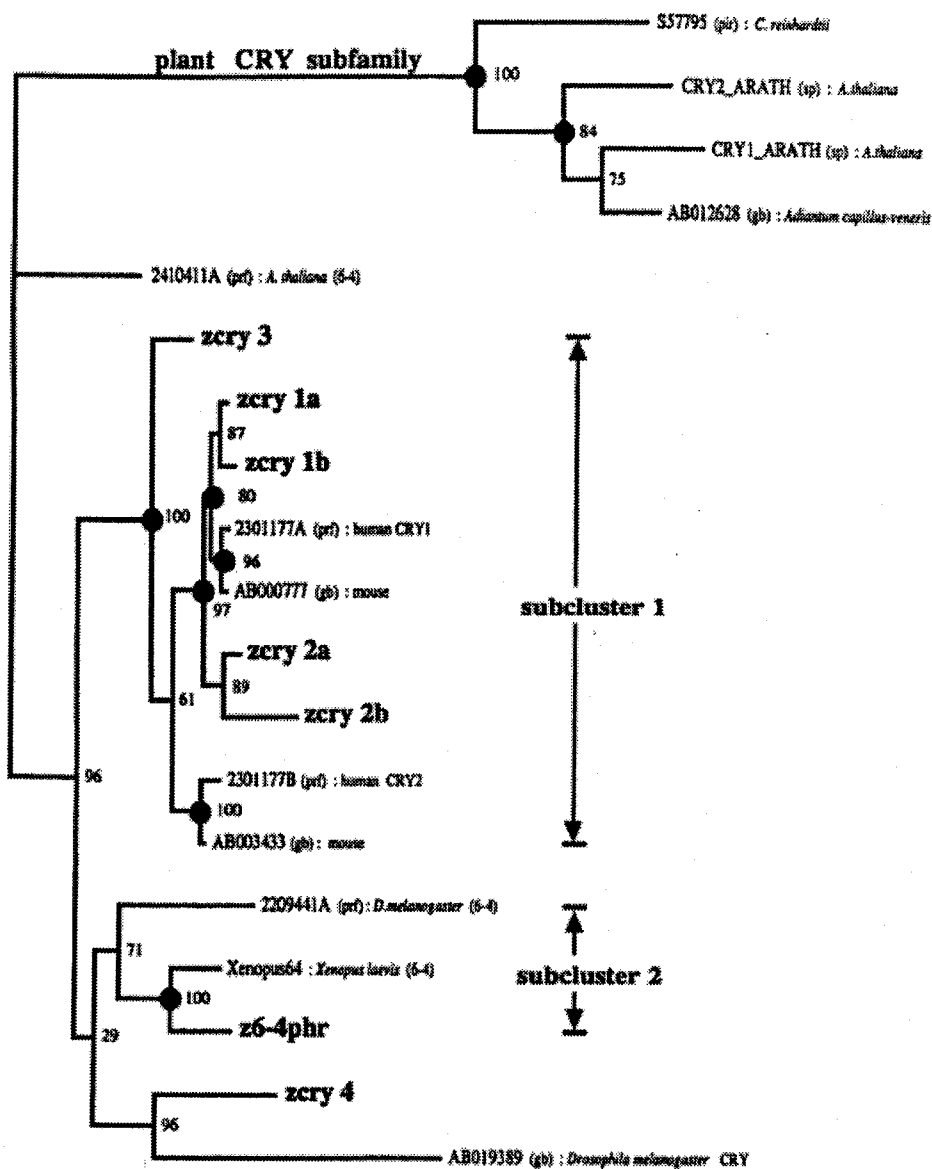


Fig.6-1 光回復酵素・青色光受容体タンパク質ファミリーの系統樹(3)
(Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)

これまでに知られている(6-4)光回復酵素と青色光受容体タンパクを
Maximum likelihood 法(ML 法)で系統解析した。

することによって CLOCK-BMAL の酸化還元状態すなわち転写活性の制御をしているのではないかと予測される。

一方ショウジョウバエにおいて、CRY は光を受容することにより、TIM タンパクをユビキチン化すること、また自らの分解を誘導することが、その後の生理機能に重要なステップであることが明らかにされてきた。しかしながら、光受容によりどの様にしてこのような反応が誘発されるのか、そのメカニズムに関しては全く判っていない。これまで知られている光受容体はいずれもクロモフォアの光異性化が初期反応として関与している。視覚に関与するロドプシンにおいてはクロモフォアであるレチナールが光受容により 11-cis 型から all trans 型へ光異性化する。その構造的な変化が引き金となってシグナルが伝わる。同様な光異性化による光シグナル伝達は植物(Phytochrome)や細菌(Photo Yellow Protein(PYP))においても知られている。しかしながら、クロモフォアが FAD の CRY では FAD の構造から光異性化は起こり得ない。FAD が光を受けることにより起こる反応といえば電子伝達系に見られるような電子の授受である。もし、CRY が本当に光受容体であるならばこれまでの光受容体とは異なる新しいタイプの光シグナルトランスダクション経路ということになる。ゼブラフィッシュの CRY は 6 つあり、転写抑制型と非転写抑制型に分かれるが、系統解析の結果その中でも非転写抑制型の zCRY4 がショウジョウバエの CRY によく似ていることが判った(Fig.5-1)(Kobayashi, Ishikawa et al., 2000)。zCRY4 が光受容に関与しているかどうか興味を持たれるところである。

また、本論文において光刺激によりリズムを刻み始める細胞を見つけることが出来た。今後、転写抑制型の CRY がいかにして CLOCK-BMAL の転写活性を制御しているのか、またその転写抑制活性に redox 反応が関与しているのか、また、非転写抑制型の zCRY4 が本当に光受容体であるのかということに焦点を絞り個体レベル、細胞レベルの両方から解析を進めていきたいと考えている。

7.参考文献

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., 3rd, and Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1157-1161.
- Agata, Y., Matsuda, E., and Shimizu, A. (1999). Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1). *J Biol Chem* 274, 16412-16422.
- Ahmad, M., and Cashmore, A. R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366, 162-166.
- Ahmad, M., Jarillo, J. A., Smirnova, O., and Cashmore, A. R. (1998). Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature* 392, 720-723.
- Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G., and Lee, C. C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* 91, 1055-1064.
- Allada, R., White, N. E., So, W. V., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 93, 791-804.
- Angel, P., and Herrlich, P. A. (1994). *The Fos and Jun Families of Transcription Factors* (Boca Raton, FL, CRC Press).
- Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-

937.

Bargiello, T. A., Jackson, F. R., and Young, M. W. (1984). Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312, 752-754.

Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J., and Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.

Ceriani, M. F., Darlington, T. K., Staknis, D., Mas, P., Petti, A. A., Weitz, C. J., and Kay, S. A. (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285, 553-556.

Cermakian, N., Whitmore, D., Foulkes, N. S., and Sassone-Corsi, P. (2000). Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4339-4344.

Crosthwaite, S. K., Dunlap, J. C., and Loros, J. J. (1997). *Neurospora* wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 276, 763-769.

Darlington, T. K., Wager-Smith, K., Ceriani, M. F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T. D., Weitz, C. J., Takahashi, J. S., and Kay, S. A. (1998). Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280, 1599-1603.

Edery, I., Rutila, J. E., and Rosbash, M. (1994). Phase shifting of the circadian clock by induction of the *Drosophila* period protein. *Science* 263, 237-240.

Emery, P., So, W. V., Kaneko, M., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 669-679.

Foster, R. G. (1998). Shedding light on the biological clock. *Neuron* 20, 829-832.

Gekakis, N., Saez, L., Delahaye-Brown, A. M., Myers, M. P., Sehgal, A., Young, M. W., and Weitz, C. J. (1995). Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science* 270, 811-815.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., and Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564-1569.

Griffin, E. A., Jr., Staknis, D., and Weitz, C. J. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286, 768-771.

Guo, H., Yang, H., Mockler, T. C., and Lin, C. (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279, 1360-1363.

Helfrich-Forster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J. C., and Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* 30, 249-261.

Hsu, D. S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F., and Sancar, A. (1996). Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* 35, 13871-13877.

Ikeda, M., and Nomura, M. (1997). cDNA cloning and tissue-specific

expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 258-264.

Ishikawa, T., Matsumoto, A., Kato, T., Jr., Togashi, S., Ryo, H., Ikenaga, M., Todo, T., Ueda, R., and Tanimura, T. (1999). DCRY is a *Drosophila* photoreceptor protein implicated in light entrainment of circadian rhythm. *Genes Cells* 4, 57-65.

Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C. R., Tanabe, A., Golden, S. S., Johnson, C. H., and Kondo, T. (1998). Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* 281, 1519-1523.

Jayaraman, L., Murthy, K. G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., and Prives, C. (1997). Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev* 11, 558-570.

Jin, X., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., de Vries, G. J., and Reppert, S. M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57-68.

Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H., and Todo, T. (1997). Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J Mol Evol* 45, 535-548.

Kato, T., Jr., Todo, T., Ayaki, H., Ishizaki, K., Morita, T., Mitra, S., and Ikenaga, M. (1994). Cloning of a marsupial DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals. *Nucleic Acids Res* 22, 4119-4124.

King, D. P., Zhao, Y., Sangoram, A. M., Wilsbacher, L. D., Tanaka, M.,

Antoch, M. P., Steeves, T. D., Vitaterna, M. H., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., *et al.* (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641-653.

Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. S., and Young, M. W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iε. *Cell* 94, 97-107.

Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamei, Y., *et al.* (2000). Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* 5, 725-738.

Konopka, R. J., and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2112-2116.

Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., and Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205.

Lee, C., Bae, K., and Edery, I. (1999). PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol* 19, 5316-5325.

Lin, C., Ahmad, M., Chan, J. & Cashmore, A. R. (1996). CRY2, a second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family. *Plant Physiol* 110, 1047-1048.

Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., and Cashmore, A. R. (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue

light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2686-2690.

McClung, C. R., Fox, B. A., and Dunlap, J. C. (1989). The *Neurospora* clock gene frequency shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene period. *Nature* 339, 558-562.

Miyamoto, Y., and Sancar, A. (1999). Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 71, 238-243.

Miyazaki, K., Mesaki, M., and Ishida, N. (2001). Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. *Mol Cell Biol* 21, 6651-6659.

Myers, M. P., Wager-Smith, K., Wesley, C. S., Young, M. W., and Sehgal, A. (1995). Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. *Science* 270, 805-808.

Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otoshi, E., Kim, S. T., Jiang, C. Z., Todo, T., Britt, A. B., and Yamamoto, K. (1998). Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 26, 638-644.

Nikitovic, D., Holmgren, A., and Spyrou, G. (1998). Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 242, 109-112.

Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Nagase, T., and Ishida, N. (1998). Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 199-203.

Pando, M. P., Pinchak, A. B., Cermakian, N., and Sassone-Corsi, P. (2001).

A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10178-10183.

Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., and Young, M. W. (1998). double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94, 83-95.

Reddy, P., Zehring, W. A., Wheeler, D. A., Pirrotta, V., Hadfield, C., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1984). Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38, 701-710.

Roenneberg, T., and Foster, R. G. (1997). Twilight times: light and the circadian system. *Photochem Photobiol* 66, 549-561.

Rutila, J. E., Suri, V., Le, M., So, W. V., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93, 805-814.

Rutter, J., Reick, M., Wu, L. C., and McKnight, S. L. (2001). Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science* 293, 510-514.

Saez, L., and Young, M. W. (1996). Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron* 17, 911-920.

Sancar, A. (1994). Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33, 2-9.

Sangoram, A. M., Saez, L., Antoch, M. P., Gekakis, N., Staknis, D., Whiteley,

A., Fruechte, E. M., Vitaterna, M. H., Shimomura, K., King, D. P., *et al.* (1998). Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* 21, 1101-1113.

Sehgal, A., Price, J. L., Man, B., and Young, M. W. (1994). Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* 263, 1603-1606.

Selby, C. P., Thompson, C., Schmitz, T. M., Van Gelder, R. N., and Sancar, A. (2000). Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14697-14702.

Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C. C., van der Horst, G. T., Hastings, M. H., and Reppert, S. M. (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019.

Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681-692.

Sun, Z. S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., and Lee, C. C. (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90, 1003-1011.

Suri, V., Qian, Z., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1998). Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 21, 225-234.

Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M., and Sakaki, Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512-516.

Tell, G., Pellizzari, L., Cimarosti, D., Pucillo, C., and Damante, G. (1998). Ref-1 controls pax-8 DNA-binding activity. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 178-183.

Thresher, R. J., Vitaterna, M. H., Miyamoto, Y., Kazantsev, A., Hsu, D. S., Petit, C., Selby, C. P., Dawut, L., Smithies, O., Takahashi, J. S., and Sancar, A. (1998). Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* 282, 1490-1494.

Todo, T. (1999). Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat Res* 434, 89-97.

Todo, T., Kim, S. T., Hitomi, K., Otoshi, E., Inui, T., Morioka, H., Kobayashi, H., Ohtsuka, E., Toh, H., and Ikenaga, M. (1997). Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4)photolyase. *Nucleic Acids Res* 25, 764-768.

Todo, T., Ryo, H., Takemori, H., Toh, H., Nomura, T., and Kondo, S. (1994). High-level expression of the photorepair gene in *Drosophila* ovary and its evolutionary implications. *Mutat Res* 315, 213-228.

Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T., and Ikenaga, M. (1996). Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* 272, 109-112.

Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K., and Nomura, T. (1993). A new photoreactivating enzyme that

specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts. *Nature* 361, 371-374.

van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P., van Leenen, D., *et al.* (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-630.

Vitaterna, M. H., Selby, C. P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E. M., Hitomi, K., Thresher, R. J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., *et al.* (1999). Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12114-12119.

Whitmore, D., Foulkes, N. S., and Sassone-Corsi, P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404, 87-91.

Whitmore, D., Foulkes, N. S., Strahle, U., and Sassone-Corsi, P. (1998). Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat Neurosci* 1, 701-707.

Xanthoudakis, S., and Curran, T. (1992). Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *Embo J* 11, 653-665.

Yagita, K., and Okamura, H. (2000). Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett* 465, 79-82.

Yan, M., Xu, W., Lu, L., Sun, L., Liu, X., and Zheng, Z. (2000). Induction of ref-1 ensures AP-1 activation in intracellular oxidative environment of IL-

2-stimulated BA/F3beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 462-469.

Yasuhira, S., and Yasui, A. (1992). Visible light-inducible photolyase gene from the goldfish *Carassius auratus*. *J Biol Chem* 267, 25644-25647.

Yasui, A., Eker, A. P., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M., and Oikawa, A. (1994). A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *Embo J* 13, 6143-6151.

Zehring, W. A., Wheeler, D. A., Reddy, P., Konopka, R. J., Kyriacou, C. P., Rosbash, M., and Hall, J. C. (1984). P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 39, 369-376.

Zylka, M. J., Shearman, L. P., Levine, J. D., Jin, X., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. (1998a). Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron* 21, 1115-1122.

Zylka, M. J., Shearman, L. P., Weaver, D. R., and Reppert, S. M. (1998b). Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20, 1103-1110.

dCLOCK	EWKFL	LDHRA	PIIGYMPFEVLGTSGYDYHFDL	DSI	VA	CH	EL	RQ	IG	EG	GK	SC	YR	FL	TK	GQ	QW	IW
mCLOCK	EWKFL	LDHRA	PIIGY	PFEVLGTSGYDYHVDDL	N	A	CH	LMQ	GK	SC	YR	FL	TK	GQ	QW	IW		
hCLOCK	EWKFL	LDHRA	PIIGY	PFEVLGTSGYDYHVDDL	N	A	CH	LMQ	GK	SC	YR	FL	TK	GQ	QW	IW		
hNPAS2	EWKFL	LDHRA	PIIGY	PFEVLGTSGYDYHIDDL	AR	CH	Q	LMQ	F	GK	SC	CY	R	FL	TK	GQ	QW	IW
zfCLOCK1	EWKFL	LDHRA	PIIGY	PFEVLGTSGYDYHVDDL	T	A	CH	LMQ	GK	SC	YR	FL	TK	GQ	QW	IW		
zfCLOCK2	EWKFL	LDHRA	SPIIGY	PFEVLGTSGYDYHVDDL	IA	Q	CH	KQ	LMQ	C	GK	SC	YR	FL	TK	GQ	QW	IW
zfCLOCK3	EWKFL	LDHRA	PIIGYMPFEVLGTSGYDYHVDDL	HS	A	CH	LMQ	F	GK	SC	YR	FL	TK	GQ	QW	IW		

Fig. 3-1 A CLOCK間で保存されているアミノ酸配列

PCRに用いたdegenerate oligonucleotideの位置は上部に示した。得られたPCR産物を翻訳した結果、すべてが既にクローニングされている遺伝子と共通のアミノ酸配列は黒塗りで、一部が共通なものについては灰色塗りで示してある。今回クローニングしたzfCLOCKは下部に示してある。

d;*Drosophila melanogaster*, m;mouse, h;human, zf;zebrafish

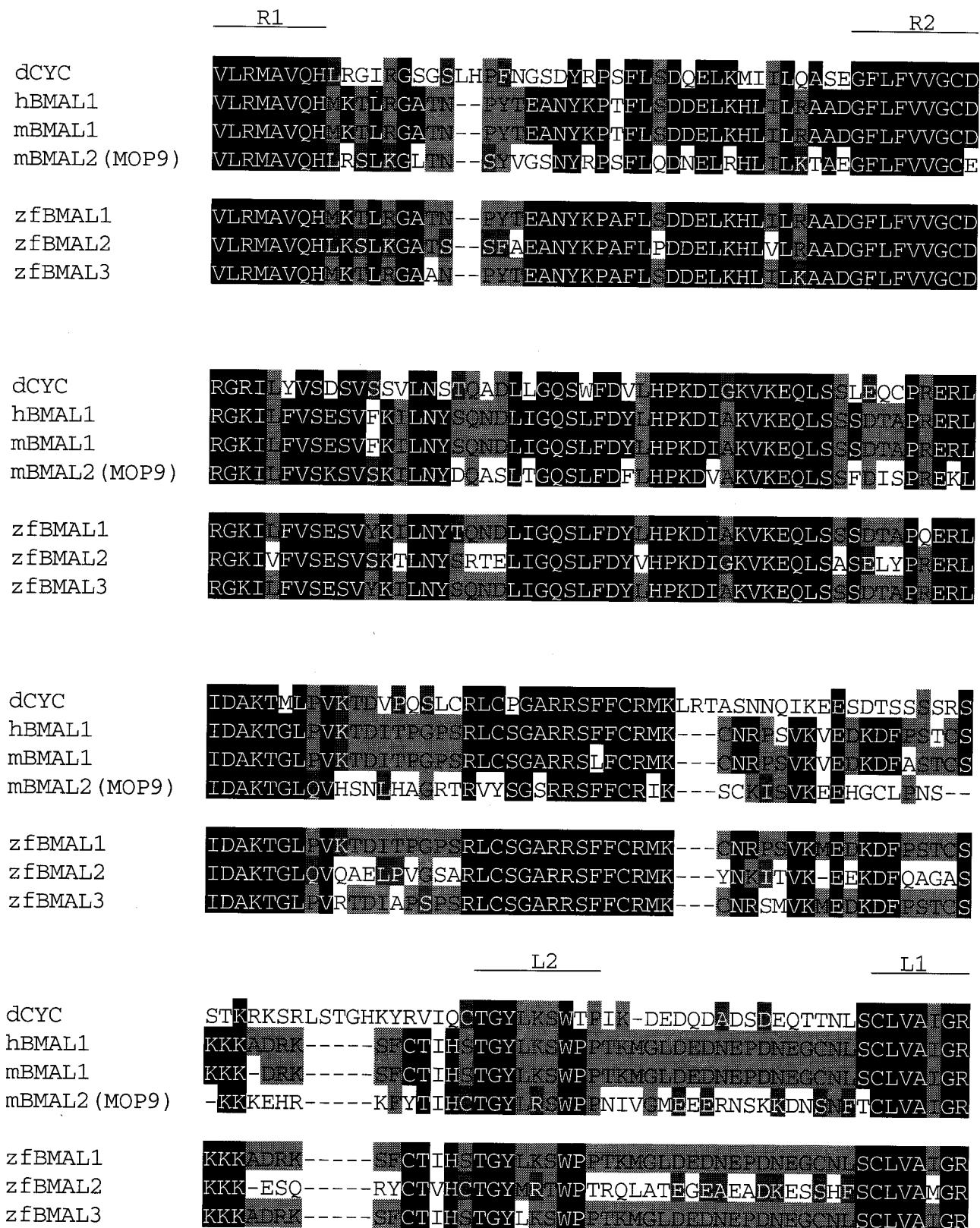


Fig.3-1B BMALで保存されているアミノ酸配列

PCRに用いたdegenerate oligonucleotideの位置は上部に示した。得られたPCR産物を翻訳した結果、すべてが既にクローニングされている遺伝子と共通のアミノ酸配列は黒塗りで、一部が共通なものについては灰色塗りもしくは灰色地に白抜きで示してある。今回クローニングしたz fBMALは下部に示してある。

d; *Drosophila melanogaster*, m; mouse, h; human, zf; zebrafish

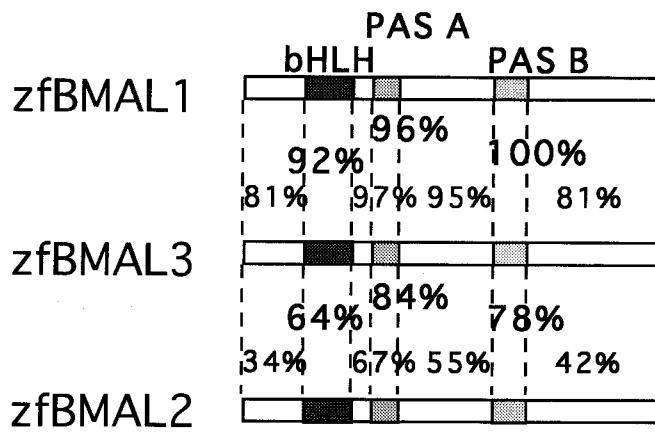
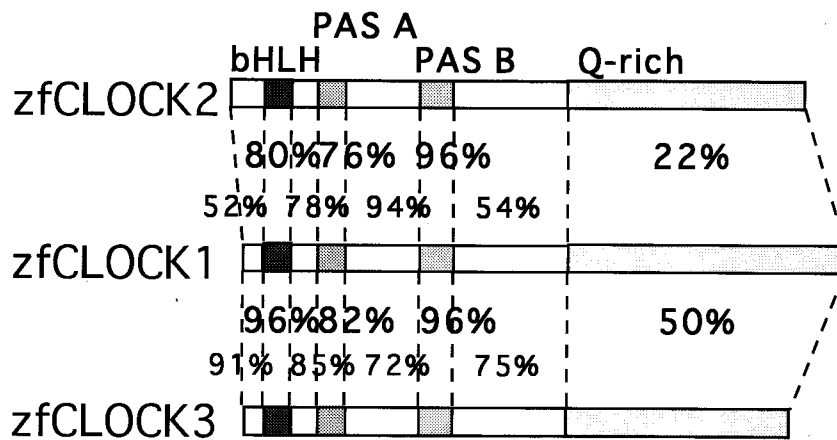


Fig.3-2 zfCLOCK、zFBMALのアミノ酸配列の類似度
 各ドメインごとに同一アミノ酸配列の割合を%で表示した。
 bHLH; basic helix loop helix、PAS; Per、Arnt、Sim domain
 Q-rich; グルタミン酸rich

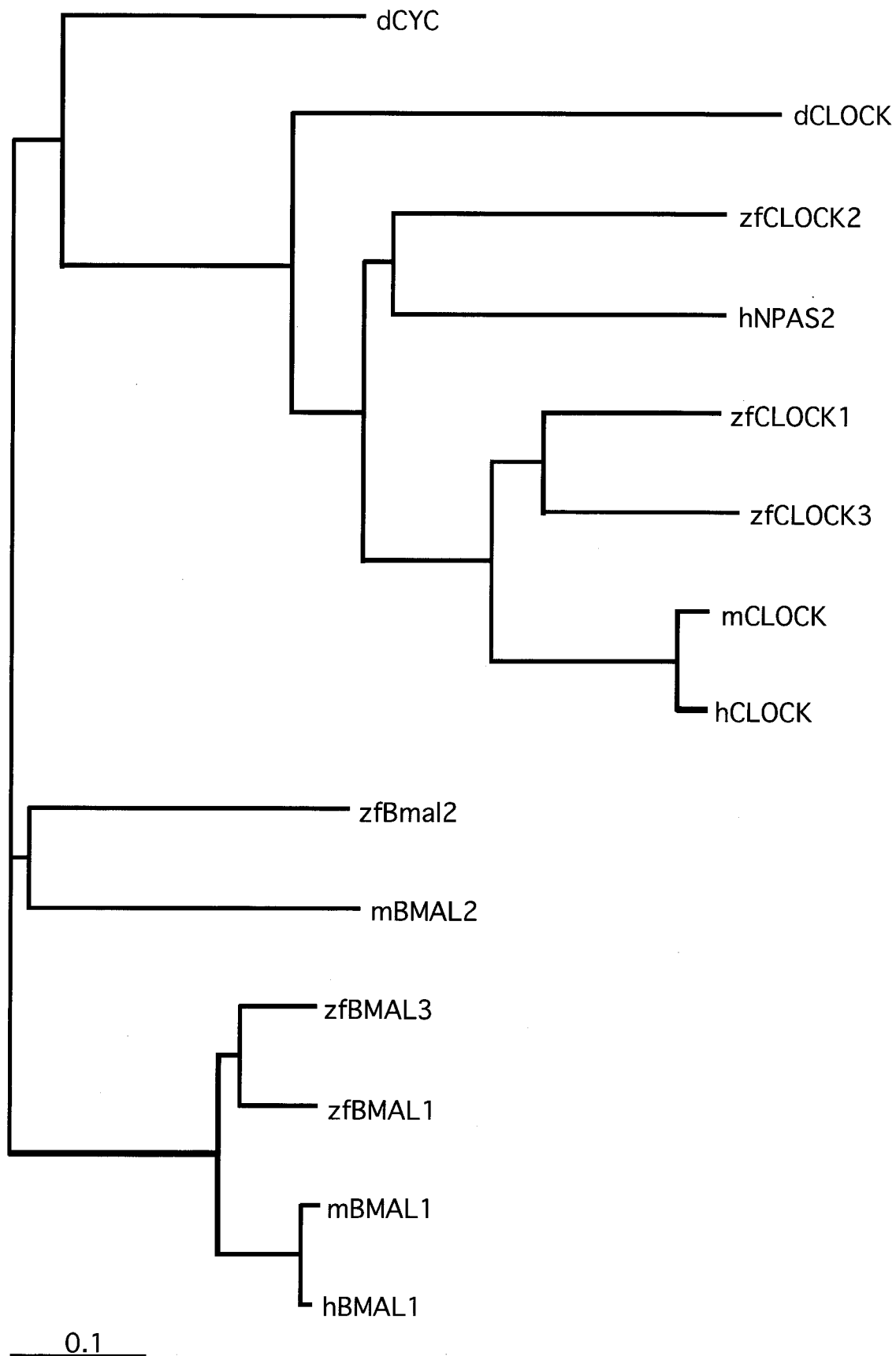


Fig.3-3 CLOCK、BMALの系統樹

これまでに知られているCLOCK、BMALについてNJ法で系統樹を作製した。

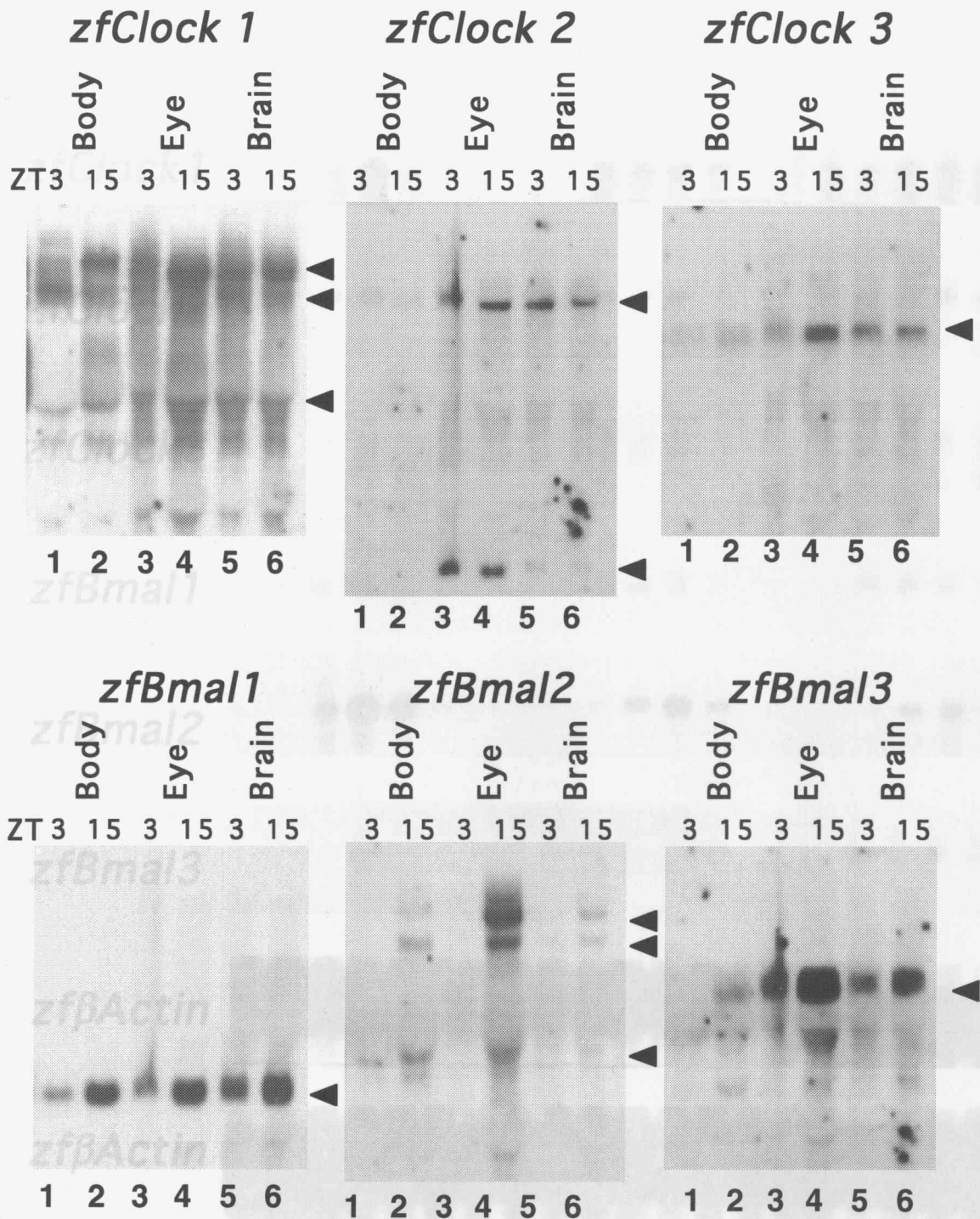
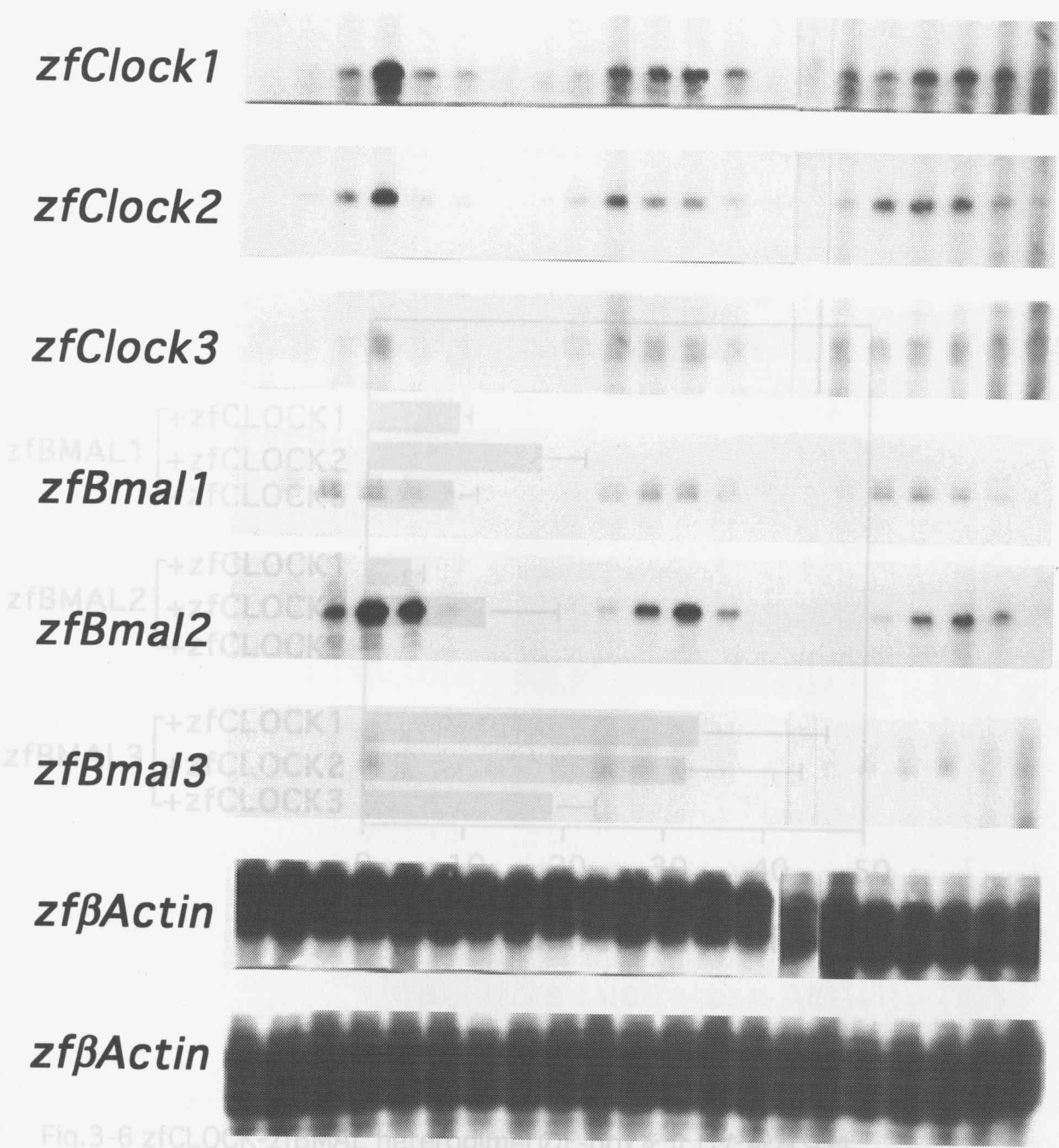


Fig.3-4 *zfClock*、*zfBmal* の組織特異的発現

14時間明10時間暗の明暗条件下(点灯時をZT0,消灯時をZT14)で飼育したときのZT3と15で各組織からRNAを回収しNorthern blotを行った。各レーンに20 μ gずつのtotal RNAを泳動し各々のcDNA全長をprobeとして検出した。検出されたバンドの大きさはそれぞれ*zfClock1*(16.5、8.3、3.5kb) *zfClock2*(8、1kb) *zfClock3*(5.2kb) *zfBmal1*(2.6kb) *zfBmal2*(11.5、8、3.4kb) *zfBmal3*(4.3kb)であった。



ZT Time 1 5 9 13 15 19 23 1 5 9 13 15 19 23

Fig.3-6 *zfCLOCK*、*zfBMAL* heterodimerのL-DOXを介した転写活性
 EnChrom (EnChrom) 領域の7-oxo-doxetetracycline (DOX) の存在下での
 promoter (M₁、M₂)領域の7-oxo-doxetetracycline (DOX) の存在下での
 constructとpcDNA3.1のみを導入したときのluciferase活性 (転写活性) を1と
 してすべての組み合わせのpcDNA-*zfCLOCK*、pcDNA-*zfBMAL*とreporter

Fig3-5 *zfClock*、*zfBmal*の経時的発現
 5日以上14:10の明暗サイクルで同調させた後、表示時間に成魚の眼球を
 回収し、それぞれの遺伝子の発現量をRNase protection assay(RPA)で検出
 した。斜線部は主観的明期。*βActin*はinternal control。

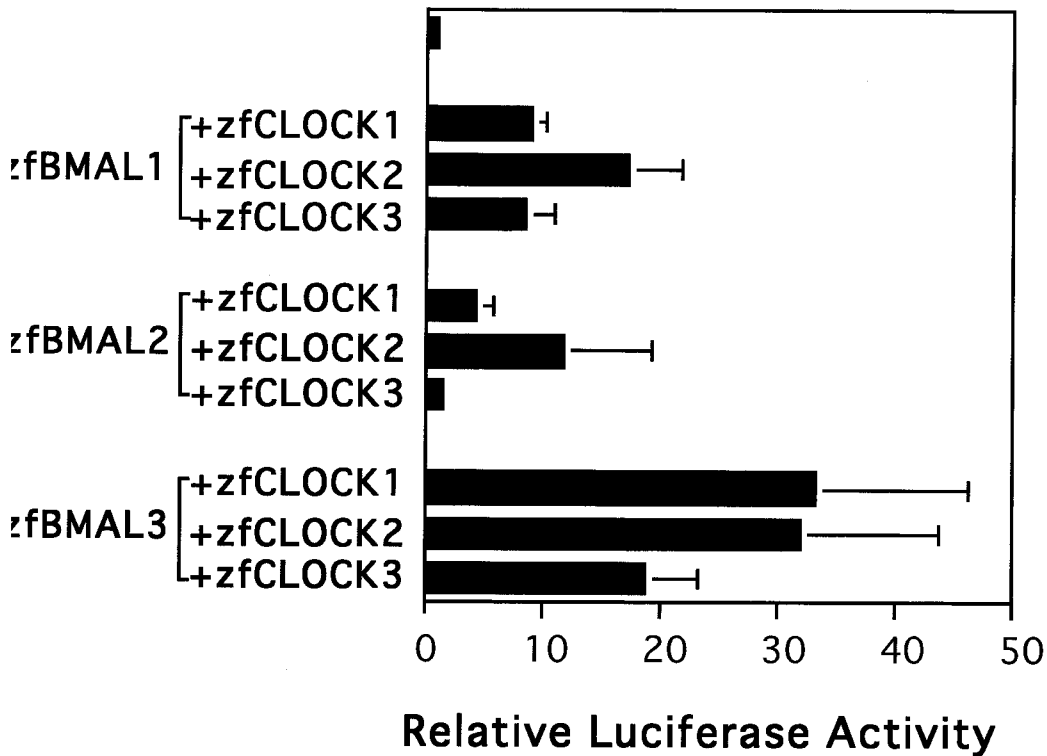


Fig.3-6 zfCLOCK-zfBMAL heterodimerのE-boxを介した転写活性 Enhancer配列であるE-boxを含むマウスのArginine Vasopressin遺伝子の promoter(mAVP)領域の下流にluciferase遺伝子をを導入したreporter constructとpcDNA3.1のみを導入したときのluciferase活性（転写活性）を1としてすべての組み合わせのpcDNA-zfCLOCK、pcDNA-zfBMALとreporter constructをBRF41細胞に導入したときの相対活性を棒グラフで示した。

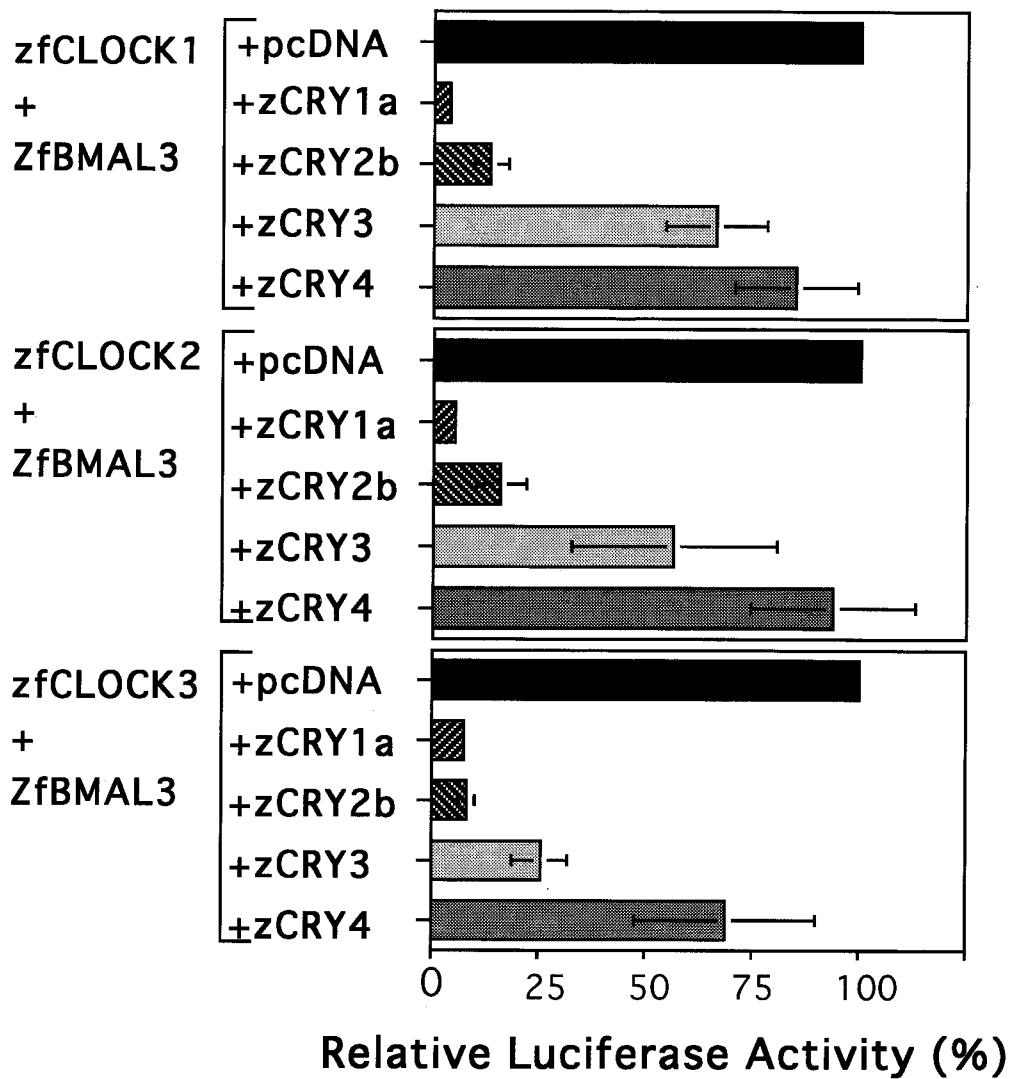


Fig.3-7 zfCLOCK-zfBMAL heterodimerに対するzCRYの転写抑制活性の測定はFig.3-6と同様の方法で行った。表示した組み合わせのzfCLOCK、zfBMALをBRF41細胞導入したときの転写活性を100% (pcDNA)として、zCRYを導入したときの相対活性を示した。

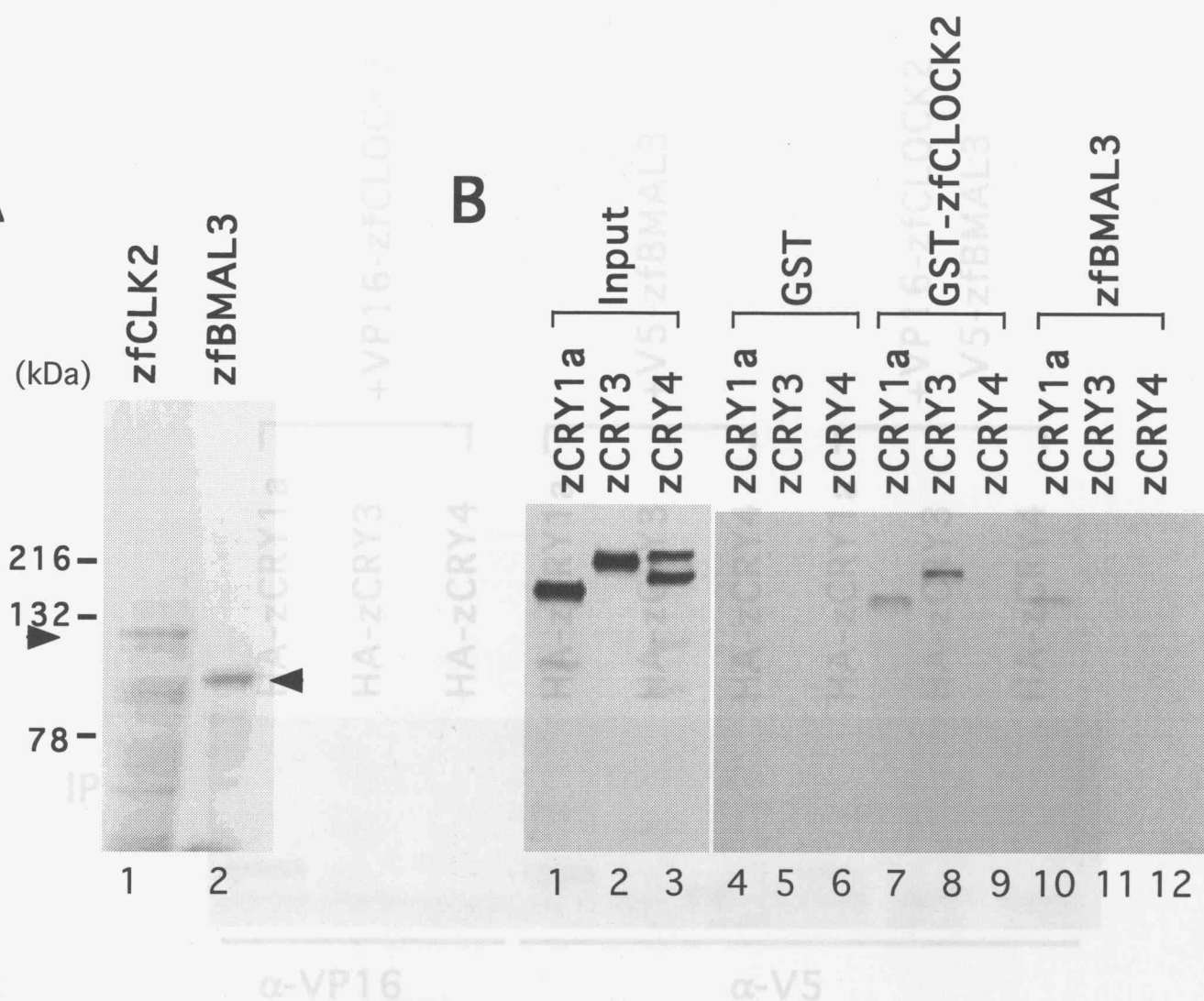
A

Fig.3-8 GST pull down assay

A.大腸菌内で高発現させ精製したGST-zfCLOCK2とzfBMAL3。それぞれ0.5 μ g、1 μ gを10%ゲルでSDS-PAGEし、CBB染色した。左側にサイズマーカーを示した。

B.in vitroで合成したzCRY1a、3、4(³⁵S標識)をGST(lane4-6)、GST-CLOCK2(lane7-9)、GST-BMAL3(lane10-12)と混ぜ、Guluthation Sepharoseとincubateした。

Sepharoseを1xBuffer(50mM KCl、25mM DTT、5%glycerol)でwash後、結合しているタンパクを溶出し、10%SDS-PAGEにかけた後、autoradiographyで検出した。

lane1-3は検出に用いた1/10量のサンプルをコントロールとして泳動した。

Fig.3-9 Immunoprecipitation(IP) Western blot analysis

zCRYとzfCLOCKzfBMALのinteractionを見るため表示した組み合わせのベクターをNIH3T3細胞にcotransfectした。そのcell lysateを抗-VP16抗体もしくは抗-V5抗体で免疫沈降し、cell lysate(input)と免疫沈降産物を10%SDS-PAGEで泳動した後、抗-HA抗体でWestern blotした。

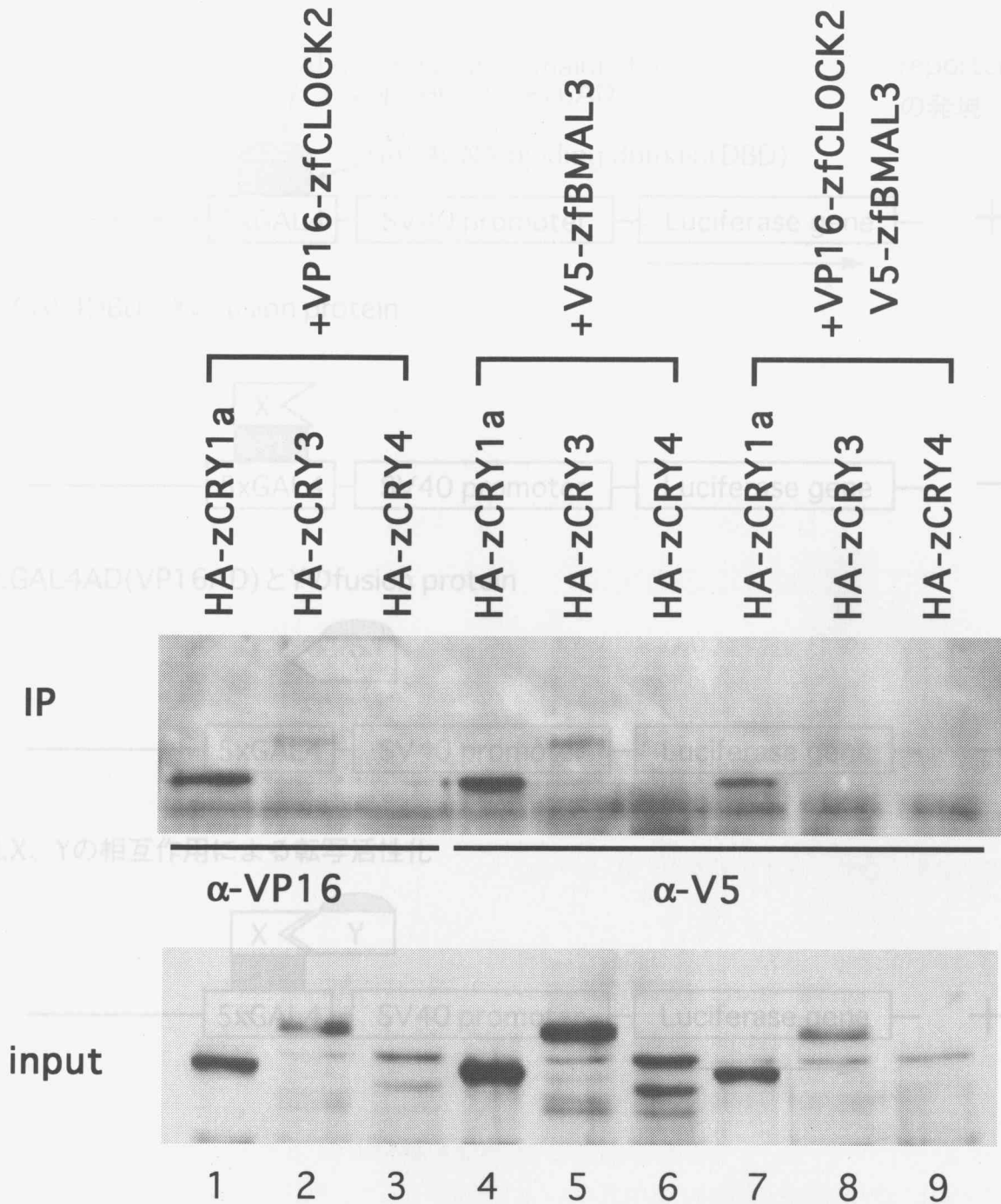


Fig.3-10 Two-Hybridの原理

a.GAL4タンパクは5xGAL4(GAL4 binding region;enhancer sequence)に結合しその下流の遺伝子 (reporter遺伝子)の転写を活性化する。

b.GAの活性は、その下流の遺伝子 (reporter遺伝子)の転写を抑制する。
 c.GAの活性は、その下流の遺伝子 (reporter遺伝子)の転写を抑制する。
 d.X、Yの相互作用は、その下流の遺伝子 (reporter遺伝子)の転写を抑制する。

Fig.3-9 Immunoprecipitation(IP) Western blot analysis zCRYとzfCLOCKzfBMALのinteractionを見るため表示した組み合わせのベクターをNIH3T3細胞にcotransfectした。そのcell lysateを抗-VP16抗体もしくは抗-V5抗体で免疫沈降し、cell lysate (input)と免疫沈降産物を10%SDS-PAGEで泳動した後、抗-HA抗体でWestern blotした。

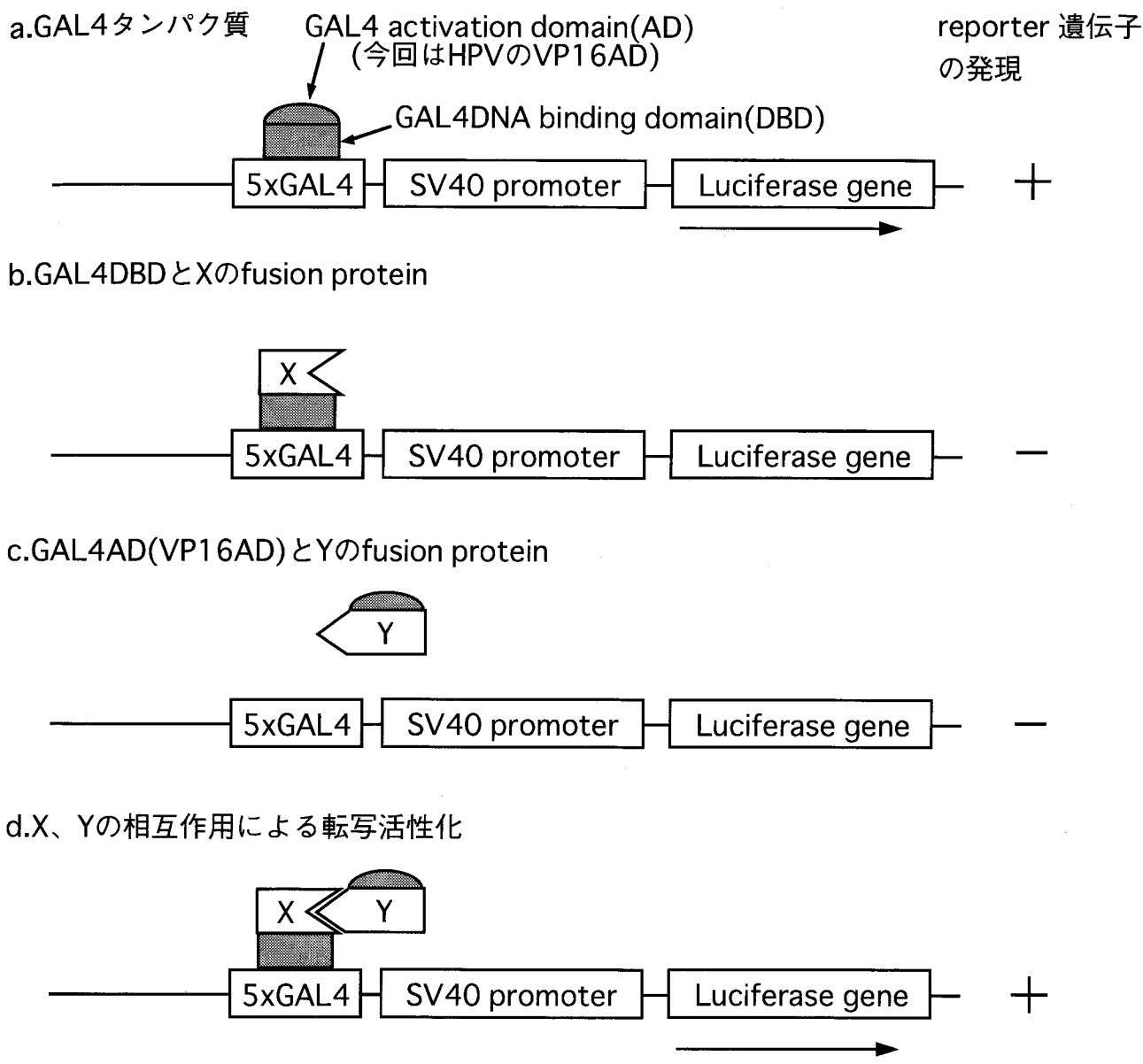


Fig.3-10 Two-Hybridの原理

- a. GAL4タンパク質は5xGAL4(GAL4 binding region; enhancer sequence)に結合しその下流の遺伝子 (reporter遺伝子)の転写を活性化する。
- b. GAL4DBDとXのfusion proteinでは、5xGAL4への結合は起こるが転写の活性化が起きない。
- c. GAL4AD(VP16AD)とYのfusion proteinでは、5xGAL4へ結合出来ないため転写の活性化が出来ない。
- d. XとYが相互作用する場合にのみ、図のようにreporter遺伝子の転写が活性化される。

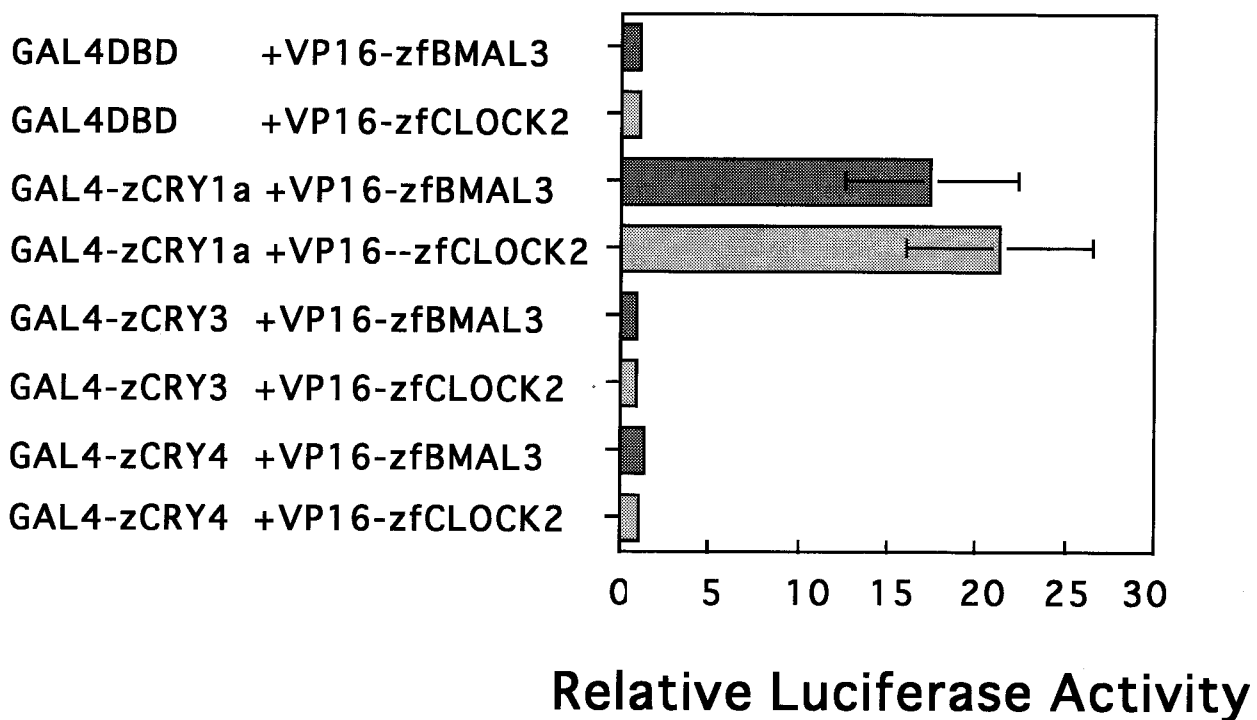


Fig.3-11 zfCLOCK2、zfBMAL3とzCRYのinteraction
 zfCLOCK2、zfBMAL3とzCRYのinteractionをmammalian two-hybrid assay
 で検出した。pGAL4DBDとVP16-zfCLOCK2もしくはVP16-zfBMAL3を
 NIH3T3細胞に導入した時のluciferase活性を1として、zfCLOCK2、zfBMAL3
 とzCRYを導入したときの相対活性を示した。

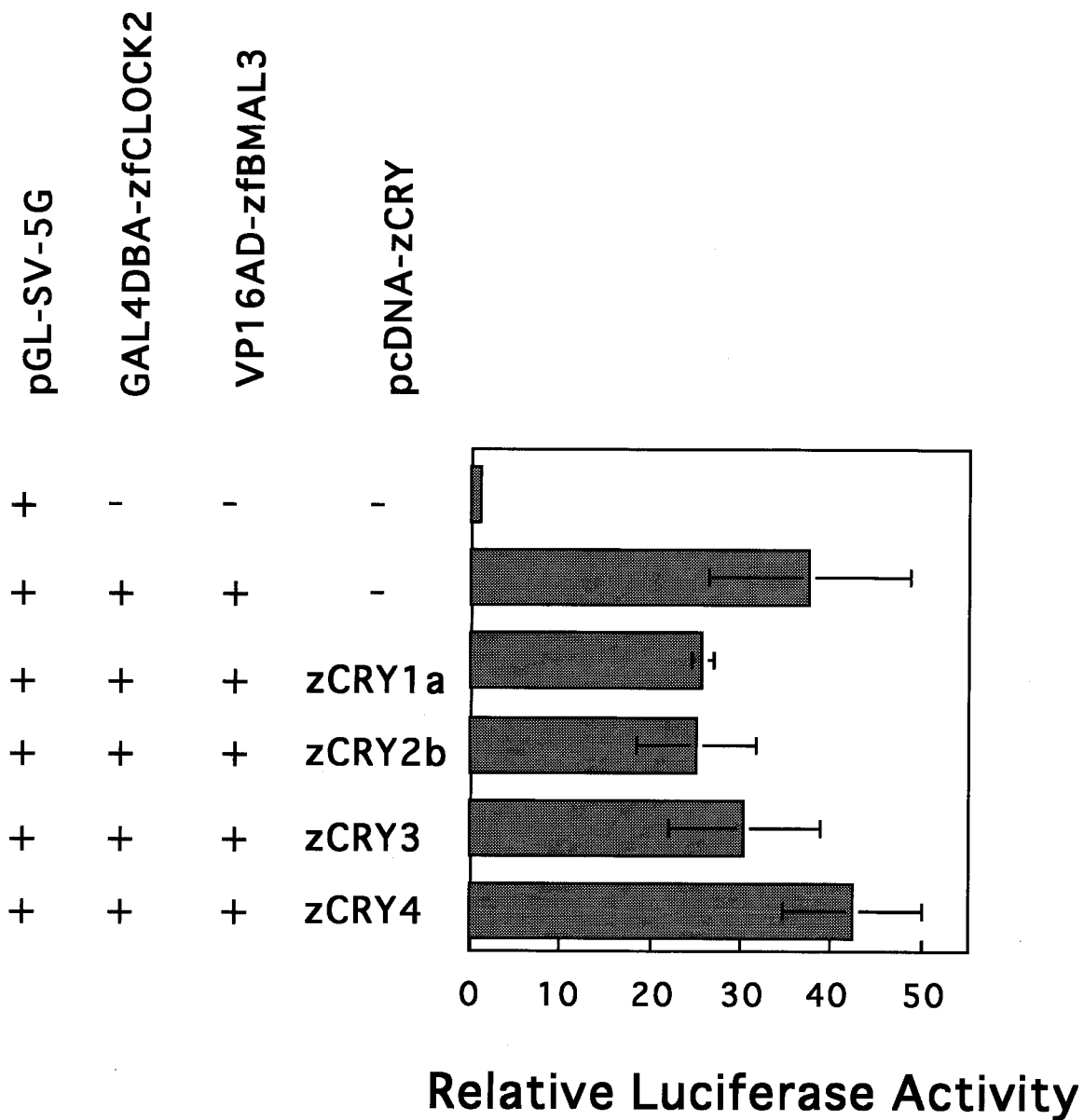


Fig.3-12 zfCLOCK2-zfBMAL3のinteractionに対するzCRYの効果
 reporter constructのみをNIH3T3細胞に導入したときのluciferase活性を1としてGAL4DBD-zfCLOCK2とVP16AD-zfBMAL3のみを導入したとき、それに加えてzCRYを導入したときの相対活性を示した。

DNA probe	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	M	E	E	E	E
DTT	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	▲			
zCRY4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zCRY3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zCRY1a	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
zfBMAL3	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
zfCLOCK2	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

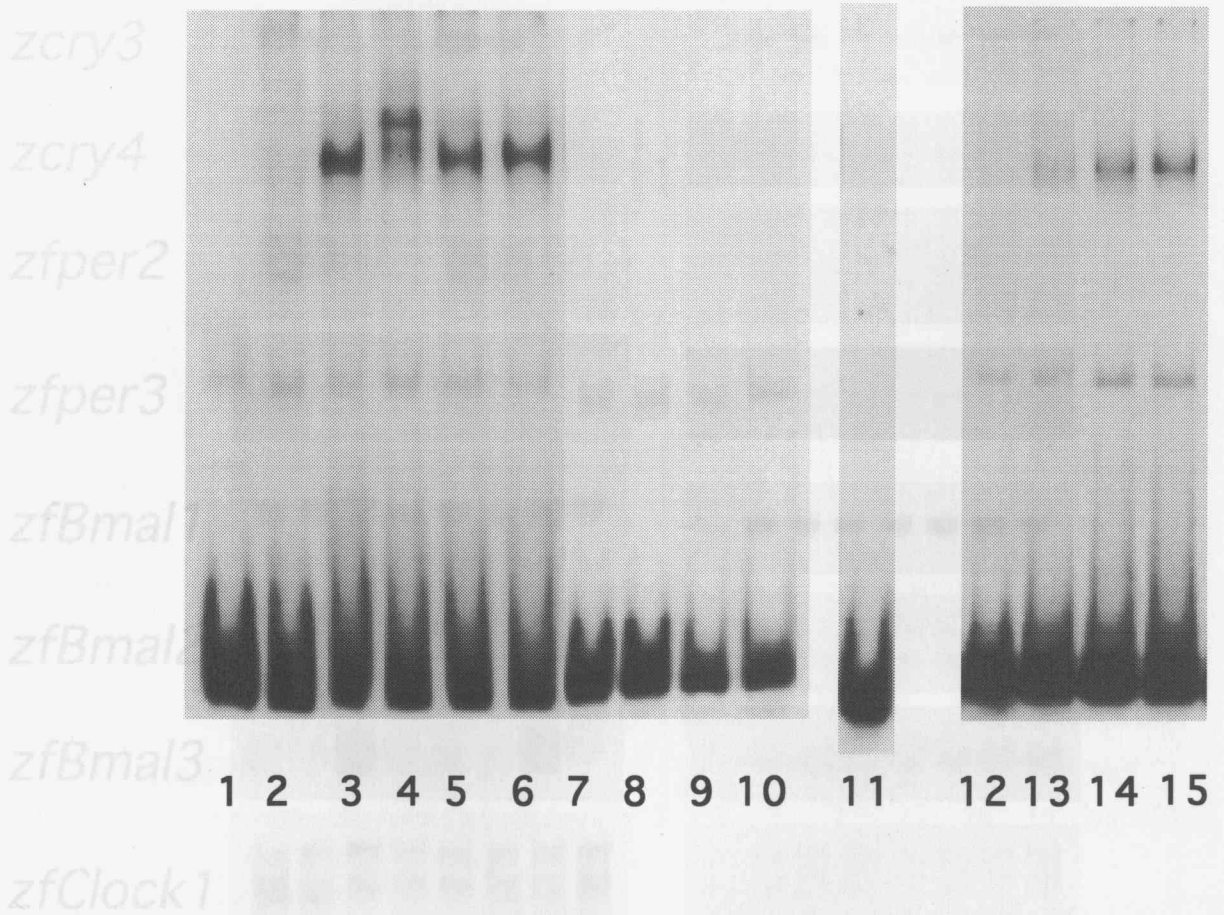


Fig.3-13 Gel Mobility Shift Assay

ラジオアイソトープで標識したE(E-box)もしくはM(mutant E-box)probeに各々の精製タンパクを加えたときのバンドの移動度の変化を示した。lane12-15はDTTの濃度を0、0.5、0.8、2.5mMと段階的に変えたときの結果を示した。

Fig. 4-1A BRF41細胞における明暗条件下での各時計遺伝子の発現

14時間明10時間暗の条件で3日以上培養した後、表示した時点で細胞を回収し、抽出したtotal RNAでNorthern blotを行った。各遺伝子のcDNA全長をprobeとして用いた。

LD(14:12)

control

3 9 15 21 27 33 39 45

3 9 15 21 27 33 39 45

zcry1a

zcry2a

zcry2b

zcry3

zcry4

zfper2

zfper3

zfBmal1

zfBmal2

zfBmal3

zfClock1

zfClock3

zfβActin

Relative mRNA Abundance

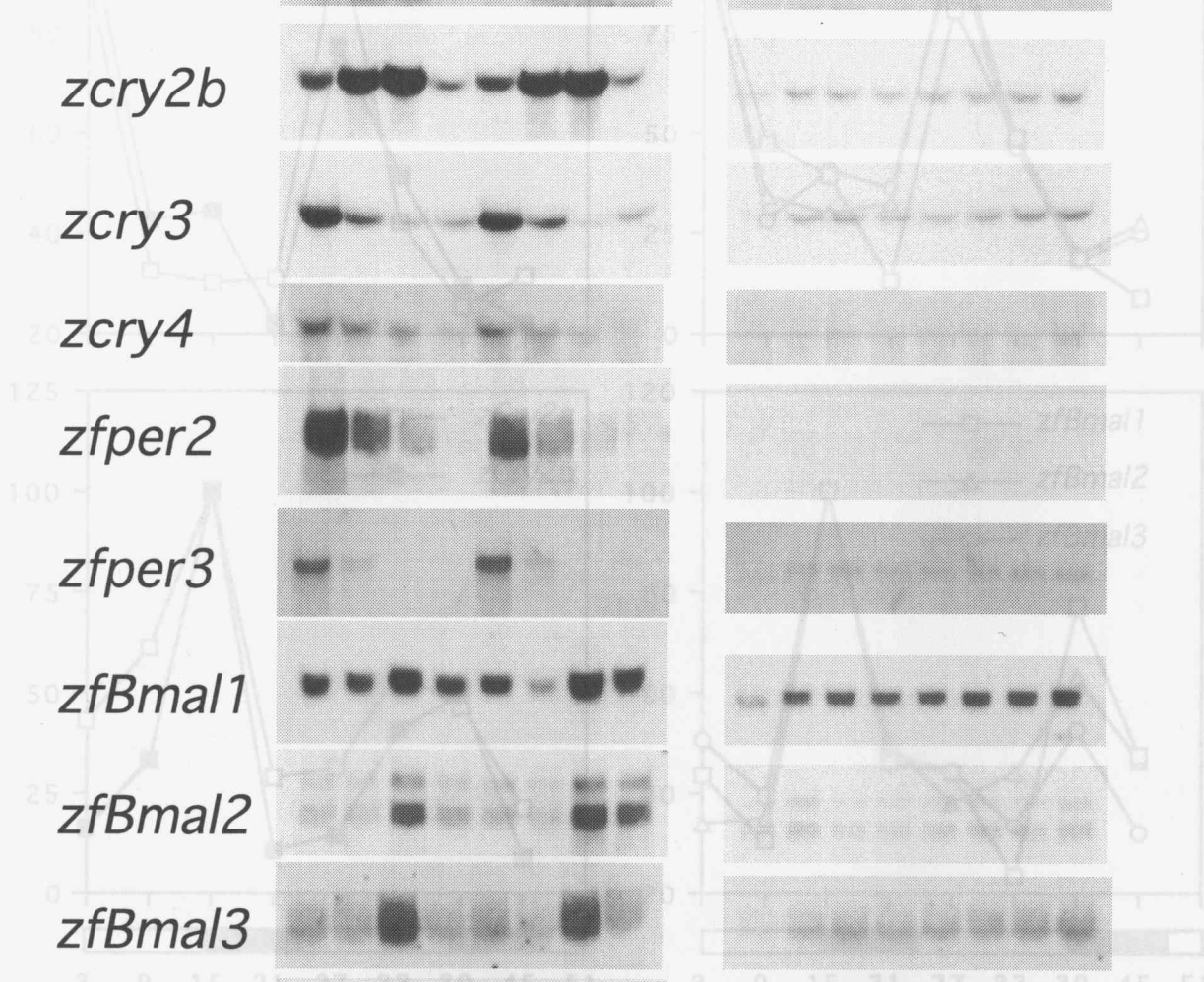


Fig.4-1A BRF41細胞における明暗条件下での各時計遺伝子の発現
 14時間明10時間暗の条件で3日以上培養した後、表示した時点で細胞を回収し、抽出したtotal RNAでNorthern blotを行った。各遺伝子のcDNA全長をprobeとして用いた。

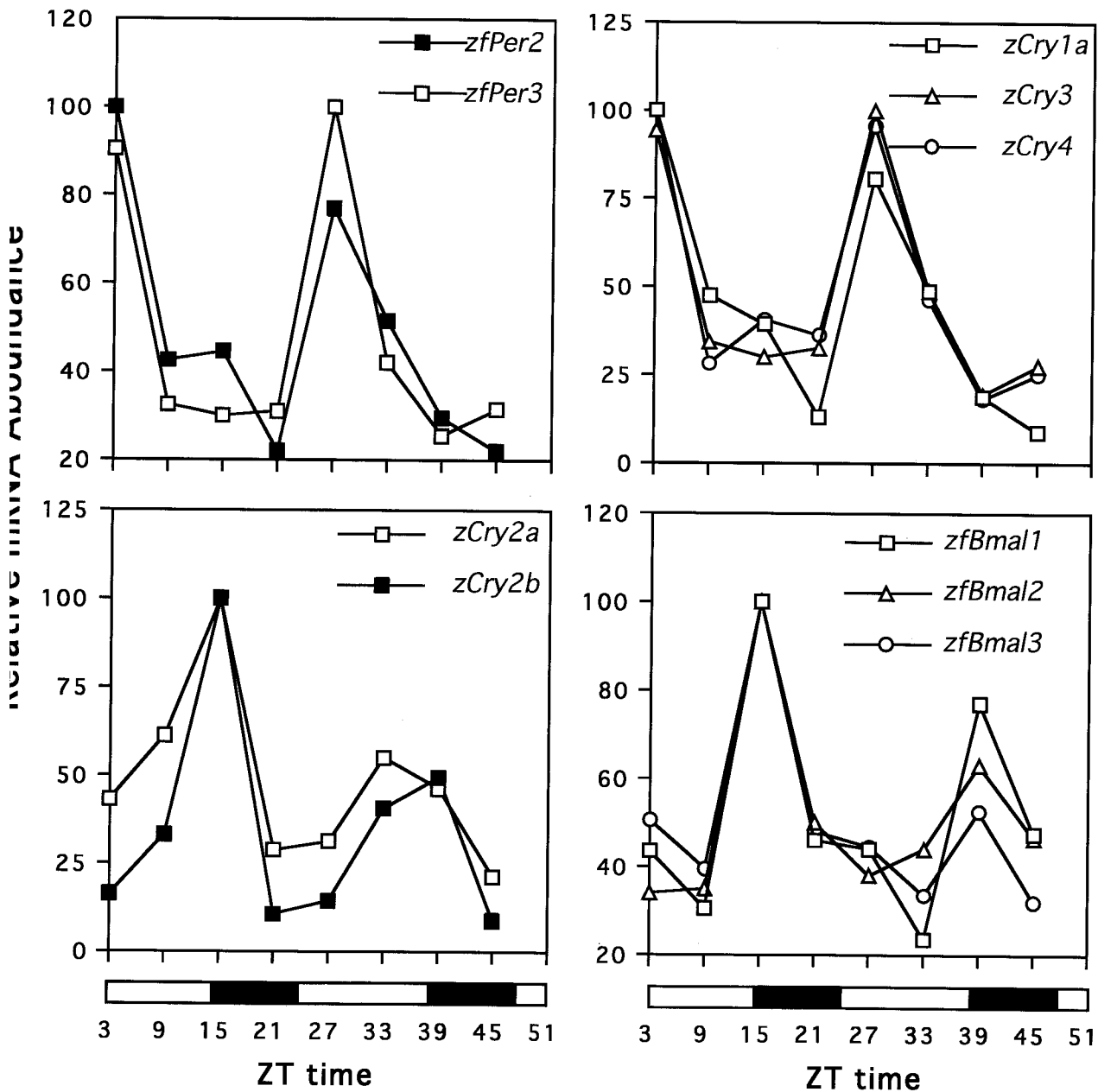


Fig.4-1B BRF41細胞における明暗条件下での各遺伝子の発現

各遺伝子の発現をNorthern blotのバンドのラジオアイソトープ活性として定量した。さらに β Actinの定量値で補正したのち最大値を100としてプロットした。

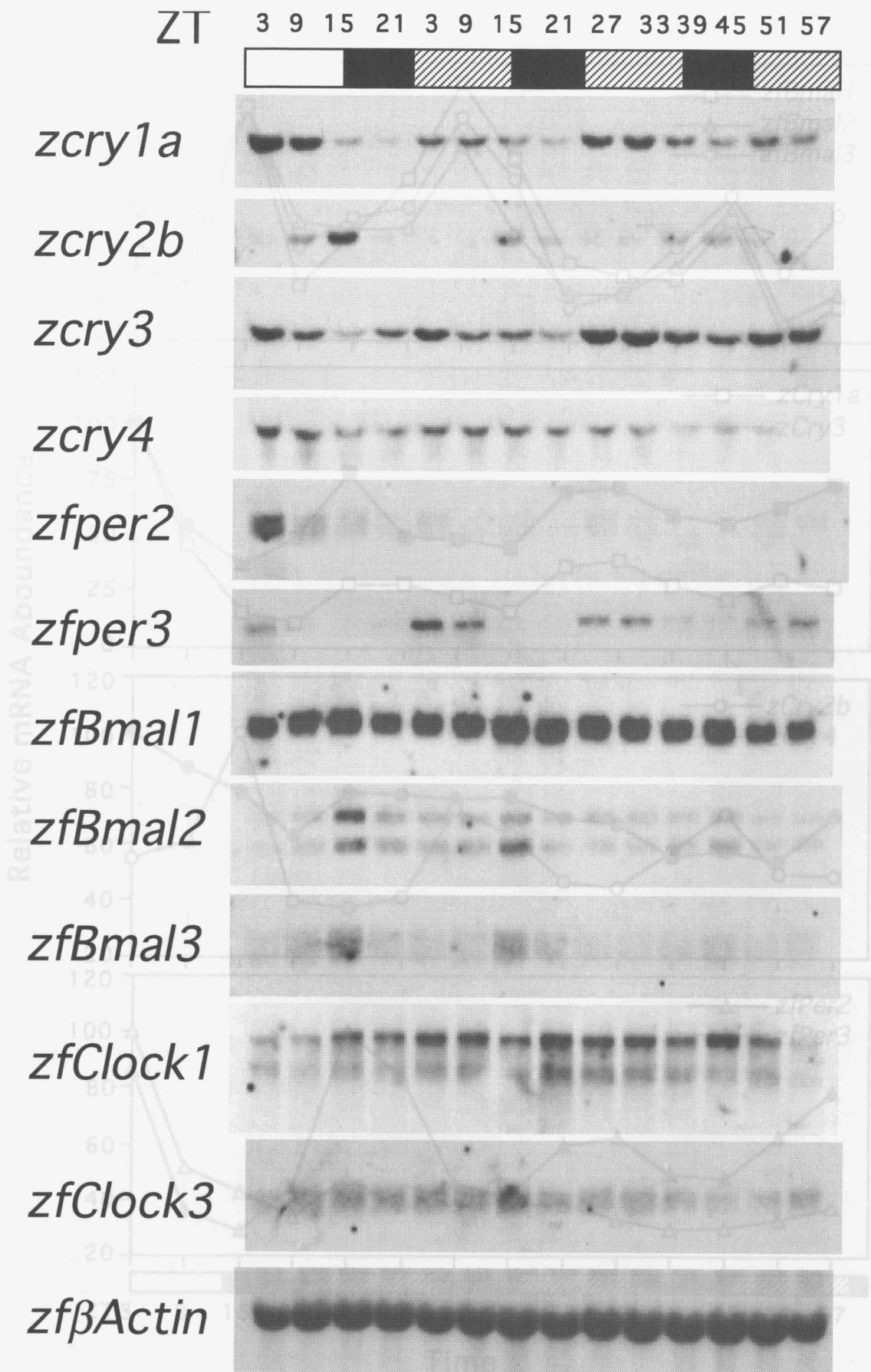


Fig.4-2A BRF41細胞における各時計遺伝子の自由継続リズム
 明暗条件下で3日以上培養後、表示時間に細胞を回収しNorthern blotを行った。
 細胞を回収し始めて2日目以降は恒暗条件に移し、続けて回収しサンプルとした。
 各遺伝子のcDNA全長をprobeとして用いた。
 斜線部は主観的明期を示す。

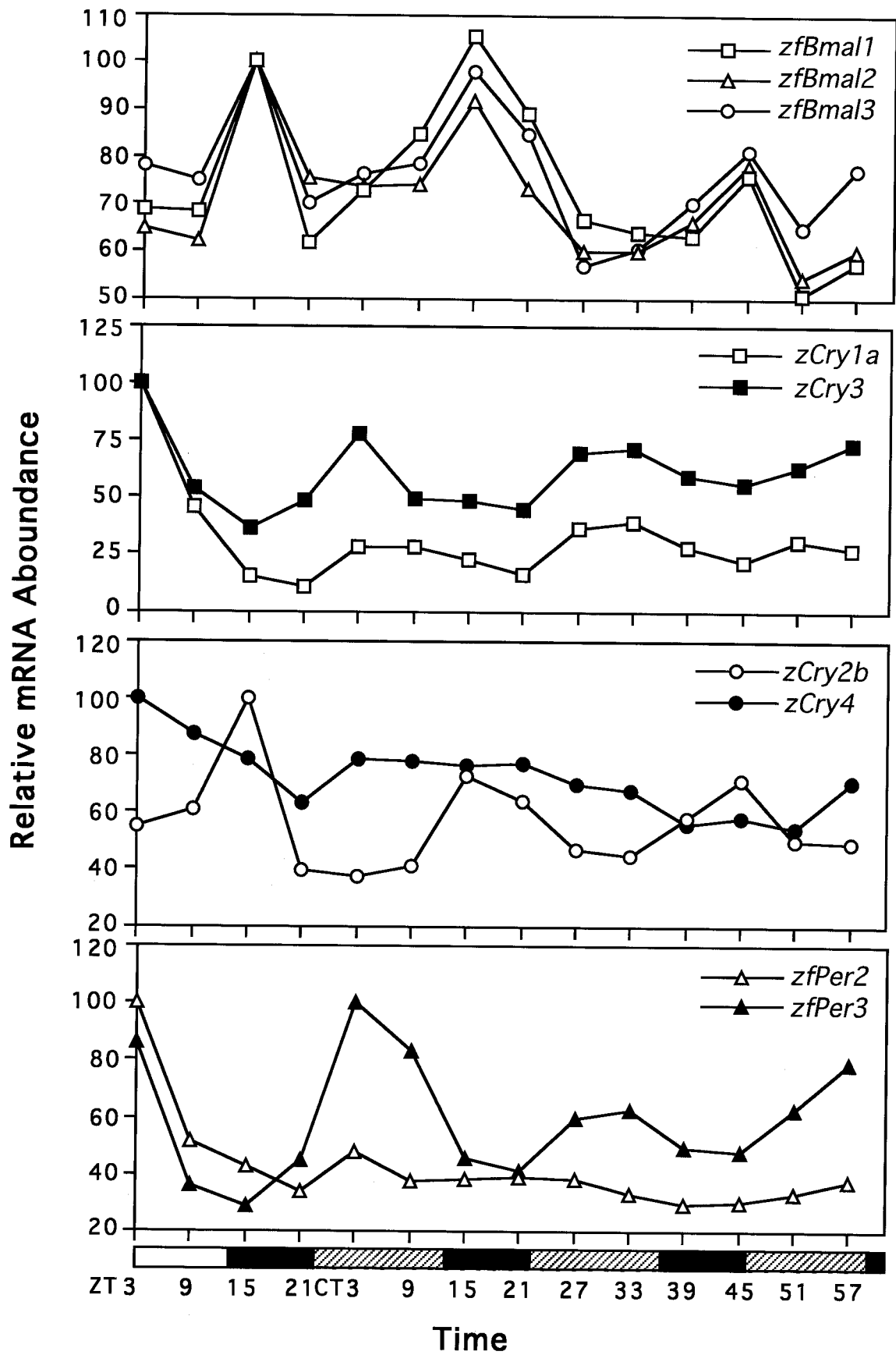


Fig.4-2B BRF41細胞における各時計遺伝子の自由継続リズム

各遺伝子の発現をNorthern blotのバンドのラジオアイソトープ活性として定量した。さらに β Actinの定量値で補正したのち最大値を100としてプロットした。

謝辞

本研究を進めるにあたり修士課程からの5年間、多大なご指導ご助言を賜りました藤堂 剛先生に心より深く感謝いたします、と共に研究をご支援いただきました放射線生物研究センターの皆様にも感謝いたします。

transgenic 個体の作製にあたり御助力いただきました、三菱化学生命科学研究所の上田 龍博士、富樫 伸博士、シヨウジョウバエの行動解析をお願いした九州大学理学部生物学科の谷村 禎一先生、松本 顕先生に深謝いたします。

また、東京大学大学院新領域創成科学研究科の嶋 昭紘先生、三谷 啓志先生には魚類の培養細胞を供与いただき厚く感謝いたします。