

氏 名 いし かわ とも こ
石 川 智 子
学位(専攻分野) 博士 (人間・環境学)
学位記番号 人 博 第 150 号
学位授与の日付 平成 14 年 3 月 25 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 Zebrafish 概日時計制御における Cryptochrome の役割

論文調査委員 (主 査)
教授 田口 貞 善 教授 速水 正 憲 教授 松井 正文
教授 藤 堂 剛(放射線生物研究センター)

論 文 内 容 の 要 旨

光回復酵素・青色光受容体ファミリーと呼ばれる一群の蛋白質が知られている。これらの蛋白質群は、一次構造の類似性のみではなく、いずれの蛋白質もフラビン・アデニン・ダイヌクレオチド (FAD) を補酵素として持つことから、共通の基本的作用メカニズムのもとに機能していると考えられる。しかしながら、それらが関与する生理機能は、DNA 損傷修復から青色光受容体といったように、実に多岐にわたっている。動物のクリプトクローム (Cryptochrome; CRY 蛋白) はこの蛋白質ファミリーの中で、最も遅く発見された蛋白質である。動物の CRY 蛋白は概日リズムの制御に重要な役割を果たしていることが、ショウジョウバエ及びマウスを用いた変異個体の表現型の解析から明らかにされてきた。ショウジョウバエとマウスの CRY 蛋白は、いずれも概日リズムに必須の構成要素ではあるが、それらの機能は異なる。CRY 蛋白は光回復酵素のホモログとして単離されたものであり、分子進化的解析から光回復酵素より分岐してきたものであると考えられている。光回復酵素・青色光受容体ファミリーが何故このように機能面で多様性を持つに至ったかを明らかにすることを最終目標として、本論文では、個体レベルでの遺伝子操作が比較的容易な魚類ゼブラフィッシュを用いて *Cry* 遺伝子の分子生物学的解析を行った。

概日時計の本体は時計遺伝子発現の約24時間の周期を持った振動である。このような遺伝子発現の調節は転写の促進因子と抑制因子から成る負のフィードバックループにより可能となることが知られている。促進因子として CLOCK-BMAL 異種二量体の転写因子が、抑制因子として CRY 蛋白が働いている。ゼブラフィッシュには6種類の *Cry* 遺伝子があるが、これらは抑制因子として機能しているものと、抑制活性を持たないものに分けうる。この抑制因子としての機能の解析を進めるためにまず、促進因子として働く *zfClock*, *zfBmal* 遺伝子のクローニングを行った。昆虫、哺乳動物の CLOCK, BMAL 蛋白で保存されているアミノ酸配列をもとにオリゴヌクレオチドを設計し、RT-PCR 法のプライマーとして用いることにより各々3種類の *zfClock*, *zfBmal* 遺伝子が得られた。得られた *zfClock*, *zfBmal* 遺伝子産物が異種二量体を形成する事、更にその形成に *Cry* 遺伝子産物がどのような作用を及ぼすのかを GST プルダウン法、免役沈降法、ツーハイブリッド法、ゲルシフト法で検討した。いずれの方法でも CLOCK-BMAL 異種二量体の形成が確認できた。また、CRY 蛋白は CLOCK-BMAL 異種二量体と DNA の複合体に結合し、その複合体を壊すことなく転写の抑制を行っていることを明らかにした。ショウジョウバエにおいては、PER 蛋白が CLOCK-BMAL 異種二量体と DNA との結合を壊すことにより転写抑制を行っていることが報告されている。ここで得られた結果は、脊椎動物においては CRY 蛋白が全く異なるメカニズムで転写抑制を行っている事を示している。更に解析を進めるにあたり、細胞レベルでの時計遺伝子発現振動系の確立は有用である。そこで、光によって時計遺伝子の発現がリズムを刻み始める魚類細胞を得ようとした。方法としては、明暗サイクル条件下で培養した細胞から RNA を抽出し、時計遺伝子である *zfPer2* 発現レベルの変動をノーザンプロットにより測定することにより行った。国内、国外から魚類細胞を入手しスクリーニングしたところ、光によって時計遺伝子発現が振動を

起こす BRF41 細胞を得ることができた。この細胞においては、転写活性化因子と、転写抑制因子の発現量が逆位相で振動している。そのパターンは、生体内での位相と一致する。また、光により特定の *Cry* 遺伝子の発現が誘導されており、この遺伝子産物が概日リズム形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。更に、この細胞は抑制因子としての機能を果たさない CRY 蛋白が概日リズムの光受容体として機能している可能性を検証する絶好の試験管内検出系となる事が期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、クリプトクローム蛋白の機能を生化学的に解析しその転写抑制メカニズムを明らかにするとともに、細胞レベルでの解析系を確立しクリプトクローム遺伝子発現の概日リズム制御における役割を明らかにしたものである。

生物と光とのかかわりは多様であり、生物は巧みに光を利用している。光合成は実質的に地球上の全生物のエネルギー源であり、また視覚は多くの生物にとり重要な感覚器官である。一方、光は生物に益をもたらすのみではなく、光の中でも波長の短い紫外線は生物に損傷を与える。生物は、その誕生から進化の初期の過程で太陽からの強い紫外線に曝されてきた。それは進化の大きな原動力であったと同時に、生物は生き残っていくために紫外線による DNA 損傷を修復する機構を獲得してきた。生物が獲得した DNA 修復機構の一つに光回復がある。光回復は長波長可視光を利用して短波長紫外線による DNA 損傷を修復する DNA 修復機構である。最近の研究から、光回復酵素が「DNA 修復酵素」のみでなく「外界からの光応答に関与する光シグナル光受容体」を含む機能的に幅広いタンパクファミリー（光回復酵素・青色光受容体タンパクファミリー）を形成していることが明らかになってきた。動物のクリプトクローム（Cryptochrome; CRY 蛋白）はこのファミリーの中で、最も最近になって発見された蛋白質であり、概日リズムの制御に重要な役割を果たしていることが、ショウジョウバエ及びマウスによる解析から明らかにされてきた。概日リズムとは、約24時間周期の生体リズムであり、地球環境により効率良く適応できるように生物が獲得したものと考えられる。つまり、この蛋白質ファミリーは、太陽に支えられている地球環境により良く適応するために、生物が祖先蛋白質を改変する事により様々な生理機能を獲得した結果形成されたものであると考えられる。CRY 蛋白を含め光回復酵素・青色光受容体ファミリーが何故このように機能面で多様性を持つに至ったかを明らかにすることを最終目標として、本論文では、魚類ゼブラフィッシュを用いて *Cry* 遺伝子の生化学的・分子生物学的解析を行っている。

CRY 蛋白は概日リズムにおいて、二種類の機能を担っている。一つは生物時計本体の重要要素として、二つ目は外部環境情報を生物時計に伝える受容体としての機能である。本論文は二部から構成されており、第一部においては前者の、第二部においては後者の機能解析を行っている。概日時計の本体は時計遺伝子発現の約24時間の周期を持った振動である。このような遺伝子発現の調節は転写の促進因子と抑制因子から成る負のフィードバックループにより可能となる。促進因子として CLOCK-BMAL 異種二量体の転写因子が、抑制因子として CRY が働いている。第一部において、CRY 蛋白が抑制因子としてどのように促進因子に作用しているかを明らかにした。ゼブラフィッシュには6種類の *Cry* 遺伝子があるが、これらは抑制因子として機能しているものと、抑制活性を持たないものに分ける。この抑制因子としての機能の解析を進めるためにまず、促進因子として働く転写因子のクローニングを行った。得られた転写因子遺伝子及び *Cry* 遺伝子を実験動物内で発現させこれらの遺伝子産物を精製した。これらの精製蛋白質を用い蛋白質間の相互作用を調べたところ、CRY 蛋白が転写因子二量体と DNA の複合体に結合し、その複合体を壊すことなく転写の抑制を行っていることが明らかになった。また第二部においては、光によって時計遺伝子の発現がリズムを刻み始める細胞を見いだした。この細胞においては、転写活性化因子と、転写抑制因子の発現量が逆位相で振動している。そのパターンは、生体内での位相と一致しており、個体における現象を反映していると考えられる。光が遺伝子発現にどのような作用を及ぼすのかを解析したところ、光により特定の *Cry* 遺伝子の発現が誘導されており、この遺伝子産物が概日リズム形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

以上、本研究で得られた結果は、CRY 蛋白の概日リズムにおける機能を解析する上で重要な知見であり、この蛋白質ファミリーの多様化した機能の根本にある基本原理を明らかにする研究に明確な基盤を与えるものであると言える。また、本研究の成果は、生物と光の関係を通して、地球環境変動に伴う生物進化においてどのような基本的青写真のもとに遺伝子変化が引き起こされたのかを明らかにする研究に重要な情報を与える。本学位申請論文は、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めざ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14年1月23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。