

「脳を知る」

平成7年度採択研究代表者

深田 吉孝

(東京大学大学院理学系研究科 教授)

## 「脳内光受容とサーカディアンリズム」

### 1. 研究の概要

多くの脊椎動物は、脳内の視床下部や松果体が光感受性をもち、光を感知して生物時計の時刻合わせ（位相同調）を行う。これらの組織には、光受容能と共に、睡眠・覚醒、行動、体温変化など一日のリズム（概日リズム）を制御する概日時計がある。また、ハトやウズラなど季節性の繁殖行動をする動物の場合は、季節性の生殖応答を制御する光周性の光センサーが脳深部に存在する。本研究プロジェクトにおいては、概日時計の光同調と光周性の脳深部光受容を中心テーマとして、光という刺激が生物の脳内に引き起こす生理的変化の分子メカニズム解析を進めている。これまで3年間の研究において、概日リズムの光位相同調や光周性（季節性の日長変化の識別）を支配すると考えられる新たな脳内光受容蛋白質をいくつか同定した。また、脳内の時計細胞において MAP キナーゼ活性が日周変動することを見出し、MAP キナーゼが概日リズムの発振系において極めて重要な役割をはたしていることを発見した。

### 2. 研究実施内容

【松果体細胞における光情報伝達経路～光センサーの性質と概日時計同調の分子機構～】

ニワトリ松果体は脳内の光感受性内分泌器官であり、概日時計機能をもっている。私どもが発見したピノプシンは、ニワトリ松果体の光センサーであり、内在する概日時計の光位相同調をになうと予想される。光センサーとしてのピノプシンの機能を調べるため、培養細胞におけるピノプシンの強制発現系と精製法を確立し、光吸収後のピノプシンの構造変化を分光学的に解析した。その結果、ピノプシンは網膜の桿体型オプシンと錐体型オプシンの両方の性質を兼ね備えた新しいタイプの光センサーであることが明らかになった。

また、松果体における概日時計の発振メカニズムへのアプローチの一つとして、ピノプシンの光情報伝達経路を調べた。これまで、ニワトリ松果体に発現する  $G\alpha$  遺伝子を網羅的に検索し、さらに、cDNA を単離した 6 種類の  $G\alpha$  の局在を免疫組織化学的に調べた。その結果、 $Gt1\alpha$  と  $G11\alpha$  が松果体細胞の外節においてピノ

プシンと共局在することが光顕レベルの観察から明らかになった。電子顕微鏡を用いた詳細な解析の結果、松果体細胞の外節の同一膜上において、Gt1 $\alpha$ と G11 $\alpha$ はいずれもピノプシンと共存していることが確かめられた。Gt1 $\alpha$ は機能的にもピノプシンと光刺激依存的に共役することを確認できた。現在、このシグナル伝達系の下流の解析を通して、時計発振系への光入力メカニズムを調べている。

ピノプシンは、概日時計の光位相同調を行う光センサーと予想されるが、これを証明するため、遺伝子導入が可能なゼブラフィッシュを用いて松果体の光受容に関する研究を行っている。予想に反して、ゼブラフィッシュ松果体にはピノプシンは検出されず、代わりに、網膜ロドプシンに類似の（しかし同一ではない）光センサーの遺伝子が見つかった。この遺伝子は、松果体の多くの細胞に強い発現を示したが、網膜での発現は検出されなかった。そこでこの新規ロドプシンを、眼外 (extra-ocular) 組織に特異的に存在するロドプシンという意味からエクソロドプシン (exo-rhodopsin) と命名した。現在、エクソロドプシンの機能を阻害した個体の作成と、そのリズム解析をめざした実験を開始している。

#### 【脳深部光受容タンパク質の同定 ～光周性の分子機構を探る～】

ハトやウズラをはじめ鳥類の脳深部には、季節を知るための光受容体が存在すると考えられてきた。すなわち、これらの動物は、日長が一定の長さを超えると生殖応答を示すが、このような光周性は脳深部を光刺激することによって引き起こされる。この脳深部光受容と日長識別のメカニズムを探るためにまず、その光受容蛋白質と光受容細胞の同定を行った。その結果、ハト脳深部の外側中隔に、網膜に発現するロドプシン遺伝子が発現していることを見出した。さらに、ロドプシン特異的抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、外側中隔の脳脊髄液接触ニューロンにロドプシンの陽性反応が得られた。これと同様の実験を、顕著な季節性行動変化を示すヒキガエルを用いて行った。その結果、ニワトリピノプシンと類似の光センサー遺伝子を単離することができた。このヒキガエルピノプシン特異的抗体を作成して、免疫組織染色を行ったところ、ヒキガエル脳の視束前核前部の脳脊髄液接触ニューロンに陽性反応が得られた。ハト脳深部にロドプシンが存在するという結果を考え併せると、脊椎動物の脳深部には、動物種によって多様なオプシン型光受容蛋白質が存在すると考えられる。現在、これらの光センサーがキャッチした光情報が、脳脊髄液接触ニューロン内でどのように信号変換されているのか、そのシグナル伝達系路を探ると共に、この光情報がどのようにして日長情報として統合されるのか、そのメカニズムにアプローチしている。

#### 【概日リズムの可視化とマイクロマニピュレーション】

「一個の時計細胞が示す概日リズム」をリアルタイムで追跡・画像解析し可視化することを目的として、ニワトリ松果体細胞のメラトニン放出過程に関与する細胞

内装置の可視化を試みた。細胞質中で合成されたメラトニンが細胞外に分泌される分子機構は不明であるが、私どもは分泌経路の要となるゴルジ体経由の分泌に注目し、ゴルジ体経由の小胞輸送の可逆的阻害試薬 brefeldin A (BFA) の効果を調べた。その結果、BFA 除去後のゴルジ体の再構築過程において NAT 遺伝子の転写抑制・NAT 活性の低下・メラトニンの放出抑制が起こっていることが明らかとなり、小胞体ーゴルジ体間の膜輸送と転写制御のクロストークという細胞生物学的にも大変興味深い細胞内情報伝達様式が存在を示唆することができた。現在、メラトニン放出とは異なる出力系を指標にして、概日リズムを可視化する試みを続けている。

#### 【松果体と網膜における MAP キナーゼ活性の日周変動とその役割】

近年、三量体 G 蛋白質とチロシンキナーゼを介するシグナル伝達経路のクロストークが明らかになっている。このことを背景に、概日時計への光入力系にチロシンリン酸化蛋白質が関与している可能性を検討した。その結果、松果体の MAP キナーゼが、光刺激に伴って脱リン酸化されることを見出した。さらに、恒暗条件下における松果体 MAP キナーゼのチロシンリン酸化量およびキナーゼ活性を調べたところ、興味深いことに、昼に相当する時間帯に低下し、夜に相当する時間帯に上昇するという概日リズムを示した。また、培養松果体の時計位相に対する MAPK キナーゼ (MEK) 阻害剤 (PD98059) の投与効果を調べた結果、夜に相当する時間帯に PD98059 を 11 時間 投与することによって、概日時計の位相が約 8 時間シフト (位相後退) した。以上の結果から、少なくともニワトリ松果体においては MAP キナーゼは概日時計のリズム形成に極めて重要な役割を果たすことが明らかになった。最近、ショウジョウバエやマウスにおいて、時計発振系の構成分子がいくつか発見されており、これら蛋白質分子の活性や安定性がリン酸化によって調節されることが示唆されている。したがって、MAP キナーゼはこれら時計分子のリン酸化を介して発振系の駆動に関与している可能性が高いと考えている。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Yoko Takanaka, Toshiyuki Okano, Masayuki Iigo and Yoshitaka Fukada: Light-dependent expression of pinopsin gene in chicken pineal gland. *J. Neurochem.*, 70,908-913 (1998)
- Yasutaka Wada, Toshiyuki Okano, Akihito Adachi, Shizufumi Ebihara and Yoshitaka Fukada,: Identification of rhodopsin in the pigeon deep brain. *FEBS Lett.*, 424, 53-56 (1998)
- Tomoko Yoshikawa, Toshiyuki Okano, Tadashi Oishi and Yoshitaka Fukada: A deep brain photoreceptive molecule in the toad hypothalamus. *FEBS Lett.*, 424,69-72(1998)

- Kanta Mizusawa, Masayuki Iigo, Hiroaki Suetake, Yasutoshi Yoshiura, Koichiro Gen, Kiyoshi Kikuchi, Toshiyuki Okano, Yoshitaka Fukada and Katsumi Aida: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the retinal arylalkylamine N-acetyltransferase of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Zool. Sci.*, 15, 345- 351 (1998)
- Takahiko Matsuda, Yuichi Hashimoto, Hiroshi Ueda, Tomiko Asano, Yoshiharu Matsuura, Tomoko Doi, Toshifumi Takao, Yasutsugu Shimonishi and Yoshitaka Fukada: Specific isoprenyl group linked to transducin gamma-subunit is a determinant of unique signaling properties among G proteins. *Biochemistry*, 37, 9843-9850 (1998)
- Toshiyuki Okano and Yoshitaka Fukada: Structure, gene expression, localization and functional implication of chicken pineal photoreceptor pinopsin. in: "Light Perception and Circadian Rhythm" (T. Hiroshige & K. Honma, eds.), pp.21-32, Hokkaido University Press, Sapporo (1999).
- Mikaru Yamao, Masasuke Araki, Toshiyuki Okano, Yoshitaka Fukada and Tadashi Oishi: Differentiation of pinopsin-immunoreactive cells in the developing quail pineal organ: in vivo and in vitro immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, 296, 667-671 (1999).