

「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. 研究実施の概要

本研究プロジェクトにおいては、光という刺激が脊椎動物の脳内に引き起こすさまざまな生理的変化の分子メカニズム解析を進めている。具体的には、光情報が概日時計の位相を調節するメカニズム（概日時計の光同調）、および脳内光受容の実体と日長識別の分子メカニズム（光周性）を中心テーマとし、光受容体・光情報伝達経路・時計発振系という3点に焦点を絞った研究を推進している。まず光受容体からのアプローチとしては、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光受容蛋白質（脳深部ロドプシン・脳深部ピノプシン・脳深部および網膜水平細胞VALオプシン・松果体エクソロドプシン）を同定した。また、松果体、網膜および脳深部における光情報伝達分子の解析を進め、概日時計への光入力系が脊椎動物の視覚の光情報伝達経路とは異なる経路から成ることを示した。概日時計の発振系へのアプローチとしては、MAPキナーゼが時計発振系に重要な役割を果たすことを明らかにするとともに、ニワトリ松果体から一群の時計遺伝子を単離した。この過程で、発振系を構成すると考えられる新規の転写因子を同定した。

2. 研究実施内容

平成11年度は、ニワトリ松果体における概日時計の光同調経路を探るため、光受容分子側からの光情報伝達経路を調べ、GqタイプのG蛋白質を介した新しい情報伝達経路が存在することを示した。また、概日時計の位相シフトを起こすような光刺激に伴いMAPキナーゼが脱リン酸化されることを見出した。これらの成果の上に立ち、Gq経路の下流にMAPキナーゼの脱リン酸化をひき起こすような未知の経路が存在し、その下流でMAPキナーゼが時計分子の活性を制御するというモデルを想定し、これを検証すべく、まず松果体に発現する時計遺伝子を単離した。これと並行して、ゼブラフィッシュを用いた松果体時計機能の解析系の構築を目指した。具体的には、これまでに同定した松果体の光受容蛋白質エクソロドプシン遺伝子上流領域を単離し、この領域が松果体特異的な遺伝子発現を導き得ることを示した。

【松果体細胞における概日時計発振の分子機構】

ニワトリ松果体から時計遺伝子を単離するために、PCRによる部分配列の単離とcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、時計発振系の「負のフィードバックループ」を構成すると推定される3種類のコンポーネントPERIOD, CLOCKおよびBMALの全長cDNAの単離に成功した。これら時計遺伝子のmRNA量の松果体における日内変動をノザンブロット解析等によって調べた結果、いずれのmRNA量も概日リズムを示すことがわかった。この転写量の概日リズムは、ニワトリ松果体細胞を分散培養しても観察されたことから、単一の松果体細胞に内在する概日時計によって転写調節の支配を受けていることがわかった。この遺伝子クローニングの過程で新規の時計遺伝子Bmal2を同定し、これがCLOCKと共にE-Boxを介して転写を正に制御することを見出した。

一方、MAPキナーゼのリン酸化リズムはニワトリ松果体のみならずウシガエル網膜やマウス視交叉上核（SCN）においても観察されたことから、MAPキナーゼのリン酸化リズムは時計細胞に普遍的な現象であり、時計発振系において共通の役割を果たす可能性が示唆された。なかでも、マウスSCNにおいては既報[Obrietan *et al.* (1998)]と異なり、領域によって位相の異なる複数のリン酸化リズムが観察された。また主観的夜における光刺激は、さらに別のSCN領域のMAPキナーゼのリン酸化を誘導することから、時計発振系に関与するMAPキナーゼと光入力系に寄与するMAPキナーゼが別の細胞で独立の活性変化を示す可能性が示唆された。

【ゼブラフィッシュ脳内の光受容蛋白質】

我々が新たに見出したエクソロドプシンは、ゼブラフィッシュ松果体に特異的に発現する光受容分子である。ゼブラフィッシュはトランスジェニック個体の作成が可能なので、松果体をターゲットとした個体レベルでの遺伝子導入を行ない、機能修飾を施した松果体の解析が期待できる。そこでこれまでに、ゼブラフィッシュから松果体エクソロドプシンおよび網膜ロドプシンの遺伝子上流（プロモータ）領域を単離し、これらにGFPを繋いだレポータコンストラクトを作成した。これらをゼブラフィッシュ受精卵に導入して一過性の発現を調べた結果、エクソロドプシンプロモータ・ロドプシンプロモータは、それぞれ松果体・網膜における部位特異的なGFPの発現を誘導した。現在、各組織特異性を決定づけるエレメントの同定を試みると共に、松果体における特定分子の機能阻害を目指したトランスジェニック個体の作成を開始した。

私共が同定したもう一つのゼブラフィッシュ脳内オプシン（VALオプシン）は、かつてサケ眼球において見つかったVAオプシン（機能不明）の新規スプライスバリエントであった。興味深いことに、VALオプシンは間脳中央部の第三脳室

に面した少数の細胞群に局在する。古くから、この狭い脳領域には体色を制御する光センサーが存在することが知られていたが、その実体は永らく謎であった。VALオプシンがその分子実体と考えると、オプシンに「体色の制御」という新たな機能が見つかったことになる。また驚くべきことに、VALオプシンは網膜の（視細胞ではなく）水平細胞にも存在することを見出した。従来、網膜では視細胞のみが光感受性をもつと考えられてきただけに、『水平細胞の光感受性が如何なる生理機能と結びついているのか』という疑問は、視覚研究のみならず神経科学の研究領域においても非常に興味深い今後の研究課題である。

【ハト脳深部の光情報伝達経路と脳脊髄液におけるメラトニンリズム】

本プロジェクトの前半で我々は、光周性の光受容中枢と考えられるハト脳深部（外側中隔）において光受容蛋白質ロドプシンが発現していることを発見した。この知見に基づき、ハト脳深部に網膜類似の光情報伝達経路を仮定し、さらなる解析を進めた。その結果、外側中隔の脳脊髄液接触ニューロンにおいてロドプシンと桿体型トランスデューシンが共局在していることを明らかにした。続いて、トランスデューシンの情報下流にあると推定されるcGMP-ホスホジエステラーゼ（PDE）およびcGMP依存性カチオンチャネル（CNGC）の遺伝子を検索し、桿体型PDEおよび錐体型CNGCの発現を見出した。これと並行して、ハト外側中隔の脳脊髄液接触ニューロンが接する側脳室にマイクロダイアリシスプローブを留置し、脳脊髄液のモニタリングシステムを完成した。これを用いてまず、側脳室内の脳脊髄液中に含まれるメラトニン含量を経時的に調べたところ、明暗条件下では暗期に高く明期に低い日内変動を、さらに恒暗条件下でも概日リズムを示すことが判明した。現在、長日／短日条件下でのリズム測定を行い、メラトニンが日長識別に（例えばメディエータとして）関与する可能性を検討している。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Atsushi Nakamura, Daisuke Kojima, Hiroo Imai, Akihisa Terakita, Toshiyuki Okano, Yoshinori Shichida and Yoshitaka Fukada: Chimeric nature of pinopsin between rod and cone visual pigments. *Biochemistry*, 38, 14738-14745 (1999)
- Hiroaki Mano, Daisuke Kojima and Yoshitaka Fukada: Exo-rhodopsin: A novel rhodopsin expressed in the zebrafish pineal gland. *Mol. Brain Res.*, 73, 110-118 (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)
- Osamu Shouno, Kamon Sanada, Tomiko Asano and Yoshitaka Fukada: Characterization of N-acylation of Goa purified from bovine retinas. *NeuroReport*, 10,

2999-3002 (1999)

- Kamon Sanada, Yuichiro Hayashi, Yuko Harada, Toshiyuki Okano and Yoshitaka Fukada: Role of circadian activation of mitogen-activated protein kinase in chicken pineal clock oscillation. *J. Neurosci.*, 20, 986-991 (2000)
- Atsuko Matsushita, Tomoko Yoshikawa, Toshiyuki Okano, Takaoki Kasahara and Yoshitaka Fukada: Colocalization of pinopsin with two types of G-protein α -subunits in the chicken pineal gland. *Cell Tissue Res.*, 299, 245-251 (2000)
- Daisuke Kojima, Hiroaki Mano and Yoshitaka Fukada: VAL-opsin: A green-sensitive photoreceptive molecule present in zebrafish deep brain and retinal horizontal cells. *J. Neurosci.*, 20, 2845-2851 (2000)
- Keiko Okano, Toshiyuki Okano, Tomoko Yoshikawa, Atsuko Masuda, Yoshitaka Fukada and Tadashi Oishi: Diversity of opsin immunoreactivities in the extraretinal tissues of four anuran amphibians. *J. Exp. Zool.*, 286, 136-142 (2000)
- Toshiyuki Okano and Yoshitaka Fukada: Photoreceptors in pineal gland and brain: Cloning, localization and over-expression. in: "Methods in Enzymology" Vol.316,"Vertebrate Phototransduction and the Visual Cycle" Part B (K. Palczewski, ed.), pp.278-291, Academic Press (2000)
- Takahiko Matsuda and Yoshitaka Fukada: Functional analysis of farnesylation and methylation of transducin. in: "Methods in Enzymology" Vol.316,"Vertebrate Phototransduction and the Visual Cycle" Part B (K. Palczewski, ed.), pp. 465-481, Academic Press (2000)