

# Molecular Cloning, mRNA Expression, and Immunocytochemical Localization of a Putative Blue-Light Photoreceptor CRY4 in the Chicken Pineal Gland

Yoko Kubo, Masashi Akiyama, Yoshitaka Fukada and Toshiyuki Okano

J. Neurochem. 97, 1155–1165 (2006)

doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03826.x

## ニワトリ松果体における青色光受容体候補分子クリプトクロム4の同定、発現解析ならびに免疫細胞学的局在解析

久保葉子、秋山正志、深田吉孝、岡野俊行

### 【本論文のポイント】

概日時計の発振系で中心的な働きを担う分子、クリプトクロム(Cryptochrome; CRY)の新しいグループであるクリプトクロム4を見出した。クリプトクロム4は、クリプトクロム1、2のような転写抑制能を持たず、鳥類では光感受性の概日時計中枢である松果体に発現が見出された。クリプトクロム4 mRNA とタンパク質はいずれも、松果体<sup>※1</sup>において光によって誘導された。松果体における細胞局在を調べたところ、光感受性の時計細胞が存在する実質領域の多くの細胞に発現していた。これらのことから、ニワトリクリプトクロム4は、松果体において青色光を受容する光センサーとして働く可能性が考えられる。

### 【概要】

クリプトクロムは植物や昆虫では、青色光を受容する光センサーとして機能する。一方、脊椎動物には、多数のファミリー分子が存在するものの、光受容能は不明である(図1)。クリプトクロム4 (Cry4) は、ゼブラフィッシュで同定された機能未知の Cry 遺伝子であるが、データベース情報からは、魚類だけでなく鳥類にも Cry4 遺伝子が存在することが示唆された。

そこで、Cry4 が新規の光受容分子として機能する可能性を考慮して、まずは、その一次構造の決定と mRNA/タンパク質の発現部位の同定を試みた。

ニワトリクリプトクロム4 (cCRY4) は529 残基のアミノ酸からなり、ゼブラフィッシュ CRY4 (zCRY4) と高い配列相同性 (62%) を有していた。cCRY1 や cCRY2 とは比較的低い相同性 (約 45%) だが、CRY/PHR ファミリーに高度に保存されたドメインを持ち、発色団である FAD の結合部位やタンパク質内電子伝達に重要な3つのトリプトファン残基が保存されていた。

定量的 RT-PCR を用いて明暗サイクル (Light:Dark=12:12) 条件下におけるニワトリ各組織 (松果体、網膜、大脳、中脳+間脳、小脳、皮膚、腎臓、肝臓、心臓) の cCry1, cCry2, および cCry4 の mRNA の日内発現変動解析を行った。その結果、概日時計因子である cCry1, cCry2 はほとんどの組織で振動が見られた。一方、cCry4 は松果体と腎臓でのみ有意な振動を示し、他の臓器では有意な振動は見られなかった。ニワトリ松果体細胞を初代培養して、cCry4 mRNA 発現変動を調べたところ、恒暗下では概日リズムがあるものの振動は2倍程度であった。一方、明暗サイクル下で培養した際には、光照射により mRNA 量が大幅に増大した(図2)。

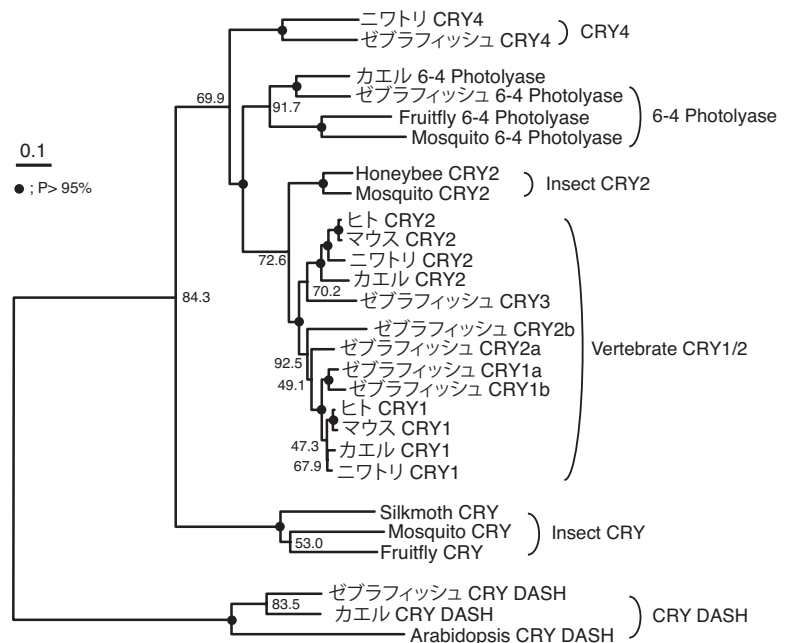


図1 ニワトリCRY4を含めたクリプトクロム・光回復酵素ファミリー分子の分子系統樹

次に松果体におけるタンパク質レベルでの発現量を明らかにするために cCRY4 の C 末端 DH 領域に対して特異的に結合するポリクローナル抗体 (DH 抗体) を作製した。Western blot の結果から、通常の明暗サイクル下においたヒヨコ個体から取り出した松果体の cCRY4 発現量は ZT12 で最大となり、先の mRNA の発現プロファイルとよく一致した (図 3)。

また、免疫組織化学的手法により松果体における cCRY4 の局在を調べたところ、松果体の 3 つの領域、すなわち、濾胞細胞、濾胞傍細胞、濾胞間細胞の全てにシグナルが観測された。松果体実質細胞である濾胞傍細胞と濾胞細胞では、特定の局在というよりは広く全体に分布していた。一方、濾胞間細胞では一部の細胞に、小さな点状または紐状構造の強いシグナルが観察された。

最後に cCRY4 が概日時計における時計遺伝子の発現を制御する転写調節能をもっているかを調べるために転写アッセイを行ったところ、時計遺伝子である cCRY1 や cCRY2 は、cCLOCK、cBMAL による転写促進活性を阻害したが、cCRY4 には阻害効果は見られなかった。したがって、転写活性を制御するというよりは、概日時計とは異なる光に関連する機能に関わると推定された。

CRY の光伝達メカニズムはシロイヌナズナやショウジョウバエにおいて広く研究されているものの、脊椎動物ではほとんど研究されていない。ニワトリ松果体における今回の cCRY4 の研究はクリプトクロムに対する新たなアプローチを可能にした。

[要約作成：佐野太紀、岡野俊行]

### 【語句の説明】

※ 1 松果体：夜間に睡眠ホルモンであるメラトニンを合成・分泌する内分泌器官。哺乳類以外の脊椎動物では光感受性をもつ。ニワトリでは頭蓋骨内の頭頂部に存在し、青色感受性の光受容タンパク質ピノプシンおよびメラノプシンが同定されている。

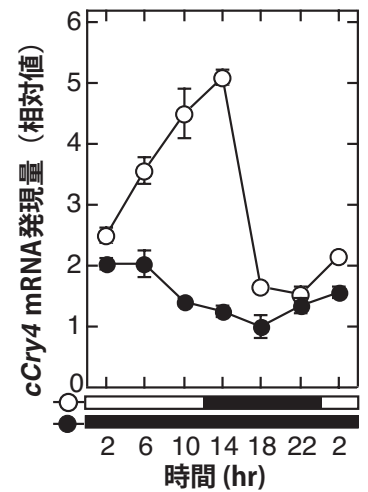


図 2 ニワトリ松果体細胞における cCry4 mRNA 発現の光誘導

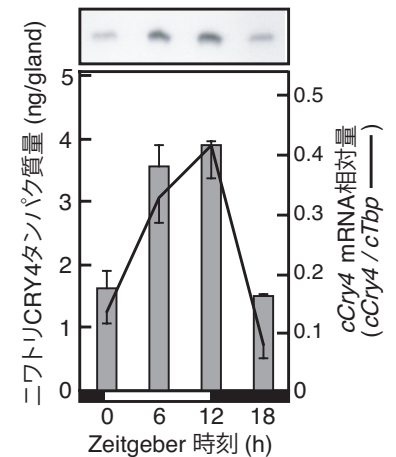


図 3 ニワトリ松果体における cCRY4 発現の光誘導