

# Cryptochrome Genes Are Highly Expressed in the Ovary of the African Clawed Frog, *Xenopus tropicalis*

Yoko Kubo<sup>†</sup>, Takahiro Takeuchi<sup>†</sup>, Keiko Okano, Toshiyuki Okano

*PLoS One* 5, e9273 (2010)

doi:10.1371/journal.pone.0009273

## ネッタイツメガエルにおいてクリプトクロム遺伝子群は卵巣において高発現している

久保葉子<sup>†</sup>、竹内崇裕<sup>†</sup>、岡野恵子、岡野俊行

<sup>†</sup>両者とも第一著者

### 【本論文のポイント】

クリプトクロム (Cryptochrome, CRY) は、分子種によって多彩な機能を持ち、概日時計発振系のネガティブフィードバックループ<sup>※1</sup>の中心的な転写抑制因子や青色光受容分子、あるいは磁気受容分子として機能する。ネッタイツメガエル (トロピカリス) の CRY の機能を調べる第一段階として、*Cry1* および *Cry2* の発現部位と転写抑制能を調べた。その結果、*Cry1* および *Cry2* の mRNA は、他の組織に比べて卵巣において桁違いに高く発現していることを見出した。CRY1 および CRY2 タンパク質は転写抑制能を保持しており、時計因子として機能することが考えられるが、卵巣においては日内変動性は見られず、概日時計とは異なる未知の機能を担っていると推定された。

### 【概要】

概日時計の研究は、マウスやショウジョウバエといった一部のモデル生物に集中して進められてきた。ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルを用いた研究は一部報告されているものの、下等脊椎動物を用いた研究は限られている。そこで本研究では、ネッタイツメガエルを用いて、クリプトクロム (XtCRYs) の発現及び概日時計発振に関わる転写調節機能についてさらなる研究を行った。ネッタイツメガエルは脊椎動物の遺伝子操作に適したモデル動物の1つである。

まず、Ensembl *X. tropicalis* と EST データベース<sup>※2</sup> の配列情報に基づいて、生体のカエルの腎臓から *XtBmal1*、*XtCry1*、*XtCry2*、*Xtβ2M* (β2-ミクログロブリン) の全長の cDNA をクローニングした。完全長の *XtClock* 配列は NCBI のデータベースにおいて既に同定されており、本研究においては完全長の *XtCry1*、*XtCry2*、*XtBmal1*、*Xtβ2M* 配列を決定することが出来た。そして得られた XtCRY1、XtCRY2、XtBMAL1 のアミノ酸配列と XtCLOCK のアミノ酸配列を、他の種のオルソログタンパク質と共に Neighbor-Joining (NJ)法を用いて分子系統樹を作製した。この結果は最尤法を用いて作製したものとほぼ同じ結果であった。

次に、昼夜交代に伴って *XtCry* の mRNA の発現量が変化するかを調べるために、正午(ZT6)と真夜中(ZT18)にサンプル

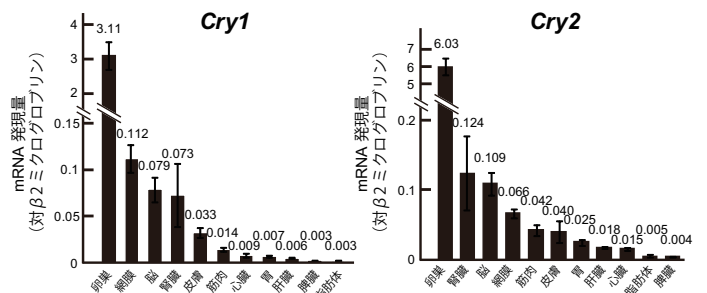


図1 ネッタイツメガエル各臓器における Cry mRNA 発現量

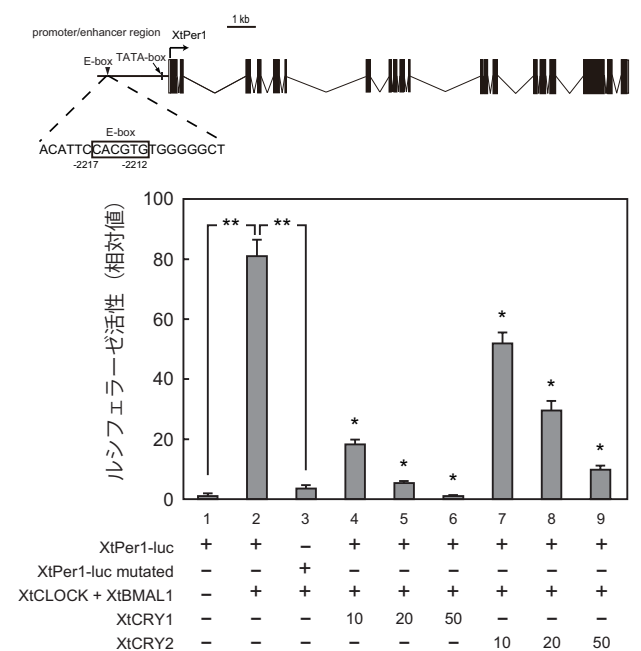


図2 ネッタイツメガエル Per1 遺伝子のゲノム構造とルシフェラーゼアッセイによる CRY の転写抑制能の解析

リングしたさまざまな組織より RNA を調製し、合成した cDNA を用いて定量的 RT-PCR 法で mRNA 量を測定した。その結果、腎臓、筋肉、心臓、肝臓、脂肪の組織において、*XtCry2* mRNA の発現量は真夜中よりも正午のほうが有意に高かった（図 1）。皮膚や網膜、胃の組織においても同様の変化が見られた。また、脾臓、網膜、胃、脂肪の *XtCry1* mRNA の発現量において、有意な変化が得られた。

、重要なことには、正午と真夜中の *XtCry* の mRNA 発現量を平均し、組織ごとに mRNA の発現量を比較すると、他の組織よりも卵巣の発現量が数十倍以上も高いと推定された。現在（2011 年時点）に至るまで、マウスやゼブラフィッシュを除いて、脊椎動物の卵巣に概日時計の働きを持つ遺伝子の発現に関する研究はなく、本研究が最初の報告である。卵巣における CRY の機能はいまだに不明であり、今後の研究が期待される。

、最後に、概日時計の機能をもつと推定した CRY タンパク質が概日時計の発振系で CLOCK-BMAL 複合体による転写促進活性を抑制する性質をもつかを調べるために転写アッセイを行った。その結果、ネツタイトツメガエル *Per1* のプロモータ領域に見出された E-box 配列に対して *XtCLOCK* と *XtBMAL* が転写を促進し、さらに CRY1 と CRY2 がいずれも抑制的に作用することがわかった（図 2）。また、*XtCRY* と GFP の融合タンパク質を発現させることにより、*XtCRY* の細胞内局在を調べた結果、単独の GFP は主に細胞質に局在するのに対して、GFP-CRY1 と GFP-CRY2 はいずれも核内に局在した。以上より、*XtCRY1*, *XtCRY2* はいずれも概日時計の構成因子として機能することが明らかとなった。

、、、、、、、、 [要約作成：岡ノ谷優貴、岡野俊行]

### 【語句の説明】

※ 1、概日時計発振系のネガティブフィードバックループ：約 24 時間周期の体内時計を概日時計と呼ぶ。概日時計は、一群の時計遺伝子の転写と翻訳にもとづく制御—被制御関係からなる多数のループ構造から構成される。その中心は、コアループと呼ばれ、PERIOD(PER)および CRYPTOCHROME(CRY)が、自身の遺伝子の転写を抑制する負のフィードバック制御構造、すなわちネガティブフィードバックループである。コアループでは、*Per* および *Cry* 遺伝子上流プロモーター／エンハンサー領域に存在する E-box 配列に転写因子 CLOCK および BMAL が結合して転写を促進、その後、翻訳された PER-CRY の複合体が結合して転写を阻害する、という負の制御が 1 日のサイクルをもって繰り返されている。

※ 2、EST データベース：EST は Expressed Sequence Tag の略であり、ある臓器や組織において発現されている配列を意味する。たとえば、肝臓 EST は肝臓において発現されている mRNA から合成した cDNA の配列を示す。EST は、遺伝子の存在だけでなく、ゲノム配列と照合することによって、エキソン／イントロンの境界を決定する手がかりになる点でも重要である。特定の配列でなく、RNA シーケンスや次世代シーケンスなどによって網羅的に配列決定し、データベース化して EST データベースとして利用することが多い。