

# Identification and Characterization of Cryptochrome4 in the Ovary of Western Clawed Frog *Xenopus tropicalis*

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

Zoolog. Sci. 31, 152–159 (2014)

doi:10.2108/zsj.31.152

## ネッタイツメガエル卵巣に発現するクリプトクロム4の同定と性状解析

竹内崇裕<sup>†</sup>、久保葉子<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 (CRY)は青色光受容体として発見され、DNA 損傷修復因子であるフォトリアーゼと近縁な分子である。我々は、脊椎動物における *Cry* の発現機構や機能を明らかにするために、ネッタイツメガエルの *Cry4* (*XtCry4*) 遺伝子に着目した。ネッタイツメガエルは、両生類のモデル生物として広く用いられており、*Cry1*、*Cry2*、*Cry4* の3種類のクリプトクロム遺伝子の存在が確認されている。CRY1、CRY2 タンパク質は概日時計因子として、CLOCK-BMAL1 といったタンパク質複合体の活性を抑制して時計遺伝子である *Per* 遺伝子の転写抑制因子として働くが、同時に、卵巣に mRNA が大量に存在する。CRY4 には、転写抑制活性は見られなかったものの、*Cry1* や *Cry2* と同様に卵巣や精巣に mRNA が高発現していた。クリプトクロムは多機能のタンパク質であり、生殖腺でまだ未解明の新機能を持っている可能性がある。

### 【概要】

#### 定量的 RT-PCR による *XtCry4* 発現解析

*XtCry4* が成体のどの組織に多く発現しているかどうかを調べるため、12箇所の組織において日中(ZT6)と夜中(ZT18) における *XtCry4* mRNA の発現量を定量的 RT-PCR(qRT-PCR) で調べた。その結果、卵巣において顕著に発現量が多いことが分かった (図 1)。すなわち、調べた中では2番目に多い腎臓に対して40倍以上、最も少ない網膜に対しては8,000倍以上の発現量と見積もられた。また、正午と夜中で発現量に有意差は見られなかったことから、*XtCRY4* に対しての光の影響は少ないということが示唆された。

#### *in situ* ハイブリダイゼーションにおける *XtCry4* 局在解析

さらに詳しく *XtCry4* の局在について調べるため、*in situ* ハイブリダイゼーション<sup>※1</sup>を行った (図 2)。その結果、卵巣では卵母細胞の細胞質に、精巣ではライディッヒ細胞および精細管でシグナルが見えた。特に卵巣においては成熟した卵母細胞で強くシグナルが見られた。また、ライディッヒ細胞は下垂体ホルモン、黄体形成ホルモンの形成と関わりがあり、雄性ホルモンアンドロゲンを放出することから、CRYが精巣の成熟と精子形成に関わっていれば興味深い。腎臓では尿細管に、網膜では外顆粒層(ONL)、内顆粒層(INL)、神経節細胞層(GCL)にシグナルが見られ、外顆粒層では特に桿体において強いシグナルが見られた。

#### *XtCRY4* の機能推定

ニワトリでは cCRY4 は、網膜や松果体といった光受容組織で高く発現している。一方、ネッタイツメガエルの網膜では *XtCry4* の mRNA 量は相対的に低かった。このような種による違いは、脊椎動物の進化過程での CRY4 の機能変化と関連しているかもしれない。

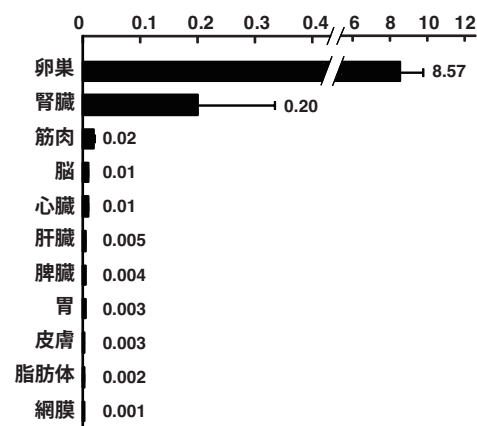


図 1 クリプトクロム 4 mRNA 発現量 (ミクログロブリンに対する相対値)

ルシフェラーゼアッセイによって XtCRY1、XtCRY2 と同様に CLOCK-BMAL に対する抑制活性を持つかどうかを調べたところ、XtCRY4 では抑制が確認されなかった。また、緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質を哺乳類培養細胞に発現させて、細胞内局在を推定したところ XtCRY1 および XtCRY2 は核へ移行したのに対して、XtCRY4 では核移行が見られなかった。さらに、卵巣における XtCRY4 タンパク質の発現を調べるために、XtCRY4 の C 末端領域に対する抗血清を作製し、卵巣タンパク質に対するウエスタンブロット解析を行なった。その結果、卵巣抽出物中に約 60kDa 付近に単一の陽性バンドを検出することができた (図 3)。

以上の結果から、XtCRY4 は時計因子としての機能というよりはむしろ、生殖腺において光受容体もしくはその他未知の機能をもつと推定された。

[要約作成：中川真里花、岡野俊行]

### 【語句の説明】

※1 *in situ* ハイブリダイゼーション： mRNA の組織局在を調べる方法の 1 つ。薄くスライスした組織切片をスライドガラスに貼り付け、標識した RNA または DNA プローブと共にインキュベートして組織内の mRNA と 2 本鎖を形成させる。そののちに結合したプローブを検出して mRNA の局在を可視化する。

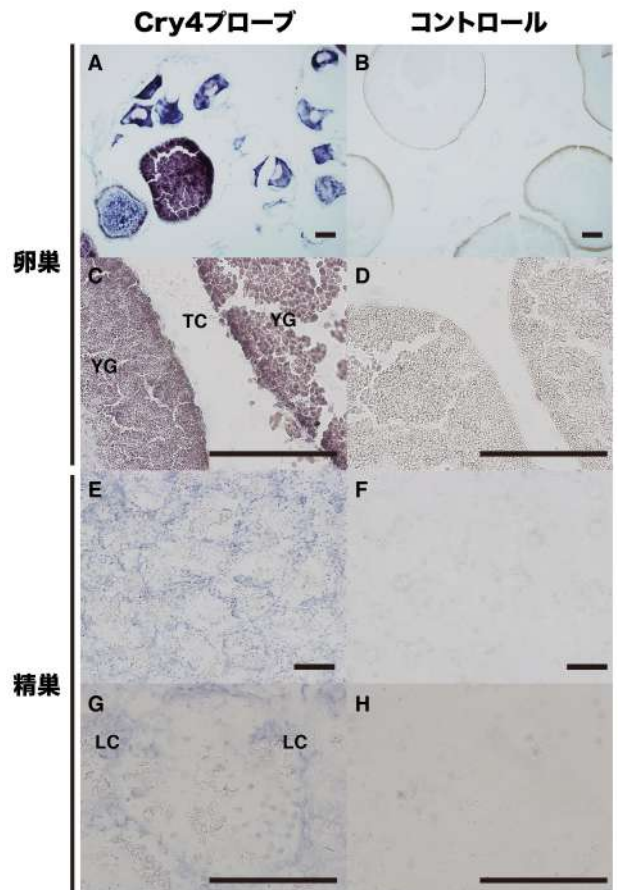


図2 ネットイツメガエル性腺における Cry4 mRNA発現 (in situ hybridization)

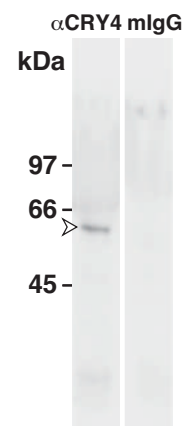


図3 ウエスタンブロットによる卵巣の cCRY4 発現解析