

## Immediate early geneのその後

安倍 博

北海道大学医学部統合生理学講座

*c-fos*、*junB*などのimmediate early gene (IEG)が、ラットやハムスターの視交叉上核 (SCN) で光により位相依存的に発現誘導されることが報告されて10年が経った。SCNでのIEG光誘導は、行動のサーカディアンリズムの光位相反応性と共通する性質を持つことから、サーカディアン振動体の光同調に関わる重要な遺伝子と考えられてきた。しかし、その後の*c-fos*欠損マウスを用いた実験などから、その可能性は少ないとされ、現在もSCNのIEGとリズム光同調との因果関係は確かめられていない。IEGは、その機能が解らないままに、そのmRNAや蛋白免疫反応を細胞活性マーカーとして、体内時計研究に利用され続けている。本総説では、体内時計研究におけるIEGのこの10年間の成果と現状、および今後についてまとめた。

## 1. はじめに

*c-fos*、*JunB*、*c-Jun*、....体内時計研究の分野でも一世を風靡したいわゆるimmediate early gene (IEG)は、いったいどうなってしまったのだろうか。こんな疑問をもっている時間生物学研究者は多いであろう。1989~90年に5つの研究室からはほぼ同時に、ハムスターやラットの視交叉上核(SCN)で光により*c-fos*遺伝子発現が誘導されることが報告されて10年。当時としては、多くのリズム研究者が、現在の*Per*や*Clock*などの時計遺伝子発見のような衝撃を持って受けとめ、それらを研究対象として盛んにとりあげた。私が1989年にカナダ・ダルハウジ大学B.Rusak教授の研究室に留学したとき、ちょうど彼らがハムスターSCNの光による*c-fos*誘導についての最初の論文を*Science*に投稿したところであった<sup>25)</sup>。そこで彼らの*c-fos*プロ

ジェクトに加わり、いくつかの実験を行うことになったのであるが、最近はその実験もやめてしまい、やはり*c-fos*はどうなったのかと疑問に感じていた。しかし、ここ数年の哺乳類時計遺伝子研究の加熱ぶりと次々と報告される新しいデータを見て、これまでの*c-fos*についてをもう一度まとめ直しておく必要性も感じていた。ちょうど昨年、この分野での*c-fos*研究先駆者の一人であるW. J. SchwartzとN. Aroninが、Society for Research on Biological Rhythmsの機関誌「*Biological Rhythms Bulletin*」に、*c-fos*の10周年を記念して、その後の経緯などを非常によくまとめた記事を掲載した。ここではそれを参考にしつつ、IEGのこれまでの成果と現状さらに今後の課題について、できるだけ簡単にまとめてみたい。なお、IEGのリズム研

究におけるこれまでの研究成果についての詳細は、いくつかの総説があるのでそれを参照されたい<sup>15, 19, 28)</sup>。

## 2. IEGと光同調

*c-fos*は従来、原癌遺伝子 (proto-oncogene) の一つとして、細胞の癌化に関与する遺伝子とされていた。それが1984年以来、様々な刺激により神経細胞核内で発現誘導されることから、細胞内情報伝達系に関わる重要な転写因子をコードする遺伝子であることが明らかにされた。*c-fos*がコードするc-Fos蛋白は、やはり同じような刺激により発現する*junB*や*c-jun*などがコードするJunファミリー蛋白と二量体を形成し、AP-1 (activating protein-1) と呼ばれる転写調節複合体となる。AP-1は、DNAの特定のAP-1結合領域 (現在、様々な遺伝子のプロモーター領域に存在することが明らかにされている) に結合し、ターゲット遺伝子の転写を調節する。これらの遺伝子群は、刺激提示後比較的早く発現することからimmediate early gene、日本語に直訳すれば「最初期遺伝子」、と呼ばれるようになった。

10年前、リズム研究においてIEGを一躍主役に仕立て上げたのは、ハムスターやラットに光を照射するとSCNに*c-fos*や*junB*のmRNAおよびその蛋白 (c-Fos, JunB) が誘導されることであった<sup>8, 10, 17, 23, 25)</sup>。IEG発現は、光パルス照射開始後30分でmRNAが、1-2時間で蛋白免疫反応がピークになり、光照射開始後2時間でmRNAが、6時間で蛋白が消失する。また発現は、5分以上の長さの光パルスで誘導される。IEGはその後、ラット・ハムスター以外の齧歯類 (マウス、シマリス、ジリス、デグーなど) やその他の哺乳類

(ヒツジ、ミンクなど) および鳥類 (ウズラ、ニワトリなど) でも研究されるようになった。その中でラット・ハムスターのSCNにおける光によるIEG発現誘導は、光による行動リズムの位相変位反応と共通点があったことから、リズム研究において注目されるようになった。

まず、(1)位相依存性：恒暗条件 (DD) で与える光の位相によってSCNでの発現が異なる。*c-fos*と*junB*は主観的暗期の光により強く発現し、主観的明期の光にはほとんど反応しない。これは夜行性種の行動リズム位相反応が主観的暗期にのみ起こることと一致する。この位相依存性は、c-FosとJunBからなるAP-1複合体のSCNにおけるDNA結合活性にも見られる<sup>18)</sup>。また*c-fos*発現の位相依存性はSCNに特異的で、やはり光により誘導される膝状体間葉 (IGL) での発現には位相依存性はない<sup>22)</sup>。次に、(2)照度依存性：SCNでの発現は、与える光の強度によって異なる。IEGを発現させる光の強度の閾値が、行動リズム位相反応に必要な光の強度の閾値とほぼ一致する。この閾値は、動物の週齢や光照射までの恒暗条件の期間によって変化するが、その変化もIEG発現とリズム位相反応とで類似する<sup>31, 36)</sup>。これらの他にも、(3)ハムスターとラットでは、SCNのIEG発現細胞はSCN腹外側領域に限られ、網膜視床下部路 (RHT) の投射部位と一致する。また、(4)RHTの神経伝達物質と考えられる物質の受容体 (例えばNMDA型興奮性アミノ酸受容体) 拮抗剤によって、ハムスターSCNのFos蛋白の光誘導が阻害される<sup>1-3, 5)</sup>。これらの拮抗剤は行動リズムの光位相反応も阻害する。

光位相反応性との相関から、SCNのIEGはサーカディアン振動体の光同調系に関与する重要な遺伝子と考えられた。そし

てこの相関性から、両者の因果関係を確かめることが次の課題となった。しかし残念ながら、光同調遺伝子としての決定打は、現在も報告されていない。因果関係の証明を試みた研究では、IEG欠損マウスを用いた実験と、IEGのmRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた実験がある。しかし、ホモ接合型の*c-fos*欠損マウスでは、正常な*c-Fos*蛋白を持たないにも関わらず、明暗サイクルに同調し、正常な光位相反応を示す<sup>16)</sup>。この研究では、*c-Fos*以外のFosファミリー蛋白、例えばFosBやFra (Fos related antigen)-2が<sup>8)</sup>、*c-Fos*の代わりに補償的に作用した可能性も考えられるが、その事実は確かめられていない。*c-fos*以外のIEG欠損マウスを用いた研究も報告されていない。アンチセンスを用いた実験では、*c-fos*と*junB*のアンチセンスオリゴヌクレオチドをラットの脳脊髄液中に注入し、光による行動リズムの位相反応への影響を見たところ、それぞれのアンチセンスを単独で与えただけでは、光位相反応は阻害されなかった<sup>26, 35)</sup>。しかし、*c-fos*と*junB*のアンチセンス両者を同時に与えると、位相反応は阻害された。しかしながらこの結果が、*c-Fos*と*JunB*のヘテロダイマーが光位相反応に関与することの強力な証拠とはならない。なぜならば、アンチセンス実験では常に起こる問題ではあるが、この実験では1種類の配列のアンチセンスオリゴでしか試しておらず、そのオリゴが配列非特異的に結合したことによって光位相反応に影響した可能性がある。この可能性は、この実験でSCNの*c-Fos*蛋白免疫反応は完全には阻害されなかったことから考えられる。この可能性を否定するためには、様々なコントロールオリゴを用いた実験が必要となるが、それについては検討さ

れていない。

また、SCNの*c-Fos*と光位相反応の関連については、昼行性シマリスと夜行性ラットやハムスターとでは結果が異なる。シマリスのSCNでの光による*c-Fos*蛋白誘導は、ハムスターと同じ主観的暗期に高い位相依存性を示すが、行動リズムは位相変位しない<sup>4)</sup>。昼行性齧歯類では、夜行性齧歯類とは異なるリズム光同調機構を持つことも考えられるが、夜行性種のような*c-Fos*と光位相反応との相関はない。

このような経緯で、現在でもIEGがサーカディアンリズムの光同調に関与する遺伝子であることの証拠はない。両者の因果関係を確かめる研究が、世界のどこかで今も行われているのかについても情報が無い。結局、依然SCN細胞活性のマーカーとして利用され続けているに過ぎない。マーカーとしての最近の研究では、例えば、ラットSCN振動体の光周期性(季節)による変動を、長日および短日周期下でのSCNの*c-Fos*光誘導リズムの変化を見ることによって確かめた研究や<sup>27, 32)</sup>、光を無条件刺激とし、ラットの顔に吹き付ける風を条件刺激としたパブロフ型条件づけのテクニックを用いて、光の位相変位効果とSCNの*c-Fos*蛋白誘導を光以外の刺激に条件づけることができること(時計の学習?)を示した研究がある<sup>6, 7)</sup>。睡眠研究では、ラットの腹外側視索前部(VLPO)で睡眠時に*c-Fos*免疫反応が増加すること<sup>30)</sup>、さらにラットVLPOの*c-Fos*は明期に高く暗期に低い日周リズムを示すことから<sup>21)</sup>、この部位が睡眠-覚醒サイクルに重要であることが示された。他にも最近の時計機能を調べた実験の中で、細胞マーカーとして*c-fos*遺伝子発現または*c-Fos*蛋白免疫反応を利用して新たな知見を得ている研究は数多い。

### 3. IEGと非光同調

行動リズムは、光以外の刺激によって位相依存的に位相変位する（ケージ交換や回転輪導入による活動誘導性位相反応）が、SCNのIEGはこれらの刺激により発現誘導されない<sup>20)</sup>。このことは、c-Fosの機能が、振動体位相反応（光刺激、非光刺激共通のもの）にあるのではなく、振動体への光入力系に特異的であることの根拠の一つとされていた。非光同調との関連では、IGLのc-Fosが非光同調に関与することが考えられたが、IGLでも光以外の刺激ではc-Fosは誘導されなかった<sup>20)</sup>。また、c-fosをマーカーとして、制限給餌同調振動体やメトアンフェタミン依存性振動体など、SCN非依存性リズムの中樞（SCN外振動体）の局在を確かめることが考えられたが、その結論についての報告はない。

### 4. SCNで自己発現するIEG

ラットとハムスターのSCNにおけるIEGは、光による誘導とは別にDDで自発的に発現し、主観的明期に高く主観的暗期に低いサーカディアン変動を示す<sup>13)</sup>。この自己発現は、光誘導の場合とは異なり主にSCNの背内側部の細胞に見られる<sup>14, 33)</sup>。この分布の違いから、自己発現するIEGは、光誘導されるIEGと機能的に異なり、むしろ振動系あるいは振動系から時計制御遺伝子への出力系に関与することが考えられた。しかし、少なくともc-fos欠損マウスでは、DDでも正常なフリーランリズムが維持される。

自己発現するc-fosをマーカーとしてSCNの振動をモニターするため、c-fosプロモーターにルシフェラーゼレポーターを組み込んだトランスジェニックマウス

が開発された。それにより*in vitro* SCNスライス培養系での発現リズムが確認された<sup>14)</sup>。しかしc-fos自己発現リズムの振幅は、他のSCN産生ペプチド（たとえばAVP）のリズム振幅に比べて小さく、振動のマーカーとしては必ずしも適当とは言えない。

### 5. IEGのSCNターゲット遺伝子

c-FosやJunBが形成するAP-1が、細胞内情報伝達において重要な転写調節因子であるにも関わらず、SCNでのAP-1のターゲット遺伝子は、未だ明らかにされていない。ラットSCN細胞でc-Fosと共存する神経ペプチドは、DDで自己発現する場合と光により発現誘導される場合とは異なる。自己発現するc-Fosの場合は、SCN背内側部のAVP、一方、光により誘導されるc-Fosは、腹外側部のVIPおよびGRPと共存する<sup>9, 24)</sup>。このことから、SCNでのc-Fosのターゲットは機能により異なり、振動系についてはAVP、光入力系についてはVIP/GRPであると予測される。しかし、これらのいずれもAP-1により転写調節されることを示す直接的なデータはない。

また、DNAのAP-1結合領域に結合するAP-1複合体は、SCN腹外側部で光により誘導される場合とそうでない場合とは構成するIEG蛋白が異なる。DDで自発的に発現する場合は、FosBとJunDのヘテロダイマーによるAP-1が結合するのに対して、光刺激を与えた場合では、c-FosとJunBのヘテロダイマーおよびFra-2またはFosBとJunBのヘテロダイマーが誘導され結合する<sup>34)</sup>。なお、自己発現する場合のAP-1がFosBではなくFra-2とJunDのヘテロダイマーであるとする報告もある<sup>11)</sup>。いずれにせよ光刺激により、SCN腹外側部の

細胞でDNA結合するAP-1の構成は変化する。このことから、SCNでAP-1により転写調節されるターゲット遺伝子は、光刺激によりAP-1の構成が変化することにより異なる調節を受けることが考えられる。あるいは、AP-1の構成の違いにより、異なる遺伝子を転写調節している可能性も考えられる。しかし、AP-1の下流、あるいはSCNの他の遺伝子の上流におけるAP-1による調節については報告がない。

現在、哺乳類における時計遺伝子研究が盛んであるが、その主役である*mPer1*、*mPer2*は、*c-fos*と似たような光反応性を示す。この類似性から、光による*mPer*発現促進は、その上流でAP-1による転写調節を受けている可能性が考えられる。*mPer*のプロモーターにおけるAP-1結合領域の存在はまだ報告されていないが、*mPer*をはじめとするいわゆるサーカディアンフィードバックループに関わる時計遺伝子とIEGとの関わりについては、今後の研究展開が待たれるところである。

## 6. IEGのこれから

以上がリズム研究におけるIEGのこれまでの経緯である。この他にも取り残した情報があるかも知れないが、いずれにせよ当初考えられていた機能に対してネガティブな結論のまま現在に至っている。前述したように各種の刺激に対する細胞活性マーカーとして利用され続けているのが現状で、いわばIEGは、*mPer*などの時計遺伝子に主役の座を奪われ、脇役に回されたと言って良い。しかし、このまま脇役で終わるのであるだろうか？

それにしてはまだ確認されていない情報が多い。それらが確認されない限り、IEGが体内時計に関わる遺伝子である可能

性はまだ残されている。例えば、光同調における役割については、前述したアンチセンス実験や*c-fos*欠損マウス実験の結果では、それを完全に否定するには充分ではなく、確認すべき点はまだ残されている。また、*mPer1*のSCN光発現誘導は、cAMP系を介した細胞内情報伝達系(CREBのリン酸化)によることから、*c-fos*の光誘導の場合と類似する。前述したように*mPer1*のプロモータ領域にAP-1結合領域があるかはまだ確認段階であるが、IEGが*mPer1*の上流でサーカディアン振動体への光入力を調節している可能性はある。

振動系・出力系における役割についても同様である。前述のようにSCNの腹外側部と背内側部で発現様式・発現細胞が異なることから、IEGがSCNの振動系・振動出力系と入力系で異なる機能を持つことが考えられる。IEGによるAVPとVIPの上流での調節の有無やその機能的違いなど、興味深い問題は残されている。

現在の哺乳類体内時計研究では、時計遺伝子による振動生成の分子メカニズムが猛スピードで明らかにされようとしている。やがてそれも解明されて、入力-振動-出力を合わせた体内時計機構の全貌も次々と明らかにされていくであろう。その過程で、*c-fos*が再び、時計に重要なキー遺伝子として脚光を浴びることもあるかも知れない。このまま細胞マーカーとして、“a living fossil” となってしまうくないことを期待したい。

## 参考文献

- 1) Abe H, Rusak B, Robertson HA : *Neurosci.Lett.* 127: 9-12 (1991)
- 2) Abe H, Rusak B, Robertson HA : *Brain Res. Bull.* 28: 831-835 (1992)
- 3) Abe H, Rusak B: *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 531-536 (1994)
- 4) Abe H, Honma S, Shinohara K, Honma K : *J Comp. Physiol. A* 176: 159-167 (1995)
- 5) Abe H, Honma S, Shinohara K, Honma K : *Brain Res.* 708: 135-142 (1996)
- 6) Amir S, Stewart J : *Nature* 379 :542-545 (1996)
- 7) Amir S, Stewart J : *Neuroscience* 83 : 657-661(1998)
- 8) Aronin N, Sagar SM, Sharp FR, Schwartz WJ : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5959-5962 (1990)
- 9) Castel M, Belenky M, Cohen s, Wagner S, Schwartz WJ : *Eur. J Neurosci.* 9: 1950-1960 (1997)
- 10) Earnest DJ, Iadarola M, Yeh HH, Olshowka JA : *Exp. Neurol.* 109: 353-361 (1990)
- 11) Francis-Bellan AM, Deprez P, Bacquet D : *J Neurochem.* 72: 841-847 (1999)
- 12) Geusz ME, Fletcher C, Block GD, Straume M, Copeland NG, Jenkins NA, Kay SA, Day RN : *Curr. Biol.* 7: 758-766 (1997)
- 13) Guido ME, Rusak B, Robertson HA : *Brain Res.* 732: 215-222 (1996)
- 14) Guido ME, Goguen D, Guido LD, Robertson HA, Rusak B : *Neuroscience* 90: 555-571 (1999)
- 15) Hastings MH, Ebling FJP, Grosse J, Herbert J, Maywood ES, Mikkelsen JD, Sumová A : *Circadian Clocks and Their Adjustment, Ciba Foundation Symposium* 183, pp 175-197, John Wiley & Sons, Chichester (1995)
- 16) Honrado GI, Johnson RS, Golombek DA, Spiegelman BM, Papaioannou V, Ralph MR : *J Comp. Physiol. A* 178: 563-570 (1996)
- 17) Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS : *Neuron* 5: 127-134 (1990)
- 18) Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS : *Science* 255:1581-1584 (1992)
- 19) Kornhauser JM, Mayo KE, Takahashi JS: *Behav. Genet.* 26: 221-240 (1996)
- 20) Mikkelsen JD, Vrang N, Mrosovsky N: *Brain Res. Bull.* 47: 367-376 (1998)
- 21) Novak CM, Nunez AA : *Am. J Physiol.* 275: R1620-R1626 (1998)
- 22) Peters RV, Aronin N, Schwartz WJ : *Brain Res.* 728: 231-241 (1996)
- 23) Rea MA : *Brain Res. Bull.* 23: 577-581 (1989)
- 24) Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J, Buijs RM : *J Comp. Neurol.*372: 1-8 (1996)
- 25) Rusak B, Robertson HA, Wisden W, Hunt SP : *Science* 248: 1237-1240 (1990)
- 26) Schlingensiepen KH, Wollnik F, Kunst M, Schlingensiepen R, Herdegen T, Brysch W : *Cell. Mol. Neurobiol.* 14: 487-505 (1994)
- 27) Schwartz WJ, Takeuchi J, Shannon W, Davis EM, Aronin N : *Neuroscience* 58: 573-583 (1994)
- 28) Schwartz WJ, Aronin N, Takeuchi, J, Bennett MR, Peters RV : *Seminars Neurosci.* 7: 53-60 (1995)
- 29) Schwartz WJ, Aronin N : *Biol. Rhythms Bull.* 1(2): 2-5 (1999)

- 30) Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB : *Science* 271: 216-219 (1996)
- 31) Shimomura K, Kornhauser JM, Wisor JP, Umezumi T, Yamazaki S, Ihara NL, Takahashi JS, Menaker M : *J. Biol. Rhythms* 13: 305-314 (1998)
- 32) Sumová A, Trávníčková Z, Peters R, Schwartz WJ, Illnerová H : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7754-7758 (1995)
- 33) Sumová A, Trávníčková Z, Mikkelsen JD, Illnerová H : *Brain Res.* 801: 254-258 (1998)
- 34) Takeuchi J, Shannon W, Aronin N, Schwartz WJ : *Neuron* 11: 825-836 (1993)
- 35) Wollnik F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon R, Bravo M, Zimmermann M, Schlingensiefen KH, Herdegen T : *Eur. J. Neurosci.* 7: 388-393 (1995)
- 36) Zhang Y, Kornhauser JM, Zee PC, Mayo KE, Takahashi JS, Turek FW : *Neuroscience* 70: 951-961 (1996)