

## PASドメインとPAS因子 -PAS因子は環境適応素子として生まれた-

池田 正明

埼玉医科大学 第一生理学教室

PASドメインは、最近相次いで発見された時計遺伝子CLOCKやBMAL1などに含まれていたことから急速に注目を集めることになったドメイン構造である。哺乳類やショウジョウバエではPASドメインを持つ因子はその殆どが転写因子として機能しており、ダイオキシンレセプターであるAhR、時計遺伝子CLOCK-BMAL1、低酸素状態に対する適応因子HIF-1 $\alpha$ はすべて転写因子として標的遺伝子の転写を調節する作用を通して特異的な機能を発現している。近年の3次元構造解析の進歩によってHERGなどのイオンチャンネルにもPASドメイン構造を持つものが発見され、また植物や細菌に至るまで光や酸素受容能とヒスチジンキナーゼなどの酵素活性を合わせ持つようなセンサーモジュールとしての機能を持つPAS因子が多数見出され、PASドメインは環境適応素子のコアドメインとして生物界に広く分布することが明らかになってきた。本稿ではPAS因子の構造を概観するとともにその機能について最近の知見をまとめた。

### 1. PASドメインの発見

CLOCKやBMAL1など時計遺伝子産物の多くがPASドメインをもつことが明らかになったのはここ2-3年の研究からであるが、最初の糸口は1980年代半ばに同定された*period (per)*遺伝子にさかのぼる。KonopkaとBenzerは1970年代はじめにキイロショウジョウバエにエチルメタンサルホン酸処理をしたものの中に、周期が24時間より短くなるもの (*per<sup>s</sup>*)、長くなるもの (*per<sup>L</sup>*)、無周期になるもの (*per<sup>m</sup>*)の3種の変異体があることを見つけていた<sup>36)</sup>。1980年代に入りその遺伝子が単離され、周期変異を起こす遺伝子であることから*period (per)*と命名された<sup>57)</sup>。当初*per*遺伝子産物の機能はプロテオグリカン類似の

配列があることから細胞間のシグナル伝達に関与する分子であろうと予想されていた。

時計遺伝子研究とは独立に、Crewsらは、ショウジョウバエから神経系の発達に関与すると思われる新しい転写因子をコードする遺伝子*single minded (sim)*をクローニングしていたが<sup>10)</sup>、その産物SIMがダイオキシンレセプターを核内に運ぶ転写因子として得られていたARNTと相同性のある領域があり、しかもその領域は*per*産物 (PER)とも相同性のあることを見出し、3つの因子の頭文字をとってPASドメイン (PAS domain)と命名した (図1)<sup>49)</sup>。

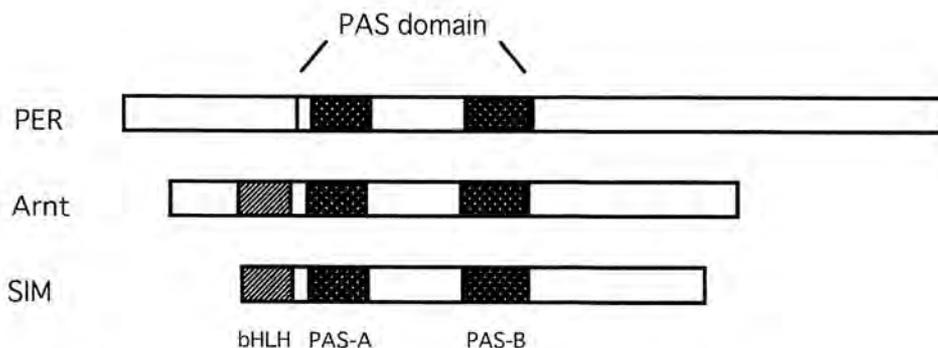


図1 PAS ドメイン

ショウジョウバエのPER, SIMおよびマウスARNTの構造を模式的に示した。3種のPAS因子は約250アミノ酸からなるPASドメインを持つ。PASドメインには約50アミノ酸からなる2個のリピード領域PAS-AとPAS-Bがある。ARNTとSIMにはDNA結合と二量体形成に関与するbHLHドメインがある。

PASドメインの機能はこの発見当時は不明であったが、bHLH-leucine zipper型転写因子からの類推から、二量体形成に関与するドメインではないかと予想された。Huangら<sup>39)</sup>はPERのPASドメインが二量体形成に必要なかを検討した。*in vitro*の転写・翻訳系を用いてPERのホモ二量体とSIMとのヘテロ二量体形成を調べたところ、明らかな相互作用が観察され、PASドメインの機能の一つが二量体形成のインターフェースであることが証明された。またこのことから、ARNTやSIMと同様にPERも転写因子として働いているのではないかと急速に注目を集めることになった。その後、ホモロジー検索や立体構造予測、結晶化による構造解析などによって、哺乳類やショウジョウバエ以外にもPASドメインを持つ分子の存在が知られるようになった。それらの分子は、植物、アカパンカビ、シアノバクテリア、細菌など広く生物界に分布している。

## 2. PAS 因子の種類と機能

哺乳類においてPASドメインを持つ分子

を機能から分類すると、時計遺伝子やダイオキシンレセプターのように転写因子として働くもの、リン酸化酵素活性を持つもの、イオンチャンネルとして機能するものの3種が今までに同定されている。

転写因子としては、哺乳類では現在のところ20のPAS因子が知られており、PER1, PER2, PER3以外はすべてPASドメインのアミノ末端側にbHLH(basic helix-loop helix)ドメインを持っているbHLH-PAS型転写因子である。(表1) PAS型転写因子は生体内の様々な機能と関わっていることが知られているが、たとえばCLOCK, BMAL1それに3種のPERは生体リズムの形成などに関わっており、時計遺伝子と呼ばれている<sup>14)</sup>。またAhRはTCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)などのダイオキシン類と結合し、ARNTとヘテロ二量体を形成後、肝臓の代謝酵素チトクロームP450C (CYC1A1)などの転写調節領域にあるxenobiotic-responsive element(XRE)に結合して代謝酵素を誘導し、解毒や薬物代謝に関与している<sup>62)</sup>(図2)。HIF-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ )はARNTと結合してhypoxia response element (HRE)に結

表1

哺乳類bHLH-PASスーパーファミリー

表に示したPER1,PER2, PER3にはbHLHドメインはない。HAT:histone acetyltransferase

遺伝子産物名	他の呼称	ヒト染色体	機能など
CLOCK		4q12	BMAL1とダイマーを形成。per1 プロモーター領域のE-boxに結合
BMAL1	MOP3, Arnt3, JAP3, TIC	11p15.1	CLOCKとダイマーを形成。per1 プロモーター領域のE-boxに結合
PER1	RIGUI	17p12-13.1	CLOCK-BMAL1のper1転写活性化を抑制
PER2	KIAA03476		CLOCK-BMAL1のper1転写活性化を抑制
PER3		1p36.21-33	CLOCK-BMAL1のper1転写活性化を抑制
AhR		7p15	ダイオキシンレセプター、ARNTとヘテロダイマーを形成。xenobiotic-responsive element (XRE) に結合
AhRR			ARNTとヘテロダイマーを形成。XREに結合、AhRの作用を抑制
ARNT		1q21	AhRとヘテロダイマーを形成。XREに結合し、手トクロームP-4501A1などの発現を誘導
ARNT2			SIM1とヘテロダイマーを形成
HIF-1 $\alpha$	MOP1	4q21-q24	低酸素により誘導、ARNTとヘテロダイマーを形成
HIF-2 $\alpha$	EPAS1, MOP2, HLF, HRF	2p21-p16	低酸素により誘導
HIF-3 $\alpha$		19q13.2	
NPAS1	MOP5	19q13.2-q13.3	胎生期と成体の神経系で発現
NPAS2	MOP4	2q13	BMAL1とヘテロダイマーを形成。in vitroでバゾプレッシン遺伝子の転写促進
NPAS3			胎生期の神経系、心臓、腎臓などで発現
SIM1		6q16.3-q21	ARNT2とヘテロダイマーを形成。発達期のparaventricular nucleus (PVN), anterior periventricular nucleus (aPV), supraoptic nucleus (SON)に発現
SIM2		21q22.2-q22.3	ダウン症関連領域
SRC-1		2q23	p300/CBP, PCAFと結合、核内ホルモンレセプターに結合、HAT
TIF2	GRIP1, NCoA-28		核内ホルモンレセプターに結合、HAT
RAC3	AIB1, ACTR, TRAM-1, p/CIP	20q12	乳癌、卵巣癌で増幅。p300/CBP, PCAFと結合、核内ホルモンレセプターに結合、HAT

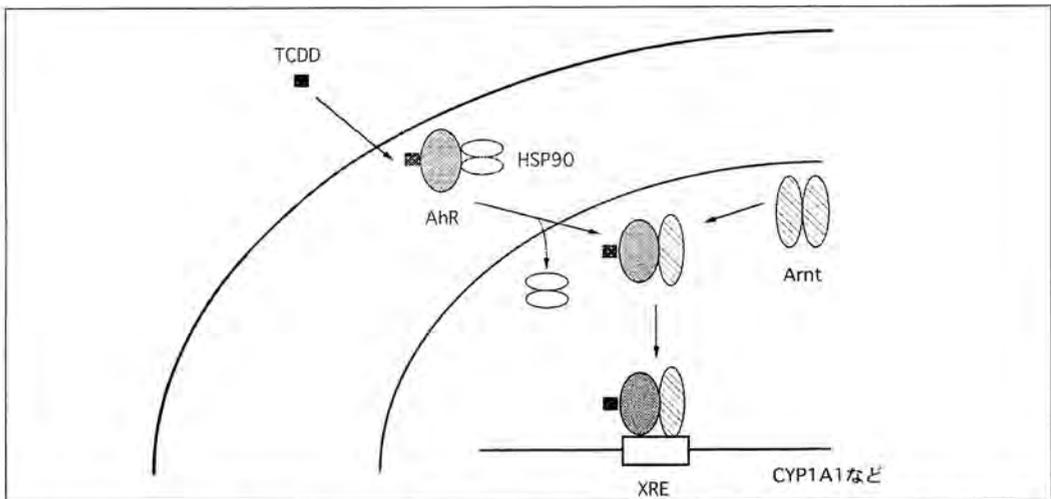


図2 ダイオキシンの作用とAhR-ARNT二量体 TCDDやPCB(ポリ塩化ビフェニール)、メチルコランスレン (3MC)は、細胞内に取り込まれるとAhR(aryl hydrocarbon receptor; Ah レセプター)と結合する。細胞質ではAhRは1分子当たり2個のHSP90(heat shock protein 90)と結合しているが、ダイオキシン類が結合すると核内へ移行し、HSP90がはなれると同時にARNTがPASドメインを介して結合し、AhR-ARNTヘテロ二量体を形成する。この二量体は薬物代謝酵素のCYP1A1やグルタチオンS-トランスフェラーゼのエンハンサー領域にあるXREに結合して転写を活性化する。

合してエリスロポエチンやVEGF (vascular endothelial growth factor)などの発現を誘導する。この反応は低酸素によって惹起される。ステロイドホルモンレセプターのコアクティベーターとして同定されたSRC-1などもbHLH-PAS型転写因子であることが知られている<sup>39)</sup>。これらのPAS型転写因子の機能はどの因子がそれに関与しているかではなく、その因子がどのようなPAS因子と二量体を形成するかによって主に決められており、組み合わせが重要になっている。それは二種類のbHLH-PAS型転写因子が二量体を形成する時、その塩基性ドメインの組み合わせが、結合するDNA配列を決定していることに由来している。すなわち同じPAS型転写因子が関係していても、二量体を形成する相手が異なれば全く異なる機能発現に関与するということもあり得るのである。PAS型転写因子にはARNTのように、種々のPAS因子と二量体を形成するものとCLOCKのようにBMAL1という限られた相手とのみ二量体を形成し、時計機能など特定の機能を発現する因子がある。また同じ組み合わせでも、発現する細胞や組織が異なると機能が異なってくる可能性も考えられるが、この点に関してはまだ十分に調べられていない。

最近、哺乳類で転写因子以外にもPASドメインを持つ分子が発見された。それはHERGとよばれるKチャンネル<sup>47)</sup>とPDE8A (cAMP specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A)というセリン-スレオニンキナーゼである<sup>20)</sup>。HERGは細胞膜貫通ドメインを6個持つ膜蛋白で、N末端とC末端の両方が細胞質にあり、4個の分子が集合してイオノフォアを形成している。このイオンチャンネルのN末端側にPASドメインのあることが結晶構造の解析から明らかにされた。

このPASドメインの機能はまだ詳しく分かっていないが、HERGチャンネルのS4-S5リンカーとの相互作用に関与してチャンネル活性化の調節を行っている可能性があり、大変興味深い。またこのKチャンネルはQT延長症候群の原因遺伝子の一つと考えられ、同疾患罹患群からPASドメイン領域に変異が見つかった(図3)<sup>8)</sup>。

哺乳類では前述のようにPASドメインを持つ因子として、転写因子、イオンチャンネル、キナーゼが知られているが、ショウジョウバエにおいても哺乳類のPAS型転写因子やイオンチャンネルと相同性の高い因子が見つかった(表1)。その殆どはアミノ酸配列の相同性ばかりでなく、機能にも類似性がみられ、生物の進化を考える上でも興味深い。ショウジョウバエの全ゲノム配列が公開されたことにより、哺乳類の因子との対応が明らかになるものと思われる。

PASドメインを持つ分子は哺乳類やショウジョウバエから見出された分子の大半が転写因子であったことからPAS因子=転写因子と思われがちであるが、枯草菌から発見された胞子形成に関わると考えられるKinAは転写因子としての特徴を持たず、そのC末端にはヒスチジンキナーゼ(histidine kinase)活性を持つドメインのあることが同定された<sup>53)</sup>。その後、他にも細菌にヒスチジンキナーゼドメインを持つ分子が多数あることが確認された。またシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の赤色光受容分子フィトクロームにもヒスチジンキナーゼ様ドメインがあり、光センサーとして働いていること<sup>52)</sup>、細菌のヘム結合性酸素感受性蛋白FixLは、ヒスチジンキナーゼ活性を持つ酸素センサーであること<sup>24)</sup>などが次々に明らかにされ、PASドメインを持つ分子は真核生物から原核生物まで広く分布

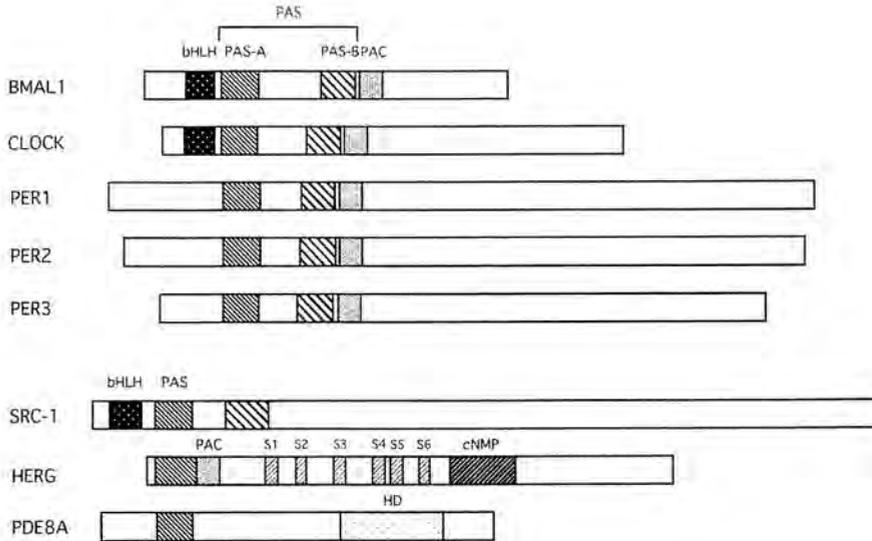


図3 PAS因子の構造

時計遺伝子には5個のPAS因子がある。BMAL1とCLOCKはともにbHLH-PAS型転写因子であり、bHLHドメインとそのC末端側にPASドメインがあり、PASドメインにはPAS-AとPAS-Bと呼ばれるリピート配列がある。またPASドメインのC末端にはPACモチーフと呼ばれる40~45アミノ酸からなる領域があり、PASドメインの折りたたみ構造と関連した配列であると考えられている。PER1、PER2、PER3はbHLHドメインはなく、PASドメインとPACモチーフがある。SRC-1にもbHLHドメインとPASドメインがある。HERG (human Ether-a-go-go)は膜貫通領域を6個もった膜蛋白構造をしており、N、C両末端が細胞質にある。膜貫通領域よりC末端側にはcNMP (cyclic nucleotide-monophosphatebinding domain)がある。PDE8A(cAMP-specific phosphodiesterase 8A)にはPASリピートが1箇所あり、HD (metal dependent phosphohydrolase with conserved 'HD' motif)がそのC末端側にある。ヒトの配列をもとに模式的に示した。

していることが知られるようになった。このようにPAS因子の中に、シグナルを受け取ってリン酸化を調節するなどセンサーモジュールとして機能している分子の存在が、クローズアップされることになった。これらのPAS因子はPASプラス因子 (PAS-Plus Protein)と呼ばれている<sup>12)</sup>。このように原核生物に見い出されたPAS因子はセンサーモジュールとして働くPASプラス因子のみであったが、フィトクロームと相互作用する因子としてツーハイブリッド法 (Two-hybrid method)によって最近クローニ

ングされたPIF3はPASドメインを持つばかりでなくそのC末端側にbHLHドメインがある転写因子様の構造をしていることがわかった<sup>50)</sup>。このようにPASドメインは転写因子とセンサーモジュールとして広く生物界に分布していることがあらためて確認されたことになる。

### 3. PASドメインの構造と機能

bHLH-PAS型因子のPASドメインは250-300アミノ酸からなり、その中に約50アミ

ノ酸のより相同性の高いリピート配列があり、それぞれPAS-A、PAS-Bと呼ばれている。一方PASプラス因子は一つのPAS-AあるいはPAS-Bに相当するドメインを持っており、細菌のPASプラス因子であるPYP (Photoactive yellow protein)のPASドメインは立体構造のモデリング研究からARNTのPAS-Bドメインに非常によく似ていることが証明されている<sup>23)</sup>。PASドメインは5ないし6個の $\beta$ シートが $\alpha$ ヘリックスループに挟まれた構造をしており、リガンドやクロモフォアを取り込むグロブのような格好をしている<sup>12)</sup>。PAS型転写因子のPASドメインはPAS型転写因子とホモあるいはヘテロ二量体を形成するためのインターフェースとなっているが、ショウジョウバエのPERとTIMの相互作用やARNTあるいはAhRのGC box結合因子であるSp1との相互作用<sup>67)</sup>のようにPAS因子以外の分子間の相互作用にも関与している。もう一つのPASドメインの機能は哺乳類のARNTや細菌のPYP、FixLのようなセンサーとしての機能である。しかしフィトクロームのクロモフォアの結合部位やHIF-1 $\alpha$ の酸素センサー部位はPASドメイン外にあることが知られており<sup>55)</sup>、必ずしもセンサーの機能がPASドメインに位置しているとは限らない。

#### 4. ダイオキシシンと AhR-ARNTによる薬物代謝酵素誘導機構

TCDDなどのダイオキシシン類は体内に吸収されると肝臓などでCYC1A1(チトクロームP-4501A1)などの薬物代謝酵素を誘導するが、この機構にはbHLH-PAS型転写因子であるAhRとARNTが関与している<sup>68)</sup>。図2に示すように、細胞内に取り込まれたTCDDなどは、細胞質でAhRのPASドメイン内に存在するリガンド結合部位に結合

する。この時、同部位に2分子結合していたHSP90が離れ、AhRは核内へ移動し、核内でホモ二量体を形成していたARNTとヘテロ二量体を形成し、XREのTNGCGTGというDNA配列に結合する。このコア配列のGTGにはARNTの塩基性領域が結合し、TNGC側はAhRが認識していることが確かめられている。はじめARNTは細胞質でAhRと結合して核内にAhRを運ぶ因子として単離され命名されたが<sup>528)</sup>、実際には核内に主に存在していてAhRの核内運搬には働かないと考えられている。ARNTのC末端側にある転写活性化ドメインにはヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を持つCBP/p300が結合しており<sup>39)</sup>、AhR-ARNT二量体がXREに結合するとプロモーター領域のクロマチン構造が変化し、CYC1A1などの転写が活性化されるものと考えられる。また、このようなりガンドに依存して活性化される機構以外に、リン酸化などを介したリガンド非依存性のAhR-ARNT二量体によるCYC1A1遺伝子の転写活性化機構の存在も知られている<sup>40)</sup>。ARNTに非常に相同性の高いbHLH-PAS型因子ARNT2も同定されている<sup>27)</sup>。ARNT2もAhRとヘテロ二量体を形成し、XREに結合することが確かめられている。ARNTとの主な違いは発現部位であり<sup>39)</sup>、*arnt2*領域欠損マウスでは胸腺の形成がみられない<sup>70)</sup>。

哺乳類以外でもAhRやARNTに相同性の高い因子が同定されている。ショウジョウバエではAhRのホモログとしてSpineless (Ss)<sup>18)</sup>、そのパートナーとしてARNTに相同性のあるTango(Tgo)が知られている<sup>12)</sup>。この二つの因子は二量体を形成し、XRE配列に結合してその遺伝子を転写活性化する点は同じであるが、哺乳類のAhR-ARNTとは全く異なった機能を持ってい

る。*spineless*遺伝子は足や触角、感覚器の細胞などで発現しており、*spineless*の欠損したショウジョウバエは遠位の触角が足になり、足の末端が欠損し、体毛のサイズも短くなる。Tgo は常時細胞質に発現しており、Ssが発現すると二量体を形成して核に入り、XREに結合し転写を活性化するが、これはダイオキシンなどのリガンド非依存的な活性化機構による。

## 5. HIFによる体内酸素環境の調節

HIFにはHIF-1 $\alpha$ 、EPAS1(endothelial PAS domain protein 1; HIF-2 $\alpha$ ), HIF-3 $\alpha$ の3つのbHLH-PAS型転写因子が知られており、これらの因子はARNT, ARNT2, BMAL1とヘテロ二量体を形成してエリスロポエチンやVEGFなどの低酸素によって誘導される遺伝子のエンハンサー領域にあるHRE(hypoxia response element; ACGTG)に結合し、これらの因子の発現を誘導する<sup>12,59</sup>。この反応は通常の酸素分圧ではHIFは急速に分解される性質があるが、体内が低酸素状態にあるとHIFの分解が弱まり、安定性が上昇し、その結果HIFが増加することによって主に起こっている。低酸素によって起こる反応はこのようにエリスロポエチン、VEGFの誘導、これらの結果おこる造血反応や血管内皮細胞の誘導による低酸素組織における毛細血管の増殖、低酸素性の呼吸に備えた解糖系の酵素や糖トランスポーターの誘導、胎盤の細胞栄養層細胞の増殖などがあるが、これらの反応にHIFの関与が示されている。またHIF-1 $\alpha$ は癌抑制因子p53と結合してその安定性を調節することによって細胞周期に関わっていることも最近明らかにされた<sup>56</sup>。*hif-1 $\alpha$* 遺伝子のノックアウトマウスは胎生期にまでしか生きられず、

神経系や心血管系の重度の異常がみられ、HIF-1 $\alpha$ の標的遺伝子発現の低下をきたすと報告されている<sup>30</sup>。*arnt*欠損マウスにも卵黄嚢や胎盤の血管欠損がみられ、HIF-1 $\alpha$ -ARNT二量体機能が失われた結果と考えられる。最近HIF-1 $\alpha$ の機能を調整する因子としてp35srjが同定された<sup>60</sup>。HIF-1 $\alpha$ はコアクティベーターであるp300あるいはCBPと結合して転写活性化を起こすが、p300とCBPのHIF-1 $\alpha$ との相互作用部位であるシステインとヒスチジンに富んだ領域(CH1 region)にp35srjが結合し、HIF-1 $\alpha$ とこれらコアクティベーターとの結合を阻害するのである。低酸素状態ではp35srjは上昇するので、この因子はオフのスイッチとして働いている可能性がある。またCBPとHIF-1 $\alpha$ の結合を抑制することで、CBPが他の転写因子と結合できるよう調整しているのかもしれない。

## 6. bHLH-PAS型転写因子と発生

ショウジョウバエのSIMは神経系の発生段階において正中細胞に発現し、分化した段階でも正中の神経細胞とグリア細胞に発現する蛋白である。*sim*の欠損したショウジョウバエでは正中線の細胞分化が全く認められなくなり、典型的な細胞形態や分化した神経細胞、グリア細胞が形成されなくなる<sup>10,11</sup>。また*sim*をヒートショック誘導性のベクターを用いて異所性に発現させると、そこに正中線に発現している遺伝子が誘導されることが確かめられている<sup>49</sup>。SIMは主に核内に存在し、哺乳類のARNTと相同性の高いTgoとヘテロ二量体を形成してCME(CNS midline enhancer element; コア配列=ACGTG)に結合し、中枢神経系正中線において特異的な遺伝子の発現を誘導する。Tgoは全身

に発現していることから、この誘導はSIMの発現に依存していると考えられる。*sim*のプロモーターにはCMEがあり、*sim*の転写はSIM自身によって活性化される。

哺乳類のSIMはSIM1とSIM2の二種類が知られており、両者ともARNTとヘテロ二量体を形成し、ショウジョウバエSIM-Tgoヘテロ二量体と同様にCMEに結合する。ショウジョウバエの*sim*の発現は中枢神経系に限局されているが、哺乳類の*sim*は中枢神経系ばかりでなく中胚葉にも発現する<sup>9,19,45,71</sup>。マウス胎生期においては、原節、鰓弓や肢節 (*sim2*)に発現がみられ、中枢神経系での発現は両者とも腹側間脳に認められ、*sim1*は中脳、脊髄での発現もみられる。成体では*sim1*は肺と腎臓、*sim2*は骨格筋と腎臓に主に発現している。*sim1*は視床下部にあるPVN(paraventricular nucleus)、aPV(naterior periventricular nucleus)、SON(supraoptic nucleus)の前駆細胞に発現しており、*sim1*欠損マウスではこれらの核で十分な神経細胞の分化が行われず、CRH(corticotropin-releasing hormone)、TRH(thyrotropin-releasing hormone)、バゾプレッシン(vasopressin)、オキシトシン(oxytocin)、ソマトスタチン(somatostatin)などのペプチドホルモン産生がなくなってしまうことが確かめられている<sup>42</sup>。*arnt2*欠損マウスでもPVNとSONで同様の低形成が起こっているため、*arnt2*が同部位で発現していること、ARNT2はSIM1と相互作用が認められること、ARNTは同部位ではあまり発現が見られないことなどから<sup>33</sup>、SIM1はARNT2とともに、視床下部のこれらの核での神経系の分化とその特異的なペプチド発現を制御していることが示唆される<sup>43,70</sup>。*sim2*はヒトの染色体21q22領域にある。この領域はダウン症の責任領域に含まれ、しかも*sim2*が頭骨、顔面、口蓋、脊椎な

どの原基に発現し、ダウン症と関連する部位でもあることから、ダウン症の原因遺伝子の一つではないかと考えられている<sup>15,19,54</sup>。SIM1はARNTなどとヘテロ二量体を形成してCMEに結合して転写を活性化するが、反対にSIM2はARNTと結合して転写を抑制する方向に働くことが確かめられ、転写を活性化するという報告はない。またSIM2はこのような直接の抑制ばかりでなく、ARNT-HIF-1 $\alpha$ による転写活性化をARNTがHIF-1 $\alpha$ に結合することによって間接的に抑制作用を発揮するという。またSIM1のARNTとの相互作用に対してもSIM2は阻害的に働くことが報告されている<sup>46</sup>。ダウン症は21番染色体の一部の領域のトリソミーであるが、そのため、この領域にある遺伝子の発現増加が想定されている。*sim2*をトランスジェニックマウスによって過剰発現させると恐怖条件回避課題や水迷路による学習課題が中程度に阻害されたという<sup>16</sup>。

## 7. bHLH-PAS型転写因子と時計発振機構

今までに哺乳類から一番下等な生物としてアカパンカビ(*Neurospora Crassa*)まで、生体リズムの形成にPAS因子を用いていることが分かっている。それぞれの生物で構成因子の相違はあるものの、大きく分けてDNAに結合して転写を活性化させる促進系の因子と、促進系の因子に直接あるいは間接に作用して転写を抑制する抑制系の因子に大別できる。そして促進系の因子は抑制系の因子の転写を促進させ、産生された抑制因子によって促進因子自身は抑制され、その結果抑制因子の転写が抑制されるという負のフィードバックループを形成している<sup>14,26</sup>。

*Neurospora*には時計機構に関連するPAS因子としてWC-1(White Collar-1)とWC-2の2つの因子が同定されている<sup>41)</sup>。これらの因子はPASドメイン以外にZincフィンガードメイン(Zinc finger domain)があり、PASドメインを介して二量体を形成し、転写因子として働いている。*Neurospora*には早くから時計変異体の存在が知られており、その本体は*frq*であることが分かっていたが、このWC-1-WC-2ヘテロ二量体は*frq*遺伝子に作用して、そのリズム発現に関与しているのではないかと考えられている。またFRQはWC-2に直接作用してその作用を抑制することで、負のフィードバックループを形成している。

ショウジョウバエの生体リズムはPERの発見が早かったこともあり、解明が一番進んでいる。ショウジョウバエの負のフィードバックループはPER、dCLOCK<sup>2)</sup>、CYCLE(dBMAL1)<sup>13,58)</sup>の3つのPAS型転写因子によって構成され、そこにTIM(Timeless)、CRY(Cryptochrome)<sup>17)</sup>などが関係している<sup>26)</sup>。PERは1980年代半ばにクローニングされたが、dCLOCK(dCLK)とCYCLE(CYC; dBMAL1)の発見は10年以上たった1998年である。PERは前述したようにPASドメインのみのPAS因子であり、dCLOCKとCYCLEはbHLH-PAS型転写因子である。dCLOCKとCYCLEはHLH-PASドメインを介して二量体を核内で形成し、*per*と*tim*のプロモーター領域にあるE-box(CACGTG)に結合し、その転写を活性化する<sup>13)</sup>。この活性化で産生されたmRNAはやや遅れて蛋白に翻訳されPERはTIMと結合して核内に移動し、dCLOCK-CYCLE二量体に作用してその転写活性を阻害するため、*per*の転写が抑制されることになり、負のフィードバックループが完成するわけである。PERとTIMがdCLOCK-CYCLE二量体の*per*

転写の活性化を抑制するメカニズムは、PERやTIMが直接この二量体形成を阻害するのでなく、三量体あるいは四量体を形成してDNAへの結合を阻害しているためであると考えられている<sup>4)</sup>。*Cycle*は24時間を通じてその発現に変動はないが、*dClock*は*per*と反対の位相でサーカディアンリズムを示す<sup>4,58)</sup>。この現象の時計発振機構における役割とそのメカニズムはまだ分かっていないが、リズムを減衰することなく維持するために促進因子と抑制因子を全く反対の位相で積極的に活性化する機構が存在するのかも知れない。ショウジョウバエの光同調機構として、光によってTIMの分解が起こり、抑制系が解除されるものが知られている<sup>548,72)</sup>、CRYの機能解析によってその分子機構と関連すると思われる現象が発見された。その機構にはCRYが光依存的にTIMあるいはPER-TIMに結合することが重要な役割を演じている。実際*in vitro*でCRYはTIMと相互作用することが確かめられているが、CLOCK-CYCLEによって*tim*遺伝子は転写活性化され、PER-TIMを加えることでこの反応は抑制されるが、さらにここにCRYを加えることでこの抑制が完全に解除されるという。しかもこの反応は光存在下でしか起こらないという<sup>7)</sup>。

哺乳類の時計遺伝子の構成はショウジョウバエと殆ど同じであるが、詳しく見るとPERが3種類あることなどだけでなく、それぞれの役割が微妙に異なっていることが分かる<sup>69)</sup>。*Clock*はENUによる変異マウスの中から約28時間周期を示す個体からポジショナルクローニングによって得られた遺伝子で、生物時計と関連するbHLH-PAS型転写因子としては、初めてのものであった<sup>34)</sup>。その後*Per1*がショウジョウバエとのホモロジーを利用してクロ

ーニングされ<sup>64)</sup>、また*Bmal1*がSCN(視交叉上核)に発現し、夜間にピークのあるサーカディアンリズムを示すこと<sup>29)</sup>、CLOCKとヘテロ二量体を形成し、*Per*遺伝子のプロモーター領域にあるE-box(CACGTG)に結合してその転写を活性化することなどが明らかになり<sup>21)</sup>、哺乳類の生物時計を司る因子が一気に出そろうことになった<sup>31,44,60,63)</sup>。CLOCK-BMAL1は促進因子として*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*などの抑制系の因子の転写を促進し、産生されたこれらの因子がCLOCK-BMAL1を介して自身の転写を抑制する機構はショウジョウバエと全く同じである<sup>14,37)</sup>。しかしCLOCK-BMAL1と抑制因子の作用様式は抑制因子間で異なることが一部分かかってきている。CRYは直接BMAL1と作用して転写抑制作用を及ぼしていると考えられるが、PER, TIMはCLOCK-BMAL1と*in vitro*での結合は認められず、CLOCK-BMAL1と直接には相互作用していないようである。またCRY1,2のCLOCK-BMAL1を介した転写活性化抑制能は、抑制因子の中では一番強いことが分かっており、BMAL1と直接作用することと関係している可能性がある。*Cry1*あるいは*Cry2*のノックアウトマウスは周期がそれぞれ短くなるあるいは長くなる現象が観察されており<sup>25,65)</sup>、これらの遺伝子のダブルノックアウトでは行動リズムが消失している<sup>66)</sup>。このことからマウスのCRY1およびCRY2は時計発振機構のなかで重要な構成因子であると考えられる。

哺乳類の光同調を担う因子はまだ見つからない。前述のようにショウジョウバエではCRYが光受容と光同調を行う因子であることが証明されたが、哺乳類のCRY1、CRY2にはそのような作用がないことが確かめられている。*Per1*や*Per2*は、

暗期に光照射するとそのmRNAが誘導されることが知られているが<sup>3,61)</sup>、*Cry1*と*Cry2*の両者を欠損したマウスに同様の処置をしてもmRNAの誘導性は全く変わらなかったからである<sup>51)</sup>。

哺乳類の時計遺伝子もショウジョウバエと同様に抑制因子と促進因子の発現位相が正反対になる現象が見つかっている。ショウジョウバエの場合、リズム発現するのは*Clock*であるが<sup>5,23,38)</sup>、哺乳類では*Bmal1*がオシレーションする<sup>1,29)</sup>。SCNでは暗期の前半に*Bmal1*の発現がピークになり、おそらく引き続いて蛋白の産生がピークを迎え、増加したCLOCK-BMAL1が暗期の後半から*Per1*の転写を活性化するため、明期の前半に*Per1*の発現がピークを迎えるものと考えられる。その後産生されたPER1などの抑制因子は明期の後半にかけて自身の転写を抑制することになる。この時なんらかのメカニズムでBMAL1の発現抑制をPER1などの抑制因子が解除するメカニズムが存在する可能性がある。すなわち抑制因子が負のフィードバックで自身を負に制御するだけではなく、促進因子を正の方向に制御していると考えられる。また反対にBMAL1は自身の転写を抑制し、反対に抑制因子を増加させる方向に働くのである。このメカニズムが実際に機能しているかは今後の研究の展開を待たなければならないが、SCNに限らず肝臓などの末梢組織においても*Per1*と*Bmal1*の発現が正反対の位相を示すことから時計発振機構に重要な現象と思われる。(図4)

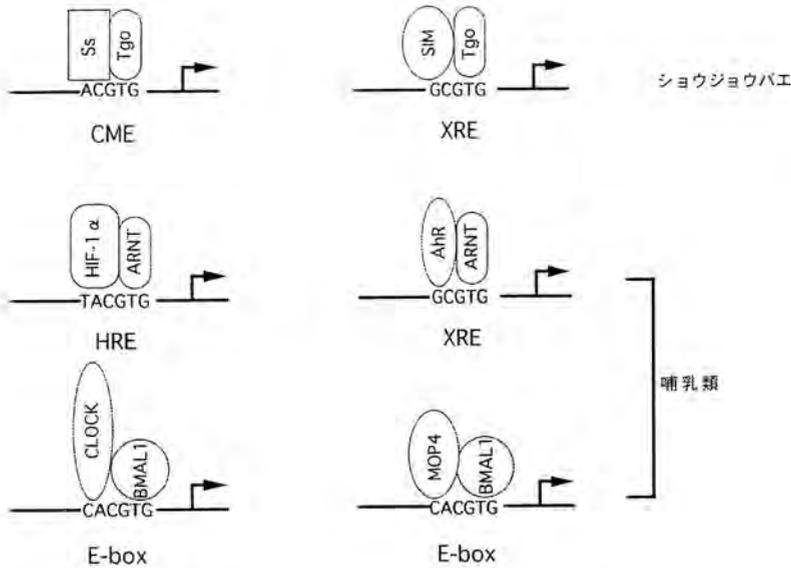


図4 bHLH-PAS型転写因子のDNA結合配列

ショウジョウバエのCMEとXRE, 哺乳類のHRE,XRE, E-boxを示した。bHLH-PAS型転写因子の二量体は標的遺伝子のプロモーターにあるそれぞれの配列に塩基性領域を介して結合し、標的遺伝子の転写調節をする。CLOCK-BMAL1は*per1*とバゾプレッシンのプロモーター領域にあるE-boxに結合し*per1*、*vasopressin*それぞれの転写を活性化する。MOP4(NPAS2)はBMAL1とヘテロ二量体を形成しバゾプレッシンプロモーター領域にあるE-boxに結合して転写活性化する。図中に示した配列はコア配列。

Ss:Spineless, Tgo:Tango

参考文献

1) Abe H, Honma S, Namihira M, Tanahashi Y, Ikeda M, Yu W, Honma K: Brain Res Mol Brain Res.66:104-110 (1999)	8) Chen J, Zou A, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC: J Biol Chem. 274:10113-10118 (1999)
2) Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC: Cell, 91:1055-1064 (1997)	9) Chrast R, Scott HS, Chen H, Kudoh J, Rossier C, Minoshima S, Wang Y, Shimizu N: Genome Res. 7:615-624 (1997)
3) Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M: Cell, 93:791-804 (1998)	10) Crews ST, Thomas JB, Goodman CS: Cell, 15:52:143-151 (1988)
4) Bae K, Lee C, Hardin PE, Edery I: J Neurosci. 20:1746-1753 (2000)	11) Crews ST: Genes Dev. 12:607-620 (1998)
5) Bargiello TA, Jackson FR, Young MW: Nature, 312:752-754 (1984)	12) Crews ST, Fan CM: Curr Opin Genet Dev.9:580-587 (1999)
6) Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM: Genes, 13:64-75 (1999)	13) Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TDL, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA: Science, 280:1599-1603 (1998)
7) Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ, Kay SA: Science, 285:553-556 (1999)	

- 14) Dunlap JC, Loros JJ, Liu Y, Crosthwaite SK: *Genes Cells*, 4:1-10 (1999)
- 15) Ema M, Morita M, Ikawa S, Tanaka M, Matsuda Y, Gotoh O, Saijoh Y, Fujii H, Hamada H, Kikuchi Y, Fujii-Kuriyama Y: *Mol Cell Biol*. 16:5865-5875 (1996)
- 16) Ema M, Ikegami S, Hosoya T, Mimura J, Ohtani H, Nakao K, Inokuchi K, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y: *Hum Mol Genet*. 8:1409-1415 (1999)
- 17) Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M: *Cell*, 95:669-679 (1998)
- 18) Emmons RB, Duncan D, Estes PA, Kiefel P, Mosher JT, Sonnenfeld M, Ward MP, Duncan I, Crews ST: *Development*, 126:3937-3945 (1999)
- 19) Fan CM, Kuwana E, Bulfone A, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA, Crews S, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M: *Mol Cell Neurosci* 7:1-16 (1996)
- 20) Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Chen g JB: *Biochem Biophys Res Commun*. 246:570-577 (1998)
- 21) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ *Science*, 280:1564-1569 (1998)
- 22) Genick UK, Soltis SM, Kuhn P, Canestrelli IL, Getzoff ED: *Nature*, 392:206-209 (1998)
- 23) Glossop NR, Lyons LC, Hardin PE: *Science*, 286:766-768 (1999)
- 24) Gong W, Hao B, Mansy SS, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, Chan MK: *Proc Natl Acad Sci U S A* , 95:15177-15182 (1998)
- 25) Griffin EA Jr, Staknis D, Weitz CJ: *Science*, 286:768-771 (1999)
- 26) Hardin PE: *Curr Opin Neurobiol*. 8:642-647 (1998)
- 27) Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y : *Mol Cell Biol*. 16:1706-1713 (1996)
- 28) Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O: *Science*, 252:954-958 (1991)
- 29) Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M: *Biochem Biophys Res Commun*. 250:83-87 (1998)
- 30) Huang ZJ, Edery I, Rosbash M: *Nature*, 364:259-262 (1993)
- 31) Ikeda M, Nomura M: *Biochem Biophys Res Commun*. 233:258-264 (1997)
- 32) Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL: *Genes Dev*. 12:149-162 (1998)
- 33) Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA: *Mech Dev*. 73:117-123 (1998)
- 34) King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS: *Cell*, 89:641-653 (1997)
- 35) Kobayashi A, Numayama-Tsuruta K, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: *J Biochem (Tokyo)*, 122:703-710 (1997)
- 36) Konopka RJ, Benzer S : *Proc Natl Acad Sci U S A* , 68:2112-2116 (1971)
- 37) Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM: *Cell*, 98:193-205 (1999)

- 38) Lee C, Bae K, Edery I : *Neuron*, 21:857-867 (1998)
- 39) Leo C, Chen JD: *Gene*, 245:1-11 (2000)
- 40) Long WP, Chen X, Perdew GH: *J Biol Chem*. 274:12391-12400 (1999)
- 41) Loros JJ : *Curr Opin Microbiol*. 1:698706 (1998)
- 42) Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM: *Genes Dev*.12:3264-3275 (1998)
- 43) Michaud JL, DeRossi C, May NR, Holdener BC, Fan C:*Mech Dev*.90:253-261 (2000)
- 44) Miyamoto Y, Sancar A:*Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:6097-102 (1998)
- 45) Moffett P, Dayo M, Reece M, McCormick MK, Pelletier J:*Genomics*,35:144-155 (1996)
- 46) Moffett P, Pelletier J : *FEBS Lett*. 466:80-86 (2000)
- 47) Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M,Mackinnon R : *Cell*,95:649-655 (1998)
- 48) Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, Young MW: *Science*,271:1736-1740 (1996)
- 49) Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA Jr, Crews ST: *Cell*,67:1157-1167 (1991)
- 50) Ni M, Tepperman JM, Quail PH:*Cell*, 95:657-667 (1998)
- 51) Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A,Muijtjens M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT: *Science*,286:2531-2534 (1999)
- 52) Pellequer JL, Wager-Smith KA, Kay SA, Getzoff ED: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:5884-5890 (1998)
- 53) Ponting CP, Aravind L: *Curr Biol*. 7:R674-677 (1997)
- 54) Probst MR, Fan CM, Tessier-Lavigne M, Hankinson O :*J BiolChem*. 272:4451-4457 (1997)
- 55) Pugh CW, O' Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ: *J Biol Chem*.272:11205-11214 (1997)
- 56) Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D,Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A :*Genes Dev*.14:34-44 (2000)
- 57) Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C,Hall JC, Rosbash M : *Cell*,38:701-710 (1984)
- 58) Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC: *Cell*,93:805-814 (1998)
- 59) Semenza GL: *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:551-578 (1999)
- 60) Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr,Reppert SM : *Neuron*, 19:1261-1269 (1997)
- 61) Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, TeiH, Moriya T, Shibata S,Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H :*Cell*,91:1043-1053 (1997)
- 62) Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: *J Biochem (Tokyo)* ,122:1075-1079 (1997)
- 63) Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K,Maebayashi Y, Sakakida Y,Okumura K, Takashima N, OkamuraH: *Genes Cells*, 3:167-176 (1998)
- 64) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R,Hirose M, Sakaki Y: *Nature*, 389:512-516 (1997)
- 65) Thresher RJ, Vitaterna MH, Miyamoto Y, Kazantsev A, HsuDS, Petit C, Selby CP, Dawut L,Smithies O, Takahashi JS, SancarA :*Science*, 282:1490-1494 (1998)
- 66) van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R,Kanno S, Takao

- M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A : *Nature*, 398:627-630 (1999)
- 67) Wang F, Hoivik D, Pollenz R, Safe S : *Nucleic Acids Res.*26:3044-3052 (1998)
- 68) Whitlock JP Jr: *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:103-125 (1999)
- 69) Whitmore D, Sassone-Corsi P, Foulkes NS: *Curr Opin Neurobiol.* 8:635-41 (1998)
- 70) Wines ME, Tiffany AM, Holdener BC: *Genomics*, 51:223-232 (1998)
- 71) Yamaki A, Noda S, Kudoh J, Shindoh N, Maeda H, Minoshima S, Kawasaki K, Shimizu Y, Shimizu N: *Genomics*, 35:136-143 (1996)
- 72) Zeng H, Qian Z, Myers MP, Rosbash M: *Nature*, 380:129-135 (1996)