

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14670

研究課題名(和文)哺乳類概日時計の自律的に発振するリン酸化反応の創生

研究課題名(英文)Creation of autonomously oscillating phosphorylation in the mammalian circadian clock

研究代表者

篠原 雄太(Shinohara, Yuta)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・特別研究員

研究者番号：10755193

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):試験管内に時計タンパク質由来のミニマムなリン酸化振動子の構成を行った。この目標を達成するために、1)CKIの脱リン酸化活性を向上させるペプチドの探索、2)試験管内のリン酸化振動条件の最適化を行った。試験管内のリン酸化振動は周期性が存在しているが、振幅が小さかった。従ってタンパク質レベルでのリン酸化振動の構成を試みた。時計タンパク質はバキュロウイルスを用いた昆虫細胞系で行い、時計タンパク質の精製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物時計の研究センターは細胞・個体といった複雑な高次の階層における漠然とした理解であるため、原理の本質である分子レベルの解明に踏み込むことは難しい。本研究はリン酸化振動子に必要な要素の同定、定量的なリン酸化測定に基づく酵素反応の速度論的な解析に加えてin vitroでのリン酸化振動子の再構成・設計・制御による合成生物学的なアプローチを相補的に用いる点に学術的な価値がある。概日時計の本質の理解は24時間リズムに伴う睡眠や代謝などの生理現象の理解に直結するため社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文):We performed a minimal phosphorylation oscillator derived from a clock protein in vitro. To achieve this goal, we 1) searched for peptides that enhance the dephosphorylation activity of CKI, 2) The phosphoric oscillation conditions in the test tube were optimized. The phosphorylation oscillations in the test tube had a periodicity, but the amplitude was small. Therefore, an attempt was made to configure the phosphorylation oscillations at the protein level. The clock protein was performed in an insect cell system using baculoviruses, and the clock proteins was successfully purified.

研究分野：生物有機化学

キーワード：概日時計 リン酸化 脱リン酸化 自律発振機構 温度補償性 蛋白質ネットワーク 酵素基質相互作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、哺乳類概日時計において、遺伝子発現動態の包括的な理解や遺伝子ネットワーク構造の同定といった動的で複雑な概日時計システムの理解が急速に進みつつある。従って概日時計システムの根底までを徹底的に理解することを可能とした、スケーラビリティを最適化するための振動設計のモジュール性を、柔軟かつ最大限に高めるアプローチが求められている。

シアノバクテリアの概日時計では、3種類の時計タンパク質である KaiA, B, C が互いに相互作用して KaiC のリン酸化反応が約 24 時間周期で自律振動している (Tomita J., *et al.*, *Science*, 2005)。さらに試験管内で KaiC の自律的なリン酸化振動が再構成され、概日時計が駆動する動作原理の中核が、振動するリン酸化反応であることが明らかとなった (Nakajima M., *et al.*, *Science* 2005)。一方で哺乳類概日時計では、転写回路による遺伝子発現と翻訳後修飾である時計タンパク質のリン酸化を経て自律振動を繰り返している。転写回路の各過程は温度に強く依存するため、概日時計の特徴である温度補償性(概日時計が温度に依存しない性質)を説明するのが難しい。従って哺乳類概日時計において、転写回路のネガティブフィードバック機構とは別の駆動システムが概日時計に備わっている可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、概日時計の温度補償された時計タンパク質のリン酸化に着目し、概日時計システムを駆動させる中核と考えられる自律的振動子を試験管内で再構成することを目的とする。さらに生体内で自律的なリン酸化振動子が生じる領域を同定して、概日リズムを駆動させる本質的な動作原理を設計・制御できるまで理解する。再構成したリン酸化振動子はボトムアップ的な研究展開を可能とするため、概日時計システムの根底を理解する独創的な研究戦略になりうる。

### 3. 研究の方法

哺乳類概日時計の周期長を決定しているリン酸化酵素 CKI  $\delta$  は、ADP 依存的に脱リン酸化活性があることが報告されている (Shinohara Y., *et al.*, *Mol. Cell*, 2017)。脱リン酸化活性を制御する候補因子は、生体内で CKI  $\delta$  と相互作用する時計タンパク質 PER1/2 と CRY1/2 が挙げられる。PER1/2 と CRY1/2 由来のペプチドを網羅的に化学合成して、CKI  $\delta$  の脱リン酸化活性の制御を試みた。活性評価は 384 ウェルプレートで測定可能なモビリティシフトアッセイ系を用いた。

CKI  $\delta$  のリン酸化および脱リン酸化活性に対するアロステリック効果を最大限に発揮する基質ペプチドを PER1/2 ペプチドライブラリにより探索する。リン酸化振動させるためには、リン酸化と脱リン酸化をを同調させ定常状態に「時間遅れ」が生じる過程が必要である。従ってペプチドライブラリより得られた基質ペプチドと CKI  $\delta$  との親和力を等温滴定型カロリメトリーで測定して親和性の高いペプチドを選抜した。CKI  $\delta$  と PER1/2 由来ペプチドが強く相互作用することで、自律的にリン酸化と脱リン酸化の繰り返し振動を試みた。

CKI  $\delta$  の酵素活性を失活させないためにタンパク質安定化に寄与するスクロースを添加させ、ATP 再生計や透析膜を利用した ATP の継続的補給による持続的に酵素活性を維持できる環境の構築を行った。長時間のサンプリングは、分注機などのロボットによる自動化を行い、実験の効率化を図った。

### 4. 研究成果

リン酸化振動子を再構成するために、CKI  $\delta$  の脱リン酸化活性を向上させる必要がある。そのため細胞内で CKI  $\delta$  とよく相互作用する時計タンパク質である PER1/2 と CRY1/2 由来ペプチドが有力候補である。また CKI  $\delta$  の C 末端ドメインは、CKI  $\delta$  による自己リン酸化を介して、リン酸化活性を抑制することが知られている (Cegielska A., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1998)。そのため CKI  $\delta$  の C 末端ドメインも脱リン酸化を制御する領域候補である。これらの候補タンパク質を断片化ペプチドとして設計を行い、ペプチド合成機により合成を行った。時計タンパク質由来のペプチド断片を用いて CKI  $\delta$  の脱リン酸化活性を制御できるかのペプチドスクリーニングを行った。その結果、いくつかのペプチドが脱リン酸化活性を向上させていることがわかった (図 1)。

次に脱リン酸化活性を向上させたペプチドを用量依存的に活性が向上できるかを確認した。驚くべきことにこれらのペプチドはリン酸基依存的に活性が上がることを示唆された。リン酸基が脱リン酸化活性を向上させるスイッチになることは、タンパク質のリン酸化

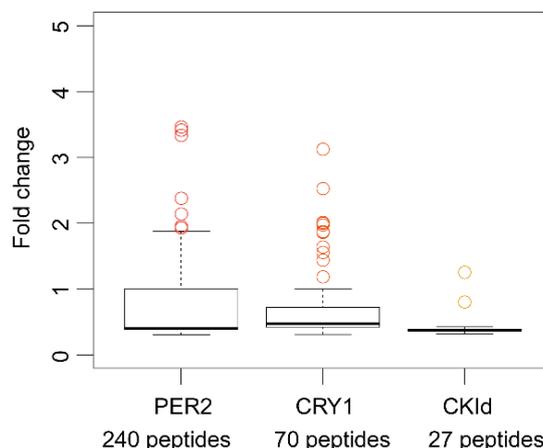


図 1. 脱リン酸化活性を向上させるペプチドスクリーニング結果

が酵素活性をアロステリック制御している可能性を示唆しており、概日時計を制御する新しい機構が明らかになるため、タンパク質間相互作用を理解する重要な知見になることが期待される。

時計タンパク質由来ペプチドを、CKI  $\delta$  のリン酸化/脱リン酸化に加え、リン酸化振動が試験管内で再構成されたかを観察した。試験管内のリン酸化振動子の周期性は微弱に存在するものの振幅が小さいため解析が難しく、ペプチドでのリン酸化振動子の構成は困難であった。脱リン酸化活性の促進は、セリン/スレオニンのリン酸基の電荷に依存する要因が高いため、ペプチド内に数個のリン酸基が必要と考えられる。

そのため、次に時計タンパク質を用いてリン酸化振動子が構成されるかを検討した。時計タンパク質の精製は大腸菌では困難なため、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞系 (Xing W., *et al.*, *Nature*, 2013) で CRY1/2 の精製を行った (図 2)。その後、CRY1/2 を CKI  $\delta$  の脱リン酸化活性との相互作用を測定したところ、CRY1/2 に新たな酵素活性が存在していることを見出した。CRY タンパク質のホモログは植物からショウジョウバエ・哺乳類と生物種に広く存在しているため、この発見は種の垣根を超えた知見になることが期待される。

#### 昆虫細胞からのタンパク質精製

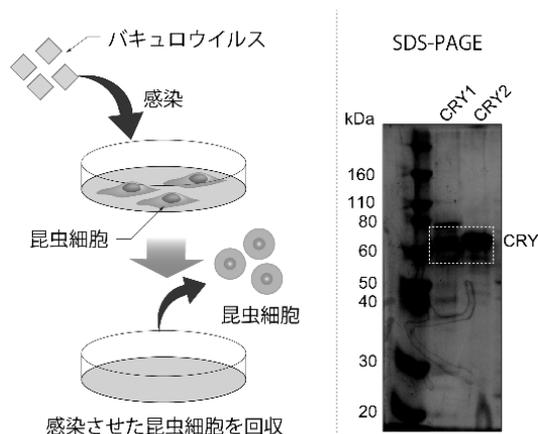


図 2. CRY1/2 のタンパク質精製

#### <引用文献>

- ①Tomita J., Nakajima M., Kondo T., Iwasaki H., No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation, *Science*, 307, 251-254, (2005)
- ②Nakajima M., Imai K., Ito H., Nishiwaki T., Murayama Y., Iwasaki H., Oyama T., Kondo T., Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro, *Science*, 308, 414-415, (2005)
- ③Shinohara Y., Koyama Y.M., Tadenuma-Ukai M., Hirokawa T., Kikuchi M., Yamada R.G., Ukai H., Fujishima H., Umehara T., Tainaka K., Ueda H.R., Temperature-sensitive substrate and product binding underlie temperature-compensated phosphorylation in the clock, *Molecular Cell*, 67, 783-798, (2017)
- ④Cegielska A., Gietzen K.F., Rivers A., Virshup D.M., Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatase and limited proteolysis, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 1357-1364, (1998)
- ⑤Xing W., Busino L., Hinds T.R., Marionni S. T., Saifee N. H., Bush M. F., Pagano M., Zheng N., SCF(FBXL3) ubiquitin ligase targets cryptochromes at their cofactor pocket, *Nature*, 496, 64-68, (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠原雄太
2. 発表標題 Design principles of temperature-compensated phosphorylation in the circadian clock.
3. 学会等名 New Frontier in Protein Design & Engineering (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原雄太, 小山洋平, 上田泰己
2. 発表標題 哺乳類概日時計における温度補償されたリン酸化反応の再構成
3. 学会等名 第14回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原雄太
2. 発表標題 Design principles of temperature-compensated phosphorylation in the mammalian circadian clock
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原雄太, 小山洋平, 上田泰己
2. 発表標題 Mechanism of Temperature Compensation in the Circadian Clock.
3. 学会等名 第98回日本化学会春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----