

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500344

研究課題名(和文) 概日システムの同期/脱同期を制御する蛋白質修飾機構の解析

研究課題名(英文) Protein modification mechanism regulating synchronization/desynchronization of circadian system

研究代表者

田丸 輝也 (TAMARU TERUYA)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：80291706

研究成果の概要(和文)：概日システムの制御に必須な蛋白質修飾として、プロテインキナーゼCK2による時計制御転写因子BMAL1の日周性リン酸化を解明した。CK2はBMAL1のSer90を日周性でリン酸化し、BMAL1の核への蓄積を制御することによって、日周性時計遺伝子発現をコントロールする。また、BMAL1のSUMO化、Acetyl化等の修飾を上流で調節することにより、概日システムを関門的に制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We elucidated circadian CK2-mediated BMAL1(a core circadian transcription factor) phosphorylation essential protein modification for circadian system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時間生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：分子・細胞・神経生物学、細胞内情報伝達、サーカディアンリズム

1. 研究開始当初の背景

概日システムは、分子時計が支配するゲノムワイドな生命過程の統合制御系である。その機能不全は睡眠障害、メタボリックシンドローム、癌、神経・精神疾患などの憎悪に関わっている。哺乳類の概日分子時計は脳の中核時計(SCN)のみならず、全身のあらゆる組織の細胞(末梢時計)で機能しており、その同調から出力に至る系(概日システム)は、時計の位相調節を全身で調和のとれたタイミングで行うことによって個体レベルで生理機能を統合する為に必須な系であると考えられる。申請者は、時計モデル細胞の同調処

理により時計蛋白質BMAL1およびCLOCK, CRY1の核・細胞質局在パターンが迅速に同期すること(Immediate synchronization response; ISR)を見いだした。また、BMAL1の修飾(Phosphorylation, SUMOylation, Ubiquitination, Acetylation)が概日システムの制御に重要な役割を果たしていることも示している。時計蛋白質のリン酸化などによる修飾と核細胞質間移行が迅速な時計同調プロセスの中核を担うという証拠に基づき本研究を進めることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、概日システムのプロテオーム的基盤となり、分子時計の同期の初期応答トリガーともなる蛋白質機能の時空間特異的な制御メカニズムを解明することである。具体的には、代表者が発見したキナーゼ PFK の日周活性変動を介した時計制御転写因子 BMAL1 のリン酸化、さらにストレス刺激に応答する BMAL1 等の転写因子の機能にとくに着目し解析を進めた。また、リン酸化等の蛋白質修飾系で構成される細胞内同調シグナリングによって引き起こされる BMAL1 等時計蛋白質の迅速な変化 (ISR) が、細胞間時計同期・発振 (時計遺伝子発現のリズム動態) にどのように寄与しているかについての解析も行った。

3. 研究の方法

BMAL1 の特定の amino 酸配列を transient protein transfection system, BMAL1-KO 細胞に BMAL1 の mutant を retro-virus transfection/mutant knock in system を用いて導入し、その時計同調・発振への影響を解析する。また、同期/脱同期状態における個々の細胞レベルでのシグナル伝達/蛋白質修飾システムの相違点を解明する。時計同期・脱同期に関わる時計蛋白質の構造基盤の解析: BMAL1 の核移行、分解にそれぞれ関わると予測される配列 (仮称: BMAL1/S or T) は、CK2 (申請者が発見した日周変動性キナーゼ PFK であることがのちに判明) 等のリン酸化ターゲット配列を複数含むことから、BMAL1 のリン酸化を介した同調反応に関わっており、BMAL1/S or T ペプチドは同調反応の競合阻害剤として作用するという仮説に基づき以下の実験を行う。GFP-BMAL1/T 融合タンパク質を大腸菌で発現/精製し、市販の transient protein transfection system を用いて時計モデル細胞に導入する。導入効率は GFP の蛍光イメージングで経時的にチェックする。導入1時間後、同調パルス処理を行い、BMAL1 の同調反応として核細胞質局在パターンを immunofluorescence confocal imaging/immunoblot によって、その後の生細胞における時計発振を Per2-luc リズムの連続モニ

タリングによって解析し、BMAL1/S or T ペプチド導入の効果を検討し、時計同調・発振系に関わる BMAL1 の構造的基盤の解明を行う。

リン酸化などの修飾を immunoprecipitation / immunoblot によって、その後の時計発振を生細胞における Per2-luc リズムの連続モニタリングによって解析する。

レトロウィルスを用いる発現系を用い、既に共同研究で明らかにしている時計発振を示さない時計遺伝子ノックアウト細胞に、時計遺伝子プロモータ下流に時計蛋白質を発現させると時計発振機能が回復する系を利用して解析を進める。

(1)ベクターの構築 /mutagenesis : Bmal1 ORF-cDNA に体内時計リズム同調・発振・出力系の制御に関与すると考える部位 (CK2 等によるリン酸化部位や、核細胞質間移行に関わる配列、分解に関わる配列等) の変異体を作製し、pCLNCX ベクター (IMGENEX) に挿入する。コントロールとして Wild type BMAL1 を挿入したベクターも作製する。

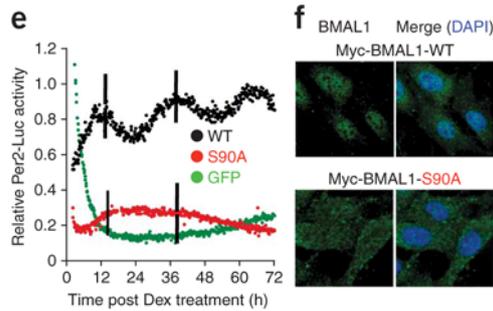
BMAL1-KO MEFs (mouse embryonic fibroblasts) に Retro-virus transfection system を用いて BMAL1 をほぼ 100%発現させる。

(2)ベクターの Knock-in・安定化発現: 上記ベクターを Retro Max Expression system を用いて導入し発現株を取得する。

(3)効果の解析: 上記発現の効果として、同調あるいは各時刻において位相シフト処理した細胞における解析を行う。BMAL1 の同調反応として、BMAL1 の核細胞質局在パターンを immunofluorescence confocal imaging/immunoblot で、リン酸化などの修飾を immunoprecipitation / immunoblot によって、時計発振を Per2-luc リズムのリアルタイムモニタリングによって解析する。

4. 研究成果

H20年度は、PFK が CK2 であることを同定し、CK2 によるリン酸化によって制御される体内時計制御転写因子 BMAL1 の機能変化が、哺乳類概日システムに必須であることを明らかにした (Nat Struct Mol Biol 2009)。



すなわち、CK2 のリン酸化部位を置換した BMAL1 は、核に蓄積出来ない為、正常な時計遺伝子発現機能を発現できない。

H21 年度は、CK2 が BMAL1 日周期性でリン酸化し、その核移行を時刻特異的に制御することに加え、その下流の BMAL1 の修飾 (Nature 2007, Science 2005)、CLOCK との結合を閼門的に制御し、概日システムの制御に必須の役割を果たしていることを明らかにしている。

H22 年度は、CK2 活性の日周期変動機構に時計制御蛋白質との周期的相互作用が関与していることを示した。CK2 をコアとした日周期性リン酸化オシレータが概日システムの制御において統合的な役割を果たしていることを解明しつつある。また、ストレス応答における概日システムの役割を解明する研究を行い、熱ショック応答に参与する分子時計メカニズムの一旦を解明した (論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ①Tamaru T, Takamatsu K. Role of periodic phosphorylation in mammalian circadian rhythm JOURNAL OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES 61: S19, 2011 (査読無)
- ②Tamaru T, Takamatsu K. Gating control of mammalian biological clock by circadian rhythmic kinase CK2. JOURNAL OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES 60: S99, 2010 (査読無)
- ③Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K (他 3 名、1 番目著者) CK2 α phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol* 16: 446-448. 2009 (査読有)
- ④Miyamura N, Hirayama J, Sawanobori K,

Tamaru T (他 3 名、4 番目著者) CLOCK: BMAL - independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochrome1a gene. *Biol Pharm Bull* 32: 1183-1187, 2009 (査読有)

⑤Tamaru T, Takamatsu K. Circadian kinase CK2 phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock.

NEUROSCIENCE RESEARCH 65: S57-S58, 2009 (査読無)

⑥Tamaru T, Takamatsu K. Multipotent kinase CK2 rhythmically phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian system. 日本分子生物学会年会講演要旨集 32: 168, 2009 (査読無)

⑦Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Takamatsu K. Circadian rhythmic kinase CK2 phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. JOURNAL OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES 59: 282-286, 2009 (査読無)

⑧Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K (他 3 名、1 番目著者) Circadian rhythmic kinase CK2 α phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nature Precedings*

<http://precedings.nature.com/documents/1702/version/1/html>, 2008 (査読無)

⑨Tamaru T, Takamatsu K. Circadian rhythmic kinase PFK phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. NEUROSCIENCE RESEARCH 61: S190, 2008 (査読無)

⑩Tamaru T, Takamatsu K. Circadian rhythmic CLOCK:BMAL1 kinase PFK controls mammalian clock function. JOURNAL OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES 58: S88, 2008 (査読無)

[学会発表] (計 7 件)

①田丸輝也, 高松 研: 概日リズム発現における周期性リン酸化シグナリングの役割. 第 88 回日本生理学会大会 (シンポジスト、オーガナイザー兼任), 横浜 (震災の為、誌上開催), 2011/03/28

②田丸輝也, 高松 研: CK2 による日周期性リン酸化は哺乳類概日システムを統合制御する. 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010/12/07

③田丸輝也, 高松 研: 日周期性 BMAL1 キナー

ゼCK2は哺乳類概日時計の必須レギュレータである。第243回生理学東京談話会，埼玉，2010/12/04

④田丸輝也，高松 研：多機能性キナーゼCK2はBMAL1を日周変動性にリン酸化する哺乳類概日システムの必須レギュレータである。第32回日本分子生物学会年会，横浜，2009/12/04

⑤田丸輝也，高松 研：概日変動性BMAL1キナーゼCK2は哺乳類体内時計の必須レギュレータである。第32回日本神経科学大会，名古屋，2009/09/17

⑥Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Takamatsu K, Sassone-Corsi P: Circadian rhythmic kinase CK2 phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 2009/07/29

⑦田丸輝也，高松 研：日周期変動性BMAL1キナーゼPFKの哺乳類体内時計における役割。第31回日本神経科学大会，東京，2008/07/10

[その他]

ホームページ等

http://jgglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBA_L_ID=200901071766454359&t=1&d=1&q=6000002824

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田丸 輝也 (TAMARU TERUYA)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：80291706

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし