

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570139

研究課題名(和文) ヘムセンサー転写因子 NPAS2 による体内時計制御と情報伝達の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of clock regulation and signal transduction by a heme sensor transcription factor, NPAS2

研究代表者

佐上 郁子 (SAGAMI IKUKO)

京都市立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10143033

研究成果の概要(和文)：哺乳類の概日リズム制御に関与するヘムタンパク質である NPAS2 の機能に対するガス小分子の影響を解析した。その結果、NPAS2 の転写活性および DNA 結合活性は、CO や NO のヘムへの結合によって濃度依存的に影響されたことから、CO および NO シグナル系による時計遺伝子発現の制御が示唆された。さらに、変異体を用いた実験により、これらにシグナルの分子内伝達に重要な PASA ヘム結合ドメイン内のアミノ酸残基を特定した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of gaseous small molecules on function of NPAS2, a heme protein associated with mammalian circadian rhythms. The transcriptional activity and DNA binding activity of NPAS2 were affected in a concentration-dependent-manner by CO or NO, suggesting cross talk between circadian rhythm and CO-, NO-signaling system. The analysis of mutants revealed that specific amino-acid residues in the PASA heme domain are essential to signal transduction in the molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物学

キーワード：シグナル伝達、分子認識、金属タンパク質、体内時計、DNA 結合活性、ガス小分子

1. 研究開始当初の背景

体内時計は、光のシグナルのみならず、NO や CO や酸化還元状態、代謝や加齢などによっても制御されることが報告されているが、その分子レベルの詳細な制御機構は不明である。中でも哺乳類の時計遺伝子の転写因子 NPAS2 は、bHLH-PAS ファミリーに属する転写因子であるが、CLOCK と同様に、NADH、NADPH 存在下で BMAL1 とヘテロダイマーを形成して時計遺伝子の発現を制御すること、NPAS2 欠損マウスは夜間に異常な睡眠パターンを示し摂食スケジュールの変化に順応できないということがわかってきた。こうした結果は、CLOCK が光による体内時計の制御に関わり、NPAS2 が摂食やホルモンなどによって制御されるリズムに関わる、というモデルを示唆するが、そのメカニズムの全容、および CLOCK と NPAS2 の体内時計制御での働きの違いなどは明らかになっていない。また NPAS2 は PAS ドメインにヘムを結合し、そのヘムへの CO の結合によって活性が制御されるが、NPAS2 のヘムセンサードメインの構造変化と機能の制御機構の詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類の時計遺伝子の転写因子 NPAS2 を遺伝子工学的に分子設計し NO や CO による構造変化と機能を解析することによって、NPAS2 のヘムセンサードメインでの情報感知機構と転写活性の制御を介した情報伝達機構を明らかにすることを目的とする。さらに他の時計転写因子や NAD(P)H、時計遺伝子 DNA などと、NPAS2 との協調的分子間相互作用を解析する。それによって、NO シグナルや CO シグナルおよび代謝シグナルと、NPAS2 を中心とした体内時計制御との分子レベルでのクロストーク機構を理解すること

を目指した。

3. 研究の方法

(1) 分子設計されたNPAS2のセンサーの構造と機能解析；変異体のDNA結合活性は、独自に開発した *in vitro*のゲルシフトアッセイ系を使った。それには、大腸菌で発現し精製した NPAS2のHis-tag-bHLH-PASAドメインおよびBMAL1のMBP-tag-bHLH-PASA-PASBドメインと³²P-E-box (*Per1*あるいは*Per2* エンハンサー/プロモーター領域にあるE-box, E-box様配列)を用いた。またNPAS2野生型とTrp変異体を用いて、蛍光スペクトル測定によってNAD(P)Hとの分子間相互作用の解析を行った。

(2) NO、COによるNPAS2の*Per 1*、*Per2*転写活性化能に対する効果；NOやCOのDNA結合活性に対する効果を調べ、NO、COによって誘起されるセンサー構造の変化と機能の制御機構を考察する。完全長のHA-tag-NPAS2とBMAL1の動物細胞における発現系を作成し、ルシフェラーゼ遺伝子上流に*Per 1*、あるいは*Per2*のエンハンサー/プロモーター領域を挿入したレポーターを用いて、ルシフェラーゼアッセイ系を作成してある。その動物細胞を用いた転写活性アッセイ系を用いて、NO、COの野生および各種変異体NPAS2の写活性化能に及ぼす影響を解析した。

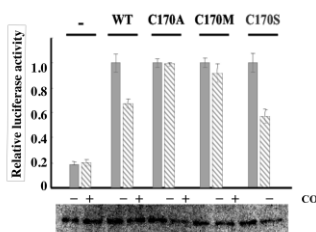
(3) NPAS2とCLOCKの構造と機能の相違の解析： CLOCKのbHLH/PASAドメインの大腸菌発現系を構築し、精製方法を開発して、ヘムの結合様式を調べた。さらにNPAS2とCLOCK、それぞれのタンパク質の機能ドメインをスイッチした各種キメラタンパク質を構築し、キメラタンパク質を用いて、*Per1*あるいは*Per2*遺伝子の転写活性化能を解析した。

4. 研究成果

(1) CO による NPAS2 の転写活性制御に働く

アミノ酸残基の特定：NPAS2 のヘムセンサー PASA ドメインのアミノ酸変異体の動物細胞発現系を作成し、ルシフェラーゼレポーターを用いて時計遺伝子 *Per 1*、*Per 2* の NPAS2 依存型転写活性に対する CO の効果を調べた。その結果、各種変異体の中で、ヘムの内部リガンドである His171 に隣接する Cys170 の Ala 変異体のみが CO による転写活性の阻害を受けなかった。そこでさらに Cys171Met, Cys171Ser 変異体を作成し解析したところ、Cys171Met は野生型と同様 CO による阻害を受けたが、Cys171Ser 変異体は CO 感受性がな

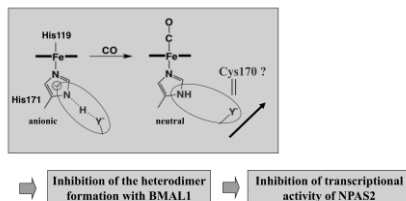
Effects of CO on the transcription activities of NPAS2 Cys 170 mutants in NIH3T3 Cells



The negative charge of Cys170 might be essential for CO sensing.

かった。それぞれの変異体の DNA 結合ドメインとヘムセンサードメイン (NPAS2 bHLH-PASA) を大腸菌で発現精製し、ゲルシフトアッセイを行ったところ、C170A は CO の添加による BMAL1 とのヘテロダイマー形成、DNA 結合活性が阻害されなかった。以上のことから、Cys170 は NPAS2 において CO のヘムへの配位シグナルを機能へ伝達する重要な残基であるということが示唆された。

C170 might be responsible for structural change at the heme domain to inhibit the DNA binding by CO.



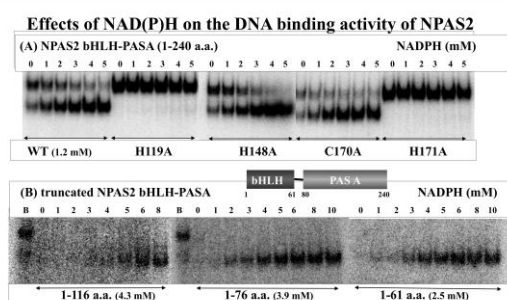
(2) NO シグナルと時計制御：NO は CO と同様に NPAS2 の還元型ヘムに結合するが、NO 添加によって野生型の DNA 結合活性はむしろ増

加することがわかった。さらに、NO が結合しない酸化型ヘムの NPAS2 でも NO による DNA 結合活性の増加が観察されたことから、NO の効果に NPAS2 ヘムへの結合は関与しないと考えられる。以上の結果は、NPAS2 が CO を感知し機能変化を引き起こす構造要因が、既知のバクテリア系ガスセンサータンパク質とは異なること、また NPAS2 の DNA 結合活性は、CO シグナルと NO シグナルを介して、それぞれ異なる機構によって制御されることを示している。

さらに、NPAS2 の bHLH-PASA ドメインの構造を明らかにするために、安定なタンパク質の大量精製系を工夫し、約 800 条件での結晶化を試みている。

(3) NPAS2 の DNA 結合活性と NAD(P)H 効果：活性型の NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマー形成は NAD(P)H により促進され、NAD(P)⁺により阻害されると報告されているが詳細は不明である。そこで、NPAS2 と NAD(P)H 補因子との相互作用について解析を行った。励起光 295 nm で野生型 NPAS2 bHLH PASA の Trp 残基を励起すると、340 nm 付近に蛍光が観測されるが、種々の濃度で NAD(P)H を加えると、その濃度依存的に NPAS2 由来の 340 nm 付近の蛍光強度が減少し、NAD(P)H 由来の 455 nm 付近の蛍光強度が増加した。NPAS2 由来の蛍光強度の減少量から K_D 値を求めたところ、NADH、NADPH どちらに対しても約 0.2 mM であった。一方、NPAS2 bHLH PASA 野生型と BMAL1 bHLH PASA/B を用いた EMSA から、NPAS2-BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性に対する NADPH の効果を調べたところ、 EC_{50} は 1.9 mM であった。対して、NPAS2 bHLH PASA K76A、F85A、F96A、Y108A の各点変異体ではいずれも約 1.4 mM で、野生型と同等の EC_{50} を示した。また、NPAS2 bHLH C 末端欠損変異体を用いて同様の実験を行ったところ、NPAS2 は N 末端の 61 ア

ミノ酸 (1-61 aa) だけでも BMAL1 とヘテロダイマーを形成して DNA に結合し、その活性は NADPH 濃度依存的に増加した。これより、NADPH との相互作用に必要な NPAS2 の領域は、1-61 aa にある事が示唆される。また、BMAL1 のみの系に NADPH を加えると、濃度依存的に BMAL1 ホモダイマーの DNA 結合活性が阻害された。よって、NADPH は NPAS2-BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合に対しては正の、BMAL1 ホモダイマーの DNA 結合に対しては負の制御効果を持つと示唆される。



•NAD(P)H enhanced the DNA binding activity of NPAS2 in a dose-dependent manner.
 •The N-terminal 61 amino acids of NPAS2 were good enough for the effects of NAD(P)H.

(4) CLOCK と NPAS2 の分子レベルの比較：
 マウス CLOCK の大腸菌発現系は、N 端のアミノ酸をいくつか欠損することで、野生型より格段に発現量、精製効率、精製タンパク質の安定性が向上した。また、CLOCK の PAS2 ドメインへも NPAS2 と同様 1 : 1 でヘムが結合し、その DNA 結合カッセイは CO で阻害された。このことは CLOCK もまた CO シグナルによる制御があることを示している。さらに CLOCK/NPAS2 のキメラタンパク質の動物培養細胞での発現系を構築し、最近ようやく Per2 レポーターを用いた転写活性解析条件を確立した。今後、CLOCK あるいは NPAS2 による *Per1*, *Per2* 発現制御の選択性や Per2 共発現の効果について解析予定である。

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 1 件)

- ① R. Sanae, F. Kurokawa, M. Oda, S. Ishijima, I. Sagami, Thermodynamic Analysis of Interactions between Cofactor and Neuronal Nitric Oxide Synthase., *Biochemistry*, 査読有, 50, 2010, 1714-1722.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 芳井克洋, 田嶋史悠, 石冨純男, 佐上郁子, 「時計遺伝子の転写因子 NPAS2 の DNA 結合能への pH 効果と NAD(P)H 効果」、第 84 回日本生化学大会、2010 年 12 月 7~10 日、神戸
- ② 目黒智美, 田嶋史悠, 石冨純男, 佐上郁子, 「時計遺伝子の転写因子 NPAS2 のヘムドメイン変異体作製と DNA 結合活性の解析」、第 84 回日本生化学大会、2010 年 12 月 7~10 日、神戸
- ③ 東香織里, 織田昌幸, 石冨純男, 佐上郁子, 「Analysis of calmodulin binding to nNOS isoforms using surface Plasmon Resonance」、第 48 回日本生物物理学会年会、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 21 日、仙台
- ④ 三角裕子, 佐上郁子, 島田秀夫, 北川禎三, 小倉尚志, 「共鳴ラマン分光法による転写調節タンパク質 NPAS2 の構造解析」、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 21 日、仙台
- ⑤ T. Takashima, K. Yoshii, T. Ueha, S. Ishijima, I. Sagami, Effect of NO on the transcriptional activity of NPAS2, a transcription factor associated with circadian rhythm, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010 年 6 月 14~17 日、京都
- ⑥ 佐上郁子, 「ガス状シグナル小分子 CO, NO による時計遺伝子発現制御の分子機構」、

第 82 回日本生化学大会シンポジウム、
2009 年 10 月 22 日、神戸

- ⑦ 田嶋史悠、高島智之、石嶋純男、佐上郁子、
「ヘム転写因子 NPAS2 変異体の転写活性
と DNA 結合活性に対する CO の効果」、第
82 回日本生化学大会、2009 年 10 月 22 日、
神戸
- ⑧ 芳井克洋、田嶋史悠、石嶋純男、佐上郁子、
「時計遺伝子の転写因子 NPAS2 と補因子
との相互作用解析」、第 82 回日本生化学大
会、2009 年 10 月 22 日、神戸
- ⑨ 東香織里、藤本紫野、織田昌幸、石嶋純男、
佐上郁子、「神経型一酸化窒素合成酵素の
カルモジュリンによる制御機構の解析」、
第 82 回日本生化学大会、2009 年 10 月 22
日、神戸
- ⑩ 田嶋史悠、高島智之、石嶋純男、佐上郁子、
「ガスセンサーNPAS2 の CO センシングと
時計遺伝子制御機構の解析」、日本農芸化
学会関西支部例会(第 459 回講演会)、2009
年 5 月 30 日、京都
- ⑪ 高島智之、上羽岳志、石嶋純男、佐上郁子、
「時計遺伝子の転写因子 NPAS2 のガス小
分子による転写制御機構の解析」、第 31
回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生
化学会大会、2008 年 12 月 9 日～12 日、神
戸
- ⑫ 田嶋史悠、高島智之、上羽岳志、石田真志
保、佐上郁子、「Characterization of
DNA-binding activity of NPAS2, a
heme-containing transcription factor」、第 31
回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生
化学会大会、2008 年 12 月 9 日～12 日、
神戸
- ⑬ M. Ishida, T. Ueha, and I. Sagami、Functional
analysis of heme-PAS domain mutants of
NPAS2;Transcriptional activity and
DNA-binding activity」、33rd FEBS Congress

& 11th IUBMB Conference、2008 年 6 月 30
日～7 月 3 日、Greece, Athens

- ⑭ 高島智之、上羽岳志、石田真志保、佐上郁
子、「時計遺伝子の転写因子 NPAS2 の機能
制御解析」、日本農芸化学会支部会、2008
年 5 月 31 日、京都

[その他]

ホームページ等

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/cell_macromol_chem/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐上 郁子 (SAGAMI IKUKO)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究
科・教授

研究者番号：10143033

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし