

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770138

研究課題名（和文） 基本生理機能調節における概日リズム制御蛋白質の酵素活性及び翻訳後修飾の役割

研究課題名（英文） Physiological roles of enzymatic activity and posttranslational modifications of circadian regulators

研究代表者

平山 順 (HIRAYAMA JUN)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：90510363

研究成果の概要（和文）： 質量分析法を用いたスクリーニングにより、概日リズム制御因子 CLOCK : BMAL1 二量体に結合する新規因子として細胞死制御因子 DAXX を同定した。DAXX は紫外線等のストレスに応答し、細胞周期、分化、及び細胞死誘導に関わる。DAXX は BMAL1 と時間依存的に結合することを見出し、この時間依存的結合の分子メカニズムとして、ヒストンアセチル化酵素 CBP による BMAL1 のアセチル化による BMAL1 と DAXX の結合能の亢進を支持する知見を得た。さらに、本研究は DAXX : BMAL1 : CLOCK 複合体の形成が CLOCK:BMAL1 二量体の転写能を亢進し、分子時計の周期性を調節することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Accumulating evidence suggests that the death domain-associated protein DAXX has a variety of functions in regulating apoptotic pathways. In this study, we have identified BMAL1, an essential circadian regulator, as a novel DAXX-interacting protein. The temporal association of circadian clock components is required for establishing and maintaining circadian rhythms. Notably, the interaction between endogenous DAXX and BMAL1 showed a circadian rhythmicity. Small interfering RNA (siRNA)-mediated silencing of endogenous DAXX expression and genetic ablation of the *Daxx* gene affected the amplitude of circadian gene expression in mammalian cells. In addition, DAXX enhanced the transcriptional capacity of the BMAL1:CLOCK heterodimer, a vital transcriptional activator in the circadian system. Our results reveal a novel function for DAXX as a modulator of circadian clock regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：概日リズム、基本生理機能、転写、分子時計、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

概日リズムはホルモン分泌等の基本的生理現象の周期を外環境に適応させ維持する機構である。この機構の異常は精神（時差症候群、不眠、うつ）、循環器(心筋梗塞、高血圧)、呼吸器(喘息)疾患等の病態に関与している。最近では、近代化がもたらす飽食に伴うメタボリック症候群、老齢化と関連する骨粗鬆症や発癌といった現代生活を脅かす疾患が概日リズムと密接に関係していることが明らかになっている。脊椎動物の概日リズムは全身の個々の細胞に存在する分子時計により制御されている。この分子時計は CLOCK, BMAL1, 及びCRY の3つの蛋白質により構成される転写/翻訳に依存したフィードバックループである。CLOCK と BMAL1 は二量体を形成し、Cry の転写を活性化する。転写活性化されたCRY は翻訳後、CLOCK:BMAL1 二量体に直接結合しその転写を抑制する。過去10年の間にこの分子時計自体の制御機構についての研究は急速に進展してきたが、分子時計がどのように疾患に関与する様々な基本的生理機能を制御しているかについては現時点ではほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は概日リズムの分子時計が基本生理機能を調節する分子機構の解明を目指し、

概日リズムの異常が原因となることが知られている生活習慣病の疾患の発症機構の理解のための基盤的を得ることを目標とする。研究代表者は概日リズム制御蛋白質の酵素活性及び翻訳後修飾に注目して研究を進める。

研究者自身が見出した「CLOCK が BMAL1 をアセチル化することで概日リズムを制御する」という知見は、CLOCK が非ヒストン蛋白質をアセチル化することでターゲット蛋白質の機能調節を行うことを示している。そこで、申請者は「概日リズム制御蛋白質 CLOCK がアセチル化により細胞周期制御因子や核内受容体等の生理機能制御蛋白質の機能調節をするという仮説」を立て研究を進めた。概日リズム制御因子 CLOCK が基本生理機能の調節を担う蛋白質を直接翻訳後修飾しその機能を調節することを証明することで、概日リズムによる生理機能制御の機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

分子時計制御に関して自身が見出した知見を発展的に展開するために、分子時計と細胞のDNA 損傷応答機構の相互関連に注目し解析を行った。質量分析法及び免疫沈降法を用いて、時計蛋白質に結合する新規因子のスクリーニングを行い、(1) キナーゼ Casein

kinase2 α (CK2 α)、(2) DNA 損傷応答因子 DAXX、を BMAL1 と結合する因子として同定した。それぞれの因子に関して特に培養細胞を用いた分子生物学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) キナーゼ CK2 α による分子時計制御

本論文は、キナーゼ CK2 α が概日リズムを制御することを哺乳動物において初めて報告した (Nat Struct Mol Biol 2009)。1)CK2 α が BMAL1 を時間依存的にリン酸化すること、2)CK2 α による BMAL1 のリン酸化は BMAL1 の時間依存的な核内局在を制御すること、3)CK2 α による BMAL1 の細胞内局在の制御は分子時計の周期性の維持に必須であることを見出した。CK2 α は DNA 損傷応答や糖代謝制御等多くの生理機能を制御することが知られている。従って、本研究の知見は分子時計が DNA 損傷応答をはじめとする他の細胞機能と時計蛋白質の翻訳後修飾を介して相互作用することを強く支持する。

(2) DNA 損傷応答制御因子 DAXX の分子時計制御における役割

研究代表者は、ゼブラフィッシュ培養細胞において、概日リズムと DNA 損傷修復を共通に制御するシグナル伝達経路の存在を示した (Cell Cycle 2009)。この研究成果は、哺乳動物においても概日リズムと DNA 損傷応答が共通に制御されている可能性を示唆している。本研究は、哺乳動物における概日リズムと発癌に関連する DNA 損傷応答の相互関連の分子機構を解明するために、DAXX と BMAL1 の結合の分子時計制御における意義を解析した。

DNA 損傷応答因子 DAXX は、哺乳動物においてアポトーシスの制御に関わることが広く知られている。また、DAXX の発現制御の異常と発癌の関係についての報告がある。さらに、

DAXX は、p53、ETS1、E2F1、Pax3 等の多くの転写因子の機能制御を担うことが知られている。本研究において、DAXX が CLOCK:BMAL1 二量体に時間依存的に結合し、その転写能を活性化することが明らかになった。また、本研究は DAXX による CLOCK:BMAL1 二量体の転写能の制御は、分子時計の周期性の制御を担うことを見出した。特に、DAXX の発現を抑制したヒト細胞では、分子時計の周期が 1 日あたり約 5 時間短くなり、3 日目に分子時計の周期の位相の反転が観察された。さらに、時間依存的な DAXX の BMAL1 への結合が HAT 活性を有する CREB-binding protein (CBP) による BMAL1 のアセチル化に依存していることを見出し、分子時計制御に関わる新規の翻訳後修飾として CBP 依存的な BMAL1 のアセチル化を見出した。さらに、DAXX が CLOCK による BMAL1 のアセチル化を抑制することを明らかにした。

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 8 件)

(1) Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, **Hirayama J**, Amin RH, Granneman JG, Piomelli D, Leff T, Sassone-Corsi P. PER2 Controls Lipid Metabolism by Direct Regulation of PPAR γ . *Cell Metab.* 2010 12: 509-20.

(2) Wu J[#], Kubota J[#], **Hirayama J[#]**, Nagai Y, Nishina S, Yokoi T, Asaoka Y, Seo J, Shimizu N, Kajiho H, Watanabe T, Azuma N, Katada T, Nishina H. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls a Switch between Cardiomyocyte and Neuronal Commitment of Murine Embryonic Stem Cells by Activating MEF2C-dependent BMP2 Transcription. *Stem Cells and Development* 2010 19, 1723-1734. ([#]Contributed equally)

(3) Seo J, Asaoka Y, Nagai Y, **Hirayama J**, Yamasaki T, Namae M, Ohata S, Shimizu N, Negishi T, Kitagawa D, Kondoh H, Furutani-Seiki M, Penninger JM, Katada T, and Nishina H. Negative regulation of wnt11 by JNK

signaling is required for convergent extension during vertebrate gastrulation.

J. Cell. Biochem. 2010; 110, 1022-1037.

(4) Nakagawa K, Sugahara M, Yamasaki T, Kajiho H, Takahashi S, **Hirayama J**, Minami Y, Ohta Y, Watanabe T, Hata Y, Katada T and Nishina H. Filamin Associates with Stress Signaling Kinases MKK7 and MKK4 and Regulates JNK Activation.

Biochem. J. 2010; 427, 237-245

(5) Uchida Y, **Hirayama J**^{*}, Nishina H. (2010) A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 535-544. Cover of the issue (*Corresponding author)

(6) **Hirayama J**^{*}, Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, Sawanobori K, Todo T, Yamamoto T, Sassone-Corsi P^{*}, and Nishina H. Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment. *Cell Cycle* 2009; 8, 2794-2801. (*Corresponding authors)

(7) Miyamura N[#], **Hirayama J**^{#,*}, Sawanobori K, Tamaru T, Asaoka Y, Honda R, Yamamoto T, Uno H, Takamatsu K, Nishina H. CLOCK:BMAL-independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochrome1 gene. *Biol. Pharm. Bull.* 2009; 32, 1183-1187. (#Contributed equally; *Corresponding author)

(8) Tamaru T, **Hirayama J**, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, and Sassone-Corsi P. CK2 α phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock.

Nat Struct Mol Biol. 2009; 16: 446-448

[学会発表] (計 5 件)

1. **Hirayama J** Light-dependent transcriptional regulation of zebrafish *Cryptochrome* [15th International Congress on Photobiology/ June 2009, Dusseldorf, Germany]

2. **平山順** DNA損傷応答因子DAXXによる概日リズム制御 [第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム：概日時計の分子制御と時刻リセット/2009 年 10 月 神戸]

3. **平山順** 磁場による概日リズム転写制御

[磁気科学会 有機・バイオ分科会/2009 年 11 月 松本]

4. **平山順** DNA損傷応答因子による概日リズム制御 [第 62 回日本自律神経学会総会 シンポジウム：生体リズム研究の新展開 /2009 年 11 月 和歌山]

5. **平山順** 概日リズムの光入力シグナルと DNA 損傷応答の類似性 [第 19 回千葉視覚研究会/2010 年 2 月 千葉]

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.html>

1

6. 研究組織
(1) 研究代表者
平山 順

研究者番号：90510363

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：