

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21770153

研究課題名(和文)

哺乳類概日時計タンパク質の生化学的解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of mammalian clock proteins

研究代表者

中嶋 正人 (NAKAJIMA MASATO)

独立行政法人理化学研究所・システムバイオロジー研究プロジェクト・研究員

研究者番号： 50432232

研究成果の概要(和文)：

概日時計の基本的性質である周期の温度非依存性(温度補償性)や非線形性をもたらす分子機構を明らかにすることを目的に、哺乳類概日時計タンパク質の生化学的解析を行った。その結果、温度に依存しないPERIODタンパク質のリン酸化を明らかにすることに成功し、さらにこの反応における酵素基質相互作用は、基質のリン酸化状態に依存して大きく変わることが明らかになった。これらの成果は、概日時計の基本的性質が、構成分子の生化学的性質に起因することを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：

The fundamental properties of circadian clocks, such like temperature compensation and nonlinearity, has not been understood. We focus on molecular properties of clock proteins in order to elucidate molecular mechanisms for these properties. The interaction between CKIε and PER-peptide is altered in accordance with phosphorylation states of PER-peptide. These results suggest that the interaction with PERIOD and the enzymatic activity of CKIε are the key processes defining the fundamental properties of the mammalian circadian clock.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：概日時計、温度補償性、リン酸化反応、酵素基質相互作用

1. 研究開始当初の背景

約1日周期で繰り返される概日リズムは、遺伝子発現から個体行動における生命のすべての階層において観察され、長年実験・理論の両面から研究が行われてきた。その結果概日リズムの発生メカニズムとして、時計遺伝子のフィードバック制御を核とした遺伝子発現調節のネットワークモデル（ネガティブフィードバック説）が提唱されている。しかし24時間周期を決定する基本原理や、温度を変えても周期が変化しない（温度補償性）といった概日時計の基本特性がどのような分子メカニズムに依存しているのかといった本質的な問題に関しては十分な回答が得られていない。これは現在の概日時計に関する知見が分子生物学や細胞生物学的手法による定性解析が中心であり、構成分子（タンパク質）の生化学的特性とネットワーク内の素過程（素反応）の定量的知見が不足していることが大きな原因であった。

唯一の例外がシアノバクテリアである。シアノバクテリア概日時計についても時計遺伝子 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* を中心としたネガティブフィードバックが概日リズム発生に中心的な役割を果たしていると考えられていた。しかし我々は、転写・翻訳活性が著しく低下する条件化においても KaiC リン酸化の概日リズムが継続することを見出し (Tomita et al., 2005, *Science*)、さらにはシアノバクテリア時計タンパク質 KaiC のリン酸化状態が KaiA, KaiB, ATP 存在下で約24時間周期の振動をすること、この試験管内 KaiC リン酸化の周期が温度補償されていること、細胞における遺伝子発現の周期と高い相関性を示すことを明らかにし、シアノバクテリア概日時計の中心機構が時計タンパク質のリン酸化であることを明らかにした (Nakajima et al., 2005, *Science*)。

モデル生物における概日時計の構成分子を見ると、モデル生物間でほとんど保存されていない。構成分子は異なるものの、概日リズムの発生がネガティブフィードバックを中心とした遺伝子発現調節のネットワークに依存していることは共通していると考えられている。哺乳類の場合、概日時計を構成する16個の時計（関連）遺伝子間の転写制御ネットワークが同定され、遺伝子・タンパク質レベルでの相互作用ネットワークも明らかになりつつある。しかし24時間周期を決定する基本原理や、温度を変えても周期が変化しない（周期の温度補償性）といった概日時計の基本特性がどのような分子メカニズムに依存しているのかといった本質的な

問題に関しては十分な回答が得られていない。

シアノバクテリア概日時計の成果は、周期の温度補償性や周期の長さなどの概日時計の基本的性質が少数の構成分子（タンパク質）の特性により規定されている可能性を示唆するものである。我々は大規模ケミカルスクリーニングにより、時計タンパク質 PERIOD の安定性と細胞内局在性の制御に関与する casein kinase Iε (CKI ε) のリン酸化反応が概日時計の周期を規定する重要な反応であることを明らかにしつつある。また PER2 のリン酸化部位を参考に設計したペプチド基質の CKI ε によるリン酸化反応が温度補償されていること、この酵素反応の温度依存性が基質の種類と CKI ε の自己リン酸化状態に依存していることなどを明らかにしつつある。これらの知見は哺乳類概日時計の温度補償性などの概日時計の基本的性質をもたらす分子メカニズムを解明する上で重要な手掛かりとなるものである。

2. 研究の目的

哺乳類概日時計研究において、24時間周期を生み出す基本原理や、周期の温度補償性などの概日時計の基本特性がどのような分子メカニズムに依存しているのかといった問題に関しては依然回答が得られていない。我々のシアノバクテリア概日時計や哺乳類概日時計に関する知見は、時計タンパク質の性質が周期や温度補償性などの概日時計全体の挙動を規定していることを示唆している。本提案では、哺乳類概日時計ネットワークの素反応である酵素反応やタンパク質間相互作用の生化学的解析による、周期決定や温度補償性などの概日時計の基本的特性をもたらす分子メカニズムの解明を目的に解析を行った。

我々は既に時計タンパク質 PERIOD の CKI ε によるリン酸化反応が周期決定機構と温度補償性に関与する重要な反応であることを明らかにしつつある。これらの知見は概日時計の周期決定と温度補償性をもたらす分子メカニズムを解明する上で、CKI ε による PERIOD リン酸化反応の反応速度論的パラメーターの定量的理解が必須であることを意味する。本提案では、CKI ε による PERIOD リン酸化反応の生化学的解析と、CKI ε および PERIOD との機能的な相互作用が報告されている時計タンパク質 CRYPTOCHROME, BMAL1, CLOCK の発現・精製を行い、これら時計タンパク質間の相互作用の生化学的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 時計タンパク質の発現・精製系の確立

PERIOD, CRYPTOCHROME, BMAL1, CLOCK の大量発現系の構築、及び精製を行う。BMAL1, CLOCK については既に昆虫細胞を用いた共発現系により発現・精製が行われ、その結果、CLOCK の Histone

Acetyltransferase 活性が報告されている (Doi et al., *Cell*, 2006)。一方、PERIOD、CRYPTOCHROME のタンパク質大量発現は報告されていない。発現系としては大腸菌、昆虫細胞、無細胞発現系を検討し、機能タンパク質の単独発現が困難な場合は、共発現や機能ドメインのみ発現を試みた。

(2) CKI ϵ 酵素反応における酵素基質相互作用の解析

得られた時計タンパク質のタンパク質間相互作用と時計タンパク質を基質としたCKI ϵ 酵素活性の測定を行う。CKI ϵ によるリン酸化により、PERIODはその安定性・局在性が制御されていること、PERIOD およびCRYPTOCHROMEはBMAL1/CLOCKの転写促進活性を阻害していることなどが知られているが、それらの分子レベルでの詳細は不明である。またCRYPTOCHROME、BMAL1もCKI ϵ によりリン酸化されることが報告されている。本提案ではPERIODタンパク質を基質としたCKI ϵ によるリン酸化反応の酵素学的解析、およびリン酸化によるタンパク質間相互作用の調節機構を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 時計タンパク質の発現・精製の試み
哺乳類概日時計における酵素反応およびタンパク質間相互作用について詳細に調べることが目的として、時計タンパク質の発現系の構築を試みた。哺乳類概日時計においてはPERIODが中心的な役割を担うことが知られており、また我々の温度補償性の解析からも、PERIODが哺乳類概日時計の基本的性質と密接に関係していることが示唆されていることから、特にPERIODの発現・精製系の構築を試みた。大腸菌発現系でPERIODの単独発現を試みたところ、可溶性画分への蓄積が認められたものの、ゲルろ過クロマトグラフィーでの溶出パターンから特定の構造をとっていないことが示唆された。そこで他の時計タンパク質との共発現を試みたところ、CKI ϵ と共発現させた場合、PERIODはCKI ϵ と結合した複合体として大腸菌内に蓄積されることが分かった (図1)。

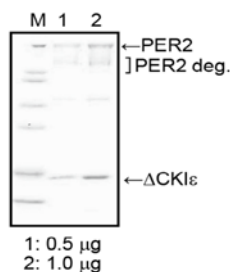


図1 PERIOD-CKI ϵ 複合体の精製

このPERIOD-CKI ϵ 複合体は、その後のイオン交換クロマトグラフィーでの精製時におい

ても分離せず、極めて安定な複合体として精製された。またCRYPTOCHROMEについても大腸菌発現を用いて発現・精製を試みたところ、特定の構造を持っていないことが予想されるものの、精製することに成功した。これらのPERIOD、CRYPTOCHROMEの発現・精製系の確立により、今後タンパク質機能に依存した哺乳類概日時計をもたらす分子メカニズムの生化学的機能解析が可能となることが期待される。

(2) CKI ϵ -ペプチド基質相互作用の解析

我々は哺乳類概日時計タンパク質 PERIOD の細胞内での分解が温度に非依存であり、さらに時計タンパク質 PERIOD のリン酸化部位由来のペプチド基質のCKI ϵ によるリン酸化反応も同様に温度非依存であることを明らかにした。これらの結果は、哺乳類概日時計の温度補償性が、CKI ϵ による時計タンパク質 PERIOD リン酸化反応に起因することを示唆している (PNAS, 2009)。さらにこのリン酸化反応が温度変化に対して頑健であるにもかかわらず、非常に反応速度が遅いことなども明らかになっている。そこで反応速度が遅くかつ温度に非依存なCKI ϵ リン酸化反応がもたらされる分子メカニズムの詳細な解析を試みた。

我々はCKI ϵ リン酸化反応の解析においてPERIODのリン酸化部位由来のペプチド基質を用いたものの、そのペプチド基質内の正確なリン酸化部位は同定されていなかった。そこでPERIODペプチド基質内のリン酸化部位の同定を行ったところ、このペプチド基質内に6ヶ所のリン酸化部位が存在し、その内、最もリン酸化効率の高い2ヶ所のSer残基を同定した (阪大・高尾ら、未発表)。さらにPERIODペプチド基質とCKI ϵ の相互作用を調べたところ、ATP存在下では時間経過に伴い相互作用強度は一旦上昇するものの、その後時間経過に伴い、徐々に低下することが分かった (図2)。

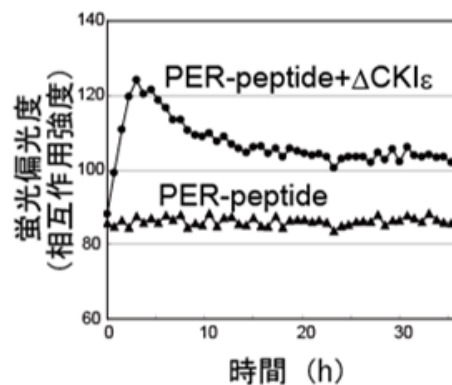


図2 CKI ϵ -ペプチド基質相互作用

この結果は、このCKI ϵ とペプチド基質間の相互作用が、基質のリン酸化状態依存的に変化することを示唆する結果である。そこで同定されたSer残基にリン酸基を導入したペプチド基質を作成し、AMPPNP存在下で相互作用を観察したところ、相互作用の強さは1ヶ所にリン酸基を導入したものが

最も強く、2ヶ所にリン酸基を導入したものとリン酸基を持たないペプチド基質との相互作用強度は同程度で、1ヶ所リン酸化されたものより低かった。これらの結果は、振動発生に必須と考えられている非線形性が、CKIεと PERIOD のリン酸化状態に依存した相互作用変化により生み出されていることを示唆するものである。

(3) まとめと考察

我々は、哺乳類概日時計の周期決定および温度補償性を規定する上で重要な役割を担う反応である、CKIεによる PERIOD リン酸化反応について詳細な解析を試みた。その結果、この反応が温度に非依存であることに加え、その反応速度が極めて遅いこと、複数のリン酸化反応からなる多段階リン酸化反応であること、酵素基質相互作用が基質のリン酸化状態により大きく変わることなどの特殊な特性を持つことを明らかにした。これらの成果は、この反応が周期や温度補償性だけでなく、振動発生に必須とされる非線形性にも密接に関係する反応であることを示唆する。

シアノバクテリア概日時計では、KaiC リン酸化リズムを中枢振動体とするモデルが提唱されている。KaiC リン酸化反応においても、その反応速度が極めて遅いことが知られている。一般に、遅い反応は温度などの環境の変動（摂動）の影響を強く受けると考えられているにもかかわらず、KaiC リン酸化反応や CKIεリン酸化反応などの、概日時計で中心的な役割を担う反応が極めて遅いことは一見矛盾するように思われる。これらの知見は我々が予期していなかった、生命システムの動的挙動の安定性をもたらす未解明な分子メカニズムの存在を示唆するものである。

KaiC は一分子あたり2ヶ所のリン酸化部位が存在するが、KaiC 六量体当たりでは計12ヶ所のリン酸化部位が存在することになる。今回の解析から明らかになったように、CKIεによる PERIOD リン酸化反応においても複数個所のリン酸化部位が同定されている。これらの知見は、反応の遅い多段階リン酸化反応が、種を問わず概日時計の基本的な性質をもたらす分子メカニズムとして重要な役割を担っていることを示唆している。

リン酸化反応はシグナル伝達やタンパク質機能のスイッチとして様々な生命現象で重要な役割を担っており、また概日時計に限らず他の生命現象においても多段階リン酸化反応の関与についての報告がある。本提案を含む概日時計におけるリン酸化反応の解析から得られた成果は、一般的な生命システムにおいても、反応の遅い多段階リン酸化反応が、生命システムの秩序を生み出す極めて重要な反応である可能性を示唆するものである。

本提案では、時計タンパク質の生化学的解

析までには至らなかったものの、哺乳類概日時計の試験管内再構成の試みを支持する結果が得られたと考えている。また、生命システムの秩序を生み出す普遍的な分子メカニズムの解明に繋がるヒントを得ることができたと考えている。

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2件)

- ① 中嶋正人、概日時計研究における生化学および構成的アプローチ、生化学、Vol. 83 (1), 41-45, (2011)、査読無
- ② Nakajima M., Ukai H., Isojima Y. and Hiroki R. Ueda, A Temperature-insensitive reaction in the mammalian circadian clock. Sleep and Biological Rhythms, **7**, 243-251 (2009)、査読無

[学会発表] (計2件)

- ① 中嶋正人、小山洋平、鶴飼英樹、上田泰己、哺乳類概日時計における温度補償性の解析と制御第17回日本時間生物学会学術大会 (2010年11月20-21、東京)
- ② 中嶋正人、小山洋平、上田泰己、概日時計システムの蛋白質科学、第10回日本蛋白質科学会年会 (2010年6月16-18日、札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 正人 (NAKAJIMA MASATO)

独立行政法人理化学研究所・システムバイオロジー研究プロジェクト・研究員

50432232