

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370037

研究課題名（和文） リズムを刻むタンパク質の相互作用機構の解明

研究課題名（英文） Protein interaction analysis of circadian clock protein

研究代表者

中津 亨（NAKATSU TORU）

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50293949

研究成果の概要（和文）：BMAL1 と CLOCK はほ乳類の生物時計において転写因子として働く。通常 BMAL1:CLOCK の bHLH ドメインはヘテロ 2 量体を形成するが、ホモ 2 量体を形成することも知られている。そこでヘテロ 2 量体、ホモ 2 量体と E-BOX 配列との相互作用を ITC により解析したところ、E-box 配列に対する親和性はヘテロ 2 量体の方がホモ 2 量体よりもよいことが判明した。次に bHLH PAS-A ドメインにおいて会合に重要であると考えられるアミノ酸について部位特異的変異導入を行い、ヘテロ 2 量体の会合に与える影響を調べた。その結果、ヘテロ 2 量体の形成は PAS-A ドメインに比べ、bHLH ドメインの方が重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：BMAL1 and CLOCK are the transcription factors of the circadian clock in mammals. The human BMAL1:CLOCK bHLH domain forms hetero or homo dimer and binds to E-box DNA. The hetero dimer of bHLH domain was more preferable to recognize the E-BOX DNA compared to the homo dimer based on the ITC analysis. Next we investigated the region related to the formation of the bHLH PAS-A domain of the human BMAL1:CLOCK hetero dimer. It is suggested that the bHLH domain is more important for the hetero dimer formation than the PAS-A domain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：生体リズム

1. 研究開始当初の背景

地球上のすべての生物は太陽の周期的な変化に行動のリズムを合わせるために、概日リズム機構を獲得してきた。このような 24 時間のリズムはほ乳類においても様々な行動や生理現象に観測されている。24 時間社会

と呼ばれる近年、リズム障害は社会の深刻な問題である。また薬物代謝や薬物効果においても日内リズムが関係しており、近年の医療を考えたときには体内リズムにおける発振機構の詳細を知っておくことは非常に重要である。

ほ乳類においてこのリズムの中核を担っているタンパク質は BMAL1、CLOCK、CRY、PER という 4 種類のタンパク質である。細胞核内において BMAL1:CLOCK 複合体は転写因子としての働きを持っており、*cry* や *per* 遺伝子のプロモーター領域にある E-Box 配列に結合する。すると転写が開始され、CRY、PER タンパク質が合成される。CRY:PER 複合体は細胞核中へと入り、BMAL1:CLOCK 複合体と相互作用することにより、転写活性が抑制される。このようにタンパク質同士、タンパク質-DNA 間の相互作用を巧みに利用し、周期的なリズムを形成している。その中でもほ乳類由来の PER タンパク質には PER1、PER2 というそれぞれ似たタンパク質がリズムにかかわっており、いずれかが発現しない場合のマウスではリズムを刻まなくなっている。しかしながらそれぞれがどのような役割を分担しているのか、またそれぞれのタンパク質の発現がどのように制御されているのかも不明である。

まず BMAL1:CLOCK による転写の部分に焦点を当てた。BMAL1:CLOCK 複合体が認識するとされている E-Box 配列は *per1* と *per2* 遺伝子でわずかに異なっている。通常 E-Box 配列は“CANNTG”という回文配列をしている。*per1* 遺伝子は CACGTG と回文構造になっているものの、*per2* 遺伝子では CACGTT と回文構造にはなっておらず、何らかの転写制御の違いがあることが予想できた。このような違いを明らかにするには立体構造を明らかにすることが最も適している。そこで、BMAL:CLOCK 複合体と *per2* 遺伝子 E-Box 配列を含む DNA との 3 重複合体の X 線結晶構造解析を行った。BMAL:CLOCK 複合体のうち、E-Box を認識する領域についてのみ、大腸菌を用いて共発現することで大量調製することができ、立体構造を決定することができた。E-Box 配列が回文配列になっていないため BMAL と CLOCK が特異的に認識している構造をとらえることができた。

2. 研究の目的

地球上の生物は時を刻む能力を進化的に獲得してきた。このリズムを刻む中心となっているものはタンパク質であり、その発現、相互作用、分解をうまく繰り返すことによりリズムを刻んでいるものと考えられている。そしてほ乳類において、その中心を担っているのが、BMAL-CLOCK および CRY-PER 複合体によるものであると考えられている。そこで、まずは BMAL1-CLOCK 複合体について、転写の際結合する E-BOX 配列との認識がどのようになっているのか、そしてどのようにして複合体を形成しているのか、という点を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト CLOCK:BMAL1 bHLH ドメインの発現、精製：ヒト BMAL1、CLOCK の bHLH ドメインの発現は pGEX6P-1 ベクターを用い、大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、GST 融合蛋白質として発現させた。LB 培地を用い、37 度で培養し IPTG 添加して発現誘導した後、18 度で 20 時間培養した。ヒト BMAL1 bHLH ドメインのホモ二量体は GST タグによるアフィニティー精製、GST タグを切断した後に陽イオン交換精製、そしてゲルろ過を行った。GST-ヒト CLOCK bHLH ドメインは GST タグによるアフィニティー精製、ゲルろ過により精製した。ヒト CLOCK:BMAL1bHLH ドメインヘテロ 2 量体の精製は CLOCK、BMAL1 を等量混合し、GST タグを切断除去したのち、GSH レジンに素通りさせることにより行った。

(2) bHLH ドメインと E-BOX 配列の相互作用解析：bHLH ドメインと DNA との相互作用解析は Auto-iTC200 を用いて行った。タンパク質濃度は Bradford 法、DNA の濃度は 260nm の吸光度を測定することにより求めた。温度は 25 度で行い、200 μ L のタンパク質溶液に対して、DNA 溶液を 2 μ L ずつ滴定することで熱量変化を測定した。結合等温曲線から ΔG 、 $-T\Delta S$ 、 K_d 、 ΔH 、 K_a 、結合比 n を決定した。

(3) ヒト BMAL1:CLOCK bHLH PAS-A の各種変異体における相互作用解析実験：ヒト CLOCK:BMAL1 bHLH、PAS-A ドメインの変異体の発現、精製：発現プラスミドにはヒト CLOCK およびヒト BMAL1 の bHLH、PAS-A ドメイン両タンパク質の C 末端には His タグを hBMAL1 の N 末端には MBP が組み込まれた共発現ベクターである pETDuet を用いた。発現にはこの共発現プラスミドで形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いた。培養は LB 培地を用い、37 度で培養し、IPTG 添加後 18 度 24 時間行った。発現した菌体の超音波破碎を行い、その上清について、His タグによるアフィニティー精製を行った。その後、MBP タグと結合する Amylose レジンに結合させ SDS-PAGE を行い、各バンドの濃さを定量化することにより、CLOCK/MBP-hBMAL1 の値を算出した。

4. 研究成果

(1) hBMAL1、hCLOCK bHLH ドメインホモ 2 量体およびヘテロ 2 量体の E-Box 配列との相互作用解析実験：hBMAL1 bHLH ドメインホモ二量体は、GST タグによるアフィニティー精製、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過の 3 段階で、GST-hCLOCK bHLH ドメインホモ二量体は、GST タグによるアフィニティー精製、ゲル濾過の 2 段階で精製した。1 L 培養あたり、hBMAL1 ホモ二量体は約 12 mg、GST-hCLOCK ホモ二量体は約 60 mg の精製タン

パク質が得られた。

取得したホモ二量体を混合し、GST タグを切断、除去した後にゲル濾過を行なったところ、3つのピークがみられた。SDS-PAGEの結果を合わせて考えると、溶出順に hBMAL1 ホモ二量体、hBMAL1:hCLOCK ヘテロ二量体、hCLOCK ホモ二量体であることが判明した。また、DNA 存在下においてヘテロ二量体およびホモ二量体はいずれも DNA との複合体を形成していると考えられた。同時に、DNA 存在下においては、ホモ二量体よりもヘテロ二量体が優先的に形成されることがわかった。

ヘテロ二量体、ホモ二量体それぞれについて、CACGTG 配列をもつ5つの E-box 配列および CACGTT 配列を持つ1つの E-box 様配列との相互作用解析を行ない、滴定に伴う熱量変化を測定した。データ解析によって得られた結合等温曲線から、 K_d 、 ΔG 、 ΔH 、 $-T\Delta S$ の値を決定した。その結果、ヘテロ二量体およびホモ二量体いずれにおいても、 ΔH は負の値、 $-T\Delta S$ は正の値を示した。従って、いずれの相互作用もエンタルピー駆動型の相互作用であることがわかった。また、ヘテロ二量体およびホモ二量体の ΔH 、 $-T\Delta S$ は、それぞれで異なる値を示した。

認識配列に対する K_d は、ヘテロ二量体、hBMAL1 ホモ二量体、GST-hCLOCK ホモ二量体の順で小さい値を示し、ヘテロ二量体はホモ二量体よりも認識配列に対する結合が強いことがわかった。ヘテロ二量体について、hPer1 および hPer2 に対する K_d を比較したところ、両者の値に顕著な違いはみられなかった。ヘテロ二量体およびホモ二量体それぞれについて、hPer1 に対する K_d を比較したところ、いずれにおいてもその値にばらつきがみられた。さらに、hPer1 に対する K_d の最大値と最小値を比較したところ、その違いはヘテロ二量体では約3倍、hBMAL1 ホモ二量体では約11倍、GST-hCLOCK ホモ二量体では約7倍であった。従って、認識配列前後の配列も結合に関与していることがわかった。そして、ヘテロ二量体はいずれの配列に対しても同程度の結合力を維持する能力が高いことがわかった。

hBMAL1 の His77 に Arg への変異を導入し、hBMAL1_H77R を作製した。この変異体のホモ二量体を野生型と同様の手順で精製したところ、1 L 培養あたり約 5 mg の精製タンパク質が得られた。ホモ二量体と認識配列の相互作用解析を行った結果、H77R 変異体は hPer1E5 に対する結合が強くなる傾向がみられた。

(2) hCLOCK:hBMAL1bHLH PAS-A と hPer2E-box 配列の相互作用解析実験：hCLOCK:hBMAL1bHLH PAS-A 領域は、タグを融合しない場合には安定的に発現できなかつた。そこで

hBMAL1bHLH PAS-A 領域の N 末端側に MBP タグを融合させることにより大腸菌で安定的に発現させることができた。hCLOCK:hBMAL1bHLH PAS-A は His タグによるアフィニティー精製、ゲルろ過クロマトグラフィー、TEV protease による MBP タグ切断、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの5段階により精製した。SDS-PAGE 上 hCLOCK, hBMAL1 がそれぞれ1本のバンドになるまで精製することができ、ヘテロ二量体は単分散性を示した。収量は 1 L 培養あたり約 0.25 mg であった。

精製した hCLOCK:hBMAL1bHLH PAS-A が機能的な構造を保持していることを確認するため hPer2 E-box 様配列との結合をゲルろ過クロマトグラフィーにより評価した。その結果、hCLOCK:hBMAL1bHLH PAS-A と hPer2 E-box との混合サンプルでは2つのピークがみられ、溶出位置はそれぞれ (a) 13.10 mL、(b) 16.10 mL であった。また hCLOCK:hBMAL1bHLH PAS-A および hPer2 E-box 様配列の溶出位置はそれぞれ 13.52 mL、16.04 mL であった。SDS-PAGE において、(a) のピークでは hBMAL1、hCLOCK 両者に相応するバンドがみられ、(b) のピークでは hBMAL1、hCLOCK のバンドが見られなかった。以上より、(a) のピークにおいて hCLOCK:hBMAL1bHLH PAS-A と hPer2 E-box 様配列の複合体が形成していると示唆された。

(3) ヘテロ二量体の形成がどのようになっているかを調べるためには通常それぞれのタンパク質を単離精製したものを、混合することにより相互作用を調べる。しかしながら hBMAL1、hCLOCK の bHLH-PAS-A を大腸菌により発現させ、それぞれ単離することはできなかつた。そこで pETDuet ベクターを用いて共発現させることにより、ヘテロ二量体の形成の割合を定量化する方法を考案した。

共発現させた後、まずは His タグを結合する TALON レジンによるアフィニティー精製をおこなうことにより hBMAL1 と hCLOCK を取得した。次に hBMAL1 に融合した MBP を Amylose レジンと結合させることで、hBMAL1 と結合した CLOCK を得た。SDS-PAGE により MBP-hBMAL1 と CLOCK のバンドの濃さを定量化することにより hBMAL1 に対する CLOCK の結合量が明らかとなり、野生型に対する変異型の hCLOCK/MBP-hBMAL1 の値を較べることで、その変異体がどの程度ヘテロ二量体を形成しやすいかを評価することができる。

野生型と変異体における Amylose レジンに結合したタンパク質の SDS-PAGE を行った。その結果、野生型と PAS-A ドメインの1アミノ酸変異体では 75 kDa、50 kDa、25 kDa 付近に3本のバンドが観察された。そして bHLH ドメインの1アミノ酸変異体では 75 kDa、25 kDa 付近に2本のバンドが観測された。

MBP-hBMAL1, hCLOCK の分子量がそれぞれ 73.5 kDa, 27.7 kDa であることから、75kDa, 25kDa 付近のバンドがそれぞれ、MBP-hBMAL1、hCLOCK であることが示唆された。50 kDa 付近のバンドは Amylose レジンに結合することから MBP を含んでおり、MBP-hBMAL1 の bHLH ドメインまでの分子量が 50.9 kDa であることから少なくとも MBP と hBMAL1 の bHLH ドメインは含まれるタンパク質であると考えられた。このことからこのバンドのタンパク質は hBMAL1, hCLOCK とともに結合している可能性があるため、バンドの定量化の際、75 kDa のものと合わせ MBP-hBMAL1 の値として計算することとした。

まず野生型および変異型の CLOCK/MBP-hBMAL1 の値を算出した。その後野生型に対する変異型の割合を計算することにより、変異型における hBMAL1:hCLOCK 間の結合を定量化した。その結果、bHLH ドメインに変異を導入した 1 残基変異体では 0.3 から 0.6 であった。また 2 残基ないしは 4 残基変異体では 0.2 から 0.3 であり、1 残基変異体に比べてわずかに二量体形成能が低下していた。一方、PAS-A 変異体では 0.6 から 0.8 であった。このことからヘテロ二量体形成には bHLH ドメインが重要であることが示唆された。bHLH ドメインの変異を入れた場所は 4 残基がお互いにファンデルワールス相互作用ができる位置にあり、1 残基変異が導入されればその状態に大きな変化が生じ、二量体を形成しにくくなることが考えられた。Huang (Huang N. et. al Science v337, 189 (2012)) らの結果においても PAS-A 変異体に比べ、bHLH の変異体のほうが二量体形成に大きく寄与していた。

PAS-A ドメインの変異体では hCLOCK の L113E の値が約 0.6 でもっとも小さな値を示した。しかし Huang らの結果ではこの位置の変異は二量体形成にはほとんど影響がないことが示された。一方 E317D 変異体において、Huang らの結果では二量体形成に大きな影響が観測されているが、今回の結果からはそれほど大きな変化は見られなかった。これは PAS-B ドメイン以降の領域の有無により変異体の挙動が異なることが考えられた。

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 5 件)

(1) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of two eukaryotic fructosyl peptide oxidases.

Ichiyonagi A, Hirokawa K, Gomi K, Nakatsu T, Kato H, Kajiyama N.

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst

Commun. (2013) 69(Pt 2):130-3. 査読有 doi: 10.1107/S1744309112051445.

(2) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Pz peptidase B from *Geobacillus collagenovorans* MO-1.

Nakano H, Hosokawa A, Tagawa R, Inaka K, Ohta K, Nakatsu T, Kato H, Watanabe K.

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. (2012) 68(Pt 7):757-9. 査読有 doi: 10.1107/S1744309112018969.

(3) Sato Y, Shibata H, Nakatsu T, Nakano H, Kashiwayama Y, Imanaka T, Kato H. Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. EMBO J. 29 4083-4093 (2010) 査読有 doi: 10.1038/emboj.2010.293.

(4) Terakado K, Kodan A, Nakano H, Kimura Y, Ueda K, Nakatsu T, Kato H. Deleting two C-terminal alpha-helices is effective to crystallize the bacterial ABC transporter *Escherichia coli* MsbA complexed with AMP-PNP. Acta Crystallogr D 66 319-323 (2010) 査読有 doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07072.x.

[学会発表] (計 10 件)

(1) 寺角 香菜子, Naumov Panche, 五味 恵子, 梶山 直樹, 加藤 博章, 中津 亨 ホタル由来ルシフェラーゼのオキシルシフェリンアナログ複合体の高分解能 X 線結晶構造解析 日本生化学会 2012 年度年会 2012/12/14-16 マリンメッセ福岡 (福岡県)

(2) Kanako Terakado, Ryosuke Yoshimune, Keiko Gomi, Naoki Kajiyama, Hideyuki Ikeuchi, Jun Hiratake, Hiroaki Kato and Toru Nakatsu. Structural basis for color modulation mechanism of firefly luciferase bioluminescence 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2012/5/28-6/2 Guelph Ontario, Canada

(3) 寺角香菜子, 吉宗良祐, 五味恵子, 梶山直樹, 池内秀幸, 平竹潤, 加藤博章, 中津亨 ケンシホタルルシフェラーゼの発光色制御メカニズムの解明 日本結晶学会 2011 年度年会 2011/11/24-25 北海道大学 (札幌市)

(4) 寺角 香菜子, 吉宗 良祐, 五味 恵子, 梶山 直樹, 池内 秀幸, 平竹 潤, 加藤 博章, 中津 亨 ゲンジボタルルシフェラーゼの発光色決定メカニズムの解明 日本農芸化学会 2011 年度年会 2011/3/25-28 京都女子大学 (京都市)

(5) 吉宗良祐, 寺角香菜子, 加藤博章, 中津亨 ホタルルシフェラーゼの発光色決定メカニズムの解明 日本結晶学会平成 22 年度年会 2010/12/3-12/5 大阪大学コンベンションセンター (大阪府)

(6) 寺角香菜子、吉宗良祐、五味恵子、梶山直樹、池内秀幸、平竹潤、加藤博章、中津亨
第10回日本蛋白質科学会年会 2010/6/16-18
札幌コンベンションセンター (札幌市)

〔図書〕 (計1件)

(1) 寺角 香菜子、中津 亨 シーエムシー出版、生体 π 空間の制御機構の解明と新機能開発-ホタルルシフェラーゼによる π 空間制御機構- 2013年 223-228

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中津 亨 (NAKATSU TORU)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50293949