

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570199

研究課題名(和文) ABCタンパク質による時計遺伝子の転写後調節機構

研究課題名(英文) Posttranscriptional regulation of clock genes by ABC protein

研究代表者

松本 顕 (Matsumoto, Akira)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40229539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：時計細胞特異的なRNAiスクリーニングでABCタンパク質CG9281を同定した。遺伝子ノックダウン系統や突然変異体は長周期を示し、既知の時計遺伝子のmRNA量に変化が見られた。相互作用因子としてカゼインキナーゼ2を同定したが、突然変異体の行動実験から概日時計への関与経路は独立と考えられた。ドミナントネガティブ変異のin vitroおよびin vivoでの解析から、CG9281は時計遺伝子の自己フィードバックの強さに転写後調節を介して影響し、これにはATP結合領域が関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：CG9281, belonging to the ATP-binding cassette family, was identified as a new clock related gene through the clock cell specific RNAi screening in *Drosophila*. Both the knockdown flies and the transposon insertional mutant of CG9281 showed a longer circadian period and altered mRNA levels in clock genes. Casein kinase 2 (CK2), which phosphorylates the clock proteins PER/TIM, was co-immunoprecipitated with CG9281 although the behavior analysis using CK2 mutants demonstrated that CG9281 affects circadian clock through the different pathway from CK2. Series of luciferase assays and behavior analyses imply that dominant negative mutants, which lacks the function of the second ATP-binding domain of CG9281, enhances the negative auto-feedback effect of PER/TIM, presumably through a post-transcriptional effect.

研究分野：時間生物学

キーワード：ショウジョウバエ 概日リズム 時計遺伝子 ABCタンパク質

1. 研究開始当初の背景

概日時計の分子メカニズムの解明は種を超えて進展しており(Tomioka & Matsumoto, Cell Mol Life Sci, 2010)、振動形成の根幹には時計遺伝子の転写に関する自己フィードバックループという共通原理が存在する。

我々は、概日時計機構の全貌解明をめざし、ショウジョウバエ頭部で周期的に発現する遺伝子群を DNA マイクロアレイによって網羅的に同定し (Ueda et al., J Biol Chem 2002)、それらの遺伝子発現を時計細胞特異的な RNAi 誘導によりノックダウンすることで、複数の新規時計遺伝子を見出してきた (Matsumoto et al., Genes Dev 2007; Itoh et al., Genes Cells 2011)。その過程で、ABC タンパク質である CG9281 が時計遺伝子候補として同定された (Matsumoto & Itoh, Appl Entomol Zool, 2012)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CG9281 の概日リズムへの関与メカニズムを分子レベルで明らかにすることであった。このために、まず CG9281 ノックダウン系統や過剰発現系統を用いた行動レベルでの解析をおこなった。また、培養細胞を用いた時計遺伝子発現への影響を調べ、その機能を推測した。さらに、CG9281 と相互作用する因子を免疫沈降法で取得し、質量分析を行うことでタンパクレベルでの同定を試みた。最後に、CG9281 突然変異体に関する行動レベルでの解析、機能獲得型変異タンパク質の培養細胞を用いた機能アッセイを行い、CG9281 の概日時計への関与メカニズムを考察した。

3. 研究の方法

(1) 実験材料としてキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を用いた。使用した系統は、国立遺伝学研究所 (三島)、Bloomington *Drosophila* Stock Center (アメリカ)、Vienna *Drosophila* Resource Center (オーストリア) などから入手し、標準的な飼料で飼育、交配を行った。方法は Itoh et al. (Genes Cells 2011) に準拠した。

(2) 歩行活動リズムの計測には、特別な事情がない限り、羽化後 1 週間以内のオス成虫を用いた。TriKinetics 社製の *Drosophila* Activity Monitor2 を用いて、個体毎の歩行活動を明暗サイクル(LD12:12)の元で数日間計測した後、恒暗条件(DD)に移して 1 週間以上計測を継続した。DD での周期は、2 ピリオドグラムによって統計解析した。方法は Itoh et al. (Genes Cells 2011) に準拠した。

(3) 各種の分子生物学実験の概略を以下に示す。

・キイロショウジョウバエの培養細胞 S2 での各種ルシフェラーゼアッセイおよび定量的 PCR は Itoh et al. (Genes Cells 2011) に準

拠して行った。

・CG9281 に対する特異的抗体作製は、CG9281 のタンパク質の 5~21 番目の 17aa に対するペプチドを抗原としてモルモットを免疫した (オペロンバイオテクノロジーに作製受託)。

・免疫沈降は特異抗体として抗 V5 抗体 (MBL)、抗 S6 抗体 (CST ジャパン) および本研究で作製した抗 CG9281 抗体を用い、抗体に添付されているプロトコールにもとづき行った。免疫沈降物を SDS 電気泳動した後、分子量ごとに分取し、トリプシン消化して LC-MS/MS (Thermo Scientific) で測定した。得られたペプチド質量データをもとに Mascot (Matrix Science) 検索を行って、それらのペプチドを含むタンパク質の同定を行った。

4. 研究結果

(1) CG9281 の概日特性の解析

時計細胞特異的に発現する pdf-gal4(pdfG4)を用いて、CG9281 塩基配列の一部を 2 本鎖 RNA として強制発現した (pdf>9281R2)。RNAi の誘導により概日リズムは長周期化した (表 1)。独立に作成された pdf>9281KK を用いた遺伝子ノックダウン(KD)でも同様の効果が見られたことから、これは off-target による効果ではなく CG9281 が概日リズムに影響する証拠と考えられた。

CG9281 野生型を強制発現 (over expression; OX)しても(pdf>UAS-9281)、概日周期には影響がなかった (表 1)。次に、CG9281KD をバックグラウンドとして CG9281 の強制発現を行ったところ (pdf>9281R2, UAS-9281)、正常に近い周期に復帰した (表 1)。

表1 CG9281ノックダウンおよび過剰発現系統の概日周期

系統	周期±S.E.M.(hr)	個体数	無周期 個体数
コントロール			
pdfG4	24.08±0.05	24	0
ノックダウン			
pdf>9281R2 (KD)	25.41±0.17*	45	43
pdf>9281KK (KD)	25.54±0.06*	60	15
強制発現(CG9281)			
pdf>UAS-9281 (OX)	24.06±0.03	37	1
pdf>9281KK,UAS-9281 (KD, OX)	24.76±0.16**	22	6
強制発現(vrille)			
pdf>UAS-vri2 (vri-OX)	24.01±0.20	8	3
pdf>9281R2,UAS-vri2 (KD, vriOX)	23.84±0.11**	23	0

*: コントロールと有意差あり(t-test p<0.05)

** : 対応するノックダウン系統と有意差あり(t-test, p<0.05)

ノックダウン系統での既知の時計遺伝子の mRNA 量を、Clk 発現のピーク位相に近い ZT5 と、Clk によって転写が活性化される時計遺伝子 (E-box clock gene) のピーク位相に近い ZT17 で、定量的 PCR によって比較した。Clk ではピークレベルが減少しており、per、tim、vri ではピークレベルの増加が見られた (図 1)。Clk の mRNA 量が減少しているにも関わらず、Clk によって転写が活性化される per、tim、vri の mRNA 量が増加

するのは単純には説明できない。

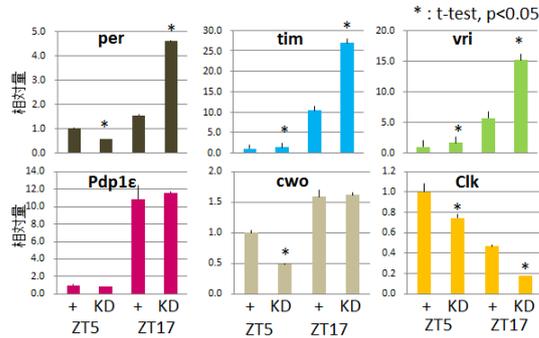


図1 CG9281ノックダウン系統での時計遺伝子mRNA量

そこで、Clkの転写抑制因子であるvriを強制発現し、さらにClk量を減少させたところ(pdf>9281R2, UAS-vri2)、周期の完全な正常化が観察された(表1)。これらの結果は、CG9281KD系統ではper, tim, vriのmRNAが過剰に安定化されると仮定すると説明可能である。すなわち、vri mRNAの増加に伴いVRIタンパク質が増加することで、Clk転写が抑制されるという解釈である。

以前のマイクロアレイ解析結果から、CG9281の発現自体には周期性はなかった(Ueda et al., J Bio Chem, 2002)、CG9281は時計遺伝子の発現量に影響するものの、自身の転写に振動が見られるような、いわゆる”コアの時計因子”ではないことが予想された。

ショウジョウバエの培養細胞(S2)を用いたルシフェラーゼアッセイにより、E-box clock gene 転写への影響を調べた(図2)。

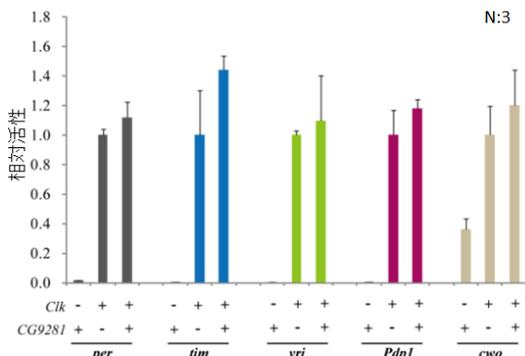


図2 既知の時計遺伝子の発現への影響

CG9281を共発現すると、転写量が増える傾向はあったが、統計的には有意差は検出されなかった。ただし、S2ではもともと高レベルでCG9281が発現されていることが後でわかった(data not shown)、人為的にCG9281の強制発現を行っても、効果が観察されなかった可能性は残されている。これを検証するには、CG9281をノックダウンしたS2細胞で同様の実験を行う必要がある。しかし、CG9281特異的なsiRNAを使った実験に関しては、本研究期間内に結果を得ることはできなかった。

CG9281タンパク質の5番目から21番目の17aaに対するペプチド抗体をモルモットを使って作製した。これを用いて培養細胞S2を蛍光免疫染色した(図3A)、シグナル

は細胞質にのみ観察されたので、CG9281は時計遺伝子のmRNA量に影響するが、核タンパク質ではないことが示唆された。また、CG9281はゲノム解析ではABCトランスポーターに分類されているが膜貫通領域をもたないため、本研究をはじめた当初は、膜貫通領域を持つ別のタンパク質と相互作用して膜輸送に関与する可能性も考慮して研究を進めていたが、この結果から、その可能性は低いと推測した。

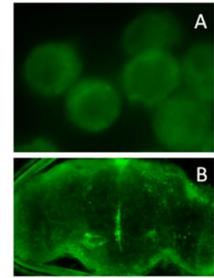


図3 CG9281の局在性 (A)S2 cell, (B)成虫頭部

ショウジョウバエ成虫頭部では脳内の多くの細胞が染色された(図3B)、視髄などで神経線維の染色が顕著であったが、脳内で特異的な領域で発現しているかどうかに関しては特定できなかった。

(2) CG9281と相互作用する因子の検索

CG9281のC末にV5/Hisエピトープ部位を組込んだCG9281V5/Hisを強制発現した培養細胞S2ホモジネートに対して、anti V5-tag抗体などを用いた免疫沈降を行った。共沈降物のSDS-PAGEを行い、分子量ごとにバンドを切り分けて(図4Aの例ではB1~3)トリプシン消化した。これをLC-MS/MSで質量分析し、それぞれのペプチドを含むタンパク質をMascot検索で同定することで、CG9281の相互作用因子の候補を検索した。

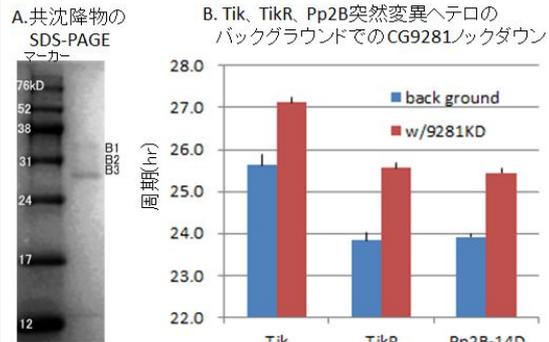


図4 CG9281相互作用因子の検索

既知の時計関連因子としてはカゼインキナーゼ2(CK2)のαサブユニットが見つかった。CK2はTIMタンパク質のリン酸化を通して、PERタンパク質の安定化に影響し(Meissner et al., J Neurosci., 2008)、CK2のATP結合サイトに突然変異を持つTik系統は長周期を示す。また、その復帰突然変異TikRは概日周期が正常化することが知られている。さらに、Tik関連因子としてカルシニユリン(Pp2B)も免疫沈降されていた。そこで、TikおよびTikR、およびPp2B突然変異の各種バックグラウンドでCG9281をノックダウンし、概日リズムに対する相互作用の行動レベルでの推定を試みた。どのバックグラウンドでもCG9281ノックダウンの影響には変化がなかった(図4B)。このことは、

これらの遺伝子と CG9281 は別経路で概日リズムに影響を及ぼすことを強く示唆する。よって、これらの因子は CG9281 と相互作用する可能性は高いが、概日リズムとは別の生体機能に関連しての相互作用であると思われる。

CK2 の他にも多くの翻訳関連因子も同定された。たとえば各種リボソームタンパク質、また、eIF(eukaryotic translation factor) のファミリーである。先行研究でも、膜貫通領域をもたない ABC タンパク質の中には翻訳関連因子として働くものがあることが知られている (Tyzack et al., J Biol Chem, 2000)。そこで、anti Ribosomal protein S6 抗体を用い、免疫沈降法によって翻訳複合体に CG9281 が含まれているかを調べることを試みた。しかし、明瞭な結果が得られず(data not shown)、CG9281 が翻訳関連因子として働くか否かに関しては結論を出せなかった。

(3) CG9281 変異体の解析

CG9281 タンパク質は全長 611aa で、ホモロジー検索から 74~292aa と 386~578aa の 2 つの領域に ATP 結合領域が存在すると予測される (図 5)。

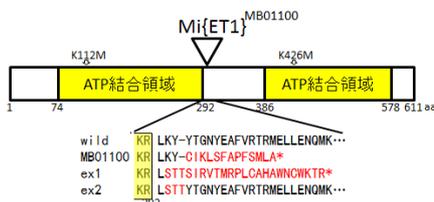


図5 CG9281タンパク質の構造と突然変異

MB01100 系統は CG9281 の open reading frame 内にトランスポゾン Mi{ET1} が挿入されており (図 5) 長周期を示した (表 2)。また、別の時期にストックセンターから移譲された MB01100 系統は、計測した 43 個体の中の 11 個体は無周期、残りは正常な周期 (24.29±0.07hr, N=31) を示した (表 2 には示していない)。同一系統でこのような差異が生じた理由は不明であるが、どちらの系統もリズム異常という面では共通しており、MB01100 系統は CG9281 の突然変異系統であると考えられた。

MB01100 に挿入されているトランスポゾン Mi{ET1} は、挿入部位近傍の時期組織特異的な遺伝子発現を GAL4 でモニターできる (Metaxakis et al., Genetics, 2005)。そこで、MB01100 バックグラウンドで CG9281 の強制発現を行ったところ (MB01100>UAS-9281)、野生型と MB01100 の中間の周期を示した (表 2)。逆に、MB01100 変異遺伝子そのものの発現をノックダウンしても (MB01100>9281R2)、元来の MB01100 表現型から変化しなかった。

トランスポゾン挿入による突然変異は、通常は機能喪失 (null mutation) を引き起こす。しかし、変異型の遺伝子発現をノックダウン

表2 CG9281突然変異系統の概日周期

系統	周期±S.E.M.(hr)	個体数	無周期個体数
挿入型突然変異			
MB01100	25.11±0.15	32	1
強制発現			
MB01100>UAS-9281	24.70±0.10*	44	7
変異型遺伝子のノックダウン			
MB01100>9281R2	25.20±0.22	18	0
トランスポゾン再転移 (Imprecise excision)			
ex1	24.52±0.07*	29	2
ex2	24.98±0.05*	31	0

*: MB01100の周期と有意差あり(t-test p<0.05)

しても表現型に変化がないことは、MB01100 が機能獲得型変異であることを強く示唆する。さらに、CG9281 野生型を強制発現しても表現型の復帰が完全でないことから、MB01100 はドミナントネガティブ型の変異である可能性が高いと考えた。

MB01100 系統に UAS-GFP 系統を交配し、子孫の成虫で CG9281 発現組織を蛍光観察した。CG9281 の発現が脳内の多くの細胞に認められること、視髄の神経線維で発現が顕著なことなど、基本的には抗 CG9281 抗体を用いた

図3の結果が裏付けられた。また、同時に時計細胞で特異的に発現する PDF に対する抗 PDF 抗体による 2 重染色を行う

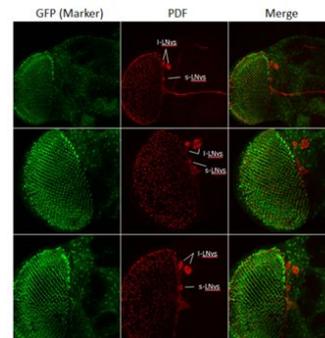


図6 MB01100(C)系統におけるCG9281の発現と脳内の時計細胞

ことで、CG9281 が時計細胞で発現していることも分かった (図 6 赤いシグナル、時計細胞は LN と表記)。野生型と比べて、脳内の時計細胞の位置や個数には変化がなかったので、CG9281 は時計細胞の発生には関与していない可能性が高いことが示唆された。

MB01100 系統の頭部での時計遺伝子の発現の概日変動を定量的 PCR で調べた。cwo をのぞいて、調べた全ての時計遺伝子に関して、ピーク位相での発現量が野生型に比べて半減していることが判った (図 7)。

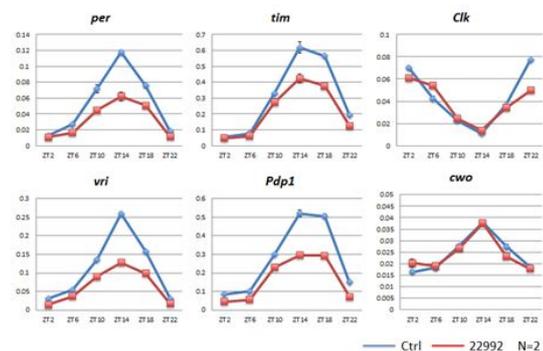


図7 MB01100(C)系統における時計遺伝子発現

一般的に per/tim の転写量の減少は周期延長を引き起こすことが知られており (Matsumoto et al, Mol Cell Biol, 1999)、MB01100 が長周期であることと一致する。

CG9281KDの場合と比べると、ClkのmRNA量が減少していることは一致していたが、E-box clock genesの発現が減少している点では異なる結果となった。MB01100がドミネガタイプの変異であることが影響している可能性があるが、詳細は不明である。

続いて、トランスポゾンの再転移によって、突然変異の誘発を試み、2系統を得た。野生型とMB01100の中間の周期を示すex1系統とMB01100と同等の長周期を示すex2系統である(表2)。

シーケンズ解析の結果、共通して263番目のアミノ酸までは正常であった。ex1では新規23アミノ酸配列が付加された後に終止コドンが生じ、正常の約半分の大きさのタンパク質が発現していることが予測された(図5)。ex2では294、295番目のアミノ酸KYが、STTという3アミノ酸に置換され、以降は野生型と同じ配列のタンパク質が発現していると予測された(図5)。なお、MB01100でのトランスポゾン挿入は296番目のアミノ酸コドン内に起きており、新規13アミノ酸配列が付加された後、終止コドンが生じている(図5)。

MB01100、ex1、ex2の3つで共通しているのは294~296番目のアミノ酸置換であり、この領域のみに変異を持つex2がリズム異常を示すことから、この領域はCG9281が概日時計機構に關与する上で重要と考えられる。この領域はCG9281と同様に膜貫通領域を持たないABCFサブファミリーで非常に保存されており(NCBI pfam12848)、CG9281の296および298~300番目のアミノ酸Y-GNYの保存性はきわめて高かった(data not shown)。

MB01100の解析と並行して、CG9281のATP結合領域の時計機能への影響を調べた。K112Mは前方の、K412Mは後方のATP結合領域のWalker Aドメインに1アミノ酸置換を人為的に導入しており(図5)ATP結合が阻害されると予測される(Paytubi et al., J Biol Chem, 2009)。K112,412Mは変異を両方に持つタイプである。

per-lucまたはtim-lucをレポーターとしたルシフェラーゼアッセイによって、時計遺伝子mRNA量への影響を調べると、per、tim共通して、K112,426MではmRNA量の増加がみられた(図8A、*印、t-test, $p < 0.05$)。K112MとK426Mの効果に関してはperとtimで異なる結果となったが、どちらの場合もmRNA量が増加することは共通していた(図8A)。

次に、PER/TIMによる負の自己フィードバックに対するCG9281変異型の影響を調べた。それぞれの変異タイプを発現させた細胞毎に、PER/TIM共発現をしない場合を1としたtim-lucの相対活性を示す(図8B)。K426MではPER/TIMによる負の自己フィードバック効果が強くあらわれた(図8B、*印、t-test, $p < 0.05$)。これは、後方のATP結

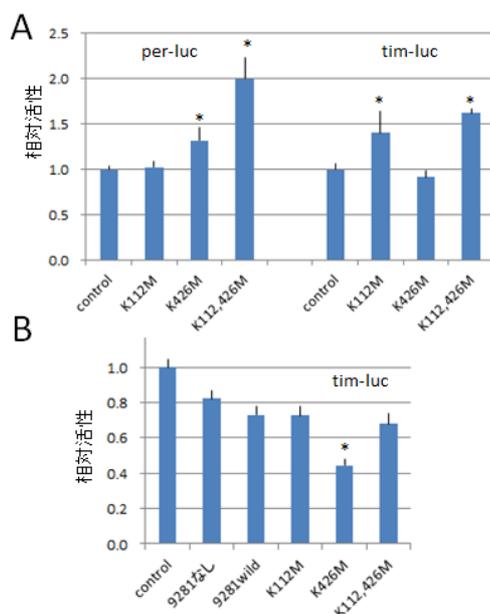


図8 CG9281変異型の時計遺伝子mRNA量(A)およびPER/TIMの負の自己フィードバック(B)に対する影響

合領域を発現しないMB01100系統で時計遺伝子発現が半減していること(図7)と対応している可能性がある。

ABCタンパク質のATP結合領域は通常は一对で機能するとされているが、片方のATP結合領域だけでも機能する場合も知られている(Paytubi et al., Biochem J, 2008)。しかし、両方が機能しない方が強い表現型になると報告されている(Paytubi et al., Biochem J, 2008; Paytubi et al., J Biol Chem, 2009)。時計遺伝子の負の自己フィードバックに対してK426Mのみが影響を与えることは興味深い。

本研究から、CG9281へのATP結合が阻害されると、時計遺伝子のmRNA量やPER/TIMの負の自己フィードバックに影響を及ぼすことが明らかになった。CG9281は核タンパク質ではないこと、CK2とは別の経路で概日時計に關与していると考えられること、またABCFサブファミリーにはmRNAの核外輸送(Kozak et al., J Biol Chem, 2002)や翻訳開始(Paytubi et al., J Biol Chem, 2009)に關与しているものがあることを総合して考えると、CG9281は転写後調節を介して、概日時計機構に關与している可能性が高いと考えられる。

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4件)

Tomioka K., Matsumoto A., Circadian molecular clockwork in non-model insects., Curr. Op. Insect Sci., 2015年、査読有総説、7巻、58-64. (Epub 2014 Dec 19)

DOI:10.1016/j.cois.2014.12.006

伊藤太一、松本顕、ショウジョウバエを用いた概日測時機構解析の40年-第2部 ショウジョウバエ再び-、時間生物学、2013年、査読有総説、19巻、70-78
<http://chronobiology.jp/journal/JSC2013-2-070.pdf>

伊藤太一、松本顕、ショウジョウバエを用いた概日測時機構解析の40年-第1部 ショウジョウバエは再びとべるか-、時間生物学、2013年、査読有総説、19巻、17-25

<http://chronobiology.jp/journal/JSC2013-1-017.pdf>

Itoh T.Q., Matsumoto A., Tanimura T., C-terminal binding protein (CtBP) activates the expression of E-box clock genes with CLOCK/CYCLE in *Drosophila*., PLoS ONE, 2013年、査読有、8巻、e63113

DOI:10.1371/journal.pone.0063113

〔学会発表〕(計1件)

松本顕、伊藤太一、ウリミバエ PER によるキイロショウジョウバエ *per⁰;tim⁰* の周期性の回復、第20回日本時間生物学会学術大会、2013年11月9-10日、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 顕 (Matsumoto, Akira)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40229539