

## 哺乳類生体リズム振動体の設計

### Designing the mammalian biological oscillators

課題番号：18H05270

上田 泰己 (UEDA, HIROKI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授



#### 研究の概要（4行以内）

概日時計は温度補償性に象徴される、堅牢な振動体によって駆動されるが、この設計はあらゆる生物種を通して実現されていない。本研究では、これまで理解が十分でなかった、哺乳類概日時計制御に関わる脱リン酸化活性に着目し、可逆的リン酸化サイクルの再構成と設計を通して、哺乳類概日リズムの動作原理を問い直す。

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：合成生物学、タンパク質リン酸化

#### 1. 研究開始当初の背景

生体リズムは、生命システムの自律制御の基盤を担う。とりわけ概日時計は堅牢な振動体によって駆動される。本研究グループでは、転写翻訳ループが振動体を形成すると信じられていた哺乳類概日振動体について、Casein kinase I (CKI)  $\delta/\epsilon$  の活性が概日時計周期長制御に決定的な役割を果たすこと、さらに驚くべきことに、そのリン酸化活性が温度にほとんど依存しないことを明らかにしてきた。この温度非依存的なリン酸化反応制御機構は、哺乳類概日時計の周期長が温度に依存しないこと、すなわち温度補償性の少なくとも一部を担っている。従って、哺乳類概日振動体の設計原理の一部は、酵素と基質から構成されるリン酸化反応の制御機構に担われていると考えられる。

タンパク質リン酸化は生体内においては、逆反応を触媒する脱リン酸化反応によって可逆的に制御されている。しかしながら、哺乳類概日振動体において脱リン酸化反応を触媒する分子実体は十分に明らかでない。

#### 2. 研究の目的

本研究計画では、哺乳類概日時計制御において CKI $\delta/\epsilon$  のリン酸化反応に特異的に拮抗する脱リン酸化反応を担う実体を明らかにすることを目的とし、

- (1) 脱リン酸化活性の制御機構の生化学的な解明
- (2) 脱リン酸化活性制御機構の個体レベルでの概日時計発振における意義の検証
- (3) 概日時計発振の特性を備えた可逆的リン

#### 酸化サイクルの再構成・設計

の3つの達成目標を掲げて研究を展開する。これを通して、これまで広く理解されてきた転写翻訳ループによる哺乳類振動体の設計原理から、可逆的リン酸化による哺乳類振動体の設計原理へのパラダイムシフトを目指す。

#### 3. 研究の方法

本研究グループは、CKI $\delta/\epsilon$  と人工的に設計したペプチドを用いて、哺乳類概日時計の周期長制御および温度補償性に対応したリン酸化反応を試験管内で再構成する実験系を有している。これを用いて、CKI $\delta/\epsilon$  によるリン酸化反応に拮抗する脱リン酸化反応酵素活性を探索する。さらに、この脱リン酸化酵素活性が、概日時計に関わるタンパク質群によってどのように制御されるのかを、CKI $\delta/\epsilon$  やその基質のリン酸化状態に着目して明らかにする。

試験管内実験系で明らかにした脱リン酸化活性やその制御機構に重要なタンパク質および残基の生体内での重要性を、マウス個体における概日時計因子の機能相補系を用いて、マウス個体の行動周期長へ与える影響を指標として検証する。

これらの実験から明らかになった脱リン酸化活性制御を CKI $\delta/\epsilon$  リン酸化反応の試験管内再構成系に加えることで、可逆的リン酸化反応が哺乳類概日時計の振動体としての性質を示すか検討する。さらに、CKI のリン酸化速度温度非依存性が概日時計機能を持たないとされる酵母 CKI にも保存されてい

ることを鑑み、哺乳類以外の CKI ファミリー・グループやその他のリン酸化酵素についても可逆的リン酸化サイクルの設計を試みる。

#### 4. これまでの成果

CKI $\delta/\epsilon$  は温度非依存的リン酸化に加えて、リン酸化基質の脱リン酸化を触媒することを見出している。この脱リン酸化活性が、もし可逆的リン酸化に基づく振動体の構成に寄与するのであれば、CKI $\delta/\epsilon$  の脱リン酸化活性は基質のリン酸化状態に応じてその活性調整を受けることが予想される。もし、そうでなければ、恒常的な脱リン酸化活性は、リン酸化反応の単なる逆反応となるため、基質リン酸化状態は定常状態に速やかに落ち着き、振動体としては機能しにくいであろう。

そこで、CKI $\delta/\epsilon$  の基質になりうるいくつかのタンパク質に着目し、それらに由来するリン酸化ペプチド存在下での、CKI $\delta/\epsilon$  活性を測定した。その結果、いくつかのリン酸ペプチドは CKI $\delta/\epsilon$  の脱リン酸化活性を変化させることが明らかとなった。

この現象の個体レベルでの意義を解析するために、これまでに開発してきた遺伝子ノックインマウス、ノックインマウスの作出技術、および個体行動解析と全脳全細胞レベルでのイメージング解析技術をさらに発展させ、変異遺伝子を導入した際の、個体行動や細胞活性の変動解析を効率よく行うことが可能となった。

また、数理モデル解析から、リン酸化酵素が脱リン酸化反応も触媒し、その活性が基質のリン酸化状態によって制御されるならば、自律的な可逆的リン酸化振動が惹起されうること、そのために重要である制御点があることを見出した。

#### 5. 今後の計画

特定のリン酸化基質の存在に依存した、CKI $\delta/\epsilon$  の脱リン酸化活性の制御機構の生化学的な詳細を調べる。具体的には、リン酸化基質と CKI $\delta/\epsilon$  の直接的な相互作用様式や、こういった特徴をもつリン酸化基質が CKI $\delta/\epsilon$  の脱リン酸化活性の制御を行うのかを、変異体解析等を通して明らかにする。

この新規 CKI $\delta/\epsilon$  脱リン酸化活性制御機構に寄与するタンパク質領域やアミノ酸残基が明らかになったならば、それらの領域やアミノ酸残基に変異を導入した変異タンパク質を発現するマウス個体を作成し、行動リズムに与える影響を調べる。これにより、CKI $\delta/\epsilon$  脱リン酸化活性制御の個体レベルでの意義を評価する。

また、これらの解析によって重要であることが確認された脱リン酸化活性制御能をもつ基質と CKI $\delta/\epsilon$  を試験管内で反応させることで、振動体としての振る舞いやその一部を可逆的リン酸化を用いて再構成する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Molecular Mechanisms of REM Sleep.  
Yamada R.G., Ueda H.R.  
Front. Neurosci.  
doi.org/10.3389/fnins.2019.01402 (2020)
2. Visualization and molecular characterization of whole-brain vascular networks with capillary resolution  
Miyawaki T., Morikawa S., Susaki E.A., Nakashima A., Takeuchi H., Yamaguchi S., Ueda H.R., Ikegaya Y.  
Nat. commun. 11, 1104-1104 (2020)
3. Tissue clearing and its applications in neuroscience  
Ueda H.R., Ertürk A., Chung K., Gradinaru V., Chédotal A., Tomancak P., Keller P.J.  
Nat. Rev. Neurosci. 21, 61-79 (2020)
4. A period without PER: understanding 24-h rhythms without classic transcription and translation feedback loops  
Millius A., Ode K.L., Ueda H.R.  
F1000Res. 8, 499 (2019)
5. Next-generation human genetics for organism-level systems biology  
Ukai H., Sumiyama K., Ueda H.R.  
Curr. Opin. Biotechnol. 58, 137-145 (2019)
6. Whole-Brain Analysis of Cells and Circuits by Tissue Clearing and Light-Sheet Microscopy  
Mano T., Albanese A., Dodt H.U., Ertürk A., Gradinaru V., Treweek J.B., Miyawaki A., Chung K., Ueda H.R.  
J. Neurosci. 38, 9330-9337 (2018)
7. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents  
Tainaka K., Murakami T.C., Susaki E.A., Shimizu C., Saito R., Takahashi K., Hayashi-Takagi A., Sekiya H., Arima Y., Nojima S., Ikemura M., Ushiku T., Shimizu Y., Murakami M., Tanaka K.F., Iino M., Kasai H., Sasaoka T., Kobayashi K., Miyazono K., Morii E., Isa T., Fukayama M., Kakita A., Ueda H.R.  
Cell Rep. 24, 2196-2210 (2018)

. ホームページ等

<http://sys-pharm.m.u-tokyo.ac.jp/>