

## 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 4 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22770122  
 研究課題名（和文） 時計タンパク質の多彩なリン酸化リズムに支えられた概日時計の振動原理に迫る  
 研究課題名（英文） Approach for circadian oscillatory mechanisms based on phosphorylation rhythms of clock proteins  
 研究代表者  
 吉種 光 (YOSHITANE HIKARI)  
 東京大学・大学院理学系研究科・助教  
 研究者番号：70569920

## 研究成果の概要（和文）：

哺乳類の概日時計システムにおいて、CLOCK と BMAL1 は DNA に結合して転写フィードバックループに貢献する中心的な時計タンパク質である。本研究では、ChIP-Seq 解析により CLOCK が結合する DNA 領域を網羅的に決定した。さらに、RNA-Seq 解析により全ての転写産物の発現プロファイルを正確に記述した。一方で、CLOCK-BMAL1 複合体をリン酸化する酵素として JNK を同定し、KO マウスの解析から概日時計の光入力系における役割を示した。

## 研究成果の概要（英文）：

In the mammalian circadian clockwork, CLOCK and BMAL1 bind to DNA and play an important role in the transcriptional feedback loops. In this study, we performed ChIP-Seq analysis and determined all the CLOCK-binding regions in genome-wide manner. RNA-Seq analysis showed circadian profiles of all the transcripts. Furthermore, we identified JNK as novel protein kinase for phosphorylation of CLOCK-BMAL1 complex, and behavioral analysis of JNK3-KO mice showed that JNK is a key player in the photic regulation of circadian clockwork.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

## 研究分野：機能生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・機能生物化学

キーワード：脳・神経、動物行動、サーカディアンリズム、概日時計、時計タンパク質、リン酸化シグナリング、ChIP-Seq、次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠覚醒リズムやホルモンリズムに代表されるように、さまざまな生理現象が約 24 時間周期のリズム性を有している。この概日リズムは、生物が地球環境の 24 時間サイク

ルに適応して獲得した生理機能であり、概日リズムを生み出す生体計時システムは概日時計と呼ばれている。哺乳類の行動リズムは視床下部の視交叉上核 (SCN) の切除により消失することから、SCN が中枢時計として機

能すると考えられるが、ほぼ全身の組織において細胞一つ一つが時計機能を有しており、これらが同調して大きなリズムを刻んでいる。個々の細胞内では、時計遺伝子の転写と翻訳を介したネガティブフィードバックループが約 24 時間で一周する。bHLH-PAS 型の転写因子である CLOCK および BMAL1 の複合体は E-box と呼ばれる時計シスエレメントに結合して様々な遺伝子の転写活性を促進する。このターゲット遺伝子の中には Per や Cry などの負の転写制御因子が含まれており、転写・翻訳された負の制御因子群は CLOCK-BMAL1 複合体に結合して自らの転写活性促進を抑制する。このように、転写抑制のタイミングは一日の周期を決定する重要な調節ステップである。この転写抑制の際には、CLOCK-BMAL1 が DNA (E-box) から解離することが Dbp 遺伝子のプロモーター領域において示されたが、生体内の数多くの E-box 上で起こっている分子イベントについて統括的な解析は行われていない。本研究では、ChIP-Seq 解析により CLOCK-BMAL1 複合体がリズムに結合している DNA 領域を網羅的に探索すると共に、CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化状態の変化が時計遺伝子の転写リズムを生み出す可能性を検証することにより、概日時計の分子発振原理を探る。

## 2. 研究の目的

約一日周期の生物リズムを生み出す概日時計は生物に普遍的かつ重要な生理機能の一つであり、近年、急進展したリサーチフロントとして注目されている。過去 15 年の分子時計研究においては、時計の構成要素として時計遺伝子が次々と発見され、その転写産物の解析が熱狂的に取り上げられることにより、フィードバックループに基づく分子メカニズムが浮かび上がってきた。しかし実際に歯車として機能しているタンパク質レベルでの解析は大きく立ち遅れているのが現状である。これは、微量しか存在しない転写因子を生化学的に解析することが技術的に困難であったことが要因である。我々は、分子プローブとして高感度かつ特異的な抗体を複数自作することにより、時計タンパク質のユニークな生化学的解析を展開し、CLOCK および BMAL1 のリン酸化が非常に重要な鍵となることを世界に先駆けて報告した[Yoshitane *et al.* Mol. Cell. Biol. 2009]。本研究では、この自作プローブを用いて ChIP 解析を行うことにより、細胞内で CLOCK-BMAL1 複合体が結合している DNA 領域を単離し、これを次世代シーケンサーに供することによって細胞内で実際に結合している DNA 領域を網羅的に同定する。さらに、様々な時刻の細胞を出発材料に同様の ChIP-Seq 解析を行うことにより、数多く

の E-box それぞれの CLOCK-BMAL1 結合リズムを正確に記述することができる。

## 3. 研究の方法

### (1) CLOCK が結合する DNA 領域の決定

マウス肝臓を出発材料に抗 CLOCK 抗体を用いた ChIP 解析を行い、定量的に CLOCK 結合 DNA 断片を回収する実験系を構築する。この条件で、様々な時刻に調整した ChIP 産物を次世代シーケンサーに供する。さらに、様々な時刻にマウス肝臓を単離し、その RNA をシーケンサーに供する。これら ChIP-Seq 解析と RNA-Seq 解析から得られたデータを比較することにより、概日時計の振動実態を正確に記述する。

### (2) CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化制御

CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化リズムがこの複合体の機能リズムを生み出し、最終的に DNA 結合リズムが生じると考えられる。そこで、CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化を触媒するタンパク質キナーゼを同定する。このリン酸化酵素を切り口に、CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化シグナリングが概日時計システムに果たす役割を解明する。

## 4. 研究成果

### (1) CLOCK が結合する DNA 領域の決定

概日リズムは、生物が地球環境の 24 時間サイクルに適応して獲得した生理機能であり、概日リズムを生み出す生体時計システムは概日時計と呼ばれている。哺乳類の概日時計において、時計タンパク質である CLOCK と BMAL1 の複合体は DNA との結合と解離を繰り返す。この約 24 時間周期の DNA 結合リズムは分子発振に重要であるが、その制御機構は謎に包まれていた。我々はこれまで、CLOCK のリン酸化が DNA 結合を強力に抑制することを見出した。本研究ではまず、我々が自作した特異的かつ高感度なモノクローナル抗体を用いて、マウス肝臓を出発材料にした ChIP 解析を行い、定量的に CLOCK 結合 DNA 断片を単離する実験条件を確立した。興味深いことに、我々は様々なエピトープの CLOCK 抗体を自作しているが、抗体が認識するドメインによって ChIP の効率が劇的に違うことが判明した。中でも定量的かつ高効率に ChIP 可能な抗体を用いて、様々な時刻に単離したマウス肝臓を出発材料に ChIP 解析を行った結果、CLOCK タンパク質の DNA 結合リズムを確認することができた。さらに、この CLOCK の DNA 結合は BMAL1-KO マウスでは観察されないことから、CLOCK-BMAL1 複合体の結合を定量的に検出できていることを確認した。交付申請書の提出時点では、この DNA 断片をマイクロアレイ解析に供する計画であったが、より網羅的な全ゲノム解析を目指して、次世代シーケ

ンサーを用いた ChIP-Seq 解析を行った。得られた莫大なデータをもとにスーパーコンピュータを用いて *in silico* 解析を行い、7,978 の CLOCK 結合領域を同定した。

CLOCK の ChIP-Seq 解析と並行して、様々な時刻に単離したマウス肝臓から RNA を抽出し、poly(A)-tailed RNA および small RNA を次世代シーケンサーに供した。この RNA-Seq および small RNA-Seq で得られたデータを *in silico* 解析し、リズムに発現している転写産物を網羅的に決定した。これら Seq データを比較解析した結果、1,126 のリズム的な転写産物のうち CLOCK による転写制御を直接受けるものは 324 と意外にも少なかった。この結果は、これまで考えられていた転写フィードバックを中心とする考え方に加えて、CLOCK-BMAL1 複合体からの間接的なリズム制御の重要性を示唆する。事実、CLOCK の直接的な標的遺伝子の中には多くの転写因子が含まれており、これら転写因子の機能リズムからの二次的な出力が判明した。また、RNA-Seq データを詳細に解析した結果、時刻依存的な選択的スプライシングの存在を見出した。さらに、リズムに発現している miRNA を同定し、その標的遺伝子が逆位相のリズムを示すことを示した。このように、多くの基礎データを切り口に概日時計の複雑な出力機構を明らかにすることができた。

## (2) CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化制御

概日時計は転写翻訳を介したフィードバックループを基本骨格としているが、約 24 時間という非常に長い時を正確かつ安定に刻むためには、時計タンパク質の翻訳後修飾が重要であると考えられてきた。特に PER2 のリン酸化は、そのシグナルの異常がヒトにおいて家族性の睡眠障害をもたらすことも報告されている。我々はこれまで、CLOCK-BMAL1 複合体が時刻依存的なリン酸化制御を受けることを報告してきた [Yoshitane *et al.* Mol. Cell. Biol. 2009]。本研究ではまず、CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化シグナリングに迫るために、リン酸化を触媒するタンパク質酵素を探索し、c-Jun N-terminal kinase (JNK) を同定した。精製タンパク質の混合系および培養細胞への過剰発現系において、JNK は BMAL1 をリン酸化した。さらに、RNAi および阻害剤を用いて JNK を機能阻害することにより、BMAL1 のリン酸化レベルが低下するとともに、細胞リズムの周期が顕著に長周期化することを明らかにした。この JNK シグナリングが個体レベルでも概日時計機構において重要な役割を担うことを示すために、JNK3-KO マウスの行動解析を行った。するとこの KO マウスは、恒暗条件下での行動周期が野生型に比べて長い (KO;  $24.1 \pm 0.1$  hr, WT;  $23.6 \pm 0.2$  hr) こと

に加えて、夜間の光照射に伴う位相シフトが大きく阻害されることが判明した。恒明条件では、アショフの経験則に従って光強度依存的にマウスの行動周期は長くなることが知られているが、JNK3-KO マウスはアショフの経験則に従わず、光強度によらず一定の周期を示すことを見出した。このように、JNK は外界の光情報を CLOCK-BMAL1 複合体にリン酸化シグナルとして伝達することにより、概日時計の周期や位相を決定することを明らかにした [Yoshitane *et al.* EMBO Rep. 2012]

## 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 1 件)

- ① Hikari Yoshitane \* (1 番目), Sato Honma \*# (2 番目), Yoshitaka Fukada # (14 番目) (合計 14 名) (\*equal contribution; #corresponding authors) JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. EMBO Rep., 13, 455-461 (2012) DOI: 10.1038/embor.2012.37 [査読有]

[学会発表] (計 28 件)

1. Hikari Yoshitane, JNK is a key regulator of circadian clock oscillator, 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, 2013 年02月02日, Shiroganedai Campus, The University of Tokyo (Japan)
2. 吉種光, 時計タンパク質CLOCKのChIP-Seq解析と概日性トランスクリプトーム解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡国際会議場 (福岡県)
3. 吉種光, 時計タンパク質CLOCKのChIP-Seq解析と概日性トランスクリプトーム解析、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡国際会議場 (福岡県)
4. 吉種光, 哺乳類の培養細胞を用いた新規位相調節シグナルの探索、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年09月15日、北海道大学 学術交流会館 (北海道)
5. 寺嶋秀騎, CLOCKがリズムに結合するDNA領域の探索、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年09月15日、北海道大学 学術交流会館 (北海道)
6. 今村聖路, ストレス応答性キナーゼJNKがマウス概日時計の制御に果たす役割、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年09

- 月15日、北海道大学 学術交流会館（北海道）
7. 佐上彩、マウス概日時計における新しい同調機構の解析、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年09月15日、北海道大学 学術交流会館（北海道）
  8. 広瀬健太郎、マウスの概日時計を制御する転写因子複合体の生化学的解析、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年09月15日、北海道大学 学術交流会館（北海道）
  9. 布川莉奈、視床下部内側基底部において制限給餌に伴って発現量が増加する遺伝子群の検出、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年09月15日、北海道大学 学術交流会館（北海道）
  10. 深田吉孝、JNK による CLOCK-BMAL1 のリン酸化を介した概日時計の光制御、日本動物学会 第83回大会2012大阪、2012年09月13日、大阪大学 豊中キャンパス（大阪）
  11. Hikari Yoshitane, c-Jun N-Terminal Kinase Regulates the Photic Response of the Mammalian Circadian Clock., SRBR 2012 Meeting, 2012年05月20日, Destin, Florida (USA)
  12. 寺嶋秀騎、マウス肝臓において時計因子 CLOCK がリズムに結合するDNA領域の探索、日本動物学会 第64回関東支部大会、2012年3月17日、東邦大学 習志野キャンパス（千葉県）
  13. 今村聖路、ストレス応答性キナーゼ JNK によるマウス概日時計の制御、時間生物フォーラム東京2012、2012年2月29日、東京大学 理学部3号館（東京都）
  14. 佐上彩、転写因子 E4BP4 を介した新規時計リセット機構の解明、時間生物フォーラム東京2012、2012年2月29日、東京大学 理学部3号館（東京都）
  15. Hikari Yoshitane, JNK phosphorylates BMAL1-CLOCK complex and controls oscillation speed and photic regulation of the circadian clock, Global COE Joint Symposium, Jan 20th, 2012, Koshiba Hall, Hongo Campus, The University of Tokyo (Japan)
  16. Rina Nunokawa, Mediobasal hypothalamus transmits the time of feeding to locomotor activity, 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Jun 2nd, 2011, Nagoya Congress Center (Japan)
  17. 佐上彩、酸性ショックによるマウス概日時計の位相制御機構、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜（神奈川県）
  18. 今村聖路、JNKによるBMAL1のリン酸化を介した概日時計発振速度の調節、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜（神奈川県）
  19. 広瀬健太郎、マウスにおける時計タンパク質 CLOCK の複合体形成とそのリン酸化との相関関係、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜（神奈川県）
  20. 吉種光、CLOCKのDNA結合リズムとその結合部位の探索、第18回日本時間生物学会学術大会、2011年11月25日、名古屋大学（愛知県）
  21. 吉種光、JNKはマウス概日時計システムの振動周期と光入力を制御する、第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、国立京都国際会館（京都府）
  22. Hikari Yoshitane, c-Jun N-terminal kinase phosphorylates BMAL1-CLOCK complex and controls oscillation speed and photic regulation of the circadian clock, Gordon Research Conferences 2011 Chronobiology, Jun 15-16th, 2011, Il Ciocco Hotel and Resort, Lucca, Barga (Italy)
  23. 吉種光、Functional regulation of bHLH-PAS transcription factors CLOCK and BMAL1 in mammalian circadian clockwork、第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会、2010年12月10日、神戸国際展示場（兵庫県）
  24. 吉種光、細胞時計の新しい位相リセットシグナリングの解析、第17回日本時間生物学会学術大会、2010年11月21日、早稲田大学 国際会議場（東京都）
  25. Ngoc-Hien Du、E-boxの周辺配列が転写活性化の制御に寄与する可能性、第17回日本時間生物学会学術大会、2010年11月21日、早稲田大学 国際会議場（東京都）
  26. 今村聖路、CLOCKのリン酸化状態を特異的に識別するプローブ抗体の作製、第17回日本時間生物学会学術大会、2010年11月21日、早稲田大学 国際会議場（東京都）
  27. 布川莉奈、制限給餌に伴う予知行動と遺伝子発現リズム変化の時刻依存性、第17回日本時間生物学会学術大会、2010年11月21日、早稲田大学 国際会議場（東京都）
  28. Hikari Yoshitane, Phosphorylation of CLOCK/NPAS2-BMAL1 complex in suppression of E-box-dependent transcription, 12th Society for Research on Biological Rhythms, 2010年5月24日, Destin, Florida (USA)

〔図書〕(計1件)

吉種光、深田吉孝

実験医学 増刊号 (羊土社)

『シグナル伝達研究の最前線』

ーサーカディアンリズムを生み出す時

計タンパク質の修飾シグナリングー

2012, vol.30, pp94-98

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：間欠駆動機構及びこれを用いた  
給餌装置

発明者：深田吉孝, 布川莉奈, 吉種光

権利者：東京大学

種類：F16H 25/12

番号：CAP11001

出願年月日：2011年3月31日

国内外の別：国内

〔その他〕

主要な原著論文については、研究室 HP の「研  
究ハイライト」のページにて研究内容をわか  
りやすく解説している。

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/research-highlights-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉種 光 (Yoshitane Hikari)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：70569920

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし