

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08217

研究課題名(和文) 蛋白質修飾・結合オシレータが司る時刻依存性適応システム

研究課題名(英文) Time-dependent adaptation system coordinated by protein modification/binding oscillator

研究代表者

田丸 輝也 (TAMARU, Teruya)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：80291706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計の乱れは生活習慣病、癌等の危険・増悪因子となる。日周性・環境への同調性をもつ概日適応システム(CAS)は、時計遺伝子Bmal1等による分子時計を基盤に、全身の多様な生理機能の時間統御を司り、疾患に抗う適応系を束ねる。本研究で、CASを駆動する蛋白質修飾・結合オシレータの中核となる時計転写因子BMAL1の日周性リン酸化の振動機構を解明した。さらにUVに同調応答するBMAL1、ヒートショック応答転写因子HSF1、癌抑制転写因子p53のネットワークによる時刻依存的クロストークの動態/構造基盤を解析し、細胞ストレスによるCASの賦活機序を解明した。本成果はCASを標的とする新たな医療に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Disorder of biological clocks cause /exacerbate lifestyle-related diseases and cancers. Daily oscillating circadian adaptation system (CAS) with synchronizing ability to environments, based on molecular clocks with clock genes, e.g., Bmal1, integrate timings of various physiological functions in whole body, and to coordinate anti-diseases adaptation systems. In this study, I first elucidated oscillatory mechanism for circadian phosphorylation of BMAL1 clock protein, the core of protein modification /binding oscillators to drive CAS. Additionally, I investigated behavior and structural basis for time-dependent crosstalk by networking among transcription factors BMAL1, heat-shock responsive HSF1 and tumor-suppressor p53 during UV-triggered clock synchronization, to elucidate activation mechanism of CAS in response to cell stresses. The achievements lead to novel medicine targeted to CAS.

研究分野：時間生物学

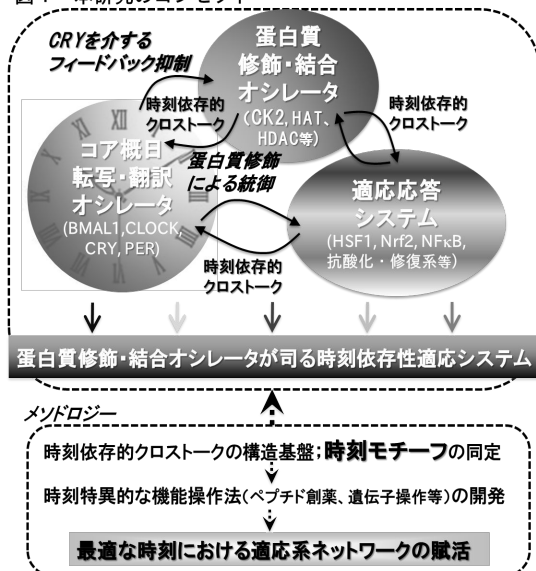
キーワード：circadian rhythm clock gene phosphorylation p53 Bioluminescence
heat shock stress response UV

1. 研究開始当初の背景

環境・ストレス・加齢等による疾病・死に抗う多様な適応系のうち、日周性・環境への同調性をもつ概日適応システムは、コア概日転写・翻訳オシレータ(図1)が駆動する細胞単位の分子時計を中核とする。分子時計では、時計遺伝子の転写-翻訳による負のフィードバックループが時計の中核となる歯車の役割を担っている。この中核ループにおいて、哺乳類では時計タンパク質 BMAL1-CLOCK 複合体が時計遺伝子 Cry1/2, Per1/2 の転写を促進し、その転写産物である CRY1/2, PER1/2 が BMAL1-CLOCK による転写を抑制する一連のプロセスが1日周期で起こる。さらに時計タンパク質の修飾系などで構成される複数の調節ループも加わり、互いに歯車(ギア)として巧みに噛み合っ分子時計が作動している。

概日適応システムはゲノムワイドな日周性遺伝子発現・生理機能の時間統御を司る。現代社会における夜型化、グローバル化は、長い進化の末に獲得した体内時計をベースとした概日適応システムによる適応防御プログラムに作動不全をもたらし、適応(防御・修復)機能の低下による細胞・分子傷害の蓄積による生活習慣病、癌などの様々な疾患のリスクを高めていると考えられる。概日システムによる様々な適応系; 抗酸化系、DNA 修復系、抗アポトーシス系等の統御が判りつつあるが(図1)、適応系ネットワークの時刻依存性統御機序については不明な点が多い。したがって、体内時計をベースとして概日適応システムの作動メカニズムにおけるクリティカルな調節シグナルを理解することは、現代医学における重要な課題である。

図1 本研究のコンセプト



ある生理機能の破綻には、特定の分子機能の不全だけでなく、生理機能システムのネットワーク障害が関わるケースも想定される。概日システムは、ゲノム遺伝子の~10-50%

に相当する生理機能を時刻依存性に統御する可能性がある。よって、概日適応システムの不全による生理機能とくに適応(防御・修復)系の時刻依存性ネットワークの障害は、細胞・分子傷害の蓄積による未病~疾患~慢性化~悪性化の移行の要因となり得る。実際、疾患抑制に重要な様々な適応系の日周性クラスター制御が示唆され、概日時計シグナルを介して適応機能を操作する新たな医療に繋がると考えられる。

研究代表者は、これまで「日周性蛋白質修飾シグナル(オシレータ)が、概日システムを統御する」という独自の説を立て、以下の予備的成果を挙げていた。

中枢時計 SCN において日周活性変動キナーゼ PFK を発見した (J Neurochem 1999)。

PFK のうち同定した CK2 が日周性 BMAL1-Ser90 リン酸化により、BMAL1:CLOCK 転写促進複合体の核移行と日周性遺伝子発現を制御することを解明した (Nat Struct Mol Biol 2009)。

BMAL1 の日周性 SUMO 化 (Science 2005) と Acetyl 化 (Nature 2007) による、安定性と転写抑制因子 CRY への結合の制御、その CK2 による統御(図1)を解明した。

熱ショック・酸化ストレスによる熱ショック転写因子 HSF1 を介する時計同調を発見した (PLoS ONE 2011, 2013)。

ストレス応答性の CK2 リン酸化による HSF1-BMAL1 結合、それをトリガーとする適応系ネットワークの賦活による細胞死抑制を解明した (PLoS ONE 2013) (図1)

2. 研究の目的

本研究は、コア概日転写・翻訳オシレータ、蛋白質修飾・結合オシレータ、適応応答システム間の時刻依存的クロストークの動態、作動機序、構造基盤(時刻モチーフ)を探り、時刻特異的機能操作法を開発し、その時計・適応機能の攪乱・調整効果を調べ、蛋白質修飾・結合オシレータが司る時刻依存性適応システムを解明することを目的とする(図1)。したがって、これらの分子機構の解明は、医学・医療に新たな視点を切り開くことが期待出来る。

本研究の独創性は、「特定の生理現象に直接関与する分子を標的にせず、システムを統御する構造基盤; 時刻モチーフを標的とする機能操作」という研究戦略にある。その為には、概日システムの中核となるオシレータと生理機能系(とくに疾患抑制に関わる適応系)の時刻依存的な蛋白質修飾・結合によるクロストークによる動的ネットワークを解明する必要がある。そして、その蛋白質修飾・結合において鍵となる時刻モチーフをピンポイントの標的とした操作により、疾患に関わる時刻依存性生理機能を Fine-tuning

する新たな医療への貢献が、将来期待できる。

3. 研究の方法

本研究は、上記の背景と研究成果のもと、図1のコンセプトに従い、以下のように遂行した。

時刻依存性制御の中核インターフェースを担うと想定される蛋白質修飾・結合オシレータの振動機序を明らかにした。

コア概日転写・翻訳オシレータ、蛋白質修飾・結合オシレータ、適応応答システム間のクロストークの動態・分子機序・構造基盤(時刻モチーフ)を探索し、解明した。

時刻特異的機能操作法(ペプチド創薬等)を開発した。

時計・適応応答機能の発光・蛍光による検出プローブを開発した。

得られた成果を利用して、細胞・組織レベルにおけるライブモニタリングを駆使し、

生理的条件における時計・適応応答機能の時刻特異的攪乱・調整効果を検討した。

得られた成果を様々な手法によって検証し、オミクス解析等による包括的データと合わせて、

コア概日転写・翻訳オシレータ、蛋白質修飾・結合オシレータ、適応システム間の時刻依存的クロストーク・ネットワークを解明した。

4. 研究成果

本研究では、まず、分子時計の複数の歯車を連動させるクリティカルな歯車(調節ループ)として、CK2 という酵素による時計タンパク質 BMAL1 の日周性リン酸化反応のプロセスを捉え、日周性酵素反応の振動メカニズムを解明した。この振動には、時計タンパク質 CRY の新しい機能である酵素活性(BMAL1 リン酸化)の抑制が重要な役割を果たしていた。

本研究のきっかけは、1) Cry1/2 遺伝子を欠損した時計機能不全細胞において、BMAL1 のリン酸化が常に高いレベルで見られる。2) 正常細胞において、CK2 α (触媒サブユニット) による BMAL1 (の Ser90) の日周性リン酸化が BMAL1-CLOCK 複合体の核移行と日周性時計遺伝子発現をトリガーするという現象である(図2)。今回、まず、BMAL1-Ser90 リン酸化の新規阻害剤を使って、脳の中枢体内時計である視交叉上核や、末梢体内時計の肝臓においても、BMAL1-Ser90 リン酸化がクリティカルな制御プロセスであることを示した。

上記の背景は、CRY 欠損細胞において、BMAL1-Ser90 のリン酸化が常に高いレベルにある可能性を示唆した。本研究では、まず、この可能性を検証した。その結果、1) CRY 欠損細胞では、常に高いレベルの BMAL1-Ser90 リン酸化がおきていることが実証され、日周性リン酸化振動も損なわれていた(図3)。2) 正常細胞では、BMAL1 と CK2 β 調節サブユニットの結合に日周リズムがみ

られ、BMAL1-CK2 β 結合が高い時刻において、BMAL1-Ser90 リン酸化は低い逆位相を示し、同時に BMAL1-CRY 結合は高い同位相のリズムを示した(図3)。3) 試験管内反応で、CK2 β により BMAL1-Ser90 リン酸化が阻害された。これらの結果から、「CRY が促進する BMAL1-CK2 β 結合による日周性阻害が、BMAL1-Ser90 リン酸化リズムを駆動する」ことが示唆された。この予想は、4) CRY 欠損細胞では BMAL1-CK2 β 結合が低下し、その日周性も損なわれていたが(図3)、この細胞に CRY を発現させると日周性 BMAL1-Ser90 リン酸化と BMAL1-CK2 β 結合がともに回復することで裏付けられた。

さらに、ホタルの発光を利用した BMAL1-CK2 β 結合のリアルタイム測定によって、生きた細胞において、1) CRY が BMAL1-CK2 β 結合を促進する 2) 日周性 BMAL1-CK2 β 結合リズムが日周性 BMAL1 リン酸化リズムと逆位相になる 3) CRY の FAD 結合領域と、BMAL1 の C 末端領域の特に CLOCK による BMAL1 のアセチル化修飾部位(Lys537)が CRY 促進性 BMAL1-CK2 β 結合に必要なことを明らかにした(図2,3)。BMAL1 アセチル化制御の重要性の裏付けとして、BMAL1 の脱アセチル化酵素 SIRT1 を欠損しアセチル化が亢進した細胞では、BMAL1-CK2 β 結合が亢進し、BMAL1-Ser90 リン酸化が低下することも示した。逆に、BMAL1 のアセチル化には、BMAL1-Ser90 リン酸化が先行して起こることが必要なことが判った(図3)。

図2は、新たに解明した分子時計の振動メカニズムを示す。CK2 α が BMAL1-Ser90 をリン酸化すると日周性遺伝子発現のスイッチが入る。それによって増えた CRY が、アセチル化をきっかけに BMAL1 に結合し、日周性遺伝子の転写が抑制される。さらに、CRY は BMAL1-CK2 β の結合を促進して、BMAL1 リン酸化活性を抑制する。最後に BMAL1 は脱リン酸化、脱アセチル化され、分解を受けなかったものは次のサイクルで、新規合成された BMAL1 とともに再びリン酸化を受ける。このサイクルが1日周期で起こる。

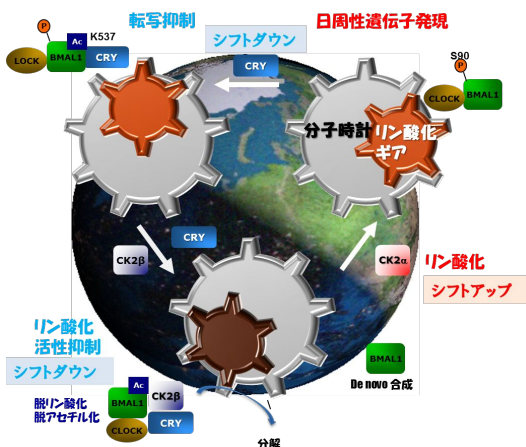


図2 日周性時計タンパク質リン酸化は体内分子時計のギアシフトを担う

CK2 による時計タンパク質 BMAL1 のリン酸化（タンパク質の化学修飾）が引き金（リン酸化ギア）となって、時計遺伝子のコードする CRY タンパク質の発現が促進（シフトアップ）される。CRY は日周性遺伝子発現と日周性 BMAL1 リン酸化の両方を抑制（シフトダウン）する。脱リン酸化されて分解を受けなかった BMAL1 は次のサイクルで、新規合成された BMAL1 とともに再びリン酸化を受ける。このサイクルが一日周期で起こる。

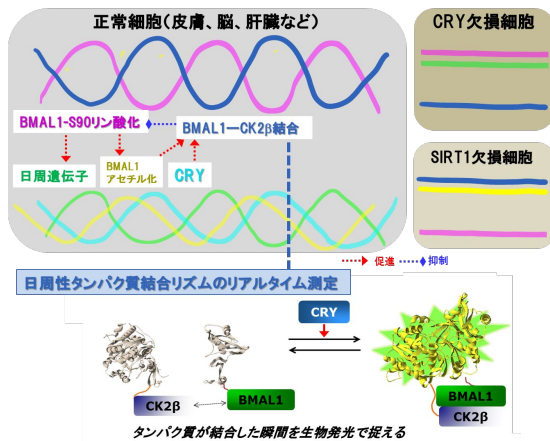


図 3 日周性時計タンパク質リン酸化の振動メカニズムを捉える
 正常細胞にみられる BMAL1-S90（セリン 90）リン酸化の日周リズムは、CRY 欠損細胞では消失し、常に高いレベルとなっている。BMAL1-S90 リン酸化は日周遺伝子発現を亢進し、増加した CRY は BMAL1-CK2β 結合を促進することにより、BMAL1-S90 リン酸化を抑制する。正常細胞では BMAL1-S90 リン酸化と逆位相の日周性 BMAL1-CK2β 結合リズムがみられるが、CRY 欠損細胞では消失し、常に低いレベルとなっている。本研究では、日周性 BMAL1-S90 リン酸化抑制の指標となる BMAL1-CK2β 結合の日周リズムを、ホタルルシフェラーゼの生物発光を利用し、生きた細胞において、リアルタイムで捉えることに成功した。また、BMAL1-S90 リン酸化振動に BMAL1 のアセチル化が重要な役割を果たしていることも示した。脱アセチル化酵素 SIRT1 欠損細胞では、BMAL1 アセチル化と共に BMAL1-CK2β 結合も高いレベルを示し、BMAL1-S90 リン酸化を抑制していた。正常細胞において、BMAL1 アセチル化は CRY を介する BMAL1-S90 リン酸化抑制のトリガーとなる。

本成果は、ヒトの体内時計が関わる生理現象を深く理解し、日周性酵素反応を標的とする新たなアプローチから、生活習慣病、癌、睡眠障害などの医療に貢献することが期待できる。

一方、細胞ストレスとして、UV に応答する BMAL1、ヒートショック応答転写因子 HSF1、

癌抑制転写因子 p53 の時刻依存的クロストークによる適応防御システムの動態を解明し、活性酸素、熱などの細胞ストレスに応答する細胞内シグナルの普遍的な側面を明らかにした（投稿論文改訂中）。さらに、細胞ストレスに応答する概日適応システムの細胞間同期に関わる時計遺伝子上の構造基盤の一部も明らかにした。これらの研究を今後さらに展開することにより、分子時計が司る適応防御システムとその基盤となる細胞内シグナルを包括的に理解し、概日適応システムを基盤とする日周性生体防御系を標的とする新たな医療への応用が期待できる。

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 6 件)

- 1) Tamaru T, Kawamura G, Yoshitane H, Fukada Y, Ozawa T, Takamatsu K: Intracellular signaling to integrate synchronous functioning of circadian adaptation system. J Physiol Sci 68: S61, 2018, 査読無
- 2) Tamaru T, Takamatsu K: Circadian modification network of a core clock driver BMAL1 to harmonize physiology from brain to peripheral tissues. Neurochemistry International, 2018 doi:10.1016/j.neuint.2017.12.013, 査読有
- 3) Tamaru T, Kawamura G, Yoshitane H, Fukada Y, Ozawa T, Takamatsu K: Molecular basis in clock genes to control synchronous circadian oscillation. J Physiol Sci 67: S69, 2017, 査読無
- 4) Tamaru T, Ikeda M: Circadian adaptation to cell injury stresses: a crucial interplay of BMAL1 and HSF1. J Physiol Sci: 66, 303-306, 2016 DOI 10.1007/s12576-016-0436-5, 査読有
- 5) Tamaru T: Protein modification oscillator shifts gear of circadian clock. J Physiol Sci 66: S52, 2016, 査読無
- 6) Tamaru T, Hattori M, Honda K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P, van der Horst GTJ, Ozawa T, Takamatsu K: CRY drives cyclic CK2-mediated BMAL1 phosphorylation to control the mammalian circadian clock. PLoS Biol 13: e1002293, 2015 DOI: 10.1371/journal.pbio.1002293, 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 国内学会
「シンポジウム」

- 1) 田丸輝也, 河村 玄気, 吉種光, 深田吉孝, 小澤岳昌, 高松研: Intracellular signaling to integrate synchronous functioning of circadian adaptation system. 第95回日本生理学会大会, サポートホール高松(香川県高松市), 2018/3月30日(シンポジウムオーガナイザー兼任)
- 2) 田丸輝也, 河村 玄気, 吉種光, 深田吉孝, 小澤岳昌, 高松研: Molecular basis in clock genes to control synchronous circadian oscillation. 第94回日本生理学会大会, アクトシティ浜松(静岡県浜松市), 2017/3月30日(シンポジウムオーガナイザー兼任)
- 3) 田丸輝也: 体内時計のギアシフトを担う蛋白質修飾オシレーター. 第93回日本生理学会大会, 札幌, 2016/3月23日(シンポジウムオーガナイザー兼任)
- 4) 田丸輝也: リアルタイム分子生理学が解き明かす体内時計と適応システムの対話. 第246回日本生理学東京談話会, 東京, 2015/9月26日

「一般発表」

- 5) 田丸輝也, 吉種光, 河村玄気, 小澤岳昌, 深田吉孝, 高松研: 概日リズムの同期プロセスを束ねる細胞内分子イベント. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市), 2017/12/8
- 6) 河村玄気, 田丸輝也, 高松研, 小澤岳昌: 概日時刻依存性のストレス転写因子活性化は紫外光照射への適応応答を制御する. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市), 2017/12/8
- 7) 田丸輝也, 吉種光, 河村玄気, 小澤岳昌, 深田吉孝, 高松研: 細胞概日時計の同期振動を統御する分子シグナル. 第24回日本時間生物学会学術大会, 京都大学吉田キャンパス(京都府京都市), 2017/10/28
- 8) 河村玄気, 田丸輝也, 高松研, 小澤岳昌: BMAL1-HSF1-p53 ネットワークによるUVストレスへの時刻依存性適応応答. 第24回日本時間生物学会学術大会, 京都大学吉田キャンパス(京都府京都市), 2017/10/28
- 9) 田丸輝也, 河村玄気, 吉種光, 深田吉孝, 小澤岳昌, 高松研: 24時間型ライフスタイルを支える分子時計・蛋白質修飾・適応防護システム間連携. 第60回日本神経化学学会大会, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2017/9/7
- 10) 河村 玄気, 田丸輝也, 服部満, 高松研, 小澤岳昌: 紫外光照射による哺乳類概日時計同調における時刻依存性分子応答の解析. 第39回日本分子生物学会

- 年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016/12月1日
- 11) 河村 玄気, 服部満, 田丸輝也, 小澤岳昌: Development of bioluminescent probes to analyze integral role of heat-shock factor 1 in the synchronization of circadian clock. (Grad. Sch. Sci., The Univ. of Tokyo) 日本化学会第96春季年会(2016年3月24~27日)同志社大学 京田辺キャンパス
 - 12) 田丸輝也, 服部満, 河村 玄気, 小澤岳昌, 高松研: 哺乳類日周性時計蛋白質キナーゼCK2の活性振動メカニズム. 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会, 2015/12月1日
 - 13) 河村 玄気, 田丸輝也, 服部満, 高松研, 小澤岳昌: UVによる概日時計同調プロセスにおける熱ショック応答系の統括的役割. 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会, 2015/12月1日
 - 14) 田丸輝也, 服部満, 中畑秦和, 小澤岳昌, 高松研: CRYが駆動する哺乳類時計蛋白質キナーゼの日周活性振動. 第22回日本時間生物学会学術大会 東京, 2015/11月21-22日

2. 国際学会

- 1) Tamaru T, Hattori M, Kawamura G, Nakahata Y, Sassone-Corsi P, van der Horst GTJ, Ozawa T, Takamats K: Circadian oscillating CK2 to control molecular clock. 8th International Conference on Protein Kinase CK2. (Homburg, Germany), Sep 7(6-9), 2016
- 2) Tamaru T, Hattori M, Kawamura G, Nakahata Y, Sassone-Corsi P, van der Horst GTJ, Ozawa T, Takamats K: Cry Drives Cyclic CK2-mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Circadian Clock. SRBR meeting 2016, Palm Harbor, Florida, USA, 2016/5月22日 MAY21-25
- 3) Kawamura G, Hattori M, Tamaru T, Ozawa T: Analysis of molecular mechanisms underlying ultraviolet-C induced circadian clock synchronization using luciferase probes. THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015, Honolulu, Hawaii, USA DEC 15 - 20 (18) 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

・**マスメディア等での情報発信**

・2015年11月13日 東邦大、東大協同プレスリリース

「体内時計を駆動する日周性酵素反応を発見～体内時計の機能不全による様々な疾患の予防や治療への貢献に期待～」

http://www.toho-u.ac.jp/press/2015_index/035254.html

「体内時計を駆動する日周性酵素反応を発見」

<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/10742/>

・2015年11月13日 日経速報ニュース-日本経済新聞

「東邦大と東大、体内時計を駆動する日周性酵素反応を発見」

<http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=400586&lindID=5>

・2015年11月15日 検査技師人材バンク臨床検査技師ニュース

「哺乳類の体内時計を働かせる日周性酵素反応を東邦大と東大が発見」

<https://www.jinzaibank.com/kjb/news/1820.html>

・2015年11月16日 日刊工業新聞（17面）

「東邦大・東大、体内時計をつかさどる酵素活性が1日周期で変動する仕組みを解明」

（電子版）

<http://www.nikkan.co.jp/articles/view/00364618>

・2015年11月16日 化学工業日報（1面）

「体内時計の一端解明 東邦大 東大、時計たんぱく質の酵素反応が関与、睡眠障害など予防・治療に期待」

・2015年11月17日 Q-LifePro-医療ニュース

「体内時計を駆動する日周性酵素反応を発見、睡眠障害などの予防や治療へ期待-東邦大」

<http://www.qlifepro.com/news/20151117/t>

[he-discovery-in-the-circumferential-enzyme-reaction-day-to-drive-the-body-clock-expected-to-prevention-and-treatment-such-as-sleep-disorders.html](http://www.santen.co.jp/medical-channel/op/medicalnews/2015/1117-the-discovery-in-the-circumferential-enzyme-reaction-day-to-drive-the-body-clock-expected-to-prevention-and-treatment-such-as-sleep-disorders.html)

・2015年11月17日 参天メディカルチャンネル

「体内時計を駆動する日周性酵素反応を発見、睡眠障害などの予防や治療へ期待-東邦大」

<https://www.santen.co.jp/medical-channel/op/medicalnews/2015/1117-the-discovery-in-the-circumferential-enzyme-reaction-day-to-drive-the-body-clock-expected-to-prevention-and-treatment-such-as-sleep-disorders.html>

・2015年11月18日 Answers（アンサーズ）製薬業界ニュース

「体内時計を動かす日周性酵素反応 発見」

<http://answers.ten-navi.com/news/5609/>

・2015年11月24日 J-CAST ニュース

「体内時計を動かすメカニズムを発見 がんや睡眠障害に救い」

<http://www.j-cast.com/healthcare/2015/11/24251278.html>

・2015年12月7日 教育新聞（5面）

「体内時計のメカニズム 生細胞で捉え解明へ」

https://www.kyobun.co.jp/comprehensive/s20151207_05/

・2016年3月22日 CIRCL

「世界が注目。日本の大学が体内時計調節をも可能にする？新酵素を発見」

<https://www.circl.jp/13657>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田丸 輝也 (TAMARU, Teruya)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：80291706

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

服部 満 (Hattori, Mitsuru)

東京大学・理学系研究科・特任研究員

研究者番号：20589858

(4) 研究協力者

該当なし