

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15766

研究課題名（和文）概日リズムの多重リン酸化を校正する酵素機能解析

研究課題名（英文）Enzymatic functional analysis for the regulation of circadian rhythm phosphorylation

研究代表者

篠原 雄太（Shinohara, Yuta）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任講師

研究者番号：10755193

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：概日リズムの周期長を決定しているCKI のリン酸化は温度に非依存的なリン酸化(温度補償性)することが知られている。本研究では、CKI に新たな酵素機能として発見した脱リン酸化活性の概日時計における生物学的な意義を探索した。CKI の脱リン酸化を促進させるペプチドを時計タンパク質断片のアミノ酸配列からスクリーニングを行いPER2タンパク質領域にCKI の脱リン酸化と強く相互作用するペプチドがあることを見出した。これらのペプチドはbTrCP領域など概日時計の周期長に影響を及ぼす配列も含まれており、脱リン酸化が周期に影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CKI はリン酸化酵素であるにも関わらず脱リン酸化活性が起こり酵素活性としての2面性を有する。しかしリン酸化酵素における脱リン酸化活性の意義は明らかにされていない。本研究ではCKI の脱リン酸化活性機構の分子メカニズムを生物物理学的なアプローチにより明らかにして、概日リズムにおけるCKI の脱リン酸化活性の意義を結びつけるための、新しい観点を提示できた。

研究成果の概要（英文）：The phosphorylation of CKI, which determines the period length of the circadian rhythm, is known to exhibit temperature compensated phosphorylation, independent of temperature. In this study, we explored the biological significance of the newly discovered dephosphorylation activity of CKI as a novel enzymatic function in the circadian clock. Through screening of peptides derived from the amino acid sequences of clock protein fragments, we identified peptides that promote the dephosphorylation of CKI and strongly interact with the PER2 protein domain. These peptides include sequences that influence the period length of the circadian clock, such as the bTrCP domain, suggesting that dephosphorylation may impact the clock's period.

研究分野：生物物理、時間生物学

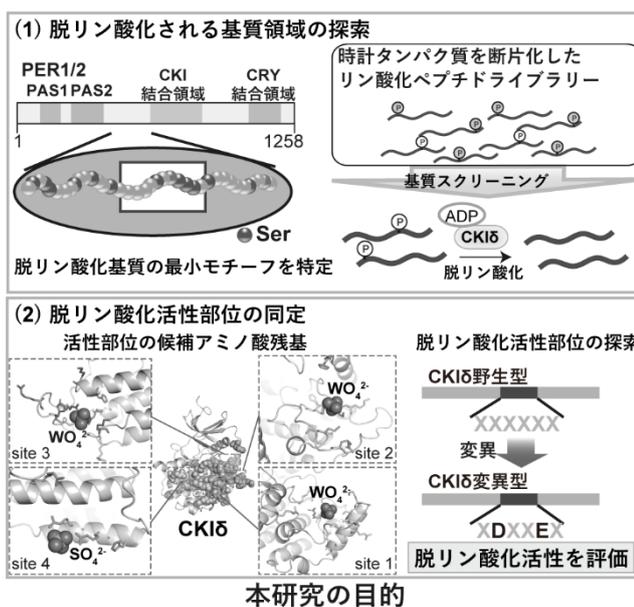
キーワード：概日リズム リン酸化酵素 温度補償性 CKI

### 1. 研究開始当初の背景

概日時計は生命の生存に必須であり、正確な周期性と頑強な温度補償性(温度に依存せず周期長が一定である性質)の特徴を有する生命システムである。近年、哺乳類概日時計では、リン酸化酵素 Casein kinase Iδ (CKIδ)のリン酸化が周期長を決定する律速段階であり、温度に依存せず反応速度が一定であることが明らかになってきた[Isojima Y. et al., PNAS, 2009]。これまでに申請者は、合成生物学的手法により CKIδ の温度に依存しないリン酸化機構を解明し、1950 年代より謎に包まれていた概日時計の頑強な温度補償性の分子機構を明らかにしてきた[Shinohara Y. et al., Mol. Cell, 2017]。今後は、24 時間の正確な周期性がどのような分子機構に基づいて成り立っているのかを十分に理解し、概日リズムを制御することが課題となる。そこで本研究では、概日時計の周期性を正確に同調させる多重リン酸化の分子機構を明らかにし、概日リズムの周期長および振幅を制御可能にする原理を提唱する。

### 2. 研究の目的

本研究は、概日リズムの周期決定を担う CKIδ の脱リン酸化活性に着目し、周期長がどのようにして 24 時間を示し同調しているのかを分子レベルで解明する。この目的を達成するために、1. 脱リン酸化が起こる時計タンパク質の基質領域を同定し、2. 脱リン酸化活性部位を特定して、多重リン酸化に規則性をもたらす空間的なアミノ酸領域を明らかにする。脱リン酸化基質候補は、CKIδ と相互作用する時計タンパク質 PER1/2 と CRY1/2 が有力である。基質領域を同定する手法として、高感度質量分析が挙げられる。しかしリン酸基の負電荷により、3 つ以上のリン酸基を含むペプチド断片はイオン化が困難であるため、高次のリン酸化領域を検出することができない。そこで PER1/2 の断片リン酸化ペプチドを合成し、ペプチドスクリーニングにより脱リン酸化活性の基質領域を同定する(図|上段)。次に脱リン酸化がどのような分子機構 および活性部位で起こるのかを明らかにする。活性部位の候補は、リン酸基と化学的特徴が類似する SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>や WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンが結合するアミノ酸近傍である可能性が高い。したがって、近傍のアミノ酸残基に負電荷アミノ酸やアラニン変異を網羅的に導入後、活性評価して脱リン酸化部位を特定する。(図|下段)。脱リン酸化の作用機序をマイクロの分子として体系化によって叙述するだけでは、必ずしも達成されたとはいえない。酵素-基質のモデルによって野生型とは異なるいくつかの活性を示す変異型をより上位の階層、つまり細胞・個体レベルで実証することができて初めて作用機序を証明する上での十分性を示すことができる。したがって脱リン酸化活性が失活および賦活化された変異型を用いて、概日リズムと脱リン酸化活性の因果関係を示す。



### 3. 研究の方法

#### (1) CKIδ の脱リン酸化基質領域の探索

時計タンパク質 PER1/2 と CRY1/2 が脱リン酸化基質として有力であるため、それらを断片化したリン酸化ペプチドを網羅的に合成し、CKIδ の脱リン酸化基質のスクリーニングを行う。基質スクリーニングは定量的にリン酸化を解析できるキャピラリー電気泳動の原理を用いた実験系と質量分析(MALDI-TOF MS)を併用する。スクリーニングより脱リン酸化基質モチーフを決定し、他の時計タンパク質(BMAL1 や CLOCK など)にモチーフ配列が存在しているかを探索し、必要であれば脱リン酸化活性を評価する。基質モチーフ配列にアミノ酸変異を導入した PER1/2 や CRY1/2 を昆虫細胞より精製し、これらを基質として CKIδ のリン酸化活性を SDS-PAGE によるバンドシフトで観測する。それと並行して試験管内の消費 ATP および ADP 量を、UPLC 測定を用いて定量する。脱リン酸化活性とリン酸化活性の相関性を結び付けるとともに、顕著にリン酸化活性が変化する変異型を特定する。

#### (2) CKIδ の脱リン酸化活性部位の探索

CKI8 の分子動力学シミュレーションより、ATP および ADP 結合型の動的な構造変化の知見を得ている。CKI8 がリン酸化(ATP 結合型)・脱リン酸化(ADP 結合型)の機能を切り替えるためには、周囲の環境に応じて立体構造を変化させ酵素機能を発揮していると考えられる。結晶構造よりリン酸化疑似体イオンが結合する部位および立体構造が著しく変化する領域にリン酸基と静電的に反発するアスパラギン酸(D)やグルタミン酸(E)変異を導入した CKI8 変異型を作製する。変異型の脱リン酸化活性の反応速度(kcat および kcat/Km)を求め、必要であれば等温滴定型カロリメトリー(ITC)を用いて、リン酸基がスルホン酸基に置換された疑似リン酸化ペプチドとの結合定数も測定する。脱リン酸化活性が著しく変化する活性部位を同定し、脱リン酸化を意図的に失活や賦活化できるまで徹底的に分子機構を理解する。

### (3) 概日リズムにおける脱リン酸化反応の意義

(1), (2)より同定した脱リン酸化の基質-酵素の作用機序に基づいて、人工的に脱リン酸化が失活および賦活化した酵素-基質モデルを設計し、脱リン酸化反応が起こるアミノ酸配列の機構を細胞レベルで検討する。改変した CKI8 や基質となる PER1/2 を細胞内で過剰発現もしくはゲノム改変技術によるノックインレスキューを行い、概日リズムの変化を観察する。PER1/2 にルシフェラーゼを連結させ、生物発光により概日リズムを測定する。脱リン酸化活性を基質-酵素の組み合わせにより制御して、細胞における概日リズムの任意の周期長や振幅を創出していく。それらの結果から、なぜ概日時計が正確に 24 時間周期を維持および同調機構を分子レベルで明らかにしていく。

## 4. 研究成果

本研究は概日時計の周期を決定している CKI8 の脱リン酸化活性に着目し、多段階なリン酸化が 1 日 24 時間の正確性を示す分子メカニズムの解明を目的としている。時計タンパク質由来のペプチドライブラリーから CKI8 の脱リン酸化基質をセレクション可能な評価系を構築し、脱リン酸化活性を促進させるペプチドを発見した。さらに CKI8 の脱リン酸化活性部位の結晶構造を基にリン酸化認識部位を推測して、点変異体を導入して、CKI8 の脱リン酸化活性部位を同定している。さらに脱リン酸化機構の仕組みを明らかにするために、等温滴定型カロリメトリー(ITC)や表面プラズモン共鳴法(SPR)などを用いて脱リン酸化を促進させるペプチドと CKI8 との結合定数を評価した。また今後の展開としては、シロイヌナズナなどの個体で温度補償性の変化を観測しやすい生物種におけるリン酸化酵素に 対しても、脱リン酸化の意義を検討していく。

また CKI8 の脱リン酸化機構の解明をしていく過程で、CKI8 と相互作用をする時計タンパク質 CRY が PP2 と強く結合して、PER2 のリン酸化を脱リン酸化させることを見出している。CRY-PP2 複合体の転写活性は概日リズムの多段階なリン酸化に関与している可能性が示唆しているため、脱リン酸化を制御することで概日リズムの周期長を変化できることが示唆される。in vivo のマウス表現型に関してはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、時計遺伝子ノックアウトマウスに遺伝子導入するレスキュー系を構築してきた。CRY1/2 のダブルノックアウトマウスに AAV による表現型のレスキュー系は構築済みである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Shiina Matsuyama, et al.   | 4. 巻<br>211         |
| 2. 論文標題<br>GM-CSF Promotes the Survival of Peripheral-Derived Myeloid Cells in the Central Nervous System for Pain-Induced Relapse of Neuroinflammation. | 5. 発行年<br>2023年     |
| 3. 雑誌名<br>Journal of immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>34-42 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.4049/jimmunol.2200567  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-           |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takeshi Yamasaki, et al.  | 4. 巻<br>35            |
| 2. 論文標題<br>Zoobiquity experiments show the importance of the local MMP9-plasminogen axis in inflammatory bowel diseases in both dogs and patients | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>International immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>313-326 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/intimm/dxad006   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Reiji Yamamoto, et al.  | 4. 巻<br>35            |
| 2. 論文標題<br>Computer model of IL-6-dependent rheumatoid arthritis in F759 mice | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>International immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>403-421 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/intimm/dxad016                             | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kaoru Murakami, et al.   | 4. 巻<br>23              |
| 2. 論文標題<br>High-precision rapid testing of omicron SARS-CoV-2 variants in clinical samples using AI-nanopore | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Lab on a chip  | 6. 最初と最後の頁<br>4909-4918 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1039/d3lc00572k  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yuta Shinohara   |
| 2. 発表標題<br>Timekeepers of the mammalian circadian clock regulate post-translational modifications |
| 3. 学会等名<br>第61回日本生物物理学会年会（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|