

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681009

研究課題名(和文) DNA損傷シグナルによる概日リズム制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of circadian clock by DNA damage stress

研究代表者

平山 順(Hirayama, Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：90510363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムは、生物の代謝や睡眠/覚醒といった生命現象に日周変動を与えその位相を外環境の明暗周期に同調させることにより生体の恒常性を維持する。この生体リズムは生物に内在する分子時計に形成される。疫学的な解析や分子時計制御因子の変異マウスの生理学・解剖学的解析により概日リズムと発癌といった疾患の関連が報告されている。本研究は、分子時計と発癌に関連するDNA損傷応答の関連の分子メカニズムの解明を目的に行い、ストレス応答性のMKK7-JNKシグナルが分子時計制御を担うことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks are intrinsic, time-tracking systems that endow organisms with a survival advantage. Studies of animal models and human tumor samples have revealed that the disruption of circadian rhythms is an important endogenous factor that can contribute to mammalian cancer development. The core of the circadian clock mechanism is molecular clock, a cell-autonomous and self-sustained oscillator system. This study tried to identify a molecular link between the molecular clock and DNA damage responses and have found that the stress kinase mitogen-activated protein kinase kinase 7 is a regulator of the molecular clock in mammalian cells.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：概日リズム DNA損傷応答 放射線 時計蛋白質

1. 研究開始当初の背景

概日リズムとは、生物の代謝や睡眠/覚醒といった生命現象に日周変動を与え、その周期位相を外環境の明暗周期に同調させることにより生体の恒常性を維持する機構である。概日リズムは、入力系、ペースメーカー、および出力系の3つのコンポーネントにより構成される。ペースメーカーは生命現象の約24時間の周期性を作り出す機構であるが、その実体は細胞自律的に制御される分子時計である。この分子時計に光といった外環境からのシグナルが伝達されその周期を外環境周期に同調させる過程が入力系である。さらに、分子時計が生命現象に日周性を与える過程が出力系である。

脊椎動物の分子時計は転写活性化因子 CLOCK、BMAL 及び転写抑制因子 CRY、PER の時計蛋白質により構成されるネガティブフィードバックループである。CLOCK は BMAL と二量体を形成し *Cry* (哺乳動物においては *Cry1* と *Cry2*) 及び *Per* (哺乳動物においては *Per1*, *Per2* および *Per3*) 遺伝子の転写を活性化する。一方、CRY と PER は CLOCK:BMAL1 二量体に直接結合しその転写活性を抑制する。分子時計の転写の活性化と抑制の周期は約 24 時間になるように調節されており、従って分子時計の標的遺伝子の発現及び標的遺伝子の制御する生理機能には日周性が与えられる。

疫学的な解析や *Bmal1* や *Clock* などの分子時計制御因子の変異マウスの生理学・解剖学的解析により概日リズムと発癌といった疾患の関連は現象として多く報告されている。また、分子時計と発癌に関連する DNA 損傷応答の相互関連の可能性を示唆する知見が報告されているが、その分子機構に関しては不明な点が多く存在する。

2. 研究の目的

本研究は、概日リズムを制御する分子時計が酸化ストレスなどのDNA損傷シグナルに

応答するメカニズムを解明することを目的に行った。特に、本研究はストレス応答性 MAPKシグナル伝達系の一つであるJNKシグナル経路に注目した。c-Jun N-terminal kinase (JNK) は、MAP kinases (mitogen-activated protein kinase: MAPKs)に分類されるリン酸化酵素で、JNK1・JNK2・JNK3のサブタイプが存在する。JNKの上流のリン酸化酵素として、MKK4とMKK7が同定されている。DNA損傷や酸化ストレス、浸透圧ストレスなどの刺激に応答し、MKK4およびMKK7がJNKの活性化に必要なTPYモチーフのスレオニン及びチロシン残基のリン酸化を行なうことで相乗的にJNKの活性を制御している。本研究は、このMKK7-JNKシグナルが分子時計制御を担うことを見出し、その分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

[細胞培養と遺伝子導入]

MEF、293T細胞および293gag細胞は10%のウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen)中で培養した。ES細胞は、15%のウシ胎児血清、0.1% 2-メルカプトエタノール、leukemia inhibitory factor (propagation medium)を添加した DMEM (GIBCO)中で培養した。培養細胞への遺伝子導入には FuGENE HD (Roche)を用いた。

[レポーター遺伝子安定発現培養細胞株の樹立とリアルタイムルシフェラーゼ解析]

線形化した mPER2 promoter (1.8kb)-luciferase-pGL3basic 7ug と pcDNA3.1 1ug を *MKK7^{flxed}* マウスから得た MEF に遺伝子導入し、ゲノムにレポーター遺伝子が組み込まれた MEF を複数クローン得た。これらのクローンの中から luciferase 活性の高い2つのクローンを選択し、*PER2-Luc Mkk7^{flxed}* MEF #1 及び *PER2-Luc Mkk7^{flxed}* MEF #2 として実験に用いた。

培養細胞への感染実験は RetroMax

expression system (IMGGENEX, San Diego, CA) を用いて行った。NLS-Cre-pCLNCX または Myc-GFP-pCLNCX (7 μ g)とエンベロープベクター-pMD.G/vsv-g (3 μ g)を 293gag 細胞に遺伝子導入し GFP または NLS-Cre を発現させるレトロウイルスをそれぞれ産生させた。レトロウイルスを含む培地を回収し、ポリブレン存在下で目的細胞にレトロウイルスを感染させた。

[半減期解析とユビキチン化解析]

Myc-PER2 及び Myc-GFP と共に MKK7-JNK1 を発現させた 293T 細胞を 3.5cm デッシュに播種した。終濃度 20 μ M シクロヘキシミドを添加した後、経時的に細胞を回収しウエスタンブロッティングにより PER2 蛋白質量を定量し、PER2 の半減期を解析した。Myc-PER2 を HA-Ubiquitin と共に 293T 細胞に遺伝子導入し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養した。細胞を 1% SDS buffer (1% SDS in TBS)で溶解し、100 $^{\circ}$ C で 10 分間ボイルした。細胞溶解液を incubation buffer (1% Triton X-100 in TBS)で 10 倍に希釈し、Myc 抗体を用いて PER2 を免疫沈降した。免疫沈降した PER2 を、HA 抗体を用いてウエスタンブロッティングすることでユビキチン化 PER2 を検出した。

4. 研究成果

1 MKK7欠損細胞における分子時計の転写制御

*Mkk7^{flxed}*マウスから樹立したマウス胚性線維芽細胞 (MEF)に *Per2* プロモーター (1.8kb) の下流でルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を組みこんで2つの細胞クローンを得た(クローン1および2)。これらのレポーター細胞に、レトロウイルス感染により Cre-recombinaseを組み込んでMKK7をノックアウトした。100nMのdexamethasone(DEX)処理を行い培養細胞のリズムを同調させた後、リアルタイム発光検出器Kronos (ATTO)を用い

10分毎に細胞の発光量を測定した結果、クローン1及び2のコントロールの細胞では、時計標的遺伝子の22.0時間及び21.8時間周期の発現変動がそれぞれ観察されたのに対して、クローン1及び2の *Mkk7* ノックアウト細胞では遺伝子発現の周期が23.8時間及び23.8時間と顕著に伸長した。この結果から、MKK7は培養細胞の分子時計の周期性の維持にも関与する可能性が示唆された。

2 MKK7-JNK1シグナルの標的分子の探索

MKK7-JNK シグナル経路の標的となる時計蛋白質を同定するために、MKK4 ならびに MKK7 のダブルノックアウト ES 細胞と野生型の ES 細胞における JNK のリン酸化及び時計蛋白質の発現量を比較した。その結果、MKK4/MKK7 ダブルノックアウト細胞では、JNK のリン酸化が低下しているのに加え、時計蛋白質 PER2 の発現量が顕著に低下していることを見出した。一方で CLOCK、BMAL1 及びCRY1の発現量はMKK4/MKK7ダブルノックアウト細胞と野生型細胞間で差は認められなかった。従って MKK7-JNK1 シグナル経路が PER2 の発現量制御に関わっている可能性が示唆された。

3 MKK7-JNK1 シグナル経路の PER2 蛋白質安定性への影響の検討

MKK7 と JNK1 を融合すると、この融合蛋白質内では MKK7 による JNK1 のリン酸化が恒常的に起こるため、MKK7-JNK1 は JNK1 の恒常的活性化体として機能する。興味深いことに、293T 細胞に MKK7-JNK1 と Myc-PER2 を共発現させると、MKK7-JNK1 (WT)の濃度依存的に PER2 の発現量が顕著に増加した。次に MKK7-JNK1 シグナル経路が PER2 の半減期に及ぼす影響を検討した。293T 細胞に Myc-PER2 と共に、MKK7-JNK1 (WT)を発現させた後、蛋白質翻訳阻害剤シク

口ヘキシミドを添加し、経時的に細胞を回収した (図 3B)。その結果、MKK7-JNK1 (WT) の共発現により PER2 の半減期が顕著に増加した。

PER2 はユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが報告されている。そこで MKK7-JNK1 シグナル経路の PER2 のユビキチン化に及ぼす影響を検討した。Myc-PER2、MKK7-JNK1 と共に、HA-Ubiquitin を 293T 細胞に発現させ細胞を回収した。細胞溶解液より PER2 を免疫沈降し、PER2 のユビキチン化を、HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。これまでの知見通り、PER2 を単独で細胞に発現させると、PER2 のユビキチン化が観察された。一方で、この PER2 のユビキチン化は、MKK7-JNK1 (WT) の共発現により顕著に低下した。以上より、MKK7 によって活性化された JNK1 がそのリン酸化酵素活性依存的に、PER2 のユビキチン化を阻害し安定化を誘導している可能性が示唆された。

本研究では、上記の研究に加え、新規ゲノム編集技術 TALEN を用いて、遺伝子改変ゼブラフィッシュを作出するシステムを導入し、既に DNA 損傷応答に関わることが示唆されている分子時計制御因子の機能阻害個体を複数作出した。また、ゼブラフィッシュの行動解析システムを準備した。今後はこれらのシステムを用いて、分子時計制御と DNA 損傷応答の関連について個体レベルで解析を進めていくことを計画している。

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 7 件)

1. Shimomura T, Miyamura N, Hata S, Miura R, Hirayama J#, and Nishina H#. The PDZ-binding

motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 206-210. 2013.

2. Egg M, Köblitz L, Hirayama J, Schwerte T, Folterbauer C, Kurz A, Fiechtner B, Möst M, Salvenmoser W, Sassone-Corsi P, and Pelster B. Linking oxygen to time: The bidirectional interaction between the hypoxic signaling pathway and the circadian clock.

Chronobiol. Int. 30, 510-529. 2013

3. Uchida Y, Osaki T, Yamasaki T, Shimomura T, Hata S, Horikawa K, Shibata S, Todo T, Hirayama J#, and Nishina H.

Involvement of the stress kinase Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7 in the regulation of mammalian circadian clock.

J. Biol. Chem. 287, 8318-8326. 2012.

4. Hata S, Hirayama J, Kajiho H, Nakagawa K, Hata Y, Katada T, Furutani-Seiki M, and Nishina H. A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents.

J. Biol. Chem. 287, 22089-22098. 2012.

5. Uchida Y, Shimomura T, Hirayama J#, and Nishina H. Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activate ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells.

Appl. Magn. Reson. 42, 69-77. 2012.

6. Osaki T, Uchida Y, Hirayama J#, and Nishina H. Diphenyleneiodonium Chloride, an Inhibitor of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase, Suppresses Light-Dependent Induction of Clock and DNA Repair Genes in Zebrafish. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1343-1347. 2011.

7. Uchida Y, Hirayama J#, and Nishina H. A common origin: signaling similarities

in the regulation of the circadian clock and
DNA damage responses *Biol. Pharm.*
Bull. 33, 535-544. 2010.

和文総説

1. 平山順[#]、仁科博史 酸化還元ホメオスタシスと概日リズム：**医学のあゆみ** (2013)
2. 平山順[#] 時計タンパク質の翻訳後修飾と分子時計制御：**ファルマシア** 48: 285-289 (2012)
3. 平山順[#]、仁科博史 活性酸素シグナルと概日リズム：**実験医学** 11月増刊号 (2012)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 平山順 ストレス応答キナーゼによる概日リズム制御 [第 19 回日本時間生物学会学術大会： 生物時計と時を刻む分子の翻訳後修飾制御/2012 年 9 月 札幌]
2. 平山順 ストレス応答キナーゼによる概日リズム制御[第 35 回日本分子生物学会年会： DNA 損傷応答研究の新境地/2012 年 12 月 福岡]
3. **Hirayama J**, Osaki Tomomi, and Nishina H Light-dependent regulation of zebrafish circadian transcription [Spin Chemistry Meeting 2011 / May 2011, Noordwijk, Netherlands]
4. **Hirayama J**, Shimomura T, Osaki T, and Nishina H Identification of novel kinase phosphorylating CRYPTOCHROME 1 to regulate its protein stability [5th Asia and Oceania Conference for Photobiology/ July 2011, Nara, Japan]
5. **Hirayama J**, Light-dependent transcription of circadian clock [Developmental Biology Seminar in University of Bath / November 2011, Bath, UK]

〔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
<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
平山 順 (Hirayama, Jun)
東京医科歯科大学 難治疾患研究所・
准教授
研究者番号：90510363

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：