

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221004

研究課題名(和文)哺乳類概日振動体の構成的な理解

研究課題名(英文)Understanding the design principle of circadian oscillator in mammals through reconstitution

研究代表者

上田 泰己(Ueda, Hiroki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：20373277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 164,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類概日時計を駆動する分子機構を、周期長の温度補償性に着目して構成的に理解することを目指した。哺乳類概日時計の律速過程を担い試験管内で温度非依存的なリン酸化活性を示すCKI β について、高温条件で基質との親和性が低下する一方、リン酸化生成物との親和性が上昇することを示した。この過程に重要なCKI β の領域を明らかにし、この領域を他の酵素に移植することで温度補償性を示す酵素を設計できることを提示した。さらに、リン酸化温度補償性を欠くCKI β 変異体の過剰発現はマウス個体の概日時計周期長やマウス組織の概日周期長の温度感受性に有意に影響を与えることを観測し、その個体レベルにおける意義を一部明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand the molecular mechanisms driving the temperature-compensated mammalian circadian clock through reconstitution. CKI β determines the period of mammalian circadian clocks and its kinase activity is almost unchanged under physiological temperature range. We found that the temperature compensation is achieved through 1) decreased kinase-substrate affinity and 2) elevated affinity between the kinase and a phosphorylated product. We further identified the responsible domain of CKI β for the temperature-dependent product binding. The domain can confer temperature compensation on the otherwise temperature-sensitive kinase. Behavioral circadian period as well as temperature sensitivity of circadian period of SCN was significantly altered in the genetically modified mice having the mutant CKI β . In summary, we uncovered the molecular mechanism underlying the temperature-compensation of CKI β action in vitro, and partly its physiological significance in vivo.

研究分野：システム生物学

キーワード：合成生物学 リン酸化 概日時計 温度補償性 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに哺乳類概日振動体を構成する転写あるいはタンパク質ネットワークの解析を行い、転写ネットワークの設計様式が時間遅れをもった負のフィードバックであることを実験的に示してきた (Ukai-Tadenuma *et al.*, *Cell* 2011)。

しかしながら、転写翻訳に基盤をおく機構は、概日時計を特徴づける周期長の温度非依存性 (概日時計の 24 時間周期が反応温度によらずほぼ一定の性質) を説明することは難しい。転写、翻訳、タンパク質分解の速度は一般的に反応温度に強く依存する過程だからである。興味深いことに、我々は Casein kinase I (CKI) δ/ϵ によるリン酸化反応が哺乳類概日周期長決定における律速過程であり、かつ温度非依存的な反応速度を示すことを見出した (Isojima *et al.*, *PNAS* 2009)。さらに理論的な側面からは、温度非依存的な振動子が、可逆的なリン酸化過程のみから構築可能であることを示している (Jolley *et al.*, *Cell Rep.* 2012)。

2. 研究の目的

これらの結果に基づき、本研究計画では、CKI δ の温度非依存的なリン酸化速度の分子機構の理解に基づいて、温度補償された自律的振動子を設計することを目指し、次の 3 点を目的に掲げる。

まず、試験管内で再現された温度補償性を持つリン酸化反応を解析し、温度補償性を生み出す基質と酵素を設計可能な程度まで理解する。次に、哺乳類概日振動子において、リン酸化を介して制御される基質の性質を、自律振動を生み出す基質と酵素を設計可能な程度まで理解し、可逆的なリン酸化を駆動力とする概日振動子の動作原理を探索する。特に、その周期長制御機構に着目し、振動周期を加速する化合物を設計し概日振動の制御を可能とする。さらに、これらの研究で得られた *in vitro/in cellulo* の知見を高速に生体内で検証することを目指す。生体内への温度補償機構、自律振動機構、および発振周期長制御機構の実装を通じて、新たに見出された哺乳類概日時計動作原理の十分性の証明を行う。

3. 研究の方法

CKI δ 反応速度の温度補償機構を知るために、粗過程の反応速度を異なる温度条件で測定する。つまり、1) 酵素と基質の結合、2) リン酸基の基質への転移、3) リン酸化産物と酵素の解離の各過程である。ほとんどの酵素的な反応は、原理上は逆反応も生じうることを踏まえて、CKI δ についても逆反応にも着目して解析する。これらの結果に基づき、温度補償性を成立させるために重要な反応ステップを明らかにする。

次に、CKI δ を用いて、試験管内での可逆的なリン酸化反応に基づく自律振動子を設計

する。このために、概日振動子において重要な役割を果たすリン酸化基質や脱リン酸化酵素の探索を行い、リン酸化振動子の構成要素に加える。これらの酵素・基質群は周期長制御にも重要と考えられる。

さらに、100%ES 細胞由来マウス作製技術 (8 細胞期胚への injection と 3 種の阻害剤を含む ES 細胞培養を組み合わせ、キメラマウスでの ES 細胞の寄与率をほぼ 100%にまで高める方法) を用いて、機能改変型タンパク質をマウスに導入することで、それらの影響を個体レベルで検証する。

4. 研究成果

(1) 温度非依存性のタンパク質リン酸化反応の理解と設計 (温度補償性)

CKI はアカパンカビから哺乳類にわたる広い生物種で、概日振動子の周期超制御に重要である一方、その基質と考えられている因子の配列保存性は低い。我々は、CKI の温度非依存的なリン酸化活性は、基質配列の配列が厳密に決っている必要はなく、むしろ CKI の生化学的特性に依ると予想し、多種類の人工的な合成ペプチドを用いることで、Per2 によらない配列でも温度非依存的なリン酸化反応を再現できることを実証した (図 1)。

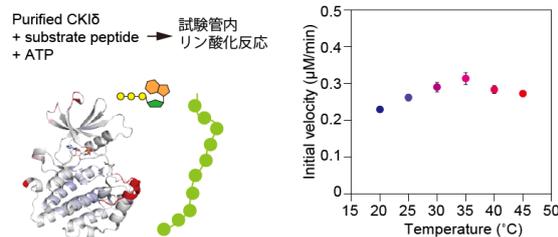


図 1. CKI δ による試験管内リン酸化反応は広い温度範囲で速度がほぼ一定となる (温度補償性)

この合成ペプチドは、リン酸化される可能性のあるサイトが 1 箇所限定されるように設計されており、基質-酵素反応の詳細な解析を行った。その結果、CKI δ と基質の親和性 ($1/K_m$) が高温条件下では減少することが示された。すなわち、高温条件下では非リン酸化基質と酵素の親和性が低下することで、温度上昇に伴う酵素反応の亢進と拮抗することが見出された。

また、哺乳類概日時計では CKI δ/ϵ は基質の複数のサイトをリン酸化することが知られている。そこで、多段階のリン酸化反応における温度補償機構を調べるために、基質の 2 箇所がリン酸化される人工的な基質を設計した。この基質のリン酸化進行にも温度補償性が見られる。2 箇所のリン酸化サイトのうち、CKI δ/ϵ によってリン酸化される 1 つめの残基が予めリン酸化されたリン酸化基質を準備した。これを基質としてリン酸化反応過程を詳細に解析したところ、ADP 存在下に

において、2 箇所ともリン酸化された基質と CKI6 の親和性が高温条件下において上昇することが見出された。すなわち、多段階のリン酸化反応過程においては、高温条件下で複数リン酸化された基質が酵素と強固な複合体を形成することで酵素の回転数に対して抑制的に働くことで温度補償性を発揮していることが強く予想された (図 2)。

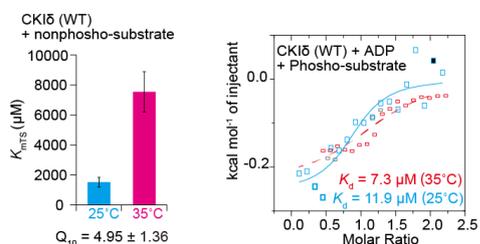


図 2. CKI6は高温条件下において、非リン酸化ペプチド基質との親和性低下 (左) および ADP 依存性なリン酸化生成物との親和性上昇 (右) が見られる

また我々は、この酵素と基質の安定的な相互作用により、CKI6 はリン酸化基質を脱リン酸化する活性を有することを見出した。この脱リン酸化活性は、ADP 依存性であり、かつ後述するように特異的阻害剤を見出すことも可能であることから、アーティファクトやカノニカルな脱リン酸化酵素のコンタミネーションではないことが示されている。

温度依存性なリン酸化基質と酵素の親和性上昇が、温度補償性の成立に寄与するか調べるために、脱リン酸化活性を指標として、OPAC ケミカルライブラリーを対象に、脱リン酸化活性を阻害する小分子を探索した。その結果、CKI6 による脱リン酸化活性を阻害する低分子化合物 Aurintricarboxylic acid (ATA)を見出した。ATA は実際に、リン酸化産物と CKI6 の結合を阻害し、さらに、リン酸化反応の温度補償性を崩した。

我々はさらに、CKI6 の変異体を用いて、リン酸化産物と酵素の結合が温度非依存的リン酸化活性のメカニズムであることを示すことに成功した。前述の低分子化合物 ATA と CKI6 の *in silico* ドッキングシミュレーションを行い、この化合物が CKI6 K224 近傍に結合する可能性が示された。この K224 残基が温度補償性に寄与するかを確かめるために、K224 残基を網羅的に変異させ、細胞内で CKI6 依存性な PER2 の分解が温度非依存的に生じること (Isojima *et al.*, *PNAS* 2009) を利用し、一連の変異 CKI6 活性の温度依存性を検証した。その結果、K224D および K224E 変異によって PER2 安定性の温度非依存性が崩れることを見出した。さらに、実際に K224D/E 変異 CKI6 は ADP 依存性なリン酸化産物との結合能を失っていることが明らかとなった。これらの結果より、温度依存性なリン酸化産物結合による温度補償性機構が裏付けられた。

動作モデルの構成的な証明として、温度補償性をもたないリン酸化酵素に対して、設計

に基づく形でリン酸化反応の温度補償性を付与することを行った。まず、CKI ファミリーに属する TTBK1 に着目し、TTBK1 はリン酸化反応が温度依存的に進行する (温度補償性を示さない) ことを確認した。次に、TTBK1 に上述した K224 を含むリン酸化生成物との結合に重要と予想されるドメインを移植した人工 TTBK1 を作製した。この人工 TTBK1 は単リン酸化および複数リン酸化基質の双方についてリン酸化反応速度に温度補償性が見出された。この成果は、設計に基づく動作原理の証明に繋がるのみでなく、温度補償性という複雑な機能を付与した酵素を設計したという点に於いて、生化学的に意義深い成果である。

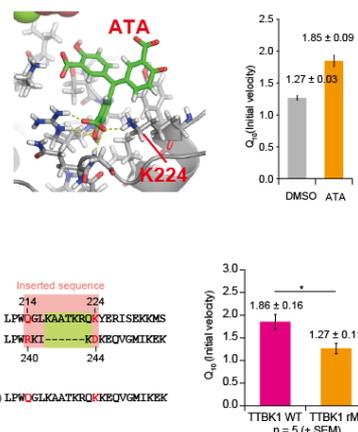


図 3. 低分子化合物による温度補償性の阻害 (上) と機能ドメインの移植による温度補償性酵素の設計 (下)

さらに、温度補償性リン酸化機構の一般性を問うために、概日時計機能を持たないと考えられている酵母の CKI ホモログについて、生化学的検討を行った。酵母 CKI ホモログは K224 周辺領域を保存している。興味深いことに、酵母 CKI ホモログも試験管内でのリン酸化温度補償性、および温度と ADP に依存したリン酸化生成物との結合が観測された。この結果から、CKI のもつ温度補償性リン酸化機構が、生物種さらには概日時計機能を越えて保存されており、これまで考えられてきたよりも広範な役割を担う可能性が想定された (Shinohara *et al.*, *Mol. Cell* 2017)。

(2) 概日振動体周期長制御機構の理解と設計 (リン酸化による自律振動体駆動)

リン酸化過程が律速であるのかを検証するためには、酵素と基質の性質を設計に基づいて変更し、それによって概日周期長を顕著に長短に変動させることが必要である。温度非依存的な CKI6/ε のリン酸化反応の理解から、産物との結合が CKI6 の活性を抑制していることが強く示唆されている。この機構は、温度補償性をもたらすのみならず、CKI6 の活性調節を介して概日周期長制御に顕著に寄与する可能性がある。

リン酸化産物結合を阻害する化合物あるいは変異が CKIδ のリン酸化活性を促進し、さらに概日時計周期長を短縮するかを検討した。まず、ATA は予測通り CKIδ による基質リン酸化速度を上昇させた。一般的に、酵素活性を促進する化合物を得ることは困難であり、メカニズムの理解に基づくスクリーニングから CKIδ のリン酸化活性促進化合物を得た。この結果は、酵素学としても重要な達成であると認識している。一方、ATA 同様にリン酸化産物と CKIδ の結合を抑制する K224D/E 変異 CKIδ は概日周期長を顕著に促進した。後述する CKIδ ノックアウト ES 細胞への機能レスキュー系に、K224 変異 CKIδ を導入することで、マウス個体および概日時計中枢である脳の視交叉上核スライスで、変異 CKIδ は概日時計周期長が顕著に短縮化していることを実証した (図 4)。すなわち、これらの結果は、CKIδ とリン酸化生産物との結合が概日時計の周期長決定にも重要であることを明確に示している (Shinohara *et al.*, *Mol. Cell* 2017)。

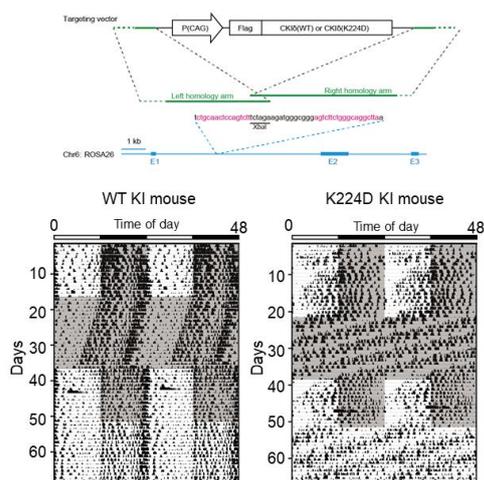


図4. CKIδノックインESマウスの行動概日リズム周期は顕著に短周期化する

概日時計振動体の周期長制御にあたって、CKIδ の基質は何であろうか？ PER-CRY 複合体と強固に相互作用し、これらのタンパク質をリン酸化することが知られている。PER リン酸化と周期長制御の関係性に加えて、本研究では CRY リン酸化と周期制御の関係を詳細に探索した。CRY1 のリン酸化サイトを質量分析計を用いて決定し、リン酸化サイト変異 CRY1 を網羅的に作成した。Cry1^{-/-}; Cry2^{-/-}ノックアウト MEF 細胞に対して、これらの変異 CRY1 を発現させることで、概日周期長が顕著に変化するリン酸化サイトを探索した。その結果、CRY1 の特定のループ構造 (p-loop) へのリン酸化が周期長を顕著に短縮化させることを見出した。さらに、この領域は *in vitro* においては CKIδ の基質となることを初めて示した (Ode *et al.*, *Mol. Cell* 2017)。概日周期長の制御に著明に関係

する CKIδ のリン酸化ターゲット残基を PER 以外のタンパク質に見出したのは、知る限り本研究が初めてである。

(3) 個体レベルでの概日振動体動作原理の検証

in vitro あるいは細胞レベルの研究で見出された CKIδ や CRY の担う温度補償性・周期長制御機構が、実際の哺乳概日振動体で果たす寄与を評価するためには、個体レベルの行動周期性で評価する必要がある。この目的のために、1) 高効率なノックアウトマウス作成技術、2) ノックアウトマウスに対して、(機能改変した) タンパク質機能を戻す技術、および 3) 行動周期性を正確に測定する技術を開発した。

1) については CRISPR/Cas9 システムを用い、一つのターゲット遺伝子の異なる 3 箇所に対するゲノム切断を誘導することにより、効率化とオフターゲット切断の確率低下を実現する方法 (トリプル CRISPR 法) を開発した (Sunagawa *et al.*, *Cell Rep.* 2016)。

2) については遺伝子ノックアウト ES 細胞の ROSA26 領域に、適切なプロモーター下でノックアウトした遺伝子を発現させ、さらにこの ES 細胞に全身のほぼ全ての細胞が由来するマウス (ES マウス) を一世代で作製する技術を確認した (Ukai *et al.*, *Nat. Protoc.* 2017)。これまでに ES マウスを用いた CRY1 の機能相補に成功し、Cry1 p-loop 領域が、個体全体の行動周期長の制御に極めて重要であることを実証した (Ode *et al.*, *Mol. Cell* 2017)。また、ES 細胞へのノックイン技術を用いて CKIδ の K224D 変異がマウス個体周期長を顕著に変化 (短周期化) させること、および、個体行動を担う視交叉上核の概日時計周期長の温度依存性を崩すことを確認した (Shinohara *et al.*, *Mol. Cell* 2017)。

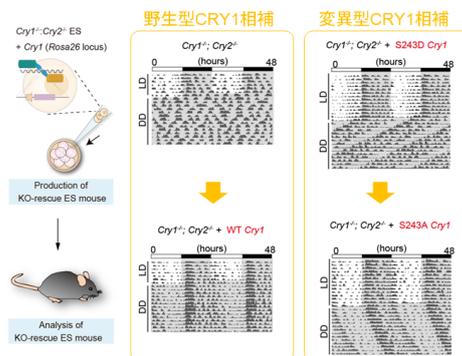


図5. 個体レベルでのノックアウト機能相補系により CKIδ のリン酸化基質となる CRY1 残基が概日周期長を長短に制御することが明らかとなった

3) については、旧来用いられている行動量測定に加えて、マウスの呼吸波形を測定することによって、より非侵襲的かつ定量的にマウスの睡眠覚醒周期を定量する手法を開発

した (Sunagawa *et al.*, *Cell Rep.* 2016)。これらの開発によって、概日時計と密接な関わりをもつ睡眠覚醒周期を司る遺伝子を多数同定することに成功した (Tatsuki *et al.*, *Neuron* 2016)。哺乳類概日振動体が、最終的に個体の行動をいかに制御するかを知るために、重要な発見である。

さらに、脳全体あるいは全身にわたる概日振動体の振る舞いを1細胞解像度で測定するために、全脳・全組織・全身透明化技術である CUBIC 法を開発した (Susaki *et al.*, *Cell*, 2104; Tainaka *et al.*, *Cell*, 2014; Susaki *et al.*, *Nat. Protoc.* 2015; Murakami *et al.*, *Nat. Neurosci.* 2018)。CUBIC 法を用いて、概日周期制御の中心である視交叉上核の神経間ネットワークや全脳の神経細胞活動パターンを概日時間に沿った時系列的に描出することに成功した。

4.まとめ

上述のように、CKI δ の試験管内リン酸化反応の示す温度補償性について、高温条件下における基質との相互作用低下、およびリン酸化生成物との相互作用上昇による温度補償メカニズムを解明した。このメカニズムの必要性 (リン酸化生成物結合の低分子や変異による障害)、十分性 (責任領域の移植による新規温度補償性タンパク質の設計) そして一般性 (酵母ホモログに保存された温度補償性の発見) を示した。試験管内での温度補償性の構成的かつ徹底的な理解を元に、細胞及び個体レベルでの概日時計振動体の制御 (周期長変化) に成功した。また、この実現のために、遺伝子ノックイン、ノックアウト、全身の細胞観測のそれぞれについて新規技術を開発した。

<引用文献>

- ① Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Xu H, Ripperger JA, Liu AC, Ueda HR: Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function, *Cell* 144, 268-281 (2011)
- ② Isojima Y. et al.: CKI ϵ/δ -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15744-15749 (2009)
- ③ Jolley CC, Ode KL, Ueda HR: A design principle for a posttranslational biochemical oscillator, *Cell Rep.* 2, 938-950 (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 34 件)

- ① Murakami TC, (11 名略), Tainaka K, Ueda HR, A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing, *Nat. Neurosci.* 21, 625-637 (2018) 査読有
DOI: 10.1038/s41593-018-0109-1
- ② Ukai H, Kiyonari H, Ueda HR, Production of knock-in mice in a single generation from embryonic stem cells, *Nat. Protoc.* 12, 2513-2530 (2017) 査読有
DOI: 10.1038/nprot.2017.110
- ③ Shinohara Y, (8 名略), Tainaka K, Ueda HR: Temperature-Sensitive Substrate and Product Binding Underlie Temperature-Compensated Phosphorylation in the Clock, *Mol. Cell* 67, 783-798 (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.molcel.2017.08.009
- ④ Kubota SI, (4 名略), Tainaka K, Miyazono K, Ueda HR: Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution, *Cell Rep.* 20, 236-250 (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.06.010
- ⑤ Sugai SS, Ode KL, Ueda HR: A design principle for an autonomous post-translational pattern formation, *Cell Rep.* 19, 863-874 (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.081
- ⑥ Ode KL, Ukai H, Susaki EA, (7 名略) Ueda HR: Knockout-rescue embryonic stem cell-derived mouse reveals circadian-period control by quality and quantity of CRY1, *Mol. Cell* 65, 176-190 (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.molcel.2016.11.022
- ⑦ Narumi R, Shimizu Y, Ukai-Tadenuma M, Ode KL, Kanda GN, Shinohara Y, Sato A, Matsumoto K, Ueda HR: Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 133, E3461-E3467 (2016) 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1603799113
- ⑧ Tatsuki F, Sunagawa GA, Shi S, Susaki EA, Yukinaga H, Perrin D, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, Fujishima H, Ohno R, Tone D, Ode KL, Matsumoto K, Ueda HR: Involvement of Ca²⁺-dependent hyperpolarization in sleep duration in

mammals, *Neuron* 90, 70-85 (2016) 査読有

DOI: 10.1016/j.neuron.2016.02.032

⑨ Sunagawa GA, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, Perrin D, Fujishima H, Ukai H, Nishimura O, Shi S, Ohno R, Narumi R, Shimizu Y, Tone D, Ode KL, Kuraku S, Ueda HR, Mammalian reverse genetics without crossing reveals Nr3a as a short-sleeper gene, *Cell Rep.* 14, 662-677 (2016) 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.052

⑩ Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Yukinaga H, Kuno A, Ueda HR: Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging, *Nat. Protoc.* 10, 1709-1727 (2015) 査読有
DOI: 10.1038/nprot.2015.085

⑪ Tainaka K, Kubota SI, Suyama TQ, Susaki EA, Perrin D, Ukai-Tadenuma M, Ukai H, Ueda HR: Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue-decolorization, *Cell* 159, 911-924 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.034

⑫ Susaki EA, Tainaka K (13名略), Ueda HR: Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis, *Cell* 157, 726-739 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.042

他 21 件

[学会発表] (計 102 件)

① Ueda HR, Towards system-level understanding of period-determining mechanisms in mammalian clock and sleep. Gordon Research Conference, 2017

② Ueda HR, Systems biology of mammalian sleep/wake cycles: involvement of Ca²⁺-dependent hyperpolarization in sleep duration in mammals. EBRs 2017, 2017

③ Etsuo EA, Comprehensive cell and cell circuit analysis of whole organ/body toward the organism level systems biology, SUNPOSIUM, 2017

④ Ueda HR, Towards Organism-level Systems Biology, Pacificchem2015, 2015

⑤ Tainaka K, CUBIC: Whole-organ, whole-body imaging with single-cell

resolution using hydrophilic chemical cocktails, International Conference on Systems Biology of Human Disease 2015, 2015

⑥ Ode KL, Mammalian cryptochrome 1 regulates circadian period through its co-factor pocket, XIV EBRs and IV WCC, 2015

⑦ Ueda HR, Towards Cell-to-Organism level Systems Biology, 第 21 回日本時間生物学会, 2014

⑧ Ueda HR, Spatiotemporal gene expression profiling with efficient brain clearing cocktails and computation, Gordon Research Conference, 2014

他 94 件

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 泰己 (UEDA, Hiroki)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20373277

(2)研究分担者

田井中 一貴 (TAINAKA, Kazuki)
(H25-H28)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80506113

洲崎 悦生 (SUSAKI, Etsuo)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10444803

大出 晃士 (ODE, Koji)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40612122