

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2013～2014

課題番号：25830146

研究課題名(和文)Cry1タンパク質のリン酸化依存的分解を介した、細胞シグナルの統合と概日時計調律

研究課題名(英文)Control of mammalian circadian clock through phosphorylation-dependent proteolysis of Cry1

研究代表者

大出 晃士(Ode, Koji)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40612122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類概日時計を制御する中心的因子の一つであるCRY1について、網羅的に同定したリン酸化サイト変異体の解析を行い、CRY1のタンパク質安定性と概日時計周期長には相関があること、この関係は人工的にCRY1のタンパク質分解を誘導しても再現されることを示した。興味深いことに、一連の変異体シリーズの中には、タンパク質安定性との相関を外れて、顕著に周期長を制御させるものが複数含まれており、それらの変異サイトがFAD結合部位周辺に集中していること、FAD結合部位の立体構造を安定化する部位の変異によっても、顕著な概日周期長変化を誘導できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：By introducing mutations on the phosphorylation sites of CRY1, one of the core component of mammalian circadian clock, many of these residues were found to be important for proper circadian period and/or robust amplitude both in cultured cell and mice. Analysis of the mutation effect on CRY1 properties re-emphasizes close coupling between CRY1 turnover rate and the circadian period. This relationship are rigorously tested by applying small-molecule-inducible degradation of CRY1. Nevertheless, several mutants show markedly altered circadian period but less alter the CRY1 stability. These mutations are located mostly around the FAD-binding pocket of cryptochrome. We further confirmed that residues not directly linked to phosphorylation/electron-transferring but supposed to be retain the structure of the two domain also alter the period.

研究分野：生化学

キーワード：概日時計 質量分析 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

一日周期の生体リズムを司る概日時計は、その振動体を構成する諸因子の動態が、系全体の動態(概日振動の周期長・振幅)を如何に規定するかを理解する上で優れたモデル系となる。概日振動体を構成する転写因子 Cry1 の発現タイミングは、振動周期長を規定する重要な要素である。Cry1 は、自身の転写を活性化する Bmal1-Clock 転写活性化因子を抑制することで負のフィードバックループを形成する。このフィードバックループにおいては Bmal1-Clock の活性化に対して Cry1 の転写されるタイミングが時間的に遅れることが安定した自律振動に必要であり、この遅れ時間によって概日周期長が変化することが示されている(Ukai-Tadenuma et al, Cell, 2011)。Cry1 転写タイミングの重要性は、同時に Cry1 蛋白質分解活性の重要性を意味する。なぜならば、蛋白質の発現タイミングは、転写活性と分解活性のバランスによって規定されるためである。

実際、SCF ユビキチンライゲースの基質認識サブユニットである F-box 蛋白質の一種、Fbxl3 は Cry1 のプロテアソームによる分解を誘導し、Fbxl3 を欠く変異体では周期延長が見られる(Siepkka et al, Cell, 2007)。SCFF-box は多くの場合、リン酸化された基質を認識する。Cry1 についても AMPK によるリン酸化が Fbxl3 依存的な Cry1 の分解に必要であることが示されている(Lamia et al, Science, 2009)。しかしながら、Cry1 リン酸化、分解活性、概日振動周期長の相互関係は明らかでない。Fbxl3 変異の周期延長と Cry1 分解を関連付ける直接的な証拠は示されておらず、さらには、報告された AMPK による Cry1 の分解誘導による概日周期長への影響(AMPK 活性化による Cry1 分解の亢進=周期延長)は Fbxl3 変異の結果(Cry1 の分解阻害=周期延長)と一致しない。

そこで、我々は Cry1 リン酸化による概日周期制御の全貌を明らかにするために、質量分析によって Cry1 リン酸化サイトを探索した。新規同定サイトを含む 28 カ所を見出し、全カ所について非リン酸化(アラニン)および疑似リン酸化(アスパラギン酸)変異体を作成した(Cry1 変異体シリーズ)。Cry1 発現プラスミドを Cry1/2 二重ノックアウト細胞に導入し概日周期を誘導する系(Cry1 レスキュー系)で変異 Cry1 の概日振動への影響を調べたところ、周期延長、短縮、周期なしの各表現型をもつ非/疑似リン酸化変異体が複数得られた。従って、Cry1 は 1 カ所のリン酸化状態の変化で周期長を延長/短縮の両方向に調整したり、概日時計をリセットすることができるクリティカルリン酸化サイトを複数もつことが示唆された。

2. 研究の目的

上述の結果より、Cry1 は複数サイトのリン酸化依存的分解誘導を介して細胞内外シ

グナルを統合し、概日時計周期を長短柔軟に制御している可能性が考えられた。本研究では、Cry1 の複数サイトをリン酸化する経路を探索するとともに、各リン酸化サイトが異なる応答(とりわけ周期長の変化)を誘導する機構を検討することを目的とする。

この目的のため、次の 3 つの観点から Cry1 およびその変異体の詳細な検討を行った。

(1) Cry1 のリン酸化変異体シリーズすべてについて、それらが惹起する概日時計周期長・周期振幅・Cry1 タンパク質の安定性・Cry1 による Bmal1-Clock 抑制活性を定量し、互いの相関関係を明らかにする。

(2) 概日周期長制御に重要な役割を果たすリン酸化サイトについて、その制御機構の分子機構をリン酸化経路の同定等を通して明らかにする。

(3) Cry1 タンパク質の安定性と概日時計周期長の関係性を構成的・定量的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Cry1 変異体シリーズの概日時計周期性、あるいは生化学活性については、次の方法を用いて検討した。

Cry1 変異体の概日時計周期長への影響は、Cry1^{-/-}; Cry2^{-/-} ノックアウトマウス由来の MEF 細胞に、Cry1 変異体を発現させ、概日振動を惹起することで測定した(Cry1 レスキュー系)。概日振動は、Bmal1-Clock の制御下にある Per2 遺伝子由来のプロモーター下流でルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を導入し、ルシフェラーゼの発現振動をモニターした。これにより、概日周期長と振幅を定量した。同様の実験系を用いて、Cry1 による Bmal1-Clock の転写活性抑制能を定量した。

さらに、いくつかの Cry1 変異体については、野生型細胞(NIH3T3)に対して過剰発現させた際の概日周期長に及ぼす影響(ドミナントエフェクト)を検証した。

Cry1 タンパク質の安定性は、Cry1 変異体にルシフェラーゼ遺伝子を融合したコンストラクトを Cry1^{-/-}; Cry2^{-/-} ノックアウト MEF 細胞に導入し、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを添加した後のルシフェラーゼシグナルの減少曲線から Cry1 タンパク質の半減期を見積もった。

(2) 概日時計周期長制御に顕著に重要な影響を及ぼすリン酸化サイトについては、その責任酵素を明らかにするために精製タンパク質を用いたリン酸化アッセイを行った。また、後述するように、リン酸化の結果として Cry1 タンパク質の構造変化に大きな影響を及ぼすことが予測された領域に関しては、タンパク質立体構造を元にした変異体作成とその解析を行った。

(3) Cry1 タンパク質の分解を人工的・定量的に誘導するために、植物ホルモン依存的にタンパク質分解を誘導する AID 法を導入し

た(Nishimura et al, Nat Methods, 2009)。この系を Cry1 レスキュー系内に構築することで、植物ホルモン依存的に Cry1 を分解し、その周期長への影響を定量した。

4. 研究成果

Cry1 リン酸化サイト変異体シリーズの全てについて、Cry1 レスキュー系を用いて概日周期長・振幅を測定した。この結果、短周期型・長周期型・無周期型の各表現型を示す変異体を複数得た。ドミナントエフェクトの検証結果から、無周期型になる原因は次の3タイプに分類されることが明らかとなった。すなわち、(1) 周期長短縮効果が極めて顕著である、(2) 野生型に比して Bmal1-Clock の抑制効果が過剰に強い、(3) 野生型に比して Bmal1-Clock の抑制効果が過剰に弱い、の3通りである。これらの結果から、Cry1 上のリン酸化ターゲットについての網羅的な概日周期長制御マップを得ることに成功した(図 1)。ここに記されている変異体のうち、過去に周期長への影響が明らかになっているサイトは5サイトのみであり、残りは新規の周期長制御サイトである。これは現時点で Cry1 リン酸化と概日周期長制御の関係性について最も網羅的な解析結果と考えており、将来的な Cry1 をターゲットとした概日時計制御の理解・創薬を通じた介入を設計するうえで重要な基盤知識となることが期待できる。

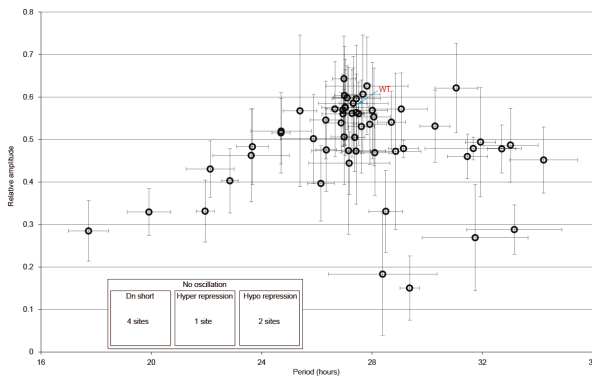


図1 Cry1 変異体の周期長(横軸)と振幅(縦軸)の関係。Dn short, Hyper active, Hypo active はそれぞれ、上記無周期型の分類の(1)~(3)に対応する。

各変異体について、そのタンパク質安定性および、Bmal1-Clock に対する転写抑制活性を定量した。これらの結果を、概日周期長・振幅と対応させることで、タンパク質安定性が周期長と、転写抑制活性が振幅と相関関係を有することが明らかとなった。この結果は、Cry1 安定性を制御する F-box タンパク質の変異から主に提唱されてきたモデルを、Cry1 側の多数の変異解析から支持する結果である。しかしながら、これら変異体解析のみからでは、周期長と Cry1 安定性の関係が相関

関係にとどまるのか、あるいは Cry1 安定性の変化が周期長変化の直接の原因たりうるかに答えることは出来ない。そこで、AID 法を用いた人工的 Cry1 分解誘導を用いて、Cry1 分解を誘導した際の周期長への影響を検討した。植物ホルモンオーキシンは、AID 法を導入した場合にのみ、概日周期長をオーキシン濃度依存的に短縮させた。すなわち、人工的に Cry1 のタンパク質安定性を低下させた時に概日周期長の短縮を誘導することに成功し、構成的に Cry1 安定性と概日周期長の関係を証明した初の成果である。

一方で、特に概日周期長を顕著に変化させる変異体については、必ずしも Cry1 のタンパク質安定性に影響があるわけではないことも明らかとなった。すなわち、本研究の測定条件では、周期長変化を Cry1 タンパク質の安定性のみから説明することは出来ない。興味深いことに、それら顕著な周期長変化をもたらす残基は、Cry1 タンパク質の特定の領域に集中していた。さらに、これらの領域の構造が、Cry1 タンパク質の FAD 結合ポケットに結合し周期長を変化させる低分子化合物によって変化することが近年の報告(Nangle et al., Cell Res. 2013)から予想された。これは FAD 結合ポケットを介した、Cry1 タンパク質の構造変化が概日周期長の制御に重要である可能性を示している。この考えに基づき、Cry1 タンパク質の FAD 結合部位周辺に着目し、その立体構造維持に重要と思われる残基の変異体解析を行った。その結果、それらの残基によっても周期長の顕著な変化、さらには3つのタイプの無周期型変異体の表現型を誘導することに成功した。

さらに、この顕著な周期長変化をもたらすリン酸化サイトの中には、概日時計周期長制御に重要な役割を果たすことが知られている Casein kinase I (CKI) δ/ϵ によってリン酸化される部位が含まれることを、in vitro リン酸化アッセイから見出した。

以上、Cry1 タンパク質のリン酸化部位に着目した概日周期長制御機構の解析から以下のことを明らかにした。

- ・Cry1 上のリン酸化サイト1アミノ酸変異に基づく、概日時計変調の全体像を提示した。
- ・Cry1 タンパク質の安定性低下と概日周期長の短縮の因果関係を Cry1 変異および人工的な Cry1 分解誘導系を通して示した。
- ・FAD 結合サイトを介した Cry1 の構造変化が概日周期長制御に重要であることを示唆した。

これらの結果は、多数の因子のネットワークから成る概日時計の周期長についても、その基本的性質である周期長制御が特定の因子の特定の残基・領域によって柔軟に変化しうることを示している。創薬などによる概日時計周期長の制御を試みる際のターゲットとして、Cry1 は特に考慮されるべき因子であると言える。

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 5 件)

Koji L. Ode, Hiroki R. Ueda, Seeing the forest and trees: whole-body and whole-brain imaging for circadian biology, Diabetes obesity and metabolism, 査読有, 印刷中

Koji L. Ode, Hiroki R. Ueda, Multi-layered control of the mammalian circadian system, Brain and Nerve, 査読無, 66, 681-689 (2014)

Shuji Ikeda, Kazuki Tainaka, Katsuhiko Matsumoto, Yuta Shinohara, Koji L. Ode, Etsuo A. Susaki, Hiroki R. Ueda, Non-Enzymatic DNA Cleavage Reaction Induced by 5-Ethynyluracil in Methylamine Aqueous Solution and Application to DNA Concatenation, PLOS ONE, 査読有, 9, e92369 (2014)

大出晃士, 可逆的リン酸化が示す複雑な振る舞い, 生物物理, 査読有, 54, 28-30 (2014)

Yoichi Minami, Koji L. Ode, Hiroki R. Ueda, Mammalian circadian clock: the roles of transcriptional repression and delay, Handbook of Experimental Pharmacology, 査読有, 217, 359-377 (2013)

〔学会発表〕(計 4 件)

Koji L. Ode, Hiroki R. Ueda, Mammalian cryptochrome 1 regulates circadian period through its co-factor pocket, The 16th Servier-IGIS symposium, 2015年4月9-12日, Sain-Jean-Cap-Ferrat (France)

Koji L. Ode, Ryohei Narumi, Hiroki R. Ueda, Phosphorylation on p-loop and electron transfer pathway of CRY1 regulate the period of mammalian circadian clock, 第87回日本生化学会大会, 2014年10月15日-18日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

Koji L. Ode, Shuhei Sugai, Craig C. Jolley, Hiroki R. Ueda, Autonomous spatio-temporal pattern arising from reversible multiple phosphorylation, JSMB/SMB 2014, 2014年7月28日-8月1日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

大出晃士, 須貝秀平, Craig C. Jolley, 上田泰己, 可逆的リン酸化から生じる自律的時空間パターン, 第三十六回日本分子生物学会年会, 2013年12月5日, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

戸根大輔, 大出晃士, 上田泰己, 化学同人, 分子脳科学 分子から脳機能と心に迫る,

2015年, 157-170

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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