

研究の背景

生物には自身の生命を保つためのさまざまな機能が存在しますが、それぞれの機能が十分に発揮されるためには個々の分子、細胞、組織がタイミングよく協調して働く必要があります。そのために、生体にはさまざまな時間を計るタイマー（体内時計）が存在します。例えば我々ヒトは、明るい昼に全身の代謝が高められ活動的になりますが、暗い夜には睡眠などによって全身でエネルギーを蓄えるようになっており、これは約 24 時間周期で振動する「概日時計」と呼ばれるタイマーが数多くの遺伝子や生体の機能を協調して制御することで可能になります。このような 24 時間のタイマーは生物個体レベルのみならず、組織レベル、単一培養細胞レベルで存在することがわかっており、その分子メカニズムは一群の時計タンパク質による転写制御(*1)によると考えられています。

例えば哺乳類において、CLOCK と BMAL1 という転写因子(*1)の働きが高まると、その標的となる多くの遺伝子の転写が促進されます。そのうちの一つに *Per* という遺伝子があり、これには CLOCK と BMAL1 の働きを抑える作用があります。この負のフィードバック作用によって、CLOCK と BMAL1 の働きの強さは一日周期で変化します(図 1)。具体的には、CLOCK と BMAL1 の活性が朝方に高くなると、多くの遺伝子とともに *Per* が転写されます。PER タンパク質が CLOCK-BMAL1 の活性を抑えるので、夜には CLOCK-BMAL1 の活性は低くなります。CLOCK-BMAL1 の活性が低くなると、PER の量が減ることになるので、また朝にかけて CLOCK-BMAL1 の活性が高くなるというわけです。つまり精巧で安定な 24 時間を刻むタイマーを刻み続けるためには、各ステップのスピードが重要です。

特に重要な PER タンパク質による CLOCK-BMAL1 の抑制ステップはこれまで、PER によって連れてこられる転写抑制因子による CLOCK-BMAL1 近傍のクロマチン状態の変化によると考えられてきました。しかし近年、PER によって連れてこられる CK1 キナーゼが CLOCK をリン酸化修飾(*2)することによって CLOCK-BMAL1 を DNA から引き離すという仕組みが存在することが報告されました。しかしこの新しい転写抑制メカニズムの概日時計における重要性はわかっていませんでした。

我々はこれまでに、CLOCK と BMAL1 は時刻依存的にリン酸化修飾されることを明らかにしています。リン酸化も DNA も負電荷を持つために静電的反発によって、リン酸化された CLOCK や BMAL1 は DNA との結合が弱くなることが考えられます。そこで PER による新しい抑制メカニズムを担う、CLOCK や BMAL1 のリン酸化修飾部位をアミノ酸残基レベルで同定することに取り組みました。

研究の内容

東京都医学総合研究所 体内時計プロジェクトの乙部優太研究員（研究当時 東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 大学院生）と、伊藤舜喬氏（研究当時 同専攻 大学院生）、深田吉孝 東京大学名誉教授、吉種光プロジェクトリーダー（同専攻 准教授兼任）らの研究グループは、韓国 KAIST の Kim 博士、Jeong 博士らとの国際共同研究として、培養細胞を用いたノックアウトレスキュー実験系と数理モデルを組み合わせてこの問題に取り組みまし

た。ノックアウトレスキューを用いたスクリーニングの結果、CLOCK や BMAL1 の DNA 結合部位に位置するセリン残基 (CLOCK-S38A/S42A や BMAL1-S78A) をアラニンに置換 (非リン酸化模倣) すると概日リズムが短縮することがわかりました (図 2)。さらに興味深いことに、これら部位をアスパラギン酸やグルタミン酸に置換 (恒常的リン酸化模倣) すると概日リズムが消失することがわかりました。これらの結果は、CLOCK と BMAL1 の DNA 結合ドメイン内のこれらセリン残基が、概日時計の周期決定において重要なアミノ酸残基であることを示しています。おそらく、これらリン酸化修飾が DNA 認識部位へ負電荷を与えることで、CLOCK-BMAL1 の E-box からの解離タイミングが制御され、概日時計の周期が決定されると考えています。

この仮説を検証するために、時計数理モデル(*3)を用いて変異体における体内時計フィードバック制御をシミュレートしました。CLOCK や BMAL1 の恒常的リン酸化状態を模倣するために、CLOCK-BMAL1 の DNA 結合を常時弱くすると概日リズムが消失し、実験と同様の結果になりました。次に、CLOCK や BMAL1 の非リン酸化状態では、リン酸化修飾依存的な CLOCK-BMAL1 複合体の DNA からの解離が抑制されるため、DNA 結合が強くなると想定されます。そこで CLOCK や BMAL1 の DNA 結合を常時強くすると長周期になり、実験と異なる結果になりました。そこで特定の状態の CLOCK-BMAL1 複合体に対して非リン酸化体が作用すると考えてシミュレーションを行うと、CLOCK-BMAL1-PER 複合体において DNA 結合を強くすると短周期になり、実験と同様の結果になりました。PER は CLOCK-BMAL1 複合体を DNA から解離させることによって転写を抑制するため、この抑制メカニズムの減弱は概日リズムを短縮させることがわかりました。さらに生化学的実験によって、3つのセリン残基が PER 依存的な転写抑制に関わることを見出しました。

まとめると、分子生物学的実験と数理シミュレーションを組み合わせることで、CLOCK-Ser38/Ser42 と BMAL1-Ser78 のリン酸化修飾が PER 依存的な転写抑制の一端を担うことが明らかとなりました (図 3)。さらにこれらの機能的リン酸化は PER 依存的な転写抑制フェーズにピークをもったリズムを示すことが示唆され、時刻依存的なリン酸化により正確で安定な時計振動が駆動されることがわかりました。

社会的意義・今後の展望

先に述べた通り、概日リズムは我々自身の生体機能、すなわち健康と直結します。特に概日リズムの周期の変化は朝型や夜型などの「クロノタイプ」の原因となることが知られています。本研究によって明らかとなったリン酸化の状態を自在に操ることができるになれば、社会活動が困難な程のクロノタイプや、海外旅行やシフトワークによる“時差ボケ”の改善につながると期待されます。

(参考) 本研究成果のイメージ図

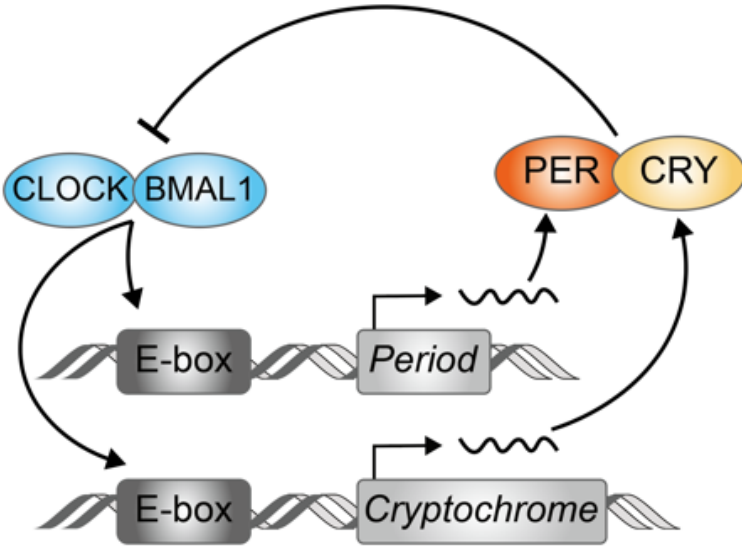


図1 概日時計におけるコアループ



時計タンパク質 CLOCK と BMAL1 のリン酸化制御 (P と表現) が体内時計の周期を制御する。

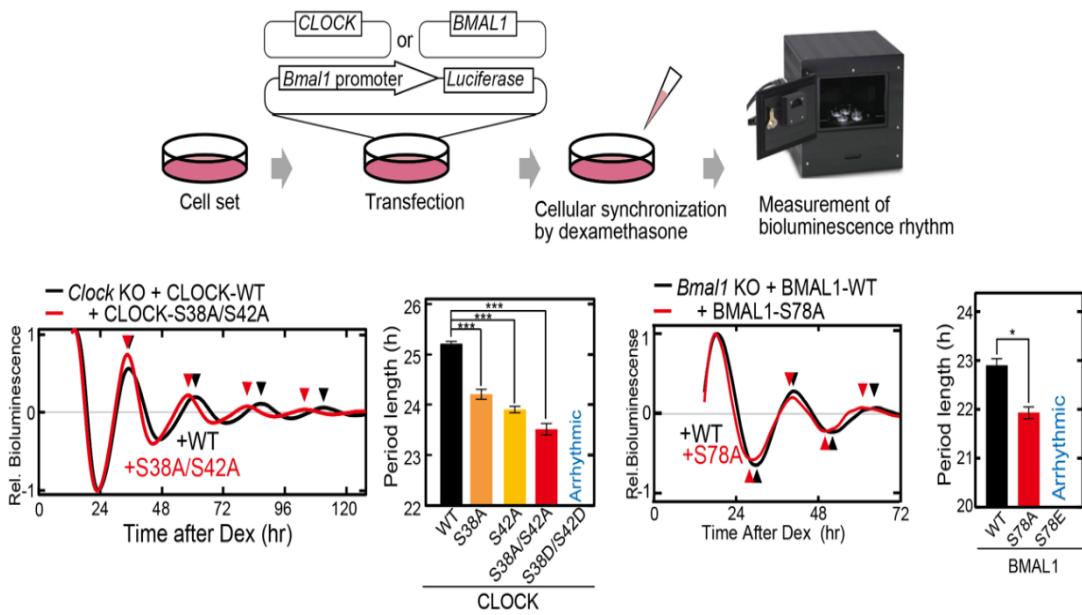


図2 ノックアウトレスキュー実験系による細胞のリズム計測

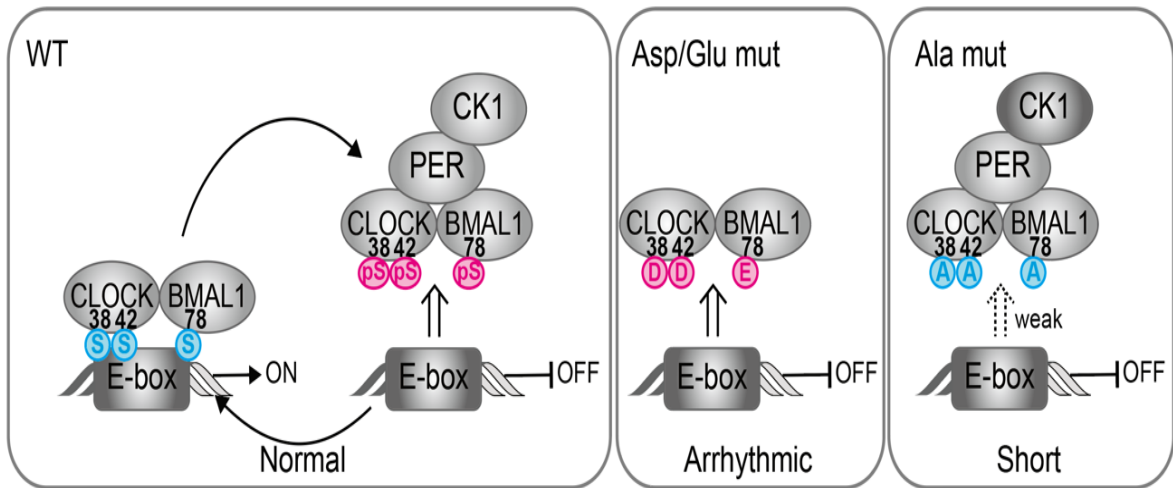


図3 本研究の概要

<用語解説>

(*1 転写制御・転写因子)

生物を形作る設計図はゲノムとよばれる DNA 分子上に書き込まれています。そこにある遺伝子とよばれる配列をもとにタンパク質という製品が生産され、さまざまな生体の機能が形作られています。このとき、DNA 上の遺伝子配列が mRNA というより短い分子に写し取られ (転写)、この短い RNA が読み取り装置 (リボソーム) かけられると遺伝子ごとのタンパク質がつくられます。遺伝子をコードするゲノムは細胞につき一対しかなく、ほとんどの細胞では同一です。一方、1つのゲノム DNA から多様な RNA が大量に転写されます。よって、生物はおかれた環境や細胞ごとに適切なタンパク質をそれぞれ必要な量ずつ作るために、状況に応じて RNA への転写量を遺伝子ごとに調節しています。この調節を行うタンパク質の一群が転写因子と呼ばれます。

(*2 リン酸化修飾)

タンパク質に付加する翻訳後修飾の一種。リン酸化修飾はタンパク質の立体構造や相互作用を変化させることで、シグナル伝達の制御やアポトーシス、代謝、増殖等の多くの生理学的プロセスに影響を与える。CK1 などのプロテインキナーゼは、基質となるタンパク質のセリンやスレオニン、チロシンのアミノ酸残基とリン酸の共有結合を触媒する。

(*3 時計数理モデル)

体内時計の振動を数理的に再現したモデル。概日時計に關与する DNA 配列 (E-box など) を介した遺伝子の転写や翻訳、翻訳後修飾などの制御を、多くの変数およびパラメーターを用いて数式に表すことで、体内時計のシミュレーションを可能にしている。↑