

論文内容の要旨

Role of bZIP Transcription Factor E4BP4 in the Chick Pineal Circadian Clock System

(転写因子 E4BP4 を介した概日時計の位相制御メカニズム)

土居 雅夫

概日時計の周期の長さは正確には 24 時間ではないため、地球上の明暗周期に対して概日時計の位相は進みすぎたり、遅れたりする。この位相の「ずれ」を補正するため、概日時計の位相は外界からの光刺激に応答して変化(シフト)する。この位相シフトには時刻依存性があり、本来昼にあたる時間帯(主観的昼)に光刺激を受けても概日時計の位相は殆どシフトしないのに対し、夜の始まり(主観的夜の前半)に光刺激を受けると位相が後退し、夜明け前(主観的夜の後半)に光刺激を受けると位相が前進する。このような時刻依存的な光位相応答は概日時計の重要な特性の一つであるが、その分子メカニズムは謎に包まれている。

申請者は、光位相制御を担う分子の実体に迫るため、概日時計機能と光受容能を合わせもつニワトリ松果体において時刻特異的に光誘導される遺伝子群を網羅的に探索した。具体的には、ヒヨコ松果体を実験材料にして、3つの時間帯、すなわち(i)主観的昼の初期、(ii)主観的夜の前半、及び(iii)主観的夜の後半において特異的に光誘導される遺伝子群をディファレンシャル・ディスプレイ(DD)解析により探索した。その結果、時刻特異的な光応答を示す複数の PCR バンドを検出することができた。そのうちで主観的夜の前半に強く光誘導された増幅断片をクローニングし、さらに RACE 法を用いてコード領域全長を含む cDNA 断片を単離して塩基配列を決定した。その結果、この遺伝子は human E4BP4 (hE4BP4) に高い相同性を示す bZIP 型の転写因子 (chicken E4BP4) をコード

していることが判明した。先行研究において hE4BP4 は転写抑制因子として同定されていたが、概日時計機構における E4BP4 の役割は不明であった。そこでまず、*chicken E4bp4* (*cE4bp4*) がニワトリ松果体の時刻発振機構や光同調機構において果たす役割を探るため、様々な時刻および光条件下において *cE4bp4* mRNA の発現パターンを RT-PCR により解析した。その結果、DD 解析において観察された通り、ヒヨコ松果体に発現する *cE4bp4* の mRNA 量は主観的夜の前半に光刺激を与えた場合に最も高いレベルにまで上昇することが判明した。さらに、ヒヨコを恒暗条件下において飼育し、松果体に発現する *cE4bp4* の mRNA 量の日内変化を調べた結果、*cE4bp4* の mRNA 量は主観的夜の初期にピークをもつ概日リズムを示すことが分かった。このことから *cE4bp4* の発現は外界からの光情報のみならず概日時計からの時刻情報によっても制御されていることが判明した。

ニワトリ松果体細胞において、転写因子 cE4BP4 は何らかのターゲット遺伝子の転写を光・時刻依存的に調節している可能性が考えられた。ここで申請者は、転写抑制活性をもつと考えられる *cE4bp4* の発現リズムが時計遺伝子 *cPer2* の発現リズムとほぼ逆位相であることに着目し、cE4BP4 が *cPer2* 遺伝子の転写を抑制するのではないかと考えた。そこで、*cPer2* 遺伝子のプロモータ領域を含む上流配列を単離し、その配列を用いて転写アッセイを行った。その結果、*cPer2* 遺伝子上流配列には E4BP4 の認識配列と高い相同性を示す配列が存在し、この配列を介して cE4BP4 が *cPer2* 遺伝子プロモータからの転写を抑制することを見出した。

以上の結果より、cE4BP4 による *cPer2* 遺伝子の転写抑制を介して時計位相が制御される可能性が考えられた。そこで、*cE4bp4* の発現誘導が最も強く見られる主観的夜の前半に光刺激を与え、(i) *cPer2* 遺伝子の発現が抑制されるか、そして (ii) その結果として概日時計の位相がシフト(後退)するかどうかを検討した。具体的には、明期を主観的夜の前半にまで延長して 18 時間とし、ヒヨコ松果体に発現する *cE4bp4*・*cPer2* 遺伝子の mRNA 量の経時変化を追跡した(図 1)。その結果、明期の延長期間中は *cE4bp4* の mRNA 量は高いレベルに維持されるのに対し、*cPer2* の mRNA レベルは低く保たれた。そして、(おそらくその結果として)翌朝の *cPer2* mRNA レベルの上昇が対照群(明期を 12 時間とした場合)に比べて約 2 時間遅れた。その後、ヒヨコを恒暗条件下において

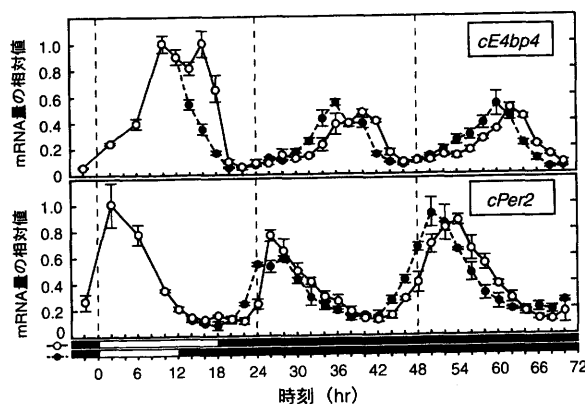


図 1 明期延長に伴う *cE4bp4* と *cPer2* の mRNA の発現変化

明期を延長した場合(-O-)、光刺激による *cE4bp4* の発現誘導と、翌朝の *cPer2* の発現上昇の遅れが観察される。さらにその後の *cE4bp4* と *cPer2* の発現リズムの位相は、対照群(-●-)に比べて約 2 時間の遅れが認められる。

飼育したところ、松果体に発現する *cE4bp4* と *cPer2* mRNA 量の日周リズムの位相は対照群に比べて約 2 時間後退していた。つまり時計発振系の位相後退が確認された。以上の結果は、ニワトリ松果体において *cE4BP4* が転写抑制因子として *cPer2* 遺伝子に作用していることを強く支持しており、この *cE4BP4* による *cPer2* 遺伝子の転写抑制が概日時計の位相後退において極めて重要な役割を果たすことを示唆している。

生体内において *cE4BP4* が *cPer2* 遺伝子の転写を抑制しているのであれば、*cE4BP4* 蛋白質は *cPer2* の発現が抑制されている時間帯に強く発現しているはずである。そこで次に、*cE4BP4* 蛋白質の動態を調べるため、特異的な抗体を作成してウェスタンブロット解析を行った。ヒヨコを様々な時刻および光条件下（明暗周期、恒暗条件ならびに明期延長条件）において飼育し、松果体に発現する *cE4BP4* の蛋白質量の経時変化を追跡した。その結果、いずれの条件下においても *cE4BP4* の蛋白質量は *cPer2* の mRNA 量が低い時間帯において増大し、一方で *cPer2* の mRNA 量が高い時間帯には *cE4BP4* の蛋白質量は低下していることが分かった。これらの観察結果は、*cE4BP4* の蛋白質量の増加と減少が *cPer2* の発現のタイミングを決める主要な要因の一つであることを強く示唆している。さらに興味深いことに、*cE4BP4* 蛋白質の動態を解析する過程で申請者は、*cE4BP4* 蛋白質の電気泳動上の易動度が一日の時刻に依存して変化することを見出した。見かけの分子量が上昇した *cE4BP4* 蛋白質はフォスファターゼ処理をすることによって本来の分子量を示すようになったことから、*cE4BP4* はリン酸化されておりリン酸化の有無によって易動度が変化することが判明した。以上の結果から、ヒヨコ松果体に発現する *E4BP4* は蛋白質の発現量ばかりではなくリン酸化の状態も時刻に依存して変動することが明らかとなった。

cE4BP4 上のリン酸化部位を探るため、既知のキナーゼの標的となりうる部位を検索したところ、カゼインキナーゼ 1 (CK1) のリン酸化モチーフが連続して存在する領域を見出した (図 2 参照)。

このような連鎖状のモチーフは CK1 の標的蛋白質によく見られるもので、アミノ末端側の第一番目のセリン残基のリン酸化が後続のリン酸化を引き起こすと考えられている (図 2)。そこで *cE4BP4* 上に存在する CK1 モチーフ中の第一番目のセリン残基をアラニン残基に置換した場合に *cE4BP4* の易動度がどのように変化するかを調べた。その結果、変異を導入した場合には、リン酸化修飾に伴って誘導される低易動度の

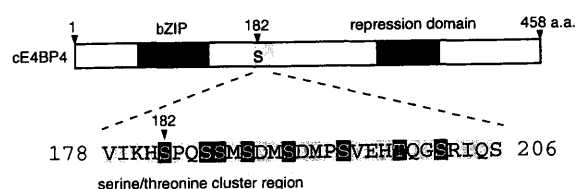


図2 E4BP4蛋白質の一次構造

アミノ酸残基182番目から始まるセリン/スレオニンのクラスター配列は、CK1のリン酸化のコンセンサス配列(Sp/Tp-X₁₋₃-S/T; S/TがCK1によってリン酸化されるセリンもしくはスレオニン、Spはリン酸化セリン、Tpはリン酸化スレオニン、X₁₋₃は1から3個の介在アミノ酸残基を表す。)に一致する。おそらく182番目のセリン残基がリン酸化されることで後続のセリン/スレオニン残基がCK1によってリン酸化されるようになると思われる。

cE4BP4 が認められなくなった。このことから、cE4BP4 のリン酸化には CK1 が関与している可能性が示された。

CK1 ファミリーに属する一群のキナーゼの中でも CK1ε は、ショウジョウバエやハムスターの遺伝学的な解析から概日時計の発振に必要な分子であることが知られている。そこで申請者は、CK1ε が cE4BP4 のリン酸化を触媒するキナーゼではないかと推測した。この可能性を検証するため、培養細胞において CK1ε と cE4BP4 を共発現させたところ、CK1ε のキナーゼ活性に依存して cE4BP4 の蛋白質量が減少することを見出した。さらに、同様の実験条件下において培養細胞中の cE4BP4 の転写抑制活性を測定したところ、cE4BP4 の抑制活性は CK1ε のキナーゼ活性に依存して低下することが分かった。これらのことから CK1ε によるリン酸化は、cE4BP4 の蛋白質量を減少させるばかりではなく、同時に cE4BP4 の転写抑制活性も低下させることが判明した。これら一連の結果は、生体内における cE4BP4 蛋白質の挙動と合致する。つまり、ヒヨコ松果体の cE4BP4 はリン酸化を受けた後に蛋白質量が減少したことから、生体内においても CK1ε は cE4BP4 の蛋白質量を負に制御することによって細胞内の cE4BP4 の活性を調節している可能性が考えられた。

以上の結果から、ヒヨコ松果体における cE4BP4 蛋白質の変動は、光・時刻に依存する *cE4bp4* 遺伝子の発現と、翻訳後になされるリン酸化を介した蛋白質の代謝によって形作られていると考えられた。こうして生み出された cE4BP4 蛋白質は *cPer2* 遺伝子の転写を抑制すると考えられる。特に、明期の延長によって誘導される cE4BP4 蛋白質は、翌朝の *cPer2* 遺伝子の発現を抑制することで概日時計の位相後退を誘導する可能性が高い。またさらに一歩踏み込むと、cE4BP4 蛋白質の日周変動は、*cPer2* 遺伝子の発現リズムの形成にも大きく寄与している可能性がある。つまりニトリ松果体の概日時計システムにおいては、cE4BP4 が時計の発振と光位相同調の両方に深く関与する重要な時計因子であると考えられた(図3)。

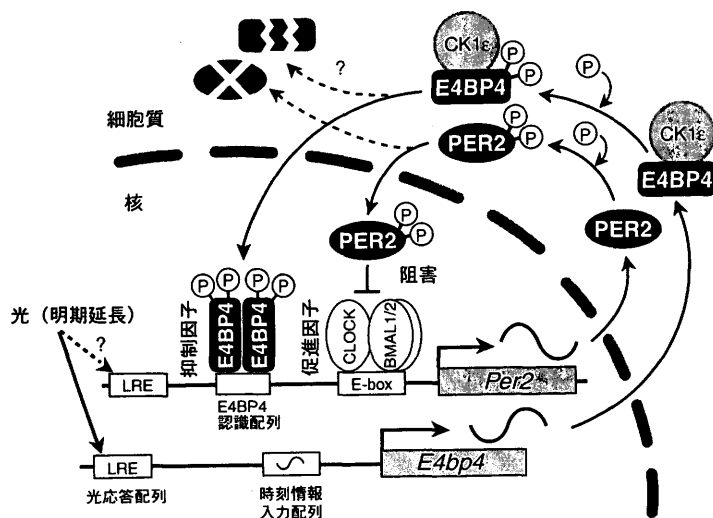


図3 ニトリ松果体の概日時計システム

時計発振系

促進因子であるCLOCKとBMAL1/2が *Per2*の転写を活性化し、その産物である PER2が抑制因子として自分自身の転写を抑制する。その結果、PER2の発現量が減少すると、この抑制が弱まり、再び *Per2*の転写が活性化される。こうして約24時間周期のリズムが形成される。E4BP4は *Per2*の転写を周期的に抑制することによって *Per2*の発現リズムを増強または安定化する。E4BP4蛋白質の安定性は、CK1εによるリン酸化を介して制御される。

光入力系

光刺激によって誘導されたE4BP4が *Per2*の転写を抑制し、時計位相を後退させる。