

論文内容の要旨

論文題目 **Mouse Cryptochromes are Phosphorylated and Functionally Regulated by Multiple Kinases in The Circadian Clock System.**

(概日時計発振系におけるマウス Cryptochrome のリン酸化と機能制御)

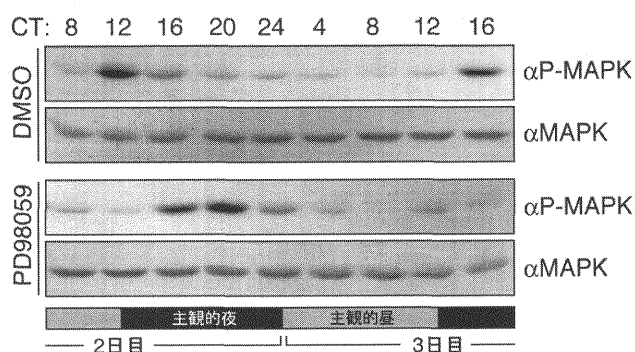
氏名 原田 裕子

地球の自転に伴う約24時間周期の環境変化に適応するため、多くの生物は概日時計機能を持っており、自らの行動やホルモン分泌を調節している。概日時計は、約24時間周期で自律的に発振すると共に、外界の明暗サイクルに同調できるという特徴をもち、脊椎動物においては網膜・視交叉上核などの中枢神経系に概日時計発振系 (master clock) が存在する。これら master clock の他に、肝臓や心臓などの末梢器官にも概日時計発振系 (peripheral clock) が存在するが、長期間におよぶ安定した発振のためには、master clock からの時刻シグナルを必要とする。近年、マウス視交叉上核や肝臓を用いた解析により、脊椎動物における概日時計発振系の基本骨格が明らかにされつつあり、master clock および peripheral clock はいずれも、同様の機構により発振していると考えられている。哺乳類の発振系においては、転写促進因子である CLOCK/BMAL1 ヘテロ二量体が mouse *Period* (*mPer1*, *mPer2*, *mPer3*) および mouse *Cryptochrome* (*mCry1*, *mCry2*) の転写を促進する。産生された mPER 蛋白質および mCRY 蛋白質は核に移行し、自らの転写を抑制する。その結果、*mPer/mCry* mRNA 量および mPER/mCRY 蛋白質量は増減を繰り返す。このような転写・翻訳を介した負のフィードバックループを基本骨格とする発振系が、24時間という周期で安定に振動するためには、転写・翻訳レベルでの制御に加えて、時計蛋白質の活性・局在・安定性などが翻訳後修飾によって巧妙に調節される必要があるが、その詳細な機構については未知の部分が多い。

私は、概日時計発振系が存在するウシガエル網膜において MAPキナーゼ (MAPK) 活性 (リン酸化量) が明暗サイクル下および恒暗条件下で (主観的) 夜に上昇し、(主観的) 昼に低下すると

いう日周変動を示すことを見出した。このような MAPK のリン酸化リズムは器官培養した網膜においても継続することから、網膜に内在する時計発振系によって制御されていると考えられた。網膜は複数種の神経細胞から構成されており、その中のいずれの細胞において MAPK 活性が日周変動しているかを明らかにするために、培養網膜を用いて免疫組織化学的解析を行った。その結果、MAPK は一日を通して常に網膜のほぼ全ての細胞層に存在するのに対して、リン酸化型 MAPK は一部のアマクリン細胞にのみ存在し、日周変動をすることが明らかになった。

さらに、概日時計システムにおける MAPK の役割を調べるため、培養網膜に PD98059 (MAPK の上流因子である MEK に対する特異的阻害剤) を主観的夜に投与した。その結果、MAPK の一時的な活性阻害に伴って、概日時計の位相が 4~8 時間も後退した (図 1)。つまり、MAPK の時刻依存的なリン酸化は MEK が担っており、MAPK の活性変動が概日リズムの形成に極めて重要な役割を果たしていると考えられた。以上の結果、(1) MAPK は発振系からの時刻シグナルによって制御され、(2) MAPK の活性変化は発振系の位相を制御する、という 2 点を考え併せると、時計発振系のコアグループに対して MAPK はサブグループを形成し、時刻情報をコアグループにフィードバックすることによって位相を巧みに調節していると考えられた。

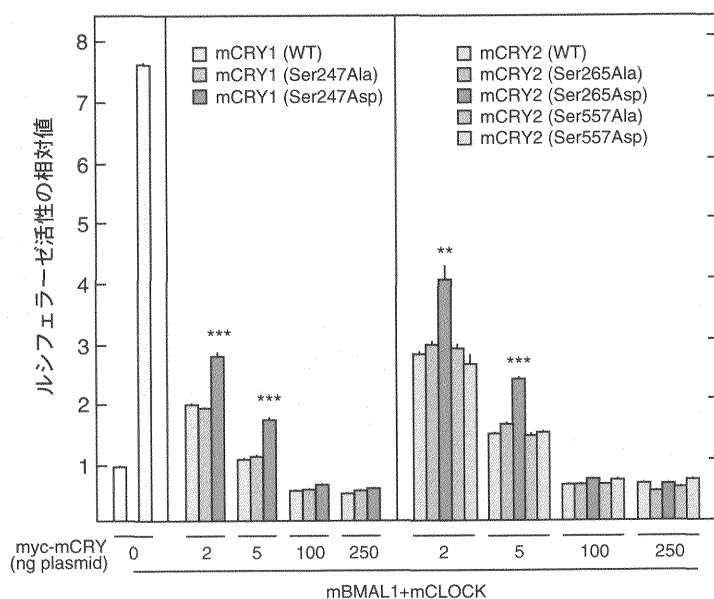


【図 1】 PD98059 が概日時計の位相に与える影響。

ZT 8 から網膜の培養を開始し、ZT 10-22 (12 時間) に PD98059 あるいはコントロールとして DMSO を投与した (1 日目)。1 日目の ZT 12 から網膜を恒暗条件下に移し、2 日目および 3 日目に網膜懸濁液を作製して anti-phospho-MAPK 抗体 (パネル 1 段目・3 段目) あるいは anti-MAPK 抗体 (パネル 2 段目・4 段目) によってイムノブロットを行った。

MAPK 活性の概日リズムはマウス視交叉上核・肝臓などでも観察できることから、マウス時計蛋白質を用いて発振系コアグループにおける MAPK の作用点を解析した。その結果、哺乳類培養細胞内において MAPK が mCRY1 および mCRY2 と結合し、さらに、*in vitro* において MAPK は mCRY1 および mCRY2 をリン酸化することが判明した。*in vitro* kinase assay において mCRY1 の Ser247 を Ala に置換した変異体を用いた場合、および mCRY2 の Ser267・Ser557 を Ala に置換した変異体を用いた場合、MAPK によるリン酸化が顕著に低下することから、mCRY1 の Ser247 および mCRY2 の Ser265・Ser557 が MAPK による *in vitro* リン酸化部位であると同定できた。mCRY1 の Ser247 および mCRY2 の Ser265 近傍のアミノ酸配列は完全に一致しており、この領域を用いて両者を認識するリン酸化特異的抗体 (anti-pS247/S265-CRY1/2 抗体) を作製した。mCRY1 あるいは mCRY2 と

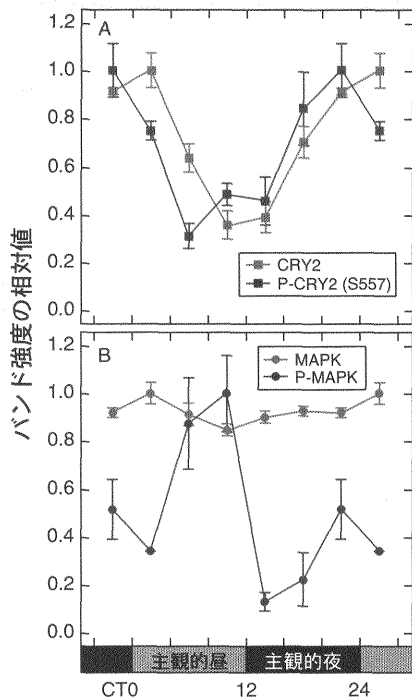
構成的活性型 MEK および MAPK とを COS7 細胞において共発現させて anti-pS247/S265-CRY1/2 抗体によってイムノブロットを行った結果、mCRY1 Ser247 および mCRY2 Ser265 は哺乳類培養細胞内においても MAPK の活性化に伴ってリン酸化が顕著に亢進することが明らかとなった。さらに、リン酸化による mCRY の機能調節の可能性を検討するため、各リン酸化部位の Asp 置換体（リン酸化状態を模倣する変異体）を作製してルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、野生型 mCRY1 および mCRY2 は CLOCK/BMAL1 を介した転写活性化を抑制するのに対して、mCRY1(Ser247Asp) および mCRY2(Ser265Asp) 変異体の転写抑制能は野生型と比較して顕著に低下することが判明した（図2）。



【図2】 mCRY のリン酸化部位変異体の転写抑制能の比較。mCRY1(Ser247Asp) 変異体および mCRY2(Ser265Asp) 変異体は野生型と比較して CLOCK/BMAL1 による E-box を介した転写活性化を抑制する能力が有意に低下する。 (**p<0.01, ***p<0.001, ANOVA)

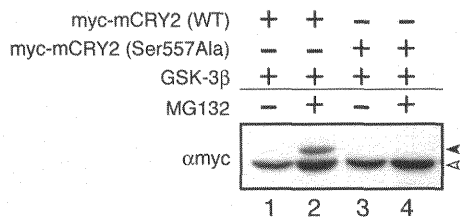
次に、mCRY2 の Ser557 に対するリン酸化特異的抗体 [anti-pS557-CRY2 抗体] を作製し、マウス肝臓における Ser557 のリン酸化の変動を調べた。その結果、mCRY2 Ser557 のリン酸化量は、主観的夜の後半から主観的昼の前半にかけて上昇するという顕著な概日リズムを示した（図3）。肝臓において、mCRY2 蛋白質の総量も顕著な日周変動を示したが、興味深いことに、mCRY2 Ser557 のリン酸化リズムは mCRY2 蛋白質量の日周変動の位相よりも約4時間先行していた（図3）。一方、MAPK 活性は主観的昼の後半に高く（図3）、mCRY2 のリン酸化リズムとは位相が一致しなかった。また、COS7 細胞に mCRY2 を発現させた場合、MAPK の活性化または不活性化にかかわらず、mCRY2 Ser557 のリン酸化レベルが変化しないことから、生体内においては MAPK が mCRY2 Ser557 のリン酸化に関与しないと考えられた。

リン酸化リズムを示す Ser557 近傍のアミノ酸配列は、glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) のリン酸化コンセンサス配列 [Ser/Thr-X-X-X-(phospho-Ser/Thr)] とよく一致し、COS7 細胞において発



【図3】マウス肝臓における mCRY2 Ser557 および MAPK のリン酸化リズム。恒暗条件下において、各時刻にマウス肝臓懸濁液を作製した後、(A) anti-CRY2 抗体によって mCRY2 を免疫沈降し、anti-pS557-CRY2 抗体あるいは anti-CRY2 抗体によってイムノブロットを行った。(B) 懸濁液に対して、anti-phospho-MAPK 抗体あるいは anti-pan ERK 抗体によってイムノブロットを行った。

本研究の結果、mCRY は MAPK や GSK-3 β などの複数のキナーゼによってリン酸化されることにより、その機能・安定性が精密に調節されていることが明らかになった。ショウジョウバエのカゼインキナーゼ Ie 変異体では、PER 蛋白質のリン酸化・安定性が変化し、発振系の周期が著しく変化することが知られている。本研究で明らかになった mCRY のリン酸化による制御もまた、発振系が 24 時間という周期で駆動するために極めて重要であると考えられた。



【図4】mCRY2 は GSK-3 β によってリン酸化されプロテアソーム系によって分解される。COS7 細胞にプラスミドを共発現させたのち 18 時間後に、MG132 を投与して 12 時間培養した。細胞懸濁液を作製し、anti-myc 抗体によって myc-mCRY2 を検出した。MG132 存在下では GSK-3 β によってリン酸化された myc-mCRY2 (\blacktriangleleft) が検出できる (レーン 2)。 \blacktriangleleft は GSK-3 β によってリン酸化されていない myc-mCRY2 を示している。

現させた mCRY2 を免疫沈降したのち GSK-3 β とインキュベートすると、実際に mCRY2 はリン酸化されて電気泳動上の移動度が低下した。このリン酸化は、mCRY2(Ser557Ala) 変異体では観察できなかったことから、GSK-3 β は Ser557 依存的に mCRY2 をリン酸化すると考えられた。また、COS7 細胞において発現させた mCRY2 を免疫沈降したのち脱リン酸化処理した場合には、GSK-3 β によってリン酸化されなかった。これらのことから、mCRY2 Ser557 のリン酸化依存的に GSK-3 β は mCRY2 をリン酸化することが明らかになった。驚いたことに、COS7 細胞に mCRY2 と GSK-3 β を共発現させても、移動度が低下したバンドが検出できないのに対して、培地中に MG132 (26S プロテアソーム阻害剤) を投与した場合には、mCRY2 の低移動度のバンドを確認することができた (図 4)。以上の結果、mCRY2 は、Ser557 のリン酸化に伴って GSK-3 β によってリン酸化され、その結果、プロテアソーム系によって分解されることが示唆された。