

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Phosphorylation-dependent regulation of CLOCK and BMAL1  
in circadian oscillatory systems

(概日時計発振系における CLOCK と BMAL1 のリン酸化による機能制御)

氏名 吉種 光

生物の重要な測時機構の一つである概日時計は、多様な生命現象にみられるサーカディアンリズムを支配しており、この概日時計の振動には、時計遺伝子とその翻訳産物である時計タンパク質が中心的な役割を果たしている。bHLH-PAS 型の転写因子である CLOCK と BMAL1 は、互いに複合体を形成して時計シスエレメント (CACGTG 配列とその類似配列、以下 E-box と略す) に結合し、*Per* や *Cry* などの負の制御遺伝子の転写を促進する。その翻訳産物である負の制御因子群は、核内に移行して CLOCK-BMAL に結合し、巨大な時計因子複合体を形成することにより E-box 依存的な転写促進活性を抑制する。この負のフィードバックループが約 24 時間という長い時間をかけて 1 サイクルすることにより、サーカディアン振動が生まれると考えられている (図 1)。1997 年に脊椎動物の時計遺伝子がクローニングされて以来、この 10 年間で分子生物学的な解析が爆発的に進展して時計遺伝子の同定が進み、負のフィードバックループ機構が明らかになったが、タンパク質レベルでの分子解剖は立ち遅れている。なかでも、巨大な時計因子複合体の形成が転写抑制を導く分子機構は、時計発振の骨格を担う重要な問題であるにもかかわらず、不明な点が多く残されている。そこで私は、タンパク質レベルでこの時計因子複合体を分子解剖することにより、概日時計の転写抑制メカニズムの実態に迫った。

本研究ではまず、時計因子複合体の解析を可能とする分子ツールとして、CLOCK および BMAL1 に対するモノクローナル抗体を作製した。特に抗 CLOCK 抗体は高感度でかつ特異性が高く、マウス肝臓より CLOCK-BMAL1 複合体を精製することを可能とした。こうして精製した CLOCK-BMAL1 複合体の時刻依存的な変動をタンパク質レベルで解析した結果、BMAL1 は E-box 依存的な転写が活性化する時刻にリン酸化レベルが上昇することを明らかにした (図 1)。一方、大部分の CLOCK はリン酸化されており、E-box 依存的な転写が抑制される時刻にはそのリン酸化レベルがさらに亢進することを見出した (図 1)。この CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化リズムは、NIH3T3 細胞を Dex 刺激により同調させた時にも観察されたことから、細胞内の分子時計によって駆動されていることがわかる (図 1)。

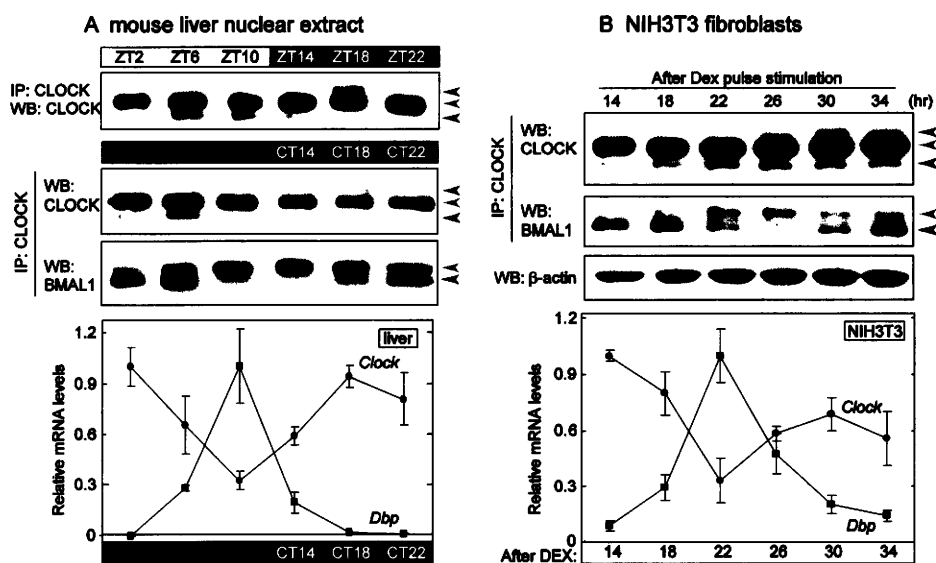


図 1 CLOCK と BMAL1 の時刻依存的なリン酸化リズム

(A) マウスを 12 時間ずつの明暗サイクルに同調させた後、4 時間おきにマウス肝臓核抽出物を調製した。明期の開始時刻を ZT0 とし、恒暗条件 1 日目の時刻を CT で表記した。  
 (B) NIH3T3 細胞を Dex 刺激により同調した後、14 時間後から 4 時間おきに細胞を回収した。  
 (A-B) 抗 CLOCK 抗体を用いて免疫沈降した産物に対して、抗 CLOCK 抗体および抗 BMAL1 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った (上部)。同条件でサンプリングした試料から RNA を抽出し、*Clock* および *Dbp* に対する特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った (下部)。

時計因子の複合体形成の生理的意義にアプローチするために、細胞内で時計因子複合体の構成成分を限定的に発現させ、その組み合わせによる CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化レベルを解析した。CLOCK および BMAL1 を NIH3T3 細胞に単独で発現させた場合には、これらのリン酸化は観察されなかったが、両者を共発現することにより CLOCK と BMAL1 の両者のリン酸化バンドを検出した。さらに、この相互依存的なリン酸化は、強い負の制御因子である CRY2 の共発現によりほぼ完全に阻害された。興味深いことに、近年あらた

たに同定された負の制御因子である CIPC を共発現することにより CLOCK のリン酸化レベルは顕著に亢進することが判明した (図 2)。このように、負の制御因子は時刻依存的に CLOCK-BMAL1 と結合し、その組み合わせやタイミングにより CLOCK-BMAL1 複合体のリン酸化状態を巧みに制御している可能性が示唆された。

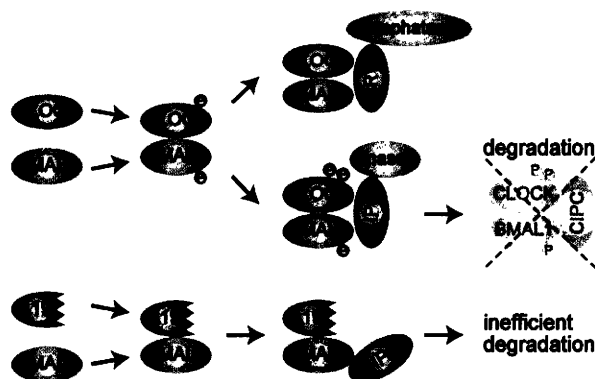


図 2 負の制御因子による CLOCK と BMAL1 のリン酸化制御 (モデル)

転写抑制の時刻において亢進する CLOCK リン酸化の意義を分子レベルで解明するために、そのリン酸化部位の同定を試みた。転写抑制の時刻にマウスより肝臓を摘出し、その核抽出物を陰イオン交換カラムおよび抗 CLOCK 抗体固定化カラムに供することにより CLOCK を単離した。こうして得られた CLOCK タンパク質を質量分析を用いたプロテオーム解析に供した結果、Ser38、Ser42 および Ser427 がリン酸化されていることが判明した。Ser38 と Ser42 は CLOCK の DNA 結合領域に位置しており、これらの Asp 置換は相加的に CLOCK の転写活性を減弱させた。さらに、Ser38 と Ser42 近傍は bipartite 型の NLS として機能しており、この短い領域を GFP との融合タンパク質を細胞に発現させたところ、GFP シグナルの核への局在が観察された。さらに Ser38 と Ser42 への Asp 置換は、この GFP シグナルの核局在を減弱するのみならず、全長 CLOCK の細胞内局在にも影響を与えることが判明した。これに加えて、*Per1* 上流の E-box 周辺配列と無細胞系で発現させた CLOCK-BMAL1 複合体を用いて EMSA を行った結果、Ser38 と Ser42 への Asp 置換は CLOCK-BMAL1 複合体の DNA 結合能を減弱させることを見出した。これらの結果は、転写抑制の時刻に CLOCK の Ser38 と Ser42 はリン酸化され、CLOCK が DNA から解離して核外へと排出されて転写活性が抑制される可能性を示唆している。

*Clock* 変異マウスにおいて、CIPC 結合ドメインを持たない変異 CLOCK ( $\Delta 19$ ) が発現していることが知られている。CIPC が CLOCK リン酸化を亢進させたことから、CLOCK $\Delta 19$  を NIH3T3 細胞に発現させたところ、そのリン酸化レベルは野生型と比べて著しく減弱して

いた（図 2）。この結果から私は、*Clock* 変異マウスを CLOCK リン酸化異常モデルマウスと位置づけた。実際、*Clock* 変異マウスの肝臓においても、CLOCK $\Delta$ 19 のリン酸化レベルは著しく減弱していた。さらに、*Clock* 変異ヘテロマウスにおいて、野生型 *Clock* と *Clock*  $\Delta$ 19 の mRNA 量に違いは見られなかったにもかかわらず、CLOCK $\Delta$ 19 の細胞内タンパク質量は野生型の 2 倍以上にまで増加していた（図 2）。このことから私は、CLOCK のリン酸化が分解に寄与している可能性を考えた。そこで、NIH3T3 細胞の calyculin A 処理により CLOCK のリン酸化レベルを上昇させたところ、過リン酸化された CLOCK はプロテアソームを介した分解へと導かれた。

以上の結果から、CLOCK のリン酸化は、自身の核移行、DNA 結合能、転写活性能、タンパク質寿命を減弱させることにより、転写抑制機構において重要なシグナルとして働く可能性が示唆された（図 3）。この CLOCK の時刻依存的なリン酸化は、負の制御因子により巧妙に制御され、分子時計の発振に重要な役割を果たすと考えられた。

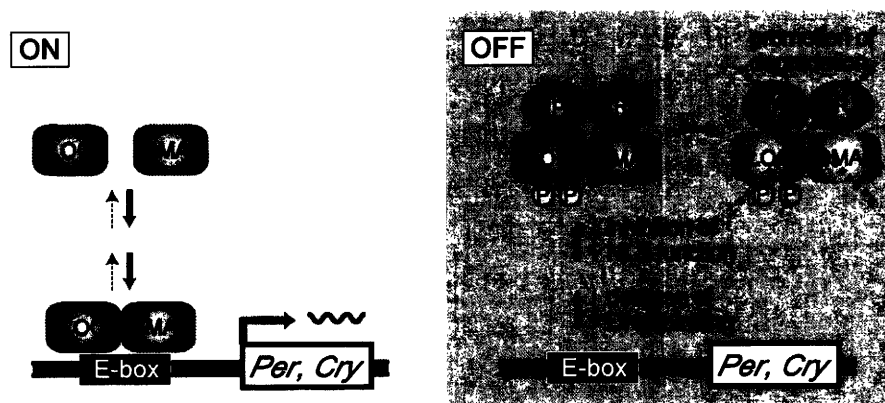


図 3 CLOCK のリン酸化は転写抑制に寄与している（モデル）