

論文内容の要旨

論文題目 Mechanism of sequential phosphorylation of mouse CRY2 and its role
in regulating the circadian clockwork

(時計タンパク質 mCRY2 の段階的リン酸化メカニズムと
その概日リズム制御における役割)

氏名 倉林 伸博

概日リズムとは地球上のほとんど全ての生物が示す約一日周期の変動現象であり、このリズムを支配する生体内の自律的振動システムを概日時計という。哺乳類の概日時計は、行動リズムを支配する視床下部の視交叉上核だけでなく、肝臓や心臓など様々な末梢組織にも存在し、それぞれを中枢時計・末梢時計と呼ぶ。これらの時計は互いに類似した機構によってリズムを形成しており、いずれも時計遺伝子の転写と翻訳を介した負のフィードバックループに基づいている。哺乳類においては、正の制御因子である CLOCK および BMAL が複合体を形成して E-box 配列 (CACGTG) やその類似配列に結合することにより、*Period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) および *Cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*) 遺伝子の転写を活性化する。翻訳された PER および CRY タンパク質は核へ移行し、CLOCK-BMAL 複合体の機能を負に制御することによって自らの転写を抑制する。このような概日時計の分子発振機構が約 24 時間という非常に長い周期を正確に維持するには、転写と翻訳の制御に加えてタンパク質の翻訳後の機能制御が重要な役割を果たす。特に、時計遺伝子の転写活性が適切な時刻に正と負の制御を受けて正確なサーカディアン変動を形成するためには、時間制御された時計タンパク質の分解が極めて重要なステップとなる。

負の制御因子の一つである時計タンパク質 CRY2 は、E-box を介した時計遺伝子の転写活性化を強力に抑制する。マウス肝臓において、CRY2 の C 末端領域に位置する 557 番目の Ser 残基 (Ser557) がリズムックにリン酸化されることを私は見出した。Ser557 がリン酸化

されたCRY2はさらにGSK-3 β によってSer553がリン酸化され、この2段階リン酸化に依存してCRY2はプロテアソームによって分解される。そのため、この一連のリン酸化反応は、CRY2のタンパク質量を制御する重要なメカニズムであると考えられた。さらにCRY2 Ser557のリン酸化レベルは、個体の行動リズムを支配する視交叉上核において日内変動を示すことを明らかにした。以上の知見から、CRY2のSer557リン酸化に依存した分解は、行動リズム周期の制御といった中枢時計の機能にも寄与する重要な調節機構である可能性が示唆された。ここで、CRY2 Ser557はERKによって*in vitro*でリン酸化されるが、培養細胞においてERKを強制発現したり不活性化してもCRY2 Ser557のリン酸化レベルは変化しない。そのため、生体内ではERK以外のタンパク質キナーゼがSer557をリン酸化してCRY2を分解に導くと考えられた。

そこで、CRY2 Ser557をリン酸化するキナーゼ（以下、Ser557キナーゼと記す）を探索するために、Ser557リン酸化活性を定量的に解析できる*in vitro*キナーゼアッセイ系を構築した。次に、マウス肝臓の懸濁液を核と細胞質の二画分に分けてSer557キナーゼ活性を測定した結果、細胞質に多くの活性（約81%）が存在することがわかった。そこで、細胞質画分のタンパク質をDEAEカラムクロマトグラフィーによって分画し、各画分のSer557キナーゼ活性を測定した。その結果、Ser557リン酸化活性が複数のピークに分離すること、および活性化型ERKを含まない活性ピークが存在することがわかった（C-3ピーク；図1）。この活性ピークに注目し、様々なキナーゼ阻害剤の存在下でSer557キナーゼ活性を測定した結果、多くの阻害剤はほとんど阻害効果を示さなかったが、CK2およびDYRK1Aの阻害剤であるTBBtがSer557キナーゼ活性を減弱することを突き止めた。そこでGST-CRY2を基質とした*in vitro*の実験によって、CK2とDYRK1Aの組み換えタンパク質がCRY2 Ser557をリン酸化する可能性を検討した。その結果、DYRK1AがCRY2 Ser557をリン酸化することを見出し、さらにDYRK1AがC-3ピークに含まれることから（図1）、Ser557キナーゼの候補としてDYRK1Aが考えられた。

DYRK1Aは、ヒトやマウスにおける脳の発生や機能形成に重要な役割を果たすSer/Thrキナーゼであり、幅広い生体組織に発現している。実際、末梢時計の研究モデルとして広く用いられているNIH3T3細胞やRat-1細胞においてもDYRK1Aの発現が認められた。そ

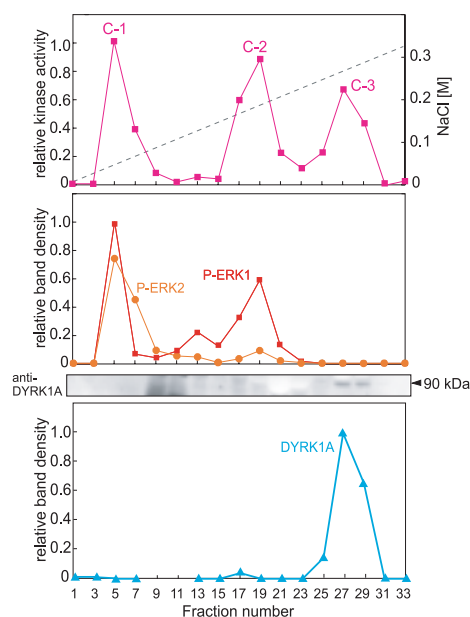


図1 マウス肝臓の細胞質画分のDEAEカラムクロマトグラム
マウス肝臓の細胞質画分（CT 6と18の等タンパク質量混合物）をDEAEカラムにロードし、NaClグラジエントによって溶出した。各画分を1 mM ATP存在下でGST-CRY2と30分間インキュベートした。この反応産物に対してanti-pS557-CRY2抗体（パネル1段目）、anti-pT202/pY204-ERK抗体（パネル2段目）およびanti-DYRK1A抗体（パネル3・4段目）を用いてウェスタンブロット解析を行った。陽性バンドのシグナル強度を定量し、最大値を1としたときの各シグナルの相対値をプロットした。

ここで次に、NIH3T3 細胞内において DYRK1A が CRY2 Ser557 をリン酸化するか否かを検証するため、細胞に内在する *Dyrk1a* をノックダウンし、共発現させた myc-CRY2 の Ser557 リン酸化レベルを解析した。この時 CRY2 タンパク質の分解を防ぐため、プロテアソーム阻害剤である MG132 を培地に投与した条件で実験を行った。独立した 2 つの *Dyrk1a* shRNA をそれぞれ細胞に発現させると、いずれの場合においても myc-CRY2 の Ser557 リン酸化レベルが減弱した（図 2）。一方、DYRK1A を NIH3T3 細胞に過剰発現させると、共発現させた myc-CRY2 の Ser557 リン酸化レベルが亢進した。以上の結果から、NIH3T3 細胞においても DYRK1A が CRY2 Ser557 をリン酸化すると考えられた。この時、DYRK1A が CRY2 のタンパク質量を負に制御することを見出した。すなわち、MG132 非存在下では、NIH3T3 細胞において *Dyrk1a* をノックダウンすると myc-CRY2 のタンパク質量が著しく増加した。一方、NIH3T3 細胞に DYRK1A を過剰発現させると myc-CRY2 のタンパク質量が減少した。myc-CRY2 とは異なり myc-CRY1 のタンパク質量は DYRK1A の過剰発現によって低下しないことから、DYRK1A によるタンパク質の分解制御は、CRY2 に特有のメカニズムである可能性が示唆された。

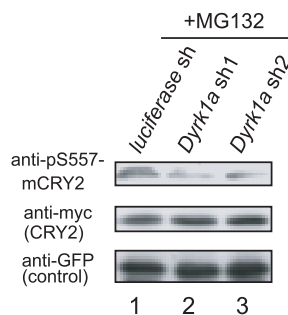


図2 *Dyrk1a* ノックダウンはCRY2 Ser557リン酸化レベルを減弱させる

NIH3T3細胞に種々のshRNAと共にmyc-mCRY2を共発現させ、その40時間後にMG132を投与して8時間培養した。細胞懸濁液に対してanti-pS557-CRY2抗体、anti-myc抗体およびanti-GFP抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

興味深いことに、マウス肝臓において DYRK1A のタンパク質量は、暗期の中頃をピークとする日周変動を示した。そこで、マウス肝臓から免疫沈降した DYRK1A の CRY2 Ser557 リン酸化活性を、GST-CRY2 を基質とした *in vitro* キナーゼアッセイによって解析した。一日の様々な時刻に調製したマウス肝臓の抽出液を用いて解析した結果、DYRK1A の Ser557 リン酸化活性も日周変動を示すことが判明した。その日周変動のプロファイルは DYRK1A タンパク質量の日周変動パターンとよく似ており、CRY2 の Ser557 リン酸化レベルの日周変動の位相より約 4 時間先行していた。この結果から、DYRK1A は CRY2 タンパク質量が増加する時間帯において CRY2 の Ser557 リン酸化に強く寄与すると考えられた。

DYRK1A が概日時計の発振制御において果たす役割を調べるため、細胞時計のリズム可視化実験を行った。具体的には、時計遺伝子 *Bmal1* のプロモーター領域に *luciferase* 遺伝子を連結したレポーターを培養細胞に導入し、その生物発光を連続観察して細胞時計を可視化した。その結果、DYRK1A の過剰発現によって NIH3T3 細胞の時計の周期が約 0.8 時間延長した。一方、*Dyrk1a* のノックダウンが細胞時計の周期に与える影響を解析するために、Rat-1 細胞において *Dyrk1a* shRNA を安定に発現する複数の細胞株を樹立した。これらの細胞に内在する時計の周期を解析した結果、いずれの場合も約 0.5 時間の時計周期の短縮が認められた。さらに、時計周期の短縮が引き起こされた分子基盤に迫るため、*Dyrk1a* ノック

ダウン細胞の核と細胞質におけるCRY2タンパク質の経時変化を調べた。その結果、細胞質においては一日の全ての時刻においてCRY2タンパク質の著しい増加が認められた。一方、核内のCRY2タンパク質に大きな変化は認められなかったが、*Dyrk1a*ノックダウン細胞においてCRY2がコントロール細胞よりも早く蓄積することが判明した(図3)。以上の結果から、DYRK1Aは主に細胞質においてCRY2の分解を促進し、CRY2の核移行タイミングを遅延させる重要な因子であると考えられた。つまりCRY2のSer557リン酸化による分解制御は、時計遺伝子の転写抑制時刻の遅延メカニズムとして時計の周期を調節すると考えられた。

以上の研究から、CRY2タンパク質を分解へと導く二段階のリン酸化メカニズムを明らかにした。最近、CRY1とCRY2は共にAMPKによってリン酸化される事、さらにこのリン酸化依存的にFbx13を介してCRYタンパク質が分解されることが明らかに

された(Lamia *et al.*, *Science*, 2009)。この分解系は主に核においてCRY2の分解を促進し、時計遺伝子の転写活性化のタイミングを調節する機構であると考えられている。一方、主に細胞質において起こるCRY2の二段階リン酸化依存的な分解は、CRY2が蓄積する時間帯に重要な役割を果たすと考えられた。つまりこの分解系は、核移行に充分量のCRY2が細胞質に蓄積するまでの時間を延長させ、CRY2の核移行を遅延する。その結果、E-boxを介した時計遺伝子の転写活性化が適切なタイミングで負に制御される。したがって本研究で明らかにしたCRY2タンパク質の分解制御系は、AMPK・Fbx13依存的な分解系とは異なる生理的役割をもつと考えられる。すなわち、時空間的に異なる2つの分解制御を受けることによってCRY2のタンパク質レベルが巧みに調節され、これらが概日時計発振に重要な役割を果たすと考えられた(図4)。

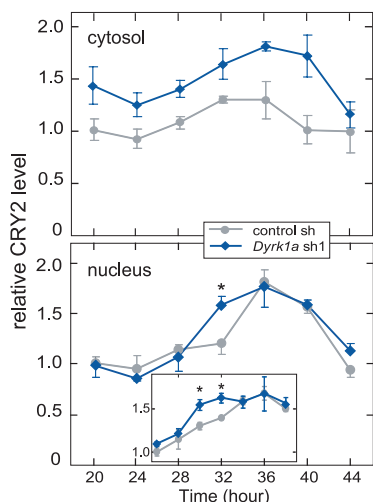


図3 *Dyrk1a*ノックダウン細胞におけるCRY2タンパク質の日周変動プロファイル control shRNAもしくは*Dyrk1a* shRNA sh1を安定発現するRat-1細胞の時計をdexamethasoneによって同調させた。細胞を4時間おき、もしくは2時間おき(インセット)に回収し、核と細胞質の画分を調製した。各画分に対してanti-CRY2抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。陽性バンドのシグナル強度を定量し、control細胞の回収を開始した時刻の値を1としたときの各シグナルの相対値をプロットした。*はP<0.05を表す(検定)。

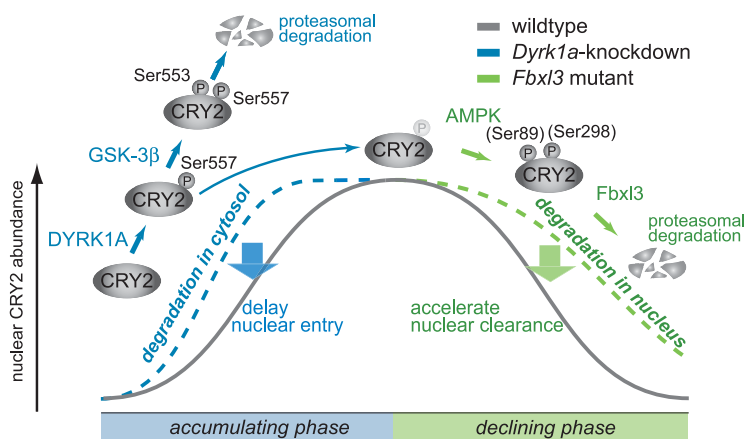


図4 時空間的に異なった2つの分解系によるCRY2タンパク質レベルの制御モデル

この分解系は、核移行に充分量のCRY2が細胞質に蓄積するまでの時間を延長させ、CRY2の核移行を遅延する。その結果、E-boxを介した時計遺伝子の転写活性化が適切なタイミングで負に制御される。したがって本研究で明らかにしたCRY2タンパク質の分解制御系は、AMPK・Fbx13依存的な分解系とは異なる生理的役割をもつと考えられる。すなわち、時空間的に異なる2つの分解制御を受けることによってCRY2のタンパク質レベルが巧みに調節され、これらが概日時計発振に重要な役割を果たすと考えられた(図4)。