

論文の内容の要旨

Posttranslational modifications regulating the stability of clock proteins PER2 and DBP

(時計タンパク質 PER2 及び DBP の安定性を制御する翻訳後修飾)

増田 周作

概日時計は約 24 時間の周期で自律的に振動し、日内の環境変化に合わせて生理機能を調節する(Reppert and Weaver, Nature, 2002)。概日時計の分子メカニズムは、転写因子である CLOCK と BMAL1 が自身の抑制因子である PER や CRY の転写を促進するという負のフィードバックによって構成される(図 1)。CLOCK と BMAL1 は PER や CRY のほかに、様々な転写因子などの発現を促進することにより、それらの制御下にある生理機能にリズム性を生み出す。例えば、概日時計の下流で機能する代表的な転写因子である DBP は、日内で発現量が大きく変動し、薬物代謝関連遺伝子などを時刻依存的に制御する(図 1)。以上のタンパク質は翻訳後修飾を受け、活性や安定性が変化することが示されてきたが、それらの制御が概日時計の振動速度に対してどの程度寄与するのか十分明らかにされていない。

本研究では PER2 及び DBP の安定性を制御する翻訳後修飾に着目して研究を行った。

前半では、PER2 の分解を促進するリン酸化が概日時計の速度に与える影響を検証した。PER2 は Ser478 (β -TrCP サイト)がリン酸化されると E3 リガーゼである β -TrCP 依存的に分解が促進するのに対し、Ser659 (FASP サイト)とその下流のセリン残基がリン酸化されると PER2 は安定化する。FASP サイトのリン酸化が阻害されると時計は短周期化するが、 β -TrCP サイトのリン酸化が阻害された際に時計の周期がどのような影響を受けるのかはわかっていない。また、最近の研究では、概日時計の中心因子の分解制御が周期の決定において重要であるかどうか疑問視されている。そこで私は、 β -TrCP サイトのリン酸化による安定性制御が概日時計機構において真に重要な制御段階であるか否かを検証した。

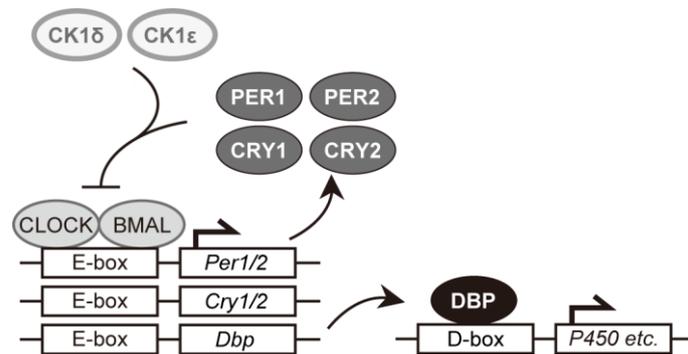


図1 概日時計を駆動する転写/翻訳フィードバックループと DBP を介した生理機能の制御

本研究では、 β -TrCP に変異が入った PER2-Ser478Ala ノックインマウスを用いて解析を行った。FASP サイトの変異体とは対照的に、このマウスは輪回し行動解析において、野生型に比べて長い概日周期を示した。変異型マウスの肝臓における *Per2* mRNA の発現量は野生型とほとんど変わらなかったのに対し、PER2 タンパク質は変異体において過剰に蓄積していた。したがって、 β -TrCP サイトのリン酸化は生体内において実際に分解シグナルとして働き、この制御が概日時計の周期長を制御することが示された。

概日時計の周期は異なる温度においても約 24 時間で振動するという温度補償性を持つ。先行研究において、PER2 のリン酸化制御は概日時計の温度補償性を担う可能性が示唆されていたため、PER2-Ser478Ala::LUC マウスに由来するマウス胚線維芽細胞(MEF)の周期を解析したところ、細胞の概日周期の温度補償性が部分的に失われていた。以上の結果から、 β -TrCP サイトのリン酸化は概日時計の周期制御に重要であり、概日時計の温度補償性の一部はこの制御によって担われていることが明らかになった。

後半では、DBP の分解制御因子を特定した。DBP は、概日時計によって制御される転写因子であり、D-box と呼ばれる DNA 配列を介して様々な生理機能を調節する。DBP の発現は、mRNA レベルとタンパク質レベルの両方で、夕暮れの時刻にピークを持った明瞭なリズムを示す。この特徴的な発現パターンを生み出す仕組みとして、CLOCK-BMAL1 による時刻依存的な転写調節が提唱されてきた。一方、DBP タンパク質の発現量は DBP の安定性制御によっても変化するが、DBP の分解メカニズムはいまだ明らかにされていない。

本研究では、ユビキチン-プロテアソーム系によって DBP が分解されることを明らかにした。また、この制御に関与する候補分子のスクリーニングを行った結果、2つの E2 酵素と1つの E3 リガーゼを同定した。この E3 リガーゼを欠失した細胞において、DBP の発現量は約 2 倍に増加したことから、安定性の調節が DBP の日内の発現パターンを決定することが明らかになった。