

リン酸化とユビキチン化によるサーカディアンリズムの制御

平野 有沙, 深田 吉孝

1. はじめに

多くの生物は、睡眠・覚醒リズムや体温リズムといった約 24 時間周期の生理リズムを示す。地球の自転周期にあわせたこのような体内リズムはサーカディアン（概日）リズムと呼ばれ、体内に存在する自律振動体であるサーカディアンクロック（概日時計）によって生み出される。概日時計は、外界からの周期的な刺激がない一定の条件においても、長い期間にわたって自律的に振動を続ける強固性（ロバストネス）を持ちながら、外界の刺激にตอบสนองして時刻を調節する柔軟性を持ちあわせる。

生物が示すリズム現象についてはかなり古くから生理学的な研究がなされてきた。一方、1997 年に *clock* 変異体のポジショナルクローニングによって *Clock* 遺伝子が同定された。これを皮切りに、概日時計の分子メカニズムの解明が急速に進んだ。概日時計システムが、24 時間という長い時間を正確に刻むために「タンパク質の翻訳後修飾」はきわめて重要である。本稿では、特にユビキチン化修飾を中心に、翻訳後修飾による時計タンパク質の制御についてこれまでの知見と、最近、我々が新しく発見した知見をまとめた。

2. 概日時計の発振メカニズム

1) 分子時計の中心ループ

概日時計の発振メカニズムの基本骨格は、時計遺伝子の転写と翻訳を介したネガティブフィードバックループであり、下等生物から高等生物まで広く保存されている（図 1）。哺乳類においては、正の転写因子である CLOCK-BMAL1 が E-box 配列に結合し、E-box エンハンサーに

よって転写活性化される *Period* (*Per1~3*) と *Cryptochrome* (*Cry1~2*) 遺伝子の転写を促進する。このように転写・翻訳された PER と CRY タンパク質は細胞内でゆっくりと時間をかけて蓄積し、PER-CRY 複合体を形成して核内に移行する。負の因子である PER-CRY 複合体は、CLOCK-BMAL1 による転写活性化を抑制してネガティブフィードバックループを形成する。転写抑制の役目を終えた PER-CRY 複合体は、核内で分解されて減少し、CLOCK-BMAL1 による次のサイクルの転写活性化が再び起こる。一日に 1 回、CLOCK-BMAL1 による転写が活性化されることにより、約 24 時間を周期としたさまざまな遺伝子の発現リズムが生み出される。

2) タンパク質修飾による時計タンパク質の制御

翻訳後修飾による時計タンパク質の精密な制御が、概日時計の発振において重要な役割を果たすことは疑いようがない。今から 25 年も前に、24 時間よりも短い異常な周期の行動リズムを示す *tau* 変異ハムスターが発見されたが、2000 年に *tau* 変異がカゼインキナーゼ Iε (CKIε) の活性変異によると証明された¹⁾。さらに、ヒトの睡眠位相症候群 (familial advanced sleep phase syndrome: FASPS) の原因遺伝子変異がヒト PER2 タンパク質のリン酸化部位 Ser662 の変異であることも示された²⁾。これらの発見により、当該研究分野において、リン酸化を中心とした翻訳後修飾による時計タンパク質の制御がにわかに脚光を浴びた。

3. ユビキチン化による時計タンパク質の分解

1) ユビキチン化によるタンパク質の制御

ユビキチンは、76 アミノ酸残基からなる小さなタンパク質である。ユビキチンの C 末端カルボキシ基は、基質タンパク質側のリシン残基の側鎖アミノ基とイソペプチド結合を形成して基質タンパク質を修飾する。基質に結合したユビキチンの分子内のリシン残基または N 末端のアミノ基に次のユビキチンが結合し、ポリユビキチン鎖が伸長する。基質特異性を決定する E3 リガーゼは、哺乳類では約 1,000 種類も存在する。一方、ユビキチン化反応は可逆的であり、ユビキチン鎖の除去やプロセッシングを行う脱

東京大学理学系研究科生物科学専攻 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Regulation of the circadian rhythm by phosphorylation and ubiquitination

Arisa Hirano and Yoshitaka Fukada (Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

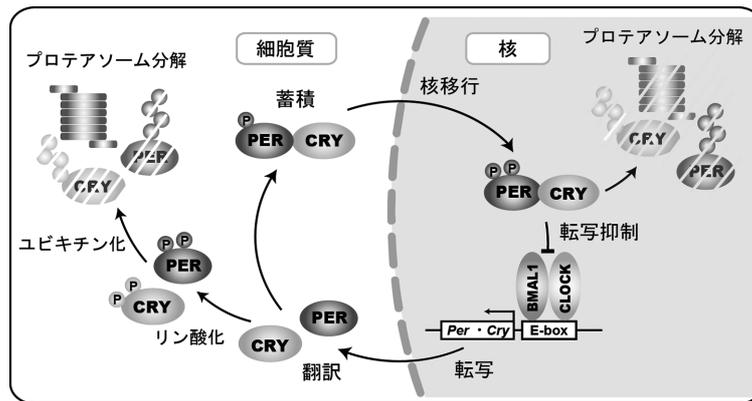


図1 概日時計のネガティブフィードバックループ
PER-CRY 複合体は CLOCK-BMAL1 の転写活性化を負に制御することにより、自身の転写を抑制する。一群の時計タンパク質は、一日を通してリン酸化やユビキチン化などさまざまな翻訳後修飾を受ける。

ユビキチン化酵素も 100 種類ほどある。

タンパク質リン酸化と同様、ユビキチン化による基質タンパク質の制御も多岐にわたる。最も古くから研究が進んでいるのは、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質の分解である。これに加え、近年ではシグナル伝達やタンパク質の局在制御にもユビキチン化修飾が関与することが明らかになってきた。このように多彩なユビキチン化の制御は、ユビキチン分子がどのような結合様式の鎖を形成するかに依存する。たとえば、ユビキチンの 48 番目のリシン残基 (K48) に結合してゆくポリユビキリン鎖は、プロテアソームにより認識されるため分解シグナルとして機能する。一方、K63 や M1 (N 末端のメチオニン残基) を介して生成するユビキチン鎖は、ユビキチン結合ドメインを持つタンパク質を集める足場となってシグナル伝達を制御する。

2) 時計タンパク質のユビキチン化研究の始まり

リン酸化による PER タンパク質制御の発見から少し遅れて、2002 年、ハエの dPER タンパク質のユビキチン化を担う E3 リガーゼ *Slimb* が同定された^{3,4)}。dPER はタンパク質キナーゼ *Doubletime* (前述の CKI のハエホモログ) によってリン酸化されることが知られており、*Slimb* はあらかじめリン酸化された dPER を認識して dPER をユビキチン化する。*Slimb* の機能欠失変異体においては、PER の発現リズムと行動リズムが消失する。興味深いことにアカパンカビにおいても、CKI または CKII 依存的にリン酸化された負の制御因子 FREQUENCY は、*Slimb* のホモログ FWD1 によってユビキチン化される⁵⁾。哺乳類においても、*Slimb* のホモログである β -TrCP によって PER1 と PER2 がユビキチン化されて分解される⁶⁾。つまり、ユビキチン化による負の因子の分解制御は幅広い種を超えて保存されている。基質である FRQ と PER には相同性がないにも関わ

らず、その分解制御を担うキナーゼと E3 リガーゼが保存されていることは興味深く、リン酸化とユビキチン化による時計タンパク質の制御機構が概日時計システムの中でいかに重要であるかがわかる。

4. FBXL3 による CRY タンパク質の分解制御

時計タンパク質の中において、PER タンパク質は一日を通してタンパク質量が顕著に概日変動する。さらに、リン酸化-ユビキチン化による分解制御の知見が早くから蓄積していたことから、PER タンパク質の量的制御に注目が集まっていた。その中で、2007 年、三つのグループから、哺乳類 CRY1・2 の E3 リガーゼとして FBXL3 が発見された⁷⁻⁹⁾。そのうち二つのグループは、変異体スクリーニングにより長周期の行動リズムを示すマウスを単離し、その原因遺伝子 *Fbxl3* を同定した。FBXL3 の点変異により、概日リズム周期が異常に長くなるだけでなく、E-box に制御された遺伝子群の転写が顕著に減少する⁷⁾。また、低分子化合物ライブラリーなどを使用した大規模スクリーニングにより、細胞時計の周期を延長させる薬剤 KL001 が同定された¹⁰⁾。この薬剤は CRY1・2 の FBXL3 結合部位である FAD 結合ポケットをターゲットとしている。そのため、KL001 による FBXL3 と CRY 結合の阻害が CRY の安定化をもたらし、細胞リズム周期を延長する。さらに、FBXL3 は、基質である CRY 依存的に E3 リガーゼ複合体 (Skp-Cull1-F-box 複合体) を形成する、という F-box タンパク質の中ではきわめて特殊な性質を持つこともわかってきた¹¹⁾。

5. FBXL21 による CRY タンパク質安定化

最近、我々と Joseph Takahashi らのグループは独立し

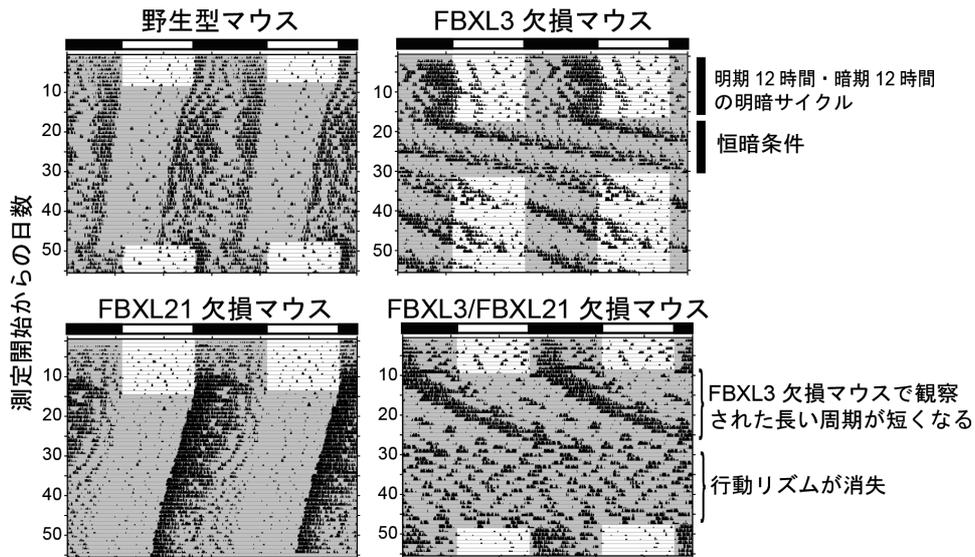


図2 *Fbxl3/Fbxl21* ノックアウトマウスの行動リズム

マウスの輪まわし行動を数週間にわたりモニタリングし、プロットした(横軸は時間、縦軸は測定開始からの日数)。黒くプロットされている部分は、マウスが行動したことを示している。灰色の影は暗期を示しており、測定開始時点では明記12時間・暗期12時間の明暗サイクルでマウスを飼育した。その後、恒暗条件に移し、マウスの行動リズム周期からマウスの体内時計の周期を算出した。野生型マウスは約23.5時間周期の行動リズムを示すため、活動の開始点が一日ずつ前にずれていく(左上)。*Fbxl3* ノックアウトマウスはきわめて長い周期(約28時間)の行動リズムを示すため、行動の開始点は一日ずつ後ろにずれていく(右上)。このような *Fbxl3* 欠損マウスの長周期性は、*Fbxl21* の欠損によって大きく緩和されて24時間に近くなる(右下)。さらに、一部のマウスは行動リズムが消失する。

て、FBXL3の相同タンパク質であるFBXL21によるCRYの新規制御メカニズムを発見した^{12,13}。FBXL21はCRY1とCRY2をユビキチン化して、意外なことにCRYを安定化することがわかった。つまり、FBXL3とFBXL21は互によく似たE3リガーゼでありながら、同じ基質を分解あるいは安定化する、という逆向きの制御をすることが判明した。米国のグループは、短周期の行動異常を示す変異体スクリーニングからFBXL21を同定した。一方、我々は *Fbxl3* と *Fbxl21* のノックアウトマウスの行動解析よりFBXL21によるCRYタンパク質の制御機構を発見した。*Fbxl3* と *Fbxl21* のダブルノックアウトマウスでは、*Fbxl3* シングルノックアウトマウスの異常に長い周期性が大きく緩和(短周期化)して24時間周期に近づいた(図2)。興味深いことに、一部のダブルノックアウトマウスにおいては恒暗条件に移してから数週間たつと行動リズムが消失した。つまり、FBXL3とFBXL21によるCRY・2の不安定化と安定化の制御は、CRYタンパク質の適切な発現変動を生み出し、概日時計の振動を安定に保つと考えられた(図3)。

6. おわりに

時計タンパク質のユビキチン化を担うE3リガーゼの同

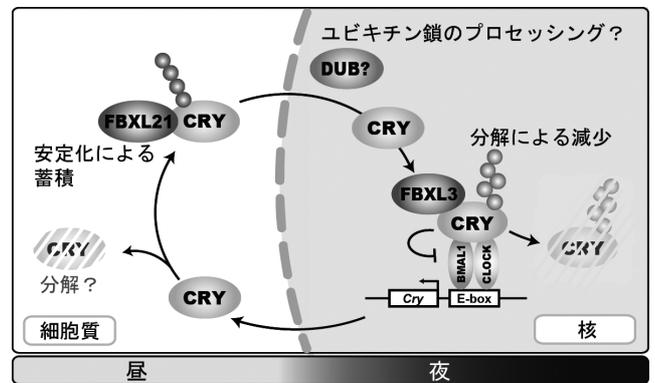


図3 FBXL3とFBXL21によるCRYタンパク質の制御

FBXL21は細胞質でCRYを安定化し、CRYの蓄積を助ける。一方、FBXL3はCRYを分解し、核内のCRYの消失を助ける。両者の拮抗作用が概日時計の発振の維持に重要な役割を果たす。

定が進む中、脱ユビキチン化酵素の同定は遅れている。現在のところ、哺乳類ではUSP2 (ubiquitin specific protease 2) がPER1, BMAL1とCRY1の脱ユビキチン化に参与していることが報告された¹⁴⁻¹⁶)が *Usp2* ノックアウトマウスの行動リズムは野生型マウスと大きく変わらないことから、概日時計を制御する未同定の脱ユビキチン化酵素が存在する可能性が高い。今後、E3リガーゼと脱ユビキチン化酵素による複雑なユビキチン化ネットワークを明らかにして

いくことが、時計発振の分子メカニズムを解く上で重要な鍵となるに違いない。

- 1) Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M., & Takahashi, J.S. (2000) *Science*, **288**, 483–491.
- 2) Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinz, W.A., Virshup, D.M., Ptáček, L.J.P., & Fu, Y.-H. (2001) *Science*, **291**, 1040–1043.
- 3) Grima, B., Lamouroux, A., Chélot, E., Papin, C., Limbourg-Bouchon, B., & Rouyer, F. (2002) *Nature*, **420**, 178–182.
- 4) Ko, H.W., Jiang, J., & Edery, I. (2002) *Nature*, **420**, 673–678.
- 5) He, Q., Cheng, P., Yang, Y., He, Q., Yu, H., & Liu, Y. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4421–4430.
- 6) Shirogane, T., Jin, J., Ang, X.L., & Harper, J.W. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 26863–26872.
- 7) Siepka, S.M., Yoo, S.-H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., Lee, C., & Takahashi, J.S. (2007) *Cell*, **129**, 1011–1023.
- 8) Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P.M., Godinho, S.I., Draetta, G.F., & Pagano, M. (2007) *Science*, **316**, 900–904.
- 9) Godinho, S.I.H., Maywood, E.S., Shaw, L., Tucci, V., Barnard, A.R., Busino, L., Pagano, M., Kendall, R., Quwailid, M.M., Romero, M.R., O’neill, J., Chesham, J.E., Brooker, D., Lallanne, Z., Hastings, M.H., & Nolan, P.M. (2007) *Science*, **316**, 897–900.
- 10) Hirota, T., Lee, J.W., St John, P.C., Sawa, M., Iwaisako, K., Noguchi, T., Pongsawakul, P.Y., Sonntag, T., Welsh, D.K., Brenner, D.A., Doyle, F.J., Schultz, P.G., & Kay, S.A. (2012) *Science*, **337**, 1094–1097.
- 11) Yumimoto, K., Muneoka, T., Tsuboi, T., & Nakayama, K.I. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 32766–32776.
- 12) Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., Nakayama, K.I., & Fukada, Y. (2013) *Cell*, **152**, 1106–1118.
- 13) Yoo, S.-H., Mohawk, J.A., Siepka, S.M., Shan, Y., Huh, S.K., Hong, H.-K., Kornblum, I., Kumar, V., Koike, N., Xu, M., Nussbaum, J., Liu, X., Chen, Z., Chen, Z.J., Green, C.B., & Takahashi, J.S. (2013) *Cell*, **152**, 1091–1105.
- 14) Yang, Y., Duguay, D., Bedard, N., Rachalski, A., Baquiran, G., Na, C.H., Fahrenkrug, J., Storch, K.F., Peng, J., Wing, S.S., & Cermakian, N. (2012) *Biology Open*, **1**, 789–801.
- 15) Tong, X., Buelow, K., Guha, A., Rausch, R., & Yin, L. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 25280–25291.
- 16) Scoma, H.D., Humby, M., Yadav, G., Zhang, Q., Fogerty, J., & Besharse, J.C. (2011) *PLoS ONE*, **6**, e25382.

著者寸描

●平野有沙 (ひらの ありさ)



東京大学理学系研究科生物科学専攻特任助教。博士（理学）。

■略歴 2008年東京大学理学部生物化学科卒業。10年東京大学理学系研究科生物化学専攻修士号取得。13年東京大学理学系研究科生物化学専攻博士号取得。同年4月から現職。14年4月からカリフォルニア大学サンフランシスコ校に留学。

■研究テーマと抱負 睡眠・覚醒リズムを制御する体内時計の分子メカニズムの研究をしています。4月からの留学先で、研究分野を広げていきたいと考えています。

■趣味 旅行。