

免疫応答に影響を与える。

4. おわりに

細胞内小胞の輸送や小胞内環境の制御機構を理解することは、ウイルスや細菌に対する免疫応答の理解にとどまらず、小胞輸送や小胞内環境の異常に起因する種々の疾患の発症機序や療法を理解する上で非常に重要であると考えられる。今後、細胞内小胞の輸送や小胞内環境の制御におけるSLC15A4の機能に焦点を当てて解析していくことにより、炎症性疾患の発症機序の理解につながる基礎的情報や新たな治療標的候補分子が明らかになることが期待される。

- Murphy, J.E., Padilla, B.E., Hasdemir, B., Cottrell, G.S., & Bunnett, N.W. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 17615–17622.
- Kagan, J.C. (2012) *Cell*, 151, 1168–1178.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006) *Cell*, 124, 783–801.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010) *Nat. Immunol.*, 11, 373–384.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012) *Nat. Rev. Immunol.*, 13, 557–569.
- Daniel, H. & Kottra, G. (2004) *Pflügers Arch.*, 447, 610–618.
- Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T., & Tohyama, M. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 10205–10211.
- Bhardwaj, R.K., Herrera-Ruiz, D., Eltoukhy, N., Saad, M., & Knipp, G.T. (2006) *Eur. J. Pharm. Sci.*, 27, 533–542.
- Lee, J., Tattoli, I., Wojtal, K.A., Vavricka, S.R., Philpott, D.J., & Girardin, S.E. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 23818–23829.
- Sasawatari, S., Okamura, T., Kasumi, E., Tanaka-Furuyama, K., Yanobu-Takanashi, R., Shirasawa, S., Kato, N., & Toyama-Sorimachi, N. (2011) *Gastroenterology*, 140, 1513–1525.
- Takeuchi, F., Ochiai, Y., Serizawa, M., Yanai, K., Kuzuya, N., Kajio, H., Honjo, S., Takeda, N., Kaburagi, Y., Yasuda, K., Shirasawa, S., Sasazuki, T., & Kato, N. (2008) *J. Hum. Genet.*, 53, 314–324.
- Han, J.W., Zheng, H.F., Cui, Y., Sun, L.D., Ye, D.Q., Hu, Z., Xu, J.H., Cai, Z.M., Huang, W., Zhao, G.P., Xie, H.F., Fang, H., Lu, Q.J., Xu, J.H., Li, X.P., Pan, Y.F., Deng, D.Q., Zeng, F.Q., Ye, Z.Z., Zhang, X.Y., Wang, Q.W., Hao, F., Ma, L., Zuo, X.B., Zhou, F.S., Du, W.H., Cheng, Y.L., Yang, J.Q., Shen, S.K., Li, J., Sheng, Y.J., Zuo, X.X., Zhu, W.F., Gao, F., Zhang, P.L., Guo, Q., Li, B., Gao, M., Xiao, F.L., Quan, C., Zhang, C., Zhang, Z., Zhu, K.J., Li, Y., Hu, D.Y., Lu, W.S., Huang, J.L., Liu, S.X., Li, H., Ren, Y.Q., Wang, Z.X., Yang, C.J., Wang, P.G., Zhou, W.M., Lv, Y.M., Zhang, A.P., Zhang, S.Q., Lin, D., Li, Y., Low, H.Q., Shen, M., Zhai, Z.F., Wang, Y., Zhang, F.Y., Yang, S., Liu, J.J., & Zhang, X.J. (2009) *Nat. Genet.*, 41, 1234–1237.
- Blasius, A.L., Arnold, C.N., Georgel, P., Rutschmann, S., Xia, Y., Lin, P., Ross, C., Li, X., Smart, N.G., & Beutler, B.

(2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 19973–19978.

- Blasius, A.L., Krebs, P., Sullivan, B.M., Oldstone, M.B., & Popkin, D.L. (2012) *PLoS Pathog.*, 8, e1002915.

田中 翼, 小林 俊彦, 反町 典子
((独)国立国際医療研究センター研究所
分子炎症制御プロジェクト)

The endosome-lysosome system in inflammatory signal transduction

Tsubasa Tanaka, Toshihiko Kobayashi and Noriko Toyama-Sorimachi (Department of Molecular Immunology and Inflammation, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Toyama 1-21-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)

高等植物の概日時計を支配する翻訳後制御と転写制御機構

1. はじめに

約24時間周期の自律的な概日(概ね一日)リズムを生み出す概日時計は、細菌からヒトまで生物に広く存在している。動き回ることのできない植物にとって、昼夜や季節変動などの来るべき外環境の変化に適応しながら生きていくために概日時計は必須である。

高等植物シロイヌナズナを用いたリズム異常を示す変異体のスクリーニングなどにより、複数の時計関連遺伝子が単離されてきた¹⁾。それらの変異体を用いた下流遺伝子の発現解析など、転写レベルでの解析が多く行われてきたが、個々の時計関連遺伝子がコードするタンパク質の機能は不明な場合がほとんどで、またそれぞれの因子が時計の制御にかかわる分子メカニズムも未解明であった。そこで、筆者らは、時計関連因子の転写後制御に着目し、個々の因子の分子機能や概日リズムが生み出される分子メカニズムの解明を目指して研究を行った。本稿では、筆者らの研究内容を中心に、概日時計の中心因子が正確な概日リズムを生み出すために働く様々な形の翻訳後調節や分子機能の一例を紹介する。

2. 概日時計の中心因子 TOC1 は ZTL により分解される

TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1) は、PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR) ファミリーの一員で、PRR1 とも呼ばれる^{1,2)}。TOC1 のみならず他のファミリー

メンバーである PRR3, PRR5, PRR7, PRR9 も機能欠損や過剰発現で概日リズムに影響をきたすことから、時計本体の制御に関わる候補因子として研究が進められてきた。特に TOC1 に関しては、MYB 型の相同転写因子である LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) / CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) と共に転写翻訳のフィードバックループを形成することで時計の中心振動体を構成する鍵因子であるとされ、様々な解析が行われてきた。しかし、PRR ファミリータンパク質は、他のレスポンスレギュレーターで保存されている被リン酸化アミノ酸が保存されておらず、どのような機能を持つのかは不明であり、よって概日リズムが生み出されるメカニズムの中でどのような分子機能を持つのかも不明であった。

そのような中で、Más らは、TOC1 タンパク質が E3 ユビキチンリガーゼ ZEITLUPE (ZTL) と相互作用し、分解を受けていることを示した³⁾。ZTL の機能欠損株では、TOC1 の転写レベルでの振動に変化がないものの、TOC1 タンパク質が高いレベルで蓄積して振動を示さなくなる。また、TOC1 タンパク質は暗期に分解されるが、プロテアソーム阻害剤処理や ZTL の機能欠損株においてそのような分解は見られなくなった。ZTL の機能欠損株では概日

リズムの周期が長くなり、逆に ZTL を過剰発現させるとその発現レベルに比例して概日リズムが短周期になり、しまいにはリズムを消失してしまう^{4,5)}。これらのことから、ZTL 量の適切な制御が正確な概日時計を生み出すのに必須であり、それが主に TOC1 の分解を介しているとし唆された。

3. ZTL は青色光受容依存的な安定化を受けてリズムを刻む

ZTL は、F-box に加え、他の青色光受容体を持つ LOV (light, oxygen, voltage) ドメインと、タンパク質間相互作用をつかさどるとされる kelch リピートを持つ⁴⁾。他のほとんどの時計関連因子と異なり、ZTL は転写レベルの日周変動を示さない。しかし、興味深いことに、タンパク質レベルでは夕方にピークを示す振動を刻む⁶⁾。筆者らは、この ZTL のタンパク質レベルでの振動が、GIGANTEA (GI) によるリズム的な安定化作用により生み出されることを発見した (図 1)⁷⁾。GI は、60 年以上前にその変異体が単離されて以来、多くの研究者がその機能を解明しようと試みてきた。しかし、GI は植物特有の機能未知の大きなタンパク質をコードし、類似遺伝子も存在しないことから、

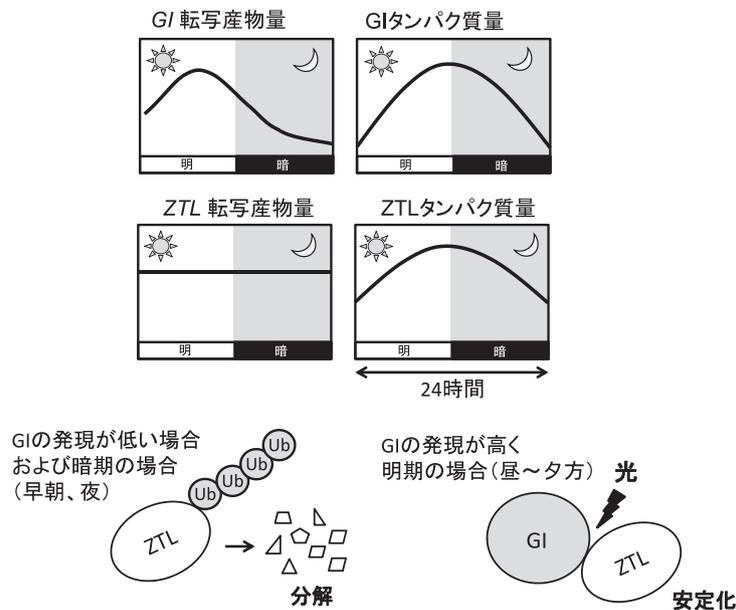


図 1 GI の働きにより ZTL タンパク質の振動が生み出されるメカニズム

GI は転写レベルでもタンパク質レベルでも夕方にピークを示す変動を示す。ZTL は転写レベルでは振動を示さないが、タンパク質レベルでは GI と似た変動を示す。これは、ZTL が光受容依存的に GI と相互作用して安定化を受けることによると考えられる。朝は GI レベルが低いため、夜は GI と相互作用できないために ZTL は積極的に分解される。昼から夕方は GI レベルが高く光も照射されており、ZTL タンパク質が蓄積する。

その分子機能は長年不明であった¹⁾。筆者らは、ZTLが *in vivo* で青色光受容体として機能し、青色光受容依存的に LOV ドメインを介して GI と相互作用することでリズム的な安定化を受けることを示した⁷⁾。GI は転写レベルおよびタンパク質レベルで夕方にピークを示す振動を示す。明け方に発現した ZTL は、GI がほぼ存在しないため盛んに分解され蓄積しないが、昼に向かうにつれ GI レベルが上がり、光受容依存的に GI と相互作用することで安定化を受け、蓄積していく。暗くなると GI と ZTL の相互作用は弱まり、ZTL は積極的に分解されていく。このようにして、ZTL の振動が生み出されていることが示唆された。実際、GI を恒常的に高発現する個体では高いレベルで、GI の機能欠損株では低いレベルで ZTL タンパク質レベルが維持され、両者ともに振動を示さなくなる。ZTL が分解のターゲットとする TOC1 は、GI の機能欠損株では明確な振動を示さなくなる。このように、光による時計制御の調整には、タンパク質分解と光受容依存的なタンパク質安定化作用が関わることが示された。

4. リズミックなリン酸化依存的 TOC1 と PRR3 の相互作用で TOC1 が安定化される

実は、分解者である ZTL と分解を受ける TOC1 は、ほぼ同じタイミングで蓄積のピークを示すという、一見矛盾した関係にある。この矛盾を説明する研究成果も得られた。PRR ファミリーは $PRR9 \rightarrow PRR7 \rightarrow PRR5 \rightarrow PRR3 \rightarrow PRR1$ (TOC1) の順で朝から夕方にかけて順にピークを示す転写レベルでの振動を示す²⁾。筆者らは、タンパク質レベルでも振動を示す PRR タンパク質がリズム的なリン酸化を受けていることを示した⁸⁾。さらに、PRR3 と TOC1 は両者がリン酸化を受けた状態でのみ相互作用することを発見した。PRR3 も ZTL も、TOC1 の N 末端を介して相互作用することから、PRR3 による安定化と ZTL による分解が時間帯に応じて競合的に働くことで、TOC1 タンパク質の振動が絶妙に生み出されていることが示された (図 2)。

5. PRR5 は TOC1 のリン酸化と核移行を促進する

PRR ファミリーメンバーのうち、TOC1 に加えて PRR5 タンパク質も ZTL による分解のターゲットとなる^{8,9)}。また、TOC1 と PRR5 タンパク質は、共に核局在を示し、ほぼ同じ位相で発現し、機能欠損では共に短周期形質を示すが、その二つのタンパク質の分子レベルでの関係性は明らかになっていなかった。局在解析や生化学的解析により、PRR5 は TOC1 のリン酸化と核内への移行を促進すること

が示された¹⁰⁾。TOC1 と PRR5 は、それぞれの N 末端にある PRR ドメインで互いに相互作用する。この相互作用により、PRR5 は TOC1 の核内への移行とリン酸化を促進する働きを持つ。また、TOC1 は核全体で見られるのに対し、PRR5 は核内 foci (点状構造) を示すが、TOC1 と PRR5 を共発現させると TOC1 も PRR5 と同様の foci 局在を示す。また、定常状態において、PRR5 と相互作用することで TOC1 レベルは上昇する。このような PRR5 による作用は、相互作用することで TOC1 を ZTL による分解から守り安定化する PRR3 と一見似ているが、PRR5 の場合、TOC1 を核内に誘導することで、細胞質における ZTL による分解を避ける形で安定化していると考えられる。このようなリン酸化に依存した核移行による制御は、動物などの時計制御のシステムと類似しており、動物と植物で時計を構成する因子は異なるものの、進化の過程でメカニズムが収束した例と考えられる。

6. HSP90 が概日時計の制御に関わる

さらに、タンパク質の分解だけでなく、翻訳後のタンパク質の成熟機構も時計の制御に深く関わることが判明した。筆者らは、ZTL が細胞質に存在する heat shock pro-

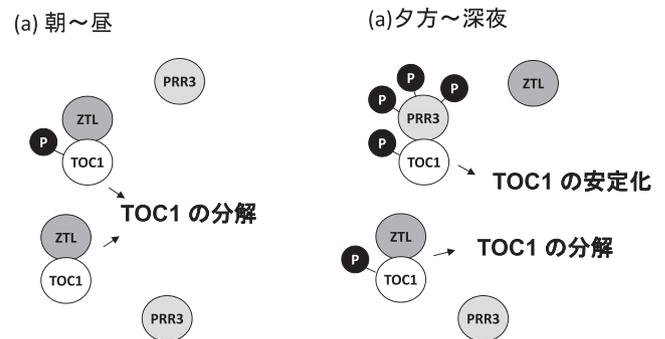


図 2 リズミックなリン酸化依存的な TOC1 レベルの制御機構
TOC1 と PRR3 は夕方から夜に発現のピークを示すタンパク質レベルでの振動を示す。さらに、それぞれ時間帯によって異なるレベルのリン酸化を受けている。TOC1 は、日中はリン酸化を受けたものと受けていないものの両方が存在しているが、夜が来るとリン酸化を受けた状態のものがほとんどになる。PRR3 は、日中はリン酸化レベルが低いのが、夜から深夜にかけて強いリン酸化を受ける比率が上昇する。TOC1 と ZTL の相互作用に TOC1 のリン酸化はあまり影響しないが、TOC1 と PRR3 が相互作用するためには両者がリン酸化を受けている必要がある。よって、朝から昼にかけて、TOC1 は PRR3 が相互作用せず、ZTL と相互作用して積極的に分解を受ける。夜になるにつれ PRR3 のリン酸化レベルが上昇し、ZTL と競合して TOC1 と相互作用し安定化する。これらの複雑な機構により、TOC1 タンパク質の正しい振動が生み出されると考えられる。

tein 90 (HSP90) と直接相互作用すること、そして HSP90 のクライアントタンパク質であることを確認した¹¹⁾。HSP90 に特異的な阻害剤であるゲルダナマイシン処理や RNAi による HSP90 レベルの低下により ZTL タンパク質レベルが低下し、概日リズムが長くなった。これは ZTL の機能欠損株の長周期形質と一致している。PRR ファミリータンパク質のうち、ZTL が分解のターゲットとする TOC1 と PRR5 のタンパク質レベルのみがゲルダナマイシン処理により上昇することから、ゲルダナマイシン処理による長周期形質が ZTL とそのターゲットへの影響によることが示唆された。このように、高等植物において HSP90 は時計の中心で機能することが示唆された。

7. PRR ファミリータンパク質は転写抑制因子として機能する

筆者らの研究などにより、PRR タンパク質の機能は翻訳後の修飾や分解、安定化、局在制御などで複雑に制御されており、それらが概日時計の制御に必須であることが示された^{7~11)}。しかし、PRR ファミリーのタンパク質がどのような分子機能を持っているかは不明であった。

中道らは、PRR9, PRR7, PRR5 が DNA 結合ドメインを持たないものの転写抑制活性を持ち、その活性には植物特有の転写抑制ドメインとして知られる EAR (ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression) モチーフ (LxLxL) が必要であることを示した¹²⁾。また、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析やそれぞれの発現解析により、PRR9, PRR7, PRR5 が *LHY/CCA1* のプロモーター領域に結合してその転写を抑えることを示した。PRR9, PRR7, PRR5 はこの順番で朝から夕方にかけて順に発現のピークを示すことから、入れ代わり立ち代わり発現を抑え続けることで *LHY/CCA1* の発現が明け方みに起こるように制御していると考えられる。

そしてさらに、Wang らは、これらの PRR タンパク質が転写抑制因子として *LHY/CCA1* の転写を抑える際に、転写のコリプレッサータンパク質と共に働くことを示した¹³⁾。シロイヌナズナの転写因子の 1 割以上が EAR モチーフを持ち、その多くが転写抑制因子として機能するであろうと考えられている¹⁴⁾。また、植物の転写抑制因子による転写抑制メカニズムはほぼ未解明であるが、Groucho/Tup1 コリプレッサーファミリーに属する TOPLESS/TOPLESS-RELATED (TPL/TPR) による働きを介するものとそうでないものがあると考えられている。PRR ファミリーメンバーのうち、EAR モチーフを持つ PRR9,

PRR7, PRR5 のみが核内で TPL/TPR と結合し、共に *LHY/CCA1* プロモーターに結合してその転写を抑えることが示された¹⁴⁾。また、すべての TPL/TPR の働きを抑えることで、三重機能欠損株 *prp9 prp7 prp5* と類似したリズム消失形質が観察された。また、*CCA1* の転写を PRR9, PRR7, PRR5 と TPL/TPR が抑えるためにはヒストン脱アセチル化酵素が必要とされることも示された。これらの結果から、TPL/TPR コリプレッサーファミリーも時計の中心振動体の制御で必須の機能を持つことが示された。

8. 植物の概日時計は転写抑制のフィードバックループでできている？

TOC1 の機能欠損株で *LHY* や *CCA1* の転写レベルが下がることなどから、長らく *TOC1* は転写の活性化因子として働くと考えられてきた¹⁾。しかし、最近になって、ChIP-seq 解析などにより、実は *TOC1* は転写の抑制因子として概日時計本体で働く可能性を示す報告が出てきている¹⁵⁾。*LHY/CCA1* は *TOC1* の転写を抑えることから、*TOC1* も転写抑制因子として機能するのであれば、シロイヌナズナの概日時計本体の中心で働く転写翻訳フィードバックループはほぼ転写の抑制のみで構成されているということになる (図 3)。

9. おわりに

本稿で述べたように、*TOC1* とその周辺因子に限って着目しただけでも、非常に複雑で多様な翻訳後の制御機構が概日時計の制御に関わることが解明されつつある。また、個々の時計関連因子が具体的にどのような分子メカニズムで時計の制御に関わるかに関しても、最近研究が進みつつある。しかし、概日時計の中心で働く転写翻訳フィードバックループを構成するほとんどの転写因子が転写を抑制する働きを持つ可能性が示されつつある一方で、植物の転写抑制の分子機構そのものが解明されておらず、そのことが概日時計制御をはじめとした各種の生命現象を理解するための律速となっていると考えられる。そこで、現在筆者らは、植物の転写抑制の分子メカニズムの解明を目指して研究を進めている。概日時計関連因子の解析から転写抑制機構の解明につながる知見が得られることも期待され、また同様に、転写抑制機構の解明が進むことにより概日リズムが生み出されるメカニズムの理解も進むと期待される。

謝辞

本稿で紹介した時計関連因子の翻訳後制御に関する研究

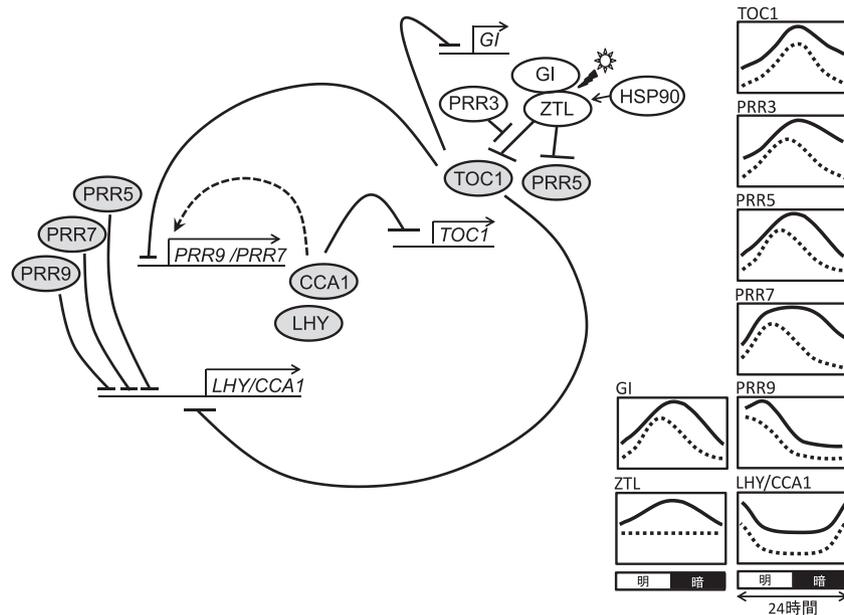


図3 シロイヌナズナの概日時計がリズムを生み出すメカニズム (簡略版)

HYとCCA1は未知の機構により朝のPRR9/PRR7の転写を誘導し、PRR9/PRR7/PRR5は順に発現して昼から夜の間LHY/CCA1の転写を抑える。LHY/CCA1は明け方にTOC1の転写を抑制し、TOC1もLHY/CCA1の転写を抑制する。TOC1は他にもPRR9/7やGIなどの時計関連遺伝子の転写を抑制する。青色光受容体のZTLは光受容依存的にGIと相互作用し共に安定化する。ZTLはTOC1やPRR5を分解に導く。ZTLによるTOC1の分解はPRR3により競合的に阻害される。HSP90はZTLタンパク質の成熟を介して時計の制御に関わる。グレーで示したのは転写因子として機能するタンパク質。右側に示したグラフは、各因子のmRNA量(点線)とタンパク質量(実線)の日周変動を模式的に示したものの。

は、主に米国オハイオ州立大学のDavid E. Somers教授のもとで行ったものです。関係者の皆様に感謝いたします。

- Nagel, D.H. & Kay, S.A. (2012) *Curr. Biol.*, **22**, R648–R657.
- Mizuno, T. & Nakamichi, N. (2005) *Plant Cell Physiol.*, **46**, 677–685.
- Más, P., Kim, W.Y., Somers, D.E., & Kay, S.A. (2003) *Nature*, **426**, 567–570.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., & Kay, S.A. (2000) *Cell*, **101**, 319–329.
- Somers, D.E., Kim, W.Y., & Geng, R. (2004) *Plant Cell*, **16**, 769–782.
- Kim, W.Y., Geng, R., & Somers, D.E. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4933–4938.
- Kim, W.Y., Fujiwara, S., Suh, S.S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G., & Somers, D.E. (2007) *Nature*, **449**, 356–360.
- Fujiwara, S., Wang, L., Han, L., Suh, S.S., Salomé, P.A., McClung, C.R., & Somers, D.E. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 23073–23083.
- Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H., & Chua, N.H. (2007) *Plant Cell*, **19**, 2516–2530.
- Wang, L., Fujiwara, S., & Somers, D.E. (2010) *EMBO J.*, **29**, 1903–1915.
- Kim, T.S., Kim, W.Y., Fujiwara, S., Kim, J., Cha, J.Y., Park, J. H., Lee, S.Y., & Somers, D.E. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16843–16848.
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N. H., & Sakakibara, H. (2010) *Plant Cell*, **22**, 594–605.
- Wang, L., Kim, J., & Somers, D.E. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 761–766.
- Kagale, S. & Rozwadowski, K. (2011) *Epigenetics*, **6**, 141–146.
- Somers, D.E. (2012) *Genome Biol.*, **13**, 153.

藤原 すみれ

(独立行政法人産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門 植物機能制御研究グループ)

Post-translational and transcriptional regulatory mechanisms of *Arabidopsis* circadian clocks

Sumire Fujiwara (Plant Gene Regulation Research Group, Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566, Japan)