

# 哺乳類の概日時計システムを分子レベルで理解する

吉種 光<sup>✉</sup>

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

## 1. 謝辞と序論

この度、第 15 回 日本時間生物学会学術奨励賞（基礎科学部門）を受賞できたことを、大変光栄に存じます。私は、修士 1 年生の時から 15 年連続で時間生物学会の学術大会に参加してきました。そして、初めて参加した第 10 回大会@札幌において学術奨励賞がスタートし、全 14 回の受賞者講演を拝聴してきました。当該分野を牽引してきた過去の受賞者の方々と名を連ねさせていただけることを大変嬉しく思うと同時に、身が引きしめる思いです。じゃじゃ馬で生意気な私を見捨てず、ここまで導いてくださった深田吉孝教授に心より感謝申し上げます。また、いつも一緒にサイエンスを追求してくれる吉種グループの全メンバーに、この場を借りて感謝の気持ちを伝えさせていただきたいと思います。私は時間生物学会が大好きで、学術大会や関連学会において著名な先生・先輩方と交流する機会に恵まれ、多くのことを学ぶことができました。時間生物学分野のますますの発展に微力ながら貢献できるよう全力を尽くしたいと思っておりますので、今後ともご指導ご鞭撻のほどどうぞよろしくお願い申し上げます。最後に、学生時代からずっと近くで研究をサポートしてくれた、そして夜中でも日曜日でも研究というと不満を一言も言わずラボに送り出してくれる妻と、時に沈みきった心を笑顔で癒してくれる息子たちに感謝を伝えたいと思います。いつもありがとう。

さて、本稿の執筆にあたり、過去の受賞者論文をいくつか拝見した。自分の研究成果を交えつつも、研究のスタートポイント、時間生物学との出会い、留学経験、そしていまの研究へと展開し、格言を残している例が多いようだ。このようにストーリー性の多い研究者人生を送られてきた過去の受賞者と比較して私は、非常にシンプルな経歴を持つ。物理・化学選択で大学に入学したものの、大学では生命科学を学びたいと当初から考えていた。大学で最先端の研究について学ぶうちに、疫学調査やケーススタディーと比較して、分

子生物学の研究に自分が強く惹かれることがわかり、特に 1999 年入学というタイミングもあり、睡眠という高次機能が遺伝子のフィードバックループで制御されている可能性を知り、深田研究室のある生物化学科へと進学した。その後、深田研で学部、修士、博士と過ごし、学位取得後には助教として、哺乳類の概日時計システムを分子レベルで解析してきた。これで終了、という訳にもいかないと思うので、それぞれの研究成果にその当時の思いを追加して説明していきたいと思う。

## 2. CLOCK のリン酸化リズム

希望通りに深田研究室に配属され、卒業研究では岡野講師（現 早稲田大学 教授）のご指導のもとで、時計タンパク質 CLOCK と BMAL1 を軸に生化学的な解析を行った。当初の目的は CLOCK の新規相互作用分子を同定する、というテーマであった。この当初の目的は完遂できないこととなるのだが、その過程で単クローン抗体を自作し（現在は MBL 社より販売するに至った）、マウス肝臓において CLOCK と BMAL1 が時刻依存的にリン酸化されていることを見出した。ここからが泥沼であったが、質量分析によりマウス個体におけるリン酸化部位の同定を目指した。大阪大学の質量分析装置を使用させていただいたため、生化学をしては試料を持って大阪大学に出張し、同定できずにトボトボと帰宅する、という小旅行をひたすら繰り返した。研究者としてやっているのであるかと、自信を喪失した時期でもあったが、この過程で身につけた質量分析を駆使した生化学は、最新 MS のオペレーターとなった現在、強力なパワーを発揮し、自分を色付けしてくれている。こうしてようやく至適化した条件で、CLOCK のリン酸化部位 Ser38、Ser42、Ser427 を同定した。このうち Ser38 と Ser42 はちょうど CLOCK の DNA 結合部位に位置しており、これらのリン酸化模倣変異体は、DNA 結合能が強力に抑制されており、E-box 依存的な転写

✉ stane@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

活性が消失することを見出した<sup>1</sup>。つまり、夜になると CLOCK はリン酸化されてその転写活性が抑制されるというフィードバックループの鍵となる 1 ステップを見つけることができた。こうして 1.1 年のオーバードクターを経て、無事に学位を取得することができたのである。

### 3. 翻訳後制御の重要性

学位取得後も特任研究員さらに助教として研究を継続した。学生時代のテーマの延長として、CLOCK-BMAL1 複合体をリン酸化するキナーゼを探索し、阻害剤スクリーニングから JNK が BMAL1 をリン酸化することを見出した。細胞レベルでのデータも順調に取れて、個体まで展開するか悩んでいたその時、北海道大学の本間研究室から共同研究のお誘いを受けた。本間研では、神経特異的な *Jnk* アイソフォームである *Jnk3* の欠損マウスの行動リズムデータを元に、その分子基盤となるメカニズムを追求していたが、両研究室のデータを統合すると論文が完成したのである<sup>2</sup>。しかしここからの道のりも簡単ではなかった。査読者からのコメントで「露骨に両研究室のデータを融合しており、その間にギャップがある」という主張である。まるで我々の事情を知っているようなコメントであるが、ここから SCN での生化学という魔の領域に突入する。世界的に見ても SCN の単離技術が高い本間研究室で集められたタンパク質試料を東大に輸送してもらい生化学実験を行う。一回の実験で 120 匹分の SCN を扱う実験はミスが許されず、手が震えた。また一部の細胞レベルのデータは、査読コメントにより撤退を余儀なくされたが、このデータは次の論文の種となり、最近、大きな花を咲かせてくれた<sup>3</sup>。これはまた次の機会にでも紹介できたらと思う。さらに某雑誌のリバイズ中に、論文最終稿の相談のために本間さんと教授が東京まできてくれたのだが、空港からのモノレールの上で東日本大震災が発生した。強い余震に怯えながら大学で様子を見ていた我々だが、都内の交通網が混乱し、空港が陸の孤島となっていることを知り、深田先生の車で本間先生をお迎えに上がることとなった。いつもは 1 時間程度の道のりだが、やはり交通網の混乱はひどく、本間先生にお会いできたのは深夜で、大学近傍のホテルに到着したのは明け方であった。無事に論文採択へとたどり着いたのだが、乗り越えた荒波の数だけ、振り返ると思い出深い論文となる<sup>2</sup>。今、荒波に飲み込まれそうになっている人がいたら、前向いてまず一步を踏み出してみたい。また、この共同研究において本間先生らからご教授い

ただいた時間生理学への考え方は、かけがえのない財産となった。この場を借りてお礼申し上げたい。

深田研究室では、時計タンパク質の翻訳後制御の重要性を、翻訳後修飾部位の決定や新規修飾酵素の同定を含めて報告してきた。例えば CRY2 は、Ser557 が DYRK1A によってリン酸化されると、これを足場に Ser553 が GSK-3β によって二次リン酸化され、プロテアソームによって分解される<sup>4,5</sup>。この Ser557 を Ala に置換したノックインマウスは輪回し行動リズムが長周期化する<sup>6</sup>。一方、CRY をユビキチン化して分解に導く E3 リガーゼ FBXL3 が知られていたが、FBXL21 は CRY をユビキチン化するにもかかわらず CRY を安定化する<sup>7</sup>。この FBXL21 によって CRY に付加されたユビキチン鎖の意義についても、現在、興味深い知見が得られつつあるが、これも別の機会でご紹介できればと思う。

我々は、CRY の相互作用因子を探索し、CRY を安定化する 2 つの分子を同定した。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子の一つである TDP-43 は、FBXL3 依存的な CRY の分解を拮抗的に抑制し、脱ユビキチン化酵素 USP7 は CRY に付加されたユビキチン鎖を除去する<sup>8</sup>。FBXL3 と FBXL21 の両者を失うと時計振動体は崩壊するので、分解と安定化の拮抗作用は時計振動の鍵を握ると考えられる。これに加えて、CLOCK リン酸化酵素 CaMKII<sup>9</sup>、BMAL1 ユビキチン化酵素 UBE3A/E6-AP<sup>10</sup>、PER2 リン酸化酵素 SIK3<sup>11</sup> など、修飾酵素の研究に共同研究者として貢献できたことは大きな経験となった。このように、哺乳類の概日時計は、転写フィードバック制御という基本骨格に対して、数多くの修飾酵素による翻訳後制御により適切なタイミングで分子の活性を巧みに調節していると考えられる。各時刻に、どの分子のどのアミノ酸残基が、どの酵素によりどんな修飾を受け、どのように活性が制御されているのか、それらが組み合わせとしてどのようにして時計振動を生み出しているのか、実体の全貌解明に向けて取り組んでいきたい。さらにこの複雑な修飾ネットワークが、発生から老化のライフステージにおいてどう変化し、また温度や光、食事によるエネルギー条件などの環境変化に対してどのような意義を持って応答するのか、興味深い問いが未解明である。

### 4. 転写リズムからの時計出力

翻訳後修飾に下支えされるフィードバック制御機構により、約半数の遺伝子はいずれかの臓器においてリズムに発現しており<sup>12,13</sup>、各臓器の生理機能が

約 24 時間周期のリズムを刻んでいる。概日時計の破綻は睡眠障害のみならず、癌や高血圧などの発症リスクを増大させるため、概日時計と各機能リズムとを結び分子経路を明らかにすることは、新たな創薬ターゲットの発掘につながる。我々はこれまで、CLOCK のリズム的なリン酸化が DNA 結合を強力に抑制することを見出した<sup>1</sup>。つまり、CLOCK のリン酸化リズムが、CLOCK-BMAL1 複合体の DNA 結合リズムを生み出す可能性が考えられた。そこで、自作単クローン抗体を用いて定量的に CLOCK 結合 DNA 断片を単離する実験条件を確立し、ChIP-Seq 解析により 7,978 の CLOCK 結合領域を同定した<sup>14</sup>。これら結合領域では、その CLOCK の結合に昼に高く夜に低いという顕著なリズム性が観察された。実はこれは、当初の研究計画からするとネガティブな結果であった。これまでに我々は、BMAL1 と BMAL2 の嗜好性の違いから、E-box の類似配列またはその周辺配列の違いにより、誘導される転写活性化レベルが変化することを見出していた<sup>15</sup>。また、同じ E-box 制御を受ける遺伝子でも、RRE など他の DNA シスエレメントとの総和として転写リズムが決定され<sup>16</sup>、転写リズムは遺伝子近傍のヒストン修飾リズムとその位相がよく一致していることが報告されていた<sup>17</sup>。このことから、E-box の配列や位置効果による”個性”が ChIP-Seq 解析から浮かび上がる可能性に期待していたのである。しかし逆に、DNA 結合リズムが先で、これらの総和によりヒストン修飾リズムが生み出されるのであろう、ということが理解できた<sup>14</sup>。

以上の研究成果をまとめている過程で、同じく CLOCK の ChIP-Seq 解析を含む大規模な研究成果が Takahashi らのグループから発表されてしまった<sup>18</sup>。そこで少し方向転換をして本研究では、東京大学の岩崎渉准教授らと共同で、ChIP-Seq データから転写因子が認識する配列を抽出するバイオインフォマティクス技術を開発し、MOCCS (Motif Centrality Analysis of ChIP-Seq) と名付けた。これを、CLOCK-ChIP-Seq のデータに適用した結果、約 8,000 の結合部位の近傍において CACGTG がもっとも高いスコアで出現することから、この解析が先行研究の知見を再現できたことを示している。興味深いことに、1 塩基 miss match の配列の中でも CACGTT や CACGNG が選択的に CLOCK に認識されており、2 塩基 miss match の CATGCG が非典型的な E-box 配列として浮かび上がった。MOCCS 解析は、時計研究に限らず、DNA に結合するさまざまなタンパク質について、実際に結合する DNA モチーフを網羅的に決

定する研究に応用されることが期待できる<sup>14</sup>。

## 5. A-to-I RNA 編集リズムの発見

我々は CLOCK の ChIP-Seq 解析と並行して、マウス肝臓の RNA から poly(A)-tailed RNA および small RNA を超並列型シーケンサーに供し、全転写産物の発現時刻プロファイルを記述した<sup>14</sup>。不規則な生活や交代勤務がもたらす体内時計の破綻は、睡眠障害のみならず多くの疾病リスクを増大させるため、遺伝子レベルでのリズムが生理機能リズムへと伝わる仕組みの解明が期待されている。例えば、この CLOCK 結合リズムの制御下では Keap1-Nrf2 シグナルが作動しており、抗酸化遺伝子の発現リズムが肺繊維化リスクの時刻依存性を生み出している<sup>19</sup>。また *Bmal1* 欠損マウスでは、軟骨細胞における *Nfatc2* の発現リズムが乱れ、変形性関節症の発症時期が顕著に早まるという早老症様の表現型を示すことが分かってきている<sup>20</sup>。約半数の遺伝子はいずれかの臓器においてリズムミックスに発現しており<sup>12,13</sup>、このような多岐に渡る時計出力リズムの理解には極めて多くの生命研究領域との融合が鍵を握ると考えられる。2010 年に発足した生物リズムの若手の会をはじめとする、研究者が集う「場」が重要な役割を担うであろう。どんな研究も自分とは関係ないとは思わず、耳を傾けてみると大発見のヒントが隠れているのかもしれない。

この分野融合の 1 例として最近、E-box によりリズムミックスに転写制御される新たな遺伝子 *Adar2* を同定した<sup>21</sup>。ADAR2 は、RNA のアデノシン (A) を脱アミノ化してイノシン (I) へと変換する酵素であり、修飾によって生じた I は C と塩基対を形成するため、遺伝情報上は A からグアノシン (G) に編集される。筆頭著者の寺嶋君は、東京大学の工学部の出身で、A-to-I RNA 編集の研究に従事していたが、マウス個体などを用いたより生理的な研究を行いたいということで、博士課程の学生として深田研究室で研究をスタートした。ちょうどこの頃、前述した CLOCK ChIP-Seq データと全 RNA の発現時刻プロファイルを持ち合わせていた我々は、*Adar2* が CLOCK による転写制御を受ける遺伝子の一つであることに気が付いた。せっかくラボを変えたにもかかわらず寺嶋君は、*Adar2* が時計の制御下で A-to-I RNA 編集リズムを生み出しているか否かを調べる、という研究をスタートした。実際にマウス時計臓器において A-to-I RNA 編集の効率は時刻依存的に変動し、この A-to-I RNA 編集リズムは *Bmal1* 欠損マウスや *Adar2* 欠損マウスでは一日を通して低い状態に保たれることを

明らかにした。この A-to-I 編集リズムは RNA-Seq 解析からも抽出されることから、これまで超並列型シーケンサーやその前処理時の技術的なエラーとして扱われてきた miss matched read の中には、生体内で編集された RNA が含まれることが判明した。つまり、数多くの転写産物において遺伝情報が A から G にリズムに書き換えられており、RNA の高次構造や翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列が変化していると考えられる。

ここまでは珍しく筋書き通りに進んだ本研究だが、さらにここからラッキーパンチを量産することとなる。RNA 編集リズムを調べるために行った RNA-Seq 解析のデータを詳しく調べていると、*Adar2* 欠損マウスでは A-to-I 編集リズムが消失するだけでなく、数多くの転写産物においてその発現量のリズムが停止することが判明した。これまで転写リズムが重要と考えられてきた時計出力のメカニズムにおいて、転写後調整の重要性を示したということで当該分野に強いインパクトを与えることができた。さらに、この変異マウスの輪回し行動リズムを調べるとその周期が有意に短いことが判明した。時計出力リズムを研究していたつもりが、時計振動そのものの異常に気がついたこととなる。しかし、RNA-Seq データを見ても、実際に RT-PCR を行っても、時計遺伝子で RNA リズムに異常が見られる遺伝子は見つからない。そこで生化学的な解析を行うと、唯一、CRY2 タンパク質が異常蓄積していることが分かった。実際に、*Cry2* 欠損マウスと交配すると、*Adar2* 欠損による時計の短周期化は見られなくなることから、CRY2 の異常蓄積が時計の短周期化の原因であると結論づけた<sup>21</sup>。

## 6. おわりに

*Adar2* 欠損による生理機能の異常は多岐に渡る。それぞれの機能発現において ADAR2 がどの遺伝子のどの A を G に書き換えることが重要なのか、全貌の解明には多くの研究が必要になるであろう。同じように、*Bmal1* 遺伝子の欠損は様々な臓器機能の低下をもたらすが、どの遺伝子のどの E-box 配列に CLOCK-BMAL1 が結合することが重要なのか、時計出力の鍵を握る DNA シスエレメントはほとんど分かっていない。時計の転写フィードバック制御においてですら、どの遺伝子のどの DNA シスエレメントによる制御が時計振動に不可欠か、順番にメスを入れて現状の分子モデルを見つめ直すことが必要ではないだろうか。過去の知見を尊重しつつも、盲信することなく、哺乳類の概日時計システムを分子レベルで理解し

ていきたい。

## 参考文献

1. Yoshitane, H. *et al.* Roles of CLOCK phosphorylation in suppression of E-box-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3675-3686 (2009).
2. Yoshitane, H. *et al.* JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep.* **13**, 455-461 (2012).
3. Imamura, K. *et al.* ASK family kinases mediate cellular stress and redox signaling to circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 3646-3651 (2018).
4. Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., & Fukada, Y. Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.* **280**, 31714-31721 (2005).
5. Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K., & Fukada, Y. DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1757-1768 (2010).
6. Hirano, A. *et al.* *In vivo* role of phosphorylation of cryptochrome 2 in the mouse circadian clock. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 4464-4473 (2014).
7. Hirano, A. *et al.* FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**, 1106-1118 (2013).
8. Hirano, A. *et al.* USP7 and TDP-43: Pleiotropic regulation of cryptochrome protein stability paces the oscillation of the mammalian circadian clock. *PLOS ONE* **11**, e0154263 (2016).
9. Kon, N. *et al.* CaMKII is essential for the cellular clock and coupling between morning and evening behavioral rhythms. *Genes Dev.* **28**, 1101-1110 (2014).
10. Gossan, N. C. *et al.* The E3 ubiquitin ligase UBE3A is an integral component of the

- molecular circadian clock through regulating the BMAL1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5765-5775 (2014).
11. Hayasaka, N. *et al.* Salt-inducible kinase 3 regulates the mammalian circadian clock by destabilizing PER2 protein. *Elife* **6**, e24779 (2017).
  12. Zhang, R., Lahens, N. F., Balance, H. I., Hughes, M. E., & Hogenesch, J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 16219-16224 (2014).
  13. Mure, L. S. *et al.* Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* **359**, eaao0318 (2018).
  14. Yoshitane, H. *et al.* CLOCK-controlled polyphonic regulations of circadian rhythms through canonical and non-canonical E-boxes. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1776-1786 (2014).
  15. Sasaki, M., Yoshitane, H., Du, N. H., Okano, T., & Fukada, Y. Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription. *J. Biol. Chem.* **284**, 25149-25159 (2009).
  16. Ueda, H. R. *et al.* System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat. Genet.* **37**, 187-192 (2005).
  17. Ripperger, J. A. & Schibler, U. Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat. Genet.* **38**, 369-374 (2006).
  18. Koike, N. *et al.* Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, **338**, 349-354 (2012).
  19. Pekovic-Vaughan, V. *et al.* The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis. *Genes Dev.* **28**, 548-560 (2014).
  20. Dudek, M. *et al.* The chondrocyte clock gene *Bmal1* controls cartilage homeostasis and integrity. *J. Clin. Invest.* **126**, 365-376 (2016).
  21. Terajima, H. *et al.* ADARB1 catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm. *Nat. Genet.* **49**, 146-151 (2017).