

FBXL21によるCRYの安定化とマウス行動リズム制御

平野有沙[✉]

東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻

はじめに

最初に、私が学部生のときからお世話になっている日本時間生物学会の学会誌に研究の紹介記事を書いていただけることに深く感謝申し上げます。「今年Cell誌に掲載された論文の要約を」という話ではありましたが、それだけでは味気ないので、できるだけ時系列に沿いながらこの研究成果がCellに受理されるまでの裏話も交えてごっくばらんに書かせていただきます。詳しい日本語の紹介レビューはインターネット上で公開されている新着論文レビュー (<http://first.lifesciencedb.jp/>) に載せているので、あわせてご覧いただければ幸いです。

FBXL3とFBXL21は概日時計の発振に必須である

私は東大深田研に配属されてからずっと時計タンパク質の翻訳後修飾について研究を行ってきた。研究を開始した頃、F-box型E3リガーゼFBXL3によるCRYの分解制御が概日時計の周期調節に重要な役割を果たしていることが報告された [1-3]。これらの研究成果は、3つのグループからサイエンスとセルに同時掲載されたことも世界的に注目を浴びた。そこで、注目していたCRYのリン酸化とFBXL3によるユビキチン化との関連を探るべく、*Fbxl3*ノックアウトマウスを中山敬一教授（九大・生医研）より分与していただいたのがプロジェクトの始まりである。

まずは、FBXL3点変異マウスの表現型がFBXL3の機能欠損によるものなのかを確かめる必要があった。さらに、ほ乳類にはFBXL3と極めて似た相同タンパク質FBXL21があり ([4] FBXL3bと呼ばれることもある)、FBXL21による相補がある可能性も考えられたため*Fbxl21*ノックアウトマウスも分与していただき、マウスの輪回し行動を解析した。*Fbxl3*ノックアウトマウスは27.7時間のフリーラン

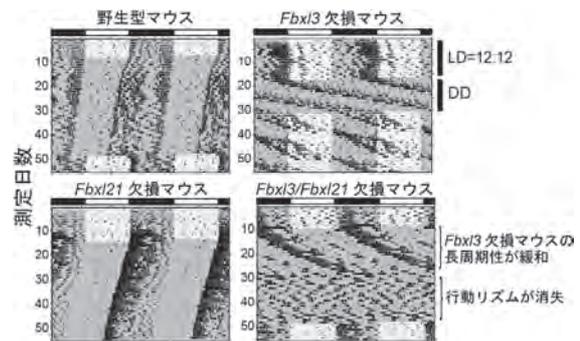


図1. *Fbxl3/Fbxl21*ノックアウトマウスの輪回し行動リズム

*Fbxl3*ノックアウトマウスは27.7時間のフリーラン周期を示した。*Fbxl3/Fbxl21*ダブルノックアウトマウスでは、*Fbxl3*ノックアウトマウスの長周期性が大きく緩和されていたが、一部の個体では行動リズムが消失した。

周期を示し、点変異マウスより著しくシビアナ表現型を呈した (図1)。一方、*Fbxl21*ノックアウトマウスにおいては、活動量のプロファイルに異常が観察されたものの、フリーラン周期とLDサイクルへの同調性には大きな影響が見られなかった。当初は、*Fbxl21*は何もやっていないのかとがっかりしたが、意外なことに*Fbxl3/Fbxl21*ダブルノックアウトマウスでは*Fbxl3*ノックアウトによる長周期性が大きく緩和されていた。自分のジェノタイピングのミスを疑って何回もジェノタイピングをやり直したが、どうもちゃんとしたダブルノックアウトマウスらしい。解析数を増やすにつれ、ダブルノックアウトマウスは周期が25.6時間に戻るだけでなく、DDにしてから数週間経つと行動リズムが消失する個体が現れることが明らかになった。つまり、FBXL3とFBXL21は概日時計の発振を安定に保つ働きがあることを見出した。

✉sahirano@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

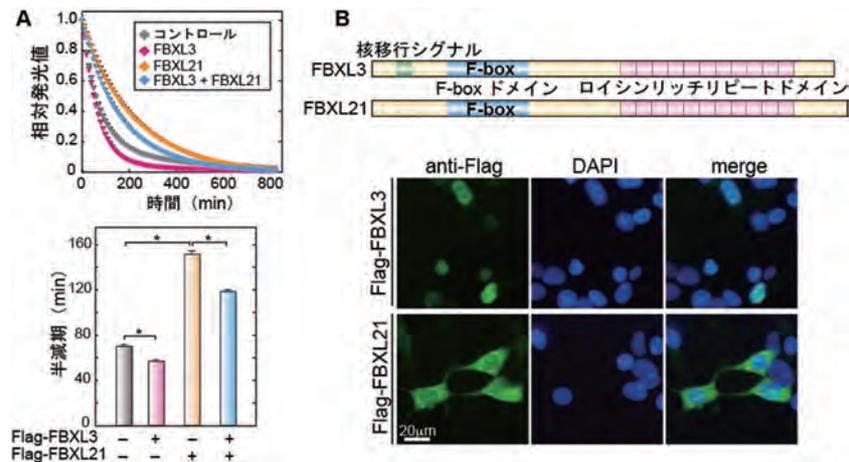


図2. FBXL21によるCRY1安定化と細胞内局在

- A. 培養細胞にCRY1-LucとともにFBXL3またはFBXL21を発現させた。タンパク質合成阻害剤（シクロヘキシミド）を投与して生物発光を計測し、CRY1-Lucの減衰曲線から半減期を算出した。FBXL3によってCRY1の分解が促進される一方、FBXL21によってCRY1は安定化する。
- B. 細胞免疫染色法によりFlag-FBXL3とFlag-FBXL21の局在を解析した。FBXL3は核に局在するが、FBXL21は細胞質に多く存在する。

FBXL21はCRYをユビキチン化して安定化する

FBXL21はCRY1と相互作用するという報告があったため [5]、FBXL21がCRYを基質として時計の調節を行っている可能性を検証した。まず、ユビキチン化アッセイを行い、FBXL21の過剰発現によりCRY1のユビキチン化レベルが上昇することを示した。FBXL3はCRYの分解を促進するため、培養細胞にFBXL3とCRYを共発現させるとCRYの発現量は劇的に減少する [1]。しかし、FBXL21とCRY1を共発現させるとCRY1のタンパク質量が増加し、FBXL3とFBXL21の両方を発現させると両者のCRY1への効果が相殺された。この発現量の変化が、CRY1の安定性の変化によるものかどうかを調べるために分解アッセイを行ったところ、やはりFBXL21によってCRY1は安定化していた (図2)。一般的にユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームの分解ターゲットとなる例が圧倒的に多いが、FBXL21はCRYをユビキチン化して安定化するという予想外の事実が判明した。

SRBRでの出会い

2012年5月にフロリダで開催されたSRBR meetingにおいて、FBXL21の点変異マウス *Pasttime* (FBXL3点変異マウスは *Overtime* である) の発表を聴いた。発表していたのは、Joseph S. Takahashi ラボ (米国テキサス大学) のDr. Yoo さんと、世界中で使用されているPER2::Lucマウスの生みの親である。それまでサンデスティンのきれい

な海を満喫してバカンス気分になっていたが、状況は一変した。急遽、教授とのディスカッションが始まり、論文を同時投稿できるように交渉することに決まった。かくして、相手が論文の投稿を少し待つことを承諾してくれたため、全身全霊を傾けて論文作製に打ち込むこととなった。このとき、マウスの行動データと核となる分子データしか手元になかった上に、一文字も論文が書けていなかった。帰国後すぐに予定されていたラボ旅行の集合場所でも深田教授と論文についてディスカッションしていたほどである。

FBXL21による細胞リズムと分子リズムへの影響

FBXL21が概日リズムにおいてどのような役割を果たすかをさらに詳細に調べるため、FBXL21による細胞リズムと分子リズムへの影響を解析した。*Fbxl21*のノックダウンによって細胞の概日周期は短くなり、細胞リズム周期に対して *Fbxl21*は *Fbxl3*とは逆向きの働きをすることが明らかとなった。さらに、*Fbxl21*ノックアウトマウスから樹立した繊維芽細胞において、*Cry1*と *Cry2*のmRNA量が増加する一方、CRY1とCRY2のタンパク質量は著しく減少していた。培養細胞を用いた過剰発現系で得られた結果と一致して、FBXL21の欠損によってCRYタンパク質が不安定化していた。FBXL21の阻害による細胞時計への影響は、*Fbxl3*の点変異や機能阻害による表現型とは大きく異なっており、2つのF-boxタンパク質が極めてよく似た配列を持ちなが

ら、CRYと概日時計に対してまったく異なる働きをしているという興味深い結果を得た。

CRYのユビキチン化部位の同定

運良く別プロジェクトで行っていたCRYの質量分析（東大・医科研 尾山大明准教授との共同研究）により、CRY1には3カ所の、またCRY2では5カ所のユビキチン化部位を同定していた。そこで、CRY1とCRY2の間で保存されているリジン残基をアルギニン残基に置換し、FBXL3とFBXL21による分解制御または安定化制御を受けるかを調べた。その結果、K107R変異型CRY1ではFBXL21による安定化制御を受けなくなることを見出した。このことから、CRY1のK107（CRY2ではK125）がFBXL21による安定化に重要であること、FBXL21とFBXL3は互いに（少なくとも一つは）異なるリジン残基をユビキチン化してCRYの安定性を制御すると考えられた。Cellに投稿できるほどのデータをとるには到底一人ではできない実験量であったため、当時、私の下について卒業研究を行っていた中川智貴氏も動員して論文投稿ぎりぎりまで実験データを取り続けた。研究を初めてたった2ヶ月だったが、CRYのユビキチン化部位の変異体の作製と、FBXL3のNLS変異体の解析（後述）は彼が行ってくれたものである。

FBXL3はK48結合型ユビキチン鎖を伸長し、FBXL21は異なるユビキチン鎖を伸長する

CRYがどのようなメカニズムでFBXL21による安定化制御を受けるのか明らかにするため、CRYに付加されたユビキチン鎖の結合様式の同定を試みた。実際、CRY精製物の質量分析では、K48結合型ユビキチンの他にK63, K11結合型ユビキチンが同定されており、CRYに付加されたユビキチン鎖の結合様式には様々な種類があると考えられた。ユビキチン分子内の7つのリジン残基のうち、K48結合型ユビキチン鎖はプロテアソーム系分解の標的になることが知られている。そこで、K48以外のリジン残基を全てアルギニンに置換した変異ユビキチン（K48-Ub）を用いたアッセイを行った。野生型のユビキチン（WT-Ub）を用いた場合は、FBXL3とFBXL21が同程度にCRY1のユビキチン化を促進したのに対して、K48-Ubを用いるとFBXL3に比べてFBXL21によるCRY1のユビキチン化促進が大きく抑制された。つまり、FBXL3がK48結合型ユビキチン鎖を伸長するのに対して、FBXL21はそれとは異

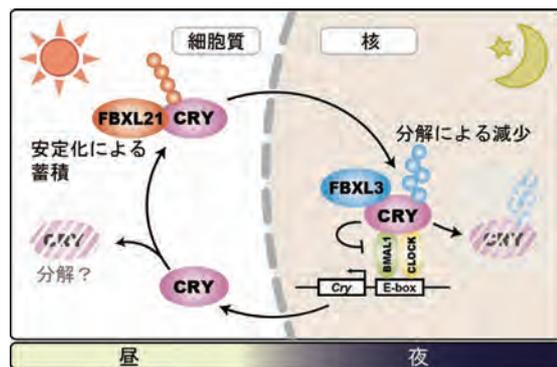


図3. FBXL21とFBXL3によるCRYタンパク質ダイナミクスの形成

細胞質においてFBXL21は分解機構と拮抗することによりCRYを安定化して蓄積を助ける。一方、夜の時間帯には核内で転写抑制の働きを終えたCRYはFBXL3による分解制御を受けて消失し、次の一日のサイクルが始まる。このような2つのF-boxタンパク質による逆相の拮抗作用によって、CRYタンパク質のダイナミクスが生み出される。

なる結合様式のユビキチン鎖をCRYに付加し、CRYを安定化することが判明した。

FBXL21は細胞質、FBXL3は核に局在する

FBXL21とFBXL3のN末端領域は互いにアミノ酸配列の保存性が低く、FBXL3のN末端近くには核移行シグナル様の配列があることを見出した。そこで、細胞免疫染色法によりFBXL21とFBXL3の細胞内局在を解析したところ、予想通りFBXL3は核に限定的に局在し [2]、NLS配列に変異を入れた変異型FBXL3では主に細胞質に存在した。一方、FBXL21は細胞質に多く存在することがわかった（図2）。これらの結果から、FBXL21とFBXL3によるCRYタンパク質のダイナミクス形成モデルを提唱した（図3）。つまり昼の時間帯においてCRYタンパク質が増加していくタイミングでは、FBXL21は分解機構と拮抗することによりCRYを安定化して蓄積を助ける。一方、夜の時間帯には核内で転写抑制の働きを終えたCRYはFBXL3による分解制御を受けて消失し、次の一日のサイクルが始まる。このようなCRYタンパク質のダイナミクスは、概日時計の安定な振動の維持に必要不可欠であると結論づけた。

おわりに

本研究成果と、順遺伝学を用いてFBXL21を同定したJoseph S. Takahashi（米国テキサス大学）らのグループの成果は、Cellに同時掲載された [6]。



図4.
左：Cellの表紙に採用されたデザイン。右：原案（広瀬健太郎氏デザイン）。FBXL3とFBXL21による概日時計の制御を、2人の女性が時計の針を互いに逆方向から押し合っている様子になぞらえてデザインした。右の絵の女性の着物の柄は、それぞれCRYの分解（散る桜）と安定化（満開の桜）を表している。

彼らは、細胞質でFBXL21はCRYの分解を促進し、核ではFBXL3と競合して安定化するモデルを立てている。ただ、細胞全体を見ればFBXL21はCRYを安定化していて、私共の実験結果と食い違いはない。実験系が異なるためそこから得られる結論やモデルが異なることもあるだろうし、これから明らかにしていくべき課題も多い。FBXL21によってCRYに付加されたユビキチン鎖の同定と、修飾されたCRYが実際に細胞内のどこに、いつ存在するのか。そしてFBXL21とFBXL3によるCRYの安定化と分解のスイッチングがどう行われるのか。想像以上に複雑な時計タンパク質修飾のネットワークの理解が今後の課題になる。

さて、Cellへの掲載が決まり、雑誌の表紙を狙うことになった。その頃、自身の学位審査も重なっていたのもあり、適当なラフスケッチを原案にしてプロのイラストレーターに頼めば良いかと考えていたところ、ラボの後輩（広瀬健太郎氏）が「是非、表紙に使ってほしい」とイラストを持ってきた（なんてタイミングの悪い…もうイラストレーターに依頼してしまったのに…）。結局、広瀬氏がデザインしたものをもとにイラストレーターに描いてもらい、広瀬氏がデザインしたものと一緒にCellの編集部へ送った。結果は、派手な見た目が編集者の目を引いたのかイラストレーターが描いたものが採用されたが、日本人にはより和風でシックな原案も人気があるようである（図4）。余談だが、広瀬氏は日本時間生物学会のロゴマークの考案者でもある。皆さんの研究成果が良いジャーナルに受理された際にはイ

ラストを描いてもらうのも良いかもしれない。今回の表紙については、インターネット上でいろいろ話題を呼んだようで、どこに行っても「あの表紙の人ですよ？」と言われる。これをきっかけに論文の方も多くの方に読んでいただければ嬉しい限りである。

文献

- 1) Siepkha, S.M., Yoo, S.H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., Lee, C., and Takahashi, J.S. Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell* 129: 1011-1023. (2007)
- 2) Godinho, S.I., 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., Lalanne, Z., Hastings, M.H., and Nolan, P.M. The after-hours mutant reveals a role for Fbx13 in determining mammalian circadian period. *Science* 316: 897-900. (2007)
- 3) Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P.M., Godinho, S.I., Draetta, G.F., and Pagano, M. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science* 316: 900-904. (2007)
- 4) Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R.C., Elledge, S.J., Pagano, M., and Harper, J.W. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev.* 18: 2573-2580. (2004)
- 5) Dardente, H., Mendoza, J., Fustin, J.M., Challet, E., and Hazlerigg, D.G. Implication of the F-Box Protein FBXL21 in circadian pacemaker function in mammals. *PLoS One* 3: e3530. (2008)
- 6) Yoo, S.-H., Mohawk, J.A., Siepkha, S.M., Shan, Y., Huh, S.K., Hong, H.-K., Kornblum, I., Lumar, V., Koike, N., Xu, M., et al. Competing E3 ubiquitin ligase govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell* 152: 1091-1105 (2013)