

多重リン酸化を基盤とした時間情報制御

大出 晃士[✉]

東京大学 大学院医学系研究科 システムズ薬理

1. 体幹

中学から大学までテニスに勤しんだ。テニスのトレーニングには、腰にゴムチューブを巻き、負荷をかけながら様々な動作を行う方法がある。何も無いかのように普通に動ければよし、もしバランスを崩すとチューブに引っ張られ身動きが取れなくなる。こうして体幹を鍛えようというのだ。学術奨励賞は、授賞者にとってゴムチューブのようなものかもしれない。奨励賞を頂けた喜びと、これから授賞者として歩もうというそこはかかないプレッシャーは、私の体幹を鍛え、バランスを崩しそうなときに、それをいち早く教えてくれると思う。

本稿ではこれまで私を鍛えてくれた様々な出会いや環境を述べ、典型的な時間生物学研究者とは言い難い背景をもつ私が、どのようにして受賞論文の執筆に至るのか、必ずしも合理的でないその時々を選択を、出来るだけ合理的に解説する。この試みを通して、時間生物学と日本時間生物学会の幅広さを描き出すことができれば嬉しい。

2. 志望順位

自分がこれからやりたいことに順位をつける、ということはいつも難しい。やってみなければ解らないからだ。

電子や原子のような単純な要素から、なぜ私のいるこの豊かな世界が出来ているのだろうか。この種のナイーブな疑問を胸に、世界を成り立たせている法則の一端を知りたいと、大学では数学をやろうと思った。あるいは、世界＝私、と思うのなら、生物学もよいかもしれない。そこで大阪大学理学部の入試出願では、数学科と生物学科を選択した。内心は数学科が第一志望だったが、願書提出直前に生物学科を第一志望、数学科を第二志望とした。生物学科のほうが倍率が高かったためである。結果として、“第一志望の生物学科に合格した。

2回生までは、視覚のシグナル伝達やミオシンのエネルギー変換など、化学反応速度論や生物物理学的な定式化が盛んに行われている分野で卒業研究をしようと考

えていた。しかし3回生の専門実習で行った染色体複製・修復の遺伝学では、遺伝学特有の方法論・理論立ての切れ味に心惹かれた。ところが、腑に落ちないこともあった。例えば、DNA損傷修復に関わる酵素群（これらの多くは遺伝学的解析から見いだされたものである）は、「損傷DNAを認識してDNA上に集積する」と解説される。なるほど、イメージングのデータを見ると、確かに損傷DNAに修復タンパク質が集積していく。あたかも修復タンパク質が、あそこに損傷DNAがあるぞ！と認識して、損傷部位に寄ってたかっているようである。

修復タンパク質には目も耳もないので、DNAに結合するまでそれが損傷DNAかどうかは解らない。それでも「認識して」という表現がしっくりくるほどに、見事な、あるいは合目的な振る舞いをタンパク質はみせている。これがどういった生化学的・反応速度論的なタンパク質の特性に基づくのだろうか。そこで卒業研究では、視覚でも、ミオシンでも、遺伝学でもない、染色体複製や損傷応答機構を生化学的に研究している滝澤温彦先生・久保田弓子先生の研究室を志望した。正式な配属先希望調査まで、私は滝澤研究室を第一志望として挙げることがなかったので、同級生からは驚かれた。

3. 全か無か

近頃、色々なことに並行して取り組むことが好まれるらしい。しかし、ときには白黒をはっきりつけて、一つのことに集中してみるのもよいだろう。卒業研究から博士課程まで、一貫して染色体複製開始の制御機構を研究した。

染色体は、一回の細胞周期でちょうど二倍に複製される必要がある。従って、複製の開始は一回の細胞周期に一度だけ生じる。これは、Mcm2-7タンパク質複合体の染色体結合を時間的に制御することで保証されている。Mcm2-7は主に細胞周期のG1期において、ORC-Cdc6-Cdt1タンパク質複合体依存的に染色体上の複数領域に

✉ kojiode@m.u-tokyo.ac.jp

結合する。S 期においては、染色体複製は Mcm2-7 結合領域から、リン酸化酵素である CDK/DDK に依存して開始する一方、新たな Mcm2-7 複合体の形成は阻害される。そのため染色体複製の開始は、各 Mcm2-7 結合領域から一回の細胞周期で一度だけ生じる。

geminin は多くの真核生物で保存されている Mcm2-7 染色体結合の阻害タンパク質である。面白いことに、geminin はある閾値濃度で、全か無のスイッチ的な様式で Mcm2-7 の染色体結合を阻害する。Mcm2-7 染色体結合は G1 期に生じ、S 期以降は阻害されるという時間的な ON/OFF 切り替え制御である。従って、その阻害タンパク質活性がある閾値濃度でスイッチ的に生じるのは、とても合目的である。ところが、geminin は Cdt1 と直接結合するという活性しか知られておらず、全か無の非線形応答を感じさせる要素は見当たらない。一見すると単純な分子の相互作用から、いつの間に合目的な振る舞いが生じるのだろうか？

ツメガエル卵を超遠心にかけて得られる卵抽出液は、染色体の正確な複製活性を有している。Mcm2-7 の染色体結合やその阻害の時間変化を追うために卵抽出液と基質 DNA を混和し、経時サンプリングしたが、基質 DNA を入れて 5~10 分後には Mcm2-7 の染色体結合がほぼ完了してしまう。複数条件を調べようとすると、サンプリングが忙しくて大変である。そこで、Mcm2-7 の染色体結合反応を遅らせようと、基質 DNA のインキュベーション温度を下げることにした。すると意外なことに、低温下では Mcm2-7 の染色体結合は阻害された一方、ORC-Cdc6-Cdt1 の染色体結合はむしろ増加した。どうやら私は、ORC-Cdc6-Cdt1 (中間) 複合体の染色体結合ステップと、Mcm2-7 の染色体結合ステップとを切り分けることに成功したらしかった。この発見自体は、ほどなくして同様の結果が報告されたが¹、悔しいと同時に、卒業研究での発見がそれほど間違いではなさそうだと安心もした。

修士課程では、geminin とその結合相手である Cdt1 が、この ORC-Cdc6-Cdt1 中間複合体のライセンス化活性を ON/OFF 双方向に変換しているらしいことが解った。では、ON/OFF の二状態を可逆的に行き来する反応系からスイッチ阻害応答を生み出すにはどうすればよいだろうか。一つの方法は、OFF 状態がさらに OFF 状態を促進するフィードバックを考えることである。つまり双安定性を有する系を考えるということだが、力学系を全く知らない私がこの種の考え方をできるようにするには数年を要した。上質なレビュー²や教科書^{3,4}を通して、時間をかけて新しい分野を学ぶ経験ができたこ

とは幸運であった。こうした環境を巧みに整備し、誘導してくださった滝澤先生には心から感謝している。

博士課程では、OFF 状態がさらに OFF 状態を促進するフィードバックの存在を支持する現象として、スイッチ的なライセンス化阻害に対応して DNA 結合 geminin が Foci 状に集積すること、ライセンス化阻害された DNA 領域の周囲は同様にライセンス化阻害される確率が高いと想定されることを、蛍光観察や DNA 一分子観察から見出した⁵。

4. 一寸先は

一寸先は闇ということわざがある。しかし一寸後は闇とは言わない。先のことは解らなくても、振り返ればその時々選択につながりを見出すことは容易である。学位取得後、私は(A)タンパク質リン酸化に着目した(B)時間生物学研究を、(C)神戸理化学研究所の上田泰己研究室で開始する。いずれも私の geminin 研究には登場しないこの三要素が、どのように関係するのかを振り返ってみたい。

A: 私の geminin 研究にタンパク質のリン酸化修飾が主だって登場しないのは、CDK や DDK といったリン酸化酵素が極めて重要な役割を果たす染色体複製制御を考えるとむしろ例外的なことであった。研究を始めてしばらくは、「どの研究も皆、リン酸化ばかりで面白くない」などと生意気を言っていたが、何年か経つうちに、どうやらリン酸化はあらゆる局面で重要らしい、という気になってきた。なかでも印象的だったのは、CDK 基質タンパク質群のたかだか数か所に疑似リン酸化変異を導入すると、染色体複製の CDK 要求性を概ねバイパスできるという報告であった^{6,7}。細胞の運命は、たった数か所のリン酸化反応に委ねられることもあるらしい。

B: 力学系の数理モデルを学ぶ過程で、リミットサイクルと生命現象の関係に出会った。本学会の多くの方が同意されると思うが、リミットサイクルの美しさには魔力がある。しかも、慣れ親しんだツメガエル卵抽出液系は、双安定性とリミットサイクルの関係を、細胞周期を舞台に示した一連の研究に使われている^{8,9}。スイッチ的な応答を研究していた私が、次は振動系を研究したいと思うのは時間の問題であった。

C: 私の修士論文には、幾分か数理モデルを用いてフィードバック経路の存在を主張する内容が含まれていた。そこで、数理モデルの使い方やその限界について評価していただくため、当時阪大生物の客員教授でもあった上田泰己さん(現・東大/理研)に修士論文の副査をお願いした。この縁がきっかけとなり、上田研(当時神戸理研)の半年に1回のプログ्रेसレポート大会

“PROFES”に参加させていただいた。ここで、上田研の梁山泊然とした雰囲気を感じて、ぼんやりとここで研究してみたいと思った。

これらの三条件が揃ったころ、上田さんから新設される理研の研究センター (QBiC) メンバーに応募してみないかと、声をかけていただいた。まだ、学位が取得できるかもはっきりしていない段階であったから、声をかけてくださった上田さんにも、応援してくださった滝澤先生にも、感謝である。

上田研での船出は、まさに一寸先は闇であった。私は動物実験の経験もなければ細胞培養の経験すらなかったのである。これは困ったことになった、と思うと同時に、身軽にもなった。身軽さついでに、せっかく学んだ力学系を使って、何かできることはないかと考えた。当時上田研では、CKI による温度非依存的なリン酸化反応の発見¹⁰に続いて、詳細な酵素反応の測定やモデル化が進められていた。一方、リン酸化反応を主眼とするモデルそれ自体は、自律振動を陽に記述するものではない。振動とは可逆的なサイクルであるから、自律振動とリン酸化の関係を調べるには、脱リン酸化反応も併せて可逆的なリン酸化を考えることが必要である。

可逆的なリン酸化モデルと複雑な応答の関係を調べた数理モデルの仕事に、Zero-order ultrasensitivity と呼ばれるスイッチ的な応答の存在を示した論文がある¹¹。この論文では、リン酸化酵素と脱リン酸化酵素が、基質の一箇所をミカエリス・メンテン型の反応スキームに従ってリン酸化・脱リン酸化する、最も基本的な可逆的なリン酸化モデルが扱われている。しかし、リン酸化サイトが1箇所であるこのモデルでは、振動は生じない¹²。それでは、PER や CRY のようにリン酸化サイトを複数にしたらどうだろうか。実はそのモデルも既に検証されており、双安定性や多安定性が生じることが示されていた^{13,14}。しかし、振動解が存在する、あるいはしないということを明示した論文を見つけることは出来なかった。そこで、ある基質の複数サイトがミカエリス・メンテン型の反応スキームに従ってリン酸化・脱リン酸化される過程のみから構成される可逆的な多重リン酸化モデルを数値計算することにした。しつこく手作業でパラメーターを変えて試していたところ、帰宅する電車の中で振動解を得た。

ここからの展開は速かった。物理出身の研究者である Craig Jolley が、パラメーターを広範囲にランダムに振った大規模計算を行い、リミットサイクルを示す膨大なパラメータセットを集めた。得られたパラメータセットは、「一方向性のリン酸化・脱リン酸化サイクル」と「酵素遮蔽を介した修飾状態の同期」という二つの要素があ

る特定のパターンで生じる時に、振動子を構成することを明確に示していた¹²。この振動原理は KaiC モデルで提唱されていたものとも、非常によく似ていた¹⁵。

その後、私たちは複数サイトの可逆的な多重リン酸化モデルの振る舞いを系統的に調べ、チューリングパターンの生成や¹⁶、カオスダイナミクスの出現を示した¹⁷。これらの一連の仕事で、決定論的力学系が示す特徴的な力学系が示す代表的な振る舞いをカバーすることができたと考えている。振る舞いの複雑さは、生化学反応経路の複雑さを必ずしも意味しない。単純な生化学反応からでも、複雑な応答は生じる。これらは力学系が十二分に示してきたことではあるが、「ミカエリス・メンテン式のみによって記述される可逆的な多重リン酸化システムでも、それは成り立つ」という小さな注釈を書き加えることはできただろう。その小さな注釈は、生化学者としての私にとっては大事な言及である。

5. 進化の痕跡

もし研究者の個性が研究に現れるとすると、それは実験系の設計や結果の解釈に、研究者のそれまでの履歴が投影されるからだろう。あたかも、現在の生物の様式に進化の痕跡が見え隠れすることがあるように。

数理モデルの仕事と並行して、CRY1 に着目して、多重リン酸化と哺乳類概日時計、とりわけ周期長制御との関係を調べることにした。ここで CRY1 を選択した理由は、多分に過去の履歴が影響している。上田研では蓼沼さんらによって、Cry1/2 ノックアウト細胞に Cry1 をレスキューして表現型を測定する系が確立されていた¹⁸。元々は Cry1 の転写制御と概日振動の関係を調べる目的の実験系として開発されたものだ。しかし、日々卵抽出液から内在性 geminin を免疫除去し、変異精製 geminin を戻して機能解析していた私には、これは変異 Cry1 遺伝子を導入して時計表現型を測定するための実験系に思えた。さらに、染色体複製研究者の目をもって哺乳類概日時計タンパク質を見ると、CRY はひときわ魅力的に見える。TIM はショウジョウバエにおける PER の結合相手であるが、脊椎動物では(概日時計ではなく)染色体複製制御に関係する因子である。一方、哺乳類では PER は TIM ではなく CRY と複合体を形成する。さらに、哺乳類の CRY と配列上高い類似性を持つクリプトクロムスーパーファミリーの一つには、青色光依存的な DNA 修復酵素である(6-4) photolyase がある。光刺激が重要な意味を持つ概日時計と DNA 修復酵素の間で、クリプトクロムの機能変化が生じたとすると、まさに進化的な履歴を CRY は背負っている。

さっそく質量分析のスペシャリストで阪大時代の先輩でもある鳴海さん（現・医薬基盤研）と共に、新しく上田研に導入された質量分析計を用いて CRY1 を解析し、多くのリン酸化サイトを発見することができた。ここでどのリン酸化サイトに着目するかが問題である。が、上田研ではそれはさしたる問題にはならず、「全部解析する」という一択になる。私には「たくさんやれば、一か所くらいは面白いリン酸化サイトもあるだろう」という打算もあったように思うが、ともかくも、全てのリン酸化サイトに対して疑似リン酸化変異と疑似非リン酸化変異を作製した。一つくらいは...という目論見は良い意味で裏切られ、ロックアウト細胞の *Cry1* レスキュー系から、概日周期長が大幅に変わるリン酸化サイト変異を複数得ることができた¹⁹。これらの変異は共通して、CRY1 の Phosphate-binding loop (P-loop) と呼ばれる領域周辺のセリン・スレオニン多重リン酸化サイトに対する、疑似リン酸化変異であった。P-loop は DNA 修復酵素である(6-4) photolyase では基質認識ポケットを構成している²⁰。酵素としてのタンパク質機能は異なっても、DNA 修復酵素と概日時計制御の間で、共通した機能ドメインが用いられているとすれば、大変興味深い。構造的に類似したタンパク質が異なる生化学反応で用いられる場合、どういった要素が必然的に満たされるべき性質で、どういった要素が偶然の進化の産物だったのか、興味深いところだ。

この間、理研上田研では”個体レベルのシステム生物学”を展開するために研究室の主軸がマウス遺伝学へと大きく転換し、また、私自身も神戸理研からマウス個体の睡眠研究を主軸とする東大医学部の上田研へ異動した。生化学解析では、生理学的意義 (physiological significance) を示せ、と良く言われる。ツメガエル卵を用いていた時代にも、何度もその指摘を受け、そのたびに苦しんできた。細胞の周期長変化を示して満足していたのも東の間、生理学的意義はマウス個体表現型まで確認しなければいけない環境になってしまった。鶴飼さん（現・東大）洲崎さん（現・順天堂大）によるマウス個体の *Cry1* レスキュー系を使うことで、P-loop 周辺の多重リン酸化サイト変異が、ことごとくマウスの行動周期長を変化させることを示すことができた。今度こそ生理学的意義を示せたのだろうか。

さて、多くの知見が CRY1 のタンパク質安定性（分解活性）が、周期長制御に寄与することを示している²¹。しかし周期長を変化させる多数の CRY1 変異体解析から、どうやら多くの変異体では確かにタンパク質安定性が変化しているが、P-loop 周辺の変異は、必ずしも CRY1 のタンパク質安定性の変化を伴わないことがわ

かった。P-loop 周辺の多重リン酸化が、安定性以外のタンパク質のどの性質を変化させているのか、その実体を捉えることが今後の課題である。また、この仕事では、植物ホルモンオーキシン依存的にタンパク質分解を誘導する AID 法を *Cry1* レスキューに組み合わせることで、オーキシン濃度依存的に CRY1 を分解誘導すると、概日周期長が短くなることを示した。AID 法は、私と同時期に助教として滝澤研に所属した鐘巻さん（現・遺伝研）が開発した手法である²²。いつぞや、鐘巻さんに「驚きはないかもしれないが、だれもがそう信じているが誰もきちんと示していないことを実験で示すことは価値がある」と言われたことがある。これまで主に相関関係として示されていた CRY1 の不安定化と短周期化（あるいはその逆）の因果関係を、その AID 法によって、完全ではないにせよ示すことができた。私のお気に入りのデータの一つである。

6. これまでとこれから

CRY1 で行った多数のリン酸化サイト変異体を網羅的に調べ上げる手段は、結果としてリン酸化サイトを指標として、機能的に重要な領域（例えば P-loop）を効率よく探索することに繋がった。得られた多数の変異タンパク質シリーズは、分子活性を様々に変化させたときに生理機能がどのように変化するかを（例えばタンパク質安定性と概日時計周期長の関係）探索する、数理モデル解析におけるパラメータサーチのような役割を果たした。

多重リン酸化は、タンパク質の構造や相互作用様式を変化させる有力な翻訳後修飾である。また、その反応様式はスイッチや振動、カオスなど多様なダイナミクスの源泉になりうる。これまでは、重要な生理機能あるいはタンパク質機能が解った後に、その制御に関わるリン酸化サイトを探索する研究が主流だったと思う。しかし、多重リン酸化修飾がシンプルな生化学反応から複雑で合目的なタンパク質機能を生み出す一つの方法ならば、むしろ多重リン酸化サイトや、網羅的疑似リン酸化変異体シリーズを指標として、未知のタンパク質機能を探索することができるのではないか。今後は、多重リン酸化を起点として、タンパク質機能を探るアプローチを模索してみたい。

数理モデルと CRY1 の経験から、一つのリン酸化では成立しない、複雑な振る舞いが複数のリン酸化では実現できるかもしれないと納得することができた。同時に、見た目の振る舞いが複雑だったとしても、それはたかだか数個のリン酸化サイトで達成できるかもしれないと期待もできるようになった（図 1）。受賞講演では予定

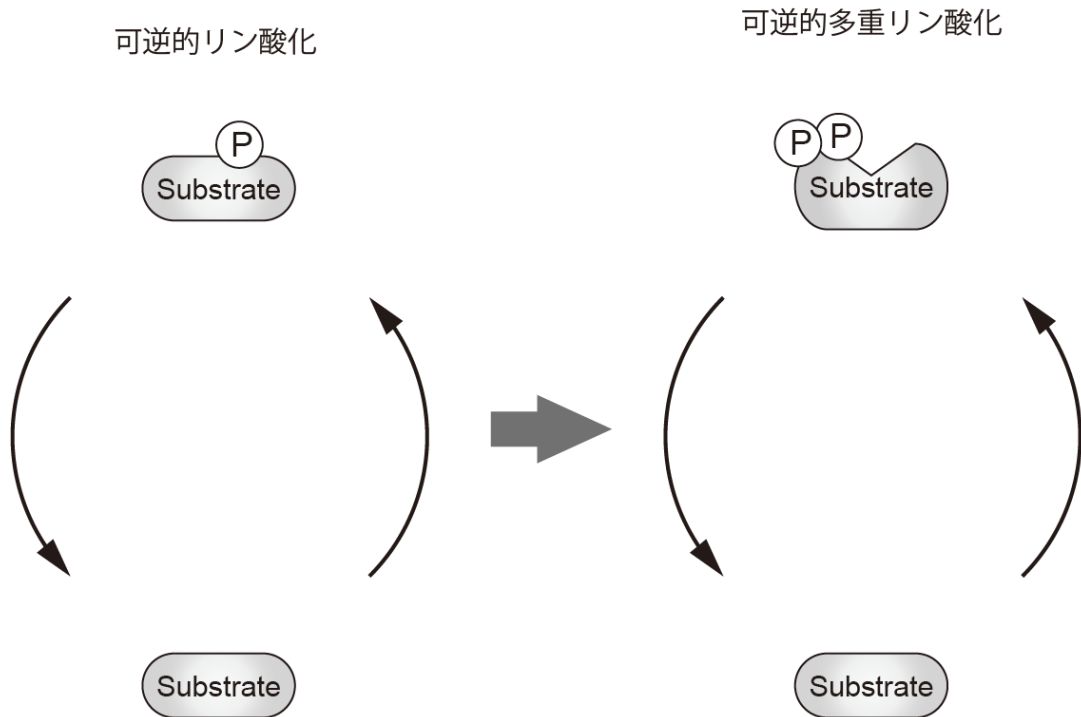


図 1. 可逆的多重リン酸化は生物の時間情報を構成する実体の一つかもしれない。

外に、「それなりに長く研究して解ったことは、たったこれだけか」という心の声が漏れてしまった。しかし私にとっては、滝澤先生、上田さんをはじめとする、ここにはお名前を挙げられなかった多くの方々と家族の支えで得た「されどこれだけ」である。2012年にはじめて時間生物学会に参加したとき、なんとオープンで温かいコミュニティなんだろうと思った。以来、歴代学術奨励賞受賞者の方々の背中を追ってきた。私もその背中の一つになれるだろうか。今後の研究を通して、そうなるう。

参考文献

1. Waga, S. & Zembutsu, A. Dynamics of DNA binding of replication initiation proteins during de novo formation of pre-replicative complexes in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem* **281**, 10926-10934, (2006).
2. Ferrell, J. E. & Xiong, W. Bistability in cell signaling: How to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible. *Chaos* **11**, 227-236, (2001).
3. Edelstein-Keshet, L. *Mathematical models in biology*. Classics edn, (Society for Industrial and Applied Mathematics, 2005).
4. Hirsch, M. W., Smale, S. & Devaney, R. L. in *Differential Equations, Dynamical Systems, and an Introduction to Chaos (Second Edition)* (eds Morris W. Hirsch, Stephen Smale, & Robert L. Devaney) (Academic Press, 2003).
5. Ode, K. L., Fujimoto, K., Kubota, Y. & Takisawa, H. Inter-origin cooperativity of geminin action establishes an all-or-none switch for replication origin licensing. *Genes Cells* **16**, 380-396, (2011).
6. Tanaka, S. *et al.* CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**, 328-332, (2007).
7. Zegerman, P. & Diffley, J. F. Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**, 281-285, (2007).
8. Pomerening, J. R., Kim, S. Y. & Ferrell, J. E., Jr. Systems-level dissection of the cell-cycle oscillator: bypassing positive feedback produces damped oscillations. *Cell* **122**, 565-578, (2005).
9. Pomerening, J. R., Sontag, E. D. & Ferrell, J. E., Jr. Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat Cell Biol* **5**, 346-351, (2003).
10. Isojima, Y. *et al.* CKIepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-

- determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15744-15749, (2009).
11. Goldbeter, A. & Koshland, D. E., Jr. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6840-6844, (1981).
 12. Jolley, C. C., Ode, K. L. & Ueda, H. R. A design principle for a posttranslational biochemical oscillator. *Cell Rep* **2**, 938-950, (2012).
 13. Markevich, N. I., Hoek, J. B. & Kholodenko, B. N. Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades. *J Cell Biol* **164**, 353-359, (2004).
 14. Thomson, M. & Gunawardena, J. Unlimited multistability in multisite phosphorylation systems. *Nature* **460**, 274-277, (2009).
 15. Rust, M. J., Markson, J. S., Lane, W. S., Fisher, D. S. & O'Shea, E. K. Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock. *Science* **318**, 809-812, (2007).
 16. Sugai, S. S., Ode, K. L. & Ueda, H. R. A Design Principle for an Autonomous Post-translational Pattern Formation. *Cell Rep* **19**, 863-874, (2017).
 17. Yamaguchi, H. Q., Ode, K. L. & Ueda, H. R. A design principle for posttranslational chaotic oscillators. *iScience* **24**, 101946, (2021).
 18. Ukai-Tadenuma, M. *et al.* Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function. *Cell* **144**, 268-281, (2011).
 19. Ode, K. L. *et al.* Knockout-Rescue Embryonic Stem Cell-Derived Mouse Reveals Circadian-Period Control by Quality and Quantity of CRY1. *Mol Cell* **65**, 176-190, (2017).
 20. Hitomi, K. *et al.* Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6962-6967, (2009).
 21. Hirano, A., Fu, Y. H. & Ptacek, L. J. The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 1053-1060, (2016).
 22. Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. & Kanemaki, M. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* **6**, 917-922, (2009).