

## 神経活動リズムに伴って変動する蛋白質リン酸化反応系 の解析

### Analysis of protein phosphorylation fluctuated with a rhythmic neural activity

研究代表者 東邦大学医学部生理学第2講座 助手 田丸 輝也  
Instructor, Department of Physiology, Toho University, School of Medicine,  
Teruya TAMARU

We have studied nuclear protein phosphorylation in the rat suprachiasmatic nucleus (SCN), and found three novel types of Ser/Thr kinases (Periodically fluctuating kinases; PFKs: p45, p100, p200). The activities of PFKs fluctuate with the light/dark cycle, and the fluctuations seem to be implicated in the circadian clock-related gene expression. In this study, we examined the phosphorylation by PFKs toward CLOCK, as a putative physiological target. Among three PFKs, p45<sup>PFK</sup>, which shows the highest level of phosphorylating activity fluctuation with the light/dark cycle, strongly phosphorylated the Ser/Pro-rich domain. p45<sup>PFK</sup> from the rat brain was highly purified. The purified p45<sup>PFK</sup> also phosphorylated CLOCK and BMAL1 expressed in Sf9 cells using baculovirus transfer vector. Rabbit anti-CLOCK antibody was raised against CLOCK C-terminal region. Immunoblot analysis revealed that the antibody recognized mainly 105 kDa and 120 kDa bands. The 120 kDa band was detected as a major band in the nuclear fraction from rat brain, whereas, the 105 kDa band was detected as a major band in the cytoplasmic fraction.

#### 1. 研究目的

地球上に誕生し進化してきたあらゆる生命は、最も普遍的な環境である地球の自転による太陽光量の周期的変化にさらされ、それに対する適応としてサーカディアンリズムという周期的な行動様式・生理的プログラムを獲得したと考えられる。サーカディアンリズムの中核、すなわち約 24 時間を 1 サイクルとする生物

時計、サーカディアンクロックは、視床下部の小さな神経核、視交叉上核 (SCN) に位置している。各 SCN ニューロンには、サーカディアンサイクルに同調した細胞内シグナル伝達系が存在し、それを構成する分子群が中心となって時を刻んでいると考えられるので、分子レベルにおいて、細胞内シグナル伝達、遺伝子発現機構から SCN ニューロンの周期的な

活動調節機構を明らかにすることは、ミクロな分子基盤とマクロな神経機能の相関を解明する一つの有力な研究モデルとなると考えられる。このような着眼点から研究を進め、SCN 核抽出液から日内時刻に伴い活性変化するユニークな3つのセリン/スレオニンキナーゼ (PFK: p45, p100, p200) を発見し、中でも p45PFK は 10 倍もの活性変動の振幅を示すことを見出した。そこで本研究では p45PFK の構造を決定し、そのリン酸化活性が、サーカディアンクロックに関連する転写にどのような影響を及ぼすか解明することを目的とした。

## 2. 研究経過

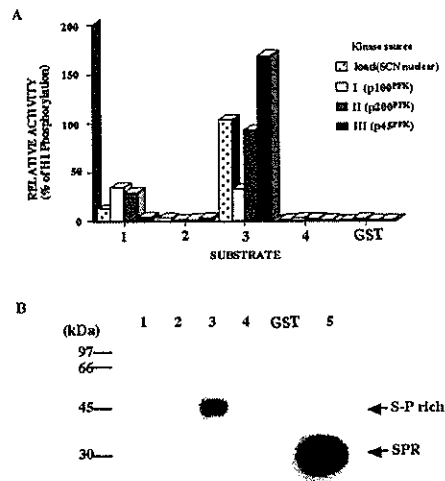
### (1) PFK の生理的ターゲットの検索

まず、SCN の3つの PFK フラクシオンを用いて、大腸菌で発現・調製した GST-CLOCK 融合蛋白質を用いたリン酸化を検討した。それぞれを GST の C 末端につないだ蛋白質のリン酸化を試みた。Mouse CLOCK の cDNA (Dr.J.Takahashi から供与) を鋳型として4つの領域 (bHLH-PAS A, PAS B, S-P-rich, Q-rich) に対応する蛋白質をリン酸化実験の基質とした。その結果、p45PFK を含むフラクシオンが、CLOCK S-P-rich 領域 (なかでも 5kDa の SPR) を強くリン酸化することを見出した (Fig. 1A の SUBSTRATE 3 と B の Lane 5)。

(2) の A) で精製した p45PFK 標品も、同様に、S-P-rich 領域を強くリン酸化した。一方、bHLH-PAS A に対してもごく弱いリン酸化活性を示した。S-P-rich 領域は、CLOCK と同じく bHLH-

PAS ファミリーに属する NPAS2(MOP4)においても認められ非常に高いホモロジーを示すが、一方、ショウジョウバエには認められない。したがって、p45PFK による CLOCK S-P-rich 領域のリン酸化は何らかの生理的に重要かつ高等動物に特徴的なモジュレーション機能を担っていることが示唆される。

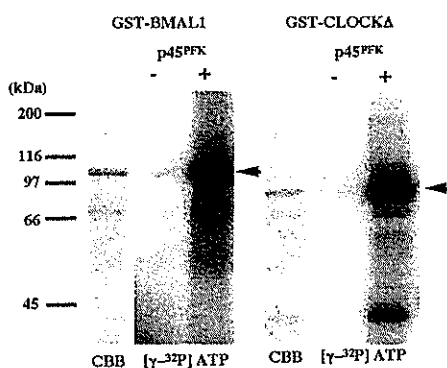
Fig. 1 ラットSCNのPFKによるCLOCKのリン酸化



つぎに、蛋白-蛋白、蛋白-DNA の相互作用を in vitro 再構成系で検討するために、昆虫細胞発現系を利用した。GST 融合蛋白質として発現させるための pACsecG2T ベクターに CLOCK Δ (Q-rich 領域以外の DNA 結合領域の全長を含む)、BMAL1 (ORF 全長) をそれぞれ組込み、Baculo Gold DNA とともに、リン酸カルシウム法を用いて Sf9 細胞に導入した。発現した GST-CLOCK Δ (90 kDa)、GST-BMAL1 (105 kDa) は、グルタチオンセファロースに吸着後、Sf9 細胞に存在する結合因子を除くために

0.1% SDS, 1% NP-40 を含むバッファでよく洗浄してから、溶出・回収した。精製 p45PFK 標品は、GST-CLOCK Δ、GST-BMAL1 を強くリン酸化した (Fig. 2)。これらの結果より p45PFK が、核内で CLOCK、BMAL1、PER1-3 などを経たサーカディアンクロック発現制御系を調節し、周期性を制御する特異的なシグナル伝達の一旦を担っている可能性が示唆された。

Fig. 2 p45PFK による BMAL1, CLOCK のリン酸化



## (2) p45PFK の精製

以前、発表した論文 (Eur. J. Biochem., 238, 152-159, 1996) に記載した PFK の精製法は、収量の低さに問題点があり、上記の材料から 1 pmole 以下しか回収することができなかった。そこで、出発材料の核画分の純度を P1 フラクシオンからさらに蔗糖密度勾配遠心法を用いて高めた。SP-Sepharose と Blue-Sepharose にかける前段階のリン酸濃度を 50mM に固定した。最終段階の Superose 12 FPLC カラムを微量精製に適した SMART system の Superdex 200 カラムに変更したことにより、分離、回収率ともに格段に改善した。現在、本改

良法を用いて精製を繰り返して、プロテインシーケンサ、マスペクトル解析などによる構造決定の準備が整いつつある。

## (3) CLOCK/BMAL1 の発現パターンの解析

生体内における上記サーカディアンクロック関連遺伝子発現制御蛋白質の動態を調べ、さらに PFK をはじめとする蛋白質リン酸化酵素による修飾の状態を解析するため、CLOCK、BMAL1 に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫化学的手法を用いて解析を行った。

CLOCK の N 末端 (マウス) と C 末端 (ラット)、BMAL1 の C 末端 (ラット) 領域で他の蛋白質と相同性の無い領域を GST 融合蛋白質として発現・精製し、ウサギを免疫した。得られた抗血清を用いて、ラット脳抽出物に対してウェスタンブロットを行った。CLOCK の C 末端 (anti-CLOCK Ct) に対する抗体では、ラット脳可溶性画分中に推定分子量にほぼ近い 105 kDa と 120 kDa にメジャーなバンドと、それらの間に多数のバンドが検出された (Fig. 3)。バンドのシグナル強度はサンプルの状態によって異なっており、ショウジョウバエ CLOCK でみられるようなリン酸化による修飾の可能性が示唆された。ラット脳について細胞分画を行い、CLOCK の細胞内発現分布を調べたところ、核内には圧倒的に 120 kDa 型が多く、逆に細胞質では 105 kDa 型が優位に発現していることが見いだされた (Fig. 4)。今後、これらの CLOCK 免疫活性バンドの属性とリン酸化、転写制御との関連性などについて明らかにしていきたいと考えている。CLOCK の N

末端と BMAL1 の C 末端に対する抗体については解析中である。

Fig. 3 抗CLOCK C<sub>i</sub>抗体によるラット脳 CLOCKの検出

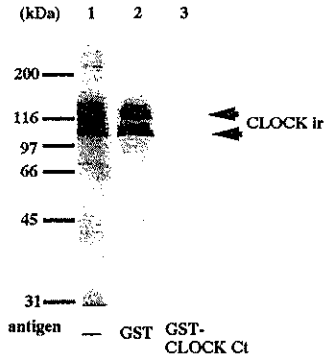
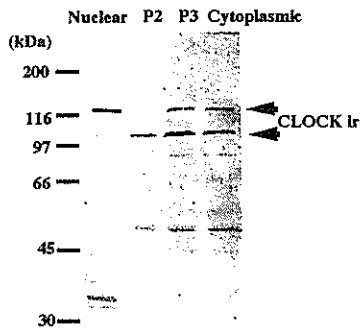


Fig. 4 ラット脳におけるCLOCKの細胞内発現分布



### 3. 研究成果

日内時刻に伴い活性変化するユニークなセリン/スレオニンキナーゼ PFK、中でも p45PFK が、生理的ターゲットの候補として、サーカディアンクロックに関連する転写因子 CLOCK, BMAL1 をリン酸化することを見出した。また、p45PFK の構造を決定するための精製法の改良にも成果が得られた。さらに CLOCK, BMAL1 に対する抗体を作製し、蛋白質の発現パターン、リン酸化などの修飾状態の解析を行いつつある。

### 4. 今後の展望

今後、p45PFK の構造を明らかにし、その *in vivo* での CLOCK/BMAL1 リン酸化状態と転写活性との関連を検討するとともに、CLOCK/BMAL1 が DNA 結合・転写活性化作用を示すターゲットのひとつである *per1* 遺伝子の E-box DNA を含んだ *in vitro*、培養細胞発現制御系を再構成し、この系において p45PFK の CLOCK, BMAL1 リン酸化がどのような影響を及ぼすか解析する予定である。

### 5. 発表論文リスト

1. Tamaru, T., Okada, M., Nagai, K., Nakagawa, H., Takamatsu, K.: Periodically fluctuating protein kinases phosphorylate CLOCK, the putative target in the suprachiasmatic nucleus, *J. Neurochem.*, **72**: 2191-2197, 1999.