

概日リズム制御因子と糖付加酵素の翻訳後修飾に注目した 概日リズムと糖代謝の相互関係

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 発生再生生物学分野
平山 順

1. はじめに

概日リズムはホルモン分泌等の基本的生理現象の周期を、主に光といった刺激を利用して外環境に適応させ、維持する機構である（参考文献 1、2）。この異常は発癌や糖尿病等の代謝異常といった現代社会を脅かす疾患を含む多くの病態に関与している（参考文献 2、3）。概日リズムは全身の個々の細胞に存在する転写/翻訳に依存したフィードバックループ（分子時計）により制御されている。この分子時計は **CLOCK**, **BMAL1**, 及び **CRY** の 3 つの因子（時計蛋白質）により構成される約 24 時間の周期性をもつ転写/翻訳に依存したフィードバックループである（図 1）。**CLOCK** と **BMAL1** は二量体を形成し *Cry* の転写を活性化する。**CRY** は翻訳後、**CLOCK:BMAL1** 二量体に直接結合しその転写を抑制する（参考文献 1）。過去 10 年間に分子時計自体の制御機構についての研究は急速に進展してきたが、分子時計がどのように疾患に関与する様々な生理機能を制御しているかについては現時点ではほとんど解明されていない。

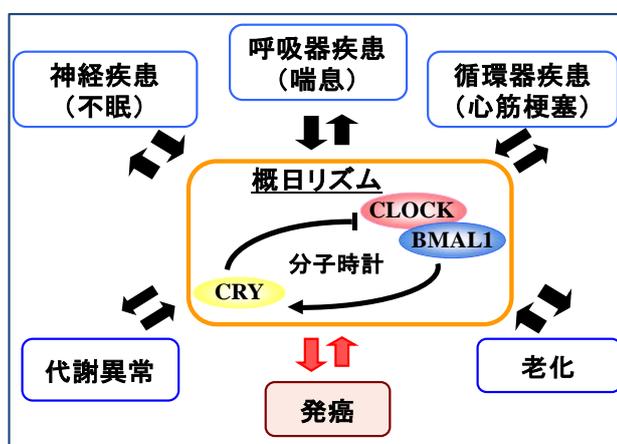


図 1：概日リズムと疾患との関連

著者は、質量分析法及び免疫沈降法を用いて、時計蛋白質に結合する新規因子のスクリーニングを行い、糖付加酵素 **OGT** を **CLOCK** と結合する新規因子として同定している。**OGT** は β -*N*-アセチルグルコサミン (**GlcNAc**) 化を触媒する酵素である。**GlcNAc** 化は蛋白質のセリン及びスレオニン残基へ一分子の **GlcNAc** を付加する反応である。この蛋白質の翻訳後修飾は、ターゲット蛋白質の安定性、転写能、細胞内局在、他の蛋白質との相互作用等の機能制御をする（参考文献 3）。

本研究は **OGT** が **CLOCK** を **GlcNAc** 化することを見出し、この **CLOCK** の **GlcNAc** 化の分子時計制御における役割について解析を行った。

2. 方法

2-1. 分子時計制御因子 CLOCK の新規結合蛋白質のスクリーニング

FLAG タグをつけた CLOCK の恒常的安定発現株を樹立し、その細胞抽出液から FLAG 抗体を用いて免疫沈降し CLOCK 複合体を精製した。質量分析法により、糖付加酵素 OGT を CLOCK の新規結合蛋白質としてを同定した。

2-2. 分子時計の可視化

分子時計は培養細胞に存在し、従って培養細胞は分子時計の転写制御の有用な解析系として確立されている (参考文献 4)。申請者は、分子時計に制御される *Per3* 遺伝子のプロモーター下で発光酵素 Luciferase を発現するカセットをレトロウイルスベクターにより培養細胞に発現させ、Luciferase 活性の変動をリアルタイムで検出することで培養細胞の分子時計を可視化した。さらに、本研究は培養細胞系とウエスタンブロット等の分子生物学的実験手法を用いて解析を行った。

3. 結果

3-1. 分子時計制御因子 CLOCK は糖付加酵素 OGT と結合する

質量分析法により糖付加酵素 OGT が分子時計制御因子 CLOCK 複合体に含まれることを見出したことから、OGT が CLOCK と結合するかを免疫沈降法により検討した。その結果、OGT が CLOCK と特異的に結合することを明らかにした

(図 2)。

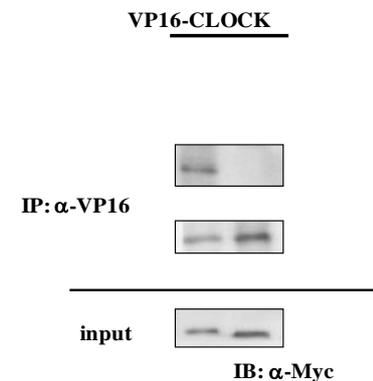


図 2: CLOCK と OGT の相互作用

3-2. OGT により CLOCK は GlcNac 化される

CLOCK と OGT の結合を見出したことから、OGT が CLOCK の GlcNac 化修飾を誘導するかを検討した。培養細胞に CLOCK を含むそれぞれの分子時計制御蛋白質を OGT と共発現した後、GlcNac 化されたセリン・スレオニンを特異的に認識する抗体により分子時計制御因子の GlcNac 化を解析した (図 3A)。その結果、OGT 依存的に CLOCK の GlcNac 化が特異的に誘導されることを明らかにした。OGT により CLOCK が GlcNac 化されるアミノ酸を特定し、それらに変異を入れた CLOCK(T/S) 変異体を作製した。この CLOCK(T/S) 変異体では OGT による GlcNac 化は顕著に低下した。興味深いことに、CLOCK の GlcNac 化サイトは、CLOCK の転写活性化ドメインの近傍に存在する (図 3B)。

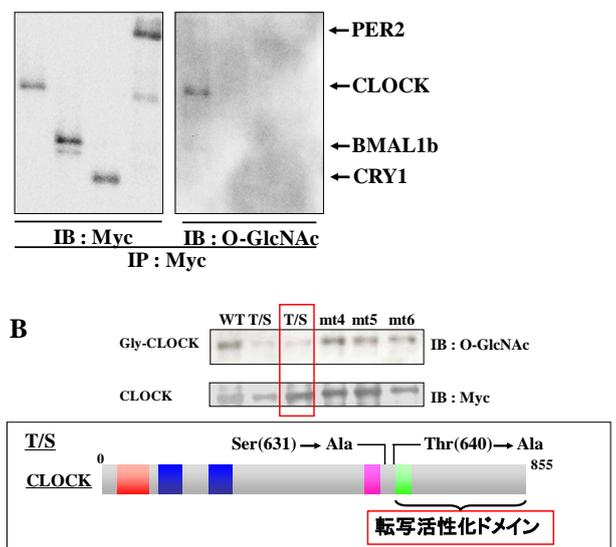


図 3: OGT は CLOCK を GlcNac 化する

3-3. GlcNac化修飾触媒酵素の機能阻害の培養細胞内の分子時計への影響

上記の方法の2-2の項に記載した分子時計を可視化した培養細胞をGlcNac化修飾を負に制御する

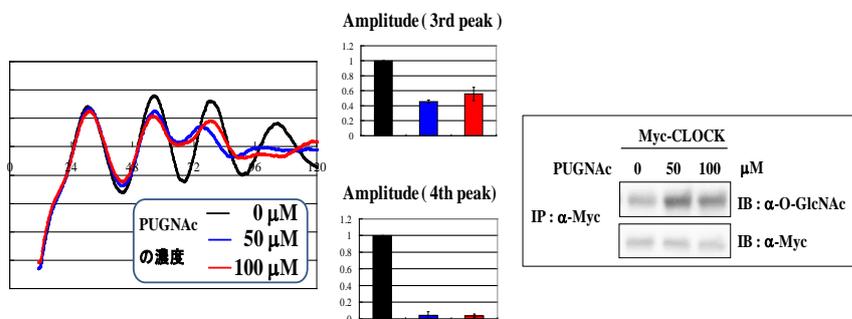


図4 : PUGNAc処理の分子時計制御への影響

酵素MGEA5の阻害剤である PUGNAcで処理し、その分子時計による転写制御への効果を解析した (図4)。興味深いことに、PUGNAc処理により分子時計の振幅が顕著に減少した。また、PUGNAcはCLOCKのGlcNac化修飾を誘導した。これらの結果は、CLOCKのGlcNac化修飾が分子時計の転写制御に関与する可能性を強く示唆する。

4. 考察 まとめ

本研究は、分子時計制御因子CLOCKが糖鎖修飾酵素OGTによりGlcNac化修飾されること及びこのCLOCKのGlcNac化修飾が概日リズムを制御する分子時計を調節することを見出した。現在までに、分子時計制御に関わる分子時計構成因子の翻訳後修飾としてリン酸化、Sumo化、アセチル化、ユビキチン化、及びポリリボシル化が報告されているが (参考文献2、5)、今回見出したGlcNac化修飾は分子時計制御に関与する翻訳後修飾としては初めての報告である。

糖鎖修飾酵素OGTは、その変異が2型糖尿病と遺伝学的な関連があることが報告されている。また、概日リズムに異常をもつ分子時計制御因子の変異マウスが糖代謝異常の表現型を示すことが報告されている (参考文献5、6)。従って、本研究の知見より、糖鎖修飾酵素による概日リズム制御蛋白質の翻訳後修飾を基盤にして概日リズムと糖代謝の相互関連の分子機構を解明することが期待される。

5. 参考文献

- (1) Hirayama, J and P. Sassone-Corsi, Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock, *Curr Opin Genet Dev* 15 (2005) 548-556.
- (2) Dunlap, J.C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-90.
- (3) Fu, L. and C.C. Lee. 2003. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 3: 350-61.
- (4) Hirayama, J., S. Sahar, B. Grimaldi, T. Tamaru, K. Takamatsu, Y. Nakahata, and P. Sassone-Corsi. 2007. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450: 1086-90.
- (5) Kondratov, R.V., V.Y. Gorbacheva, and M.P. Antoch. 2007. The role of mammalian circadian proteins in normal physiology and genotoxic stress responses. *Curr Top Dev Biol* 78: 173-216.
- (6) Hunt, T, and P. Sassone-Corsi, Riding tandem: circadian clocks and the cell cycle, *Cell* 129 (2007) 461-464.