

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月22日現在

哺乳類概日振動体の構成的な理解

Understanding the design principle of circadian oscillator in mammals through reconstitution

課題番号：25221004

上田 泰己 (UEDA HIROKI)

東京大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要

定量的な測定・解析に基づく解析的アプローチと、*in vitro/in cellulo* および *in vivo* での再構成・設計・制御による構成的アプローチとを相補的に用いることで、哺乳類概日振動体の構成的な理解、とりわけ温度補償性を有する酵素・基質システムの設計と制御、酵素・基質からなる、自律振動システムの設計と制御、およびそれらの個体レベルでの実装に取り組む。

研究分野：総合生物

キーワード：合成生物学

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに哺乳類概日振動体を構成する転写あるいはタンパク質ネットワークの解析を行い、転写ネットワークの設計様式が時間遅れをもった負のフィードバックであることを実験的に示してきた。

しかしながら、転写翻訳に基盤をおく機構は、概日時計を特徴づける周期長の温度非依存性（概日時計の24時間周期が反応温度によらずほぼ一定の性質）を説明することは難しい。転写、翻訳、タンパク質分解の速度は一般的に反応温度に強く依存する過程だからである。興味深いことに、我々はCKI ϵ/δ によるリン酸化反応が哺乳類概日周期長決定における律速過程であり、かつ温度非依存的な反応速度を示すことを見出した。さらに理論的な側面からは、温度非依存的な振動子が、可逆的なリン酸化過程のみから構築可能であることを示している。

2. 研究の目的

これらの結果に基づき、本研究計画では、CKI ϵ/δ の温度非依存的なリン酸化速度の分子機構の理解に基づいて、温度補償された自律振動子を設計することを目指し、次の3点を目的に掲げる。

まず、試験管内で再現された温度補償性を持つリン酸化反応を解析し、温度補償性を生み出す基質と酵素を設計可能な程度まで理解する。次に、哺乳類概日振動子において、リン酸化を介して制御される基質の性質を、自律振動を生み出す基質と酵素を設計可能な程度まで理解し、可逆的なリン酸化を駆動力とす

る概日振動子の動作原理を探求する。特に、その周期長制御機構に着目し、振動周期を加速する化合物を設計し概日振動の制御を可能とする。さらに、これらの研究で得られた *in vitro/in cellulo* の知見を高速に生体内で検証することを目指す。生体内への温度補償機構、自律振動機構、および発振周期長制御機構の実装を通じて、新たに見出された哺乳類概日時計動作原理の十分性の証明を行う。

3. 研究の方法

CKI ϵ/δ 反応速度の温度補償機構を知るために、粗過程の反応速度を異なる温度条件で測定する。つまり、1) 酵素と基質の結合、2) リン酸基の基質への転移、3) リン酸化産物と酵素の解離の各過程である。ほとんどの酵素的な反応は、原理上は逆反応も生じうることを踏まえて、CKI ϵ/δ についても逆反応にも着目して解析する。これらの結果に基づき、温度補償性を成立させるために重要な反応ステップを明らかにする。次に、CKI ϵ/δ を用いて、試験管内での可逆的なリン酸化反応に基づく自律振動子を設計する。このために、概日振動子において重要な役割を果たすリン酸化基質や脱リン酸化酵素の探索を行い、リン酸化振動子の構成要素に加える。これらの酵素・基質群は周期長制御にも重要と考えられる。さらに、100%ES細胞由来マウス作製技術（8細胞期胚への injection と3種の阻害剤を含むES細胞培養を組み合わせ、キ

メラマウスでのES細胞の寄与率をほぼ100%にまで高める方法)を用いて、機能改変型タンパク質をマウスに導入することで、それらの影響を個体レベルで検証する。

4. これまでの成果

CKI δ による温度非依存的リン酸化が、リン酸化サイトを一か所のみ有する人工基質ペプチドでも生じることを明らかにした。この単純化したペプチドを用いて、詳細なリン酸化反応機構を解析し、温度が上昇すると見かけの酵素反応速度が抑制される反応ステップが存在することを見出した。酵素の変異体スクリーニングおよび、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングから、上記の抑制ステップに重要なサイトを推定し、試験管内でのリン酸化温度非依存性を崩すことに成功した。

さらに、それらの変異体・低分子化合物はCKI δ のリン酸化活性を亢進させることが明らかとなった。個体レベルでの変異体導入・解析技術の開発を進め、高効率な遺伝子ノックアウト技術や、行動周期の正確な測定手法を開発した。実際に、上記の変異CKI δ を有するマウスの行動周期が顕著に短縮していることを実証した。

5. 今後の計画

温度補償性や周期長を制御するCKI δ の重要なサイトを明らかにできたことを受けて、このサイトの特性を他のタンパク質に移植することで、温度非依存性リン酸化酵素の設計を行う。さらに、試験管内リン酸化の温度非依存性が崩れた酵素を有するマウス個体を用いて、個体レベルでの概日周期長の温度補償性の有無、およびその意義を問う。

また、概日周期長を制御する酵素・基質複合体を、精製用のタグを付加したタンパク質を発現する遺伝子改変マウス個体の組織から精製し、その構成要素を網羅的に決定、生化学振動子の再構成を進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Involvement of Ca²⁺-dependent hyperpolarization in sleep duration in mammals
Tatsuki F., Sunagawa G.A., Shi S., Susaki E.A., Yukinaga H., Perrin D., ... (5名), Ode K.L., Matsumoto K., Ueda H.R., **Neuron** advanced online publication (2016)

2. Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals
Susaki E.A., Ueda H.R. **Cell Chemical Biology** 23, 137-157 (2016)

3. Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene

Sunagawa G.A., Sumiyama K., Ukai-Tadenuma M., Perrin D., ... (8名), Ode K.L., Kuraku S., Ueda H.R., **Cell Reports** 14, 1-16 (2016)

4. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging

Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D., Yukinaga H., Kuno A., Ueda H.R., **Nature protocols** 10, 1709-1727 (2015)

5. Seeing the forest and trees: whole-body and whole-brain imaging for circadian biology

Ode K.L., Ueda H.R., **Diabetes Obes. Metab.** 17 Suppl 1, 47-54 (2015)

6. Whole-Body Imaging with Single-Cell Resolution by Tissue Decolorization

Tainaka K., Kubota S.I., Suyama T.Q., Susaki E.A., Perrin D., Ukai-Tadenuma M., Ukai H., Ueda H.R., **Cell** 159, 911-924 (2014)

7. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis

Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D., ... (11名), Ueda H.R., **Cell** 157, 726-739 (2014)

8. Non-Enzymatic DNA Cleavage Reaction Induced by 5-Ethynyluracil in

Methylamine Aqueous Solution and Application to DNA Concatenation
Ikeda S., Tainaka K., Matsumoto K., Shinohara Y., Ode K.L., Susaki E.A., Ueda H.R., **PLOS ONE** 9, e92369 (2014)

9. Mammalian circadian clock: the role of transcriptional repression and delay.

Minami Y., Ode K.L., Ueda H.R. **Handbook of Experimental Pharmacology** 217, 359-377 (2013)

10: 第15回 山崎貞一賞
受賞: 上田 泰己 (2015)

11: Anne Heidenthal Prize for Fluorescence Research at International Conference on Systems Biology of Human Disease 2015
受賞: 田井中 一貴 (2015)

ホームページ等

<http://sys-pharm.m.u-tokyo.ac.jp/>