

Title	Site-directed spin labeling-ESR mapping of the residues of cyanobacterial clock protein KaiA and KaiC affected by KaiA-KaiC interaction
Author(s)	石井, 健太郎
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34057
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (石 井 健 太 郎)

論文題名

Site-directed spin labeling-ESR mapping of the residues of cyanobacterial clock protein KaiA and KaiC affected by KaiA-KaiC interaction
(SDSL-ESR法による藍色細菌時計タンパク質KaiA-KaiC相互作用部位の探索)

論文内容の要旨

【研究の背景】

藍色細菌は生物時計を持つことが確認されている生物のなかで最もシンプルな生物である。その生物時計は*in vitro*で再構成できる。この再構成系は3種類の時計タンパク質KaiA、KaiB、KaiCとATPから成り、Kaiタンパク質間の相互作用によりKaiCのATPase活性とリン酸化レベルが約24時間の周期で自律的に振動する。しかもその周期は温度によってほとんど変化せず一定である。この振動を生み出す分子機構は解かれていない。KaiAはKaiCのATPase活性とリン酸化レベルを上昇させ、KaiBは下降させる。私は、KaiAとKaiCがどのように相互作用してATPase活性を上昇させるかという問題を解決するためにSite directed spin labeling-electron spin resonance (SDSL-ESR) 法を用いてKaiA-KaiC相互作用の影響を受けるKaiAとKaiCの残基を探索した。

【方法】

SDSL-ESR法はタンパク質に部位特異的に不対電子をもつ有機化合物 (スピンラベル) を導入しESR測定を行う方法である。得られるESRスペクトルはスピンラベルの回転運動性を反映しているので、相互作用にともなう立体障害を受けた残基を同定することができる。またESRスペクトルは2つのスピンラベルの距離 (5-25Å) を反映するので構造変化をみつけることもできる。KaiA表面の25箇所のアミノ酸残基をそれぞれシステイン残基 (Cys) に置換し、それらをスピンラベルで化学修飾しKaiC単量体または6量体の添加によってESRスペクトルが変化するかどうか調べた。Cys置換とスピンラベル導入によってKaiCへの結合が阻害されていないことはnative-PAGE法で確認した。同様にKaiC側も18箇所についてSDSL-ESR法で調べた。

【結果と考察】

1. KaiA中央の溝状構造に位置するL233、I265、A269でスピンラベル標識によるKaiCへの結合阻害がみられた。したがってこの溝状構造がKaiCとの結合に関与している(KaiC-binding grooveと名付けた)。またKaiC-binding groove周辺のN212とS230およびconcave surface周辺のF205とY260においてKaiC添加でスピンラベルの運動性が低下した。したがってこれらの部位はKaiCとの相互作用面にあると考えられる。
2. KaiAの2つのサブユニットが開いた部分に位置するR252、E254、D255、L258はKaiC添加で閉じることが距離測定などでわかった。したがってこの部分をMobile lobeと名付けた。この構造変化が可能かどうか分子動力学解析で調べたところ開閉が観察されたのでMobile lobeの構造変化が可能と分かった。
3. KaiAの結晶構造は表と裏が同じ構造をしている。しかし分子動力学解析により得られたKaiAの構造はKaiC-binding grooveの構造が表と裏で異なっていた。KaiC-binding grooveが非対称であることはKaiAが2つのKaiC結合部位を持つにもかかわらず1分子のKaiCしか結合しないことを合理的に説明できる。
4. KaiC本体の2箇所とTailの7箇所において、KaiAの添加によってESRスペクトルが変化した。したがってKaiAはKaiC本体とTailの両方に相互作用していると考えられる。
5. KaiCには6本のTailがある。これらTailはKaiC分子内部のリン酸化部位付近を通してC末端ドメインから外部へ突出している。そのTailのつけ根にあるT495とS498ではKaiA添加でスピンラベル間距離が増加した。したがってKaiAの相互作用によってTail同士が広がったと考えられる。
6. KaiCはAAA+ファミリーに属するATPaseである。そのATPase活性は非常に低く($\sim 10^{-4} \text{s}^{-1}$)、温度依存性がほとんどなく、KaiAにより約2倍活性化される。KaiC本体で同定された2箇所の残基は同じ β シート上にあり、この β シートはWalker's motif Aに作用することが可能である。そこで私はKaiAがその β シートを押し上げることでMg-ATPをcatalytic glutamatesに近づけてATPase活性を促進するという機構を提案した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (石 井 健 太 郎)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 後 藤 祐 児
	副 査	教授 米 崎 哲 朗
	副 査	教授 上 田 昌 宏
	副 査	准教授 池 上 貴 久
	副 査	准教授 荒 田 敏 昭
	副 査	名古屋大名誉教授 石 浦 正 寛

論文審査の結果の要旨

藍色細菌の概日リズムは、生物時計タンパク質 KaiA-KaiB-KaiC 複合体における KaiC ATPase やリン酸化の自励発振によって駆動される。近年、それぞれのタンパク質の結晶構造が解明されたが、タンパク質間の相互作用の構造基盤およびその日周変化は、よくわかっていない。

そこで、好熱性藍色細菌由来のタンパク質 KaiA-KaiC 間相互作用を部位特異的スピンラベル ESR 法で調べた。まず、システイン変異をいれた KaiA をスピンラベルし、KaiA₂-KaiC 複合体、または ATP を加えて KaiA₂-KaiC₆ 複合体を再構成して調製し、1)スピンラベル側鎖の接触による立体障害を ESR 運動性測定で、2) スピンラベル間距離を ESR 距離測定で調べ、3)スピンラベルの遊離と SS 架橋によって、結合に関与する KaiA のアミノ酸を同定して、KaiA の結晶構造にマッピングした。その結果、KaiA の concave 領域に KaiC 結合領域があり、特徴的な KaiA モノマー間の相互作用部位を発見した。KaiA のスピンラベル運動性とモノマー間の相互作用部位は、KaiA ダイマーの分子動力学的シミュレーションによっても支持された。シミュレーションは、長寿命の立体非対称性ができること示唆し、結合比がダイマーあたり KaiC モノマー 1 個であることを合理的に説明している。同様に、KaiC の結合部位の同定も行い、その結果と矛盾しない KaiA₂-KaiC 複合体のドッキングシミュレーションをおこなった。また、KaiC の tail 間距離の ESR 計測から、KaiA 結合による KaiC tail 間距離増大を観測し、KaiC の重要な構造変化を発見した。さらに、KaiA の結合部位が KaiC 複合体の ATPase 活性中心に近いことから、ATPase 活性化機構仮説を提唱した。

したがって、この論文は、時計タンパク質の日周変動の根幹を成す、KaiA-KaiC 相互作用の構造基盤に重要な枠組みを与える発見である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。