The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Serine/Threonine residues of mPer1 phosphorylated by casein kinase 1ε responsible for subcellular localization and turnover
Author(s)	髙野, 敦子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44100
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

氏　　名	髙　野　敦　子（たかの　あつこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　１７５４７　号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Serine/Threonine residues of mPer1 phosphorylated by casein kinase 1ε responsible for subcellular localization and turnover. **（哺乳類時計関連蛋白質 Per1 の細胞内局在と分解における casein kinase 1ε の役割）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　永井　克也 （副査） 教　授　吉川　和明　　教　授　関口　清俊

論　文　内　容　の　要　旨

地球上の生物は、約 24 時間周期の概日リズムを示す。概日リズムの体内時計の時刻発振の分子機構は、positive-negative feedback 機構であると想定されている。この分子機構には転写抑制因子である Per の核内移行や分解が重要なステップであると考えられ、そこに蛋白質のリン酸化が関与している可能性が示唆されている。私は以前に COS7 細胞に mPer と casein kinase1ε（CK1ε）を強制発現させた結果、CK1ε は mPer と結合・リン酸化して、mPer1、3 をリン酸化依存的に核内移行させる事を確認した。そこで次に哺乳類体内時計の分子機構の解明を目的として CK1ε による Per の核内移行・分解に関与する Per1 のリン酸化について研究を行った。mPer1、2、3 を４～５断片にして GST 融合蛋白質を作成し、*in vitro* kinase assay 法を用いて CK1ε によるリン酸化部位を調べた。mPer1、2、3 はそれぞれ同様の領域がリン酸化される事がわかった。さらに、mPer1 ではリン酸化領域を３ケ所（628-666aa、666-742aa、742-799aa）同定した。mPer1 の CK1ε によるリン酸化領域内で、CK1ε のリン酸化配列を検索したところ、３つのクラスター（S/T653-63、S714-26、S/T784-787）が存在する事がわかった。この mPer1 のリン酸化領域内のセリン/スレオニン残基をアラニン残基に置換した変異体を作成し培養細胞に強制発現したもので、変異体間でのリン酸化の差異、細胞内局在の変化を調べた。その結果、714 番目のセリン残基が他の領域のリン酸化を制御し分解に関与している可能性が示唆された。このセリン残基は hPER2 における概日リズム異常を示す遺伝性疾患 FASPS（Familial Advanced Sleep-Phase Syndrome）の原因となるアミノ酸置換に相当する。次に、変異体を COS7 細胞、HEK293 細胞に強制発現させ、細胞染色を行ったところ、S[653-663]A 変異体では核内移行しなかった。そこで、リン酸化依存的な核内移行を示さなかった mPer2 に mPer1 652-667aa を導入させた変異体を作成し強制発現させ細胞染色を行ったところ、この変異体は CK1ε との共発現において核内移行を示した。さらに、mPer1 653-663aa 内に存在する７つのセリン/スレオニン残基を１つずつアラニン残基に置換した変異体を作成し強制発現させた。その結果 661 と 663 番目のセリン残基のリン酸化が mPer1 の核内移行に重要であると示唆された。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の概日リズムの体内時計の時刻発信機構は、時計関連遺伝子の転写の positive-negative feedback loop から成り立っており、この分子機構において転写抑制因子である Per 蛋白質の核内移行が重要なステップであると考えられている。本研究は casein kinase1 ε（CK1 ε）が Per 蛋白質をリン酸化することを同定した上、クローニングにより得られたラット CK1 ε の mPer 蛋白質の核内移行における役割を培養細胞での発現実験により検討した。その結果、CK1 ε によりリン酸化される Per 蛋白質の２つのセリン残基が核内移行に重要な役割を果たすことを示す結果を得た。本研究は哺乳類の概日リズムの体内時計機構を理解する上で重要な知見をもたらしたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値があるものと認める。