The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	温度補償性をもつリン酸化反応における分子機構の理解
Author(s)	篠原, 雄太
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52244
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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕温度補償性をもつリン酸化反応における分子機構の理解
Understanding of the molecular mechanism for temperature-independent phosphorylation

学位申請者　篠原　雄太

シアノバクテリアから哺乳類にいたるあらゆる生物種において、1日約24時間周期の哺乳類概日時計システムが備わっている。概日時計の主な特徴として1) 1日約24時間周期で時計遺伝子の発現パターンが自律振動していること。2) 光などの外部刺激によって外部環境に同調すること。3) 温度によって概日リズムの周期長が変化しないこと(温度補償性)が挙げられる。本研究では哺乳類概日リズムにおける温度補償性機構について、分子レベルでの理解を目的とする。

哺乳類における生物時計の遺伝子ネットワークシステムはCLOCKとBMAL1のヘテロ2量体がPer(Period)やCry遺伝子上流のE-Boxに結合して転写が促進される。発現されたPERタンパクがCKIε/δによってリン酸化され、リン酸化されたPERタンパクがCRYタンパクと複合体を形成しながら核移行し、自分自身のPerやCry遺伝子の発現を抑制するネガティブフィードバックループによって1日約24時間周期の自律振動が成立している。このように遺伝子発現動態の包括的な理解や遺伝子ネットワーク構造の同定といったシステム生物学的アプローチを通じて、概日時計に関する遺伝子ネットワークのシステム的理解が急速に進みつつある。

これまでにPERの変異体で概日リズムが短周期化する家族性睡眠相前進症候群が報告されており、ハムスターにおいてCKIε変異体(tau mutant)のリン酸化活性が向上することで、周期長が短周期化することが報告されている(*Science*, 288, 483, 2000)。このことから哺乳類概日時計の周期異常は、CKIεやPERのリン酸化反応に由来することが示唆される。さらに周期変化を誘導するケミカルライブラリのスクリーニングから、周期を延長する薬剤がCKIε/δのリン酸化活性を著しく阻害されており、PERの断片ペプチド(β-TrCPペプチド)のCKIε/δのリン酸化反応過程が、概日時計における周期性に関与しているだけではなく、温度に依存しない過程であることが報告されている(*Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 15744, 2009)。

一般的には生体におけるほとんどの生化学反応において、温度変化に伴う反応速度の変化を表す係数Q_{10}は2～3となる(温度を10℃上昇させると2～3倍反応速度が上昇することに対応している)。しかし概日時計における周期長のQ_{10}は約1.0である。例えば概日時計に温度補償性機構が無くQ_{10}が仮に2だとすると概日時計が37℃のときは24時間周期であるのに対して27℃のときは48時間と長周期になる。1年のうちに夏と冬は気温に大きな変動があり、外部温度環境下によって時計の周期長が異なれば、概日時計システムとしての機能を維持できないことが容易に想像できる。また温度補償性機構は原核生物からヒトといった生物が維持していることが証明されており、概日時計システムの必要な機能として進化の早い時期に獲得された形質として考えられる。

1.　単純な基質配列を用いた温度非依存なリン酸化反応

PERの断片ペプチドであるβ-TrCPペプチドを基質としたCKIε/δによるリン酸化反応は周期と密接に相関性があり温度に依存しない反応過程である。しかしβ-TrCPペプチドは配列中にセリンやスレオニンを10箇所以上有しており、複雑な多段階のリン酸化反応を経由するため、このままではリン酸化反応における温度非依存な分子機構を理解するのは困難である。そこでよりシンプルなモデルペプチドを探索するために、これまでに報告があるセリンを2つ含むCKItideペプチドをベースにして基質の配列探索を行った。その結果、セリンを１箇所含むペプチドを用いてもCKIε/δのリン酸化反応は温度に依存しておらず、単一のリン酸化過程で温度補償性が成立していることを見出した。

2.　CKIε/δのリン酸化された生成物との強い親和力結合

基質の配列探索によりアミノ酸配列を変えてもリン酸化反応は温度に依存しないことから、温度補償性機構の本質は基質側のペプチドではなく酵素側に備わっている。CKIε/δによるリン酸化過程において、長時間高温(35℃)で反応させるとリン酸化されたペプチドが脱リン酸化反応を起こす現象が確認された。さらに詳細に検証するためリン酸化ペプチドを高収率で合成する方法を確立した。ADP存在下、リン酸化ペプチドとCKIε/δをインキュベートすると、ADP依存的、かつ温度依存的な脱リン酸化反応が確認された。温度補償されたリン酸化反応が、ADP依存的な脱リン酸化反応によって説明ができるかを検証するために、脱リン酸化反応速度Kcatを測定した。その結果、脱リン酸化反応

はリン酸化反応に比べて非常に遅い反応だった。次にリン酸化された生成物とCKIδとの結合・解離過程をSPRやITCで測定した結果、非常に強い結合であり、かつエントロピー支配的な結合過程であるこが示された。従ってCKIε/δのリン酸化過程における温度補償性は、温度依存的な脱リン酸化反応による拮抗反応によりもたらされているのではなく、温度依存的な生成物結合の安定化によるターンオーバー制御によりもたらされている可能性が示唆された。

3. 温度非依存なリン酸化反応の数理モデル

一般的な酵素反応は1基質1産物のため、定常状態近似によって容易にミカエリス・メンテン式で表すことができる。しかし2基質2産物のような複雑な反応系の場合は定常状態近似することが困難である。そこで酵素の速度論を幾何学的に考えることができるKing-Altman法を用いて、CKIδのリン酸化・脱リン酸化・ATP消費速度を数理式として表す。これまでの実験的に求めたリン酸化速度や脱リン酸化速度また結合速度定数などから温度非依存なリン酸化反応の数理式を導いた。この数理式からCKIδのリン酸化反応において温度補償性が成立するためには、酵素と生成物が強い結合を示さなければならないことがわかった。

4. 温度依存的なCKIε/δ変異体の探索

CKIε/δはリン酸化された生成物に強く結合することから、負電荷を持つイオン(WO_4^{-2}、SO_4^{-2})がCKIδに結合している部位近傍のアミノ酸残基に着目した。これらのアニオン近傍の正電荷をもつアミノ酸残基を負電荷のアミノ酸に改変することで、リン酸化生成物との結合が弱くなり、その結果温度依存的なリン酸化過程が観測されると予想した。細胞内のPER2のリン酸化過程を指標に、温度依存的なリン酸化反応を示すCKIδ変異体のスクリーニングを行った結果、Q_{10}が2を超えるK224D,K224Eを発見した。さらにこれらのCKIδ変異体(K224D,K224E)では、高温におけるリン酸化活性が拮進しており、in vitroの結合評価により、リン酸化生成物に対する親和性が著しく減弱していることが示された。このことから、CKIδにおいてK224がリン酸化生成物との結合に必須なアミノ酸残基であり、温度補償性が生成物との結合によるターンオーバー制御に起因することを支持する結果が得られた。

5. リン酸化活性作動薬の探索

もし脱リン酸化がリン酸化活性を抑制しているのであれば、脱リン酸化反応の阻害剤はリン酸化反応の作動薬になり得る。そこで脱リン酸化活性の阻害剤をケミカルライブラリから探索した。その結果、Aurintricarboxylic acid(ATA)が脱リン酸化活性を著しく阻害し、リン酸化活性を著しく促進させていることがわかった。興味深いことにATA存在下におけるCKIδによる基質のリン酸化過程は温度依存的な反応過程だった。ATAとCKIδとの結合解離定数をITCで測定した結果、CKIδに対してATAが2分子結合していることがわかった。さらにCKIδとATAとのドッキングシミュレーションを行い、ATAのCKIδへの結合部位を予測した結果、K224近傍のアミノ酸付近で安定化することがわかった。以上の結果から、脱リン酸化活性の阻害剤はK224近傍に結合し、生成物との親和性を減弱させることで、温度依存的にリン酸化反応を拮進させていることが示唆された。

6. CKI変異体マウスの表現型

1から5の結果より、in vitroにおいてCKIδのリン酸化反応では、K224がCKIδ-生成物間の相互作用に寄与することで温度非依存な反応過程が構築されていることが示唆された。これらの知見が、個体レベルでの温度補償性に実際に寄与しているかを検討するために、K224D,K224E変異マウスを作出し、個体・組織レベルでの表現型を観測した。生成物結合が起こらないCKIδ変異体マウスは、概日リズムの周期が約19時間と短周期化していた。哺乳類概日時計の周期はPERのリン酸化状態が拮進すれば、PERが不安定化するため周期が短くなることが知られており、個体の表現型においても予想通りの結果が得られた。マウスは恒温動物であるため温度補償性の検証実験は恒温動物なため困難である。そのためCKIδ変異体マウスから概日時計の中枢であるSCNスライスを作製し、組織レベルで温度補償性の検証を行った。その結果、CKIδ変異体では概日周期はSCNスライスでも短周期化していた。またSCNの培養温度を変えて培養し、概日リズムに温度依存性を評価した。WTではQ_{10}が1.0であるのに対して、CKIδ変異体ではQ_{10}が1.1と僅かに上昇し、温度補償性機構が崩れている傾向にあることが確認された。

7. 総括

本研究ではvitroにおけるCKIδの温度に依存しないリン酸化反応機構の数理モデル化に成功した。その数理式では温度非依存なリン酸化反応では生成物結合が重要なパラメータであり、CKIδに生成物結合する素過程が存在することを実験で証明した。またCKIδにおいて温度補償性に寄与するアミノ酸残基を同定し、これらのアミノ酸残基の変異体マウスにおいて概日リズムの周期が短周期化することを確認した。この変異体はCKIδが生成物結合しない変異体であり、生成物結合が概日リズムの周期に関与する素過程であることを裏付けている。以上より、個体において維持されている概日時計の温度補償性の分子機構の理解に一歩近づいたといえる。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　篠原　雄太　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	特任教授	柳田　敏雄
	副 査	教授	近藤　滋
	副 査	教授	難波　啓一

論文審査の結果の要旨

篠原氏は哺乳類の概日時計における温度補償性の分子機構を解明するために薬物などによる周期変化に関わる、casein kinase ε/δによるPERタンパク質のリン酸化活性に注目し、独自の反応系と計測系を工夫することにより、温度依存的な生成物の結合が温度補償に重要な役割を果たすことを明らかにしました。またcasein kinase δのリン酸化反応の温度補償性に関わるアミノ酸を同定し、その変異体で概日周期が短くなること、温度依存性が変化することを確認してこの系が概日時計の温度補償性に重要な役割をはたす可能性があることを証明しました。これは博士号の学位授与に値する十分に質の高い研究成果であると考えられます。