

# リン酸化率依存的な KaiC-KaiA 相互作用の変調

中尾 有紗<sup>1</sup>、青山 理紗子<sup>1</sup>、山崎 洋一<sup>1</sup>、

秋山 修志<sup>2,3</sup>、米澤 健人<sup>1,4</sup>、上久保 裕生<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・物質創成科学領域、

<sup>2</sup>分子科学研究所・協奏分子システム研究センター、<sup>3</sup>総合研究大学院大学・分子機能科学研究科

<sup>4</sup>奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・デジタルグリーンイノベーションセンター

生体内では、多数のタンパク質が協奏的にはたらき、生命を維持するための生理機能を有している。生命維持システムの1つとして概日時計がある。シアノバクテリア由来の概日時計システムである Kai システムは、3種類のタンパク質 (KaiA, KaiB, KaiC) と ATP の化学エネルギーのみによって安定な 24 時間周期を刻み、さらには試験管内での再現が可能であることが知られている<sup>[1]</sup>。このシステムでは、2か所のリン酸化部位 (Ser431, Thr432) を有する KaiC が六量体を形成し KaiC<sub>6</sub> をコアとして、二量体を形成する KaiA<sub>2</sub> による KaiC<sub>6</sub> 自己リン酸化促進と、単量体 KaiB による KaiA<sub>2</sub> の作用の抑制で概日リズムを実現する。これまで、各プロトマーのリン酸化状態を指標とし、Kai システムにおける 24 時間周期のリン酸化・脱リン酸化反応の解釈が行われてきた。しかし、溶液中で六量体として存在し、部分的にリン酸化された KaiC<sub>6</sub> と KaiA / KaiB との結合動態は未だ明らかになっていない。よって本研究では、KaiC-KaiA 結合に着目し、滴定 X 線溶液散乱測定法を用いて KaiC のリン酸化率に依存した KaiA によるリン酸化調節機構を報告する。

KaiC-KaiA の結合状態を観察するため、リン酸化率の異なる KaiC として、高リン酸化率 (68%) の p-KaiC と低リン酸化率の np-KaiC (26%) を用いた。これらに対して KaiA の連続滴定 SAXS 測定を行い、各散乱曲線から KaiC 単独の散乱曲線と KaiA のみの散乱曲線を差し引くと Cross term が観測されたことから、いずれの条件においても KaiC-KaiA 複合体が形成していることがわかった。この Cross term の小角領域 ( $0.016 < Q < 0.038 \text{ \AA}^{-1}$ ) の積分強度を KaiA<sub>2</sub> 濃度に対してプロットした結果を図 1 に示す。この結果を回帰分析し求めた解離定数は、p-KaiC と KaiA 及び np-KaiC と KaiA でそれぞれ  $1.38 \pm 0.14 \mu\text{M}$  と  $8.60 \pm 1.1 \mu\text{M}$  と見積もられた。また、KaiA<sub>2</sub> の濃度が  $14.9 \mu\text{M}$  の時の np-KaiC と p-KaiC の Cross term を図 2 に示す。P-KaiC と np-KaiC のスペクトルを比較すると、p-KaiC の方が負のブロードなピークが大きく、小角側にシフトしており、形成される KaiC-KaiA 複合体の形状が変化していることが示された。以上のことから、リン酸化率が一定以上になると KaiC-KaiA のドメイン配置構造に変化が生じ、その結果、KaiC-KaiA の結合が弱められると考えられる。

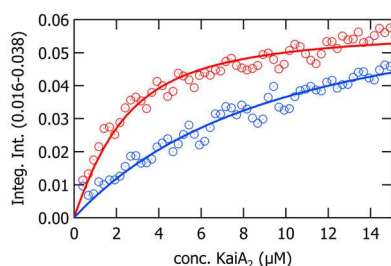


図 1 KaiA<sub>2</sub> 濃度に対する Cross term の小角領域の積分強度

(赤) np-KaiC (青) p-KaiC

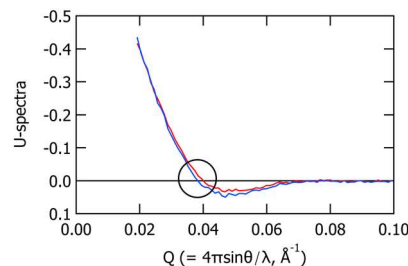


図 2 Croaa term における U-spectrum の比較

(赤) np-KaiC (青) p-KaiC