

氏名	てい しょうなん 蹄 暁 南
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第392号
学位授与年月日	平成17年 9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Mechanism by which TIME measures time-interval with special reference to the interaction with PIN-peptide (PINペプチドとの相互作用からみたTIMEタンパク質の測時機構)
学位論文審査委員	(主査) 甲斐英則 (副査) 古賀大三 星川和夫 森嶋伊佐夫 東政明

学位論文の内容の要旨

TIME (Time Interval Measuring Enzyme) is a novel enzyme, ATPase, that measure time interval of diapause development. PIN is a peptide that regulates the time measurement through its interaction with TIME. Present experiment was carried out to address the mechanism by which TIME measures time interval from a view point of the interaction between TIME and PIN.

TIME and PIN were prepared from diapausing eggs and pupal ovaries of C108 (old) silkworm, *Bombyx mori* L. by the method of Kai et al., (1996, 1999). The ATPase activities were determined by the method of one-time integration assay with Malachite green colorimetric determination of liberated inorganic phosphate. The fluorescence anisotropy was measured on a Beacon 2000 fluorescence polarization instrument (Pan Vera Corp.) at 4 °C and 25 °C with a 488 nm excitation filter and a 520 nm emission filter. Anisotropy at each TIME concentration was analyzed using the Beacon Data Manager and GraphPad PRISM software provided with the instrument.

The termination of diapause requires cold for a fixed minimum duration during which some physico-chemical development called diapause development completes before morphogenesis can resume. The chilling period is depended upon the ages of eggs when the exposure to cold is initiated. To determine the accurate period of chilling indispensably required for the completion of the diapause development, eggs were chilled at 5 °C various days after

oviposition and hatching larvae were counted every day until all hatching completed. The diapause development elongated as the chilling-commencement delayed. Yet, eggs attained the longest diapause development in 12 days after oviposition; no further elongation was observed in chilling commenced later than 15 days after oviposition. The parallel measurements of TIME-ATPase activities confirmed that the transitory burst activation occurred at a time equivalent to shortly before the completion of diapause development. The later the TIME was extracted from diapausing eggs, the later the timing of ATPase activity appeared. Whereas TIMES obtained from diapausing eggs later than 12 days after oviposition exhibited the activity at the same latest time; no further delay was shown. TIME appeared at different times under different conditions of eggs in relation to lengths of diapause development. Interestingly, TIME was also obtained from pupal ovaries. The younger the ovaries from which TIME was isolated, the earlier the transitory burst activation of ATPase appeared, while no such timer activation of ATPase appeared in ovaries earlier than 6 days after pupation. Hence, a straight descending line of ATPase appearing time was observed with ages throughout the stages from establishment of diapause development in eggs to ovarian development in pupae. To address the mechanism how TIME shows the activity at different times, TIME was mixed with PIN. The longer TIME and PIN were mixed, the later the time of ATPase activity appeared. The rate of delay was almost the same to that observed in TIME of eggs. Since the timer mechanism is built into the protein conformation of TIME, PIN may act on TIME to structure the timer conformation. The capacity of PIN to bind with TIME was measured by fluorescence polarization. The binding interaction was much tighter (nearly 1000 times) at 25 °C than that at 4 °C. Because the $\log EC_{50}$ (in nM) at 4 °C was about 7, PIN must dissociate from TIME at low temperatures at the physiological concentration of TIME in eggs. Thus, TIME appears to be restructured into a time-measuring conformation by PIN at the high temperatures of summer, whereas the TIME-PIN complex would dissociate at the low temperatures of winter. This dissociation acts as the preliminary cue for the ATPase activity burst of TIME, which in turn causes the completion of diapause development and initiates new developmental programs.

All the results mentioned above suggest that PIN would occur about 6 days after pupation and then would keep act on TIME through pupal stages to laid eggs. During those periods of action, PIN would structure the timer conformation. The longer the PIN acts on TIME, the longer the period of diapause development was and the longest diapause development was established in eggs 12 days after oviposition. It has become apparent that the interaction between TIME and PIN plays a central role in the time measurement of the interval timer.

論文審査の結果の要旨

TIME (Time Interval Measuring Enzyme) は、タイマー機能を有する酵素 ATPase である。カイコ休眠卵から発見された。次のような経緯からである。カイコ休眠卵を 5℃ に冷蔵すると、低温要求性の生理学的発育 (休眠間発達) が進行し、休眠が破れる。この休眠間発達完了期直前に、卵中の TIME-ATPase 活性が突然発現する。しかし、その後はたちまち元の低レベルに戻ってしまい、一過性の活性となる。TIME を試験管内で冷蔵しても、やはり休眠間発達完了相当期に一過性の活性を発現する。このような経緯からである。その測時的活性発現機構は TIME タンパク質の立体構造中に組み込まれており、活性発現が休眠間発達完了、つまり胚子発育再開のシグナルになるものと推察されている。また、続いて発見され構造も決定されたペプチド PIN は、TIME-ATPase 活性を阻害し、時計現象を制御するものと推察されている。本研究は、タンパク質測時機構を明らかにする目的で、その構造解析を行うとともに、PIN との相互作用について検討し、TIME の測時機構に考察を加えたものである。

まず、卵の休眠間発達期間を明らかにした。カイコの休眠が産下 2 日後から始まるため、従来は、産下 2 日後から卵を冷蔵した場合の休眠間発達のみが検討されてきたからである。産下後の種々の時期に卵を冷蔵したところ、冷蔵開始が遅くなるにしたがって要求される休眠間発達期間は長くなった。しかし、産下 12 日後以降の冷蔵では、もはやそれ以上の延長はなく、約 45 日であった。同時に TIME の ATPase 活性も測定した。TIME を冷蔵開始直前の卵から分離精製して試験管中で保護したところ、冷蔵開始までの時間の長い卵から得た TIME ほど ATPase 活性が遅く発現した。しかし、産下 12 日後以降の卵から得た TIME ではさらに遅くなることはなく、約 40 日相当時間後に一過性の極大活性が発現した。休眠間発達期間の変化に応じて TIME-ATPase 活性発現時間も変化し、これら試験管内での活性発現時期は、卵内での発現時期に一致し、いずれも休眠間発達完了期直前に相当した。したがって、TIME は休眠期間を認識し、タイマー機能を有するタンパク質である可能性が確認された。

産下 12 日後から産下 2 日後まで、卵齢が若くなると共に、TIME-ATPase 活性発現までの時間が短くなることが明らかになった。そこで、産下 2 日より若い、休眠開始前の卵や蛹発育中の卵巣についてもさらに検討した。その結果、それらからも TIME が得られ、得られた TIME の ATPase 活性は卵の場合より早く発現した。また、蛹令の若くなるほど早くなり、蛹化 6 日以前では TIME 精製後直ちに活性が認められた。すなわち、蛹化 6 日以前では TIME のタイマー構造は形成されていないことが判明した。PIN は、卵特異的タンパク質 (ESP) から切り出されてくるペプチドであり、その ESP の生合成は蛹化 7 日頃に最も盛んになる。つまり、PIN は蛹化 6 日以降の卵巣に現われ、その後 TIME との相互作用を始める可能性が示された。

TIME を精製してから活性が発現するまでの時間は、蛹化 6 日後からの時間経過との間で比例的直線関係にあり、その関係は産下 1 2 日後まで続いた。活性が発現するまでにかかる時間の延長割合は、1 日のエイジングあたり約 1 時間であった。TIME は単一のタンパク質である。それにも拘わらず、様々な時間に一過性の活性を発現したのである。単一タンパク質が種々の時間で活性

を発現する機構は、TIME の測時機構解明の重要な糸口になる。PIN との関係から追究した。TIME の時間よみ調節には PIN ペプチドの関与することが明らかになっているので、TIME と PIN とを試験管中で混合したところ、両者は等モル複合体を形成することが MALDI-TOF-MS 分析によって示された。また、混合時間を長くするにしたがって ATPase 活性発現までの時間が長くなった。その延長割合は、やはり混合時間 1 日あたり約 1 時間であり、卵で見られた割合とほとんど同じであった。

タイマー機能は TIME の立体構造中に組み込まれていることがわかっている。PIN は TIME と結合するので、PIN が TIME のタイマー構造を形成させる可能性がある。TIME と PIN 両者間の解離会合定数 (KD 値) を Beacon 2000TM を用いて測定したところ、両者の混合温度が 25 °C の場合で約 104 nM であった。ところが、4 °C では約 107 nM であった。TIME の生理学的濃度条件下では、夏の温度である 25 °C で PIN と TIME は複合体を形成し、冬の温度である 4 °C では解離することが明らかになった。

PIN は、蛹化 6 日以降の卵巣で ESP から切り出されて TIME と結合し、タンパク質タイマー構造を形成する。卵が低温に遭遇すると PIN が解離し、その結果 PIN フリー-TIME の構造が解きほぐれる。低温下でのその解きほぐれ立体構造変化速度が時間の関数になり、休眠期間時計を形成する。このように推察された。

以上のように、本研究はインターバルタイマー型生物時計という従来にはない全く新しい研究領域を拓き、タンパク質がタイマーとして機能する仕組みについて重要な情報を提供している。関連分野の発展にも大いに寄与すると思われる。したがって、学位論文として十分な独創性と優れた内容があるものと判定した。