

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770029
 研究課題名(和文) 「生物」時計の解明、試験管内再構成系からのアプローチ
 研究課題名(英文) The analysis of biological clock using in vitro reconstitution system

研究代表者
 北山 陽子 (KITAYAMA YOKO)
 名古屋大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号：20444367

研究成果の概要：多くの生物の持つ概日時計機構を解明するため、シアノバクテリアを用いて解析を行った。試験管内での実験からシアノバクテリアの概日時計機構の本質は時計タンパク質 KaiC のリン酸化サイクルであると考えられてきたが、本研究からリン酸化サイクルが存在しない細胞においても概日リズムは形成されることがわかった。つまり、リン酸化サイクルは唯一の振動体ではなく、細胞ではリン酸化サイクルと転写翻訳サイクルの二重の振動体が存在し、それによって安定した概日リズムが形成維持されていることが解った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、概日時計、シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上の多くの生物は、昼夜の環境変動に適応するために概日時計と呼ばれる内因性の時間測定機構を持っている。概日時計の働きによって、動物の睡眠覚醒、植物の葉の就眠運動などが約 24 時間周期で変動し、花の開花などの季節性リズムは日の長さという環境変化を概日時計が評価することで引き起こされる。概日リズム形成の分子機構は、「特定の時計遺伝子のリズム的な転写によって時計タンパク質の蓄積量変動し、その時計タンパク質が自分自身の遺伝子発現にたいして抑制的にフィードバックす

ることで転写を抑制し、この繰り返しがリズムを生み出す」という転写翻訳のフィードバックによって説明されてきた。

(2) シアノバクテリアは、原核生物において概日リズムが存在することが報告された唯一の生物である。時計遺伝子群 *kaiABC* がクローニングされ、その発現解析と細胞内での Kai タンパク質の生化学的解析によって、*kaiA*, *kaiB*, *kaiC* の三つの遺伝子はどれもリズムを形成するために必須であり、KaiA が *kaiC* 発現をポジティブに、KaiC が *kaiC* 発現をネガティブに制御することによってリズムが形成され、さらに KaiC のリン酸化状態

が Kai タンパク質複合体の形成を制御することで KaiC の転写抑制活性を調節している、つまり振動発振機構は原核生物と真核生物において共通であると考えられていた。

(3) 2005 年に、シアノバクテリアの概日時計機構は転写翻訳のフィードバック制御を必要としないことがわかった。精製した KaiA, KaiB, KaiC と ATP を試験管内で混合すると、KaiC のリン酸化状態が概日リズムの性質をもって振動し、細胞内での転写翻訳リズムの周期と試験管内における KaiC のリン酸化サイクルの周期はほぼ一致していたため、試験管内で再構成された KaiC リン酸化サイクルが細胞内でも機能している概日時計の振動体であり、シアノバクテリアの概日時計は時計タンパク質 KaiC のリン酸化脱リン酸化振動がリズムを生み出していると考えられるようになった。

2. 研究の目的

(1) 試験管内再構成系の実験から、試験管内の時計＝リン酸化サイクルがシアノバクテリアの時計において非常に重要な役割をはたしていると考えられる。しかし、試験管内と生きている細胞では環境が大きく異なっている。細胞においては、代謝変動や細胞分裂の影響等の内的環境変化および光温度条件や周囲の栄養状況などの外的環境変動にさらされているが、概日時計は安定に維持され機能している。さらに、概日時計は外環境の時刻に自分の時刻をあわせる性質を持っている。

本研究は、再構成系で得られた知見をふまえて、動的で複雑な生きた細胞環境において生物時計はどのように動き、どのような機能を持っているのか、を解析することを目的とした。KaiC のリン酸化振動がどのような仕組みで時を刻むかを試験管内再構成系を用いて解析を行い、その仕組みの必要性、重要性を細胞において検証する。さらに、生きた細胞の時計において転写翻訳フィードバック制御がどのような意義を持つのか、KaiC のリン酸化サイクルとのリンクを含めて解析する。

(2) シアノバクテリアは試験管内で時計を再構成できる唯一の生物であるとともに、概日リズムを簡単に観察でき、遺伝子操作も容易である。シアノバクテリアを用いることで細胞で働く概日時計と試験管内で動く振動体を比較し、振動体の仕組みを生きた時計において検証することで、地球上の多くの生物がもつ「生体内の時計」がどのような要素で構成され組織化されているかを解明し作動原理モデルを提唱する。

3. 研究の方法

(1) シアノバクテリアに概日リズムを生じ

させ環境に適応することを助ける概日時計は、試験管内で動く KaiC リン酸化振動体と完全に同一ではないと考えられる。そこで、細胞で働く概日時計と試験管内で動く振動体 KaiC リン酸化サイクルの違いを解析・比較し、細胞の概日時計に特異的な反応を探索することによって、生体内の時計にとって必要な要素、特に周囲の内外環境変動に対する安定性や環境に体内の時計の時刻を合わせる同調機構に必要な要素の同定を試みた。

① 細胞と試験管内で表現型の異なる *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* 変異体のスクリーニング:
kaiA, *kaiB*, *kaiC* には様々な表現型を示す変異が同定されている。その中から長周期、短周期、無周期をそれぞれ数個選び、細胞内の Kai タンパク質をウエスタンブロットで解析し、発現が確認できた変異型 Kai タンパク質を大腸菌発現系で発現、精製した。試験管内のリン酸化変動を解析し、細胞のリズムと異なる表現型を示すものをスクリーニングした。

② 細胞と試験管内で表現型の異なる *kaiABC* 変異体の試験管内の時計の性質と、細胞における Kai タンパク質の動態や温度と光条件の概日リズムに対する影響を解析した。

(2) 転写翻訳を阻害しても試験管内においても、KaiC のリン酸化は概日振動をする。しかし、シアノバクテリアは現実には光を浴びて生育しており、その時は *kaiC* は転写活性、mRNA の蓄積、KaiC 合成速度、KaiC の分解、細胞内における局在にリズム的な変動が観察されている。これはどの遺伝子についても観察される現象ではなく、マイクロアレイ解析から、シアノバクテリアの遺伝子の中で概日リズムをもって mRNA が蓄積するのは 10%程度であることが解っている。そのため、これらのリズムは概日時計を制御するために積極的な意味を持っていると考えられる。そこで、転写翻訳フィードバック制御の生体内の時計における意義の解明を行った。

① 細胞内においてリン酸化サイクルを阻害し、リン酸化サイクルのない概日リズムが生じるかを検証し、転写翻訳フィードバック制御が概日時計に機能的重要性を持っているかを調べた。KaiC のリン酸化を促進する *kaiA* を過剰に発現する *kaiA* 過剰発現株を用いて KaiC のリン酸化サイクルを阻害、もしくは自己リン酸化活性が損なわれている *kaiC* [K294H] 変異体、KaiC の自己リン酸化部位のアミノ酸置換変異体 *kaiC* [S431E;T432E] 変異体において細胞の概日リズム表現型を発光レポーターによる遺伝子発現、ウエスタンブロットによるタンパク質発現解析をおこなった。

- ② 転写翻訳フィードバック制御はリン酸化サイクルとどのようにカップリングしているのか、機能分業が行われているのかを、野生型細胞と KaiC のリン酸化を促進する *kaiA* 過剰発現株および試験管内再構成系に対して擾乱を与えることで解析した。

4. 研究成果

本研究は、再構成系で得られた知見をふまえて、細胞の時計システムの構造を解析し、以下の成果を得た。

(1) 細胞で働く概日時計と試験管内で動く振動体 KaiC リン酸化サイクルの違いの発見
試験管内と細胞の時計の相違点を比較し、細胞の概日時計に特異的な反応を探索し、生体内の時計システムにとって必要な要素を同定するため、試験管内と細胞で表現型の異なる *kaiABC* 変異体の探索を行った。これまでに同定されていた様々な表現型を示す *kaiABC* 変異体から数個選び、変異型 Kai タンパク質を大腸菌発現系で精製を行い、試験管内で表現型を解析したところ、細胞と異なる変異体を得られた。

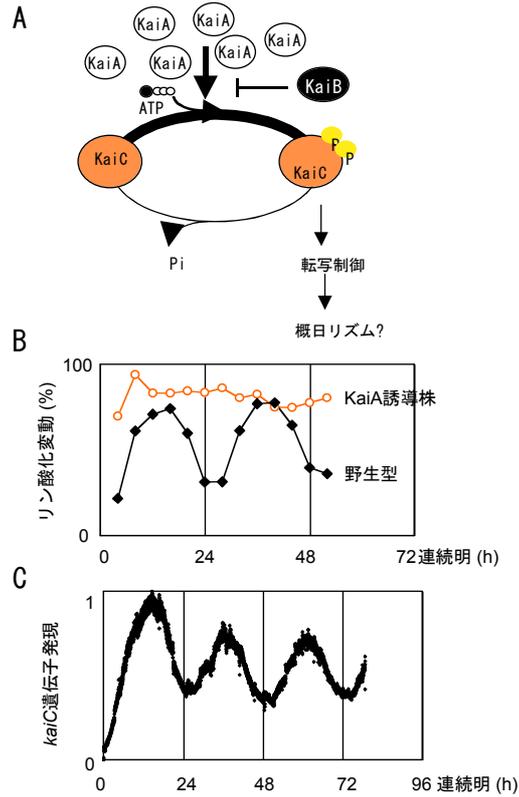
(2) 転写翻訳フィードバック制御の生体内の時計における意義の解析

リン酸化サイクルは転写翻訳フィードバック制御がなくても概日リズムを生み出すため、転写翻訳フィードバック制御ではなくリン酸化サイクルが概日時計機構の本質であると考えられてきたが、シアノバクテリアの細胞内において KaiC のリン酸化を促進する KaiA を過剰に発現することによって KaiC リン酸化サイクルが阻害される *kaiA* 誘導株を用いて概日リズムの表現系を観察した結果、遺伝子発現に概日リズムが存在することを発見した (図 1)。

さらにリン酸化修飾がおこらない KaiC 変異体 KaiC [S431E;T432E] を用いた解析から、リズム形成と *kaiC* 遺伝子発現のフィードバック制御には KaiC のリン酸化が必要ではないこともわかった。これらの結果は、リン酸化サイクルはシアノバクテリアにおいて概日リズムを形成するための唯一の振動体ではなく、転写翻訳フィードバック制御と協調して細胞にリズムをもたらしていることを示している。

さらに、KaiA 過剰発現株を用いて解析を行った結果、細胞の時計では、リン酸化サイクルと転写翻訳のフィードバック制御が両方も存在しないと、振動周期が短周期化し、さらに振動は安定性を欠くことがわかった。この結果から、概日時計機構は時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC を基盤とする二つの振動発振機構が存在し、それらが協同して機能することで安定で正確な概日リズムが維持されることがわかった。

図 1 KaiC リン酸化サイクルがなくても概



日リズムは持続する

A, B) KaiA を誘導すると KaiC リン酸化サイクルは阻害された。A. 模式図、B. ウェスタンブロッティングによって KaiC のリン酸化状態を検出し時間変化を測定した。C) KaiA 誘導株における遺伝子発現の時間変化を測定したところ、明らかな概日リズムが検出された。

(3) KaiC リン酸化サイクル概日時計の備えるべき性質 (約 24 時間周期のリズムの自律振動性、環境同調、周期の温度補償性) をすべて備えている。しかし、細胞は KaiC リン酸化サイクル単一ではなく転写翻訳フィードバックループとの二重の振動発振機構を持っていた。これは、『生物』の時計は互いに補い合う複数の振動体が必要であることを示唆している。真核生物では転写翻訳フィードバックによって概日時計が動くと考えられているが、細胞なかで概日リズムを正確に安定に維持するためには、シアノバクテリアで発見された複数の振動体機構が生物に共通して存在することが考えられる。多くの生物で概日時計の研究は進んでいるが、二つの振動システムが概念モデルではなく時計タンパク質を基盤として実在すること、またその意義を示したのは本研究の大きな成果である。本研究の成果をもとに、他の生物を用いては困難な概日時計システム全体の分子レベルでの解析を細胞および試験管内再構成系を用いて行い、概日時計の仕組みを明らかにし、活用していくことが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kitayama Y, Nishiwaki T, Terauchi K, Kondo T. Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of cyanobacteria. *Genes Dev.* 査読有り、22, 2008, 1513-1521
- ② Mackey SR, Choi JS, Kitayama Y, Iwasaki H, Dong G, Golden SS. Proteins found in a CikA interaction assay link the circadian clock, metabolism, and cell division in *Synechococcus elongatus*. *J Bacteriol.* 査読有り、90, 2008, 3738-3746
- ③ Terauchi K*, Kitayama Y*, Nishiwaki T, Miwa K, Murayama Y, Oyama T, Kondo T. ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 査読有り、104, 2007, 16377-16381 *equally contributed.
- ④ Nishiwaki T*, Satomi Y*, Kitayama Y*, Terauchi K, Kiyohara R, Takao T, Kondo

T. A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J.* 査読有り、26, 2007, 4029-4037 *equally contributed.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 北山陽子、杉浦安奈、西脇妙子、寺内一姫、近藤孝男 変異型 Kai タンパク質を用いた概日時計機構の解析、日本植物生理学会、2009年3月22日、名古屋
- ② 北山陽子、杉澤由姫子、西脇妙子、森田暁、近藤孝男 KaiC 六量体内部におけるリン酸化サイクルの制御、日本時間生物学会、2008年11月8日、岡山
- ③ 北山陽子、近藤孝男 時計タンパク質 KaiC が制御するシアノバクテリアの概日時計システム、日本遺伝学会第80回年会、2008年9月4日、名古屋
- ④ 北山陽子、西脇妙子、近藤孝男 変異型シアノバクテリア概日時計調節因子 DnaA の同定と解析、日本植物生理学会、2009年3月21日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北山 陽子 (KITAYAMA YOKO)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：20444367