

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19870026
 研究課題名（和文）
 シアノバクテリア時計蛋白質 KaiC の分解に関与するプロテアーゼの同定及び解析
 研究課題名（英文） Global analysis of the protease concerning KaiC degradation in *Synechococcus sp. PCC 7942*.
 研究代表者 岡野 圭子（今井 圭子）
 関西医科大学・医学部・助教
 研究者番号 90454610

研究成果の概要：

シアノバクテリアの概日振動の安定性において、時計蛋白質 KaiC 蓄積量の調節は重要な因子の一つであるが、その分解機構はわかっていない。本研究では、KaiC 分解に関与するプロテアーゼを探索するため、シアノバクテリアのプロテアーゼ群の網羅的な解析を行った。その結果、ATP 依存性プロテアーゼ Clp 群の破壊株や過剰発現株において *kaiBC* プロモーター活性の周期が変化し、概日時計との関連性が示唆された。また、KaiC 分解速度を簡便に測定するための手段として、*in vitro* KaiC リン酸化振動の再構築系を用いた KaiC 分解活性測定法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：時間生物学

科研費の分科・細目：植物生理・分子

キーワード：概日時計、植物生理学、シアノバクテリア、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

概日リズムを示す最も単純な生物シアノバクテリア (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) では、概日時計を構成する必須時計遺伝子 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* が同定されている。KaiC は ATPase 活性を持ち、さらに自己リン酸化・脱リン酸化能を持つ分子で、KaiA は KaiC 自己リン酸化を促進し、KaiB は KaiA 効果抑制の働きがある。KaiC のリ

ン酸化レベルは細胞内で概日リズムを示し、さらに KaiA, KaiB, KaiC3種の精製タンパク質による *in vitro* で概日周期を持つリン酸化リズムを再構築でき、KaiC リン酸化レベルに現れる概日振動系が細胞内でも中心的な振動子として働いていることが示された。この発見は、様々なモデル生物で示されてきた、概日振動の発生には時計遺伝子群の転写レベルのネガティブフィードバック制御が中核になっているという提

案を覆し、概日時計研究の新たな展開を迎えた。

一方で細胞内においては、KaiC リン酸化レベルだけでなく KaiC 蓄積量も概日振動しており (mRNA 量も概日振動を示す)、KaiC 蛋白質量を一時的に増減させると位相が変動する。このことから、KaiC 量が直接概日振動の位相を決定し、蛋白質量の変動が細胞内での24時間の振動の安定性に重要であると考えられている。さらに、細胞内の KaiC 量の調節は、合成・分解速度の双方が概日振動する事で積極的に行われており、この代謝回転の概日振動が、シアノバクテリアの概日振動システムの適切な振動周期や振幅の維持に関わっていると考えられる。*in vitro* リン酸化振動再構築系でも KaiABC の量比が振動周期や振幅の安定に大きな影響を与えることが示されている。シアノバクテリアの細胞レベルで起きている安定した概日振動メカニズムを理解するためには、蛋白質合成分解による蓄積量調節機構の解明も重要な課題である。

2. 研究の目的

シアノバクテリアでは時計遺伝子群を含む全遺伝子のプロモータ活性は概日時計に制御され、転写レベルで概日周期の遺伝子発現を繰り返すことが示されている。この基本転写機構を介した転写、翻訳の振動が KaiC 合成速度の時間変動を直接決めている事は、既に示された。しかし、KaiC の分解機構についてはほとんど明らかになっていない。KaiC の安定性に関して、驚くべき事に *in vitro* 系で KaiC のリン酸化リズムが一週間繰り返される間、KaiC はほとんど分解されない。さらに、恒暗条件下で *kaiC* mRNA は速やかに分解され転写もほぼ行われぬにも関わらず、KaiC のリン酸化振動は持続され、KaiC の蓄積量も少なくとも二日は安定している事が示されている。この様に、蛋白質の合成の抑制された条件下では KaiC の分解がほとんど行われず、KaiC リン酸化振動を正常に保つよう、KaiABC 蛋白質群の蓄積量を安定性の変化により積極的に調節する機構があると考えられる。私は、細胞内のシアノバクテリア概日振動の安定機構システムの理解 (周期・位相・振幅などの安定なリズムの維持) には、KaiC の分解経路や概日振動成分を持つメカニズム解明が重要であると考えた。

そこで、このメカニズムを理解する手始めとして、*S. elongatus* のプロテアーゼ遺伝子群を網羅的に解析し、KaiC の分解に関与するプロテアーゼの同定を行う事を本研究の目的とした。さらに、これらの分解機構の解明の為に研究を行うに当たり、分解活性を簡便に行える系を開発する事が好ましいと考えた。今後シアノバクテリア時計遺伝子 KaiC の分解機構の解明研究を進展させる為のツールとして、簡便な分解活性を測定する系を

開発する事も目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロテアーゼ破壊株・過剰発現株の概日リズムへの影響

S. elongatus のゲノム情報を元に、プロテアーゼ関連遺伝子を抽出し、 Ω カセットを挿入または置換することで破壊株を網羅的に作製した。それらの株の *kaiBC* プロモーター活性リズムを自動生物発光測定装置で測定し、概日時計への影響を調査した。さらに、Clp 群のプロテアーゼについては、IPTG の添加により一過的に発現誘導が出来る *trc* プロモーターを用いて、過剰発現体の作製も行い、生物発光リズムへの影響を確認した。いくつかのプロテアーゼには、環境ストレス応答が報告されている。このような応答とシアノバクテリアの概日時計の温度補償性に及ぼす影響を調べるため、高温 (35°C)、低温 (25°C) 条件下における変異体の周期長も測定し、標準条件下 (30°C) でのリズムの周期、位相、振幅を比較した。

(2) Clp 群過剰発現株の生育への影響

過剰発現レベルによる育成への影響を調べるために、様々な IPTG 濃度条件下 (寒天培地) での生育速度を調査した。連続明条件 (30°C、3500lux) と 12 時間暗期 12 時間明期条件でそれぞれ調べた。KaiC 蛋白質量を比較する実験は液体培養条件下 (エアレーション有り) を行うため、液体培養条件下においても連続明 4 時間目と連続明 1 6 時間目に IPTG 添加後 (100 μ M)、生育を調査した。

(3) プロテアーゼ変異体における KaiC 蛋白質蓄積量の変化の解析

プロテアーゼ破壊株は、連続明 4 時間と連続明 1 6 時間に細胞を回収した。プロテアーゼ過剰発現株は、連続明 4 時間目と連続明 1 6 時間目に 100 μ M の IPTG を添加し、経時的にシアノバクテリア細胞を回収した。細胞抽出液を SDS-PAGE で分離後、KaiC 抗体によるウェスタン解析により、KaiC 蛋白質蓄積量の変化を調べた。また、過剰発現体についてはプロテアーゼの発現量を確認するため C 末に FLAG-tag を付加し、その発現量も解析した。

(4) 分解活性の簡便な測定方法の開発

シアノバクテリアの KaiC リン酸化振動の *in vitro* 再構築系を用いた測定方法の開発のために、大腸菌内で発現させた *in vitro* KaiABC 蛋白質を精製した。細胞内の KaiC と区別するため、精製蛋白質は KaiC-FLAG を用いた。様々な条件のシアノバクテリアからの細胞抽出液を KaiC-FLAG に添加し、経時的に混合

液をサンプリングした。その混合液を FLAG 抗体で免疫沈降し、KaiC-FLAG を回収した。その後 SDS-PAGE を行い、KaiC-FLAG の減少率を確認した。精製蛋白質 KaiC-FLAG のリン酸化パターンを調整するため、KaiA, KaiB の混合条件下でも同様の実験を行い、KaiC-FLAG の減少率を比較した。

4. 研究成果

(1) プロテアーゼ破壊株・過剰発現株の概日リズムへの影響

Synechococcus elongatus PCC 7942 と同程度の高いシアノバクテリア、*Synechococcus elongatus* PCC 6301 のゲノム情報から、20 のプロテアーゼ関連遺伝子の存在が確認された。これらの遺伝子の網羅的な破壊を行った。*clpC*、*clpR*、*clpP3*、*syc0869_d* の4つの遺伝子については遺伝子の破壊が不可能であった。*clpC*、*clpR*、*clpP3* については、同様の報告もあり生存に必須の遺伝子であると考えられる。*clpP*、*clpP2*、*clpX* の破壊株では、*kaiBC* プロモーター活性リズムの周期が、それぞれ、2時間、2時間、0.7時間の長周期化を示した。それ以外のプロテアーゼ破壊株では著しい周期長の変化は見られなかった。プロテアーゼ破壊株の温度補償性の解析では、PqqA、YmxG、*syc0448_c* などいくつかのプロテアーゼについて、周期変化や位相変化などの影響が見られた。

破壊株で長周期化したプロテアーゼ ClpP1、ClpP2、ClpX は、複合体を形成して働くこと ATP 依存性プロテアーゼである。さらに、生存に必須である ClpP3、ClpR、ClpC も複合体を形成して機能する。これらのプロテアーゼの概日時計に対する影響をさらに調べるために、IPTG の添加により一過的な過剰発現が可能な株を作製した。ClpX 過剰発現株では、100 μ M IPTG 添加後、速やかに *kaiBC* プロモーター活性が低下することがわかった。ClpP1、ClpP2 過剰発現株では振動周期にほとんど影響はなかった。一方、ClpP3、ClpR の過剰発現体では、周期が長周期化 (~0.5 時間) した。これらのプロテアーゼ変異体の解析から、ATP 依存性プロテアーゼ Clp 群がシアノバクテリアの概日時計に何らかの影響を与えることが示された。

(2) Clp 群過剰発現株の生育への影響

ClpP1、ClpP2、ClpR、ClpR-ClpP3 の過剰発現株においてもどの IPTG 濃度条件においても生育速度に変化は見られなかった。一方、ClpX 過剰発現株では、10 μ M の IPTG でさえも寒天培地上では生存出来なかった。ClpP2-ClpX 過剰発現株では 10 μ M の IPTG 濃度で生育速度が非常に遅くなったが、500 μ M の IPTG 濃度条件下でも、弱いながらも生存した。

また、ClpP3 過剰発現体では、100 μ M 以上の IPTG 濃度で生育が非常に遅くなった。このことから、原核生物に一般的な ATP 依存性プロテアーゼである Clp は概日時計だけでなく、シアノバクテリアの生育に必須の蛋白質に影響を与えると示唆された。連続明条件下でも、12 時間暗期 12 時間明期条件においても同様の結果が得られた。また、液体培地条件 100 μ M IPTG で、ClpP1、ClpP3、ClpR、ClpX 過剰発現体は液体培養 (エアレーション有り) では IPTG 添加後 24 時間で影響は無かった。ClpP2-ClpX、Clp2 過剰発現体は、IPTG 添加後生育が悪くなり、Clp2 過剰発現体は生育不能で白濁した。液体培養中の ClpX 過剰発現株の *kaiB* プロモーター活性リズム (生物発光) は、IPTG 添加後一旦ゼロレベルまで発現は下がったが、その後同じ位相で生物発光が低振幅ながら回復する事がわかった。この様に、液体培地中と寒天培地上の生育に差が見られた。また、ClpX、ClpP2 破壊株は生育速度に変化は無かったが、ClpP1 破壊株は液体培地でも寒天培地上でも生育が悪くなった。

(3) プロテアーゼ変異体における KaiC 蛋白質蓄積量の変化の解析

野生型で最も KaiC の多い連続明 16 時間と、最も少ない連続明 4 時間について、プロテアーゼ破壊株の KaiABC 蓄積量をウエスタン解析により確認したが、顕著に蛋白質量が変わるプロテアーゼは得られなかった。分解速度が変化しているにも関わらず、KaiC の転写翻訳を介したネガティブフィードバック制御により、蓄積量が調整されている可能性もあり、今後 KaiC の分解速度や mRNA 量への影響を調べる必要がある。

ATP 依存性プロテアーゼ Clp 群では、*kaiBC* プロモーター活性リズムへの影響が見られたため、過剰発現株についても、KaiC 蛋白質蓄積量への影響を確認した。連続明 4 時間と連続明 16 時間からそれぞれ 100 μ M IPTG を添加し、0、0.5、1、3、6、12、24 時間後のプロテアーゼ量 (α -FLAG 抗体) と KaiC 量 (α -KaiC 抗体) をウエスタン解析で確認した。ClpP3、ClpR、ClpR-ClpP3、ClpX は、IPTG 添加後 1~3 時間後にはプロテアーゼ量が上昇した。しかし、KaiC 量の顕著な減少は確認できなかった。ClpP1、ClpP2、ClpP2-ClpX の過剰発現株は、プロテアーゼの発現量が少なかった。連続明 4 時間から IPTG を添加した ClpP1 過剰発現株について、KaiC が減少する傾向が見られた。しかし、連続明 16 時間目ではその傾向が見られなかった。それ以外の Clp 群過剰発現株についても KaiC 量の顕著な減少は確認できなかった。これらのプロテアーゼ過剰発現株の KaiC のリン酸化パターンは概日振動するが、IPTG 添加後非リン酸化型

KaiC 量が減少する傾向が見られた。今後、これらのプロテアーゼ変異体の KaiC の分解への関与をより詳細に解析する必要がある。

(4) 分解活性の簡便な測定方法の開発

*in vitro*系を利用した分解活性を測定した。野生型のシアノバクテリアにおいて連続明4時間の細胞抽出液では分解活性が低く、連続明16時間では高いという傾向を示し、既に明らかになっている *in vivo*での分解速度測定の結果を再現できることがわかった。この方法が確立出来たことにより、今後予定している、上記のプロテアーゼ変異体を含む様々な変異体を用いた KaiC 分解活性の比較解析が簡便に行えるようになった。さらに、様々な概日時間や生育条件（温度変化や連続暗条件下など）での細胞抽出液を用いる事や、*in vitro*-KaiC-FLAG のリン酸化状態を変化させ、その分解速度への影響を確認するなど、様々な応用し研究を進めることで、KaiC の分解経路の解明が期待できる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1 今井圭子、北山陽子、近藤孝男・Effect on circadian rhythm of protease mutants in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Effect on circadian rhythm of protease mutants in *Synechococcus elongatus* PCC 7942・BMB 2008 (第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会) 2008年12月9~12日 神戸

2 今井圭子、村山依子、近藤孝男・シアノバクテリアの時計遺伝子 *kaiC* の多数の周期長変異体の表現型解析・第14回日本時間生物学会学術大会・日本睡眠学会第32回定期学術集会合同大会・2007年11月7~9日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 圭子(今井 圭子)(OKANO-IMAI KEIKO)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号 90454610

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

研究協力者

北山 陽子 (KITAYAMA YHOKO)
名古屋大学大学院・理学研究科・助教

近藤 孝男 (KONDO TAKAO)
名古屋大学大学院・理学研究科・教授