

機関番号：34315

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570035

研究課題名（和文）シアノバクテリア概日時計再構成系を用いたアショフ法則の分子基盤解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of cyanobacterial circadian clock using the reconstituted in-vitro oscillator.

研究代表者

寺内 一姫（TERAUCHI KAZUKI）

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70444370

研究成果の概要（和文）：

シアノバクテリアの時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC を用いて試験管内で概日時計の再構成が可能である。本研究では、光強度による概日時計の周期長変動のメカニズムを明らかとするため、光環境に応じて細胞内で変化が起きると考えられる要因の概日時計再構成系への影響を調べると共に、シアノバクテリアの酸化還元状態のセンサーと推定される LdpA を生化学的に解析した。LdpA は酸化還元状態変化により、分子の構造を変化することが明らかとなった。また、pH により KaiABC による概日時計再構成系の周期長が変動することから、LdpA と細胞内 pH の 2 つの要因が光による概日時計の周期長変動に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The circadian clock can be reconstituted in vitro by the KaiA, KaiB, and KaiC proteins in the presence of ATP. In this study, LdpA presumed to be a redox sensor in cyanobacteria was analyzed biochemically. The structure of the molecule was changed by a redox state. Moreover, it was found that pH of the KaiABC reconstitution system have an effect on the length of the cycle. The two factors, pH in the cell and LdpA, could get involved in the change of the period length the cycle by light.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：植物生理学

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：シアノバクテリア 生物時計

## 1. 研究開始当初の背景

概日時計は、バクテリアから植物、ヒトにいたるすべての生物においてみられる生命システムであり、地球上の最も日常的な変化である昼夜の変化に適応するために、生物が進化の過程で獲得した分子機構である。光は、概日時計に様々な作用をもたらす最も重要な環境因子である。その中でも、光が概日リズムの周期長を変化させる作用をもつこと

が古くから観察されていた。昼行性動物では、周期長が恒暗より恒明で短く、恒明条件の光強度が高くなるほど周期長は短くなる。高等植物や藻類、そしてシアノバクテリアにおいても、恒明条件下においては光強度が高いほど概日時計の周期は短くなる。調べられたほぼすべての生物の概日リズムでこのような効果が認められることから、この現象は発見者（Aschoff）の名にちなんで「アショフの

法則」とよばれる。この法則の分子基盤については未だ全く不明であり、生物時計研究分野における大きな課題として残されている。最近、シアノバクテリアの3つのタンパク質 KaiA、KaiB、KaiC と ATP による概日時計再構成系が構築され、時間を計測するというメカニズムがタンパク質に組み込まれていることが明らかになった。我々は、この再構成系の解析を進め、KaiC の ATPase 活性と概日時計の振動数（周波数）は正比例する、すなわち KaiC がもつ ATPase 活性が概日時計の速度を決定することを見出した。この結果は、概日時計の 24 時間の周期長が ATPase 活性という生化学的なプロセスによって決定されていることを示す画期的な発見である。この再構成系を活用することで、KaiC の ATPase 活性という観点から「アショフの法則」の分子メカニズムに迫ることが可能ではないか、という着想を得た。

## 2. 研究の目的

光合成生物であるシアノバクテリアにとって光は単に昼夜の手がかりとなる環境因子のみならず、生育のためのエネルギー源でもある。光環境の変化に応答して細胞の代謝活性が調節され、生育速度や色素含量などに反映される。シアノバクテリアの概日リズムの周期長に影響を及ぼす因子として LdpA と呼ばれる鉄硫黄クラスターをもつタンパク質が知られ、LdpA が細胞内の酸化還元状態を鉄硫黄クラスターによって感知することで、概日リズムの周期長に影響をもたらすと推察されている。また、LdpA が KaiC と細胞内で相互作用することが示唆されている。この推察を、我々が提唱するモデルから説明すると、光は細胞内の酸化還元状態を変化させ、その変化が何らかの LdpA を介した機構により KaiC の ATPase 活性を修飾し、その結果概日リズムの周期長の変動をもたらしている可能性がある。「アショフの法則」によると、概日リズムの周期は光強度が高いと短くなる。したがって、光強度が強いほど、KaiC の ATPase 活性は高くなることが予測される。本研究では、シアノバクテリアの KaiC の ATPase 活性に着目し、「アショフの法則」を検証し、さらにその分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 再構成系における概日時計周期長および KaiC の ATPase 活性に影響をもたらす要因の探索

光強度変化によりシアノバクテリアの細胞内で変動すると推定される要因のうち、KaiC の ATPase 活性に影響を及ぼす可能性のある要因に着目する。KaiC を用いた概日時計

再構成系の反応溶液は、KaiA、KaiB、KaiC、ATP、 $Mg^{2+}$ 、Tris-HCl (pH 8.0) で構成されている。この中で、光環境に応じて細胞内で変化がおこると考えられるものは、Kai タンパク質の量比、pH、ATP 濃度、 $Mg^{2+}$  濃度である。すでに3つの Kai タンパク質の混合モル比のわずかな差が周期長に変動をもたらすことが報告されている。そこで、これらの条件を変動させた際の概日時計周期長を測定する。

(2) 細胞の酸化還元センサー候補 LdpA と新規光強度認識タンパク質が再構成系に与える影響

光は、シアノバクテリアのチラコイド膜の電子伝達系を駆動し、細胞内の酸化還元状態を変化させる。この酸化還元状態の変化は、何らかの分子機構で感知されていると推察される。LdpA と呼ばれる鉄硫黄クラスターをもつタンパク質は、その欠損変異株では光による周期長変化が認められなくなることから、概日時計に対する酸化還元状態のセンサーの一つであると提唱されており、KaiC の ATPase 活性に影響を与えるタンパク質の有力な候補である。LdpA タンパク質の酸化還元状態が KaiC の ATPase 活性および周期長の変動をもたらす可能性を *in vitro* 再構成系で検討する。すなわち、LdpA を大腸菌で大量発現させて精製し、ジチオナイトなどの還元剤、フェリシアン化カリウムなどの酸化剤などであらかじめ処理し、Kai タンパク質への影響を観察する。

## 4. 研究成果

(1) 再構成系における概日時計周期長および KaiC の ATPase 活性に影響をもたらす要因の探索

光環境に応じてシアノバクテリアの細胞内で変化がおこると考えられるものは、Kai タンパク質の量比、pH、ATP 濃度、 $Mg^{2+}$  濃度である。3つの Kai タンパク質の混合モル比のわずかな差が周期長に変動をもたらすことはすでに報告されている。pH、ATP 濃度、 $Mg^{2+}$  濃度の条件を変化させ、シアノバクテリア生物時計再構成系において周期長を求めた。その結果、pH、ATP 濃度、 $Mg^{2+}$  濃度どれもが概日時計に影響を及ぼすが、周期長に最も顕著な影響があるのは、緩衝液の pH の違いであることを見出した。光強度による細胞内 pH の変動が概日時計の周期長に関連している可能性が示唆された。

(2) 細胞の酸化還元センサー候補 LdpA と新規光強度認識タンパク質が再構成系に与える影響

LdpA を大腸菌で大量発現させて安定的に精製することを試みた。当初精製できた LdpA タンパク質は精製度が低く、その後の解析に不適であると判断し、精製方法を改良した。その結果、精製度の高い LdpA タンパク質を得ることができた。LdpA は、420nm 付近に吸収ピークをもち、そのピークは還元状態において消失した。これは、LdpA タンパク質が鉄硫黄クラスターを持ち、細胞内の酸化還元状態を感知している可能性を示している。

また、このタンパク質をシアノバクテリア生物時計再構成に加えて、KaiC のリン酸化状態の変化をモニターした。検討した条件下においては、KaiC のリン酸化状態の変化に顕著な変化は認められず、酸化還元状態を変化させた条件下において、LdpA をシアノバクテリア生物時計再構成に供する必要があると考えられた。

さらに、LdpA タンパク質の多量体形成についてブルーネイティブ電気泳動法を用いて検討した。その結果、LdpA は 2 量体を形成していると考えられ、また酸化還元状態によってその分子量サイズに変動が見られた。このことから、LdpA は酸化還元状態によって構造変化していることが示唆された。LdpA タンパク質が鉄硫黄クラスターを持ち、細胞内の酸化還元状態を感知している可能性が見出されたが、この結果と考え合わせると、LdpA が酸化還元センサーであるという推察を指示する結果が得られたと考えられる。

一方、シアノバクテリアの LdpA 欠損株においては、先行研究において光に応答した周期長変化が消失するという形質が明らかになっていた。本研究では LdpA 欠損株が好気条件下では生育するが、低酸素条件下では生育に著しい阻害が生じることが見出された。現時点では、この形質がどのように概日時計の制御と関わっているのかについては不明な点が多いが、今後さらに低酸素条件下での概日時計の挙動等を調べることにより時計の周期長変化と酸化還元状態において新たな進展が明らかになると考えられる。

#### 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 3 件)

1. 著者名：Y. Murayama A. Mukaiyama, K. Imai, Y. Onoue, A. Tsunoda, A. Nohara, T. Ishida, Y. Maéda, K. Terauchi, T. Kondo, S. Akiyama, 論文標題：Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution、雑誌名：The EMBO Journal、査読：有、発表年：2011 年、30, 68 – 78

2. Ito H, Mutsuda M, Murayama Y, Tomita J, Hosokawa N, Terauchi, K., Sugita C, Sugita M, Kondo T, Iwasaki H. (2009) Cyanobacterial daily life with Kai-based circadian and diurnal genome-wide transcriptional control in *Synechococcus elongatus*. Proc Natl Acad Sci USA. 106:14168-14173 査読：有
3. Y. Kitayama, T. Nishiwaki, K. Terauchi, and T. Kondo (2008) Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of cyanobacteria Genes Dev. 22: 1513-1521. 査読：有

[学会発表](計 22 件)

1. 発表者名：村山依子他、発表標題：シアノバクテリアの時計タンパク質 KaiC の構造からみた概日時計、学会等名：第 52 回日本植物生理学会年会、発表年月日：2011 年 3 月 11 日、発表場所：講演要旨による発表
2. 発表者名：高井直樹他、発表標題：シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 の時計蛋白質 KaiC の ATPase 活性による時間の規定、学会等名：第 52 回日本植物生理学会年会、発表年月日：2011 年 3 月 11 日、発表場所：講演要旨による発表
3. 発表者名：寺内一姫、発表標題：シアノバクテリアの窒素固定と生物時計、学会等名：第 3 回微細藻類生産性研究会、発表年月日：2011 年 3 月 8 日、発表場所：名古屋大学農学部（愛知県）
4. 発表者名：秋山修志他、発表標題：シアノバクテリア時計タンパク質 KaiC の分子鼓動の可視化、学会等名：第 24 回日本放射光学会、発表年月日：2011 年 1 月 7 日、発表場所：つくば国際会議場（茨城県）
5. 発表者名：秋山修志他、発表標題：ATPase- and phospho-dependent structural changes of circadian clock protein KaiC、学会等名：Pacifichem2010、発表年月日：2010 年 12 月 15-20 日、発表場所：Honolulu, Hawaii (USA)
6. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：生物時計は大腸菌で機能するか？生物時計移植の試み、学会等名：第 36 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム、発表年月日：2010 年 11 月 18 日、発表場所：大阪大学銀杏会館（大阪府）
7. 発表者名：秋山修志他、発表標題：Spectroscopic Studies on Circadian Ticking of KaiC in Solution、学会等名：第 48 回日本生物物理学会年会、発

- 表年月日：2010年9月20～22日、発表場所：東北大学（宮城県）
8. 発表者名：秋山修志他、発表標題：時計タンパク質 KaiC の ATPase やリン酸化に依存した構造変化、学会等名：第 37 回生体分子科学討論会、発表年月日：2010年6月18-19日、発表場所：山口大学（山口県）
  9. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：ATP/2e<sup>-</sup> ratio of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*、学会等名：Sixth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments、発表年月日：2010年6月12日、発表場所：エポック立命21（滋賀県）
  10. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：生物時計は大腸菌で機能するか？生物時計移植の試み、学会等名：第 36 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム、発表年月日：2010年11月18日、発表場所：大阪大学銀杏会館（大阪府）
  11. 発表者名：野亦次郎他、発表標題：ニトロゲナーゼ類似型プロトクロロフィリド還元酵素の化学量論的解析、学会等名：第 51 回日本植物生理学会年会、発表年月日：2010年3月21日、発表場所：熊本大学（熊本県）
  12. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：シアノバクテリアで解き明かす体内時計のしくみ、学会等名：立命館大学大阪オフィス講座、発表年月日：2009年12月16日、発表場所：立命館大学アカデミア（大阪府）
  13. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：ATP hydrolysis in reaction of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase、学会等名：The 16th international congress on nitrogen fixation、発表年月日：2009年6月18日、発表場所：Big Sky (Montana, USA)
  14. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：シアノバクテリアの生物時計：試験管内で時を刻むタンパク質、学会等名：光生命科学研究会セミナー、発表年月日：2009年5月15日、発表場所：立命館大学（滋賀県）
  15. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：シアノバクテリア時計タンパク質の ATP 加水分解が生み出す概日時計発振メカニズム解析、学会等名：第 50 回日本植物生理学会年会、発表年月日：2009年3月22日、発表場所：名古屋大学（愛知県）
  16. 発表者名：北山陽子他、発表標題：変異型 Kai タンパク質を用いた概日時計機構の解析、学会等名：第 50 回日本植物生理学会年会、発表年月日：2009年3月22日、発表場所：名古屋大学（愛知県）
  17. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：時計タンパク質 KaiC における ATP 加水分解活性の温度補償性と構造変化、学会等名：第 34 回日本生体エネルギー研究会、発表年月日：2008年11月6-8日、発表場所：東京医科歯科大学（東京都）
  18. 発表者名：寺内一姫、発表標題：シアノバクテリアの一日：Kai 蛋白質が刻む 24 時間、学会等名：日本植物学会主催 平成 20 年度一般講演会、発表年月日：2008年10月18日、発表場所：東京大学（東京都）
  19. 発表者名：寺内一姫、発表標題：シアノバクテリアの 24 時間を刻む KaiC タンパク質、学会等名：埼玉大学分子生物学科セミナー、発表年月日：2008年9月11日、発表場所：埼玉大学（埼玉県）
  20. 発表者名：寺内一姫、発表標題：試験管内で時を刻む KaiC タンパク質：FoF1 勉強会、発表年月日：2008年8月15日、発表場所：学習院大学（東京都）
  21. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：The Cyanobacterial Clock Protein KaiC ticks in vitro、学会等名：T Microbiology Seminar, Indiana University、発表年月日：2008年7月25日、発表場所：Bloomington (IN, USA)
  22. 発表者名：寺内一姫他、発表標題：The ATPase activity of the cyanobacterial clock protein KaiC、学会等名：The 22nd symposium of The Protein Society、発表年月日：2008年7月19-23日、発表場所：San Diego (CA, USA)
- 〔図書〕(計1件)
1. 寺内一姫 (2009) シアノバクテリアで概日リズムを探る、「研究をささえるモデル生物」(吉川寛、堀寛編) 化学同人社, pp. 251-252. (査読有り) 2009.9.1 発刊 21
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)  
取得状況 (計0件)
- 〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.collabo.sk.ritsumeai.ac.jp/laboratory/seिताibunshi\\_network.htm](http://www.collabo.sk.ritsumeai.ac.jp/laboratory/seिताibunshi_network.htm)
6. 研究組織  
(1) 研究代表者

寺内 一姫 (TERAUCHI KAZUKI)  
立命館大学・生命科学部・准教授  
研究者番号：70444370

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
藤田 祐一 (FUJITA YUICHI)  
名古屋大学・生命農学研究科・准教授  
研究者番号：80222264