

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570037

研究課題名（和文）

試験管内再構成系を用いたシアノバクテリア概日時計の温度補償機構の解明

研究課題名（英文）

In vitro studies on the mechanism underlying temperature compensation of circadian period

研究代表者

大川 妙子（西脇妙子）(OHKAWA-NISHIWAKI TAEKO)

名古屋大学・理学研究科・特任講師

研究者番号：30432230

研究成果の概要（和文）：

シアノバクテリア概日時計蛋白質 KaiC のリン酸化リズムは、試験管内で KaiA、KaiB、KaiC を ATP と混合することにより再構成が可能である。このリズムの周期は温度によらずほぼ一定である「周期の温度補償性」という性質を示す。本研究では、KaiC は ATP の分解と生成を繰り返した結果としてリズムが生じることが明らかとなった。反応の平衡は、低温では ATP の分解に、高温では ATP の合成に傾くことが示唆された。この結果は、温度補償性の解明において、重要な手掛かりになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial clock protein KaiC can be reconstituted *in vitro* by mixing KaiC with KaiA and KaiB in the presence of ATP. The period of the rhythm is compensated for the changes in the ambient temperature. In this study, we clarified that the phosphorylation rhythm of KaiC results from repeating synthesis and degradation of ATP. The higher the temperature, the equilibrium was more favorable to ATP formation. These results can serve as important clues to elucidate the mechanism for temperature compensation of circadian period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生化学

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 概日時計 リン酸化 脱リン酸化 ATP

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは、原核生物から高等動植物まで観察される約 24 時間周期の生理活性のリズムである。概日リズムは昼夜の環境変化に適応するために生物が備えた機構であり、内因性の概日時計により駆動されている。概日リズムの特徴の1つとして、周期の温度補償性があげられる。概日リズムの周期は、外界の温度にかかわらず、ほぼ

一定である。この性質により、生物は季節を問わず正確にリズムを刻むことができる。

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 の概日時計は、試験管内で再構成が報告されている唯一の例である。概日時計蛋白質 KaiC を ATP 存在下でリン酸化促進因子である KaiA、KaiA 阻害因子である KaiB と混合し反応させることによって、約 24 時間周期の KaiC の

リン酸化リズムが観察される(Nakajima *et al.* 2005, *Science* 308, 414-415、図1)。このリズムは 25°Cから 35°Cの範囲内では

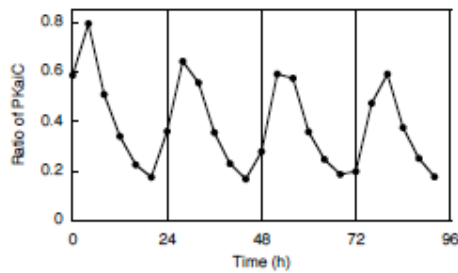


図1 KaiCのリン酸化リズム

とんど周期が変化せず、10°Cの温度上昇に対する周波数（周期の逆数）の比率 Q_{10} は約 1.1 である(Nakajima *et al.* 2005, *Science* 308, 414-415)。KaiC は自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性という2つの活性を持ち(Nishiwaki *et al.* 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 495-499; Xu *et al.* 2003, *EMBO J.* 22, 2117-2126)、KaiC のリン酸化状態はこれらの活性によって制御されている。したがって KaiC のリン酸化リズムの温度補償機構を明らかにするためには、これらの活性が温度に対して、どのような変化をするかを解明することが重要であると考えられる。

KaiC はダブルドメイン型の P-loop ATPase であり、N 末端側の CI と C 末端側の CII という2つの ATPase ドメインが直列に並んだ構造をとる(Iwasaki *et al.* 1999, *EMBO J.* 18, 1137-1145)。KaiC は ATP 存在下で CI 同士、CII 同士で会合し、6量体を形成する(Pattanayek *et al.* 2004, *Mol. Cell* 15, 375-388)。

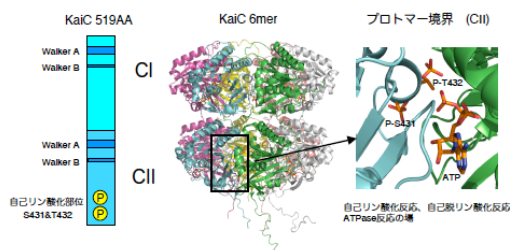


図2 KaiCの構造

CI、CII ともに ATPase 活性を示すが(Terauchi *et al.* 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16377-16381)、自己リン酸化、自己脱リン酸化活性は CII のみに存在する(Hayashi *et al.* 2006, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 864-872)。自己リン酸化部位は CII ドメインの S431 と T432 の2つであり(Nishiwaki *et al.* 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13927-13932)、これらは、CII のサブユニット境界部位で隣接するサブユニット上の ATP と向かい合う形で存在する(Xu *et al.* 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101,

13933-13938)。自己リン酸化反応の活性部位は、このサブユニット境界部位である(図2)。

P-loop NTPase superfamily にはヌクレオチドの加水分解に関わる NTPase に加え、様々なキナーゼも存在することが知られている(Leipe *et al.* 2003, *J. Mol. Biol.* 333, 781-815)。一方 KaiC は蛋白質の脱リン酸化に関わるプロテインホスファターゼとは全く相同性が見出されない(Shi 2009, *Cell* 139, 468-484; Taberero *et al.* 2008, *FEBS J.* 275, 867-882)。KaiC がプロテインホスファターゼと同様の機構によって、自己脱リン酸化を行っているのかはこれまで不明であったが、この点に着目した研究は全くといっていいほど行われてこなかった。

2. 研究の目的

本研究は、KaiC のリン酸化状態を制御する、自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性が、温度に対してどのように変化するかを明らかにし、これを手掛かりとして KaiC リン酸化リズムの周期の温度補償機構を解明することを目指す。そのためにはまず、これまで不明であった KaiC の自己脱リン酸化機構を明らかにすることが必要である。

3. 研究の方法

① KaiC の自己脱リン酸化反応の観測

KaiC を放射性の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて自己リン酸化し、得られた $^{32}\text{P}\text{-KaiC}$ を用いて 30°C で自己脱リン酸化反応を開始させる。経時的に試料を採取し、薄層クロマトグラフィーにより $^{32}\text{P}\text{-KaiC}$ 由来の放射活性の時間変化を測定する。得られた結果について速度論的解析を行い、自己脱リン酸化反応機構を解明する。また $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて脱リン酸化反応時の KaiC のヌクレオチド結合状態を観察する。経時的に試料を採取し、遊離の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を脱塩カラムによって除去した後、KaiC 結合ヌクレオチドを薄層クロマトグラフィーにより検出する。

② 自己リン酸化、自己脱リン酸化反応に対する温度の影響

様々な温度において、自己リン酸化、自己脱リン酸化活性を測定し、温度変化に対する応答を観察する。

4. 研究成果

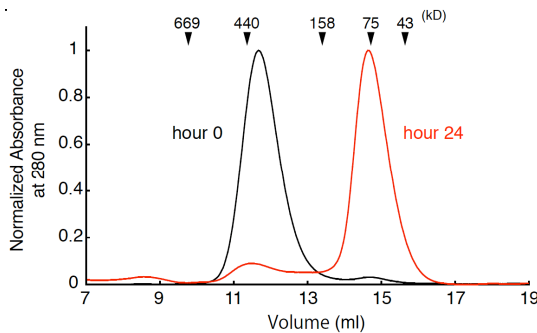
① 自己脱リン酸化活性測定法の確立

KaiC には自己脱リン酸化活性に加えて、自己リン酸化活性、ATPase 活性を併せ持つため、KaiC の自己脱リン酸化反応を測定するためには、反応系内に存在する $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を除去し、 $^{32}\text{P}\text{-KaiC}$ 由来の ^{32}P 標識分子種のみを検出することが必要である。本研究に

においては、脱塩カラムによる遊離の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の除去に加えて、KaiC 6量体を単量体化することによって、サブユニット境界部位に結合している $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を除く方法を確立した。

近縁の好熱性 *Thermosynechococcus* KaiC においては、ATP を除去することで KaiC 6量体が単量体化することが報告されている (Hayashi *et al.* 2003, *Genes Cells* 8, 287-296)。そこで、*Synechococcus* KaiC 溶液から遊離の ATP を脱塩カラムによって除去した後、単量体化の過程を観察した。ATP 非存在下では、約 10°C 以上で *Synechococcus* KaiC は凝集してしまうため、氷上でインキュベートした。約 24 時間後には、90% 以上の 6 量体が単量体化することが確認できた (図 3)。この時、0.1 mM の ADP を共存させることで、KaiC 単量体を安定化できることも明らかとなった。また、この操作によりサブユニット境界の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ が除去されていることも確認できた。

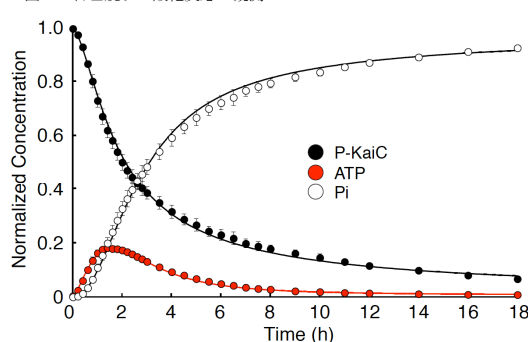
図 3 KaiC 単量体の調製



② KaiC の自己脱リン酸化機構の解明

上記の方法によって得られた ^{32}P -KaiC 単量体を非放射性 ATP 存在下で再 6 量体化し、自己脱リン酸化反応を開始した。その結果驚くべきことに、脱リン酸化の最終産物である ^{32}P リン酸の生成に先だって ^{32}P -ATP の一過的な増加減少が観察された。速度論的解析と併せてこの結果は、ATP が自己脱リン酸化反応の中間体であることを示す (図 4)。

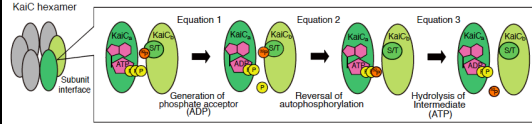
図 4 自己脱リン酸化反応の観測



KaiC の脱リン酸化反応は以下のような機構で起こる。KaiC の S431/T432 残基上のリン

酸基は、まず KaiC 結合 ADP に転移され、中間体として ATP を生成する。この反応は自己リン酸化の逆反応である。次に KaiC の ATPase 活性によって、ATP は加水分解され、最終産物であるリン酸が生成する。この反応機構は、リン酸化アミノ酸の加水分解による一般的な蛋白質の脱リン酸化反応とは異なる新規の機構である (図 5)。

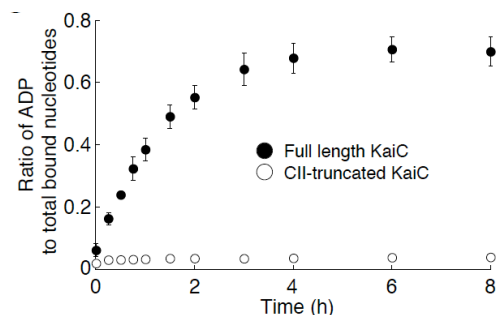
図 5 KaiC の脱リン酸化反応機構



③ 自己リン酸化逆反応のリン酸基受容体 ADP の結合

自己リン酸化の逆反応は、ADP を要求するが、KaiC に実際 ADP が結合しているか否かについてはこれまで全く報告がなかった。そこで、KaiC 単量体を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で再 6 量体化し、30°C でヌクレオチド結合状態の経時変化を追った。KaiC には 6 量体あたり 12 個のヌクレオチドが結合しており、反応前にはその約 90% が ATP であったが、徐々に ADP の割合が増加し、約 4 時間で約 70% を ADP が占めるようになったことから、KaiC には実際に ADP が結合していることが確認できた (図 6)。反応系には ADP を加えていないことから、この ADP は ATP の加水分解産物と考えられる (図 5)。

図 6 ヌクレオチド結合状態の経時変化



④ 自己リン酸化、自己脱リン酸化に対する温度の影響

本研究の結果より、リン酸化リズムは、自己リン酸化の正反応 (ATP からリン酸化アミノ酸と ADP を生成する反応) と逆反応 (リン酸化アミノ酸と ADP から ATP を生成する反応) が繰り返し起こった結果発振しているものと考えられる。またこの反応の制御には、KaiC 結合ヌクレオチドが重要な役割を果たしていることが推測される。

30°C においては、KaiC を単独で ATP と反応させると自己リン酸化の逆反応が進行するが、0°C で同様に反応を観察したところ、30°C とは異なり正反応が進行した。また上記③で示したように、30°C では反応開始後 4 時間で全結合ヌクレオチドに対する ADP

の割合が 70%に達したのに対し、0°Cでは反応開始後 24 時間後においても ATP が 70%を占めていた。今後は温度による KaiC 結合ヌクレオチド制御と自己リン酸化反応の平衡の制御との関連についてさらに詳細に調査し、これを手掛かりに概日リズムの温度補償機構の全貌を解明したい。

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 1 件)

Taeko Nishiwaki and Takao Kondo, Circadian autodephosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC occurs via formation of ATP as intermediate (2012) The Journal of Biological Chemistry 287, 18030-18035 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 大川 (西脇) 妙子、近藤孝男、ATP を中間体とする概日時計蛋白質 KaiC の新規脱リン酸化機構とその意義、第 76 回日本生化学会中部支部例会、24 年 5 月 26 日、自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター
- ② Taeko Nishiwaki-Ohkawa, Yuuki Shibata, Hidetaka Tsukamoto, Yohko Kitayama and Takao Kondo, Characterization of nucleotide binding and enzymatic activities of CI and CII domains of KaiC, International symposium "Designing the circadian clock", 23 年 11 月 25 日~26 日、名古屋大学
- ③ 大川妙子、柴田有紀、塚本英貴、北山陽子、近藤孝男、概日時計蛋白質 KaiC の CI、CII ドメインに関する生化学的解析、第 18 回日本時間生物学会学術大会、23 年 11 月 24 日~25 日、名古屋大学
- ④ 大川 (西脇) 妙子、近藤孝男、シアノバクテリア概日時計蛋白質 KaiC の活性スイッチング機構、第 17 回日本時間生物学会学術大会、22 年 11 月 21 日、早稲田大学国際会議場
- ⑤ 大川 (西脇) 妙子、近藤孝男、シアノバクテリア概日時計蛋白質 KaiC の自己脱リン酸化反応の解析、第 51 回 日本植物生理学会年会、22 年 3 月 18 日~19 日、大阪国際会議場
- ⑥ 村山依子、大川 (西脇) 妙子、秋山修司、近藤孝男、シアノバクテリア概日時計蛋白質 KaiC の ATPase 活性により周期決定機構と温度補償機構の解析、第 16 回 日本時間生物学会学術大会、21 年 10 月 27 日、大阪国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大川 妙子 (西脇 妙子)

(OHKAWA-NISHIWAKI TAEKO)

名古屋大学・大学院理学研究科・特任講師

研究者番号：30432230

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし