

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手 B（基金）

研究期間：2011～2013

課題番号：23770039

研究課題名（和文） 時を測る蛋白質 KaiC に備わった分子内フィードバックの解明

研究課題名（英文） The elucidation of ATPase-mediated intramolecular feedback in KaiC

研究代表者 高井 直樹 (TAKAI NAOKI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教

研究者番号：80580018

研究成果の概要（和文）：

シアノバクテリアの概日時計は KaiA, KaiB, KaiC を用いて試験管内で再構成できる。中でも KaiC の ATPase 活性は概日リズムの周期を規定しており、温度補償されている。本研究では KaiC の ATPase 活性が広い温度レンジの下でも安定的にリズムを生み出すメカニズムを明らかにするため、温度ジャンプ時の ATPase 活性の挙動を調べると共に、概日リズム異常型の KaiC 蛋白質を精製し、野生型 KaiC 蛋白質との挙動の差異を生化学的に解析した。その結果、温度ジャンプ時の ATPase 活性は一過的に上昇するが、即座に抑制される過渡応答が見られた。また、温度補償異常型では過渡応答が見られなかったことから、KaiC は ATPase 活性を用いた分子内フィードバックにより、周期の温度補償性を獲得し、その機能には C2 ドメインが重要な働きを担うと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The circadian clock comprises three clock proteins named KaiA, KaiB, and KaiC. The ATPase activity of KaiC defines the period of circadian rhythms *in vivo* and *in vitro* and has an essential circadian characteristic of temperature compensation. In this study, we show how the ATPase activity of KaiC keeps the period of circadian rhythms constant across broad range temperature functions. When an ATPase reaction of KaiC are initiated by a temperature jump from on-ice to 45 °C, the ATPase activity is elevated instantaneously, and soon repressed by an intramolecular feedback in itself, but nevertheless the ATPase activity in KaiC mutant that lose the characteristic of temperature compensation of the period do not show this attenuation as KaiC-WT showed. We presumed that KaiC has an intramolecular feedback mechanism using ATPase activity of C2 domain in itself, which keeps the period of circadian rhythms constant across broad range temperature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時間生物学

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：KaiC, ATPase, 生物時計, シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアのような原核生物から我々哺乳類をはじめとした高等真核生物までほとんどの生き物には昼夜の環境変動に適応するために内因性の測時機構である概日時計

が備わっている。この概日時計は植物の葉の就眠運動や開花、動物の睡眠覚醒や季節性繁殖等、様々な生命現象を司っていることが知られている。これらの生命現象の存在は古くから知られており、様々な概日リズム異常変

異体が報告されてきた。その中で90年代初頭から分子生物学的手法が発展してきたことにより、様々な生物において概日リズムを刻むための必須遺伝子（時計遺伝子）がクローニングされた。

シアノバクテリアにおいても時計遺伝子 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* がクローニングされ、*kaiA* が *kaiC* の発現を促進し、*kaiC* の発現は自身の発現を抑制したことから、転写・翻訳のフィードバック制御こそが概日時計の本体であると長年考えられてきた。しかし、2005年になり、*KaiA*, *KaiB*, *KaiC* を ATP とともに混合するだけで *KaiC* のリン酸化リズムが試験管内で再構成できたことから、シアノバクテリアのリズム情報はこれら3つの蛋白質に内包されていることがわかってきた (Nakajima et al., 2005)。再構成系の解析はさらに進められ、驚くべきことに *KaiC* の ATPase 活性と概日リズムの振動数（周期の逆数、即ち時計の速さ）は正比例し、その ATPase 活性は温度を 10°C 変えてもほとんど変わらず、概日時計の最大の特性である周期の温度補償性を保有していることがわかってきた (Terauchi et al., 2007)。この事実は *KaiC* が時の長さ（周期）を測りつついることを示している。よって、私はたったひとつの蛋白質 *KaiC* の中にこそ全ての時間情報が内包されているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では *KaiC* のまだ明らかになっていない分子に内包した時間決定機構、そして概日リズムの最も重要な性質である温度補償性のメカニズムを明らかにする。これまでに *KaiC* の様々な長さの周期変異体が同定されているが、ほとんどの変異体の ATPase 活性は温度を 10°C 変えても低いものは低く、高いものは高い状態で温度補償されている。この現象を説明するには、*KaiC* の中に何らかの強い復元力（バネ）が存在すると考えるとわかりやすい。*KaiC* は温度に非依存なのではなく、温度に応じてその ATPase 活性は増加するが、そこで生まれたエネルギーは自身のバネの強さに応じて ATPase 活性を抑制し、温度が変わっても、一定の緊張状態で平衡を保っているのだろう。このような仕組みをフィードバック制御と呼び、ATPase 活性の高い *KaiC* は強く、低いものは弱い復元力を持つことで一日の活性を平衡状態に保っているのかもしれない。復元力とは何だろうか？一つの可能性として、加水分解によって生じたエネルギーを使う事によって *KaiC* の 6 量体が構造変化する可能性が考えられる。この ATPase 活性に応じた動的な構造変化の分析は近藤グループの他の研究者が着々と進めている。よって、私はこれまでに報告された様々な周期や温度補償の変異型 *KaiC* 蛋白質を精製し、温度のような外乱を

受けても、*KaiC* の中には一定の ATPase 活性を保つための復元力が存在し、*KaiC* が *RecA* をはじめとした他の一般的な ATPase には無い、温度補償および周期の決定を分子内のフィードバック制御により行っていることを明らかにする。

3. 研究の方法

1) *KaiC* に温度刺激を与えた時の短時間での ATPase 活性の反応速度の解明

予備的な研究として *KaiC* 蛋白質を氷温から温度ジャンプさせた時の ATPase 活性の変動を調べた。その結果、氷上から 45°C に *KaiC* を移した最初の1時間の活性を調べた場合、45°C での活性は 30°C の活性の2倍まで上昇することがわかった。45°C で ATPase 活性が倍になるのならば、*KaiC* のリン酸化リズムの周期は半分にならなければいけない。しかし、45°C にしても *KaiC* のリン酸化・脱リン酸化リズムの周期はほとんど変わらないことが報告されている (Yoshida et al., 2008)。よって、申請者は温度を低温から高温に温度ジャンプした時の ATPase 活性の経時変化を調べた。その結果、4°C から各々の反応温度に移すと温度依存的に定常状態の約2倍程度まで ATPase 活性が上昇し、その後、定常状態 (10 ATP/day/*KaiC*) まで下がった。この結果は *KaiC* の ATPase 活性は温度補償されているが、温度を上げた瞬間の活性は温度依存し、非常に速い速度でフィードバック制御を受ける事を示している。そこで私は従来より時間分解能の高い手法を用いて、*KaiC* の ATPase 活性の温度に対するより詳細な反応速度を調べる。

2) 周期の温度補償性に異常を示す変異体の温度に対する ATPase 活性の反応速度の解明

これまでに、周期の温度補償性に異常を示す *KaiC* 変異体がいくつか報告されている。これらは温度が 10°C 上昇すると ATPase 活性が2倍強に増加し、一般的な酵素反応と同様の挙動を示す。これらの変異体を用いて温度を変化させたときに ATPase 活性がどのような挙動を示すか調べる。さらに、温度補償変異型は野生型と比べても 30°C での ATPase 活性が高いので、RI を用いた手法と同時に HPLC を用いて ATPase 活性をモニターし、野生型のデータや温度補償性を持たない ATPase (*RecA*) のデータと比較する事によって、温度補償の要因が *KaiC* に内在するフィードバック制御であることを示す。

3) 周期異常変異体の温度に対する ATPase 活性の反応速度の解明

次に、周期長の異なるKaiC蛋白質に内包された分子内フィードバックの強さを確かめるために、様々なKaiC周期異常変異体の温度に対するATPase活性の変化を測定し、KaiCが内包する時間成分がフィードバック制御により生まれることを示す。短周期型（ATPase活性が高い）変異体ではより強く、長周期型（ATPase活性が低い）変異体ではより弱く復元力が働き、ATPase活性を瞬間的に高めてから定常状態へと戻る速度に差が現れることが予想される。

4) KaiCを構成するC1およびC2の寄与

KaiCは相同性の高い二つのドメインから構成されている。これらはどちらにもATPの結合サイトが存在するが、リン酸化サイトはC2ドメインに存在する。さらに、C1ドメインのみのATPase活性を測定すると、全長の活性の80%程度の活性を示したことから、KaiCのATPase活性のほとんどはC1が担っているものと考えられる。そこでこれらの変異体を作成し、各々のドメインがどのように寄与してKaiCのATPase活性が一定に保たれているのかを解明する。

4. 研究成果

1) KaiCに温度刺激を与えた時の短時間でのATPase活性の反応速度の解明

RIの自然分解で生じる遊離のリン酸基を除去することにより、分単位でのATPase活性の変化をモニターすることを可能にした。氷温から高温にKaiCを温度ジャンプさせると、温度変化直後はその温度に比例して活性が上昇するが、温度に関わらず一定の速度を保って野生型独自のATPase活性

(10ATP/day/KaiC)まで抑制された。このことは外乱に応じてATPase活性が上昇してもそこで生まれたエネルギーが自身のATPase活性に対して抑制的に負のフィードバックが働いていることを示している。また、ATPase活性に対して負のフィードバックが働くことから、KaiC自身が単独でも概日リズムを刻める可能性を示唆している。

2) 周期の温度補償性に異常を示す変異体の温度に対するATPase活性の反応速度の解明

周期の温度補償性の異常型KaiC蛋白質を精製し、ATPase活性を測定したところ、その活性は野生型とは全く異なるものであった。まず、野生型では温度補償性が働くので反応温度を10°C変化させてもATPase活性も周期もほとんど変化しない。しかし、この温度補償変異型蛋白質は温度に依存してATPase活性が増大し、その活性は振動数に対

して正比例することがわかった。さらに、温度ジャンプ時のATPase活性の変動をモニターすると、野生型で見られたフィードバック制御がほとんど失われているように見られた。温度補償性を持たないRecAについても調べてみると同様にフィードバック制御は見られなかった。このことは温度補償性の維持にフィードバック制御が必須なことを示唆している。

3) 周期異常変異体の温度に対するATPase活性の反応速度の解明

短周期から長周期型のKaiC変異体を精製し、温度ジャンプ実験を行った。それら各々の定常状態の活性までの緩和速度を調べると、当初の予想通り、変異型固有の周期に応じて活性の高い（短周期型）ものは速く、低い（長周期型）ものは遅く、緩和速度が変化し、周期と緩和速度に一定の相関が見られた。このことはフィードバック制御のかかる速度のずれが発振周期の長さを規定している可能性を示唆している。

4) KaiCを構成するC1およびC2の寄与

KaiCのATP結合サイトの変異体やC1を精製した。C2の精製も試みたが、6量体を構築できないため、KaiCとしての解析に不都合だと判断し、解析から除外した。これらの活性の温度補償性を調べてみると、C1蛋白質は全長に比べて温度補償性に欠陥が生じるのにも関わらず、C1のATP結合部位の欠損変異体では全長に比べて活性は下がるものの、温度補償性はほとんど維持されていた。このことは温度補償性の維持にC2のATPase活性が重要なことを示唆している。また、温度ジャンプ実験を行ったところ、温度補償性に欠陥のあるC1蛋白質はほとんどフィードバック制御が失われていた。以上の結果はATPase活性のジェネレーターとしてはC1がほぼ全てを担うが、その活性の制御装置としてC2が働き、フィードバック制御が維持されることにより、振動体としての機能をKaiCが獲得していることを示唆している。

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1件)

1. 著者名: M. Hanaoka, N. Takai, N. Hosokawa, M. Fujiwara, Y. Akimoto, N. Kobori, H. Iwasaki, T. Kondo, K. Tanaka、論文標題: RpaB, another response regulator operating circadian clock-dependent transcriptional regulation in *Synechococcus*

elongatus PCC 7942、雑誌名：Journal of Biological Chemistry、査読：有、発表年：2012年、287、26321-26327

[学会発表] (計 6 件)

1. 発表者名：高井直樹他、発表演題：時計蛋白質 KaiC の ATPase 活性を用いた分子内フィードバックの解明、学会等名：第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21-23日、発表場所：岡山大学（岡山県）
2. 発表者名：華岡光正他、発表演題：シアノバクテリアの概日時計機構を支える RpaA/B による協調的な転写制御、学会等名：第 35 回日本分子生物学会年会、2012年 12 月 11-14 日、発表場所：福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡県）
3. 発表者名：華岡光正他、発表演題：シアノバクテリアの概日時計出力系に関わる新規転写制御因子 RpaB の役割、学会等名：第 19 回日本時間生物学会学術大会、2012年 9 月 15-16 日、発表場所：北海道大学（北海道）
4. 発表者名：華岡光正他、発表演題：シアノバクテリアの概日時計応答に関わる新たな転写制御様式の発見、学会等名：第 3 回日本光合成学会年会、2012年 6 月 1-2 日、発表場所：東京工業大学（神奈川県）
5. 発表者名：伊藤久美子他、発表演題：シアノバクテリア時計蛋白質 KaiC の ATPase 活性と kinase 活性の分子内カップリング、学会等名：第 18 回日本時間生物学会学術大会、2011年 11 月 24-25 日、発表場所：名古屋大学（愛知県）
6. 発表者名：高井直樹他、発表演題：シアノバクテリアの時計蛋白質 KaiC の ATPase 活性を用いた周期の規定および温度補償性の獲得機構、学会等名：第 18 回日本時間生物学会学術大会、2011年 11 月 24-25 日、発表場所：名古屋大学（愛知県）

[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]

ホームページ等

<http://www-mls.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/mcbl/index2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井直樹 (TAKAI NAOKI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教

研究者番号：80580018

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし