

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01427

研究課題名(和文) KaiC概日時計の動作プログラム：2つのATPaseの協働の生理・生化学的解析

研究課題名(英文) Circadian program for KaiC circadian oscillator: physiological and biochemical approaches to coupling of two ATPases in KaiC

研究代表者

近藤 孝男 (Kondo, Takao)

名古屋大学・理学研究科・名誉教授

研究者番号：10124223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：地球に生息する生命は約24時間周期の概日時計を持ち昼夜の時刻を認識して生活している。時計遺伝子の発現制御が時間測定原理と考えられていたが、シアノバクテリアでは試験管内の3つのKaiタンパク質とエネルギー源であるATPだけで24時間測定が可能であることが明らかになっている。本研究はこの新たな時計機構仕組みを解明するために、中心であるKaiCタンパク質の機能を集中的に解析した。その結果、KaiCはごくわずかのATPを使いKaiC内にバネを構成し、機械式時計によく似たデザインで時計機構を実現していること予想された。本研究ではこの仮説を検証するためATP分解を詳しく解析しその可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は基礎研究であり、直接イノベーションに結びつくものではないが、これまでの概念をくつがえし、生物の細胞内の時間測定が人類が開発してきた振り子式機械式時計と同様の原理で行われてきたことを明らかにした。生命は人類のはるか以前にタンパク質内に振り子による時間測定とゼンマイによる駆動方法を組み込んだようである。これは生命の不思議がタンパク質で実現可能なことを示したもので、大きな驚きであるとともに生物学のあらたな展開を期待させるものである。

研究成果の概要(英文)：By endogenous circadian clock mechanisms, living organisms on Earth can measure 24 h of a day to enhance fitness on the day/night alternating environment. Gene expression of clock genes has been assumed as the time measuring process. However, three Kai proteins of cyanobacteria can precisely measure 24 h in the test tube. This study aimed to elucidate the time measuring mechanism in KaiC protein. We confirmed that KaiC generate a tension in KaiC structure by negative feedback of energy released from hydrolysis of very tiny portion of ATP. Our data on the ATPase activity of KaiC support our hypothesis that protein clock is designed in a similar fashion of mechanical clock.

研究分野：Chronobiology

キーワード：Circadian clock KaiC ATPase pacemaker harmonic oscillator

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

地球に生息する生命は 24 時間周期の昼夜環境に合わせ、巧みに一日の生活をプログラムしている。概日時計は細胞に備えられた生命の基本装置であり、大変正確で温度が変わっても周期はほとんど狂わない。生命活動が温度に大きく影響されることを考えるとこれはとても不思議で、生命がいかにして地球の自転周期を細胞内に記憶し、温度に依存しない 24 時間の振動を発生するかという問題は、多くの研究者を魅了し、2017 年にはノーベル賞がこの分野のパイオニアに贈られた。しかし 24 時間周期とその温度補償性を実現する仕組みは不明であった。

我々はシアノバクテリアの 3 つの時計遺伝子 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* を発見し、*kaiC* の発現が高等生物で提唱されていた遺伝子発現を基にした時計モデルと同様なものであることを示した。しかし、このモデルでは安定した 24 時間の周期を説明することは困難で、この謎に迫るため主役だと思われた KaiC タンパク質の機能の解明を目指した。その結果、2005 年に 3 つの Kai タンパク質と ATP を試験管内で混ぜるだけで温度に影響されない 24 時間リズムが発生することを発見し、概日時計を試験管内で再構成することに成功した (Science, 2005)。驚いたことに、このタンパク質のリズムは大変安定で周期も温度補償され、細胞や個体の概日時計と同様な性質を持つことが明らかになった。生きた細胞の機能だと思われていた概日時計の研究にとって、この発見はコペルニクスの転回であり、高等生物の時計研究にも非常に大きなインパクトを与えた。また、この成果は「時を刻む」というタンパク質の全く新しい機能を発見したもので、物理や化学分野の研究者にも注目されている。

## 2. 研究の目的

Kai タンパク質はどのようにして 24 時間をきざむのか？主役の KaiC は二つの ATP 分解酵素 (ATPase) から構成されている。そこで私たちは KaiC の活性を測定してみたが、その結果にもう一度驚かされることになった (PNAS, 2007)。まず活性は極めて低く、一日に 10-15 個程度の ATP を分解するだけである。この活性はほとんどゼロレベルで失活した酵素のようだが、よく調べるとこの活性は温度の影響を受けず極めて安定であった。さらに周期の変化した突然変異体の KaiC で調べると、この活性は概日時計の速さに比例していた。これは ATPase の活性が概日時計の特性 (周期とその安定性) を決めていることを意味する。さらに重要なことはこの性質はリズムを発生していない KaiC でも見られることである。これは、KaiC はリズムを起こして時間を計っているのではなく、KaiC タンパク質内部に温度に影響されない定数として 24 時間の長さを記憶していることを示している。

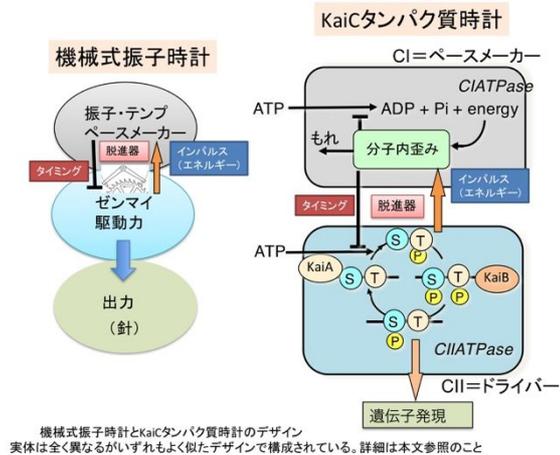
KaiC の ATPase はどのようにしてこれを実現しているのか？生命活動は通常化学反応の組合せで構成されているが、KaiC の周期の温度補償性や一日に 10 個程度という KaiC の低いエネルギー消費量を理解するには、全く異なったメカニズムが必要なようだ。我々は、物理的な調和振動を想定すればいずれも容易に説明できるのではないかと考え、概日時計に関する膨大な生理学的観察と KaiC に備わる 2 つの ATPase (CI と CII) の機能解析から、KaiC 内部に振り子機構 (調和振動機構) が生成され、あたかも振り子時計のような計時機構を構成する以下のような作業モデルを構築した。

(1) CI-ATPase は ATP 加水分解のエネルギーで、KaiC の立体構造に歪みを生成し、その歪みで自身の ATPase 活性を抑制し、温度補償性を実現する。これが実現すれば KaiC 内部構造にバネのような仕組みが維持されるので、機械式時計のテンプのように周期が温度や振幅に依存しない物理的な調和振動のペースメーカーとして機能することが可能であろう。

(2) このCIのペースメーカーだけでは振動は早晚停止してしまい、24時間を憶えていてもそれを外に伝えられない。そこで、CII-ATPaseによるリン酸化反応から定期的にエネルギーを得て振動を持続する。

(3) その結果CIとCIIの協働(カップリング)により温度補償された周期で振動が持続する。

以上のモデルは、機械式時計のデザイン:振り子(ペースメーカー=CI)・ゼンマイ(ドライバー=CII)・脱進機(CI-CIIの協働機構)を想起させる。我々はこの類似に着目し、研究計画を構築することが、Kaiタンパク質時計の分子設計を解明する唯一の道であると考えた。



### 3. 研究の方法

これまでの生理生化学的解析から示されたKaiCの機能を実現するメカニズムを明らかにするために、我々に特有な以下の3つの解析方法を基礎とし研究を展開した。

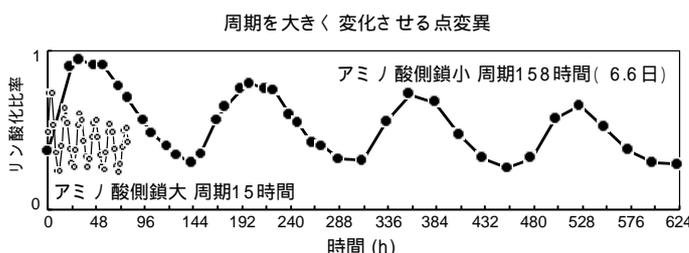
- (1) 高効率な遺伝子導入技術とCCDカメラを用いた生物発光レポーター技術による高効率なスクリーニング技術による変異体分離
- (2) 高精度なKaiCのin vitroの生化学的活性(2つのATPase活性の分離) kinase活性の解析方法
- (3) 機械式振り時計をモデルにした2つのATPase活性の動作機構の解析(位相解析とCIによるゲート機能)

なお、本研究は分子遺伝学的方法を利用した生理生化学的解析を中心とするが、構造生物学的解析は共同研究者(秋山修志博士・分子研)と連携して行った。

### 4. 研究成果

(1) 概日振動の特性を生じる(約24時間周期の決定と振動の持続)のメカニズム

効率的な変異導入と生物発光によるスクリーニングを組み合わせることで、周期を決定するATPase機能に深く関与するアミノ酸部位を同定し、構造生物学的な知見も統合し、「周期の決定機構」・「振動の持続機構」を担うKaiCの構造を推定することを目指し、点変異ライブラリーにより周期を大きく変化させる点変異体の探索を行った。CI-ATPaseが形成したテンションが24時間周期を規定するメカニズムを解明するため、大幅に周期が変わる変異体は有効である。我々は部位特異的な変異体を効率よく得るため、mix塩基を利用した点変異ライブラリーを作製してKaiCの任意のアミノ酸部位を全アミノ酸に置換し、CCDカメラによる発光リズムスクリーニングを行う実験系を開発した。この方法では一度の操作ですべての変異体を作成し、1000個のコ



ロニーごとの表現型を一回で確認できる。すでにこの実験系により、変異部位のアミノ酸の側鎖サイズと相関してリン酸化リズムの概日周期が15時間から6.6日と広範囲に変化するアミノ酸部位を見出している(投稿中)。

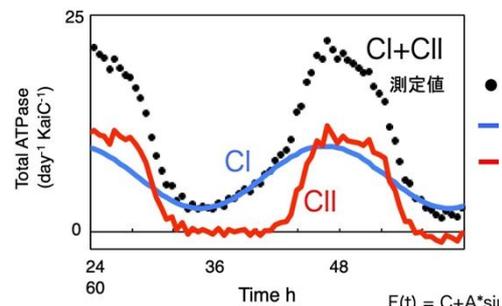
## (2) CI によるリン酸化サイクルゲート機構の解析

我々のモデルでは CI が物理的な調和振動子として機能し、CII の化学的リン酸化サイクルの進行を制御することにより概日時計の特性を説明することである。とすればこの動作を確認することが不可欠になる。これまでの解析では KaiC のリン酸化サイクルは KaiA と KaiB の作用で制御されていることがわかっている。一方、温度ステップは主に KaiC の CI-ATPase に作用すると考えられているので KaiA と KaiB の投与時刻をスキャンし確立された位相を解析した。その結果、リン酸化サイクルの進行は温度ステップからの時間経過後に支配されていることがわかり、CI がペースメーカーとしてリン酸化サイクルの進行を制御されていることが示された。

## (3) ATPase 活性の精密測定技術を利用した CI と CII の ATPase 活性の分離解析

我々のモデルでは KaiC は CI と CII の ATPase により制御されているが、その作用は全く異なっており、相互作用することで安定したリズムが発生すると想定される。生化学的には活性は同じなので測定できる活性は2つの活性の和のみで、片方の活性を選択的かつ可逆的に制御できない限り2つの作用を分別して確認することは難しい。そこで2つの ATPase に想定される振動をもとに2つの活性をシュミレートすることを試みた。UPLC を用いた ATPase 活性の精密測定技術の開発により、KaiC の ATPase 活性リズムの特徴的な波形を30分の解像度で捉えることに成功し、CI-ATPase の振動(サイン波)と CII-ATPase の振動(矩形波)を分離推定する方法を具体化した。推定した CII-ATPase の活性は、リン酸化第1段階のタイミングと一致し、本分離法の妥当性を示している(右図)。この方法によりカップリングした2つの ATPase それぞれの挙動を解析できる。KaiC 変異体について、温度や KaiA・KaiB 量を変化させて ATPase 活性リズムを測定し分離解析を行って2つの ATPase 協働機構を体系的に理解する。

$$\text{KaiC ATPase} = \text{CI (harmonic)} + \text{CII (relaxation)}$$



## (4) CII から CI にインパルスを与えるメカニズム

CII の ATPase 活性はリン酸化サイクルを駆動して、CI の調和振動を持続させるために周期の同調したエネルギー(インパルス)を CI に与えると考えられる。この CII の ATPase の機能を高精度に解析することで、CI と CII カップリングのメカニズムを明らかにする。インパルスが機能しない変異体はリズムが減衰すると考えられる。そこで CII の ATPase の機能部位に点変異ライブラリーを導入しリズムが減衰する変異体を探索した。

## (5) 温度補償性機構の解明

温度補償性の低下した KaiC 変異体を見出し、その生化学的解析から2つの ATPase のカップリングが外れることで CII のリン酸化サイクルが暴走し、温度補償性が低下したことを示した。この研究ではさらなる温度補償変異体の探索と、得られた変異体の生理・生化学的な解析を進め CI と CII のカップリング部位は物理的に相互作用が可能な CI と CII の境界面あるいは CI と CII のリンカーに位置すると想定された。これらの領域の点変異を導入することで、温度補償性変異体を複数得ている。これら変異体の ATPase 活性・kinase 活性のリズムや KaiC 単体の生化学活性を高精度に測定することでカップリングの具体的な動作様式を解析した。

## (6) 同調機構の解明

概日リズムの各位相で刺激を与えると、共通性の高い位相変位が概日周期で繰り返される。この位相応答曲線は概日時計の重要な性格で環境適応の基礎である。この位相変位とペースメーカーとしての CI-ATPase の関連を調査する。この KaiC-ATPase 活性が温度変化に应答することか

ら、ATPase が形成する分子内テンション変動が温度同調に関わる可能性が高い。そこでリズム測定中に急激に温度変化させ、直後の ATPase 活性の変化を高精度で調べた。ATPase 活性の自動測定中に反応温度を急激に変化させる技術は開発済みであり、温度変化に対する ATPase 活性とリン酸化リズムに同時測定に成功している。まず、温度変化直後の ATPase 活性の変化とリン酸化リズムの位相変化を詳細に調べ、対応づけた。この知見をもとに T-cycle (24 時間以外の温度サイクル) や骨格周期 (1 日に 2 回の温度パルスサイクル) への同調を調べる。

なお、Kai タンパク質による時計は温度サイクルに同調し、さらには KaiC 間での同調も可能である。この現象は我々が世界に先駆けて報告してきたものであるが、その具体的機構の解析はまだ行われていない。この現象も KaiC に潜む時計機構の重要な特徴であり、今後の重要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ouyang D, Furuike Y, Mukaiyama A, Ito-Miwa K, Kondo T and Akiyama S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Development and Optimization of Expression, Purification, and ATPase Assay of KaiC for Medium-Throughput Screening of Circadian Clock Mutants in Cyanobacteria.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.3390/ijms20112789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 伊藤（三輪）久美子	4. 巻 24
2. 論文標題 シアノバクテリアの概日時計タンパク質KaiC が1 日を計る仕組み	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 時間生物学	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 7件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤孝男
2. 発表標題 生物時計の仕組み — 概日時計の基本デザイン
3. 学会等名 東大医学部薬理学特別講義（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤孝男
2. 発表標題 生命の1日を計るタンパク質のしくみ
3. 学会等名 ダイセル イノベーションパーク（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤孝男
2. 発表標題 機械時計から体内時計と睡眠を考えるー生物時計の研究から見えてきた機械時計
3. 学会等名 日本睡眠学会市民公開講座（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤孝男
2. 発表標題 生物時計の仕組みー概日時計の基本デザイン
3. 学会等名 NHK文化センター名古屋[ひとの大学2019]（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤孝男
2. 発表標題 24時間を計るタンパク質の仕組み：概日時計の基本デザイン
3. 学会等名 大隅基礎科学創成財団 第2回創発セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤久美子、近藤孝男
2. 発表標題 時計タンパク質KaiCの特定部位のアミノ酸の大きさが周期を決める
3. 学会等名 26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤久美子、近藤孝男
2. 発表標題 KaiCの二つのATPase活性を基盤としたシアノバクテリアの時計メカニズム
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤(三輪)久美子、村中智明、近藤孝男
2. 発表標題 KaiCタンパク質に潜む概日時計：C1-ATPaseの調和振動が周期とその安定性を決めるペースメーカーである
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤(三輪)久美子、村中智明、近藤孝男
2. 発表標題 KaiCタンパク質に潜む概日時計：2つのATPaseのルースカップリングが安定な振動を維持する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三輪久美子、近藤孝男
2. 発表標題 シアノバクテリアの時計タンパク質KaiCの分子内フィードバックとドメイン間カップリングによるリズム発振機構
3. 学会等名 第81回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takao Kondo
2. 発表標題 Design of circadian clock of cyanobacteria by dual ATPases in KaiC
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三輪久美子, 近藤孝男
2. 発表標題 シアノバクテリアの時計タンパク質KaiCのドメイン間カップリングによるリズム発振機構
3. 学会等名 第24回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤孝男
2. 発表標題 生命に宿る振り子時計
3. 学会等名 第26回 国際土岐コンファレンス市民学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤(三輪)久美子、近藤孝男	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 9
3. 書名 発光イメージング実験ガイド 発光イメージング実験ガイド:発光によるシアノバクテリアのコロニースクリーニング 高精度なデータを得るための秘訣	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Kondo Lab. Biochronometry Group  
<http://clock.bio.nagoya-u.ac.jp>  
 Biochronometry Group  
<http://clock.bio.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	村中 智明  (MURANAKA Tomoaki)  (50761938)	名古屋大学・理学研究科・研究員          (13901)	