

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分

平成27年5月29日現在

研究課題名（和文） シアノバクテリアの時計タンパク質による概日時間の生成機構

研究課題名（英文） Circadian Pacemaker of Cyanobacteria by Clock protein KaiC

課題番号：24000016

研究代表者

近藤 孝男 (KONDO TAKAO)

名古屋大学・大学院理学研究科・特任教授



研究の概要：シアノバクテリアの3つの Kai タンパク質は ATP とともに混合されるだけで安定した24時間周期の概日リズムを示す。その振動の周期や温度補償性は2つの ATPase から構成される KaiC が規定している。本研究ではタンパク質に埋め込まれた概日時計のメカニズムの最終的理解を得るため突然変異体を利用した KaiC の生化学的解析と構造生物学的解析を行い、KaiC があたかも機械式振り子時計のように機能していることを示した。さらに真核生物の概日時計についても同様な可能性を検討している。

研究分野：生物学

キーワード：シアノバクテリア、生物時計、概日リズム、ATPase、時間生物学、Kai、構造生物学、周期の温度補償性、突然変異

1. 研究開始当初の背景

我々が腕時計を利用するように、動物や植物あるいは微生物も概日時計を利用して地球上の昼夜環境下で効率的な生活を実現している。概日時計は「時計」として機能するための特性を備えており、我々ヒトも含め、生命が進化の過程で獲得した生命活動調節のための細胞内基本装置である。本計画では試験管内で3つの Kai タンパク質と ATP によって再構成される概日時計を利用し、概日時計の最も根源的な発振機構を解明し、さらに広くタンパク質の情報を処理する機能を解明することを目的とする。

2. 研究の目的

(1) シアノバクテリアの時計タンパク質 KaiC の活性を様々な遺伝学的背景で解析し、このタンパク質に潜む、安定した概日振動発生機構を解明する。

(2) 生命がいかにして24時間という地球の自転周期をタンパク質分子内に記憶したかをタンパク質構造をもとに理解する。

(3) 原振動の解明を基礎として、細胞内でのように多くの生理機能の時間的統合が実現されているかを、六量体の機能として解明する。

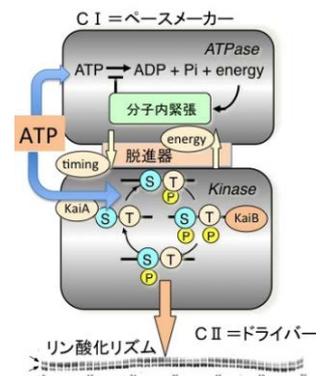
(4) 真核生物で同様の可能性をさぐる

3. 研究の方法

本計画は時計タンパク質の生化学的活性

解析、物理化学的機能解析と構造生物学（X線構造解析）を組み合わせ、時計機能の理解を目指す。生理学的解析を基礎とした変異体の利用も積極的に進める。図の作業モデルに従い、以下の解析を行った。

(1) KaiC の活性の解析に基づく時計モデルの検証。高感度 ATPase 活性測定で KaiC の ATPase 活性の時間的特性を解析し、KaiC の ATPase 活性と概日周期との関係を明らかにする。またリン酸化サイクルと ATPase の共鳴による自励振動発生の検証めざす。



(2) KaiC-タンパク質時計の構造生物学的機能解析。新規の結晶化技術を導入し、KaiC 時計タンパク質の X 線結晶構造解析を可能として、多くの変異体も含め、構造と機能の相関を解明する。

(3) 細胞システムの時計機構の基礎として Kai タンパク質の持つ同調機構を明らかにする。

(4) KaiC の解析をもとに真核生物の未知の ATPase を探索し、その周期の決定の可能性を探る。

4. これまでの成果

(1) KaiC ATPase の活性制御と機能の解析極めて弱い KaiC の ATPase をできるだけ高い時間分解能で測定すること、さらに CI と CII の ATPase 活性を分別するため高性能液体クロマトグラフ (UPLC) の測定条件を厳密に制御することにより、2つの活性を分別する測定精度を得た。さらに温度などの測定条件を再現性よく行う装置も自作し開発した。この方法を集中的な KaiC 変異体のスクリーニングから得られた多数の周期変異体、CI と CII の相関を司る脱進器機構の変異体、およびリン酸化サイクルの KaiA 依存性変異体の解析を進め、図に提示した、KaiC タンパク質による時計機構のモデルを提案できる実験的成果が得られたので、その成果を論文として準備中である。一方、リン酸化や脱リン酸化反応の時間経過を生化学的手法で追跡し、CII ドメインの ATPase 活性が脱リン酸化反応を進めるための重要な素反応であることを示した。

(2) 24 時間を記憶するメカニズムの解明—構造生物学—CI リングについて、2 オングストロームを切る高精度の構造解析を行い、「遅さ」の構造基盤および分子科学的起源を突き止めた (Science, in press, 2015)。本成果は学術的インパクトが高く、「KaiC が太古の地球のリズムを如何にその内に取り込み、今日まで保持・進化させてきたか」という時間生物学における最終回答に迫るものであり、専門家から一般市民まで幅広く支持されるものと考えられる。

(3) 細胞内における KaiC 時計の機能

KaiC 自身は細胞内での雑音に対して頑強に設計されていることが示唆された。すなわち 6 量体を形成している個々のサブユニットの間には、リン酸化状態を介してお互いの状態を監視・伝達するような仕組みが存在し、6 量体 KaiC の全体としての活性が頑強となるよう制御していることが明らかになった。

5 今後の計画

- (1) 変異体を利用して提案した KaiC 時計モデルの生化学的検証を進める
- (2) 細胞内の KaiC 六量体の機能を解明する。
- (3) KaiC の全長の高分解能 X 線構造解析を進める。
- (4) KaiC の機能解明を基礎に真核生物のペ

ースメーカータンパク質を探索する。

6. これまでの発表論文等

(1) 論文 (査読付)

- 1) Abe, J., Hiyama, T. B., Mukaiyama, A., Son, S., Mori, T., Saito, S., Osako, M., Wolanin, J., Yamashita, E., Kondo, T. and Akiyama, S. Atomic-scale origins of slowness in the cyanobacterial circadian clock, *Science*, in press, 2015.
- 2) Mukaiyama, A., Osako, M., Hikima, T., Kondo, T. and Akiyama, S. A protocol for preparing nucleotide-free KaiC monomer. *BIOPHYSICS*, 11, pp. 79-84, 2015.
- 3) Nishiwaki-Ohkawa, T., Kitayama, Y., Ochiai, E. and Kondo, T. Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *PNAS*, 111, pp. 4455-4460, 2014.
- 4) Kitayama, Y., Nishiwaki-Ohkawa, T., Sugisawa, Y. and Kondo, T. KaiC intersubunit communication facilitates robustness of circadian rhythms in cyanobacteria. *Nature Communications*, 2897, pp. 1-13, 2013.
- 5) Nishiwaki, T., and Kondo, T. Circadian autodephosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC occurs via formation of ATP as intermediate. *J. Biol. Chem.*, 287, pp. 18030-18035, 2012.
- 6) Akiyama, S. Structural and dynamic aspects of protein clocks: How can they be so slow and stable? *Cell. Mol. Life. Sci.*, 69, pp. 2147-2160, 2012.

(2) 受賞・Lectureship

- 1) 日本学士院賞「シアノバクテリア概日時計の再構成と計時機構の研究」, 日本学士院, 2014
- 2) 内藤記念科学振興賞「Kai タンパク質による概日振動の再構成とシアノバクテリアの概日時計の基本デザイン」, 公益財団法人内藤記念科学振興財団, 2015
- 3) Gilbert Morgan Smith Medal, The U.S. National Academy of Science, 2015
- 4) Chilton Lecture, 'Measuring Time of a Day in Cyanobacteria by Circadian Clock Protein KaiC', Univ. of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA, 2015