

令和元年6月19日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21523

研究課題名(和文)シアノバクテリア時計蛋白質KaiC複合体による細胞内時計の安定性制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of stability control of intracellular circadian clock by cyanobacterial clock protein KaiC complex.

研究代表者

岡野 圭子(今井圭子)(OKANO-IMAI, Keiko)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：90454610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：主観的昼と夜のKaiC複合体にそれぞれ含まれる蛋白質の候補を質量分析により検出した。顕著に時間特異性を示す因子は得られなかったが、KaiCに結合するいくつかの候補因子が得られた。既に長周期化することがわかっているプロテアーゼClpPも因子の候補として得られた。候補因子のタンパク質とKaiCとの直接的な結合を確認するためin vitro免疫沈降を行った。さらに、破壊株、過剰発現株の概日リズムへの影響を調べた結果、trigger factor, SecAなどのタンパク質の品質や輸送に関わる因子、走化性に関わる因子などでリズム周期や位相が少し変化しており、KaiCの細胞内での新たな機能が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日時計の最もシンプルなモデル生物であるシアノバクテリアの時計蛋白質と結合する新たな因子の探索を行い、タンパク質の品質や輸送、走化性に関わる因子を同定した。これらの結果は、シアノバクテリアの概日時計のシステムにおいて、時計蛋白質の代謝を含む細胞内での翻訳後制御を介した細胞内時計の安定的な振動維持の機構解析への足がかりとなり、新たな知見をもたらす事を期待している。また、より複雑な高等生物での概日時計のシステムの理解への一助となる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The candidate proteins contained in the subjective day and night were detected by mass spectrometry. The protease protein ClpP1, which is already known to long period phenotype by deletion mutant, was also obtained as a candidate for complexed with KaiC. In vitro immunoprecipitation was performed to confirm direct binding of candidate factor protein to KaiC. Furthermore, as a result of investigating the effect of the circadian rhythm on disrupted or overexpressed mutants of these candidate, The rhythm period and phase were slightly effected of the factors participate in protein quality and transport such as trigger factor and SecA, and participate in chemotaxis.

研究分野：時間生物学

キーワード：シアノバクテリア 概日時計

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

概日時計とは、地球の自転に伴う環境変化に適応するため、地球上のほとんどすべての生物が獲得している生命現象である。シアノバクテリアでは遺伝学的解析から概日時計を構成する三つの必須時計遺伝子 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* が同定され、KaiA, KaiB, KaiC 3種の精製蛋白質により、*in vitro*での KaiC リン酸化の 24 時間周期振動を再構築出来る (Nakajima, *Imai et al.*, *Science*, 308.414-5, 2005)。

しかし、「細胞レベルでは、どの様に安定な 24 時間振動を維持しているのか?」という疑問は解決されていない。時計蛋白質の化学的振動からの時間情報を元にシアノバクテリアでは、ゲノムの凝集、蛋白質の局在、光合成活性、細胞分裂の *gateing*、窒素固定など、様々な生理現象を概日制御している。また、時計遺伝子群を含むほぼ全ての遺伝子のプロモーター活性が KaiC の基本転写機構を介した転写翻訳フィードバックに制御され、概日周期の遺伝子発現を繰り返す (Nakahira *et al.*, *PNAS* 101,881-885, 2004)。さらに、KaiC 蓄積量も概日振動し、KaiC を含む複合体の大きさは約 300kD から 600 kD へと時間依存的に変化しており、KaiC 複合体の時間依存的な機能の変化が示唆されている (Kageyama *et al.*, *JBC* 278 (4)2388-95 2006)。KaiC は KaiA, KaiB などと時間依存的に相互作用するが、複合体サイズから未知の因子も含まれている事が示唆されている。時間依存的に変化する複合体の機能は、複合体を形成する因子、結合による構造変化やリン酸化などの翻訳後修飾が関与していると考えられる。本研究では、プロテオーム解析により、KaiC 複合体の構成因子を決定し、その機能解析を行うことにより KaiC の翻訳後修飾による概日時計の安定性の制御機構を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

24 時間という比較的長い振動周期を決める重要な要素の一つに KaiC 蛋白質量の適切な振動がある。我々は、これまでに KaiC の合成・分解速度の概日振動が KaiC 量の調節を積極的に行うことで、適切な振動周期や振幅の維持を行うと示唆した (*Imai et al.*, *JBC* 279, 36534-39, 2004)。また、*in vitro*の系を利用した分解活性測定法を確立し、脱リン酸化型 KaiC の分解速度がより速く、細胞抽出液中に KaiC を積極的に分解する何らかの因子が存在する事を示した (未発表)。KaiC には時間依存的分解活性がある事から、何らかの翻訳後制御 (リン酸化、複合体形成、構造変化) により安定性を変化させ、蓄積量を積極的に調節する機構がある事が示唆される。時間依存的にサイズが変化する KaiC 複合体の中に分解を制御する因子が含まれている可能性がある。これらの新規因子による時間制御への関与が、24 時間の安定的な時計制御メカニズムの解明に繋がることを期待している。

## 3. 研究の方法

### (1) KaiC 複合体を構成する蛋白質を LC-MS/MS を用いた質量分析

KaiC 複合体に時間依存的に含まれているタンパク質を同定するために、KaiC-FLAG を持つシアノバクテリアを主観的な昼、主観的な夜の KaiC 複合体を affinity 精製後、LC-MS/MS を用いた質量分析により同定した。affinity 精製には、付加により概日時計に影響が少ない事が確認されている flag タグを用いた。また、転写活性がほとんどない連続暗条件下における KaiC 複合体の構成因子についても比較した。

### (2) 候補因子の KaiC との結合確認

酵母ツーハイブリッド法、及び *in vitro* の免疫沈降法により、KaiC と候補因子が直接結合するかを確認した。

### (3) 複合体構成する因子の変異体を作製し、概日リズムへの影響を確認

同定された因子の概日時計への影響を調べる為に、遺伝子破壊変異体及び過剰発現株を作成し、自動発光測定装置でリズムを詳細に測定し、比較した。

## 4. 研究成果

主観的な昼、主観的な夜における KaiC 複合体の構成因子を調べるため、FLAG タグを付加した KaiC で免疫沈降後に質量分析を行った。連続明条件下、連続暗条件の各条件で比較をした結果、条件による明確な違いは得る事が出来なかったが、各条件で結合する候補因子がいくつか得られた。既に長周期化することがわかっているプロテアーゼ ClpP もこの解析により得られた事から、実験系は有効であると考えられる。候補因子 Clp プロテアーゼ群合わせて 16 遺伝子についてクローニングを行い、KaiC の直接的な結合を確認するために、酵母ツーハイブリッド法や *in vitro* 免疫沈降を行った。酵母ツーハイブリッド法では、擬陽性が排除できず KaiC との結合を確認できなかった。免疫沈降の結果、いくつかの KaiC に直接結合している可能性があるタンパク質が得られた (図 1)。



図1 in vitro 免疫沈降  
(GST-KaiC vs Flag-tag proteins)

次に候補因子の遺伝子破壊株及び、IPTG の添加により遺伝子発現を誘導できる過剰発現株を作成し、概日リズムへの影響を確認した (図2)。その結果、タンパク質の品質や輸送に関わる因子以外に、細胞運動に関わるヒスチジンキナーゼなど、いくつかの変異体で周期及び位相への影響が見られた。今回使用したシアノバクテリア (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) では、走行性は確認されていないが、この遺伝子の破壊株においては、走行性を示す事が報告されており、この遺伝子を調べる事により概日時計による走化性の制御について明らかに出来るかも知れない。また、synpcc7942\_2524 は、過剰発現株で顕著に生育が悪くなり (図3)、1時間ほど短周期化する事がわかった。この遺伝子は、プロテアーゼ遺伝子のオペロン clpP2-clpX の上流の遺伝子にコードされた trigger factor であり、共にタンパク質の品質に関わっていると考えられる。現在、これらの変異体の KaiC タンパク質の時間変動や、蓄積量への影響などの解析を進めており、今後さらに KaiC の翻訳後制御を介した概日時間の安定化機構を明らかにしたい。

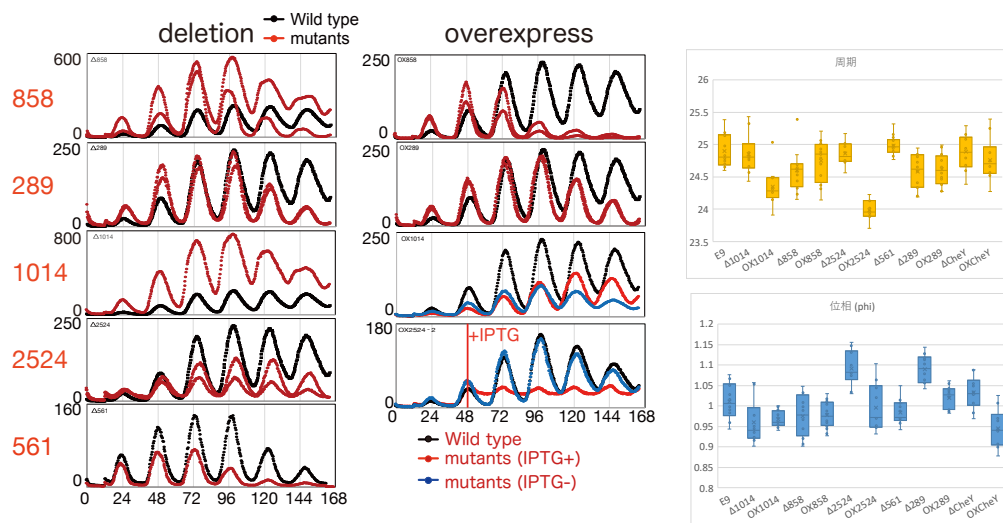


図2 変異体のリズム及び、周期・位相の比較

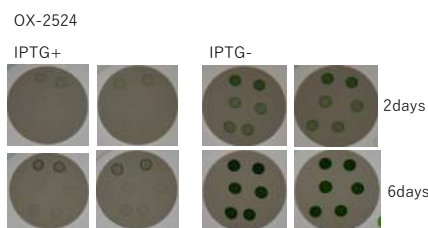


図3 synpcc7942\_2524 の過剰発現下での生育阻害  
IPTG の添加により synpcc7942\_2524 を過剰発現すると、  
生育が悪くなる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Keiko Imai, Yohko Kitayama, Masayuki Fujiwara, Kenyo Kaneko, Hiroshi Ito, Takao Kondo KaiC の代謝速度のリズムへの影響と KaiC の分解に関連する因子の探索 第 60 回日本植物生理学会年会 2019
- ② 金子健陽 今井圭子 伊藤浩史 Disappearance of circadian rhythm of rapidly

- dividing cyanobacteria 第25回日本時間生物学会学術大会 2018
- ③ 今井圭子 北山陽子 藤原正幸 金子健陽 伊藤浩史 近藤孝男 Search for proteins involved in the degradation of KaiC and the effect on rhythm by KaiC turnover. 第25回日本時間生物学会学術大会 2018
  - ④ 今井圭子 KaiC タンパク質の代謝と時計の安定性 CyanoClock 1.0 2018
  - ⑤ Keiko Imai, Yohko Kitayama, Masayuki Fujiwara, Takao Kondo Search for proteins involved in the degradation of KaiC and the effect on rhythm by KaiC turnover. 第59回 植物生理学会 2018
  - ⑥ Keiko Imai, Yohko Kitayama, Masayuki Fujiwara, Takao Kondo Analysis of the KaiC degradation mechanism with a dependence on the phosphorylated states. circadian clock of cyanobacteria during 1991-2017 2018
  - ⑦ Keiko Imai Yohko Kitayama, Masayuki Fujiwara, Takao Kondo The effect on the rhythm in the change of KaiC turnover and search for related protein. 第22回日本時間生物学会学術大会 2017
  - ⑧ Keiko Imai, Yohko Kitayama, Masayuki Fujiwara, Yoichiro Fukao, Takao Kondo Proteome analysis of KaiC complex in Synechococcus elongatus PCC 7942 第23回日本時間生物学会 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：北山 陽子  
ローマ字氏名：(KITAYAMA Yohko)

研究協力者氏名：藤原 正幸  
ローマ字氏名：(FUJIWARA Masayuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。