

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：63903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06171

研究課題名(和文) 時計タンパク質の機能から探るシアノバクテリア生物時計の環境適応メカニズム

研究課題名(英文) Exploring the mechanism behind environmental adaptation of circadian clock in cyanobacteria

研究代表者

向山 厚 (Mukaiyama, Atsushi)

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・助教

研究者番号：80647446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はシアノバクテリアの概日時計の進化的多様性の解明に向けた実験研究である。

3種類のタンパク質(KaiA, KaiB, KaiC)から構成されるシアノバクテリアの概日時計において、周期長を規定する主要な因子がKaiCただ1種の時計タンパク質に内包されている。配列相同性が様々なKaiCホモログを調製し、それらの時計としての機能を評価したところ、現在のKaiCが段階的な分子進化を経て計時機能を獲得したことを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、現在のシアノバクテリア生物時計が段階的な進化を経て形作られたことが示唆された。今後、その詳細を解析することで生物時計の起源を知る手がかりが得られると予想される。

研究成果の概要(英文)：This project aims to clarify the mechanism underlying the evolutionary diversity of cyanobacterial circadian clock.

The cyanobacterial circadian clock is composed of the three kinds of proteins (KaiA, KaiB and KaiC), and the periodicity is encoded in KaiC solely. Biochemical analysis of diverse KaiC homologues suggests that KaiC has acquired its clock function through a stepwise evolutionary process.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：生物時計 シアノバクテリア KaiC ATPase

1. 研究開始当初の背景

生物(概日)時計とは地球の自転に伴う周期的な環境変化に合わせて自らの生理・行動を約 24 時間周期でリズムに変調させる内在性のシステムのことを言い、ヒトを始めとする哺乳類から、植物そして微生物に至るまで様々な生物種に共通して存在する。シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株では、時計遺伝子 *kaiABC* の翻訳産物である 3 種類の時計タンパク質 (Se-KaiA、Se-KaiB、Se-KaiC) を ATP とともに混合することで、試験管の中で約 24 時間周期の概日リズムが再構成される (Nakajima *et al.*, *Science* 2005)。中心振動体としての役割を担う KaiC は ATP を加水分解する酵素 (ATPase) であり、その活性は 1 日に 10 数個の ATP を分解する程度で、良く知られているモータータンパク質の活性 (1 日に $10^3 \sim 10^7$ 個の ATP を分解する) と比べて著しく低活性である (Terauchi *et al.*, *PNAS* 2007)。申請者らは、Se-KaiC の ATPase としての機能を詳細に調べたところ、KaiC 単体に生物時計の振動の起源がコードされていて、自身の ATPase の活性の強さが振動周期、つまり 24 時間の周期を規定していることを明らかにした (Abe and Mukaiyama *et al.*, *Science* 2015)。

この観察から概日時計が KaiC を中核として進化したという仮説が導かれる。KaiC ホモログはシアノバクテリアのみならず、それ以外のバクテリアやアーキアにも一部存在する。研究回避当初、*S. elongatus* 以外の KaiC ホモログの ATPase 機能についての報告例は少なく、多様な配列空間に位置する KaiC ホモログの時計としての機能については十分にわかっていなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では様々な他種 KaiC ホモログを単離し、それらの ATPase 機能がどのような特徴を示すかを明らかにする。ATPase の特徴を進化系統樹と対応付けることで、Kai タンパク質時計の進化的多様性について検証する。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌を用いた異種発現による他種 KaiC ホモログの大量取得

公開されているデータベースをもとに、候補となる KaiC ホモログを選定し、発現ベクターを構築、大腸菌による発現を試みた。発現した KaiC ホモログは各種クロマトグラフィーを用いて精製し、機能解析に供した。精製純度は CBB 染色により評価した。

(2) 他種 KaiC ホモログの機能解析

Se-KaiA、Se-KaiB が共存すると Se-KaiC の ATPase 活性は 24 時間周期で上下に変動する。条件を整えると、Se-KaiC の ATPase 活性は単独 (Se-KaiA、Se-KaiB 非存在下) でも減衰型の振動を示し (図 1)、減衰振動に含まれる固有振動数は細胞スケールの振動数 (周期の逆数) と一致する。この技術を用いて単離した KaiC ホモログを解析することで、振動能およびその固有振動数を評価した。

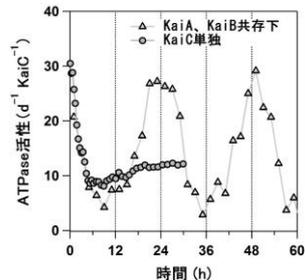


図 1. KaiC ATPase の時間変化

4. 研究成果

(1) 大腸菌による他種 KaiC ホモログの大量取得

本研究を円滑に進めるために、まず 3 種類の発現ベクターと 3 種類の培養条件からなる計 9 種類の発現スクリーニング系を構築した (図 2A)。一例を挙げると、シアノバクテリア *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 株由来 KaiC (G1-KaiC) では、3 条件で良好な発現量が見られ (図 2B)、かつ高純度試料の調製に成功した (図 2C) (Mukaiyama *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.* 2019)。このスクリーニング系を Se-KaiC との配列同一性が比較的高い (~80%) の種から同一性が低い (~20%) 種に適用し、最終的に Se-KaiC を含 13 種類の KaiC ホモログを揃えるに至った。

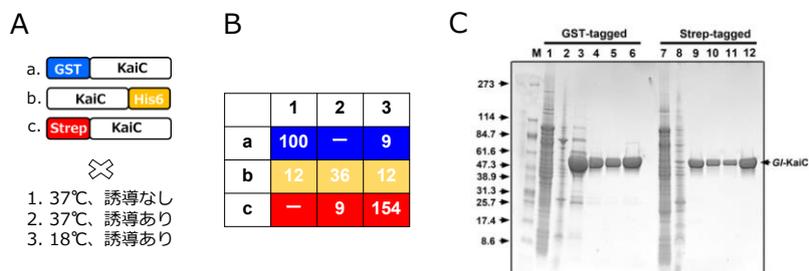


図 2. 他種 KaiC ホモログの発現スクリーニング系

(A) スクリーニング基本条件 (B) G1-KaiC の発現量の比較 値は条件 a-1 における発現量を 100 とした相対値で表されている。表中の-は発現量が検出限界以下であったことを示す。(C) 精製した G1-KaiC の純度チェック。

(2) 他種 KaiC ホモログの機能解析

取得した KaiC ホモログに対して ATPase 機能解析を行った。3 種の KaiC ホモログについては安定性の問題により定量的な解析ができなかったため、残りの 10 種について比較解析を行った。その結果、2 種(図 3、赤)を除くすべての種で減衰振動が観測された。そのうち 4 種 (図 3、緑)が Se-KaiC 同様、24 時間周期に相当する固有振動数を示したのに対し、残りの 3 種 (図 3、青)の中には 24 時間より短 (長) い周期に相当する振動数を備えた種が存在していた。こうした機能による分類が進化系統樹を基にした分類と対応し、概日リズムを司る現生の KaiC が進化の過程で「振動能の獲得」、「24 時間に対応する固有振動数の実現」の少なくとも 2 段階を経て形作られた可能性が示唆された。今後、機能の違いを生み出す因子を同定することで、KaiC 単体に内包される計時機能の解明につながると期待される。

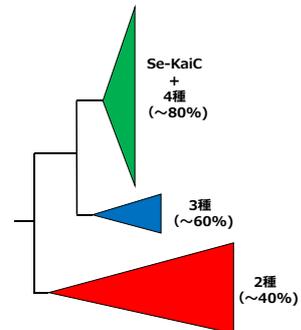


図 3. KaiC における機能と分子進化との連関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3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） 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 Mukaiyama A, Ouyang D, Furuike Y, Akiyama S	4. 巻 131
2. 論文標題 KaiC from a cyanobacterium Gloeocapsa sp. PCC 7428 retains functional and structural properties required as the core of circadian clock system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 67-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.051.	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 Mukaiyama A, Furuike Y, Abe J, Yamashita E, Kondo T, Akiyama S	4. 巻 8
2. 論文標題 Conformational rearrangements of the C1 ring in KaiC measure the timing of assembly with KaiB	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27131-8.	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9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 向山 厚、欧陽 東彦、古池 美彦、秋山 修志
2. 発表標題 多種KaiCの機能解析によるシアノバクテリア生物時計の進化的多様性の考察
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向山 厚
2. 発表標題 機能解析から探るKaiタンパク質時計システムの進化的多様性
3. 学会等名 Cyanoclock2.0
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mukaiyama A, Ouyang D, Furuike Y and Akiyama S
2. 発表標題 Seeking for evolutionary diversity of Kai-protein clock system in cyanobacteria
3. 学会等名 XVI European biological rhythm society congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mukaiyama A, Ouyang D, Furuike Y and Akiyama S
2. 発表標題 Evolutionary diversity of Kai-protein clock in cyanobacteria
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向山 厚、秋山 修志
2. 発表標題 他種KaiCの機能解析から探るシアノバクテリア生物時計システムの進化的多様性
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Mukaiyama, Yoshihiko Furuike, Eiki Yamashita, Takao Kondo and Shuji Akiyama
2. 発表標題 Conformational rearrangements of the C1 ring in KaiC measure the timing of assembly with KaiB via a conformational selection mechanism
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向山 厚、古池 美彦、秋山 修志
2. 発表標題 シアノバクテリア生物時計の分子起源とその進化
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向山 厚、歐陽 東彦、古池 美彦、秋山 修志
2. 発表標題 シアノバクテリアGloeocapsa sp. PCC 7428株由来KaiCの機能解析
3. 学会等名 平成30年度日本生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向山 厚、古池 美彦、秋山 修志
2. 発表標題 シアノバクテリア概日時計における進化的多様性の分子メカニズム
3. 学会等名 令和2年度日本生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mukaiyama A, Furuike Y and AkiyamaS (分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北海道大学出版会	5. 総ページ数 164ページ
3. 書名 Biological Rhythms	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------