

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05833

研究課題名(和文) 時計タンパク質KaiCにおける温度補償性の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of temperature compensation in the cyanobacterial clock protein KaiC

研究代表者

寺内 一姫 (Terauchi, Kazuki)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70444370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計の温度補償性は、温度が変化しても周期長が変化しない、すなわち、振動の速度が温度に対して一定に保持される、この特性の基盤となる分子機構については大きな謎である。本研究は、シアノバクテリアにおける時計タンパク質KaiCが内包するATPase活性の温度補償性が担保される分子機構を明らかにすることを旨とした。KaiCのATPase活性の測定を諸条件下で実施した。またKaiC-likeタンパク質を精製し、KaiCの生化学的特性と比較した。温度補償性は、KaiCに特有の性質であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Kaiタンパク質による概日時計再構成系は、試験管内で時間発振可能なタンパク質による唯一の概日振動システムである。動物や植物において生体内で高次の機能をもつタンパク質複合体は多く見出されているが、24時間周期でその機能が変動するタンパク質はこれまでに知られていない。アレニウスの式に示されるように、酵素反応の速度定数は温度が増すにつれて指数関数的に増加する。このような通常の酵素反応が適応されない温度補償性の分子機構解明は、これまでの生化学とは異なる角度から生命現象を理解しようとするものである。

研究成果の概要(英文)：The temperature compensatory nature of the circadian clock is a great mystery regarding the molecular mechanism underlying this property, in which the period length does not change with temperature, i.e., the rate of oscillation is held constant with respect to temperature. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism that ensures the temperature compensatory nature of the ATPase activity of the cyanobacterial clock protein KaiC, and measured the ATPase activity of KaiC under various conditions. KaiC-like proteins were purified and compared with the biochemical properties of KaiC. Temperature compensatory properties were suggested to be unique to KaiC.

研究分野：植物生理学、時間生物学

キーワード：シアノバクテリア 概日時計 ATPase 温度

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バクテリアから植物、ヒトにいたるほとんどの地球上の生物は概日時計（体内時計、生物時計）を細胞内に備えている。概日時計は地球上の最も日常的な変化である昼夜の変化に適応するために、生物が進化の過程で獲得した分子機構である。概日という名が表すように、その周期長は、現在の地球の自転周期 24 時間に調整されている。

概日時計をもつ最も単純な生物であるシアノバクテリアは、分子レベルで概日時計を解析できる格好の生物となっている。シアノバクテリアでは *kaiABC* 遺伝子とその概日時計の中核をなす 3 つの Kai タンパク質をコードしている。これら 3 つの時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC により *in vitro* において ATP 存在下で約 24 時間の概日振動を再構成できる (図 1)。この再構成実験によって、時間を計測するというメカニズムがタンパク質に組み込まれていることが初めて明確に示された。Kai タンパク質による概日時計再構成系は、試験管内で時間発振可能なタンパク質による唯一の概日振動システムである[1]。生体内で高次な機能をもつタンパク質複合体がさまざま見出される中で、24 時間周期でその状態が変動するタンパク質はこれまでに KaiC 以外に知られていない。このような精緻な時計機能をもつ機構の中に、温度補償性の分子機構が内包されており、きわめてユニークな研究対象となっている

シアノバクテリアの KaiC タンパク質 (519 アミノ酸残基) は、互いに相異なる CI、CII とよばれる 2 つの ATPase ドメインが、ヒンジ配列を介してタンデムに連結した配列をもつ (図 2)。我々は、これまでの研究で、概日時計の 24 時間の周期長が中心振動体である KaiC の ATPase 活性という生化学的なプロセスによって決定されており、この ATPase 活性に温度補償性が認められることを見出した[2]。KaiC は、極めて弱い ATPase 活性 (KaiC 分子が 24 時間で約 12 分子の ATP を加水分解する) を示し、その活性が概日時計の速さ (振動数) に比例することから、概日リズムの発生機構が KaiC の ATPase を分子基盤とすることを示している (図 3)。さらに、この ATPase 活性は温度変化に対して一定である。この発見は、まったく謎に包まれていた概日時計の温度補償性の分子機構を、KaiC の ATPase 活性という一つの化学反応にまでその実体を落とし込むこととなり、その解明に向けた大きな一歩となった。

2. 研究の目的

前述した背景から、本研究ではシアノバクテリアにおける時計タンパク質 KaiC が内包する ATPase 活性に注目し、概日時計の周期が温度によって変化しない温度補償性の生化学的基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

シアノバクテリアの KaiC タンパク質 (図 2) は、ホモ六量体として作動し、2 つのリング (CI リング CII リング) が重なった構造をとる。2 分子の ATP がそれぞれ CI と CII のプロトマー界面に結合する。KaiC は、ATPase 活性に加えて、Ser431 と Thr432 に対し自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性を示す。これまでに KaiC の CI ドメイン側に結合している ATP が加水分解されることで、六量体 KaiC の構造が変化することを明らかにした。また、KaiC 六量体には、Blue-native PAGE (BN-PAGE) 法によって分離できる 2 つの状態が存在することを見出し、ATP 加水分解前の状態を gs (ground-state) 型 KaiC、加水分解後を cs (competent-state) 型 KaiC と名付け、cs 型 KaiC にのみ KaiB が結合することを報告した[3]。

さらに、KaiC の gs 型および cs 型 KaiC の存在比率が、反応溶液の温度によって異なっていることを見出した。温度が高いほど、cs 型 KaiC の比率が高くなる。これらの結果から、2 つの存在状態 gs

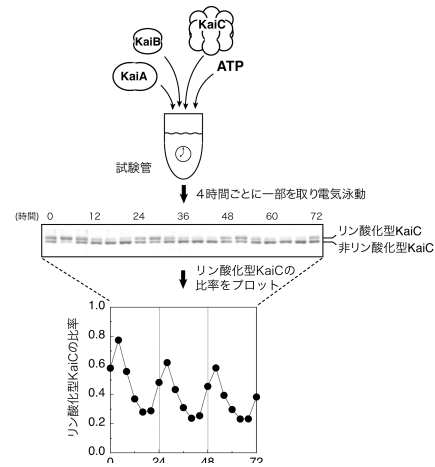


図1 Kaiタンパク質による概日時計再構成系
3つのKaiタンパク質とATPにより
24時間周期で振動する。

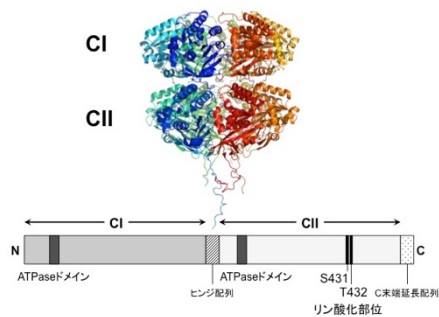


図2. KaiCはCIおよびCIIとよばれる2つの
ATPaseドメインからなり、六量体を形成する

型 KaiC および cs 型 KaiC において、ATPase 活性が大きく異なっており、それらの和としての KaiC の見かけの活性が温度非依存的になっているのではないかという仮説を得た。本研究では、この仮説を検証するために KaiC の ATPase 活性を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1)まず KaiC タンパク質の精製方法を再検討した。その結果、より純度の高い KaiC を多量に精製することに成功した。また、タンパク質標品の取扱方法や ATPase 活性の HPLC の測定方法も改良し、新規の解析で得られた ATPase 活性データと既存のデータを精査した。

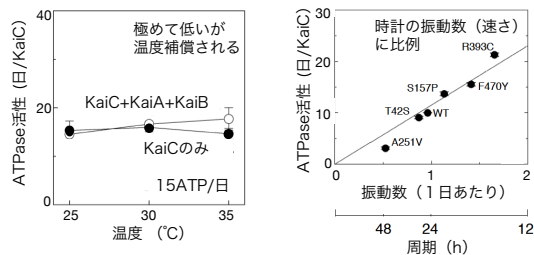


図3 KaiC の ATPase 活性

(2)改良した HPLC による ATPase 活性の測定法を用いて、KaiC の ATP 加水分解量を解析した。先行研究において、30°C において KaiC の ATPase 活性は ADP 生成速度として、およそ 12~15 day⁻¹ と報告されている。この既報のデータ比較し、その活性 kcat は同等の値を得た。しかし、KaiC のタンパク質精製条件や反応条件により、Km 値に違いがあることが新たに確認された。ATPase 活性の阻害様式を精査したところ、非 Michaelis-Menten 型の反応を示唆する曲線が得られた。これらの結果から、KaiC の CI ドメインと CII ドメインがそれぞれ異なる酵素学的パラメーターをもつ ATPase であることが示唆された。KaiC の 2 つのドメインの相互作用が周期の温度補償性をもたらすと重要な要因であることが確認された。

(3)上記の点を踏まえ、KaiC の総 ATPase 活性、CI および CII の各ドメインの ATPase 活性を pH 変化に対して評価した。これまでの KaiABC の概日時計再構成系では用いる緩衝液は pH8.0 を標準としている。そこで、pH6.0 から 9.0 の範囲の緩衝溶液を用いて ATPase 活性を検証した。30°C において KaiC の ATPase 活性は pH が高くなると活性はやや低下したが、その変化は小さかった。また、CI および CII 各ドメインも pH が変化しても活性は大きく変動しなかった。一方、KaiC のリン酸化および脱リン酸化反応は pH により影響を受けることがわかった。in vitro の周期長は pH により影響を受けるが異なった pH においても温度補償性が維持されていた。これらの結果から ATPase の温度補償性と周期長の温度補償性に関して考察した。

(4)一方、時計タンパク質 KaiC の特性を浮き彫りにするために、KaiC に相同性の高い他生物が有する KaiC-like タンパク質の解析を実施した。まず、このタンパク質の温度補償性を検証するために大腸菌内で発現させ精製した。KaiC が 6 量体を形成しているのに対して、ゲルろ過クロマトグラフィー解析において、KaiC-like タンパク質はそれよりもさらに多量な複合体を形成していることが見いだされた。精製したタンパク質を用いて、25°C、30°C、35°Cでの ATPase 活性を測定した。その結果、温度上昇により反応速度が増加した。すなわち、KaiC-like タンパク質には温度補償性は認められず、KaiC とは異なる性質を示すことが明らかになった。KaiC-like タンパク質は生物時計の原型である可能性が示唆された。

(5)これらの結果から、CI と CII が分子内でゆるい相互作用をすることによって、CI の ATPase は CII のリン酸化サイクルの速度を調節し、CII は CI に調和振動を維持するためのエネルギーを与えることで安定な振動が持続していると考えられた。KaiC の gs 型および cs 型 KaiC の存在比率がこれらの機構によって制御されていると考えられた。今後はこの仮説を明らかにすることが重要であると考えられた。

引用文献：

- [1] Nakajima, M. et al. (2005). *Science* 308, 414-415. [2] Terauchi, K., et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16377-16381. [3] Oyama, K. et al. (2016) *Sci. Rep.* 6, 32443.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshihiko Furuike Atsushi Mukaiyama, Shinichi Kodac, Damien Simon, Dongyan Ouyang, Kumiko Ito-Miwa, Shinji Saitoc, Eiki Yamashita, Taeko Nishiwaki-Ohkawa, Kazuki Terauchi, Takao Kondo and Shuji Akiyama	4. 巻 119
2. 論文標題 Regulation Mechanisms of the Dual ATPase in KaiC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 e2119627119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2119627119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagata K., Oyama K., Ota A., Azai C., Terauchi K.	4. 巻 66
2. 論文標題 Mutation of alanine-422 in KaiC leads to a low amplitude of rhythm in the reconstituted cyanobacterial circadian clock	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gen Appl Microbiol	6. 最初と最後の頁 140-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2020.01.008	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 Wiegard A, Kobler C, Oyama K, Dorrich AK, Azai C, Terauchi K, Wilde A, Axmann IM	4. 巻 202
2. 論文標題 Synechocystis KaiC3 displays temperature- and KaiB-dependent ATPase activity and is important for growth in darkness.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Bacteriol	6. 最初と最後の頁 e00478-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jb.00478-19	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kumiko Ito-Miwa, Yasuhiro Onoue, Takao Kondo, Kazuki Terauchi
2. 発表標題 Period of cyanobacterial circadian rhythm correlates with solution pH in vitro
3. 学会等名 17th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤久美子、尾上靖宏、近藤孝男、寺内一姫
2. 発表標題 溶液のpHがシアノバクテリアの時計タンパク質KaiCのリン酸化リズムに与える影響
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾上靖宏、大木千里都、寺内一姫
2. 発表標題 時計タンパク質KaiA二量体の安定性
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾上靖宏、山田貴淳、寺内一姫
2. 発表標題 紅色細菌由来の時計タンパク質 KaiC ホモログの生化学的解析
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾上靖弘、大木千里都、寺内一姫
2. 発表標題 シアノバクテリア時計タンパク質KaiA二量体のプロトマー交換反応
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Onoue, Kotona Fujie, Kazuki Terauchi
2. 発表標題 Construction and functional characterization of heterodimeric KaiA, an activator of circadian clock protein KaiC
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水埜元太、尾上靖宏、寺内一姫
2. 発表標題 シアノバクテリア時計タンパク質KaiCのC末端領域とKaiAの結合様式
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本恵、三林芳太郎、浅井智広、寺内一姫
2. 発表標題 酸素によるシアノバクテリア時計タンパク質KaiCのATPase活性阻害
3. 学会等名 第10回日本光合成学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺内一姫
2. 発表標題 シアノバクテリアの概日時計in vitroとin vivo解析
3. 学会等名 CyanoClock2.0 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Terauchi K, Onoue, Y,	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 13
3. 書名 Cyanobacterial Physiology: From Fundamentals to Biotechnology	

1. 著者名 Ito-Miwa K., Terauchi K., Kondo T.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 13
3. 書名 Circadian Rhythms in Bacteria and Microbiomes (Eds., Carl H. Johnson, Michael Rust)	

〔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
研究協力者	尾上 靖宏 (Onoue Yasuhiro)		

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