

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009□ 2010

課題番号：21770039

研究課題名(和文)

概日時計を構成する二重の振動発振経路の実体と相互作用機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of dual-oscillatory system of cyanobacterial biological clock

研究代表者：

北山 陽子 (KITAYAMA YOKO)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：20444367

研究成果の概要(和文)：生命活動は概日時計によって調節されている。本研究はシアノバクテリアの二重の振動発振経路で構成される概日時計の実体の解明と二重経路の相互作用機構の解析を行った。時計タンパク質 KaiC の ATPase 活性とリン酸化の関係や時計タンパク質複合体形成を調べたところ、遺伝子発現の概日リズムは KaiC のリン酸化状態に加え時計タンパク質複合体状態にも制御されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Many organisms possess circadian clock, which allow them to regulate their biological activity with a 24-hour period. In this study, I analyzed the dual-oscillatory system of cyanobacterial circadian clock. The results suggests that temporal change of KaiC-containing protein complex is probably important process to control the gene expressions rhythm in the absent of KaiC phosphorylation rhythm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、概日時計、シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上の生物は24時間周期で繰り返される昼と夜の環境変化に適応して生活するために概日時計と呼ばれる内因性の時間測定機構を持っている。概日時計によって時間をはかり、その情報をもとに様々な遺伝子発現が制御されることで、生命現象が昼夜の適切な時間におこっている。概日リズムは動物、植物、藻類、原核生物など様々な生物で観察されており、どの生物の概日時計も基本的には、時計遺伝子のリズム的な転写・翻訳によって自分自身の転写が抑制される、転写翻訳フィードバック制御によって動いていると考えられてきた。

(2) 多くの生物で概日リズムの存在が確認

されているが、原核生物で概日リズムが観察されているのはシアノバクテリアだけである。シアノバクテリアでは3つの時計遺伝子 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* が概日時計機構の中核あり、その転写翻訳の自己フィードバック制御によって概日リズムの発振がおこると考えられていた (Ishiura et al., 1998)。しかし新規のタンパク質合成がおこらない条件でも概日リズムが存在することや (Tomita et al., 2005)、大腸菌から組換えタンパク質として精製した KaiA と KaiB と KaiC を ATP とともに混合すると、細胞の中でなくし試験管内でも KaiC のリン酸化状態が概日変動することがわかったため、概日時計の実体は転写翻訳のフィードバック制御ではなく KaiC の

リン酸化サイクルであると考えられた (Nakajima et al., 2005)。

(3) 試験管内再構成系を使った実験から、シアノバクテリアの概日時計の動作メカニズムは分子レベルで解析がすすんでいる。KaiCには二カ所のリン酸化部位があるが、その二カ所のリン酸化部位のリン酸化状態によって KaiC の自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性が制御され、反応の方向性が決まり、その流れのなかで脱リン酸化促進因子である KaiB は KaiC に結合し、KaiB-KaiC 複合体にリン酸化促進因子である KaiA がトラップされることでネガティブフィードバックとなり、安定した振動が生まれる (Nishiwaki et al., 2007)。さらに KaiC が ATPase 活性をもっていることも発見され、KaiC の ATPase 活性が概日時計を機能させる最も基本的な活性であると考えられるようになった (Terauchi et al. 2007)。

(4) 私は、KaiC のリン酸化を促進する KaiA を過剰に発現するシアノバクテリアを使った解析から KaiC リン酸化サイクルが阻害されても、遺伝子発現に概日リズムが存在することを発見した (Kitayama et al., 2008)。さらにリン酸化修飾がおこらない KaiC 変異体を用いた解析から、リズム形成と *kaiC* 遺伝子発現のフィードバック制御には KaiC のリン酸化が必要ではないこともわかった。これらの結果から、シアノバクテリアの概日時計機構は、時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC を基盤とする二つの振動発振経路が存在することがわかった。

2. 研究の目的

(1) 概日時計を持つ最も単純な生物であるシアノバクテリアの概日時計機構が二重の振動発振経路を持っていたことは、生物の時計は互いに補い合う複数の振動体が必要であることを示唆している。真核生物では“研究開始当初の背景”において述べたように時計遺伝子の転写翻訳フィードバックによって概日時計が動くと考えられているが、細胞なかで概日リズムを正確に安定に維持するためには、シアノバクテリアで発見された二重の振動機構が原核生物のみでなく生物に共通して存在することが考えられる。概日時計がどう組織化されたシステムなのかを知ることによって、幅広い生物に存在し、生物にとって重要な機能を担っている概日時計の仕組みを明らかにし、活用していくことができると考えられる。

(2) 二重の振動発振経路で構成されるシアノバクテリアの概日時計システムの全体像と、その意義を調べるため、本研究では振動発振経路の構造と信号伝達機構を調べるとともに、二つの振動発振経路がどのように相互作用しているかを解析することが目的で

ある。

(3) 二重の振動発振経路のうち一つは KaiC のリン酸化サイクルであると考えられる。KaiA が KaiC の自己リン酸化が促進し、逆に KaiB は KaiA を抑制することで KaiC のリン酸化状態が 24 時間周期で振動することがわかっている。しかし、もう一つの振動発振経路については、KaiA, KaiB, KaiC が必要であること以外には作動原理やシグナル伝達経路は不明である。そこで、本研究は KaiC リン酸化サイクルに依存せず機能する振動発振経路の実体、なにが時刻情報を保持し、どのように遺伝子発現の概日リズムへと伝達されるのかを解明することを目的とした。さらに、振動発振経路が二重であることが安定で正確な概日振動の維持に重要であることから、何らかのカップリングがあることが予想されるため、その相互作用機構の調査も行った。

3. 研究の方法

(1) KaiC リン酸化サイクルに依存せず機能する振動発振経路の構成要素の同定
—KaiC の ATPase 活性の解析—

シアノバクテリアの概日時計には時計タンパク質 KaiC リン酸化サイクルに依存しないで機能する振動発振経路があり、それは KaiA, KaiB, KaiC のなんらかの活性の変動を反映していると考えられる。

試験管内において KaiC は自己リン酸化活性、自己脱リン酸化活性および ATPase 活性をもっており、また 3 つの Kai タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC は複合体を形成することや KaiA と KaiB が KaiC の活性を調節することがわかっている。KaiC は ATP 加水分解のエネルギーによって構造変化がおこることで機能する RecA superfamily のメンバーであるが、KaiC の ATPase 活性は KaiA, KaiB と混合するとその活性変化が 24 時間周期で変動する。また、温度を変えても活性に大きな変化がないことがわかり、概日時計の重要な性質の一つである周期の温度補償性 (振動周期が温度の影響を受けないこと) が KaiC の ATPase に起因することもわかっていることから、概日時計を生み出す最も基本的な活性であると考えられる。さらに、KaiC は細胞でいくつかのタンパク質と複合体を形成し、その状態に応じて遺伝子発現が制御されると考えられることから、KaiC リン酸化サイクルに依存せず機能する振動発振経路においては ATPase 活性の変動に伴う KaiC の構造変化によって、KaiC を含む複合体構造が変化することで遺伝子発現がリズムに制御され、細胞に概日リズムが形成されるのではないかと考え、この仮説の検証を行った。

① KaiA は KaiC のリン酸化を促進するため、試験管内再構成系において KaiC に対する

KaiA の量を増やし KaiC をリン酸化状態で固定した状態をつくり、KaiC の ATPase 活性の測定を行った。KaiC リン酸化サイクルが存在しない KaiC[S431E;T432E], KaiC[K294H] を大腸菌発現系で発現、精製し試験管内再構成系で ATPase 活性を測定した。

② ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて試験管内再構成系において KaiC に対する KaiA の量を増やし KaiC をリン酸化状態で固定した状態における複合体形成の測定を行った。

(2) KaiC リン酸化サイクルに依存せず機能する振動発振経路の構成要素の同定—システム構成因子のスクリーニング—

シアノバクテリアの細胞においても KaiC は試験管内と同様にリン酸化脱リン酸化を繰り返すとともに、*kai* 遺伝子の発現や Kai タンパク質の量が時刻依存的に変動し、また KaiC の複合体サイズも時刻によって変化する。また、KaiC は直接に遺伝子発現を制御することではなく、KaiA, KaiB, KaiC によって形成された時刻情報は遺伝子発現制御機構に伝達されることで概日リズムが形成される。KaiC のリン酸化リズムに依存しない振動発振経路は Kai タンパク質のみによって試験管内で再構成することができる振動体によってではなく、細胞内での現象により、遺伝子発現の概日リズムが形成されていることも考えられる。

また、KaiA, KaiB, KaiC からの情報(リン酸化状態およびリン酸化状態に依存しない情報)を受け取る因子の探索も必ず必要である。

① シアノバクテリアの細胞を使って、KaiC のリン酸化リズムがない *kaiA* 過剰発現株における Kai タンパク質及び SasA の会合状態を、シアノバクテリアの細胞抽出液をゲルろ過カラムによって振り分けた後、Kai タンパク質抗体を用いてウエスタンブロットティングを行い Kai タンパク質の会合状態を調べた。

② リン酸化サイクル変異体 (*kaiA* 過剰発現株、KaiC リン酸化部位変異体) に変異導入し、リズムを失う変異体を生物発光リズムを測定し探索する準備を行った。

(3) 二つの振動発振経路 (KaiC リン酸化経路および KaiC リン酸化サイクルに依存せず機能する経路) の相互作用機構の解析

二つの振動発振経路が協同して機能することによって安定で正確な概日リズムが維持されると考えられるため、相互作用機構を分子レベルで明らかにするため、それぞれ一つの振動発生経路しか持たないシステム (試験管内再構成系、細胞の恒常明条件、恒常暗条件、KaiC のリン酸化状態を固定した条件) に温度および光変化を与え、その応答を観察

するため、測定方法の検討を行った。

4. 研究成果

本研究は、試験管内再構成系および、細胞の概日時計機構の構造を解析し、以下の成果を得た。

(1) KaiC の ATPase 活性とリン酸化脱リン酸化活性および Kai タンパク質複合体形成は相互に密接にカップリングしている。

KaiC は ATP 存在下で KaiA, KaiB と一定量比で混合すると、KaiC のリン酸化リズムが見られ、過剰量の KaiA を KaiB, KaiC と混合すると、KaiC は常にリン酸化状態で固定されリン酸化リズムは失われることがわかっている。さらに KaiC のリン酸化リズムが観察される条件においては、KaiC の ATPase 活性はリズムに変動する。そこで、過剰量の KaiA を KaiB, KaiC と混合し KaiC のリン酸化リズムを失わせた時に、KaiC の ATPase 活性にリズムが見られるかどうかを測定した。その結果、KaiC リン酸化リズムがないときには KaiC の ATPase 活性のリズムが見られなかった。リン酸化部位やリン酸化活性部位に点変異を導入しリン酸化がおこらない状態にした KaiC を精製し ATPase 活性の測定を行ったが、ATPase 活性は検出されたが、KaiA と KaiB と混合しても活性に振動は観察されなかった。

ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて試験管内における KaiC 複合体のストイキオメトリ計測実験を行った。KaiC のリン酸化リズムが観察される条件において、KaiA, KaiB, KaiC は 24 時間周期で会合と解離を繰り返しているが、過剰量の KaiA を KaiB, KaiC と混合し KaiC のリン酸化リズムを失わせた時には時間による会合状態の変動がなかった。KaiC のリン酸化リズムがない時には、KaiC の ATPase 活性のリズムがなくなり、Kai タンパク質の会合状態の変化のリズムもなくなるという以上の結果から、KaiC の ATPase 活性とリン酸化脱リン酸化活性および Kai タンパク質複合体形成は相互に密接にカップリングしており、細胞において観察されるリン酸化振動に依存しない概日リズムは Kai タンパク質のみによって試験管内で再構成することができる振動体によってではなく、細胞内での現象や他の因子を必要としていることが示唆された。

(2) 細胞における概日時計の実体の探索の準備

シアノバクテリアの細胞を使って、KaiC のリン酸化リズムがない *kaiA* 過剰発現株における Kai タンパク質の会合状態を調べた。その結果、細胞においては KaiC のリン酸化状態が固定されていても複合体形成にはリズム的な変動が見られることがわかった。また、複合体サイズやストイキオメトリは野生

型とはことなることもわかった。Kai タンパク質同士の相互作用は KaiC のリン酸化状態によって制御されていると考えられてきたが、実際には他の要素によっても制御されており時間依存的に複合体状態が変化することによって遺伝子発現が制御されていると考えられる。

そこで、KaiA, KaiB, KaiC からの情報を受け取る因子の探索を行うため、リン酸化サイクル変異体 (*kaiA* 過剰発現株、KaiC リン酸化部位変異体) に変異導入し、リズムを失う変異体を生物発光測定することで探索する準備を行っている。

(3) 今後の展望

本研究ではリン酸化サイクルに依存せず機能する振動発振経路の分子実体を明らかにすることはできなかった。しかし、それが細胞内での現象や他の因子を必要としており、二重の振動発振経路で構成されるシアノバクテリアの概日時計システムの全体像を調べるためには細胞内での解析を行うことが必要であることをみつけた。今後本研究で進めたスクリーニングを行うことおよび遺伝子発現制御機構における KaiC の役割を調べていくことによって細胞で働く安定正確な概日時計を理解し利用することができると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

①北山陽子、西脇妙子、近藤孝男 概日時計による細胞周期の制御・調節機構の解析 日本植物生理学会年会 2011年3月22日 仙台東北大学

②北山陽子、西脇妙子、近藤孝男 シアノバクテリア DnaA の概日時計機構における機能 日本植物生理学会年会 2010年3月21日 熊本大学

③北山陽子、西脇妙子、近藤孝男 シアノバクテリア概日時計調節因子 DnaA の研究 日本分子生物学会年会 2009年12月10日 横浜パシフィコ横浜

④北山陽子 ラン藻の概日時計の制御機構 かずさDNA研究所研究会 2009年12月4日 千葉かずさパーク

⑤北山陽子、近藤孝男 シアノバクテリアの概日時計—作動原理と細胞での動態 日本生化学会年会 2009年10月22日 神戸ポートアイランド

〔図書〕(計1件)

北山陽子 (大西武雄 監修) 朝倉書店 からだと光の辞典 シアノバクテリアの生物時計 2010年 p. 288-290 (総ページ数 421 ページ)

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計0件)

○ 取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

1) 研究代表者

北山 陽子 (KITAYAMA YOKO)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：20444367