

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770043

研究課題名(和文) 時計タンパク質 KaiC による細胞分裂制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of controlling mechanism of the circadian clock for cell cycle

## 研究代表者

北山 陽子 (Kitayama, Yoko)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20444367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアの概日リズム発生には、時計タンパク質 KaiC が中心的役割を担っていることがわかっている。本研究では KaiC に結合するタンパク質であり、DNA複製開始因子として知られる DnaA の解析を行った。dnaA を破壊しても細胞は生育が可能であったが、その概日リズムの周期が短周期になり、さらに、変異体において細胞分裂異常がおこることが示唆された。DnaA は、KaiC と相互作用して概日時計を調節するとともに、概日時計による細胞周期の調節機構の一部として働いているのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythm is an endogenous oscillations of physiological activities with a period of ~24 h. Many organisms have circadian rhythms and use the rhythms to enhance their fitness in a day/night changes. Cyanobacterium is only prokaryotes that have circadian rhythms. In cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, kaiA, kaiB and kaiC are essential genes for circadian rhythm generation. I analyzed about DnaA, which is known as DNA replication initiation factor in bacteria and is KaiC-association protein. The mutants with inactivated dnaA were viable, however, shortened the period of circadian rhythm in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. It was also found that there was relationship between DnaA and cell division and circadian clock. It is thought that DnaA modifies the circadian rhythm and cell cycle by interacting with KaiC.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：生物時計

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生物の様々な現象が、約24時間の周期をもって自律的に振動することはよく知られており、そのようなリズムを概日リズムと言う。概日リズムは体内にある概日時計という生物時計によって形成されており、昼夜変動という環境リズムに適応するために発達したリズム現象である。また、生物は環境リズムとは独立した細胞周期のリズムも持つ。細胞周期自体は外部環境とは独立して振動しているが、同時に概日時計に制御されている。

(2) 概日時計が時刻依存的に生理活性を阻害する現象は Gating と呼ばれ、細胞分裂が Gating されることは、紫外線による DNA 損傷の抑制や、発生や成長を環境に適応して調整するなど、生物にとって重要な役割を持つと考えられている。しかし、細胞分裂の Gating が起こる分子機構は、明らかになっていない点が多い。

(3) 様々な生物において概日リズムが観察されているが、酸素発生型の光合成を行うシアノバクテリアは、概日リズムが観察されている唯一の原核生物である。シアノバクテリアでは、*kaiA*, *kaiB*, *kaiC* という三つの時計遺伝子群が概日リズムを支配している。単細胞性のシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 でも、細胞分裂は概日時計に制御されており、夜の前半に細胞分裂が抑制されていることが知られている。さらに、細胞分裂時に細胞の中央に現れる細胞分裂装置(Zリング)の形成が、時間依存的に抑制されることが、シアノバクテリアにおける概日時計による細胞周期の調節機構となっていると考えられている。

(4) 概日時計タンパク質 KaiC は RecA / DnaB superfamily に属する ATPase であり、細胞分裂の Gating は、KaiC の ATPase 活性と相関していること、また、Zリング形成が KaiC の ATPase 活性の変異体において異常になることから、KaiC の ATPase 活性の変化が細胞分裂装置の関連因子の転写を調節することで、細胞の中央での Zリング形成を抑制すると考えられている。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、概日時計による細胞周期調節の分子機構解明のために、単細胞性のシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 をモデル系として、概日時計タンパク質 KaiC が、細胞分裂時に細胞の中央に現れる Zリング形成を時間的に調節する分子機構を明らかにすることを目的としている。

(2) 大腸菌や枯草菌における先行研究によって、Zリングを細胞の中央に正確に形成す

るためには、Min システムと Nucleoid Occlusion という二つの機構があることがわかっている。Min システムでは Min タンパク質が細胞膜上を振動しながら移動することによって細胞の両極における Zリングの形成を抑制するのに対して、Nucleoid Occlusion ではヌクレオイド上に一様に結合するタンパク質が、ヌクレオイド上に Zリングが形成されることを防ぐことによって、ヌクレオイド上での分裂を抑制し、染色体が正確に分配されると考えられている。

(3) シアノバクテリアでは大腸菌等と同様に Min システムが細胞極での分裂を抑制しているのに対して、Zリングがヌクレオイド上にも形成されることから Nucleoid Occlusion は機能していないと考えられてきた。しかし、最近の研究からシアノバクテリアでも、ヌクレオイド構造と Zリング形成には関連があることがわかったため、複数コピーのゲノムがあるシアノバクテリアでも、大腸菌ほど厳密ではないが、DNA 複製分配と細胞分裂がある程度協調して起こるために、ヌクレオイド状態によって Zリング形成を制御する機構が働いていると考えられるようになった。

(4) 私は、概日時計タンパク質 KaiC が DNA 結合能を持つことや、シアノバクテリアのヌクレオイド構造が約24時間周期で変化を繰り返していることから、KaiC は DNA に結合しヌクレオイド構造を制御することによって、遺伝子発現調節を介さずに、DNA の複製分配とある程度は協調して Zリング形成を制御するのではないかと考えた。

(5) そこで、ヌクレオイド構造とその時間的な変動に着目し、概日時計が細胞分裂を時間的に調節する分子機構について、時計タンパク質 KaiC が直接ヌクレオイドに作用して関与するのか、または細胞分裂装置の発現等を介して間接的に制御するのかを検証することを目的として解析をおこなった。

(6) さらに、概日時計による細胞周期制御機構の全貌を明らかにするために、概日細胞周期制御機構因子(Gating 因子)の探索を行うことも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 概日時計による細胞分裂制御機構にヌクレオイド構造の制御が関与するかを検証する。

ヌクレオイド構造と細胞分裂の時間変動を測定する。また、これらの間の因果関係を明らかにするため、ヌクレオイド構造を人為的に変化させ、影響を測定することを試みた。

明暗サイクルを与えることによって、

概日時計を同調させた *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を用いて、ヌクレオイド構造と細胞分裂、Z リングをあつくる FtsZ の局在をフローサイトメトリーや免疫蛍光顕微鏡法によって測定する。

阻害剤を添加することによって、ヌクレオイド構造を人為的に変化させる。また、転写阻害剤を添加することによって、細胞全体の転写を抑制しヌクレオイド構造を人為的に変化させ、その時のヌクレオイド構造と細胞分裂、FtsZ の局在をフローサイトメトリーや免疫蛍光顕微鏡法によって測定する。その結果をもとに、ヌクレオイド構造と細胞周期の関係を解析する。

(2) DnaA の細胞内での機能を細胞周期と概日時計の両面から解析する。

原核生物において複製開始因子として知られている DnaA が、概日時計タンパク質 KaiC と相互作用することを明らかにしたため(北山、未発表) DnaA の機能解析を遺伝学的、生化学的に行った。

*dnaA* 破壊株を作製し、概日時計および細胞周期への影響を測定する。*dnaA* の過剰発現株を作製し、概日時計および細胞周期への影響を測定する。

*dnaA* の機能ドメイン(DNA 結合モチーフ、ATPase モチーフ)の解析を行う。

大腸菌発現系を用いて *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の DnaA を精製する方法の検討する。

DnaA の特異的抗体の作製  
エピトープタグを付加した *dnaA* を *Synechococcus elongatus* PCC 7942 細胞で発現する系を構築する。

(3) KaiC と DnaA の結合に基づいて、概日時計タンパク質 KaiC による細胞周期制御機構を調べる。

DnaA と KaiC の相互作用を調べることで、KaiC が細胞分裂時に現れる Z リング形成を時間的に調節する分子機構を明らかにすること試みた。

KaiC と DnaA の *Synechococcus elongatus* PCC 7942 細胞内での相互作用を、免疫沈降法を用いて解析する。*in vitro* pull down 法を用いて KaiC と DnaA の相互作用解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 多くの生物は昼夜の環境変動に適応するため、体内に約 24 時間周期のリズムを発生する概日時計を持っており、シアノバクテリアは概日時計をもつ最も単純な生物とし

て知られている。これまでの研究からシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の概日リズム発生には *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* 遺伝子群が必須であり、特に時計タンパク質 KaiC が中心的役割を担っていることがわかっている。

(2) KaiC に結合するタンパク質のスクリーニングを行った結果、原核生物の DNA 複製開始因子 DnaA が同定された(北山、未発表)。そのため、DnaA のシアノバクテリアでの機能を細胞周期と概日時計の両面から解析し、DNA 複製開始因子である DnaA が概日時計の周期を調節していることを明らかにした。また、DnaA による周期調節は KaiC を介していることもわかった。

*Synechococcus elongatus* PCC 7942 の DnaA は原核生物に保存されている DNA 複製開始因子 DnaA と相溶性が高く、同様の機能を持つと考えられた。しかし、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 の *dnaA* を破壊して表現型を観察した結果、細胞は生育が可能であることがわかった。DNA 複製は生物にとって必須機能であるが、シアノバクテリアでは *dnaA* を破壊しても生育に影響はなかったため、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 の *dnaA* は DNA 複製開始因子としての機能をもたないか、もしくは、シアノバクテリアでは DNA 複製開始機構が大腸菌等とは異なっていることが考えられる。

概日リズム機構での機能を解析するために、*dnaA* 破壊株の概日リズムの測定を行った結果、リズムは発振していたが、その周期が短周期になることがわかった。

*dnaA* 変異体において細胞分裂が抑制されることが示唆された。これまでの研究から、細胞周期は概日時計に調節されており、KaiC の ATPase 活性が細胞分裂を調節することが示唆されている。本研究の結果から、DnaA は、KaiC と相互作用して概日時計を調節するとともに、概日時計による細胞周期の調節機構の一部として働いているのではないかと考えられる。

DnaA と KaiC の相互作用を明らかにするため、大腸菌発現系を用いて *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の DnaA と KaiC の精製を行い、*in vitro* pull down 法での解析、さらに DnaA の特異的な抗体を作製し、シアノバクテリア細胞内での相互作用を免疫沈降法で解析すること試みた。相互作用解析は、現在継続して行っている。

(3) これらの研究から、シアノバクテリア

においては、概日時計本体である時計タンパク質 KaiC が、DNA 複製開始因子のホモログである DnaA となんらかの相互作用しており、直接細胞周期を調節している可能性が考えられた。

細胞分裂装置と時計タンパク質との相互作用について、今後さらに調べることが必要である。また、概日時計による転写制御が基になり細胞周期が調節されている可能性についても、解析を進めることが重要である。

#### 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 4 件)

1. Nishiwaki-Ohkawa T, Kitayama Y, Ochiai E, Kondo T (2014) Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC Proc Natl Acad Sci USA. 111: 4455-4460 doi:10.1073/pnas.1319353111.

2. Umetani M, Hosokawa N, Kitayama Y, Iwasaki, H (2014) Hypersensitive photic responses and intact genome-wide transcriptional control without KaiC phosphorylation cycle in the Synechococcus circadian system. J. Bacteriol. 196: 548-555 doi: 10.1128/JB.00892-13

3. Kitayama Y, Nishiwaki-Ohkawa T, Sugisawa Y, Kondo T (2013) KaiC intersubunit communication facilitates robustness of circadian rhythms in cyanobacteria. Nat. Commun. 4:2897 doi: 10.1038/ncomms3897

4. Imai K, Kitayama Y, Kondo T (2013) Elucidation of the role of Clp protease components in circadian rhythm by genetic deletion and overexpression in cyanobacteria. J. Bacteriol. 195: 4517-4526 doi: 10.1128/JB.00300-13

[学会発表](計 6 件)

1. 北山陽子、大川(西脇)妙子、近藤孝男「時計タンパク質による概日リズムの同調機構」、日本時間生物学会第 21 回年会、大阪、2014 年 11 月 7 日～11 月 9 日

2. 北山陽子、近藤孝男「時計タンパク質による概日リズムの同調機構」、第 38 回内藤コンファレンス、札幌、2014 年 10 月 7 日～10 月 10 日

3. 北山陽子、大川(西脇)妙子、本間道夫、近藤孝男「時計タンパク質による概日リズム

の同調機構」、第 52 回生物物理学会年会、札幌、2014 年 9 月 25 日～9 月 27 日

4. 北山陽子、大川(西脇)妙子、近藤孝男「シアノバクテリアの時計タンパク質 KaiC 六量体による概日リズム制御機構」、第 55 回日本植物生理学会年会、富山、2014 年 3 月 19 日

5. 北山陽子、西脇妙子、近藤孝男「時計タンパク質 KaiC の 6 量体としての活性制御機構とその機能」、日本時間生物学会第 20 回年会、大阪、2013 年 11 月 9 日

6. 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」、日本時間生物学会第 19 回年会 2012 年 09 月 15 日～2012 年 09 月 17 日札幌

[図書](計 0 件)

[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  
<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~bunshi4/fourth.html>

#### 6. 研究組織

(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

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：