

戦略的創造研究推進事業
発展研究 (SORST)

研究終了報告書

研究課題

「KaiC リン酸化サイクルによる生物時計の計時機構」

研究期間：平成 17 年 11 月 1 日～
平成 20 年 3 月 31 日

研究代表者：近藤孝男
(名古屋大学大学院理学研究科・教授)

1. 研究課題名

KaiC リン酸化サイクルによる生物時計の計時機構

2. 研究実施の概要

概日時計は生命に共通する基本機構でありが地球で効率良く生活するために多様な機能を果している。我々はシアノバクテリアの概日時計を3つの蛋白質とATPで再構成することに成功し、その生化学的解析を進めた。SORSTの研究では *in vitro* の再構成系を利用し、KaiC のリン酸化サイクルの解析を集中的に行い、以下の4つの重要な知見を得た。1) KaiA と KaiB は独特の様式で KaiC と相互作用し、リン酸化サイクルを進行させている。また KaiC の6量体間でのモノマーの入れ替えが特定の位相で起こることを示し、これがリズムの安定性に大きく貢献していることを明らかにした (Mol Cell 2007)。2) KaiC は2つの隣り合ったセリンとスレオニンがリン酸化される。部位毎にリン酸化を解析し、片方のリン酸化が相互に他方のリン酸化を制御することで、リン酸化サイクルが進行すること明らかにした。これは KaiC 分子内に弾み車的な性質が潜んでいることを意味している。3) ATP の消費を詳細に解析し、1日に16個という極めて遅く、しかも温度の影響を受けない安定した ATP 分解活性を見いだした。この活性はリン酸化サイクルが進行する条件ではリズムを示すが、停止した状態でも保たれる。さらに周期の変異体による解析からこの活性は周期の逆数(すなわち時計の速さ)と正比例関係を示し、この ATPase 活性が概日時計の周期を決定する最も根源的なものであることを示した。先に述べたように概日時計は24時間周期をもつことに生理的意義があるが、その周期が ATP の分解により直接規定されているということは全く新しい知見であり、他の生物の時計研究に大きな影響を与えると思われる。4) さらに我々は *in vitro* の KaiC のリン酸化サイクルの安定性の解析を行ない、異なった時刻の KaiC 間で速やかに同調がおこることを発見した。これは全く予期しなかった現象であるが、細胞内で KaiC のリン酸化サイクルが機能するために不可欠の機能であり、KaiC 六量体間でモノマーの交換が行なわれることが基礎となっていることが示された。

一方、KaiC は細胞内ではゲノムの状態もしくは基本転写装置を制御し、包括的な遺伝子発現のリズミックな制御を実現している(PNAS 2004a)。概日時計システムは細胞が環境に適応して行くために不可欠な時間コーディネーターであり、細胞活動全般に広範な影響を持つ。これまでに細胞内での KaiC の遺伝子発現制機能を仲介する因子を探索し、2つの重要な遺伝子(*rpaA* と *labA*) を明らかにした。

3. 研究構想

試験管内で概日振動は世界初のものであり、生命が時間を計るという複雑なメカニズムが3つの蛋白質に組み込まれていることを証明したものである。では、どのようにして KaiC のリン酸化サイクルが成立するのか? SORST のプロジェクトにおいて、我々は、このシステムを、生化学、物理化学的に解析することを、第一の目標とした。将来 Kai 蛋白質の構造解析も加えれば、生物が時間を測定する原理について最終的な解答を得ることも期待できよう。また情報素子としての蛋白質の新たな機能を理解することにもつながる。

一方、シアノバクテリアでは概日時計は遺伝子発現を包括的に制御することが判っており、このサイクルは細胞内で kai 遺伝子および時計関連遺伝子を制御し、生理的な機能を実現していると考えられる。逆にその細胞内のリズム的な変動はこのサイクルの安定性向上と昼夜サイクルへの同調を実現していると考えられる。すなわち、新たに解明されたこのサイクルを核にしたシアノバクテリアの概日システム解明このプロジェクトのもう一つの課題である。

具体的な研究計画およびその方法は当研究室のこれまでの蓄積を出来るだけ活かし、生化学的機能の解析 (Kai 蛋白質間の相互作用、KaiC リン酸化の仕組み、ATP 分解との関連) を中心とし、一方、概日振動の動的解析、多数の突然変異の解析などを組み合わせて進める。

一方、細胞内での KaiC の機能については当研究室でこれまで行なわれてきた KaiC の遺伝子発現制御メカニズムの解明に重点を置く。なおサブグループ毎の構想は該当しない。

4. 研究実施内容

(1) in vitro の再構成系を利用した、これまでの KaiC のリン酸化サイクルの解析

以下の4つの重要な知見を得た。これらは概日時計についてこれまでの概日時計のパラダイムとは全く異なった視点を提供するものである。

1) KaiC リン酸化サイクルにおける KaiA, KaiB の相互作用

リズムは KaiA, KaiB の協調的作用によって形成されている。そこで KaiC のリン酸化と Kai 蛋白質間相互作用の生化学的解析を行った。KaiABC 蛋白質のリズム的な複合体形成ダイナミクスを定量に解析し、KaiC に対する KaiA, KaiB の結合親和性と結合速度の違いを見だし、KaiA と KaiB が独特の様式で KaiC と相互作用し、リン酸化サイクルを進行させているシナリオを解明した。また KaiC の6量体間でのモノマーの入れ替えが特定の位相で起こることを示し、これがリズムの安定性に大きく貢献していることを明らかにした。(Mol Cell 2007)

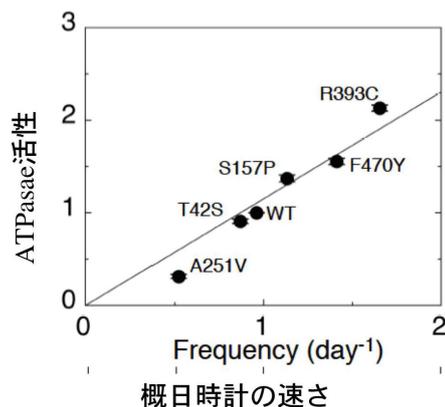
2) KaiC のリン酸化プログラムの解明

KaiC の2つのリン酸化部位(セリン[S431]とスレオニン[T432])の意義を解明するため、質量分析法および改良 SDS-PAGE 法により KaiC の2つの部位のリン酸化状態を分別して調査した。その結果、リン酸化はまず T432 が単独でリン酸化され、次に S431 の両方がリン酸化されること、脱リン酸化もまず T432、次に S431 の順でプログラムされていることを明らかにした。この時間プログラムのメカニズムを調べるため、T432 および S431 にリン酸化状態および脱リン酸化状態を模倣する突然変異を導入し、そのリン酸化を調べたところ、各ステップが次を促進することが確認され、リン酸化サイクルが KaiC 分子内の「弾み車」的性質で進行することを解明した。さらに S431 のリン酸化状態が KaiC の活性を自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性の間でスイッチすることが明らかとなった。すなわち二つのリン酸化部位は KaiC 分子内に組み込まれた、リン酸化リズムの発生装置であると考えられる (Nishiwaki et al.; EMBO J 2007)。

3) 周期を規定する KaiC の ATPase 活性

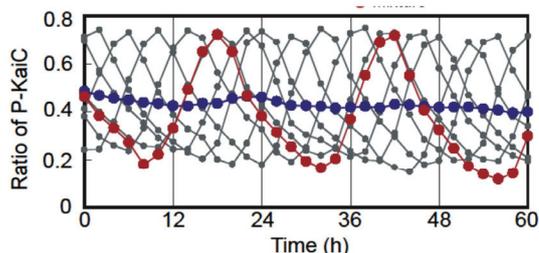
時計タンパク質 KaiC には、2つの ATP 結合モチーフがあり、ATP 依存的にリング状の 6 量体を形成する。この構造は recA などの ATPase と類似するがこれまで KaiC の ATPase 活性は検出されていなかった。そこで HPLC を用いて KaiC の ATPase 活性を経時的に測定した結果、KaiC には非常に低い ATPase 活性 (KaiC 1 分子が 1 日に加水分解する ATP はわずか 16 分子) があることが明らかになった。驚くべきことに、この微弱な活性は温度の影響を受けない極めて安定なものであり、周期変異型 KaiC の活性の解析から概

日時計の振動数 (周期の逆数、即ち時計の速さ) と KaiC の ATPase 活性は正比例することが明らかになった。先に述べたように概日時計は 24 時間周期をもつことにその生理的意義があるが、その周期が ATP の分解により直接規定されているということは全く新しい知見であり、他の生物の時計研究に大きな影響を与えると思われる (Terauchi et al.; PNAS 2007)。



4) KaiC リン酸化リズムの自己同調機構

KaiC リン酸化リズムは 10 日以上減衰せずに観察される。このような正確で頑健な振動はいかにして達成されているのか。まず、位相が 4 時間ずつ異なる再構成系を等量 6 つ混合してみた。混合試料ではリン酸化状態は平均化されリズムは消失するという予想に反し、振動は特定の位相から混合前と全く変わらない明瞭なリズムを示した。これは KaiC リン酸化リズムのシステム内部に同期機構が存在し、位相の異なる KaiC を同位相にそろえる事が可能であることを示している。二種類の蛍光色



リン酸化リズムの同調 6つの異なった時刻のKaiCを混合する。予測では平均化され青のカーブが期待されるが、実際は赤のようにリズムが同調する

素で標識した KaiC を混合し経過を観察した結果、脱リン酸化初期の KaiC は他の位相を自分の位相に引き込むことが明らかとなった。この同期現象がみられるためには、KaiC 振動子間のコミュニケーションが必要であるが、我々はこのコミュニケーションの分子の実体が KaiC 六量体間の単量体交換 (モノマーシャッフリング) であることを免疫沈降法により確認した。重要な点は、この現象はリン酸化状態の異なる KaiC の混入という擾乱に対して安定性を有しているということの意味し、新規の KaiC の合成が予想される細胞内で KaiC リン酸化リズム安定して持続することを可能とするものである (Ito et al; Nature Struct. Mol Biol 2007)。

(2) 細胞システムとしての概日時計

一方、DNA マイクロアレイが実用化される以前に、生物発光遺伝子によりゲノム中のほとんどの遺伝子発現をリアルタイムで測定する方法を考案し、細胞活動全体が時計により調整されていることを示した。(Gene & Dev. 1995)。さらに KaiC はゲノムの状態もしくは基本転写装置を制御し、包括的な遺伝子発現のリズミックな制御を実現していることを示した (PNAS 2004a)。これらの研究は概日時計システムは細胞が環境に適応して行くために不可欠な時間コーディネーターであり、細胞活動全般に広範な影響を持つことを明らかにしたものとして、高く評価されている。最近では KaiC リン酸化サイクルによる遺伝子発現制御機について解析を進め 2 つの重要な遺伝子を明らかにした。

1) rpaA の解析

ヒスチジンキナーゼ SasA は KaiC 結合蛋白質として同定され、概日遺伝子発現の安定化因子である。SasA に対応するレスポンスレギュレーター RpaA を同定した。rpaA を遺伝子破壊すると sasA と同様に、ほぼ全ての遺伝子発現が劇的に低下した。さらに、試験管内において、SasA と RpaA 間のリン酸基転移活性は生物時計の本体である KaiC の概日リン酸化状態に応じて 24 時間周期で概日振動することがわかった(PNAS 2006)。

2) labA の解析

KaiC は自分自身を含む概日発現遺伝子の抑制効果を持つ。この抑制機能に関わる因子を探索し、labA 遺伝子を得た。sasA, rpaA 両遺伝子との遺伝的エピスタシス解析から、labA は sasA とは独立に rpaA の上流で働くことが示された。すなわち Kai 振動体の出力経路として少なくとも二つの独立な経路があり、それらが RpaA を介して最終的な転写制御を行うモデルを提唱した。これらの研究は概日時計から転写制御へつながる出力系の大枠を明確に示した初めての成果となった (Gene & Dev 2007)。

3) KaiC による転写制御の速度論的解析

シアノバクテリア細胞内で KaiC のリン酸化状態の変化により、転写促進と転写抑制を交互におこし、安定した KaiC リン酸化リズムに必要な KaiC 量を維持するとともに、その転写翻訳フィードバック制御の時間経過が KaiC リン酸化サイクルと共鳴し、細胞の安定した概日振動を成立させていることを示した (J. Bacteriol 2008)。

4) KaiC による転写制御サイクル

KaiC のリン酸化状態を固定した細胞でも温度補償された自律振動が発生することを見出した。この転写制御サイクルの周期は KaiC により支配されており、KaiC の未知の機能による細胞内振動機構が示された。さらに低温では KaiC のリン酸化サイクルと転写制御サイクルが協同して、細胞の概日振動を維持していることを見出した。(Gene & Dev in press)

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

現在、哺乳類を含む様々な生物で概日時計の基本原理解明のための解析が行われているが、我々のシアノバクテリアの解析は既にこの問題を 3 つの蛋白質のみの問題に還元しており、さらに KaiC の中に時間を正確に計ることが出来ることが示されている。まさに KaiC は真の時計蛋白質である。この点だけでシアノバクテリアの研究が他の生物の概日時計の解析とは異なったレベルにあることは明白である。シアノバクテリアの概日

時計の解析は研究代表者が中心となって開発してきたものであり、遺伝学的、生理学的解析、生化学的においても常にリードしてきた。我々は常に生理・生化学的機能を前提に研究を進めており、構造生物学やモデル・シミュレーション的方法は行ってこなかった。

3つの Kai 蛋白質の構造は2004年までに決定されており、その構造から機能についていくつかの議論が行われているが、生化学的機能とは必ずしも関連した研究とはなっていない。我々は研究の進展に従って、構造生物学やモデル・シミュレーション的方法を導入するが、あくまでも蛋白質の生化学的機能とその生理学的意義を前提に研究を展開したいと考えている。

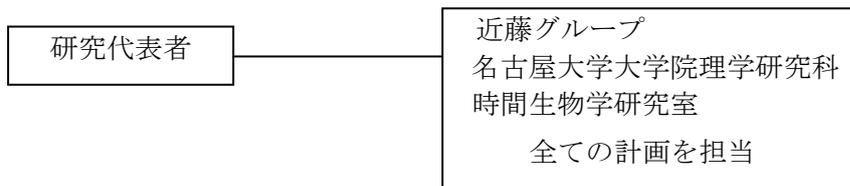
我々の研究と関連する KaiC のリン酸化サイクルの解析は、米国の Johnson らのグループ、O'Shea のグループにおいて、異なった方法で行われているが報告されているが、その結果は概ね、我々の結果を支持するものである。

なお、*in vitro* の実験系の報告以後、その数理解析が活性化し、これまでに国内、海外を含め、10 報程度報告されている。Nakajima 2005、Kageyama 2006、および Kitayama 2003 のデータをもとに、なぜ安定したリズムが KaiA、KaiB、KaiC および ATP を混合するだけで発生するのかをそれぞれ独自の理論で説明を試みている。これらは示唆に富むものであるが、必ずしも我々の生化学的解析とは関連していない。主なものを以下に概説する。

- 1) 我々は Kageyama 2006 において、KaiC 6 量体間で、単量体の交換反応がおこることを実験的に証明したが、この反応が系内の KaiC の同調に必須であることが、Emberly et al 2006, Mori et al 2007, Yoda et al 2007 において数理的に示されている。
- 2) Mehra et al 2006 および Kurosawa et al 2006 においては、Kai タンパク質間相互作用がリズム発生に必須であると仮定し、双安定となるパラメーター、および振動がおこるパラメーターが決定されている。
- 3) Takigawa-Imamura et al 2006、Clodong et al 2007 では、Kai タンパク質複合体の形成および解消をいくつかの素過程にわけ、リズム発生機構をこれらの過程間でおこるネガティブフィードバックにより説明している。
- 4) Mori et al 2007、Yoda et al 2007、van Zon et al 2007 においては、Kai タンパク質間相互作用に加えて、KaiC 自身のアロステリック構造変化も含めてリズム発生機構を説明している。

6. 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

①近藤グループ (全計画)

近藤グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
近藤孝男	名大院理学研究 科生命理学専攻	教授	研究統括	17年11月~20年3月
小山時隆	名大院理学研究 科生命理学専攻	助教	リン酸化サイクルの生 化学的解析	17年11月~20年3月
北山陽子	名大院理学研究 科生命理学専攻	助教	リン酸化サイクルの生 化学的解析	18年6月~20年3月
中嶋正人	名大院理学研究 科生命理学専攻	JST 研究員	リン酸化サイクルの生 化学的解析	17年11月~18年3月
寺内一姫	名大院理学研究 科生命理学専攻	研究員	リン酸化サイクルの生 化学的解析	17年11月~20年3月
大川妙子	名大院理学研究 科生命理学専攻	研究員	リン酸化サイクルの生 化学的解析	17年11月~20年10月
陸田径典	名大院理学研究 科生命理学専攻	研究員 (JSPS)	KaiC リン酸化サイクルに よる遺伝子発現制御機構	17年11月~20年10月
景山伯春	名大院理学研究 科生命理学専攻	研究員	リン酸化サイクルの生 化学的解析	17年11月~18年3月
高井直樹	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生 研究員	KaiC リン酸化サイクルに よる遺伝子発現制御機構	17年11月~19年3月
伊藤浩史	名大院理学研究 科生命理学専攻	受託大学院生 (東工大)	KaiC リン酸化サイクル の反応機構のモデル	17年11月~20年3月
村山依子	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	KaiC リン酸化サイクルに よる遺伝子発現制御機構	17年11月~20年3月
三輪久美子	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生 研究員	リン酸化サイクルの生 化学的解析	18年4月~20年3月
芹川雅之	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	リン酸化サイクルの生 化学的解析	18年4月~20年3月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

なし

(2) 招聘した研究者等

なし

8. 発展研究による主な研究成果

(1) 論文発表 (英文論文 9 件 邦文論文 0 件)

Kageyama T, Nishiwaki T, Nakajima M, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T (2006) Cyanobacterial Circadian Pacemaker: Kai Protein Complex Dynamics in the KaiC Phosphorylation Cycle *In Vitro* Mol. Cell 23:161-171

Takai, N., Nakajima, M., Oyama, T., Kito, R., Sugita, C., Sugita, M., Kondo, T., and Iwasaki, H., (2006). A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 12109-12114

Taniguchi Y, Katayama, M, Ito R, Takai N, Kondo T, Oyama T. (2007) *labA*: a novel gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC, *Genes & Dev* 21:60-70

Nishiwaki, T, Satomi Y, Kitayama Y, Terauchi K, Kiyohara R, Takao Toshifumi, Kondo T: A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J* (2007) 26, 4029-4037. (2007)

Terauchi K, Kitayama Y, Nishiwaki T, Miwa K, Murayama Y, Oyama T, Kondo T: The ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* (2007) 104, 16377-16381

Ito H, Kageyama H, Mutsuda M, Nakajima M, Oyama T, Kondo T: Origin of the resilience of the cyanobacterial circadian clock, *Nature Struct Mol Biol*(2007) 14, 1084-1088

Murayama Y, Oyama T, Kondo T. (2007) Regulation of Circadian Clock Gene Expression by Phosphorylation States of KaiC in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 190:1691-8

Kondo T (2008) A cyanobacterial circadian clock based on the Kai oscillator In *Clocks and Rhythms* Edited By Stillman B and , Stewart D, *Cold Spring Harbor Laboratory press (Review)*

Kitayama Y, Nishiwaki T, Terauchi K, Kondo T. (2008) Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of cyanobacteria, *Genes and Dev*, in press

(2)口頭発表

①学会

国内 46 件, 海外 13 件

②その他

国内 7 件, 海外 5 件

(3)特許出願 (本研究に係わり、JST から出願したものとで研究機関から出願したもの)

なし

(4)その他特記事項

新聞記事

1. 平成 18 年 2 月 10 日 朝日新聞 夕刊 8 面 生物時計、解明進む
2. 平成 19 年 10 月 01 日掲載 日経産業新聞、「生物の体内時計の周期 たんぱく質関与」
3. 平成 19 年 10 月 08 日掲載 朝日新聞、「生物時計の周期 決める仕組み解明」
4. 平成 19 年 10 月 29 日掲載 日経産業新聞、「微生物のリズム刻むたんぱく質 時刻合わせの仕組み」
5. 平成 19 年 11 月 02 日掲載 朝日新聞、「体内時計 秘密に迫る」
6. 平成 19 年 11 月 08 日掲載 中日新聞、「生物時計の 24 時間周期 タンパクがクオーツ役」
7. 平成 19 年 11 月 09 日掲載 中日新聞 中日春秋にて
8. 平成 19 年 12 月 17 日掲載 四国新聞、「体内時計の仕組み解明 酵素が刻む 24 時間のリズム」
9. 平成 19 年 12 月 19 日掲載 福井新聞、「体内時計 酵素が刻む 活性周期 自転を記憶」

受賞 (近藤孝男)

平成 18 年 4 月 18 日 文部大臣表彰科学技術賞 文部大臣

平成 18 年 9 月 18 日 日本植物学会学術賞 日本植物学会

平成 19 年 1 月 29 日 朝日賞 朝日新聞

平成 19 年 3 月 29 日 日本植物生理学会賞 日本植物生理学会

9. 結び

研究の達成度と自己評価

SORST の研究は大変順調に推移したと考えている。*in vitro* の実験系の利点を活かし、蛋白質が安定した 24 時間の振動を発生するメカニズムについて 4 つの重要な知見を得ることが出来た。Kai 蛋白質間相互作用の解明、2 つのリン酸化サイトの相関などは KaiC 蛋白質の分子内に振動機構が内在することを示すものであり、他の生物の概日時計研究に比べ本質的に異なったレベルで時計機構を理解することに貢献することが出来た。さらに重要なことは KaiC の ATPase 活性が概日時計の特性である周期の安定性とその絶対値を特定していることを見いだしたことであろう。これは振動機構の解明よりはるかに重要な知見

でありその原理についてモデルを提出できたことは最も重要な成果といえよう。また、KaiC のリン酸化サイクルが細胞内での安定に機能するため、KaiC 六量体に同調機構が内包されていることの発見も全く予期しえなかった概日時計の巧妙さ示したのものとして、極めて重要な成果である。以上の成果は SORST 開始時にはほとんど予期しなかった発見であり我々自身大きな驚きの連続であったが、学会発表での反応も同様であった。これは *in vitro* の解析の賜物であろう。

一方、細胞内の解析も KaiC のシグナルを伝達する 2 つの因子の発見、KaiC の転写制御の速度論的解析、さらに KaiC のリン酸化サイクルが細胞内での安定に機能するための独立した転写制御サイクルの発見と、今後の細胞内の解析の基礎となる大きな成果を得たといえよう。

今後はこの成果をさらに発展させ、概日時計が設計できるレベルまで理解を深めたいと考えている。

今後の研究

今後の研究は *in vitro* の実験系を用いた KaiC リン酸化サイクルのメカニズムと細胞内での KaiC リン酸化サイクルの動態と機能の解明に集中したいと考えている

A. KaiC リン酸化サイクルのメカニズム

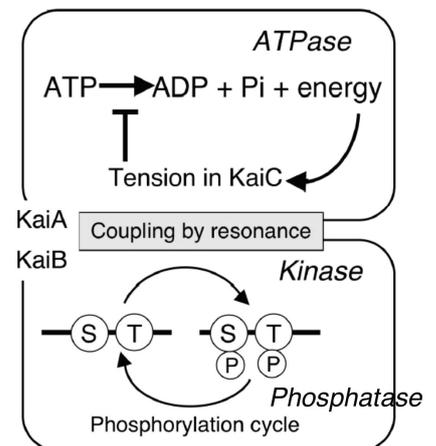
作業モデル (図) から想定される以下の仮説の検証を目指して解析を行う。

- 1) 潜在的にはもっと高い活性をもつ KaiC の ATPase 活性は、その加水分解エネルギーが KaiC 分子内に蓄積することにより、Tension を発生し、ATPase 活性を現在測定されるレベルまで抑制している。この分子内フィードバック抑制により、KaiC の ATPase 活性が温度補償された 24 時間周期を規定する。
- 2) 2 つの隣り合ったアミノ酸のリン酸化により実現された S431 のリン酸化により、KaiC 蛋白質はアロステリックな変位を生じ、KaiC の kinase 活性と phosphatase 活性が切り替わり、リン酸化サイクルが発生する。
- 3) KaiB の KaiC への結合は 2) のアロステリックな変位に連動して制御され、KaiA のリン酸化促進機能を調節する。
- 4) ATPase 活性と kinase-phosphatase 活性は KaiC のリン酸化状態、KaiA, KaiB の存在により、KaiC の微細な構造変化を介して、相互作用し、安定した自励振動を発生させる。

すなわち、分子下のレベルでも概日時計現象はシステムとして実現されていると考えられるが、この仮説の検証には高精度、高時間分解の構造生物学的解析と、自励振動モデルのシミュレーションが必要である。

当面の戦略はこの検証に必要な生化学的解析を中心とし、自励振動モデルのシミュレーションに必要なパラメーターを得ることめざす。

KaiCATPaseとリン酸化の共鳴



KaiC の構造生物学的解析

上記の諸機能は KaiC タンパク質が分子時計の本体であり、概日振動の発生機構は KaiC 六量体内部に存在することを意味している。したがって、KaiC の生化学的解析から導かれる機構を、KaiC の経時的な構造変化として証明することで、概日振動発生機構にせまることができると考えられる。そこで、(1) KaiC の ATPase 活性を制御する KaiC 内の分子構造の解明、(2) KaiC の ATPase 活性と kinase/phosphatase 活性の相互作用の解明、(3) KaiC のリン酸化状態によるアロステリック構造変化に伴う kinase/phosphatase 活性の切り替え機構の解明、を目ざす。

B. 細胞内での KaiC リン酸化サイクルの動態と機能

ヘキサマー間の引き込み現象は極めてユニークな現象であり、我々の解析により明らかになった概日時計の安定化のメカニズムである。この性質は細胞内で KaiC リン酸化サイクルが安定に機能するための重要な性質であり、分子（ヘキサマー）間での時間情報交換というシステムの解明が必要である。このため以下の解析を行う。

- 1) ヘキサマー間のモノマー交換のメカニズムを解明する。
- 2) 細胞内の KaiC の動態（合成と分解）を考慮に入れたシミュレーションを行い、安定性などのような条件が必要かを解析する。

つぎに概日時計の環境同調機構の解明するために以下の3つの解析を行う。

- ・試験管内再構成系を利用し、概日時計の中核である KaiC リン酸化サイクルを同調させる機構を解明する。すなわち、時計本体のリセット機構の解明
- ・外部環境が細胞内で概日時計の中核へ伝達される機構の解明する。
- ・1と2を統合し、シアノバクテリア概日時計の同調を試験管内で検証する。

期待される成果と将来展望

本研究は基礎研究である。従ってその応用面での展望は前述した範囲に止まるが、概日時計の基本原理の解明という観点からは、真核生物の概日時計研究に大きな意味を持つと思われる。Kai 蛋白質は真核生物に見られないので、そのまま適用することはあり得ないが、この研究の意味する点、すなわち翻訳後の過程が概日時計の特性を決定していることは重要な点である。すなわち、遺伝子発現のフィードバックループは、電気回路でいえば配線に相当するが、電気回路の機能はその構成要素の特性で決まるということである。システム生物学のゴールが生命現象の設計であるとするれば、概日時計の研究により本質的なことは翻訳後の蛋白質の機能であろう。

蛋白質の新たな機能

この研究が蛋白質の新たな機能を意味していることも前述したが、その活性が ATPase であることは、大きな意味を持っている。いうまでもなく ATPase は生命の最も基本的な酵素であるが、その機能はより高い活性をもつことが重要であると考えられてきた。しかし、KaiC は逆により弱い活性をもつように機能している ATPase といえよう。KaiC の解析は、これまで知られていなかった情報を扱う ATPase の機能を解明するきっかけになるかもしれない

CREST/SORST について

これまでの当研究室の研究は JST の支援を継続的に受けており、大変感謝している。CREST/SORST については選考も客観性の高いものであり、優れた制度である。戦略的重点目標については様々な側面があろうが、夫々の分野の基礎的な研究を常にカバーすることが重要であろう。

研究室のメンバー

