

近藤 孝男

名古屋大学大学院理学研究科・教授
名古屋大学高等研究院・院長

シアノバクテリアの概日システム

1. 研究実施の概要

昨年度までの解析から、シアノバクテリアの概日振動の特性を規定するものは KaiC の ATPase 活性であることが示された。20 年度はこの概日振動の基本振動の発生機構を解明する KaiC の ATPase 活性の構造生物学的理解に向け、研究体制を整備することを試みた。部分的な結晶構造の解明を達成した。一方、その機能的解析（環境同調機能、細胞システムとの相関）を進め、何れについても予期しなかった知見を得ることに成功し、論文として報告した。また KaiC の ATPase 活性の生化学的機能について多くの解析試み、今後の解析の基礎となる重要な成果を得た。

2. 研究実施内容（文中にある参照番号は 4.(1)に対応する）

KaiC の構造生物学

「シアノバクテリアの時計の周期」と「KaiC の ATPase 活性」に見出された相関は、時を生み出す機構が KaiC の立体構造に織り込まれていることを示唆する。この“構造生物学的からくり”を解き明かすべく、我々は X 線結晶構造解析を柱とした KaiC の構造解析を推し進めてきた。

対象となる KaiC タンパク質群については、単分散状態で試料調製するための基礎技術がほぼ確立した。野生型 KaiC や AA 変異体の結晶化条件を精力的にスクリーニングしてきたが、現在までのところ、回折実験に耐える大きさ・質を伴った結晶は得られていない。一方、KaiC の C 末端ドメインを切除した変異体 (CI) については、適切な結晶化条件を見出すことに成功した。現在、200~300 ミクロンの大きさまで結晶を成長させることが可能となり、回折実験を行うに十分な大きさの結晶調製に目途がついた。この結晶を実験室系の X 線発生装置を用いて調べたところ、結晶化に用いる沈殿剤や塩とは異なるタンパク質由来の回折点が観測され、間違いなく CI の単結晶が生成していることが確認された。

CI の回折実験を本格的に行うため、クライオプロテクトの選定と最適化を行った。

グリセロール、ショ糖、PEGなどについて種類と濃度を検証した。その結果、用いるクライオプロテクタントの種類には大きく依存しないが、濃度がある閾値を超えるとCI結晶が不安定化することが判明した。クライオプロテクタントの濃度が十分に稼げないと、X線による放射線損傷がより顕著となるため、回折実験や解析の際には十分な注意が必要になると予測される。CI結晶の安定性と放射線損傷のバランスを考慮しつつ、実験室系で回折データを収集した。試行錯誤の末、3.5 Åまでの分解能を有するデータセットを取得することができている。分子置換による初期位相の決定にも成功し、CIの全体形状やポリペプチド主鎖の配向が明らかとなりつつある。今後、結晶化条件やクライオプロテクタントの条件最適化を行い、更に分解能が高まるよう努める。

KaiCの生化学的機能解析

KaiC-AA (S431A/T432A) のATPase 活性

非リン酸化模倣変異体であるKaiC-AA (S431A/T432A) のATPase活性が野生型よりも高く、特にKaiA存在下においては野生型の約20倍に上昇することを見出した。さらに興味深いことに、KaiA存在下においてこの活性は一般的な酵素活性と同様に温度依存性を示すことが明らかになった。

KaiCのATPase反応における律速過程の同定

KaiCのATPase活性は15ATP/KaiC/Dayと低く抑えられている。化学反応の反応速度に大きく影響を及ぼすのは、反応の素過程のうちで最も遅い過程（律速過程）である。ATPase反応は少なくとも1ATP結合、2ATP加水分解、3リン酸の放出、4ADPの放出、の4つの過程から成っているものと考えられる。律速段階を明らかにするためには、これらの過程を測定する方法を確立する必要がある。今年度はATP加水分解過程、リン酸放出過程およびADP放出過程の測定法をほぼ確立した。

KaiC単量体調製法の確立

KaiC単量体は、律速過程を同定するための前定常状態の速度論的解析や、6量体内でのプロトマーの相互作用などを研究する上で欠かせないが、これまで*Synechococcus* KaiCの単量体は得ることができなかった。今年度は6量体として得られたKaiCをATP非存在下において低温でインキュベートすることにより、単量体を得る方法を確立した。

CIおよびCIIドメインの概日時計への寄与

それぞれのドメインのATPase活性部位の変異体を作成し、その影響を観察した。特にCIドメインの活性部位変異体においては、30℃でインキュベーションすることにより、ATP存在下においても6量体が単量体化することが明らかとなった。またこの変異体においてはATPase活性が低下するとともに温度補償性も失われていることが示唆された。これらのことから、正常な6量体構造はATPase活性およびその温度補償性に重要であると考えられる。

KaiCの6量体の構造とリン酸化の制御

KaiCの二カ所のリン酸化部位(S431, T432)は概日リズム発生に必須であり、KaiCリン酸化サイクルは前の段階の反応産物が次の段階の反応を促進することで進行し、S431のリン

ン酸化状態が KaiC の自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性を切り替えることが解っている(Nishiwaki *et al.*, 2007)。そこで KaiC の二カ所のリン酸化部位をリン酸化もしくは脱リン酸化状態に固定した変異型 KaiC を用いて、リン酸化状態に応答した KaiC の活性の切り替わりが KaiC の六量体内部でどのように制御されるのかを解析した。その結果、KaiC の自己リン酸化活性はプロトマーの境界において制御されること、また脱リン酸化活性については、KaiC の 6 量体の構造が変化し、6 量体内部で制御されていることが示唆された。

KaiC の概日時計機能の解析

リン酸化によらない 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 の未知の機能により、遺伝子発現が制御され、細胞内振動機構が駆動されていることが示された。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。(論文 1)

温度サイクルによる *in vitro* KaiC リン酸化リズムの同調

In vitro の KaiC リン酸化リズムを様々な温度サイクルに置くことで、位相が温度サイクルに同調することを見出した。同調のメカニズムの詳細な解析から、同調は温度シフトによる位相変位として予想されるもの一致することが明らかになった。すなわち、温度変化は KaiC 分子に直接刺激を与えることで、その振動発生機構を調整し、同調を可能とすることが示された。この事実は *in vitro* での KaiC の計時機能は概日時計の基本的性質である同調機能も満たしていることを示している。(論文 2)

3. 研究実施体制

(1)「近藤」グループ

①研究分担グループ長:近藤 孝男(名古屋大学、教授)

②研究項目

(1)KaiC の構造生物学

(2)KaiC の生化学的機能解析

(3)KaiC の概日時計機能の解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Kitayama Y, Nishiwaki T, Terauchi K, Kondo T. (2008) Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of cyanobacteria, *Genes & Development*.22, 1513-1521

2. Yoshida T, Murayama Y, Ito H, Kageyama H, Kondo T (2009)
Non-parametric entrainment of the *in vitro* circadian phosphorylation
rhythm of cyanobacterial KaiC by temperature cycle. PNAS 106, 1648-1653

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）