

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

本研究では、1)シアノバクテリアの時計蛋白質 KaiC に潜む概日振動発生機構を解明し、生命がいかにして24時間という地球の周期を蛋白分子内に取り込んだかという問題について最終解答を得ることを目指すとともに、2)上記の原振動がいかにして細胞内で機能し、多くの生理機能を実現しているかを解明し、この原振動の解明を基礎にして、細胞内でいかに概日システムを構成されているかを解明することを目指す。

本研究を支える3本柱は、KaiC の生化学的機能解析、構造生物学的解析、生物物理学の解析である。生化学的機能解析により KaiC の有する非凡な ATPase 活性を明らかとし、構造生物学的解析により ATPase 活性を制御する分子構造基盤を可視化し、そして生物物理学の解析により ATPase 活性や分子構造の時間発展(ダイナミクス)を捉える。これら3つの学問及び計測手法を統合的かつ相補的に駆使し、KaiC に取り込まれた 24 時間を生み出す分子機構を解明する。

今年度は、KaiC の ATPase 活性が分子内フィードバックにより制御されるという作業仮説のもと、フィードバック機構を解明するための方法論を構築し、その手法を駆使することで仮説の正しさを実験的に示すことができた。また、生物物理学の解析にも大きな進捗が見られ、ATPase 活性と関連した KaiC の動的構造変化の一端が解明された。今後も多面的なアプローチを継続することで、タンパク質の新たな機能を解明したい。

§ 2. 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

(名古屋大学理学研究科 教授、名古屋大学高等研究院 院長)

② 研究項目

・全計画

1 KaiC の生化学的解析

- 1-1 KaiCの ATPase 活性の解析
- 1-2 リン酸化サイクルと ATPase の共鳴
- 1-3 KaiC の CI および CIIドメインの機能分化
- 1-4 抑制変異のスクリーニング

2 KaiC の生物物理学的解析

- 2-1 KaiC の内部状態の計測
- 2-2 KaiC 六量体再構成過程の速度論的解析
- 2-3 FT-IR を用いたKaiC 構造変化の計測

3 KaiC のX線結晶構造解析

4 細胞内での KaiC 蛋白質時計の機能

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1 KaiC の生化学的解析

1-1 KaiC の ATPase 活性の解析

我々は ATPase 活性が分子内フィードバックを生じ、恰もバネのように自身の活性を抑制するという可能性を作業仮説とした。ATPase の自己抑制が KaiC 分子内で発生しているとすれば、タンパク質が機能的に生成後すぐに抑制がかりその経過を確認することは難しい。従って、我々の取得戦略は *in vitro* のリズムを位相変位させる刺激に対する応答を詳細に解析することである。詳細な解析の結果は KaiC の活性制御についての作業仮説(分子内フィードバック)を始めて実験的に示すものであった。

1-2 リン酸化サイクルと ATPase の共鳴

ATPase 活性とリン酸化活性両方を同じサンプルから高時間分解能で解析する技術的検討を行った。これまでの解析で、リズムが継続する状態で 2 つの活性が密接に関係していることが確認された。今後、どのように 2 つの活性が相関しているかを解析し、振動発生を検討する。

1-3 KaiC の CI および CII ドメインの機能分化

CI および CII ドメインの変異体を利用し、それぞれの ATPase 活性とリン酸化を調査した。構造から予測されるように ATPase 活性は主に CI に起因するようだが CII の変異も活性に影響を及ぼすことが確認され、2 つのドメインの重要性が確認された。

1-4 抑制変異のスクリーニング

KaiC の機能が異常となった変異体の抑制変異をスクリーニングし、それぞれについて興味深い変異を得た。今後、原子構造と機能の解析を進めるため、重要な手がかりになることが期待される。

2 KaiC の生物物理学的解析

2-1 KaiC の内部状態の計測

KaiC の ATPase 活性がリン酸化状態と共役して変化する点に着目し、リン酸化状態を反応軸とした KaiC の溶液構造変化を X 線小角散乱で検証した。KaiC はドーナツを 2 つ積み上げたような 2 重のリング状構造をしている。N 末端リングにある「周期を規定する ATPase 活性」の制御状態と密に連動して、もう片方の C 末端リング半径が膨らんだり、縮んだりを繰り返す。あたかも、心臓が拍動するかのように形状をリズムカルに膨張・収縮させることで、24 時間周期で時を刻むことが解明された¹⁾。また、このような KaiC の分子鼓動を蛍光分光法でリアルタイム追跡することに成功した¹⁾。

2-2 KaiC 六量体再構成過程の速度論的解析

KaiC 単量体とヌクレオチドを混合し、KaiC6 量体が再構成される過程を各種分光手法で追跡し、我々の作業仮説を支持する結果を得た。KaiC6 量体は ATP を徐々に加水分解することで自身に

構造歪みを蓄積することでフィードバックを実現していることが予測される。

2-3 FT-IR を用いたKaiC 構造変化の計測

温度変化に伴うKaiCの形態変化過程や, KaiC 単量体とヌクレオチドを混合した後の6量体再構成過程について, FT-IRを用いた時間分解計測を行った。

3 KaiC のX線結晶構造解析

全長 KaiC について3~4つの有望な結晶化条件を見出すに至っている。現在, 高分解能結晶核の生成や成長速度を最適化するため, フェムト秒レーザー照射や溶液攪拌を用いた結晶成長法を試みている。

一方, KaiC の一部を切除した変異体(ΔKaiC)については, 構造解析に耐えるレベルにまで結晶化条件を最適化することができ, 分子内フィードバックに関連すると思われる構造基盤が見出されつつある。

4 細胞内での KaiC 蛋白質時計の機能

細胞システム内での KaiC 蛋白質時計の同調は大変魅力的な課題であるが, 次ステップの解析の前提である基本振動の発生と6量体の動態の解明が進んでから行なうべきと判断し, 22年度はそちらに焦点を当てて研究を行った。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Murayama Y., Mukaiyama A., Imai K., Onoue Y., Tsunoda A., Nohara A., Ishida T., Maéda Y., Terauchi K., Kondo T. and Akiyama S., “Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution”, *The EMBO Journal*, **30**, 68-78, 2011 (doi:10.1038/emboj.2010.298).
2. Ito H, Mutsuda M, Murayama Y, Tomita J, Hosokawa N, Terauchi K, Sugita C, Sugita M, Kondo T, Iwasaki H: Cyanobacterial daily life with Kai-based circadian and diurnal genome-wide transcriptional control in *Synechococcus elongatus* PNAS (2010), 106: 14168-14173