

研究代表者 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. 研究実施体制

(1) 「近藤」グループ

① 研究代表者: 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

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1 KaiC の生化学的解析

1-1 KaiC の ATPase 活性の解析

平成 22 年度末, 我々は ATPase 活性が分子内フィードバックによる制御化にあることを示す最初の実験データを得た. この結果は, フィードバック制御を恰もバネの力学的な復元力のように利用することで, KaiC が 24 時間の発振周期を分子内に閉じ込めている可能性を示唆するものであった. そこで平成 23 年度は, 「分子内にフィードバック回路が存在する」という主張を揺るぎないものとするため, ATPase 活性の生化学的解析をより定量的にかつ高い時間分解能で行った.

温度変化に対する ATPase 活性の応答を野生型と各種変異体について詳しく解析したところ, 温度補償変異体では分子内の制御回路に一部障害が生じている様子で, フィードバック制御がほとんど機能していないことが示された. この結果は, 「概日時計の周期の温度補償性」と「タンパク質分子内の生化学反応」の因果関係を証明した画期的な成果であり, 現在, 論文として取りまとめている (Takai N. et al. in preparation).

野生型と周期変異体の実験データを比較すると, 十分にフィードバック制御がかかるまでの時間に差が見いだされた. 各変異体について, 発振周期とフィードバック制御の速さには一定の相関が見いだされ, これはフィードバック制御からのズレがあたかも分子内の復元力のように働いていることを支持する重要なデータである. KaiC 分子内に作用している復元力について, その位相依存性や KaiA/KaiB を加えたときの応答について詳しく調べている.

1-2 リン酸化サイクルと ATPase の共鳴

H22 年度より, 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てきた. 一般的な酵素に比して, KaiC の有する ATPase 活性およびリン酸化活性は微弱であるため, 目的の達成には, 放射性 ATP を駆使した実験の技術改善が求められる.

微弱な活性の時間発展を定量的に捉えるためには, とにかく感度を向上させることが肝要となる. 現状として感度の制限となっていると考えられる因子は, 実験に使用する放射性 ATP に含まれる自然分解物 (放射性 Pi), 検出器 (イメージングプレート) のバックグラウンド, 読み出しノイズ, フェーディングなどである. 購入した放射性 ATP には自然加水分解物として微量の放射性 Pi が含まれているが, これがバックグラウンドとして信号に寄与してくると, KaiC に由来する微弱な変化の定量に差し支える. これまでは, ATP の特異的吸着材を用いて放射性 Pi 残存量を下げることができた. このような KaiC の ATPase 測定感度の向上および kinase の活性の測定時間分解能向上により, 調和振動を基礎とした自励振動発生モデルの検討を開始した. 温度ステップに対し, この2つの活性は速やかに反応し密接にリンクしていることが確認されたが, 今後さらに時間分解能向上をはかり, 自励振動発生機構を明らかにしたい.

1-3 KaiC の CI および CIIドメインの機能分化

本項目に関する H23 年度の主な成果は、KaiC の脱リン酸化過程について全く新しい反応機構が見つかったことである。我々は以前の研究で、KaiC が Ser431 と Thr432 の 2 ヶ所でリン酸化修飾を受けること、またそれぞれのアミノ酸がリン酸化・脱リン酸化されることで計4つのリン酸化状態を取ることを示してきた。KaiC の脱リン酸化ダイナミクスを定量的に解析したところ、リン酸基が非凡な反応機構に沿って KaiC 分子内を転移していることが明らかとなった¹⁾。現在、この新しい反応機構が生物時計の性質とどのように関係づけられるのか、注意深く研究を進めている。一方、KaiC の脱リン酸化過程を担う phosphatase 活性について、詳細な解析を行い、通常の phosphatase とは全く異なった反応機序を明らかにすることが出来た (Nishiwaki T & Kondo T, in press).

1-4 抑制変異のスクリーニング

H22 年度末に、KaiC の機能が異常となった変異体の抑制変異を *in vivo* スクリーニングすることに成功した。H23 年度は、抑制変異を有した Kai タンパク質を大腸菌内で発現させ、分離精製後にその諸性質を *in vitro* で詳しく検証した。

2 KaiC の生物物理学的解析

2-1 KaiC の内部状態の計測

KaiC に内在するトリプトファン残基からの蛍光は、フィードバック制御の根幹をなす KaiC の構造変化を捉える手法として、感度や時間分解能の両面から有用である。H23 年度は、ATPase 活性の過渡応答に付随した構造変化を捉える、活性部位近傍にトリプトファン残基を有する変異体を新たに設計した。トリプトファンは側鎖体積の大きなアミノ酸のひとつであるため、活性中心近傍への導入は、本来の機能を損なわないよう細心の注意を要する。幸い、生物時計の本質をある程度保った変異体が作成されたので、その変異体のフィードバック制御機構と蛍光強度、変異導入部位との相関を探っているところである。また、予定よりかなり遅れてしまったが、ATPase 活性を秒のスケールで分光学的に計測するシステムの開発に着手した。

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、我々の分子内フィードバック仮説を強く支持する結果を得た。すでに大よそのデータ収集は終了している。論文として取りまとめるべく、現在、補足データの収集を進めている。

2-3 FT-IR を用いた KaiC 構造変化の計測

計測系の安定性や感度を向上させるために長い時間を費やしてきたが、ようやく、フィードバック制御に対応する KaiC の構造変化を FTIR により実時間検出することに成功した。観察された赤外差吸収のアサインメントや各種変異体を用いた計測を精力的に進めている。

3 KaiC のX線結晶構造解析

KaiC の一部を切除した変異体について結晶化条件が最適化され, 分子内フィードバック制御の根幹となる KaiC の構造歪みの一端が解明された. 代表的な短周期変異体, 長周期変異体, リズム消失変異体については結晶構造解析が概ね済んでおり, 論文として取りまとめるべく生化学的な補足データを収集している.

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, 23 年度はそちらに焦点を当てて研究を行った.

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Shuji Akiyama, "Structural and dynamic aspects of protein clocks: How can they be so slow and stable?", *Cellular and Molecular Life Science* (in press).
2. Taeko Nishiwaki and Takao Kondo. The Circadian Autodephosphorylation of Cyanobacterial Clock Protein KaiC Occurs via the Formation of ATP as an Intermediate. *J Biol Chem.* 2012 in press