

平成25年12月13日

## 生物時計の安定性の秘密を解明

### 【概要】

名古屋大学理学研究科の北山陽子助教、近藤孝男特任教授らの研究グループは、光合成をおこなうシアノバクテリアの生物時計機構を解析し、時計タンパク質 KaiC が、安定な24時間周期のリズムを形成する分子機構を明らかにしました。

生物は、生物時計(概日時計)を利用して様々な生理現象を「時間的に」コントロールし、効率的に生活しています。概日時計を持つ最も単純な生物であるシアノバクテリアでは、KaiA, KaiB, KaiCという三つの時計タンパク質が概日リズムをつかさどっています。これまでの解析から、時計タンパク質 KaiC の6量体構造に基づく活性こそが概日時計の基盤であると考えられてきましたが、その仕組みは明らかではありませんでした。

今回、私たちは、KaiC は、自身のリン酸化状態に応じて6量体のサブユニット接触面の状態を変化させることによって、自らの活性を調節しており、この相互の調節によって KaiC の活性が同調されることを発見しました。この6量体内部の同調によって、非常に安定な 24 時間周期のリズムを形成されることがわかりました。サブユニット間相互作用によるリズム安定化機構は、生物時計が、大きな変化にさらされる細胞環境において、生理活性を正確に「時間的に」制御するために必須な性質である、と考えられます。

時計タンパク質の新たな機能を解明した今回の研究成果は、ヒトを含めた真核生物の生物時計の仕組みの理解や、時計を利用した生産性向上、医学・薬学分野の応用研究に展開する上での大きな手がかりとなることが期待できます。

本研究成果は 2013 年 12 月 5 日に英国科学雑誌「Nature Communications」に掲載されました。

### 【ポイント】

時計タンパク質 KaiC の活性制御機構を解明

KaiC6量体のサブユニット間の同調が安定したリズム維持の鍵

疾患等に影響する概日時計の制御システム構築の手がかりとなると期待

## 【背景】

生物にとって、昼夜や季節変動は非常に大きな環境変化であり、それに対応するために、生物時計(概日時計)を持っています。概日時計は、様々な生理現象を「時間的に」コントロールし効率よく生きることを可能にする、大変重要な生物機能です(図1)。概日時計は、幅広い生物で見いだされており、時計が損なわれると広範囲な生理活性の調節に障害がおよび、例えば、重篤な病気の引き金になることが指摘されています。そのため、概日時計がどのように時を刻み、生理活性を調節するのか、ということが世界中で活発に研究されています。

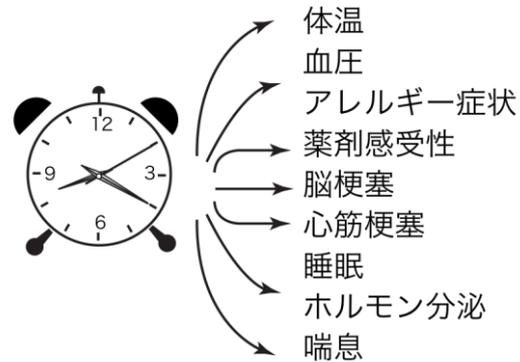


図1：生物時計が調節する人間の生活

私たち人間では、生物時計の働きによって様々な生理現象や疾病等が1日の中の特定の時刻に起こりやすいことが知られている。

シアノバクテリアは、概日時計を持つ最も単純な生物です。私たちは、これまでの研究から、KaiA, KaiB, KaiC という三つの時計タンパク質を ATP と混合すると、KaiC のリン酸化状態や ATP 加水分解活性が24時間周期で振動することを明らかにしてきました(図2)。試験管内での概日時計の再構成は、時計タンパク質の生化学的な性質こそが概日時計をつくっていることを示しており、この最も単純な実験系を用いて概日時計の分子機構の解明が期待されています。

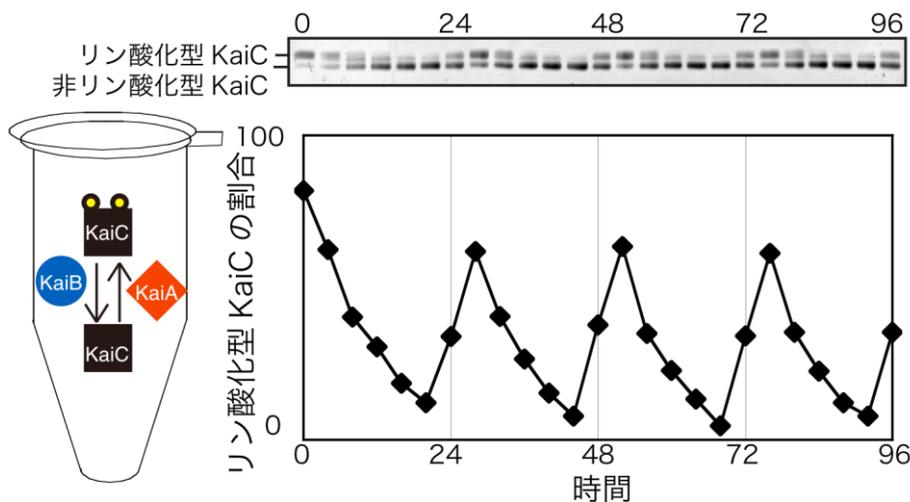


図2：試験管内での生物時計の再構成に成功

KaiC の持つ ATP 加水分解活性、自己リン酸化活性、自己脱リン酸化活性は概日リズムをつくる上で必須であり、それらが周期的に転換されることによってリン酸化状態変化のリズムが生じ、そのリズムに応じて遺伝子発現が制御されるため、KaiC の活性制御機構こそが概日時計の基盤であると言えます。KaiC は6つの同一のサブユニットがリング状に集合した6量体構造をとっており、その活性制御機構は6量体構造に基づくことが想像できます。しかし、これまでどのように KaiC の活性が6量体内部で制御されているのか、また6量体構造の機能的重要性は明らかではありませんでした。

## 【研究の内容】

### 1. 概日時計機構の基盤である KaiC の活性制御機構の解明

KaiC はセリン残基(S)とスレオニン残基(T)の二カ所がリン酸化されます。私たちは、KaiC の活性に重要なアミノ酸を変化させた KaiC の6量体を一度ばらばらにした後、混合し、6量体を再構成することによって、6量体構造としての KaiC の活性制御機構を解析しました。その結果、リン酸化、脱リン酸化反応はサブユニットの接触面でおこっており、リン酸化、脱リン酸化反応の結果として変化する二カ所のリン酸化部位のリン酸化状態に応じてサブユニットの接触面に結合しているヌクレオチドの状態(ATPとADP)が変化することによって、KaiC の活性が周期的に、リン酸化と脱リン酸化活性の間で転換されていることを発見しました(図3)。

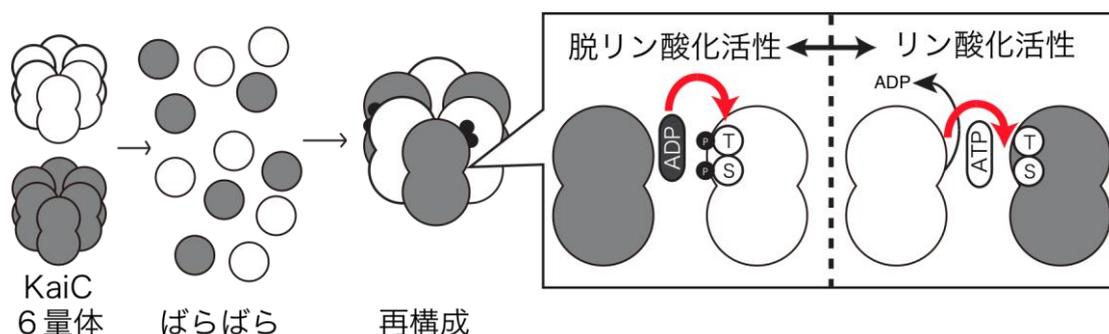


図3 : KaiC 6量体のサブユニット接触面における活性制御機構

### 2. KaiC の自己同調機構が安定した振動維持に寄与する

KaiC には活性部位である接触面が6つあるため、リン酸化反応がそれぞれの接触面で独立に制御される以外に、相互作用があることも考えられます。そこで、野生型の KaiC 6量体にリン酸化状態を固定した変異型 KaiC を一つだけ混ぜて相互作用を阻害し、KaiC のリン酸化リズムを測定しました。すると、興味深いことに、たった一つ変異型 KaiC が混ざっているだけで、概日リズムが失われることが解りました(図4)。

KaiC リン酸化リズムは非リン酸化状態からスレオニン(T)リン酸化状態になり、二重リン酸化状態になった後、セリン(S)リン酸化状態の順番で進行します。4つのリン酸化状態にそれぞれ固定した変異体と野生型 KaiC を混合した6量体の自己リン酸化活性を測定した結果、スレオニンリン酸化 KaiC は6量体の自己リン酸化活性を促進することで全体のリン酸化反応を進ませ、逆に、セリンリン酸化状態の KaiC は自己リン酸化活性を下げることで脱リン酸化反応を進ませ、この6量体内部での相互作用制御によって反応系は同調し安定な24時間周期の概日リズムを実現していることがわかりました(図5)。

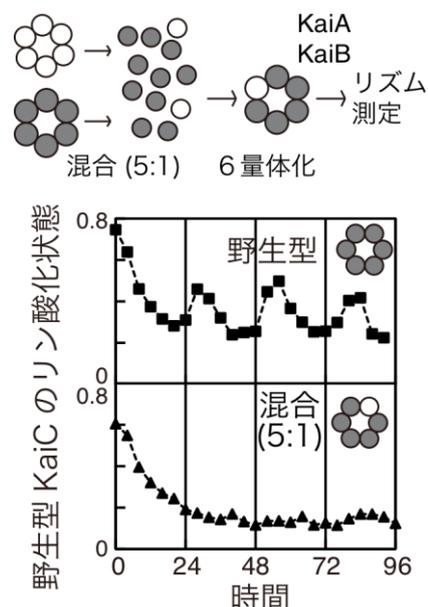
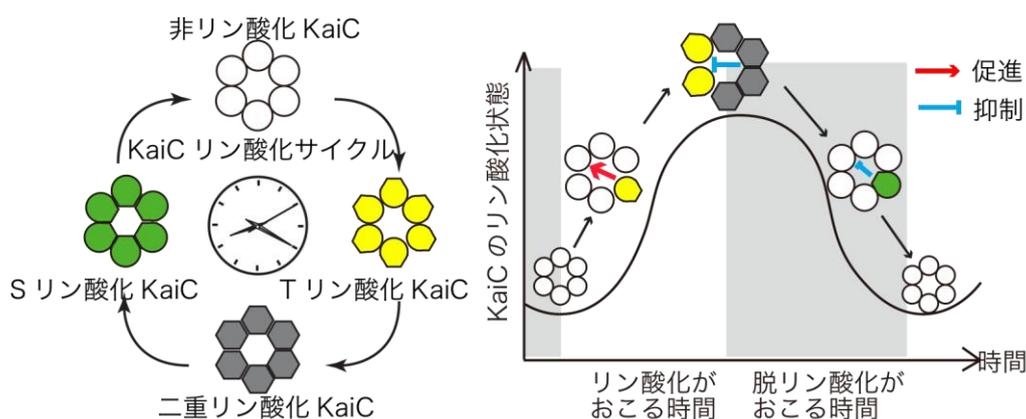


図4 : 6量体の相互作用が概日リズムには重要

この結果は、野生型 KaiC と変異型 KaiC の相互作用が概日リズムの維持に重要な役割を果たしていることを示しています。



**図5：6量体内部の相互作用によって KaiC は同調して振動する**

KaiC のリン酸化サイクルは4つのリン酸化状態を順番に繰り返している（左図）。この順番に振動が同調して持続するために、6量体の内部でリン酸化状態に依存してサブユニット間の相互作用が働いて自己リン酸化活性が制御されている（右図）。

細胞では光や温度のような外部環境、代謝の内部環境がたえず変動していますが、そのような動的な環境においても、概日時計は正確に時を刻んでいます。そのためには KaiC のタンパク質レベルでのリズムが安定であることが必要であると考えられています。今回明らかになった6量体内部における相互作用制御による安定な振動形成機構は、様々な生理活性を時刻依存的に制御するために必要不可欠な性質である、と考えられます。

### 【成果の意義】

従来、概日時計は時計遺伝子の転写・翻訳フィードバック制御によって振動を生み出していると考えられており、タンパク質だけでつくられる概日リズムは、シアノバクテリアのみの特異な現象と見なされがちでしたが、最近では高等動植物においても報告され、時計タンパク質による振動体の存在が一般的であると考えられるようになりました。本研究により解明された概日時計の動作原理は、高等生物の概日時計研究の手がかりとなると考えられるため、今後、さらにシアノバクテリアを用いてより詳細な解析を進めることによって、ヒトを含めた真核生物の概日時計の仕組みの理解にも重要な知見を与えることが期待されます。

また、概日時計機構は、光合成を始めとする様々な代謝機能を最適化するシステムと捉えることができます。時計タンパク質 KaiC の同調機構という新しい機能に基づく、振動の安定化機構を明らかにした今回の研究の成果は、将来、概日時計を利用して光合成能を向上させるなどの応用研究に展開する上での大きな手がかりとなり、農業分野に寄与することが期待できます。概日時計機構は動物にも広く見いだされることから、医学・薬学分野への応用や、時計の仕組みを分子スイッチの設計などに利用する合成生物学分野への応用も期待されます。

## 【用語説明】

### 生物時計(概日時計)

多くの真核生物とシアノバクテリアで観察されている、遺伝的に組み込まれ、自律的に動く時計機構。特に振動の周期が約24時間のものを概日時計と呼ぶ。概日時計の生み出すリズムを概日リズムと呼ぶ。

### 時計遺伝子

概日リズムを生み出すために必須の遺伝子のこと。シアノバクテリアでは *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* と名付けられた三種類の遺伝子が該当する。これらの遺伝子を破壊すると概日リズムは消失する。

### 時計タンパク質

時計遺伝子によってコードされる時計機能を維持するために必須となるタンパク質。時計タンパク質の変異や欠損により、生物のさまざまな行動のリズムが変化する。

### 転写・翻訳フィードバックモデル

時計遺伝子の転写が自身のコードする時計タンパク質によって抑制される、「ネガティブフィードバック制御」により、時計遺伝子の転写・翻訳のリズムが生まれ、それによって概日リズムが形成されるというモデル。

### ATP

アデノシン三リン酸。生物がエネルギー保存および利用に用いるヌクレオチドであり、「生体のエネルギー通貨」と呼ばれる。アデノシンという物質に三つのリン酸基が結合した形をしており、ATP加水分解酵素の働きによって、リン酸基がはずれ分解され、その過程でエネルギーを放出する。リン酸基が一つはずれたものをADPという。

## 【論文名】

雑誌名: Nature Communications

論文タイトル: KaiC intersubunit communication facilitates robustness of circadian rhythms in cyanobacteria