

時計タンパク質はどのようにして「1日」を記憶するか？ ～周期を0.6日から6.6日まで調節する時計タンパク質の アミノ酸の場所を発見～

名古屋大学大学院理学研究科、高等研究院の伊藤（三輪）久美子招へい教員、近藤 孝男特別教授らは、シアノバクテリアの生物時計タンパク質 KaiC の1つのアミノ酸の変更によって、試験管の中の生物時計の周期（通常は24時間）が1週間周期まで長くなることを発見しました。

生物は地球の自転に伴う昼夜の環境変化に適応するため、約24時間周期で振動する生物時計の仕組みを備えています。シアノバクテリアの生物時計は3つの時計タンパク質 KaiC、KaiA、KaiB から構成され、この3つを試験管の中で混ぜるだけで、約24時間周期のリズムを作り出すことができます。リズムの周期は KaiC タンパク質の酵素活性（ATP 分解活性）によって決まることが分かっていますが、その詳しいメカニズムは分かっていません。

今回、KaiC タンパク質の402番目のアミノ酸を変えるだけで、試験管内の生物時計の周期が最長1週間から最短0.6日まで大幅に変化することが分かりました。周期の大幅な変化は、KaiC の酵素活性（ATP 分解活性）が402番目のアミノ酸の大きさによって変化したことが原因でした。この発見は KaiC の402番目のアミノ酸は生物時計の周期を決める重要な位置であることを示しており、周期決定メカニズムの解明に向けた大きな発見です。また、タンパク質の1か所の変化だけで試験管内のリズムを1週間周期までのばすことができるという結果は、タンパク質の驚異的な調節能力を示したという点でも大きな発見です。

これまで生物時計は複数の分子の働きによって24時間を測ると考えられてきました。今回の結果は生物時計の周期はたった1つのタンパク質の中で決まることが示しており、これまでの常識を覆す発見です。生物時計はヒトからバクテリアまで共通性の高い現象であるため、タンパク質による時計メカニズムはヒトの生物時計にも当てはまる可能性があります。

この研究成果は、2020年8月3日付米国科学雑誌 *Proceeding of the National Academy of Sciences* オンライン版に掲載されました。

この研究は、JSPS 科研費『KaiC 生物時計の動作プログラム：2つの ATPase の協働の生理・生化学的解析』などの支援のもとで行われたものです。

【ポイント】

- ◇ シアノバクテリアの生物時計タンパク質 KaiC の 402 番目のアミノ酸を変えるだけで、試験管内の生物時計の周期（通常は 24 時間）が最長 1 週間から最短 0.6 日まで大幅に変化することを発見した。
- ◇ 周期が変化した原因は、KaiC の 402 番目のアミノ酸の大きさによって KaiC の酵素活性（ATP 分解活性）が変化することだった。
- ◇ KaiC の 402 番目のアミノ酸は生物時計の周期を決める重要な部位であり、この発見はタンパク質による周期決定メカニズムの解明に向けた大きな発見である。
- ◇ タンパク質の 1 か所の変化だけで試験管内のリズムを 1 週間周期までのばすことができるという結果は、タンパク質の驚異的な調節能力を示す。

【研究背景】

ヒトから植物、バクテリアまで、多くの生物は生物時計（体内時計、概日時計とも呼ばれます）によって生命活動を約 24 時間周期で調節することで、地球の昼夜の環境変化に適応しています。光合成を行う原核生物であるシアノバクテリアも生物時計の仕組みを持っており、3 つの時計タンパク質 KaiC、KaiA、KaiB によって約 24 時間周期のリズム（概日リズム）が生み出されます。興味深いことに、この 3 つのタンパク質を試験管の中で混合すると、KaiC タンパク質のリン酸化と呼ばれる活性が約 24 時間周期の概日リズムを示します。最も重要なのは KaiC で、KaiC の酵素活性によって概日リズムの周期が決まります。一般的に生物時計は時計遺伝子と時計タンパク質との相互作用（用語 1）によって生み出されると考えられており、2017 年にはこの仕組みを解明した 3 人の研究者にノーベル賞が贈られました。しかし、3 つのタンパク質のみから構成される試験管内での概日リズムは、時計遺伝子がなくても時計タンパク質だけで概日リズムを生み出す仕組みが存在することを示しています。

生物時計の仕組みを解明するためには、概日リズムの周期が変わったりリズムがなくなったりする時計遺伝子の変異体が役立ちます。KaiC についても多くの周期変異体が見つかっており、研究に役立てられています。しかし、概日リズムの周期が 1 日になるメカニズム、特に KaiC の「どの部分がどのように作用して周期が決まるのか」についてはよく分かっていません。これまで見つかった KaiC の周期変異体は変異の場所や内容がばらばらであるためです。

【研究内容】

時計タンパク質 KaiC の概日リズムが 1 日周期になる仕組みを知るためには、概日リズムの周期が極端に変わる KaiC の変異体が役立つと考えられます。研究グループは研究室に保存されていた KaiC 変異体のシアノバクテリアコレクションの概日リズムを詳しく調べ、KaiC の 402 番目のアミノ酸が正常なチロシン（野生型）から、システインに変わった変異体（Y402C、以下 KaiC の 402 番目のアミノ酸が X に変わった変異体を Y402X とします）の周期が約 4 日と非常に長いことに注目しました

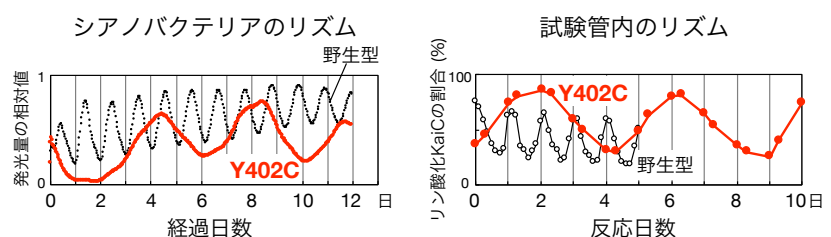


図1 KaiC Y402C変異体の概日リズム

正常の場合（野生型）は1日周期だが、Y402Cは4日に周期がのびる。

(図1)。そこで、KaiCの402番目のアミノ酸を様々に変えた変異体を作製しシアノバクテリアの発光リズムによって概日リズムを調べたところ、最長154時間(6.4日)(Y402P)から最短16時間(Y402W)まで幅広く周期が変化することが分かりました(図2左、中)。アミノ酸の性質と周期との関係を調査した結果、興味深いことに、KaiCの402番目のアミノ酸の大きさが小さいほど周期が長く、大きいほど周期が短くなる相関関係があることも分かりました(図2右)。

ヒトや植物などの時計因子の変異体は、数時間周期が変われば大幅に変化したと見なされます。タンパク質のたった1か所のアミノ酸を小さくするだけで周期が1週間まで長くなるという発見は

大きな驚きでした。KaiCタンパク質は約500個のアミノ酸がつながってできていますが、KaiCの402番目のアミノ酸の大きさは周期を決める重要な要因であると言えます。

研究グループはKaiCの402番目のアミノ酸の変異体のいくつかについて、大腸菌に作らせたKaiCタンパク質を用いて試験管内でのKaiCの概日リズムを調べました。シアノバクテリアの発光リズムと同様に、試験管内のリズムの周期も最長158時間(6.6日)(Y402A)から最短15時間(Y402W)まで大幅に変化しました(図3)。Y402Aの6.6日周期のリズムは約3週間にわたって驚くほど安定に続きました。試験管内のリズムの周期もKaiCの402番目のアミノ酸の大きさが小さいほど周期が長く、大きいほど周期が短くなる相関関係を示しました(図3)。

これらの変異体は温度を変えてもほぼ同じ周期を示しました。生物時計は「環境の温度が変わっても周期は変わらない」という特徴を示します(周期の温度補償性)。ほとんどの生命活動の活性は温度によって大きく変化しますが、生物時計は周期の温度補償性という仕組みを備えることでどの季節でも正しく時間を認識することができます。大幅に周期が変わっても周期の温度補償性は維持されるという結果は驚きです。

周期が大幅に変化した原因はKaiCの酵素活性(ATP分解活性)が変化したことでした。KaiCはATPアーゼという酵素で、ATP(アデノシン三リン酸)という分子を分解してエネルギーを取り出すことができます(図4左)(用語2)。KaiCのATP分解活性は一般的な酵素に比べて1万

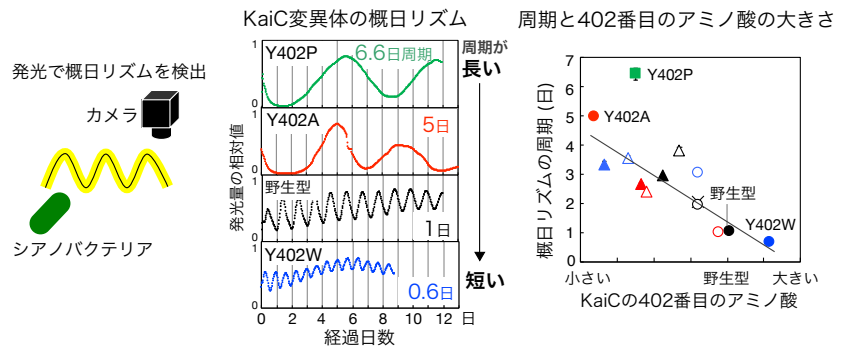


図2 シアノバクテリアの概日リズム

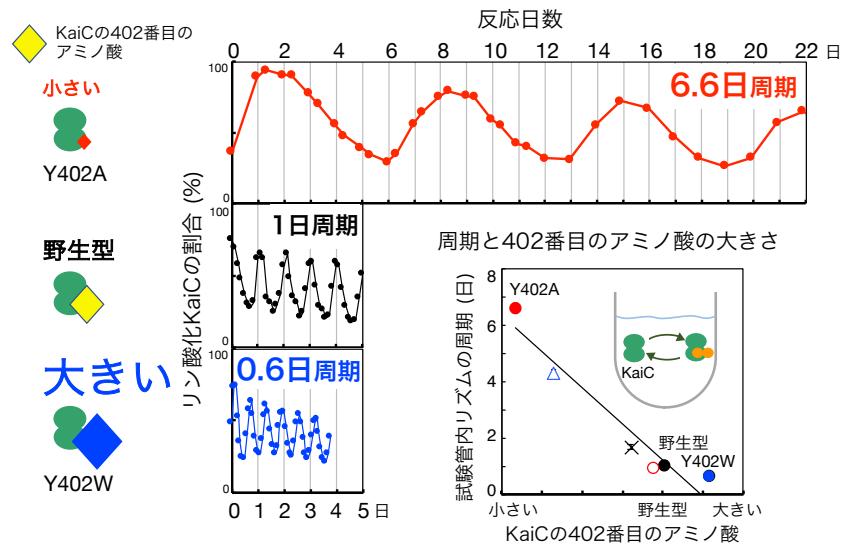


図3 試験管内の概日リズム

KaiCの402番目のアミノ酸が小さいほど周期が長く、大きいほど周期が短くなる。

分の 1 以下と極めて低く、KaiC は 1 日でわずか 10~15 個の ATP しか分解できません。しかし、KaiC の ATP 分解活性は温度で変化せず、周期との相関関係を示すことから、生物時計の性質を決める機能を担います。KaiC の 402 番目のアミノ酸の変異体の ATP 分解活性も周期が長い変異体ほど活性が低くなる相関関係（図 4 中）と、温度補償性を示しました。また、変異体の ATP 分解活性は KaiC の 402 番目のアミノ酸の大きさによって ATP 分解活性が変わることが原因で、周期が大幅に変わったことを示しています。

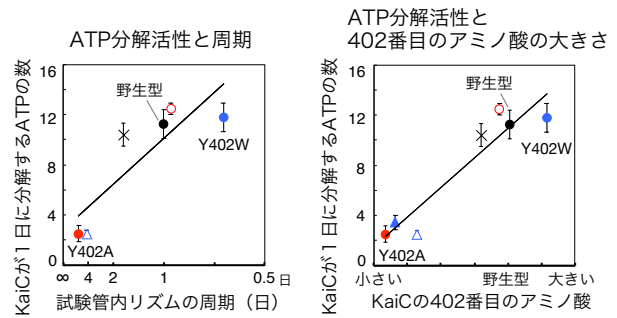
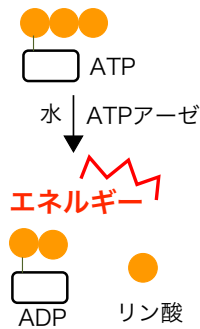


図4 KaiCのATP分解活性

KaiCの402番目のアミノ酸が小さいほどATP分解活性は低く周期が長くなり、大きいほどATP分解活性は高く周期が短くなる。

【成果の意義】

タンパク質の1か所の変化だけで、試験管内の概日リズムの周期を1週間周期までのばすことができるという結果は、生物時計の研究分野だけではなく、タンパク質の驚異的な調節能力を示したという点でも大きな発見です。また、現在国内外の多くの研究者たちが試験管内の生物時計の仕組みを解明しようとしています。それらの研究の多くはKaiCとKaiA、KaiBとの相互作用によって生物時計の性質を説明しようとするものです。しかし、アミノ酸の大きさによってKaiCの酵素活性（ATP分解活性）が変わることで周期が大幅に変化するという結果は、KaiCタンパク質の中に生物時計の性質が組み込まれていることを示しています。KaiCが自身のATP分解活性によって生まれたエネルギーをどのように利用して時を計るのか、今後の研究の発展が期待されます。生物時計は約24時間周期や周期の温度補償性など、ヒトからバクテリアまで共通性の高い特徴を持つ現象であるため、タンパク質による時計メカニズムはヒトの生物時計にも当てはまる可能性があります。

【用語説明】

用語1：時計遺伝子と時計タンパク質との相互作用

概日リズムの分子メカニズムを説明するモデルで、転写・翻訳フィードバックモデルと呼ばれる。生物は生物時計を構成する時計遺伝子の情報を元に、発現と呼ばれる仕組みによって時計タンパク質を合成する。時計タンパク質はしばらくすると、自身の時計遺伝子の発現を抑制する。そのうち時計タンパク質は分解して徐々に量が減る。するとまた時計遺伝子の発現が開始されてもとの状態に戻る。このような仕組みにより、振動がおこる。

用語2：ATPアーゼ

ATP（アデノシン三リン酸）をADP（アデノシン二リン酸）とリン酸に加水分解する酵素。ATPの加水分解によってエネルギーが発生する。バクテリアから植物、ヒトまで全ての生物はATP

アーゼが ATP を加水分解することによって生まれるエネルギーによって活動している。そのため、ATP は「生体のエネルギー通貨」とも呼ばれる。

【論文情報】

雑誌名 : *Proceeding of the National Academy of Sciences*

論文タイトル : Tuning the circadian period of cyanobacteria up to 6.6 days by the single amino acid substitutions in KaiC.

著者 : Kumiko Ito-Miwa, Yoshihiko Furuie, Shuji Akiyama and Takao Kondo

DOI : 10.1073/pnas.2005496117

【著者所属】

名古屋大学大学院理学研究科、高等研究院 : 伊藤 (三輪) 久美子、近藤 孝男

自然科学研究機構・分子科学研究所 : 古池 美彦、秋山 修志

【科研費】

- ✓ JSPS 科研費 基盤研究 A 『KaiC 生物時計の動作プログラム : 2つの ATPase の協働の生理・生化学的解析』 (17H01427)
- ✓ JSPS 科研費 特別推進研究 『シアノバクテリアの時計タンパク質による概日時間の生成機構』 (24000016)
- ✓ JSPS 科研費 基盤研究 S 『統合的多階層アプローチによるシアノバクテリア生物時計システムの展開』 (17H06165)

【研究者連絡先】

名古屋大学大学院理学研究科、高等研究院

招へい教員 (研究員) 伊藤 (三輪) 久美子 (いとう くみこ)

特別教授 近藤 孝男 (こんどう たかお)

TEL : 052-789-2498 FAX : 052-789-2963

E-mail : miwa@bio.nagoya-u.ac.jp (伊藤) 、 kondo@bio.nagoya-u.ac.jp (近藤)

【報道連絡先】

名古屋大学管理部総務課広報室

TEL : 052-789-3058 FAX : 052-789-2019

E-mail : nu_research@adm.nagoya-u.ac.jp