

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔事後評価用〕

平成15年度採択分

平成21年 3月31日現在

研究課題名（和文）	概日時計により統合されるシアノバクテリアの細胞システムの時間的統合	
研究課題名（英文）	Temporal Integration of cellular system by circadian clock in cyanobacteria	
研究代表者	近藤 孝男（TAKAO KONDO） 名古屋大学・大学院理学研究科・教授	

研究の概要：概日時計による細胞システムの統合を理解するため、DNA チップと発光レポーターを使った包括的解析を行った。一方、Kai 蛋白質による概日時計の再構成に成功し、これまでの転写翻訳モデルを大きく修正し、蛋白質による新たな振動発生モデルを提出した。

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：概日時計、シアノバクテリア、Kai 蛋白質による概日時計の再構成

1. 研究開始当初の背景

概日時計は時計遺伝子の発現のフィードバック制御によるとされており、概日振動の周期長や安定性を説明するためには細胞の遺伝子発現の包括的解析が必要で、それを基にシステムの解析が必要と考えられた。

2. 研究の目的

当初の計画では DNA チップと生物発光レポーターで遺伝子発現の包括的解析を可能として、シアノバクテリア細胞の概日システムの分子機構の全体像を解明することを目的とした。その後、蛋白質のみの概日振動発生に成功したので、この特質を活かし、振動の発生機構のみでなく、いかにして 24 時間という周期の長さとその安定性が実現されているかを、Kai 蛋白質の生化学的解析とリズムの生理学的解析により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子発現の包括的解析としては DNA チップの開発に加え、ゲートウェイ法によりすべてのプロモーターの生物発光レポーターを作製した。遺伝子発現の制御機構の解

析は分子生物学的手法を用いた。当初、予期しなかった再構成による概日振動の解析には精製 Kai タンパク質による生化学的解析を中心とした。

4. 研究の主な成果

包括的遺伝子発現解析（当初計画の成果）

1) 当初計画にもとづきシアノバクテリアの概日時計による遺伝子発現制御の包括的解析を 2 つの方法（*Synechococcus* の GeneChip の開発、生物発光による遺伝子発現解析）で可能とし、振動サイクルでの時間経過について解析を行なった。

2) シアノバクテリアの概日性遺伝子発現の制御を解析し、以下の成果を得た。

- KaiC による包括的遺伝子発現制御の解析
- KaiC のリン酸化による転写制御の解析
- KaiC による転写・翻訳フィードバックの成立過程の解析

• KaiC による遺伝子発現をになう 2 つの新奇な遺伝子 (*rpaA* および *labA*) の発見
これらの成果は当初計画の中核であり、当初の期待と予測をほぼ裏付ける成果を得ることができた。今後、新たなタンパク質による時計モデルに基づいて、概日システムを解析する時には、その基礎となる。

KaiCリン酸化サイクルの再構成の発見に基づく研究成果

当初、全く予想していなかった転写の停止した暗期中でのKaiCリン酸化サイクルを見出し、さらに3つのタンパク質とATPのみでこれを再構成した。これは極めてインパクトの大きな発見で、概日時計の基本モデルに大きな修正を迫るものである。幸い中間評価でも高く評価されたので、期間の後半は*in vitro*の再構成系を利用したKaiCのリン酸化サイクルの生化学解析を中心として行い、以下の成果を得た。

いずれもタンパク質自体が高度な機能をもつことを示したものであるが、特に概日時計の特徴である24時間の周期長とその安定性がKaiCのATPase反応に基づくことやKaiC6量体間でその時間情報が交換されることなど、大きなインパクトをもつ結果が得られ、概日時計のデザイン原理を理解する可能性をもつものである。

- ・ KaiA, KaiBの相互作用
- ・ KaiC のリン酸化プログラムの解明
- ・ 周期を規定する KaiC の ATPase 活性
- ・ KaiC リン酸化リズムの自己同調機構
- ・ リン酸化によらない KaiC の転写制御
- ・ 温度サイクルによる KaiC リン酸化リズムの同調

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

概日システムの包括的解析は当初の計画どおりほぼ予定通り順調であったが、本研究の大きな成果は3つの Kai タンパク質と ATP を試験管内で混ぜるだけで安定した24時間振動が発生することを発見し、「概日時計を初めて試験管内で構築した」ことである。この発見は生物時計研究にとってコペルニクス的転回と言うべきもので、ヒトをも含めた高等生物の時計研究にも非常に大きなインパクトを与えるものである。今後、この分子内メカニズムを解明し、概日時計のデザインを行うことも可能である

う。これまでの解析で KaiC が真の時計蛋白質であるからくりが、その ATPase 機能にあることが示された。KaiC の解析は、これまで知られていなかった情報を扱うタンパク質の機能を解明するきっかけになるかもしれない。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

- 1) Hiroshi Ito, Hakuto Kageyama, Michinori Mutsuda, Masato Nakajima, Tokitaka Oyama, and **Takao Kondo**, "Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm", *Nature Struct Mol Biol*, vol.14, pp.1084-1088, (2007)
- 2) Kazuki Terauchi, Yohko Kitayama, Taeko Nishikawa, Kumiko Miwa, Yoriko Murayama, Tokitaka Oyama, and **Takao Kondo**, "ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria", *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol.104, pp.16377-16381, (2007)
- 3) Masato Nakajima, Keiko Imai, Hiroshi Ito, Taeko Nishiwaki, Yoriko Murayama, Hideo Iwasaki, Tokitaka Oyama, **Takao Kondo**, "Reconstitution of Circadian Oscillation of Cyanobacterial KaiC Phosphorylation in Vitro", *Science*, vol. 308, pp.414-415, (2005)
- 4) Jun Tomita, Masato Nakajima, **Takao Kondo**, Hideo Iwasaki, "No Transcription-Translation Feedback in Circadian Rhythm of KaiC Phosphorylation", *Science*, vol. 307, pp.251-254, (2005)
- 5) Yoichi Nakahira, Mitsunori Katayama, Hiroshi Miyashita, Shinsuke Kutsuna, Hideo Iwasaki, Tokitaka Oyama, and **Takao Kondo**, "Global gene representation by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system", *Proc. Natl Acad. Sci.*, vol.101, pp.881-885, (2004)

ホームページ等

<http://clock.bio.nagoya-u.ac.jp/web/>

http://www.brh.co.jp/s_library/j_site/scientistweb/no55/