

別紙 4

報告番号	※ 乙 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Roles of the cyanobacterial clock protein KaiB for the generation of circadian oscillations: importance of the monomer-dimer-tetramer interconversion of KaiB

(概日リズム発振における藍色細菌時計タンパク質 KaiB の役割：KaiB の単量体-二量体-四量体間オリゴマー構造変化の重要性)

氏 名 飯田 高広

論 文 内 容 の 要 旨

地球上に生息する多くの生物は、地球の自転によって生じる約24時間周期の昼夜交代リズムに適応するために、体内の様々な活性を約24時間周期で自律的に振動させている。生物は時計機能を進化させることにより、事前にこの環境変動を予測し、生命活動を時間的に統合している。この自律的振動が概日リズムであり、このリズムを制御する細胞内分子機構が生物時計である。

藍色細菌は生物時計を持った唯一の原核生物である。藍色細菌の生物時計の振動子は相互作用する3つの時計タンパク質KaiA、KaiB、KaiCから構成され、ATP存在下の試験管内で3つのKaiタンパク質を反応させると、KaiCのリン酸化レベルやATPase活性が24時間周期で振動する(*in vitro* KaiABC振動子)。KaiBは四量体であり、2つのサブユニットから成る二量体がさらに二量体を形成した形を取っている。KaiBはC末端に酸性領域を持ち、この領域を含む95から108番目のアミノ酸残

基を欠失させたKaiB変異体(KaiB₁₋₉₄)は二量体(KaiB^{2mer})として存在する。KaiB₁₋₉₄は*in vitro* KaiABC振動子を正常に振動させることができる。しかし、KaiB₁₋₉₄は藍色細菌細胞では著しく振幅が弱まった遺伝子発現リズムしか起こすことができない。KaiB₁₋₉₄はS431とT432の2つのリン酸化サイトをグルタミン酸に置換したKaiCの六量体(KaiC_{S431D/T432D}^{6mer}; KaiC_{DD}^{6mer})とサブユニット当たり野生型KaiB(KaiB_{WT})と同じ分子比で複合体を形成する。この事実に基づいて、KaiBはKaiCと結合する際には2分子のKaiB^{2mer}に解離するというモデルが提唱されている。一方、KaiBの単量体(KaiB^{1mer})については今までに知見が全く無く、KaiB^{1mer}が試験管内及び藍色細菌細胞内で存在するかどうか、さらに、KaiB^{1mer}が試験管内及び藍色細菌で概日振動を起こすことができるかどうかは明らかではなかった。本論文ではこれらの疑問に答えることを目的とし、単量体構造を取るKaiB変異体を作製してその時計機能を解析した。

N末端の1番目から9番目のアミノ酸残基を欠失させたKaiB変異体(KaiB₁₀₋₁₀₈)を作製し、超遠心機を使った沈降平衡法でオリゴマー構造を解析したところ、KaiB₁₀₋₁₀₈は4 °Cでは単量体(KaiB₁₀₋₁₀₈^{1mer})、35 °Cでは二量体(KaiB₁₀₋₁₀₈^{2mer})であることが明らかになった。ゲルろ過クロマトグラフィー(GFC)による解析から、KaiB_{WT}は低KaiB濃度条件下もしくは1 M NaCl存在下では二量体と四量体の平衡状態にあることが分かった。さらに、GFCでKaiB₁₀₋₁₀₈のKaiC_{DD}^{6mer}との複合体形成を解析したところ、KaiB₁₀₋₁₀₈は4 °Cでも40 °CでもKaiC_{DD}^{6mer}と複合体を形成した。したがって、KaiB₁₀₋₁₀₈-KaiC_{DD}^{6mer}複合体では、KaiB₁₀₋₁₀₈は単量体として存在している可能性が示され、KaiBはKaiCと結合する際には4つの単量体に解離することが考えられる。

KaiB₁₀₋₁₀₈は*in vitro* KaiABC振動子を25 °Cで正常に振動させることができたが、41 °Cでの藍色細菌細胞の遺伝子発現リズムを正常に駆動させることはできなかった。SasAはKaiCと結合し、KaiABC振動子が生み出した時間情報の下流への出力に関わるタンパク質であり、KaiBはKaiCと結合することで競合的にSasA-KaiC複合体の形成を阻害することが知られている。KaiB₁₋₉₄と同様に、KaiB₁₀₋₁₀₈はKaiB_{WT}より強くKaiC_{DD}に結合し、SasA-KaiC複合体形成をKaiB_{WT}より強く阻害した。したがって、藍色細菌のKaiB₁₀₋₁₀₈発現株に見られた遺伝子発現リズムの異常は、このSasA-KaiC複合体の形成の競合的阻害が原因だと考えられる。

本論文の研究結果から、KaiBは藍色細菌の細胞内において単量体、二量体、四量体の平衡状態にあること、そして、単量体と四量体はそれぞれ時計振動子の発振機能とSasA-KaiC相互作用の制御に関与することが示唆された。