

別紙 1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

| | | | |
|------|---|---|---|
| 報告番号 | ※ | 第 | 号 |
|------|---|---|---|

氏 名 飯田 高広

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)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学遺伝子実験施設 准教授 理学博士 杉山 康雄
委員 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
教授 博士 (理学) 東山 哲也
委員 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
教授 博士 (理学) 木下 俊則
委員 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
教授 博士 (農学) 吉村 崇

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

地球上に生息する多くの生物は、約 24 時間周期の昼夜交代リズムに適応するため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。この自律的振動（概日リズム）を制御する細胞内分子機構が生物時計である。

藍色細菌の生物時計の振動子は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)。野性型 KaiB (KaiB_{WT}) は 4 量体 (KaiB^{4mer}) であるが、C 末端の 95 から 108 番目のアミノ酸残基を欠失させた変異体 KaiB₁₋₉₄ は 2 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が、藍色細菌細胞内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。また、KaiB₁₋₉₄ と KaiB_{WT} は同じサブユニット分子比で KaiC₆ 量体 (KaiC^{6mer}) (その 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_{DD}^{6mer}) と結合することから、KaiB_{WT}^{4mer} は KaiC と結合する際には 2 分子の KaiB_{WT}^{2mer} に解離するというモデルが提唱されていた。しかしながら、KaiB 単量体 (KaiB^{1mer}) については今までに知見が全くなく、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。

飯田さんは、これらの疑問に答えることを目的として、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。まず、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、超遠心沈降平衡法でオリゴマー構造を解析して、KaiB₁₀₋₁₀₈ は 4 °C では単量体 (KaiB₁₀₋₁₀₈^{1mer})、35 °C では 2 量体 (KaiB₁₀₋₁₀₈^{2mer}) であることを明らかにした。次に、ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) 法による解析から、KaiB_{WT} は低 KaiB 濃度条件下や 1 M NaCl 存在下では 2 量体と 4 量体の平衡状態にあること、さらに同様の解析から、KaiB_{WT}、KaiB₁₋₉₄、KaiB₁₀₋₁₀₈ はいずれも同じサブユニット分子比で KaiC_{DD}^{6mer} に結合することを明らかにした。そして、KaiB は KaiC と結合する際には KaiB^{1mer} に解離し、1 分子の KaiC_{DD}^{6mer} に最大 6 分子の KaiB^{1mer} が結合するモデルを提案した。さらに、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できないことを見出した。その原因を探るため、飯田さんは、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る SasA に注目した。KaiB は SasA-KaiC^{6mer} 複合体形成を競合的に阻害することが知られているが、KaiB₁₀₋₁₀₈ は KaiB_{WT} より強く KaiC_{DD}^{6mer} に結合することによって、SasA-KaiC_{DD}^{6mer} 複合体形成を KaiB_{WT} より強く阻害することを見出した。そして、藍色細菌の KaiB₁₀₋₁₀₈ 発現株が示す遺伝子発現リズムの異常は、この KaiB₁₀₋₁₀₈ による SasA-KaiC^{6mer} 複合体形成の競合的阻害が原因であると推察した。

以上のことから、飯田さんは、KaiB は藍色細菌の細胞内において単量体、2 量体、4 量体の平衡状態にあること、そして、単量体と 4 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という新しいモデルを提唱した。

以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。