

名古屋大学高等研究院1年生向け特別講義
2008. 7. 1 経済学部コンファレンスホール

時を刻むタンパク質

石浦正寛

名古屋大学遺伝子実験施設

TEL: 052-789-4527; FAX: 052-789-4526

E-mail: ishiura@gene.nagoya-u.ac.jp

<http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~ishiura-g/>



生物時計とは何か

1. 24時間周期のリズム(概日リズム):
睡眠覚醒リズム、体温リズムなど。
2. 時差ぼけ
3. ほとんど全ての真核生物はほぼ24時間周期の時計(概日時計)を持っている。
4. バクテリアも時計を持っている。

生物時計の研究

どのように研究するのか？

生理学

時計現象(リズム)の測定、解析



分子遺伝学

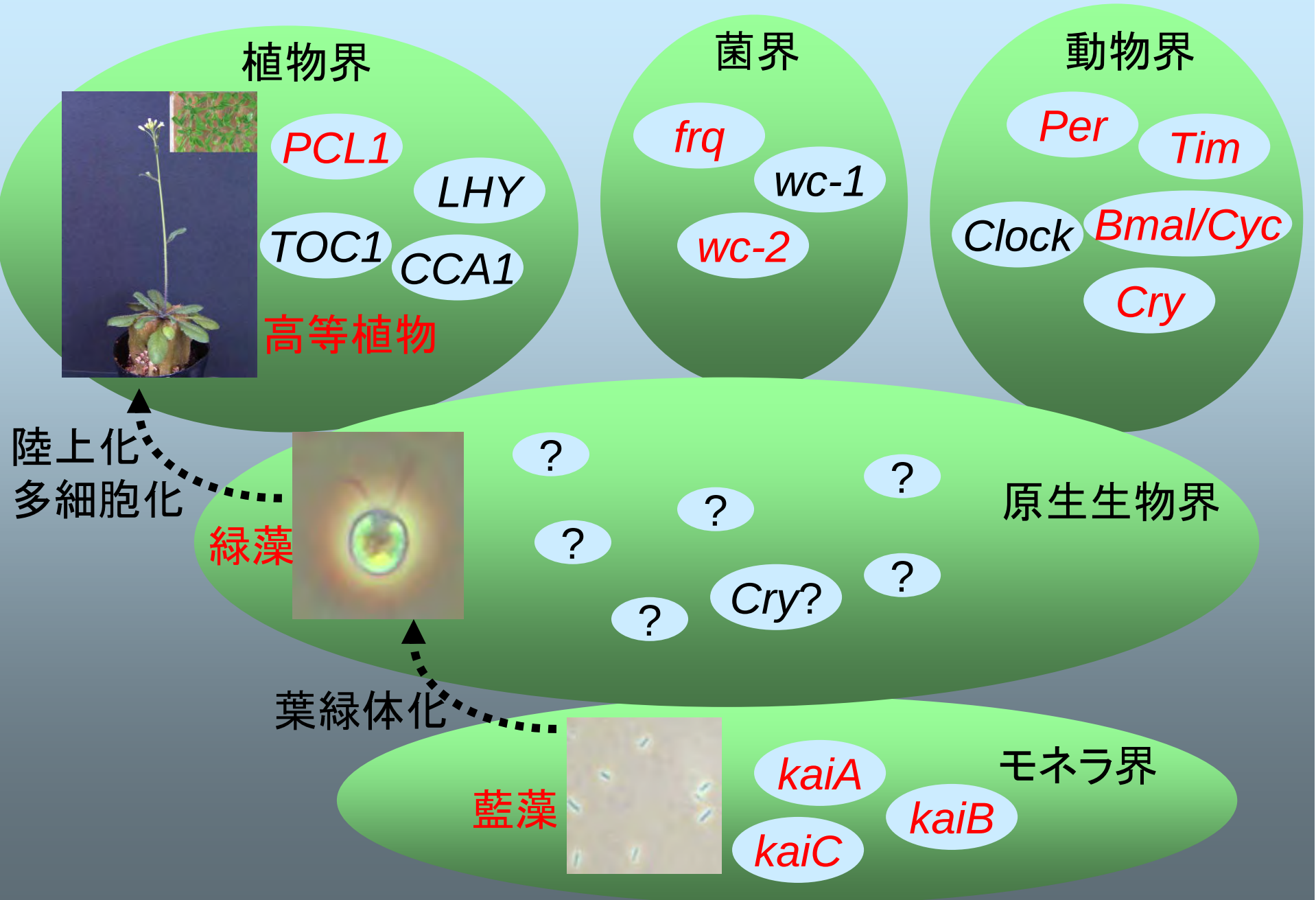
突然変異体の分離、時計遺伝子の同定・クローニング



タンパク質科学、生物物理学

時計タンパク質、時計分子装置の構造と機能の解明

生物界と時計遺伝子



私の研究:

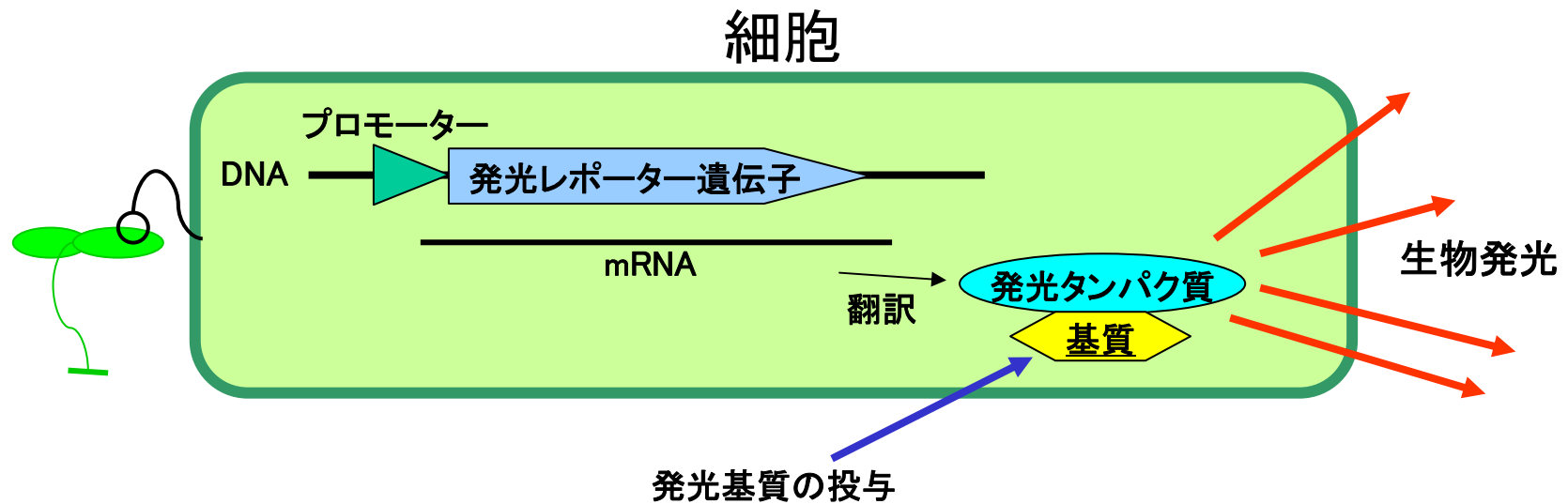
植物系細胞の生物時計(植物時計)

1. 生物時計(分子装置)の働くしくみを原子レベルで解明する。
2. 藍色細菌、藻類、コケ、シダ、高等植物に共通の生物時計は存在するか？
3. 多分時計の部品は異なっている(一部重なっている可能性はある)。
4. 植物時計の進化が面白い。

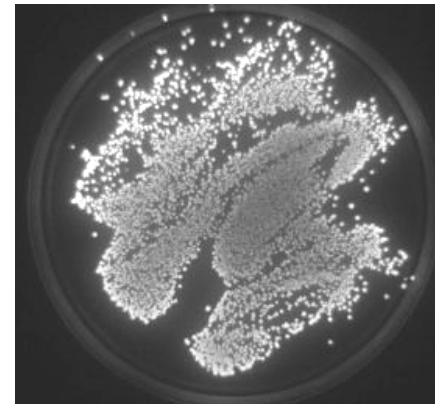
生物発光リアルタイム測定法を開発する

1. リズムを自動測定したい。
2. 夜光虫はほぼ24時間周期で発光する
(生物発光リズム)。
3. 夜光虫は遺伝子の実験には適していない。
4. なければ、遺伝子の実験に便利な他の細胞で「人工的な夜光虫」を自分で作ろう。

人工生物発光細胞(人工夜光虫)のしくみ



シロイヌナズナの
発光レポーター株



藍色細菌の
発光レポーター株

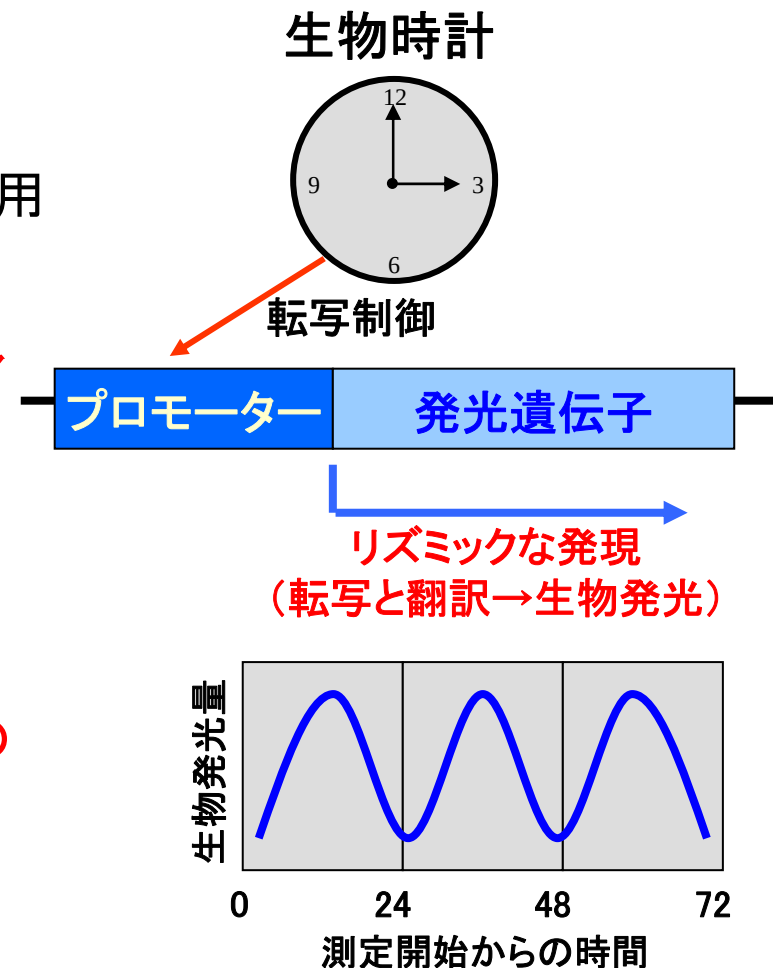
人工生物発光細胞を用いた概 日リズムのリアルタイム測定

特徴

- 生物発光を人工的な「時計の針」として利用

利点

- 生きたままの細胞での連続自動測定(リアルタイム測定)
- 高感度、高精度、高時間分解能
- 多くの試料の全自動測定
- リズム変異体の大規模スクリーニング
- 時計遺伝子(リズム変異の原因遺伝子)の迅速なクローニング



生物発光自動測定装置も作ろう

作った生物発光自動測定装置

- 平板型試料交換機付生物発光測定装置

- 1,920試料が同時に測定できる。
- 高価で大きいのが欠点である。

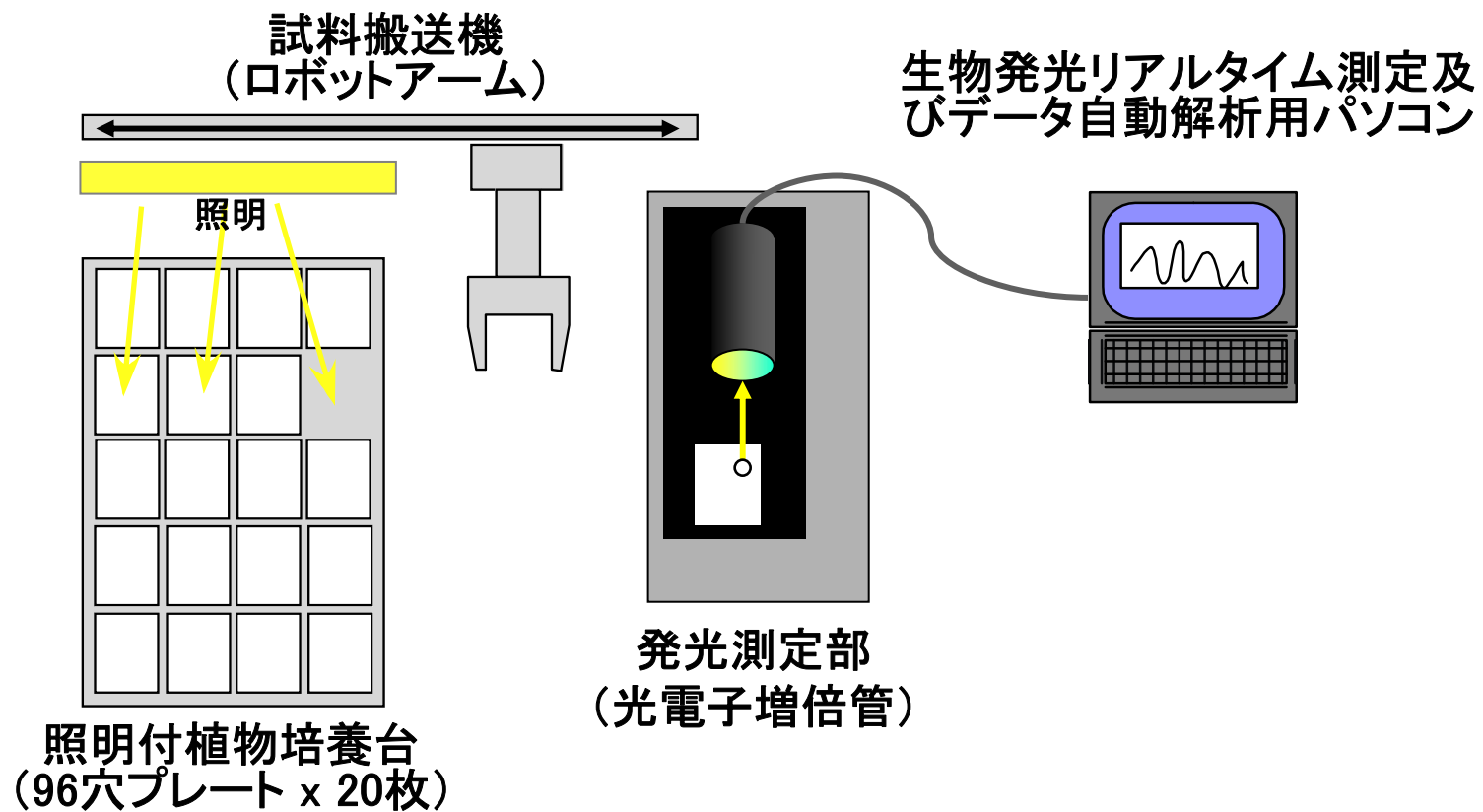


- 巡回型試料交換機付生物発光測定装置

- 960試料が同時に測定できる。
- 小型、軽量で安い。
- 50°Cまでの高温条件下で測定可能である。



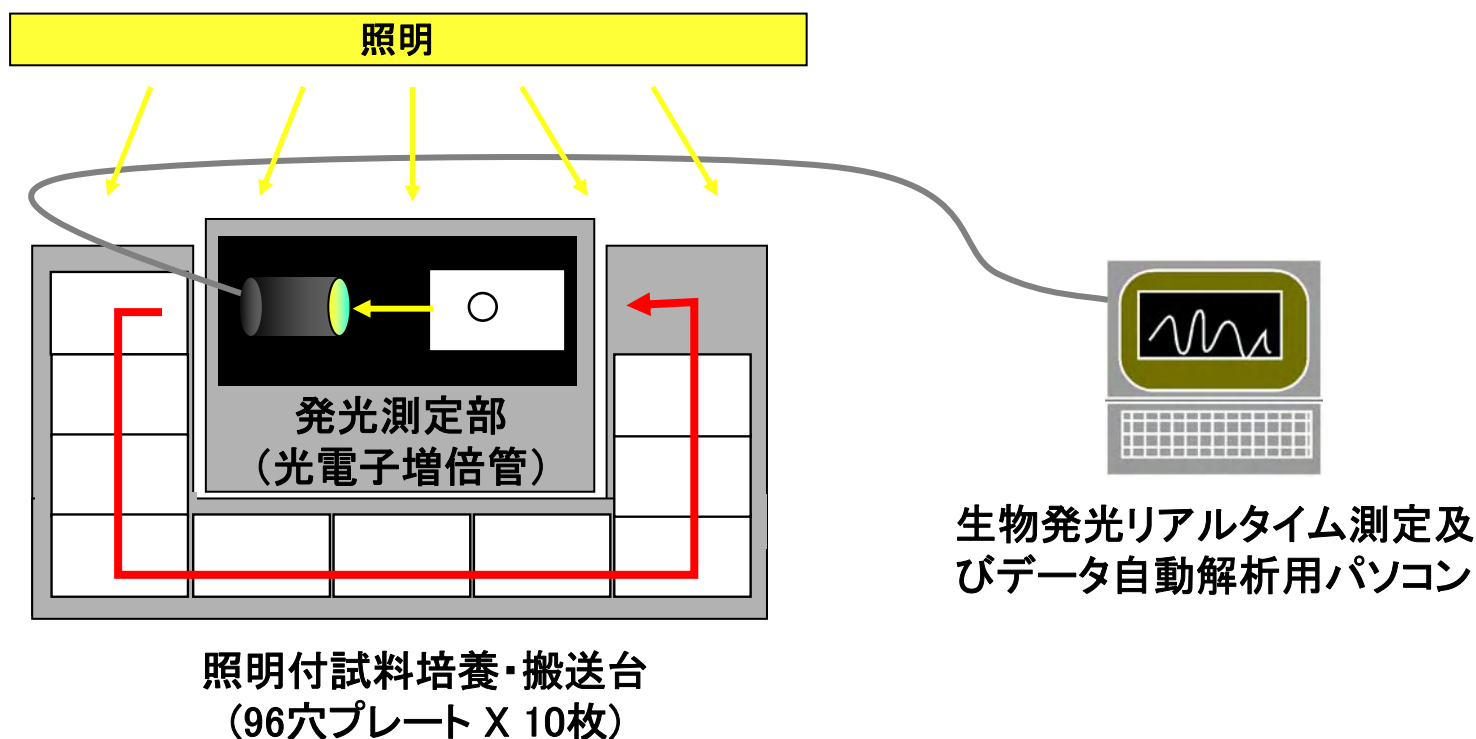
平板型試料交換機付 生物発光測定装置



平板型装置の動作



巡回型試料交換機付 生物発光測定装置

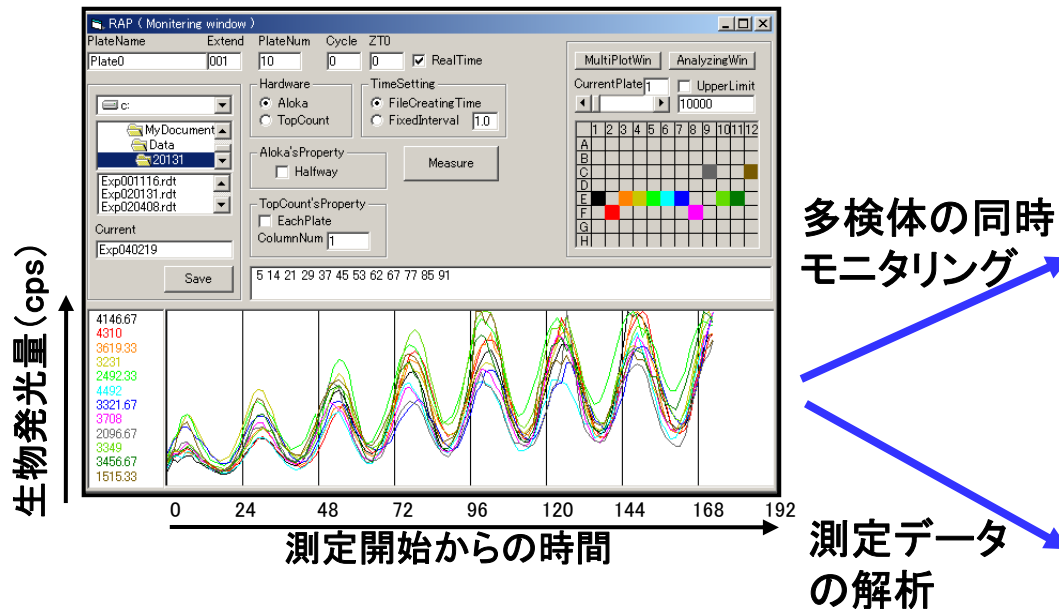


巡回型装置の動作



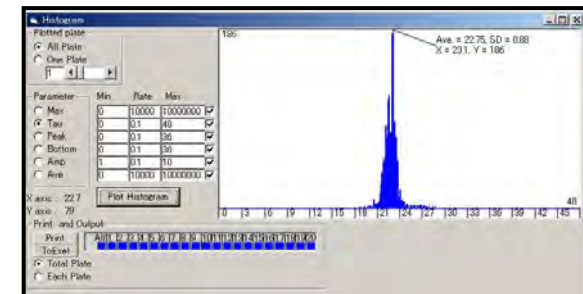
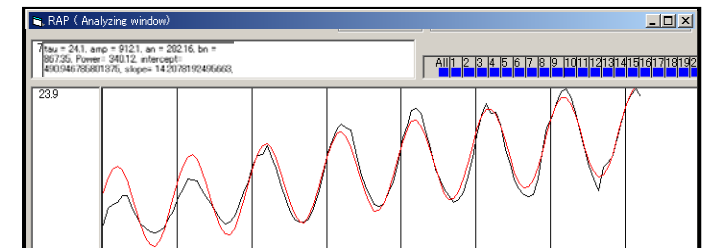
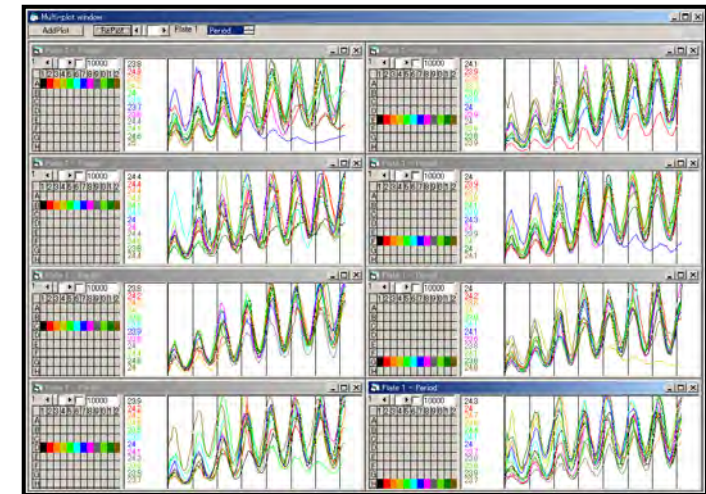
リズムの自動表示・解析プログラムも作ろう

生物発光リアルタイム測定・リズム解析プログラムの開発



- ・ 測定データのリアルタイム表示と自動記録
- ・ 様々なアルゴリズムによるリズム成分の解析
- ・ データベース機能と統計処理機能を内蔵
- ・ 他のプログラムのファイル形式の入出力
- ・ 強力な表示・印刷機能
- ・ 発光測定以外のデータも解析できる汎用性

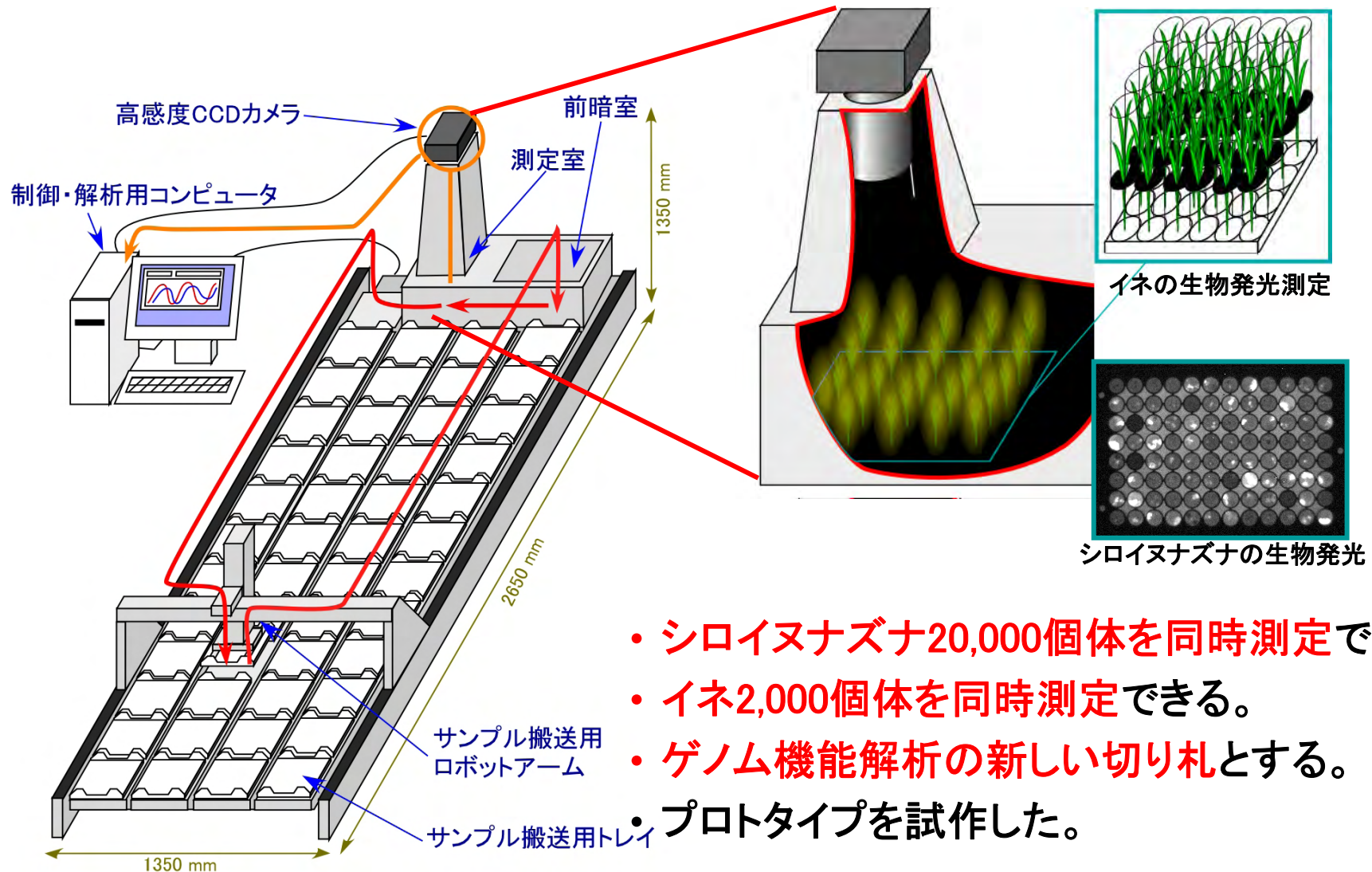
Okamoto *et al.*, 2005, *Anal Biochem* 340:193-2000



もっと大規模装置、高感度装置 を作ろう

1. ハイスループット化
2. 高感度化

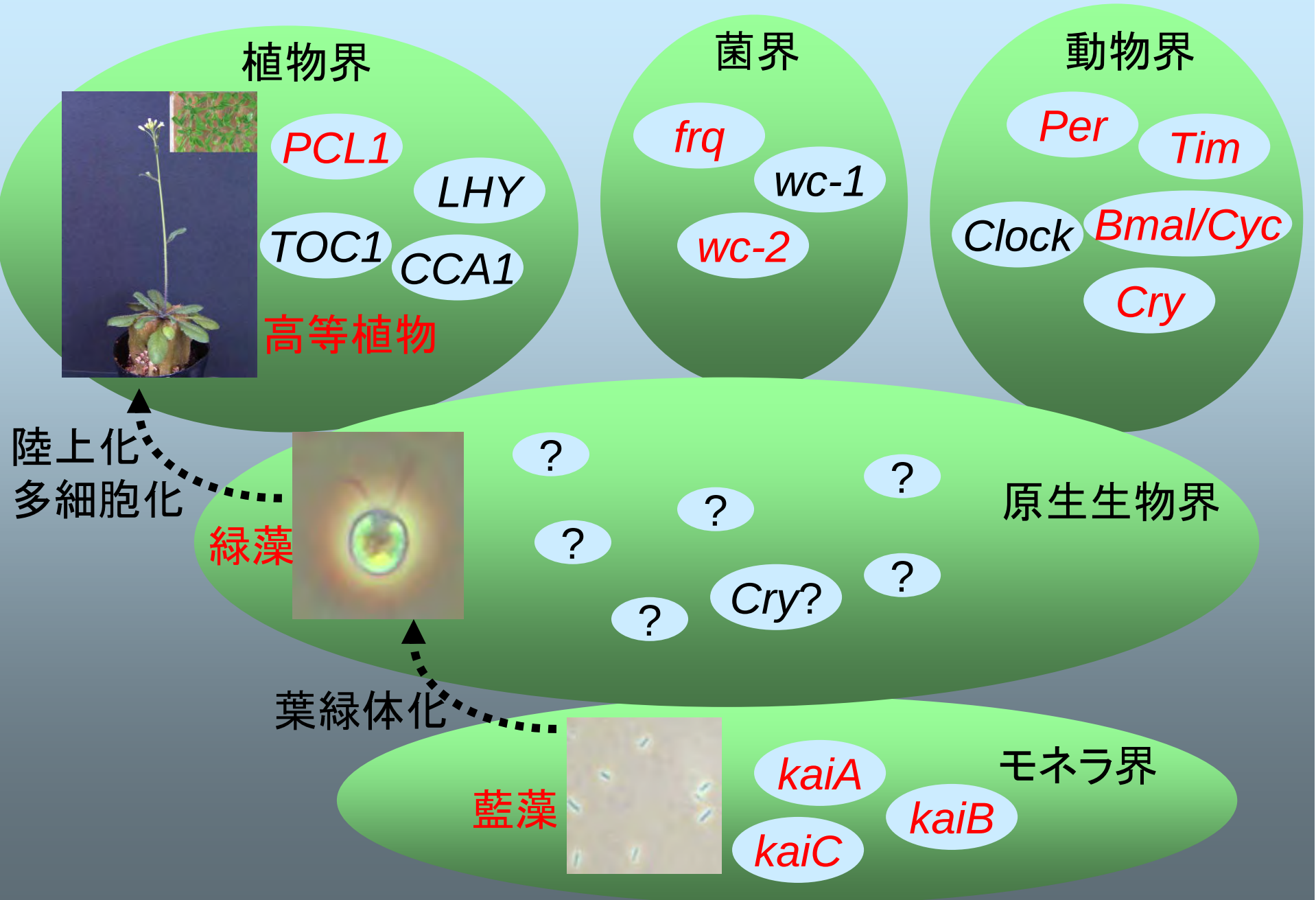
ハイスループット生物発光測定装置の開発



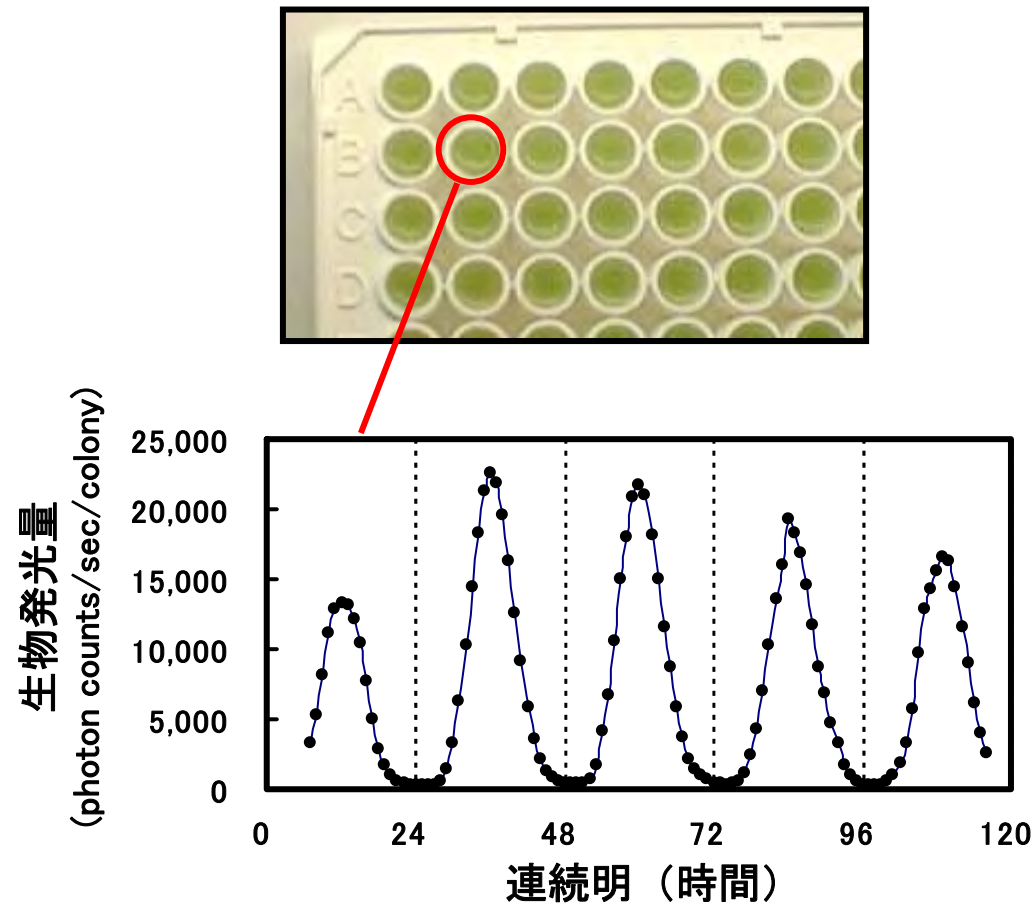
- ・シロイヌナズナ20,000個体を同時測定できる。
- ・イネ2,000個体を同時測定できる。
- ・ゲノム機能解析の新しい切り札とする。
- ・プロトタイプを試作した。

人工生物発光細胞の例

生物界と時計遺伝子



30°Cで生育する藍色細菌（藍藻）の生物発光リズム

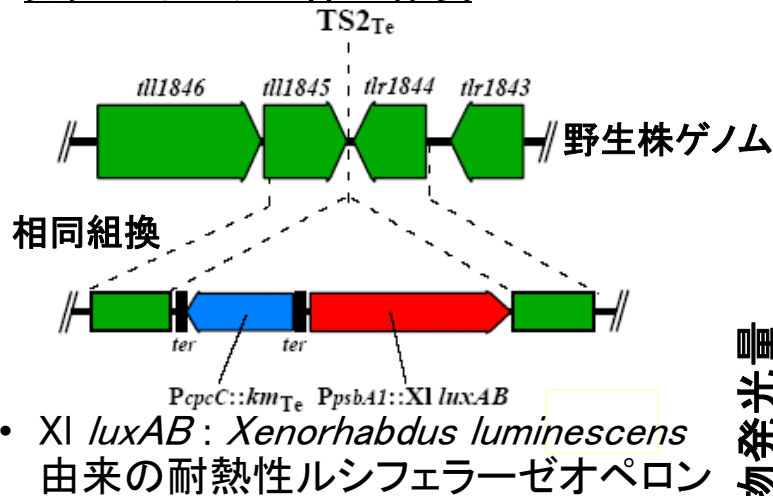


常温度性藍色細菌
Synechococcus sp. strain
PCC 7942

別府温泉産の藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* の生物発光リズム

Onai et al., 2004, J. Bacteriol. 186:4972-4977

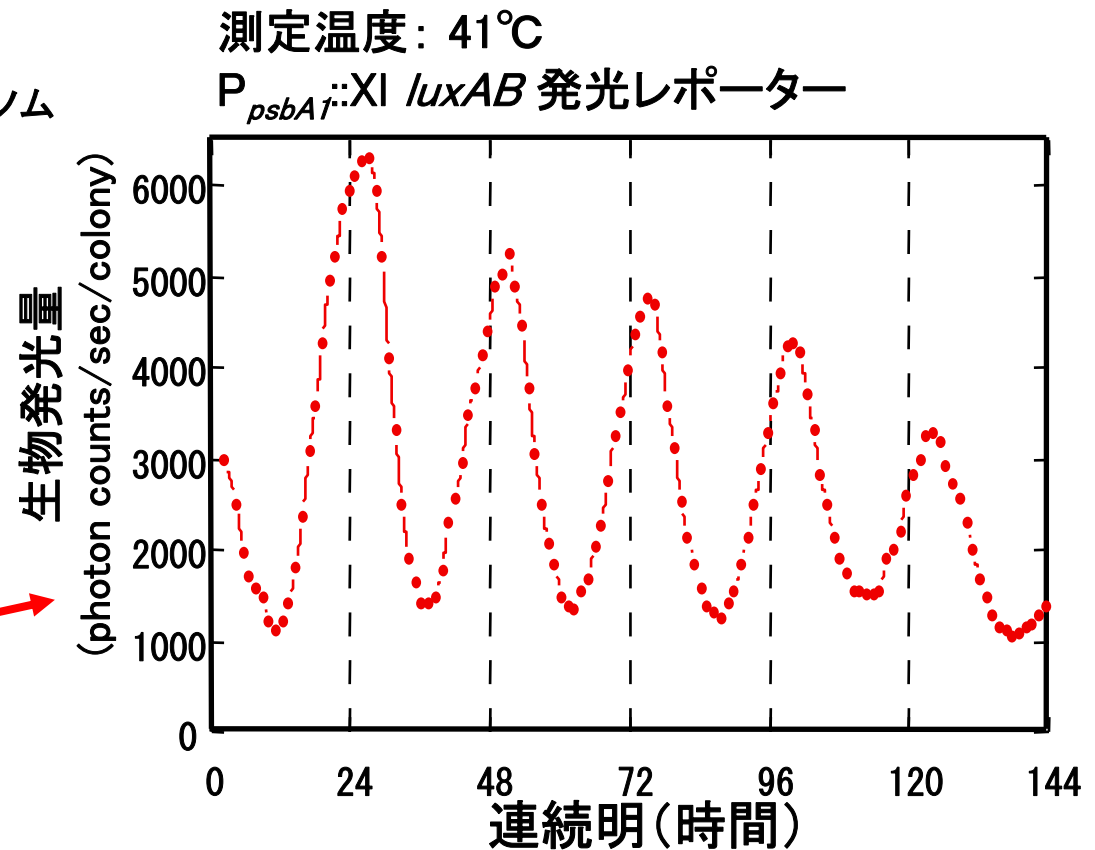
- 発光レポーター株の作製



- 生物発光リズムの測定

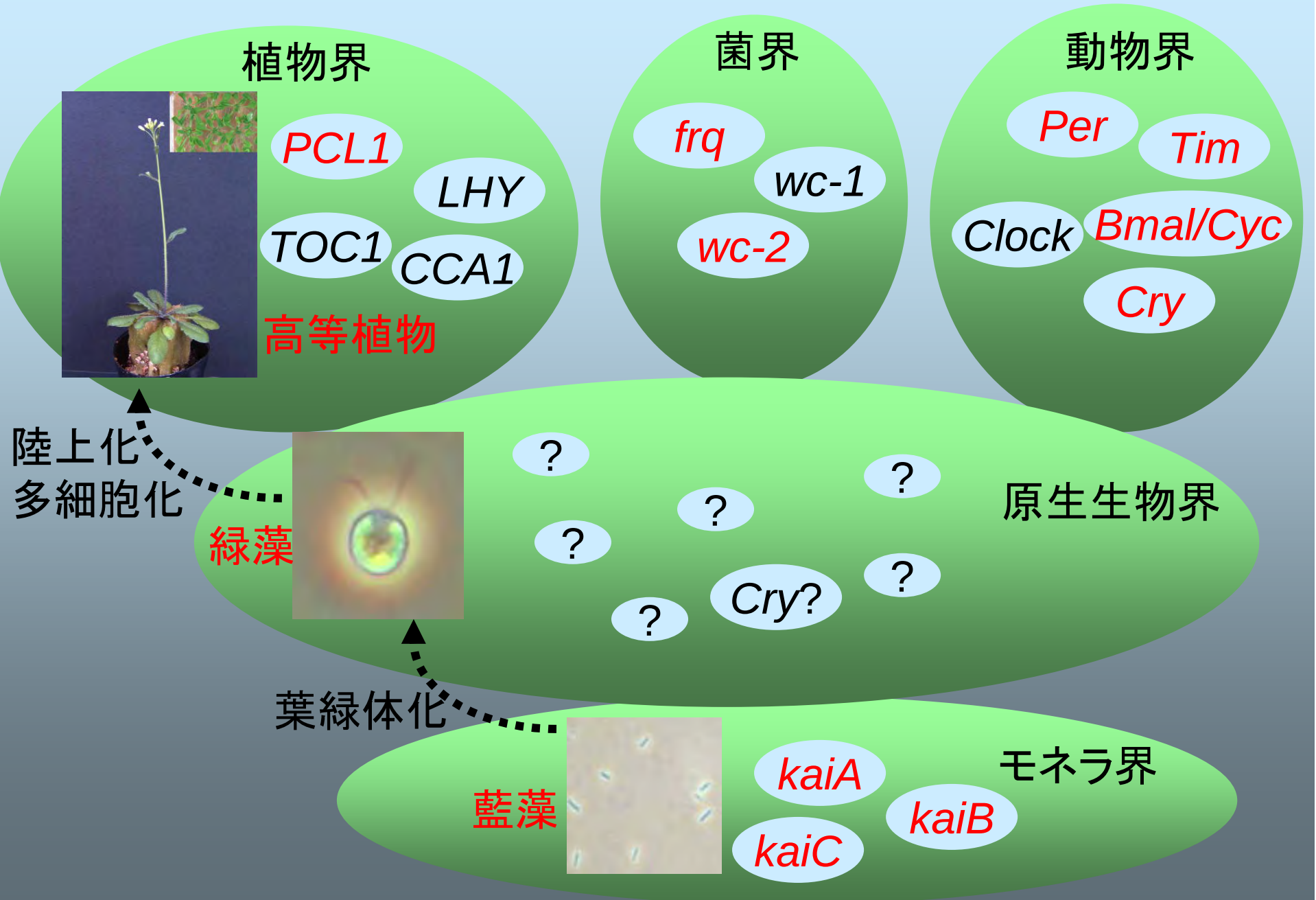


96穴プレートに入れた
発光レポーター株の
シングルコロニー



好熱性生物にも生物時計が存在することの最初の例

生物界と時計遺伝子

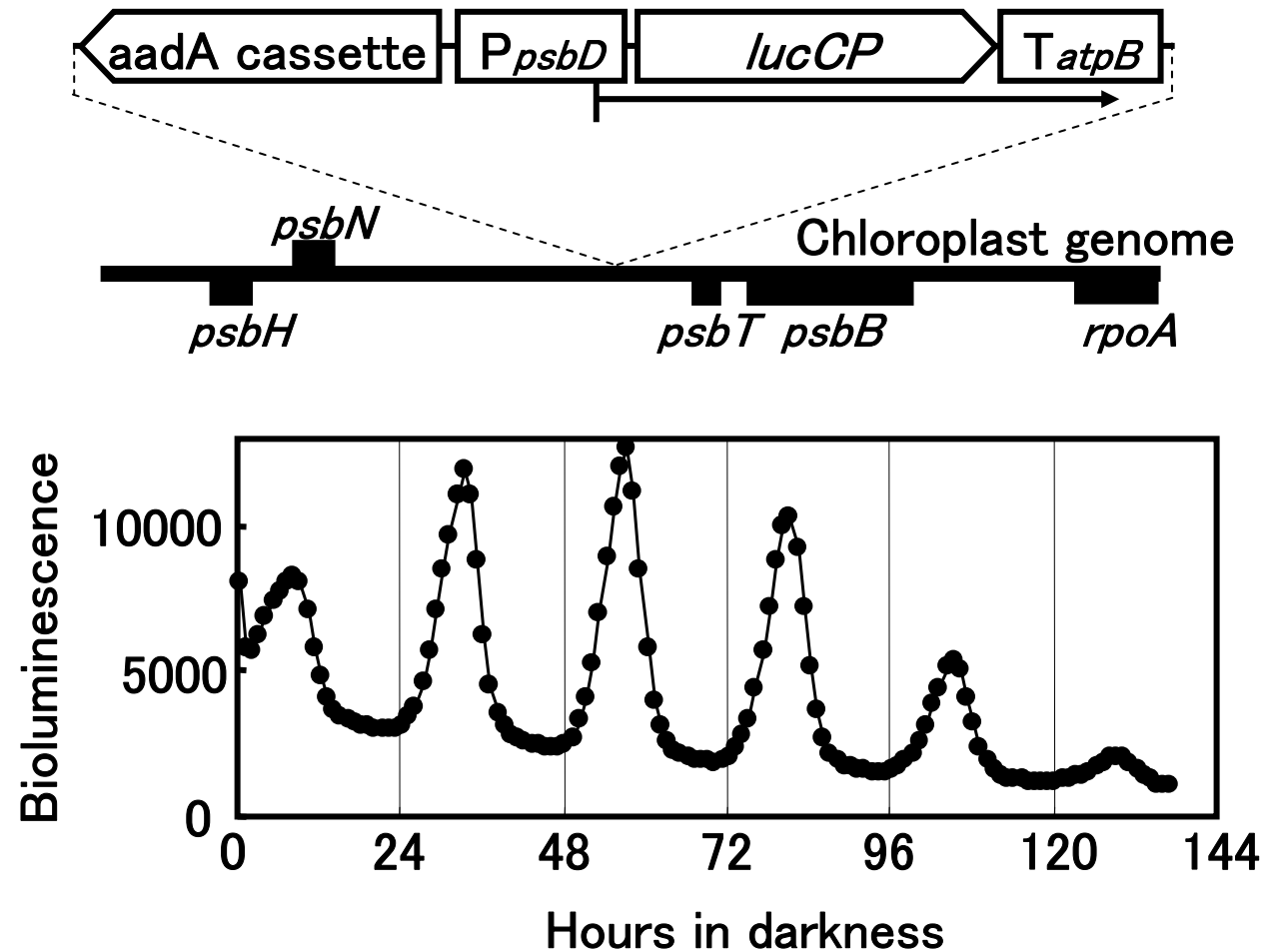


単細胞性緑藻クラミドモナスの生物発光リズム

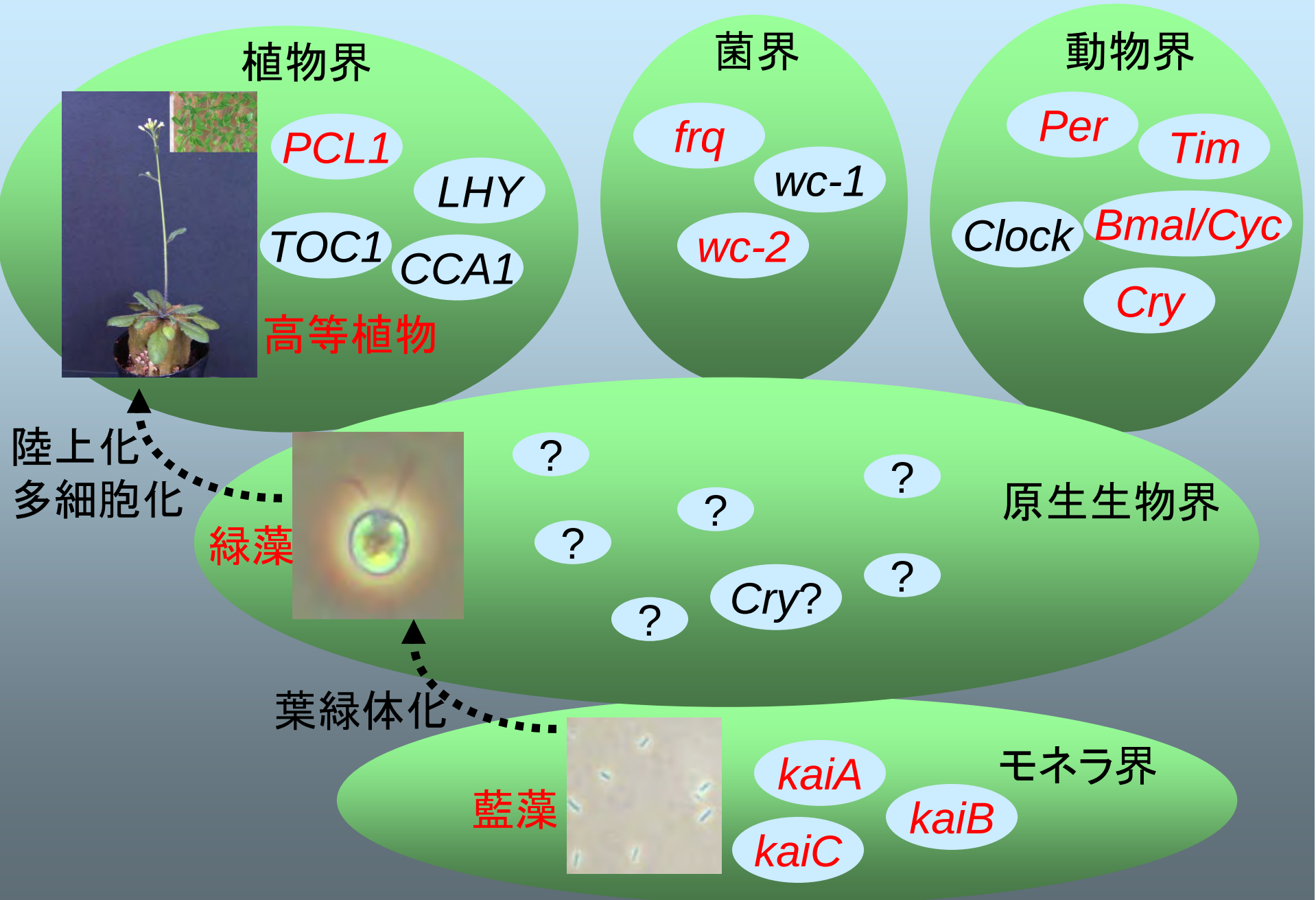
-葉緑体遺伝子発現の概日リズムを生物発光として見る



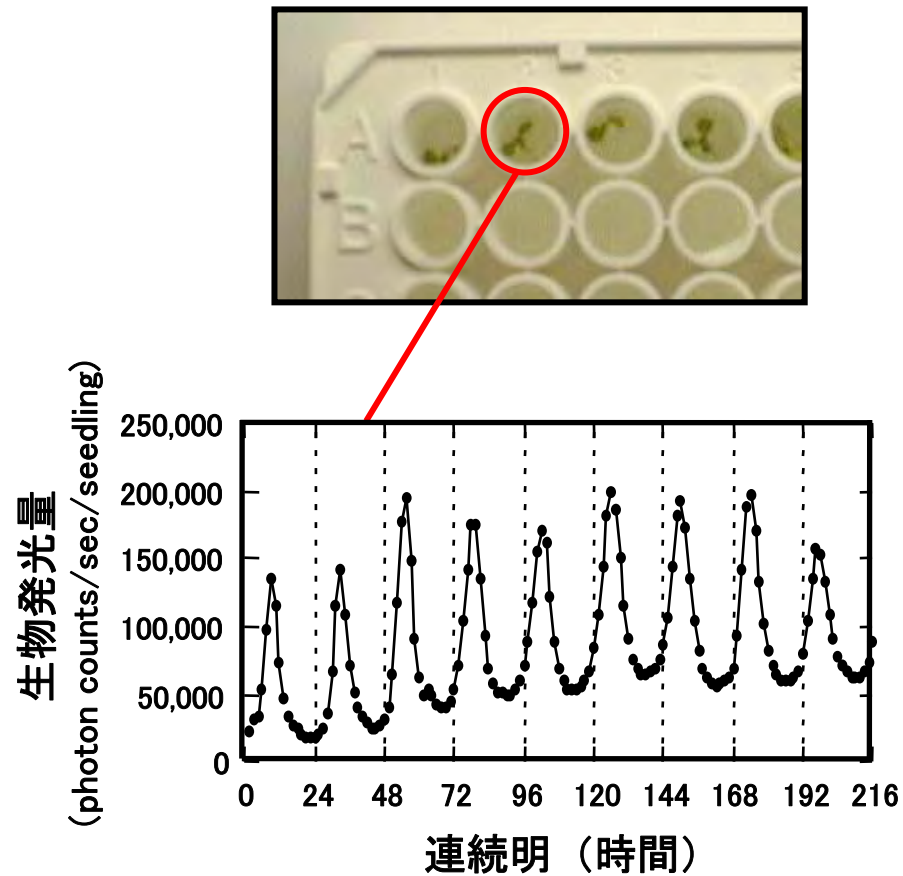
クラミドモナス



生物界と時計遺伝子



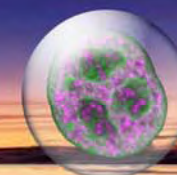
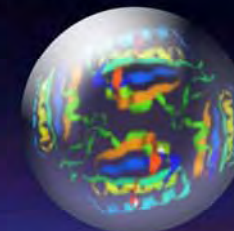
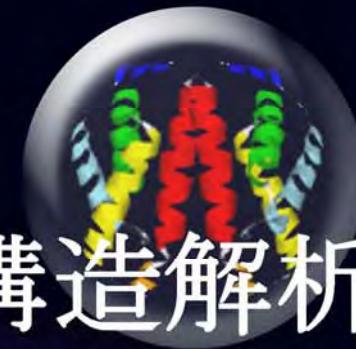
高等植物シロイヌナズナの生物発光リズム



シロイヌナズナ
Arabidopsis thaliana

Onai *et al.*, 2004, Plant J. 40:1-11

好熱性藍色細菌 時計タンパク質のX線結晶構造解析



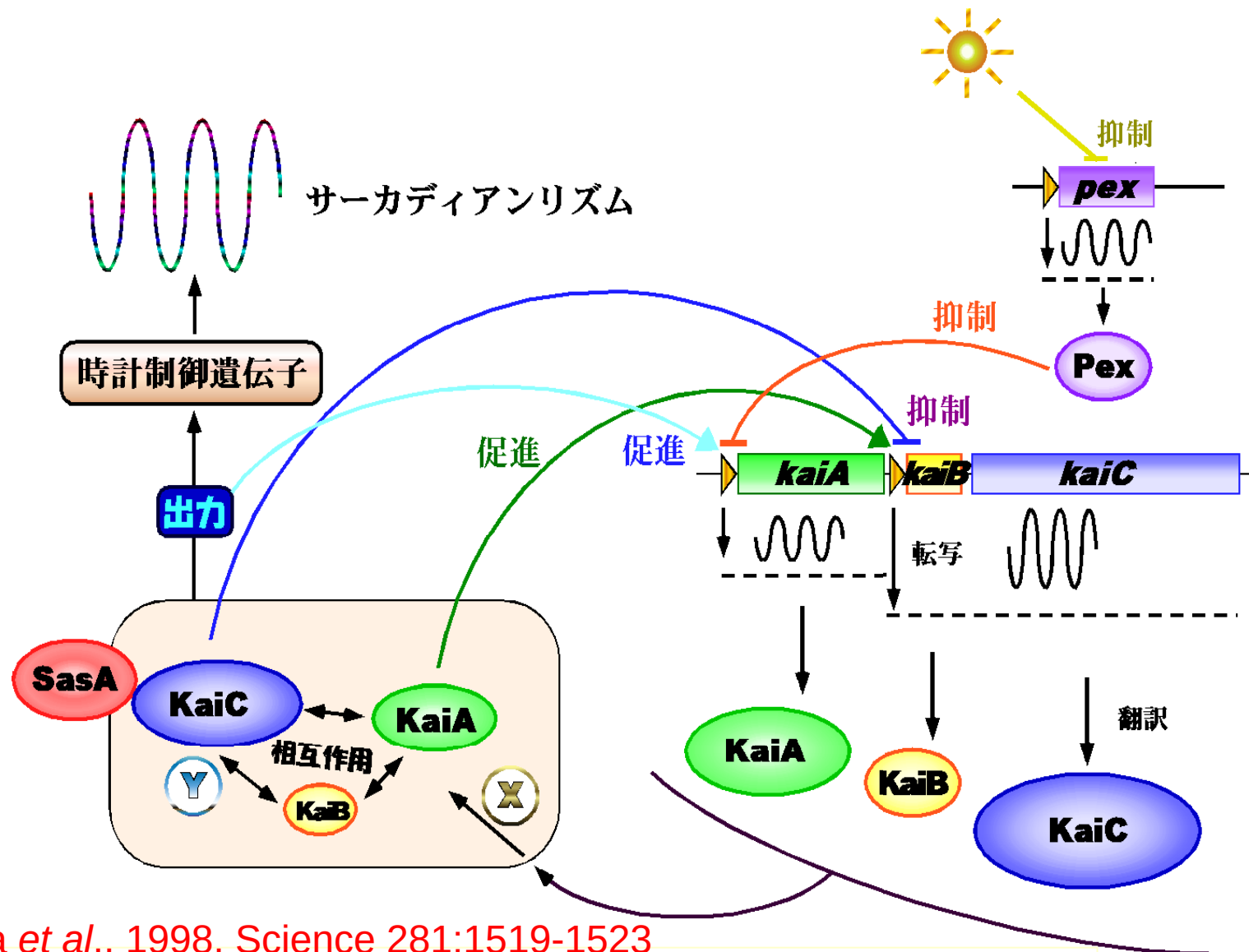
名古屋大学遺伝子実験施設
石浦 正寛

E-mail: Ishiura@gene.nagoya-u.ac.jp

TEL: 052-789-4527; FAX: 052-789-4526

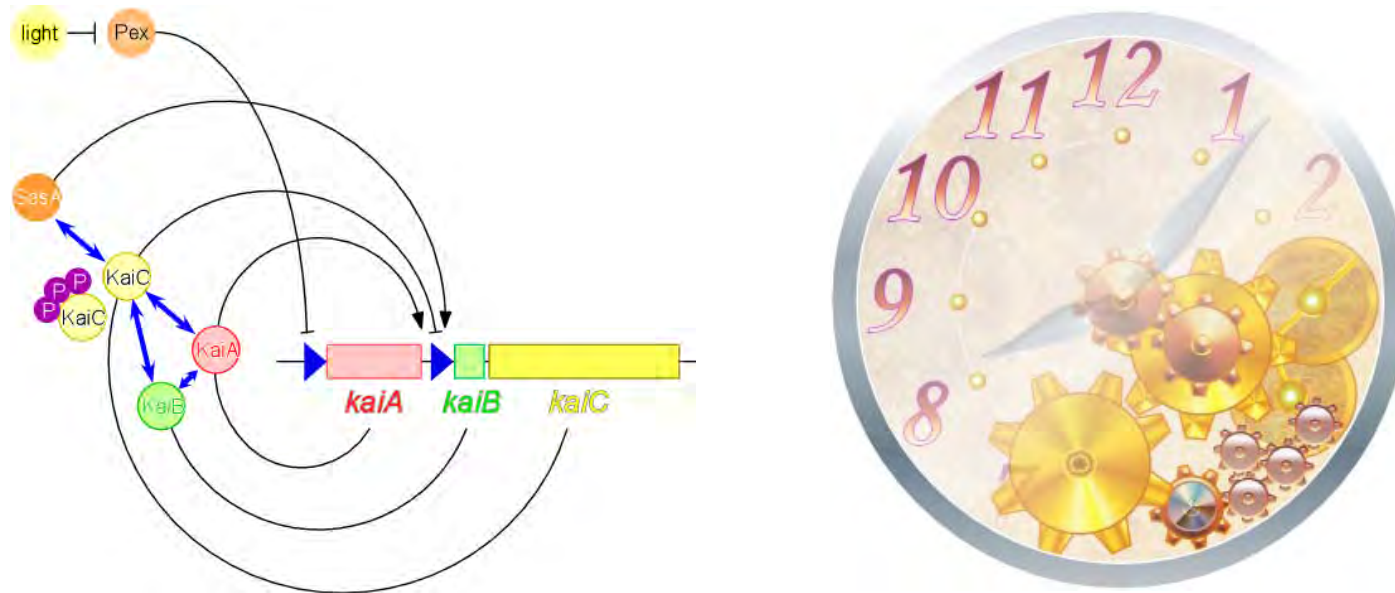
<http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~ishiura-g/>

常温性藍色細菌 *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 の *kai ABC* 遺伝子クラスターの転写制御



Ishiura et al., 1998, Science 281:1519-1523

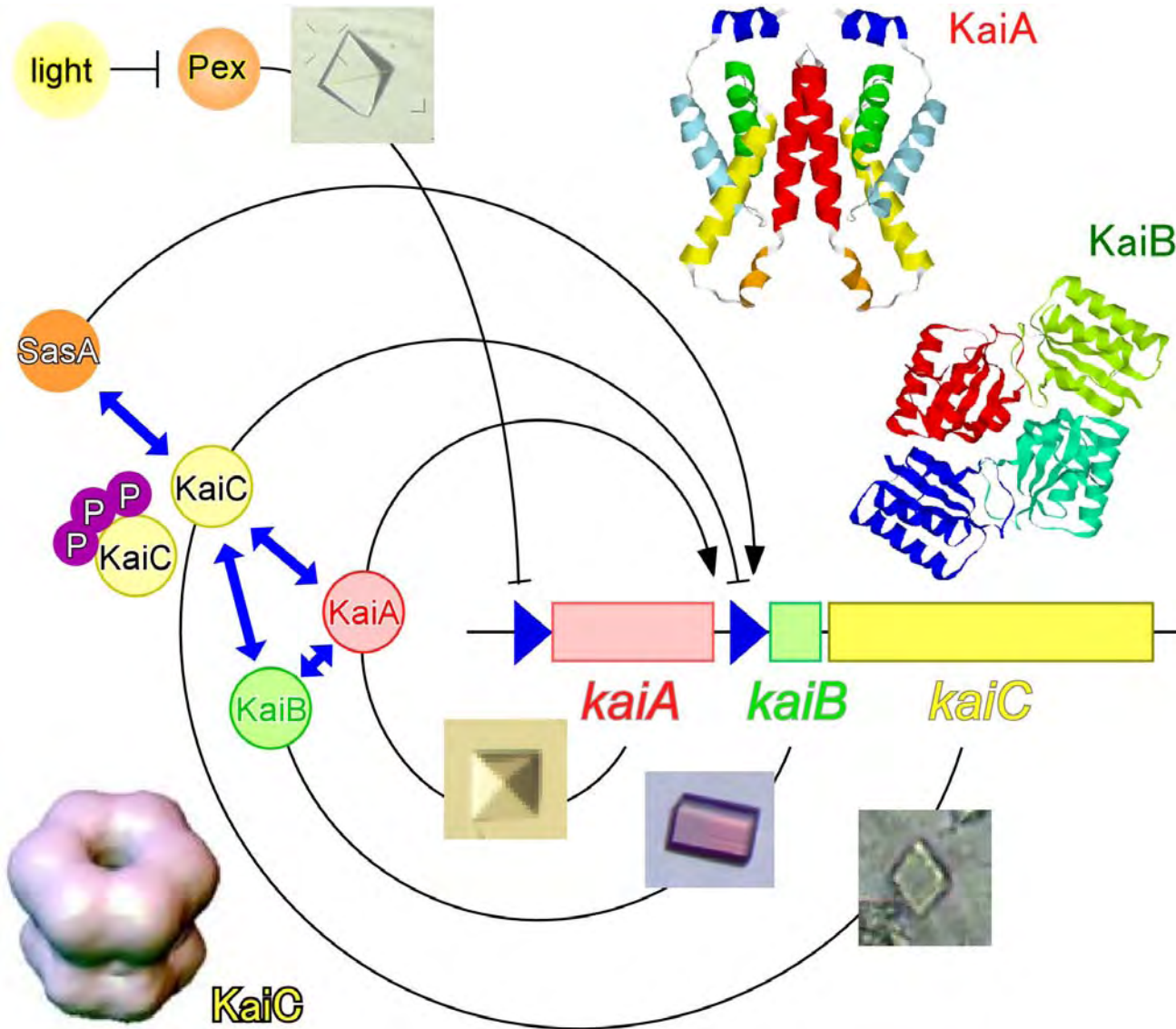
分子遺伝学から構造生物学・生化学へ



生物時計を「精巧な分子装置」として捉えて、
原子レベルで解明したい

発振の継続性、周期の安定性(正確で温度に影響されない、24-h、時計の時刻合わせ(リセット))

- ・時計タンパク質、時計関連タンパク質は時計の部品
- ・構造の解明＝部品の形状(大きさ、歯の数など)、種類(振り子、歯車など)の決定
- ・機能の解明＝歯車と歯車の相互作用、針が動く仕組みの決定



生物時計を精巧な分子装置(タンパク質複合体)と捉えて、時計発振を原子レベルで解明したい(構造解析と機能解析)。

3つの時計タンパク質
KaiA、KaiB、KaiCを
Mg²⁺-ATP存在下で反
応させると、24時間周
期のリン酸化リズムが
生じる(名古屋大近藤
グループ、2005)。

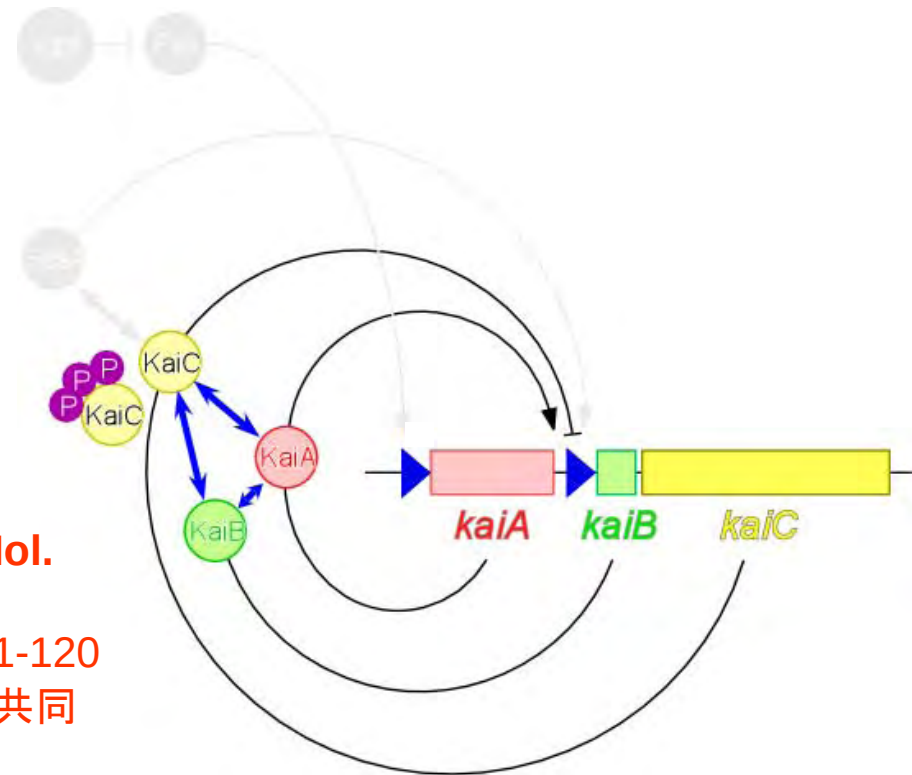
結晶構造解析、NMR解析

1. タンパク質の研究に適した耐熱性タンパク質が利用できる別府温泉産の好熱性藍色細菌で人工生物発光リズム細胞をつくる。
2. 時計タンパク質を大腸菌で大量生産し、結晶化し、X線結晶構造解析でタンパク質の原子構造を解明する。
3. NMR解析でタンパク質間相互作用を解明する。

The clock: **KaiA**, KaiB, KaiC

- ・振動子
- ・リズム発振に不可欠

1. Uzumaki *et al.*, 2004, **Nature Struct. Mol. Biol.**, 11:623- 631
2. 宇津巻等, 2005, 蛋白質核酸酵素 50:111-120
(京都大学薬学研究科加藤博章研究室との共同研究)



KaiAのアライメント解析



N末端ドメイン 中央ドメイン C末端ドメイン

N

C

KaiAドメイン欠失変異体のリズム

kaiA genotypes
(KaiA expressed)

kaiA-null strain (host strain)
(None)

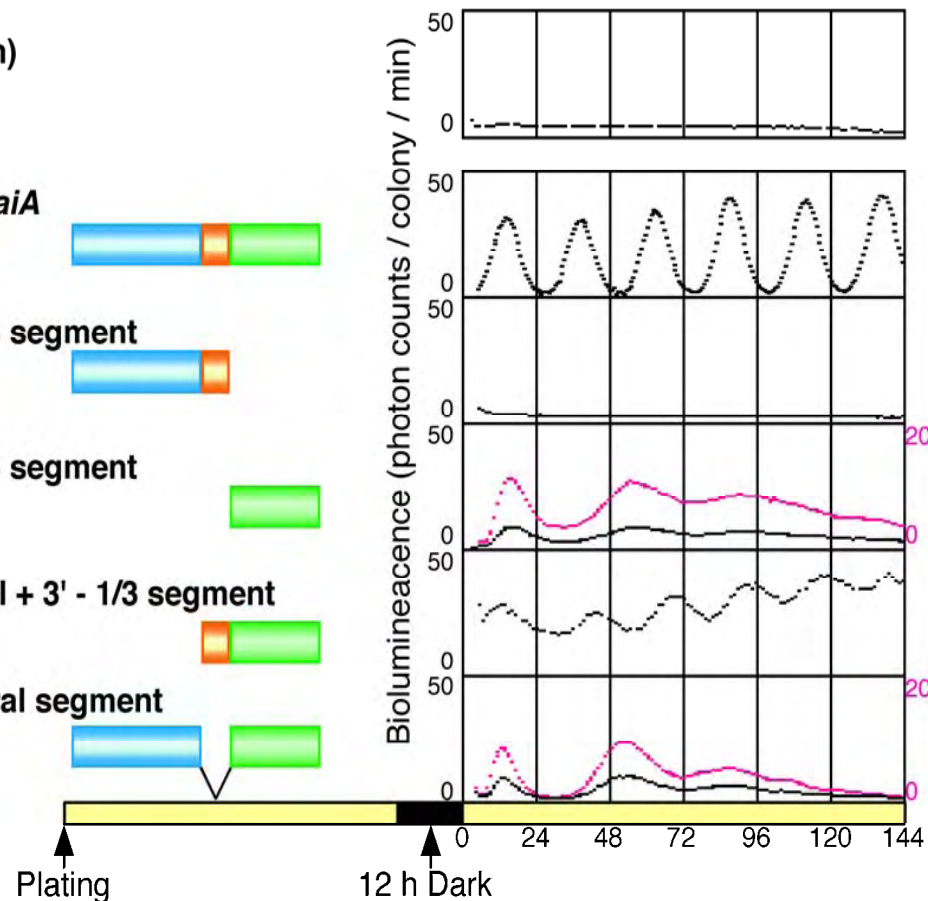
Synechococcus wild-type *kaiA*
(*SynKaiA*₁₋₂₈₄ [full-length])

Synechococcus kaiA 5' - 2/3 segment
(*SynKaiA*₁₋₁₇₄)

Synechococcus kaiA 3' - 1/3 segment
(*SynKaiA*₁₇₅₋₂₈₄)

Synechococcus kaiA central + 3' - 1/3 segment
(*SynKaiA*₁₄₀₋₂₈₄)

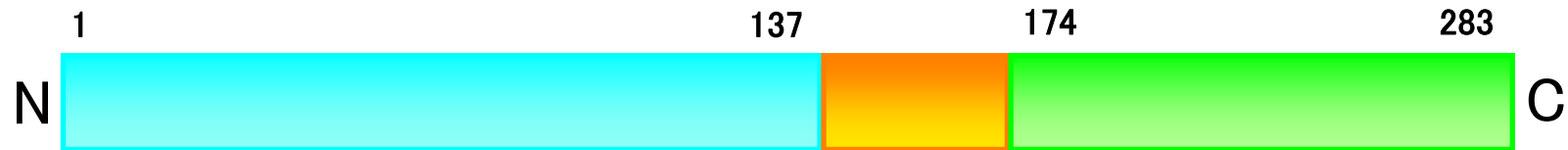
Synechococcus kaiA Δcentral segment
(*SynKaiA*_{1-139 + 175-284})



- C末端ドメイン: リズムを発振
- 中央ドメイン: 周期を24時間に調節
- N末端ドメイン: 振幅を増幅



KaiAの3つの機能ドメイン



N末端ドメイン

振幅の増幅

(Amplitude amplifier)

中央ドメイン

周期の調節

(Period adjuster)

C末端ドメイン

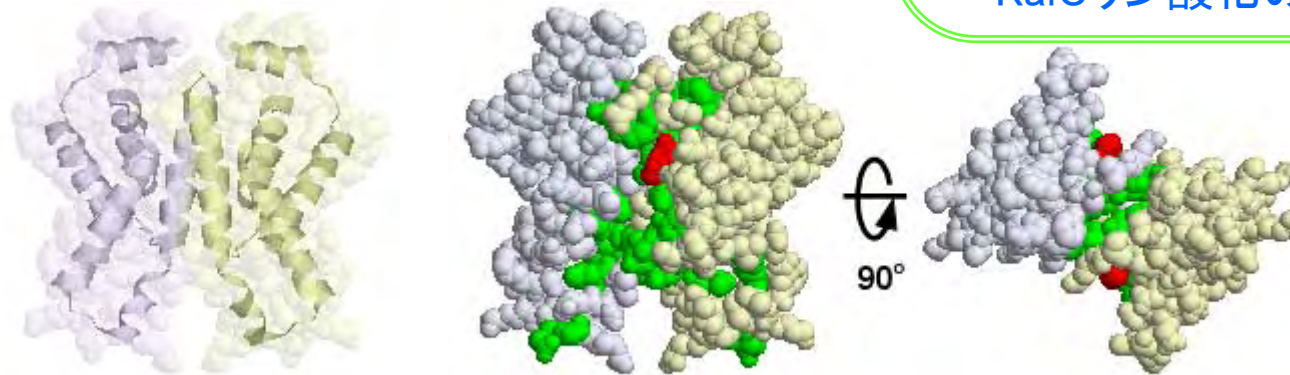
リズムの発振

(Clock oscillator)

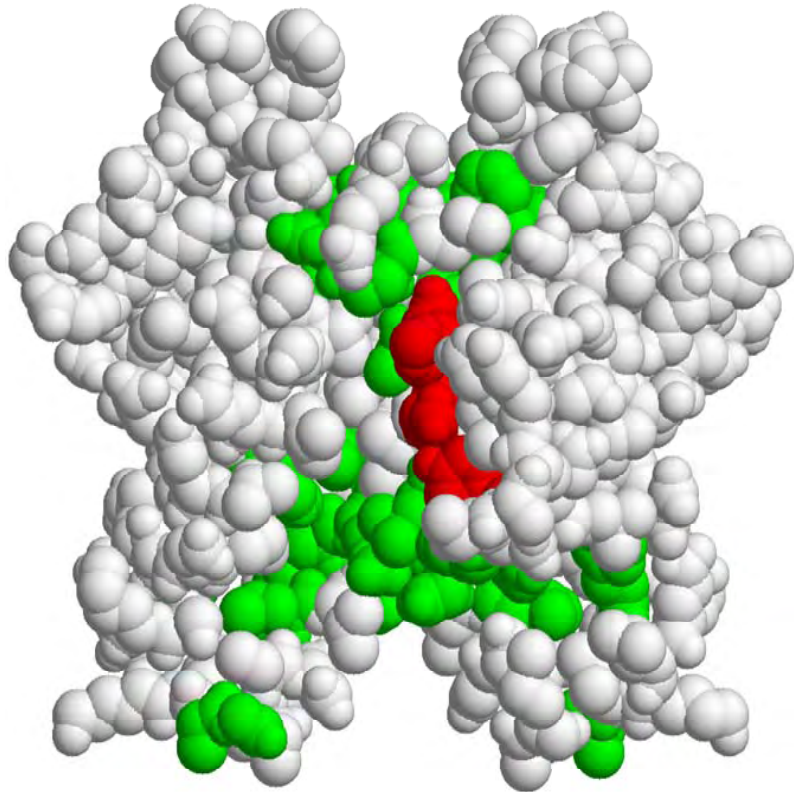
二量体形成

KaiCとの結合

KaiCリン酸化の促進



保存残基のマッピング

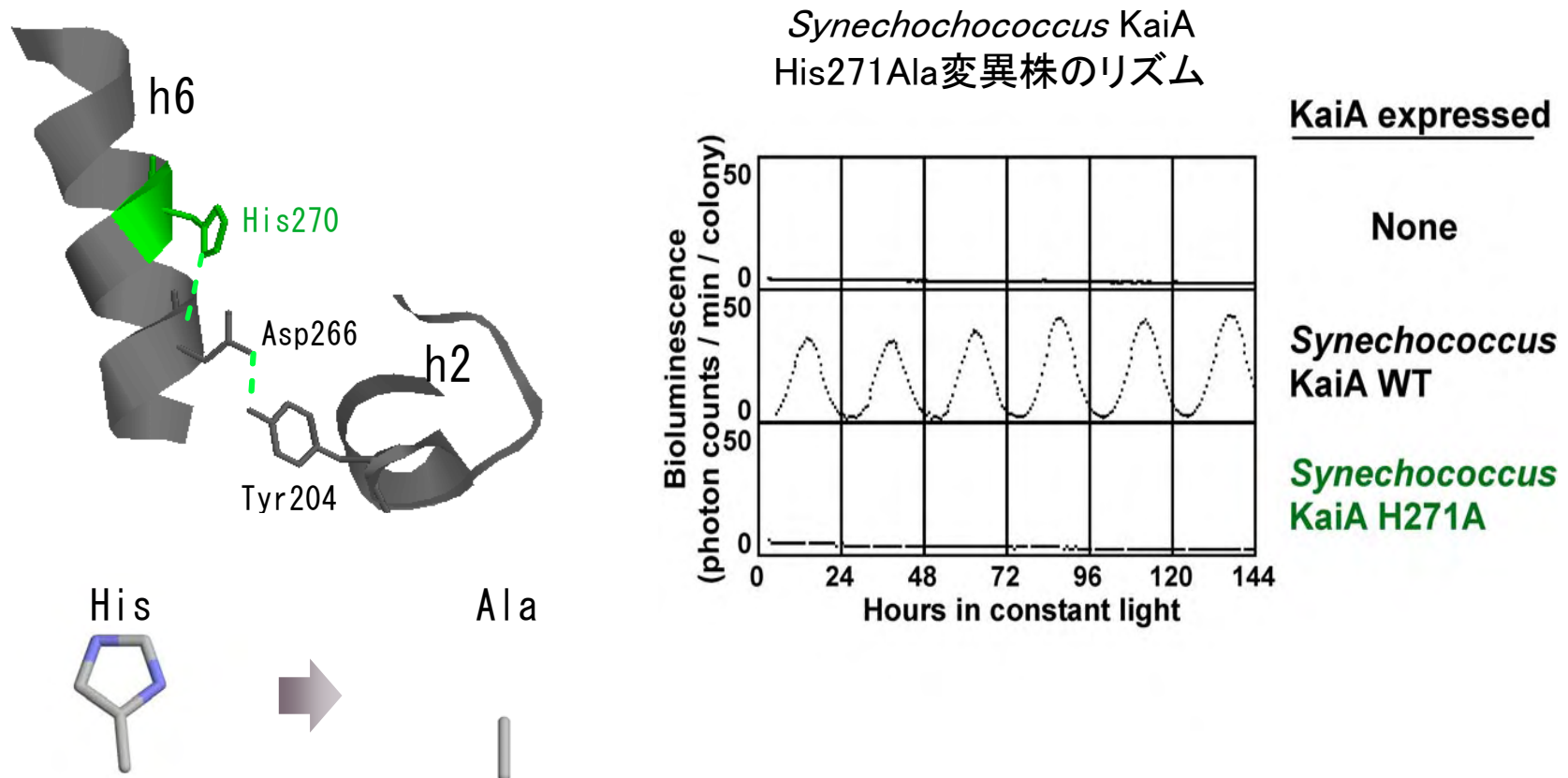


赤と緑は保存残基

- 保存残基の多くは、二量体形成面に並んでいる。
- Tyr204、Asp266、His270は、二量体によって形成される曲面の最深部に位置し、水素結合で連結されている。
- Asp266、His270は、KaiA分子の外側（溶媒側）に側鎖を伸ばしている。
- Tyr204は、Asp266、His270の位置を固定している。
- これらの残基は何らかの機能を担っていると予想される。

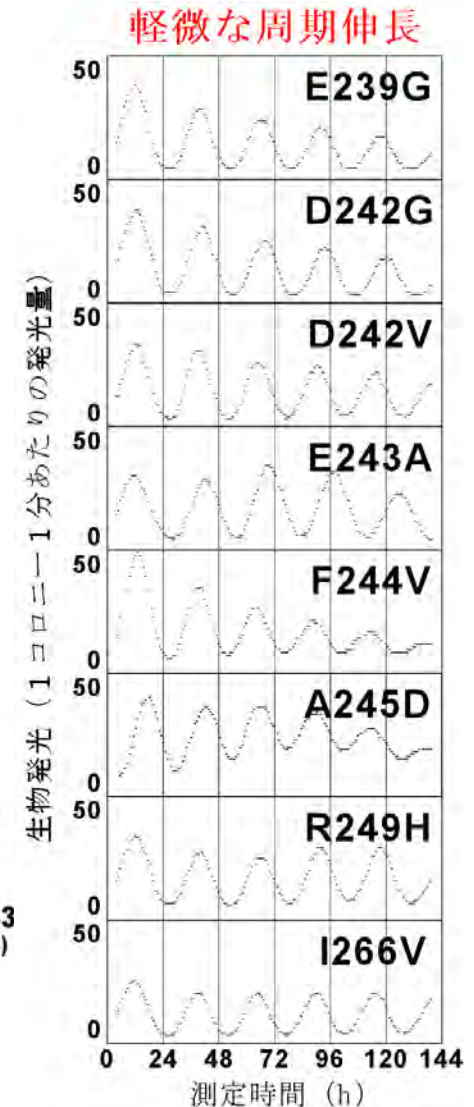
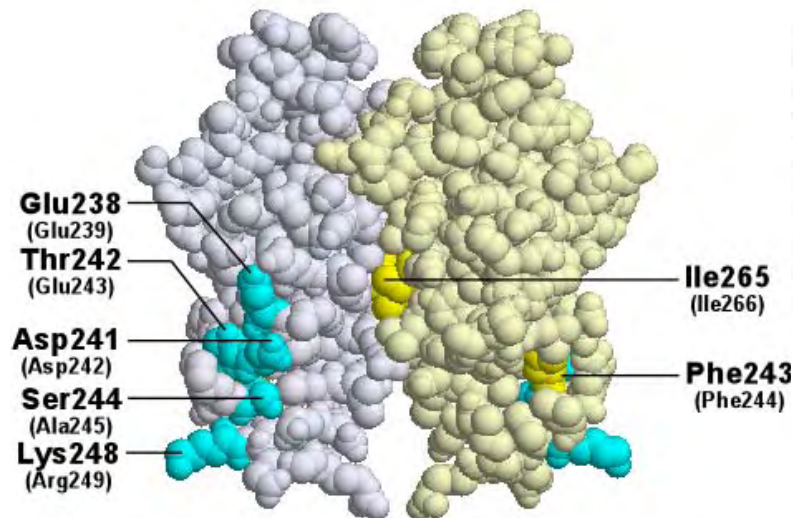
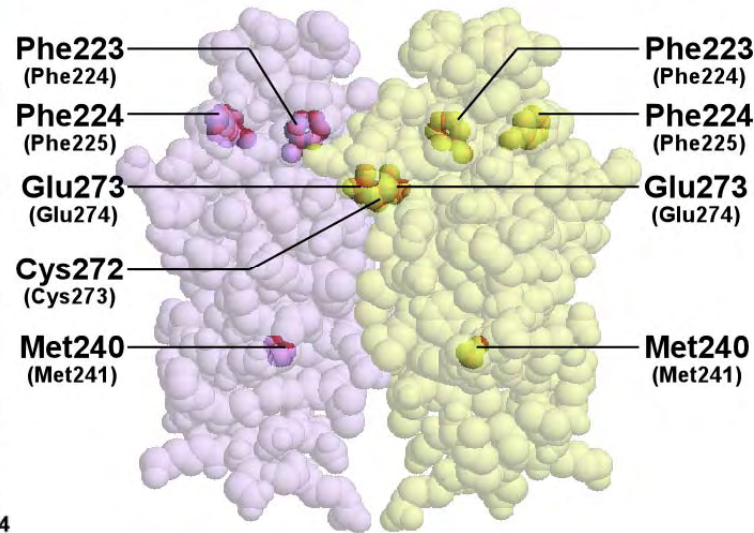
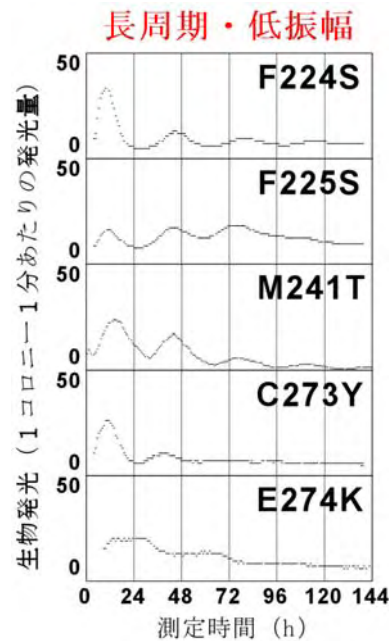
His270Ala変異タンパク質の解析

リズム測定は測定が容易な *Synechococcus* を宿主細胞を用いて行った。



Synechococcus KaiA His271Ala変異株では、リズム発振は全く認められなかった。

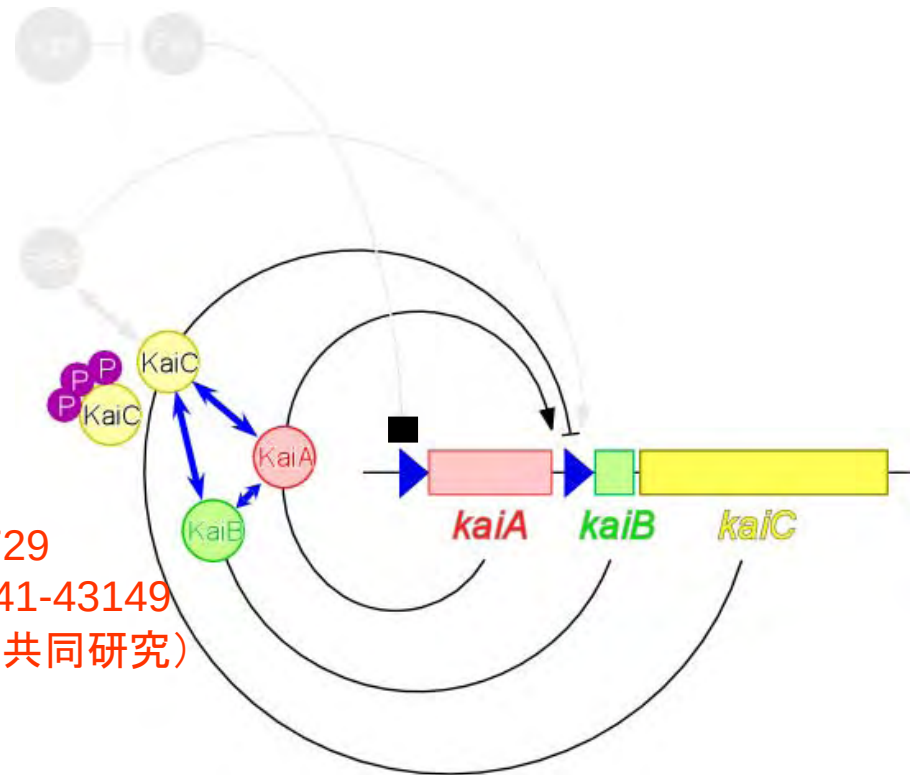
時計発振ドメインの機能-構造相関



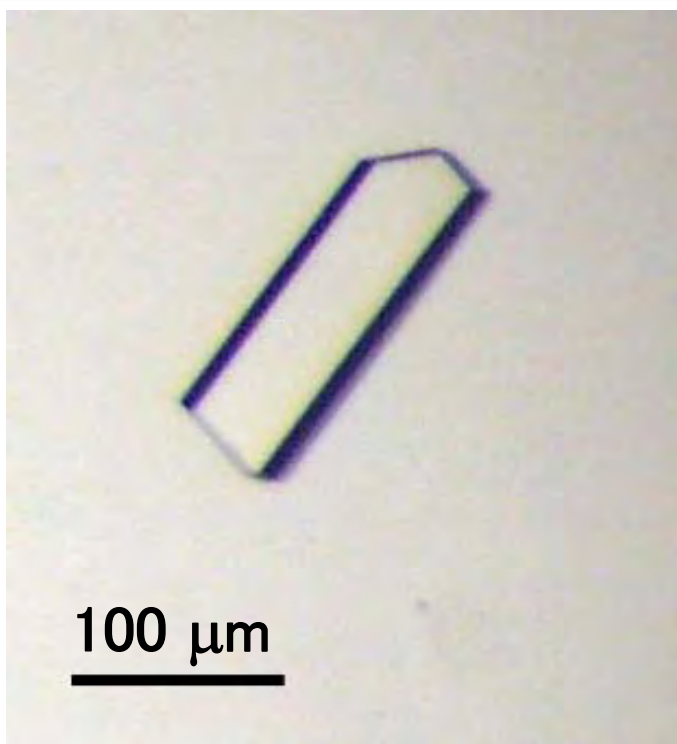
The clock: KaiA, KaiB, KaiC

- ・振動子
- ・リズム発振に不可欠

1. Iwase *et al.*, 2004, **Acta Crysta.** D60:727-729
2. Iwase *et al.*, 2005, **J. Biol. Chem.** 280:43141-43149
(大阪大学生命機能研究科難波啓一研究室との共同研究)



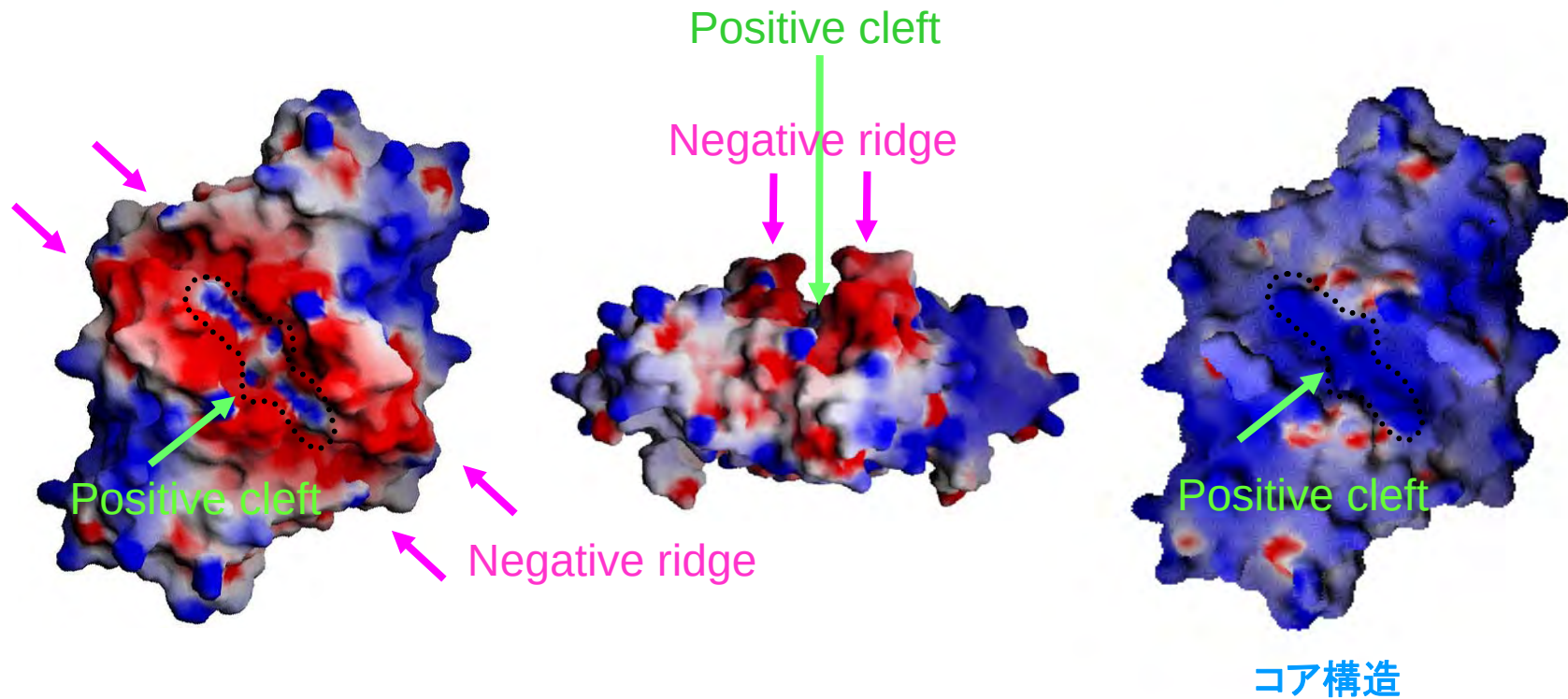
結晶化、構造解析



KaiB 結晶の一例

- 最大約 0.5 mm の結晶が得られた
- SPring-8 (BL38B1、BL41XU) でデータ収集
- Osを付加した結晶を作製し、MAD法を利用して位相決定
- 2.6 Å の解像度で構造解析

Positive cleft はNegative ridgeに隠されている

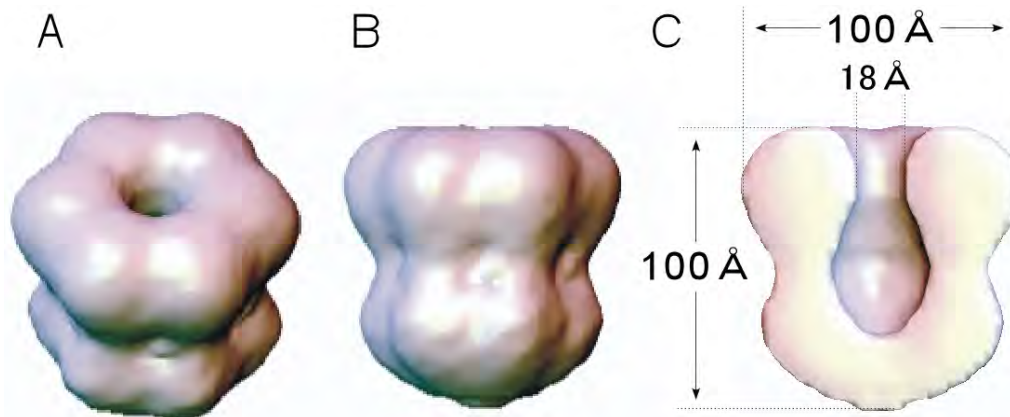
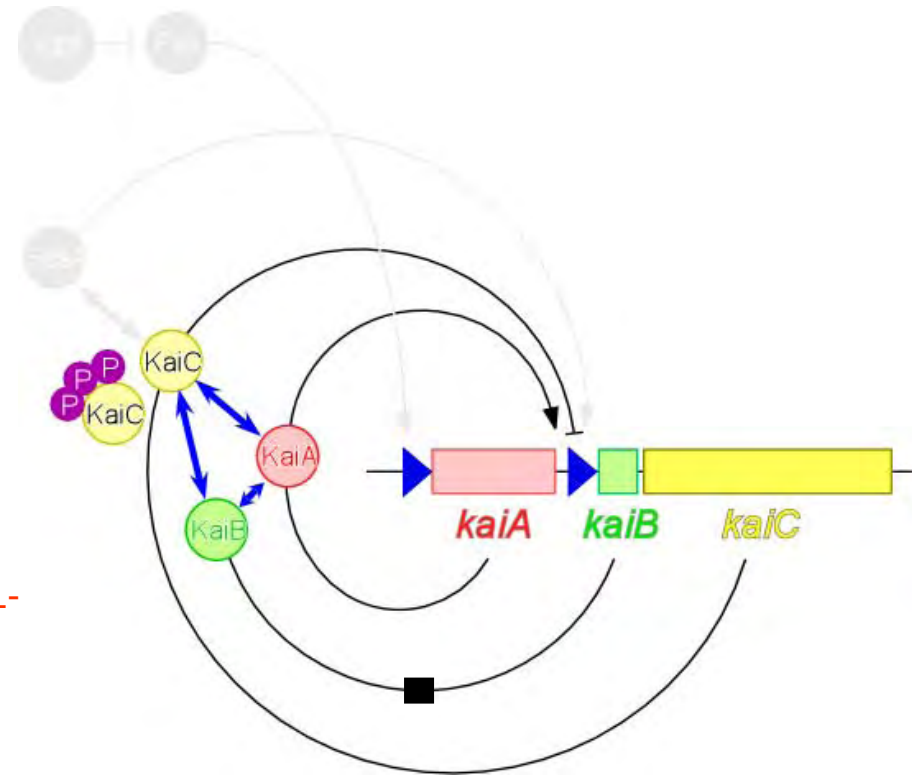


- C末端酸性アミノ酸領域はコア構造の上に局在し、Positive cleftを囲んでいる。
- Negative ridgeは蝶番のように動くのではないか。

The clock: KaiA, KaiB, KaiC

- ・振動子
- ・リズム発振に不可欠

1. Hayasi *et al.*, 2003, **Genes Cells** 8:287-296
2. Hayashi *et al.*, 2004, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 316:195-202
3. Hayashi *et al.*, 2004, **J. Biol. Chem.** 279:52331-52337
4. Hayashi *et al.*, 2006, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 348:864-872



N末端ドメイン: 高親和性ATP結合部位
六量体形成
C末端ドメイン: 低親和性ATP結合部位
熱安定性、リン酸化

電子顕微鏡像の単粒子解析による立体構造モデル

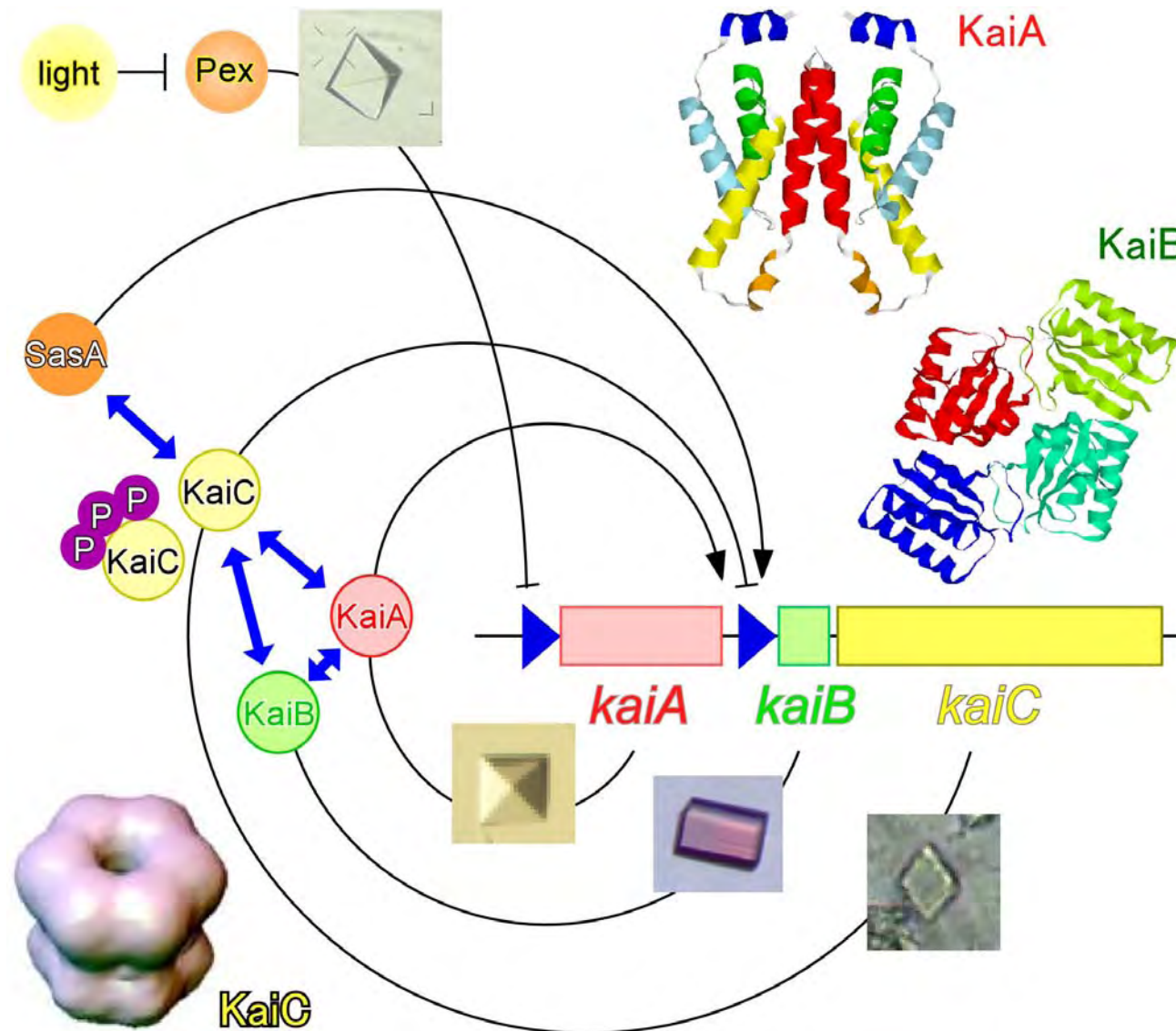
(大阪大学生命機能研究科難波研究室との共同研

究)

生物時計遺伝子と時計タンパク質の制御ループ

*pex*遺伝子は光で発現が抑制される。

KaiAタンパク質は P_{kaiA} プロモータ活性を抑制する。



クラミドモナスの生物時計の分子 遺伝学的研究

1. 生物発光リズム系の開発
2. リズム変異体の分離
3. 時計遺伝子のクローニング

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)

- 概日リズムを示す
- 核相が単相である
- コロニー形成する
- 遺伝子操作が可能であり、核・葉緑体・ミトコンドリアの各ゲノムに遺伝子移入が可能である
- 高効率な核ゲノムへの遺伝子移入法が開発されており、遺伝子相補を利用した遺伝子クローニングが可能である
- 核ゲノムと葉緑体ゲノムにおけるコドン使用頻度が特異であり、外来遺伝子の発現が困難である



Chlamydomonas の顕微鏡写真

葉緑体レポーター株の作製

Matsuo *et al.*, 2006, Mol. Cell. Biol. 26:863-870

葉緑体ルシフェラーゼ遺伝子

クラミドモナスの葉緑体ゲノムのコドン使用頻度に最適化したホタルルシフェラーゼ (*lucCP*) を人工合成した。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
atggaagatg ctaaaaatat taaaaaagg tccagctccat tttatccatt agaagatggg acagctgggt aacaattaca taaagctatg aaacggttat ctttagttcc aggtacaatt

130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
gcttttacag atgctcatat tgaagtgat attacatat ctgaatat tgaatgtca gttcgttttag ctgaagctat gaaacggttat gggttaaata caaatcatcg tattgttgtt

250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
tgttcagaaa attcattaca attttttatg ccagttttag gtgctttatt tattggtgtt gctgttgctc cagctaataga tatttataat gaacgtgaat tattaaattc aatgggtatt

370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
tcacaaacaa cagttgtttt tgtttcaaaa aaaggtttac aaaaaatttt aaatgttcaa aaaaaattac caattattca aaaaaattatt attatggatt caaaaaacaga ttatcaagggt

490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
tttcaatcaa tgtatacatt tgttacatca catttacac cagggttttaa tgaatatgat tttgttccag aatcatttga tcgtgataaaa acaattgctt taattatgaa ttcacagggt

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
tcaacagggtt taccaaaaag tgttgcttta ccacatcgta cagcttgtgt tcgtttttca catgctcgtg atccaatttt tggtaatcaa attattccag atacagctat tttatcagtt

730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
gttccatttc atcatgggtt tggtatgttt acaacattag gttatttaaat ttgtggtttt cgtgttggtt taatgtatcg ttttgaagaa gaattatttt tacgttcatt acaagattat

850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
aaaattcaat cagctttatt agttccaaca ttattttcat tttttgctaa atcaacatta attgataaat atgatttatc aaattttacat gaaattgctt cagggtggtgc tccattatca

970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
aaagaagttg gtgaagctgt tgctaaacgt tttcatttac cagggtattcg tcaagggttat gggttaacag aaacaacatc agctatttta attacaccag aagggtgatga taaaccagggt

1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
gctgttggtt aaagttgtcc attttttgaa gctaaaagttg ttgatttaga tacaggtaaaa acattagggtg ttaatcaacg tgggtgaatta tgtgttcgtg gtccaatgat tatgtcagggt

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300    1310    1320
tatgttaata atccagaagc tacaaatgct ttaattgata aagatgggtg gttacattca ggtgatattg cttattggga tgaagatgaa cattttttta ttgttgatcg tttaaaaatca

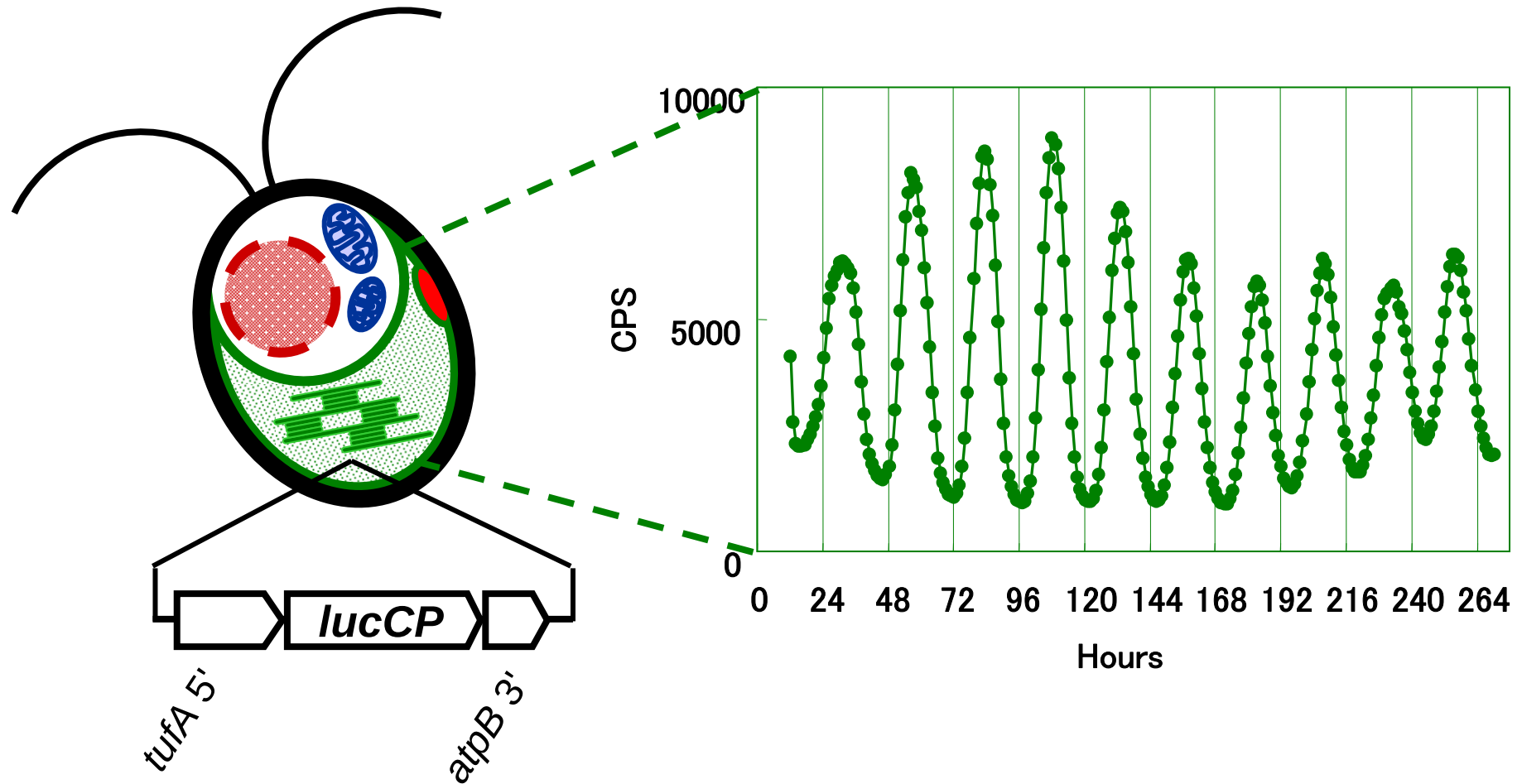
1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
ttaattaaat ataaagggtt tcaagttgct ccagctgaat tagaatcaat tttattacaa catccaaata tttttgatgc tgggtgttgc gggttaccag atgatgatgc tgggtgaatta

1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520    1530    1540    1550    1560
ccagctgctg ttgttgtttt agaacatggg aaaacaatga cagaaaaaga aattgttgat tatgttgctt cacaagttac aacagctaaa aaattacgtg gtggtgttgt ttttgttgat

1570    1580    1590    1600    1610    1620    1630    1640    1650    1660
gaagttccaa aagggttaac aggtaaaatta gatgctcgta aaattcgtga aatttttaatt aaagctaaaa aagggtggtaa aattgctgtt taa

```

葉緑体生物発光レポーター一株



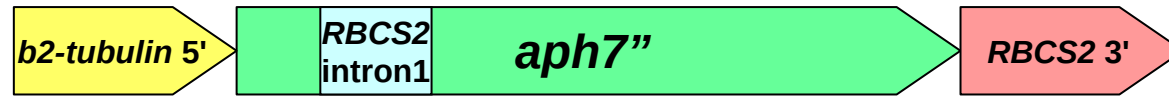
葉緑体ルシフェラーゼ遺伝子

概日リズム変異体のスクリーニング

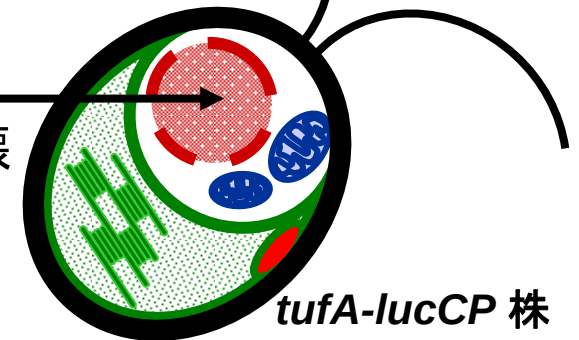
(Matuo *et al.*, 2008, Gene & Dev.)

概日リズム変異体のスクリーニング

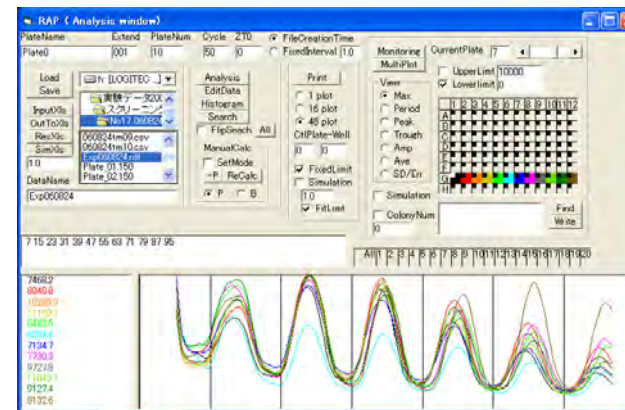
葉緑体レポーター株の核ゲノムにハイグロマイシン耐性遺伝子を移入



ランダムに核ゲノムに挿入され遺伝子破壊
(遺伝子タギング)

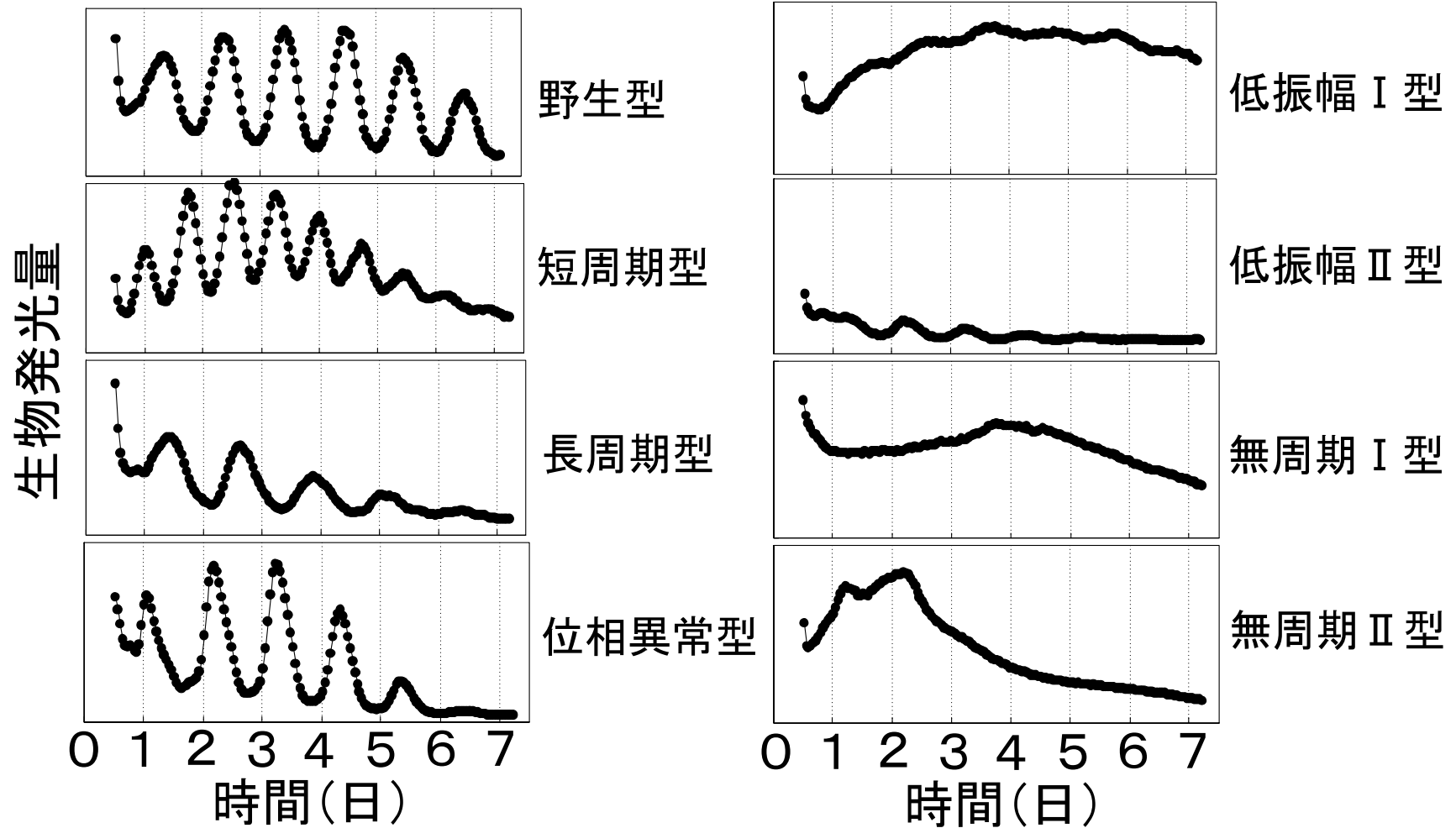


～16000のハイグロマイシン耐性クローンの葉緑体リズムを測定



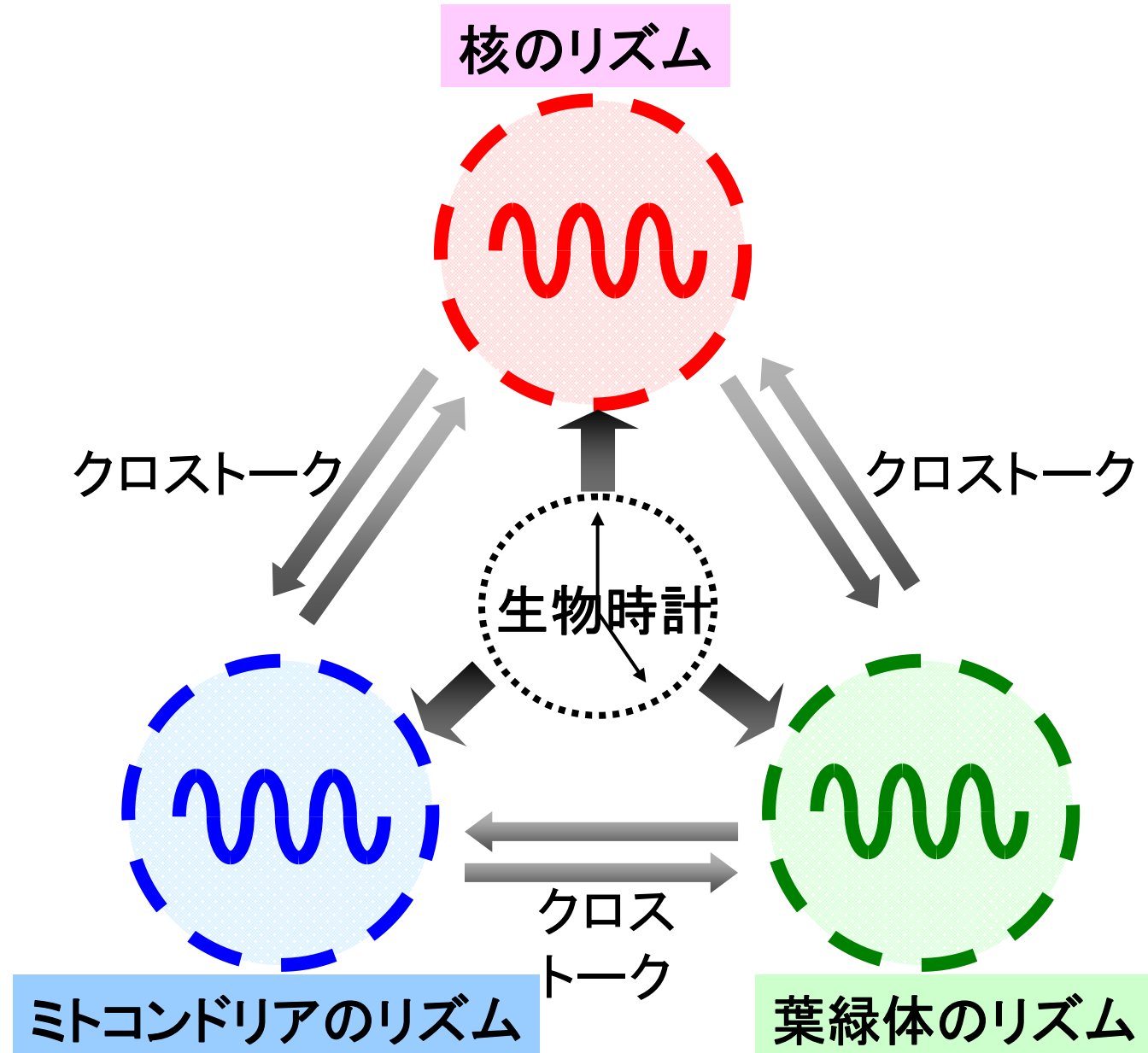
115の概日リズム変異体を単離

代表的な概日リズム変異体



核レポーター株の作製 (松尾ら、未発表)

オルガネラ間の時間情報のクロストーク



時計遺伝子のクローニング

(松尾ら、進行中)

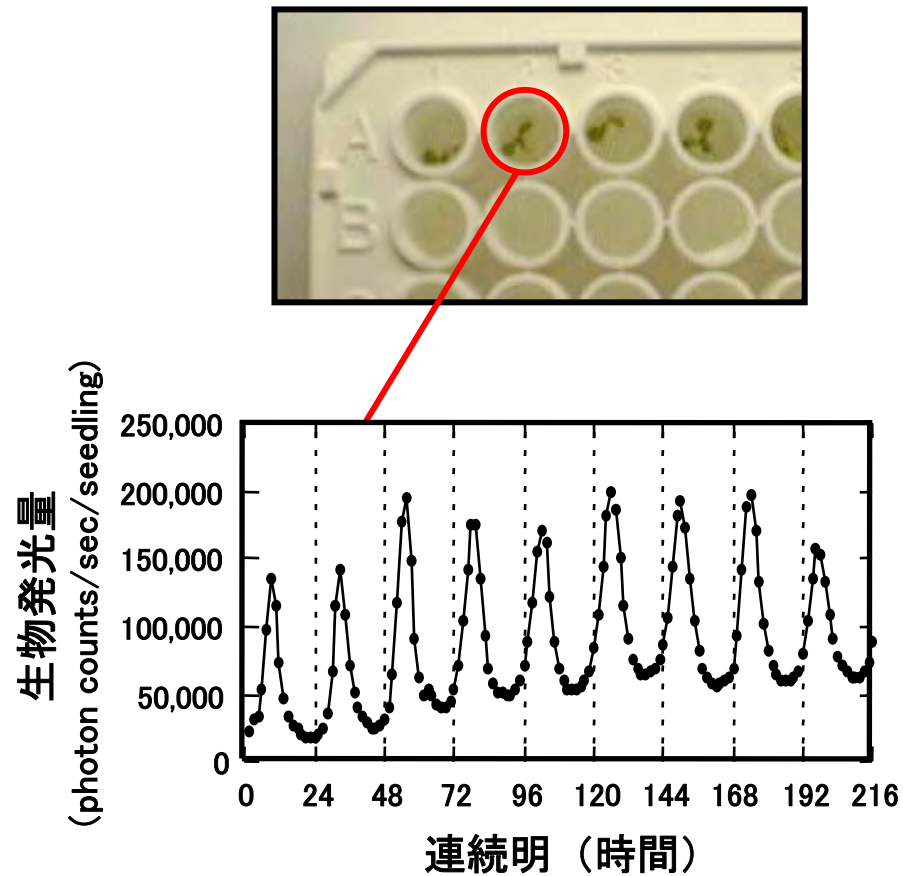
タグ配列のゲノム挿入部位の塩基配列を決定することにより、原因遺伝子の同定を進めている。

今後、**全ての変異体の原因遺伝子をクローニングする。**

シロイヌナズナの時計遺伝子 *PCL1*のクローニング (小内ら)

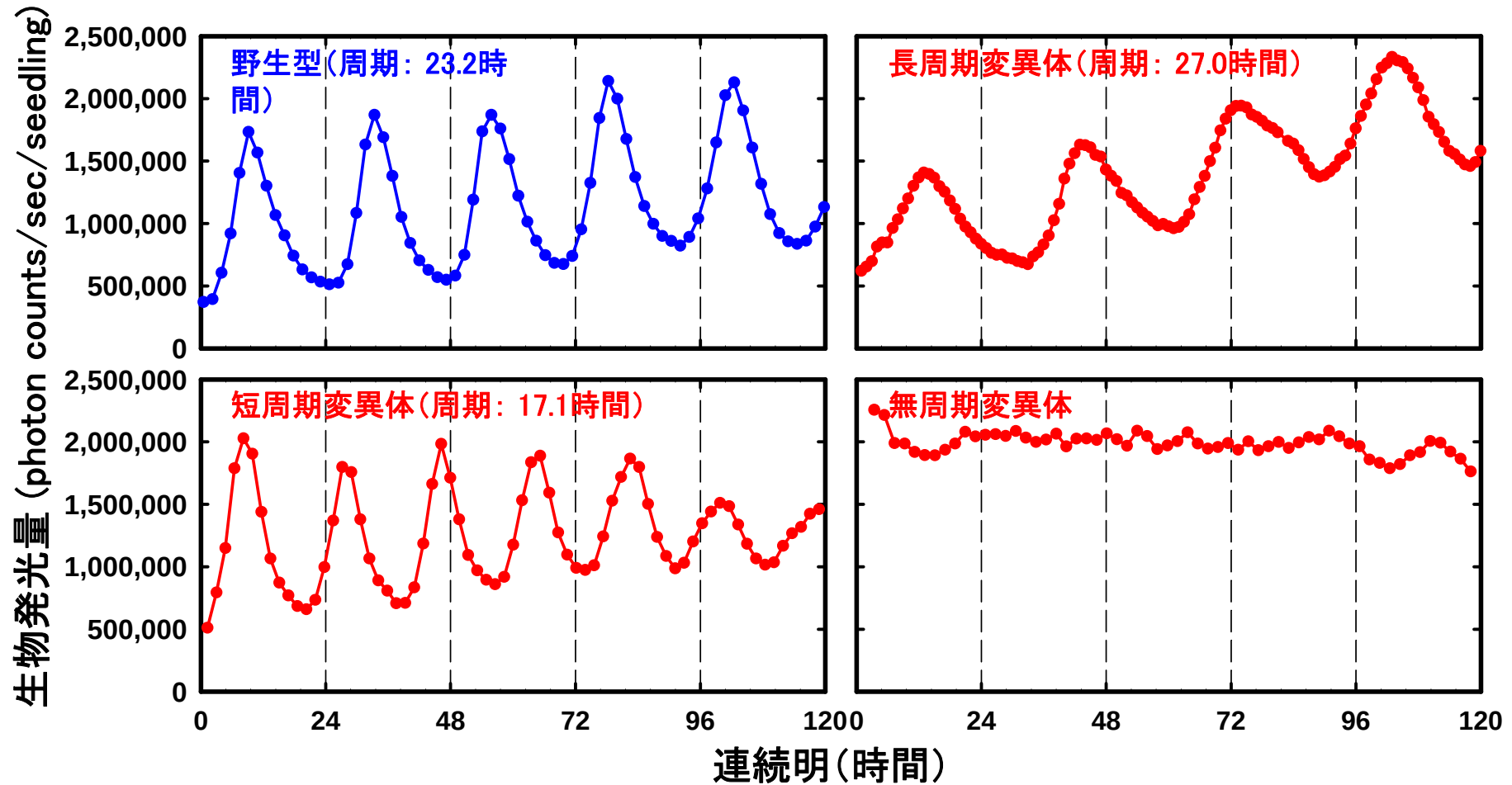
1. 生物発光リズム系の開発
2. 突然変異体の分離
3. 時計遺伝子のクローニング

シロイヌナズナの生物発光リズム

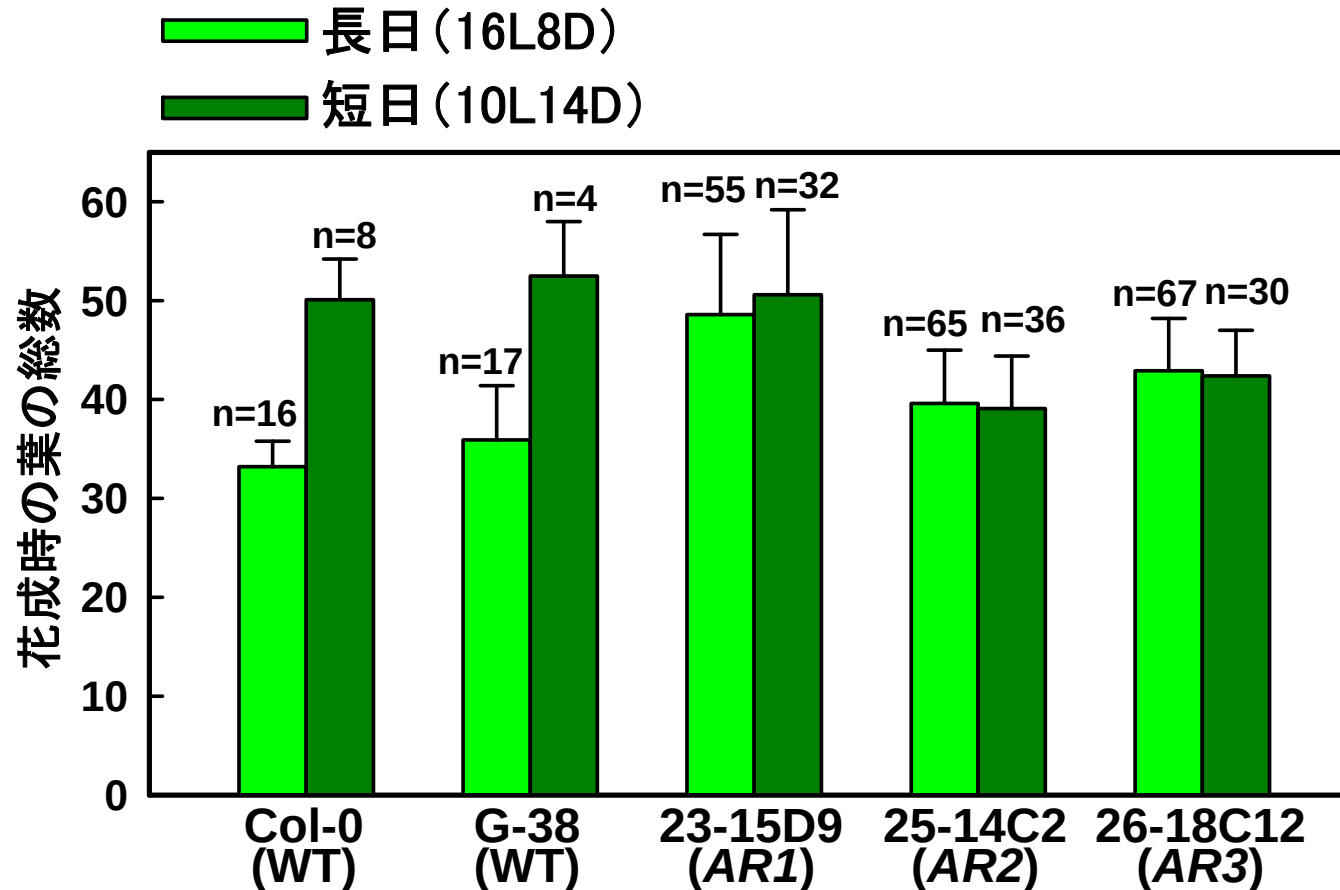


シロイヌナズナ
Arabidopsis thaliana

代表的なリズム変異体



無周期変異体の光周的花芽形成



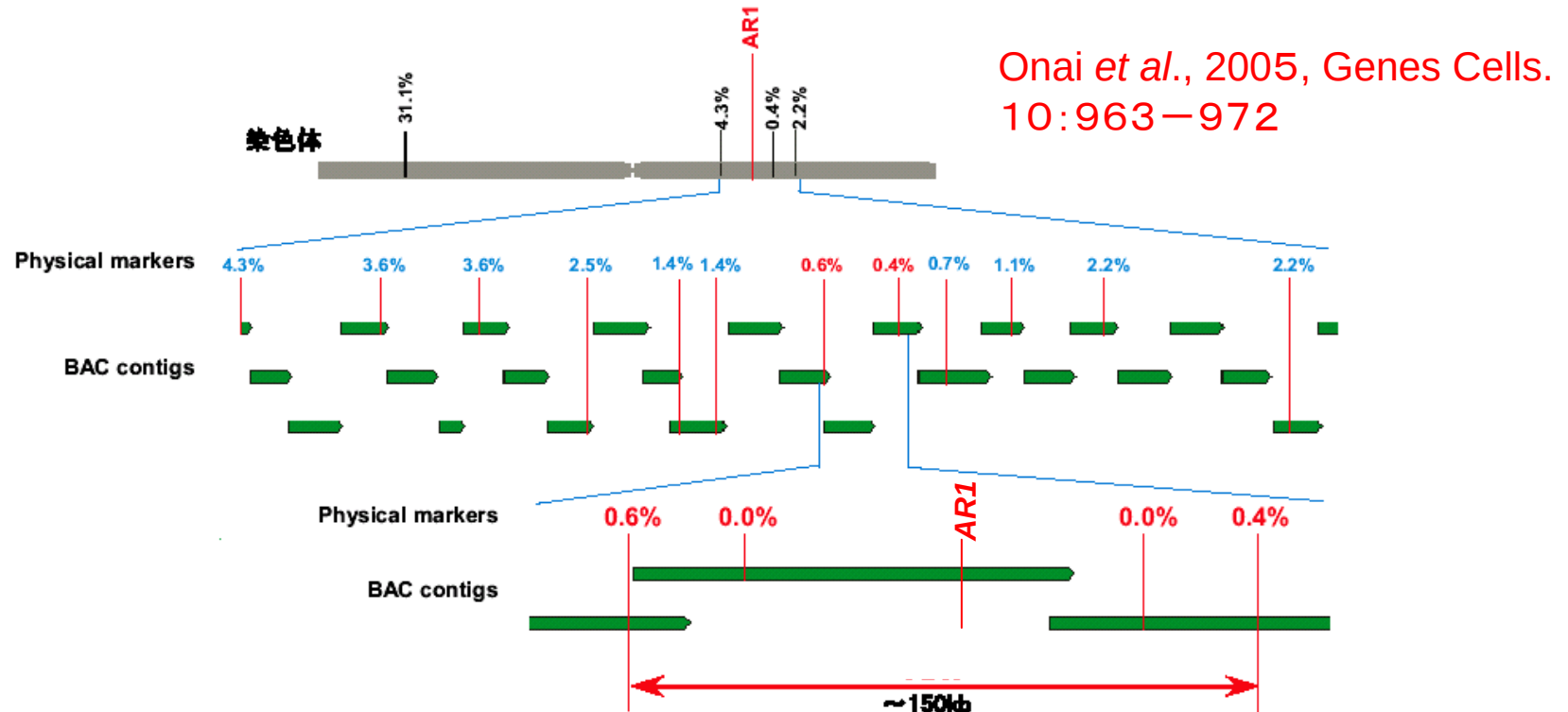
無周期変異体は、光周的花芽形成が日長不感受性であった



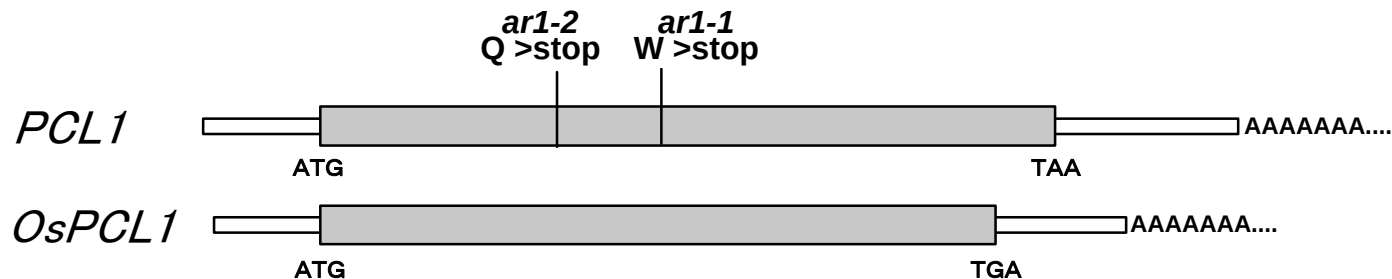
AR1、*AR2*、*AR3* 遺伝子は光周性を支配している

PCL1 (=AR1) 遺伝子のポジショナルクローニング

(a)

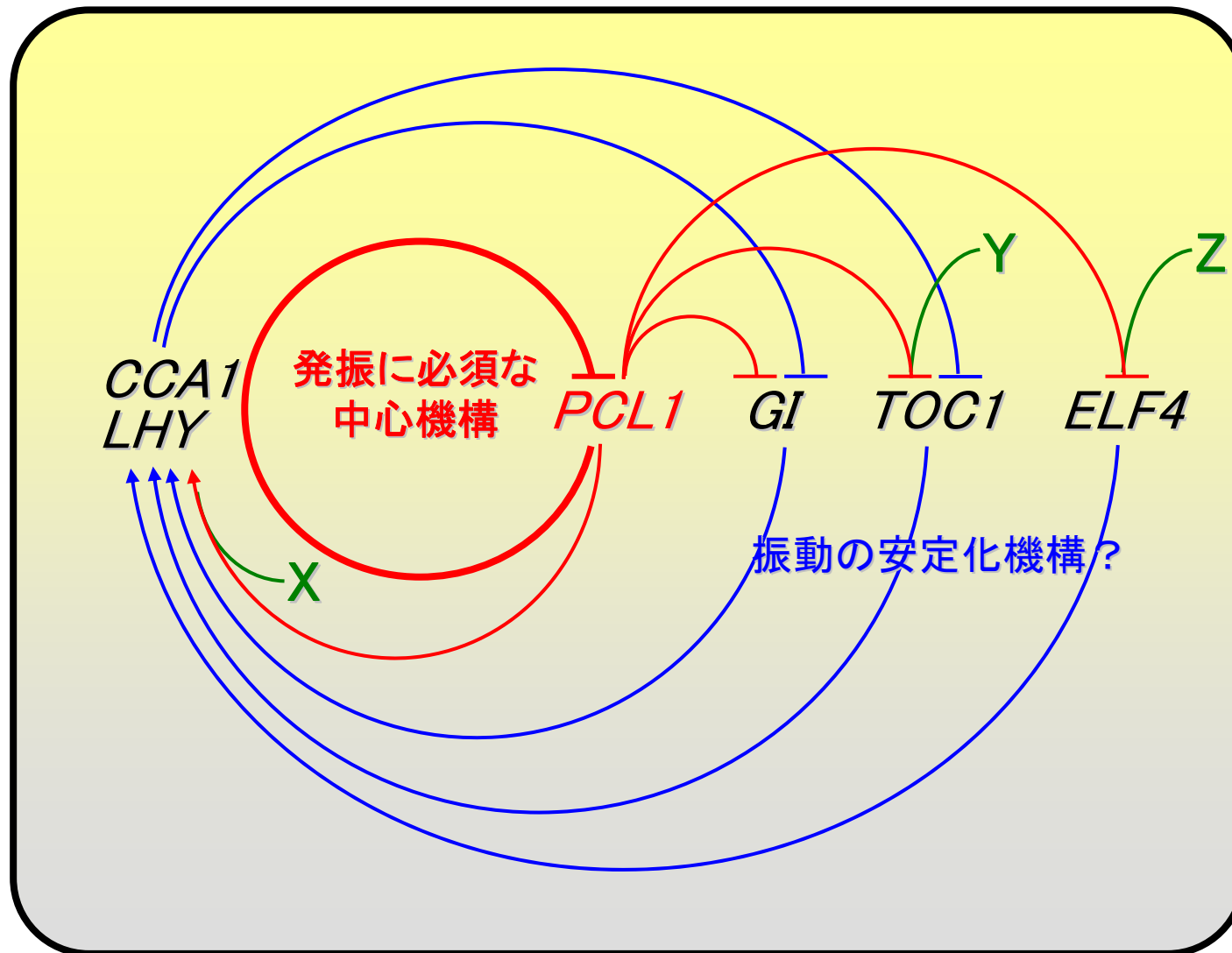


(b)



- *pcl1-1*、*pcl1-2* 変異は共にナンセンス変異だった。
- *PCL1* 遺伝子のホモログ *OsPCL1* がイネにも存在していた。

植物時計遺伝子 *PHYTOCLOCK1* (*PCL1*) と多重フィードバック



初心に帰る

1. 24歳の時、クラミドモナスにおいて「配偶子形成の概日リズム」を見つけた。
2. 40歳で生物時計の研究に挑戦した。
 - 49歳: 藍色細菌の生物時計遺伝子の発見
 - 54歳: 藍色細菌時計タンパク質KaiCの立体構造解明
 - 55歳: 藍色細菌時計タンパク質KaiAの原子構造の解明
 - 56歳: 高等植物の時計遺伝子*PHYTOCLOCK1*のクローニング
 - 57歳: 藍色細菌時計タンパク質KaiBの原子構造の解明
3. 50歳でクラミドモナスの生物時計の研究に再挑戦した。
4. 59歳でクラミドモナスの生物時計遺伝子を発見した。

人のやらないことをやろう

1. 自分が「面白い」と思えることをやる。
2. 人とは異なる「概念(発想)、材料、方法」を持つ。
3. 必要なものは「自分で作る」。
4. 必要なことは何でも「自分でやる」。
5. 足らないものは人に「助けてもらう」(共同は楽しい)。
6. 認められなくても「孤立に耐える」(簡単には認めてもらえない、ずっと無視されるかも)。
7. 「5年間」努力すれば道は拓ける(新しいことができる、ずっとできないかも)。

理学(研究)の心

1. 役に立つことは尊い。しかし「**直ぐに役に立つことは直ぐに役に立たなくなる**」。
2. 直ぐに役に立つことより、「**面白いこと、のめり込めること、物事の本質**」を究める。
3. 何んの役にも立たない真理はない。「**いずれ必ず何かの役に立つ**」。