

生命の時を刻むタンパク質

近藤 孝男

生命理学専攻教授

生物時計とその3つの特徴

ちょっと信じ難いかもしれませんが、生物のひとつひとつの細胞は腕時計のような仕組みをもっています。ヒトの生物時計の存在を明らかにするためには2、3カ月間、ボランティアの人に外部と遮断され、時間を知る手がかりがない隔離室で生活してもらう実験を行います(図1)。人工時計や昼夜のない条件でもヒトは周期的に睡眠覚醒を繰り返しますが、この条件ですと、睡眠時間が規則的に1日に1時間ずつ後ろにずれていきます。これは、われわれの身体の中に時計がひそんでいて、それが25時間周期で動いていることを意味します。周期が25時間サイクルであることは、このリズムが地球の24時間のサイクルによるものではなく、生物時計によるものであることを示しています。一方、この実験中に24時間周期の明暗のサイクルをつけると、睡眠のサイクルはすぐ24時間周期になります。私も皆さんも、本当は25時間の時計をもっているのですが、毎日、1日1時間ずつ早起きしてそれを24時間に調整しているのです。この昼夜サイクルへの同調機能も生物時計の重要な特徴です。

生物時計があることを証明したデータは、1960年ごろにはすでにいくつも報告されていましたが、生物が24時間を独自に計れるなんていうことはおおよそ信じ難いもので、ほとんどの研究者は信じていませんでした。ですが、私はこれは信じざるを得ない、面白いと思ってしまった。



Takao Kondo

1948年生まれ。名古屋大学理学部の太田行人教授の研究室でウキサスの概日時計の研究を始める。1978年岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所助手、1995年名古屋大学大学院理学研究科教授。概日時計の研究から生物の生き様を理解したいと考えている。

ということで私は研究を始めたわけですが、こういう非常に「ニッチ」なテーマを選びますと、なかなか苦労します。しかし、面白いと思った以上ほれたようなものですから、もう容易に逃げ出すわけにはいきません。

多くの生物時計を調べていくと必ずみつける3つの性質があり、「生物時計の3つの条件」といわれています。1つは、約24時間周期で持続することです。2つ目は、温度を変えても時計の速さはほとんど変わらないことです。これを周期の「温度補償性」といいます。地球の自転に合わせるためには、夏と冬で時計の速さが変わると困るわけです。3つ目の特徴は先ほども話しましたが、外から24時間サイクルがくれば、簡単に同調できることです。生物時計は時計として不可欠なこの3つの条件を満たしてはじめて地球上で生活するために役に立つのです。このメリットがあるため生物時計は進化してきたわけで、これらを説明しないと生物時計の謎を解明したことにはなりません。

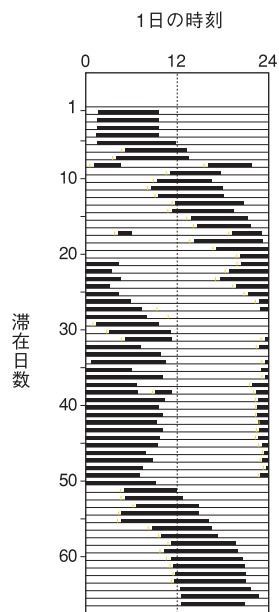


図1 ヒトの生物時計実験

外界の昼夜環境の変化を遮断し、時間情報の手がかりを得られない隔離実験室での睡眠の記録。1日の各時間(横軸)のうち睡眠時間を黒線で示した。最初の1週間、32～50日、60日以降24時間の昼夜サイクルを与えた。

時計遺伝子の発見

こうして私は生物時計の研究を始めたのですが、その仕組みの解明は当時の生物学では歯が立たない状況でした。謎が解明されてきたのは1980年ごろから普及した遺伝子工学技術のおかげです。スタートになったのは、私が大学院に入った1971年の報告です。ショウジョウバエの野生型は24時間周期で羽化しますが、3種の突然変異(リズムがなかったり、周期が短くなったり、周期が長くなったりする)が見つかりました。これらは同じ遺伝子の変異であることがわかり、*period (per)*^{*}と命名されましたが、その実体が明らかになるまでには、10年以上かかりました。

余談ですが、当時、私は理学部ではなく山岳部ではないかといわれるほど、山登りに一生懸命でした。山登りもそろそろ一段落したころ、気づいて見ると、1984年、*per*遺伝子がクローニングされ、解読されました。実体が明らかになると、芋づる式に多くの時計遺伝子が明らかになり、急に多くの研究者が参入するようになりました。さらに*per*遺伝子とよく似た遺伝子が我々哺乳類にもあることがわかり、時計研究はさらに我々に身近なものになっていきます。その成果ですが、*per*遺伝子発見以来、約15年ぐらいかかって、多くの重要な発見が積み重なり、それが時計として働く機構を説明する仮説がまとまってきました。その考えは時計遺伝子の「転写翻訳モデル」とよばれるものです。この考えの基本は時計遺伝子のつくる時計タンパク質が時計遺伝子自身の働きを抑える負のフィードバックの存在です。時計タンパク質が自分の発現(転写)を抑えますから、タンパク質の合成(翻訳)も停止します。時計タンパク質が一定の速度で分解されることで、タンパク質濃度がしばらくして下がり、また、時計遺伝子が発現します。これで、24時間の振動が発生します。実際、測ってみれば時計遺伝子のメッセンジャーRNA(mRNA)もタンパク質も少しずれた24時間の振動を示し、時計遺伝子の発現を乱してやれば、リズムも変化します。DNAからタンパク質へのセントラルドグマ(分子遺伝学の中心原理)で生物時計も説明できる。めでたし、めでたし、というわけです。

シアノバクテリアとの出会い

私は1990年ごろまでは植物の時計の研究をしていましたが、ショウジョウバエの時計研究と競うには限界を感じて、何かいい研究材料はないかと探していました。そんなときにテキサスA&M大学のスーザン・ゴールドデン博士に偶然出会い、シアノバクテリアを利用して新しい研究を進めることができました。これは私にとっては大変ラッキーなことでした。シアノバクテリアの示してくれた生物時計の謎は、おそらく他のどの生物より本質に迫るものでした。このバクテリア(図2)は自然がその時計の秘密を我々にささやくために準備した生物のような気がします。その一部をこれからご紹介しようと思います。

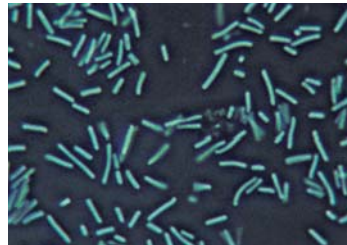


図2 シアノバクテリア

最初に行ったことは生物時計に応じてシアノバクテリアを光らせることです。まず発光細菌の発光遺伝子をシアノバクテリアのゲノムに組み込みます。生物時計にコントロールされて発光遺伝子が動くようにいろいろ条件を試し、24時間周期の生物発光リズムを得ることに成功しました。生物時計の動きを光でモニターできるようになり、測定が飛躍的に正確になりました。よく調べて見ると、バクテリアの時計であっても、温度によっても周期は変わらないし、光や温度の24時間サイクルに同調することもできました。重要なことは生物発光による測定を利用すれば、1万個以上のバクテリアの生物時計測定を自動化することができます。そこで石浦正寛博士(現・名古屋大学)やカール・ジョンソン博士(現・バンダービルト大学)らとともに分子遺伝学の手法に従って突然変異体を分離し、時計遺伝子を探しました。みつかったのが3つの*kai*遺伝子*kaiA*、*kaiB*、*kaiC*です。その突然変異は*per*遺伝子と同じように周期が長かったり短かったり、リズムがなくなったりしますが、50以上のさまざまな突然変異はすべて*kai*遺伝子に変異をもっていました。

「グルグル回る」ということで*kai*(回)と名づけたのです。

次に、先ほどの転写翻訳モデルにしたがって*kai*遺伝子の発現を調べると動物の場合と同じことが起こります。*kaiC*からつくられるKaiCタンパク質が自分自身の遺伝子を非常に強く抑えるのです。実験ではKaiCタンパク質だけを細胞の中で大量につくらせます。すると、この遺伝子の発現はパタッとなくなってしまいます。つまり、強い負のフィードバックが起こっていますから、これが原因で振動が起こっていると考えられます。おまけに、一時的にKaiCタンパク質だけたくさんつくらせる実験をすると、いかにもKaiCタンパク質の量を変えて、時計をずらせることもできました。そこで、私たちは疑うことなく、シアノバクテリアでも転写翻訳モデルが当てはまると考え、論文を出しました。

こうした話を講演ですると、必ず「わかった。これがフィードバックを起こして、こういう仕組みで振動しても不思議はないだろう。だけど、なぜ24時間で振動するのだ。どうして12時間じゃないんだ」と聞かれます。それから、「なぜ温度を変えてもスピードは変わらないのか」と聞かれますと、実は答えようがないのです。改めて先ほど私が示しました3つの特徴を考えると、もしこれが24時間でなければ何の役にも立ちません。温度によって変わるようでは、やっぱり役に立たない。「これで満足してはいけいない。そこを説明しなければ肝心なことには何も答えていない」と考えて、さらに研究を進めたわけです。

^{*}1 生物学の決まりでは、遺伝子を表すときには「*per*」や「*kaiC*」のように斜体の文字で示す。これに対して、その遺伝子からできるタンパク質は「Per」や「KaiC」のように書き表す。



大学院生時代に登ったヒマラヤにて

タンパク質による時計

なぜ24時間になるのか。この問いに答えるには細胞の中でのKaiCタンパク質の働きを調べるしかありません。なぜならKaiCの突然変異だけ、周期が大きく変わるからです。いろいろなことを調べた末わかったことは、量が多い時にKaiCタンパク質にリン酸基がくっつくことでした*2。つまり、KaiCのリン酸化も1日の間でサイクルを刻んでいたのです。「このリン酸化は怪しい」と考えたのですが、実はその先、どうやればいいのかまったくわかりませんでした。こうした時は五里霧中の努力を続けていると、なぜか運のいいことがまわってきます。この時もこうしたことが起きました。シアノバクテリアを外の24時間サイクルに同調させるためには、12時間真っ暗にすればいいのです。その時「どういう仕組みで同調するか」ということが私の研究室の富田淳さんという大学院生の研究テーマでした。シアノバクテリアは暗くなると転写や翻訳が止まります。そもそも転写翻訳モデルからすれば、転写や翻訳が止まるということは時計が止まるということです。そんなところを調べて何になるのだということで、それまで誰もやらなかったのですが、彼はまる3日間徹夜して、真っ暗な状態でKaiCタンパク質の状態を測定してみました。このバクテリアでは暗くすると、遺伝子はまったく読まれなくなり、タンパク質の合成も分解も止まってしまいます。しかし、驚いたことに、KaiCの量はずっと変わらないのに、KaiCのリン酸化のサイクルだけは続いており、時計が止まってないことに富田さんは気づきました(図3)。これは転写翻訳のフィードバックが振動の原因だとするモデルという考え方を根底からひっくり返し、KaiCのリン酸化のサイクルが振動の原因だということを意味します。

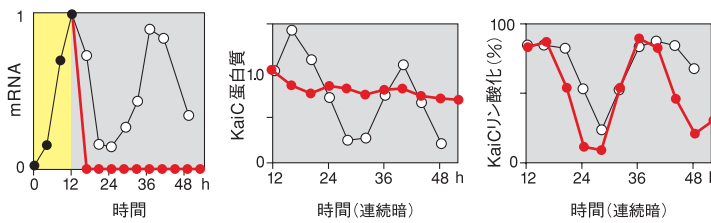


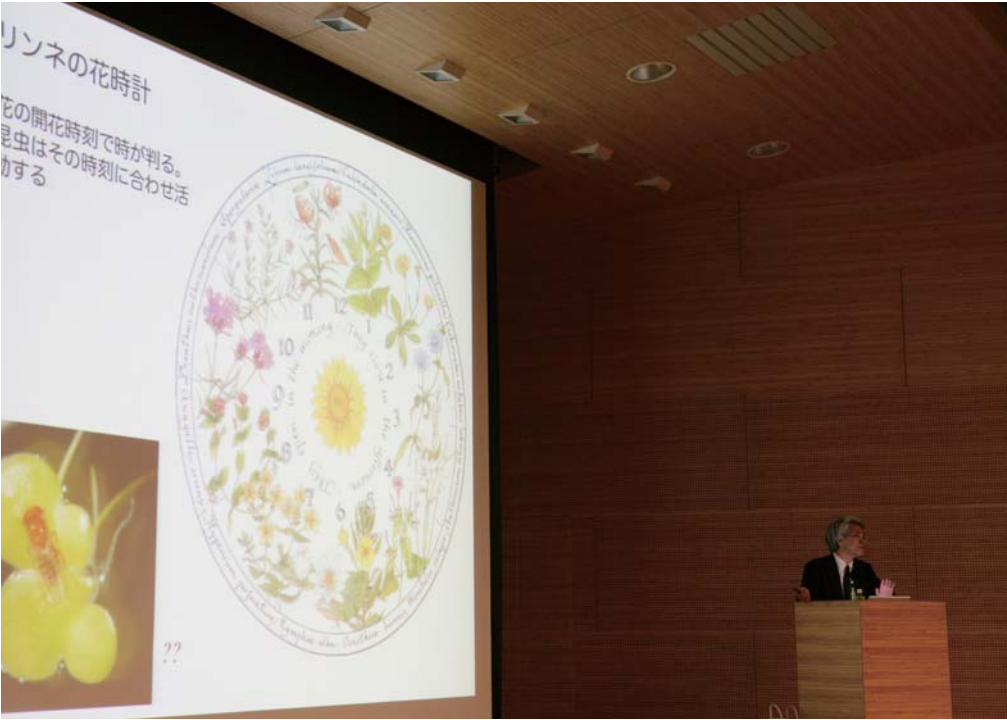
図3 暗期中のKaiCタンパク質の状態

シアノバクテリアを長時間暗黒中に置き、kaiC-mRNA、KaiCタンパク質量、およびそのリン酸化を測定した。黒丸は前培養の明期中の状態。赤丸がそのあと連続暗条件、白丸は連続明条件にしたときの状態。

僕たちも困りましたが、他の生物の時計研究者もショックだったと思います。実際、KaiCのリン酸化のサイクルは温度を変えても周期は変わりませんでした。

もしもこれがタンパク質だけで起こっているのなら、試験管の中でタンパク質を混ぜただけでリズムが出るのではないか。そういうことに、われわれは気づいた、といえはカッコいいのですが、「まあ、やってみよう」あるいは「誰か他の人がやっちゃうと悔しいから」ぐらいい感じで、みんなでワイワイいって始めました。そして、数カ月の努力の結果、試験管の中でKaiCのリン酸化振動を再構成する、つまり、生物時計を試験管の中でつくり出すことができたのです。3つのタンパク質(KaiA、KaiB、KaiC)を精製し、エネルギー源としてのATPといっしょに混ぜ、KaiCの状態を2時間ごとに測定します。そうするとリン酸化されたKaiCとそうでないKaiCがきれいに12時間ずれて交互に現れたり消えたりしています(図4)。この周期は温度を変えても、もちろん変わりません。さらに*kaiC*の突然変異のタンパク質を精製し、再構成して周期を調べてみると、もとの突然変異の示す周期と同じ21時間や28時間という周期を示します。このデータが示されると、「試験管の中で発生しているリズムが、細胞の中で実際に時間を測定している」以外の可能性はちょっと思いつくのが難しいわけです。

KaiCがリン酸化されたり脱リン酸化されるサイクルが実は自発的に振子として働いていて、細胞の中で遺伝子発現がサイクルで起こっているのは、その時計の針に過ぎないことになります。これまでオーケストラを指揮していたと思われる指揮者は、実は、オーケストラにあわせて



踊っていたのかもしれないということです。どちらの場合もほとんど同じに見えるのですから。区別するために片方を止めてみればよいのですが、その結果は富田さんの実験が示したとおりです。つい最近までは、私たちも発現フィードバックモデルで説明できと思っていたし、データも見事にそのようになっていました。生命の各プロセスは細胞の中で相互に影響しあって進んでいます。ですから2つのプロセスの関係(原因と結果)を混同しないのはとても難しいことなのです。「遺伝子の発現がより重要だ」なんて思い込んでいると、ついつい「こっちが原因で、こっちが結果だ」と勝手に考えてしまいます。注意が必要です。

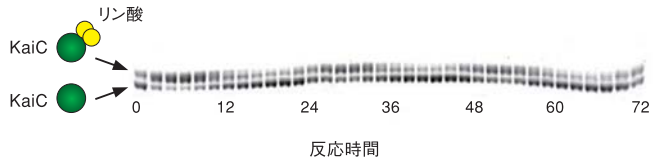


図4 試験管の中のKaiCリン酸化時計

精製したKaiA、KaiBおよびKaiCをATPとともに試験管内で混合し30℃に保った。2時間ごとに少量を採り、反応を停止させ、電気泳動によりKaiCの状態を調べた。KaiCタンパク質は上のリン酸化型および下の脱リン酸化型の2本のバンドとして検出される。図から明らかのようにリン酸化の状態は約24時間周期で振動した。この周期は温度補償されており、突然変異体のタンパク質は変異体のリズムと同じ周期のリズムを示した。

ATPで時を測る

最後にお話したいことは最初に申し上げた24時間の謎について、シアノバクテリアのKaiCが何を教えてくれたかです。結論から先に申し上げれば、KaiCによるATPの分解*3が時を刻む最も基本的な素過程ではないか、ということです。実はKaiタンパク時計の主役であるKaiCはATP分解酵素(ATPase)です。実際にKaiタンパク時計にはATPが不可欠です。タンパク時計のATP分解を調べると、その活性の低さにもう一度驚かされることになりました。1つのKaiCは一日に16個のATPを分解するだけです。これはそれまで知られていた最も活性の弱い酵素の

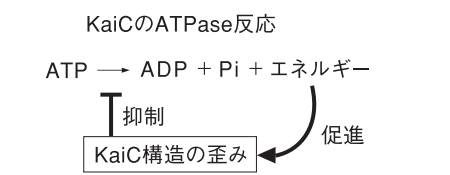


図5 KaiCのATPase活性とその温度補償の仮説

KaiCによりATPが分解されると得られたエネルギーはKaiCのなかに蓄えられ、ATPase反応を強く抑制する。この負のフィードバックがKaiCの温度補償性を支えていると考えられる。

1万分の1程度にしかならず、酵素としては壊れていると考えるべきレベルで、普通であれば測定を諦めるところですが。しかし我々は非常にゆっくりした振動を扱っているため、長時間根気強く測定することは慣れています。測って見ると2つの驚くべき性質が明らかになりました。まず驚いたことは、ほとんどゼロでもその活性は大変安定で温度に左右されないことです。大変理解し難かった温度補償という現象を支えていたのは、たった1つの「壊れかけ」の酵素だったのです。さらに驚いたことは、異なる周期の突然変異のKaiCタンパク質をつかって調べると、ATPase活性が高いKaiCだと時計は速く進み、低いと遅く進んだことです。Kaiタンパク時計は、ATPをゼンマイに、KaiCのATPaseを振り子として動いていたのです。KaiCのATPase活性は、転写翻訳モデルでは説明することが絶望的であった生物時計の周期決定機構とその温度補償性の両方を説明する重要な鍵を与えてくれたのです。

大切なことはこの2つの性質がKaiCのみの性質であることです。ですからKaiCのATPase活性という酵素反応が、2つのユニークな性質を満たすと考えざるを得ません。多くのATPaseではATP分解により発生したエネルギーはすみやかに他の分子へ移され、多くの仕事がなされますが、KaiCの場合にはこのエネルギーは分子内歪みとして蓄積され、自身の活性を強く抑えるのではないのでしょうか(図5)。とすればこれは強い負のフィードバックになります。これが十分強くすみやかに行われれば、温度上昇により潜在的ATPase活性が強まってもプレーキも強まるので実活性は一定に保たれます。KaiCはどのようにしてそんなことを可能にしているの

でしょうか。その答えはおそらく生物時計研究の最終解答となりますが、現在はまったくわかっていません。それが得られるためにはKaiCタンパク質のダイナミックで高精度な構造解析が不可欠となります。これは大変困難な作業ですが、KaiCタンパク質の原子構造の中に、これこそ時計のからくりだと、我々が感動するであろう答えがかくされているはずです。これはタンパク質による情報処理という新たな視点を拓くものになるでしょう。

- *2 タンパク質の中には特定のアミノ酸にリン酸基が結合したものが、これをタンパク質のリン酸化という。このリン酸基は特殊な酵素によって結合させたり、解離させたりできるので、生物はしばしばリン酸化をタンパク質の機能制御に用いている。
- *3 ATPはアデノシン3リン酸とよばれる化合物で、生体内ではいろいろな生化学反応のエネルギー源として用いられる。ATPaseはこのATPを加水分解して、ADPとリン酸にする酵素。この際に放出されたエネルギーが、多くの場合、他の生体反応に利用される。

