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

植物界

PCL1

LHY

TOC1

CCA1

高等植物

菌界

frq

wc-1

wc-2

動物界

Per

Tim

Clock

Bmal/Cyc

Cry

陸上化
多細胞化

緑藻

?

?

?

?

?

?

Cry?

原生生物界

葉緑体化

藍藻

kaiA

kaiB

kaiC

モネラ界

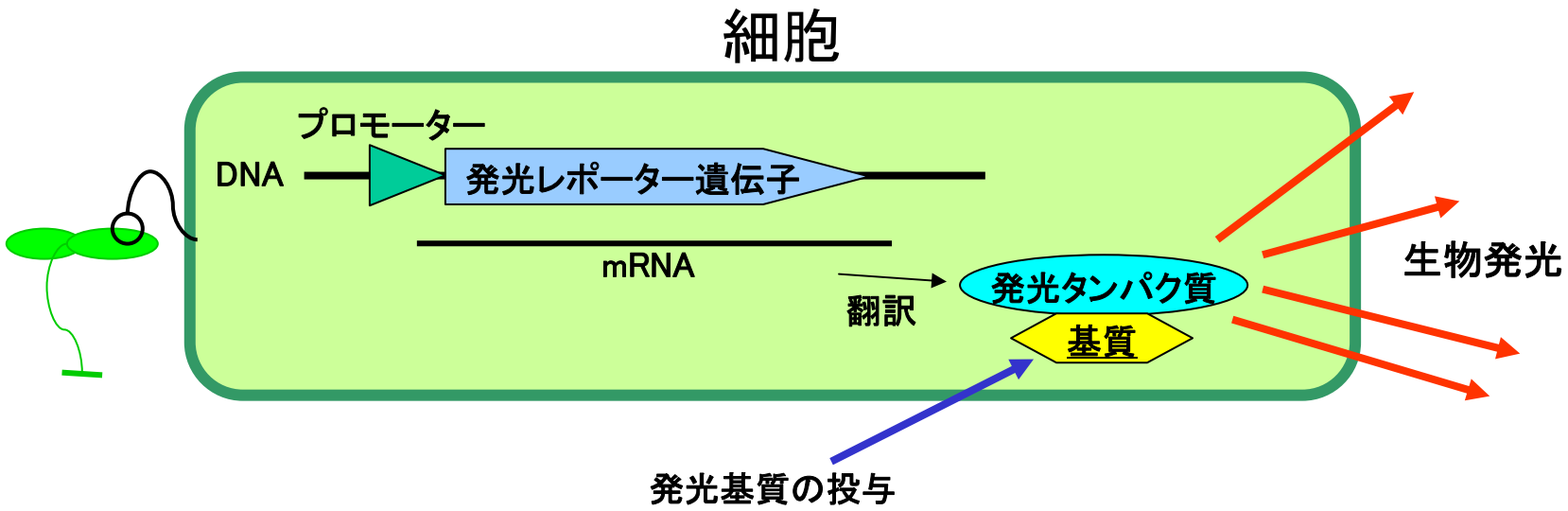
私の研究:
植物系細胞の生物時計（植物時計）

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。

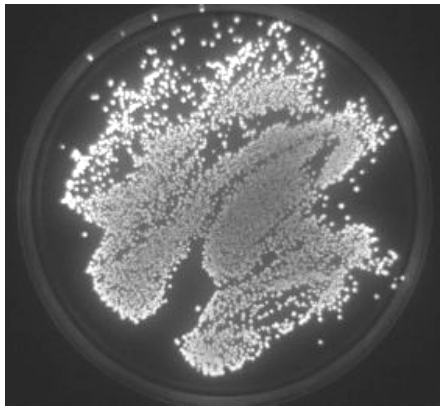
生物発光リアルタイム測定法を開発する

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

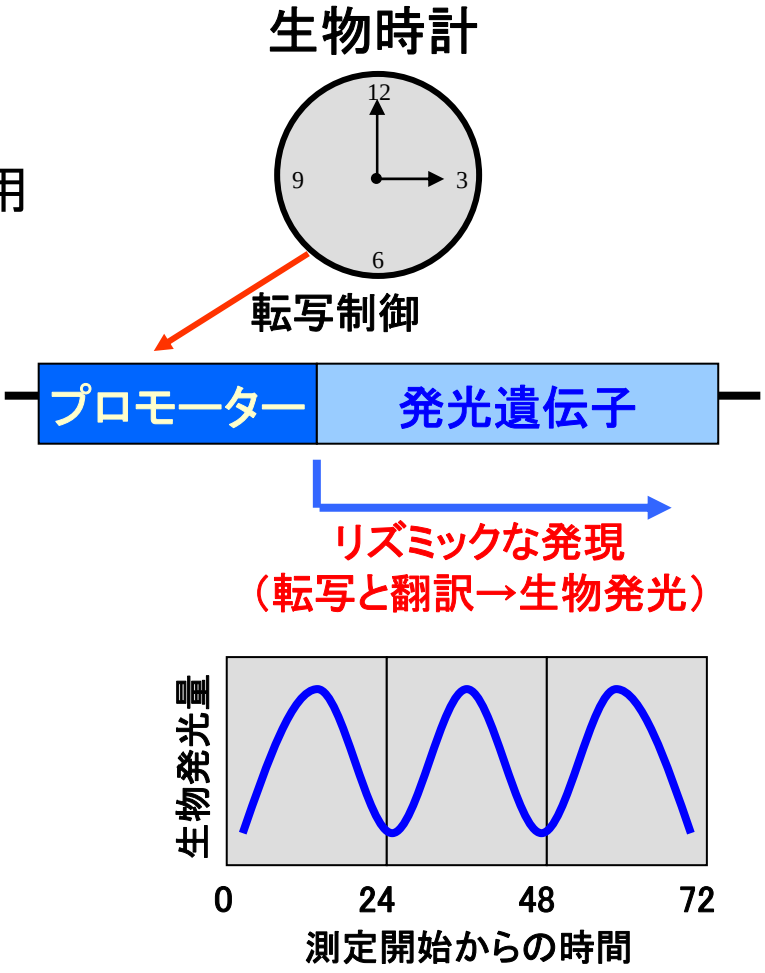
人工生物発光細胞を用いた概日リズムのリアルタイム測定

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



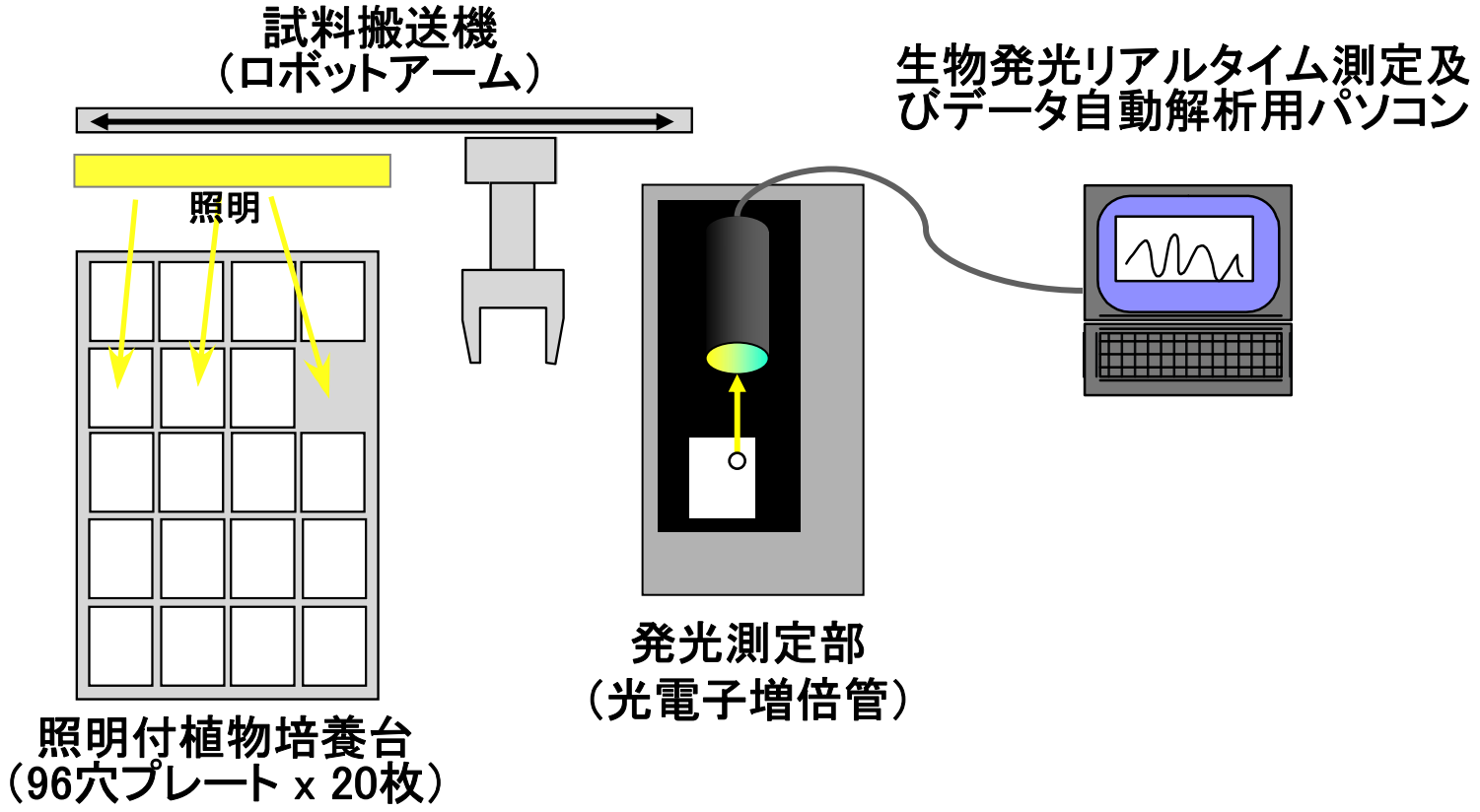
生物発光自動測定装置も作ろう

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℃までの高温条件下で測定可能である。

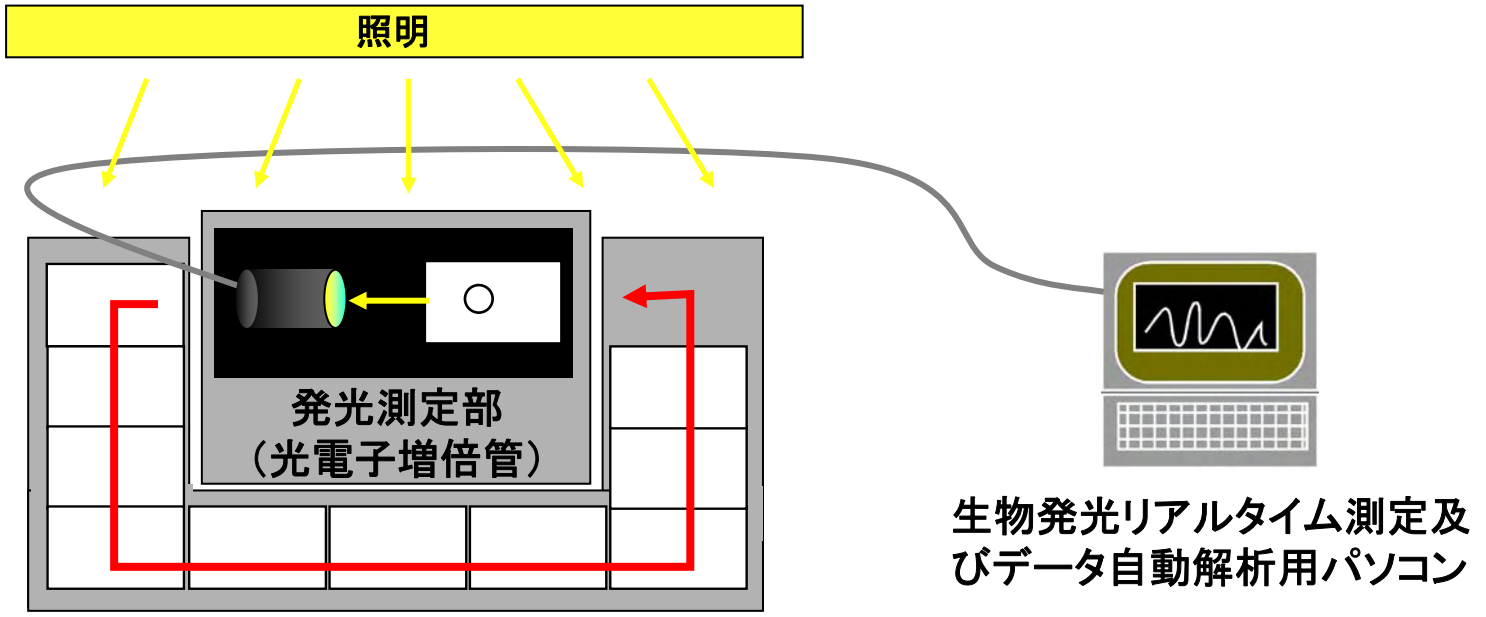
平板型試料交換機付
生物発光測定装置



Okamoto *et al*., 2005, **Anal Biochem** 340:187-192

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

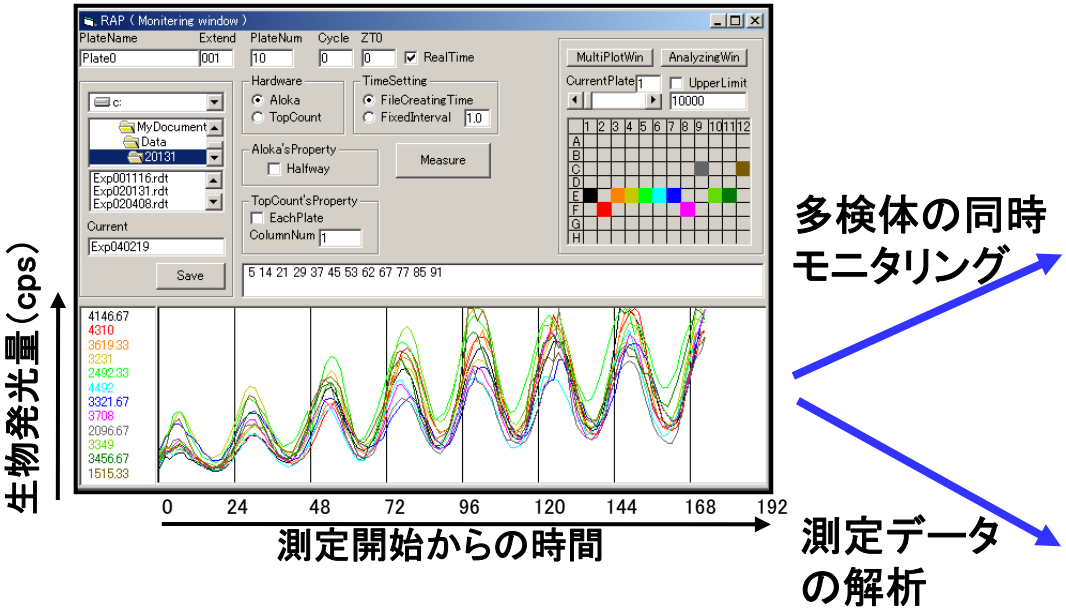


Okamoto *et al*., 2005, **Plant Cell Environ** 28:1305-1315

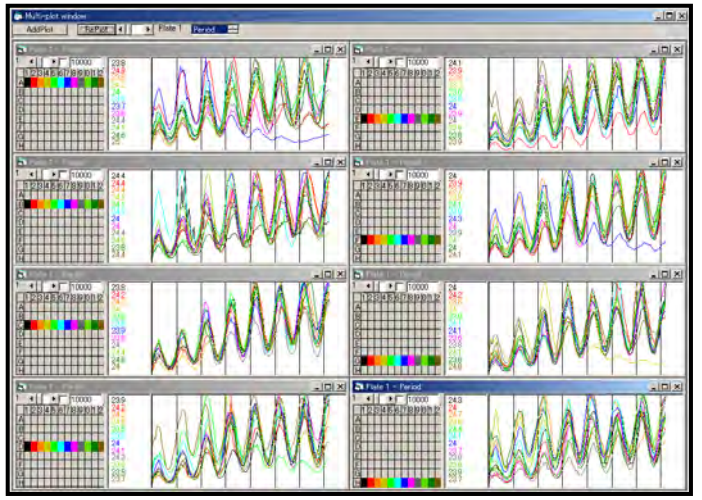
巡回型装置の動作

リズムの自動表示・解析プログラムも作ろう

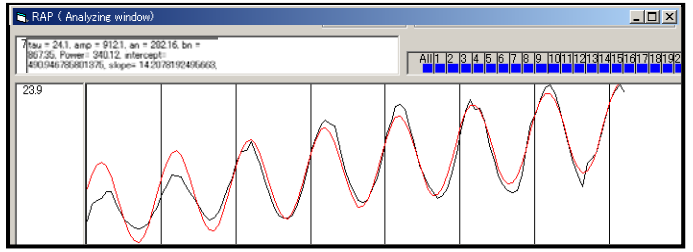
生物発光リアルタイム測定・リズム解析プログラムの開発

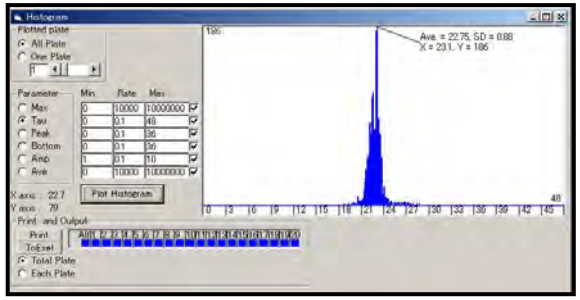


多検体の同時モニタリング



測定データの解析





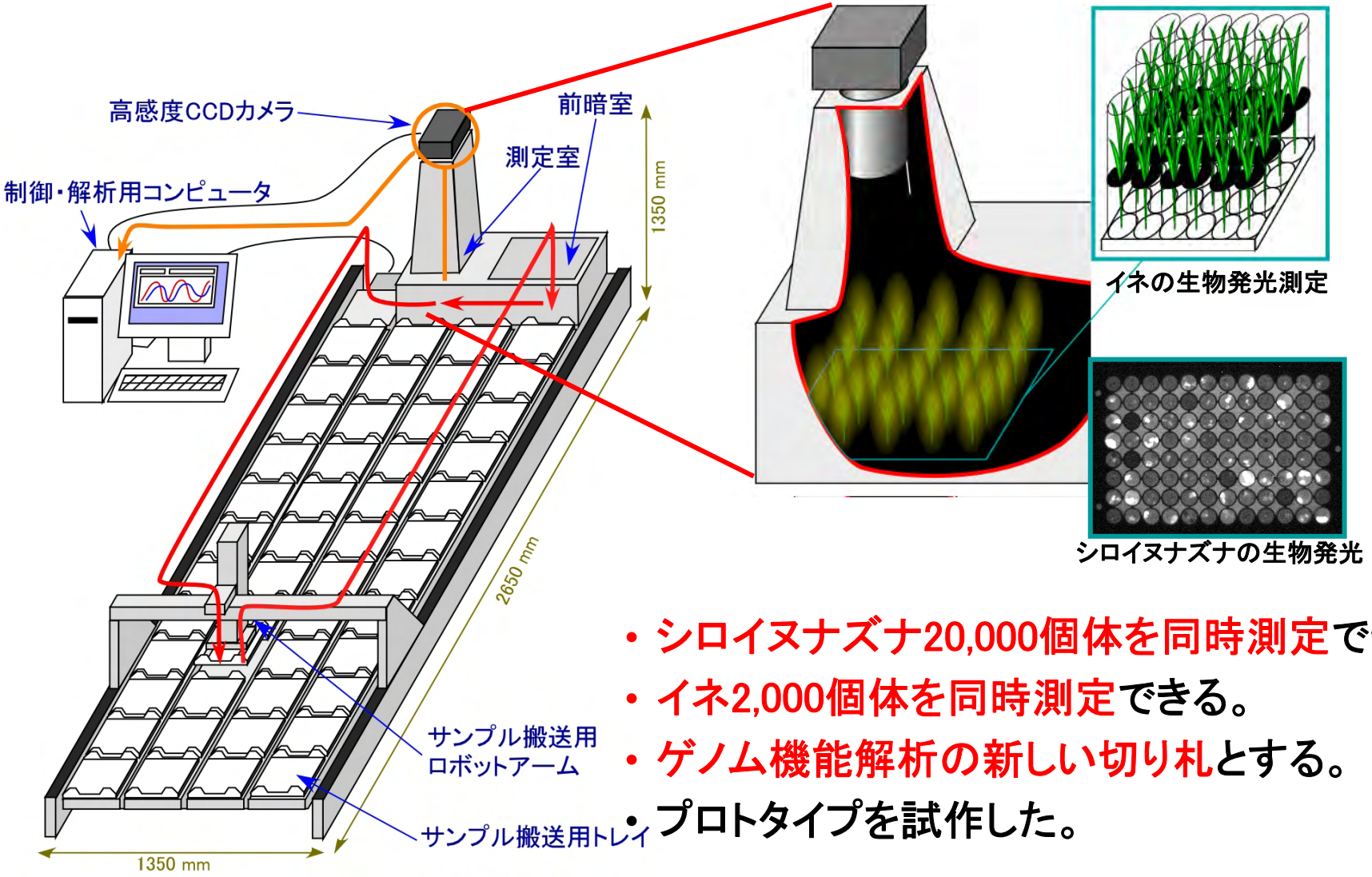
- 測定データのリアルタイム表示と自動記録
- 様々なアルゴリズムによるリズム成分の解析
- データベース機能と統計処理機能を内蔵
- 他のプログラムのファイル形式の入出力
- 強力な表示・印刷機能
- 発光測定以外のデータも解析できる汎用性

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

植物界

PCL1

LHY

TOC1

CCA1

高等植物

菌界

frq

wc-1

wc-2

動物界

Per

Tim

Clock

Bmal/Cyc

Cry

陸上化
多細胞化

緑藻

?

?

?

?

?

?

Cry?

原生生物界

葉緑体化

藍藻

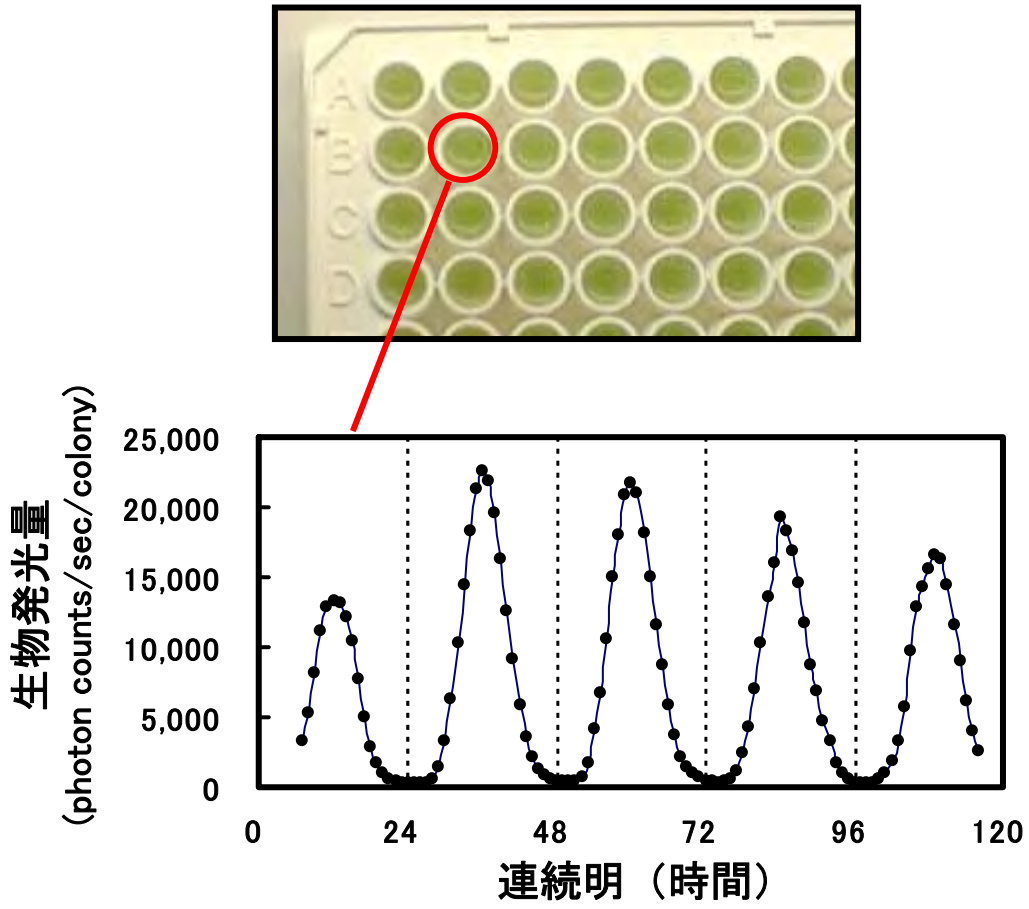
kaiA

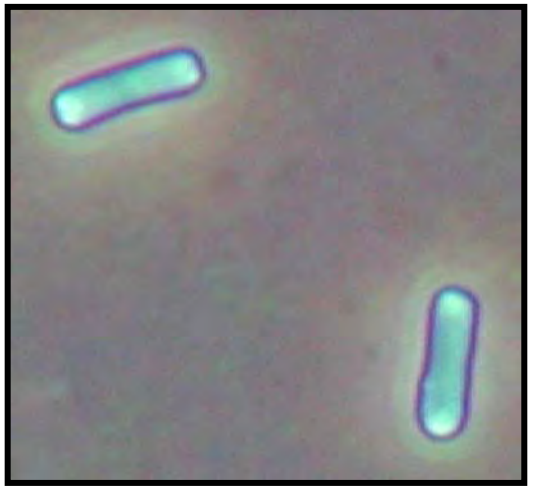
kaiB

kaiC

モネラ界

30℃で生育する藍色細菌（藍藻）の生物発光リズム



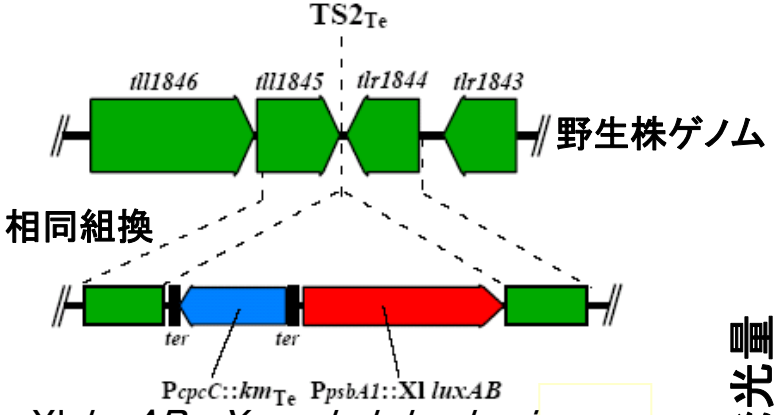


常温度性藍色細菌
Synechococcus sp. strain
PCC 7942

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

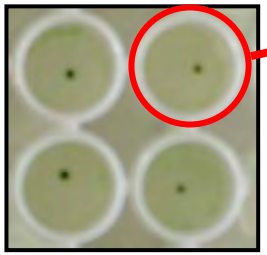
Onai *et al*., 2004, J. Bacteriol. 186:4972-4977

- **発光レポーター株の作製**



- Xl *luxAB*：*Xenorhabdus luminescens* 由来の耐熱性ルシフェラーゼオペロン

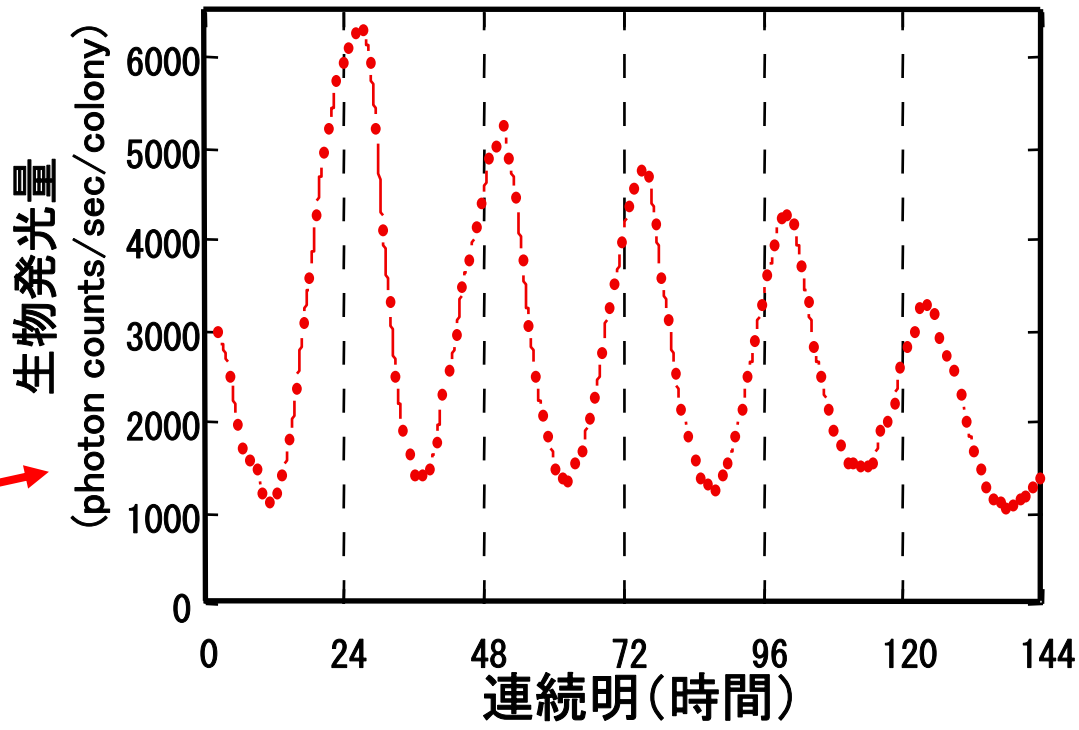
- **生物発光リズムの測定**



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

測定温度：41℃

P_{psbA1}::Xl *luxAB* 発光レポーター



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

植物界

PCL1

LHY

TOC1

CCA1

高等植物

菌界

frq

wc-1

wc-2

動物界

Per

Tim

Clock

Bmal/Cyc

Cry

陸上化
多細胞化

緑藻

?

?

?

?

?

?

Cry?

原生生物界

葉緑体化

藍藻

kaiA

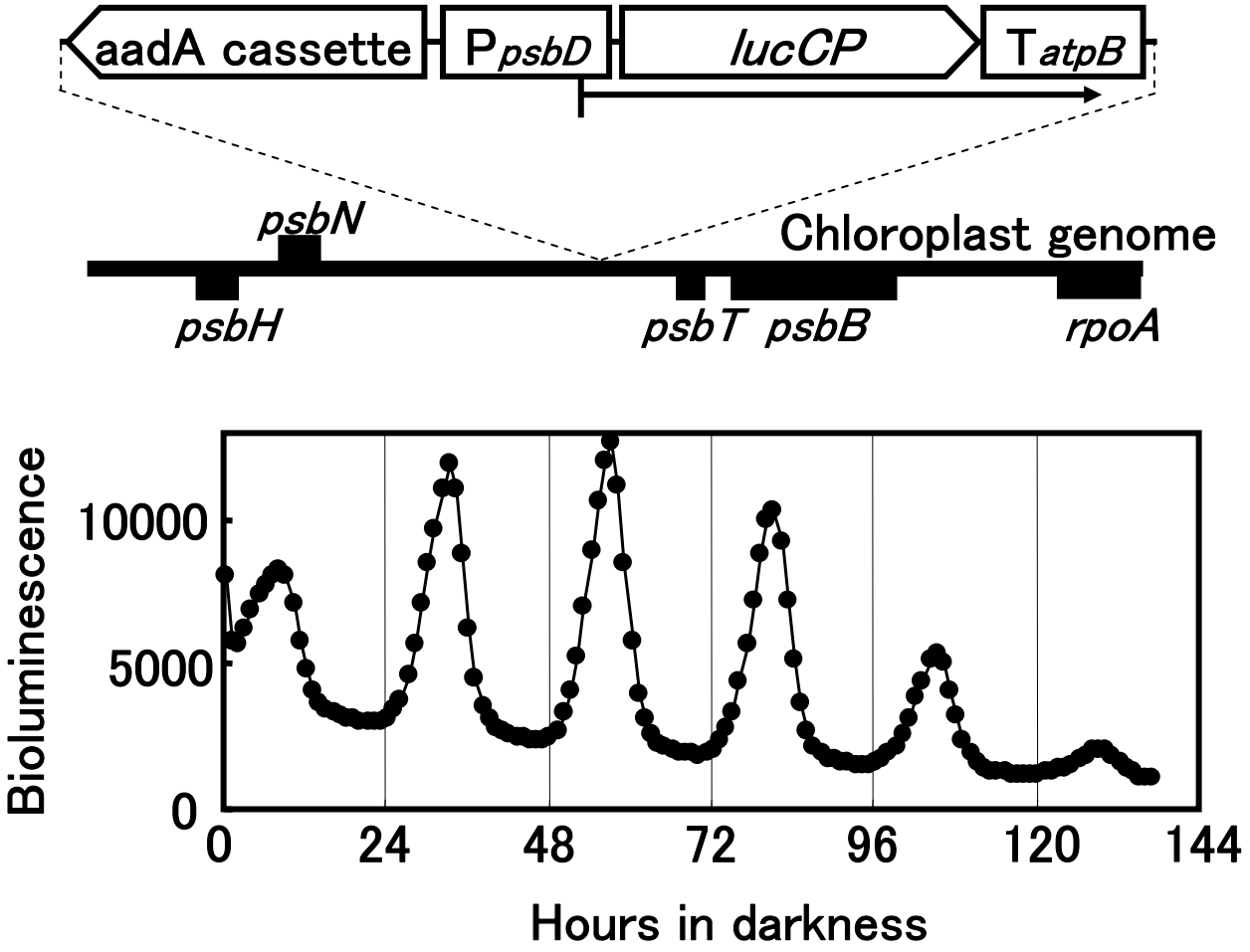
kaiB

kaiC

モネラ界

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



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

生物界と時計遺伝子

植物界

PCL1

LHY

TOC1

CCA1

高等植物

菌界

frq

wc-1

wc-2

動物界

Per

Tim

Clock

Bmal/Cyc

Cry

陸上化
多細胞化

緑藻

?

?

?

?

?

?

Cry?

原生生物界

葉緑体化

藍藻

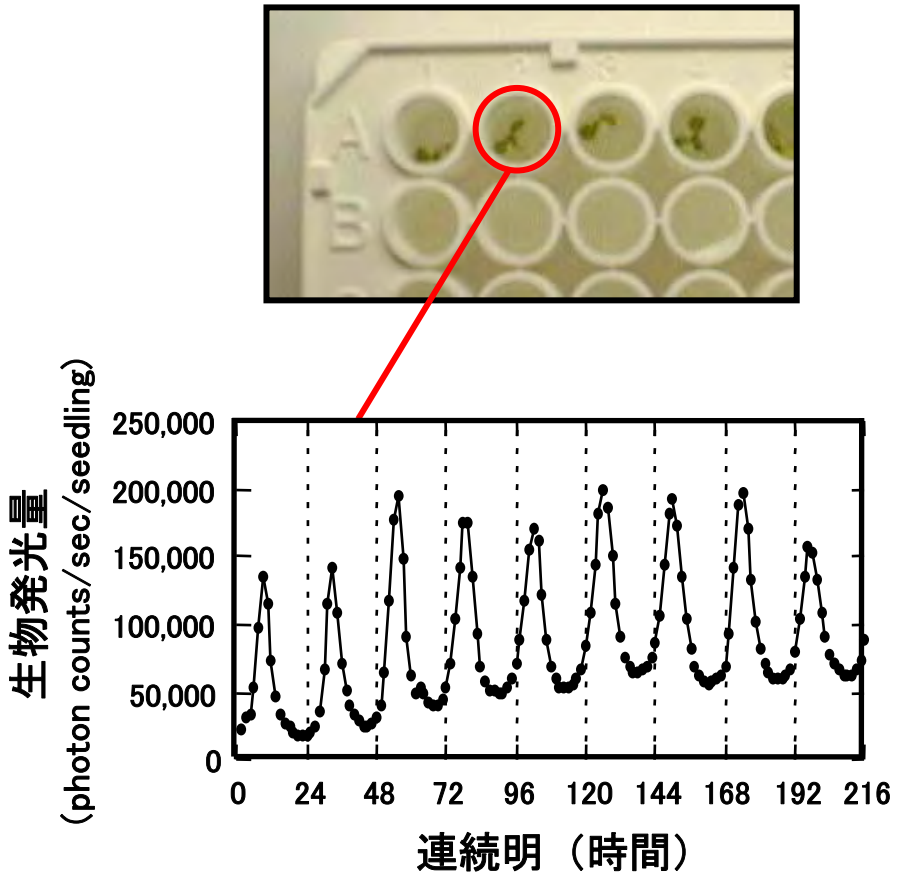
kaiA

kaiB

kaiC

モネラ界

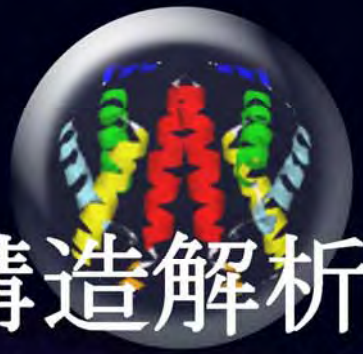
高等植物シロイヌナズナの生物発光リズム

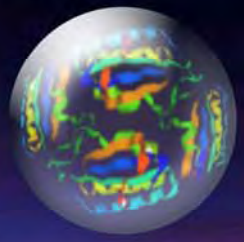


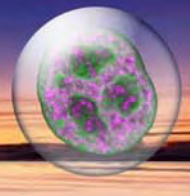
シロイヌナズナ
Arabidopsis thaliana

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

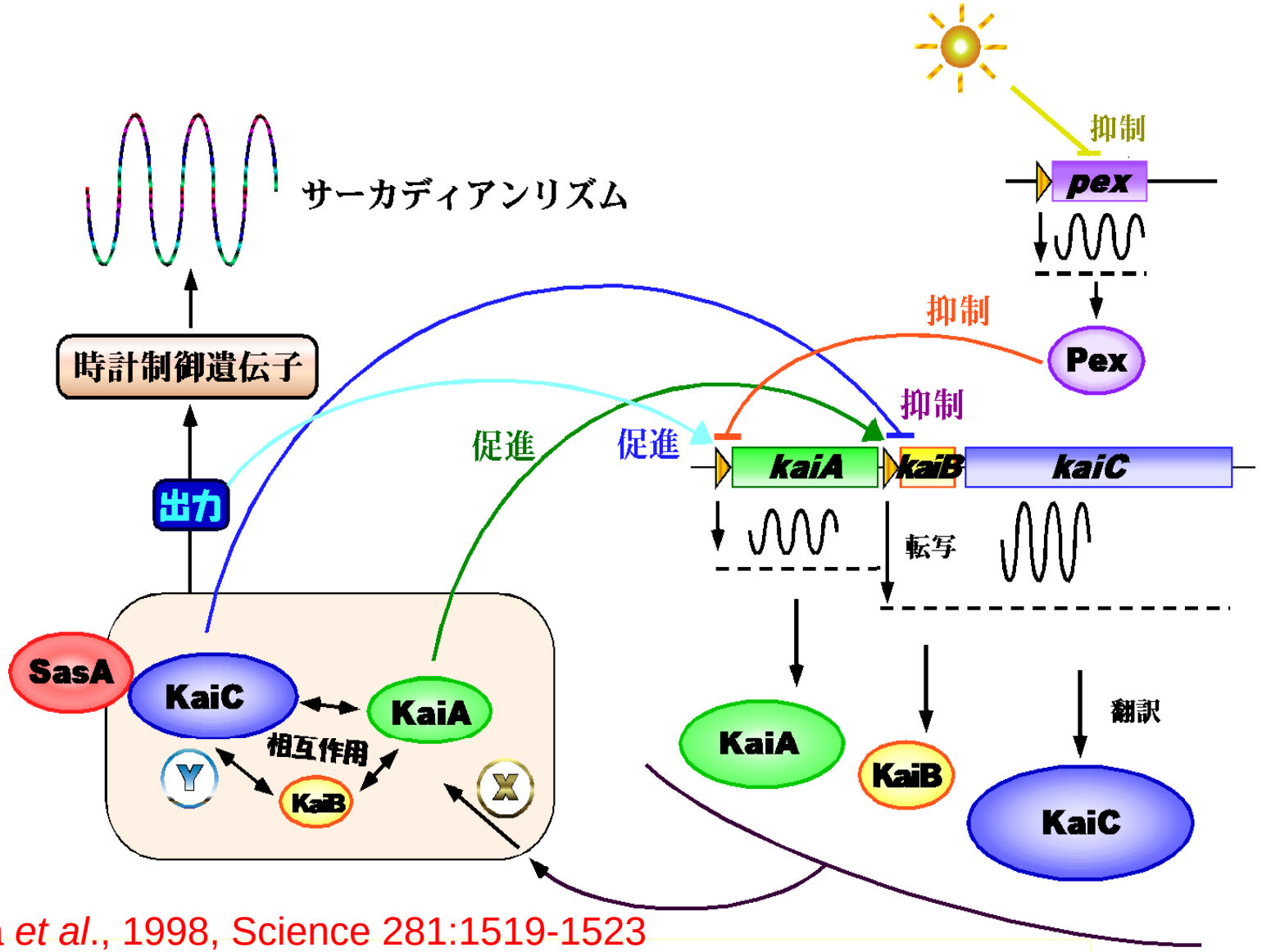






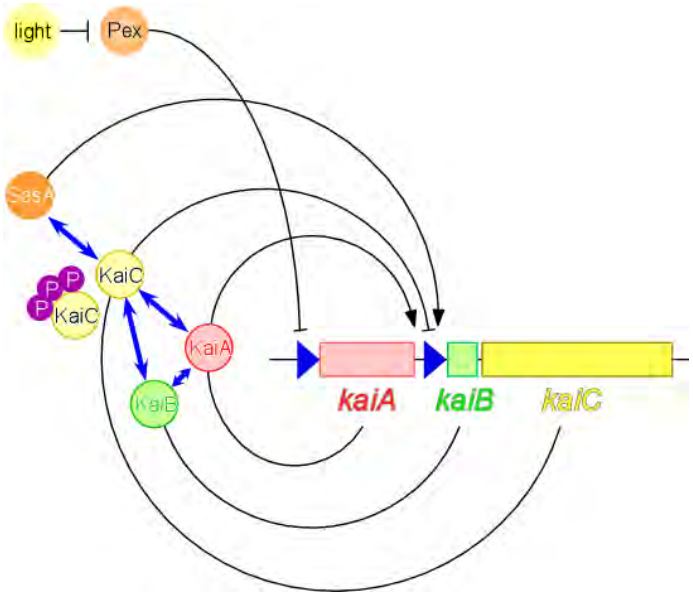
名古屋大学遺伝子実験施設
石浦　正寛
E-mail: Ishiura@gene.nagoya-u.ac.jp
TEL: 052-789-4527; FAX: 052-789-4526
http;//www.gene.nagoya-u.ac.jp/~ishiura-g/

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

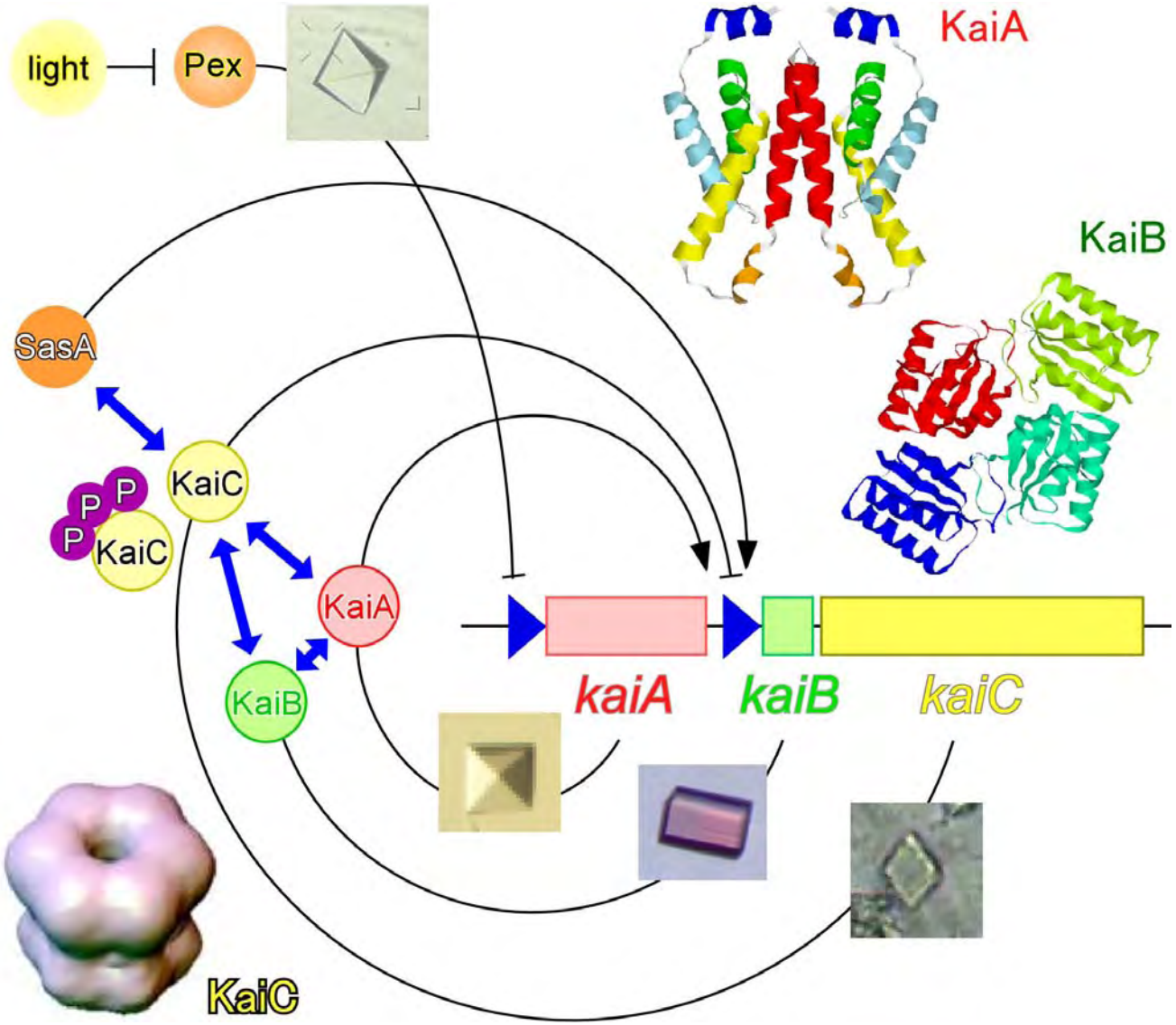


生物時計を「精巧な分子装置」として捉えて、原子レベルで解明したい

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

藍色細菌の時計分子装置



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**）。

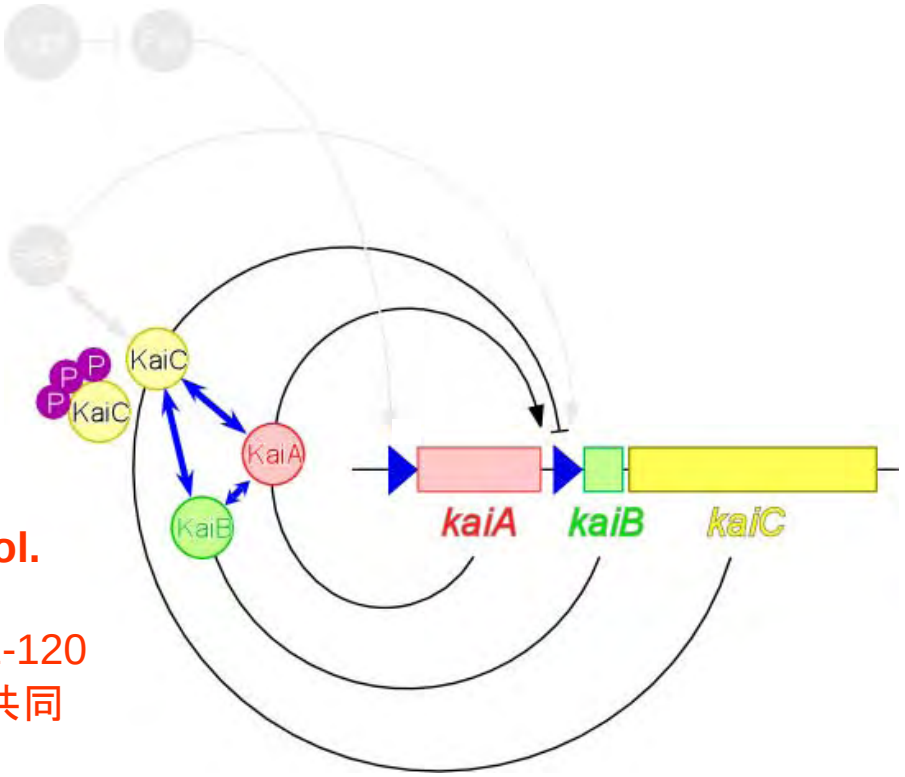
3つの時計タンパク質**KaiA、KaiB、KaiCをMg^{2+}-ATP存在下**で反応させると、**24時間周期のリン酸化リズム**が生じる（名古屋大近藤グループ、2005）。

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。

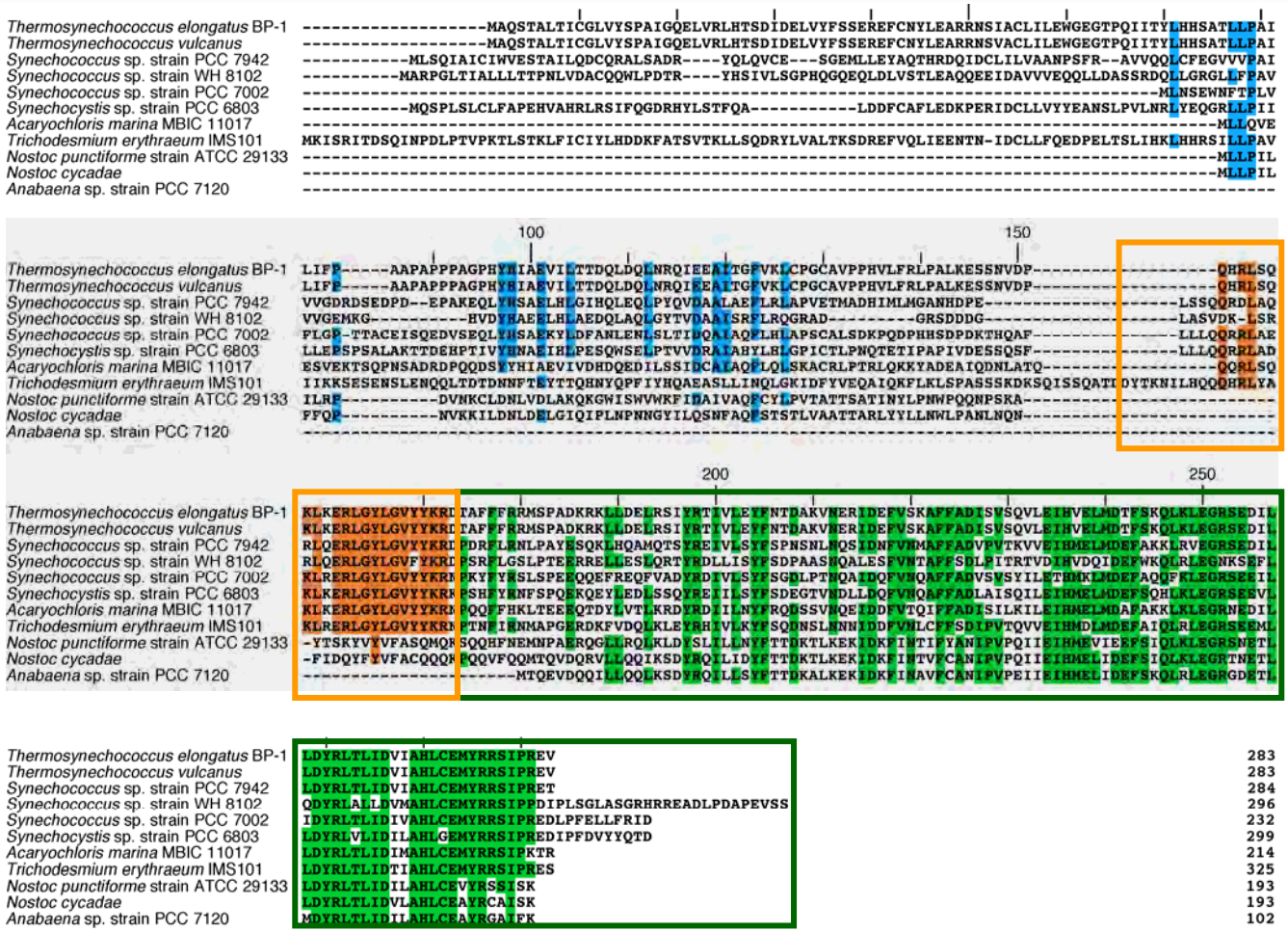
The clock:
KaiA, KaiB, KaiC

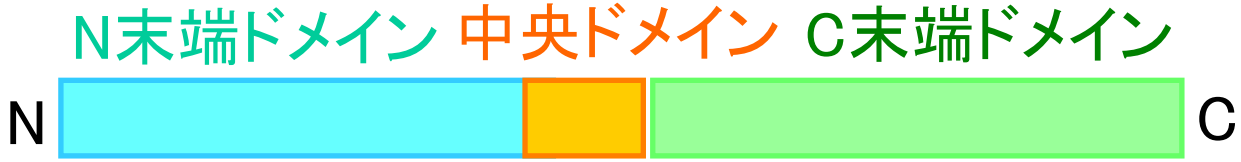
・振動子
・リズム発振に不可欠



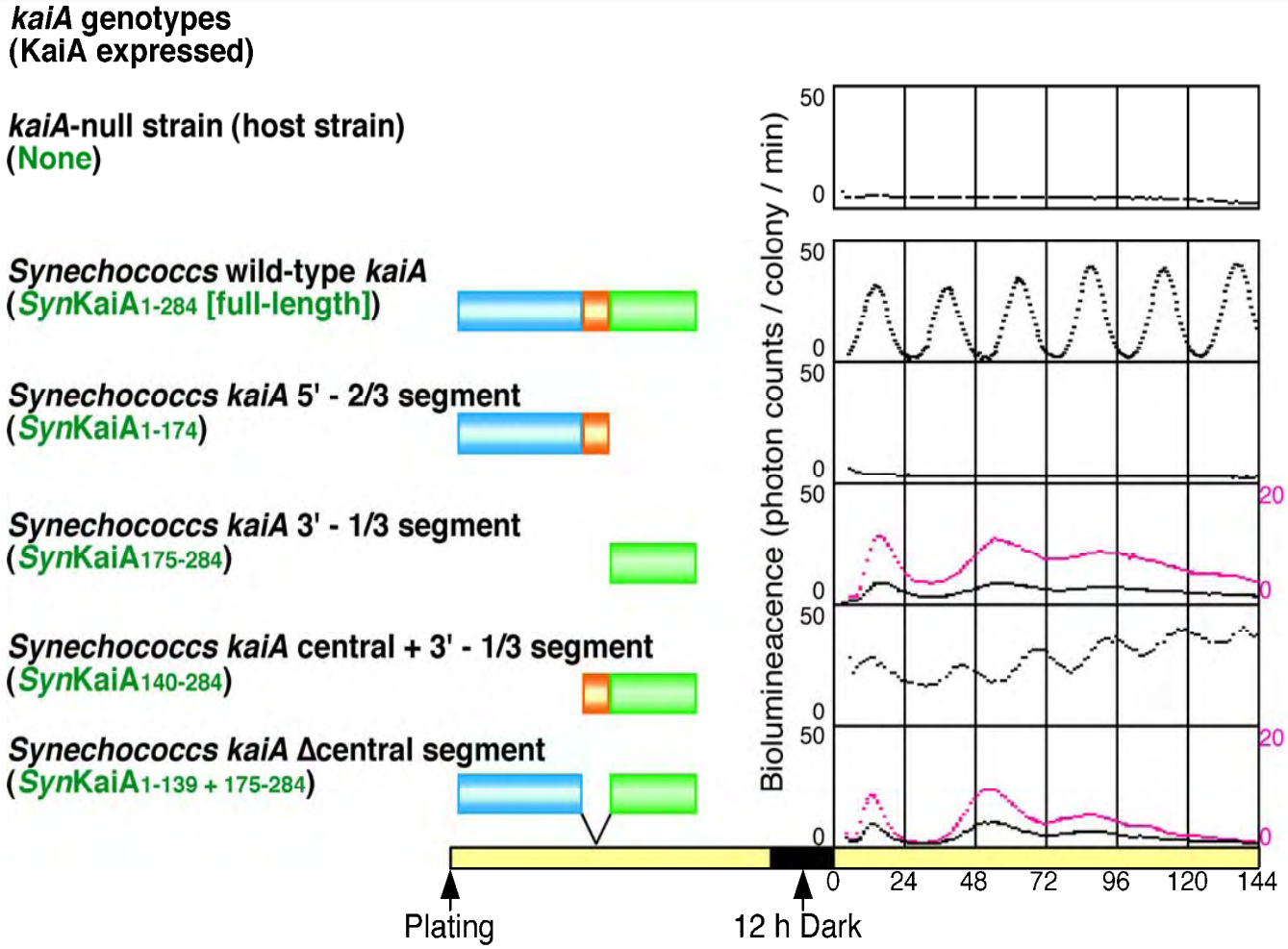
1. Uzumaki *et al*., 2004, **Nature Struct. Mol. Biol.**, 11:623- 631
2. 宇津巻等, 2005, **蛋白質核酸酵素** 50:111-120
（京都大学薬学研究科加藤博章研究室との共同研究）

KaiAのアライメント解析

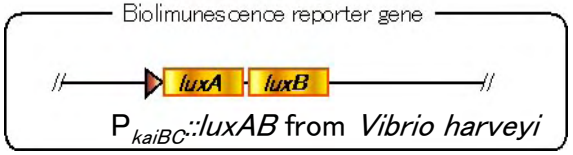




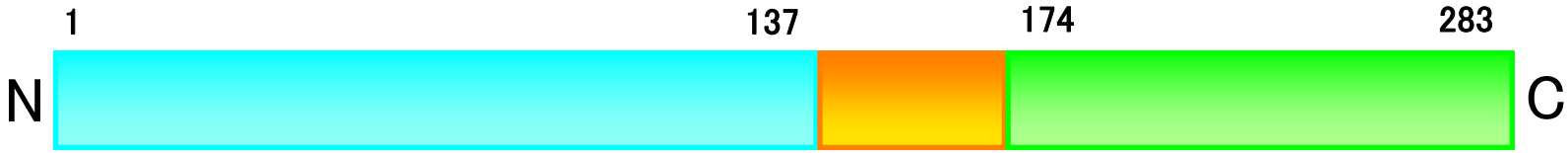
KaiAドメイン欠失変異体のリズム



- 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



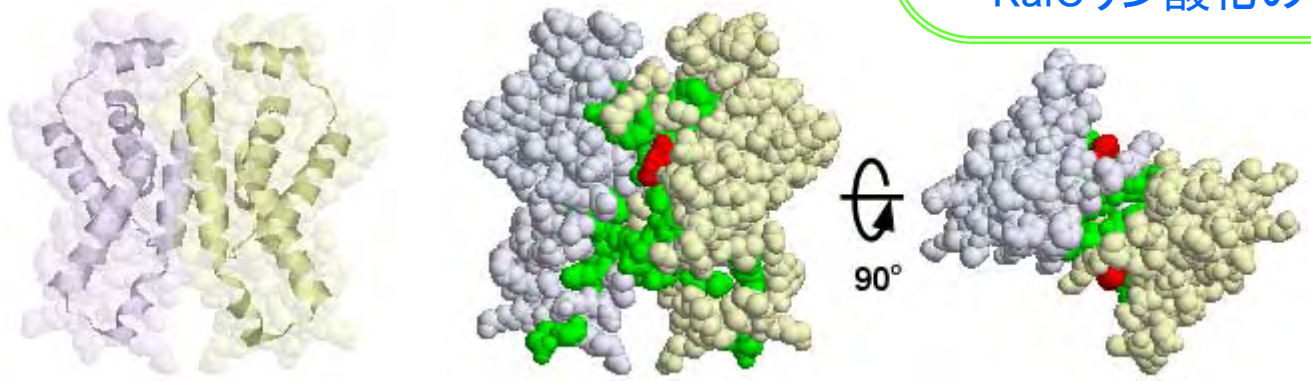
KaiAの3つの機能ドメイン



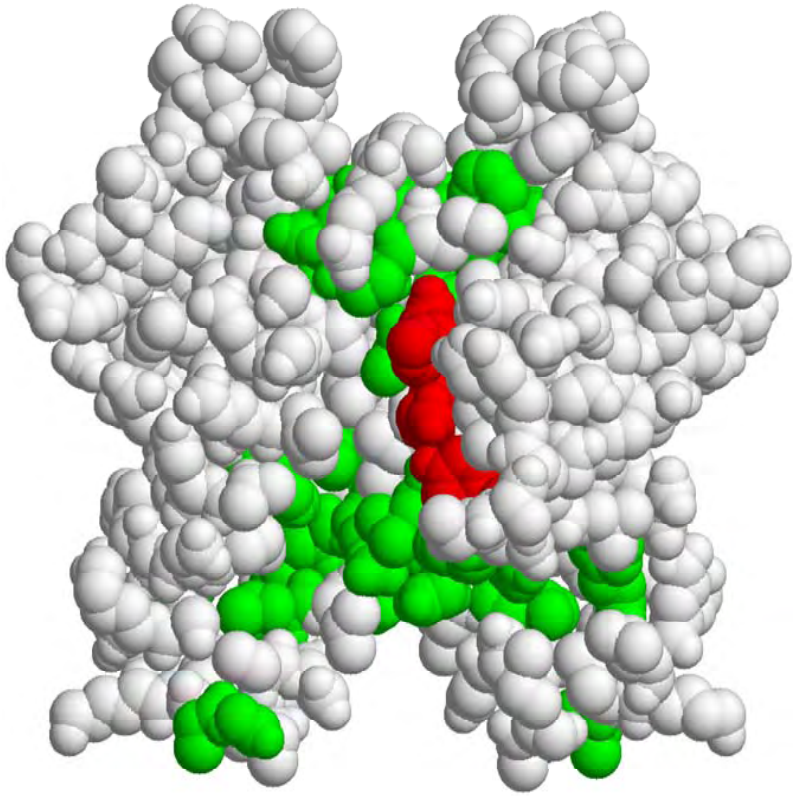
N末端ドメイン
振幅の増幅
(Amplitude amplifier)

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

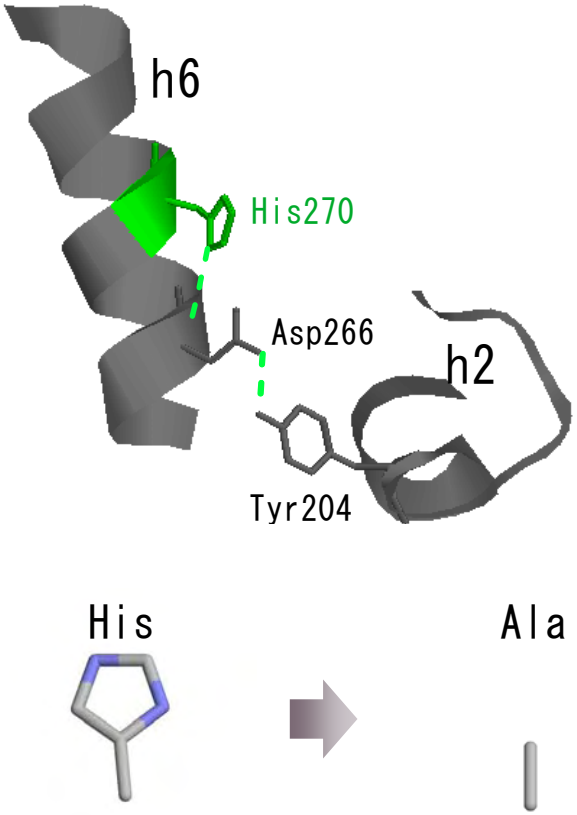


赤と緑は保存残基

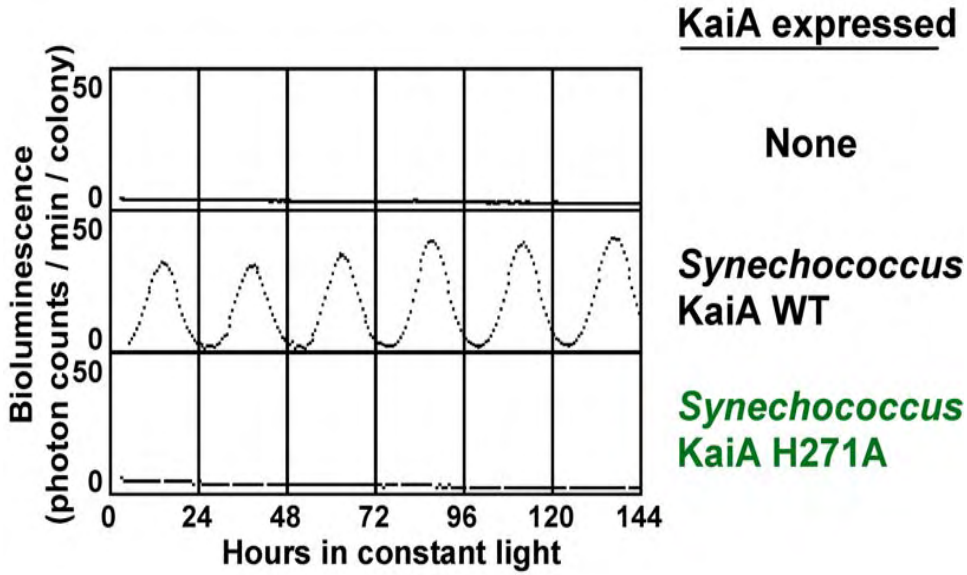
- 保存残基の多くは、二量体形成面に並んでいる。
- Tyr204、Asp266、His270は、二量体によって形成される曲面の最深部に位置し、水素結合で連結されている。
- Asp266、His270は、KaiA分子の外側（溶媒側）に側鎖を伸ばしている。
- Tyr204は、 Asp266、His270の位置を固定している。
- これらの残基は何らかの機能を担っていると予想される。

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。

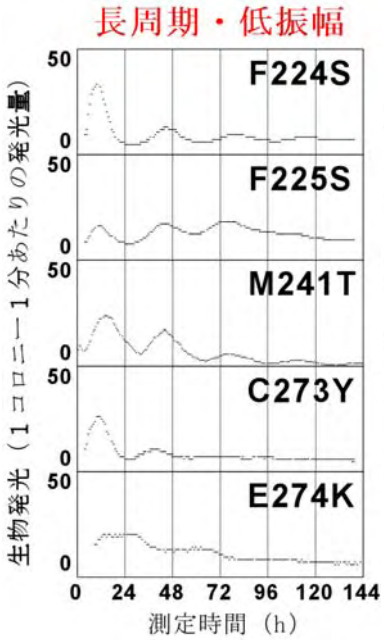


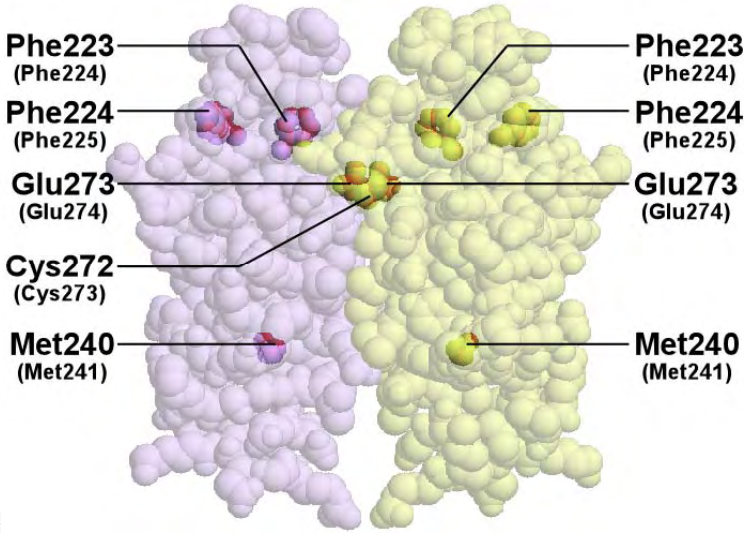
Synechochococcus KaiA
His271Ala変異株のリズム

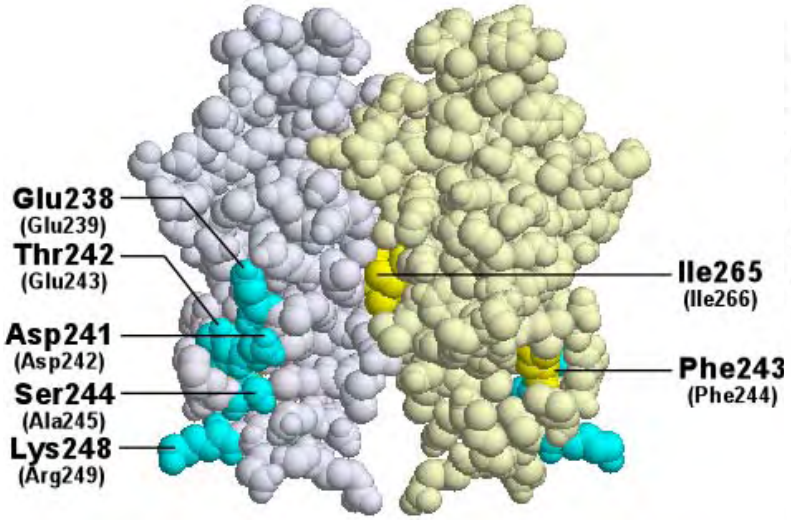


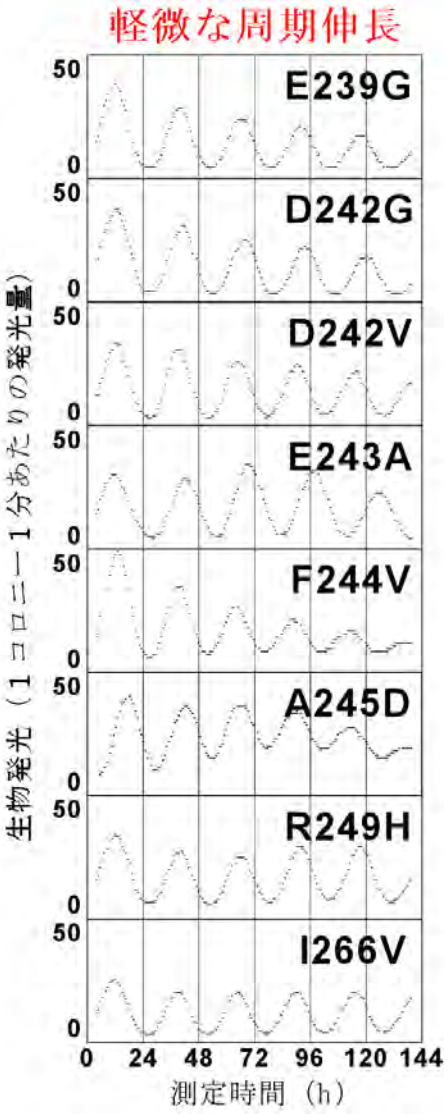
Synechococcus KaiA His271Ala変異株では、リズム発振は全く認められなかった。

時計発振ドメインの機能−構造相関



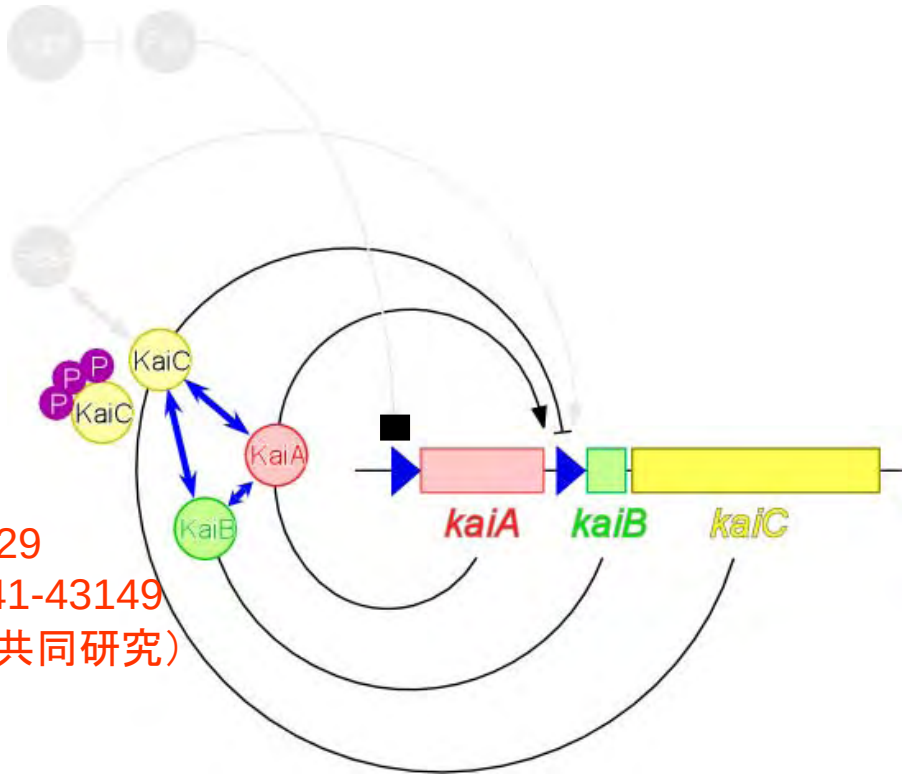






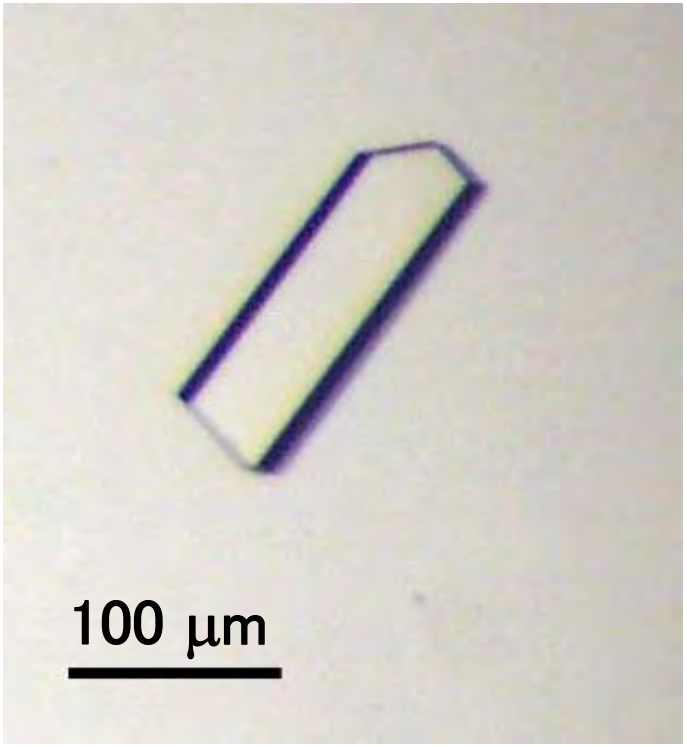
The clock:
KaiA, KaiB, KaiC

・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）

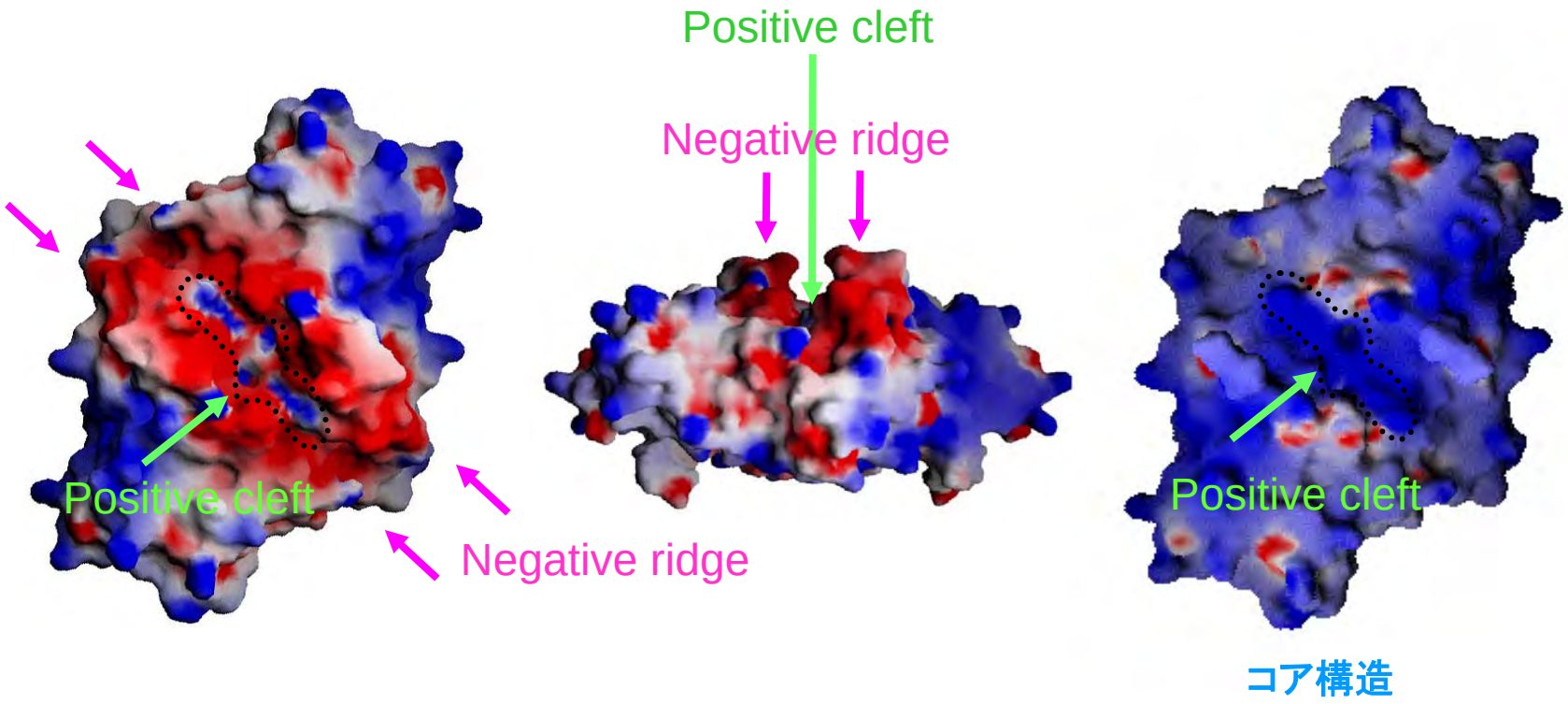
結晶化、構造解析



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

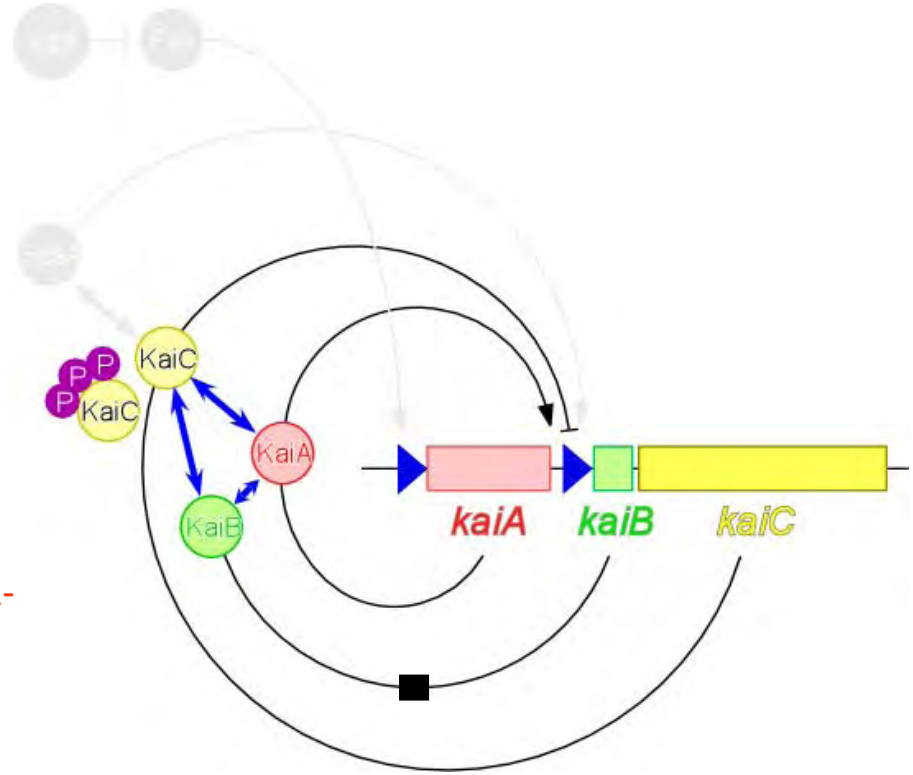
Positive cleft はNegative ridgeに隠されている



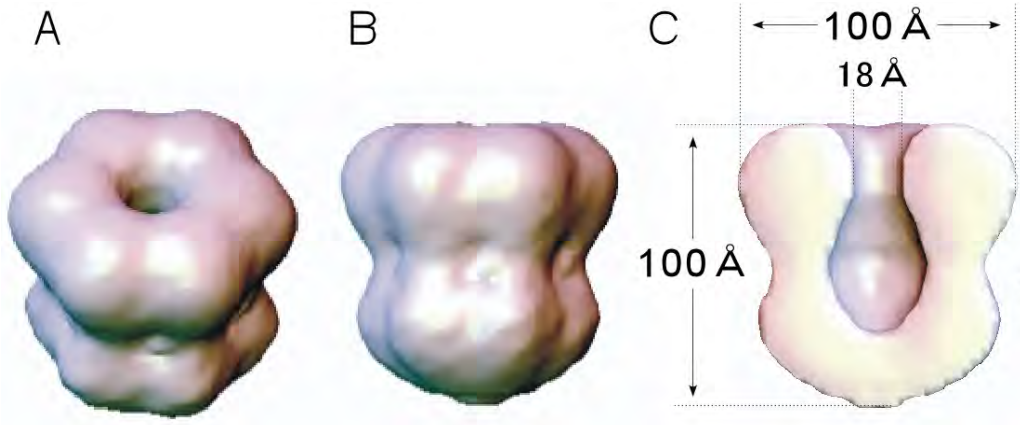
- C末端酸性アミノ酸領域はコア構造の上に局在し、Positive cleftを囲んでいる。
- Negative ridgeは蝶番のように動くのではないか。

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



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）

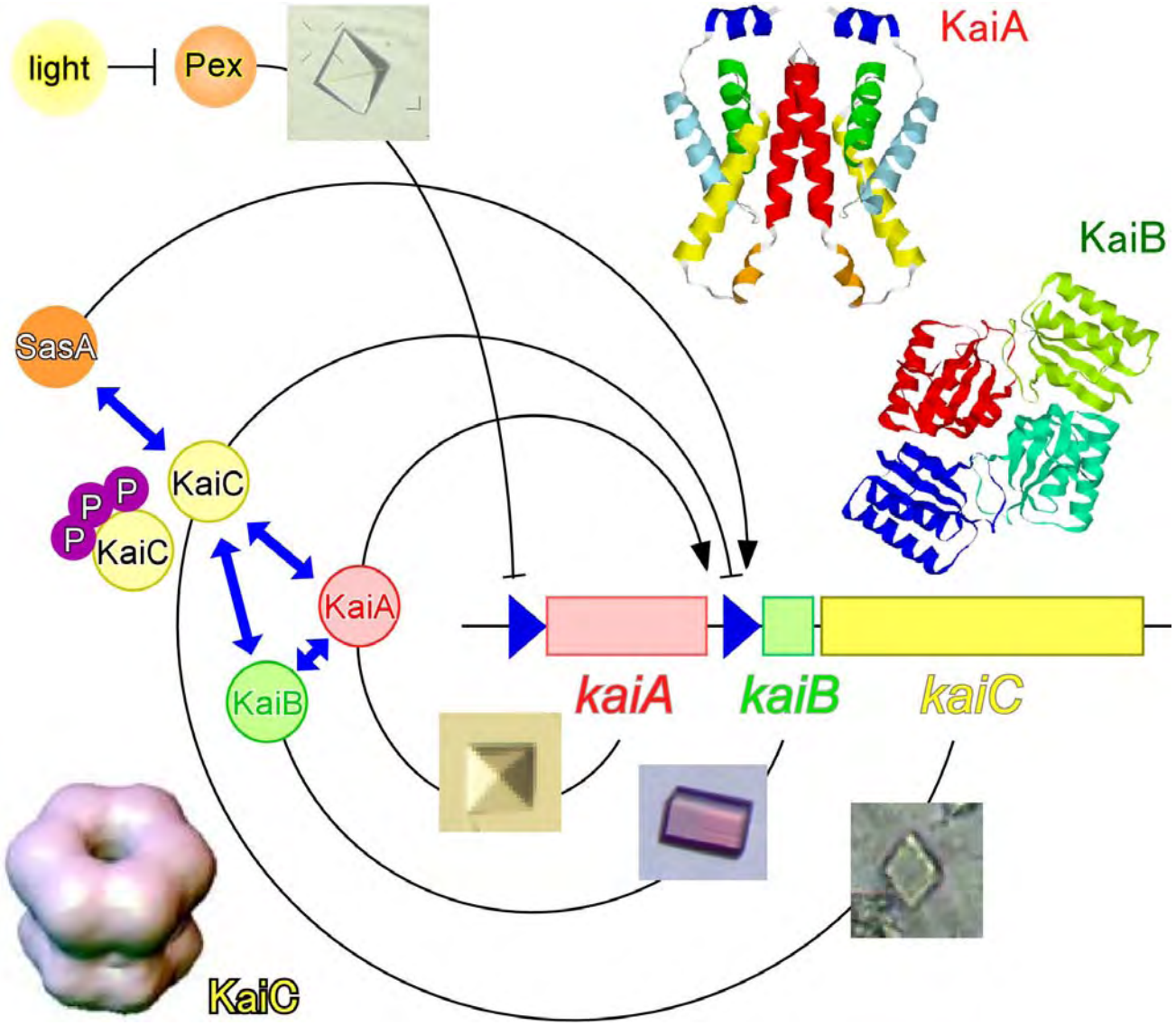
N末端ドメイン：高親和性ATP結合部位
六量体形成

C末端ドメイン：低親和性ATP結合部位
熱安定性、リン酸化

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

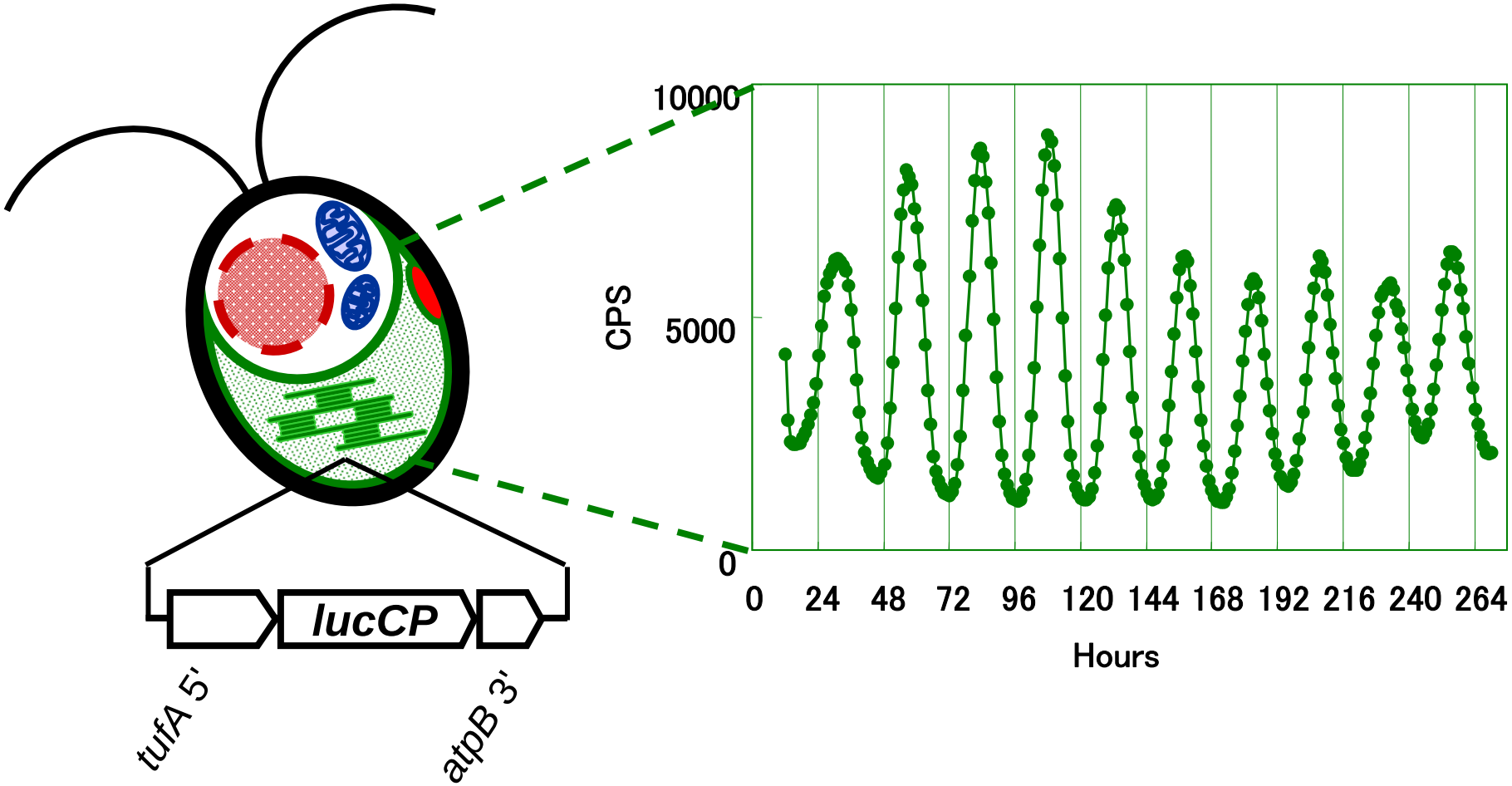
Matsuo *et al*., 2006, Mol. Cell. Biol. 26:863-870

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 taaaaaaggt ccagctccat tttatccatt agaagatggt acagctggtg aacaattaca taaagctatg aaacgttatg ctttagttcc aggtacaatt

      130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230        240
gcttttacag atgctcatat tgaagttgat attacatatg ctgaatattt tgaaatgtca gttcgtttag ctgaagctat gaaacgttat ggtttaaata caaatcatcg tattgttgtt

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

      370        380        390        400        410        420        430        440        450        460        470        480
tcacaaccaa cagttgtttt tgtttcaaaa aaaggtttac aaaaaatttt aaatgttcaa aaaaaattac caattattca aaaaattatt attatggatt caaaaacaga ttatcaaggt

      490        500        510        520        530        540        550        560        570        580        590        600
tttcaatcaa tgtatacatt tgttacatca catttaccac caggttttaa tgaatatgat tttgttccag aatcatttga tcgtgataaa acaattgctt taattatgaa ttcatcaggt

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

      730        740        750        760        770        780        790        800        810        820        830        840
gttccatttc atcatggttt tggtatgttt acaacattag gttatttaat ttgtggtttt cgtgttgttt 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 aaatttacat gaaattgctt caggtggtgc tccattatca

      970        980        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050       1060       1070       1080
aaagaagttg gtgaagctgt tgctaaacgt tttcatttac caggtattcg tcaaggttat ggtttaacag aaacaacatc agctatttta attacaccag aaggtgatga taaaccaggt

     1090       1100       1110       1120       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190       1200
gctgttggta aagttgttcc atttttgaa gctaaagttg ttgatttaga tacaggtaaa acattaggtg ttaatcaacg tggtgaatta tgtgttcgtg gtccaatgat tatgtcaggt

     1210       1220       1230       1240       1250       1260       1270       1280       1290       1300       1310       1320
tatgttaata atccagaagc tacaaatgct ttaattgata aagatggttg gttacattca ggtgatattg cttattggga tgaagatgaa catttttta ttgttgatcg tttaaaatca

     1330       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400       1410       1420       1430       1440
ttaattaaat ataaaggtta tcaagttgct ccagctgaat tagaatcaat tttattacaa catccaaata tttttgatgc tggtgttgct ggtttaccag atgatgatgc tggtgaatta

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

     1570       1580       1590       1600       1610       1620       1630       1640       1650       1660
gaagttccaa aaggtttaac aggtaaatta gatgctcgta aaattcgtga aattttaatt aaagctaaaa aaggtggtaa aattgctgtt taa
```

葉緑体生物発光レポーター株



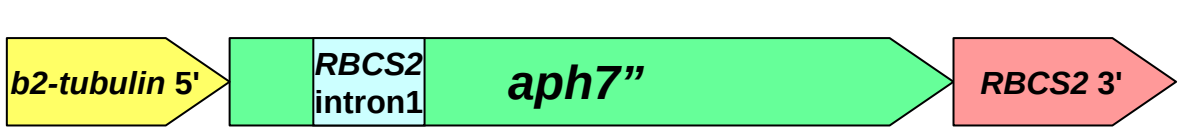
葉緑体ルシフェラーゼ遺伝子

概日リズム変異体のスクリーニング

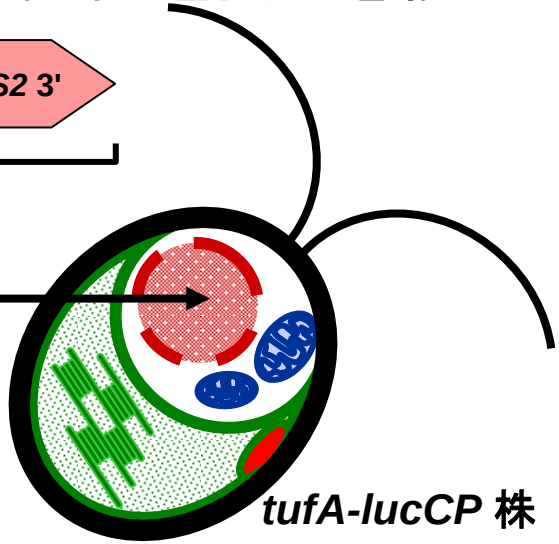
（Matuo *et al*., 2008, Gene & Dev. ）

概日リズム変異体のスクリーニング

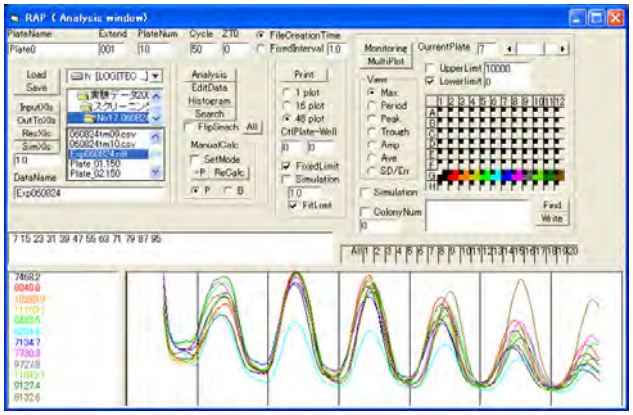
葉緑体レポーター株の核ゲノムにハイグロマイシン耐性遺伝子を移入



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）

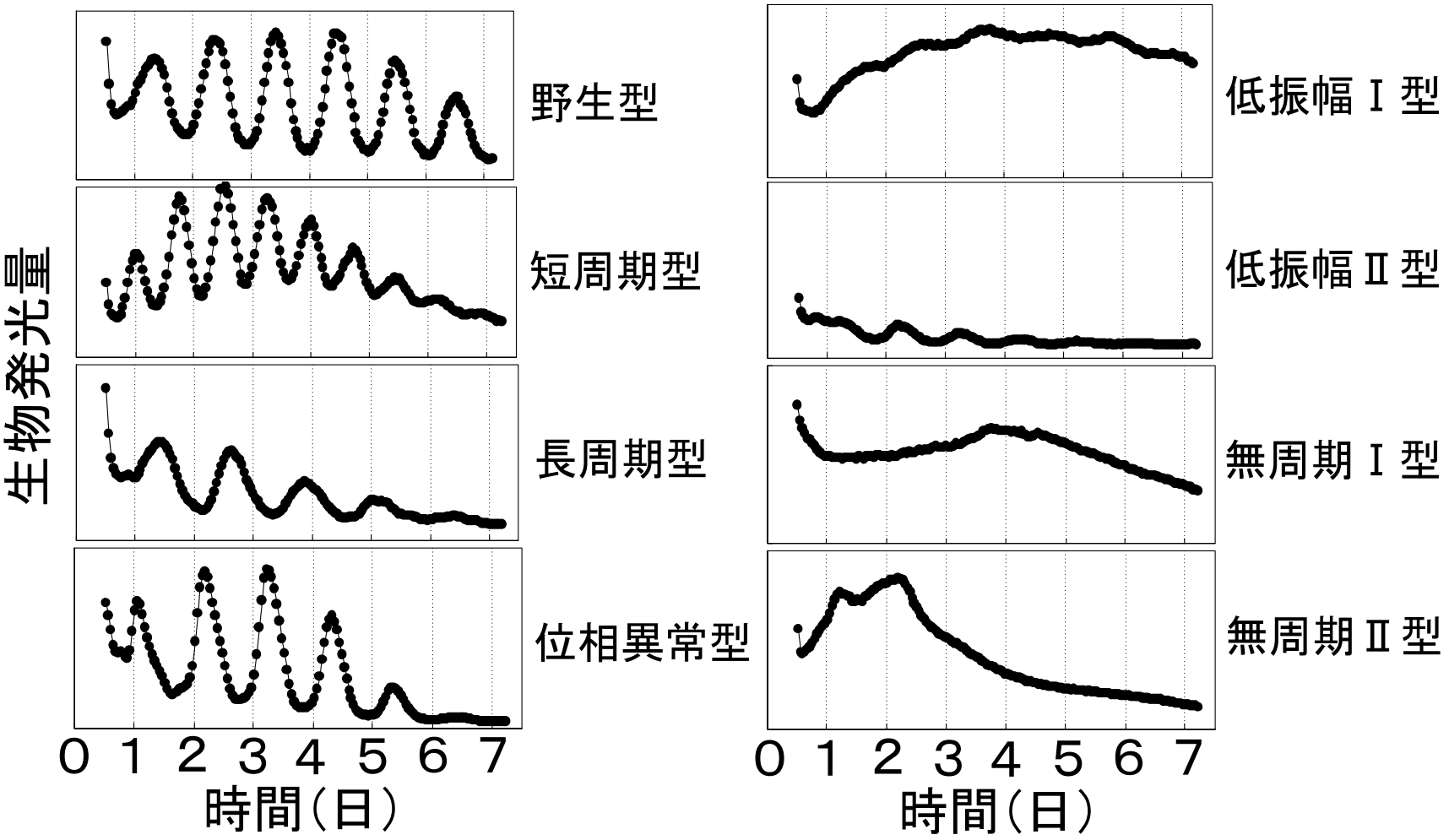


～16000のハイグロマイシン耐性クローンの葉緑体リズムを測定



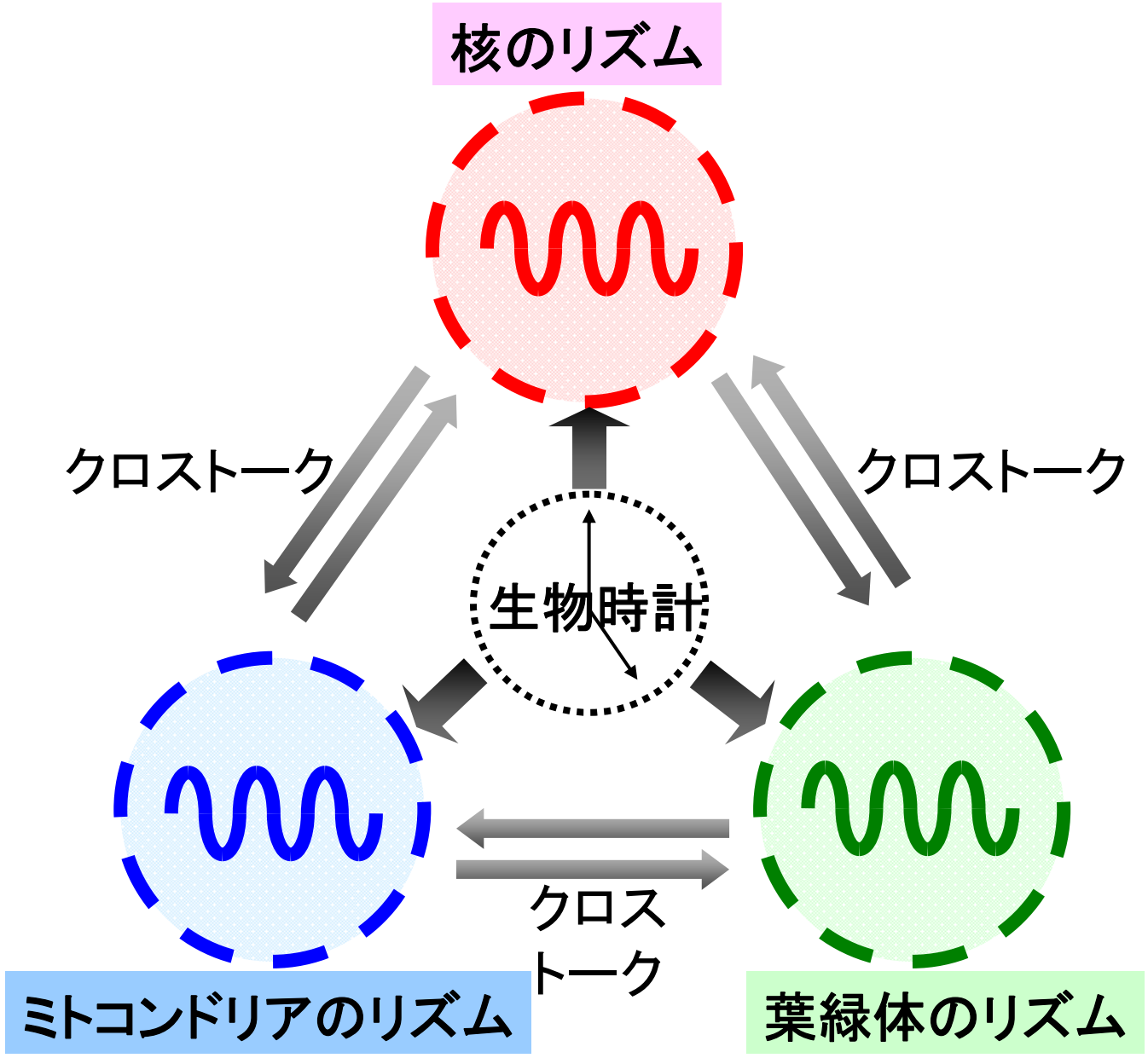
115の概日リズム変異体を単離

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）

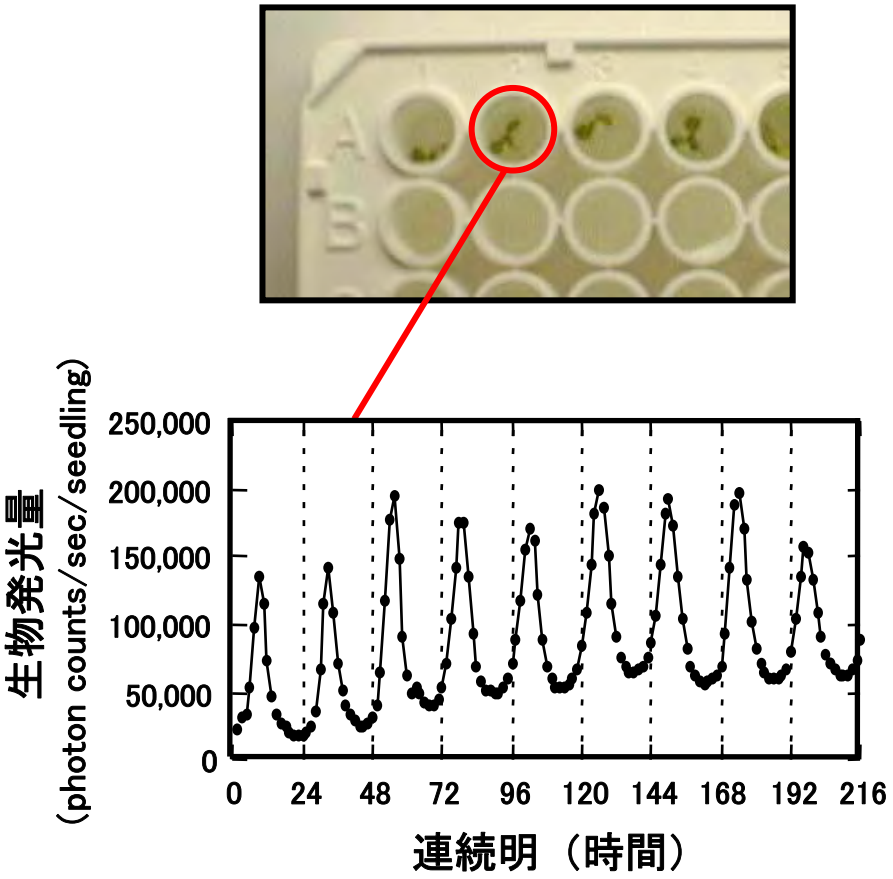
タグ配列のゲノム挿入部位の塩基配列を決定することにより、原因遺伝子の同定を進めている。

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）

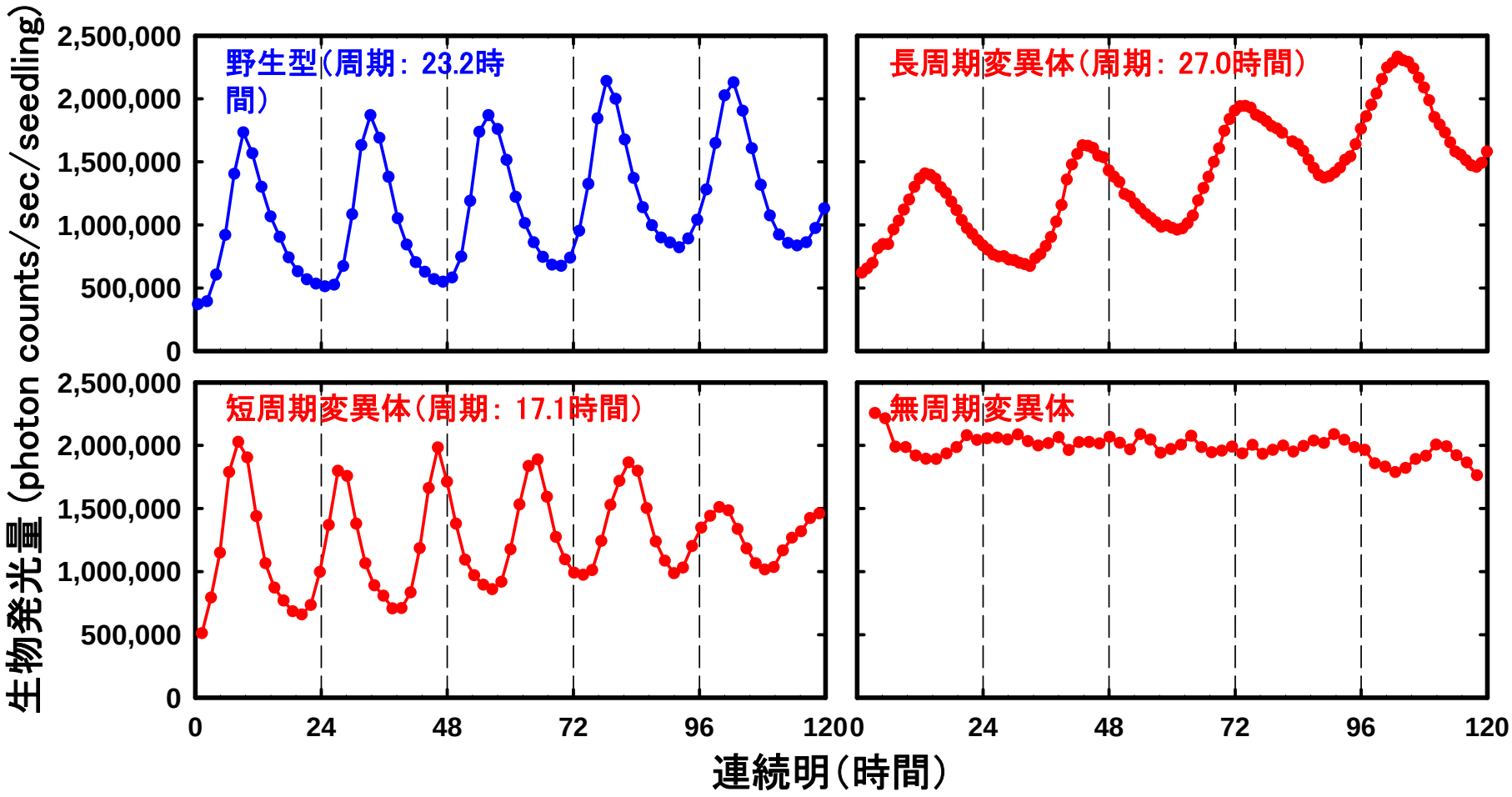
1. 生物発光リズム系の開発
2. 突然変異体の分離
3. 時計遺伝子のクローニング

シロイヌナズナの生物発光リズム

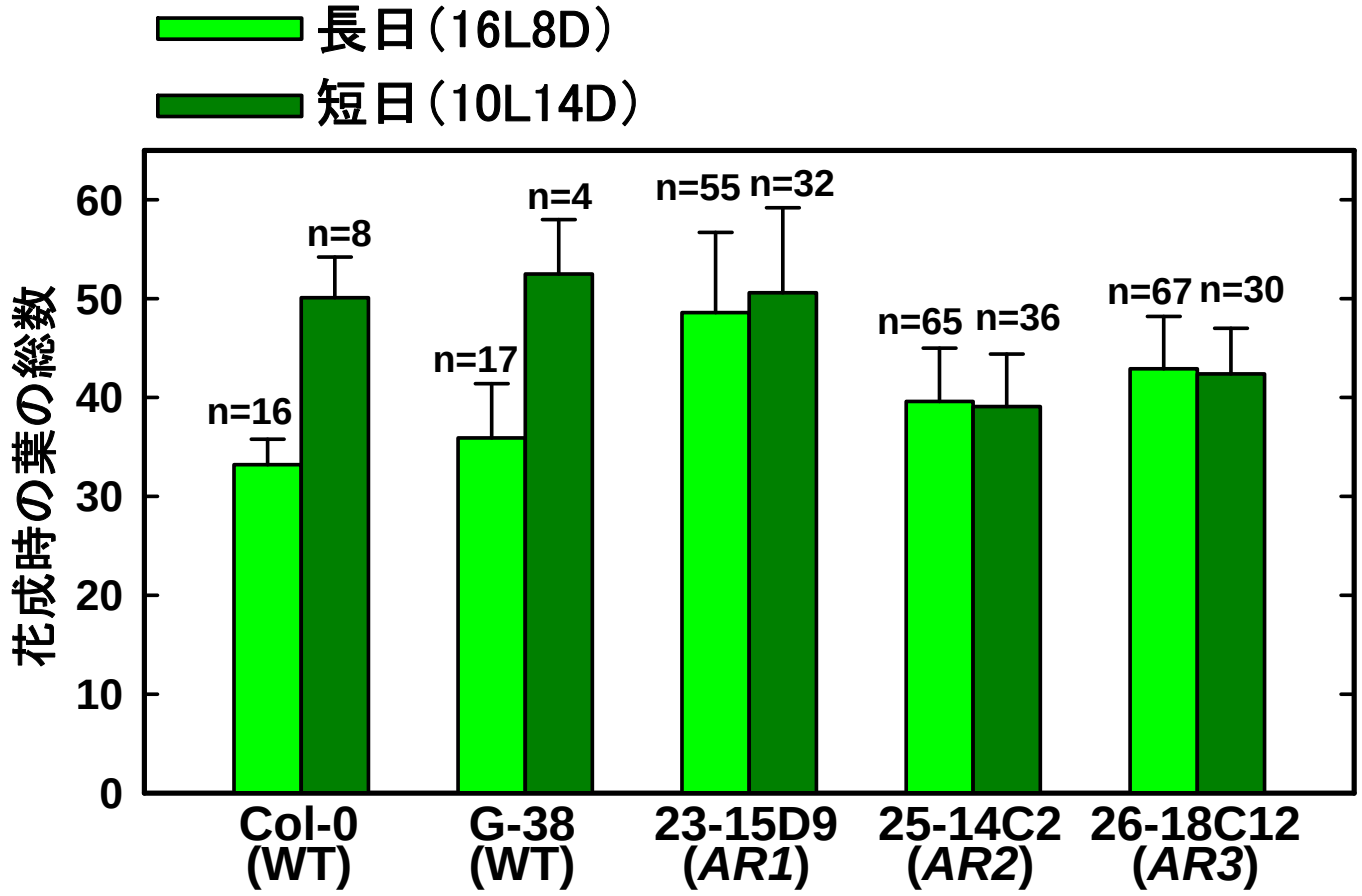


シロイヌナズナ
Arabidopsis thaliana

代表的なリズム変異体


野生型(周期：23.2時間)
長周期変異体(周期：27.0時間)
短周期変異体(周期：17.1時間)
無周期変異体
生物発光量(photon counts/sec/seedling)
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0
24
48
72
96
120
連続明(時間)

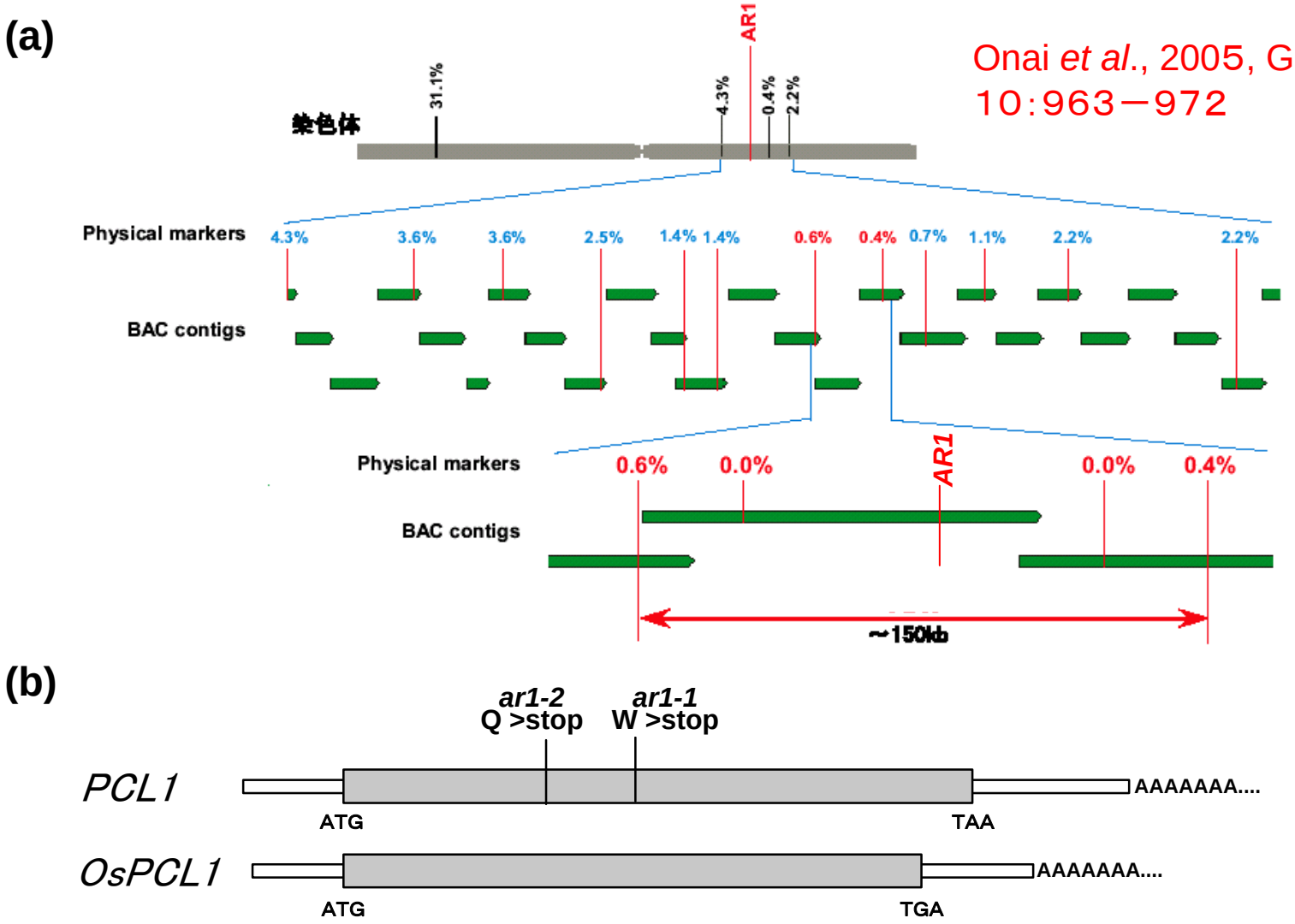
無周期変異体の光周的花芽形成



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

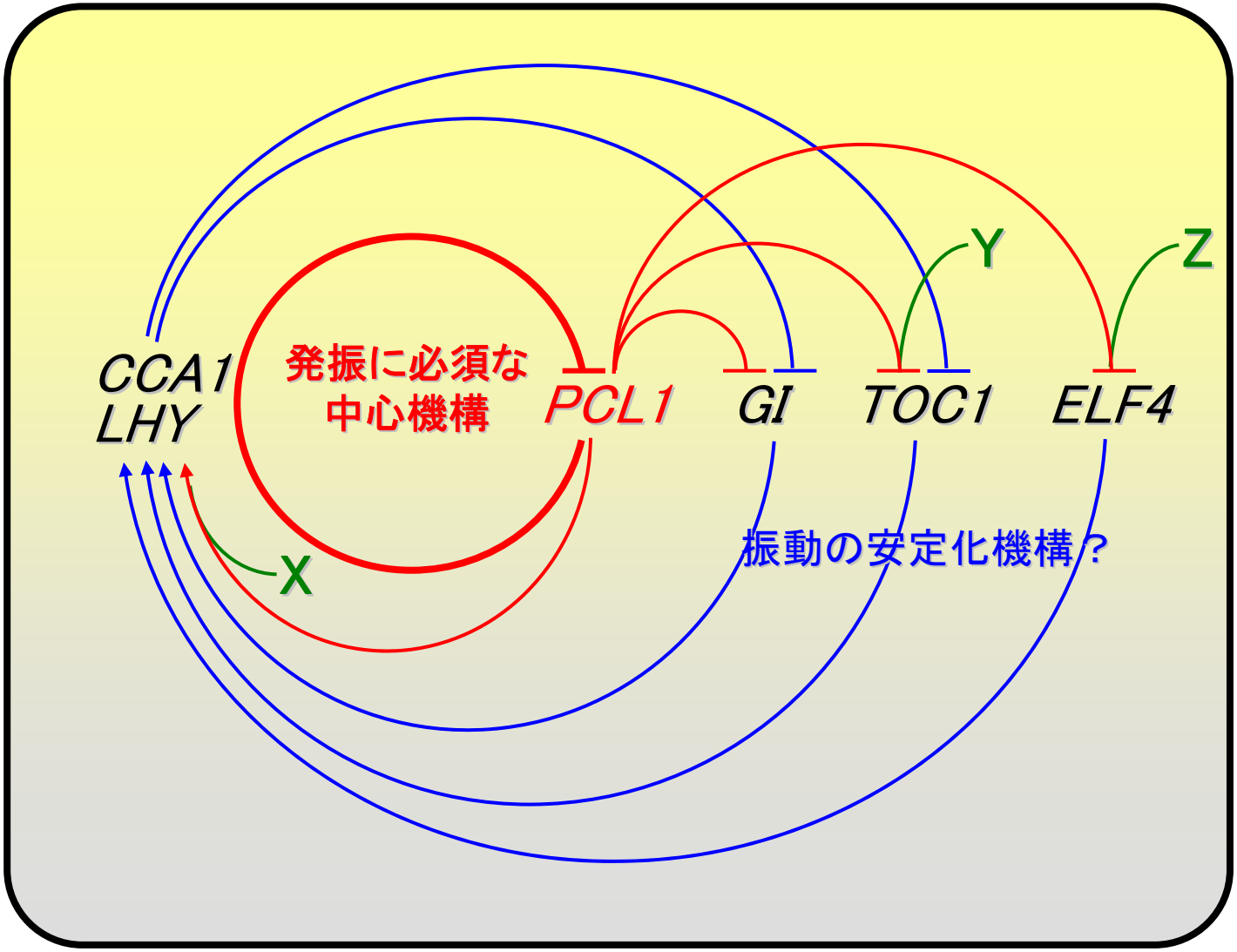
PCL1 (=*AR1*) 遺伝子のポジショナルクローニング



Onai *et al*., 2005, Genes Cells. 10:963−972

- *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」。