

24 時間計るタンパク質の仕組み — 概日時計の基本デザイン

名古屋大学理学研究科 名誉教授 近藤孝男

地球に生息する生命は24時間周期の昼夜環境に合わせ巧みに生活しています。私たちは腕時計を携帯し毎日の生活に利用していますが、腕時計をもたない動物、植物、あるいはバクテリアもその細胞内に時計を持っていて、一日の生活をプログラムしています。この時計は概日時計（生物時計）と呼ばれますが、大変正確で温度が変わってもほとんど狂いませぬ。生命活動が温度に大きく影響されることを考えると、これはとても不思議なことです。もちろん我々も概日時計をもっており、体の様々なはたらきや睡眠を正確に調節しています。

生命がいかにして地球の自転周期を細胞内に記憶し、24時間の温度に依存しない振動を発生するかという問題は、幅広い分野の研究者を魅了してきました。私たちは1992年に生物発光を利用したシアノバクテリアの実験系を開発し、3つの時計遺伝子 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* (*kai*は回転から命名) を見出し、*kaiC* の発現が高等生物で提唱されていた遺伝子発現を基にした時計モデルと同様なものであることを示しました。しかし、次第にこのモデルでは安定した24時間の周期を説明することは困難であると考えようになり、この謎に迫るため主役だと思われたKaiCタンパク質の生化学的機能の解明を目指しました。その結果、2005年に3つのKaiタンパク質とATPを試験管内で混ぜるだけで温度に影響されない24時間リズムが発生することを発見し、概日時計を試験管内で再構成することに成功しました（図1）。驚いたことに、このタンパク質のリズムは大変安定で周期も温度補償され、細胞や個体の概日時計と同様な性質を持つことが明らかになりました。生きた細胞の機能だと思われていた概日時計の研究にとって、この発見はコペルニクスの転回であり、高等生物の時計研究にも非常に大きなインパクトを与えました。また、この成果は「時を刻む」というタンパク質の全く新しい機能を発見したもので、化学・物理分野の研究者にも注目されています。

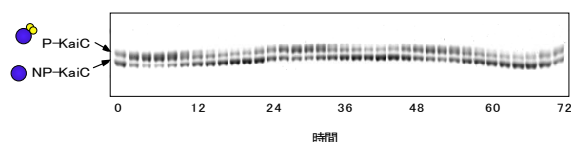


図1 タンパク質による概日時計

KaiCは試験管内で自律的にほぼ24時間周期で、リン酸化を繰り返す。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。

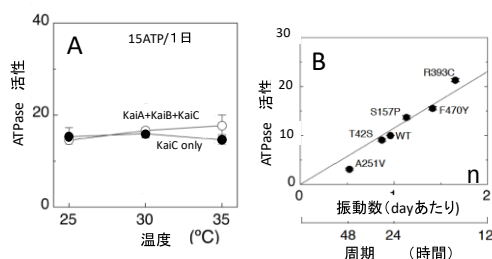


図2 KaiCのATPase活性。KaiCのみをATPと共に置き、ATPase活性を測定した。KaiCのみの場合、リン酸化リズムは生じていない。(A) KaiCのATPase活性は極めて低い。かつ精密に温度補償されている。(B) さらにこの活性は概日時計の周期数（速さ）に比例する。振動数との相関。野生型と5つの周期変異体のATPase活性をその振動数（周期の逆数）に対してプロットした。

では、Kaiタンパク質はどのようにして24時間をきざむのでしょうか？主役のKaiCは二つのATP分解酵素(ATPase)から構成されています。ATPは「細胞内の通貨」といわれ、ほとんどの生命活動の直接のエネルギー源になる分子です。生命は様々なATPaseを使い、ATPを分解して生命活動のエネルギーを得ています。そこで私たちはKaiCの活性を測定してみました、その結果にもう一度驚かされることになりました(図2)。まず活性は極めて低く、1日に10-15個程度のATPを分解するだけなのです。この活性は驚くほど低く(ほとんどゼロでレベル)、機能を失った酵素のようですが、よく調べるとこの活性は温度の影響を受けず極めて安定です。さらに周期の変化した突然変異体のKaiCで調べると、この活性は概日時計の速さに比例していました。これはATPaseの活性が概日時計の特性(周期とその安定性)を決めていることを意味します。さらに重要なことはこの性質はリズムを発生していないKaiCのみで見られることです。これはKaiCはリズムを起こして時間を計っているのではなく、KaiC内部にその固有の性質として24時間を記憶していることを示しています。

KaiCのATPaseはどのようにしてこれを実現しているのでしょうか？これは概日時計のもっとも

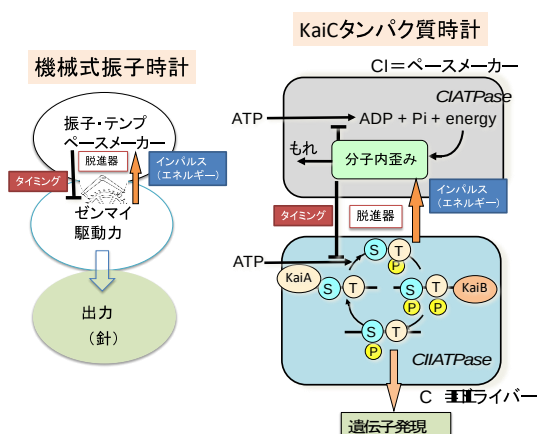


図3 機械式振子時計とKaiCタンパク質時計のデザイン
実体は全く異なるがいずれもよく似たデザインで構成されている。詳細は本文参照のこと

基本的な問題ですが、まだ良く判っていません。しかし、使われているエネルギー量では、通常の化学反応の組み合わせで24時間の振動を説明することはほとんど不可能で、まったく異なったメカニズムが必要なようです。最近の研究ではKaiCの片方(CI)のATP分解エネルギーがその分子構造に複雑な歪みを生じ、自身のATP分解活性をメカニカルに抑制することで、安定した負のフィードバックが成立している可能性が検討されています(図3)。これが実現すればタンパク質内部の歪みにバネのような仕組みが維持されるので、機械式腕時計のテンプのように温度や振幅に依存しない単振動のペースメーカー

として機能することが可能になります。しかし、このペースメーカーだけでは振動は早晩停止してしまい、24時間を憶えていてもそれを外に伝えられません。

そこでもう一つのATPase(CII)を使ってリン酸化サイクルを駆動し、これをペースメーカーとカップルさせることで安定した振動を発生、持続させていることが考えられます。KaiCのCII ATPaseはKaiAとKaiBの協働して、CIIの隣り合った2つのアミノ酸のリン酸化・脱リン酸化を順次繰り返しています。このサイクルの周期は当然温度や様々な環境の影響を受けるとは思われますが、その進行がCIのペースメーカーで制御されれば安定な周期となります。そして、このサイクルのどこかでCIがCIIからごくわずかな機械的エネルギーを受けることができれば、CIは自分の周期と同じ周期でエネルギーを獲得できますので振動を持続できます。このようにすれば2つのサイクルは同じ周期で安定した振動を続けることができ、CIIも安定した周期を得て、様々な代謝活性を24時間周期で制御できます。つまり、二つの性質の異なった振動を組み合わせ、良いところ取りをしたこととなります。実は、こうした構成は機械式時計のデザインと同じで、カップリング

のメカニズムは脱進器と呼ばれています。脱進器はガリレオが発見した等時性をもつ振子とそれより速い周期のゼンマイや錘による回転機構をつなぐわけですが、ホイヘンスやフック、さらにはその後の多くの時計技師が開発した仕組みにより、作用の方向を一方通行に限定し、作用時間もごく短時間とし、ペースメーカー（振子やテンプ）がゼンマイに駆動された回転機構を確実に制御しつつ、ごく僅かなエネルギーを確実に獲得して、自由な単振動を続けるように工夫されています。

このような仕組みがKaiCの中に可能でしょうか。その動きは原子レベルのわずかな動きでしょうから、具体的に解明するのはまだまだ時間がかかると思いますが、KaiCの数多くの変異体のなかにはこの機能に異常が持つと考えられるものが見つかっています。この変異体は周期が温度の影響を受けるのですが、周期は8-10時間となり、リン酸化サイクルも野生型のように停止期間は見られず、自由回転しているようです。こうした変異体の存在は機械式時計と同じような時計機構がタンパク質内に仕組まれていることを期待させるものです。