1P113

藍色細菌時計タンパク質の1分子測定に向けて

○和田 ちひろ¹、新井 由之²、林 史夫³、岩瀬 亮¹、宇津巻 竜也¹、岩根 敦子⁴、柳田 敏雄^{4,5}、石浦 正寛¹ (¹名大・遺伝子・ゲノム、²阪大院・基礎工・システム人間系、³群大・院工・ナノ材料、⁴阪大院・生命機能・ナノ生体、⁵JST・CREST)

多くの生物において様々な生理活性が24時間周期で変動することが知られており、これらのリズムを司る細胞内のリズム発振の分子機構を「生物時計」と呼んでいる。我々は生物時計を精巧な分子装置である「生物時計装置」と捉えて、藍色細菌の生物時計装置を構成する時計タンパク質 (KaiA、KaiB、KaiC) の諸性質や相互作用を解析して来た。KaiA (2量体) と6量体型 KaiC との相互作用はリズム発振に極めて重要である。これまでにこの KaiA-KaiC 間相互作用を詳細に調べ、ATP 存在下では1分子の KaiA が1分子の6量体型 KaiC に結合して KaiC のリン酸化を促進すること、KaiC のリン酸化後に KaiA は KaiC から解離することを明らかにしている。KaiA との相互作用は KaiC サブユニットでも認められる。KaiC サブユニットには1カ所以上のリン酸化部位が同定されている。したがってホモ6量体である6量体型 KaiC には理論上6カ所の KaiA 相互作用部位と6カ所以上のリン酸化部位が存在する。6量体型 KaiC の1つのサブユニットにおいて、KaiA 結合、KaiC リン酸化、KaiA 解離の各反応が段階的に起きると思われる。その後、別のサブユニットでも同様の一連の反応が起きるのか。もしそうならば6個の全てのサブユニットにおいて同様に起きるのか。もしそうならば、各サブユニットにおける KaiA の結合は一定の時間間隔で起きるのか、不定期におきるのか、それとも時間間隔は6量体型 KaiC のリン酸化されたリン酸化部位の数に応じて変化するのか。我々はこれらの問題に答えるために KaiA-KaiC 間相互作用の1分子測定の可能性を検討した。

C.Wada, Y.Arai, F.Hayashi, R.Iwase, T.Uzumaki, A.H.Iwane, T.Yanagida, M.Ishiura : Single-molecule imaging of cyanobacterial circadian clock proteins

1P115

好熱性藍色細菌の生物時計の分子機構に関わる時計タンパク質 KaiC の ATP 加水分解とリン酸化反応のキネティクス

○三宅 歩¹、林 史夫²、岩瀬 亮¹、石浦 正寛¹ (¹名大・遺伝子・ゲノム、²群大・院工・ナノ材料)

多くの生物で、様々な生理活性に約24時間周期の変動が見られ、そのリズムは内因性の生物時計によって制御されている。藍色細菌は現在のところ、生物時計の存在が確認された唯一の原核生物である。藍色細菌の生物時計の中核を担うのは時計遺伝子クラスター *kaiABC* である。時計タンパク質 KaiA は *kaiBC* オペロンの発現を促進し、時計タンパク質 KaiC は *kaiBC* オペロンの発現を抑制する。この自己フィードバック制御が時計発振の本質であると考えられている。しかし最近、KaiA、KaiB、KaiC、の3つの時計タンパク質と ATP を試験管内で混ぜると、KaiC のリン酸化状態が約24時間周期で変動することが確認され、これらの時計タンパク質間の相互作用に基づく KaiC のリン酸化サイクルが生物時計の発振メカニズムであるというモデルが提唱されている。しかしながら、これらの時計タンパク質の詳細な生化学的活性は明らかになっていない。時計の発振機構の解明にはこれらの活性を詳細に解析することが不可欠である。KaiC は相同性の高い二つのドメインで構成され、各ドメインに ATPase motif を持つ。*in vitro* で自己リン酸化活性が見られる。さらに KaiC のリン酸化は KaiA により促進される。我々は KaiC の ATPase 活性が時計発振に不可欠であり、リン酸化 KaiC はその中間体であると考えている。本研究では、KaiC が ATPase 活性を持つことを証明し、そのキネティクスを明らかにすることを試みた。さらに ATPase 活性と KaiC リン酸化との関係に関しても解析を進めている。

A.Miyake, F.Hayashi, R.Iwase and M.Ishiura : Kinetics of the ATPase and phosphorylation activities of circadian clock protein KaiC from *Thermosynechococcus elongates* BP-1

1P114

藍色細菌時計タンパク質 KaiC の N 末端、C 末端ドメインのはたらき

○林 史夫¹、岩瀬 亮²、宇津巻 竜也²、石浦 正寛² (¹群大・院工・ナノ材料、²名大・遺伝子・ゲノム)

多くの生物は、さまざまな生理活性を約24時間周期で自律的に変動させる。この自律的変動が「概日リズム」であり、この概日リズムを制御する細胞内の分子機構が「生物時計」である。我々は生物時計を精巧な分子装置である「生物時計装置」と捉えて、藍色細菌の生物時計装置を構成する時計タンパク質 (KaiA、KaiB、KaiC) の諸性質や相互作用を解析してきた。時計タンパク質 KaiC は ATP と相互作用して可逆的に六量体型 KaiC となり、六量体ポット状構造をとる。KaiC サブユニットは垂直方向のダンベル状構造であり、ダンベル構造の二つの球状部分 (N 末端ドメインと C 末端ドメイン) にそれぞれ ATPase motif (Walker motif A、B、触媒残基と推定されるグルタミン酸残基) が存在する。これまでに、各ドメインの ATPase motif にアミノ酸置換を施した変異タンパク質を用い、N 末端ドメインの ATPase motif が C 末端ドメインのそれより ATP に対する親和性が高く、六量体形成により寄与すること、C 末端ドメインの ATPase motif はリン酸化反応に不可欠であることを示してきた。今回、我々は KaiC の各ドメインタンパク質を調製し、以下のような各ドメインのはたらきを明らかにした。1) N 末端ドメインが六量体形成活性を持つ、2) KaiA は C 末端ドメインにしか相互作用しない、3) その相互作用は KaiC の6量体構造を必要としない、4) その相互作用は C 末端ドメインのリン酸化を促進する。また、リン酸化活性 (触媒活性) を失った KaiC 変異タンパク質も用いることで、KaiC リン酸化は同一サブユニット内で起きるのではなく、サブユニット間で起きることを示した。これら結果をふまえ、藍色細菌生物時計の時計発振機構における KaiC の機能を議論する。

F.Hayashi, R.Iwase, T.Uzumaki, M.Ishiura : Roles of N- and C-terminal domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC

1P116

シャペロニン GroEL の第2の ATP 結合部位の探索

○高橋 一暢¹、木下 賢吾²、桑島 邦博¹ (¹東大院・理、²東大・医科研)

大腸菌のシャペロニン GroEL は物理化学的な立場からの研究が最も進んでいるシャペロニンの一つである。GroEL は分子量 57kDa の単量体7つが環状に並んだリングが二個背中合わせに重なった14量体の二重ドーナツ型構造を持っている。GroEL による標的蛋白質の効率的な巻き戻りは、ATP 依存的に起きる GroEL のアロステリック転移により制御されている。しかし、その詳細な分子機構は完全には明らかとされていない。我々は GroEL のシャペロニンの機能発現にとって必要な ATP によるアロステリックな構造転移の速度論を *in vitro* のモデル系を用いて調べた。GroEL には1つのドーナツ内での相互作用、さらには2つのドーナツ間での相互作用が存在し、複雑な系となっている。そこで、1つのリング内での挙動を明らかにするために、1つのリングだけからなる GroEL の変異体 SR1 の蛍光ラベルしたもの (Y485W) の構造転移を蛍光ストップフロー法を用いて速度論的に調べた。そして、観測された4つの相のうち2番目の相の見かけの速度定数の ATP 濃度依存性を解析した結果、2つの相が見られた。その ATP 濃度依存性を説明するためには、GroEL には本来の ATP 活性部位の他にもう一つ、ATP と弱く結合する部位が存在するというモデルが考えられる。そこで、そのモデルを実証するために、表面物性の形状と静電ポテンシャルの類似性検索とフレキシブルドッキングの手法を利用することにより、第2の ATP 結合部位の推定を行い、その位置 (A251、A258、A275) に変異を導入して、これらの変異体の ATP の結合の機構を調べる予定である。本発表ではこの実験の進展について報告する。

K. Takahashi, K. Kinoshita, K. Kuwajima : Exploration of the second ATP-binding site of GroEL