

氏 名 今村 寿子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1102 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 **Theoretical predictions of the oscillating mechanism in
cyanobacterial circadian rhythms**

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
准教授 望月 敦史
教授 野田 昌晴
教授 近藤 孝男（名古屋大学）

論文内容の要旨

日々繰り返される昼夜の変化に適応するため、生物は生理状態を24時間周期で変化させる”時計”、いわゆる概日リズムを備えている。概日リズムは、時計遺伝子産物の状態の時間的な振動と捉えることができ、時計発振機構の理解に数理的研究は大きな役割を果たしている。転写に対する負のフィードバックを発振原理とする数理モデルは、その後の分子遺伝学的解析により、普遍的な時計発振原理として位置づけられてきた。ショウジョウバエ、アカパンカビ、マウス、ヒトといった概日モデル動物のいずれにおいても、transcription translation feedback oscillatory (TTO) 過程は、時計タンパク質のリン酸化と共に、共通する不可欠な要素となっている。

シアノバクテリアは概日リズムが知られている唯一の原核生物である。他の既知の概日モデル生物と異なり、核といった細胞構造や、細胞周期に依存せずに、概日リズムを発現する。シアノバクテリアの概日振動体は、自己キナーゼ・フォスファターゼ活性を有するKaiCと、そのリン酸化を調節するKaiA、KaiBから成る。KaiCは転写の自己制御に関与し、これにより転写・翻訳レベルの概日振動が生じると考えられる。一方でKaiCリン酸化の概日振動は、転写が無くとも生体内で継続しており、また試験管内で3つのKaiタンパク質とATPを混ぜることで再現された。このようにKai振動体ではTTO過程とnon-TTO過程の双方が働いており、これが他の生物にも共通する概日発振構造であるのか否かという議論を含め、概日システムの中核を解析する最も単純な系として注目を集めている。本研究では(1) TTO過程におけるKaiC転写制御機構 (2) non-TTO過程におけるKaiCリン酸化制御機構について、それぞれ数理モデルを用いたメカニズムの予測を行った。

(1) TTO過程におけるKaiC転写制御機構について、KaiCはリン酸化状態によって転写を正にも負にも制御している可能性が実験により示されている。ここではKaiCの各リン酸化状態が自身 (*kaiBC* オペロン) の転写制御にどのように働くのか、発現レベルの振動が起きる条件を明らかにすることで調べた。重要と思われる3つの要素、*kaiBC* mRNA、非リン酸化KaiC、リン酸化KaiCの発現の増減を微分方程式で表した。非リン酸化KaiCとリン酸化KaiCのそれぞれが、転写を正か負に制御すると仮定し、制御のあらゆる組み合わせを表現できる数理モデルを設定した。数理解析の結果、振動が起きるには (i) リン酸化速度が速く、リン酸化KaiCが転写を促進する場合、(ii) リン酸化速度が遅く、リン酸化KaiCが転写を抑制する場合の2通りだけが可能と分かった。どちらの場合も非リン酸化KaiCの転写制御における役割は重要では無かった。シミュレーションの結果、(i) では*kaiC* 遺伝子の変異株等で観察される転写活性の変化をよく再現できた。このモデルはKaiBによるリン酸化反応への負のフィードバックが重要であり、既知のTTO過程における転写制御様式と異なる。リン酸化速度の振幅が高いうえ、KaiCの濃度変化にロバストであり、生体内のメカニズムを表現している可能性が高いと考えられる。(ii) では実験結果を再現できず、リン酸化速度の振幅およびKaiCの濃度変化に対するロバストネスは非常に低かった。以上、KaiCは非リン酸化状態では転写を抑制し、リン酸化されると転写を促進することが理論的に予測された。

(2) non-TTO過程におけるKaiCリン酸化制御機構について、Kaiタンパク質間相互作用の周期的変化に着目した。KaiAはKaiCのリン酸化を促進し、次第にリン酸化KaiCと

安定な複合体を形成するようになる。よって複合体形成により、遊離 KaiA が減少することで、KaiC リン酸化反応に負のフィードバックが働き、KaiC のリン酸化振動が生じる可能性がある。しかし、観察される複合体形成過程をそのまま取り込んだ基本モデルは、シミュレーションにより、振動しないことが分かった。そこで一般的な性質を解析するために、ある分子が全体の量を保ったまま、複数の状態を順番に遷移する系を考えた。このような閉鎖系で、各状態の濃度が振動するには、遷移反応へのフィードバックが必要であると証明できた。さらに、フィードバックを受ける反応と与える因子は、一定の状態数以上離れている必要があることを明らかにした。この知見を基に改良したモデルを用いて KaiC のリン酸化振動を解析した。その結果、振動するためには、KaiC は初期のリン酸化の後、KaiA との複合体を形成する前に、未知の別の状態を経る必要があることが分かった。この結果はフィードバックの時間遅れが発振に必要であることを示している。ただし、時間遅れの効果を発現するためには状態数を増やすことが必要であり、反応速度を遅くするだけでは発振できないことも解析により示した。KaiC は発現すると速やかにホモ六量体を形成しており、多様なリン酸化状態や立体構造を取ると推測されている。本研究により、KaiC の多様な状態間の機能的差違と、その振動制御における重要性が明らかになった。

論文の審査結果の要旨

昼夜の変化に適応するため、生理状態を24時間周期で変化させる”時計”、いわゆる概日リズムは、多くの生物において確認されている。概日リズムの本体は、時計遺伝子産物の量的な振動、あるいは状態の振動と捉えることができる。これら時計遺伝子の発振機構の理解に、数理解的研究はこれまで大きな役割を果たしてきた。特に転写における負のフィードバックを原理とする理解は、その後の分子遺伝学的解析により、普遍的な時計振動メカニズムとして位置づけられてきた。

一方で、概日リズムが知られている唯一の原核生物であるシアノバクテリアでは、他の既知の概日モデル生物と異なり、核といった細胞構造や、細胞周期に依存せずに、概日リズムが現れる。シアノバクテリアの概日振動体は、自己キナーゼ活性を有するKaiCと、そのレベルを調節するKaiA、KaiBから成る。KaiCは自己の転写制御に関与し、これにより転写・翻訳を介した概日振動が生じると考えられる。転写の振動はバクテリアゲノム全体に及ぶことが知られており、これにより生理的な24時間振動が作り出されると考えられる。一方でKaiCリン酸化の概日振動は、転写が無くとも生体内で継続しており、また試験管内で3つのKaiタンパク質とATPを混ぜることで再現された。本研究では(1)転写制御による振動(2)転写非依存のKaiCリン酸化振動について、それぞれ数理モデルを用いて解析し、これら現象の本質となるメカニズムの予測を行った。

(1) 実験事実に基づき、非リン酸化KaiCとリン酸化KaiCのそれぞれが、転写を正か負に制御すると仮定し、制御のあらゆる組み合わせを表現できる数理モデルを設定した。数理解析の結果、振動が起きるには(i)リン酸化速度が速く、リン酸化KaiCが転写を促進する場合、(ii)リン酸化速度が遅く、リン酸化KaiCが転写を抑制する場合の2通りだけが可能と分かった。シミュレーションの結果、(i)では*kai*遺伝子の変異株等で観察される転写活性の変化をよく再現できた。このモデルは、転写における負のフィードバックは含まない一方で、KaiBによるリン酸化への負のフィードバックを含み、既知の時計分子振動機構と異なる。リン酸化速度の振幅が高いうえ、KaiC濃度の変化にロバストであり、生体内のメカニズムを表現している可能性が高い。(ii)では実験結果を再現できなかった。以上から、KaiCは非リン酸化状態のままでは転写を抑制し、リン酸化されると転写を促進することが理論的に予測された。

(2) 転写制御に依らない KaiC リン酸化発振メカニズムについて、生体内で見られる Kai タンパク質間相互作用の周期的変化に着目した。観察される複合体形成過程をそのまま取り込んだ基本モデルは、シミュレーションにより、振動しないことが分かった。そこで状態遷移とフィードバック制御を一般的に解析するために、分子が全体の量を保ったまま、複数の状態を順番に遷移する力学モデルを解析した。このような閉鎖系で、各状態の濃度が振動するには、遷移反応へのフィードバックが必要であると証明できた。さらに、フィードバックを受ける反応と与える因子は、一定の状態数以上離れている必要があることを明らかにした。この知見を基に、改良版モデルによって KaiC のリン酸化振動を解析した。その結果、振動するために

は、KaiCは初期のリン酸化の後、KaiAとの複合体を形成する前に、未知の別の状態を経ている必要があることが分かった。KaiC六量体は多様なリン酸化状態や立体構造を取ると推測されている。本研究により、多様な状態間の機能的差違と、振動制御におけるその重要性が予測された。

以上の諸成果は、シアノバクテリア概日リズムの理解に大きく貢献していると考えられる。また、得られた数理的結論は、他の様々な生化学的振動現象に応用できる可能性も高い。よって、申請者の論文は学位論文として十分ふさわしいものである、と審査委員会一致で判断した。