

シアノバクテリアの概日時計タンパク質 KaiC が 1 日を計る仕組み

伊藤（三輪） 久美子[✉]

名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻 計時機構グループ

シアノバクテリア (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) の概日時計タンパク質 KaiC、KaiA、KaiB と ATP を試験管内で混ぜるだけで、そのリン酸化状態は概日リズムを示す。主役の KaiC は典型的な ATP 加水分解酵素 (ATPase) の構造をとる。KaiC の ATPase 活性は極めて低いが、単独で温度補償性を示し、概日リズムの速度 (振動数) と相関することから、ペースメーカーとして概日リズムの温度補償性と周期を規定すると考えられる。この活性を基盤とした Kai の時計システムは、これまで想定されてきた転写・翻訳や分子同士の相互作用等を必要としない、全く新規の概日時計機構の存在を示している。本稿では KaiC の ATPase 活性の解析から我々 (名古屋大学 近藤孝男研究グループ) が想定した、シアノバクテリアの概日時計システムについて解説する。

1. はじめに

多くの生物は概日時計を持つことによって、地球の昼夜環境に適応し、たくみに生活することができる。概日時計は時計として不可欠な 3 つの条件 (約 24 時間周期、周期の温度補償性、環境への同調性) を満たすことで地球上での生活に有利となり、長い進化の過程で広く生命の基本システムとして発展してきた¹。従ってその本質を理解するためには、安定した振動のシナリオだけでは不十分で、これら 3 つの特徴を裏付けている物質的基礎を説明しなければならない。生命の進化の初期過程で水を分解する光合成とそれに伴

う酸素発生能を獲得し、さらに植物の葉緑体へ進化したとされるシアノバクテリアは、明確な概日リズムを示し、概日時計解明のための重要なモデルでもある。本稿では当研究室で展開されたシアノバクテリアの時計システムの研究、特に周期決定および温度補償性の仕組みについて解説し、タンパク質のみで構成される新たな概日時計のモデルを提案する。

2. シアノバクテリアの時計システム

シアノバクテリアの概日時計遺伝子 *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* (*kai* は回の意) は、1996 年頃に生物発光を利

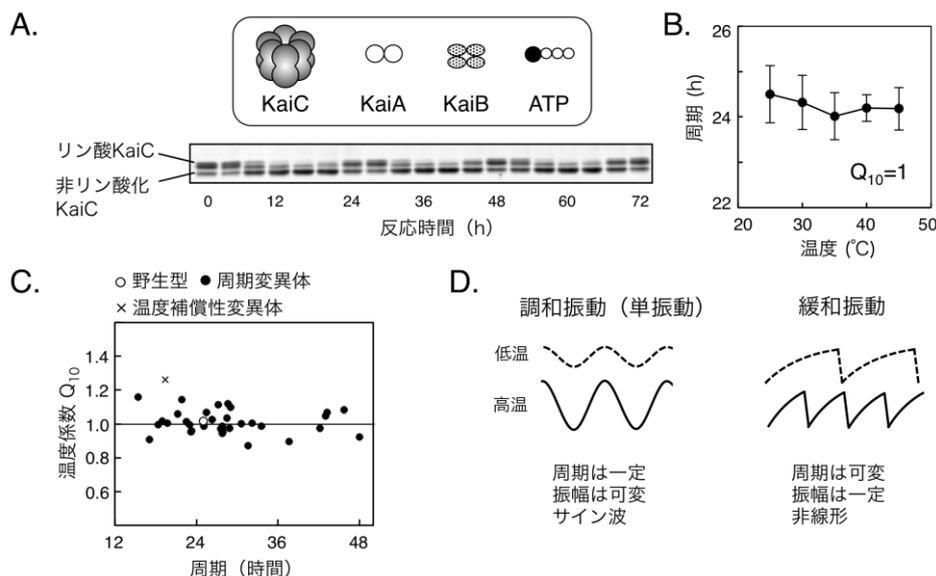


図1 シアノバクテリアの概日振動の特性

✉ miwa@bio.nagoya-u.ac.jp

用した分子遺伝学的解析によって見出された²。 *kaiC* 遺伝子の発現が自己制御されることから、当初は真核生物と同様に転写・翻訳フィードバックモデルが当てはまると考えられていた。しかし 2005 年に 3 つの精製された Kai タンパク質と ATP を試験管内で混ぜるだけで、KaiC のリン酸化状態が安定した 24 時間振動を発生すること (KaiC リン酸化リズム) が明らかになり、転写・翻訳によらない計時機構が存在することが示された (図 1A)³。この KaiC リン酸化リズムは幅広い温度で周期の温度補償性を示し、温度サイクルに同調するなど、概日時計の 3 つの条件を満たす (図 1B)^{3,5}。我々は、わずか 3 つのタンパク質で高等生物の概日時計に匹敵する特性を示すこの単純な計時機構は、概日時計の謎を解明するために最も適したシステムであると考え、そのメカニズムの解析を進めてきた。

3. 周期の温度補償性からみた概日時計の特性

生体におけるほとんどの生化学反応の速度は温度に依存して変化し、温度が 10°C 上がるとその速度は 2-3 倍になる (温度係数 $Q_{10}=2-3$ 、 Q_{10} は反応温度を 10°C あげたとき、反応速度が何倍になるかを表す)⁶。概日時計は季節変化などによる外界温度の違いがあっても、周期の温度補償性という特別な仕組みにより、一定の周期を保つ。我々は 30 種以上の *kaiC* 周期変異体の温度補償性を調べたが、幅広い周期の変異体で温度補償性は成立した (図 1C)。突然変異で周期が変わっても温度補償性は普遍的に成立するという事実は、周期の温度補償性が周期の決定機構より基本的な性質として備わっていることを示唆している。

概日時計研究のパイオニア、E. Bünning は概日リズムの特徴を検討し、概日リズムは調和振動 (単振動) と緩和振動の 2 つの性質を併せ持つことを示唆した (図 1D)⁷。調和振動はバネや振り子の振動に代表され、フックの法則に従う物理的振動で振動の持続にエネルギーを消費しない。振幅は振動系に与えられたエネルギーによって容易に変わるが、周期はフックの法則の物理的定数 (振り子の長さやバネの強さ) により決定され、振幅に依存しない (振り子の等時性)。一方、緩和振動は、細胞内で想定すれば、プログラムされた生化学反応のループ (反応が蓄積することで順次スイッチングが起こり、次のステップに進行する) で説明される。従って速度は生化学反応が律速となり、周期は温度によって反応速度が変われば容易に変わるが、振幅はスイッチングの閾値で決定され不変である。周期の温度補償性は概日リズムの基礎機構が調和

振動の性質を持つことを示唆する一方で、リズムの持続性は緩和振動として説明が容易である。実際に、KaiC リン酸化リズムの反応温度低下に伴う振幅の低下、さらに低温にすることによる振動の消失の観測等によって、このリズムの調和振動的な性質が示唆されている⁸。

ガリレオが発見したこの調和振動 (振り子) の等時性は、ホイヘンスやフックによって機械式時計のペースメーカーに組み込まれ、その精度を飛躍的に向上させた。概日時計の周期も正確で、いくつかの生物では 1 日に数分から 10 分程度の揺らぎでリズムを刻むことが知られている^{1,9}。我々の解析でも KaiC のリン酸化リズムの周期も同程度の精度を持つことが確認された。概日時計の精度は地球の自転という極めて精度の高い周期に対応するために重要だが、調和振動を利用することでこれが可能になるのかもしれない。

4. KaiC の ATPase 活性と分子内フィードバック

Kai タンパク質が刻む概日リズムは、どのようにして温度の影響を受けない周期性を示すことができるのだろうか? その答えは KaiC が ATP を分解する活性 (ATPase 活性) の中に書き込まれているようだ^{10,11}。KaiC のアミノ酸配列は RecA などの ATP 加水分解酵素 (ATPase) に類似している¹²。しかしその ATP 分解活性はほとんどゼロとっていいほど低く、1 分子の KaiC は 1 日あたりわずか 10 から 15 個の ATP を分解するのみ (多くの酵素活性の 1 万分の 1 以下) である¹⁰。しかし、KaiC の ATPase 活性は広い範囲の温度で安定で、温度補償性を示す (図 2A)。さらに周期変異体の KaiC タンパク質の ATPase 活性を調べると、短周期の KaiC では ATPase 活性が高く、長周期の KaiC では ATPase 活性が低くなり、ATPase 活性と振動数 (周期の逆数) との間に比例関係が見られる (図 2B)。この 2 つの結果は温度補償性と周期という概日時計のもっとも重要な特徴を KaiC の ATPase 反応が規定していることを意味しており、この反応が概日時計の最も基本的なペースメーカーであることを予期させる。

KaiC の ATPase 活性が示すこの 2 つの性質は KaiC だけで実現される。この事実は KaiC 内部に概日時計のペースメーカーとしての本質的な仕組みが内蔵されていることを意味する。一方で、KaiC だけではリン酸化リズムをはじめ、いかなる概日振動も発生しないことに注意されたい。すなわち概日周期とその温度補償性は概日振動が発生して測定されるのではなく、振動していない KaiC タンパク質の構造内に

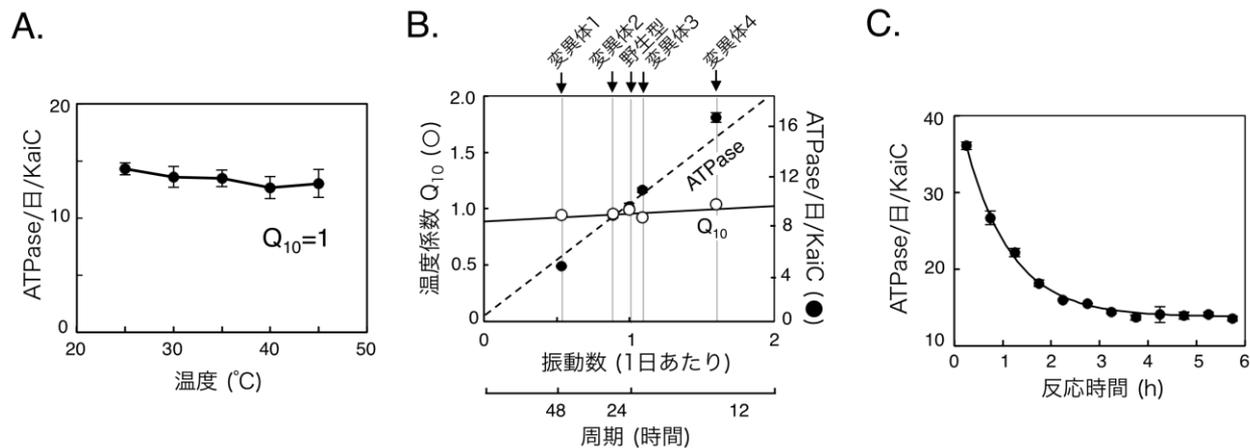


図2 KaiC ATPase 活性の特性

A. 温度補償性。野生型の KaiC の ATPase 活性を、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) を用いて様々な温度で測定した^{5,10}。KaiC のみで ATPase 活性は温度補償性を示した。B. 振動数との相関。野生型と 4 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。ATPase 活性 (黒丸) は振動数と相関を示した¹⁰。全ての変異体の ATPase 活性の Q_{10} (白丸) はほぼ 1 となり、温度補償性を示した (投稿準備中)。C. 温度ステップに対する応答 (投稿準備中)。野生型の KaiC を氷温から 30°C に移し、ATPase 活性の時間変動を調べた。ATPase 活性は温度ステップ直後に安定時の活性の 2 倍以上に上昇し、緩やかに減少して安定な活性を保った。

潜在的に記憶されていることになる。この一見受け入れがたい事実は、止まってしまった振り子が地上の重力のもとで調和振動を発生した時の振動周期を振り子の長さとして記憶していることと全く同じ関係になっており、KaiC は単独で振り子の性質を潜在的にもっていることを強く示唆している。

どのようにしてそのようなことが可能であろうか？我々は可能性の 1 つとして分子内フィードバックを想定している。通常の 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、様々な物理的または化学的仕事がなされるとともに次の ATP 分解が繰り返されるが、KaiC の場合にはこのエネルギーは同一の KaiC 分子内に蓄積され、タンパク質内部構造にバネの復元力のような緊張状態 (テンション) を生成し、自身の ATPase 活性を強く抑えるのではないだろうか。KaiC 分子内に蓄積したエネルギーは、時間とともに分子外へと放出される (もれる) と考えられる。そのエネルギーのもれが緊張状態に比例すると想定すれば、ATP 分解によるエネルギーの生産とエネルギーのもれが一致するところで平衡し、以後安定な緊張状態を維持できると考えられる。生命で見られる多くのフィードバックが複数のタンパク質による化学反応のループで成立するのに対し、これは単一のタンパク質の内部で起こる”分子内フィードバック”である。その実体は分子内に生じる歪みのような、KaiC の機械的特性による自動制御と想定できる。温度に大きく依存する化学反応と異なり、分子構造に由来する機械的特性は温度に影響されにくいと予想され、分子内フィードバックによる平

衡状態も温度の影響が小さいことが予想される。つまり、この KaiC 分子内でのフィードバック系で KaiC リン酸化リズムの周期の温度補償性が実現されるだろう。

KaiC の内部にこのような仕組みがあるとすれば、外部からの刺激によって緊張状態を乱せば、ATPase 活性が変化し、活性が元に戻る様子を観察できるだろう。KaiC リン酸化リズムは温度サイクルに同調することから、我々は温度変化が KaiC の緊張状態を乱す刺激になりうると考えた。そこで図 2C に示すように氷温から 30°C へ温度ステップを行なったときの KaiC の ATPase 活性を測定したところ、温度ステップ直後の活性は安定時の活性の 2 倍以上に上昇し、緩やかに減少して一定の活性を保った (図 2C)。この結果は、温度上昇で KaiC の緊張状態が一度緩み、その後平衡状態を生じさせる緊張状態に戻ったとみなすことが可能だろう。さらに周期変異体の KaiC タンパク質を用いて調べると短周期ほど速く活性が低下し、長周期ほど緩やかに活性が下がった。KaiC 変異体の周期が長くなるほどその ATP 分解活性が低いことから、KaiC 変異体間に見られる平衡状態へ移行するまでの時間の違いは、我々が想定した ATP 分解に起因する緊張状態の程度の差として表れたと解釈することが可能となる。つまり、KaiC の ATP 分解で発生したエネルギーは温度変化がもたらす活性の変動を打ち消し、安定した緊張状態で平衡する。だとすれば緊張状態としての KaiC の「バネ」の強さは概日振動の速さを規定することが可能だろう。物理的なバネの単振動ではバネが強くなれば周期が短くなるが、同

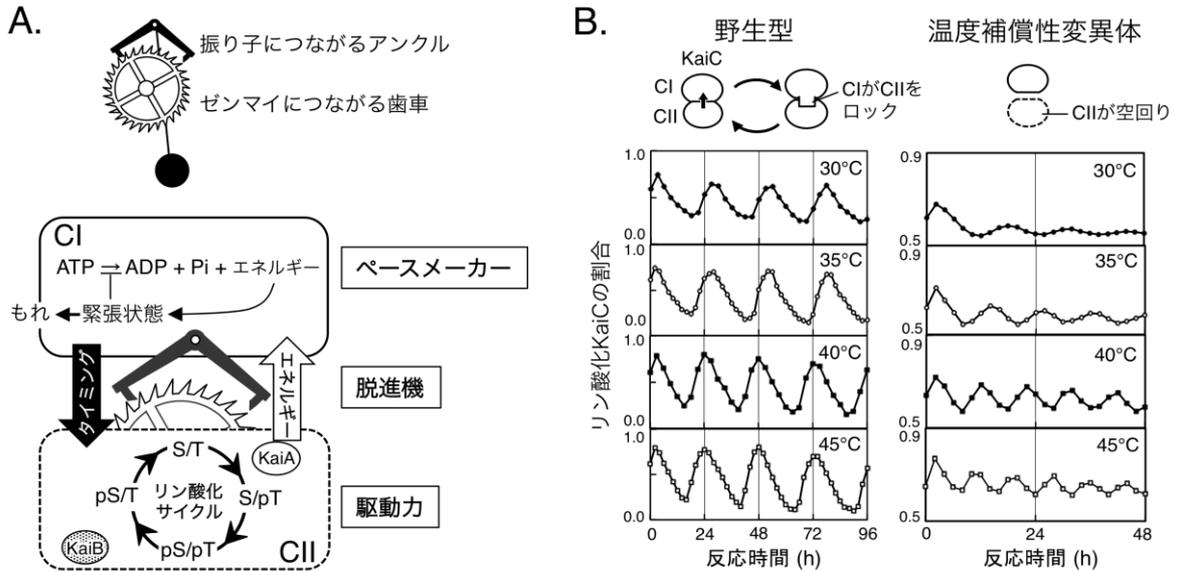


図3 KaiCの時計モデル

A. CI と CII の相互作用モデル。CI の ATPase は調和振動の性質を持つペースメーカー、CII のリン酸化サイクルは振動の駆動力として機能する。CI の ATP 分解によるエネルギーは分子内フィードバックによって緊張状態を生成する。CI の緊張状態は、CII のリン酸化サイクルのタイミングを制御し、CII は CI に振動を持続するエネルギーを与えることによって安定な概日時計を構成する。この仕組みは機械式振り子時計の脱進機 (図4) を想定させ、CI を振り子、CII をゼンマイと見立てることができる。B. 野生型と温度補償性変異体のリン酸化リズム (投稿準備中)。30 から 45°C のリン酸化リズムを示した。野生型では KaiC の 2 つのドメイン (CI と CII) が時間依存的に相互作用するが、温度補償性変異体では相互作用が異常になったために CII が本来持つ温度依存性性質が表れたと考えられる。

様のことが KaiC でも起こっているのではないかな。なお KaiC の緊張状態を示唆する構造変化の可能性が、結晶構造解析により報告されている¹¹。

5. KaiC の 2 つの ATPase ドメイン間の相互作用による安定した概日振動

バネや振り子の調和振動のもつエネルギーは保存量であるが、実際には摩擦などにより失われ、振動はいずれ減衰する。調和振動が安定な振幅を維持する自励振動を生成するには外力を供給する必要がある。KaiC の場合も同様で、KaiC だけでは振動は発生せず、ここに KaiA と KaiB を加えると ATPase 活性とリン酸化状態が安定な概日リズムを発生する。Kai の時計システムが安定なリズムを示すために、KaiC が 2 つの ATPase が重複したドメイン (CI と CII) から構成され、KaiA と KaiB の補助によって 2 つのドメインが互いに相互作用することが重要だと我々は考えている (図 3A)。KaiC の 2 つの ATPase ドメイン、CI と CII のうち、CI は全体の ATPase 活性の半分以上を担い、調和振動の性質を持つペースメーカーとして機能し、CII の ATP 活性はリン酸化サイクル (KaiC の自己リン酸化および自己脱リン酸化) を駆動する^{10,13}。この CII のリン酸化サイクルは複数の化学反応から構成されるループからなるため¹⁴⁻¹⁶、周期が温度に依

存する緩和振動の特性を持つことが考えられるが、CI がペースメーカーとして CII の活性 (自己リン酸化および自己脱リン酸化) のタイミングを制御することによって、リン酸化サイクルの周期は CI の調和振動と同じものになり温度補償性を獲得するのかもしれない。

一方、CI の調和振動は CII のリン酸化サイクルによって生じる CII の「動き」から、その調和振動を持続させるエネルギーを得るのではないだろうか。CII は CI の調和振動と同じ周期になっているので、ごく僅かなエネルギー供給でも繰り返し起こることで共鳴し、安定した振動が持続できるだろう。これまでの研究から KaiA は CII に結合して CII の ATPase 活性を上昇させることで KaiC の自己リン酸化を促進すること¹⁷⁻¹⁹、KaiB は CI に結合して KaiA の機能を阻害することで KaiC を自己脱リン酸化に転じさせること^{14,20} が分かっている。調和振動 (CI) と緩和振動 (CII) の相反する性質をもつ 2 つの振動が、1 つの KaiC 分子内で相互作用し、安定な自励振動を生じると考えられる。こうしたデザインで安定した調和振動が可能なのは自然界にも工学の分野でも多くの例を見出すことができる (7 節)。

6. 温度補償性変異体のスクリーニング

前節で KaiC の機能が 2 つの ATPase による機能的分業で行われることを提案した。この分業は 2 つのドメインの機械的カップリングで実現されていると考えられるが、その動きはタンパク質内部構造の微細な動きによるものと考えられ、直接示すことは容易ではない。今後の構造生物学的な解析が期待されるところだが、現時点でこの可能性を検討するため、図 1 に示した KaiC の周期変異体の温度補償性を再検討した。先にも述べたようにほとんどの場合、周期が変化しても温度補償性は維持されるが、例外的に温度補償性が弱くなった変異体 (シアノバクテリアの発光リズムが高温下で短周期になる) が見出された (図 1C)。変異体のリン酸化リズムも高温で周期が短くなり、45°C ではわずか 8 時間の超短周期になる (図 3B)。一方、変異体の ATPase 活性も温度依存的に高温で上昇したが、これは CI ではなく、CII の ATPase 活性上昇によるものであった。このことから、この変異体は CI による CII の制御が効かなくなった変異体であり、CII 本来の温度依存 (緩和振動であるため) な性質が表れたと考えられる。またこの変異体の周期 (8-10 時間) が野生型の概日周期よりはるかに短いことは重要である。CI が自身の周期より短い周期である CII の振動を制御することは、CII の反応を停止させるなどの単純な仕組みで可能であるが、周期の長い CII の反応を加速することは容易ではないことに注意されたい。

KaiC の ATPase 活性とリン酸化活性のリズムを調べると、変異体の両活性はリン酸化位相では野生型と変わらなかったが、脱リン酸化位相では野生型と比べて高かった。つまり、この変異体 KaiC における CI

による CII の制御の異常が脱リン酸化位相で顕著に生じていることが示唆される。周期の温度補償性をもたらす CI と CII の相互作用は普通の歯車のように常時かみ合っている静的でリジットな結合ではなく、時間 (位相) 限定的であり、作用にも方向性が必要なのだろう。

7. 機械式時計のデザインと概日時計のデザイン

3 節で述べたように、物体に平衡状態からのずれが生じたとき、ずれに比例した復元力が生じればフックの法則が成立するので、調和振動が発生する。この振動の周期は振幅が変わっても変化せず、振動エネルギーは保存される。この振動は多数の分子の統計的振る舞いに基づく化学反応ではなく、フックの法則に規定されたマクロな物体の物理的な運動であり温度の影響もほとんど受けない。したがって Bünning が指摘したように周期の温度補償性を特徴とする概日振動の基礎として重要である。なお、細胞内の運動や構造維持に関与する多くの ATPase は、力学的トルクを発生することができる。従って KaiC ATPase の高次構造内に、物理学的メカニズムに基づいた調和振動を起こすカラクリが潜んでいることは十分考えられることであろう。

一方、概日時計のもう 1 つの重要な特徴は振動が持続することである。生命現象にこの持続性を説明する仕組みを探した時、まず候補になるのは緩和振動であり、実際に細胞内の様々な周期の振動がこのモデルで説明できる。概日時計のモデルとして考えられている転写・翻訳のフィードバックモデルも緩和振動のモデルである。我々は当初シアノバクテリアでもこれが成り立つと考えたが、周期の温度補償性の説明がどうし

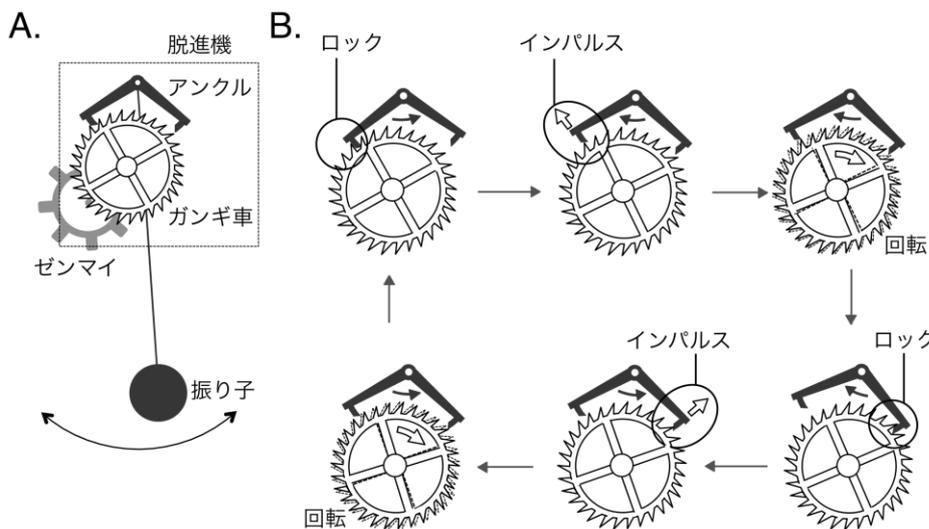


図 4 機械式振り子時計の脱進機

A. 脱進機。振り子に連動する「アンクル」と、ゼンマイによって駆動する「歯車 (ギンギ車)」とで構成される。B. 脱進機の動き。ゼンマイの動力で回転し続けようとするギンギ車の動きを、振り子の調和振動と連動するアンクルの 2 つの爪が止めたり (ロック)、外したりすることで、ギンギ車は一定の間隔で回転する。一方でギンギ車の回転は、振り子にその振動を持続するためのエネルギー (インパルス) を与える。

でも困難であった。そこで安定して持続する調和振動を考えた時、17世紀に発明された機械式の振り子時計は大変良いモデルであった。振り子時計は等時性を持つ振り子と、ゼンマイの動力による歯車の回転が、脱進機と呼ばれる装置で組み合わされる(図4)。脱進機は振り子につながったアングルと呼ばれる爪と、ゼンマイにより駆動されるガンギ車と呼ばれる特殊なかたちの歯車から構成される。ガンギ車の回転速度は振り子により制御され高い時間精度を得るとともに、歯車の形状によりゼンマイのエネルギーが振り子に一時的に与えられ(インパルス)、振り子は持続性を獲得する。脱進機は通常の歯車のように常時かみあっているのではなく、位相限定的に方向性をもった作用をするように設計され、2つの振動の長所を併せ持つ振動を可能にしている。

こうした振動は自励振動とよばれるが、時計以外にも安定した周期を必要とする多くの装置や物理現象(管楽器、弦楽器、電氣的発振器など)で知られており、いずれも振動の周期を規定する調和振動(それぞれ周波数を規定する弦、管内の空気柱の弾性、コンデンサーとコイルによる時定数回路が相当する)とそれを増幅、安定化する振動体(振幅を持続させる弓、息による空気の流れ、真空管やトランジスタによる増幅器が相当する)の組み合わせで構成されている。

このデザインを KaiC 分子内に想定すると、CI の ATPase 活性を振り子、CII のリン酸化サイクルをゼンマイにあてはめることができる(図3A)。CI の ATP 分解によるエネルギーは KaiC 分子内に蓄積し、これが引き起こす分子内緊張がバネとして機能して、調和振動を発生させる潜在性を獲得し、ペースメーカーとして機能する。一方 CII のリン酸化サイクルは KaiA と KaiB の作用で回転力を獲得し、本来は温度依存的に回転する振動体として機能する。この2つの過程が KaiC 分子内に構成された脱進機でかみ合うことで、温度の影響を受けない周期と安定した振幅をもつリン酸化サイクルが生成する。以上が、我々が想定しているシアノバクテリアの計時機構の設計原理である。

8. おわりに

シアノバクテリアは約30億年前から地球に生息していると考えられている。昔の地球のような過酷な環境下でも安定な時を刻むために、シアノバクテリアは外部環境の乱れに対して安定な周期を保つことができる調和振動性の時計を持つようになったのかもしれない。さらに KaiC は1つのタンパク質に2つの ATPase ドメイン(CI と CII)を持ち、それぞれに

ATPase 活性とリン酸化リズムという異なる機能を分担させることで、CI の「バネ」が振動を持続することを可能にした。今後、KaiC の CI と CII それぞれの生化学的活性と原子レベルの構造を明らかにすることによって、「バネ」を実現する分子内フィードバック、駆動力を供給し細胞内を制御するリン酸化サイクル、そして「脱進機」として機能する CI と CII の分子内カップリングの仕組みを具体化することができるだろう。なお真核生物に KaiC のホモログは存在しないが、ATPase は生命の最も基本的酵素であるので、KaiC のような機能をもつ ATPase が潜んでいることを否定するのは時期早尚であろう²¹。KaiC タンパク質に潜む「バネ」と「脱進機」の実体は、機械式振り子時計の発明よりはるか昔に生命が獲得したからくりであることは明らかなのだから。

謝辞

この解説は我々が名古屋大学大学院理学研究科で、2010年ごろから行ってきた KaiC の ATPase 機能に基づく概日リズム発生機構の研究をまとめたものであり、本研究をまとめた成果は現在投稿準備中である。この研究は CREST (シアノバクテリアの概日システム、2007-2012)、科研費特別推進研究(24000016 シアノバクテリアの時計タンパク質による概日時間の生成機構、2012-2017)、基盤研究 A(KaiC 概日時計の動作プログラム: 2つの ATPase の協働の生理・生化学的解析、2017-2019)(いずれも代表近藤孝男)の支援で実施された。一連の解析で重要な貢献をされた岡野(今井)圭子博士(関西医科大学)、村山依子博士(九州大学)、高井直樹博士(横浜市立大学)、村中智明博士(京都大学)、この間研究を指導していただいた近藤孝男博士に深く感謝いたします。

参考文献

1. Dunlap, J. C., Loros, J. J. & DeCoursey, P. J. *Chronobiology: Biological Timekeeping*. (Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2004).
2. Ishiura, M. *et al.* Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**, 1519-1523 (1998).
3. Nakajima, M. *et al.* Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* **308**, 414-415 (2005).
4. Yoshida, T., Murayama, Y., Ito, H., Kageyama,

- H. & Kondo, T. Nonparametric entrainment of the in vitro circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial KaiC by temperature cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **106**, 1648–1653 (2009).
5. Murayama, Y. *et al.* Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution. *EMBO J.* **30**, 68-78 (2011).
 6. Giese, A. C. *Cell physiology.* (Maruzen, 1965).
 7. Bünning, E. *The physiological clock.* (Springer-Verlag, 1967).
 8. Murayama, Y., Kori, H., Oshima, C., Kondo, T., Iwasaki, H. & Ito, H. Low temperature nullifies the circadian clock in cyanobacteria through Hopf bifurcation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **114**, 5641–5646 (2017).
 9. Njus, D., Gooch, V. D. & Hastings, J. W. Precision of the *Gonyaulax* circadian clock. *Cell Biophys.* **3**, 223-231 (1981).
 10. Terauchi, K. *et al.* ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **104**, 16377–16381 (2007).
 11. Abe, J. *et al.* Atomic-scale origins of slowness in the cyanobacterial circadian clock. *Science* **349**, 312-316 (2015).
 12. Leipe, D. D., Aravind, L., Grishin, N. V. & Koonin, E. V. The Bacterial replicative helicase DnaB evolved from a RecA duplication. *Genome Res.* **10**, 5-16 (2000).
 13. Nishiwaki, T. *et al.* Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **101**, 13927–13932 (2004).
 14. Kitayama, Y., Iwasaki, H., Nishiwaki, T. & Kondo, T. KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J.* **22**, 2127–2134 (2003).
 15. Xu, Y., Mori, T. & Johnson, C. H. Cyanobacterial circadian clockwork: roles of KaiA, KaiB and the *kaiBC* promoter in regulating KaiC. *EMBO J.* **22**, 2117–2126 (2003).
 16. Nishiwaki, T. *et al.* A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J.* **26**, 4029–4037 (2007).
 17. Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M. & Kondo, T. KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **99**, 15788–15793 (2002).
 18. Kim, Y. I., Dong, G., Carruthers, C. W. Jr., Golden, S. S. & LiWang, A. The day/night switch in KaiC, a central oscillator component of the circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **105**, 12825–12830 (2008).
 19. Nishiwaki-Ohkawa, T., Kitayama, Y., Ochiai, E. & Kondo, T. Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **111**, 4455-4460 (2014).
 20. Tseng, R. *et al.* Structural basis of the day-night transition in a bacterial circadian clock. *Science* **355**, 1174-1180 (2017).
 21. Edgar, R. S. *et al.* Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* **485**, 459–464 (2012).