

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14185

研究課題名（和文）時計タンパク質における時空間階層運動の協奏が創る機能発現機構の理論的解明

研究課題名（英文）Theoretical study of clock proteins focusing on cooperation of spatio-temporal dynamics

研究代表者

甲田 信一（Koda, Shin-ichi）

分子科学研究所・理論・計算分子科学研究領域・助教

研究者番号：10790404

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題ではシアノバクテリアの体内時計の中核を構成する時計タンパク質KaiABC振動子の動作原理に関し理論研究を行った。特に、KaiB-KaiC複合体形成に焦点を絞り、その詳細な進行過程を理論的に提案した。本研究では既報の実験データを詳細に検討することで、見過ごされた重要な事実を理論的/数値的に立証した。例えば2020年にはKaiB-KaiC複合体形成速度の遅さの起源に関し、従来の説とは異なりKaiC側に遅さの起源が存在することを示した。また最終年度には、KaiB-KaiC複合体形成とKaiCのATP加水分解の協同関係の詳細を理論的見地から新たに提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計は多くの生物が備える機能であり、その原理の解明は重要である。特にシアノバクテリアの体内時計はわずか3種のタンパク質から構成されており、時計の原理を分子レベルで理解するために格好のモデルである。本研究は振動子の発振において中枢的な役割を担うKaiB-KaiC複合体形成の機構を素過程レベルで明らかにした。これは振動子の分子レベルの動作原理の更なる理解につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we conducted theoretical research on the clock proteins, KaiA, KaiB, and, KaiC, which constitute the core oscillator of the cyanobacterial biological clock. In particular, we focused on the KaiB-KaiC complex formation and theoretically proposed its detailed process. In this study, we theoretically and numerically established important overlooked mechanisms through a detailed review of previously published experimental data. For example, in 2020, we showed that the origin of the slowness of the KaiB-KaiC complex formation is on the KaiC side, contrary to the previous account. In the final year, we proposed a new mechanism of the cooperation between KaiB-KaiC complex formation and KaiC ATP hydrolysis from a theoretical viewpoint.

研究分野：理論化学

キーワード：体内時計 シアノバクテリア 時計タンパク質 数理モデル 概日リズム

### 1. 研究開始当初の背景

生体内では、化学反応など生体分子間の局所的かつ速い過程がトリガーとなり、幅広い時空間階層をもった運動が協奏し大域的な生体機能に昇華される。したがって、生体现象を分子科学の立場から理解していくためには、「個々の過程の精緻な理解」と「時空間階層運動の協奏の理解」、この両者が本質的に不可欠である。

この点、シアノバクテリアの時計タンパク質 (KaiA, KaiB, KaiC) は格好の研究対象である。と言うのも、この体内時計はわずかに3種のタンパク質とATPを混合するだけで、安定した環境である試験管の中で容易に再構成できるからである。また、この系は構成要素こそ簡潔ではあるが、多くの運動の時空間階層が協奏している。ここではKaiC (二重リング構造の六量体) のいくつかのアミノ酸残基のリン酸化状態が周期変動するが、KaiCはピコ秒程度で進むATP加水分解 (図1a) のエネルギーを使い構造変化 (図1b) することでKaiA (リン酸化促進)・KaiB (抑制) との複合体形成 (図1c) を制御し、リン酸化状態の24時間周期の変動 (図1d) を実現させている。したがって、本研究ではシアノバクテリアの体内時計を研究対象とし、その系で生じる様々な時空間階層運動がいかに協奏し機能を発現させるか理論的に解明することにした。

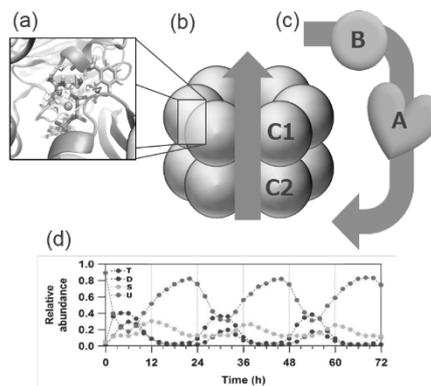


図1：時計タンパク質の運動の時空間階層。(a)ATP加水分解、(b)KaiCの構造変化、(c)KaiA, KaiBの離散集合、(d)リン酸化振動

### 2. 研究の目的

この系ではこれまで多くの研究が行われてきたが、個々の過程の詳細、そして機能発現機構のどちらにも未解明の点が多く残されている。例えば、KaiCのC1リング中で生じるATP加水分解 (図1a) の頻度は約10回/日であり、種々のモータータンパク質 (10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>回/日) と比べると極めて低い。この加水分解活性は、小さいにもかかわらず遠く離れたC2リングのリン酸化反応の周期を制御するという重要な役割を持つ。しかし、活性の低さの原因に加え、その体内時計制御機構の詳細は研究開始当初は明らかではなかった。そこで本研究では、ATP加水分解および付随して生じる過程に的を絞り、一連の階層的運動が時計を駆動させる機構を“微視的過程の積み重ね”として理解することを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究ではC1リングのATP加水分解と密接に関係し、KaiABC振動子のフィードバックループ構成において中枢的役割を担うKaiB-KaiC複合体形成に着目した。本研究では、既報の実験結果 (定性的事実) を基にした「精密な数理 (反応) モデリング」および既報の実験データ (定量的事実) を基にした「モデルパラメタのベイズ推定」を組み合わせることで、これまで見過ごされてきたKaiB-KaiC複合体形成の分子機構を発見する。

「精密な数理モデリング」とは、系の素過程/素反応を近似や抽象化を加えることなくそのまま組み合わせることで詳細な反応ネットワークを構成することである。ここでは、既知の素過程は極力採用する。また、既知の過程だけでは不足する部分は仮説的な過程を提案する。これらの素過程を組み合わせる際は既知の実験事実をできるだけ多く再現できるようにする。以上のような精密モデリングは、普遍性追求のために抽象化を指向する数理生物学的研究とは対照的である。しかし、現実系が実際に従っている動作機構を明らかにするためには、本研究のような精密モデリングが有用であると考えられる。

「モデルパラメタのベイズ推定」とは既知の実験データを再現するようなモデルのパラメタ、ここでは素過程の反応速度定数や平衡定数を推定することである。ベイズ推定の利点としては、尤もらしいパラメタ値の分布が得られることである。これにより、得られたパラメタの分布を用いて定量的に系の動作原理を議論することが可能となる。

## 4. 研究成果

### (1) KaiB-KaiC 複合体形成の遅さの起源の解明 (Koda & Saito, Sci. Rep. (2020))

KaiB-KaiC 複合体はその形成に数時間かかる遅い過程である。一般に遅い過程は時計の周期決定に大きな影響を及ぼすため、その遅さの起源を理解することは重要である。KaiB と KaiC はどちらも複合体形成の前に結合不能な構造から可能な構造へ構造変化する必要があることが知られている。時計の周期がタンパク質濃度に拠らないことから、高次反応である結合可能な KaiB と KaiC の結合自体は速やかに進むと考えられる。よって律速は KaiB もしくは KaiC の結合前構造変化である。

問題はどちらが律速かである。これについて米国のグループは 2015 年に、特異な KaiB-KaiC 複合体形成の振る舞いを発見し、それを KaiB の構造変化が遅いと仮定し説明づけた (Science (2015))。一方、2018 年に分子科学研究所秋山グループおよび本課題代表者らは、KaiB-KaiC 複合体形成速度の KaiB 濃度依存性から、複合体形成の遅さは KaiC 側に由来することを示した (Sci. rep. (2018))。これにより、前者の特異な KaiB-KaiC 複合体形成の振る舞いのメカニズムは不明となった。

そこで本研究では、そのメカニズムを明らかにすべく、KaiB-KaiC 複合体形成の新たな反応モデルを提案した。リング状の六量体である KaiC 上には、やはりリング状に KaiB が 6 個結合することが知られているが、本研究では KaiB 間に親和的な相互作用が働き、KaiB の離脱速度が両隣に他の KaiB が存在するか否かに依存すると仮定した。そして、Science 誌報告の実験のような稀薄な KaiB 濃度において、その KaiB-KaiC 複合体形成の特異な振る舞いが出現することを理論的に説明することに成功した。この結果は Scientific Reports 誌で出版された。

本研究で提案した反応モデルは、例えば KaiB-KaiC 複合体形成に関する後続の実験研究 (JACS (2022)) においてデータ解析の主軸として用いられるなど、KaiB-KaiC 複合体形成の理解促進に一定のインパクトを与えている。

### (2) KaiB-KaiC 複合体形成速度と KaiC の多量体性の構造-機能相関の解明 (Koda & Saito, PLOS Comput. Biol. (2022))

KaiB-KaiC 複合体形成は KaiC がリン酸化されるほど加速することが知られている (Nat. Commun. (2020))。この現象は環境摂動 (例えば温度摂動) に対する周期の頑健性に密接な関係がある可能性がある。すなわち、KaiB-KaiC 複合体は KaiC のリン酸化振動を脱リン酸化方向に相を転換させる役目を持つが、摂動により過剰にリン酸化が生じた場合、KaiB-KaiC 複合体形成が加速することで、速やかに脱リン酸化に転じることが可能になるからである。したがって、この複合体形成加速のメカニズムを解明することは重要である。しかし、これまでに提案されていた反応モデルでは、KaiC がリン酸化されるほど複合体形成は減速してしまっていた。

本研究では、既存の反応モデルに不足していた要素を明らかにした上で、KaiB-KaiC 複合体形成の全貌を記述するモデルを新たに提案した。具体的には、KaiC の多量体性をあらわに考えること、KaiC の結合可能構造は KaiB 結合時に初めて安定化されること、KaiC の結合可能構造において ATP 加水分解で生じた ADP はリリースされにくくなることをモデルに新たに取り入れた。また、これにより KaiB-KaiC 複合体形成加速が説明できることを示した。

本研究は一方で、KaiB-KaiC 複合体形成の出版済み実験データを用い、モデル中の反応速度定数をベイズ推定の枠組みで推定した。これによると KaiC の結合可能構造からの ADP リリースおよびそれに誘導される KaiB の離脱は極めて遅いことが予想された。これは参照した KaiB-KaiC 複合体形成と比較してもかなり遅いものである。すなわち、これはベイズ推定により隠れた遅い現象を見つけ出したことに相当する。なお、本研究は PLOS Comput. Biol. 誌で出版されたが、この極めて遅い KaiB 離脱速度は本研究の後に発表された実験研究において実証された (Biophysics and Physicobiology (2022))。これは本研究で提案したモデルの妥当性を強く支持するものである。

本研究は KaiB-KaiC 複合体形成に関して、その前段である KaiC 中の ATP 加水分解および KaiB/KaiC の構造変化を含んだ統合的な反応モデルを提案した。本モデルはこれまで説明できなかった多くの現象を記述でき、その妥当性は高いものと考えられる。したがって、KaiABC 振動子の最重要部であるフィードバックループの機構、また、環境摂動に対する周期の頑健性の機構など、体内時計としての重要な機能を今後明らかにしていく上で、本モデルはその基盤となるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shin-ichi Koda, Shinji Saito	4. 巻 18
2. 論文標題 Multimeric structure enables the acceleration of KaiB-KaiC complex formation induced by ADP/ATP exchange inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1009243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pcbi.1009243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koda Shin-ichi, Saito Shinji	4. 巻 10
2. 論文標題 An alternative interpretation of the slow KaiB-KaiC binding of the cyanobacterial clock proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-67298-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 甲田信一、斉藤真司
2. 発表標題 時計タンパク質KaiCの一方向的アロステリに関する反応モデル構築に基づく考察
3. 学会等名 第21回理論化学討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------