

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19279

研究課題名（和文）月面閉鎖生態系の構築を目指した改変型シアノバクテリアの設計

研究課題名（英文）Active design of the Kai proteins on the basis of cross-scale causality

研究代表者

秋山 修志（Akiyama, Shuji）

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・教授

研究者番号：50391842

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：シアノバクテリアの概日時計は、3種類の時計タンパク質（KaiA、KaiB、KaiC）とATPを混合することで試験管内に再構成される。分子のスケールから細胞のスケールまでを繋ぐクロス・スケール性を基盤に、ATPase活性が著しく低下したKaiC変異体を設計することにより、時計の周期を概日から「概月の三分の一」まで長周期化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質分子のみから成る分子システムによって長周期リズムを実証することができれば、未だそのメカニズムが解明されていない概月リズムや概年リズムの理解深化はもとより、それらの設計原理にも指針を与え得る。

研究成果の概要（英文）：The cyanobacterial circadian clock system can be reconstituted in vitro by mixing three kinds of clock proteins (KaiA, KaiB, and KaiC) in the presence of ATP. Based on the cross-scale causality that connects the molecular scale to the cellular scale, the clock period was lengthened from circadian to "one-third of a month" by designing a KaiC mutant with an extensively reduced ATPase activity.

研究分野：生物物理学

キーワード：シアノバクテリア

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球外環境下で生態系を構築するためには、克服すべき多くの課題が残されている。地球に最も近い月であっても、大気が存在しないために寒暖差は約 280 度に及び、生命にとって過酷な環境である。外界との熱や物質の出入りが無い閉鎖生態系の構築が第一段階の到達点であるが、それでもなお、解決しなくてはならない二つの課題がある。その一つは環境サイクルである。月面上の 1 日の長さは、地球の約 1 ヶ月に相当するため、概日(約 24 時間)周期の体内時計(概日時計)を保持する地球上の生命は適応が困難である。二つ目の課題は宇宙放射線である。放射線被曝量を減らすか、生命体の放射線耐性を向上させる必要がある。

2. 研究の目的

本課題の目的は、太古の地球で大繁殖し、光合成によって酸素を生み出してきたシアノバクテリアの概日時計を改変して月面環境サイクル耐性を付与し、放射線耐性の向上を図る次期研究課題へのステップアップに向けた足掛かりを作ることである。

3. 研究の方法

シアノバクテリアの概日時計は、3 種類の時計タンパク質(KaiA、KaiB、KaiC)と ATP を混合するだけで試験管内に再構成され(Nakajima et al. Science 2015)、そのリズムの周波数(周期の逆数)は KaiC の ATPase 活性に依存する(Terauchi et al. PNAS 2007, Abe et al. Science 2015) アミノ酸変異によって KaiC 単独の ATPase 活性が 2 倍に向上すると、再構成系や細胞内リズムの振動数も 2 倍になる(周期は 1/2 になる)。分子のスケールから細胞のスケールまでを繋ぐ因果関係を基盤に、ATPase 活性が著しく低下した KaiC 変異体を設計することにより、時計の周期長を概日から概月へと大きく引き伸ばして月面環境サイクル耐性を付与する。

4. 研究成果

周期長(ATPase 活性)を変化させる KaiC の点変異ライブラリを拡張した。以前の研究で開発した ATPase を指標とした *in vitro* スクリーニング系(Ouyang et al. Int. J. Mol. Sci. 2019)を用いて、約 400 種の ATPase 変異体を取得した。そのうち約 100 種については、ATPase 活性が温度補償型から温度依存型に変化していた。

本研究では、上記の変異体ライブラリから KaiC の長周期(低 ATPase)変異をリストアップし、それらを複数導入した KaiC 多重変異体を設計する。長周期変異体の機能評価は長期間(~数週間~)に及ぶため、スクリーニングをより効率よく行うための実験系を確立する必要がある。そこで、逆に著しく高い ATPase 活性を示す変異体、もしくは著しく短周期化された変異体をスクリーニング用の鋳型とし、そこに候補となる長周期変異を導入して効果を検証することにより、機能評価・スクリーニングに要する時間の短縮を試みた。

変異体ライブラリと KaiC の結晶構造を総合的に勘案しつつ、野生型 KaiC に 3 種の点変異を導入することにより、鋳型となる短周期変異体を設計した。同変異体の ATPase 活性は野生型の 3 倍程度にまで向上しており(図 1A)、そこに KaiA と KaiB を添加したところ、8.5 時間(40)の周期で発振することを見出した(図 1B)。

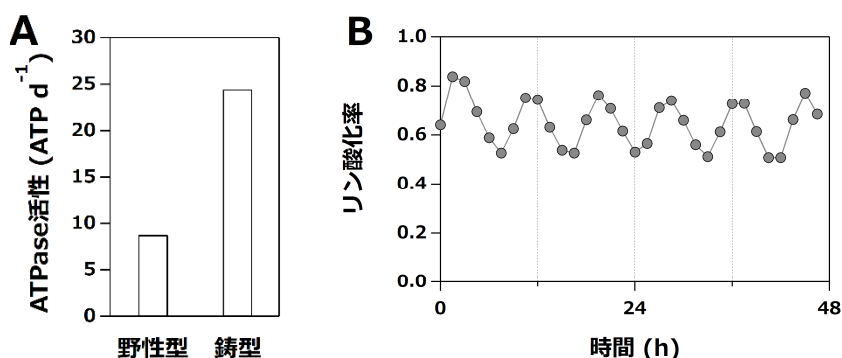


図 1 鋳型となる短周期変異体の ATPase 活性(A)とリン酸化サイクル(B)。

上記の短周期変異体を鋳型に、変異体ライブラリに含まれる長周期変異の相加性/相乗性を検証した。いずれも長周期化傾向を示したが、KaiC のリン酸化サイクルを著しく長周期化(10 倍以上にまで)する長周期変異セットを見出すには至らなかった。そこで、他種シアノバクテリア由来の KaiC のアミノ酸配列、機能、活性などを参照しつつ、選択した長周期変異が著しい構造不安定化や機能失活をもたらす可能性などを検証し、その結果をもとに 2 種類の長周期変異セット(LPS1, LPS2)を構築した。

野生型 KaiC に LPS1 および LPS2 を導入し、そこに KaiA と KaiB を添加した試料を 30 で静置した。独自に開発した自動サンプリング装置(Furuike et al. Biophysics and Physicobiology,

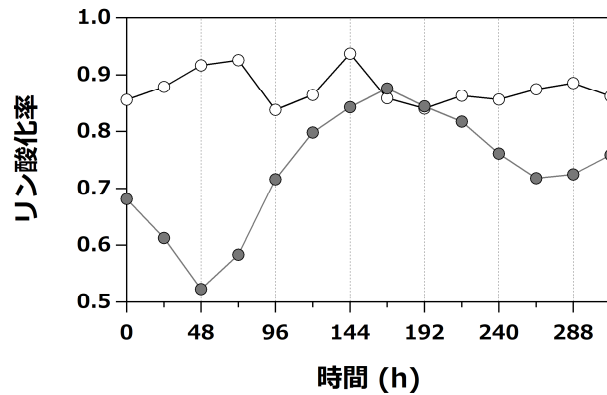


図2 LPS1(○)およびLPS2(●)のリン酸化サイクル(30日)。

2016)を用いて24時間ごとに一定量の試料を抽出し、その都度反応をクエンチして $KaiC^{LPS1}$ および $KaiC^{LPS2}$ のリン酸化率を定量した(図2)。 $KaiC^{LPS1}$ は長期間にわたって高いリン酸化率を保持し、明瞭なリズムを示さなかった。他方、 $KaiC^{LPS2}$ のリン酸化率は218時間(9.1日)の周期でリズムに変動した。

図2に示されるような長期間の実験では、試料自体や、自動サンプリング装置を介した雑菌等の混入が実験の精度や再現性に大きな影響を及ぼす可能性がある。実際、 $KaiC^{LPS2}$ の周期長は抗生物質の有無によって10%弱変化し、抗生物質の種類によってはそれ以上の変化を生じることが見いだされつつある。また別の実験から、図2に示される長周期リズムの周期長がKaiAの濃度に敏感である可能性が示唆された。

$KaiC^{LPS2}$ の周期長は未だ概月サイクルの1/3であるが、今後、設計・調製・評価のフィードバック・サイクルを更に加速させることにより、当初の目的に叶う長周期変異セットの特定を目指す。長周期リズムの周期長が添加物質やKaiA濃度の影響を少なからず受けたことは予想外の結果であるが、現時点では必ずしもネガティブな結果であるとは考えていない。これらの影響の背後にある生化学的要因を突き止めることができれば、それを逆手に取ることで、更なる周期長の伸長へ繋げることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Furuike Yoshihiko, Onoue Yasuhiro, Saito Shinji, Mori Toshifumi, Akiyama Shuji	4. 巻 -
2. 論文標題 The priming phosphorylation of KaiC is activated by the release of its autokinase autoinhibition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.03.21.584037	査読の有無 無
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 Furuike Yoshihiko, Yamashita Eiki, Akiyama Shuji	4. 巻 21
2. 論文標題 Structure-function relationship of KaiC around dawn	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e210001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v21.0001	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 Yoshihiko Furuike, Atsushi Mukaiyama, Shuji Akiyama	4. 巻 -
2. 論文標題 Master allostery in clock protein KaiC orchestrates circadian rhythm	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA Research Frontiers 2022	6. 最初と最後の頁 26-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋山修志
2. 発表標題 概日時計のこれまでとこれから
3. 学会等名 生物科学異分野融合シンポジウム2023
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 秋山修志
2. 発表標題 Autonomous Disassembly of Circadian Clock System at Dawn
3. 学会等名 学術変革領域研究B「時間タンパク質学」領域会議2023（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋山修志
2. 発表標題 概日時計のこれまでとこれから
3. 学会等名 2023年生物リズム若手研究者の集い（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshihiko Furuike, Shuji Akiyama
2. 発表標題 ATPase Regulation in KaiC Triggers Assembly and Disassembly of Clock Proteins in Cyanobacteria
3. 学会等名 日本生物物理学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋山修志
2. 発表標題 概日時計のこれまでとこれから
3. 学会等名 大学共同利用機関2023 現代の社会問題に挑む（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------