

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840058

研究課題名(和文) 溶液中における時計タンパク質KaiCの動態解析

研究課題名(英文) Structural transition of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution

研究代表者

向山 厚 (Mukaiyama, Atsushi)

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・助教

研究者番号：80647446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアの生物時計はKaiA、KaiB、KaiCの3つのタンパク質から構成されている。本研究では中心振動体であるKaiCの構造変化を解析した。KaiCは2つのリングが積み重なった6量体構造を形成し、近年の研究からN末端側リングのATPaseが周期の規定に関与していることが指摘されている。そこで、部位特異的にトリプトファン(Trp)を挿入したKaiCを作成し、時分割蛍光スペクトル測定を行った。挿入Trpからの蛍光強度成分の周期的な変動を観測し、N末端側リングの構造変化を捉えることに成功した。一方、観測された強度変化は微弱であり、振動中の構造変化は非常に繊細であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacterial circadian clock is composed of the three proteins, KaiA, KaiB, and KaiC. In this study, we examined the structural transition of KaiC during circadian oscillation. KaiC is a hexameric protein, consisting of the two rings. Recent studies have pointed out that ATPase of N-terminal ring of KaiC functions as a circadian pacemaker. We constructed KaiC mutant in which tryptophan (Trp) was introduced at the N-terminal ring and conducted time-resolved fluorescence measurements. We found that the fluorescence intensity from an inserted Trp exhibited the rhythmic change in the presence of KaiA and KaiB. This is a clear sign of the structural transition of the N-terminal ring in solution. The oscillatory amplitude in the fluorescence intensity was subtle, which indicates that small-scale structural transition of the N-terminal ring of KaiC.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：生物時計 タンパク質 構造変化

1. 研究開始当初の背景

地球上に生息する生物は、地球の自転に伴う周期的な環境変化に適応するためのシステムとして約 24 時間周期の内在性の発振装置(生物時計)を有している。現在までのところ、多くの生物における生物時計の発振機構は時計遺伝子の転写・翻訳フィードバック制御に基づくと考えられている。その仕組みはある時計遺伝子から転写・翻訳により発現されたタンパク質が、ある一定時間経過した後、その時計遺伝子自身の発現を抑えるというものである。しかしながら、光合成を行うシアノバクテリアの一種である *Synechococcus elongatus* PCC7942 株において、これらの機構を介さない全く新しい生物時計の存在が明らかとなった (Tomita et al., 2005, Nakajima et al., 2005)。シアノバクテリアの生物時計は KaiA、KaiB、KaiC の 3 つのタンパク質から構成されており、単離したこれら 3 つの時計タンパク質とアデノシン三リン酸 (ATP) を混合すると、試験管内で生物時計が再構成される。この画期的な発見は生物時計が「どのようにして約 24 時間周期の遅いリズムが刻まれるのか？」を解く鍵がタンパク質に内包されていることを示している。

その後の研究から、KaiC がシアノバクテリア生物時計の中心振動体としての役割を担っていることが示された。KaiC は ATP を分解する (ATPase) 活性、自己リン酸化/自己脱リン酸化活性を持ち、KaiA、KaiB 存在下において、これらの酵素活性を約 24 時間周期でリズムカルに変動させる。このような活性の変動は KaiC が自身の構造を変化させなければ実現しないはずである。したがって、遅く、かつ安定した振動を生み出している KaiC の構造変化を明らかにすることが、シアノバクテリア生物時計の動作原理を解明するために重要だと考えられる。

2. 研究の目的

KaiC は ATP と結合し、6 量体を形成する。結晶構造解析により 6 量体 KaiC は相同性の高い 2 つのリング (C1、C2) が積み重なった構造であることが示された (Pattanayek et al., 2004)。C 末端側の C2 リングに 2 つのリン酸結合部位 (431 番目のセリン、432 番目のスレオニン) が存在する。KaiA は KaiC の自己リン酸化を促進し、一方 KaiB は KaiA の効果を抑制することにより、KaiC のリン酸化状態が変動する (リン酸化サイクル)。申請者らは以前、KaiC に内在するトリプトファン (Trp) からの蛍光および X 線小角散乱法を用いて、発振中における C2 リングの構造変化を調べた。その結果、リン酸化状態の変動に応じて C2 リングが膨張・伸縮を繰り返す構造変化をすることを明らかにした (Murayama and Mukaiyama et al., 2011)。

C2 リングが最も膨張するタイミングが KaiA・KaiB と 3 体複合体を形成するタイミングと一致する。つまり、この C2 リングの運動が KaiA、KaiB との位相依存的な結合・解離のタイミングを計っていることを意味している。

生物時計にとってさらに重要だと考えられている ATPase は C1、C2 のいずれのリングにも備わっている。最近の研究から、N 末端側の C1 リングの ATPase が生物時計の周期の決定に関与していることが指摘されているが、C1 リングが発振中にどのような構造変化をするのかはこれまで十分に明らかにされていなかった。

そこで、本研究では時分割 Trp 蛍光スペクトル測定により、発振中における KaiC の動的構造変化、特にこれまで不明であった C1 リングの運動を捉え、蛍光強度変化から構造変化に関する知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) KaiC の部位特異的構造変化の観察に向けた蛍光プローブ挿入変異体の構築

Trp 蛍光はその高い感度に加えて、タンパク質の特定の部位の構造変化を反映することから、タンパク質研究において広く用いられている測定手法である。KaiC は元来、C1 リングに 1 つ、C2 リングに 2 つの Trp を有している。しかしながら、申請者らの以前の研究から、C1 リングに内在する Trp は構造変化を観察するのに適していないことがすでにわかっていた。そこで、既知の結晶構造の情報を参考にして、KaiC の C1 リングに新たに Trp を挿入した変異体を作製した。

(2) KaiC の生物リズム発振中における動的構造変化の解析

振動中における KaiC の構造変化を観察するために、3 つの Kai タンパク質 (KaiA、KaiB、KaiC) と ATP を含む溶液の時分割 Trp 蛍光スペクトル測定を行った。Trp からの蛍光強度は温度依存性を示すため、周囲の温度変化の影響が無視できるほどに高度に制御された環境下で行った。また、測定に使用した変異体 KaiA および野生型 KaiB は Trp を持たないので、観測される蛍光強度変化は KaiC の Trp 由来として帰属できる。

4. 研究成果

(1) KaiC の部位特異的構造変化の観察に向けた蛍光プローブ挿入変異体の構築

Trp は蛍光プローブとしての有用性を示す一方、溶解度の低さと大きい側鎖のために、しばしば Trp の挿入がタンパク質の構造安定性や機能に悪影響を及ぼすことが見受けら

れる。Trp を挿入することで KaiC の時計としての機能が失われてしまう変異体は本研究の遂行に利用できない。そこでまず、構築した変異体の酵素としての機能 (ATPase 活性、およびリン酸化サイクル) を評価した。構築した変異体の中には、安定性が著しく低下し、時計機能が失われたものや、時計の周期や振幅が大きく変化したものが見られたが、プロトマー界面の特定の位置に Trp を挿入した変異体が、野生型 KaiC と同程度の ATPase 活性を保持し、さらにリン酸化サイクルの周期、振幅、位相のいずれも野生型 KaiC とほぼ同一であることを見出した。また、野生型 KaiC では、ATPase 活性およびリン酸化サイクルの周期が生理環境付近の温度では、外界の温度の影響をほとんど受けない性質 (温度補償性) を示すのだが、この変異体においても同様の性質が確認された。以上の結果は、この Trp 挿入変異体が発振中における C1 リングの構造変化を観測するのに優れた KaiC 変異体であることを示している。

(2) KaiC の生物リズム発振中における動的構造変化の解析

(1) で得られた Trp 挿入変異体を用いて、Trp を持たない変異体 KaiA および野生型 KaiB 存在下における時分割 Trp 蛍光スペクトル測定を行った。並行して測定した野生型 KaiC の結果を利用して、挿入した Trp からの蛍光の時間変化成分を抽出したところ、その強度が周期的に変動していることを見出した (図 1)。蛍光強度変化が示す周期は同時に計測したリン酸化サイクルの周期と一致したことから、この結果は C1 リングの構造が振動中に変化していることを示す直接的な結果と言える。

観測された蛍光強度の変化から溶液中における構造変化の規模を推定するために、単量体および変性状態における挿入 Trp の蛍光強度と比較した。変性した KaiC はタンパク質変性剤として知られる塩酸グアニジンに溶液中に高濃度加えることで調製した。一方、単量体 KaiC は溶液中から ATP を除去することで調製した。通常の条件において、単量体 KaiC は非常に不安定で容易に凝集するのだが、2 種類のアミノ酸 (グルタミン酸、およびアルギニン) を加えたリン酸バッファーにおいてその安定性が増大することを見出し [雑誌論文]、Trp 蛍光スペクトル測定が可能となった。単量体、変性状態における野生型および変異体 KaiC の Trp 蛍光スペクトル測定を行い、それぞれの状態において挿入した Trp からの蛍光強度成分を抽出した。その結果、大規模な構造変化をもたらす単量体化および変性に伴い、挿入した Trp からの蛍光強度は著しく増大し、その変化と比較して、発振中に観測される蛍光強度変化は非常に微弱であることがわかった (図 1)。このことは、C1 リングが発振中に繊細な構造変化を

していることを示している。現在、本研究で得られた実験結果と既存の知見を元に、溶液中における KaiC の構造転移のモデル化を進めている。

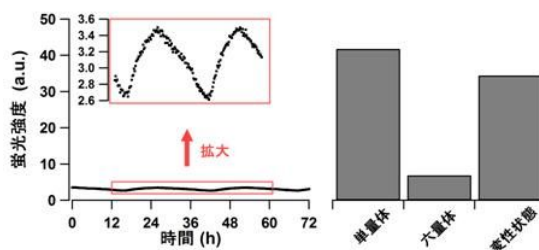


図1 C1リングに挿入したTrpからの蛍光強度変化
単量体KaiCはATPの除去により、変性状態KaiCは高濃度の塩酸グアニジンの添加により調製した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

査読あり

Mukaiyama A, Osako M, Hikima T, Kondo T, Akiyama S.

A protocol for preparing nucleotide-free KaiC monomer. *BIOPHYSICS* **11**, 79-84 (2015)
doi:10.2142/biophysics.11.79

[学会発表] (計5件)

向山 厚、阿部 淳、檜山 卓也、秋山 修志 蛍光分光法による時計タンパク質 KaiC の構造変化の解析 2015年3月10日 日本生物物理学会中部支部講演会 (岡崎コンファレンスセンター・愛知県・岡崎市)

Mukaiyama A, Akiyama S. Conformational transition of a cyanobacterial clock protein KaiC monitored with fluorescence spectroscopy 2014年9月27日 第52回日本生物物理学会年会 (札幌コンベンションセンター・北海道・札幌市)

向山 厚、秋山 修志 蛍光分光法によるシアノバクテリア時計タンパク質 KaiC の構造変化の解析 2014年6月27日 第14回日本蛋白質科学会年会 (ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア・神奈川県・横浜市)

Mukaiyama A, Akiyama S. Conformational transition of a cyanobacterial clock protein KaiC monitored with fluorescence spectroscopy 2014年3月

6 日 日本生物物理学会中部支部講演会
(岡崎コンファレンスセンター・愛知県・岡崎市)

Mukaiyama A, Akiyama S. Conformational transition of a cyanobacterial clock protein KaiC monitored with fluorescence spectroscopy 2014 年 2 月 24-25 日 Asian CORE Winter School (Taipei, Taiwan)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

秋山グループホームページ
<http://bms.ims.ac.jp/AkiyamaG/index.html>
↓

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向山 厚 (Mukaiyama Atsushi)
分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・助教
研究者番号：80647446

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：