

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：23401

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05132

研究課題名（和文）時間タンパク質学：生命の時間を宿す機能的KaiCホモログの探索技術の開発

研究課題名（英文）Chrono-proteinology：Seeking for functional KaiC homologues in mammals

研究代表者

向山 厚（Mukaiyama, Atsushi）

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：80647446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 15,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題はシアノバクテリアの時計タンパク質KaiCのように概日時計の周波数特性を備えるタンパク質を哺乳類において探索するための技術開発を目指すものである。我々はKaiCの動態を指標とした試験管内リズム計測系を整備し、10倍以上の高感度化に成功した。また、独自に確立したマウスの発生過程を再現したin vitro系を用いて概日リズムの出現と並行して時計タンパク質複合体が形成されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果はKaiCの変異体スクリーニング系の整備により周波数特性を創出する因子（配列機能相関）の同定につながる基盤技術である。今後、マウスの発生過程において概日リズムの出現とともに形成される時計タンパク質複合体についてKaiCの知見と照合することが、哺乳類（マウス）において周波数特性を担う因子の同定につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：This research project aims to develop technique to search for clock proteins in mammals that define circadian timescale such as the cyanobacterial clock protein KaiC. We have developed a technique to detect circadian rhythm in a clock reconstructed system using highly sensitive Trp fluorescence probe from KaiC and succeeded in increasing the sensitivity by a factor of 10 or more. We also found that the clock protein complexes were formed at the stage of the emergence of circadian rhythms using an in vitro system that recapitulates the developmental process of mice.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 KaiC 周波数特性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトをはじめとする哺乳類、植物、コケ、そして微生物にいたる多種多様な生物が、地球の自転による周期的な環境変化と調和すべく、概日時計を用いて自らの生命活動を約 24 時間周期で変調させる。概日時計には以下に示す 3 つの生理学的性質が生物種を超えて保存されている。

- 1) 恒常的な条件下において概日周期で自律的に振動する
- 2) 周期の長さが外界の温度の影響をほとんど受けない (温度補償性)
- 3) 外界のリズムに同調することができる。

概日時計の分子機構を説明するモデルとして遺伝子の転写・翻訳を介した転写・翻訳フィードバックモデルがある。このモデルは細胞内リズムをうまく記述することができる一方、転写の速度、翻訳の速度は本来、分の時間スケールで起こるイベントであることから、24 時間の遅さの起源は依然として未解明であった。

光合成細菌であるシアノバクテリアは概日時計を有する微生物の一種で、KaiA、KaiB、KaiC の 3 種類のタンパク質から構成される。これら 3 種類の Kai タンパク質と ATP を試験管内で混合すると、概日時計を再構成することができ、KaiC の機能 (リン酸化、ATPase) 構造、そして複合体の組成比が約 24 時間周期でリズムに変動する。研究代表者 (向山) らは、シアノバクテリア概日時計の周期長を規定する主要な因子が KaiC だけ 1 種類のタンパク質の中に内包されることを突き止めた (Abe *et al.*, *Science* 2015) (図 1)。これらの発見から、概日時計の 1 日に 1 回の頻度を生み出す特性 (周波数特性) が限られた数のタンパク質の中に刻まれているとする新たな概念を掲げる契機となったのだが、この概念がはたして他の生物種にも当てはまるものなのだろうか? KaiC はアミノ酸配列の類似度の観点から原核生物に固有のタンパク質であるが、KaiC の周波数特性は生物界に普遍的に存在する因子 (水分子、ATP、ペプチドの異性化反応) を活用することで表出されることから、他生物種においても KaiC と類似の機能を持ったタンパク質 (機能的 KaiC ホモログ) が形を変えて存在しているのかもしれない。

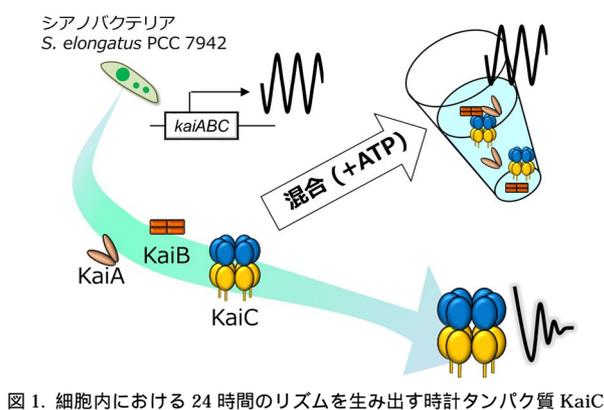


図 1. 細胞内における 24 時間のリズムを生み出す時計タンパク質 KaiC

### 2. 研究の目的

本研究の目的は時計タンパク質の酵素活性、構造変化そして分子間相互作用といったタンパク質ダイナミクスに注目して、哺乳類における機能的 KaiC ホモログを探索するための技術の開発である。具体的には周波数特性を備えた KaiC の配列・機能相関の理解に向けた試験管内再構成系におけるスクリーニング系の開発、および哺乳類における周期創出機構解明のためのマウス ES 細胞を用いた *in vitro* 概日時計形成モデルを用いたタンパク質複合体解析等である。以下にそれぞれの取り組みについて項目ごとに説明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 溶液中における KaiC の構造変化を指標としたリズム計測系の高感度化

タンパク質工学的手法により Trp を導入した KaiC 変異体を作成し、野生型 KaiC と同様に、大腸菌による発現・精製を行った。取得した変異体 KaiC について KaiA、KaiB 共存下における蛍光強度の時間変化を蛍光分光法により計測し、リズムに変動する蛍光強度変化を解析した。

(2) 体内時計形成に伴う生体の概日時間秩序の生成機構については、我々が発見し確立したマウス ES 細胞の *in vitro* 分化誘導による概日時計の発生再現系、および Gastruloid オルガノイドによる発生プロセスの *in vitro* 再現系を活用し、概日時計の成立プロセスにおける周波数特性の獲得過程を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 溶液中における KaiC の構造変化を指標としたリズム計測系の高感度化

KaiC に内在する Trp 残基の蛍光強度を用いた計測法は *in vitro* における概日リズムを検出する優れた手法であるが (Murayama *et al.*, *EMBO J.* 2011)、Trp の本来の蛍光特性から見れば観測された信号強度は微弱なものであった。そこで、Trp 蛍光を用いたリズム計測系のさらなる高感度化を目指し、Trp 蛍光プローブを新たに KaiC に挿入することを検討した (Mukaiyama *et al.*, *Biochem. J.* 2022)。化学状態 (リン酸化) の異なる KaiC の結晶構造 (Furuike *et al.*, *Sci. Adv.* 2022) から、KaiC のリン酸化修飾を受ける部位近傍が大規模に構造変化すると予想された。そこで、リン酸化部位周辺に Trp 蛍光プローブを導入した KaiC 変異体を作成し、得られたそれぞれの KaiC 変異体に対して KaiA、KaiB 共存下での蛍光強度変化を追跡した結果、アミノ酸 419 番目に Trp を挿入した KaiC 変異体 (KaiC<sup>W419</sup>) においてリズムの振幅が著しく増加すること (野生型に比べて約 14 倍) を観測した (図 2)。一方、観測されたリズムの安定性や周期長の長さは野生型と比べても遜色なく、さらに周期の温度補償性も保持されていたことから、コア振動子としての KaiC の機能は KaiC<sup>W419</sup> においても担保されているといえる。今回の高感度化の成功により、リズム計測に必要な試料の大幅な軽減が可能となり、スクリーニングにおけるスループットの向上が見込まれる。

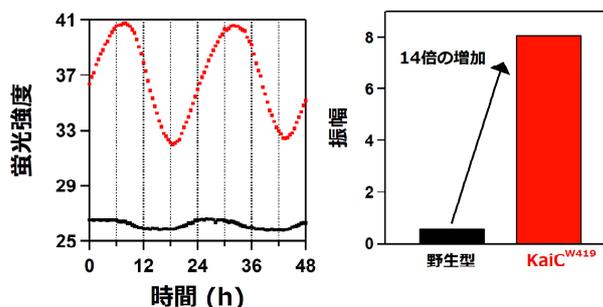


図 2. Trp 蛍光プローブ導入による KaiC の構造変化を指標としたリズム計測系の高感度化

今後はこの技術を活用し、周波数特性を備える KaiC の配列 機能相関の解明につなげるとともに、その知見を他生物種の機能的 KaiC ホモログ探索に活用する予定である。

(2) 本研究ではマウス ES 細胞の *in vitro* 分化誘導系を用いた概日時計の発生プロセスに焦点を当て、周波数特性の獲得過程について解析した。地球の自転周期に生体機能を適応させる概日時計は、時計遺伝子によって細胞レベルで約 24 時間周期のリズムを生み出している。

今回、我々は、ES 細胞の分化誘導系において約 24 時間周期のリズム出現が非常に遅いことに注目し、24 時間の周波数が抑制されている期間に細胞内で生じる現象に着目して解析を行なった。ES 細胞の分化誘導培養では、通常 7 日間程度の分化誘導培養により未分化マーカーは消失し細胞が分化したとみなす。しかし、概日時計の 24 時間リズム出現はさらに遅く、分化誘導開始後 14 日間程度を要する。これは、マウスの個体発生における概日時計の発生と非常に類似した時間経過である。マウス個体発生では、この間、体節形成という発生学上非常に重要なイベントが進行するが、概日時計の鍵因子である転写因子複合体 CLOCK/BMAL1 が体節時計のリズムに及ぼす影響について、ES 細胞から誘導した胚オルガノイド系を用いて検討した。誘導未分節中胚葉 (induced PSM, iPSM) および、体節形成が再現できる胚オルガノイドである gastruloid (ガストロイド: 人工擬似胚) を用い、体内時計の鍵転写因子 CLOCK/BMAL1 の発現誘導による Hes7 リズムおよび体節形成への影響を解析した。その結果、CLOCK/BMAL1 の発現誘導により Hes7 のリズム消失とともに体節構造の形成も消失することが確認された。本研究によって、発生過程において体節形成の完了まで体内時計を厳密に抑制することは、正常な発生プロセスにおいて極めて重要な生理学的意義がある可能性が示唆された (Umemura *et al.*, *PNAS*, 2022)。

このような結果は、ES 細胞の分化に伴い約 24 時間周期の周波数特性が出現するタイミングに生理学的に重要な意義があることを示唆するものである。これを踏まえ、ES 細胞の分化に伴い、時計タンパク質複合体がどのような状態変化をきたすのかを解析した。時計遺伝子 *Per1*, *Bmal1*, *Cry1* について、Flag-tag をそれぞれの N 末端あるいは C 末端にインフレームでノックインした遺伝子改変 ES 細胞株を樹立し、それぞれの ES 細胞株の分化に伴うタンパク質複合体を免疫沈降法で解析した。その結果、概日時計の 24 時間リズムの出現パターンと並行して時計タンパク質複合体が成立することを明らかにした。

今後は、さらに ES 細胞など概日時計のリズムが検出されない細胞における時計タンパク質を中心としたタンパク質複合体解析を進め、24 時間の周波数特性出現の鍵を握るタンパク質のスクリーニングを行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Mukaiyama Atsushi, Furuike Yoshihiko, Yamashita Eiki, Akiyama Shuji	4. 巻 479
2. 論文標題 Highly sensitive tryptophan fluorescence probe for detecting rhythmic conformational changes of KaiC in the cyanobacterial circadian clock system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 1505 ~ 1515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20210544	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 Furuike Yoshihiko, Mukaiyama Atsushi, Koda Shin-ichi, Simon Damien, Ouyang Dongyan, Ito-Miwa Kumiko, Saito Shinji, Yamashita Eiki, Nishiwaki-Ohkawa Taeko, Terauchi Kazuki, Kondo Takao, Akiyama Shuji	4. 巻 119
2. 論文標題 Regulation mechanisms of the dual ATPase in KaiC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2119627119	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 Furuike Yoshihiko, Mukaiyama Atsushi, Ouyang Dongyan, Ito-Miwa Kumiko, Simon Damien, Yamashita Eiki, Kondo Takao, Akiyama Shuji	4. 巻 8
2. 論文標題 Elucidation of master allostery essential for circadian clock oscillation in cyanobacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.abm8990	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 Furuike Yoshihiko, Ouyang Dongyan, Tominaga Taiki, Matsuo Tatsuhiro, Mukaiyama Atsushi, Kawakita Yukinobu, Fujiwara Satoru, Akiyama Shuji	4. 巻 5
2. 論文標題 Cross-scale analysis of temperature compensation in the cyanobacterial circadian clock system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Physics	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) 10.1038/s42005-022-00852-z	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 Nakai Hiroko, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Asano Taiki, Ueno Morio, Umemura Yasuhiro, Sasawaki Yuh, Ono Ryutaro, Hamuro Junji, Sotozono Chie, Yagita Kazuhiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Comprehensive Analysis Identified the Circadian Clock and Global Circadian Gene Expression in Human Corneal Endothelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology Visual Science	6. 最初と最後の頁 16 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.63.5.16	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 Sasawaki Yuh, Inokawa Hitoshi, Obata Yukiko, Nagao Suzune, Yagita Kazuhiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Association of social jetlag and eating patterns with sleep quality and daytime sleepiness in Japanese high school students	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Sleep Research	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) 10.1111/jsr.13661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Benkli Barlas, Kim Sun Young, Koike Nobuya, Han Chorong, Tran Celia, Silva Emma, Yan Yuanqing, Yagita Kazuhiro, Chen Zheng, Yoo Seung-Hee, Burish Mark Joseph	4. 巻 10
2. 論文標題 Circadian Features of Cluster Headache and Migraine: A Systematic Review, Meta-analysis, and Genetic Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology	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) 10.1212/WNL.0000000000207240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Maruyama Michiyo, Furukawa Yuko, Kinoshita Masato, Mukaiyama Atsushi, Akiyama Shuji, Yoshimura Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Adenylate kinase 1 overexpression increases locomotor activity in medaka fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0257967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0257967	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 Simon Damien, Mukaiyama Atsushi, Furuike Yoshihiko, Akiyama Shuji	4. 巻 19
2. 論文標題 Slow and temperature-compensated autonomous disassembly of KaiB?KaiC complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v19.0008	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 Umemura Yasuhiro, Koike Nobuya, Tsuchiya Yoshiki, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Kageyama Ryoichiro, Yagita Kazuhiro	4. 巻 119
2. 論文標題 Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114083119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114083119	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 Wirianto Marvin, Wang Chih Yen, Kim Eunju, Koike Nobuya, Gomez Gutierrez Ruben, Nohara Kazunari, Escobedo Gabriel, Choi Jong Min, Han Chorong, Yagita Kazuhiro, Jung Sung Yun, Soto Claudio, Lee Hyun Kyoung, Morales Rodrigo, Yoo Seung Hee, Chen Zheng	4. 巻 36
2. 論文標題 The clock modulator Nobiletin mitigates astroglial associated neuroinflammation and disease hallmarks in an Alzheimer's disease model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101633R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Furuike Yoshihiko, Mukaiyama Atsushi, Akiyama Shuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Master allosteric 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 27 ~ 28
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 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 Koike Nobuya, Umemura Yasuhiro, Inokawa Hitoshi, Tokuda Isao, Tsuchiya Yoshiki, Sasawaki Yuh, Umemura Atsushi, Masuzawa Naoko, Yabumoto Kazuya, Seya Takashi, Sugimoto Akira, Yoo Seung-Hee, Chen Zheng, Yagita Kazuhiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Inter-individual variations in circadian misalignment-induced NAFLD pathophysiology in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108934 ~ 108934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.108934	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 該当する

1. 著者名 Han Chorong, Lim Ji Ye, Koike Nobuya, Kim Sun Young, Ono Kaori, Tran Celia K., Mangutov Elizaveta, Kim Eunju, Zhang Yanping, Li Lingyong, Pradhan Amynah A., Yagita Kazuhiro, Chen Zheng, Yoo Seung Hee, Burish Mark J.	4. 巻 64
2. 論文標題 Regulation of headache response and transcriptomic network by the trigeminal ganglion clock	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Headache: The Journal of Head and Face Pain	6. 最初と最後の頁 195 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/head.14670	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yagita Kazuhiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Emergence of the circadian clock oscillation during the developmental process in mammals	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 102152 ~ 102152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2024.102152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 八木田和弘, 藪本和也	4. 巻 90
2. 論文標題 概日リズムの基礎, 特集: 時間の流れと産婦人科学	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 451 ~ 458
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Atsushi Mukaiyama, Yoshihiko Furuike and Shuji Akiyama
2. 発表標題 Exploring ancient origins of the circadian clock system through molecular evolution
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向山厚、古池美彦、秋山修志
2. 発表標題 周波数特性を備えた時計タンパク質の分子起源とその進化
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向山厚
2. 発表標題 周波数特性を備えたシアノバクテリア時計タンパク質の分子機構解明
3. 学会等名 第12回都医学研シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 概日時計の発生と時計タンパク質動態
3. 学会等名 第12回都医学研シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mukaiyama A, Furuike Y, Akiyama S
2. 発表標題 Exploring ancient origin of circadian oscillation through KaiC evolution
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向山 厚、古池 美彦、秋山 修志
2. 発表標題 分子進化的アプローチに基づく概日時計の進化的起源の探究
3. 学会等名 令和3年度日本物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yagita Kazuhiro
2. 発表標題 Clocks and Temporal Orders in Physiology
3. 学会等名 17th European Biological Rhythms Society (EBRS) Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yagita Kazuhiro
2. 発表標題 Circadian Time Order: Emergence and Homeostasis
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2022, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yagita Kazuhiro
2. 発表標題 Circadian misalignment-induced pathophysiology in mouse cohort model
3. 学会等名 Asian Forum on Chronobiology 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 向山厚
2. 発表標題 概日時計の周波数特性を備えた時計タンパク質の分子起源解明
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 細胞の概日時計形成プロセスにおける蛋白質動態
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会 (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
研究 分担者	八木田 和弘  (Yagita Kazuhiro)  (90324920)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (24303)	

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
---------	---------