

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18492

研究課題名(和文) 藍色細菌時計タンパク質KaiBの構造と機能の解明

研究課題名(英文) The structural and functional analysis of the cyanobacterial circadian clock protein KaiB

研究代表者

谷山 怜子(村上怜子)(TANIYAMA, Reiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・その他

研究者番号：00444365

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)：Kai生物時計機構が時間情報を生み出す機構を明らかにするため、藍色細菌の時計システムを構成するKaiA、KaiB、KaiCおよびSasAの複合体が時間振動中にどのように変化していくかを解析した。また、高い協同性を持って6分子のKaiBが6量体リングのKaiC上に配置されることにより、SasA-KaiC複合体形成を阻害すると考えられる。従って、KaiBがKai時計システムの制御に非常に重要な働きを持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： The circadian clock is an endogenous biological mechanism that generates autonomous daily cycles. The molecular machinery of the cyanobacterial circadian clock consists of three proteins, KaiA, KaiB, and KaiC. The time information is transmitted from KaiC to SasA.

We showed that mass-spectrometric titration data of KaiB-KaiC complex showed that the proteins formed a complex exclusively in a 6:6 stoichiometry and that the inverse contrast-matching technique of small-angle neutron scattering revealed a disk-shaped arrangement of the KaiB subunits on the outer surface of the KaiC ring, suggesting that cooperatively binding KaiB competes with SasA with respect to interaction with KaiC. On the other hand, KaiB enhanced KaiA-KaiC complex formation. These results suggested that the KaiB play the important role in the regulation of Kai protein complex formation.

研究分野：生化学

キーワード：生物時計 藍色細菌 概日リズム 溶液散乱 超分子質量分析

1. 研究開始当初の背景

地球上の多くの生物は、地球の自転に伴う昼夜交替の変化に適応するために、様々な活性を24時間周期で自律的に振動させている。この自律的振動が『概日リズム』であり、リズムを制御する細胞内の分子機構が『生物時計』である。

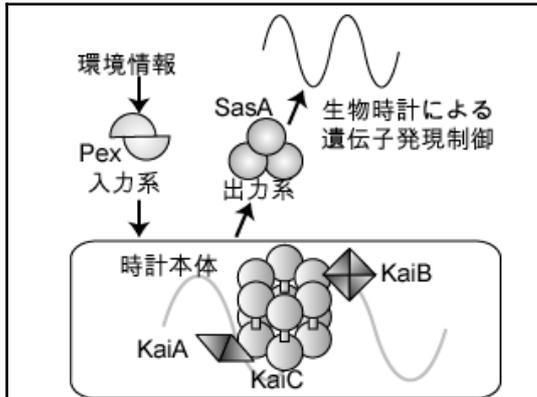


図1: 藍色細菌の時計タンパク質

入力系: Pexは光に反応して発現し、KaiAの発現を制御する。

時計本体: KaiA、KaiB、KaiCを保温すると複合体構造、KaiCのリン酸化レベルなどが24時間周期で振動する。

出力系: SasAはKaiCと相互作用し、時間情報を遺伝子発現系に伝える主要な出力経路である。

藍色細菌の生物時計は時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC [1]から構成されている。3つの Kai タンパク質は相互に作用し、ATP存在下においてこの3つのタンパク質を試験管内で保温すると、KaiCのリン酸化活性[2]と ATPase 活性[3]、KaiBの KaiC への結合親和性[4]が24時間周期で振動する。時計本体である Kai タンパク質の他に、光情報を時計本体に伝える入力系の Pex[5]や、KaiC と相互作用し時計本体が発信する時間情報を下流の遺伝子発現系に伝える出力系の SasA の存在[6]が知られている(図1)。

これまでに KaiB の構造と機能の関わりに着目し、研究を進めてきた。KaiB の結晶構造解析によると、KaiB は4量体と同定された。4量体 KaiB において、機能必須アミノ酸残基(活性部位)は分子の内部に埋もれており、時間発振のための構造変化が予想された[7]。KaiB の2量体型変異体 KaiB₁₋₉₄ は、KaiC に対する結合親和性が KaiB_{WT} に比べ高く[8]、2量体化することによって KaiB 活性部位が露出し、KaiC に対する結合親和性が上昇すると考えられた。KaiB₁₋₉₄ は SasA-KaiC 複合体形成を阻害し、SasA を介した時間情報の出力系に影響を及ぼした。このことから、KaiB のオリゴマー構造の変化とそれに伴う KaiC に対する結合親和性の変化は、時間発振に重要な要素であることが示された。しかし、KaiB のオリゴマー構造と機能の関わりについては、未知の点が多かった。

参考文献

1. Ishiura *et al.*, (1998) *Science* **28**, 1519-1523.
2. Nakajima *et al.*, (2005) *Science* **308**, 414-415.
3. Terauchi *et al.*, (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16377-16381.
4. Kageyama *et al.*, (2006) *Mol Cell* **23**, 161-171.
5. Kutsuna *et al.*, (1998). *J. Bacteriol.* **180**, 2167-2174.
6. Iwasaki *et al.*, (2000) *Cell* **101**, 223-233.
7. Iwase *et al.*, (2005) *J Biol Chem* **280**, 43141-43149.
8. Murakami *et al.*, (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 29506-29515.

2. 研究の目的

KaiB のオリゴマー構造の変化と、それに伴う KaiC に対する結合親和性の変化が、Kai 時計システムにおいて果たす役割を明らかにすることを目的とする。

具体的には、以下の点の解明を目指す。

- I. KaiB-KaiC 複合体の構造を解明し、KaiB と KaiC の結合の分子機構を明らかにする。
- II. 2量体 KaiB および単量体 KaiB の構造を明らかにする。
- III. KaiB-KaiC 複合体形成が Kai 時計分子装置に与える影響を解明する。KaiA、KaiB および SasA は、相互に関わり合いながら KaiC と相互作用することが示唆されている。KaiB-KaiC 複合体が形成されることによって KaiB および KaiC の構造がどのように変化するかを明らかにし、それが KaiA および SasA の KaiC との相互作用にどのような影響を及ぼすかを解析する。以上の解析によって、KaiB の KaiC に対する結合親和性がどのようにして変化するのか、そして、KaiB の KaiC に対する結合親和性の変化が Kai 時計タンパク質複合体全体にどのような影響をもたらすかを考察する。

3. 研究の方法

時計タンパク質 KaiA、KaiB および SasA は、それぞれが時計タンパク質 KaiC と相互作用する。

X線小角散乱法、中性子小角散乱法および超分子質量分析法などの手法によって、KaiB の野生型およびオリゴマー変異体の構造、そして KaiB-KaiC 複合体の構造を解明し、KaiB のオリゴマー構造と KaiC に対する相互作用に関わりを明らかにする。

また、KaiB-KaiC 相互作用が KaiA や SasA の KaiC に対する相互作用にどのような影響をあたえるかを解析し、KaiA、KaiB および SasA の相互の関わりを明らかにする。

これらの解析によって、KaiB の KaiC に対

する結合親和性が変わることが、Kai 時計タンパク質複合体全体にどのような影響をもたらすかを考察する。

4. 研究成果

(1) KaiB のオリゴマー構造の解析

超分子質量分析法により、KaiB のオリゴマー構造を解析し、その正確な分子量を見積もった。KaiB は分子量から主として 4 量体として存在した。また、量は少ないが単量体が検出された (図 2)。

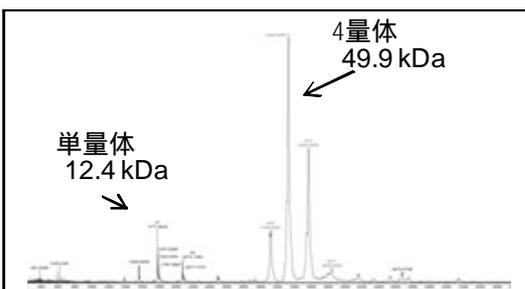


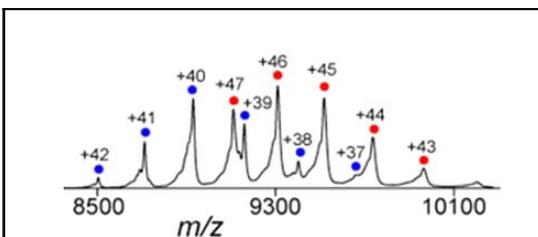
図2 超分子質量分析法によるKaiBの解析

超分子質量分析法により、KaiBの解析を行った。KaiBは単量体および4量体として存在していた。

(2) KaiB-KaiC 複合体の構造と KaiB による SasA-KaiC 複合体の形成阻害

超分子質量分析法による解析

超分子質量分析法により KaiB の KaiC への結合は高い協同性を示すことを明らかにした。超分子質量分析法は、複合体の分子量を高い精度で見積もることができる。KaiB の添加量を増やしながらか解析したところ、検出された KaiC-KaiB 複合体の分子量は 428 kDa で、これは 6 分子の KaiB が KaiC6 量体に結合していることを示した (図 3)。それ以外の結合比で KaiB が結合した複合体は検出されず、KaiB-KaiC 複合体は協同性が高いことが示された。



- KaiC 単独のシグナル
- KaiB - KaiC (6:6) 複合体のシグナル

図3 KaiB-KaiC複合体の超分子質量分析法解析

超分子質量分析法により、KaiB-KaiC複合体の解析を行った。シグナルは、KaiC 単独もしくは KaiB と KaiC が 6:6 の比で結合したもののしか検出されなかった。

中性子小角散乱法による構造解析
中性子小角散乱法により、KaiB-KaiC 複合体の構造解析を行った (図 4)。

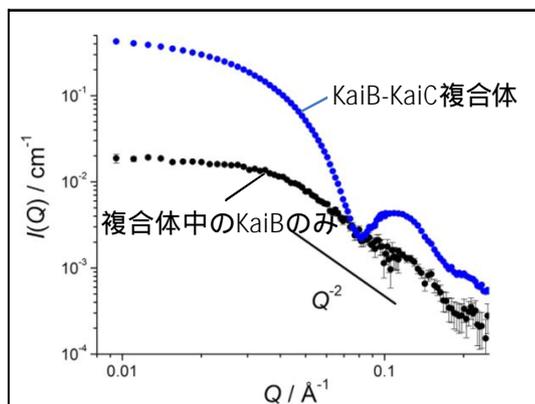


図4 KaiB-KaiC複合体の中性子小角散乱法による解析

中性子小角散乱法により、KaiB-KaiC複合体の構造解析を行った。中性子小角散乱は、複合体中の軽水素を含む分子のみを検出する手法であり、これにより、KaiB-KaiC複合体中のKaiBのみを検出することができる

このデータをもとに、KaiB-KaiC 複合体のモデルを作成した。6 分子の KaiB が 6 量体リングの KaiC の相互作用部位を覆う構造を取るため、SasA の KaiC への結合を阻害するのだと考えられた (図 5)。

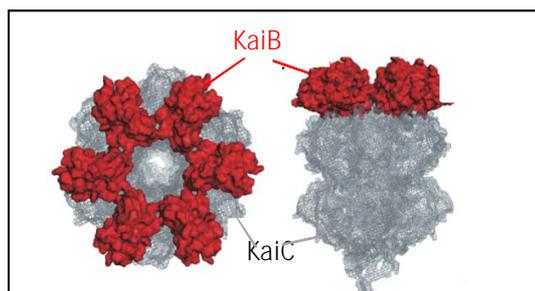


図5 KaiB-KaiC複合体モデル

超分子質量分析法および中性子小角散乱法の結果をもとに、構造モデルを作製した。

以上の結果は、下記の論文で発表した。
Sugiyama *et al.*, (2016). *Sci. Rep.* DOI: 10.1038/srep35567.

(3) KaiA-KaiB-KaiC 複合体の形成

KaiA-KaiC 複合体形成のリズム振動

KaiA と KaiC の複合体形成を、分子の移動速度をもとに分子量を見積もる蛍光相関分光法 (FCS 法) により解析した。

KaiA は、KaiC のリン酸化期と脱リン酸化期に、2 度複合体を形成した (図 6)。

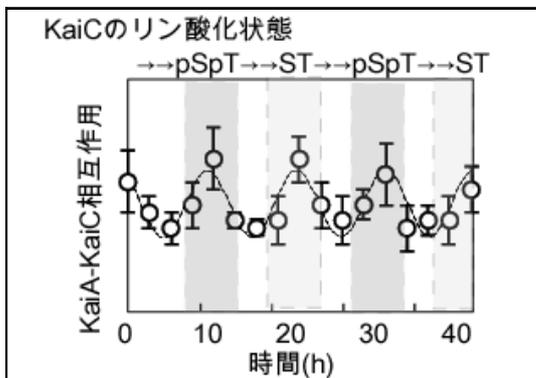


図6 KaiA-KaiC複合体形成の概日振動

蛍光相関分光法により、KaiAとKaiCの複合体形成を周期変化を検出した。

KaiB 非存在下では、KaiA はリン酸化型 KaiC との結合親和性が低く、脱リン酸化型 KaiC と結合親和性が高かった。リン酸化型 KaiC と KaiA が複合体を形成するためには KaiB が必要であることを示した (図7)。このことから、KaiB は、KaiA-KaiC 相互作用にも影響を及ぼす存在であることを示した。

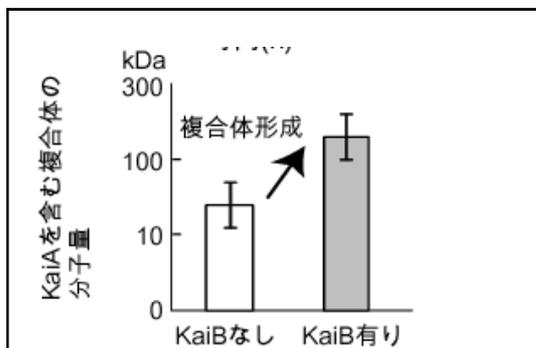


図7 KaiAとリン酸化型KaiCの相互作用

蛍光相関分光法により、KaiAを含む分子の分子量を求めた。KaiAとリン酸化型KaiCを混合しても、KaiAを含む分子の分子量は上昇せず複合体形成は検出されなかった(左)。KaiA、KaiB、リン酸化型KaiCを混合すると、複合体形成が観察された。

KaiC のリン酸化期には、KaiA-KaiB-KaiC 複合体が形成される。KaiA-KaiB-KaiC 複合体では、KaiB が KaiA と結合することで KaiA - KaiC 間相互作用を阻害し、KaiA による KaiC のリン酸化の促進を負に制御している可能性が示唆された。

以上の結果は、下記の論文で発表した。

Murakami *et al.*, (2016) *Genes Cells*. 8: 890-900. doi: 10.1111/gtc.12392.

(4) SasA-KaiC 複合体の解析

KaiB と配列相同性を持つ SasA のオリゴマー構造を超分子質量分析法により解析した。この結果、SasA も KaiB と同様に複数のオリゴマー構造を持つことが示された (図8)。この構造の生体内での意義は、今後解析が必要である。

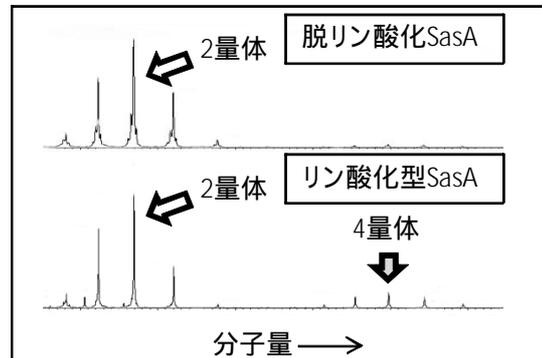


図8 超分子質量分析法によるSasAのオリゴマー状態の解析

超分子質量分析法により、SasAの解析を行った。SasAは主として2量体で存在した。リン酸化を擬似した変異体SasAでは4量体も顕出された。

続いて、SasA-KaiC 複合体の化学量論を超分子質量分析法により解析した。KaiC6 量体に対し、異なる分子数の SasA が結合した、SasA-KaiC 複合体が顕出された (図9)。すなわち、SasA には KaiB のような協同性はないと考えられた。

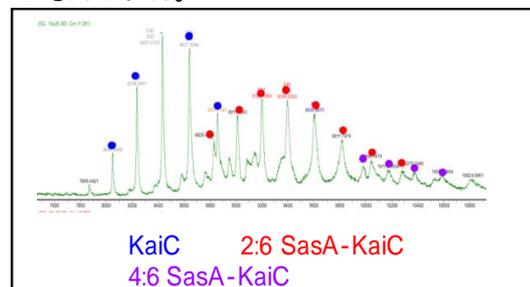


図9 SasA-KaiC複合体の超分子質量分析法による解析

超分子質量分析法により、SasA-KaiC複合体の解析を行った。シグナルは、KaiC単独、SasAとKaiCが2:6の比で結合したもの、4:6の比で結合したものがそれぞれ検出された。

SasA と KaiB が競合する分子機構の解明のため、今後、SasA-KaiC 複合体と KaiB-KaiC 複合体の違いを、より詳細に解明していく予定である。

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)

研究成果は全て、旧姓の村上怜子 (Reiko Murakami) で発表している。

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Sugiyama, M.,*, Hirokazu Yagi, H.,*, Ishii, K., Porcar, L., Martel, A., Oyama, K., Noda, M., Yunoki, Y., Murakami, R., Inoue, R., Sato, N., Oba, Y., Terauchi, K., Uchiyama, S. & Kato, K. (2016) Structural characterization of the circadian clock

protein complex composed of KaiB and KaiC by inverse contrast-matching small-angle neutron scattering. *Sci. Rep.* DOI: 10.1038/srep35567.

- (2) Murakami R, Mutoh R, Ishii K, Ishiura M. (2016) Circadian oscillations of KaiA-KaiC and KaiB-KaiC complex formations in an in vitro reconstituted KaiABC clock oscillator. *Genes Cells*. 8: 890-900. doi: 10.1111/gtc.12392.

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 村上怜子、矢木宏和、石井健太郎、柚木康弘、石浦正寛、加藤晃一、藍色細菌の時計関連タンパク質 SasA が生物時計によって発振される時間情報を出力する分子機構の解明、超異分野学会、京都、オムロン京都センタービル啓真館、2016年3月19日
- (2) YUNOKI, Yasuhiro · ISHII, Kentaro · MURAKAMI, Reiko · NODA, Masanori · YAGI, Hirokazu · INOUE, Rintaro · SUGIYAMA, Masaaki · UCHIYAMA, Susumu · KATO, Koichi, Conformational and Stoichiometric Characterization of Protein Complexes by Small-angle Neutron Scattering in Conjunction with Native Mass Spectrometry、日本化学会大96春季年会、京都、同志社大学、京田辺キャンパス、2016年3月24-27日
- (3) Yunoki, Y. Sugiyama, M., Yagi, H., Ishii, K., Oyama, K., Porcar, L., Martel, A., Noda, M., Murakami, R., Inoue, R., Sato, N., Oba, Y., Terauchi, K., Uchiyama, S., Kato, K. Structural characterization of circadian clock protein complexes by small-angle neutron scattering and native mass spectrometry analyses、新学術領域「動的秩序と機能」第5回国際シンポジウム、平成29年1月22日-22日、東京大学、東京
- (4) 柚木康弘、杉山正明、矢木宏和、石井健太郎、大山克明、Lionel Porcar, Anne Martel, 野田勝紀、村上怜子、井上倫太郎、佐藤伸浩、大場洋次郎、寺内一姫、内山進、加藤晃一、物理化学的計測による時計タンパク質複合体の構造解析、第81回生化学会中部支部会、2017年5月20日、名古屋市立大学、名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷山 怜子(村上怜子)

TANIYAMA Reiko (MURAKAMI Reiko)

名古屋市立大学薬学研究科・研究員

研究者番号：00444365