

令和元年6月10日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14685

研究課題名(和文) 時計タンパク質KaiCの立体構造とATPase活性に基づく古地球自転周期の考察

研究課題名(英文) Structures and Activities of Clock Protein KaiC Encoding the Earth Rotation from the Ancient Time

研究代表者

古池 美彦 (Furuike, Yoshihiko)

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：70757400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生物は24時間周期の地球自転に対応するため体内時計システムを有しています。光合成生物のシアノバクテリアにおいて中心的な役割を担っているのが二重リング構造をもつKaiCというタンパク質です。KaiCは一方のリングでATPを加水分解してシステム全体の速度を調節しながら、もう一方のリングで自己リン酸化と脱リン酸化を繰り返すことで24時間周期の振動を生み出しています。KaiCは反応に伴い様々な構造をとって刻々と時間を表現するはずですが、その詳細は分かっていません。本課題によって太古の昔からKaiCが多様な化学状態を内包するための柔軟な構造特性をもっていることが明らかになりつつあります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計の仕組みを解明するためには、ナノサイズの構成部品である遺伝子やタンパク質の構造変化(空間情報)に基づき化学反応機構(空間情報から時間情報への変換)を明らかにして、そこから地球自転周期という時間情報を抽出する必要があります。したがって体内時計研究の進展そのものは、これまで空間情報の収集に関心の高かった構造生物学に時間方向への視点の転換を促すことに繋がります。放射光施設等を活用した本課題の一定の進捗により、少なくとも10億年以上前には成立した多様で特異なKaiC構造が明らかになりつつありますが、今後は他の手法を組み合わせることで多角的に議論を深める必要があります。

研究成果の概要(英文)：Various organisms on the Earth possess biological clock systems for adapting to the environment which changes with a 24-hours period. The clock system of cyanobacteria is driven by a clock protein, KaiC. A unique double-ring shaped structure of KaiC achieves two functions simultaneously. The speed of the whole system is determined by the ATPase ring of KaiC, while the rhythm is amplified in the phosphorylation ring. In this research, we mainly conducted the structural analysis of KaiC to clarify the relationships between the two rings. We succeeded to observe diverse molecular structures of KaiC which were different from ones previously deposited in the data bank. The results enabled us to investigate the structural flexibility of KaiC accommodating various chemical states in order to encode the Earth rotation from the ancient time.

研究分野：構造生物化学

キーワード：概日時計 時計タンパク質 KaiC X線結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球上の多くの生物は 24 時間の自転周期に対応しながら生息している。行動科学、栄養科学、生態学など多くの学術分野において確認されている生命活動の概日リズムは生体に組み込まれた生物時計システムによって駆動されている。一般的に生物時計システムは複数の時計遺伝子とそれらの転写翻訳産物である時計タンパク質によって構成されており、時計タンパク質による時計遺伝子の不活性化、すなわちネガティブフィードバックによるリズム生成が生物時計システムの基本原理であるとされてきた。しかしながらシアノバクテリア(藍藻)を用いた研究の目覚ましい進展により、時計遺伝子の活動を伴わず時計タンパク質のみによって構成される生物時計システムの存在が広く知られるようになった。シアノバクテリアの 3 種の時計タンパク質は KaiA, KaiB, KaiC と呼ばれ、これらは ATP の存在下において離合集散を繰り返して 24 時間周期の振動反応を織り成す。なかでも中核となる KaiC は ATP を加水分解することで振動反応全体のスピードを調整しながら、自己リン酸化/脱リン酸化を繰り返して 24 時間周期のリズムを生み出す(24 時間周期の自律振動性)。また KaiC の活性は温度にほとんど依存せず(温度補償性)、温度などの外部刺激によって振動反応の位相はリセットできる(同調性)。こうした Kai タンパク質の特徴は高等生物の体内時計システムにおいても共通に見られる。時計タンパク質のみによって進行するこの特異な振動反応は試験管内において再構成できるため、生物時計システムの物理化学的研究において格好の材料となっている。

シアノバクテリアと Kai タンパク質の歴史について遡ってみると、25 億年前の光合成開始および大酸化イベントとほぼ同期して KaiC の成り立ちがあったと考えられている。AAA<sup>+</sup>ファミリータンパク質を起源として N 末側ドメインが、さらに遺伝子重複等により C 末側ドメインが誕生したとの説がある。他の多くの ATP 加水分解酵素と同様に KaiC の N 末側ドメインと C 末側ドメインはそれぞれリング状のホモ六量体を形成する(C1 リングおよび C2 リング)。C1 リング、C2 リング共にプロトマー界面には ATP もしくは ADP が結合でき、それぞれのプロトマーは異なるリン酸化状態をとることができる。KaiC の歴史的な成り立ちや温度補償性などの特異な機能から考えると、こうした多様な化学状態を内包する KaiC 二重リングの柔軟な構造動態は生物時計のメカニズムを考えるうえで非常に重要な論点であるが、これまで検討されてこなかった。

### 2. 研究の目的

本課題の目的としては以下の 4 点が挙げられる。

#### (1) 祖先型 KaiC の構造推定

多様な化学状態を許容する KaiC の二重リング構造および ATP 結合部位やリン酸化部位といった機能の根幹に関わる領域の祖先型アミノ酸配列における保存性を明らかにする

#### (2) KaiC が二重リング構造をもつことの意義

ATP 加水分解によって生物時計の速度を規定する C1 リングとリン酸化部位を有する C2 リングの構造上の関係性を明らかにする

#### (3) KaiC の活性部位における水分子結合サイトの同定

ATP 加水分解および脱リン酸化等に関わる水分子を同定し、二重リング構造における水分子と水素結合の影響と役割を明らかにする

#### (4) 生物時計システムの長時間追跡実験の高効率化

数日間にわたる振動反応実験と解析のハイスループットシステムを開発し、(1) - (3) に関わる変異体等の大規模スクリーニングを実施する

### 3. 研究の方法

研究の目的に挙げた 4 点に対し、以下のように研究を進めた。

#### (1) 祖先型 KaiC の構造推定

祖先型 KaiC のアミノ酸配列を推定するために、50 種以上の現生シアノバクテリア由来の KaiC ホモログのシーケンス情報を収集した。系統解析ソフトウェアを用いて系統樹を描画し、分岐点上に祖先型 KaiC の情報を得た。祖先型と現生型の詳細なアミノ酸配列の比較により、KaiC の特徴的な構造が共有されているかを考察した。

#### (2) KaiC が二重リング構造をもつことの意義

ATP/ADP を結合した状態、リン酸化/脱リン酸化した状態、およびそれらが組み合わされた状態の KaiC 構造を観察するために全長 KaiC の六量体に対して複数の結晶化条件を検討し、得られた多数の結晶を分子科学研究所内に設置された実験室系 X 線回折計 FR-X により評価したのち、大型放射光施設 SPring-8 にて中 - 高分解能の構造解析を行った。

### (3) KaiC の活性部位における水分子結合サイトの同定

KaiC のナノスケールの二重リング構造動態と活性部位におけるサブナノスケールの現象の関連を明らかにするために好熱性シアノバクテリア由来 KaiC の結晶品質を向上させた。さらに抗凍結条件を最適化して高分解能の構造解析を行った。得られた電子密度に明確な水分子のピークを多数同定し、アミノ酸残基の詳細な側鎖配向を決定した。

### (4) 生物時計システムの長時間追跡実験の高効率化

数日から数週間におよぶ振動反応を追跡するために分取ピペットと温度制御テーブルを実装した自動化装置および電気泳動の結果得られるリン酸化状態比率の解析を高効率に行うためのソフトウェアを開発した。またこれらの自動化/半自動化システムを用いて変異体等のスクリーニングを実施した。

## 4. 研究成果

研究の目的に掲げた4点に対し、以下のように研究を進展させることができた。

### (1) 祖先型 KaiC の構造推定

10 億年以上前の太古地球において存在しえた KaiC は既に N 末側ドメインと C 末側ドメインの両方を有し、ATP 結合部位およびリン酸化部位も現生のものと同等のアミノ酸配列となっていた(図1)。他にも祖先型 KaiC は Arg フィンガーや触媒性 Glu 残基など多くの必須条件を備えていることが判明し、KaiC は太古から現在にいたるまで普遍的にヌクレオチドとリン酸の結合・解離を許容する二重リング構造をとってきたと推察される。

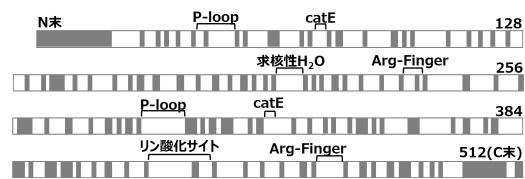


図1：系統樹から推定された祖先型配列

基本的な機能(P-loop, 触媒Glu残基(catE), Argフィンガー, リン酸化サイト)が備わっている。保存領域と非保存領域はそれぞれ白と黒で区別している。

### (2) KaiC が二重リング構造をもつことの意義

多様な化学状態をとりうる全長 KaiC の結晶化には一般的なタンパク質結晶化条件が有効でない場合があり、実際の結晶構造の発表はこれまで米国の単独の研究グループに独占されてきた。課題開始当初から新たな視点を導入した幅広い結晶化条件のスクリーニングの再検討を行って KaiC の結晶化条件を確立し、複数の晶系において中～高分解能の構造を構築することに成功した(図2)。得られた複数の結晶構造はそれぞれ異なるリン酸化状態にあり、ATP 加水分解部位とリン酸化部位のカップリング機構を考える材料が揃ったといえる。構造精密化ののちに構築された複数の分子モデルは、少なくとも十数種類の構造をとっており、KaiC の多様な構造が確認された。こうした構造多様性と溶液中における振動反応との関連については新たな生化学実験をデザインし実施する必要がある。

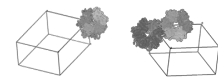


図2：様々な晶系と位相決定  
複数の結晶化条件で見出された代表的な結晶格子の例

### (3) KaiC の活性部位における水分子結合サイトの同定

好熱性シアノバクテリアから同定されたホモログ KaiC の結晶化条件を絞り込み高分解能構造の取得に成功した(図3)。(2)において得られた構造との比較検討の結果、ATP 結合部位、リン酸化部位は細部にわたって共通の構造をとっており、二次 四次構造にいたるナノスケールにおいても類似の構造が見られた。ATP に配位結合する Mg(II)イオンの八面体構造が明瞭に確認され、プロトマー界面に入り込む多数の水分子が観察された。水和水を含めて千数百個の水分子を同定することに成功した。

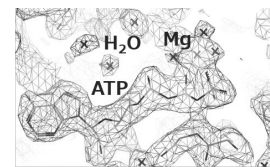


図3：高分解能データの電子密度  
明確に観測されたATP, Mgイオン, 水分子の電子密度

### (4) 生物時計システムの長時間追跡実験の高効率化

振動反応を追跡するための装置およびデータ分析を迅速に行うためのソフトウェアを独自開発した(図4)。これらの自動/半自動化により従来では数日間にわたって複数の人員が必要となっていた実験の労力を大幅に削減することに成功し、大規模な変異体スクリーニングや生化学条件スクリーニングを実施できる見込みとなった。

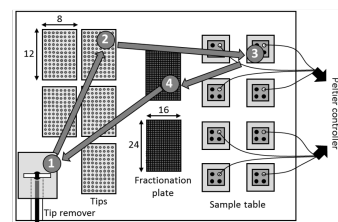


図4：自動サンプリング装置のデザイン

サンプル分取のピペットがペルチエコントローラによって温度制御されたサンプルテーブルとチップストレージを往復する基本動作

以上のように当初掲げた一連の課題に取り組み、一定の成果を挙げた。一方で系統樹計算および祖先型配列の推定など難点にも当たったが、解決に向けての道筋についても把握することができ、今後の課題を明確にすることができた。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計7件)

秋山修志、古池美彦、向山厚、変化し続ける概日時計研究のかたち、時間生物学、24巻2号、2019年、67-73。(査読有り)

<http://chronobiology.jp/journal/JSC2018-2-092.pdf>

Mukaiyama Atsushi, Dongyan Ouyang, Yoshihiko Furuike, and Shuji Akiyama, KaiC from a cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 retains functional and structural properties required as the core of circadian clock system, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol.131, 2019, 67-73。(査読有り)

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.051>

Atsushi Mukaiyama, Yoshihiko Furuike, Jun Abe, Eiki Yamashita, Takao Kondo, and Shuji Akiyama, Conformational rearrangements of the C1 ring in KaiC measure the timing of assembly with KaiB, *Scientific Reports*, vol.8, 2018, 8803-8813。(査読有り)

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27131-8>

Shuji Akiyama, Atsushi Mukaiyama, Jun Abe, and Yoshihiko Furuike, Cyanobacterial circadian clock system: how and why can it be so slow and stable?. *Biological Clocks: with reference to suprachiasmatic nucleus*, 2017, 73-77。(査読有り)

Yoshihiko Furuike, Jun Abe, Atsushi Mukaiyama, and Shuji Akiyama, Accelerating in vitro studies on circadian clock systems using an automated sampling devices. *Biophysics and Physicobiology*, vol.13, 2016, 235-241。(査読有り)

[https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0\\_235](https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_235)

古池美彦、宮原郁子、神谷信夫、Mn(II)イオンの結合によって誘起される結晶相 ADP リボース加水分解酵素反応の観察、*日本結晶学会誌*、58巻4号、2016年、186-192。(査読有り)

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcrsj/58/4/58\\_186/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcrsj/58/4/58_186/_pdf)

Yoshihiko Furuike, Yuka Akita, Ikuko Miyahara, and Nobuo Kamiya, ADP-Ribose Pyrophosphatase Reaction in Crystalline State Conducted by Consecutive Binding of Two Manganese(II) Ions as Cofactors. *Biochemistry*, vol.55(12), 2016, 1801-1812。(査読有り)

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00886>

### [学会発表](計13件)

古池美彦、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志、好熱性藍藻に由来する時計タンパク質 KaiC の活性部位における水和構造、平成 30 年度日本生物物理学会中部支部例会、2019 年

古池美彦、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志、時計タンパク質 KaiC に組み込まれたアロステリック制御、平成 30 年度日本結晶学会年会、2018 年

Yoshihiko Furuike, Atsushi Mukaiyama, Eiki Yamashita, Takao Kondo, and Shuji Akiyama, Searching Allosteric Pathways in Clock Protein KaiC Responsible for Temperature Compensation、平成 30 年度日本生物物理学会年会、2018 年

古池美彦、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志、時計タンパク質 KaiC に組み込まれたアロステリック制御、*CyanoClock 1.0*、2018 年

Yoshihiko Furuike, Atsushi Mukaiyama, Eiki Yamashita, Takao Kondo, and Shuji Akiyama, Identification of Clock Protein KaiC Mutants Losing Temperature Compensation Ability, 第二回名古屋リズム研究会、2018 年

Yoshihiko Furuike, Atsushi Mukaiyama, Eiki Yamashita, Takao Kondo, and Shuji Akiyama, Identification of Clock Protein KaiC Mutants Losing Temperature Compensation Ability, 平成 29 年度日本生物物理学会中部支部例会、2018 年

古池美彦、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志、リン酸化および脱リン酸化した時計タンパク質 KaiC の結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析、2017 年

古池美彦、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志、リン酸化および脱リン酸化した時計タンパク質 KaiC の結晶構造解析、平成 29 年度日本結晶学会年会、2017 年

Yoshihiko Furuike, Atsushi Mukaiyama, Eiki Yamashita, Takao Kondo, and Shuji Akiyama, Identification of Clock Protein KaiC Mutants Losing Temperature Compensation Ability, 平成 29 年度日本生物物理学会年会、2017 年

Yoshihiko Furuike, Jun Abe, Atsushi Mukaiyama, Eiki Yamashita, Takao Kondo, and Shuji Akiyama, Functional and Structural Study on Peptide Isomerization in KaiC, *Circadian Clock of Cyanobacteria during 1991-2017 (国際学会)*、2017 年

古池美彦、阿部淳、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志、KaiC における主鎖異性化反応の意義、平成 28 年度日本生物物理学会年会中部支部例会、2017 年

Yoshihiko Furuike, Jun Abe, Eiki Yamashita, Takao Kondo, and Shuji Akiyama, Structural

Difference between Phosphorylated and Dephosphorylated States of Clock Protein KaiC,  
平成 28 年度日本生物物理学会年会、2016 年  
古池美彦、阿部淳、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志、KaiC における主鎖異性化反応  
の意義、平成 28 年度時間生物学会年会、2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。