

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14667

研究課題名（和文）概日リズム発振にともなうKai複合体の構造変化の経時的解析

研究課題名（英文）Analysis of structural changes in the Kai complex during circadian oscillation

研究代表者

武藤 梨沙（Mutoh, Risa）

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：10622417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、部位特異的スピンラベル電子スピン共鳴（SDSL-ESR）法を用いた。KaiB上の任意の位置にCys残基を導入し、スピンラベル（MTSSL）を化学修飾で付加した。ラベル化したKaiBとKaiAのC末端ドメインタンパク質を混合し、反応させるとKaiBからMTSSLの遊離が観察されたことから、KaiB上のKaiA相互作用部位を決定した。次に、KaiABC三者共存下でESR測定を行い、スピンラベルがいつ遊離するのかを検証した。その結果、反応開始12時間後からスピンラベルが遊離した。この結果から、KaiA-KaiBは12時間頃から相互作用を開始することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでも、KaiABC三者共存下で、複合体が経時的に変化していることは報告されていた。また、電子顕微鏡解析によりKaiABC複合体構造も明らかにされた。本研究では、具体的にいつ、どこでKaiA-KaiBが相互作用するのかを明らかにし、またKaiAのN末端ドメインの構造変化を示唆するデータを得た。SDSL-ESR法を用いた本解析では、全長タンパク質を用いており、より生理的条件に近い状態を反映している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used a site-specific spin-labeled electron spin resonance (SDSL-ESR) method. An arbitrary position on KaiB was substituted by Cys residue and a spin label (MTSSL) was introduced into Cys residue. The KaiA interaction site on KaiB was determined by detecting released MTSSL from KaiB when the labeled KaiB and KaiA C-terminal domain proteins were mixed and reacted at physiological temperature. Next, ESR measurements were performed in the presence of the KaiABC mixture to verify when the spin label was released. As a result, the spin label was released 12 hours after the start of the reaction. This result indicates that the KaiA-KaiB interaction starts around 12 hours.

研究分野：生物物理

キーワード：時計タンパク質 藍色細菌 核磁気共鳴法 電子スピン共鳴法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上に生息する多くの生物は、様々な生理活性を約 24 時間周期で自律的に振動させている。この『概日リズム』を制御する細胞内分子機構を『生物時計』と呼ぶ。藍色細菌の生物時計研究は、1998 年に時計遺伝子や時計関連遺伝子が発見されて以来 (Ishiura et al., 1998) 分子生物学的解析が進められてきた。その後、生物時計の時計分子装置本体が時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC の 3 つであること、それらを試験管内で混合すると ATP 存在下で KaiC のリン酸化レベルや ATPase 活性が約 24 時間周期で変動することが明らかになり (Nakajima et al., 2005; Terauchi et al., 2007) 生化学的解析や構造生物学的解析を中心に研究が展開されるようになった。これまでに、KaiA

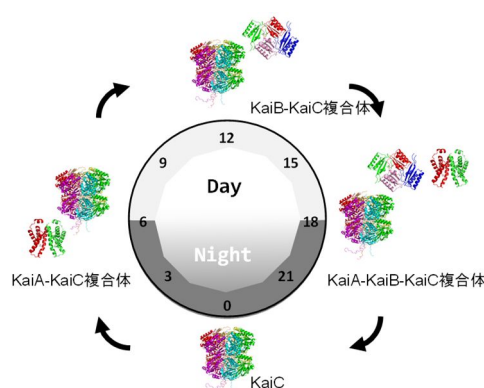


Fig. 1 Kaiタンパク質のKai複合体形成モデル

(Uzumaki et al., 2004) KaiB (Iwase et al., 2005) KaiC (Pattanayek et al., 2004) それぞれ単独の X 線結晶構造解析がなされ、Kai タンパク質の機能解析も飛躍的に進んだ。さらに X 線小角散乱や電子顕微鏡解析により KaiA-KaiC 複合体、KaiB-KaiC 複合体、KaiA-KaiB-KaiC 複合体のモデルが発表された (Akiyama et al., 2008; Pattanayek et al., 2011) 。

しかし、低分解能のため相互作用部位の詳細は未解明であった。その後、X 線結晶構造解析による KaiB-KaiC 複合体の構造 (Tseng et al., 2017) とクライオ電子顕微鏡解析による KaiA-KaiB-KaiC 複合体の構造 (Snijder et al., 2017) が発表され、Kai 複合体の詳細な構造が明らかとなったが、これらはリズム発振中に形成される多様な複合体のうちの一つでしかなく (Fig. 1) KaiA、KaiB、KaiC がいつ、どのような複合体を形成するのか、経時的に明らかにした研究はまだない。

2. 研究の目的

藍色細菌の生物時計分子装置は、3 つの Kai タンパク質が 24 時間周期で会合・解離を繰り返すことで作動している。この作動原理を解明するためには、リズム発振中に形成される多様な Kai 複合体構造とそれらが形成される時刻を明らかにする必要がある。本研究課題では、リズム発振中に形成されるすべての Kai 複合体の会合・解離の時刻を決定し、Kai 複合体が形成される際の KaiA と KaiB の構造変化を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、Kai タンパク質間相互作用を感度よく測定するために電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いる。ESR 法は回収した試料を溶液状態のまま測定でき、測定時間も短いいため Kai 複合体の構造変化を経時的に観測することが可能である。

- (1) システイン (Cys) 残基へ特異的に結合するラベル化剤 (スピンラベル) を用いて、部位特異的にラベル化する (SDSL-ESR 法)。本研究では、ニトロキシドラジカルを持つスピンラベル (MTSSL) を化学修飾により KaiB へ導入する (Fig. 2)。これにより、KaiB 上の KaiA 相互作用部位を網羅的に解析する。
- (2) KaiA の N 末端に His タグを付加する。この His タグに Cu^{2+} を付加し、ESR 測定を行う (Fig. 3)。 Cu^{2+} 間距離を測定することで、N 末端ドメインの構造変化を捉える。

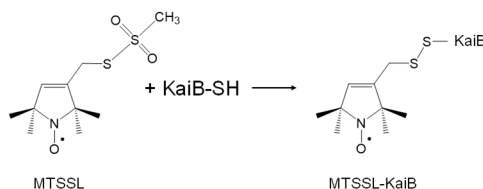


Fig. 2 スピンラベルとKaiBの反応

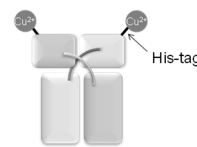


Fig. 3 His-tagへの Cu^{2+} 付加モデル

4. 研究成果

(1) Cys スキャンニングによる、KaiB 上の KaiA 相互作用部位の同定

KaiB 上の KaiA 相互作用部位を同定した。KaiB は、単独で 2 量体-2 量体の 4 量体を形成する (Iwase et al., 2005) 。

2 量体-2 量体境界面には、活性残基が集まっており、KaiA や KaiC と相互作用する際には、露出し、単量体へと構造変化する。ここでは、活性中心部位を中心に、N 末端ループ、C 末端ループを含めて、20 種類の Cys 残基導入変異体 KaiB を作製し、MTSSL を導入した。以下に導入部位の一例を示した (Fig. 4) 。

これらのラベル化タンパク質と、KaiA の C 末端ドメインタンパク質 (KaiAc) を 40 で 3 時間反応させ、反応前と反応後の ESR スペクトルをそれぞれ測定した。

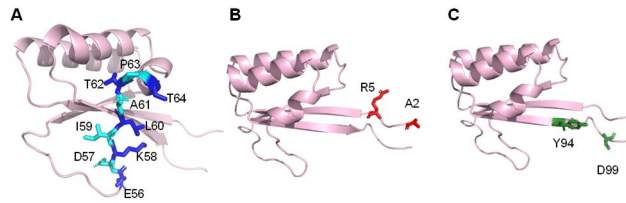


Fig. 4 KaiB上のCys残基導入部位の一例

MTSSL-KaiB_{E55C}では、スピンラベルの遊離は見られなかった(Fig. 5A)。隣接するMTSSL-KaiB_{E56C}では、KaiA_C添加によるスペクトル変化が観察され(Fig. 5B)、保温前と後の差スペクトルから、等価な3本のピークが得られた。これは、KaiAに内在するCys残基が、MTSSLとKaiB間のS-S結合を還元したことにより、ラベルが遊離したと考えられる。脱塩カラムにおいて反応後のMTSSL-KaiB_{E56C}-KaiAの低分子画分を回収した。それをESR測定したところ、差スペクトルと同様に等価な3本のピークが得られ、スピンラベルが遊離したことを確認した。ほかのKaiB Cys残基置換変異体においても同様に実験を行ったところ、KaiB_{D57C}からKaiB_{P63C}まで、遊離量に差はあるものの(Fig. 5C, D)、すべてにおいてスピンラベルの遊離が観察された。一方、KaiBのN末端ループ(Fig. 4B)とC末端ループ(Fig. 4C)にもMTSSLを導入し、同様の実験を行ったが、これらの部位では、いずれもスペクトル変化は見られず、これらの部位はKaiAの相互作用部位ではないことが示された(Mutoh et al., in preparation)。

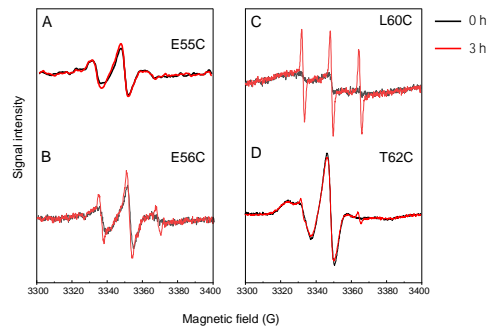


Fig. 5 ESRスペクトルの変化
黒：0 h, 赤：40 3 h保温

(2) KaiA-KaiB 相互作用時刻の決定

(1)の結果のうち、KaiA_{WT}ではスペクトルが変化せず、KaiA_Cのときのみスペクトルが変化する変異体があった(MTSSL-KaiB_{E56C}、MTSSL-KaiB_{D57C})。これは、KaiAのN末端ドメインがKaiBとの相互作用を阻害していることを示唆している。そこで、MTSSL-KaiB_{E56C}とKaiA、KaiCを混合してESR測定を行えば、KaiAのN末端ドメインが構造変化する時間帯すなわちKaiA-KaiB相互作用時刻を決定できるのではないかと考えた。

まず、MTSSL-KaiB_{E56C}の活性を確認するため、MTSSL-KaiB_{E56C}、KaiA、KaiCを混合し、4時間ごとに試料を回収した。SDS-PAGEを行い、リン酸化バンドと非リン酸化バンドに分離した(Fig. 6A)。それぞれのバンドからリン酸化KaiCの割合を求めグラフにプロットした(Fig. 6B)。その結果、MTSSL-KaiB_{E56C}を用いてもリン酸化リズムに影響がないことがわかった。次に、これらの試料を用いて、ESR測定を行った。KaiABC三者混合のESRスペクトルから、KaiB単独のESRスペクトルの差スペクトルを取り、3本のピークのうち、一番高磁場側のピーク(h_1)を用いて、そのシグナル強度の変化をプロットした(Fig. 6C)。その結果、12時間目までは変化がなかったが、16時間目以降の差スペクトルではシャープな3本のピークが検出された。以上の結果から、KaiABC三者共存下では、12時間目以降にKaiAとKaiBが相互作用することが明らかになった(Mutoh et al., in preparation)。

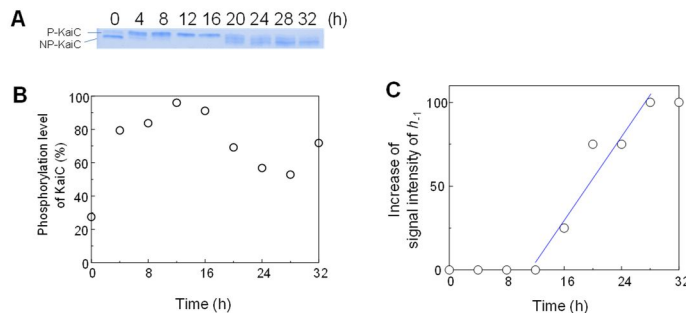


Fig. 6 (A, B) MTSSL-KaiB_{E56C}, KaiA, KaiC混合下でのリン酸化レベルの変化
(C) 3者混合下でのESRスペクトルのシグナル強度変化

(3) His-tag 付加による KaiA の構造変化の解析

(2)で得られた、KaiAのN末端ドメインの可動を検証するため、パルスESR法によりN末端ドメインの距離を測定しようと試みた。KaiAには、内在するCys残基が6つあり、任意の位置にスピンラベルを導入するためにはそれらをAlaやSerに置換する必要がある。しかし、多くの場

合、内在の Cys 残基に変異を導入すると、タンパク質の変性や活性の低下につながる。そこで、スピラベルの代わりに Cu^{2+} を付加したパルス ESR 法を検討した。

まず、KaiA の N 末端に His タグを付加した (His-KaiA)。そこへバッファーで調製した硫酸銅水溶液を添加した。CW-ESR で確認したところ、Cu のピークが検出され、付加できたことを確認した。次に、KaiC を添加し、ESR スペクトルが変化するか否かを観察した。その結果、ESR スペクトルに変化は見られなかった。これは、ESR 測定条件が適切でないのか、または KaiA-KaiC 複合体が形成されていない可能性が考えられた。そこで、His-KaiA が KaiC リン酸化促進能を持つのか否かを確認した。KaiA_{WT} または His-KaiA に KaiC を添加し、0、1、3、5、24 時間後に試料を回収し、SDS-PAGE を行った。His-KaiA の活性は KaiA_{WT} の約 8 割であることが分かった (Fig. 7)。同様に試料を回収し、Native PAGE で KaiA-KaiC 複合体を確認したところ、His-KaiA では安定な複合体を確認することはできなかった。今回、His-tag を付加した N 末端側は、KaiC と直接の相互作用はないとされている。しかし、His-tag 付加によって、活性や複合体形成に影響が出たことから、His タグを付加したことにより KaiA の N 末端側の電荷が変わり、それが KaiC との相互作用に影響を及ぼしたのではないかと考えられる。今後、N 末端ドメインの構造変化を検証するためには、電荷をもたないラベルの修飾などを用いる必要がある。

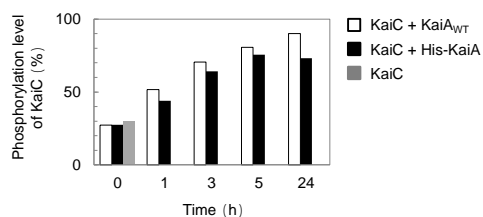


Fig. 7 KaiAによるKaiCリン酸化促進率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kondo Toru, Mutoh Risa, Tabe Hiroaki, Kurisu Genji, Oh-Oka Hirozo, Fujiyoshi Satoru, Matsushita Michio	4. 巻 11
2. 論文標題 Cryogenic Single-Molecule Spectroscopy of the Primary Electron Acceptor in the Photosynthetic Reaction Center	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3980 ~ 3986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c00891	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 Matsuo Takuya, Iida Takahiro, Ohmura Ayumi, Gururaj Malavika, Kato Daisaku, Mutoh Risa, Ihara Kunio, Ishiura Masahiro	4. 巻 16
2. 論文標題 The role of ROC75 as a daytime component of the circadian oscillator in Chlamydomonas reinhardtii	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008814	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 Mutoh Risa, Iwata Keita, Iida Takahiro, Ishiura Masahiro, Onai Kiyoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Rhythmic adenosine triphosphate release from the cyanobacterial circadian clock protein KaiC revealed by real time monitoring of bioluminescence using firefly luciferase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 83 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12825	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 Tohda Rei, Tanaka Hideaki, Mutoh Risa, Zhang Xuhong, Lee Young-Ho, Konuma Tsuyoshi, Ikegami Takahisa, Migita Catharina T., Kurisu Genji	4. 巻 296
2. 論文標題 Crystal structure of higher plant heme oxygenase-1 and its mechanism of interaction with ferredoxin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100217 ~ 100217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.ra120.016271	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 Grabsztunowicz Magda, Mulo Paula, Baymann Frauke, Mutoh Risa, Kurisu Genji, S?tif Pierre, Beyer Peter, Krieger Liszkay Anja	4. 巻 99(2)
2. 論文標題 Electron transport pathways in isolated chromoplasts from Narcissus pseudonarcissus L.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 245-256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14319	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 武藤梨沙、河合 (久保田) 寿子、池上貴久	4. 巻 59
2. 論文標題 光化学系I-アナログフェレドキシン複合体の構造解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 32-33
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 -

1. 著者名 Kubota-Kawai H, Mutoh R, Shinmura K, Setif P, Nowaczyk MM, Roegner M, Ikegami T, Tanaka H, Kurisu G.	4. 巻 4
2. 論文標題 X-ray structure of an asymmetrical trimeric ferredoxin-photosystem I complex.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 218-224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0130-0.	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 Grabsztunowicz M, Mulo P, Baymann F, Mutoh R, Kurisu G, Setif P, Beyer P, Krieger-Liszkay A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Electron transport pathways in isolated chromoplasts from Narcissus pseudonarcissus L.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Journal	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/tpj.14319.	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

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mutoh R, Iida T., Mino H.
2. 発表標題 The determination of the interacting time between KaiA and KaiB during circadian oscillation.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武藤梨沙、飯田高広、三野広幸
2. 発表標題 概日リズム発振中のKaiA-KaiB相互作用時刻の決定
3. 学会等名 電子スピンスイェンス学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mutoh, R., Kubota-Kawai, H., Muraki, N., Tanaka, H., Ikegami, T., Kurisu, G.
2. 発表標題 Structural analyses of photosystem I-ferredoxin complex
3. 学会等名 The 6th Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mutoh, R., Iida, T., Mino, H., Ishiura, M.
2. 発表標題 Protein interactions in the in vitro cyanobacterial circadian clock system revealed by SDSL-ESR
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kishimoto, H., Nagaoka, T., Azai, C., Mutoh, R., Tanaka, H., Miyanoiri, Y., Kurisu, G., Oh-oka, H.
2. 発表標題 Isolation of the Rieske/cytochrome b complex from green sulfur bacteria and interaction of the Rieske protein with cytochrome c-556
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田明香音、武藤梨沙、得津隆太郎、皆川純、山本大輔
2. 発表標題 強光下における光合成膜内タンパク質の動的挙動解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩戸将貴、飯田高広、三島正規、池上貴久、武藤梨沙
2. 発表標題 時計タンパク質Kai複合体の機能と構造解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤梨沙
2. 発表標題 ESR法を用いた藍色細菌時計タンパク質間相互作用部位の同定と経時的構造変化の解析
3. 学会等名 サントリー生有研シンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤梨沙、河合（久保田）寿子、村木則史、池上貴久、栗栖源嗣
2. 発表標題 光化学系I-フェレドキシン複合体の構造解析
3. 学会等名 NMR若手研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Nakaniwa, R. Mutoh, K. Fushimi, A. Yasuda, T. Mizoguchi, H. Tamiaki, C. Azai, H. Tanaka, S. Itoh, H. Oh-oka, G. Kurisu
2. 発表標題 X-ray structure of the type-I reaction center from <i>Heliobacterium modesticaldum</i> at 3.2 resolution
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018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