

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06530

研究課題名(和文) 生物時計の圧力応答研究

研究課題名(英文) Pressure effects on the cyanobacterial circadian clock

研究代表者

北原 亮 (Kitahara, Ryo)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：70512284

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)：シアノバクテリアの概日時計はKaiA, KaiB, KaiCと呼ばれる3種類のタンパク質によって構成されている。概日時計は温度によって周期長が変化しない性質(温度補償性)を持つことが知られているが、圧力やpH、有機小分子に対する応答については知られていない。我々は、1気圧下で22時間である周期長が200気圧下14時間、400気圧で11時間まで短縮すること、ATPase活性が加圧によって上昇したことが要因と解明した。また、ATPase活性は、遷移状態で体積が収縮することを見出した。周期長変異体KaiC-R393C、F470Yの圧力応答も観測し、周期長やATPaseの活性化体積の違いを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含めた地球上の生物は地球の自転に同調した生物リズムを有する。本研究では、最も構造生物学的研究が進んでいるシアノバクテリアの概日時計をモデルとして、その圧力効果を調べた。概日時計は3つのタンパク質KaiA, KaiB, KaiCとATPからなり、KaiCのリン酸化脱リン酸化のサイクルが約24時間の周期を示す。加圧により周期長が短縮すること、短縮はKaiCの有するATP加水分解活性(ATPase活性)の上昇と相関があることを見出した。活性化体積が負であること、つまり反応の遷移状態で体積が収縮することを示す。深海(高圧)など極限環境での生命現象の理解やその環境適応についての知見となる。

研究成果の概要(英文)：Despite broad-scale adaptations of organisms across domains (from bacteria to animals) to various environmental conditions such as temperature, pressure, pH, and salt concentrations, the circadian clock is a shared characteristic as a fundamental timing device. However, the detailed molecular mechanism of each autonomously operating circadian clock remains unclear. The circadian clock of cyanobacteria is controlled by three proteins, KaiA, KaiB, KaiC, and ATP. While the circadian rhythm is inherently robust to temperature change, we found that KaiC phosphorylation cycles were accelerated from 22 h at 1 bar to 14 h at 200 bar and to 11 h at 400 bar, decreasing circadian-period length. This reduction resulted from pressure-induced enhancement of KaiC ATPase activity and allosteric effects. This relationship was also investigated in the KaiC mutants, R393C and F470Y.

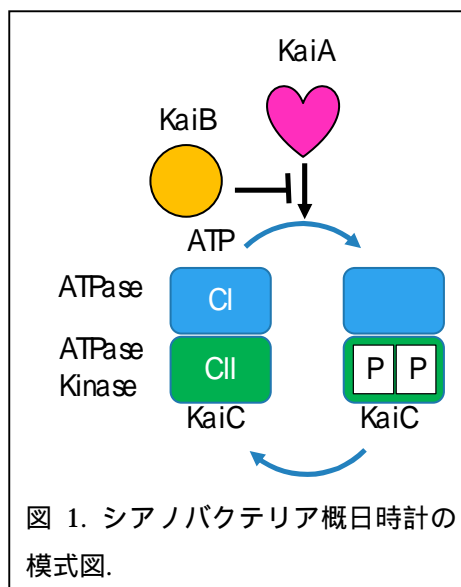
研究分野：構造生物学

キーワード：概日時計 シアノバクテリア 高圧 ATPase

1. 研究開始当初の背景

生命の生息環境の多くは、深海や地中など1気圧以上であるのに対し、生命の圧力に対する応答は、温度応答に比べ著しく未解明である。概日時計は種により異なるタンパク質が関わっているが、地球の自転に同調した24時間という遅い自律的周期を形成し、生理温度付近(25℃~40℃)で周期長が変化しない「温度補償性」という共通した特徴を持つ。シアノバクテリアの概日時計はKaiA-KaiB-KaiCの3つのタンパク質とATPから成り、試験管内でも概日時計を刻む、まさにタンパク質時計である(Nakajimaら Science 2005)(図1)。応募者は、この概日時計が圧力に脆弱であることを発見した(100気圧あたり3.8時間周期長が短縮)。KaiCリン酸化周期について、短周期や長周期を示す周期長変異体は複数報告されているものの、野生型で周期長を極端に短縮した例は初である。

研究課題の核心をなす学術的な「問い」は、生物の概日時計(システム、個体)と周期長を制御する酵素活性(分子)に圧力補償性があるのか?である。



2. 研究の目的

生物の概日周期には広く温度補償性が知られているが、圧力に対する情報は皆無である。圧力補償性はあるのか?という疑問が本研究に至った発端である。熱力学的には、圧力可変実験は体積情報を与える。分子の体積変化は、構造変化とも密接に関係するため、時計制御機構の解明に有効な情報になると考えた。圧力軸実験の特徴: 平衡定数の圧力依存性は、状態間の部分モル体積差(ΔV)の情報を与える。反応速度定数の圧力依存性は、活性化体積(ΔV^\ddagger)の情報を与える。圧力という独創的切り口で、概日時計研究に新たな情報を提供することが目的であり、類似の報告例はなく高い独自性がある。生命現象の圧力応答は、温度応答に比べ未解明な点が多いため、学術的新規性が高く、新たな科学技術につながる可能性を秘める。例えば、シアノバクテリアを含む藻類(クロレラ、ユーグレナなど)は、健康補助食品や工業原料として用途拡大され、光合成を利用したバイオ燃料や水素生産の研究がされている。概日周期の圧力による制御は、微生物を利用した効率的な物質生産につながる可能性がある。また、ヒトを含めた哺乳類では、力を感じるイオンチャンネル(Piezo1, Piezo2)も見つかっている。細胞の力学/圧力応答はメカノバイオロジーとして学術的な発展を見せており、応用研究や新しい技術開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

<タンパク質試料の調整>

大腸菌を用いてシアノバクテリア(*Synechococcus elongatus* PCC 7942)KaiA, KaiB, KaiCタンパク質を発現させ、Strep-tactin Sepharose カラム、Superdex 75PG26/60 カラムを用いて精製した。濃度検定はブラッドフォード法を用いた。緩衝溶液は20 mM Tris-HCl (pH 8.0)で、KaiA, KaiB, KaiCの最終濃度は、0.04 mg/ml, 0.04 mg/ml, 0.2 mg/mlとした。また、KaiCのCIIドメインまたはCIドメインのATP加水分解活性を失活させた変異体(CIモデル、CIIモデル)を作製し、同様な手法で精製した。

<高圧蛍光測定>

蛍光装置(FP-8300、日本分光)および耐圧光学セル(シン・コーポレーション)を用いて高圧下での蛍光測定を行なった。耐圧光学セルの内部セルは石英製で、内径が4 mmである。蛍光測定は、キセノンランプを光源として295 nmで励起し、340 nmのトリプトファン蛍光の時間測定を行なった。蛍光スペクトル測定は290-380 nmで行なった。

<SDS-Pageによりリン酸化KaiCの定量>

KaiA, KaiB, KaiC(それぞれ0.04 mg/ml, 0.04 mg/ml, 0.2 mg/ml)と3 mM ATPをシリコンチューブ内に入れ、目的の圧力と温度でインキュベートし、一定時間間隔でサンプリングし、SDS-Pageによりリン酸化KaiCと非リン酸化KaiCを分離し定量した。

<KaiCのATPase活性測定>

KaiCの全長またはCI, CIIドメイン(0.2 mg/ml)をATP 2 mMを混合しインキュベートした。一定時間間隔でサンプリングし、反応溶液を液体クロマトグラフィー測定し、生成物であるADP

の濃度を定量した。ADP 濃度増加の時間依存性より k_{cat} を算出した。ATP 過剰な条件で、見かけの反応速度定数を酵素濃度で割ることで k_{cat} が算出できる ($k_{obs} = V_{max} = k_{cat} [\text{酵素}]$)。 k_{cat} の圧力依存性から反応に伴う活性化体積を求めた。

4. 研究成果

- (1) 高圧蛍光測定および SDS-Page を用いたリン酸化 KaiC の定量実験から得られたリン酸化周期長は、1 気圧で 21.9 ± 0.7 時間、100 気圧で 17.8 ± 0.6 時間、200 気圧で約 13.2 ± 0.9 時間、300 気圧で約 12.8 ± 0.6 時間、400 気圧で 11.1 ± 0.5 時間と、加圧と共に周期長は短縮することがわかった (表 1)。
- (2) KaiC 全長の ATPase 活性を 1~400 気圧の範囲で、CI ドメイン (CII ドメインを削除) と CII ドメイン (CI-ATPase 活性を E77Q/E78Q 変異により失活) を 1~200 気圧の範囲で測定し、加圧と共に全長とそれぞれのドメインで ATPase 活性が増加することがわかった (表 1)。200 気圧までの範囲の ATPase 活性の圧力依存性から活性化体積 (V) を見積もった。CII ドメインの V は -100 ± 30 mL/mol と CI ドメインのそれに比べ 5 倍大きく、反応に伴う体積収縮が大きい事を示唆する。X 線結晶構造解析からも、CII ドメインには分子内空洞が多いことがわかる。また 1 気圧における KaiC の結晶構造では、ATP に対して加水分解に関わる水分子の位置が反応しにくい位置にあることがわかっている (Abe et al. Science 2015)。遷移状態では、ATP や水分子、触媒残基が反応しやすい位置をとっている可能性が高く、体積収縮を伴うものと考えられる。高圧力下でそのような遷移状態が安定化したといえる。
- (3) KaiC のリン酸化サイクルの周期長および ATPase 活性の圧力依存性を 1 気圧、100 気圧、200 気圧、300 気圧、400 気圧で測定した結果を図 2 にまとめた。周期長と ATPase 活性には正の相関があり、ATPase 活性が 1 day^{-1} 増加すると周期長が 1 h 増加する関係が得られた。KaiC の周期長変異体で知られている相関と概ね一致する結果となった。

表 1. KaiC リン酸化サイクルの周期長と KaiC 全長、CI ドメイン、CII ドメインの ATPase 活性の圧力依存性

Pressure (bar)	周期長 (h)	$k_{cat} \pm \text{stdev} (\text{day}^{-1})$		
		WT	CI	CII
1	21.9 ± 0.7 (n=6)	14 ± 2 (n=25)	11 ± 2 (n=13)	2.3 ± 0.6 (n=11)
100	17.8 ± 0.6 (n=3)	18 ± 4 (n=7)	12.0 ± 0.8 (n=5)	4 ± 1 (n=6)
200	13.3 ± 0.9 (n=3)	22 ± 3 (n=10)	13 ± 1 (n=7)	5 ± 2 (n=6)
300	12.8 ± 0.6 (n=3)	22 ± 1 (n=2)		
400	11.1 ± 0.5 (n=3)	25 ± 3 (n=6)		
活性化体積 ΔV^\ddagger (mL/mol) (1-200 bar)		-57 ± 2	-18 ± 2	-100 ± 30

- (4) KaiC-R393C および F470Y 変異体について ATPase 活性測定を行なった。1 気圧では、それぞれ 20 ± 3 (n=5) と 21 ± 3 (n=4) で、200 気圧では 23 ± 2 (n=5) と 25 ± 2 (n=4) となった。200 気圧での活性増加率は R393C と F470Y でそれぞれ 1.1 倍、1.2 倍となった。野生型の 1.6 倍に比べ優位に小さく、負の活性化体積の絶対値が小さいことが示唆された。

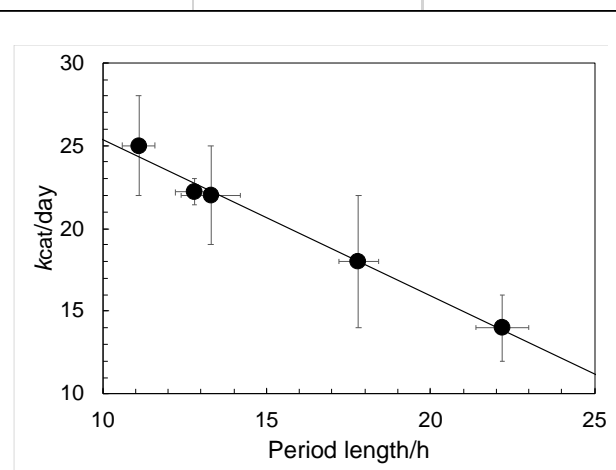


図 2. KaiC リン酸化サイクルの周期長と KaiC ATPase 活性の相関。

(5) 結論

概日時計には温度に影響を受けにくい性質 (温度補償性) が備わっている。これは時計を制御するタンパク質の活性が温度に依存しにくいあるいは相殺する機能を有する事を示唆する。一方、圧力に対しては容易に活性が変化し周期長が変化した。圧力は、分子内空洞が大きいタンパク質に大きな影響を与える。分子進化と分子内空洞との関係性についても今後研究展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 三橋景汰、北原亮	4. 巻 58
2. 論文標題 高圧力が蛋白質に及ぼす影響～圧力で早まるシアノバクテリアの概日時計～	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 579-584
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 Kitahara Ryo, Oyama Katsuaki, Kawamura Takahiro, Mitsuhashi Keita, Kitazawa Soichiro, Yasunaga Kazuhiro, Sagara Natsuno, Fujimoto Megumi, Terauchi Kazuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Pressure accelerates the circadian clock of cyanobacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48693-1	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keita Mitsuhashi, Rina Sakurai, Soichiro Kitazawa, and Ryo Kitahara
2. 発表標題 Pressure-induced acceleration of the cyanobacterial circadian clock
3. 学会等名 第20回蛋白質科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keita Mitsuhashi, Rina Sakurai, Soichiro Kitazawa, Kazuki Terauchi and Ryo Kitahara
2. 発表標題 Pressure-induced acceleration of the cyanobacterial circadian clock
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 三橋景汰、櫻井里菜、北沢創一郎、寺内一姫、北原亮
2. 発表標題 シアノバクテリアの概日時計の圧力応答研究
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三橋景汰、北沢創一郎、寺内一姫、北原亮
2. 発表標題 圧力で早まるシアノバクテリアの概日時計
3. 学会等名 第61回高圧討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Kitahara, Keita Mitsuhashi, Soichiro Kitazawa, Kazuki Terauchi
2. 発表標題 Pressure accelerates the circadian clock of cyanobacteria
3. 学会等名 65th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三橋景汰、大山克明、川村宇宙、北沢創一郎、安永和寛、相良夏乃、藤本恵、寺内一姫、北原亮
2. 発表標題 シアノバクテリアの生物時計は高圧力下でどうなる？
3. 学会等名 第19回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Kitahara, Katsuaki Oyama, Takahiro Kawamura, Keita Mitsuhashi, Soichiro Kitazawa, Kazuhiro Yasunaga, Natsuno Sagara, Megumi Fujimoto, and Kazuki Terauchi
2. 発表標題 Pressure accelerates the circadian clock of cyanobacteria
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井里菜、三橋景汰、北沢創一郎、寺内一姫、北原 亮
2. 発表標題 シアノバクテリア概日時計の圧力依存性 -野生型KaiC および周期長変異型KaiC のリン酸化サイクルについて-
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三橋景汰、北沢創一郎、寺内一姫、北原亮
2. 発表標題 極限環境と概日時計
3. 学会等名 第140回日本薬学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

立命館大学薬学部 生体分子構造学研究室（北原研究室） http://www.ritsumeai.ac.jp/pharmacy/kitahara/kitahara_lab.html

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