

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16061

研究課題名(和文) 太古の地球自転を時計タンパク質の分子構造にみる

研究課題名(英文) Atomic Structures of Clock Protein Reflecting Ancient Earth's Rotation

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) 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を構成する時計タンパク質KaiCが、ATP加水分解とリン酸化・脱リン酸化という二種類の化学反応を利用して、時を刻む仕組みを解明した。各化学反応の重要なステップを捉えた計十種のKaiC結晶構造ライブラリは、KaiCが自身の活性部位内の原子配置、二次構造変換、三次・四次構造を制御することで、概日振動を発生させていた。この仕組みは概日時計の起源に近い祖先型KaiCにおいても既に確立されていたと考えられる。また本研究課題で明らかになったKaiCの動作原理は、複雑多様な機能・構造をもつと考えられる高等生物由来の時計タンパク質が思いのほかシンプルな機構を持つ可能性を示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちヒトを含む生物は、自転する地球の環境に適応して暮らしています。日周環境変動への適応システムは、社会や生態系のような大規模なものから、細胞や生体分子のような微小なものにまで様々なかたちで存在します。概日時計システムは、全長約10nmのタンパク質の化学反応によって駆動されています。分子内では、原子ひとつひとつや、原子の結合によって構成される構造ユニットの運動が、時間帯に応じて精密制御されていることが明らかになりました。本研究の着眼点、手法、成果および創出された学術概念は、様々な生物の概日時計研究に適用でき、また時間を読み取って自律制御する極小デバイスの開発などに知見を与え得ると考えられます。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacterial clock protein KaiC measures time by using two chemical reactions, ATP hydrolysis and (de)phosphorylation. Newly identified ten KaiC crystal structures captured the key steps of each chemical reaction. KaiC generates circadian oscillations by regulating the atomic arrangement in active sites, secondary structural transformation, and tertiary and quaternary structures. This mechanism may have already been established in the ancestral KaiC, which is close to the origin of the circadian clock. The mechanism of KaiC revealed in this research project suggested that clock proteins from non-bacterial organisms, which are thought to have complex and diverse functions and structures, may have an unexpectedly simple mechanism.

研究分野：構造生物化学

キーワード：概日時計 概日リズム 時計タンパク質 ATP加水分解 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアの概日時計は、時計タンパク質 KaiC の化学反応によって駆動される。ホモ六量体で二重リング構造を形成する KaiC は、上部リングで ATP を加水分解して時計システムの速度を決定し、下部リングで自己リン酸化・脱リン酸化をサイクリックに繰り返してリズムを発生している。この上部・下部それぞれで進行する反応の活性は、一定の位相差を保って概日振動することから、二重リング間に何らかの構造上の相互作用あるいは相互制御が働くと考えられてきた。このアロステリックな2つの活性部位のコミュニケーションは、40 Åの距離を介した長距離連携を実現するものであり、そのメカニズムは理解されていなかった。2種類の化学反応に基づく KaiC の概日振動は、生物史において最も古い概日時計のメカニズムそのものを反映しているが、その歴史的な起源についても決着はついていなかった。

2. 研究の目的

時計タンパク質 KaiC の二重リング間に働く相互制御メカニズムおよび、その地球史的な起源を、構造生物学、生物物理学、生化学、進化学の観点から明らかにすることが本研究課題の目的である。具体的には、

- (1) 現生型 KaiC の ATP 加水分解サイクル、リン酸化サイクルの重要な反応ステップを原子構造で捉えて、二重リング間の相互作用様式を明らかにする
- (2) 数百種の現生型 KaiC ホモログのアミノ酸配列および系統樹から、祖先型 KaiC を復元する
- (3) 現生型と祖先型の KaiC 構造の比較により、概日時計の起源を時計タンパク質構造に見出すことを目標に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 現生型 KaiC のリン酸化状態を制御したうえで結晶化条件を広範囲に探索し、X線結晶構造解析を進めた。結晶構造から想定された KaiC の動作メカニズムの妥当性を確認するため、変異体 KaiC を設計・調製し、生化学的な検証を行った。(2) 次に既報データやデータベースから現生型 KaiC ホモログのアミノ酸配列情報を収集し、系統樹を描画した。系統樹上の分岐点において統計的に推定された祖先型配列をもとにプラスミドを作製し、祖先型 KaiC を調製した。(3) 祖先型 KaiC の結晶化条件を同定し、こちらについても結晶構造を取得した。

4. 研究成果

研究目的に列挙した3項目それぞれで大きな進展があった。とりわけ(1)については、シアノバクテリア以外の高等生物の概日時計研究にも影響を与える重要な知見を得ることができた(図1)。

現生型 KaiC を対象にした X線結晶構造解析では、KaiC のリン酸化サイクルの全4状態を含み、ATP 加水分解サイクルの反応前・反応後を捉えた計10種の KaiC 原子構造を構築した。この新たに構築した KaiC 構造ライブラリーの入念な観察によって、KaiC は ATP 加水分解サイクル中に、上部リング内で隣接するプロトマーのズレを引き起こすことが分かった。一方、2か所のリン酸化部位を有する KaiC の4状態を経由するリン酸化サイクルにおいては、一方のリン酸化部位の状態変化に呼応する二次構造変換のみが上部リングとのアロステリーに必須であることが判明した。この上部・下部リングそれぞれにおける構造変化は、二重リング界面の水素結合の切

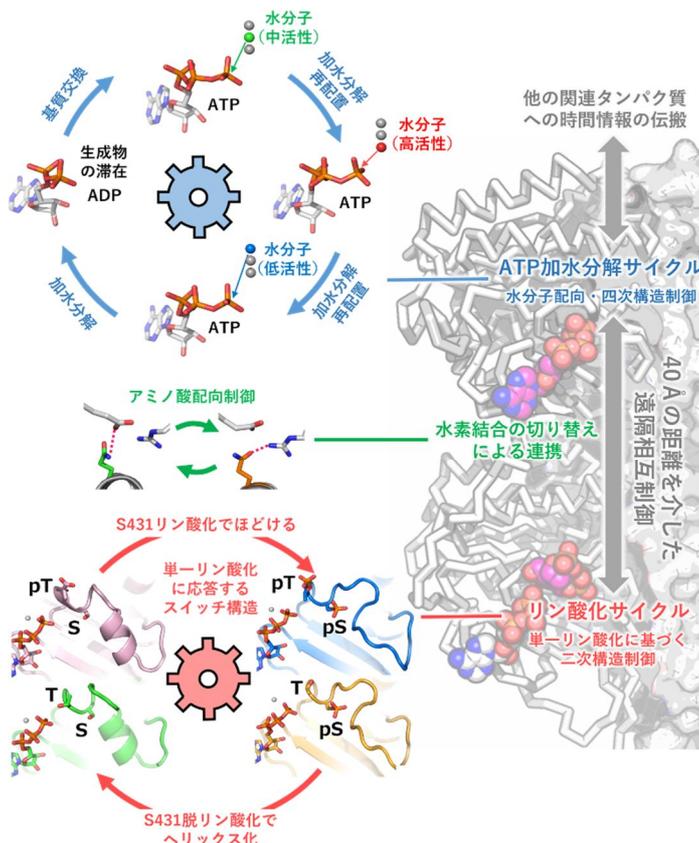


図1：時計タンパク質KaiCの二重リング相互制御機構

り替えによって仲介されていた。

なかでも KaiC の 2 か所のリン酸化部位のうち一方のみが概日振動の発生に必須である、という発見は、時間生物学の常識を覆すものであった。ヒトを含む高等生物の時計タンパク質には、数十～数百のリン酸化部位が保存されており、その「複数性」が概日時計にとって重要であると考えられ、また多重リン酸化モデルは理論的に支持されてきたからである。本研究の成果は、概日振動の発生にとって重要な要素は、リン酸化部位の「複数性」ではなく、リン酸化・脱リン酸化反応によって制御される時計タンパク質の「構造多型」である、ということを示している。

こうした現生型 KaiC に関する知見は、祖先型 KaiC にも適用できる。系統樹を用いて統計推定された祖先型 KaiC も、ホモ六量体の二重リング構造を形成していた。上部・下部リングそれぞれの活性部位の原子構造は現生型 KaiC に酷似しており、二重リング間の相互制御が概日振動発生の主要メカニズムであることが進化・歴史の観点からも実証された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito-Miwa Kumiko, Furuike Yoshihiko, Akiyama Shuji, Kondo Takao	4. 巻 117
2. 論文標題 Tuning the circadian period of cyanobacteria up to 6.6 days by the single amino acid substitutions in KaiC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 20926 ~ 20931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2005496117	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 Ouyang Dongyan, Furuike Yoshihiko, Mukaiyama Atsushi, Ito-Miwa Kumiko, Kondo Takao, Akiyama Shuji	4. 巻 20
2. 論文標題 Development and Optimization of Expression, Purification, and ATPase Assay of KaiC for Medium-Throughput Screening of Circadian Clock Mutants in Cyanobacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2789 ~ 2789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20112789	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 Mukaiyama Atsushi, Ouyang Dongyan, Furuike Yoshihiko, Akiyama Shuji	4. 巻 131
2. 論文標題 KaiC from a cyanobacterium <i>Gloeocapsa</i> sp. PCC 7428 retains functional and structural properties required as the core of circadian clock system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 67 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.051	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 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 n/a-n/a
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 Furuike Yoshihiko, Ouyang Dongyan, Tominaga Taiki, Matsuo Tatsuhito, 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 n/a-n/a
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 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 n/a-n/a
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 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 n/a-n/a
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 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古池美彦、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志
2. 発表標題 シアノバクテリア概日時計を駆動する時計タンパク質KaiCの動作転換メカニズム
3. 学会等名 第 27 回 日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihiko FURUIKE, Atsushi MUKAIYAMA, Eiki YAMASHITA, Takao KONDO, and Shuji AKIYAMA
2. 発表標題 Structural Relationships between ATP-hydrolysis and Phosphorylation Domains in Cyanobacterial Clock Protein KaiC
3. 学会等名 V World Congress of Chronobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiko FURUIKE, Atsushi MUKAIYAMA, Eiki YAMASHITA, Takao KONDO, and Shuji AKIYAMA
2. 発表標題 Structural Diversity of KaiC Hexamer in Cyanobacterial Circadian Clock
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古池美彦、向山厚、山下栄樹、近藤孝男、秋山修志
2. 発表標題 時計タンパク質KaiCのリン酸化ドメインにおける水分子の同定
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古池 美彦
2. 発表標題 時計タンパク質KaiCにおける リン酸化過程の原子レベルでの理解
3. 学会等名 名古屋リズム研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古池 美彦
2. 発表標題 時計タンパク質KaiCのアロステリーを基軸とする シアノバクテリア概日振動の理解
3. 学会等名 Cyanoclock3.0
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古池美彦, 向山厚, 欧陽東彦, 伊藤(三輪)久美子, Damien SIMON, 山下栄樹, 近藤孝男, 秋山修志
2. 発表標題 藍藻の概日リズムを制御する 時計タンパク質KaiCのアロステリー
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiko Furuike, Atsushi Mukaiyama, Dongyan Ouyang, Kumiko Ito-Miwa, Damien Simon, Eiki Yamashita, Takao Kondo, and Shuji Akiyama
2. 発表標題 Core Allosteric Regulation in Cyanobacterial Circadian Clock Protein KaiC
3. 学会等名 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 古池美彦
2. 発表標題 時計タンパク質のアロステリーに 基づく複雑なシアノバクテリア 概日振動の理解
3. 学会等名 名古屋リズム研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古池美彦
2. 発表標題 原子レベルでみた 時計タンパク質KaiCの概日サイクル
3. 学会等名 日本生物物理学会中部支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古池 美彦, 向山厚, 山下栄樹, 近藤孝男, 秋山修志
2. 発表標題 シアノバクテリア概日時計のアロステリー機構
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2022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