

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16088

研究課題名（和文）X線小角散乱と超遠心分析の統合的解析による時計タンパク質KaiCの溶液中動態解明

研究課題名（英文）Integrated structural analysis of clock protein KaiC in solution with small-angle scattering and analytical ultracentrifugation

研究代表者

守島 健（Morishima, Ken）

京都大学・複合原子力科学研究所・助教

研究者番号：40812087

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）：シアノバクテリアが有する生物時計機構の基盤的役割をもつ蛋白質KaiCの溶液構造解析を行った。本研究ではまず、KaiCの正確な散乱プロファイルを得るために、超遠心分析（AUC）とX線小角散乱（SAXS）を組み合わせたAUC-SAXS法を開発した。次に、AUC-SAXS法によって得たKaiCの散乱プロファイルを再現する3次元構造を粗視化分子動力学シミュレーションを用いて探索した。得られた3次元構造からは、KaiCの両末端鎖が天然変性領域として振る舞ってい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

本研究ではKaiCのKaiAおよびKaiBとの相互作用を理解するために重要な3次元構造の知見が得られた。今後は天然変性領域として振る舞う両末端鎖の運動に立脚した複合体解析によって、生物時計機構のより詳細な理解につながると期待される。

また、本研究で開発したAUC-SAXS法はKaiCだけに限らず一般的な生体高分子に対して普遍的に適用可能である。溶液中の凝集による影響はX線小角散乱実験において長年の問題であったため、これを解決する方法として幅広く応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated the structure of the clock protein “KaiC” in solution, which plays a fundamental role in circadian clock system of a cyanobacteria. First, an integral analytical method of analytical ultracentrifugation (AUC) and small-angle X-ray scattering (SAXS), namely “AUC-SAXS”, was developed to obtain the correct scattering profile for KaiC. Subsequently, the three-dimensional structure of KaiC, which reproduces the scattering profile, were searched with coarse grained-molecular dynamics (CG-MD). As a result, it was found that terminal chains of KaiC behaved as intrinsically disordered region.

研究分野：生物物理学

キーワード：超遠心分析（AUC） X線小角散乱（SAXS） 時計蛋白質

1. 研究開始当初の背景

地球上の殆どの生物は、生命活動を昼夜の環境に同調させるため、生物時計という機構を有する。シアノバクテリアが有する3種類の時計タンパク質 (KaiA, KaiB, KaiC) は、アデノシン三リン酸 (ATP) と共に試験管内で混合するだけで、3者間での会合-解離を24時間周期で繰り返す最も単純な生物時計の再構成モデルである。24時間周期の生物時計サイクルは、KaiC-KaiA間と、KaiC-KaiB間の会合-解離からなり、リング状6量体構造をもつKaiCが基盤ユニットとして働く。KaiCは分子内にATP加水分解酵素(ATPase)活性を有し、溶液中のATPを加水分解して生じたリン酸でKaiC自身をリン酸化する。興味深いことに、リン酸化状態の変化は、KaiC-KaiAおよびKaiC-KaiBの会合-解離挙動と相関があることがわかっている。しかしながら、リン酸化によって生じるKaiCの局所的な状態変化の部位は、KaiAおよびKaiBとの分子間相互作用部位とは位置が異なっており、「KaiCの局所的な状態変化」が直接的に分子間での会合-解離を引き起こしているわけではない。したがって、Kai生物時計の動作原理を理解するにあたっては「KaiCの局所状態変化(リン酸化状態の変化)」と「分子間会合-解離」の間を結びつけているメカニズムはどのようなものかという点を解明する必要がある。

2. 研究の目的

生物時計機構におけるKaiCの動態を明らかにするためには、「溶液中」におけるKaiCの動態を明らかにすることが必要である。そこで本課題開始前の予備検討にてX線小角散乱(SAXS)測定を行ったところ、すでに明らかになっている結晶構造と矛盾が生じることに気がついた。この点から、結晶構造とは異なる「溶液中」での柔軟なKaiC立体構造は、生物時計の動作原理にとって重要な意味を持つのではないかと発想した。そこで本研究では溶液中でのKaiCの柔軟なKaiC立体構造を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、試料を結晶化や凍結する必要がなく溶液中での「ありのまま」の蛋白質構造を捉えることができるX線小角散乱(SAXS)測定を用いてKaiCの立体構造解析を行った。SAXS測定では、近年の計算機による解析プログラムの発達によって、以前より高分解能な立体構造を得ることが可能となってきた。一方で、このような高度の解析を行うためには、目的とする蛋白質の高品質な実験データ(散乱プロファイル)を得ることが大変重要である。しかしながら、溶液中に複数の蛋白質が会合した「凝集」が共存する場合、実験で得られる散乱プロファイルに大きく影響を及ぼしてしまい、結果として目的とする蛋白質の正しい構造が得られないことが長年の問題であった。本研究で溶液中のKaiCの立体構造を詳細に明らかにするためには、凝集の影響を受けない正確な散乱プロファイルを取得することが不可欠である。そこで本研究ではまず、超遠心分析(AUC)とSAXSを組み合わせる凝集の影響を受けない正確な散乱プロファイルを取得する方法を開発した。続いて、得られた散乱プロファイルを再現する構造を粗視化分子動力学シミュレーションを用いて探索し、溶液中のKaiC構造解析を行った。

4. 研究成果

AUCは、高速回転で生じる遠心力で溶液中の蛋白質分子が沈降する過程の測定を行い、溶液中に存在する各分子の分子量とその濃度を求める手法である。一方、SAXS測定で得られる散乱プロファイルにおける凝集の寄与は、凝集の分子量とその濃度(溶液中の存在比率)によって決まる。本研究ではAUCで得られる凝集の種類とその濃度の情報を用いて散乱プロファイルから凝集の寄与を除去し、目的蛋白質だけの寄与を得ることができる解析法「AUC-SAXS法」を開発した(図1)[1]。AUC-SAXS法は次のステップからなる:

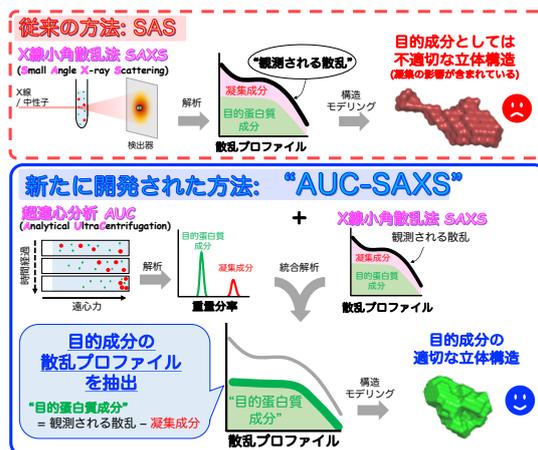


図1. AUC-SAXS法の概略

(i) SAXS 測定により蛋白質溶液の散乱プロファイルを取得する。

(ii) AUC 沈降速度法の測定により溶液中に存在する目的成分と凝集成分の重量分率を決定する。

(iii) (i) と (ii) の結果を用いて、目的蛋白質 (非凝集成分) の原点散乱強度と高角領域の散乱強度を計算する。

(iv) (iii) で得られた散乱強度を、Guinier 近似を用いて内装し、目的成分の全角度領域の散乱プロファイルを導出する。

図 2 には、AUC-SAXS 法を KaiC に適用した結果を示す。AUC 測定により溶液中には主成分 (97.7%) である KaiC 6 量体に加えて凝集が 2.3% 含まれることがわかった。上記に示した AUC-SAXS の手順により、SAXS 測定で得られた散乱プロファイル (図 2b 白丸) から凝集の影響を取り除いて KaiC 6 量体の散乱プロファイル (図 2b 青丸) を導出することに成功した。Guinier 解析 (図 2c) の結果、KaiC 6 量体の回転半径 R_g が $44.4 \pm 0.2 \text{ \AA}$ と得られた。

上記で得られた KaiC 6 量体の散乱プロファイルを再現する構造を、粗視化分子動力学計算によって探索した。構造探索は以下の手順で行った。

(1) 初期構造の作成。

(2) 粗視化分子動力学計算を用いた初期構造の変調による候補構造集団の作成。

(3) 候補構造集団から実験データを再現する最適構造を決定。

これまでに、KaiC は X 線結晶構造解析により P11 - E501 のアミノ酸配列に対応する 3 次元構造 (PDB code: 4O0M) が報告されている。そこで、結晶構造で欠損している N 末端 15 残基及び C 末端 18 残基を伸び切り鎖状として 4O0M に対して補完することで、構造探索のための KaiC 全長の初期構造を作成した。続いて、この初期構造に対して粗視化分子動力学計算を実施した。図 3 には、AUC-SAXS で得た散乱プロファイルを最もよく再現した 3 次元構造と、その散乱プロファイルを示す。中心部分のリング構造は結晶構造と大きな相違は確認されないことが明らかになった。一方、X 線結晶構造解析で座標が特定されていない両末端鎖は溶液中で天然変性領域として振る舞うことがわかった。KaiC-KaiA の相互作用部位は KaiC の C 末端近傍、KaiC-KaiB の相互作用部位は KaiC の N 末端の近傍であることから、これらの末端鎖の揺らぎがこれらの相互作用と関連していることが示唆される。

参考文献

[1] K. Morishima *et al.*, *Communication Biology* **3**, 294, (2020).

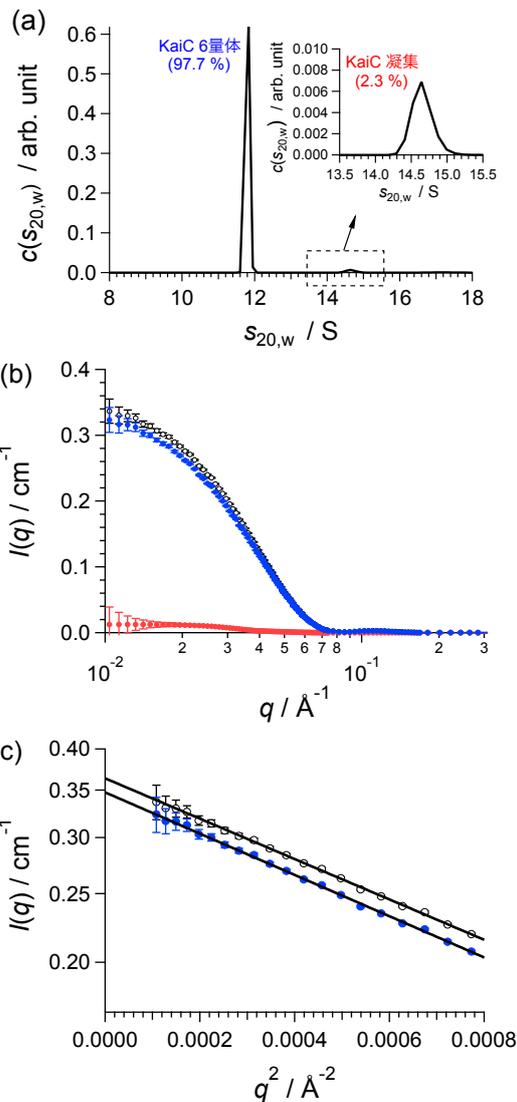


図 2. (a) KaiC 溶液の AUC 測定結果。

(b) SAXS 測定で得られた KaiC 溶液の散乱プロファイル (白丸)、AUC-SAS で得られた KaiC6 量体の散乱プロファイル (青丸)、及び凝集成分の散乱プロファイル (赤丸)。(c) AUC-SAS 前後の Guinier プロット。

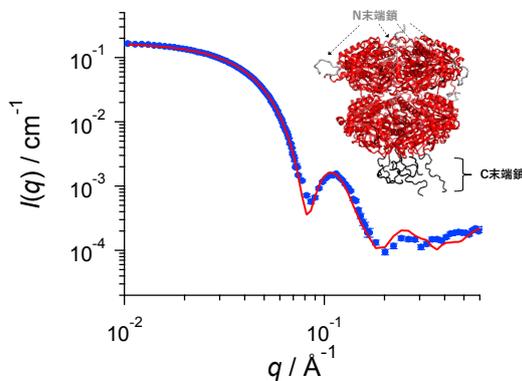


図 3. AUC-SAXS で得た散乱プロファイル (青丸) と、それを最も再現した候補構造の散乱プロファイル (赤丸)。挿入図はその候補構造。

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 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 R. Inoue, T. Nakagawa, K. Morishima, N. Sato, A. Okuda, R. Urade, R. Yogo, S. Yanaka, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, K. Omoto, K. Ito, M. Sugiyama	4. 巻 9
2. 論文標題 Newly developed Laboratory-based Size exclusion chromatography Small-angle x-ray scattering System (La-SSS)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48911-w	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 Morishima Ken, Okuda Aya, Inoue Rintaro, Sato Nobuhiro, Miyamoto Yosuke, Urade Reiko, Yagi-Utsumi Maho, Kato Koichi, Hirano Rina, Kujirai Tomoya, Kurumizaka Hitoshi, Sugiyama Masaaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Integral approach to biomacromolecular structure by analytical-ultracentrifugation and small-angle scattering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-1011-4	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 Inoue Rintaro, Oda Takashi, Nakagawa Hiroshi, Tominaga Taiki, Saio Tomohide, Kawakita Yukinobu, Shimizu Masahiro, Okuda Aya, Morishima Ken, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Sato Mamoru, Sugiyama Masaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Dynamics of proteins with different molecular structures under solution condition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78311-4	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 Inoue Rintaro, Sakamaki Yusuke, Takata Takumi, Wood Kathleen, Morishima Ken, Sato Nobuhiro, Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Urade Reiko, Fujii Noriko, Sugiyama Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Elucidation of the mechanism of subunit exchange in B crystallin oligomers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82250-z	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 Okuda Aya, Inoue Rintaro, Morishima Ken, Saio Tomohide, Yunoki Yasuhiro, Yagi-Utsumi Maho, Yagi Hirokazu, Shimizu Masahiro, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Kato Koichi, Sugiyama Masaaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Deuteration Aiming for Neutron Scattering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 16~27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v18.003	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 Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Sugiyama Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Solution structure of multi-domain protein ER-60 studied by aggregation-free SAXS and coarse-grained-MD simulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85219-0	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 -

1. 著者名 Sato Nobuhiro, Yogo Rina, Yanaka Saeko, Martel Anne, Porcar Lionel, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Tominaga Taiki, Arimori Takao, Takagi Junichi, Sugiyama Masaaki, Kato Koichi	4. 巻 170
2. 論文標題 A feasibility study of inverse contrast-matching small-angle neutron scattering method combined with size exclusion chromatography using antibody interactions as model systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvab012	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 該当する

〔学会発表〕 計15件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 H. Yagi, Y. Yunoki, K. Morishima, K. Ishii, R. Murakami, L. Porcar, A. Martel, R. Inoue, K. Terauchi, S. Uchiyama, M. Sugiyama, K. Kato
2. 発表標題 Structural characterization of the circadian clock protein complexes composed of KaiA, KaiB and KaiC by integrative structural approaches
3. 学会等名 J-PARC symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Inoue, Y. Sakamaki, K. Morishima, K. Wood, N. Sato, A. Okuda, R. Urade, N. Fujii, M. Sugiyama
2. 発表標題 Subunit dynamics in α -crystallin through deuteration-assisted small-angle neutron scattering
3. 学会等名 J-PARC symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Takata, K. Morishima, R. Inoue, M. Sugiyama, N. Fujii,
2. 発表標題 Creation and analysis of isomers-containing lens α -crystallin
3. 学会等名 International Conference of Lens 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守島健, 矢木真穂, 井上倫太郎, 佐藤信浩, 奥田綾, 裏出令子, 加藤晃一, 杉山正明
2. 発表標題 超遠心分析-小角散乱 (AUC-SAS) 法を用いた解離会合平衡下にあるタンパク質複合体の構造解析
3. 学会等名 2019年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本洋祐, 守島健, 井上倫太郎, 佐藤信浩, 奥田綾, 裏出令子, 杉山正明
2. 発表標題 超遠心分析-小角散乱 (AUC-SAS) 法の高濃度凝集含有溶液への適用法の考察
3. 学会等名 2019年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤信浩, 裏出令子, 奥田綾, 守島健, 井上倫太郎, 杉山正明
2. 発表標題 X線小角散乱を用いた大豆タンパク質の凝固に伴うナノ構造解析
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守島健, 井上倫太郎, 佐藤信浩, 裏出令子, 杉山正明
2. 発表標題 X線小角散乱と超遠心分析を協奏的に用いた蛋白質溶液の構造解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Yohda, M. Nakamura, N. Kurokawa, K. Morishima, R. Inoue, M. Sugiyama
2. 発表標題 Oligomeric structure and its temperature-dependent change of HspB1 from Chinese hamster ovary cell
3. 学会等名 2020 World Conference of Protein Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 R. Nishijima, K. Morishima, R. Inoue, M. Sugiyama, M. Yohda
2. 発表標題 Structural and functional characterization of sHsps from the fission yeast
3. 学会等名 2020 World Conference of Protein Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥田綾, 清水将裕, 守島健, 佐藤信浩, 井上倫太郎, 裏出令子, 杉山正明
2. 発表標題 中性子散乱解析を目指したタンパク質ライゲーションの技術戦略
3. 学会等名 日本中性子科学第20年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守島健, 井上倫太郎, 中川達央, 宮本洋祐, 清水将裕, 奥田綾, 佐藤信浩, 裏出令子, 杉山正明
2. 発表標題 Innovative Small-Angle Scattering for Structural Analysis of Biomacromolecule in Solution
3. 学会等名 CBI2020大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守島健, 宮本洋祐, 清水将裕, 柚木康弘, 奥田綾, 佐藤信浩, 井上倫太郎, 裏出令子, 矢木宏和, 加藤晃一, 杉山正明
2. 発表標題 超遠心分析と小角散乱の統合手法(AUC-SAS)によるタンパク質複合体の構造解析
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野里奈, 有村泰宏, 鯨井智也, 柴田幹夫, 奥田綾, 守島健, 井上倫太郎, 杉山正明, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 ヒストンバリエントH2A.Bを含むヌクレオソームの新規動態の解析
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤信浩, 守島健, 井上倫太郎, 與語理那, 谷中冴子, 矢木宏和, 加藤晃一, Martel Anne, Porcar Lionel, 杉山正明
2. 発表標題 タンパク質会合体の精密構造解析のための分析超遠心, SEC-SAXSおよびSEC-iCM-SANSの統合的利用
3. 学会等名 日本中性子科学第20年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤信浩, 裏出令子, 奥田綾, 守島健, 井上倫太郎, 杉山正明
2. 発表標題 X線小角散乱でみる大豆タンパク質のナノ構造に対する緩衝剤および塩の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 守島健	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 400
3. 書名 62. 超遠心分析: 相分離生物学の全貌(現代化学増刊46) 白木賢太郎編	

〔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

オーストラリア	ANSTO			
フランス	ILL			