

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号： 63903  
 研究種目： 若手研究（A）  
 研究期間： 2010～2012  
 課題番号： 22687010  
 研究課題名（和文） 時を生み出すタンパク質 KaiC における ATPase 自己抑制・温度補償機構  
 研究課題名（英文） Structural Studies on Auto-regulatory Mechanism of Cyanobacterial Clock Proteins  
 研究代表者  
 秋山 修志 (AKIYAMA SHUJI)  
 分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・教授  
 研究者番号： 50391842

研究成果の概要（和文）：本課題の主要な研究成果は、X線小角散乱を始めとする各種分光法を用いて KaiC の動的構造変化を捉えたことである。KaiC はドーナツを2つ積み上げたような2重のリング状構造をしており、片方のリングにある「周期を規定する ATPase」の制御状態と密に連動して、もう片方のリング半径が膨らんだり、縮んだりを繰り返す。あたかも、心臓が拍動するかのように形状をリズムカルに膨張・収縮させることで、24時間周期で時を刻むことが解明された。また、KaiC の分子鼓動が蛍光分光法でリアルタイム計測できるようになった。これらの成果により、KaiC に内包された周期決定因子と離合集散プロセスをカップリングさせる分子機構の一端が解明された。

研究成果の概要（英文）：Dynamic structural change of the KaiC hexamer revealed in this study provides notable insights into the cyanobacterial circadian clock. Our model implies that KaiC ticks through expanding and contracting motions of the C2 ring. The timing of the accumulation of KaiC carrying the expanded C2 ring is coincident with that of accumulation of KaiC associated both with KaiA and KaiB. The conformational ticking of KaiC is likely to serve as a timing cue for assembly/disassembly of KaiA and KaiB.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	20,000,000	6,000,000	26,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：生物物理, 生物時計, 分光学, 小角散乱

#### 1. 研究開始当初の背景

地球に生息する生命体の多くが生物時計を備えており、時計が発振する24時間周期(概日周期)のリズムを指針に、代謝や光合成といった生命活動を昼夜環境サイクルと同調

させている。2005年に発表された藍藻に関する研究成果は(Nakajima et al, 2005, Science 308, 414-), 時計遺伝子の転写・翻訳を介した振動モデルを根底から揺さぶるものであった。藍藻の生物時計は3種類の時計

タンパク質 (KaiA, KaiB, KaiC) で構成され、3つの Kai タンパク質と ATP を試験管内で混合すると、KaiC がリン酸化型と脱リン酸化型のあいだを概日周期で振動することが発見された。これは、時計遺伝子の転写・翻訳を介さないタンパク質時計の存在を実証した画期的な研究成果である。

現在のところタンパク質時計は藍藻に限定された観察であるが、生物時計の本質の所在が「転写・翻訳を介した振動モデル」から「3種類の時計タンパク質」へ掘り下げられ、そして今や「唯一のタンパク質 KaiC」にまで絞りこまれつつある。本課題では KaiC の生物物理学的・構造生物学的研究を推し進め、KaiC 分子内に潜む「24 時間を生み出すからくり」を解き明かすことを目的としている。

## 2. 研究の目的

藍藻は生物時計を備えた生物で、その発振周期は時計タンパク質 KaiC の ATPase によって規定される。KaiC の ATPase 活性は温度依存性が極めて小さく (温度補償性)、これは生物時計と名のつくものに必ず備わっている性質の1つである。本課題の目的は、生物物理学的研究 (X線小角散乱, 赤外, 蛍光) を推し進め、時計タンパク質 KaiC に織り込まれた「温度補償性を実現する仕組み」や「24 時間を生み出すからくり」を解き明かすことである。

## 3. 研究の方法

### (1) KaiC の低分解能・分光学的解析

KaiC のみを試験管内に加えて実験する。3つのパラメータ (ATPase, リン酸化状態, 温度) を振って、それに伴う KaiC の状態 (構造) 変化を3つの分光法 (蛍光・赤外・X線小角散乱) で検出する。

### (2) KaiC 構造歪みの速度論的解析

ATP などのモノヌクレオチドを除去すると KaiC はモノマー化する。KaiC モノマーは不安定で凝集しやすいが、ある特定の条件では安定に存在し、ATP の添加とともに可逆的に6量化する。このダイナミクスを3つの分光法で追跡する。また、外部パラメータを変えた直後のレスポンスを高い時間分解能で記録する。

## 4. 研究成果

### (1) KaiC の低分解能・分光学的解析

我々はタンパク質分子の形状変化に敏感な X線小角散乱を用い、時計タンパク質が 24 時間周期で離合集散する様子を丁寧に観察してきた。その結果、KaiC が ATPase 活性 (リン酸化状態) に応じて構造を変化させ、それが時計の針を進めるタイミング信号として利用されていることが予測された。よって解

き明かすべきは、KaiC の ATPase 活性を “ゆっくり” かつ “安定” に制御する機構、すなわち、リン酸化状態や ATP 加水分解状態に応じた KaiC の構造変化である。

そこで我々は、ATPase 活性 (リン酸化状態) に応じた KaiC の構造変化を時分割 X線小角散乱を用いて追跡した [雑誌論文①, ②, ⑤]。R<sub>g</sub> は時間依存的に変化し、それが凝集や変性によるものではなく、時計機構と密接に関連した重要な構造変化であることを突き止めた。

既存の X線結晶構造をベースに、得られた時分割散乱データに合致する KaiC の分子形状モデルを構築した。KaiC はドーナツを2つ積み上げたような2重のリング状構造をしている (図 1)。片方のリングにある「周期を規定する ATPase」の制御状態と密に連動して (図 1A)、もう片方のリング半径が膨らんだり、縮んだりを繰り返す。あたかも、心臓が拍動するかのように形状をリズムカルに膨張・収縮させることで、24 時間周期で時を刻む様子が可視化された。また、このような KaiC の分子鼓動を蛍光分光法でリアルタイム計測できるようになった (図 1C)。今後、より広い方面への応用が期待される。

これらの成果は、溶液中の KaiC の分子鼓動を X線小角散乱で捉えた画期的なものであり、新聞記事 (中日新聞, 日刊工業新聞) だけでなく、Faculty of 1000 Biology, SPring-8 の施設紹介としても取り上げられた。

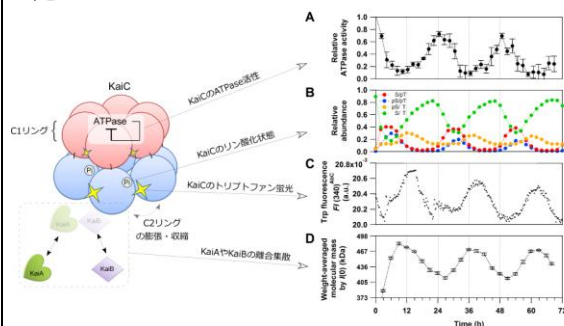


図 1 KaiC の分子鼓動 フィードバック制御下にある ATPase 活性 (A) をペースメーカーに、KaiC のリン酸化状態 (B) やリング状の 6 量体構造 (C) がリズムカルに変動する。KaiA や KaiB は KaiC の分子鼓動に呼応して離合集散し (D)、系の振動をより頑強なものとしている。

### (2) KaiC 構造歪みの速度論的解析

試料調製と計測システムの両面から工夫を重ねた結果、KaiC の 6 量体再構成過程が安定かつ高感度で計測できるようになった。我々の作業仮説にほぼ合致する状態が過渡的に蓄積する証拠が得られた。これらの成果は、過渡的中間体における ATPase 活性と構造歪みの相関を検証するための基盤技術となるもので、現在、論文として取りまとめている。

外部刺激に対する分子時計の応答を記録

したところ、これまでに報告されていない分子応答が観察され、そのタイムスケールが予測よりも速いことが確認された。この運動モードがどのKaiタンパク質に由来するものかを判断するため、各種変異体などを用いて統一的な解析を行ったところ、KaiC由来であることがわかった。この構造転移と計時機構の相関を解明するため、蛍光、赤外、X線小角散乱を用いた分光学的解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Akiyama S., “Structural and dynamic aspects of protein clocks: How can they be so slow and stable?”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 2147-2160 (2012), 査読あり.
- ② Mukaiyama A, Kondo T, Akiyama S., “Visualization of circadian ticking of cyanobacterial clock protein KaiC in real time”, *SPRING-8 Research Frontiers* 2011, 46-47 (2012), 査読なし (解説記事).
- ③ 秋山 修志, “タンパク質時計—時間と空間の狭間を漂うように—”, *生物物理* 52, 102-103 (2012), 査読なし (解説記事).
- ④ Akiyama S., Hikima T., “Octuple Cuvette for Small-angle X-ray Solution Scattering”, *J. Appl. Cryst.*, 44, 1294-1296 (2011), 査読あり.
- ⑤ Murayama Y., Mukaiyama A., Imai K., Onoue Y., Tsunoda A., Nohara A., Ishida T., Maéda Y., Terauchi K., Kondo T. and Akiyama S., “Tracking and Visualizing the Circadian Ticking of the Cyanobacterial Clock Protein KaiC in Solution”, *EMBO J.*, 30, 68-78 (2011), 査読あり.
- ⑥ 秋山 修志, 近藤 孝男, “KaiC タンパク質による概日時間”, *細胞工学*, 30, 1269-1276 (2011), 査読なし (解説記事).
- ⑦ 秋山 修志, 向山 厚, “時計タンパク質 KaiC の概日性分子鼓動”, *実験医学*, 29, 1281-1284 (2011), 査読なし (解説記事).
- ⑧ Akiyama S., “Quality control of protein standards for molecular mass determinations by small-angle X-ray scattering”, *J. Appl. Cryst.*, 43, 237-243 (2010), 査読あり.
- ⑨ 秋山 修志, “X線小角散乱でナノ空間を照らし出す”, *現代化学*, 468, 54-58

(2010), 査読なし (解説記事).

[学会発表] (計17件)

- ① Akiyama S., “Tracking and Visualizing Intramolecular Feedback in Cyanobacterial Clock Protein KaiC”, The 5th Japan-Taiwan joint meeting on neutron and X-ray scattering, Feb 26 2013, Tokai, Japan.
- ② Akiyama S., “Circadian ticking of cyanobacterial clock protein KaiC in solution”, from Structure to Dynamics: for Our Understanding of Protein-Protein Interactions, Mar 16 2012, Nagoya, Japan.
- ③ 秋山 修志, “Kai タンパク質時計の源振の分子科学的解明に向けて”, 第19回時間生物学会学術大会, 2012年9月16日, 北海道大学.
- ④ 秋山 修志, “時計タンパク質のダイナミクス”, 放射光将来光源利用サイエンス若手シンポジウム, 2012年8月18日, 東京大学.
- ⑤ 秋山 修志, “時計タンパク質 KaiC の概日性分子鼓動”, 第12蛋白質科学会年会, 2012年6月22日, 名古屋国際会議場.
- ⑥ 秋山 修志, “タンパク質時計に秘められた秩序ある遅いダイナミクス～源振の分子科学的解明と新光源への期待～”, 第25回日本放射光学会年会, 2012年1月7日, 鳥栖市民文化会館.
- ⑦ Akiyama S., “Tracking and Visualizing Intramolecular Feedback in Cyanobacterial Clock Protein KaiC”, The 12th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Oct 11 2012, Seoul, Korea.
- ⑧ Akiyama S. and Kondo T., “Circadian Pacemaker of Cyanobacteria by Intra-molecular Feedback of KaiC ATPase”, GCOE International Symposium, Nov26 2011, Nagoya, Japan.
- ⑨ 秋山 修志, “X線小角散乱を用いた動的構造解析～シアノバクテリア時計蛋白質の概日性分子鼓動～”, 第1回名古屋大学反応科学超高压電子顕微鏡ワークショップ, 2011年11月21日, 名古屋大学.
- ⑩ 秋山 修志, “Kai タンパク質時計に秘められた秩序ある遅いダイナミクス”, 分子研研究会「実験と理論による高次分子システムの機能発現の分子論的理解」, 2011年11月2日, 分子科学研究所.
- ⑪ 秋山 修志, “シアノバクテリア時計タンパク質 KaiC の分子鼓動の可視化”, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 京都国際会議場.
- ⑫ Akiyama S., “Quality Control of

Protein Standards for Molecular Mass Determinations by SAXS”, XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Aug23 2011, Madrid, Spain.

- ⑬ 秋山 修志, “シアノバクテリア時計タンパク質はどのようにして時を測るのか”, 理論計算領域ワークショップ, 2011年4月4日, 分子科学研究所.
- ⑭ Akiyama S., “Circadian Ticking of Cyanobacterial Clock Protein KaiC In Solution ”, GCOE International Symposium: Protein structure and dynamics; from molecules to assembly, Nov24 2010, Nagoya, Japan. (招待講演)
- ⑮ 秋山 修志, “時計タンパク質の構造変化と小角 X 線散乱測定による実時間解析”, 第1回高分子科学研究会, 2010年11月6日, SPring-8 (上坪講堂).
- ⑯ 秋山 修志, “シアノバクテリア時計タンパク質はどのようにして時を測るのか”, 第1回バイオ単分子研究会, 2010年8月6日, ATI 会議室.
- ⑰ 秋山 修志, “時計タンパク質の複合体形成ダイナミクスと遅い構造転移  $\sim \mu s^{-1}$  から  $day^{-1}$  まで”, 2010年6月17日, 第10回日本蛋白質科学会年会.

[図書] (計1件)

秋山 修志, “タンパク質によって操られている体内時計”, 「放射光が解き明かす驚異のナノ世界」, 講談社ブルーバックス, 2011年9月2発行.

[その他]

ホームページ

<http://bms.ims.ac.jp/AkiyamaG/index.htm>  
1

アウトリーチ活動

- ① 秋山 修志, “生物の不思議 ～ 体内時計～”, サイエンスキャンプ, 2010年8月, SPring-8 (普及棟).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 修志 (AKIYAMA SHUJI)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究  
領域・教授

研究者番号: 50391842

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者