

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号 : 13901
研究種目 : 特別推進研究
研究期間 : 2012 ~ 2016
課題番号 : 24000016
研究課題名 (和文) シアノバクテリアの時計蛋白質による概日時間の生成機構
研究課題名 (英文) Circadian pacemaker of cyanobacteria by clock protein KaiC
研究代表者 近藤孝男 (KONDO Takao)
名古屋大学大学院理学研究科・教授
研究者番号 : 10124223
交付決定額 (研究期間全体) (直接経費) : 319,800,000 円

研究成果の概要 (和文) :

概日時計は生命の活動を地球の昼夜サイクルに正確にフィットさせている。その仕組みは細胞の遺伝子発現制御によると考えられていたが、シアノバクテリアの3つの Kai 蛋白質は試験管内で安定した24時間周期の概日リズムを示し、その周期と温度補償性は KaiC の ATPase 活性が規定している。本研究ではこの時計蛋白質に埋め込まれた概日時計のメカニズムを解明し、その最終的理解を得るため、突然変異体を利用した KaiC の生化学的解析と構造生物学的解析をおこなった。その結果、KaiC が機械式振子時計のように時を刻んでいる新たな概日時計のモデルを提案することができた。さらに真核生物の概日時計についても同様な可能性を検討している。

研究成果の概要 (英文) :

Circadian clock fit metabolisms of living cells with the day-night cycle of the Earth. The basic mechanism of the circadian clock has been assumed to the autoregulation of clock gene expression in the cell. However, three Kai proteins of cyanobacteria generate precise and stable 24 h rhythm by mixing three proteins with ATP in the test tube. In this project, we focused on biochemical and structural analyses of KaiC and its clock mutants to elucidate the timing mechanism installed in the clock protein KaiC. We found that KaiC ticks time by coupling harmonic pacemaker with driver oscillator by the escapement mechanism, which can be found in the mechanical pendulum clock or classical watches. We are proposing the new clock model for circadian clock and surveying similar mechanisms in eukaryotic clock system.

研究分野 : 時間生物学、植物生理学

キーワード : シアノバクテリア KaiC 蛋白質 概日時計 ATPase 活性制御
機械式概日時計モデル 時間生物学 構造生物化学 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

我々が腕時計を利用するように、動物や植物あるいは微生物も概日時計を利用して地球上の昼夜環境下で効率的な生活を実現している。概日時計は「時計」として機能するための特性を備えており、我々ヒトも含め、生命が進化の過程で獲得した生命活動調節のための細胞内基本装置である。本計画では試験管内で3つのKai蛋白質とATPによって再構成される概日時計を利用し、概日時計の最も根源的な発振機構を解明し、さらに広く蛋白質の情報を処理する機能を解明することを目的とする。

2. 研究の目的

(1) シアノバクテリアの時計蛋白質 KaiCの活性を様々な変異体で解析し、この蛋白質に潜む、安定した概日振動発生機構を解明する。

(2) 生命がいかにして24時間という地球の自転周期を蛋白質分子内に記憶したかを蛋白質構造をもとに理解する。

(3) 原振動の解明を基礎として、細胞内でのように多くの生理機能の時間的統合が実現されているかを、六量体の機能として解明する。

(4) 真核生物で同様の可能性をさぐる。

3. 研究の方法

本計画は時計蛋白質の生化学的活性解析、物理化学的機能解析と構造生物学(X線構造解析)を組み合わせ、時計機能の理解を目指す。生理学的解析を基礎とした変異体の利用も積極的に進める。図の作業モデルに従い、以下の解析を行った。

(1) KaiCの活性の解析に基づく時計モデルの検証。高感度ATPase活性測定でKaiCのATPase活性の時間的特性を解析し、KaiCのATPase活性と概日周期との関係を明らかにする。またリン酸化サイクルとATPaseの共鳴による自励振動発生の検証めざす。

(2) KaiC-蛋白質時計の構造生物学的機能解析。新規の結晶化技術を導入し、KaiC時計蛋白質のX線結晶構造解析を可能として、多くの変異体も含め、構造と機能の相関を解明する。

(3) 細胞システムの時計機構の基礎として

Kai蛋白質の持つ同調機構を明らかにする。

(4) KaiCの解析をもとに真核生物の未知のATPaseを探索し、その周期の決定の可能性を探る。

4. 研究成果

(1) ペースメーカー-KaiC ATPaseの機能

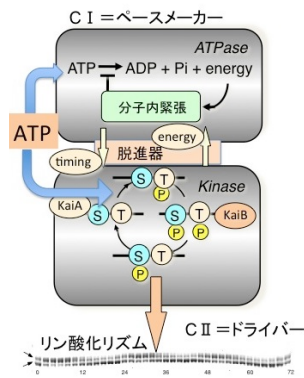
極めて弱い(10-20 ATP/day/KaiC) KaiCのATPaseをできるだけ高い時間分解能で測定することが最初の困難な課題であった。さらにKaiCのCIとCIIのATPaseは異なる機能をもっており、この2つの活性を分別することも必要であった。当初、³²Pによる測定を試みたが、測定操作や放射能の自己分解などによる誤差が障害となり困難であった。そこで超高速高分離液体クロマトグラフ(UPLC)を導入し、測定条件を厳密に制御することにより、2つの活性を分別する測定精度を得た。さらに温度などの測定条件を再現性よく行う装置も自作し、CIとCIIの活性を分別し解析する可能性が生まれた。この方法により時計機構の進行(位相変位)と相関するATPase活性変動を詳細に解析した。

この方法を集中的なKaiC変異体のスクリーニングから得られた多数の周期変異体、CIとCIIの相関を司る脱進器機構の変異体、およびリン酸化サイクルのKaiA依存性変異体の解析を進め、KaiC蛋白質による時計機構のモデルを提案できる実験的成果が得られた。一方、リン酸化や脱リン酸化反応の時間経過を生化学的手法で追跡し、CIIドメインのATPase活性がリン酸化・脱リン酸化反応を進めるための重要な素反応であることを示した。

(2) リン酸化サイクルとの共役メカニズムの解析とモデリング

リン酸化や脱リン酸化反応の時間経過を生化学的手法で追跡し(論文10)、CIIドメインのATPase活性が脱リン酸化反応を進めるための重要な素反応であることを世界に先駆けて示した(論文6)。従来、ATPase活性はCIリングに局在すると考えられてきたが、本発見によって、両リングで機能するATPase活性の共役を解き明かすことが次の重要な課題として位置づけられることとなり、今後格段の発展をもたらすものと期待される。これらの成果は以下に述べる構造生物学的成果と合わせ、概日時計研究の一里塚であると位置付けている。

なお、生物発光による変異体のスクリーニングは様々な方法で継続しており、これまでに周期4-5日の超長周期変異体や脱進器機構に影響する変異体などが得られており、今後の解析に手がかりになると期待している。また、Kai蛋白質を異なる蛍光色素で標識し、



蛍光相関分光法を用いて相互作用の様式や安定度をリアルタイム計測し、リン酸化サイクルと Kai 蛋白質の離合集散ダイナミクスを解明した(論文 9)。この成果は、細胞内における蛋白質時計の機能を解析するために重要である。

(3) 24 時間を記憶するメカニズム

—概日時計の構造生物学—

6 量体 KaiC の機能発現機構を理解する上で、単量体化した KaiC を利用することの重要性が指摘されてきたが、ヌクレオチド除去により得られる単量体 KaiC が溶液中で極めて不安定であることが技術的な問題となっていた。我々は、単量体 KaiC の安定性を高める溶液条件をスクリーニングし、2 種類のアミノ酸(グルタミン酸およびアルギニン)を含むリン酸バッファー中で単量体 KaiC が安定に存在しうることを突き止めた(論文 5、BIOPHYSICS 2015)。さらに、ATP を加えて再構成された 6 量体 KaiC が単量体化を経ていない 6 量体 KaiC と同一の機能を保持していることを、X 線小角散乱などの物理化学的手法を用いて示した。本成果は KaiC の ATPase 活性、および自己リン酸化/自己脱リン酸化活性の前定常状態解析に向けた技術基盤となった。

そこで分子科学研究所に結晶構造解析に取り組むための諸設備を導入し、構造解析に向けた準備として Kai 蛋白質および各種変異体の調製方法を最適化した。CI リングについて、2 オングストロームを切る高精度の構造解析を行い、「遅さ」の構造基盤および分子科学的起源を突き止めた(論文 4、Science, 2015)。本成果は学術的インパクトが高く、「KaiC が太古の地球のリズムを如何にその内に取り込み、今日まで保持・進化させてきたか」という時間生物学における最終回答に迫るものであり、専門家から一般市民まで幅広く支持されるものと考えられる。また、高精度蛍光計測システムを用いて KaiC の CI ドメインの概日揺らぎを計測し、その動的な構造変化をアミノ酸レベルで計測した。その結果、上記の結晶構造解析で観察されたような構造変化が溶液中で実時間計測され、これまでの構造生物学的観察を支持する結果が得られた。

(4) 細胞内における KaiC 時計の機能

単独で安定に発振する Kai 蛋白質時計も、細胞内では種々の因子とのカップリングを介して計時機構に影響を受ける。たとえば、我々は、Clp プロテアーゼファミリーである clpP1、clpP2、clpX をシアノバクテリア中でノックアウト、また clpP3 を過剰発現すると、いずれも時計が長周期化することを発見した(Bacteriol. 2013)。

他方、KaiC 自身は細胞内での雑音に対して頑強に設計されていることが示唆された。すなわち 6 量体を形成している個々のサブユ

ニットの間には、リン酸化状態を介してお互いの状態を監視・伝達するような仕組みが存在し、6 量体 KaiC の全体としての活性が頑強となるよう制御していることが明らかになった(論文 7、Nature Comm. 2013)。

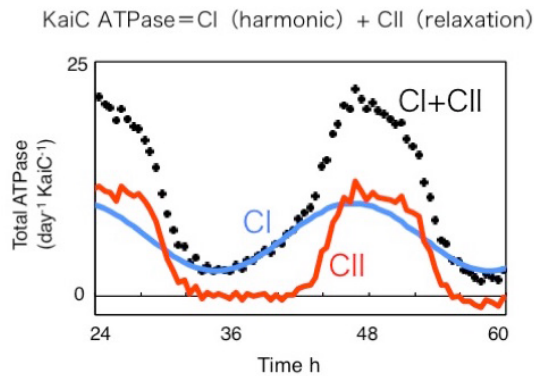
(5) 真核生物の概日時計

平成 24-25 年度より、KaiC 様 ATPase の蛋白質群を哺乳類の cDNA ライブラリから 1 次スクリーニングしてきた。ATPase 活性を指標としたスクリーニングからは、KaiC のように低い ATPase 活性を有する候補が複数見出された。これらの候補について、RNAi による抑制等の手法を用いて計時機能への影響を検証したが、劇的な表現系を示すクローンは得られていない。スクリーニング指標や条件を再検討し、平成 27 年度以降も真核生物の蛋白質時計のスクリーニングを続けたが、これまでの基本的な問題点は候補蛋白質の精製が high-throughput な方法では不十分であったと考えている。そこで今後は、個別に精製し、特異な ATPase 活性の正確な検定を行い、候補蛋白質を絞りたいと考えている。

(6) ATPase の新たな機能 「遅く」、「安定」、かつ「秩序」ある KaiC の非凡な機能が、蛋白質という軽く柔軟な素材によってどのように実現されているのか——、これを学問として取り組むべき課題や問題点について物理化学的に考察して総説として発表した(論文 11、Cell. Mol. Life. Sci. 2012)。この検討は今後、分野として扱うべき課題や研究の方向性をシアノバクテリア以外の時間生物学者に向けて発信するものであり、また同時に真核生物における時計のスクリーニング指針の策定などにも貢献するものである。

(7) 最終年度の展開と今後の研究について最終年度は極めて低い安定性の高い ATPase 活性の詳細な解析を中心に研究を展開した。前年度の測定法の改善によりこの活性を再現性良く測定することを可能としたが、測定できるのは 2 つの ATPase 活性の和であり、相互作用の解明には分別して測定することが不可欠である。2 つの活性を変異導入により調整してそれぞれを測定することが良く行われるが、KaiC のように計時機構が相互作用に深く依存している場合には、この方法で分別することはできない。しかし、2 つの成分は異なった温度感受性をもつことが期待できるので、我々は様々な温度条件で波形を正確に評価することで 2 つの成分の分別を試みた。その結果、2 つの ATPase 活性はペースメーカーとして機能する調和振動とリズムの駆動装置としてのリン酸化サイクルを生じる緩和振動として評価できることを示した。この成果は概日振動の正確な周期発生機構と全体を駆動する振動発生機構を説明することを可能とし、概日時計のデザインについて新たなモデルを提案するこ

ととなった。



一方、2016年度までの研究活動を通して、N末端ドメイン(CI)の高分解能X線結晶構造解析を実施し、KaiCの固有振動数と密接に関係しているATPase活性の制御機構について詳しく検証してきた。結晶中での構造変化が、より生理的な溶液中におけるKaiCのリズミックな運動とどのように対応するかを調べるため、KaiCの高感度蛍光計測を実施した。その結果、6量体リング内径側でATP加水分解に連動した主要な構造変化が起こる一方で、外径側はATP近傍の小規模な構造変化にとどまることが明らかとなり、結晶構造解析から示唆されていたATP加水分解機構を支持する内容であった。これらの成果は本研究の主要な2つの目的に対し大きな進展をもたらしたものである。

本プロジェクトの継続について
特別推進研究終了後は以下の2つのプロジェクトが採択されており、引き続き分担・協力して研究を継続している。蛋白質の生化学、物理的機能および原子構造の解析に基づき、様々な生命現象の新たな定量的な理解を追求していきたい。

①基盤研究(A) KaiC 概日時計の動作プログラム：2つのATPaseの協働の生理・生化学的解析 2017-2019年度
代表 近藤孝男 名古屋大学

②基盤研究(S) 統合的多階層アプローチによるシアノバクテリア生物時計システムの新展開 2017-2021年度
代表 秋山修志 分子科学研究所
分担 近藤孝男 名古屋大学

論文発表について

この報告で記載したように、本プロジェクトの研究はKaiCのATPase活性の解析を基礎として展開した。その成果はKaiCによる機械式概日時計モデルを強く支持するものであった。この成果は多くの研究者の注目するところとなり、内外で多数の招待講演をする機会を得た(学会発表参照)。聴衆の反応はつねに大変肯定的であったが、しかし、論文と

して発表するにはいくつかの困難があり、難解であるとの評価もあった。無論、原稿の不十分さも認めなければならないが、新たなモデルが既存の分子生物学的パラダイムを大きくはみ出していることが主要な原因だと考えている。このため、モデルの支持するデータをより具体的に準備し、モデル全体をまとめて提案することが必要であり、そのような形で、成果をまとめて発表すること計画している。すでに、新たなデータとモデルを加えたKaiCを核にした機械式時計モデルの目処がついたので、早急に投稿したいと考えている。論文は紹介することはここではできないが、我々のモデルを解説した小文を添付しておく。これは最近(2017年12月)に行った講演の解説である。

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16件)

- ①伊藤(三輪)久美子, 村中智明, 近藤孝男, シアノバクテリアの概日時計蛋白質 KaiC による計時機構、生体の科学, **67**, 507-511, 2016、査読有
- ②秋山修志 概日時計因子の構造や動態を調べる意義とは?, 生物物理 **56**, 266-270, 2016 査読有
- ③向山厚, 阿部淳, 孫世永, 秋山修志 蛋白質の化学反応が細胞内の時を計る。実験医学 **33**, 3119-3122, 2015 査読有
- ④Abe, J., Hiyama, T. B., Mukaiyama, A., Son, S., Mori, T., Saito, S., Osako, M., Wolanin, J., Yamashita, E., Kondo, T. and Akiyama, S., Atomic-scale origins of slowness in the cyanobacterial circadian clock, *Science*, **349**, 312-316, 2015, 査読有.
- ⑤Mukaiyama, A., Osako, M., Hikima, T., Kondo, T. and Akiyama, S. A protocol for preparing nucleotide-free KaiC monomer. *BIOPHYSICS*, **11**, pp. 79-84, 2015. 査読有
- ⑥Nishiwaki-Ohkawa, T., Kitayama, Y., Ochiai, E. and Kondo, T. Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **111**, pp. 4455-4460, 2014. 査読有
- ⑦Kitayama, Y., Nishiwaki-Ohkawa, T., Sugisawa, Y. and Kondo, T. KaiC intersubunit communication facilitates robustness of circadian rhythms in cyanobacteria. *Nature Communications*, **2897**, pp. 1-13, 2013. 査読有
- ⑧Imai, K., Kitayama, Y. and Kondo, T. Elucidation of the Role of Clp Protease Components in Circadian Rhythm by

Genetic Deletion and Overexpression in Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, **195**, pp. 4517-4526, 2013. 査読有

- ⑨ Goda, K., Ito, H., Kondo, T. and Oyama, T. Fluorescence Correlation Spectroscopy to Monitor Kai Protein-based Circadian Oscillations in Real Time. *J. Biol. Chem.*, **287**, pp. 3241-3248, 2012. 査読有
- ⑩ Nishiwaki, T., and Kondo, T. Circadian autodephosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC occurs via formation of ATP as intermediate. *J. Biol. Chem.*, **287**, pp. 18030-18035, 2012. 査読有
- ⑪ Akiyama, S. Structural and dynamic aspects of protein clocks: How can they be so slow and stable? *Cell. Mol. Life. Sci.*, **69**, pp. 2147-2160, 2012. 査読有

[学会発表] (計 111 件)

- ① 近藤孝男 (2017) 生命に宿る振り子時計, 第 26 回 国際土岐コンファレンス学術講演会
- ② Kondo T (2015) Measuring Time of a Day in Cyanobacteria by Circadian Clock Protein KaiC, Chilton Lecture, Univ. Texas, Southwestern Medical center, 2015, Dallas, USA
- ③ 近藤孝男, Circadian pacemaker of cyanobacteria by KaiC ATPase, CDB Symposium 2015 (理化学研究所・神戸) 2015.
- ④ 近藤孝男, シアノバクテリアの時計蛋白質 KaiC ATPase, 大阪大学蛋白質研究所セミナー (大阪大学・吹田) 2015.
- ⑤ 近藤孝男, シアノバクテリアの概日時計のペースメーカーと駆動装置をになう ATPase KaiC, 山口大学時間学研究所時間学特別セミナー (山口大学・山口) 2015.
- ⑥ Shuji Akiyama, Watching slow but ordered dynamics of clock proteins, 第 21 回日本時間生物学会学術大会 (九州大学・福岡) 2014.
- ⑦ Takao Kondo, Design of circadian timing mechanisms in cyanobacteria and robust biological rhythms in various organisms. JSC International Symposium (九州大学・福岡) 2014.
- ⑧ 秋山修志, 概日時計システム研究における bioSANS への期待と展望, 平成 26 年度第 1 回生物構造学研究会 (エッサム神田ホール・東京) 2014.
- ⑨ 近藤孝男, 時計蛋白質 KaiC によるシアノバクテリアの時計機構, 東大理学系研究科生物科学第 986 回生物科学セミナー (東京大学・東京) 2014.
- ⑩ Takao Kondo, Design of circadian timing mechanisms in cyanobacteria, The 68th Fujiwara Seminar (IBM 天城ホームステッド・伊豆) 2014.
- ⑪ Takao Kondo, Circadian pacemaker and

oscillator in the cyanobacterial clock protein KaiC, Seminar at University of Geneva (Univ. of Geneva, Geneva) 2014.

- ⑫ Akiyama Shuji, KaiC as Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock, Society for Research on Biological Rhythms 2014 (Big Sky, Montana, USA) 2014.
- ⑬ Takao Kondo, Functional Structure of cyanobacterial clock protein KaiC, Society for Research on Biological Rhythms 2014 (Big Sky, Montana, USA) 2014.
- ⑭ 近藤孝男, 時計蛋白質 KaiC ATPase によるシアノバクテリアの概日時計, 大阪大学蛋白質研究所セミナー (大阪大学・吹田) 2014.
- ⑮ Shuji Akiyama, KaiC as A Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock, 6th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science, Okazaki, Japan, 2013.
- ⑯ 秋山修志, 時計蛋白質の概日揺らぎの分子化学的解明を目指して, 自然科学研究機構プロジェクト合同シンポジウム (生理学研究所・愛知) 2013.
- ⑰ 近藤孝男 (2013) シアノバクテリアの概日システム, CREST シンポジウム 研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」, 2013 年 2 月 25 日, 東京
- ⑱ Takao Kondo, Circadian pacemaker and oscillator of cyanobacteria installed in KaiC protein, Symposium, Toward Whole-Cell Modeling (神戸国際会議場・神戸) 2012.
- ⑲ Takao Kondo, Clock protein KaiC as both pacemaker and the oscillator of circadian clock in cyanobacteria, The 9th Okazaki Biology Conference (岡崎・沖縄) 2012.
- ⑳ Shuji Akiyama, Tracking and Visualizing Intramolecular Feedback in Cyanobacterial Clock Protein KaiC, The 12th KIAS Conference and Protein Structure and Function (The Korea Institute for Advanced Study, Seoul, Korea) 2012.
- ㉑ Takao Kondo, Circadian pacemaker and oscillator of cyanobacteria installed in KaiC protein, The EMBO meeting 2012, (Nice Acropolis, France) 2012.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://clock.bio.nagoya-u.ac.jp>

https://groups.ims.ac.jp/organization/akiyama_g/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 孝男 (KONDO, Takao)
名古屋大学・大学院理学研究科・名誉教授
研究者番号：1124223

(2) 研究分担者

秋山 修志 (AKIYAMA, Shuji)
分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・教授
研究者番号：50391842

(3) 連携研究者

北山 陽子 (KITAYAMA, Yoko)
名古屋大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：20444367
(2016年8月逝去)