

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：63903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291039

研究課題名(和文) 時計タンパク質の固有周波数の分子科学的解明

研究課題名(英文) Analysis of time constant encoded in circadian clock proteins

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアの生物時計システムにおいては、発振周期を規定する候補因子が唯一のタンパク質分子(KaiC)にまで絞り込まれつつある。本研究課題ではKaiCのATPase活性の前定常状態解析を行い、その緩和ダイナミクスと生物時計システムの周波数(周期の逆数)の相関を調べた。その結果、KaiCそのものに1日に1回振動するための物理化学的基盤が備わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This research project aims at analyzing pre-steady-state relaxations of the ATPase activity of a clock protein, KaiC, which is known to be a pacemaker of the circadian clock system in cyanobacteria. A fine correlation between the relaxation time of KaiC alone and the clock-system's frequency supports the idea that the slow ATPase in KaiC yields the circadian response frequency of intermolecular interactions with other clock-related proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：概日時計

1. 研究開始当初の背景

生物時計とは、地球に生息する多くの生命が備えているタイミング制御システムで、時計の発する約 24 時間 (概日) 周期のリズムを指針に、様々な生命活動を昼夜環境サイクルと同調させている。

生物時計には次の 3 つの特徴が種を超えて保存されている。第一に、外界から刺激のない恒常的条件でも自律的に発振する (自律的発振)。例えば、連続的な暗所もしくは明所であっても概日周期で時を刻む。第二に、発振周期が外界温度の影響を受けにくい (温度補償性)。通常の化学反応が温度依存的に加速されるのに対し、時計の周波数 (周期の逆数) は夏でも冬でも変わらず一定である。そして第三に、光や温度といった外界のリズムと同調することができる。

シアノバクテリアの生物時計は転写や翻訳を必要としない自律振動系を有する。すなわち、3 種類の Kai タンパク質 (KaiA, KaiB, KaiC) を試験管内で混ぜ合わせると、KaiC のリン酸化状態が概日周期でリズムに変動することが知られている (Nakajima *et al.*, *Science* **308**, 414-415, 2005)。試験管内再構成をかわきりに、生化学、生物物理学、構造生物学など幅広い分野の研究者が発振機構の解明に取り組み、それらの研究によって多くの知見が得られた。しかし、タンパク質分子という材料だけで、ゆっくりかつ安定した反応を実現している物理化学的な基盤は未解明であった。

2. 研究の目的

3 種の Kai タンパク質のうち、KaiC に時計のコアが秘められていることを示唆する報告がある。第 1 に、KaiC 単独の ATPase 活性が Kai タンパク質時計 (KaiA + KaiB + KaiC) の周波数 (周期の逆数) と相関し、かつ温度補償性を保持している (Terauchi *et al.*, *PNAS* **104**, 16377-16381, 2007)。これは、生物時計に共通する 3 つの性質の大部分を KaiC が保持していることを意味する。また、KaiA や KaiB が KaiC と相互作用するタイミングは、ほぼ KaiC の状態 (リン酸化、ATPase など) により決定されている (Akiyama S, *CMLS* **69**, 2147-2160, 2012)。

本課題では、ATPase 活性の詳細解析を通して KaiC の時定数 (固有周波数) を検証し、「何が 24 時間を決めているのか」という単純明快な問いの回答を導く。

3. 研究の方法

概日時間スケールの実験において、試料の状態や活性の評価はときに何十時間から何週間という長期間に及ぶ。KaiC のリン酸化状態や ATPase 活性を長期間かつ安定に定量するための多チャンネル型精密測定装置を設計し、安定性およびスループットの向上を図った。

KaiC の ATPase 活性の前定常状態解析を

行い、遅く安定した反応を実現している物理化学的基盤を探索した。野生型 KaiC の測定に続き、複数の KaiC 変異体について検証を行った。

野生型および周期変異型 KaiC の X 線結晶構造を行い、ATPase 活性の詳細解析から見積もった時定数 (固有周波数) を構造上にマッピングした。

4. 研究成果

多チャンネル型のプログラム式温調試料ホルダーを装備したオートサンプラーや分光光度計は市販されていない。本課題では、各種のムーブメント、ドライバ、ペルチェ素子、分光素子などを個別に調達し、制御システムのプログラミングを独自に行うことで独自の装置を安価に製作した (論文準備中)。以下、KaiC のリン酸化サイクルや ATPase 活性は、本装置を用いて評価を行った。

KaiC の ATPase 活性を調べるためには、ATP を結合していないアポ型 KaiC に ATP を添加し、その後に系が定常状態へと向かう反応過程 (前定常状態) を詳細に追跡する必要がある。ホロ型 KaiC が安定な 6 量体構造を形成するのに対し、アポ型 KaiC は単量体で熱的に不安定である。当事、アポ型 KaiC を安定に取り扱う術がなかったため、ATPase 活性の前定常状態解析は困難を極めた。我々は試料調製法の改善と最適化に取り組み、その結果、ヌクレオチド (ATP, ADP など) を含まない溶液環境下でアポ型 KaiC をより安定に取り扱うことができるようになった (Mukaiyama *et al.*, *BIOPHYSICS* **11**, 79-84, 2015)。これにより、KaiC の ATPase 活性の前定常状態解析に一定の道筋がついた。

上述の計測・調製技術を用いて、KaiC の ATPase 活性の前定常状態解析を行った。反応開始直後に約 $35 \text{ ATP d}^{-1} \text{ KaiC}^{-1}$ であった ATPase 活性は指数関数的に減少し、ATP 添加後約 8 時間で最小値 ($\sim 8 \text{ ATP d}^{-1} \text{ KaiC}^{-1}$) を示し、その後驚くべきことに緩やかな増加へと転じて、24 時間後に定常状態 ($12 \text{ ATP d}^{-1} \text{ KaiC}^{-1}$) へと至った。この減衰振動にも目される緩和曲線を 2 次の伝達関数を仮定して解析したところ、 0.91 d^{-1} の固有振動数 (ω_c) が見積もられた。これは、KaiC そのものに 1 日に 1 回振動するための物理化学的基盤が備わっていることを示唆する。

これまでの研究から、Kai タンパク質時計 (KaiA, KaiB, KaiC が全て共存) の周期を大きく変える KaiC 変異体が幾つか報告されている。そこで、短周期型、長周期型、リズム喪失型の KaiC 変異体について同様の解析を行い、KaiC 単独での ω_c と、Kai タンパク質時計としての周波数 (ω_{abc}) との相関を調べた。 ω_c と ω_{abc} はほぼ 1 対 1 で対応しており、KaiC に秘められた ω_c が Kai タンパク質時計の周波数の根源であると考えられた。驚くべきことに、 ω_c との対応関係はシアノバク

テリア細胞内の転写・翻訳リズムにまで伝播していた (Abe *et al.*, *Science* **349**, 312-316 2015).

「遅さ」絶対的に小さい「遅さ」の起源を探るべく、KaiC の N 末端ドメインの X 線結晶構造を詳しく検証した。その結果、ATP への水分子の接近を妨げる立体障害が存在すること、その立体障害の解消にはタンパク質主鎖のシス-トランス異性化が必要であることを突き止めた (Abe *et al.*, *Science* **349**, 312-316 2015)。これらの構造的基盤は、そもそも活性の高い ATPase 活性を遅く抑制制御して活用していることを示唆する。

今後も種々の KaiC 変異体を用いて研究を行い、KaiC の固有周波数が分子の何処にどのような形で書き込まれているのかを検証する予定である。

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 5 件)

秋山 修志, “時間生物学と放射光科学の接点”, *放射光*, 査読有り, **29**, 56-63 (2016).

阿部 淳, 向山 厚, 秋山 修志, “時計タンパク質 KaiC の「遅さ」が刻み込まれた原子構造”, *SPRING-8/SACLA 利用者情報*, 査読無し, **21**, 2-4 (2016).

向山 厚, 阿部 淳, 孫 世永, 秋山 修志, “タンパク質の化学反応が細胞内の時を計る”, *実験医学*, 査読無し, **33**, 3119-3122 (2015).

Abe 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*, 査読有り, **349**, 312-316 (2015). DOI: 10.1126/science.1261040

Mukaiyama A., Osako M., Hikima T., Kondo T., and Akiyama S., “A protocol for preparing nucleotide-free KaiC monomer”, *BIOPHYSICS*, 査読有り, **11**, 79-84 (2015). <http://doi.org/10.2142/biophysics.11.79>

[学会発表](計 2 件)

秋山 修志, “藍藻生物時計システムにおける分子動態と貫階層性”, 次ステージ機能生命科学の展望, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市) (Mar 10, 2016).

Akiyama S., “X-ray Solution Scattering as Research Tools for Bio-molecular Systems”, Winter School of ASIA CORE

Program, Beijing, China (Feb 26, 2016).

Mukaiyama A., Abe J., and Akiyama S., “Circadian periodicity encoded in KaiC ATPase”, Winter School of ASIA CORE Program, Beijing, China (Feb 26, 2016).

Akiyama S., “Atomic-scale origins of slowness in the cyanobacterial circadian clock”, 8th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science: Experiments and Simulation, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市) (Feb 16, 2016).

秋山 修志, “タンパク質の奏でる生体リズム”, 城北科学の日, 岡崎市立城北中学校 (愛知県岡崎市) (Feb 12, 2016).

秋山 修志, “階層横断的に機能する分子システムの構造アンサンブルとダイナミクス研究”, 第 29 回日本放射光学会年会, 東京大学柏の葉キャンパス駅前サテライト (千葉県柏市) (Jan 11, 2016).

秋山 修志, “藍藻生物時計システムに見られる貫階層性”, 第 6 回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市) (Nov 26, 2015).

秋山 修志, “藍藻の時計タンパク質に内包された概日周期と遅さの根源”, 藍藻の分子生物学 2015, かずさアカデミアホール (千葉県木更津市) (Nov 17, 2015).

Akiyama S., “KaiC as Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock”, Grand Design of Molecular Systems, 分子科学研究所 (愛知県岡崎市) (Oct 8, 2015).

Akiyama S., “KaiC as Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock”, European Biological Rhythms Society (EBRS)/World Congress of Chronobiology (WCC) meeting, Manchester, UK (Aug 6, 2015).

秋山 修志, “生物時計システムに見られる階層性 ~ 原子から細胞スケールまでを貫くロジック ~”, 第 3 回 Neutrons in Biology 研究会, 日本原子力研究開発機構 (茨城県那珂郡) (Mar 3, 2015).

秋山 修志, “生物の時間をはかるタンパク質時計”, 国研セミナー, 分子科学研究所 (愛知県岡崎市) (Nov 28, 2014).

Akiyama S., “Watching slow but ordered dynamics of clock proteins”, 第 21 回日本時間生物学会学術大会, 九州大学百年講堂

(福岡県福岡市) (Nov 8, 2014).

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 (東京都千代田区) (Oct 3, 2014).

Akiyama S., “KaiC as Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock”, Society for Research on Biological Rhythms, Montana, USA (Jun 17, 2014).

Akiyama S., “Small-angle x-ray Scattering Study on Cyanobacterial Clock Protein KaiC”, The 6th Taiwan-Japan Joint Meeting on X-ray and Neutron Scattering, Taipei, Taiwan (Mar 11, 2014).

Akiyama S., “KaiC as A Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock”, Asian CORE Winter School on Frontiers of Molecular, Photo-, and Material Sciences, Taipei, Taiwan (Feb 25, 2014).

Akiyama S., “KaiC as A Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock”, 6th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Science, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市) (Nov 27, 2013).

秋山 修志, “タンパク質時計のブラックボックスを開く”, 第 4 回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市) (Nov 19, 2013).

Akiyama S., “The frontier in protein-clock system ~ How do organisms measure time? ~”, サマースクール 2013 「生命システムの動秩序」, 岡崎統合バイオサイエンスセンター (愛知県岡崎市) (Aug 24, 2013).

⑭ Akiyama S., “KaiC as a Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock”, 15th Japan-Korea Symposium on Molecular Science, ホテル北野プラザ六甲荘 (兵庫県神戸市) (Jul 5, 2013).

〔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 :
出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :