

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

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
An Integrated Multi-scale Approach for Studying
Cyanobacterial Circadian Clock System

課題番号：17H06165

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



研究の概要

生物時計は生命活動を約24時間（概日）の周期でリズムに制御するシステムである。しかし、24時間周期がどのように実現されているのか依然として謎である。本課題では、シアノバクテリアの生物時計の中核となる時計タンパク質を対象に、生物物理学、構造生物学、時間生物学、制御工学などを用いた統合的多階層アプローチにより、この謎の解明に挑戦している。

研究分野：生物物理学、時間生物学

キーワード：概日時計、時計タンパク質、シアノバクテリア、KaiC

1. 研究開始当初の背景

生物時計は生命活動を約24時間（概日）の周期でリズムに制御するシステムである。多様な生物種を対象とした研究がなされ、(1)概日周期での自律的発振、(2)周期の温度補償性、(3)同調能という3つの性質が種を超えて保存されていることが知られている。

研究対象であるシアノバクテリアにおいては、時計遺伝子 (*kaiABC*) の発見当初は転写・翻訳サイクルが発振モデルとして採用されていたが (*Science* 1998)、その後の研究により、翻訳物である3種類の時計タンパク質 (KaiA、KaiB、KaiC) と ATP を混ぜ合わせるだけで、概日リズムを奏する自律振動子が再構成された (*Science* 2005)。これを機に研究の舞台は転写・翻訳から Kai タンパク質へと移されたが、24時間を規定する時定数のエンコード先/方法の解明が次の課題となった。

2. 研究の目的

シアノバクテリアの生物時計システムは階層間の連動が顕著であり、計時システムの周波数だけでなく温度補償性までもが KaiC 単体の影響を受ける。本課題では、多階層にわたる現象を統合的に解析し、計時システムのコア (KaiC) に秘められた24時間周期と温度補償の制御基盤を解明する。

3. 研究の方法

次の5項目を並行して研究を進める。

①周期変異体、温度補償変異体のスクリーニング：ATPase を指標とした *in vitro* スクリ

ーニング系を独自開発し、既存の生物発光スクリーニング系と併用しつつ、KaiC の周期変異株や温度補償変異株を大規模スクリーニングする。両スクリーニング系からの結果を比較検討後にマージして、研究項目②～④における機能解析や構造解析に供する。

②固有振動数の分子内・進化系統樹上マッピング：我々は、KaiC 単体の固有振動数 (ω , 野生型は 0.91 d^{-1}) を実験的に定量する技術を確立した (*Science* 2015)。一方で、他種シアノバクテリアにおいて KaiA/KaiB の遺伝子が欠損している例があることを加味すると、「KaiC ホモログの ω に時計の振動数が書き込まれている」という仮説が導かれる。同技術で KaiC ホモログを解析し、 ω の分布を進化系統樹上や KaiC 分子内にマッピングして仮説の是非を検証する。

③固有振動数を規定する ATPase/リン酸化構造基盤の解明：野生型/周期変異型 KaiC の X 線/中性子結晶構造解析に理論化学計算を援用して、水分子等と ATP の反応過程やプロトン還流経路を可視化する。取得した KaiC の構造情報をもとに、ATPase 活性部位とリン酸化部位の共役関係、KaiA/KaiB の KaiC に対する結合親和性を解析する。

④温度補償制御の解明：*In vitro* スクリーニング系を駆使して、温度補償変異 ($Q_{10} \geq 1.2$ or $Q_{10} \leq 0.8$) の KaiC 分子内マッピングを実施する。KaiC 温度補償変異体の構造を X 線結晶構造解析するとともに、分子全体の揺らぎを中性子準弾性散乱で評価する。

⑤液中における動的構造解析：KaiA/KaiB濃度を高精度でアナログ的に連続変化させることができるマイクロ流路型・連続滴定測定系を整備し、KaiCとKaiA/KaiBの分子間相互作用を蛍光やX線溶液散乱で精査することで、結晶相では検出困難であった多様なKaiCの構造や状態を捕捉する。

4. これまでの成果

前述の5項目について主要成果を記述する。

① *In vitro* スクリーニング系を新規開発し[4]、従来比10倍以上のスループットで200変異体を解析して、75種のATPase変異体、62種のATPase温度補償変異体を取得した[3]。並行して *in vivo* スクリーニングを実施し、これまでに300種のKaiC周期変異体、7種のKaiC温度補償変異体を同定した。そのなかでも、超短周期(15 h)から超長周期(158 h)にわたるリズムを表出せしめる同一サイト点変異群の発見は特筆に値する(論文投稿中)。

② 23種のKaiCホモログを研究対象として選択した。同時に、発現精製過程を最適化する際の基本戦略を策定し[5]、同戦略に沿って試料調製を進めた。進化系統樹上に露わとなった ω の分布図は、我々の仮説を支持するのみならず、KaiCを核とした計時システムの進化過程を解明するものであった[2]。

③ 既報構造中で最高の空間分解能を誇るKaiC新規構造を解明した。理論化学計算を援用することで、ATP反応過程におけるプロトン還流経路やATPase/リン酸化共役機構の可視化を達成した[3]。

④ *In vitro* スクリーニングの結果をKaiC分子内にマッピングし、温度依存性を示す変異群($Q_{10} \geq 1.2$)や、逆温度依存性を示す変異群($Q_{10} \leq 0.8$)のクラスターを同定した。温度補償変異体のX線結晶構造に基づいて中性子準弾性散乱を実施し、温度補償制御と揺らぎの間に明瞭な因果関係があることを発見した。

⑤ Kaiタンパク質に特化したマイクロ流路型・連続滴定測定系を構築した[7]。KaiCに対してKaiA/KaiBの連続滴定X線溶液散乱測定を行ったところ、6量体内の不均一性に由来する非凡かつ多様な結合モードが解明された(論文投稿中)。また、KaiBC複合体の形成がKaiCの遅いATPaseにより律速されることを発見した[6]。KaiCはこの仕組みを活用して、 ω に織り込まれた遅い時定数を他の分子種、延いては計時システム全体に波及させていることを解明した[1, 8]。

5. 今後の計画

引き続き前述の5項目について研究を継続する。②進化系統樹上における ω の分布図、および③ATPase/リン酸化構造基盤を解明したので、それらを論文発表する。④温度補償制御の解明については、他の温度補償変異体を用いた実験を早急に実施し、観察の普遍性を確認して論文化する。KaiCの①変異体ス

クリーニングと⑤液中動的構造解析は順調に進捗しているので、今のペースと質を堅持して研究を進める。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

- [1] Mukaiyama A, Furuike Y, Akiyama S, A kinetic mechanism gating the assembly of KaiB-KaiC complex in the cyanobacterial circadian clock system, *Biological Clocks: with reference to suprachiasmatic nucleus*, in press (2020).
- [2] Akiyama S, Cyanobacterial circadian clock system through the chemistry of rhythm, structure, and evolutionary diversity, *Keynote Lecture, ELSI 8th International Symposium*, Tokyo, Japan (Feb 4, 2020).
- [3] Akiyama S, Cyanobacterial circadian clock system through the chemistry of rhythm, structure, and evolutionary diversity, *Keynote Lecture, V World Congress of Chronobiology*, Suzhou, China (April 25, 2019).
- [4] Ouyang D, Furuike Y, Mukaiyama A, Ito-Miwa K, Kondo T, Akiyama S, Development and Optimization of Expression, Purification, and ATPase Assay of KaiC for Medium-Throughput Screening of Circadian Clock Mutants in Cyanobacteria, *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2789-2800 (2019).
- [5] Mukaiyama A, Ouyang D, Furuike Y, Akiyama S, KaiC from a cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 retains functional and structural properties required as the core of circadian clock system, *Int. J. Biol. Macromol.* 131, 67-73 (2019).
- [6] Mukaiyama A, Furuike Y, Abe J, Shin-ichi Koda, Yamashita E, Kondo T, Akiyama S, Conformational rearrangements of the C1 ring in KaiC measure the timing of assembly with KaiB, *Sci. Rep.* 8, 8803 (2018).
- [7] 上久保裕生, 連続滴定X線溶液散乱測定を志向した μ 流路型自動サンプリングシステムの開発, *J. Comput. Chem. Jpn.* 17, 57-64 (2018).
- [8] Akiyama S, Mukaiyama A, Abe J, Furuike Y, Cyanobacterial circadian clock system: how and why can it be so slow and stable?, *Biological Clocks: with reference to suprachiasmatic nucleus*, 73-77 (2017).

7. ホームページ等

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