

(SPRUC 2022 Young Scientist Award 受賞 研究報告)

放射光 X 線で照らす時計タンパク質 KaiC の概日振動メカニズム

自然科学研究機構 分子科学研究所

協奏分子システム研究センター 古池 美彦

Abstract

シアノバクテリアの概日時計は、時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC によって構成される。ペースメーカーとして働く KaiC は、N 末端側の C1 ドメインにて ATP 加水分解反応を触媒して時計システム全体のペースを決定し、C 末端側の C2 ドメインではリン酸化・脱リン酸化によりサイクル反応を進行させる。C1 ドメインと C2 ドメインの間には、密接な連携メカニズムが存在すると長年考えられてきたが、リン酸化サイクル反応における C2 ドメインの構造変化の全容が解明されていなかったために、その仕組みは明らかになっていなかった。

SPRING-8 において構築した KaiC 結晶構造ライブラリーに基づき、リン酸化サイクル反応全体を原子分解能で可視化することによって、リン酸化部位の状態に依存して二次構造が転移するスイッチ機構を見出した。このリン酸化スイッチ機構は、C1 ドメインの ATP 加水分解反応によって生じる構造変化と連携していた。この 2 つのドメインにまたがって、それぞれのサイクル反応を統合するアロステリックな分子構造変化は、「概日周期をもった振動性」をはじめとする概日時計の機能に必須であった。

1. 原子スケールで時を刻むタンパク質、KaiC

地球の自転による 24 時間周期の環境変動に対応するため、生命は体内の計時システムを発達させ、細胞活動をリズムに制御している。これは概日時計と呼ばれ、時計遺伝子、時計タンパク質によって構成される。概日時計に関わる時計遺伝子がショウジョウバエで発見されて以降、シアノバクテリア、昆虫、植物、ヒトを含む哺乳類など、概日時計を支える生体分子が相次いで発見されている。

時計遺伝子が誘起する細胞活動の概日振動性は、転写-翻訳フィードバック機構によって説明がなされている。これは、細胞核内の時計遺伝子の転写-翻訳によって生成された時計タンパク質が、核外へと移動して他の関連因子との複合体形成・化学反応を通して状態変化し、核内に戻って自身の転写活性を抑制、しだいに時計タンパク質の濃度が低下するに伴い転写活性の抑制効果がおさまリ、ふたたび時計タンパク質の生成量が増加するという一連の振動メカニズムである。

研究の進展に伴い、転写-翻訳フィードバック機構の背後で実際に時刻情報を生み出す化学的基盤として、時計タンパク質の活性部位で進行する触媒

反応（リン酸化、脱リン酸化、ATP 加水分解など）が着目されはじめ、現在では時計タンパク質の動態研究とりわけ立体構造解析が主要な研究の舞台のひとつとなっている。

シアノバクテリアの概日時計^[1]は、時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC によって駆動されている。2005 年には、これら 3 種のタンパク質と ATP（アデノシン三リン酸）を混合するだけで、24 時間周期の振動反応が試験管内で再現できることが明らかにされ、転写-翻訳フィードバックループに依存せずとも^[2]、時計タンパク質のみで概日振動を引き起こせることが実証された^[3]。以降、生化学、生物物理学、構造生物学にまたがる *in vitro* 実験が様々な角度から試みられ、KaiA-KaiB-KaiC の離合集散現象が、KaiC の ATP 加水分解反応および自己リン酸化・自己脱リン酸化反応によって指揮されていることが明らかにされてきた^[4-10]。

しかしながらペースメーカーとして働く KaiC の内部で、どのようなメカニズムが働き、時刻情報が生成されているかは謎に包まれたままであった。KaiC は、C1、C2 という 2 つのドメインによって構成され、ATP を結合して六量体を形成し機能する (図 1A)。C1 では ATP 加水分解反応 (C1-ATPase サイクル)

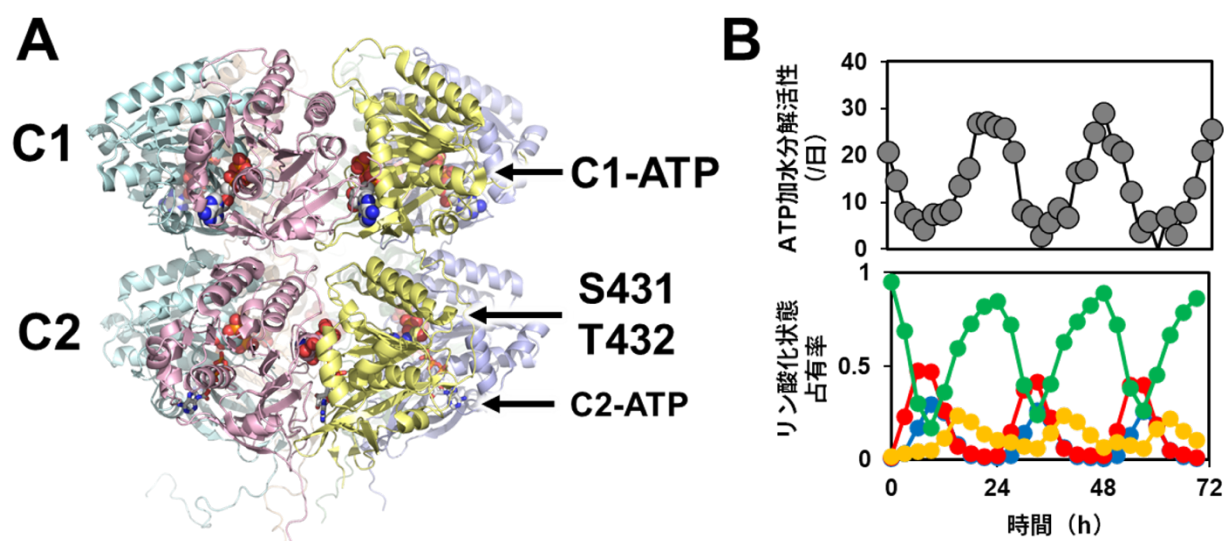


図1 時計タンパク質 KaiC の全体構造と ATP 加水分解活性およびリン酸化状態の概日振動
(A) KaiC 六量体の 2 つのドメイン (C1、C2) と基質 ATP およびリン酸化部位 (S431、T432) の配置、(B) ATP 加水分解活性およびリン酸化状態 (緑: KaiC-ST、赤: KaiC-SpT、青: KaiC-pSpT、黄: KaiC-pST) の振動。

が進行し、その反応速度により時計システム全体のペースが規定される^{5, 6)}。C2 では S431 と T432 という 2 つのアミノ酸残基が順にリン酸化・脱リン酸化されるサイクル反応 (C2-リン酸化サイクル) が進行し (ST → SpT → pSpT → pST → ST: S は S431、T は T432、p はリン酸化した状態を指す)、これにより KaiC の状態が 24 時間周期で変動する⁴⁾ (図 1B)。C1 と C2 のあいだには密接な連携があり、どちらか片方でも反応活性が損なわれると、KaiC は計時機能を失う。シアノバクテリア概日時計の中核を成すこの C1-C2 連携メカニズムは長年明らかにされてこなかった。

2. 時計タンパク質 KaiC の X 線結晶構造解析

KaiC がみせる「1 日」にわたる構造変化の全容を明らかにするためには、異なるリン酸化状態にある KaiC を調製する必要があった。あらかじめ溶液中でリン酸化状態をコントロールした KaiC 試料を用いて結晶化に取り組み、広範な条件探索の末、計 13 種類におよぶ KaiC 六量体構造を結晶中にて観察することができた。

SPring-8 BL44XU での回折実験で得られた 2.2-3.1 Å 分解能の電子密度マップに基づき、KaiC 六量体に含まれる全プロトマーのリン酸化状態を逐一同定した。その結果、本研究で構築した KaiC 構造ライブラリーには、六量体すべてが脱リン酸化した状態の

KaiC-ST、T432 を Glu に変異させて pT432 を模倣した KaiC-SpT (SE)、全てのリン酸化部位が修飾を受けた KaiC-pSpT、T432 が脱リン酸化した KaiC-pST が含まれており、C2-リン酸化サイクル全体をカバーすることができた。他にも、部分的に脱リン酸化が進行した KaiC 六量体 (KaiC-pSpT/pST や KaiC-pST/ST) も捉えられており、溶液中でみられる KaiC のリン酸化状態変化の特徴が再現されていた。

また同様に、C1 ドメインの活性部位の状態を判別したところ、ATP 加水分解反応の結果生じた生成物 ADP (アデノシン二リン酸) を結合している KaiC 六量体が構造ライブラリーに含まれていることが分かった。これは、C1 と C2 の 2 種類の反応サイクルにおける重要な反応ステップがはじめて同時に捉えられたことを示している。

3. KaiC を駆動する 2 つのドメインの連携メカニズム

KaiC 構造ライブラリーの詳細な観察の結果、C1-C2 連携メカニズムを支える 3 つの構造基盤を明らかにすることができた。

リン酸化部位である S431 と T432 は、C2 ドメインのプロトマー界面に位置している (図 1A)。その近傍に、リン酸化状態の変化に応じて二次構造が転移する領域が存在することがはじめて明らかとなった。KaiC-ST では、この領域はヘリックス構造をとってい

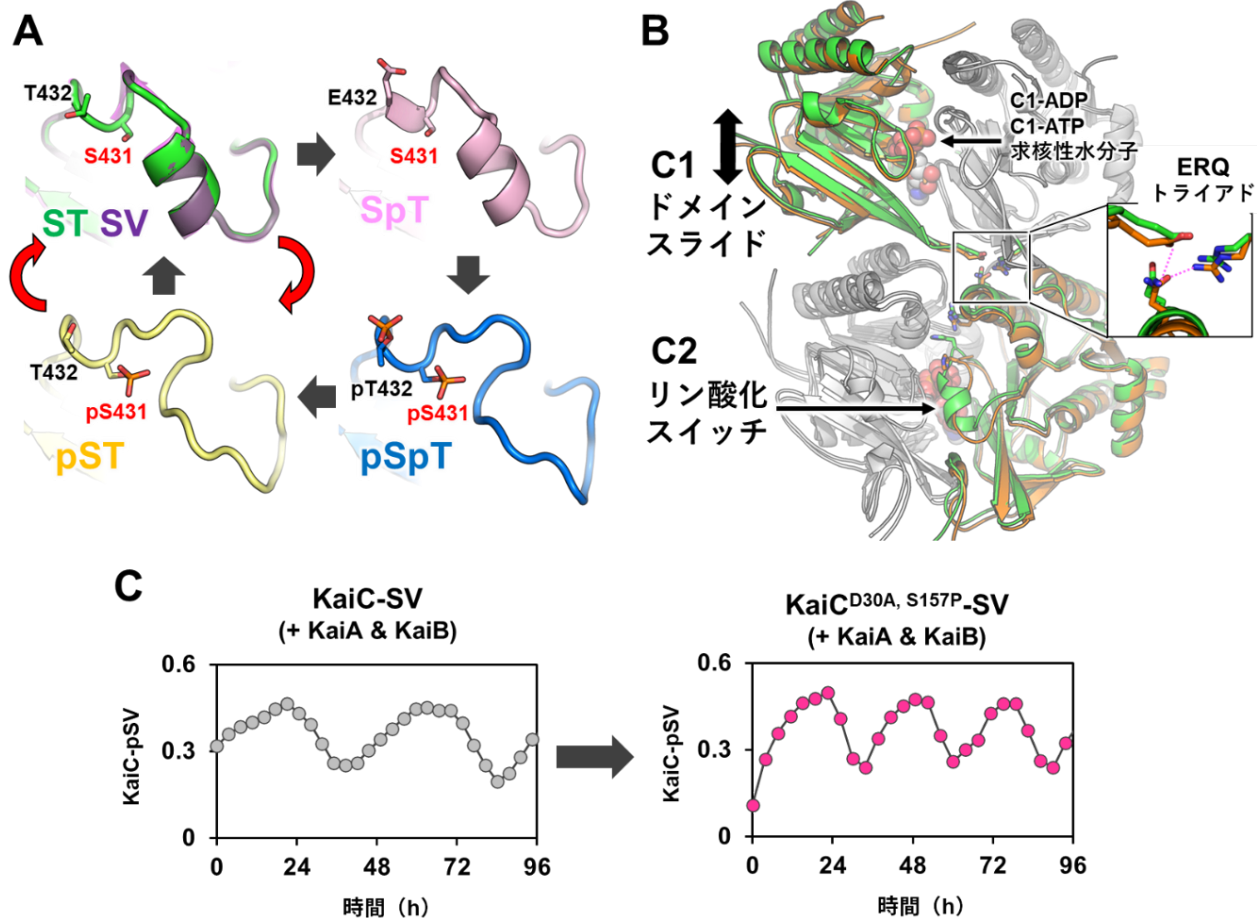


図2 KaiCの概日振動の根幹をなすC2-リン酸化サイクルとC1-ATPaseサイクルのあいだのアロステリックな連携 (A)C2-リン酸化サイクルにともなうヘリックス構造-ほどけた構造の転移 (緑: KaiC-ST、赤: KaiC-SpT、青: KaiC-pSpT、黄: KaiC-pST、紫: KaiC-STに重ねて描画した KaiC-SV)、野生型の KaiC は黒色の矢印に沿って4状態を経由するが KaiC-SV は赤色の矢印に沿って2状態のみを経由して概日振動を生み出す、(B)隣り合う2つのプロトマーを六量体の中心 (リング内径) からみたときに見出されるC1-C2連携を生み出す構造的要素の配置 (緑: C1-ATPと求核性水分子を結合した KaiC-ST、橙: C1-ADPを結合した KaiC-pST)、(C)S431単一リン酸化変異体 (KaiC-SV) の KaiA、KaiB存在下での47時間周期振動 (灰色)とATPase活性化変異によって短縮化された29時間周期振動 (ピンク色)。

た (図2A)。このヘリックス構造は、T432のリン酸化の影響を受けず、KaiC-SpTにおいても同様に観察された。KaiC-pSpTでは、同じ領域に特定の二次構造は存在せず、ほどけた構造が見つかった。これはT432の脱リン酸化によって変化することなく、KaiC-pSTでも同様のほどけた構造がみられた。このヘリックス構造-ほどけた構造の転移は、S431およびpS431の側鎖体積の違いや周辺との水素結合パターンの差異によって生じており、S431のリン酸化状態のみに依存して切り替わるスイッチ機構 (C2-リン酸化スイッチ) として働くことが分かった。

生化学的に同定されていた4つのリン酸化状態 (ST、

SpT、pSpT、pST) が2種類の構造に分類されるという結果は意外なものではあったが、このC2-リン酸化スイッチがC1とのドメイン間連携において重要な役割を果たすこともあわせて明らかになった (図2B)。C1は、プロトマー界面に結合している生成物ADP (C1-ADP)と新たな基質ATP (C1-ATP)の交換時に、隣り合うプロトマー間でドメイン全体が上下方向にシフトする構造変化 (C1-ドメインスライド) を起こすこと、そしてC1-ドメインスライドがATP加水分解で反応物となる求核性水分子の配置と対応していることが判明した。

C2-リン酸化スイッチとC1-ドメインスライドの構

造変化は、水素結合の切り替え機構によって仲介されていた (図 2B 挿入図)。C2 に由来する中性の Q394 が、C1 ドメインに属する塩基性の R217 と酸性の E214 のあいだを行き来できるようにドメイン界面がデザインされていたのである (これら 3 つのアミノ酸残基をまとめて ERQ トライアドと名付けた)。

このように C1-C2 連携メカニズムは、たった 3 つの構造的要素、すなわち C2-リン酸化スイッチ、C1-ドメインスライド、ERQ トライアドによる仲介、によって単純化して記述できることが判明した。C1-ATPase サイクルは、ATP の結合、求核性水分子の配置、リン酸結合の開裂、ADP の解放、といった多数の素過程から成っている。C2-リン酸化サイクルについても、少なくとも 4 種のリン酸化状態が必須と考えられてきた。KaiC はこうした活性部位における化学反応をアロステリックな運動へと統合的に変換することで、分子全体のリズムミクな構造変化すなわち概日振動性を獲得しているのである。

4. S431 単一リン酸化変異体によって実証された KaiC 概日振動メカニズム

C2-リン酸化スイッチの発見は、KaiC がリン酸化主要 4 状態を経由せずとも、S431 のリン酸化状態変化のみによって KaiC が概日振動できる可能性を示していた。そこで、T432 を非リン酸化アミノ酸である Val に変異させた S431 単一リン酸化変異体 (KaiC-SV) を調製し、溶液条件中での検証を行った。KaiC-SV はリン酸化により KaiC-pSV となるが、KaiA および KaiB と混合したうえで、その存在比を電気泳動によって求めたところ、47 時間周期の振動がみられた (図 2C)。また概日スケールから逸脱して伸長した振動周期は、C1-ATPase サイクルの速度を操作することで再び短縮できた。ATP 加水分解活性を上昇させるアミノ酸変異 (D31A と S157P) を C1 ドメインに追加導入することで、振動周期は 29 時間周期になった。しかもこの変異体はシアノバクテリア細胞内でも機能することができた。これにより、C1 (ドメインスライド)-C2 (リン酸化スイッチ) 連動性に基づく S431 単一リン酸化変異体が、概日振動体として機能しうることが実証できた。

ヒト、昆虫、植物の時計タンパク質は、配列・構造

が異なるものの、いずれもが複数のリン酸化部位を有している。このリン酸化部位の複数性・多重性こそが概日振動を生み出す化学的基盤であるとする考えもある。しかし S431 単一リン酸化変異体が概日振動体として機能できるという事実は、個々の全てのリン酸化・脱リン酸化反応が等価に必須機能を担っているというよりは、時計タンパク質の全体構造の連動性のなかでそれぞれが異なる意義を有している可能性を示している。

5. 概日時計の時空間スケールと SPring-8/SACLA

本研究は、KaiC の 2 つのドメインそれぞれの反応サイクルを成す多数の素過程をできるだけ多く、X 線結晶構造解析によって捉えることを目標に開始した。その結果、KaiC の概日振動は原子スケールの機構で動作する C1-C2 連携メカニズムによって説明できた¹¹⁻¹³。この成果は、SPring-8/SACLA が幅広い時空間スケールの生命現象の解明に有力な性能を備えていることを示している。

SPring-8 では、進行速度をうまく制御した秒～分スケールのタンパク質結晶相反応の原子構造追跡研究や一分子回折計測研究が重ねられてきた実績があり、SACLA の供用開始以後には、フェムト秒スケール (10^{-15} 秒) に至るタンパク質の超高速動態研究が加速度的に進められている。一方で、概日時計のような 1 日 (10^5 秒) スケールで極端にゆっくり進行する生命現象の解明においても SPring-8/SACLA は有力であったように、放射光 X 線を用いた計測によって時間生物学をはじめとする長い時間スケールで進行する原子・分子構造変化の追跡研究が今後進展していくことが見込まれる。

謝辞

本研究は、分子科学研究所の向山厚助教、甲田信一助教、欧陽東彦博士、Damien SIMON 博士、秋山修志教授、斉藤真司教授、大阪大学蛋白質研究所の山下栄樹准教授、名古屋大学の伊藤 (三輪) 久美子特任助教、西脇 (大川) 妙子准教授、近藤孝男特別教授、立命館大学の寺内一姫教授との共同研究です。的確なご指導、有意義なご議論をいただきありがとうございます。

X線回折実験は、SPRING-8のBL44XUにおいて課題番号2017A6700、2017B6700、2018A6700、2018B6700、2019A6700、2019B6700、2020A6700、2020A6500、2017A6702、2017B6702、2018A6802、2018B6802、2019A6902、2019B6902、2020A6502のもとで行いました。BL44XUビームラインスタッフの皆さま、構造生物学ビームラインの関係者の皆さまにお礼を申し上げます。

また本研究は、科研費（17H06165、19K16061、18K06171）、AMED創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業）JP20am0101072（support number 0583）等の支援を受けて実施しました。

参考文献

- [1] M. Ishiura *et al.*: *Science* **281** (1998) 1519-1523.
- [2] J. Tomita *et al.*: *Science* **307** (2005) 251-254.
- [3] M. Nakajima *et al.*: *Science* **308** (2005) 414-415.
- [4] T. Nishiwaki *et al.*: *EMBO J.* **26** (2007) 4029-4037.
- [5] K. Terauchi *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (2007) 16377-16381.
- [6] S. Akiyama *et al.*: *Molecular Cell* **29** (2008) 703-716.
- [7] J. Abe *et al.*: *Science* **349** (2015) 312-316.
- [8] Y. Chang *et al.*: *Science* **349** (2015) 324-328.
- [9] R. Tseng *et al.*: *Science* **355** (2017) 1174-1180.
- [10] J. Snijder *et al.*: *Science* **355** (2017) 1181-1184.
- [11] Y. Furuike *et al.*: *Science Advances* **8** (2022) eabm8990.
- [12] Y. Furuike *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **355** (2022) e2119627119.
- [13] A. Mukaiyama *et al.*: *Biochem. J.* **479** (2022) 1505-1515.

古池 美彦 *FURUIKE Yoshihiko*

自然科学研究機構 分子科学研究所
協奏分子システム研究センター
総合研究大学院大学
〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町大字西郷中 39 番地
TEL : 0564-55-7336
e-mail : furuike@ims.ac.jp