

時計タンパク質複合体の情報伝達機能の解析

研究チーム：時計タンパク質複合体機能解析

研究期間：令和元年7月24日～令和4年3月31日

研究代表者：武藤梨沙

研究員：塩井成留実、古賀鈴依子

研究成果

【研究背景】

地球上に生息する多くの生物は、地球の自転に伴って生じる、約24時間周期に合わせて、体内の様々な生理活性を調節している。この概日リズムを制御する分子機構を生物時計と呼び、その分子装置は時計タンパク質から構成されている。生物時計は、原核生物の藍藻から、真核生物の緑藻、高等植物、菌類、動物に至るまで幅広い生物で確認されており、どの生物時計も同じ特性（恒常条件下での24時間周期の持続、温度補償性、リセット機能）を持っているが、共通した時計因子は現在見つかっていない。

シアノバクテリアは、最も単純な生物時計を持っており、その生物時計は時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC の3つから構成されている。これらのタンパク質と ATP を試験管内で混合すると、KaiC のリン酸化レベル (Nakajima et al., 2005) や ATPase 活性 (Terauchi et al., 2007) が約24時間周期で変動する。この変動は、Kai タンパク質が結合・解離をすることで生み出されている (図1)。生物時計によって生み出された時間情報は、KaiC に結合した時計関連タンパク質 SasA のリン

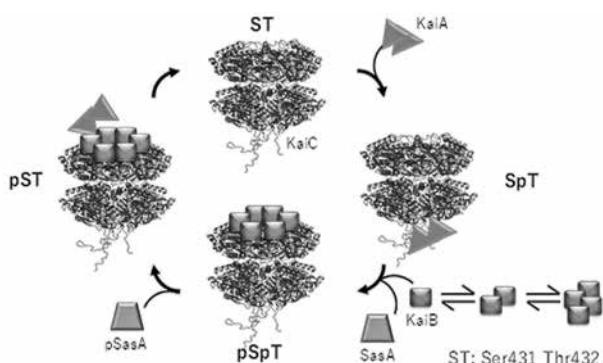


図1 リズム振動中の KaiABC および SasA の結合・解離モデル

酸化という形で出力される (図1)。この出力は KaiB が SasA と競合的に KaiC に結合することで制御されている。また、KaiC のリン酸化レベルの上昇は、SasA のリン酸化を促進し、SasA および KaiB の KaiC への親和性を高めることで出力の制御に関わっている。これまでに、各 Kai タンパク質の単独の構造や、ドメインタンパク質を用いた複合体構造が解析され、生物時計の作動原理が明らかになりつつあるが、24時間周期の中で、いつ、どのように複合体を形成するのか、生物時計から生み出されたリズムはどのように外部へ出力されるのかについてなど、詳細は未解明な部分が多い。

そこで、本研究では、まず、KaiC に結合した ATP に着目し、生物時計が生み出す大本のリズムについて解析を行った。次に、KaiB-KaiC、KaiC-SasA 複合体に着目し、KaiB と SasA がどのように競合して KaiC と結合するのかを、核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて解析を行った。

【結果と考察】

1. KaiC からの ATP 遊離測定によるリズム解析

KaiC は、相同な配列を持った N 末端ドメインと C 末端ドメインから構成されており、それぞれに ATP 結合部位を持つ。KaiC は ATP 存在下で 6 量体を形成するので、KaiC は合計 12 個の ATP を保持している。KaiC は AAA+ ファミリーに属する ATPase で、1 日に KaiC 1 分子あたり約 12 個の ATP を分解する。ATP 加水分解のほか、KaiC から定期的な ATP の遊離を検出した。本研究では、KaiC からの ATP 遊離のパターンを測定し、ATP 遊離とリズム発振の相関について調べた。

遊離 ATP 量は、精製 KaiC の溶液に含まれる ATP を除去し、そこへホタルルシフェラーゼとルシフェリンを添加し、生物発光を利用して検出した。まず、野生型 KaiC (KaiC_{WT}) と様々な KaiC 変異体 (リン酸化型

変異体 [KaiC_{DD}、KaiC_{AA}]、ATP 結合部位欠失変異体 [KaiC_{K53H}、KaiC_{K294H}] の ATP 遊離パターンを測定し

た (図 2)。

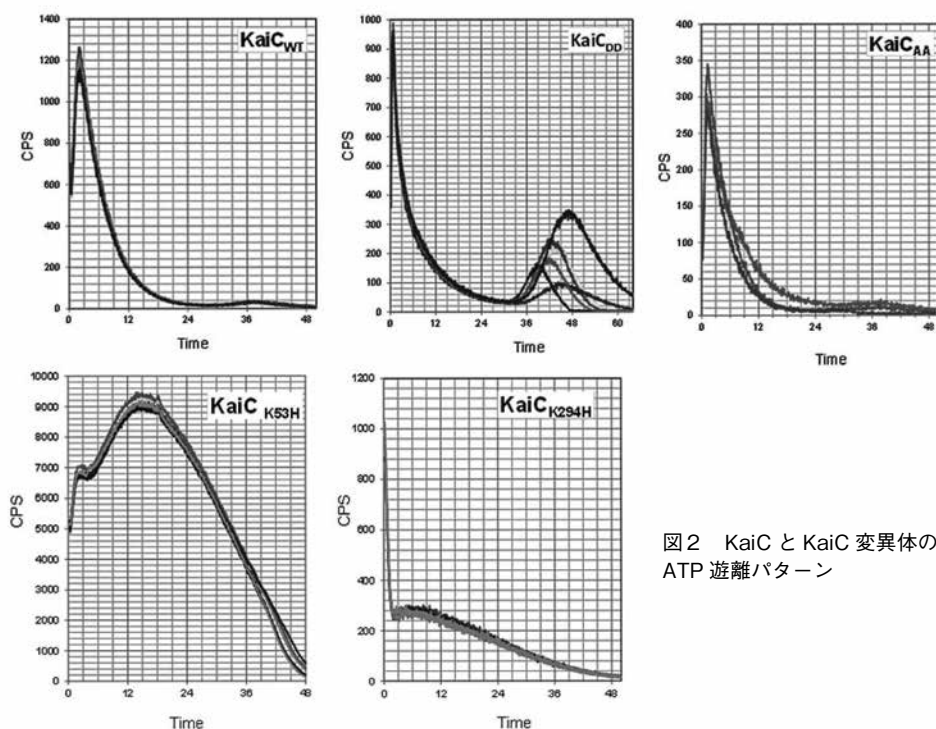


図2 KaiC と KaiC 変異体の ATP 遊離パターン

KaiC_{WT} は、測定開始後約 2 時間で 1 つ目のピークが出現し、36 時間目付近に 2 つ目のピークが出現した。2 つ目のピークは 1 つ目のピークよりも 1/30 の発光量であった。疑似リン酸化型 KaiC (KaiC_{DD}) では、KaiC_{WT} と同様のピークパターンを示し、2 つ目のピークは KaiC_{WT} よりもはっきりと検出することができた。疑似脱リン酸化型 KaiC (KaiC_{AA}) でも KaiC_{WT} と同様のピークパターンを示したが、全体的に ATP 遊離量は KaiC_{WT} と比較すると極端に減少することがわかった。これは、KaiC から ATP が放出されないように KaiC_{AA} の構造が強固になったことが示唆される。これは以前に報告されている X 線小核散乱のデータと一致する (Akiyama et al., 2008)。

KaiC_{K53H} は、KaiC の N 末端ドメインの ATP 結合部位を欠失させた変異体であるので、C 末端ドメインからの ATP 遊離量を見ていることになる。同様に、KaiC_{K294H} は、N 末端ドメインからの ATP 遊離量を見ている。KaiC_{K53H} と KaiC_{K294H} の 0 時間目から 48 時間目までの ATP 遊離量を比較すると、KaiC の C 末端からの ATP 遊離量は、N 末端のそれよりも約 5 倍多いことがわかった。これら 2 つの変異体の ATP 遊離パターンは、KaiC_{WT} や KaiC_{DD} とは異なり、決まったタイミングで遊離するのではなく、遊離するスピードが徐々に緩やかになると言える。よって、ATP 遊離パターンは ATP 結合部位を欠失させると周期を示さなくなることがわかった。

次に、この ATP 遊離パターンが KaiC の周期変異体とどのような関係があるのかを調べた。周期変異体とは、*in vivo* において、遺伝子発現の周期が短周期または長周期になる変異体である。上記と同様に、精製 KaiC を用いて ATP 遊離パターンを測定した。ここでは、短周期変異体 (21h) として KaiC_{R321Q} を、長周期変異体 (60h) として KaiC_{Y422H} を使用した。周期変異体を用いた場合、ATP 遊離パターンも変異体の持つ周期に依存して周期が変わることを期待した。しかし、長周期変異体のほうが、より遅い時間帯にピークが出ているものの、どちらの変異体 KaiC も 48h にピークが見られたウェルがあり、今回の結果では有意差があるとはまでは言えなかった (図 3)。*in vivo* で見られる周期の異常は、KaiABC から発せられ、そのリズムが SasA などに伝わり、下流の遺伝子発現でのリズムである。ATP 遊離リズムは、KaiC そのものから発せられるリズムである。これらのことから、

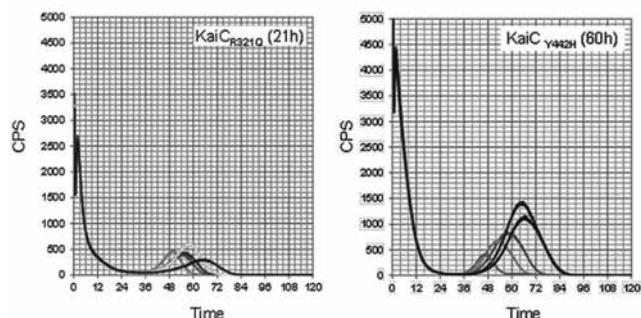


図3 短周期および長周期 KaiC 変異体の ATP 遊離パターン

周期の決定は、KaiC 自身が持つのではなく（または潜在的に持っている）、下流に到達するまでの間にほかの因子によって決められる可能性があることが示唆された。今後は、周期を決定している因子の探索をすることで、自由に周期を操れるようになれば、食物増産や睡眠障害の治療などへの応用へ発展していく可能性がある。

2. NMR 法による KaiC 上の KaiB または SasA の相互作用部位の解析

NMR 法は、溶液中のタンパク質の構造変化を捉え、分子構造や分子間相互作用を解析することが可能な分光法の一つである。NMR は核スピンを観測するため、ターゲットタンパク質を NMR 標識する必要がある。アミド基を検出する場合には¹⁵N 標識、メチル基を検出する場合には¹³C 標識を行う。本研究では、KaiC 上の相互作用部位を同定するために、^{[13}C, ¹⁵N] 標識した KaiC の N 末端ドメインタンパク質 (^{[13}C, ¹⁵N]-KaiC_N) を用いた。分子量の大きいタンパク質を NMR 測定する場合には、アミノ酸の標識過多によるピークの重なりやブロードニングにより観測が困難な場合があるため、ドメ

インに分けて測定することが一般的である。

まず、KaiC_N 上の SasA と KaiB の相互作用部位を明らかにするために、SasA の N 末端ドメインタンパク質 (SasA_N) と KaiB2 量体変異体 (KaiB₁₋₉₄) を使用した。まず、^{[15}N, ¹³C]-KaiC_N のみで ^{[15}N]-HMQC スペクトルと ^{[13}C]-TROSY スペクトルを測定した。次に、^{[13}C, ¹⁵N]-KaiC_N と SasA_N、KaiB₁₋₉₄ をそれぞれモル濃度 1 : 1 で混合し、NMR 測定を行った。^{[15}N]-KaiC_N HMQC スペクトルでは、206 個のピークが検出された (図4A)。SasA_N 存在下 (図4B) と KaiB₁₋₉₄ 存在下 (図4C) で NMR 測定をした結果、両方でピークがシフトした、または消失したピークが 3 個、SasA_N のピークのみがシフトした、または消失したピークが 10 個、KaiB₁₋₉₄ のピークのみがシフトした、または消失したピークが 5 個確認された (図4B, C)。¹³C-KaiC_N TROSY の結果からは、127 個のピークが検出された (図5A)。SasA_N 存在下 (図5B) と KaiB₁₋₉₄ 存在下 (図5C) の両方でシフトしたピークは 26 個、SasA_N 存在下でのみピークがシフトした、または消失したのは 6 個、KaiB₁₋₉₄ 存在下でのみピークがシフトした、または消失したのは 5 個確認さ

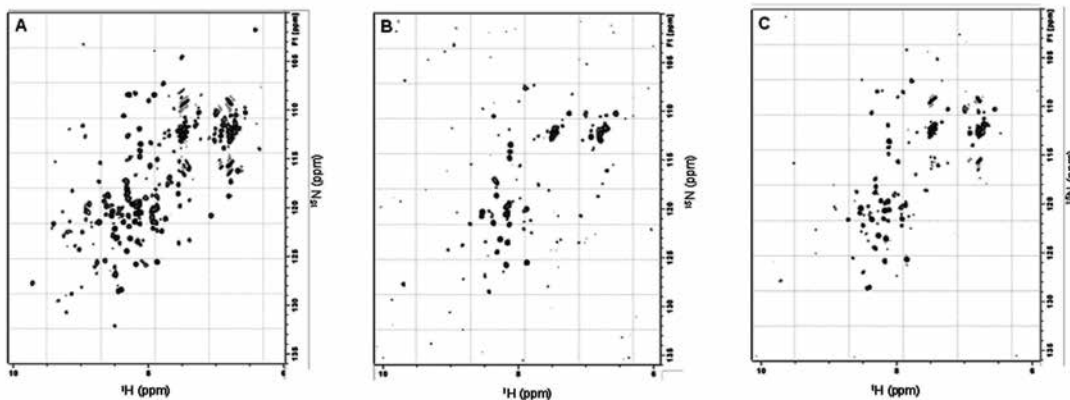


図4 ^{[15}N]-KaiC_N の HMQC スペクトル
(A) KaiC_N 単独、(B) SasA_N 添加、(C) KaiB₁₋₉₄ 添加

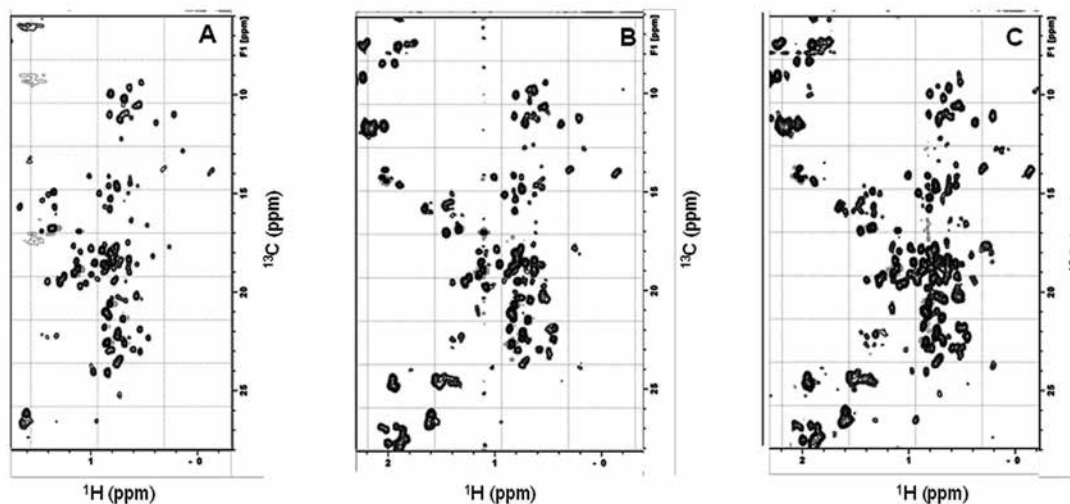


図5 ^{[13}C]-KaiC_N の TROSY スペクトルの一部
(A) KaiC_N 単独、(B) SasA_N 添加、(C) KaiB₁₋₉₄ 添加

れた (図5B, C)。 ^{15}N -KaiC_N HMQC または ^{13}C -KaiC_N TROSY の測定結果から得られたピークの数を用いて、SasA_N の相互作用部位中に占める KaiB₁₋₉₄ の相互作用部位の割合を算出すると、それぞれ約23% (^{15}N -HMQC)、約81% (^{13}C -TROSY) となった。また、同様に KaiB₁₋₉₄ の相互作用部位中に占める SasA_N の相互作用部位の割合を算出すると、それぞれ約37% (^{15}N -HMQC)、約83% (^{13}C -TROSY) となった。この結果は、KaiC_N 上の SasA_N と KaiB₁₋₉₄ の相互作用部位は、かなりの割合で一致していることを示している。先行研究 (Vakonakis *et al.*, 2004) から SasA と KaiB のアミノ酸配列の相同性が高く、類似の相互作用部位を持つと考えられている。そのため、KaiB による SasA の KaiC への結合阻害様式は、KaiC の同一部位への競合であることが示唆された。今後は、KaiC 上の KaiB や SasA の相互作用部位を具体的に同定するために、KaiC の NMR ピークの帰属が必要となる。

研究業績

武藤梨沙

- Kondo T., Mutoh R., Arai S., Kurisu G., Oh-oka H., Fujiyoshi S., Matsushita M., Energy transfer fluctuation observed by single-molecule spectroscopy of red-shifted bacteriochlorophyll in the homodimeric photosynthetic reaction center., *The Journal of Chemical Physics*, 156 (10), 105102. 2022
- Suetake I., Nakazawa S., Sato K., Mutoh R., Mishima Y., Kawakami T., Takei T., Watanabe M., Sakai N., Fujiwara T., Takui T., Miyata M., Shinohara A., Hojo H., Arata T., Structural dynamics of the chromo-shadow domain and chromodomain of HP1 bound to histone H3K9 methylated peptide, as measured by site-directed spin-labeling EPR spectroscopy., *BBRC*, 567, 42-48. 2021
- Tohda R., Tanaka H., Mutoh R., Zhang X., Lee Y. H., Konuma T., Ikegami T., Migita C. T., Kurisu G., Crystal structure of higher plant heme oxygenase-1 and its mechanism of interaction with ferredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, jbc. RA120.016271. 2021
- Mutoh R., Iwata K., Iida T., Ishiura M., Onai K., Rhythmic ATP release from the cyanobacterial circadian clock protein KaiC revealed by real-time monitoring of bioluminescence using firefly luciferase. *Genes to Cells*, 26 (2), 83-93. 2021
- Matsuo T., Iida T., Ohmura A., Gururaj M., Kato D., Mutoh R., Ihara K., Ishiura M., The role of ROC75 as a daytime component of the circadian oscillator in *Chlamydomonas reinhardtii*, *PLoS Genet.*, 16 (6): e1008814. 2020
- Kondo T., Mutoh R., Tabe H., Kurisu G., Oh-oka H., Fujiyoshi S., Matsushita M., Cryogenic single-molecule spectroscopy of the primary electron acceptor in the photosynthetic reaction center., *J Phys Chem Lett.*, 6: 3980-3986. 2020
- Grabsztunowicz M., Mulo P., Baymann F., Mutoh R., Kurisu G., Sétif P., Beyer P., Krieger-Liszskay A., Electron transport pathways in isolated chromoplasts from *Narcissus pseudonarcissus* L. *Plant J.*, 99 (2): 245-256. 2019

塩井成留実

- Megumi Endo, Jung In Kim, Narumi Aoki Shioi, Shigenori Iwai and Isao Kuraoka, *Arabidopsis thaliana* endonuclease V is a ribonuclease specific for inosine-containing single-stranded RNA, *Open Biology*, 11 (10): 210148 (web) 2021.
- Yaopeng Hu, Qin Li, Lin-Hai Kurahara, Narumi Shioi, Keizo Hiraishi, Takayuki Fujita, Xin Zhu and Ryuji Inoue, An Arrhythmic Mutation E7K Facilitates TRPM4 Channel Activation via Enhanced PIP2 Interaction *Cells*, 10 (5), 983-997. 2021
- Narumi Aoki-Shioi, Shigeyuki Terada, Roland Hellinger, Yoshitaka Furuta, Christian W. Gruber, Isolation and functional diversity of Bowman-Birk type serine proteinase inhibitors from *Hyacinthus orientalis*, *Biochemical Journal*, 478, (6), 1287-1301, 2021.
- Narumi Aoki-Shioi, Chacko Jobichen, J Sivaraman, R Manjunatha Kini, Unusual quaternary structure of a homodimeric synergistic-type toxin from mamba snake venom defines its molecular evolution, *Biochem J*, 477 (20): 3951-3962, 2020
- Lin Hai-Kurahara, Keizo Hiraishi, Aya Yamamura, Ying Zhang, Kohtarō Abe, Eiji Yahiro, Mikiko Aoki, Kaori Koga, Hiroyasu Yokomise, Tetsuhiko Go, Kaori Ishikawa, Zhang Bo, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi, Narumi Aoki-Shioi, Satoh Toru, Ryuji Inoue, Katsuya Hirano, Eicosapentaenoic acid ameliorates pulmonary hypertension via inhibition of tyrosine kinase Fyn, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 148, 50-62, 2020
- Takashi Tadokoro, Cassandra M. Modahl, Katsumi Maenaka, and Narumi Aoki-Shioi, Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) from Venomous Snakes: An Overview of the Functional Diversity in a Large and Underappreciated Superfamily, *Toxins*, 12 (3): 175-195, 2020

14. Narumi Aoki-Shioi, Cho Yeow Koh, R. Manjunatha Kini, Natural inhibitors of Snake venom metalloproteinases, *Australian Journal of Chemistry*, 73, 277–286, 2020
15. Cassandra M. Modahl, Rajeev Brahma, Cho Yeow Koh, Narumi Shioi and R. Manjunatha Kini, 'Omics' Technologies for Profiling Toxin Diversity and Evolution in Snake Venom: Impacts on the Discovery of Therapeutic and Diagnostic Agents, *Annual Review of Animal Biosciences*, 8, 91-116, 2020
16. Haruka Tsuruta, Yuina Sonohara, Kosuke Tohashi, Narumi Aoki Shioi, Shigenori Iwai and Isao Kurauka, Effects of acetaldehyde-induced DNA lesions on DNA metabolism, *Genes and Environment*, 42 (2), 1-7, 2020
17. Narumi Shioi, Takashi Tadokoro, Seijiro Shioi, Yuki Okabe, Haruki Matsubara, Shunsuke Kita, Toyoyuki Ose, Kimiko Kuroki, Shigeyuki Terada, Katsumi Maenaka, Crystal structure of the complex between venom toxin and serum inhibitor from viperidae snake, *JBC*, 294 (4), 1250–1256, 2019
18. Narumi Aoki-Shioi, Adaptation and diversification of venomous snake proteins, *The Nucleous*, 62 (2), 165-172, 2019
- selective analysis of curcumin with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chromatography*, 40, 115-119, 2019
23. Aogu Furusho, Reiko Koga, Takeyuki Akita, Masashi Mita, Tomonori Kimura, Kenji Hamase, Three-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of Asn, Ser, Ala, and Pro enantiomers in the plasma of patients with chronic kidney disease, *Anal. Chem.*, 91, 11569-11575, 2019
24. 石井千晴, 古賀鈴依子, 浜瀬健司, 生体試料における D-アミノ酸微量分析技術, *生化学*, 91 (3), 301-308, 2019

古賀鈴依子

19. Shimba Kawasue, Yohei Sakaguchi, Reiko Koga, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Hitoshi Nohta, Multiple phosphorylated protein selective analysis via fluoruous derivatization and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis, *Anal. Biochem.*, 628, 114247, 2021
20. Yohei Sakaguchi, Rina Kawamura, Erina Nakayama, Kenta Ako, Shimba Kawasue, Reiko Koga, Hideyuki Yoshida, Hitoshi Nohta, Selective Analysis of the Okadaic Acid Group in Shellfish Samples using Fluoruous Derivatization Coupled with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 1173, 122681, 2021
21. Shimba Kawasue, Yohei Sakaguchi, Reiko Koga, Hideyuki Yoshida, Hitoshi Nohta, Assessment method for deamidation in proteins using carboxylic acid derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 181, 113095, 2020
22. Shimba Kawasue, Yohei Sakaguchi, Ena Yano, Tadashi Hayama, Reiko Koga, Hideyuki Yoshida, Hitoshi Nohta, Fluoruous derivatization method for