

高速 AFM による時計タンパク質 Kai の複合体形成ダイナミク
スの可視化と概日周期の頑強性に関する研究

**Dynamic complex formation and robustness of circadian rhythm of
clock proteins Kai revealed by high-speed AFM**

金沢大学大学院自然科学研究科数物科学専攻

氏名: 杉山 翔吾

Abstract

The circadian clock proteins KaiA, KaiB, and KaiC reconstitute a remarkable circa-24 h oscillation of KaiC phosphorylation that persists for many days in vitro. It is known that KaiA stimulates KaiC phosphorylation, whereas KaiB promotes KaiC auto-dephosphorylation by sequestering KaiA. In this thesis high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) was applied to visualize in real time and quantify the dynamic interactions of KaiA proteins on sub-second timescales. HS-AFM images clearly showed that KaiA and KaiB bind to the opposite sides of a KaiC hexamers depending on the phosphorylation states of KaiC. Based on the HS-AFM observations, a model which interrelates the circadian rhythm and the ternary complex was proposed. Furthermore, it was revealed that KaiA transiently interacts with KaiC, thereby stimulating KaiC autokinase activity. As KaiC becomes progressively more phosphorylated, KaiA's affinity for KaiC weakens, revealing a feedback of KaiC phosphostatus back onto the KaiA-binding events. These non-equilibrium interactions integrate high-frequency binding and unbinding events, thereby refining the period of the longer term oscillations. Moreover, this differential affinity phenomenon broadens the range of Kai protein stoichiometries that allow rhythmicity, explaining how the oscillation is resilient in an in vivo milieu that includes noise. Therefore, robustness of rhythmicity on a 24-h scale is explainable by molecular events occurring on a scale of sub-seconds.

要旨

生物の大半は概日周期と呼ばれる約 24 時間のリズムによって「遺伝子発現」、「細胞分裂」、「新陳代謝」など多岐にわたる生体活動が制御されている。概日リズムによって我々人間は地球の自転に適応した生活を営んで行おり、概日リズムの乱れは睡眠障害や生活習慣病といった問題になることが知られている。

これまでの研究によって大半の生物の概日リズムは時計遺伝子をそれによって発現される時計タンパク質が抑制することで振動する転写翻訳フィードバックループモデルで説明できることが明らかになっている。しかしながら、どのように 24 時間という周期を定めているのか、温度補償性のメカニズム、さらには内外の環境変化に対する耐性といった様々な特性の分子機構の全貌は未だ明らかになっていない。

一方、シアノバクテリアは転写翻訳フィードバックループに加えて、タンパク質の相互作用のみで構成される概日周期で振動することが知られている。シアノバクテリアの概日リズムを司る 3 つの遺伝子 KaiA、KaiB、KaiC が同定されている。驚くべきことに、これら 3 種類のタンパク質と ATP を試

験管内に混合だけで KaiC のリン酸化状態で長期間に渡って自発的に振動する概日リズムが再構成される。このため、Kai タンパク質は最も単純な生物時計のモデル系として広く研究されてきた。概日リズムの中心をなす KaiC は、CI リング (N 末端側) と CII リング (C 末端側) の 2 つのリングが重なったドーナツ状のホモ六量体を形成しており、自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性の両方を備えている。この活性が切り替わることで Kai タンパク質の概日リズムが制御される。KaiA と KaiB は KaiC の活性を切り替える役割を担っており、KaiA は KaiC の CII リング側に結合することで KaiC のリン酸化を促進する。一方、KaiB は KaiA を非活性化することで KaiC の自己脱リン酸化を促進すると考えられているが、KaiC への結合部位や KaiA を非活性化する分子機構などは明らかになっていなかった。これまでに様々な手法でこれら Kai タンパク質の複合体構造に関する研究が行われてきたが、質複合体形成の過程をリアルタイムで計測することはできなかった。本研究では液中で個々のタンパク質の挙動をリアルタイムで観察できる高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて、KaiC-KaiA と KaiC-KaiB、さらには KaiC-KaiA-KaiB 三者複合体の形成ダイナミクスをナノスケールで直接可視化することで、これまで明らかになっていなかった複合体形成のダイナミクスと概日リズムの分子機構について明らかにすることを目的に研究を行った。

高速 AFM により Kai タンパク質間複合体形成のダイナミクスの観察に成功し、KaiA は KaiC の CII リングに、一方、KaiB は KaiC の CI リングに結合する様子の直接可視化と結合解離のダイナミクスを明らかにした。さらに、KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体の観察によって KaiB が KaiA を非活性化するメカニズムを明らかにし、複合体形成と概日リズムの関係についての新たなモデルを構築した。また、KaiC と KaiA は結合と解離を繰り返す非常にダイナミックな相互作用であり、その親和性の変化は概日リズムと同期して振動していることを明らかにした。この親和性の変化が概日リズムに対してどのような影響を及ぼすのかを数値シミュレーションによって検討したところ、概日リズムが安定に振動するタンパク質濃度の許容範囲を広げていることがわかった。タンパク質の濃度は細胞内で大きく変化することが知られているが、KaiC-KaiA 間の親和性変化は Kai タンパク質による概日リズムの頑強性に寄与していることが明らかになった。

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

高速 AFM による時計タンパク質 Kai の複合体形成ダイナミクスの可視化と概日周期の頑強性に関する研究

2. 論文提出者 (1) 所属 数物科学 専攻

(2) 氏名 ^{ふり} ^{がな} ^{すぎやま} ^{しょうご}
杉山 翔梧

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

シアノバクテリアの概日時計システムは3つの Kai タンパク質(KaiA、KaiB、KaiC)を構成因子とする振動体から構成されており、KaiA、KaiB および Kai C と ATP を試験管内で混合するだけで KaiC のリン酸化状態が約 24 時間の概日周期で自律的に振動する。KaiC は KaiA 及び KaiB との相互作用によってリン酸化状態が制御されることから、Kai タンパク質の複合体形成のダイナミクスと概日リズムとの関係を明らかにすることは、概日リズムの分子機構を理解する上で極めて重要である。杉山氏は高速原子間力顕微鏡(AFM)を用いた一分子スケール観察によって、KaiB は KaiC 六量体の N 末側に協同的に結合し、一方、KaiA は KaiC の C 末側に結合することを明らかにした。さらに、三者複合体の観察にも成功し、KaiC のリン酸化状態の制御機構に関する新たなモデルを構築した。また、KaiA と KaiC の結合と解離が概日周期と同期して振動する現象(Phosphoform Dependent Differential Affinity :PDDA)を見出した。PDDA を考慮した概日周期の数値計算シミュレーションを行い、PDDA はタンパク質濃度変動の許容範囲を広げ、概日振動の頑強性に寄与していることを明らかにした。これら杉山氏の研究成果は、Kai タンパク質による概日リズムの発生及びその頑強性の分子機構の理解に大きな貢献をするものであり、博士(理学)の学位に値するものと判断した。

4. 審査結果 (1) 判定 (いずれかに○印) 合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士(理学)