

# 博士論文

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

金沢大学大学院自然科学研究科  
数物科学専攻

学 籍 番 号：1624012004

氏 名：杉山 翔吾

主任指導教員名：古寺 哲幸

提 出 年 月：2019 年 1 月

## 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、どのように約 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、Kai タンパク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リング側に、一方、KaiB は KaiC の CIリング側に結合する様子を直接可視化することで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間親和性の変化は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。

# 目次

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| <b>第1章</b> | 序論   | 001 |
| 1.1        | 研究背景                                       | 001 |
| 1.1.1      | 概日リズム                                      | 001 |
| 1.1.2      | シアノバクテリアの概日リズム                             | 006 |
| 1.1.3      | Kai タンパク質                                  | 010 |
| 1.1.4      | Kai タンパク質による複合体形成                          | 015 |
| 1.2        | 本研究の目的                                     | 018 |
| 1.3        | 本論文の構成                                     | 018 |
| <b>第2章</b> | Kai タンパク質の精製および実験装置と手法                     | 020 |
| 2.1        | タンパク質                                      | 020 |
| 2.1.1      | タンパク質の精製                                   | 020 |
| 2.1.2      | in vitro での Kai タンパク質による概日リズムの再構成          | 024 |
| 2.2        | 高速原子間力顕微鏡                                  | 026 |
| 2.2.1      | 高速原子間力顕微鏡の原理と装置                            | 027 |
| 2.2.2      | Kai タンパク質の観察および解析手順                        | 032 |
| 2.3        | まとめ  | 036 |
| <b>第3章</b> | 高速 AFM による Kai タンパク質の観察・解析                 | 037 |
| 3.1        | KaiC の基板への吸着方向制御と高速 AFM 観察                 | 037 |
| 3.2        | KaiC-KaiB 間相互作用の観察・解析                      | 041 |
| 3.2.1      | KaiC と野生型 KaiB の相互作用の観察                    | 041 |
| 3.2.2      | KaiC と変異体 KaiB (KaiB-G88A/D90R) の高速 AFM 観察 | 045 |
| 3.2.3      | KaiC-KaiB 間相互作用の KaiC のリン酸化状態依存性           | 047 |
| 3.3        | KaiC-KaiA 間相互作用の観察・解析                      | 051 |
| 3.3.1      | KaiC-KaiA 間の結合部位の確認                        | 051 |
| 3.3.2      | KaiC-KaiA 間相互作用のリン酸化状態依存性                  | 055 |
| 3.3.3      | KaiC のリン酸化状態変異体と KaiA の相互作用                | 057 |
| 3.3.4      | 概日リズムと KaiC-KaiA 間相互作用の相関                  | 060 |
| 3.3.5      | ATP の有無による KaiC-KaiA 間相互作用への影響             | 066 |
| 3.3.6      | KaiC の C 末テイル構造と KaiA の結合に関する検討            | 070 |
| 3.3.7      | KaiC-KaiA 相互作用の温度依存性                       | 078 |

|            |                                     |            |
|------------|-------------------------------------|------------|
| 3.4        | KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体の観察             | 083        |
| 3.5        | 概日リズムと Kai タンパク質複合体形成の関係            | 086        |
| 3.6        | まとめ                                 | 088        |
| <b>第4章</b> | <b>数値シミュレーションによる概日リズムの頑強性に関する検討</b> | <b>090</b> |
| 4.1        | リン酸化サイトの数を考慮しない単純なモデル               | 090        |
| 4.2        | KaiC プロトマーごとのリン酸化サイトを考慮したモデル        | 094        |
| 4.3        | PDDA による概日リズムへの影響の検討                | 099        |
| 4.4        | まとめ                                 | 110        |
| <b>第5章</b> | <b>総括</b>                           | <b>111</b> |
| 5.1        | 結論                                  | 111        |
| 5.1.1      | KaiC-KaiB 間相互作用                     | 111        |
| 5.1.2      | KaiC-KaiA 間相互作用                     | 112        |
| 5.1.3      | KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体                | 112        |
| 5.1.4      | 数値シミュレーション                          | 113        |
| 5.2        | 問題点と今後の展望                           | 113        |
|            | 謝辞                                  | 115        |
|            | 参考文献                                | 117        |

# 第1章 序論

## 1.1 研究背景

### 1.1.1 概日リズム

人間(哺乳類)から昆虫、植物、細菌まで、生物の大半は概日リズム(生体時計)と呼ばれる約 24 時間周期の内因性的リズムによって生体活動が制御されている。生体時計によって調整される生体活動は「遺伝子発現」、「細胞分裂」、「新陳代謝」など多岐にわたっている[1]。我々が朝起きて、夜寝るといった地球の自転に適応した生活をしているのもこのリズムに従った生体活動が存在するからである。概日リズムには重要な 3 つの要素があり[1]、まず第 1 に、概日リズムが内因性的リズムであり恒常状態で約 24 時間の周期を刻むことである。第 2 に、概日リズムは外界の明暗によってリセットされて周期を調整できることである。さらに、第 3 の要素として、生理的な温度範囲内で周期が変動しない、すなわち温度補償性を有していることである。これら 3 つの要素によって構成される概日リズムは外部環境の変化、すなわちノイズに対して高い頑強性を持っていることも必要である。

概日リズムの存在は 1729 年にフランスの天文学者 de Mairan によってオジギソウが恒暗環境下でも 24 時間周期で葉を閉じる(就眠活動)ことから、太陽の存在にかかわらず時間を感知できると初めて発表された[2]。その後、ドイツの植物生理学者である E. Bünning によって概日リズムが内因性的リズムであり、遺伝性であることが明らかにされた[2]。1960 年代には隔離環境での生活によって人間の内因性的概日リズムが約 25 時間であることが J. Aschoff によって見出された[3]。1970 年代には遺伝学による研究が進展し、1971 年に R. J. Konopka と S. Benzer によって突然変異を誘発したショウジョウバエでは羽化のリズム周期に異常が生じ、その原因遺伝子が X 染色体に存在していることが明らかにされ、生体時計が遺伝子によって制御されていることが発見された[4]。羽化周期を制御する遺伝子は *period(per)* と名付けられ、1984 年に M. Rosbash・J. Hall らのグループと

M. Young のグループによってクローニングされた[5]–[7]。また、*per* 遺伝子から発現する PER タンパク質の発現と *per* mRNA の発現の量は振動しており、PER タンパク質の振動が mRNA より少し遅れていることが明らかとなった。それによって、P. E. Hardin は mRNA の発現が PER タンパク質によって負のフィードバックがかかっているモデルを提唱した[8]。実際、1995 年に M. Y. Young らによって発見された *timeless* (*tim*) 遺伝子から発現される TIM タンパク質と PER が結合したのちに核内に侵入し、*per* 遺伝子の抑制を行うことが知られている[9], [10]。また、*per* と *tim* の転写は *Clock* (*Clk*) [11] と *cycle* (*cyc*) [12] の 2 つの遺伝子から発現される CLK/CYC 複合体が E-Box と呼ばれる転写促進塩基配列に結合することで促進されることから、PER による *per* と *tim* の抑制は CLK/CYC を介して行われていると考えられている。一方、*Clk* は *Par Domain Protein 1* (*Pdb1*) と *vri* (*vri*) という 2 つの遺伝子によって発現がそれぞれ促進、抑制される[13]。これらの 2 つの転写翻訳フィードバックループによって図 1-1 のように概日リズムを制御していると考えられている[14], [15]。また、P. Emery らによって 1998 年に発見された *cry* 遺伝子[16]によって発現される青色光受容体タンパク質 Cryptochrome (CRY) は、光に依存して TIM タンパク質の分解を促進する[17]。これによって生体時計の重要な要素の 1 つである明暗によるリズムのリセットが行われる。図 1-1 はショウジョウバエの概日リズムのモデルを示しているが、他の生物も同様に転写翻訳フィードバックモデルによって概日時計が制御されていると考えられている。例えば、哺乳類ではショウジョウバエの時計遺伝子 *per*, *tim*, *Clk*, *cyc*, *Pdp1*, *vri* のそれぞれに対応する *per*[18], [19], *cry*[20], *Clk*[21], *Bmal1*[22], [23], *Rora*[15], [24], *Rev-Erba*[25], [26]が発見されており、図 1-2 のように転写翻訳フィードバックループを形成している。ショウジョウバエには存在しなかった *Clock* を制御する時計遺伝子である *Dec* の存在[27]、CRY が周期の調整ではなく遺伝子の翻訳を抑制する役割を持っている(ショウジョウバエの TIM 相当)など、ショウジョウバエと厳密に一致はしないが、確かに遺伝子の転写翻訳によって自身の発現を制御することで時計タンパク質が振動を行っていることが明らかとなっている。概日リズムの振動メカニズムは一般的にはこのモデルで説明することができると考えられてきたが、24 時間という周期の起源、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

った様々な概日リズム特性の分子機構は、いまだ明らかにはなっていない。



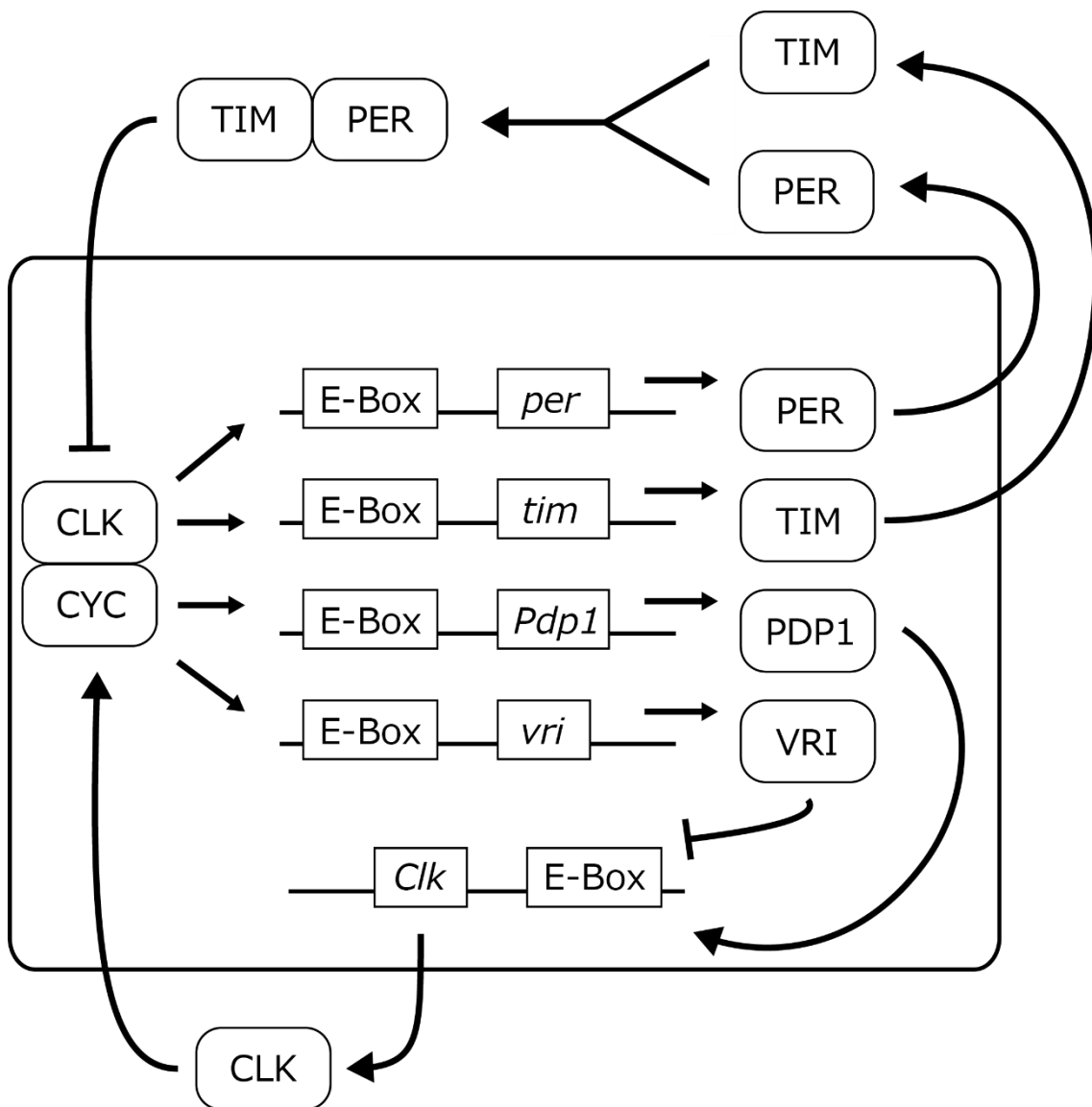


図 1-1 ショウジョウバエの概日リズムを制御する転写翻訳フィードバックループ。

① CLK/CYC 複合体によって PER と TIM の発現が促進される。その後、PER と TIM は PER/TIM を形成し、CLK/CYC を抑制する。これによって PER と TIM の発現が停止する。その後時間経過とともに TIM と PER が分解されるため、再び CLK/CYC が遺伝子翻訳の促進を始める。② 一方、CLK/CYC は PDP1 と VRI の促進も行っている。これら二つのタンパク質は CLK の発現をそれぞれ促進、抑制する。これによって CLK も自らの転写翻訳によってその発現が制御される。これら①と②の二つのループによってショウジョウバエの概日リズムは構成される。

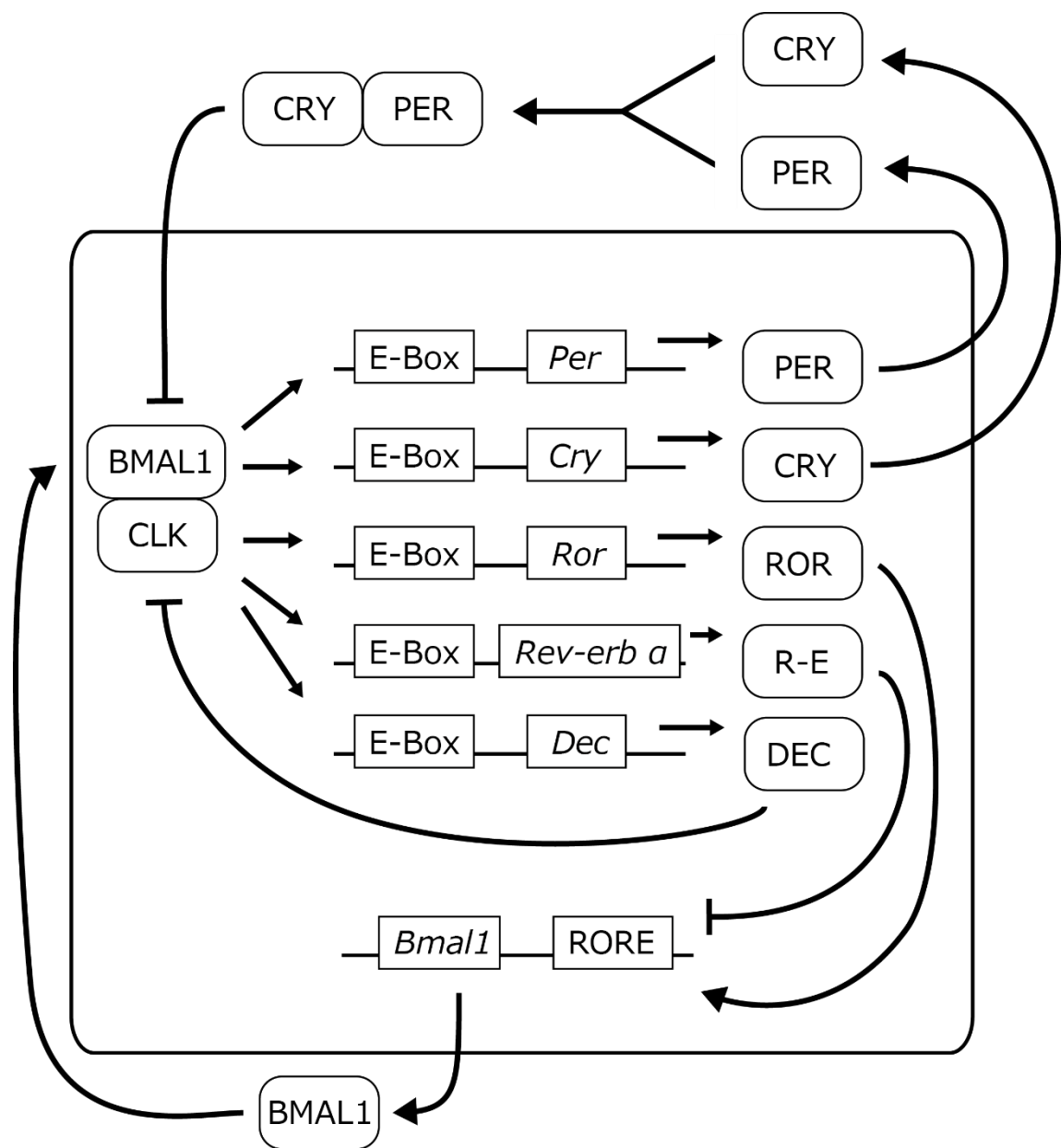


図 1-2 哺乳類の概日リズムを制御する転写翻訳フィードバックループの単純なモデル図。  
 ショウジョウバエにおける CLK/CYC に相当する BMAL1/CLK によって PER と CRY の発現が促進される。ショウジョウバエと異なり、*cry* 遺伝子は周期のリセットではなく時計の制御に働いている。その後、CRY/PER は BMAL1 を抑制することで自身の発現を抑制する。一方、ショウジョウバエの PDP1、VRI に相当する ROR と REV-ERB $\alpha$  はそれぞれ BMAL1 の発現を抑制、促進する。さらに、ショウジョウバエには存在しなかった *Dec* 遺伝子によって CLK が抑制される。これらのループによって哺乳類の概日リズムは制御されていると考えられている。

### 1.1.2 シアノバクテリアの概日リズム

シアノバクテリアは光合成によって酸素を発生させる原核生物であり、概日リズムを有する生物の中で最も下等であることが知られている。当初、原核生物において概日リズムが存在するとは考えられておらず、核の存在が概日リズムに必須であるとされていた[28]。しかしながら、1986年に N. Grobelaar, A. Mitsuiらによって核を持たないシアノバクテリアにおいて概日リズムの存在が報告された[29], [30]。1993年には M. Ishiura, T. Kondo, C. H. Johnson, S. S. Goldenらによって、シアノバクテリアの概日周期によって制御されている光合成遺伝子のプロモーターである *psbA1* の下流にルシフェラーゼ遺伝子 *luxAB* を組み込むことで、光合成遺伝子の活性を生物発光として観察する手法が確立され、約 24 時間周期での振動が測定された(図 1-3)[31]。その後、1998年にシアノバクテリアの概日リズムを制御する 3 つの時計遺伝子 *kaiA*、*kaiB*、*kaiC*(*kai* という名前は「回転」から名付けられた)が特定された[32]。また、生物発光の実験から、*KaiC* の過剰発現は *kai<sub>bc</sub>* プロモーター(*kaiB* と *kaiC* のプロモーターは同じ領域に存在する)の活性を抑制し、*KaiA* の過剰発現は *kai<sub>bc</sub>* プロモーターの活性を促進することが明らかとなった。さらに、*KaiC* は *KaiA* および *KaiB* によってリン酸化状態を制御されており、概日リズムに深く関与していることが示唆された[33]。これらの結果から、シアノバクテリアの概日リズムは *KaiC* が自身のリン酸化状態を参照し、自らの転写を抑制することによる転写・翻訳フィードバックループによって制御されていると考えられた。しかしながら、2005年に恒暗条件下(RNA やタンパク質の合成が抑制される)において、転写や翻訳が抑制されているにもかかわらず、*KaiC* のリン酸化状態が約 24 時間周期で振動をし続けていることが発見された[34]。すなわち、シアノバクテリアは転写・翻訳フィードバックループの他に、まったく別の方法でも概日リズムを制御していることが示唆されたのである。さらに、*KaiC* のリン酸化状態は *KaiA*、*KaiB*、*KaiC* の 3 つのタンパク質と ATP を混合するのみで、*in vitro* で約 24 時間周期の振動を再現することが発見された(図 1-4)[35]。この結果は *KaiC* のリン酸化状態の概日振動は遺伝子による制御とは全く関係なく、タンパク質間の相互作用によってのみで構成されていることを明確に示している。このように非常に単純な系でも、10 日ほどの長期間に渡って概日リズムは減衰しない。

さらに、温度計数  $Q_{10}$  (温度が 10 度上がった際に反応速度が何倍になるかを示す) は約 1.1 で、高い温度補償性を有していることも示された (図 1-5) [35]。また、リン酸化状態が異なる KaiC を混合しても、振動しながら KaiC のリン酸化状態、すなわち位相が同調していくことも報告された (図 1-6) [36]。このように、Kai タンパク質は概日リズムの重要な 3 つの要素をわずか 3 種類の分子のみで再現できることから、生物の概日リズム研究のモデルシステムとして広く研究されてきた。

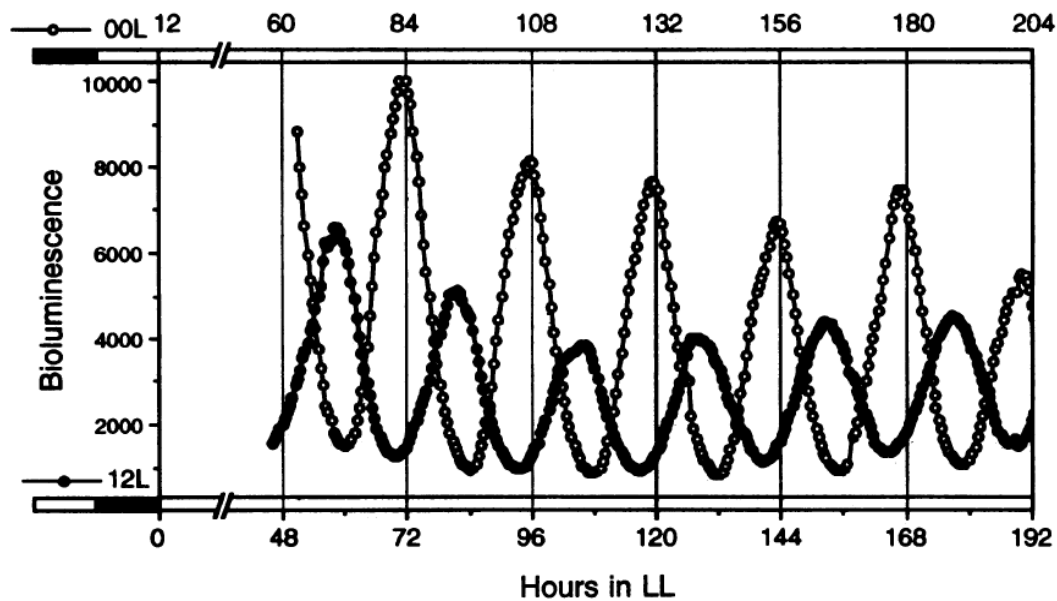


図 1-3 ルシフェラーゼ遺伝子を組み込まれたシアノバクテリアの発光リズム[31]。  
12 時間位相のずれた明暗サイクル下から恒明環境で生物発光を測定した。どちらも約 24 時間周期で生物発光のピークが現れている。

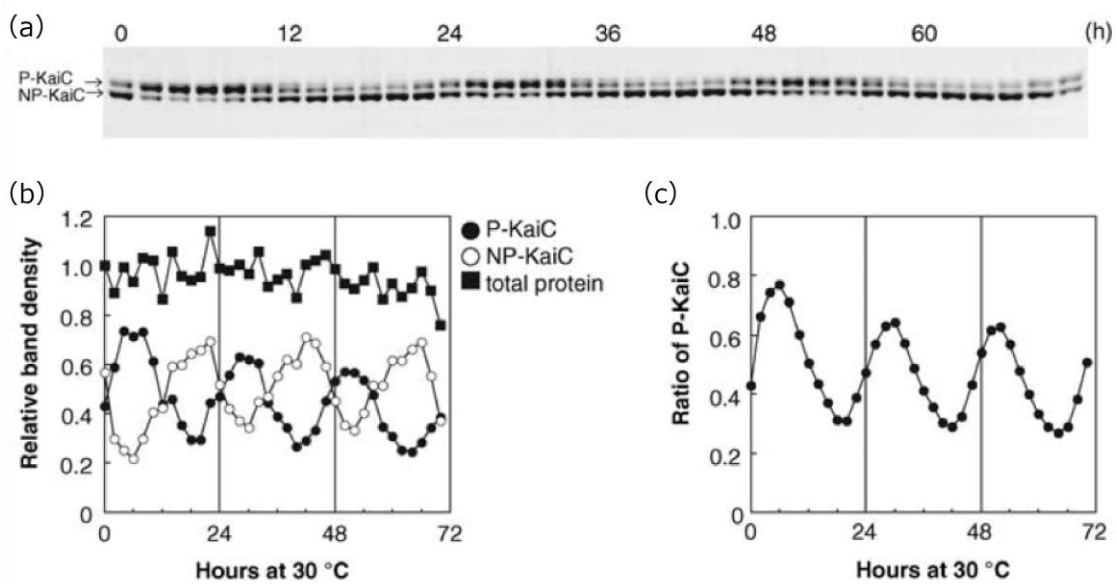


図 1-4 *in vitro* での KaiC リン酸化状態による概日リズム[35]。  
(a) 概日リズムを再構成した KaiC のリン酸化状態を表す SDS-PAGE のゲル。上のバンドがリン酸化 KaiC、下のバンドが脱リン酸化 KaiC を表している。(b) リン酸化 KaiC (白) と脱リン酸化 KaiC (黒) のバンドの密度の割合と全体の KaiC の量の変化。(c) リン酸化した KaiC の割合の時間変化。

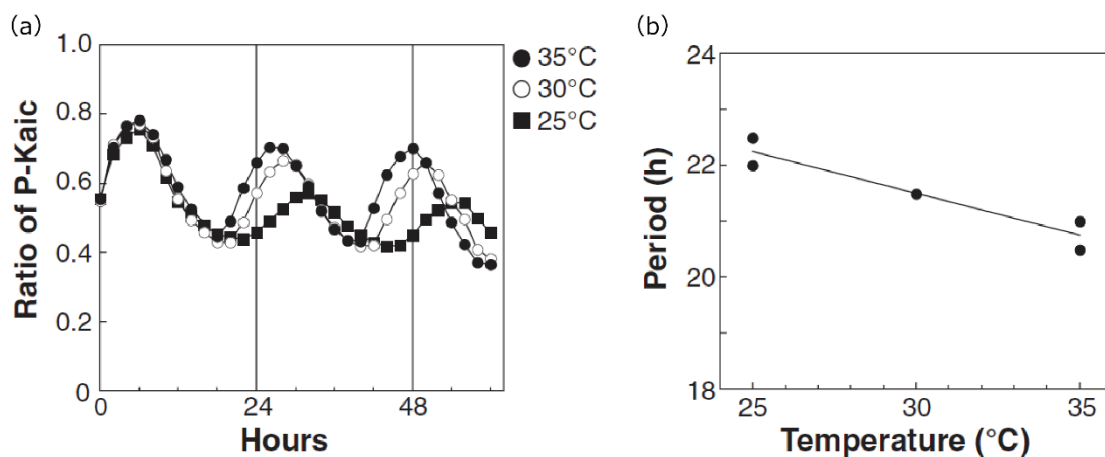


図 1-5 Kai タンパク質の概日リズムの温度補償性[35]。

(a) 35°C、30°C、25°Cの恒温環境での KaiC リン酸化状態の振動。温度が低いほど周期が伸びている。(b) 縦軸を周期の長さ、横軸を温度としてプロットしたグラフ。温度係数  $Q_{10}$  は約 1.1 となっており温度補償性が確認できる。

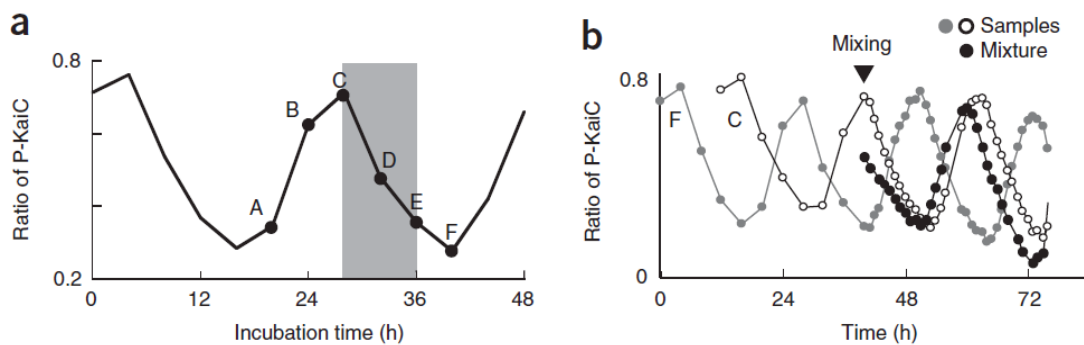


図 1-6 リン酸化状態の異なる KaiC を混合した際の周期の同調[36]。

(a) KaiC の異なるリン酸化状態を A-F で示している。(b) C と F のリン酸化状態 KaiC を混合すると、混合してから 10 時間後には C とほぼ同様の周期に同調する。C は脱リン酸化相に入る際に混合されており、脱リン酸化過程の KaiC に同調している。

### 1.1.3 Kai タンパク質

シアノバクテリアの時計タンパク質である Kai タンパク質は KaiA、KaiB、KaiC の 3 種類のタンパク質から構成される。なかでも KaiC のリン酸化状態が概日周期的に振動することから、KaiC は概日リズムの中心となるタンパク質である。KaiC は N 末端側 1~250 番目のアミノ酸残基から構成される CI ドメインと、C 末端側 251~519 番目アミノ酸残基の CII ドメインの 2 つの主要なドメインから構成され[37](図 1-7 a, b, PDB:2GBL)、6 個の単量体(約 60 kDa)でホモ六量体(約 350 kDa)を形成する。ホモ六量体は、CI と CII ドメインがリング状に並んだ直径約 100 Å、高さ約 100 Å のダブルリング構造を形成し、CII リング側にはテイルと呼ばれる不定形領域(498~519 番目のアミノ酸残基)を有する[37], [38]。2 つのドメインにはそれぞれ ATP(アデノシン三リン酸)が結合する WalkerA モチーフ(P-loop)が存在する(CI ドメインでは 46~53 番目、CII リングでは 288~295 番目のアミノ酸残基、)[39]。P-loop にある 2 のリジン(K52、K294)のどちらかをヒスチジンに置換することで六量体の形成が阻害されることから、六量体形成には ATP が必須だとわかるが[40]、ATP の類似体で加水分解しない AMP-PNP(adenylyl-imidodiphosphate)の存在下でも六量体を形成することから、加水分解によるエネルギーを用いずに ATP 結合状態で六量体を形成すると考えられている [40]。

KaiC は自己リン酸化活性と、自己脱リン酸化活性の両方を持っており、この 2 つの活性を切り替えることでリン酸化と脱リン酸化の振動を行う[33]。この際、CII リング側に存在する二つのリン酸化部位である 431 番目アミノ酸残基のセリン(S431)と 432 番目のスレオニン残基(T432)が一定の順番でリン酸化状態を変化させる(図 1-8)[41], [42]。リン酸化部位が 2 か所あるため、KaiC 単量体には 4 つのリン酸化状態、KaiC-S/T、KaiC-S/pT、KaiC-pS/pT、KaiC-pS/T(S および T はそれぞれリン酸化部位を表しており、p はそのアミノ酸残基がリン酸化していることを表す)を取る。脱リン酸化状態にある KaiC-S/T の T432 が最初にリン酸化され KaiC-S/pT となり、次に S431 がリン酸化することで完全にリン酸化した KaiC-pS/pT となる。脱リン酸化時には、まず T432 の脱リン酸化が起こり(KaiC-pS/T)、次に S431 が脱リン酸化することで KaiC-S/T になる。この 4 状態の KaiC リン酸化状態のサイクルが、ATP 存在下では KaiA および KaiB との相互作用のみで約 24 時間周期で振動

するということが Kai システムの最大の特徴である。

KaiC の概日リズムは KaiC の ATP 加水分解の速度に依存することも知られている [43]。KaiC には ATP 結合モチーフが存在するが、長い間 ATPase 活性についての報告はなかった。2007 年に寺内等によって KaiC の ATPase 速度が計測され、一日に ATP は 12-16 個しか分解されず、異常なまでに ATPase 活性が低いことが報告された[43]。さらに、KaiC のリン酸化周期が変調した変異体 KaiC では、その周期の変化と同期するように ATPase 活性も変化しており、ATPase 活性が概日リズムの長さを決定していることが示唆された(図 1-9)。

先述したように、Kai タンパク質による概日リズムは位相同調機能を有している [36]。脱リン酸化過程にある KaiC のリング状六量体は分解し、他の六量体とサブユニットを交換することが見出されており[44]、サブユニット交換が位相同調機能の起源と考えられている。また、van Zon らは数値シミュレーションによって、リン酸化過程における KaiC 六量体の同調機能を提唱した[45]。KaiC-KaiA 間の親和性が KaiC のリン酸化状態に依存しており、脱リン酸化状態の KaiC を優先的にリン酸化することで先にリン酸化した KaiC に追いついていくというモデルである(図 1-10)。KaiC が mRNA から合成された際に、リン酸化状態はすでに振動している KaiC と異なっているが、位相同調機能によって安定な概日リズムを維持できると考えられている。



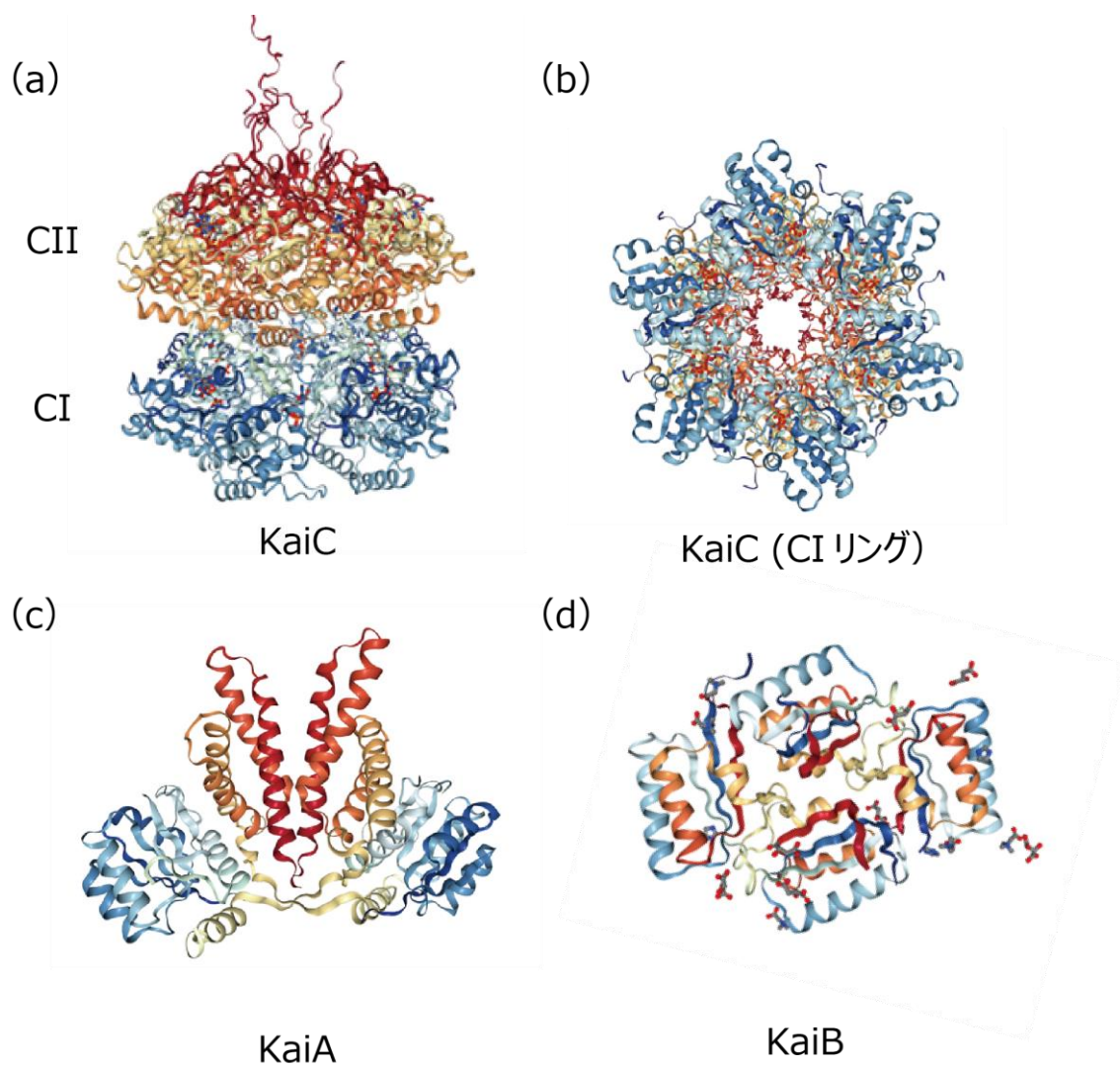


図 1-7 Kaiタンパク質の結晶構造。

(a,b) KaiC 六量体の構造 (PDB:2GBL) [46]。 (a) 側面から見た構造と (b) 底面 (CIリング側) から見た構造。ホモ六量体のリング構造が 2 つ重なったような構造をしており、CII リング側の中央には天然変性領域であるテイル領域が存在する。 (c) KaiA 二量体の構造 (PDB:1R8J) [47]。 (d) KaiB 四量体の構造 (PDB:1WWJ) [48]。

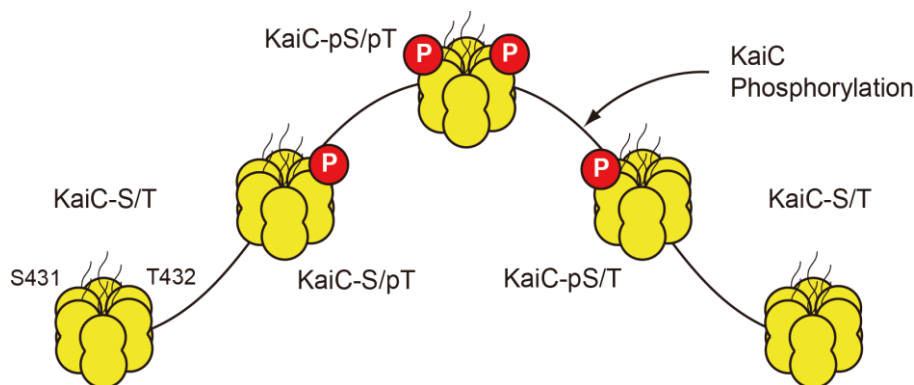


図 1-8 KaiC の四つのリン酸化状態。

KaiC にはセリン(S431)とスレオニン(T432)の2つのリン酸化部位が存在する。そのどちらかがリン酸化することで4種類のリン酸化状態をとる。脱リン酸化状態の KaiC-S/T はまずスレオニンがリン酸化することで KaiC-S/pT となり、その後セリンがリン酸化し KaiC-pS/pT へと遷移する。脱リン酸化過程においても、まずスレオニンが脱リン酸化し KaiC-pS/T になり、最後にセリンが脱リン酸化して KaiC-S/T へと戻る。このような順番で KaiC のリン酸化のサイクルが形成されている。

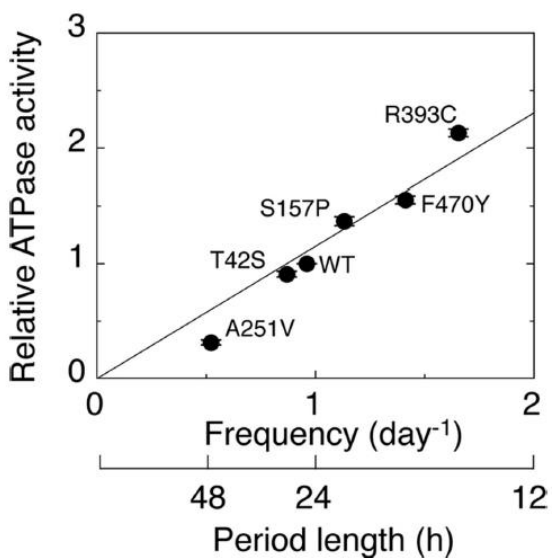


図 1-9 概日リズムの周期と KaiC の ATPase 活性の相関[43]。

縦軸に KaiC の ATPase 活性 (WT の活性を1として規格化) を、横軸に KaiC 変異体の概日周期の長さをプロット。R393C (393 番目のアルギニンをシステインに置換)、F470Y (470 番目のフェニルアラニンをチロシンに置換)、S157P (157 番目のセリンをプロリンに置換)、T42S (52 番目のスレオニンをセリンに置換)、A251V (251 番目のアラニンをバリンに置換) はそれぞれ周期の長さが変化した KaiC 変異体。周期が短い変異体ほど ATPase 活性が低く、長い変異体ほど活性が高いことから、概日周期の長さと KaiC の ATPase 活性が関係していることがわかる。

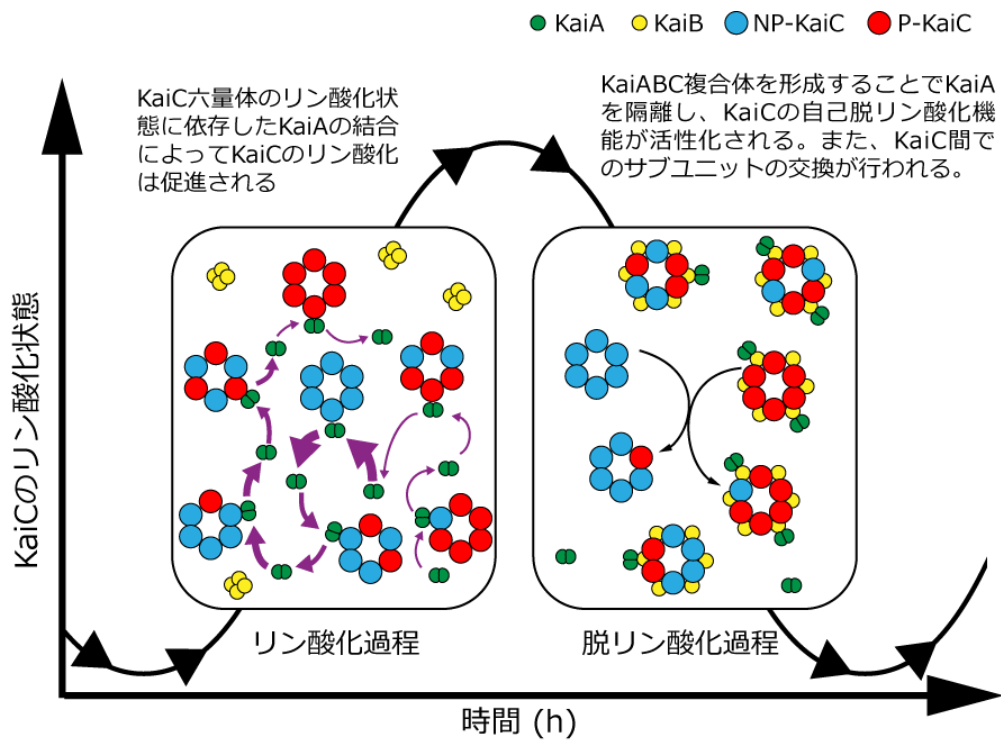


図 1-10 KaiC のリン酸化状態同調機能のモデル図。

脱リン酸化過程において KaiC 六量体はサブユニットを交換することで KaiC 同士のリン酸化状態を同期させる。一方、リン酸化過程においては、KaiA は脱リン酸化している KaiC に優先的に結合を行う。これによってリン酸化 KaiC へとリン酸化状態が追いつき、KaiC 間のリン酸化状態が同期すると考えられる。KaiA を緑、KaiB を黄色、リン酸化 KaiC を赤、脱リン酸化 KaiC を青で示す。また、矢印の太さは親和性を表す。

#### 1.1.4 Kai タンパク質による複合体形成

KaiC は KaiA および KaiB と結合することで複合体を形成し、それによって KaiC の自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性を切り替えている[37], [49]。KaiA は KaiC と結合して KaiC の自己リン酸化活性を促進し、他方、KaiB は KaiA の機能を阻害することで KaiC の自己脱リン酸化を促進する[33], [49]–[51]。KaiA 単量体はホモ二量体(約 60 kDa)を形成し(図 1-7 c, PDB:1R8J)[37], [47]、C 末端側が KaiC の CII リング(C 末端側)のテイルに結合することで KaiC の自己リン酸化活性を促進する[46], [52]–[54]。他方、KaiC の自己脱リン酸化活性への切り替えは KaiB によって行われ、KaiB が KaiA による KaiC 自己リン酸化活性の促進を阻害することで KaiC の自己脱リン酸化活性が促進される。KaiC と結合していない自由な KaiB は四量体もしくは二量体を形成しており、単量体へと解離して KaiC へと結合する(図 1-7 d, PDB:1WWJ)[37], [51], [55]–[60]。この際、KaiB は脱リン酸化中にある KaiC-pS/T に結合することで KaiC の脱リン酸化を促進させる。KaiB-KaiC 間の結合部位はこれまでに様々な相矛盾する報告があり、KaiC の CI リング(N 末端側)、CII リング(C 末端側)のどちらに結合するかは明確になっていなかった。例えば、ドッキングシミュレーション(HADDOCK)[57]や X 線小角散乱[58]による研究からは、KaiB は KaiC の CII リング側に結合すると予測されたのに対して、低温電子顕微鏡(Cryo-EM)[59]や核磁気共鳴(NMR: Nuclear Magnetic Resonance)[60]では CI リング側に結合すると結論されていた。異なる結論が導かれた理由として、KaiC の CI リング、CII リングの構造が類似しているために Cryo-EM ではリングの向きを識別することが困難であったことが挙げられる。また、KaiB が KaiC に結合する頻度が非常に低いために、安定な KaiC-KaiB 複合体を形成させることが困難で X 線結晶解析に成功しなかったためである。KaiB はメタモルフィックタンパク質と呼ばれる二次構造が可逆的に変化するタンパク質で、通常は  $\alpha$  ヘリックスと  $\beta$  シートが  $\beta\alpha\beta\alpha\alpha\beta$  (KaiB<sub>gs</sub>) の順番で並んだ構造をしているが、ごくまれにチオレドキシシ[61](図 1-11 a)と類似した構造  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  (KaiB<sub>fs</sub>) の単量体へとスイッチし、この KaiB<sub>fs</sub> のみが KaiC に結合することができる(図 1-11 b)[55]。そのため KaiB の KaiC への結合頻度は  $0.058 \pm 0.0051 \text{ hr}^{-1}$  と極端に低い。一方、チオレドキシシ型構造を模倣した変異体である

KaiB-G88A/D90R では、KaiC への結合速度は  $0.83 \pm 0.14 \text{ hr}^{-1}$  まで増加し、この変異体の発見によって KaiC-KaiB 複合体を安定に形成できるようになり、X 線結晶構造解析で KaiC-KaiB-KaiA 複合体の構造が解かれた[51]。さらに、Cryo-EM の単粒子解析の発展によって KaiC-KaiB 複合体構造も解析できるようになった[62]。これらの結果から、ごく最近になって KaiB は KaiC の CI リング側に結合することが明らかになった。また、リン酸化過程にある KaiC には結合せずに脱リン酸化過程で KaiC-pS/T に強く結合することや[42]、KaiC 六量体に協同的に結合することが質量分析[62]や中性子散乱[63]による計測で示唆されている。

KaiB による KaiC の脱リン酸化は結合することで自己リン酸化活性を促進するのではなく、KaiB と KaiC は複合体を形成したのちに、KaiA の機能を阻害することで行うと考えられている[33], [49]–[51]。しかしながら、KaiC-KaiB 間の結合部位が長い間明らかで明らかではなかったため、KaiA が非活性化される分子機構も解明されていなかった。

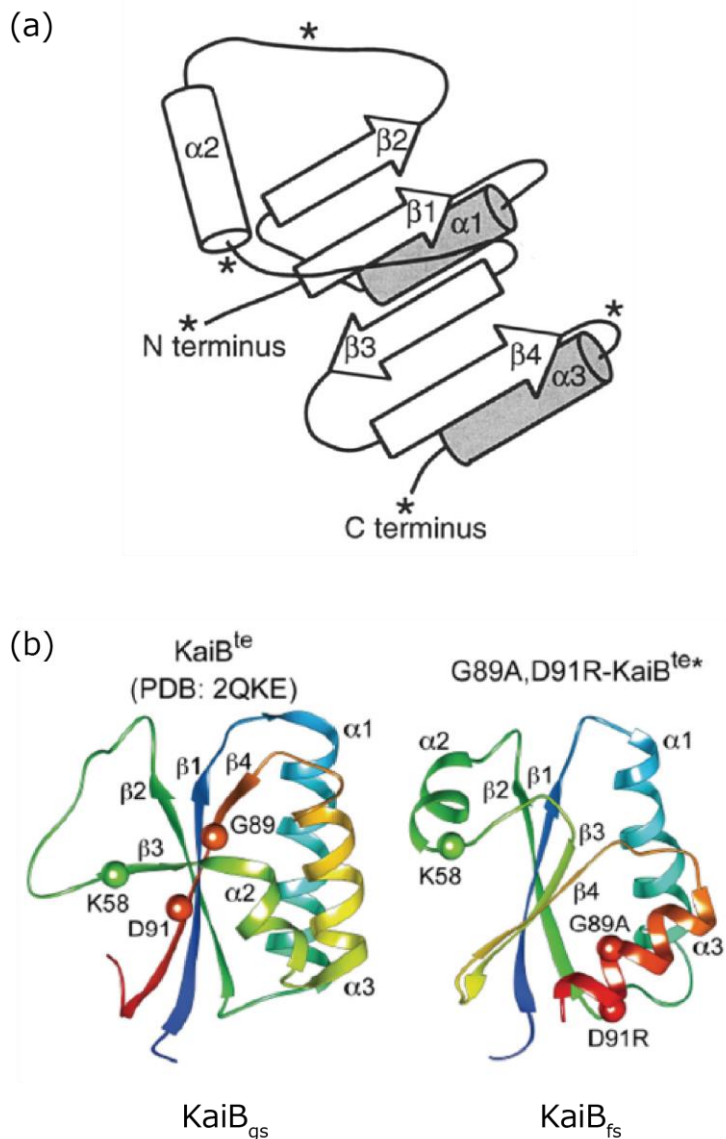


図 1-11 KaiC へと結合可能な KaiB とチオレドキシンの構造。

(a) チオレドキシンの構造のモデル図。αヘリックスとβシートがβαββαの順番で並んでいる[61]。  
 (b) KaiC へ結合できない(左) KaiB<sub>gs</sub> と結合可能状態にある KaiB<sub>fs</sub> を模倣した(右) 変異体 (KaiB-G89A/D91R) の構造(構造の安定している *Thermosynechococcus elongatus* 由来の KaiC が使われている)[55]。αヘリックスとβシートが KaiB<sub>gs</sub> ではβαββαβの順番に対して、KaiB<sub>fs</sub> ではβαβββαの順番になっており、チオレドキシンの構造と一致している。

## 1.2 本研究の目的

これまで様々な手法を駆使して、Kaiタンパク質の構造と概日リズムの分子機構について多くの研究が行われてきた。しかしながら、それらは電子顕微鏡のように静止画であったり、結晶構造解析や質量分析、NMR、電気泳動のように多数分子の平均としての現象しか解析できなかった。Kaiタンパク質の複合体形成のダイナミクスを単分子レベルで観察できれば、概日リズムの分子機構のより詳細な知見が得られるに違いない。本学位論文では、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としている。

## 1.3 本論文の構成

各章の概要を以下に述べる。

### 第2章 Kai タンパク質の精製および実験装置と手法

本研究で用いたKaiタンパク質の精製法および高速AFMの測定原理について述べる。最初に、Kaiタンパク質の精製方法および、概日リズムの *in vitro* 再構成法について詳述する。次に、AFMの動作原理と装置構成について述べ、高速化のための要素技術の概略を述べる。最後に、高速AFMによるKaiタンパク質の観察について、実験手順と観察結果の解析方法について述べる。

### 第3章 高速AFMによるKaiタンパク質の観察・解析

高速AFMによるKaiタンパク質間相互作用の観察および解析結果について述べる。最初にKaiCとKaiAあるいはKaiBとの相互作用を観察するための基盤となる、KaiC六量体リングの固体基板表面への吸着方向の制御法について検討した結果を述べる。次に、KaiCとKaiB六量体との間の相互作用を観察した結果を示す。野生型KaiBを用いて、KaiBがKaiC六量体リングのC末

端側と N 末端側のどちらの面に結合するかを特定した。また、KaiC に安定に結合可能なチオレドキシニン型変異体 KaiB を用いて、KaiC-KaiB 間相互作用の動態を観察した。さらに、KaiC-KaiB 間相互作用に対する KaiC のリン酸化状態依存性を解析した。次に、KaiC 六量体リングと KaiA の相互作用を観察した結果を示す。KaiA が KaiC 六量体の CII リング面と相互作用することを確認した後に、KaiA との親和性が KaiC のリン酸化状態に依存性していることを見出した結果について説明する。さらに、KaiA と相互作用する KaiC の C 末端テイルの数を変化させた KaiC 六量体と KaiA との相互作用の観察結果について述べ、テイルの数が KaiA との親和性にどのような影響を及ぼすかについて考察する。また、概日リズムの温度補償性の分子機構解明に向けて、高温環境下 (40°C) で KaiC-KaiA 間の相互作用を観察した結果を示す。最後に、KaiC-KaiB-KaiA からなる三者複合体の観察結果を示すとともに、これらの結果を総合して概日リズムと複合体形成の関係についてモデルを提示する。

#### 第 4 章 数値シミュレーションによる概日リズムに関する検討

本研究によって明らかになった KaiC-KaiA 間の親和性のリン酸化状態依存性が、Kai タンパク質による概日リズムにどのような意義を持っているのかを数値シミュレーションによって明らかにする。van Zon らによるモデルを基に、高速 AFM 観察で得られた結果を取り入れた新たなモデルを構築する。モンテカルロ法による数値シミュレーションで概日リズムを再現し、KaiC のリン酸化状態に依存した KaiA との親和性の変化が、概日リズムのノイズ耐性に与える影響について考察する。

#### 第 5 章 総括

本研究で得られた結果を総括し、今後の課題と展望を述べる。



## 第2章 Kai タンパク質の精製および実験装置と手法

### 2.1 タンパク質

本研究で用いた Kai タンパク質試料は共同研究者である Vanderbilt 大学の盛徹也博士によって精製された。ここでは、Kai タンパク質試料の精製方法と Kai タンパク質の試験管内概日リズムの再構成実験の方法について述べる。

#### 2.1.1 タンパク質の精製

Kai タンパク質は野生型、変異体ともにシアノバクテリア (*Synechococcus elongates*) 由来のものを用い、N 末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合させて大腸菌で発現させた後、既報の方法に従い次のようにして精製を行った[64]–[66]。図 2-1 に精製の手順についての模式図を示す。

pGEX ベクターを有する *Escherichia coli*, BL21 (Novagen, EMD Millipore) もしくは DH5 $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific) [35], [50], [64]–[66] を 100 mg アンピシリンもしくはカルベニシリンを含む 1 L の LB (Lysogeny Broth) 培地中に培養し、100  $\mu$ M IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) を加えた後に 22~24°C で 24 時間誘導することで、組み換えタンパク質を発現させた。次に、菌体を遠心分離器 (3000  $\times$  g, 4°C, 10 min) によって回収し、35 mL の抽出バッファー溶液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM DTT) で懸濁した。なお、野生型および変異体 KaiC の精製時にはバッファー溶液内に常に 5 mM MgCl<sub>2</sub> と 1 mM ATP を含めて作業を行った。その後、圧力式ホモジナイザー (French pressure cell) で 5.5 MPa の圧力を 4 回印加して細胞を破碎した。破碎した細胞の残渣を取り除くため、遠心分離機 (20,000  $\times$  g, 90 min) にかけて、上澄みをグルタチオン (GSH)-アガロースビーズ (Pierce, Thermo Fisher Scientific) を用いてアフィニティクロマトグラフィーカラム (PD-10, GE Healthcare Life Sciences) によって精製した。まず 40~60 mL の抽出バッファー溶液で洗浄した空のカラムに、上澄みと GSH-アガロースビーズ (1 mL) を 2 mL の抽出バッファー

溶液で懸濁し、タンパク質の GST タグとビーズの GSH を結合させた。次に、カラム内にヒトライノウィルス由来の 3C プロテアーゼを加えて(最終濃度 10~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )タンパク質の GST タグを 4°C で一晩かけて切断した。その後、8 mL の抽出バッファー溶液でタグを除いた目的のタンパク質をカラムから溶出した。アフィニティカラムのみでは若干の不純物が含まれているため、溶出したタンパク質をバッファー溶液(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, KaiC の場合さらに 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP を加えた)で NaCl の濃度が 90 mM になるように希釈し、イオン交換カラム(1 mL Q Sepharose Fast Flow, GE Healthcare Life Sciences)によってさらに精製した。KaiA と KaiC については、バッファー溶液(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM DTT, KaiC の場合さらに 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP を加えた)に NaCl を段階的に加えて勾配(100 ~ 450 mM, 10 mM ずつ増加)を作り、1 段階ごとに 1.0 mL もしくは 1.5 mL のバッファー溶液を重力落下によって流すことでカラムから溶出させた。しかしながら、KaiB は Q Sepharose に結合しないため、イオン交換カラムからの流出液を集めた後に濃縮し、ゲル濾過カラム(Sephacryl S-100 HR, GE Healthcare Life Sciences, 1.5 cm  $\times$  45 cm)を用いて溶出させた(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT を約 0.25 mL/min で流した)。イオン交換もしくはゲル濾過カラムからのタンパク質が溶出するピークは SDS-PAGE によって決定した(野生型 KaiC を精製した際のピークを図 2-2 に示す)。そのピーク分を集めた後に、アミコンウルトラ遠心式フィルターユニット(分画分子量は 30 kDa もしくは 100 kDa, EMD Millipore)を用いて保存用のバッファー溶液(20mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, KaiC の場合さらに 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP を加えた)に交換および濃縮(1~3 g/L)した。タンパク質の純度は Blue silver colloidal Coomassie 検出[67]を用いた SDS-PAGE によって > 98%と決定され、タンパク質の濃度はブラッドフォードタンパク質アッセイ[68]によって得られた検量線をウシ血清アルブミン(BSA)による検量線と比較することで決定された。タンパク質は精製後、液体窒素によって急速冷凍された後に実験に使用するまで -80°C で冷凍保存した。

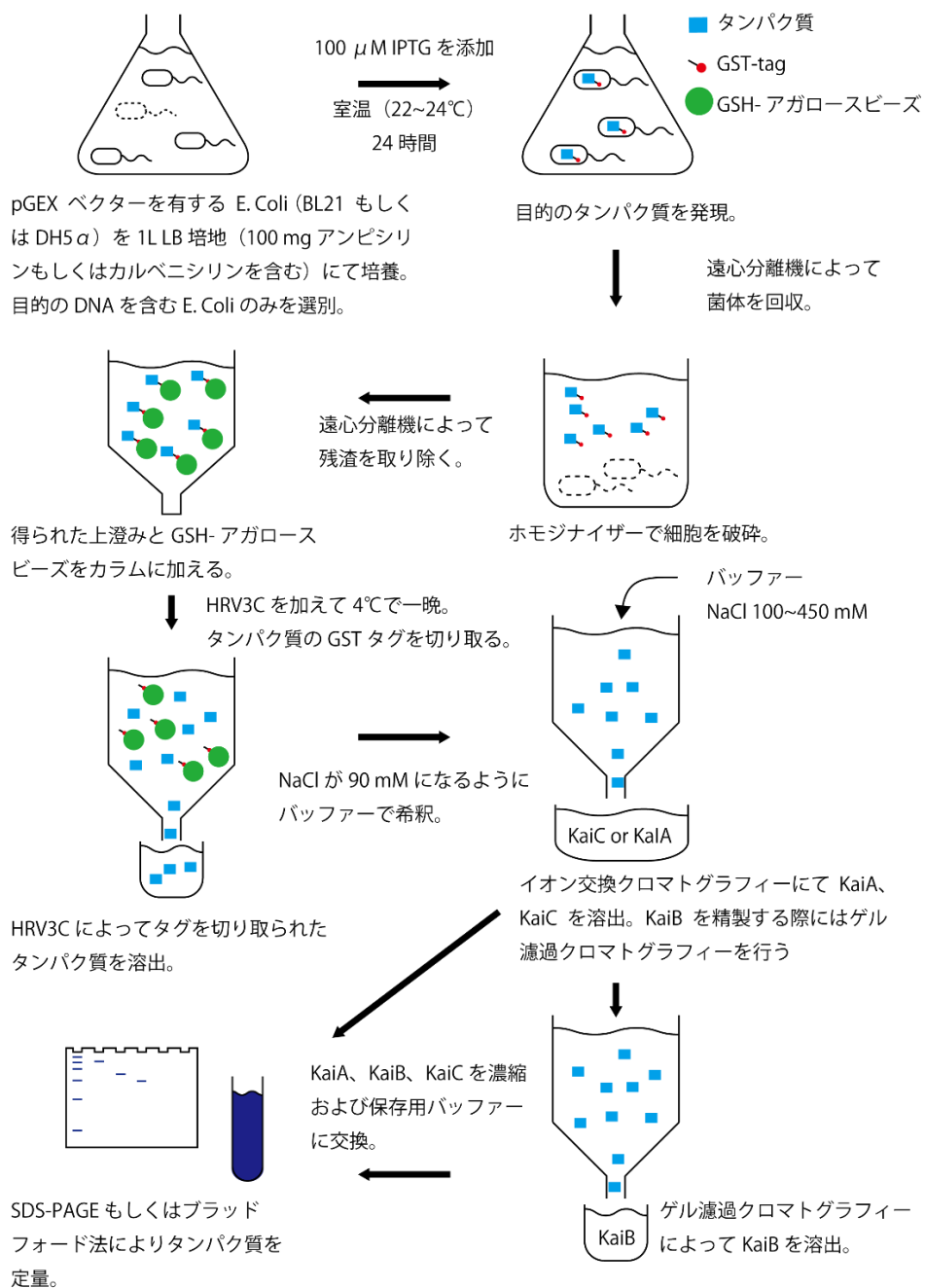


図 2-1 Kai タンパク質精製の概要。

目的の GST 融合タンパク質を発現させた *E. coli* を遠心分離によって回収し、ホモジナイザーで破碎した後に遠心分離で細胞残渣を取り除く。その後、GSH-アガロースビーズと GST を結合させたのちに HRV3C プロテアーゼによって GST タグをタンパク質から取り除く。イオン交換もしくはゲル濾過クロマトグラフィーによって目的のタンパク質のみを生成し、最後に SDS-PAGE によって純度を、ブラッドフォード法によって濃度を定量化する。

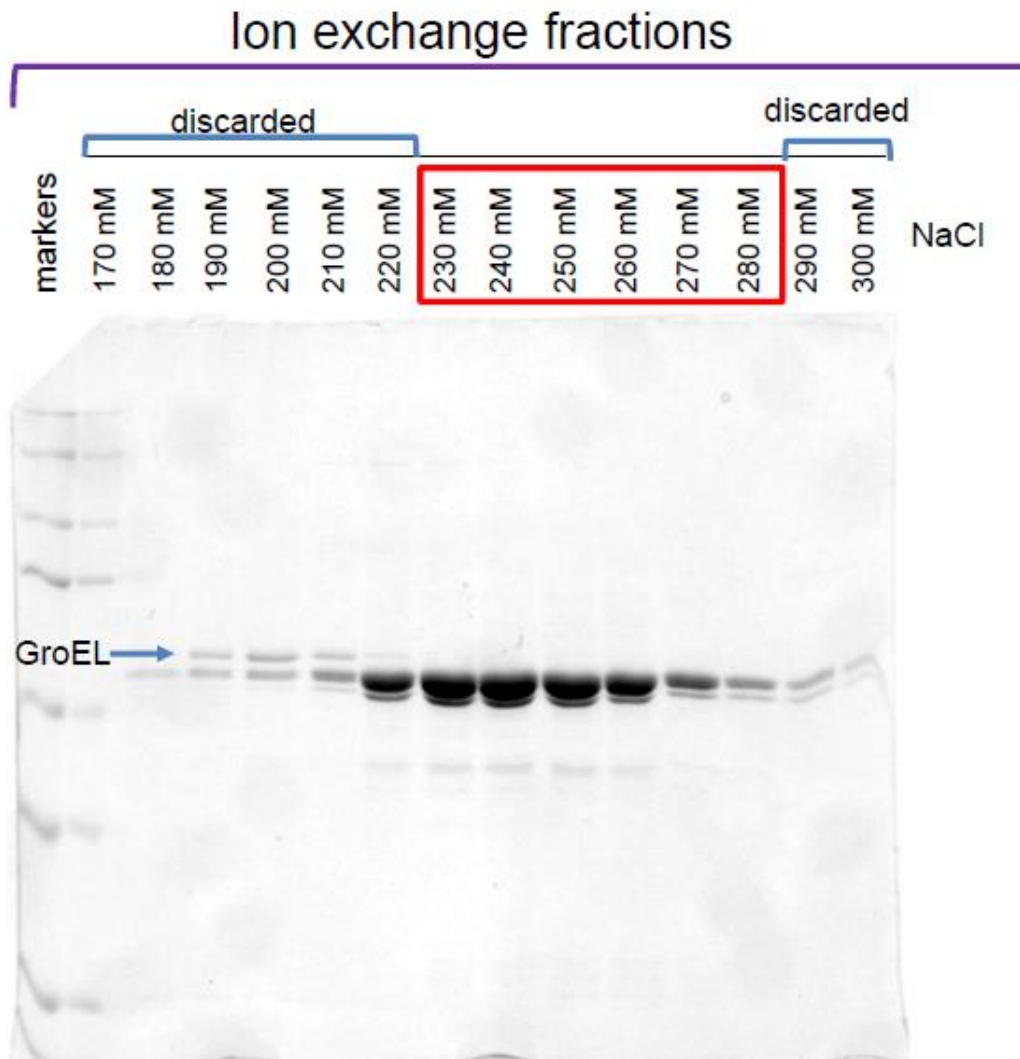


図 2-2 野生型 KaiC を精製した際のイオン交換クロマトグラフィーのピークを決める SDS-PAGE。溶出に用いたバッファー溶液の NaCl の濃度毎に溶出液を SDS-PAGE に用いた。上部に NaCl の濃度を示す。220~280 mM NaCl の際に KaiC のバンドが濃く出ているが、220 mM では GroEL のバンドが出ているため不純物が含まれている。そのため、230~280 mM NaCl を含むバッファー溶液で溶出したものを用いた。

### 2.1.2 in vitro での Kai タンパク質による概日リズムの再構成

in vitro での概日リズム再構成時の Kai タンパク質の濃度は KaiA、KaiB、KaiC それぞれ 50 mg/L (1.52  $\mu$ M)、50 mg/L (4.27  $\mu$ M)、200 mg/L (3.43  $\mu$ M) である[35], [66]。これらをバッファー溶液内 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 0.5 mM EDTA) で混合し、恒温水槽もしくはサーマルブロック内に 30°C でインキュベートした。3 時間毎に試料の一部を取り出して高速 AFM 観察に使用する。また、同時に試料を 2  $\mu$ L 抜き出して、4  $\mu$ L の SDS-PAGE 用バッファー溶液 (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS : Sodium Dodecyl Sulfate, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.02% BPB : Bromophenol blue) と混合することで反応を停止させた後に -20°C で冷凍保存し、後日 SDS-PAGE による KaiC のリン酸化状態の定量に用いた。異なるリン酸化状態の KaiC を SDS-PAGE (10% acrylamide ゲル, 37.5:1 = acrylamide:bis-acrylamide) によって分離したのちに、SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific) によって染色した (図 2-3)。Typhoon (GE Healthcare Life Sciences) によってスキャンして ImageJ を用いてゲルのバンドの濃淡を分析することでリン酸化状態の KaiC の割合を算出した。この際、KaiC の分子量がリン酸化状態によって変化するためバンド上に各リン酸化状態の KaiC が別れて検出される。

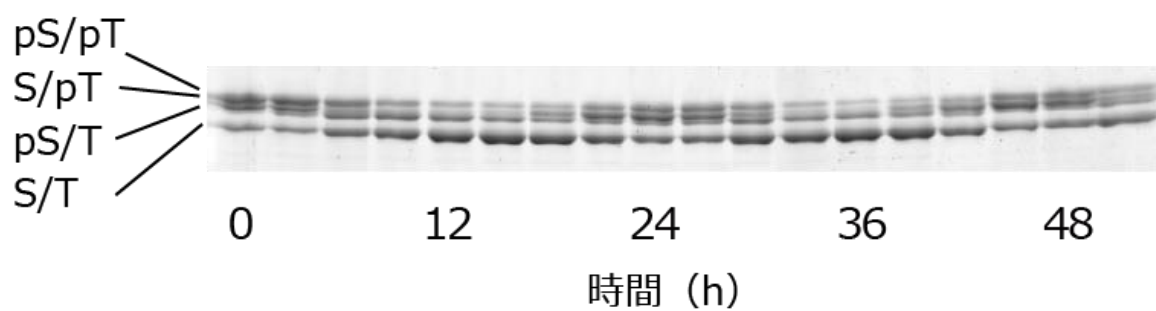


図 2-3 概日リズムを再構成した際の SDS-PAGE のゲル。

上から KaiC-pS/pT、KaiC-S/pT、KaiC-pS/T、KaiC-S-T のバンドが現れている。このバンドの濃さから濃度を計測する。また、バンドの濃淡は約 24 時間周期で変動していることが見て取れる。

## 2.2 高速原子間力顕微鏡

生体分子は自己集合や構造変換、また他の分子との相互作用といったダイナミックな現象を介して、特有の機能を発現している。そのため、生体分子の機能について詳細に理解するためには単分子でダイナミクスを観察・解析することが極めて重要である。これまでに生体分子の動的な機能の観察は光学顕微鏡をベースとした単分子観察の手法が研究され、様々な成果を収めている [69], [70]。しかしながら、光学顕微鏡による観察は GFP (green fluorescent protein) や蛍光色素、ビーズといった標識を計測している。それによって、単分子の振る舞いを観察可能であるが、同時にどのように構造が変化しているかを観察することは困難である。また、近年の Cryo-EM の発展 [71], [72] により様々なタンパク質の構造が高解像で明らかになっているが、得られるのはあくまで静止構造であり、構造変化しているタンパク質の連続した構造情報を直接的に得ることは不可能である。

1986 年に G. Binnig, C. Quate らによって開発された原子間力顕微鏡 (AFM: Atomic Force Microscopy [73]) は、鋭い探針の先で試料表面を触れるようにして走査し、凹凸を感知することで対象をナノスケールで可視化できる顕微鏡である。対象との物理的な相互作用を検出することから対象の性質や、周囲の環境 (大気、溶液、真空中) に依らずに観察することができる。しかしながら、従来の AFM は観察のための走査速度が非常に遅く、1 枚の画像を取得するために数分以上もの時間がかかってしまうため、ダイナミックなタンパク質の構造変化や相互作用を観察することは困難であった。そのため、AFM の高速化はいくつかのグループによって研究が進められてきた。金沢大学・安藤グループによって微小カンチレバー、カンチレバーの変位を検出する光学系、高速走査可能なスキャナーなどの多くの要素技術が開発され、2001 年には 80 ms/frame のイメージング速度でタンパク質を観察できるようになった [74]。その後、様々な低侵襲化のための技術開発が施され、2008 年には実用的な高速 AFM が完成した [75]。その結果、従来の手法では観察することが困難であったミオシン V のアクチンフィラメント上での歩行運動 [76]、回転子のない F<sub>1</sub>-ATPase の回転運動 [77]、最近では代表的なゲノム編集ツールである CRISPR-Cas9 が DNA を切断する様子

[78]など、様々なタンパク質について動態と構造を同時に観察することに成功してきた。

### 2.2.1 高速原子間力顕微鏡の原理と装置

AFMは柔らかい板バネ(カンチレバー)の先にある鋭い針状のプロープによって試料表面のなぞるように走査することで、表面形状を読み取る。生体試料での観察には対象への影響を最小限に抑えるためにタッピングモード[79]と呼ばれる方法が主に使用されている。カンチレバーを振動させることでプロープから試料にかかる横方向の力を小さくでき、タンパク質のように柔らかく基板への吸着が弱い試料に適している。カンチレバーはホルダー近傍にあるピエゾ素子によって共振周波数付近で振動しており、振動振幅は試料とプロープ間の力学相互作用によって変化する。この振幅変化を光てこ法[80]によって計測し、振動振幅の減少量を一定に保つように試料が搭載されたZ方向ピエゾ素子をフィードバック制御によって伸縮させる。このピエゾ素子の移動量が試料表面の高さ情報に相当する。XY方向の二次元走査を行いながら、Zピエゾ素子に印加される電圧信号をプロットすることで試料形状の三次元画像を得る(図2-4 aにAFMの装置構成の簡略図、bにステージ表面の拡大図を記載)。

タッピングモードAFMの高速化にはカンチレバーを高速に振動させる必要がある。さらに、プロープから試料に加わる力を小さくするためには柔らかいカンチレバーを使う必要がある。要するに、高い共振周波数と低いばね定数を持ったカンチレバーを使わなければならない。共振周波数 $f_c$ とばね定数 $k_c$ はカンチレバーの形状と材料で決まり、以下の式で表される( $L$ : 長さ、 $w$ : 幅、 $d$ : 厚さ、 $E$ : 材質のヤング率、 $\rho$ : 材質の密度)。

$$k_c = \frac{wd^3}{4L^3}E \quad (2-1)$$

$$f_c = \frac{0.56d}{L^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}} \quad (2-2)$$

これらの式から、高い共振周波数と小さなばね定数を両立するためには、カンチレバーのサイズは小さくする必要があることがわかる。高速AFM観察ではオリンパス株式会社で開発されたシリコン



製の微小カンチレバー (BL-AC7DS-KU4:  $5.5\sim 7.5\ \mu\text{m} \times 1.7\sim 2.3\ \mu\text{m} \times 80\sim 120\ \text{nm}$ , 長さ  $\times$  幅  $\times$  厚さ)を用いている(図 2-5 a-b)[81]。ばね定数は約  $0.1\ \text{N m}^{-1}$ 、液中での共振周波数は約  $0.8\ \text{MHz}$ 、 $Q$  値は約 2 である。AFM の分解能はプローブの先端半径で規定されるので、高分解能観察には先鋭なプローブが必要である。しかしながら、微小カンチレバーには先鋭な探針がついていない。このため、走査型電子顕微鏡内に有機ガスを導入し、カンチレバー先端に電子線照射を行うことで針状カーボンを堆積させる EBD (Electron Beam Deposition) 法[82]を用いてプローブを製作した。電子顕微鏡は株式会社エリオニクスの ERA-8000FA を用い、有機ガスにはフェロセン (Bis (cyclopentadienyl) iron (II)、和光純薬)を用いた。また、カンチレバー上に堆積したカーボン針はプラズマクリーナー (HARRICK PLASMA) によるプラズマエッチングで先鋭化した(アルゴン存在下で  $0.4\ \text{Torr}$ 、電圧は High:  $18\ \text{W}$  で 5 分)。カーボンプローブの走査型電子顕微鏡観察像を図 2-5 c, d に示す。高速 AFM で用いるカンチレバーは非常に小さいために、光てこ検出用レーザーのスポットを絞るために光学顕微鏡の対物レンズを使用している。光学系の構造の都合上、レーザーがカンチレバーに反射する前後ではほぼ同じ光路をたどってしまうため従来の光てこ法(図 2-6 a)は適応できない。レーザーダイオードから出力された直線偏光の光は  $\lambda/4$  波長板によって円偏光へと変換され、カンチレバーに反射することで  $180^\circ$  位相が反転する。その後再び、 $\lambda/4$  波長板に入射されると最初のレーザー光から  $90^\circ$  傾いた直線偏光のレーザーとなる。この偏光の違いを利用して入射光と反射光は偏光ビームスプリッターで分離される。反射光は 2 分割フォトダイオードへと導入され、上下ダイオードへの入射光量の差分によりカンチレバーの変位が検出される(図 2-6 b)。カンチレバーの振動振幅は振幅測定器によって直流値に変換され、PID (P: 比例、I: 積分、D: 微分) フィードバック回路に入力され、その出力が高圧アンプを通して Z 圧電素子に印加される。Z 圧電素子への印加信号を補正した信号をパソコンに取り込んで、二次元走査の各ピクセルに描画することで試料の表面形状を画像として得ることができる。本研究で使用した高速 AFM で得られる最速のイメージング速度は、 $100 \times 100\ \text{pixel}^2$ 、 $250 \times 250\ \text{nm}^2$  の条件で  $50\ \text{ms}$  程度である。

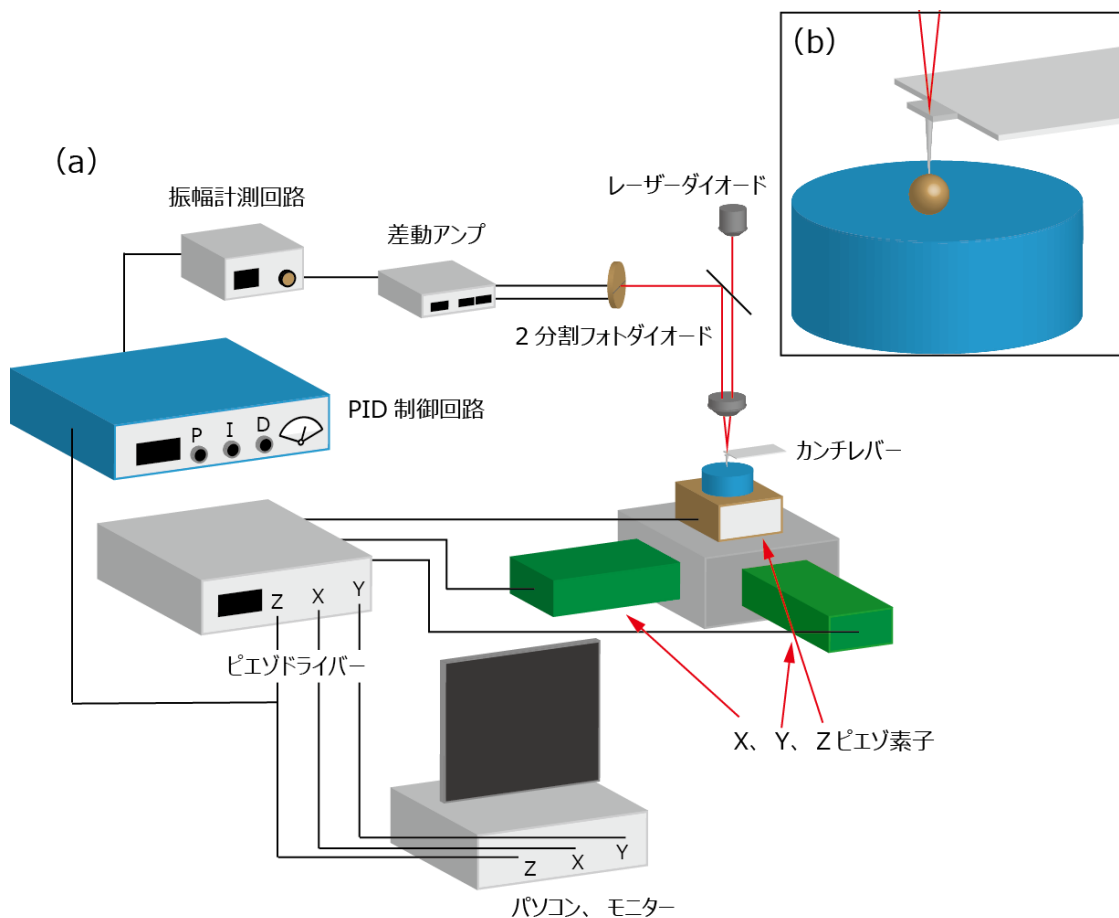


図 2-4 原子間力顕微鏡 (AFM) の装置構成。

(a)ダイオードから出力されたレーザーはカンチレバーで反射した後に2分割フォトダイオードで受光される。その信号が増幅器によって増幅され、振幅計測回路で直流値に変換、PID フィードバック制御回路に出力される。制御回路からの出力がピエゾドライバーによって X、Y、Z それぞれのピエゾを伸縮させることでスキャンする。この Z 方向の信号によって試料表面の形状が画像化される。(b)はステージ表面の拡大図。

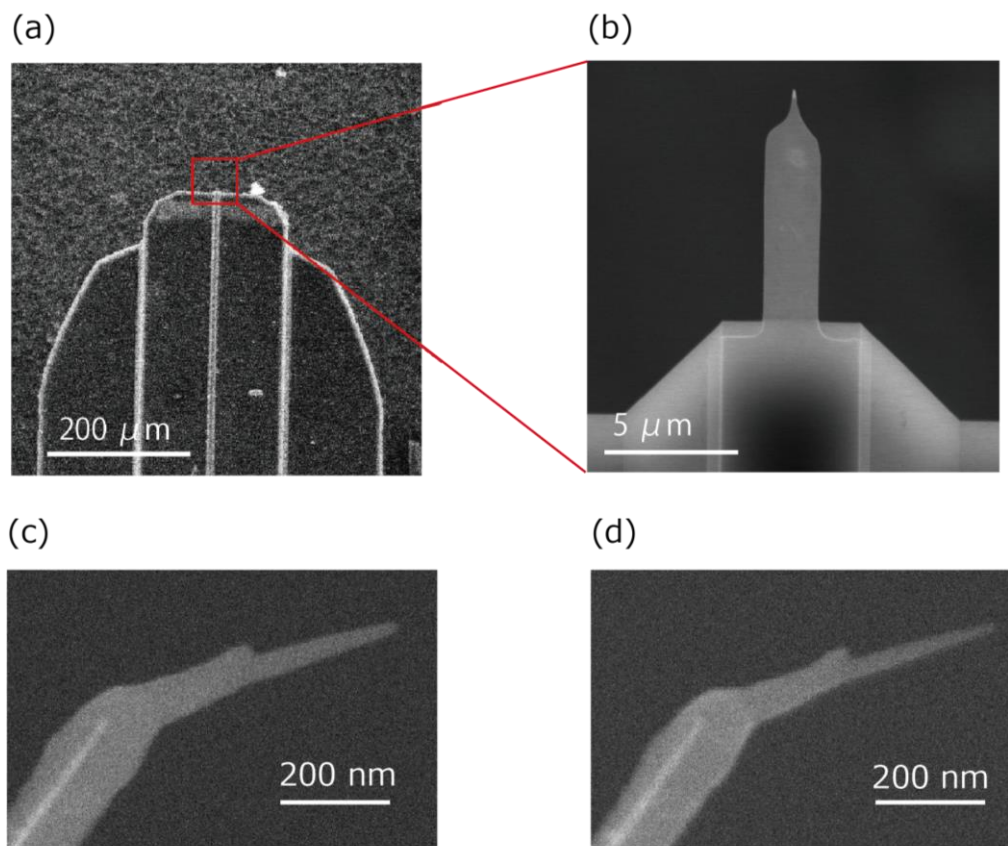


図 2-5 高速 AFM 用カンチレバーの写真および電子顕微鏡観察像。

(a)カンチレバーの電子顕微鏡観察像 (b)先端(赤枠)を拡大して観察した像。(c)カンチレバー先端にカーボン製プローブを作成した後に側面から観察した像。(d)プラズマエッチングによる先鋭化後のプローブ。

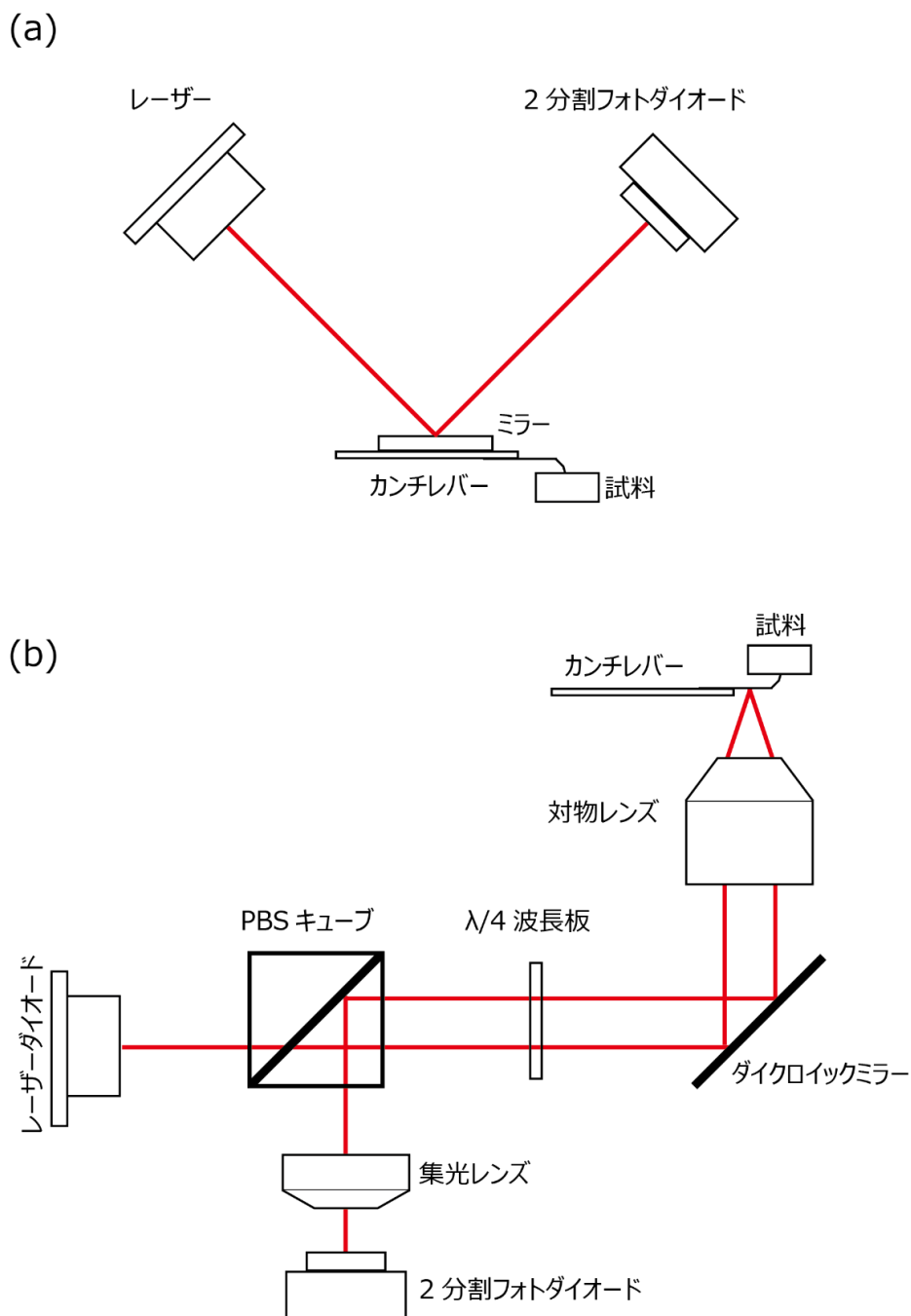


図 2-6 光てこ光学系。

(a)従来の光てこ光学系の模式図。出力されたレーザーが斜めにカンチレバーの背面に入射され、反射光が 2 分割フォトダイオードに入力される。(b)微小カンチレバー用光てこ光学系。レーザーが往路と復路でほぼ同じ経路をたるため、 $\lambda/4$  波長板と変更ビームスプリッター (PBS) で入射光と反射光を分離し、反射光のみが 2 分割フォトダイオードへ到達する。

### 2.2.2 Kai タンパク質の観察および解析手順

Kai タンパク質間相互作用の観察時には、カンチレバーの自由振動振幅を 1~2 nm に設定し、フィードバック制御によって自由振動の約 90%の振幅を維持するように目標振幅を設定した。KaiC 六量体はマイカ(φ1.5 mm、高さ 2 mm の円柱形のガラスステージ(株式会社ジャパンセル)上に φ1.5 mm のマイカ(フルウチ化学株式会社)を固定、図 2-7 a)もしくはアミノシラン(3-aminopropyltriethoxy silane, KBE-903, 信越シリコーン)によって化学修飾されたマイカ表面(APTES-マイカ)に吸着させた。アミノシラン処理は、劈開により清浄な面を得たマイカ基板上に超純水(Direct-Q Water Purification System, Merk Millipore)で 0.1%に希釈したアミノシランを 3 μL 滴下し、3 分間のインキュベーション後、約 50 μL の超純水で洗浄してから試料溶液を滴下した(図 2-7 b)。観察バッファー溶液は 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub> で、いくつかの実験では 1~2 mM ATP、もしくは 150 mM NaCl を加えている(各図の説明欄に記載する)。また、温度補償性の実験以外は室温(約 25~28°C)で観察を行った。

タンパク質の基板への吸着は、マイカもしくは APTES-マイカ上に KaiC 六量体を含む試料溶液を 2 μL 滴下し、5 分間インキュベートして、その後、特筆しない限り観察バッファー溶液で洗浄することで基板上に吸着していないタンパク質を除去した。

Kai タンパク質間の相互作用を観察する場合、あらかじめ KaiC を基板に吸着させて高速 AFM 観察により KaiC の吸着状態を確認した後、KaiA もしくは KaiB を観察バッファー溶液内に添加した。観察プール内のバッファー溶液の量は 70 μL であり、KaiA もしくは KaiB の添加容量を予め抜いた後に添加し、最終容量が 70 μL で変化しないようにした(KaiA、KaiB の最終濃度は各図の説明欄に記載する)。添加後、観察バッファー溶液を数回ピペッティングすることによって試料濃度を均一化させた。これによって、基板に吸着した KaiC 六量体の表面に KaiA あるいは KaiB が結合・解離する様子を高速 AFM 観察した。

KaiB に関しては、KaiC との親和性が低いため、観察バッファー溶液中に KaiB 溶液を添加すると濃度が低いため頻度よく KaiC-KaiB 複合体を観察すること困難であった。そのため、KaiB を観

察バッファー溶液内に添加せずに、KaiC が基板上に均一に吸着しているのを高速 AFM 観察で確認した後、一度試料ステージを観察バッファー溶液から引き上げて、基板上に KaiB 溶液(濃度は本文に記載)を直接 2  $\mu$ L 滴下し、30 分もしくは 3 分間インキュベートしたのちに、バッファー溶液による洗浄を行わずに観察を行った。

KaiC-KaiA 複合体の結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を算出するために、KaiA が KaiC へ結合している時間を高速 AFM の連続像から計測した。さらに、KaiA が KaiC から解離した後、同一の KaiC に KaiA が結合するまでの時間を計測することで KaiC と KaiA が KaiC-KaiA 複合体を形成するまでの解離時定数  $\tau_{\text{unbound}}$  を算出した。KaiA の KaiC への結合および解離は KaiC 六量体上での輝点の出現、または消失を目視によって確認して行った(解析の一例を図 2-8 に示す)。また、KaiA が観察バッファー溶液内に均一に存在するように、添加後にピペッティングを行ってから 5 分以上経過した高速 AFM 観察像について解析を行った。これによって得た結合状態の時間および解離状態の時間からそれぞれヒストグラムを作成し、指数関数によってフィッティングすることで KaiC-KaiA 間の結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  および解離時定数  $\tau_{\text{unbound}}$  を算出した。フィッティングは Igor Pro に標準で搭載されている回帰分析機能を用いて行い、エラーバーは標準誤差である。

KaiC の観察面が CI リング側か CII リング側かを特定するために、剛体球シミュレーションにより高速 AFM 像の予測を行った。シミュレーションには、結晶構造解析で得られている KaiC 六量体の構造(PDB:2GBL)を用いた[46]。結晶構造の各表面原子に対して剛体球モデルを適用し、KaiC の表面原子と AFM のプローブ(先端半径 0.5 nm、コーン角度 10°Cの円錐形)が接触する座標を計算することで疑似 AFM 像を構成した。KaiC- $\Delta$ C については C 末端側のテイル領域である 490 ~519 番目アミノ酸残基に相当する原子を取り除いた構造を用いてシミュレーションを行った。

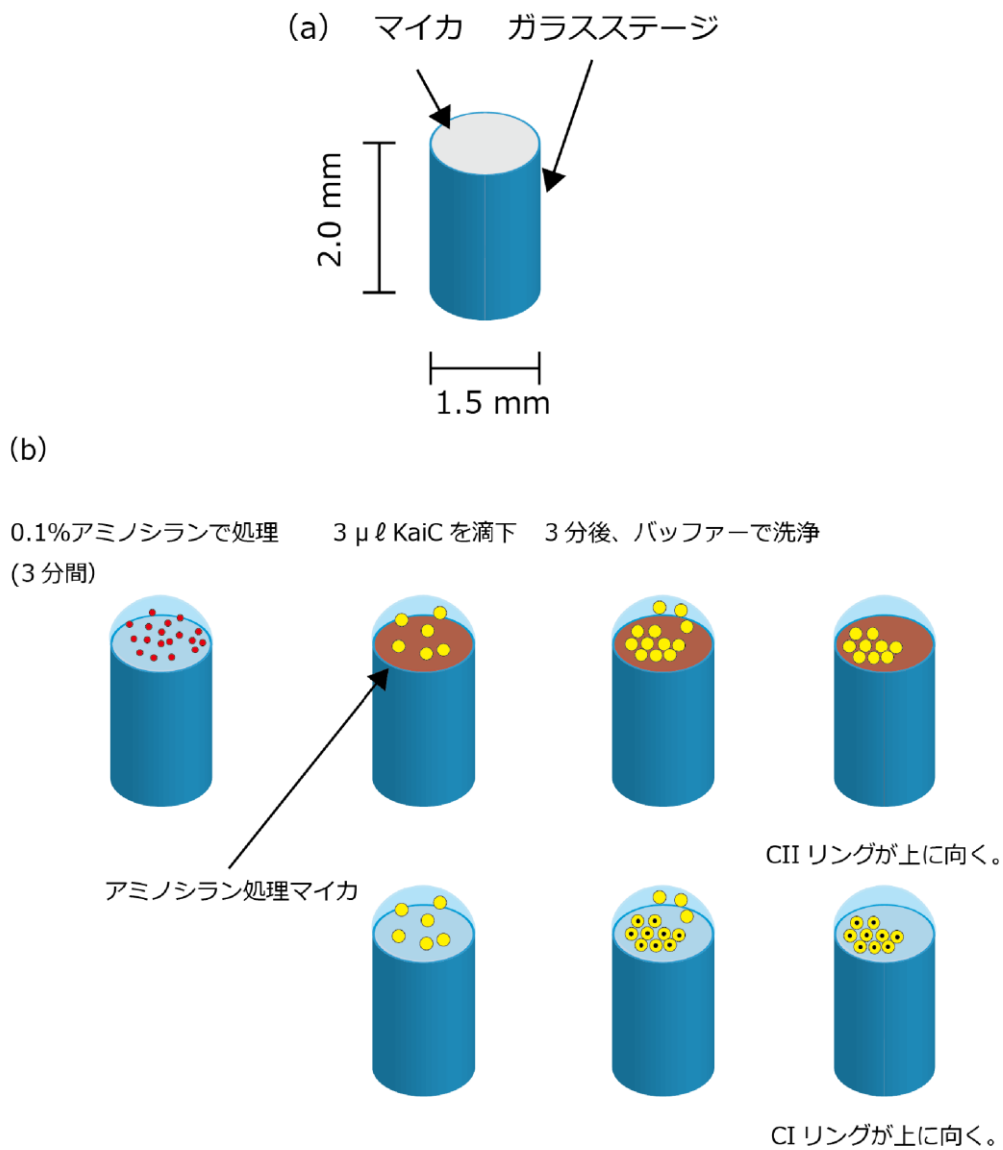


図 2-7 高速 AFM による観察の準備。

(a) 観察に用いたガラスステージの模式図。高さ 2.0 mm、直径  $\phi$  1.5 mm の円柱型。平らな面に直径  $\phi$  1.5 mm の円形のマイカ(フルウチ化学株式会社)を接着して使用する。(b) KaiC の観察手順。CII リング側を観察する場合には 0.1%アミノシランを 3  $\mu\text{L}$  滴下して、3 分間インキュベートした後にバッファー溶液で洗浄したものを用いる。CI リング側を観察する場合はマイカ基板を用い、KaiC 溶液を 2  $\mu\text{L}$  滴下してから 3 分後にバッファー溶液で洗浄して観察を行った。

0.0 s

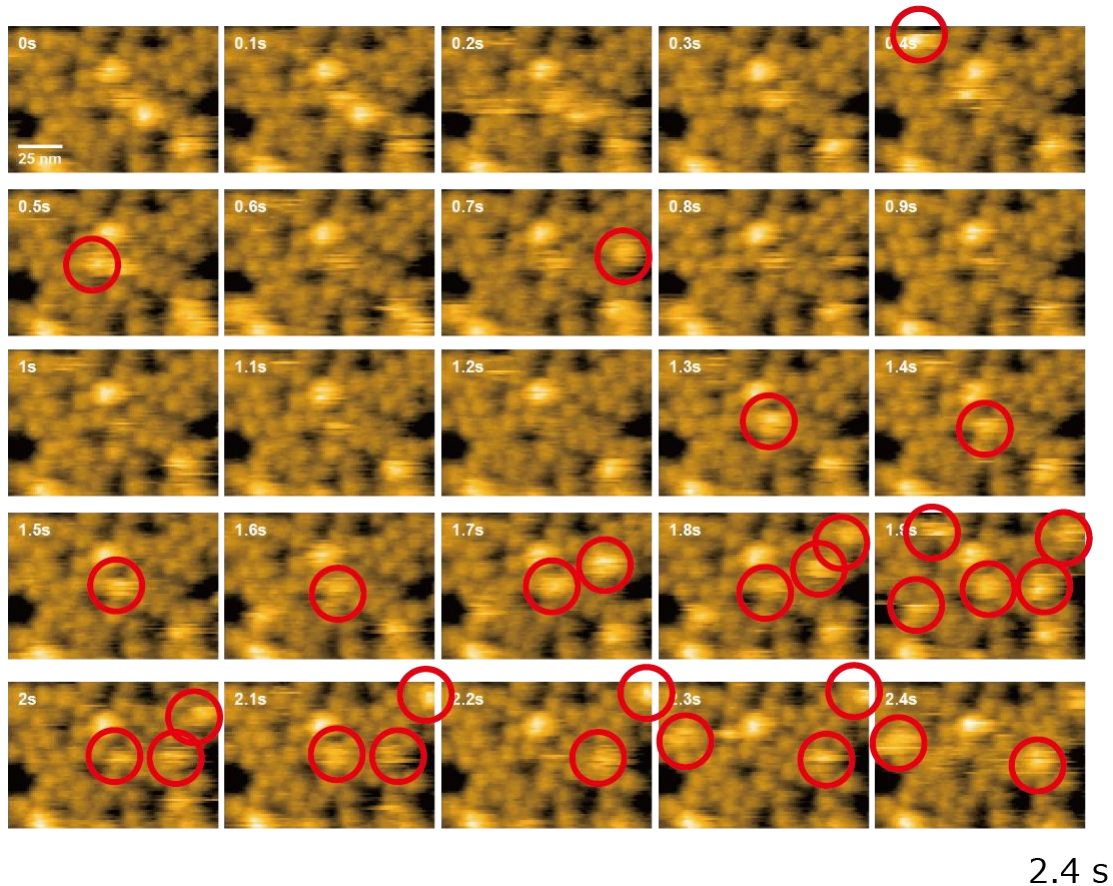


図 2-8 KaiC-KaiA 間相互作用の解析の一例。

輝点が現れた場所に KaiA が結合、輝点が消失すると KaiA が解離したとして、目視によって解析を行った。KaiA が結合した場所を赤丸で示す。イメージング開始時に既に結合している KaiA はカウントせずに、イメージング中に新たに結合した KaiA のみを解析した。観察像のスケールバーは 25 nm でイメージング速度は 0.1 s/frame。



## 2.3 まとめ

本章では、Kai タンパク質の精製方法および Kai タンパク質間の相互作用観察に用いた高速 AFM の詳細について述べた。Kai タンパク質は従来の研究によって確立された方法によって、N 末端に GST を融合したタンパク質として *E. coli* 内に発現した。タンパク質は遠心分離やホモジナイザーでの破碎によって抽出された後、GSH-アガロースビーズを用いたアフィニティクロマトグラフィーでタンパク質のみを溶出した。溶出したタンパク質はイオン交換もしくはゲル濾過クロマトグラフィーによって KaiA、KaiB、KaiC に分離され、SDS-PAGE 等の手法によって純度や濃度を定量化した。精製された Kai タンパク質は ATP と混合することによって概日リズムを刻むことができ、KaiC のリン酸化状態は SDS-PAGE によって計測した。

高速 AFM はカンチレバー、スキャナー、フィードバック制御等の様々な要素技術の開発によって、タンパク質の構造変化や複数のタンパク質のダイナミックな相互作用を 100 ms 以下のイメージング速度で可視化できるようになった。このようにタンパク質の動態に非常に強力な手法である高速 AFM を今回精製された Kai タンパク質に適用し、複合体形成のダイナミクス観察を行い、Kai タンパク質間の相互作用を解析した。

## 第3章 高速 AFM による Kai タンパク質の観察・解析

### 3.1 KaiC の基板への吸着方向制御と高速 AFM 観察

KaiC は Kai タンパク質の概日リズムに中心的な役割を担う最も重要なタンパク質であるため、まず KaiC 六量体を高速 AFM で安定にイメージングすることが必要不可欠である。過去の報告から KaiA は KaiC の CII リング側と相互作用することが既に明らかとなっているが[46], [83], KaiB は KaiC のどちらのリング面と相互作用するのかは必ずしも明らかではなかった[55], [57], [59], [62], [84]–[86]。KaiB の KaiC への結合部位を決定することは、Kai タンパク質による概日周期の分子機構を理解するためにはなくてはならない情報である。高速 AFM で KaiC-KaiA および KaiC-KaiA 複合体、さらには三者複合体の構造を調べるためには、まず KaiC 六量体の基板への吸着方向を制御することが必須である。そこで、基板の化学修飾条件を検討し、KaiC の基板吸着の向き制御を行った。

KaiC は C 末端に折りたたみ構造を持たないテイルと呼ばれる天然変性部位を持つため、KaiC 六量体の N 末端側の CI リング面と C 末端側の CII リング面では、高速 AFM で観察される画像が異なると予想される[40]。実際に観察像に違いがあるかどうかを確かめるために、KaiC 六量体の結晶構造 (PDB:2GBL [46]) を用いて、六量体の両面に対して、剛体球モデルで疑似 AFM 像をシミュレーションした(図 3-1 a, b)。シミュレーションは先端曲率半径 0.5 nm、コーン角度 10°の円錐状探針で行った。その結果、図 3-1 d に示されるように CI リング側面の疑似 AFM 像では中央に穴の開いた六量体リング構造が得られた。一方、CII リング側ではテイルが存在するために中央の穴がふさがれた疑似 AFM 像が得られた(図 3-1 e)。これら KaiC 六量体の疑似 AFM 像から、六量体リング面の基板への吸着方向の違いを AFM で識別できると期待される。

次に、実際に条件の異なる基板に野生型 KaiC を吸着させて高速 AFM 観察を行った。劈開直後のマイカ基板に野生型 KaiC を吸着させ、洗浄したのちに観察を行ったところ、リング構造が多数観察された(図 3-1 g)。挿入図で示してある拡大像からリング構造は六量体であることが確認で

きる。CI リング面の疑似 AFM 像(図 3-1 d)とよく一致したことから、マイカ基板に吸着した野生型 KaiC は CI リング面を上に向けて吸着していることが分かった。また、リング構造以外に不定形構造も観察されたが、これは一部の KaiC がリングの側面吸着しているものと考えられる。APTES-マイカ基板上では、明瞭なリング構造が観察できず球状の分子のみが観察された(図 3-1 h)。疑似 AFM 像から CII リング面はテイル構造によって六量体リングの中心穴が塞がれて AFM で観察できないことが予想されたので(図 3-1 e)、この球状構造は KaiC の CII リング面を観察していると考えられる。さらに、C 末端のテイル(490~519 番目のアミノ酸残基)を取り除いた KaiC- $\Delta$ C についても観察を行った(図 3-1 c)。野生型 KaiC と同様に KaiC- $\Delta$ C の CII リング面の AFM 像をシミュレーションすると、CI リング面の疑似 AFM 像に比べて一回り小さいリング構造を示す像になった(図 3-1 f)。実際に、APTES-マイカ基板上に吸着した KaiC- $\Delta$ C を高速 AFM で観察したところ、リング構造が観察でき、疑似 AFM 像で示されたように中心孔のサイズが CI リング面の像に比べて小さく観察されている(図 3-1 i)。以上の結果から、APTES-マイカ基板では野生型 KaiC は CII リング面を上に向けて吸着することが分かった。

マイカ基板へのアミノシラン修飾の有無によって KaiC 六量体リングの観察面の制御することができ、野生型 KaiC はマイカ基板上では CI リング面を、APTES-マイカ基板上では CII リング面をそれぞれ上に向けて吸着した。これは KaiC の C 末端と N 末端の表面電荷分布の違いによるものであると考えられる図 3-2 に示すように、KaiC 六量体のアミノ酸配列から、CI リング側 (C 末端) では負電荷を持つアミノ酸残基(アスパラギン酸、グルタミン酸)が多く、一方、CII リング側は正電荷を持つアミノ酸残基(アルギニン、リジン)が多く分布していることがわかる[38]。一般的にマイカ表面は負電荷に帯電しており、一方 APTES-マイカ表面はアミノ基によって正に帯電していることから、KaiC 六量体が基板に吸着する際の向きは基板の電荷極性によって変化していると考えられる。

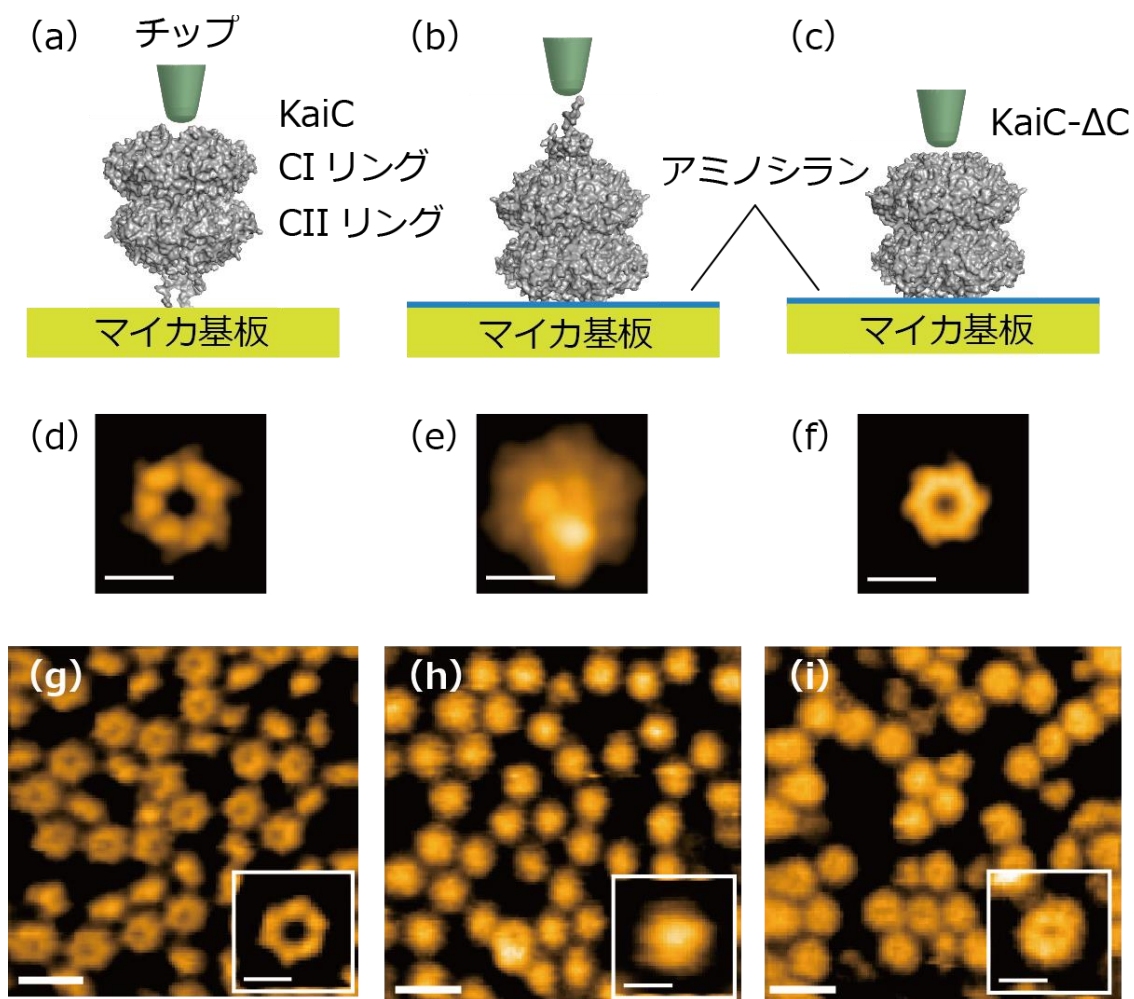


図 3-1 異なる基板上に吸着した KaiC 六量体の高速 AFM 観察。

(a-c) マイカおよび APTES-マイカに固定した KaiC 六量体と探針を横から見たイメージ図。(d-f) 剛体球モデルによる KaiC 六量体のシミュレーション AFM 像。探針の先端半径は 0.5 nm、コーン角は 10°でシミュレーションを行った。スケールバーは 5 nm。野生型 KaiC の (d) CI リング面と (e) CII リング面、(f) KaiC- $\Delta$ C の CII リング面のシミュレーション像。(g-i) 野生型 KaiC の高速 AFM 像。スケールバーは 15 nm。右下の拡大図のスケールバーは 5 nm。(g) マイカ基板上に固定した場合 KaiC は CI リング面を、(h) APTES-マイカ上では CII リング面を観察している。(i) KaiC- $\Delta$ C を APTES-処理マイカ基板上に固定した場合にもリング構造が観察される。

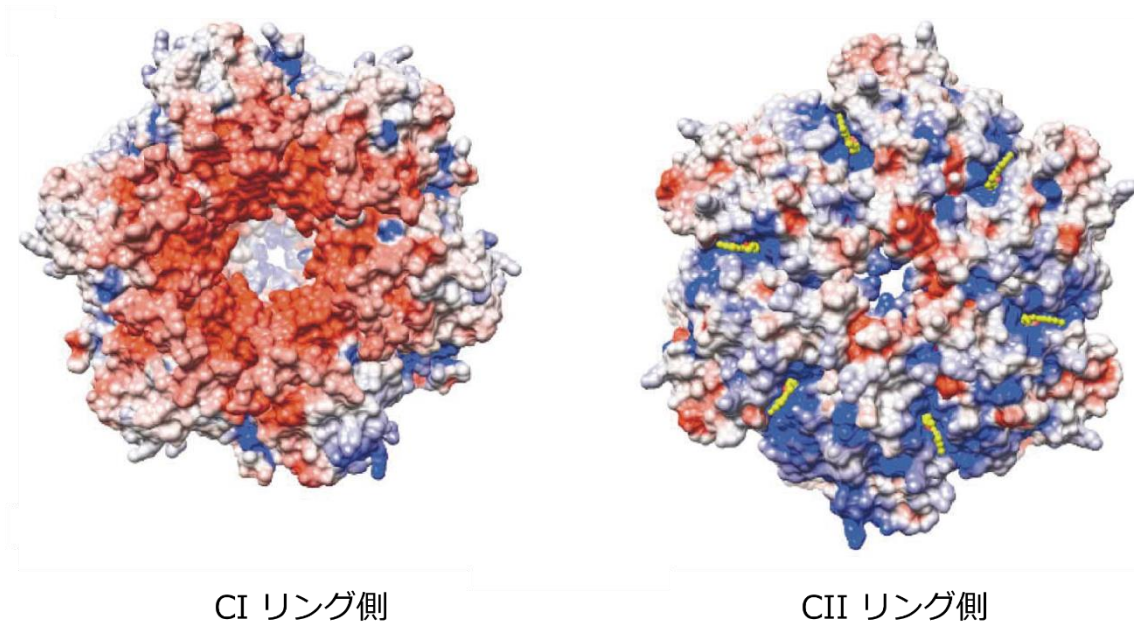


図 3-2 KaiC 六量体の表面電化密度[38]。

左に CIリング面、右に CIIリング面を示す。赤は負電荷を、青は正電荷を示している。黄色は ATP を示す。

## 3.2 KaiC-KaiB 間相互作用の観察・解析

KaiB が KaiC の CI、CII リング面のどちらと強く相互作用するのか、実験によって矛盾する結果が報告されており、本研究の開始当初は明確な結論は出ていなかった[55], [57], [59], [62], [84]–[86]。さらに、そのダイナミクスについても研究例はなかった。本章では、KaiB が KaiC のどちらのリング面と相互作用するのか、また、結合状態のダイナミクスを調べた実験結果について述べる。

### 3.2.1 KaiC と野生型 KaiB の相互作用の観察

KaiB はリン酸化状態の KaiC に強く結合することが知られていることから[52], [42]、まず最初に KaiB が KaiC 六量体リングの CI 側と CII 側のどちらの面に結合するのかを特定するため、リン酸化状態を模倣した KaiC 変異体(KaiC-S431D:リン酸化部位のひとつである 431 番目のアミノ酸残基であるセリンをアスパラギン酸へ置換した)と野生型 KaiB を用いて実験を行った。図 3-3 a は KaiC 六量体の CII リング面を観察した結果を示している。野生型 KaiB を観察バッファー溶液内に添加(最終濃度は約 7  $\mu\text{M}$ )したところ、観察像に変化は全く現れなかったことから、KaiB は CII リング側に結合しないと考えられる。他方、CI リング側を観察中に同様に野生型 KaiB を観察バッファー溶液内に最終濃度を約 7  $\mu\text{M}$  になるように添加して観察を行ったところ、観察を続けているとわずかながらではあるが輝点が現れるのが確認された(図 3-3 b の白い点線内)。これらの結果から、野生型 KaiB はリン酸化変異体 KaiC の CII リング側には結合できず、CI リング側にはわずかに結合すると考えられる。しかしながら、輝点の現れる頻度が非常に少なく、KaiC-KaiB 間相互作用のダイナミクスを観察することはできなかった。

次に、高濃度(22  $\mu\text{M}$ )に野生型 KaiB を含む溶液を KaiC/マイカ基板に滴下し(図 3-4 a)、30 分間インキュベーションした後に洗浄せずに観察した。その結果、KaiB が KaiC に結合している様子を明瞭に観察することに成功した(図 3-4 b)。AFM 像から、KaiB は KaiC 六量体の CI リング面で KaiC 六量体中の各プロトマーに KaiB が一つずつ結合していることがわかる。KaiB はモノマー状態で KaiC 六量体の各プロトマーに結合することが報告されていることから[62]、AFM で観察された

KaiB の輝点はモノマーであると考えられる。

KaiB は溶液中では四量体を形成しており、KaiC に結合する際に単量体へと解離し、さらに、チオレドキシンの結合型構造 (KaiB<sub>fs</sub>) へと構造変化することで KaiC へ結合可能になるが[55]、KaiB ⇌ KaiB<sub>fs</sub> の平衡定数は  $K = 0.13 \pm 0.02$  と見積もられている。このことは KaiC に結合できる KaiB<sub>fs</sub> は KaiB 全体の中でも結合型に構造変化したごく一部でしかないことを意味している。そのため非常に高濃度な KaiB でなければ KaiC との結合を高速 AFM で観察すること困難であったと考えられる。

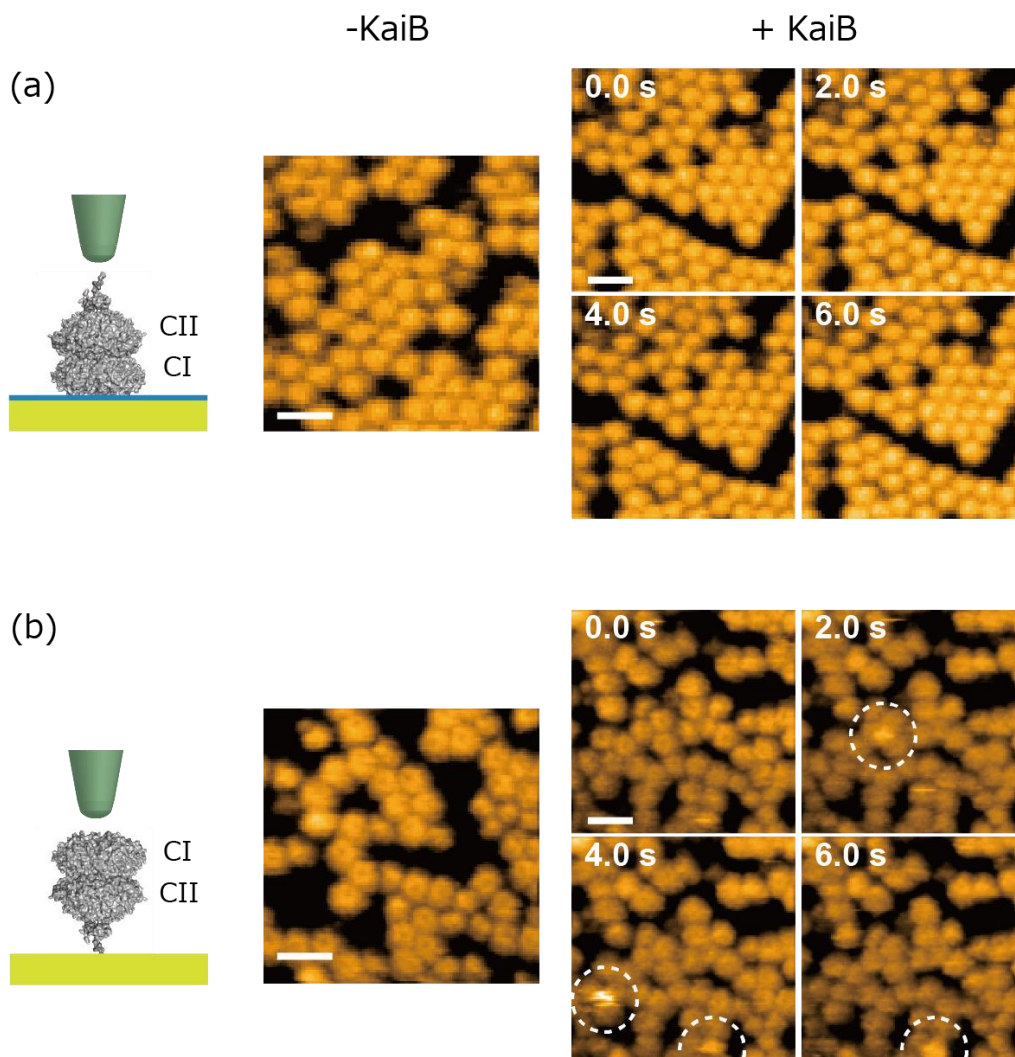


図 3-3 リン酸化変異体 KaiC(S431D) 六量体と野生型 KaiB の高速 AFM 観察像。

中央の高速 AFM 像が KaiB を添加前、右の観察像が添加後(最終濃度は約  $7\mu\text{M}$ )。 (a) KaiC 六量体の CII リング面の観察。 KaiB を添加した後にしばらく待っても観察像に変化はない。 (b) KaiC 六量体の CI リング面の観察。 KaiB の結合と思われる輝点がわずかに現れた(右図、白い点線内)。スケールバーは 15 nm。イメージング速度は 0.5 s/frame。



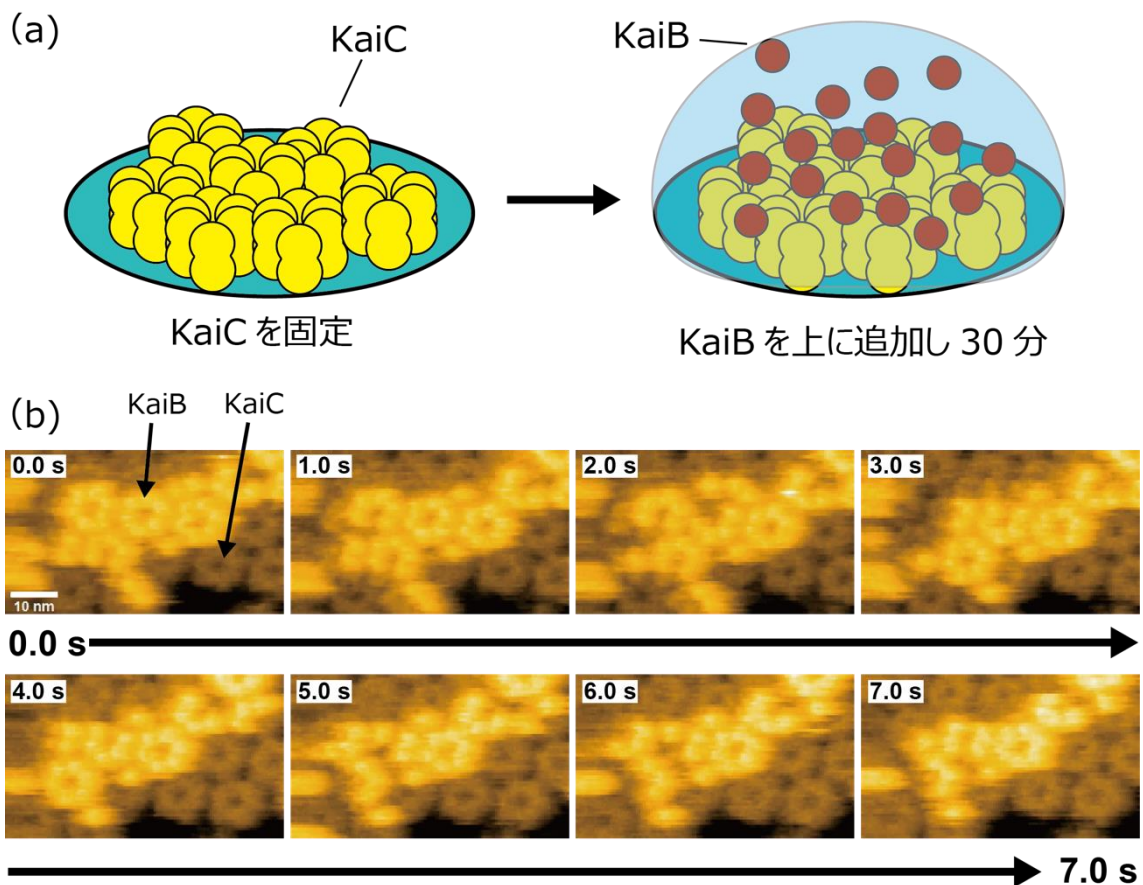


図 3-4 高濃度な野生型 KaiB と野生型 KaiC の高速 AFM 観察。

(a) 観察方法の模式図。(b) 野生型 KaiC に野生型 KaiB が結合している様子的高速 AFM 像。KaiB が KaiC 六量体の CI リング上にサブユニット毎に結合している。スケールバーは 10 nm。イメージング速度は 0.1 s/frame。

### 3.2.2 KaiC と変異体 KaiB (KaiB-G88A/D90R) の高速 AFM 観察

上述したように野生型 KaiB は溶液中で四量体を形成しており、KaiC に結合するためには単量体への解離と結合型への構造変換が必要である。ここでは、KaiC への結合型構造を模倣する変異体 KaiB (G88A/D90R) を用いて KaiB と KaiC の結合の観察を行った。

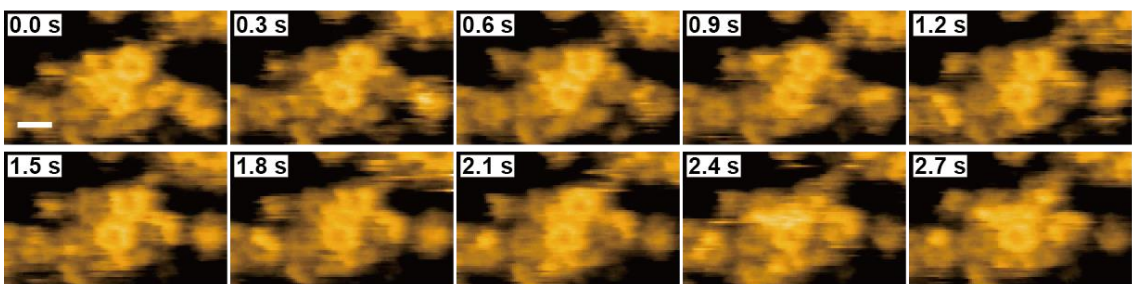
リン酸化状態を模倣する変異体である KaiC-S431D の CI リング面を観察中に KaiB-G88A/D90R を観察バッファー溶液内に添加して実験を行った。野生型 KaiB での観察時の半分程度の濃度 (最終濃度は約 3.5  $\mu\text{M}$ ) でも KaiC-S431D への KaiB-G88A/D90R の結合が観察された (図 3-5 a, b)。一方、CII リング面を上に向けて同様の実験を行ったが、やはり KaiB-G88A/D90R が KaiC-S431D に結合する様子は観察されなかった。このことから KaiB は KaiC の CI リング側にのみ結合することを確認できた (図 3-5 c)。

KaiB の KaiC への結合は協同的に起こることが質量分析と中性子散乱による研究で示唆されている [62], [63]。実際に高速 AFM で観察された KaiB の KaiC-CI リング面への結合を詳しく見ると、図 3-4 b と図 3-5 b の連続像に示されるように、KaiC 六量体上で KaiB がリングを形成して結合している場合には、そのうちの一部の KaiB が KaiC から解離した場合でも、すぐに別の KaiB が結合してリング形状を復元している様子がわかる (図 3-5 b の 0.6 秒で上部のリングの一部が欠損したのちに 0.9 秒の時点でリングが復元している)。一方、KaiB が少量、もしくは結合していない KaiC 六量体に対しては KaiB が KaiC の上に新たにリングを形成する頻度は非常に少なかった。このことから、KaiB は KaiC の CII リング面に協同的に結合し、複数の KaiB が同時に結合することで安定した複合体構造になると考えられる。

(a)



(b)



(c)

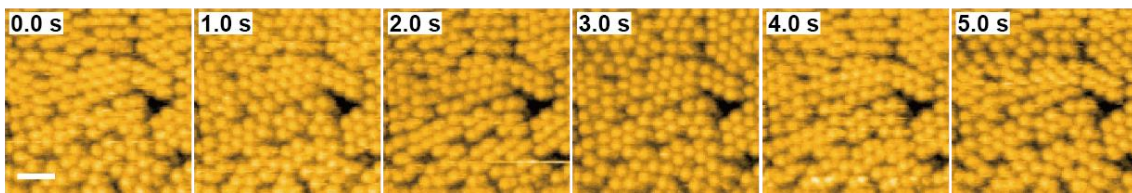


図 3-5 KaiB-G88A/D90R と KaiC-S431D の高速 AFM 像。

(a, b) KaiC の CII リング面を上に向けた高速 AFM 像。KaiB-G88A/D90R が KaiC 六量体上にリング状に結合・解離する様子が観察されている。(b) 0.6 秒で上部のリングから KaiB が欠損するが、0.9 秒時点で KaiB が再び結合してリングを復元している。スケールバーは 10 nm。イメージング速度は 0.1 s/frame。(c) KaiC の CII リング面を上に向けた高速 AFM 像。KaiB が結合する様子は見られなかった。スケールバーは 30 nm。イメージング速度は 0.5 s/frame。

### 3.2.3 KaiC-KaiB 間相互作用の KaiC のリン酸化状態依存性

最後に、KaiC-KaiB 間相互作用のリン酸化状態依存性について調べた。KaiC のリン酸化状態に応じて KaiB との親和性は変化し、リン酸化によって親和性が高くなると考えられている[33], [49]。そこで、異なるリン酸化状態にある KaiC 六量体と KaiB の結合の様子を高速 AFM で観察し、KaiC の二か所のリン酸化残基 (S431, T432) のどちらが KaiB との親和性変化に寄与しているかを調べた。

KaiC は KaiA の非存在下において自己脱リン酸化および自己リン酸化活性を持ち[33]、リン酸化状態の野生型 KaiC を 30°C でインキュベートすると時間とともに脱リン酸化が進行し、4°C ではリン酸化が進行する(図 3-6)。電気泳動(図 3-6 a)による測定では KaiC の全リン酸化状態(図 3-6 b)だけでなく、二ヶ所のリン酸化サイト(S431 と T432)のリン酸化状態によって KaiC の電荷状態が異なるために異なる位置にバンドが現れ区別できる(図 3-6 c)。この実験では、野生型 KaiC を 30°C で脱リン酸化させながら、3 時間毎に KaiC を少量取り出してマイカ基板に吸着させて、その上で KaiB との結合状態を観察することで、KaiC と KaiB の親和性のリン酸化状態依存性を調べた。KaiC を基板に吸着させた後に野生型 KaiB (約 22  $\mu\text{M}$ ) 溶液を滴下し 3 分間インキュベートしてから、KaiB が解離しないようバッファー溶液による洗浄を行わずに高速 AFM 観察を行った (KaiB-G88A/D90R を用いると KaiC の全面に KaiB が強く結合し、変化が確認できない可能性があったために野生型 KaiB を用いた)。図 3-7 a に脱リン酸化をスタートしてから時間毎に取り出した KaiC に KaiB を結合させた高速 AFM 像を示す。図 3-7 b の青色プロットは、図 3-7 a の画像から概算した KaiC-KaiB 複合体の数を縦軸にとり、KaiC のインキュベーション時間(時間が経つほど脱リン酸化が進行する)を横軸にプロットしたグラフを示す。走査による探針の影響で KaiB が KaiC から解離してしまう可能性を考慮して、高速 AFM 観察を始めてから 2 s 以内の画像について解析を行った。また、探針のサイズ効果により観察される KaiB のサイズが画像ごとに変化してしまうために、画像内の KaiB の数を画像全体の面積の比率で算出することは困難であった。そのため、画像内の KaiB の輝点の数を計測している。なお、図 3-7 a の全ての画像の走査範囲は  $150 \times 150 \text{ nm}^2$  で

統一してあることから、KaiB の輝点の数が KaiC との親和性の強弱を示していると考えている。図 3-7 b の水色と橙色のプロットは、それぞれ電気泳動法で測定された KaiC の全リン酸化化状態と pS/T (S431 と T432 のうち S431 のみがリン酸化している状態の比率) の変化を示している。

80%以上の野生型 KaiC がリン酸化状態にあるインキュベート前では KaiC-KaiB 複合体の数は画像内で 50 個程度であるのに対して、KaiC の脱リン酸化が進行していくと KaiC-KaiB 複合体の数が増加していき、6 時間後に KaiC-KaiB 複合体の数は最大値 (110 個) を示した。さらに脱リン酸化が進行すると KaiB は KaiC から解離していき、KaiC-KaiB 複合体の数は減少して 18 時間後にはインキュベーション前とほぼ同量まで減少した。その後、36 時間インキュベーションしても KaiC-KaiB 複合体の数に大きな変化はなかった。これらの結果から、KaiB と KaiC の親和性は、単純に KaiC の全リン酸化状態 (図 3-7 b のシアン色曲線) に依存しないことがわかる。

一方、図 3-6 の中段パネルに示している KaiC の4つのリン酸化状態 (KaiC-S/T, pS/T, S/pT, pS/pT) のインキュベーション時間に対する割合の変化を見ると、4 状態の割合は時間に対して単純な増減を示していない。特に、pS/T 状態は 30°Cでのインキュベーション中にピークを持つ山型の曲線を描いている。KaiC-pS/T の時間変化を図 3-7 b (オレンジ色曲線) に重ねて描いて、KaiC-KaiB 複合体の数の変化と比較すると、2 つのグラフの増減の傾向はよく一致していることがわかる。また、完全にリン酸化している KaiC とは強く結合していないことから、KaiC-pS/pT から KaiC-pS/T へと遷移した際に KaiC に KaiB が結合し始めて、KaiC を脱リン酸化過程へと移行させる。KaiB が KaiC-pS/T に強く結合することは先行研究によっても示されており[42]、KaiC-pS/T への遷移が KaiC の脱リン酸化のスイッチになっていることを示唆している。

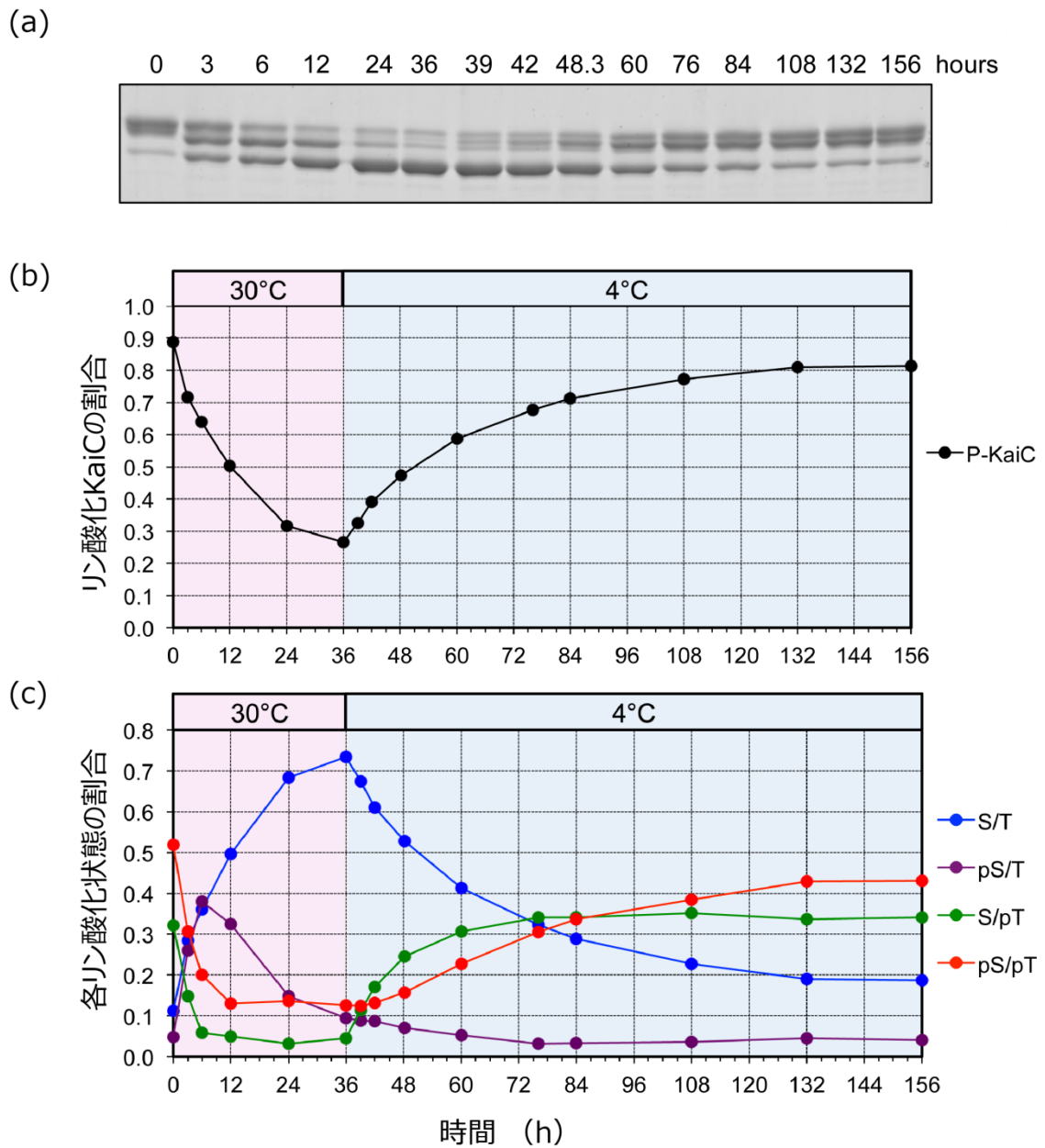


図 3-6 30°Cおよび 4°Cでインキュベーションした野生型 KaiC の SDS 電気泳動結果。

(a) SDS-PAGE によって得られたゲルパターン。(b) KaiC 全体のリン酸化状態の時間変化。(c) 4 つの KaiC のリン酸化状態 KaiC-S/T (青)、KaiC-pS/T (紫)、KaiC-S/pT (緑)、KaiC-pS/pT (赤) を示す。

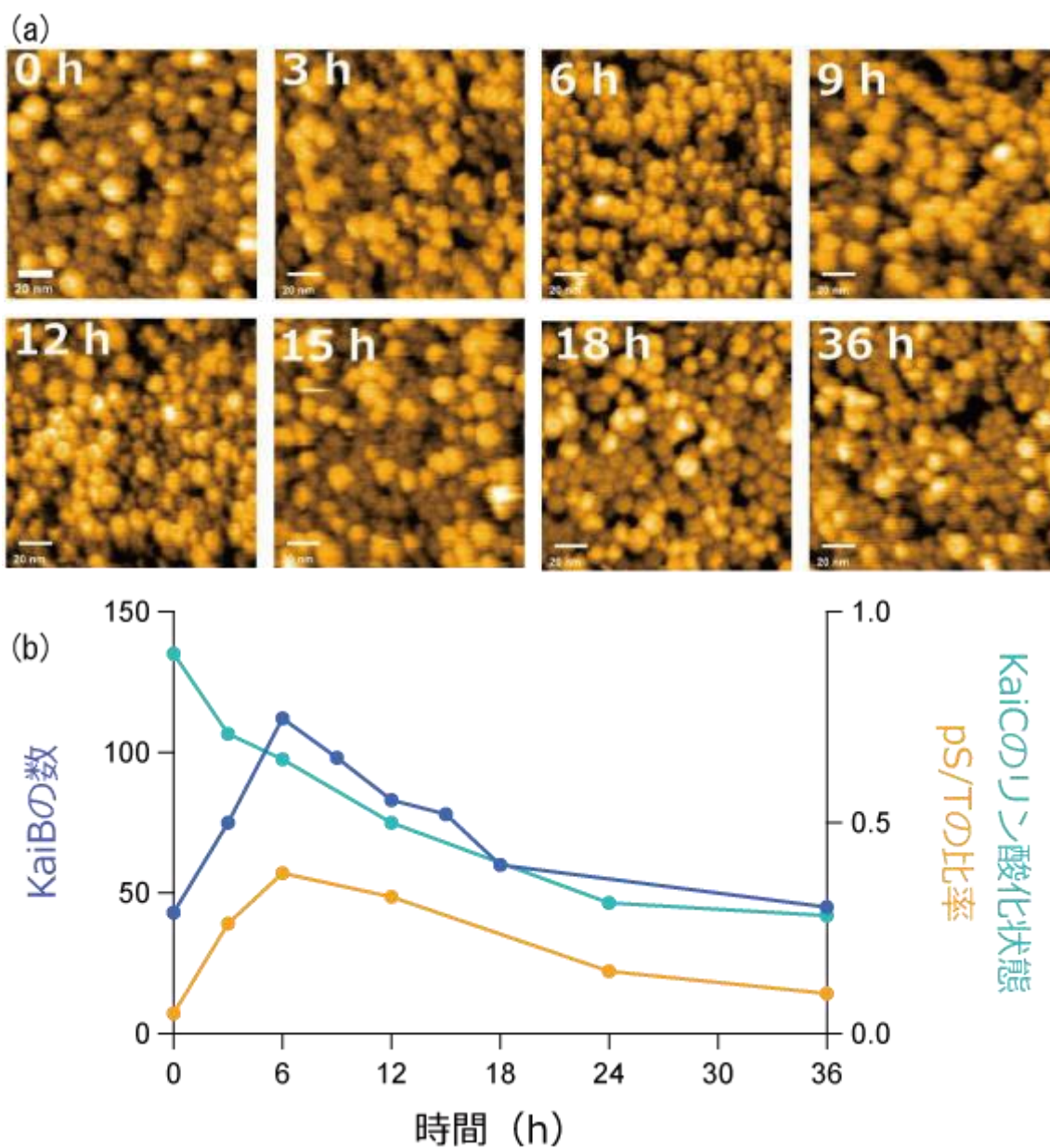


図 3-7 KaiC-KaiB 間相互作用のリン酸化状態依存性。

30°Cでのインキュベーションにより自己脱リン酸化過程にある野生型 KaiC に対する KaiB の結合数を調べた。(a)インキュベーションスタート後3時間毎の KaiC の CIリング面に結合した高速 AFM 像。画像中の明るい輝点が KaiC に結合した KaiB。スケールバーは 20 nm。(b) KaiC のリン酸化状態 (シアン)、KaiC-pS/T の割合 (オレンジ) および KaiC に結合している KaiB の数 (青)。

### 3.3 KaiC-KaiA 間相互作用の観察・解析

KaiC はリン酸化過程において KaiA と複合体を形成することで自己脱リン酸化機能が活性化される。これまで KaiC-KaiA 複合体の構造解析は電子顕微鏡や SDS-PAGE 等による静止状態かつ多数分子の平均構造に関する研究しかなく[46], [83]、KaiC と KaiA の結合状態の単分子観察や複合体形成のダイナミクスに関する研究はなかった。高速 AFM を用いて KaiC-KaiA 間の相互作用を直接可視化することで、KaiA と KaiC に複合体構造形成とそのダイナミクスを解析した結果について述べる。

#### 3.3.1 KaiC-KaiA 間の結合部位の確認

KaiA は KaiC の CII リング面に結合することが既に知られている[34], [49]。まずこれを確認するために、野生型 KaiC の CI リング面あるいは CII リング面の高速 AFM 観察を行いながら KaiA の結合を観察した。

約 80%リン酸化状態の野生型 KaiC の CII リング面を観察しながら KaiA を観察バッファー溶液内に最終濃度を約 1  $\mu\text{M}$  となるように添加した。プール内を懸濁してから数秒経過すると、敷き詰められた KaiC 六量体の上いくつもの輝点が現れた(図 3-8 a)。この輝点は KaiA を添加してからのみ現れることから、KaiA が KaiC 六量体の CII リング面と相互作用していると考えられる。KaiA の輝点は 1 秒以下の時間で現れたり消失したりを繰り返していることから、KaiA と KaiC の相互作用は短時間の結合と解離を繰り返していることを示している。これまでの研究では、KaiA は KaiC の自己リン酸化機能を活性化させる際に長時間にわたって結合し続け、KaiC のリン酸化が完了した後解離するという、いわば静的な結合様式であると想定されていたが[46], [53]、今回の高速 AFM 観察の結果は KaiC-KaiA の相互作用は非常にダイナミックなものであることを示している。

次に、KaiC 六量体の CI リング面を観察している際に KaiA を添加(最終濃度は約 1  $\mu\text{M}$ )したところ、CII リング面とは異なり KaiA の輝点が現れることはなく観察像に大きな変化は見られなかった(図 3-8 b)。これから、KaiA は KaiC の CI リング面とは相互作用せず、CII リング面、すなわち C 末



端とのみ相互作用することが確認できた。

観察された KaiC の CII リング面への KaiA の結合と解離が、KaiA との特異的な相互作用であることを確かめるために、KaiA (33.5 kDa) より大きな分子量を持つウシ血清アルブミン (BSA、66 kDa) と、小さな分子量を持つ緑色蛍光タンパク質 (GFP、27 kDa) が KaiC の CII リング面と相互作用するかどうかを確認した。BSA もしくは GFP をブールバッファー溶液内に最終濃度が約 1  $\mu$ M になるように添加した後も、図 3-9 示すように観察像に輝点が現れる様子は全く見られなかった。これらの結果から KaiA は KaiC の CII リング面への結合と解離は特異的な相互作用によるものであることが分かる。

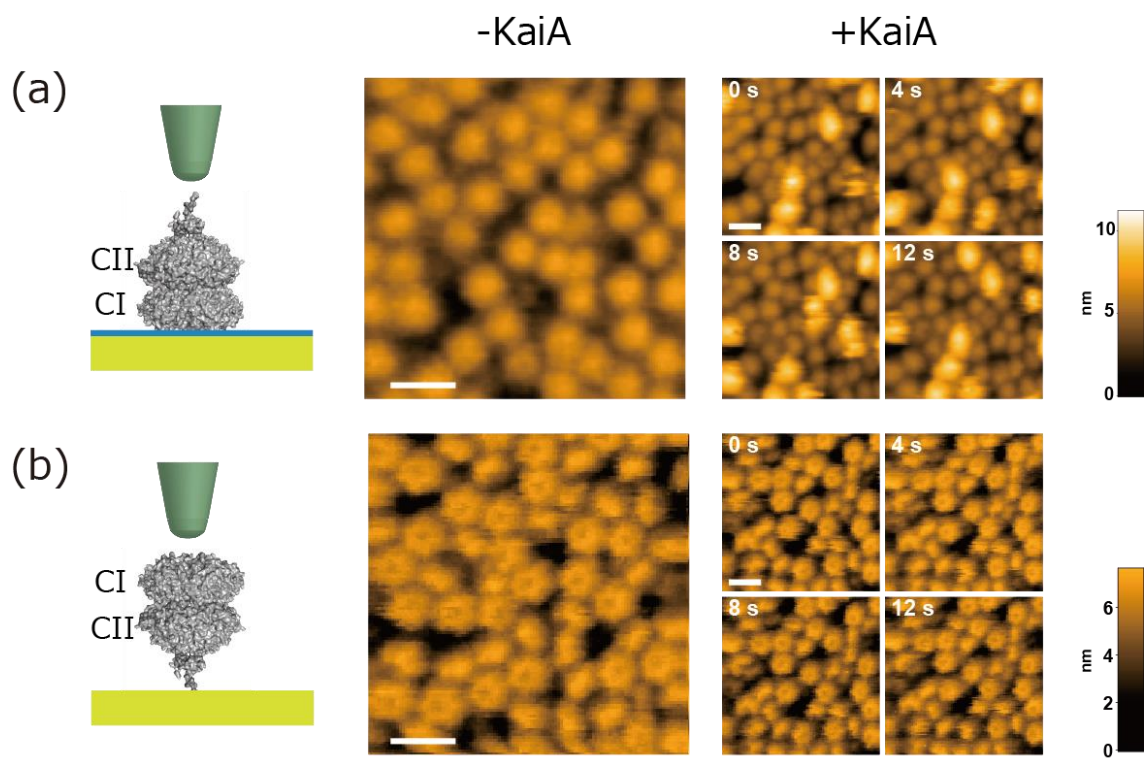


図 3-8 KaiC-KaiA 間相互作用の高速 AFM 観察像。

野生型 KaiC の (a) CI リング側および (b) CII リング側を観察中に最終濃度が約  $1\mu\text{M}$  になるように KaiA をプールバッファー溶液に添加し観察を行った。中央の高速 AFM 像が KaiA を添加前、右の観察像が添加後。スケールバーは 15 nm。イメージング速度は 1 s/frame。

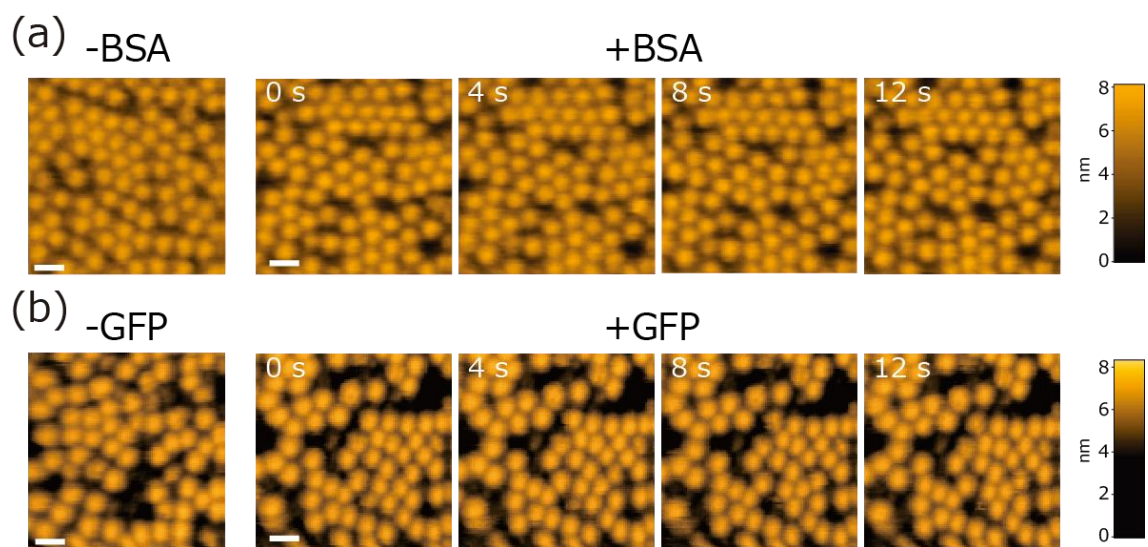


図 3-9 野生型 KaiC の CII リング面を観察中に BSA もしくは GFP を添加した際の高速 AFM 観察像。

(a) BSA もしくは (b) GFP を添加 (最終濃度は約  $1 \mu\text{M}$ ) した後に KaiC 六量体上に輝点が現れることはなかった。スケールバーは 15 nm。イメージング速度は 1.25 s/frame。

### 3.3.2 KaiC-KaiA 間相互作用のリン酸化状態依存性

KaiA と KaiC 間の親和性が KaiC のリン酸化状態に依存して変化する可能性は van Zon らの数理シミュレーションモデルによって示唆されていたが[45]、実験的な証拠はなかった。KaiC-KaiA 間相互作用のリン酸化状態依存性を PDDA (KaiC-KaiA Pphospho-form Dependent Differential Affinity) と名付け、その存在の有無を高速 AFM 観察により確かめた。

最初に、PDPA の有無を確認するために、リン酸化状態と脱リン酸化状態にある野生型 KaiC への KaiA の結合解離過程を観察した。観察には 81%リン酸化状態の野生型 KaiC と 30°C で 36 時間インキュベートすることで 27%まで脱リン酸化させた野生型 KaiC を用いた。KaiC の CII リング面を観察中に、プールバッファー溶液中に KaiA を最終濃度が約 0.4  $\mu$ M となるように添加した。81%リン酸化状態にある野生型 KaiC の場合、図 3-9 a の上段に示すように KaiA は KaiC へ短時間の結合と解離を繰り返していた。一方、27%リン酸化状態にある野生型 KaiC に対しては、KaiA は長時間にわたって KaiC に強固に結合している様子が観察された(図 3-9 a、下段)。この結果を詳しく調べるために、0.1 s/frame のイメージング速度で観察を行い、KaiA が KaiC に結合している時間を解析した。結合時間のヒストグラムを作成し(図 3-10 b)、指数関数でフィッティングして結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を算出した。81%リン酸化状態の KaiC では  $\tau_{\text{bound}}$  は  $0.44 \pm 0.01$  s で、27%リン酸化状態の KaiC では  $1.12 \pm 0.03$  s であった。また、結合している KaiA が KaiC から解離し、再び結合するまでの時間についてもヒストグラムを作成し、指数関数でフィッティングして解離時定数  $\tau_{\text{unbound}}$  を算出した。 $\tau_{\text{unbound}}$  は 81%リン酸化状態にある KaiC で  $7.90 \pm 0.19$  s、27%リン酸化状態にある KaiC で  $5.47 \pm 0.12$  s であった。これらの結果から、KaiC のリン酸化状態に依存して KaiA との親和性が変化していることは明らかであり、リン酸化状態の KaiC では脱リン酸化状態に比べて結合している時間が短く、解離している時間が長くなる、すなわち親和性が低いことがわかった。これは KaiB の KaiC への親和性のリン酸化状態依存性と逆の傾向を示しており、KaiA が KaiC の自己リン酸化を促し、KaiB は逆に KaiC の自己リン酸化を抑制するという、概日リズムにおける役割を考えると、KaiA-KaiC および KaiB-KaiC の親和性の変化が概日周期と強く相関していることを示唆している。

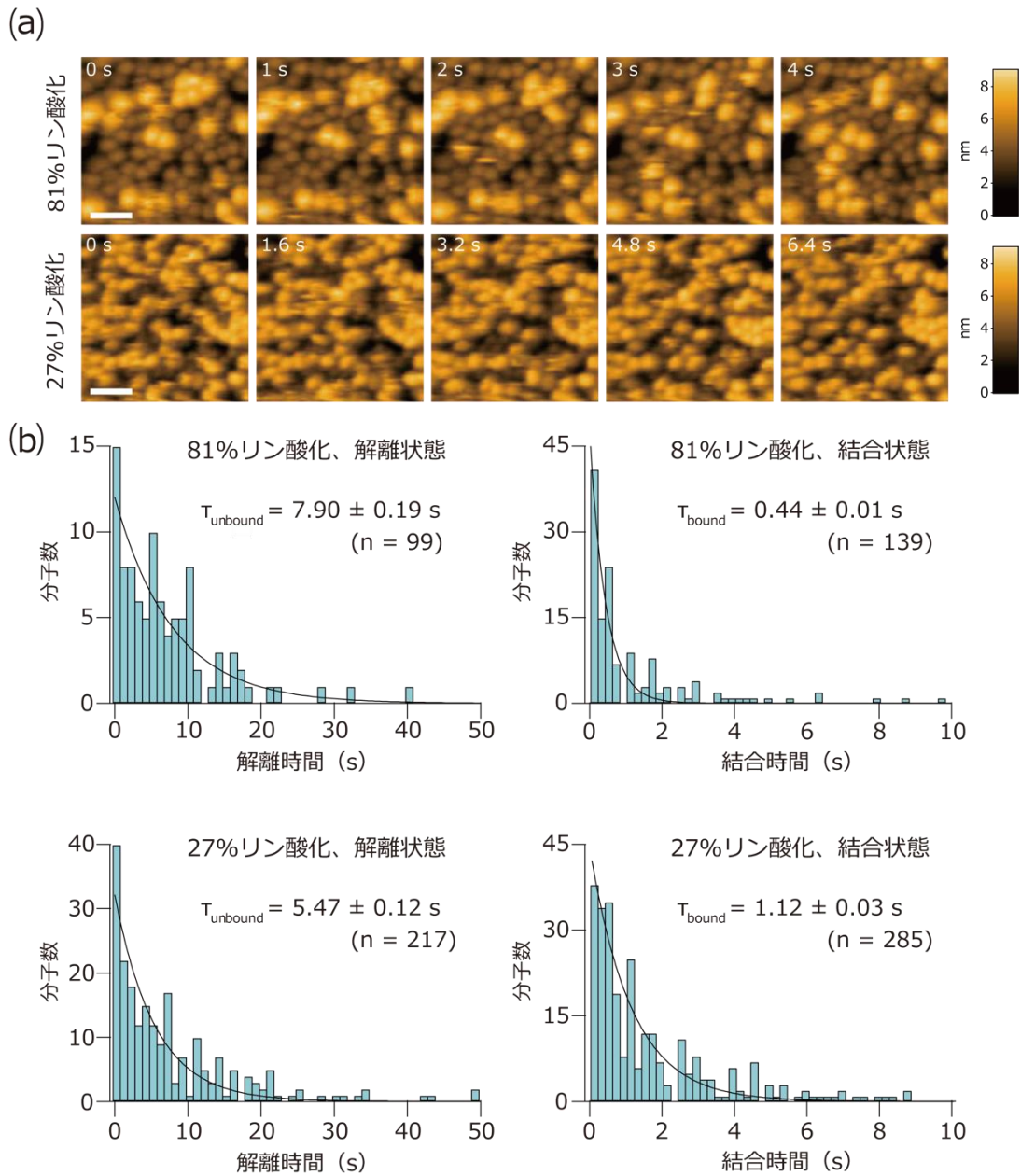


図 3-10 81%および 27%リン酸化状態の野生型 KaiC と KaiA 間の相互作用。

(a) KaiC 六量体に KaiA (最終濃度は約  $0.4 \mu\text{M}$ ) が結合している様子を示す高速 AFM 像。上段は 81%リン酸化状態の野生型 KaiC で下段は 27%リン酸化状態の野生型 KaiC で、CII リング面を観察している。輝点は KaiC に結合した KaiA になる。スケールバーは 30 nm。イメージング速度は (上段)  $1 \text{ s/frame}$  と (下段)  $1.25 \text{ s/frame}$ 。(b)  $0.1 \text{ s/frame}$  のイメージング速で 1000 frame 間の観察結果から得られた KaiA の結合時間と解離時間のヒストグラム。指数関数フィッティング (黒線) によって算出した結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  と解離時定数  $\tau_{\text{unbound}}$  を得た。n は計測した KaiA の分子数を示

す。

### 3.3.3 KaiC のリン酸化状態変異体と KaiA の相互作用

KaiC のリン酸化サイトは S431 と T432 の二ヶ所あり、概日周期と対応して S/T→S/pT→pS/pT→pS/T の順番で変化する[41], [42]。PDDA によって KaiA との相互作用がこれら 4 状態でどのように変化するかを KaiC のリン酸化状態を模倣する変異体を用いて調べた。一般的にセリン(S)およびスレオニン(T)の脱リン酸化状態はアラニンで置換した変異体でリン酸化状態が模倣される。また、セリンとスレオニンのリン酸化状態はそれぞれアスパラギン酸(D)とグルタミン酸(E)で置換した変異体で模倣される[42], [50], [65]。ここでは、KaiC の S431 と T432 を置換した変異体(KaiC-AA、KaiC-AE、KaiC-DE、KaiC-DA)で4つのリン酸化状態を模倣し、KaiA の結合解離過程を高速 AFM で観察した。

これまでと同様に KaiC の CI リング面を上に向けて固定した後に KaiA を添加して観察を行った (KaiA の最終濃度は約 1  $\mu$ M)。図 3-11 a は 4 つの異なるリン酸化状態にある KaiC 六量体に KaiA が結合解離している様子を示した高速 AFM 連続像である。一見して、KaiC のリン酸化状態に応じて結合している KaiA の分子数が異なることがわかる。それぞれの観察から KaiA が KaiC 六量体に結合してから解離するまでの時間を算出して作成したヒストグラムを図 3-11 b に示す。さらに、これらのヒストグラムを指数関数でフィッティングして結合時定数( $\tau_{\text{bound}}$ )を解析した。S431 と T432 の両方がリン酸化した状態に対応する KaiC-pS/pT(KaiC-DE)では、 $\tau_{\text{bound}}$  は  $0.26 \pm 0.05$  s となり、81%リン酸化状態 KaiC よりもさらに短い時間で解離している。S431 あるいは T432 のみがリン酸化した状態を模倣する変異体 KaiC-pS/T(KaiC-DA)と KaiC-S/pT(KaiC-AE)では、 $\tau_{\text{bound}}$  はそれぞれ  $0.43 \pm 0.14$  s と  $1.0 \pm 0.15$  s であり、S431 と T432 の両方がリン酸化した KaiC-pS/pT よりも結合時間が長くなっている。また、これら 1 つのサイトのみがリン酸化状態にある KaiC-pS/T と -S/pT でも KaiA との親和性が同じではなく、KaiC-S/pT は KaiC-pS/T よりも  $\tau_{\text{bound}}$  が 2 倍以上長い。このことから、T432 のリン酸化が S431 よりも KaiA との親和性変化により大きな影響を与えていることがわかる。S431 と T432 の両方が脱リン酸化した状態を模倣する変異体 KaiC-S/T(KaiC-AA)では KaiC-KaiA

間相互作用のリン酸化状態依存性が顕著に表れており KaiA は KaiC に非常に長時間にわたって結合し、ほとんど解離しないために結合時間の測定は困難であった。これらの結果から、KaiC と KaiA の親和性は KaiC の 4 つのリン酸化状態に依存して大きく変化していることが明確になった。

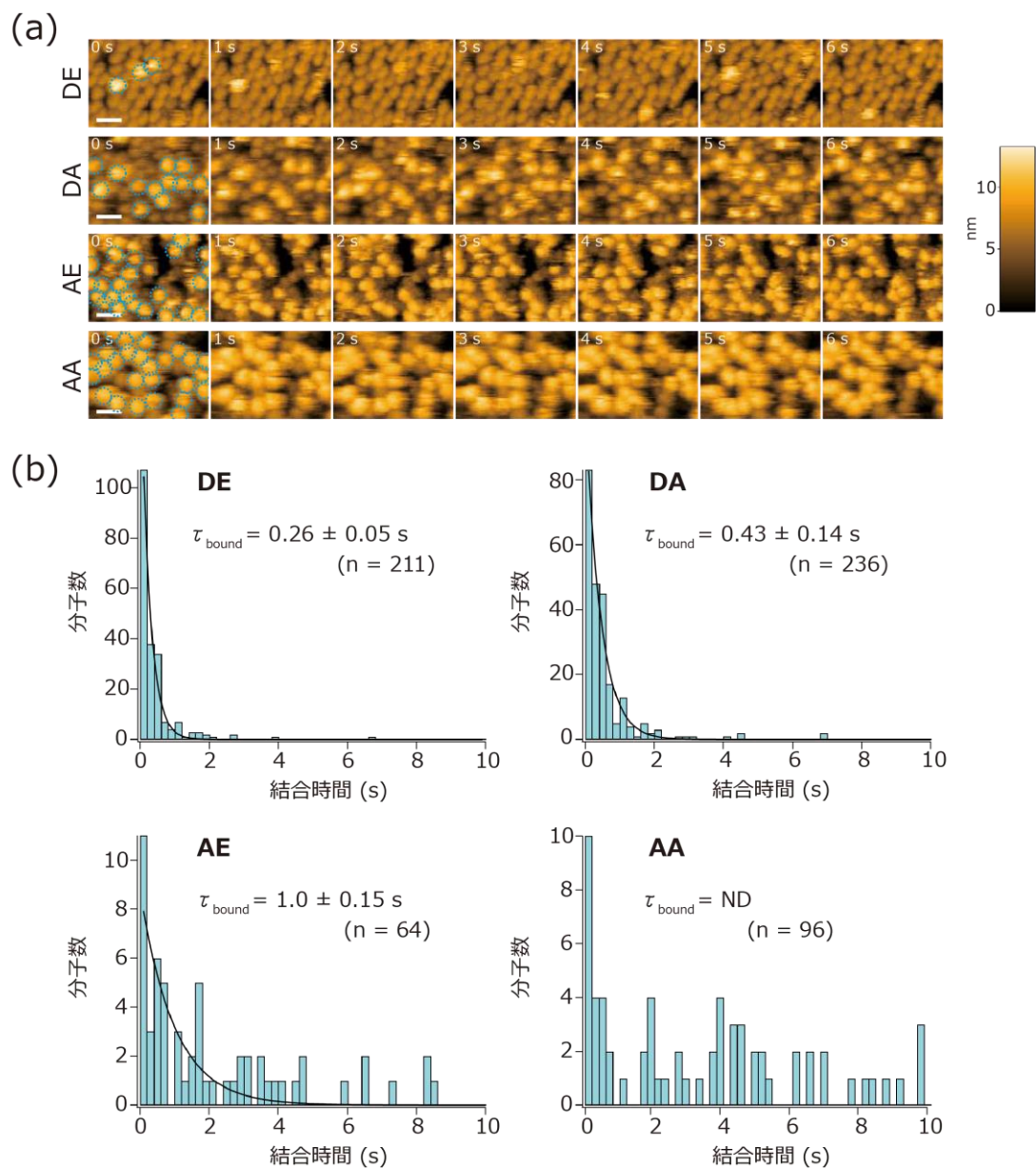


図 3-11 KaiC の 4 つのリン酸化状態を模倣する変異体と KaiA との相互作用。

(a) KaiC 変異体を基板上に固定したのちに KaiA を添加 (最終濃度は約  $1 \mu\text{M}$ ) した高速 AFM 像。上から KaiC-DE、KaiC-DA、KaiC-AE、KaiC-AA の観察像。それぞれ、KaiC-pS/pT、KaiC-pS/T、KaiC-S/pT、KaiC-S/T (p は S431 残基もしくは T432 残基がリン酸化していることを表す) を模倣した変異体に相当する。スケールバーは 20 nm。イメージング速度は 1 s/frame。(b) 4 つの変異体で測定した KaiA の結合時間のヒストグラム。指数関数フィッティング (黒線) によって算出した結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を示す。KaiC-AA については結合時間が長すぎるため解析が困難であり、 $\tau_{\text{bound}}$  を得ることができなかったため ND (Not be determined) と表した。n は計測した KaiA の分子数を示している。



### 3.3.4 概日リズムと KaiC-KaiA 間相互作用の相関

KaiC と KaiA の相互作用を制御している KaiC のリン酸化状態は概日リズムによって変化する [34], [35], [49]。したがって、結合時間が正確に KaiC のリン酸化状態を反映するのであれば、*in vitro* で再現した Kai タンパク質の概日リズムの最中に KaiC と KaiA の親和性も約 24 時間周期で振動していると推測される。このことを確認するために Kai タンパク質の概日リズムを試験管内で再構成し、概日振動中に変化する様々なリン酸化状態の KaiC と KaiA 間の相互作用を高速 AFM で観察した。

野生型の Kai タンパク質 (KaiC: 3.43  $\mu\text{M}$ 、KaiA: 1.52  $\mu\text{M}$ 、KaiB: 4.27  $\mu\text{M}$ 、全体量 100  $\mu\text{L}$ ) を 1 mM の ATP 存在下で試験管内混合して概日周期を再構成した。概日振動中に、3 時間毎に試験管から試料を 2  $\mu\text{L}$  から取り出して、APTES-マイカ基板上に吸着させて高速 AFM 観察を行った。試験管から取り出した試料は KaiA、KaiB、KaiC の 3 種類のタンパク質を含むが、APTES-マイカに展開した後にバッファー溶液で洗浄すると、KaiA や KaiB は観察されず、KaiC のみが CII リング面を上に向けて基板上に吸着している様子が観察された。KaiA は KaiC と結合解離を繰り返しているために、洗浄によって大部分が除去されたためだと考えられる。また、野生型 KaiB についても概日周期を再構成する際の濃度では KaiC に結合する数が極めて少ないために、KaiA と同様に洗浄により多くが除去されたと考えられる。

基板上に吸着した野生型 KaiC の観察中に KaiA を添加(最終濃度は約 1.9  $\mu\text{M}$ )したところ、KaiA が結合解離を繰り返す様子が観察された(図 3-12 a)。3 時間毎に取り出した KaiC に対して、KaiA が結合している時間を計測し、ヒストグラムを作成した(図 3-12 b, c)。ヒストグラムを指数関数でフィッティングして、3 時間毎の結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を算出した。KaiC のリン酸化状態がピークに達している 24 時間(図 3-12 b)と脱リン酸化がピークに達している 15 時間(図 3-12 c)の値を比較すると、結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  の差は明白である。3 時間毎に取り出した試料で測定したヒストグラムと算出された結合時間  $\tau_{\text{bound}}$  を図 3-13 に示す。図 3-14 に同じ試料で KaiC のリン酸化の時間変化を電気泳動でも測定した結果を示す。電気泳動で測定した KaiC のリン酸化の割合(図 3-12 d, 青色)と

KaiA と KaiC の結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  (図 3-12 d, 赤色) から、 $\tau_{\text{bound}}$  は KaiC のリン酸化状態と同期して約 24 時間周期で振動していることがわかる。KaiC のリン酸化状態と結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  の相関係数  $r^2$  は 0.79 と高い値になり、KaiC-KaiA の親和性と KaiC のリン酸化状態は有意に相関があると言える (図 3-12 e)。同様の実験を再度行ったところ、再現性良く KaiC-KaiA の結合時間と KaiC のリン酸化状態の間に相関がみられた (図 3-15)。

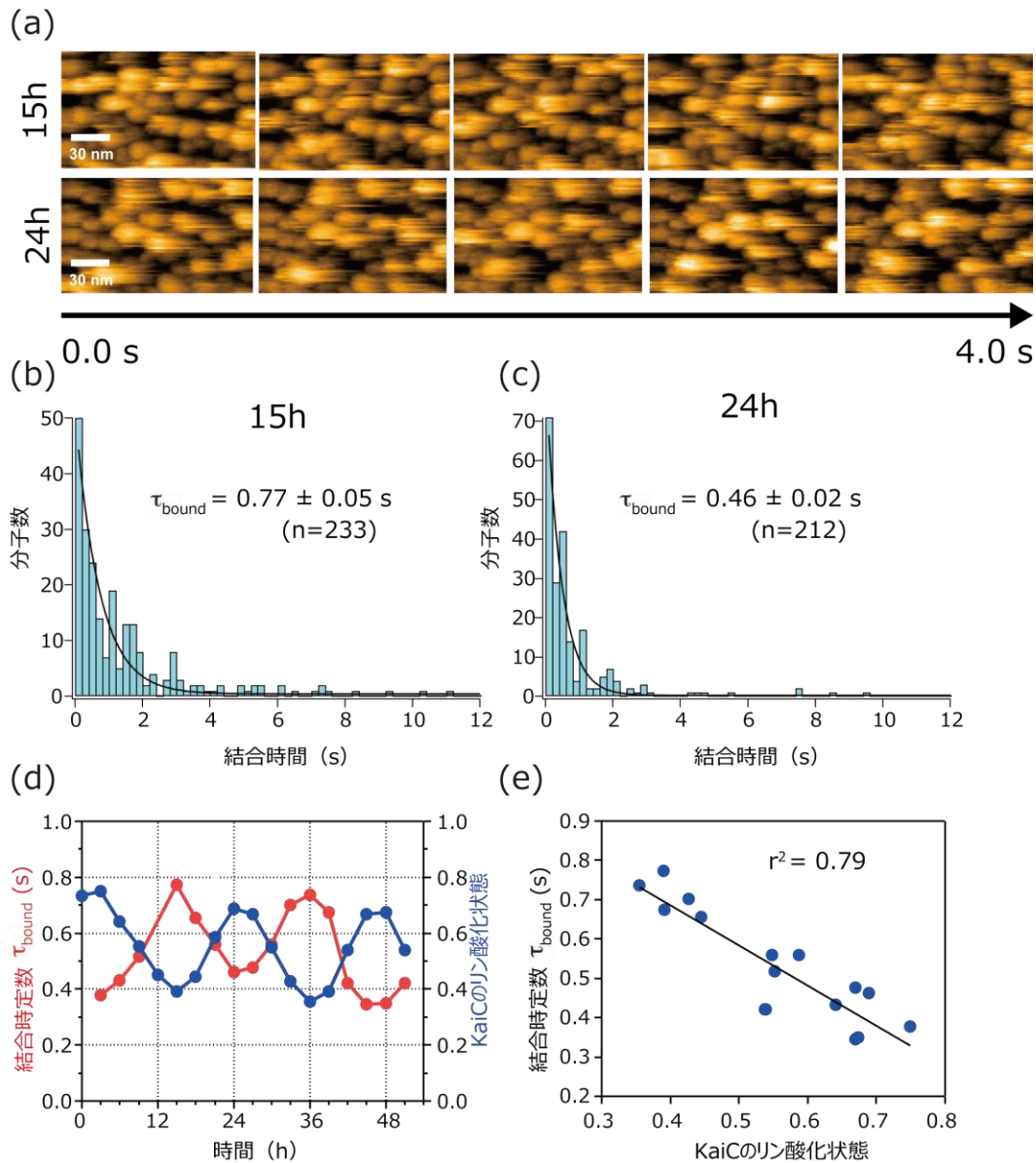


図 3-12 KaiC の概日周期と KaiC-KaiA 間相互作用。

脱リン酸化状態のピークである 15 時間とリン酸化状態のピークである 24 時間での KaiC-KaiA 間相互作用の観察像(最終濃度は約 1.9  $\mu\text{M}$ )。スケールバーは 30 nm。イメージング速度は 0.1 s/frame。(b, c) 脱リン酸化状態のピークである 15 時間とリン酸化状態のピークである 24 時間での KaiC への KaiA の結合時間のヒストグラム。指数フィッティング(黒線)によって結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を算出した。n は計測した KaiA の分子数を示す。(d) KaiC-KaiA 間の結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  (赤線) と SDS-PAGE によって得られた KaiC のリン酸化状態(青線)の時間変化。(e) 結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  (縦軸) と KaiC のリン酸化状態(横軸)の相関関係を示している。 $r^2$  は相関係数を示している。

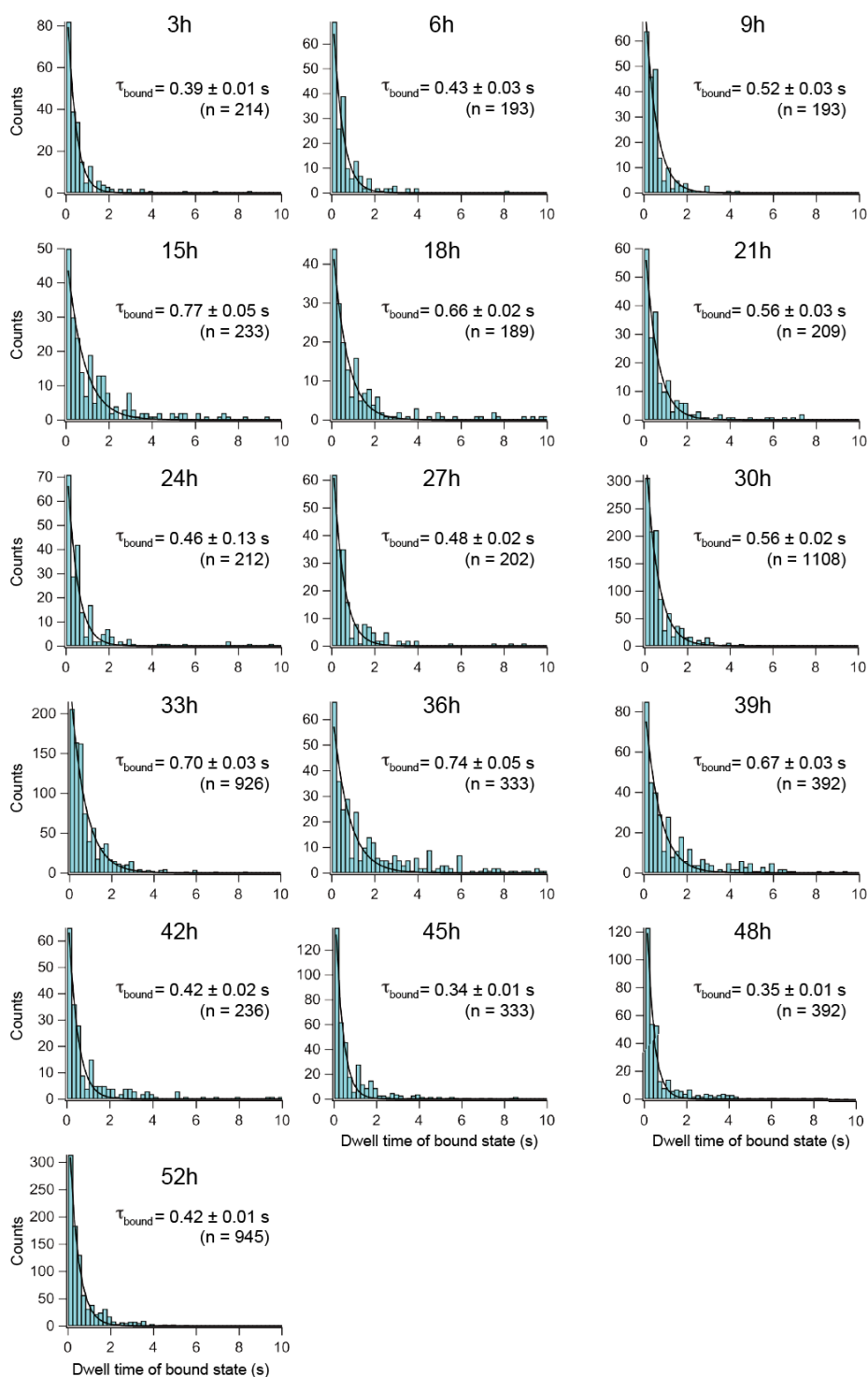


図 3-13 概日周期中に3時間毎に試験管から取り出した KaiC と KaiA の結合時間のヒストグラム。指数関数フィッティング(黒線)によって得られた結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を示す。12 h については観察に失敗したため計測することができなかった。n は計測した KaiA の分子数を示す。

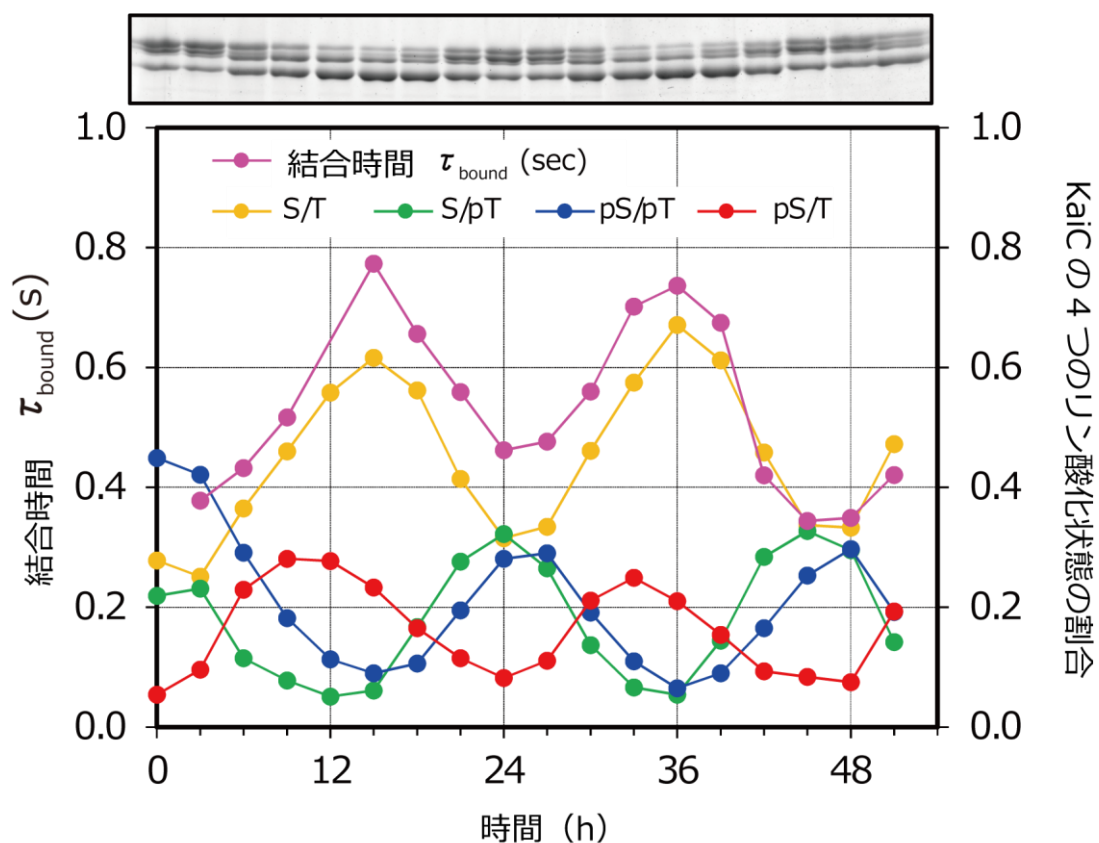


図 3-14 KaiC-KaiA 間の結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  と SDS 電気泳動で測定した KaiC のリン酸化状態。上段に SDS 電気泳動で得られたゲルパターンを示す。高速 AFM 観察から計測した KaiC-KaiA 間の結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  (紫) と、KaiC の 4 つのリン酸化状態 KaiC-S/T (黄色)、KaiC-S/pT (緑)、KaiC-pS/pT (青)、KaiC-pS/T (赤) の割合の時間変化を示している。

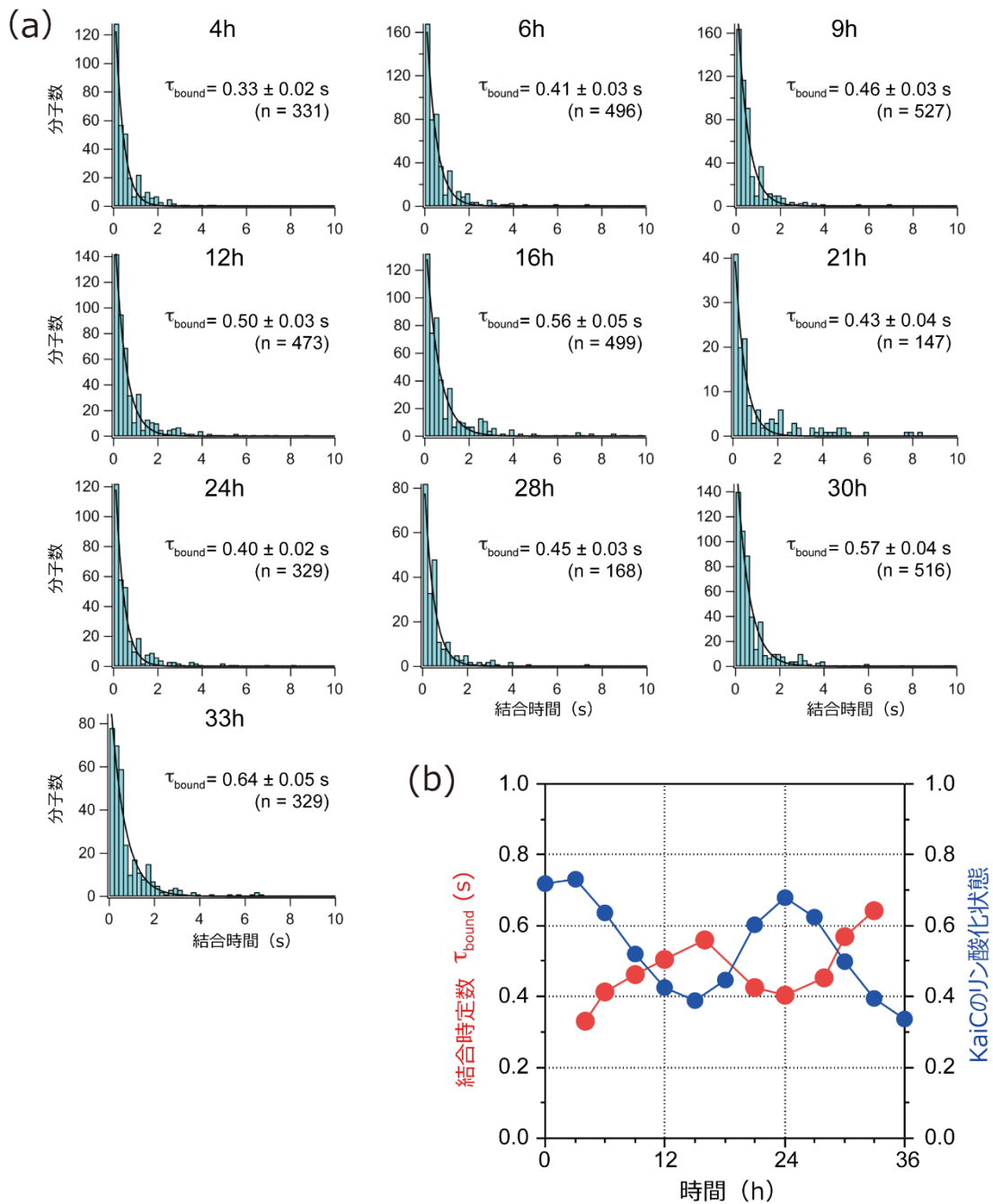


図 3-15 KaiC と KaiA の結合時間のと概日周期の相関。

再現性確認のために行った。(a) 3 時間毎の高速 AFM による計測から得られた結合時間のヒストグラム。指数関数フィッティングによって得られた結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を示す。n は計測した KaiA の分子数を示す。(b) 結合時間  $\tau_{\text{bound}}$  (赤線) と KaiC のリン酸化状態 (青線) の関係。

### 3.3.5 ATPの有無による KaiC-KaiA 間相互作用への影響

上述の高速 AFM 実験は全て ATP が溶液に無い条件で行った。しかしながら、Kai タンパク質の概日リズムには ATP が必須である。そのためこれまでの実験の結果について考察する前に、KaiC-KaiA 間相互作用のリン酸化状態依存性について ATP の有無による影響がないことを確かめた。

ATP 存在下でも KaiC と KaiA の相互作用が ATP 非存在下と同様に KaiC のリン酸化状態に依存して変化するかを確かめるために、リン酸化状態の野生型 KaiC (81%リン酸化) と脱リン酸化状態の野生型 KaiC (27%リン酸化) で実験を行った。2 mM の  $Mg^{2+}$ -ATP 存在下で KaiC 六量体と KaiA の相互作用を高速 AFM で観察を行った(図 3-16)。KaiA と KaiC の結合時定数  $\tau_{bound}$  および解離時定数  $\tau_{unbound}$  を計測したところ、81%リン酸化状態の野生型 KaiC ではそれぞれ  $\tau_{bound} = 0.38 \pm 0.01$  s と  $\tau_{unbound} = 7.62 \pm 0.25$  s であった。同様に 27%リン酸化状態の野生型 KaiC では  $\tau_{bound} = 1.54 \pm 0.03$  s と  $\tau_{unbound} = 5.60 \pm 0.09$  s であった。ATP 非存在下での実験結果と比較するとその差は全て 1 秒以内であり、ATP の有無による影響は無視できると考えられる。さらに、4 つのリン酸化状態変異体(KaiC-DE、KaiC-DA、KaiC-AE、KaiC-AA) についても同様に ATP の有無による影響を検討した(図 3-17)。リン酸化状態が異なる KaiC 変異体と KaiA の結合時定数  $\tau_{bound}$  は、KaiC-DE で  $1.54 \pm 0.03$  s、KaiC-DA で  $1.54 \pm 0.03$  s、KaiC-AE で  $\tau_{bound} = 1.54 \pm 0.03$  s となった。KaiC-AA については ATP 非存在下の時と同様に結合時間が長すぎるために結合時定数を算出することはできなかった。これらの比較を表 3-1 に示す。変異体による結果は ATP の有無にかかわらず結合時定数  $\tau_{bound}$  は 1 割程度しか変化をしておらず、ATP による影響はほとんど無視できると考えられる。一方、野生型の KaiC では最大 2 割程度の変化が出てしまったが、野生型の KaiC はリン酸化状態が安定していないためであると推測され、絶対値の差があるものの KaiC のリン酸化状態に依存して親和性が変化することが確認できた。

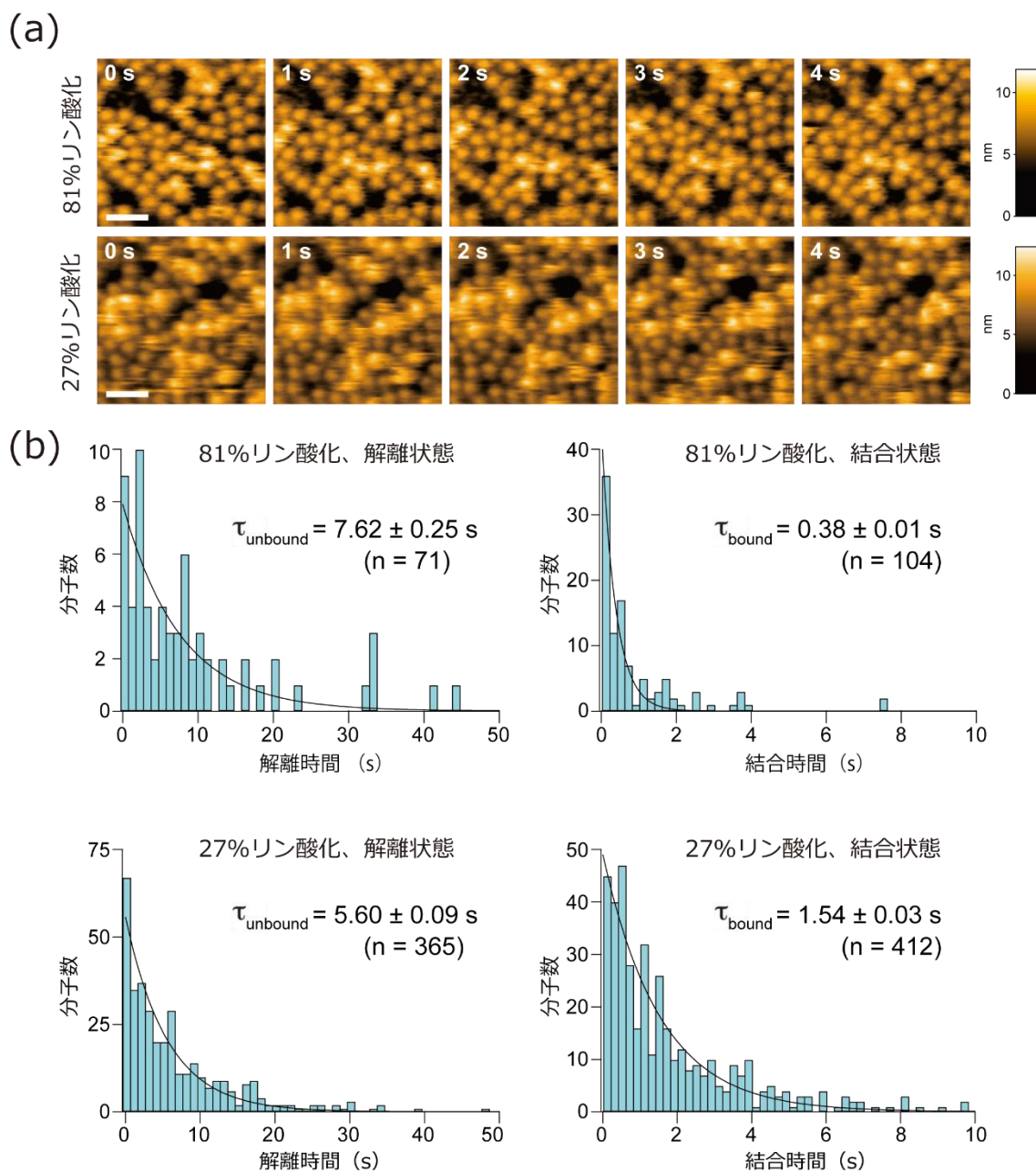


図 3-16 2 mM の  $Mg^{2+}$ -ATP 存在下での 81%および 27%リン酸化状態の野生型 KaiC と KaiA との相互作用。

(a) KaiC 六量体に KaiA が結合している様子的高速 AFM 像 (KaiA の最終濃度は約 0.4  $\mu$ M)。スケールバーは 30 nm。イメージング速度は 1 s/frame (81%) と 1.25 s/frame (27%)。 (b) 0.1 s/frame で 1000 frame 観察した結果から得られたヒストグラム。指数関数フィッティング (黒線) によって結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  と解離時定数  $\tau_{\text{unbound}}$  を算出した。n は計測した KaiA の分子数を示している。



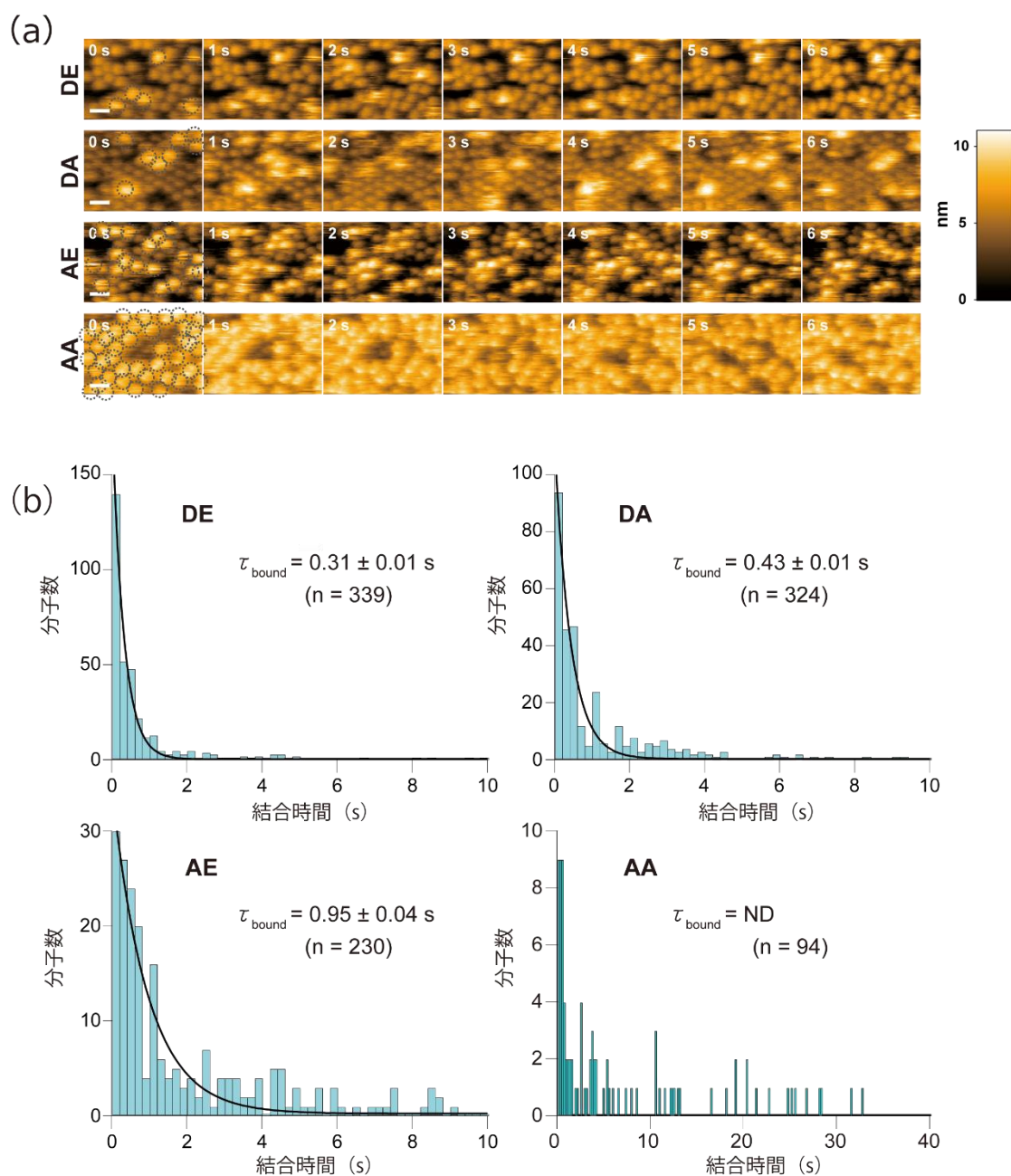


図 3-17 2 mM の  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 存在下での 4 種類のリン酸化状態 KaiC 変異体と KaiA との相互作用。

(a) 上から KaiC-DE、KaiC-DA、KaiC-AE、KaiC-AA に KaiA が結合している様子を示す高速 AFM 像 (KaiA の最終濃度は約  $1 \mu\text{M}$ )。スケールバーは 20 nm。イメージング速度は 1 s/frame。(b) 0.1s/frame での観察結果から得られた結合時間のヒストグラム。指数関数フィッティング (黒線) によって結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を算出した。KaiC-AA については結合時間が長すぎるため解析ができなかったため ND (Not be determined) と表した。n は計測した KaiA の分子数を示している。

表 3-1 野生型および変異体 KaiC と KaiA の結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  と解離時定数  $\tau_{\text{unbound}}$  の ATP の有無による違い。

|                      | ATP 非存在下                  |                             | 2mM Mg <sup>2+</sup> ATP 存在下 |                             |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
|                      | 結合時定数                     | 解離時定数                       | 結合時定数                        | 解離時定数                       |
|                      | $\tau_{\text{bound}}$ (s) | $\tau_{\text{unbound}}$ (s) | $\tau_{\text{bound}}$ (s)    | $\tau_{\text{unbound}}$ (s) |
| 81%リン酸化状態<br>KaiC-WT | 0.44±0.01                 | 7.90±0.19                   | 0.38±0.01                    | 7.62±0.25                   |
| 27%リン酸化状態<br>KaiC-WT | 1.12±0.13                 | 5.47±0.12                   | 1.54±0.03                    | 5.60±0.09                   |
| KaiC-DE              | 0.26±0.05                 | /                           | 0.31±0.01                    | /                           |
| KaiC-DA              | 0.43±0.14                 | /                           | 0.43±0.01                    | /                           |
| KaiC-AE              | 1.0±0.15                  | /                           | 0.95±0.04                    | /                           |
| KaiC-AA              | ND                        | /                           | ND                           | /                           |

### 3.3.6 KaiC の C 末端テイル構造と KaiA の結合に関する検討

KaiA は KaiC の C 末端テイル構造と相互作用すると考えられている[46], [52]。KaC 六量体には 6 本のテイルがあるが、テイルの数と KaiA との結合の関係はこれまで知られていなかった。そこで、テイル構造を形成するアミノ酸残基(490-519 番)を欠損した KaiC- $\Delta$ C と、テイルを持つ KaiC とを混合してテイルの数を変化させた KaiC 六量体と KaiA の結合解離を調べた。

KaiC- $\Delta$ C で六量体を形成し、それをマイカ基板へのアミノシラン処理の有無によって CI リング面もしくは CII リング面を上に向けて高速 AFM 観察しながら、観察バッファー溶液中に KaiA を添加した(最終濃度は約 1  $\mu$ M)。図 3-18 a は KaiC- $\Delta$ C の CI リング面を高速 AFM 観察した像であり、KaiA を添加しても観察像に変化は全く見られず、KaiA は CI リング面とは相互作用しないことが再確認された。CII リング面は KaiC の C 末端テイルが無いので中心に孔の空いたリング構造として観察され、KaiA を観察バッファー溶液に加えると KaiA と思われる輝点が短時間現れて、すぐに解離していく様子が観察された(図 3-18 b)。KaiA は KaiC の C 末端テイルに結合するのでテイルが無いと KaiA は全く結合しないと予想したが、テイルが無い CII リング面でも相互作用することが分かった。しかしながら、KaiC- $\Delta$ C の上に輝点が現れる時間は 0.2 秒以下であり、野生型 KaiC での観察結果に比べると極端に短いことから非特異的に結合していると考えられる。このことから、テイル構造は確かに KaiA との相互作用に寄与しているが、テイルが無くても弱いながら KaiA と相互作用すると考えられる(図 3-19)。KaiC の C 末端テイルは KaiA との特異的な結合に必要であるが、テイル以外の C 末端部位からの静電気力による長距離相互作用で KaiA を引き寄せることで、より効率的な複合体形成を可能にしているのかもしれない。

次に、KaiC 六量体内のテイルを持つ KaiC プロトマーの数を変化させて観察を行い、テイルの本数と KaiA との結合の関係を調べた。KaiA は二量体を形成しており、単量体それぞれに KaiC への結合部位を持っていることが知られている[52]。KaiA 二量体のプロトマーがそれぞれ KaiC のテイル構造に結合すると考えると、KaiC 六量体のうち 2 個のプロトマーにテイルがあれば安定した結合を行えると推測される。KaiC 六量体のテイル本数を制御するために、脱リン酸化変異体 KaiC-AA

とそれの C 末テイル構造を除去した KaiC-AA- $\Delta$ C を混合して、テイル構造を持つプロトマーの数を  
変えた脱リン酸化状態 KaiC 六量体を調製した。ここで、テイルの数が減少することで KaiA との親  
和性が低下し測定が難しくなることを考慮し、KaiA との親和性の高い脱リン酸化変異体 KaiC-AA  
を用いた。KaiC 六量体は ATP を除くと単量体に分解し、ATP を加えることで六量体が再形成され  
る。この性質を利用して KaiC-AA と KaiC-AA- $\Delta$ C の混合比率を変えて六量体を形成した(図  
3-20)。

KaiC-AA と KaiC-AA- $\Delta$ C を混合して得られた KaiC-AA 六量体と KaiA (最終濃度は約 1  $\mu$ M) と  
の相互作用を高速 AFM 観察した結果を図 3-21 に示す。図 3-21 の #1~8 は表 3-2 に示してある、  
KaiC-AA と KaiC-AA- $\Delta$ C の混合比率を変えた試料の番号である。#1 の試料は KaiC 六量体の全  
プロトマーがテイルを持っており、#8 では全プロトマーがテイルを持っていない。#2~7 につい  
てはテイルの数が異なる六量体が混在している(表 3-2)。#1 の試料ではテイル付きの脱リン酸化状  
態にある KaiC 六量体なので、KaiA は KaiC に強く結合している。#2 と #3 ではテイルの数が減少し  
ているが、KaiA は依然 KaiC-AA 六量体の全面を覆うように強く結合し、ほとんど解離しないために  
結合時間を解析することはできなかった(図 3-21)。#2 では約 9 割の六量体が 4 つ以上のテイルを  
持ち、#3 では約 7 割の六量体が 4 つ以上のテイルを持っている。すなわち、六量体中にテイルを  
持つプロトマーが 4 個以上あると全プロトマーがテイルを持つ場合と KaiA との親和性はほとんど変  
わらないことを意味している。次いで、#4 になるとテイルを持つプロトマーが 4 つ以上ある六量体の  
割合は 3 割程度まで減少し、KaiA の KaiC-AA 六量体からの結合と解離の繰り返しが観察される  
ようになった。図 3-22 a に #4~8 の KaiC-AA への KaiA が結合している時間のヒストグラム、図 3-22  
b KaiC-AA と KaiC-AA- $\Delta$ C の混合比率と結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  との関係を示す。テイル数の減少に従  
って結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  が単調に短くなっており、テイルの数と KaiC-KaiA の親和性の関係は明らか  
である。一方、#7 の試料では約 9 割以上の六量体がテイルを持たないか、1 個のプロトマーだけに  
テイルがあるが、それでも KaiA は短時間であるが結合している。このことから、KaiA 二量体のうち  
一つだけでも KaiC 六量体と相互作用できることを示している。一方、#1~3 の試料では KaiA は

KaiC に強固に結合したことから、KaiA は二量体であるが、KaiC 六量体の4つ以上のプロトマーのテイルと相互作用していると考えられる。

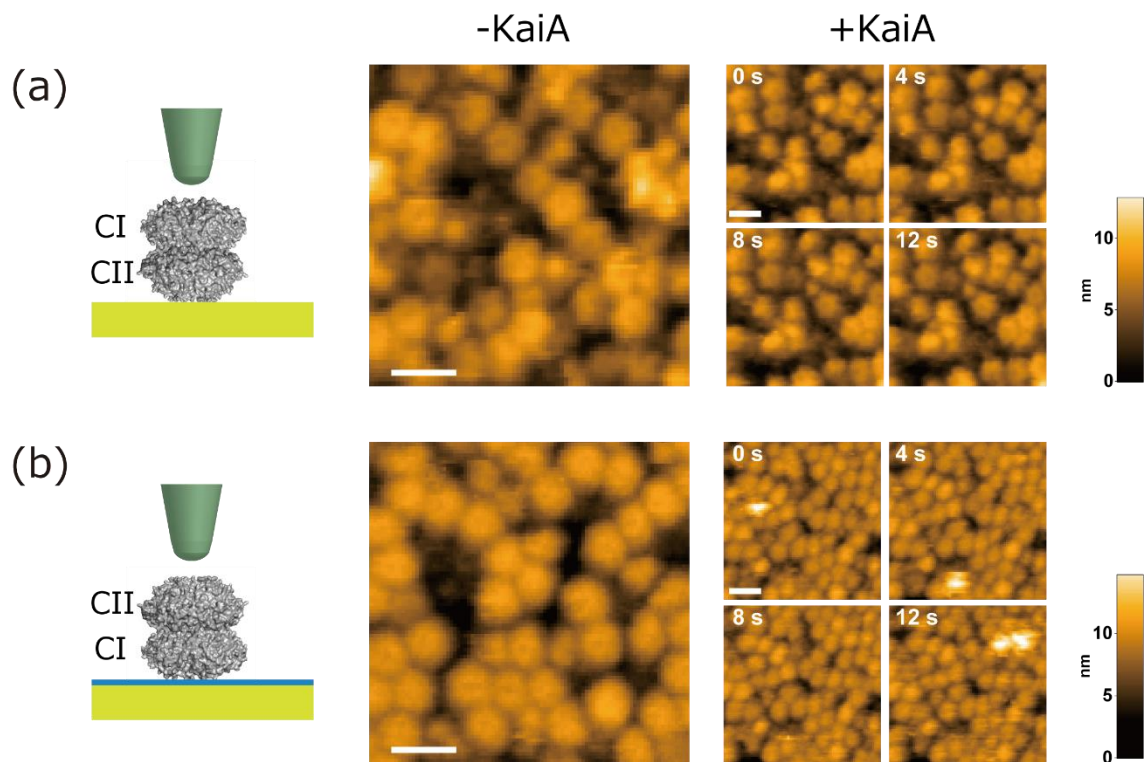


図 3-18 KaiC の C 末端テイル構造(490-519 番アミノ酸残基)を切除した KaiC- $\Delta$ C 六量体と KaiA との相互作用。

(a) CI リング面と (b) CII リング面の観察中に KaiA を添加した(最終濃度は約 1  $\mu$ M)。スケールバーは 15 nm。イメージング速度は 1 s/frame。

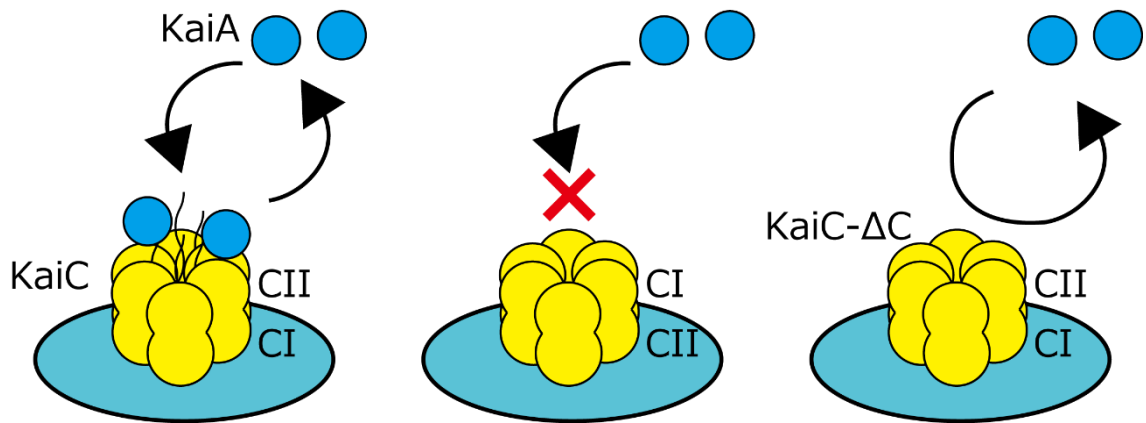


図 3-19 KaiC 六量体と KaiA の相互作用のモデル図。

黄色が KaiC 六量体で青色は KaiA を示している。KaiA は KaiC の CII リング面とは特異的に相互作用するが、CI リング側とは相互作用しない。C 末端テイルがない KaiC- $\Delta$ C 六量体でも非常に弱く相互作用している。

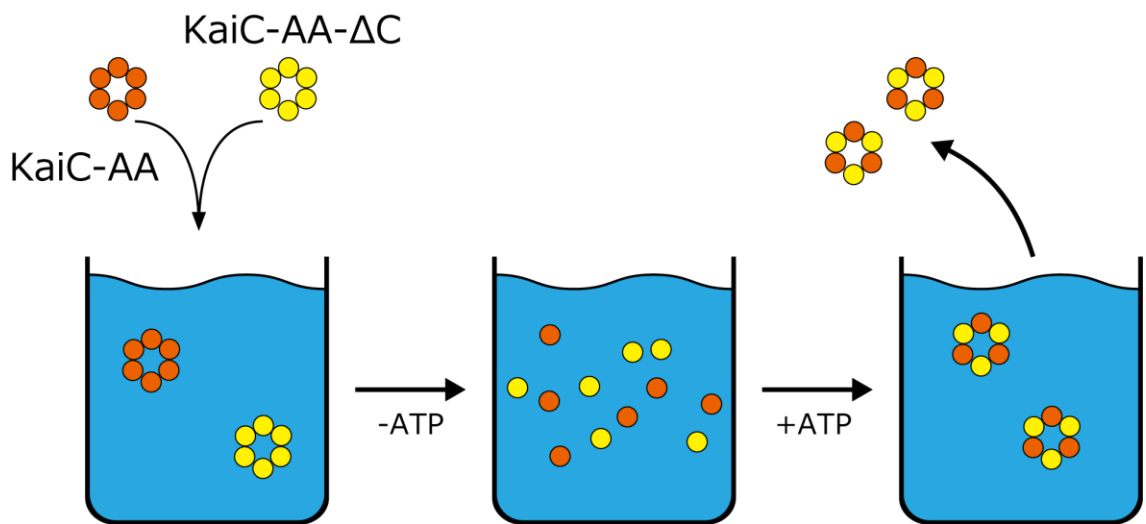


図 3-20 KaiC 六量体内のテイルの数の制御。

(a) Kai-AA と C 末テイルを除去した KaiC-AA- $\Delta$ C 六量体を混合し、ATP を除くことで単量体に分離させる。その後再び ATP を加えることで六量体を形成させることによって、サブユニットを混合させた。赤が KaiC-AA プロトマー、黄色が KaiC-AA- $\Delta$ C プロトマーを示す。

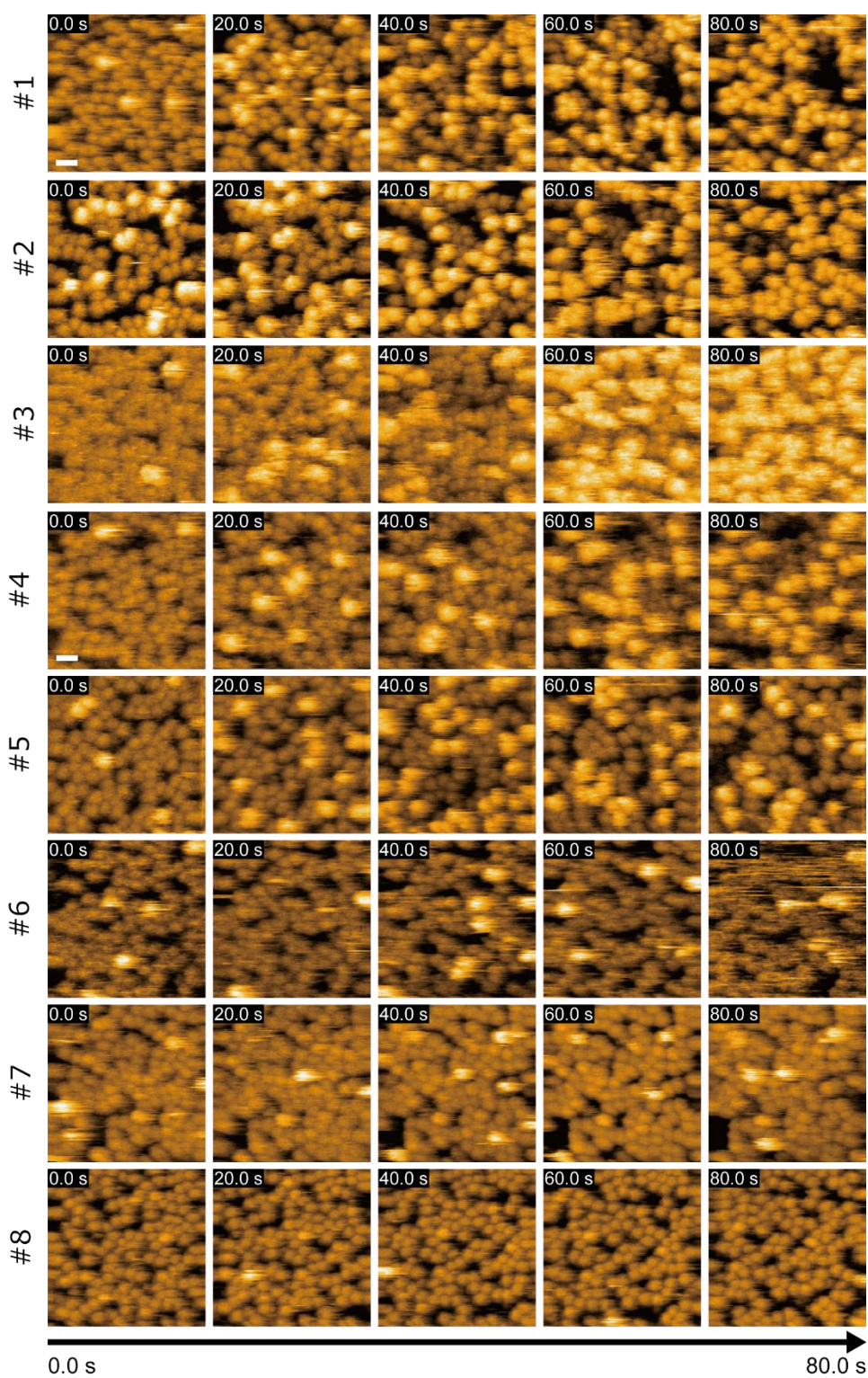


図 3-21 KaiC-AA と KaiC-AA-ΔC を混合した KaiC 六量体の高速 AFM 観察像。

#1-3 では KaiA は KaiC に強く結合し、KaiC 上を覆いつくしている。#4-8 では KaiA は KaiC から結合・解離を繰り返している。スケールバーは 30 nm で観察速度は 1 s/frame。



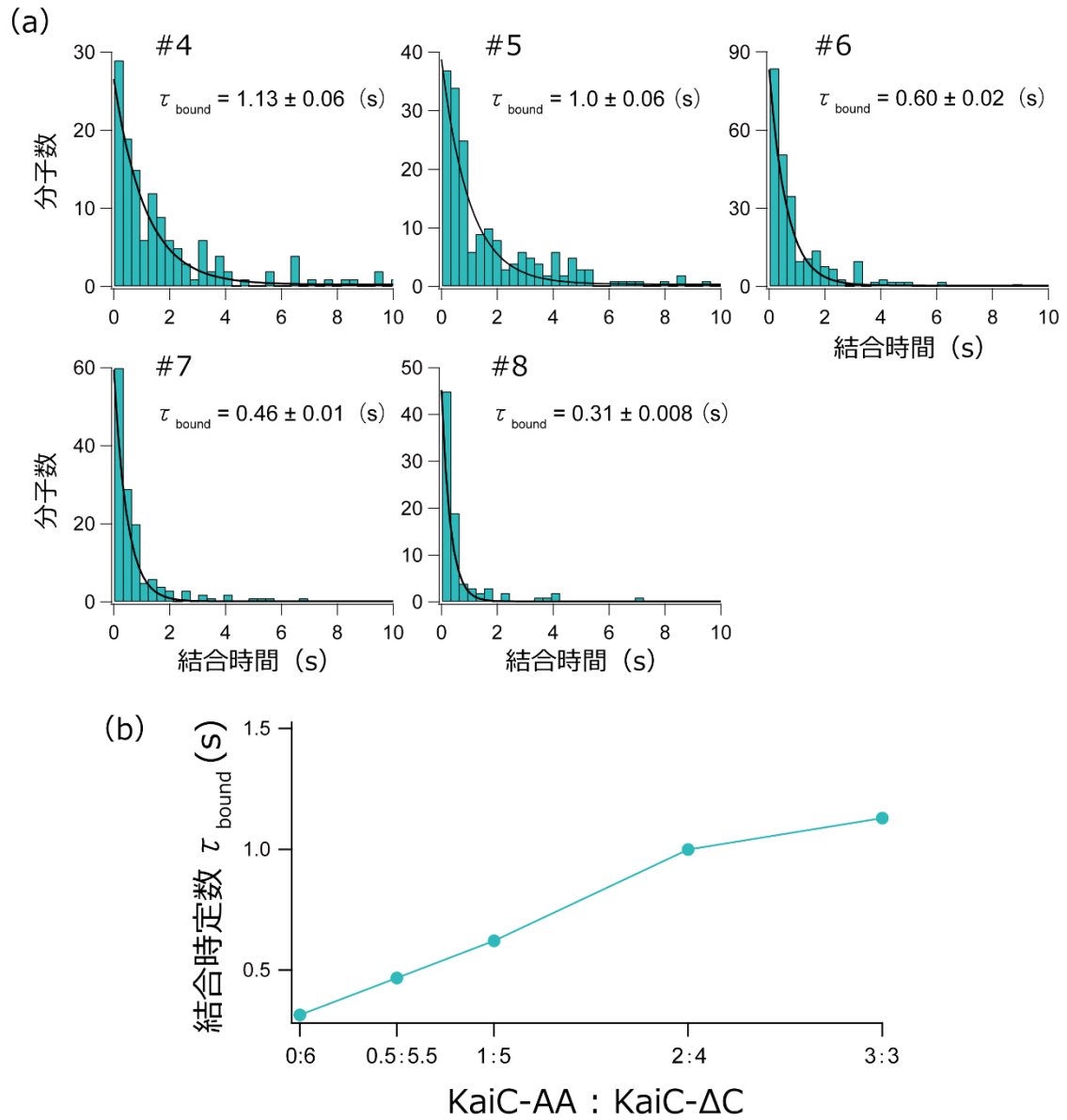


図 3-22 #4-8 の解析結果と結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  と混合比の関係。

(a) #4-8 について 0.1 s/frame での観察から得られたヒストグラム。フィッティングによって得られた結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を示す。また、結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  とテイルの本数との関係を示す (b)。

表 3-2 KaiC-AA と KaiC-AA-ΔC の混合比率とテイル数の異なる六量体の割合。

|                      | #1     | #2       | #3       | #4    |
|----------------------|--------|----------|----------|-------|
| KaiC-AA : KaiC-AA-ΔC | 6:0    | 5:1      | 4:2      | 3:3   |
| テイルが0本の六量体           | 0      | 0.000021 | 0.0014   | 0.016 |
| テイルが1本の六量体           | 0      | 0.00064  | 0.016    | 0.094 |
| テイルが2本の六量体           | 0      | 0.0080   | 0.082    | 0.23  |
| テイルが3本の六量体           | 0      | 0.054    | 0.22     | 0.31  |
| テイルが4本の六量体           | 0      | 0.20     | 0.33     | 0.23  |
| テイルが5本の六量体           | 0      | 0.40     | 0.26     | 0.094 |
| テイルが6本の六量体           | 1      | 0.33     | 0.088    | 0.016 |
| 計                    | 1      | 1        | 1        | 1     |
|                      | #5     | #6       | #7       | #8    |
| KaiC-AA : KaiC-AA-ΔC | 2:4    | 1:5      | 0.5:5.5  | 0:6   |
| テイルが0本の六量体           | 0.088  | 0.33     | 0.59     | 1     |
| テイルが1本の六量体           | 0.26   | 0.40     | 0.32     | 0     |
| テイルが2本の六量体           | 0.33   | 0.20     | 0.074    | 0     |
| テイルが3本の六量体           | 0.22   | 0.054    | 0.0089   | 0     |
| テイルが4本の六量体           | 0.082  | 0.0080   | 0.00060  | 0     |
| テイルが5本の六量体           | 0.016  | 0.00064  | 0.000022 | 0     |
| テイルが6本の六量体           | 0.0014 | 0.000021 | 0        | 0     |
| 計                    | 1      | 1        | 1        | 1     |

### 3.3.7. KaiC-KaiA 相互作用の温度依存性

Kai タンパク質の概日周期における温度補償性の分子機構について、KaiC と KaiA の結合解離の温度依存性を調べることで手掛かりが得られるのではないかと考え、観察バッファー溶液を昇温して KaiC と KaiA の結合解離がどのように変化するかを調べた。

通常の高速 AFM では室温条件でしか観察を行うことができないので、最近開発された昇温高速 AFM システムを用いた[87]。カンチレバーホルダーの溶液プールの底面は変位検出用のレーザーを透過させるためにガラスになっているが、昇温カンチレバーホルダーではこのガラスを ITO (Indium Tin Oxide) で作製されており、ITO への通電で観察溶液を昇温することができる(図 3-23 a)。図 3-23 b にマイカ基板に展開した平面脂質二重膜(ジパルミトイルホスファチジルコリン: DPPC) の高速 AFM 像を示す。室温ではゲル状態で流動性が低いが、ゲル相から液晶相の相転移温度 41°C 付近まで溶液温度を上昇させると膜の流動性が増加し、膜形状が時間とともに変化している(図 3-23 c)。以上の結果から、高速 AFM で室温以上でも安定に試料の表面構造の観察ができることが確認できる。

KaiC のリン酸化状態変異体である KaiC-S431D を APTES-マイカ基板に吸着させて溶液温度を 40°C まで上昇して KaiA (KaiA の最終濃度は約 1.5  $\mu\text{M}$ ) との結合解離を観察した。その後に室温で観察を行い、それらの結果を比較した。40°C でも室温での観察と同様に KaiA が KaiC-S431D の CII リング面に結合解離する様子が見られた(図 3-24 a)。KaiA が KaiC 六量体に結合している時間のヒストグラムを室温と 40°C での測定に対して作成し、指数関数フィッティングにより結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を求めた(図 3-24 b)。結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  は室温と 40°C でそれぞれ  $0.24 \pm 0.02$  s と  $0.22 \pm 0.003$  s で大きな差は見られなかった。しかしながら、KaiA が KaiC に結合する頻度に大きな変化が表れていた。室温条件下では KaiA の KaiC-S431D への結合は 1 秒当たり観察範囲内で 2.76 回観察されたのに対して、40°C では 1 秒当たり 15.4 回となり、5 倍ほど結合頻度が上昇していた。言い換えると、高温では KaiA が KaiC 六量体から解離して再び結合するまでの時間が短くなっている。

次に、脱リン酸化状態の変異体 KaiC-AA と KaiA の結合解離を観察した(図 3-25 a)。室温では

これまでの結果と同様に KaiA は KaiC からほとんど解離しないが、40°Cでは KaiA の結合解離が観察された。KaiA の結合時間のヒストグラムから結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を算出すると  $0.48 \pm 0.02$  s であり (図 3-25 b)、室温に比べると極端に短くなっている。

KaiC は温度が上昇することで自己脱リン酸化する速度が上昇する[34]。概日リズムが温度補償を得るためには、高温での自己脱リン酸化を打ち消すようにリン酸化機能をより活性化する必要がある。今回の実験の結果から、リン酸化状態にある KaiC では、KaiA の結合時間に変化はないが、結合する頻度が大きく上昇していた。このことから、高温では KaiA が KaiC に結合しているトータル時間は長くなっていることになり、これにより結果的に KaiA による KaiC のリン酸化が促進され、脱リン酸化とリン酸化がバランスしている可能性がある。一方で脱リン酸化状態の KaiC では、KaiA の結合時間は短くなっており、これは KaiC のリン酸化を妨げるように働くので、この結果の合理的な説明は今のところできない。概日周期には KaiB との相互作用も関係するので、将来的には三者複合体の形成過程の温度依存性を明らかにする必要がある。

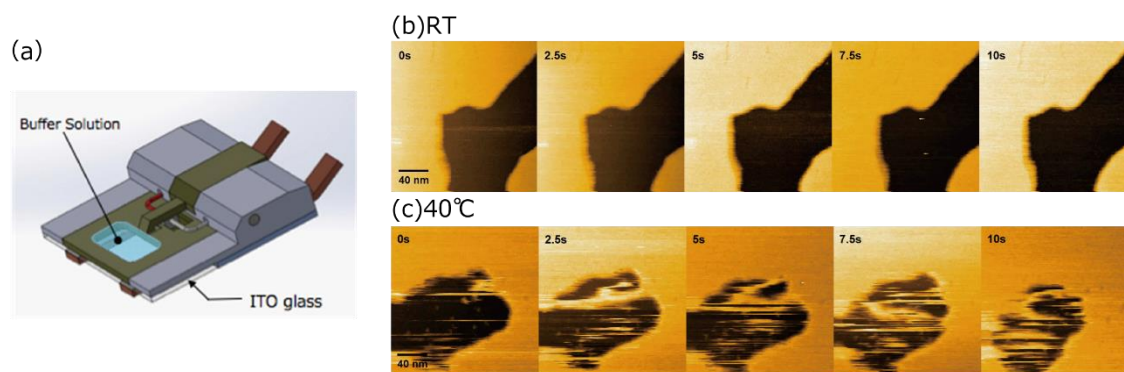


図 3-23 昇温カンチレバーと脂質膜の高速 AFM 観察。

(a) 温度制御カンチレバーホルダーの構成。(b) 室温で測定された脂質二重膜(ジパルミトイルホスファチジルコリン: DPPC)の高速 AFM 像。(c) 40°Cでの観察した脂質二重膜。DPPC のゲル相から液晶相への相転移温度は 41°Cであり、40°Cでは流動性が高くなっている様子がわかる。スケールバーは 40 nm。イメージング速度は 0.5 s/frame。

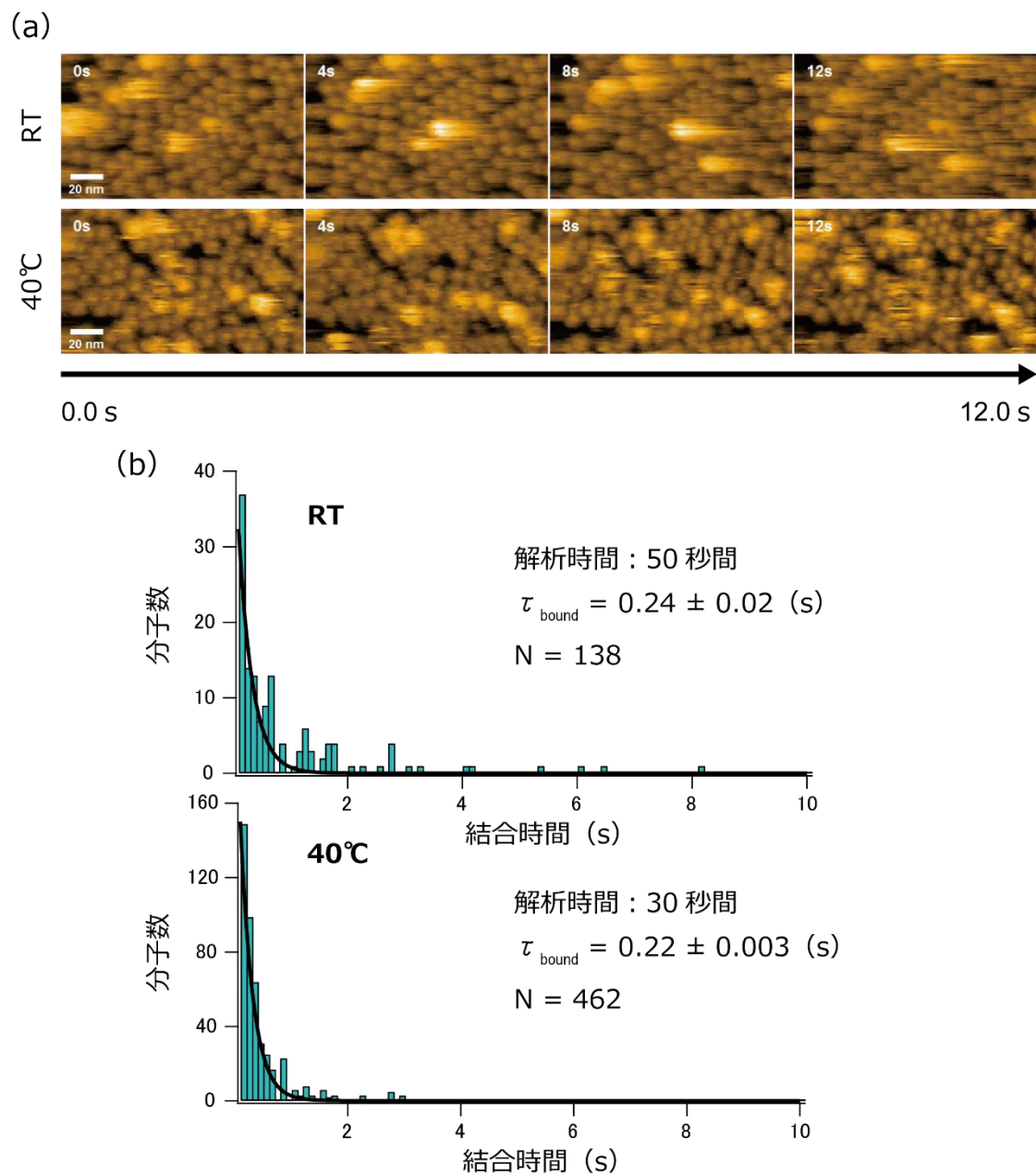


図 3-24 室温と高温におけるリン酸化変異体 KaiC-S431D と KaiA の相互作用。

(a)室温および 40°Cの溶液温度で KaiC-S431D の CII リング面に KaiA(最終濃度は約 1  $\mu\text{M}$ )が結合解離している様子。スケールバーは 20 nm。イメージング速度は 0.1 s/frame。(b) KaiA が KaiC 六量体に結合している時間のヒストグラム。指数関数フィッティングによって結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  を得た。n は測定した KaiA の分子数を示している。

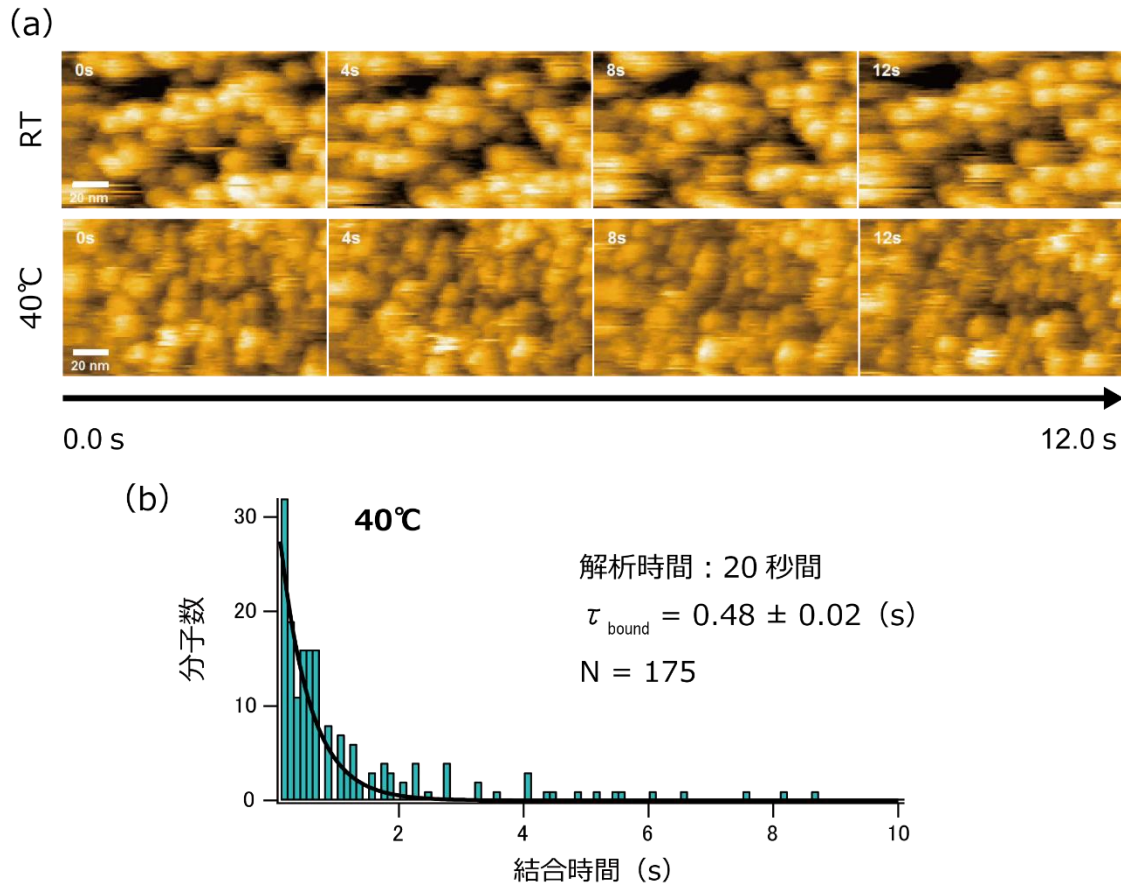


図 3-25 室温と高温における脱リン酸化変異体 KaiC-AA と KaiA の相互作用。

(a)室温および 40°Cの溶液温度で KaiC-AA の CIIリング面に KaiA(最終濃度は約 1.5  $\mu\text{M}$ )が結合解離している様子。スケールバーは 20 nm。イメージング速度は 0.1 s/frame。(b)40°Cでの KaiA が KaiC-AA に結合している時間のヒストグラム。指数関数フィッティングによって結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$ を得た。n は測定した KaiA の分子数を示している。室温条件ででは KaiA が KaiC-AA からほとんど乖離しないので解析不可能であった。

### 3.4 KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体の観察

3.2 節の結果から KaiB はリン酸化状態にある KaiC 六量体の CI リング面にモノマー状態で結合することが明らかになった。KaiB は KaiA の機能を阻害して KaiC の脱リン酸化を促すことから、単純にリン酸化状態の KaiC に結合した KaiB によって KaiA がトラップされることで、KaiA の CI リング面への結合を阻害しているのではないかと考えられる (図 3-26 a)。これを確認するために三者複合体の高速 AFM 観察を行った。

リン酸化状態変異体 KaiC-S431D をマイカ基板上で CI リング面を上に向けて吸着させ、その上に KaiB の活性型変異体である KaiB-G88A/D90R 溶液 (濃度は約 20  $\mu\text{M}$ ) をのせて 3 分間インキュベートして KaiC-KaiB 複合体を形成させた。その後、高速 AFM 観察の観察バッファー溶液内に KaiA を添加 (最終濃度は約 1.5  $\mu\text{M}$ ) して観察を行った。

KaiB は KaiC の CII リング面で KaiC プロトマーにモノマーで結合し、リング状として観察されるが、KaiA が溶液中に存在する場合にはサイズの異なる 2 種類のリング構造が観察された (図 3-26 b)。図 3-26 b の実線で囲ったリング構造は KaiC-KaiB 複合体の構造と同じサイズであり、かつ、実線で囲ったサイズの大きなリング構造は KaiA が溶液中に無い場合は観察されなかった。このことから、サイズの大きなリングは KaiC-KaiB 複合体リング上にさらに KaiA 二量体が KaiB と結合していると思われる。実際、観察中に AFM プローブからの荷重を増加させると、大きなリング構造が壊れてその下に KaiC-KaiB 複合体リング構造が現れる (図 3-26 c)。さらに、KaiC-KaiB 複合体のリング構造の一部に KaiA 二量体と思われる輝点が結合解離する様子も観察された (図 3-26 d)。これらの結果から、KaiC-KaiB 複合体の KaiB に KaiA が結合することで三者複合体を形成している可能性が示された。最近になって、X 線結晶構造解析[51]や電子顕微鏡[56]で三者複合体の構造が解かれ、高速 AFM で観察された三者複合体の構造が正しいことが確認された。

三者複合体の構造から、リン酸化状態にある KaiC 六量体に KaiB が結合し、その KaiB にさらに KaiA が結合することで、溶液中にある自由な KaiA の濃度が実効的に減少し、KaiC の CII リング面に結合できる KaiA の数が減り KaiC の自己リン酸化機能の活性化が阻害されると考えられる。



試験管内で概日リズムを再構成する際に KaiA の濃度を高くすると脱リン酸化が起こらず、リン酸化し続ける[88]という事実も、KaiB が KaiA の KaiC への結合を直接阻害しているのではなく自由な KaiA の数を制御している分子機構を支持する。

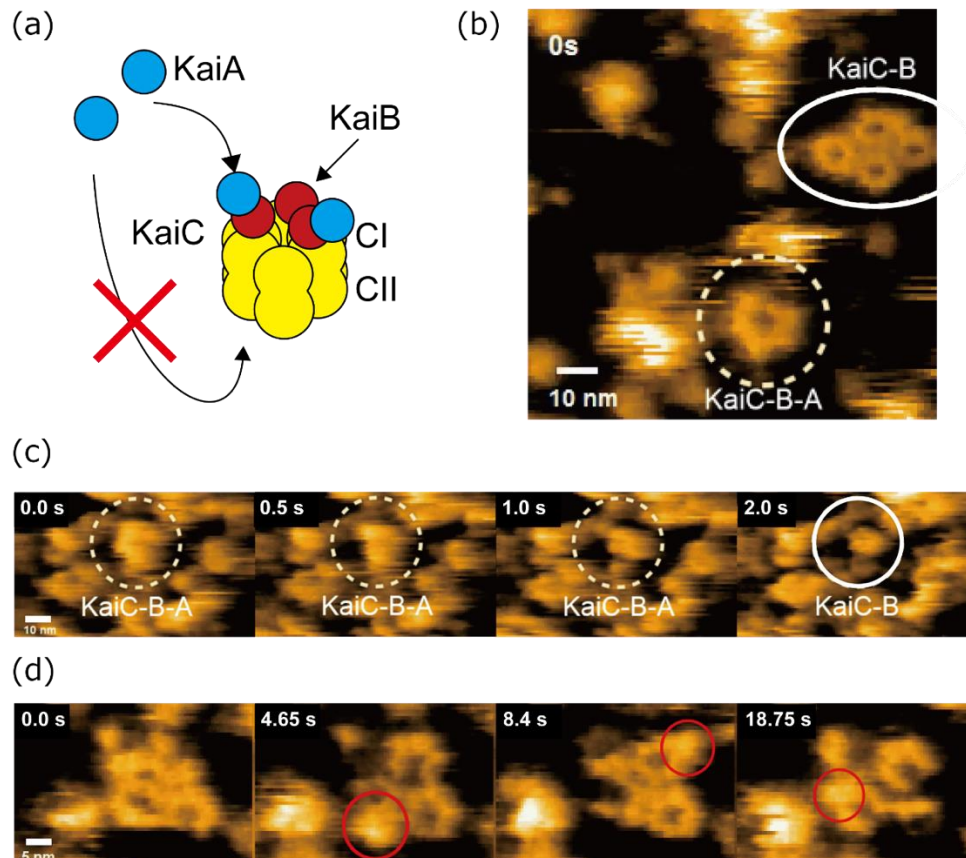


図 3-26 KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体の観察。

(a) KaiB が KaiA を非活性化する分子機構のモデル。KaiC-KaiB 複合体が KaiA を捕らえることで KaiA が CII リング側に結合できなくなり、KaiC の自己リン酸化機能を阻害する。(b-d) KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体の AFM 観察像 (KaiA の最終濃度は約  $1.5 \mu\text{M}$ )。 (b) 実線円内は KaiC-KaiB 複合体で、破線で円内の一回りサイズが大きなき KaiC-KaiB-KaiA 複合体に相当する。スケールバーは 10 nm。 (c) 高速 AFM 観察中に AFM 探針からの荷重を増加させると KaiA が外れて KaiC-KaiB 複合体のリング構造が現れる。スケールバーは 10 nm。イメージング速度は 0.1 s/frame。 (d) KaiC-KaiB 複合体リングに KaiA 二量体が結合する様子。スケールバーは 5 nm。イメージング速度は 0.15 s/frame。

### 3.5 概日周期と Kai タンパク質複合体の関係

これまでの結果をまとめると、Kai タンパク質の概日リズムと Kai タンパク質の複合体形成の関係は次のようになる(図 3-27)。脱リン酸化状態の KaiC-S/T の CII リング面の C 末端テイルに KaiA が強く結合し、KaiC の自己リン酸化機能が活性化する。これにより、KaiC の T432 のリン酸化が進行し KaiC-S/pT となる。次に、KaiC の S431 がリン酸化されることで KaiC のリン酸化が完了し KaiC-pS/pT へと移行する。KaiC のリン酸化の進行に伴い、KaiA と KaiC との親和性が低下して、結合と解離を短時間で繰り返すようになる。KaiA の結合時間が短くなることで KaiC の脱リン酸化が進行し、T432 の脱リン酸化が起こる。その結果、KaiC-pS/T の CI リング面に KaiB 単量体が結合し、さらに、KaiB に KaiA が結合して三者複合体を形成する。これによって KaiC の自己リン酸化機能を活性化させる自由な KaiA の数が減少し、KaiC の自己脱リン酸化がさらに進行する。最終的に S432 と T432 の両方が脱リン酸化した KaiC-S/T となり、CI リング面に結合していた KaiB が解離し、同時に捕らえていた KaiA を自由にする。それによって、KaiC の CII リング面に結合できる KaiA の濃度が増加し、KaiC-S/T はリン酸化過程へと移行する。このようにして、Kai タンパク質による概日リズムは複合体形成によって制御されていると考えられる。

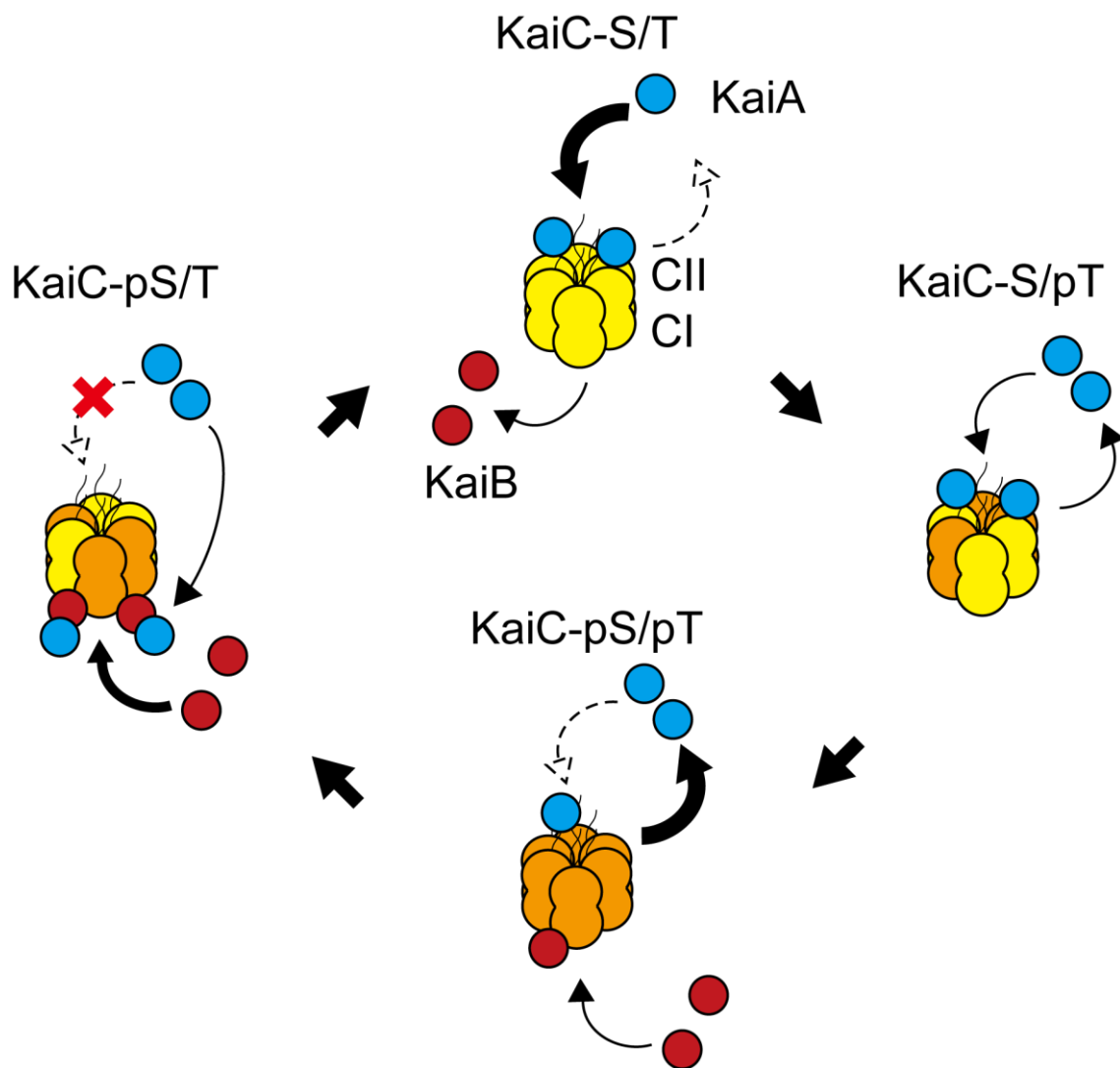


図 3-27 KaiC のリン酸化状態の遷移と複合体形成のモデル。

青丸が KaiA、赤丸が KaiB を示している。矢印の太さで KaiA と KaiC 間の親和性の強さを表している。p は S431 残基もしくは T432 残基がリン酸化していることを表す。KaiC-S/T に KaiA が強く結合し、リン酸化を促進する。リン酸化が進行し、KaiC-pS/pT になると、KaiA の KaiC への親和性は弱くなり結合・解離を繰り返す。KaiB が結合し始め、KaiC-pS/T へと脱リン酸化すると、KaiC-KaiB 複合体を形成し、KaiA を捉えることで KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体を形成する。これによって KaiA は KaiC の CII リング側に結合することができなくなり、リン酸化を促進できなくなる。KaiC は自己脱リン酸化活性によって KaiC-S/T へと遷移する。KaiC-S/T から KaiB が解離し、KaiA が自由になることで再び KaiC のリン酸化を促進する。

### 3.6 まとめ

高速 AFM 観察によって Kai タンパク質の複合体形成過程を単分子レベルで可視化することに成功した。マイカ基板のアミノシラン修飾の有無によって KaiC 六量体リングの観察面を選択できた。KaiA もしくは KaiB を観察バッファー溶液へ添加すると、KaiA は KaiC の CII リング側 (C 末端側) に、KaiB は KaiC の CI (N 末端側) に結合する様子が観察された。これらの結合を詳しく観察すると、KaiB は KaiC 六量体のプロトマーひとつずつに協同的に結合していることがわかった。さらに、KaiB-G88A/D90R (KaiC 結合型の KaiB) を用いた観察では野生型 KaiB と比較して容易に KaiC 結合することが確認できた。また、KaiC の自己脱リン酸化中に数時間おきに KaiB との結合を観察することによって KaiC-KaiB 間相互作用のリン酸化状態依存性を解析することで、KaiB は KaiC-pS/T に強く結合しており、先行研究と同様に KaiC-pS/T に KaiB が結合することで KaiC が脱リン酸化過程に移行することが示唆された。

一方、KaiA は、これまで KaiC との結合は静的であると考えられていたが、高速 AFM による観察によって結合・解離を繰り返す動的な相互作用であることが明らかになった。KaiC-KaiA 間相互作用について解析を進めると、この結合・解離の時間、すなわち KaiC-KaiA 間の親和性は KaiC のリン酸化状態によって変化していた。これまで数理シミュレーションモデルで推測されていた PDDA が存在することを実験的に裏付けることができた。また、KaiC の C 末端テイルと KaiA の結合の関係を調べたところ、KaiA は KaiC のテイル構造へ結合していることが確認され、テイルの数によって結合の安定性が変化することがわかった。さらに、温度補償性について明らかにするために KaiC-KaiA 間相互作用を高温条件下 (約 40°C) で観察したところ、KaiA が KaiC に結合する頻度が室温よりも増加することが明らかとなったが、残念ながら現状ではこの変化が温度補償性にどのように関与しているかは明確でない。

KaiC-KaiB 複合体を観察中に KaiA を添加して高速 AFM 観察を行うことで、KaiC-KaiB-KaiA の三者複合体の観察に成功した。この結果から、KaiB は KaiC-KaiB 複合体を形成したのちに、KaiB に KaiA が結合することで、KaiA が KaiC の CII リング面に結合することを阻害し、KaiC の自己脱リ

ン酸化が促進されると推測される。これらの結果から Kai タンパク質の複合体形成と概日リズムの関係についてモデルを提示した。KaiC は KaiA と結合・解離を繰り返しながらリン酸化していき、完全にリン酸化した KaiC では結合時間が短くなる。それによって KaiC は脱リン酸化し、KaiC-pS/T へと遷移する。KaiC-pS/T へ KaiB が協同的に結合することで KaiC 全体に安定して KaiB の安定な結合が起こる。その後、KaiA を捉えることで KaiC の自己脱リン酸化を促す。脱リン酸化した KaiC からは KaiB が解離し、同時に KaiA が再び KaiC の CII リング面に結合できるようになり、KaiC のリン酸化が促進される。この複合体形成によって Kai タンパク質の概日リズムが成立していると考えられる。

## 第4章 数値シミュレーションによる概日リズムの

### 頑強性に関する検討

KaiC のリン酸化状態に依存した KaiC と KaiA の親和性の変化 (PDDA) は、van Zon らの数値シミュレーションモデルで既に提唱され[45]、親和性の変化によって KaiC 分子間のリン酸化状態の同調が起こり、それにより概日リズムが安定化されると結論されていた。今回、高速 AFM 観察でも KaiC のリン酸化状態に依存して KaiA との親和性が変化する結果が得られたが、リン酸化状態に依存した結合時定数の変化は秒スケールであり、約 24 時間という概日周期の時間スケールに比べて圧倒的に短い事象である。しかしながら、van Zon モデルでは KaiC と KaiA が秒スケールでダイナミックに結合解離する事実は想定されていなかった。今回実験によって得られたパラメータをもとに数値シミュレーションを行うことで、PDDA が概日リズムの安定性に本当に寄与しているのか、寄与していないとしたら PDDA が概日リズムにとってどのような効果があるのかを調べるために、実験で得られたパラメータを取り込んだ数値シミュレーションを行った。

なお、数値シミュレーションは共同研究者である Spring Hill 大学の Mark Byrne 准教授が設計し、同氏と Vanderbilt 大学の盛徹也博士によって筆者と議論しながら行われた。

#### 4.1 リン酸化サイトの数を考慮しない単純なモデル

最初に PDDA の効果について確認するために、van Zon らのモデル(図 4-1)[45]を基にして、KaiC のリン酸化状態について簡略化したモデルで数値シミュレーションを行った。

2007 年に報告された彼らのモデルでは KaiC のプロトマーにはリン酸化状態と脱リン酸化状態の二つの状態しか存在しないとされていたが、現在では KaiC は単量体当たり 2 つのリン酸化サイトが存在するため 4 つのリン酸化状態をとり、KaiC 六量体では  $4 \times 6$  の計 24 状態をとり得る[41], [42]。しかしながら、本研究ではまず従来のモデルと同様にプロトマーごとのリン酸化サイトの数を考慮せず、リン酸化状態が 2 つであると仮定した単純なモデルを使った。

KaiC 六量体でリン酸化しているプロトマーの数は 0 から 6 個あるので、計 7 つのリン酸化状態が

存在し( $C_j$ ;  $j$  は状態係数であり 0~6 の範囲をとる、図 4-2 a)、その数に依存して KaiA との親和性  
 が変動すると仮定する。また、KaiC 六量体と KaiA 二量体は単純に 1:1 で結合すると仮定している。  
 単純化のために非活性化( $f_i$ )、活性化( $b_i$ )、リン酸化( $k_{ps}$ )、脱リン酸化( $k_{dps}$ )の速度は全て  $1.0 \text{ hr}^{-1}$   
 とし、KaiC と KaiA 間の解離速度定数と結合速度定数を計算する(図 4-2 b)。KaiC と KaiA の解離  
 速度定数は  $k_j^{Ab} = k^{ab} \alpha^j \text{ (hr}^{-1}\text{)}$  で表し、 $\alpha$  は PDDA の度合いを表す定数である。ここで、最も解離速  
 度が遅い状態である  $k^{Ab}$  を  $0.1 \text{ hr}^{-1}$  とする。 $\alpha = 1$  のとき KaiC のリン酸化状態による解離速度定数は  
 一定になり、 $\alpha > 1$  のときは KaiA の解離速度定数は KaiC 六量体のプロトマーがリン酸化するごと  
 に  $\alpha$  のべき乗に比例して大きくなる。他方、KaiC-KaiA 複合体を形成する結合速度定数は  $k_{A+} \equiv$   
 $k^{Af} [C_0] \text{ (hr}^{-1} \text{ M)}$  と定義した。 $[C_0]$  は KaiC の初期濃度であり、KaiA の初期濃度  $[A_0]$  は  $[A_0]/[C_0] =$   
 $0.25$  とし、シミュレーション開始時に複合体は形成していないものとしている。

脱リン酸化過程で KaiC がサブユニット交換するモデル[65]を使って、KaiC-KaiA 間の結合・解  
 離の速度定数を、 $k^{Af}$  と  $\alpha$  を変化させてシミュレーションを行った結果、KaiC のリン酸化状態は  
 PDDA の効果が弱い場合( $\alpha = 1\sim 2$ )、強い場合( $\alpha = 4$ )共に発振しない(図 4-2 c)。PDDA の効果  
 が強い( $\alpha = 4$ )場合は、KaiC 六量体の 1-3 個のプロトマーがリン酸化すると KaiA が KaiC から解離  
 し、それ以上のリン酸化が進行しないためである( $j = 4\sim 6$  の KaiC に KaiA が結合する可能性が低  
 すぎる)。この結果から PDDA によって KaiC のリン酸化状態が同期するためには  $\alpha = 3$  程度の値  
 が必要で、つまり発振するためには KaiC-KaiA 間の親和性が  $3^0\sim 3^6$  (729) 倍程度の範囲で変化  
 する必要があることがわかる。



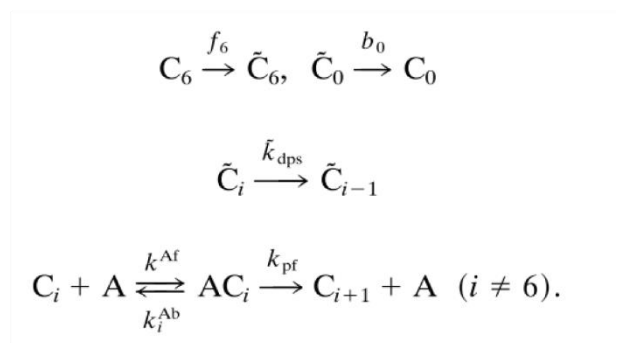
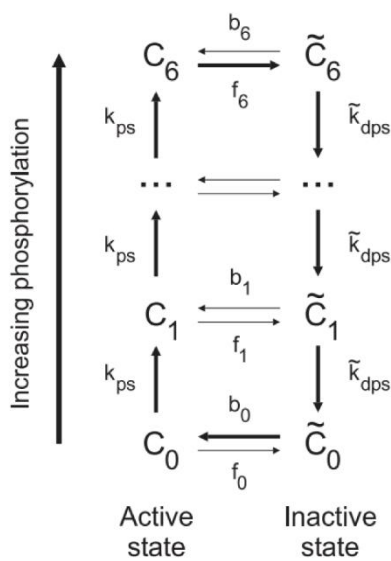


図 4-1 van Zon らによる KaiC-KaiA 間の親和性が変化するモデル[45]。

KaiC が 0-6 のリン酸化状態によって 7 つの状態をとり、活性化状態の KaiC は  $k_{ps}$  の速度定数でリン酸化し、非活性化状態の KaiC は  $k_{dps}$  で脱リン酸化する。また、リン酸化には KaiC-KaiA 複合体を形成している必要がある。KaiC と KaiA の結合速度は  $k^{Af}$ 、解離速度は  $k_i^{Ab}$  である。KaiC は速度定数  $f_i$  で非活性化し  $b_i$  で活性化する。  $C_i$  と  $\tilde{C}_i$  はそれぞれリン酸化機能が活性と非活性の KaiC 六量体に対応する。  $i$  は KaiC 六量体内にあるリン酸化状態のプロトマーの数で、  $A$  は自由な KaiA、  $AC$  は KaiC-KaiA 複合体を示している。

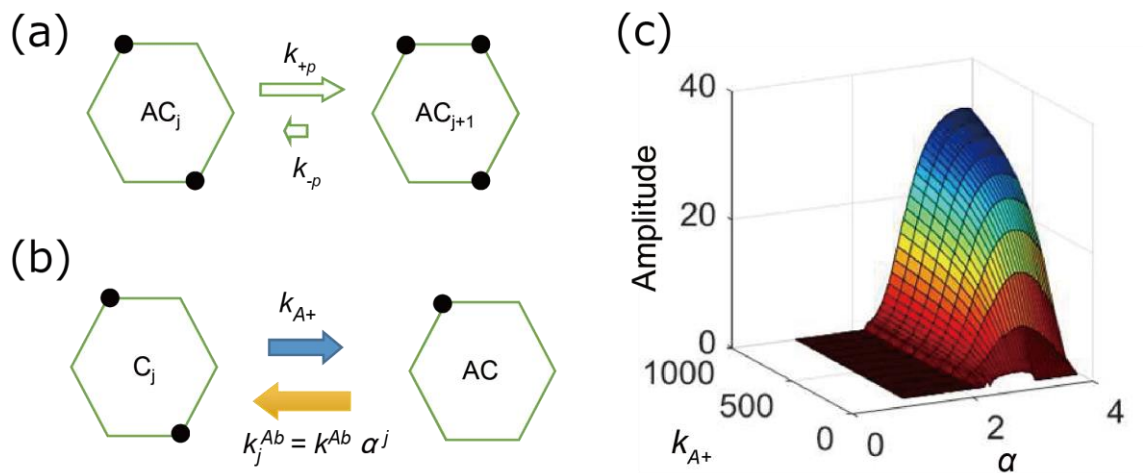


図 4-2 KaiC のプロトマーにリン酸化部位が一つずつ存在する単純なモデルによるシミュレーション。

(a)  $C_j$  はリン酸化状態のプロトマーが  $j$  個ある KaiC 六量体を示す。KaiC-KaiA 複合体が速度定数  $k_{+p}$  でリン酸化し  $k_{-p}$  で脱リン酸化する。(b) KaiC-KaiA 間の親和性が変化するモデル。 $k_{A+}$  は KaiC と KaiA の結合速度定数。 $\alpha^j$  に比例して KaiA が KaiC から解離する速度定数  $k_j^{Ab}$  が変化する。つまり、KaiC のリン酸化プロトマーの数で  $\alpha$  のべき乗で解離速度定数が増加する。(c) KaiC リン酸化状態の振動振幅の  $k_{A+}$  および  $\alpha$  に対する変化を示し、振幅がゼロは概日発振していないことを意味している。

## 4.2 KaiC プロトマーごとのリン酸化サイトを考慮したモデル

KaiC のプロトマーごとにリン酸化部位が 2 つ (S431、T432) 存在することを考慮し、KaiC がリン酸化状態を遷移する確率と Kai タンパク質が結合・解離する確率に対してモンテカルロ法を適用することで PDDA の効果を調べた。この際、KaiC プロトマーは  $U = S/T$ 、 $T = S/pT$ 、 $D = pS/pT$ 、 $S = pS/T$  のいずれかの状態をとりえる。各リン酸化状態間の遷移確率は先行研究の結果を基に表 4-1 の数値を用いた[41]。また、脱リン酸化過程で KaiC 六量体間をサブユニット交換[36], [44], [66]させ、その頻度は特に記載がない限り  $1 \text{ hr}^{-1}$  とした。

高速 AFM から明らかになったように KaiC と KaiA は秒スケールで結合解離を繰り返しており概日周期に比べて非常に速い。一方、数値シミュレーションは 6 分間のステップで計算を実行しており、計算時に KaiC に結合している KaiA が全てリン酸化に寄与してしまうために、KaiC のリン酸化が過剰になる。そのためにリン酸化状態を促進することができる安定した KaiC-KaiA 複合体を形成できる割合の最大値を次式で制限した。

$$x^* = \frac{1}{2}(b \pm \sqrt{b^2 - 4a_0}) \quad (4-1)$$

ここで、 $b = 1 + a_0 + k_d$  で表される。 $a_0 = [A_0]/[C_0]$  で定義され、 $[A_0]$  と  $[C_0]$  はそれぞれ KaiA と KaiC の初期濃度である。 $k_d$  は KaiC-KaiA 間の解離定数で、親和性が KaiC 六量体内の各プロトマーのリン酸化状態によって変化するように次式のように定義した。

$$k_d = k_{d0} + c(\gamma_1 N(T) + \gamma_2 N(D) + \gamma_3 N(S)) \quad (4-2)$$

ここで、 $N(T)$ 、 $N(D)$ 、 $N(S)$  はそれぞれ KaiC-S/pT、KaiC-pS/pT、KaiC-pS/T 状態のプロトマー数を示しており、 $N(T) + N(D) + N(S) < 6$  になる。 $\gamma_n$  はそれぞれのリン酸化状態にある KaiC と KaiA の解離速度定数の比で、リン酸化状態を模倣した KaiC 変異体を用いた高速 AFM 観察で得られた結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  の比から  $\gamma_1 : \gamma_2 : \gamma_3 = 1.0 : 3.9 : 2.3$  を用いた。 $k_{d0}$  は完全脱リン酸化状態の解離速

度定数になる。KaiC-AA を用いた高速 AFM 観察では結合時定数  $\tau_{\text{bound}}$  は計測不可能なほど結合時間が長かったので、 $k_{d0} = 0.01 \text{ s}^{-1}$  と仮定した。c は PDDA の度合いを調整する因子であり、c = 0 の場合 KaiC-KaiA 間の親和性は一定 ( $k_d = k_{d0}$ ) となるため-PDDA (PDDA を考慮しないこと) になる。全ての N が 0 の際に最も強い親和性 (完全に脱リン酸化した KaiC) を示し、そこから N (リン酸化したプロトマー) が増加するごとに KaiC-KaiA 間の親和性が弱くなる。 $k_d$  の最大値は約  $20c$  となり、先行研究[41][44]によって全ての KaiC 六量体の解離定数の平均値  $K_D$  が  $1 \sim 3 \mu\text{M}$  であることから  $c < 0.05$  と考えられ、生化学実験による KaiC のリン酸化・脱リン酸化の速度を再現する先行研究によるモデル[41] (図 4-3 a) との比較から  $c = 0.025$  と仮定した。また、各リン酸化状態間の遷移確率は表 4-2 の数値を用いた。これらのパラメータを用いて KaiA との相互作用の有無による KaiC のリン酸化と脱リン酸化の時間変化をシミュレーションした (図 4-3 b)。ここで、KaiC 六量体の総量は  $N = 1000$  で KaiC と KaiA の濃度は  $A_2 / C_6 = 1.15$  を用いた。PDDA を考慮していないシミュレーション (c = 0) 結果を図 4-3 c に示す。また、+PDDA での KaiC と KaiA の解離定数  $k_d$  の変化を図 4-3 d に示す。

KaiC 六量体間のリン酸化状態の同調機能を確認するために、同調性の度合いを表す変数 Sync を次式で定義した。

$$\text{Sync} = 1 - \left( \frac{0.2}{N_{\text{hex}}^2} \right) \Sigma D_{i,j} \quad (4-3)$$

ここで、KaiC 六量体の  $N_{\text{hex}}$  は KaiC 六量体の数で、 $D_{i,j}$  は次式で定義される。

$$D_{i,j} \equiv \sqrt{\sum_{\beta=1}^4 [N_i(\beta) - N_j(\beta)]^2} \quad (4-4)$$

$N_{i,j}(\beta)$  は各リン酸化状態のプロトマーが KaiC 六量体内に存在する数を示し、 $\beta = \{S/T, pS/T, pS/pT, S/pT\}$  で KaiC-S/T のプロトマーがひとつならば  $N(S/T) = 1$  になる。例えばすべての KaiC が

完全に脱リン酸化している場合、 $D_{ij} = 0$  となり、Sync は 1 となり、同調が最大ということになる。全ての KaiC 六量体間について Sync を計算した。

図 4-3 b と c で PDDA の有無による違いを比べると、Sync (黄線) は PDDA の有無によらずほぼ同じ変化を示し、PDDA の有無は KaiC と KaiA のみの相互作用時には KaiC リン酸化状態の同調性には寄与していないことがわかる。KaiC-pS/T (赤線) は PDDA の有無によってリン酸化過程で違いが見られ、これは +PDDA では KaiC-pS/pT と KaiA の親和性が弱いことから KaiC の脱リン酸化が PDDA よりも進行しやすいことを示している。

表 4-1 各リン酸化状態の KaiC のリン酸化・脱リン酸化の遷移確率。[89]

| KaiA + KaiC<br>([A] = 1.3 $\mu$ M, [C] = 3.4 $\mu$ M) | リン酸化確率<br>(hr <sup>-1</sup> ) | 脱リン酸化確率<br>(hr <sup>-1</sup> ) |
|---|-------------------------------|--------------------------------|
| S/T $\Leftrightarrow$ S/pT                            | 0.36                          | 0.27                           |
| S/T $\Leftrightarrow$ pS/T                            | 0.04                          | 0.01                           |
| S/pT $\Leftrightarrow$ pS/pT                          | 0.16                          | 0.13                           |
| pS/T $\Leftrightarrow$ pS/pT                          | 0.38                          | 0.07                           |
| KaiC 単独<br>([C] = 3.4 $\mu$ M)                        | リン酸化確率<br>(hr <sup>-1</sup> ) | 脱リン酸化確率<br>(hr <sup>-1</sup> ) |
| S/T $\Leftrightarrow$ S/pT                            | 0.00                          | 0.21                           |
| S/T $\Leftrightarrow$ pS/T                            | 0.00                          | 0.11                           |
| S/pT $\Leftrightarrow$ pS/pT                          | 0.00                          | 0.00                           |
| pS/T $\Leftrightarrow$ pS/pT                          | 0.00                          | 0.31                           |

表 4-2 KaiC-KaiA 間のダイナミックな結合解離を考慮し、実際に使用した遷移確率。

| KaiA + KaiC                  | リン酸化確率<br>(hr <sup>-1</sup> ) | 脱リン酸化確率<br>(hr <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| S/T $\Leftrightarrow$ S/pT   | 0.50                          | 0.05                           |
| S/T $\Leftrightarrow$ pS/T   | 0.01                          | 0.05                           |
| S/pT $\Leftrightarrow$ pS/pT | 0.30                          | 0.10                           |
| pS/T $\Leftrightarrow$ pS/pT | 0.50                          | 0.00                           |
| KaiC 単独                      | リン酸化確率<br>(hr <sup>-1</sup> ) | 脱リン酸化確率<br>(hr <sup>-1</sup> ) |
| S/T $\Leftrightarrow$ S/pT   | 0.00                          | 0.20                           |
| S/T $\Leftrightarrow$ pS/T   | 0.00                          | 0.15                           |
| S/pT $\Leftrightarrow$ pS/pT | 0.00                          | 0.00                           |
| pS/T $\Leftrightarrow$ pS/pT | 0.00                          | 0.27                           |

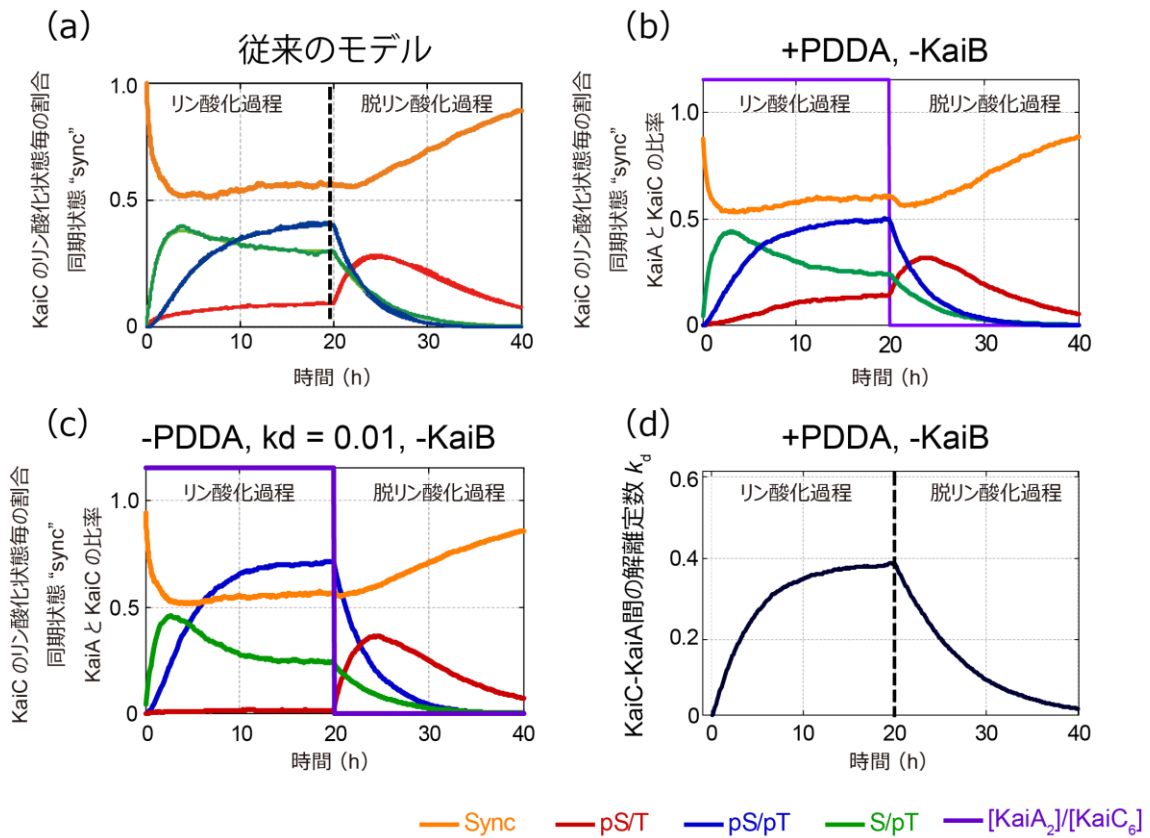


図 4-3 KaiC 六量体のプロトマーに 4 つのリン酸化状態が存在するシミュレーション。

(a) 先行研究によるリン酸化サイトが一つで仮定したモデル[89]を用いたシミュレーション結果。(b) と(c)は PDDA の有無によるシミュレーション結果。KaiC-S/pT、KaiC-pS/pT、KaiC-pS/T の割合はそれぞれ緑、青、赤線で、 $KaiA_2/KaiC_6$  (KaiA 二量体の KaiC 六量体の濃度比) は紫線で示されている。黄線は同調性 Sync の変化を示す。(d) PDDA による KaiC-KaiA の解離定数の変化。

### 4.3 PDDA による概日リズムへの影響の検討

これまでのシミュレーションは KaiC と KaiA のみについて考慮してきたが、Kai タンパク質の概日リズムが振動するためには KaiB による KaiA の隔離が必要である。次に、KaiC、KaiB、KaiA の 3 つのタンパク質が存在する系についてシミュレーションを行った。

高速 AFM による実験結果や、先行研究から KaiB は KaiC-pS/T に強く結合することが明らかになっている。しかしながら、親和性が低いながらも KaiC-pS/pT への結合も確認されているため、本研究ではこれまでの実験結果や報告に基づいて[41], [42], [49], [55], [63], [65], [90]–[93]、KaiB の KaiC への結合について 2 つのモデルを用いてシミュレーションを行った。一つ目 (A) は KaiC-pS/T スイッチモデルであり、KaiC 六量体の一定数 ( $B_{+,pS/T}$ ) のプロトマーが KaiC-pS/T へと遷移したときに KaiB が KaiC 六量体への結合を開始する。二つ目 (B) はデュアルスイッチモデル、KaiB の KaiC 六量体への結合を開始するのに KaiC-pS/T プロトマー ( $B_{+,pS/T}$ ) もしくは KaiC-pS/T と KaiC-pS/pT のプロトマーの合計 ( $B_{+,pS/T+pS/pT}$ ) が一定数以上必要である。この条件を満たすことで KaiC 六量体は  $k_{+B}$  の確率で KaiC-KaiB 複合体を形成する。なお、実際の系では KaiC のプロトマーごとに KaiB がひとつずつ結合することが知られているが、KaiC に結合している KaiB の数は考慮しない。KaiC のリン酸化に必要な自由な状態の KaiA ( $A_{free}$ ) が次式のように KaiC-KaiB 複合体にもなって増減することによって KaiC 六量体の脱リン酸化活性が制御される。

$$A_{free} = A_0 - n_{seq}(BC) \quad (A_{free} > 0) \quad (4-4)$$

$A_0$  は KaiA の初期濃度で  $n_{seq}$  は KaiC-KaiB 複合体一つあたりが隔離する KaiA の数の平均であり、 $BC$  は KaiC-KaiB 複合体の濃度を示す。KaiC-KaiB 複合体が分離する解離速度定数  $k_{-B}$  は  $0.01 \text{ hr}^{-1}$  と仮定した。さらに、KaiC が完全に脱リン酸化すると KaiB が KaiC から迅速に解離することが知られているため、KaiC 六量体内のプロトマーがすべて KaiC-pS/T から KaiC-S/T に遷移した場合、 $k_{relax} = 1.0 \text{ hr}^{-1}$  で解離すると仮定する。



表 4-3 に記載したパラメータを用いて KaiC リン酸化状態の時間変化についてシミュレーションを行った結果を図 4-4 に示す。この際、図 4-4 b, d から KaiC-KaiA 間の相互作用の解離定数である  $k_d$  が約 0.1~0.3 の間で振動していたため、比較のために-PDDA では  $c = 0$  である  $k_d = 0.01$  の他に  $k_d = 0.25$  のふたつの条件でシミュレーションを行った結果を図 4-4 に示す。

KaiC のリン酸化状態はモデル A では-PDDA について親和性が強いとき ( $e, k_d = 0.01$ ) に発振することが確認できず、他の条件下では発振することが確認された。KaiC のリン酸化状態が振動している条件(図 4-4 a, c, f-h)について比較すると同調状態を示す”sync”ほどの条件においても、リン酸化過程において大きく減少し、脱リン酸化過程において増加している。グラフを見比べてみても大きく差はなく、van Zon らの提唱したリン酸化過程における KaiC リン酸化状態の同調は高速 AFM による実験で得られたパラメータでは発生しなかった。先述した通り、彼らのモデルでは KaiC-KaiA 間の親和性が 729 倍程度の変化をしていたが、高速 AFM による実験から得られた結果では解離定数  $k_d$  は大きくても 5 倍程度の変化しか起こっていなかった。そのため実際の系における PDDA は周期の同調性に大きく寄与しないことが明らかとなった。

次に、これまでの実験的な値に基づいたシミュレーションから、PDDA が同調機能とは別の役割を持っているかどうかについて検討を行った。先述した通り、PDDA はリン酸化過程において KaiC-pS/pT から KaiC-pS/T への脱リン酸化を促進しており(図 4-3 b, c の青と赤の線)、これは KaiA と KaiC-pS/pT の親和性が弱いためだと推測できる。さらに、図 4-4 e では KaiA と KaiC-pS/pT の親和性が強いため KaiC-pS/T への遷移がおこらず、KaiB が KaiC へと結合できないためリン酸化状態が発信しなかったと考えられる。実験で得られたパラメータよりも親和性を低くした場合(図 4-4 f)では発振することからも KaiC-pS/pT から KaiA が解離することによる KaiC-pS/T への遷移が重要であることがわかる。このことから、PDDA は KaiC-KaiB 複合体の形成を促すことで KaiC リン酸化状態の振動の安定性に寄与していると予測された。PDDA の KaiC-KaiB 複合体形成への効果をより詳しく調べるために KaiC と KaiB の結合速度定数  $k_{iB}$  を変化させ、KaiC リン酸化状態の振動の周期についてシミュレーションを行い、その結果を図 4-5 に示す。まずモデル A(a, b)での結

果について比較すると、 $k_d = 0.01$  の際は図 4-4 の結果と同様に -PDDA (黒) では発振せず、+PDDA (赤) のみ発振することがわかる。先程のシミュレーションで振動していた  $k_d = 0.25$  の場合、+PDDA による結果は、-PDDA に比べて Kai タンパク質による概日周期 (約 22 時間) に近い周期で振動していることがわかる。一方、モデル B (c, d) の場合は、 $k_d$  の値によらず PDDA の有無による差は小さいが、わずかに +PDDA の周期が 22 時間に近くなっている。これらの結果から、PDDA によって概日リズムの周期の安定性が向上していることが明らかとなった。

次に、KaiA の濃度をランダムに変動させながら KaiC リン酸化状態の振動について時間変化をシミュレーションし、その結果を図 4-6 に示す。+PDDA (赤) でのシミュレーション結果は -PDDA (黒) と比較して振動が安定していることが明らかとなった。KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> の変動が小さい条件下 (a、KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> = 1.7~2.3) では PDDA の有無にかかわらず振動を維持しているが、KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> が大きく変動する条件下 (b, c、KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> = 1.5~3.0) では、KaiA の濃度が増加した際に -PDDA では振動が消失した。一方、+PDDA では周期が変化するが、振動が消失することはなかった。また、KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> の濃度比を様々な条件で固定してシミュレーションを行った (図 4-7)。PDDA の有無にかかわらず振動する範囲 (KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> = 0.5~2.5) の間で +PDDA は -PDDA より正確に概日周期 (約 22 時間) に近い長さで振動しており、-PDDA では振動を維持できない濃度比でも +PDDA では発信していた。これらの結果ら PDDA は KaiA と KaiC の濃度比の許容範囲を広げていることが示唆された。さらに、KaiA の濃度と KaiC のリン酸化状態の振動について PDDA の効果を調べるために様々な条件下で KaiC と KaiA の濃度比を変化させたシミュレーションを行った (図 4-8)。その結果、すべての条件において +PDDA は -PDDA より振動の安定性が向上することを示した。振動を維持することができる KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> の範囲が広がっており、濃度の変化による周期の変動が小さくなっている。これらの結果から、PDDA はタンパク質の濃度の変動に対する耐性としての役割を担っていることが明らかとなった。

最後に、これまでのシミュレーション結果から明らかになった濃度の変動に対する耐性が Kai タンパク質による概日リズムに存在するのかを、シミュレーションと *in vitro* での実験を比較することで

確かめた。KaiA を脱リン酸化過程で添加し、KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> の濃度比を変化させたシミュレーション (図 4-9 a) ではこれまでのシミュレーション結果と同様に +PDDA は振幅、周期共に -PDDA に対してより広い範囲で維持することができる。このシミュレーション結果が *in vitro* での実験と一致するかを確認するために、Kai タンパク質による概日リズムを再構成し、脱リン酸化中に KaiA を添加することで実験を行った (図 4-9 b)。これらの結果を比較すると、+PDDA でのシミュレーション結果は実験による結果とほぼ一致していることがわかる。KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> が 1.33 → 4.1 へと増加する際に振動が消失、1.33 → 3.0 に増加した際に周期が延長することを予測することができていた。一方、-PDDA では 1.33 → 3.0 で振動が消失し、1.33 → 2.4 で周期が延長していた。これは実験結果とは一致していない。これらの結果から、Kai タンパク質は KaiA と KaiC の濃度比の変動に対して振動を維持するための耐性を持っており、PDDA その耐性を担っており、概日リズムの安定性を向上していると明らかになった。

表 4-3 KaiB を考慮したシミュレーションのパラメータ

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| KaiC-KaiC 複合体が隔離する<br>KaiA の数 (平均)  | $n_{\text{seq}} = 4$                                   |
| モデル A<br>KaiB の結合に必要な pS/T の数       | $B_{+, \text{pS/T}} = 2$                               |
| モデル B<br>KaiB の結合に必要な pS/T、pS/pT の数 | $B_{+, \text{pS/T}} = 2, B_{+, \text{pS/T+pS/pT}} = 3$ |
| KaiB が完全に解離する状態<br>(六量体内の pS/T の数)  | $B_{-, \text{thresh}} = 0$                             |
| KaiB の結合速度定数                        | $k_{+B} = 0.5 \text{ hr}^{-1}$                         |
| 通常時の KaiB の解離速度定数                   | $k_{-B} = 0.01 \text{ hr}^{-1}$                        |
| pS/T が一定数以下の場合の解離速度定数               | $k_{\text{relax}} = 1.0 \text{ hr}^{-1}$               |

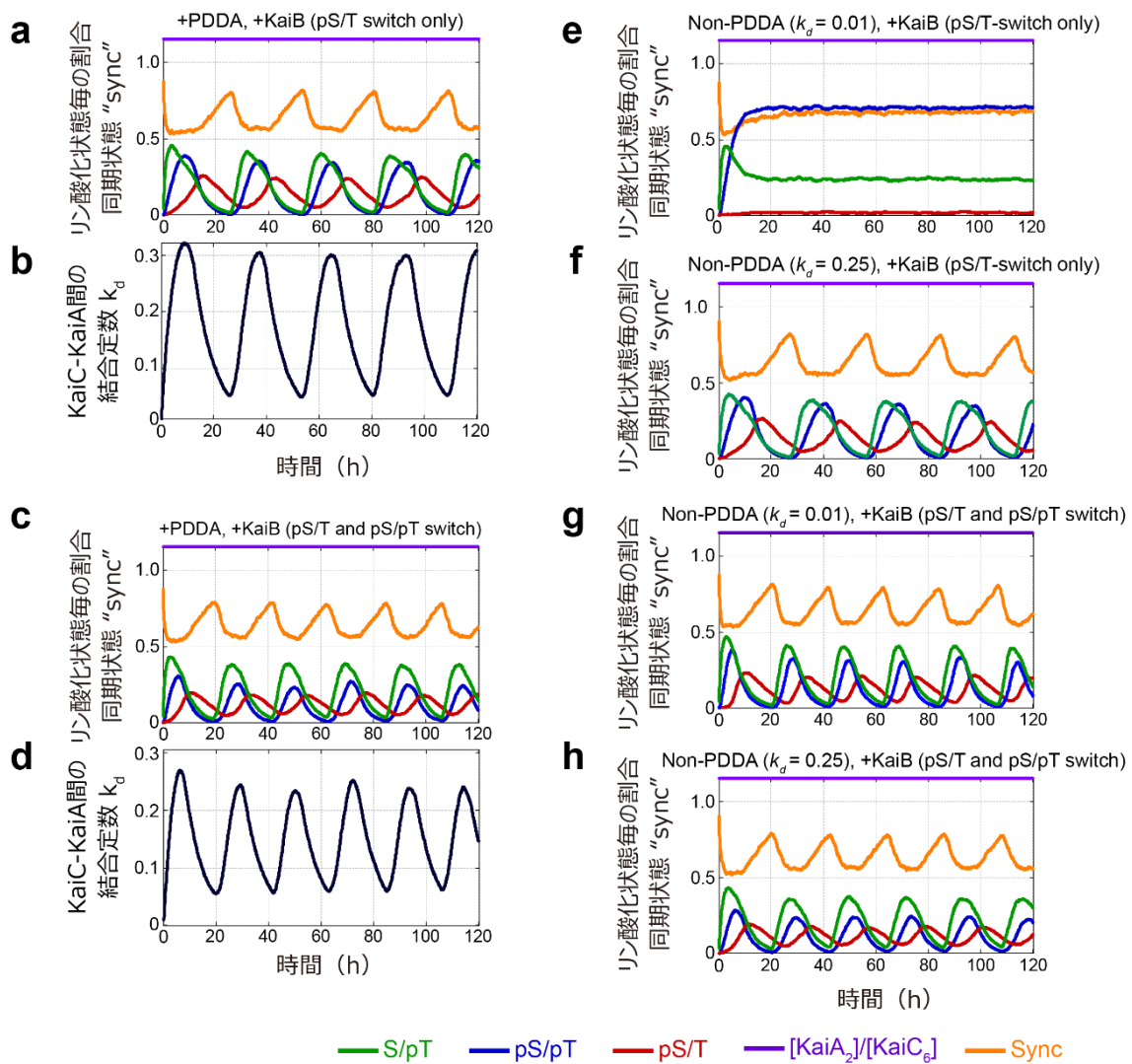
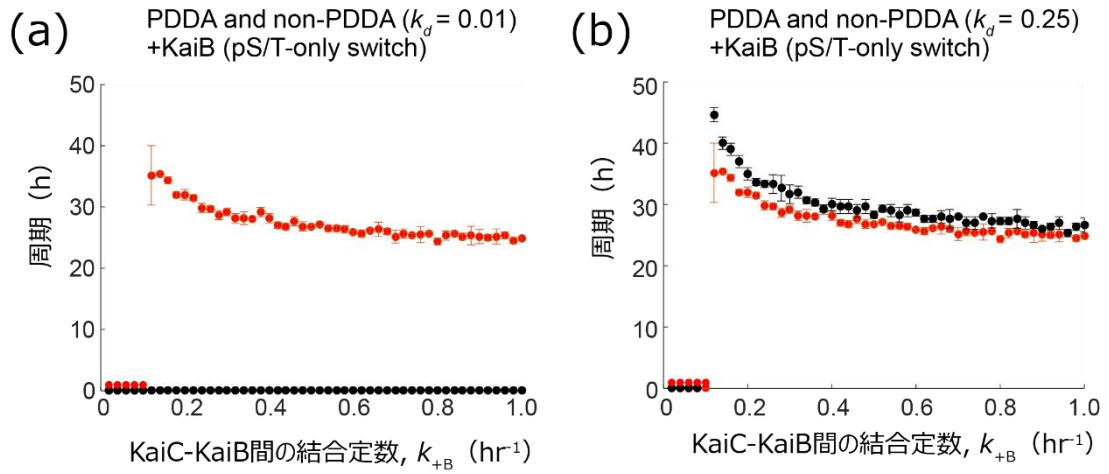


図 4-4 Kai タンパク質全体による KaiC リン酸化状態の振動のシミュレーション。

モデル A (a, b, e, f) は KaiC 六量体内に KaiC-pS/T が 2 個以上あるときのみ KaiC-KaiB 複合体を形成する。モデル B (c, d, g, h) は KaiC-pS/T が 2 個もしくは KaiC-pS/T と KaiC-pS/pT の合計が 3 個以上あるときに KaiC-KaiB 複合体を形成する。KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> は 1.15 で固定しており、KaiB の KaiC への結合速度  $k_{B+}$  は  $0.5 \text{ hr}^{-1}$ 。KaiC のリン酸化状態 KaiC-S/pT、KaiC-pS/pT、KaiC-pS/T の割合をそれぞれ緑、青、赤で示す。また、Sync を黄色で示す。条件はそれぞれ a, b は +PDDA でモデル A、c, d は +PDDA でモデル B、e は -PDDA でモデル A、 $k_d = 0.01$ 。f は -PDDA はモデル A、 $k_d = 0.25$ 。g は -PDDA でモデル B、 $k_d = 0.01$ 。h は -PDDA でモデル B、 $k_d = 0.25$ 。b, d は +PDDA による KaiC と KaiA 間の解離定数の変化を示す。

モデルA (pS/Tのみに結合)



モデルB (pS/TとpS/pTに結合)

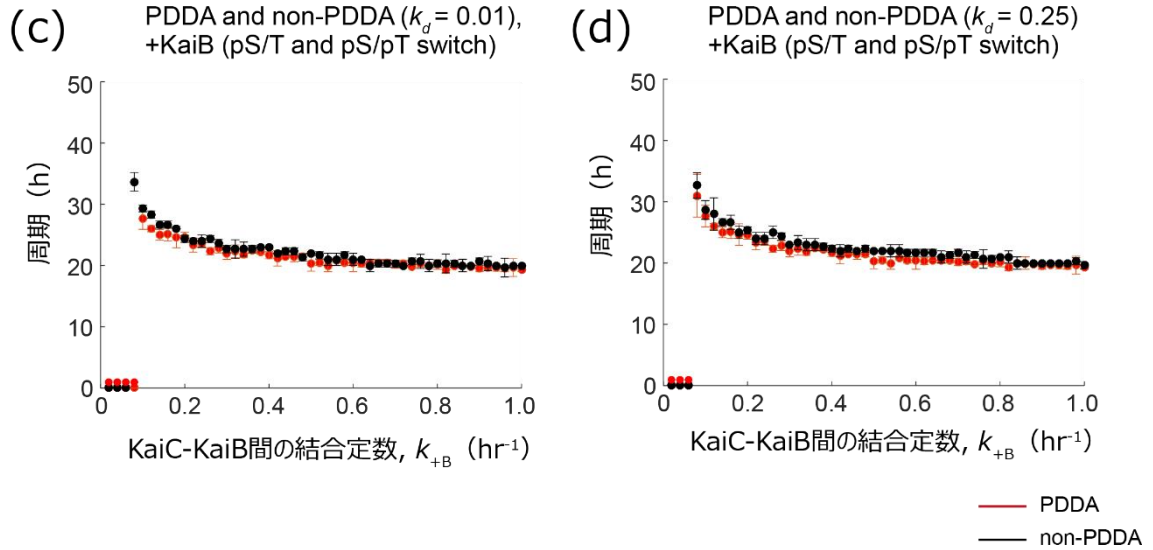


図 4-5 KaiC-KaiB 間の結合に関するシミュレーション結果。

KaiC-KaiB 複合体を形成する結合速度定数である  $k_{+B}$  を変動させることで、PDDA による影響を確認した。KaiB が KaiC-pS/T のみに結合するモデル A (a, b) では +PDDA (赤) は -PDDA (黒) と比較してより安定した周期を刻むことがわかる。モデル B (c, d) については PDDA と -PDDA の差は大きく表れなかった。縦軸である周期は 200 時間シミュレーションを行い、得られた周期の平均を表している。

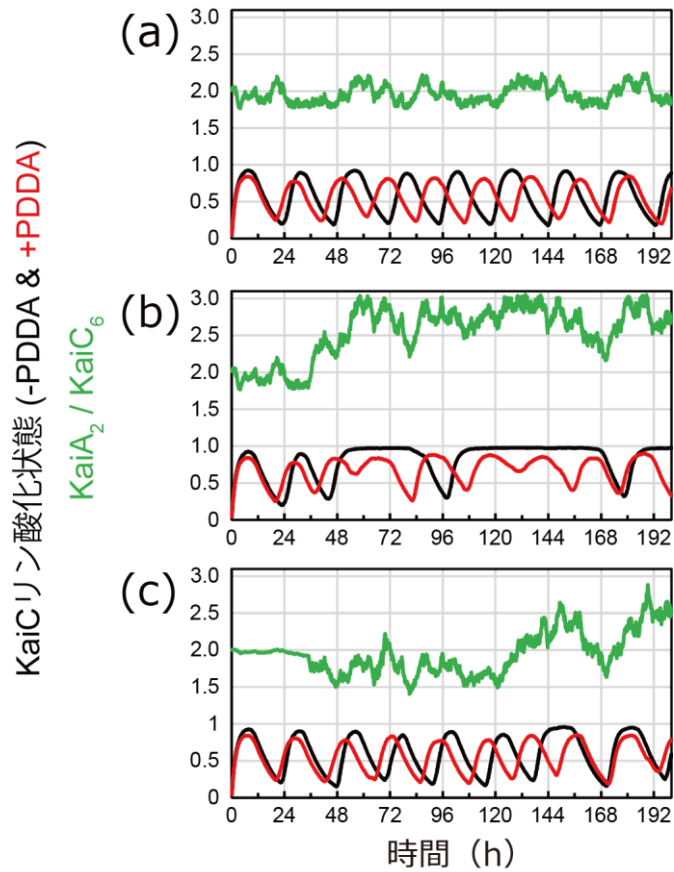


図 4-6 KaiA の濃度を変動させたシミュレーション結果。

KaiC のリン酸化状態が振動している際に、KaiA の濃度をランダムに増減させた。KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> の比率を緑で示し、+PDDA と-PDDA をそれぞれ赤と黒で示す。濃度変動が小さい場合は PDDA の有無によらず振動を続けているが(a)、濃度が大きく変化すると-PDDA では振動を維持できない(b, c)。KaiB の結合モデルは B であり、KaiC-KaiA 間の解離定数は  $k_d = 0.01$ 。

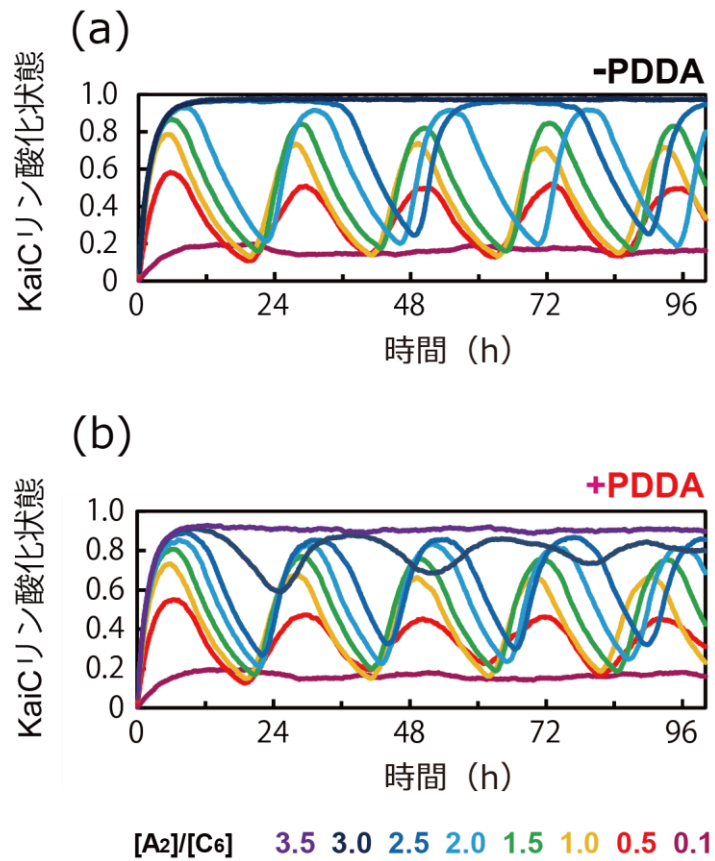
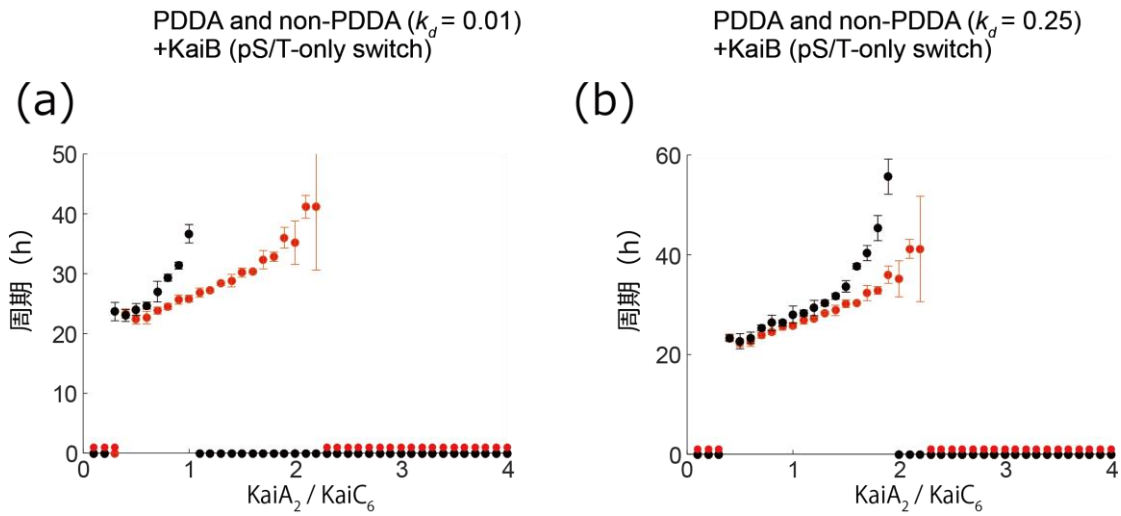


図 4-7 KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub>の様々な比率でのシミュレーション結果。

KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub>の比率を一定にしたシミュレーション。(a)が-PDDA、(b)が+PDDAでの結果である。PDDAの有無によらず振動を続ける比率(0.5~2.5)において+PDDAの振動の周期は-PDDAに比べ概日周期(22時間)に近く、-PDDAでは振動を維持できない比率(3.0)で+PDDAは振動を続けていた。KaiBの結合モデルはBであり、KaiC-KaiA間の解離定数は $k_d = 0.01$ 。



モデルA (pS/Tのみに結合)



モデルB (pS/TとpS/pTに結合)

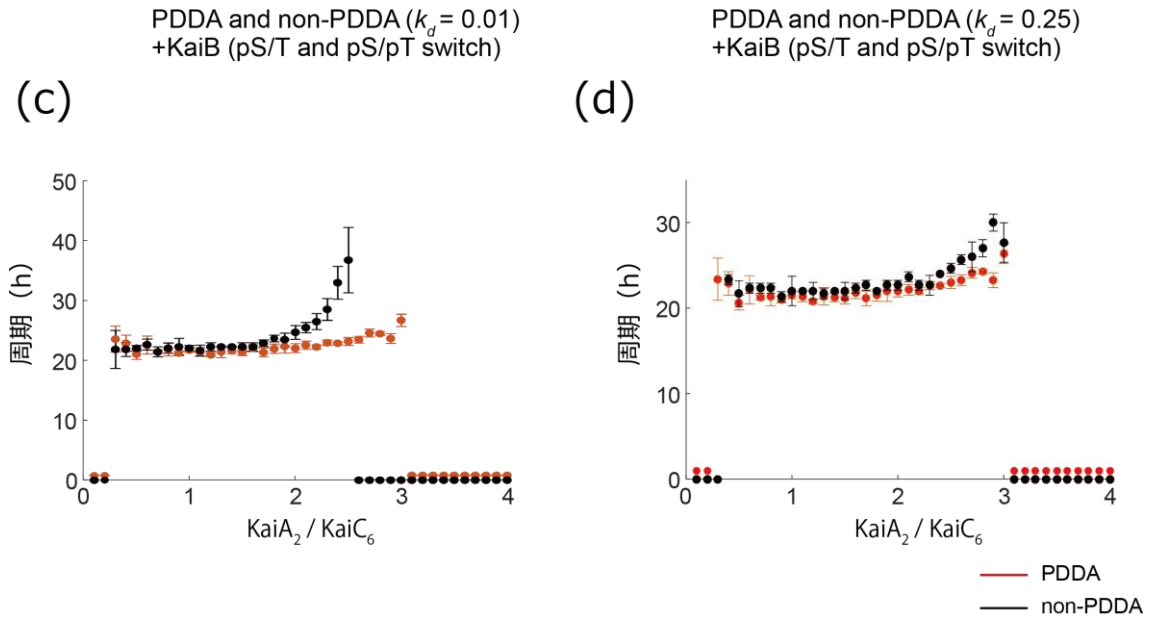


図 4-8 KaiA の濃度を変動させたシミュレーション結果。

KaiA の濃度を変動させることによって KaiA<sub>2</sub>/KaiC<sub>6</sub> の濃度比を変動させた。すべての条件において、+PDDA (赤) は -PDDA (黒) に比べて概日リズム (約 22 時間) に近い周期を保っている。また、-PDDA では周期が消失してしまう比率において +PDDA が振動を維持している (a, b, c)。条件はそれぞれ a は  $k_d = 0.01$ 、モデル A。b は  $k_d = 0.25$ 、モデル A。c は  $k_d = 0.01$ 、モデル B。d は  $k_d = 0.25$ 、モデル B。

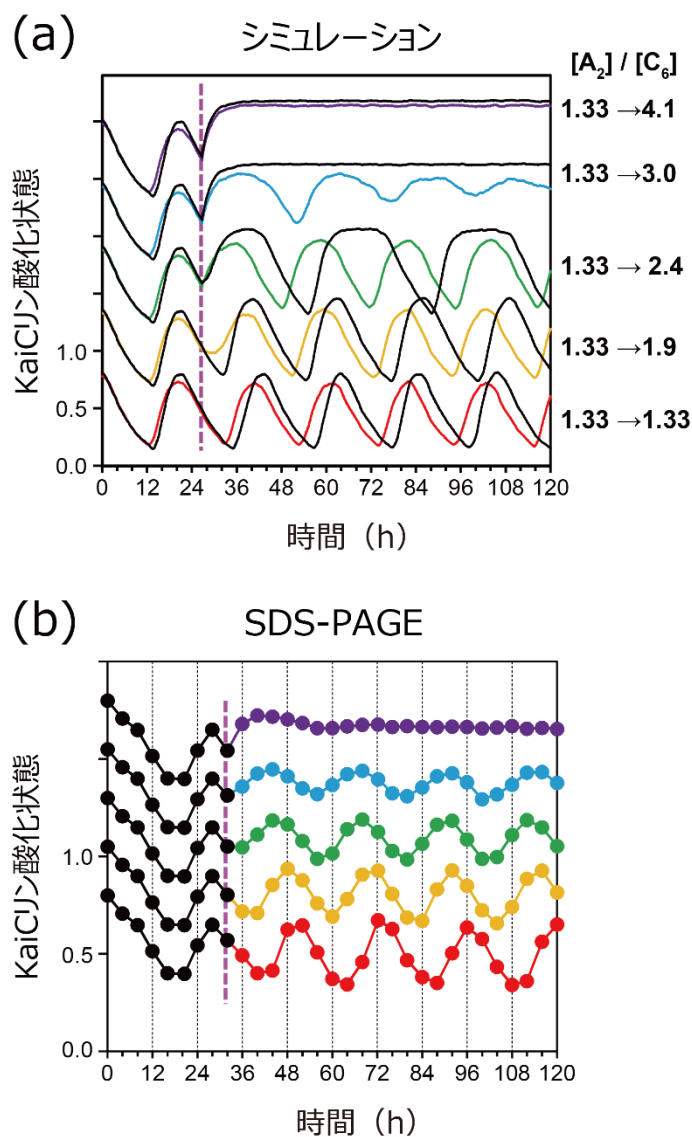


図 4-9 KaiC の脱リン酸化過程に KaiA を添加したシミュレーションおよび実験結果。

(a)シミュレーションによる結果。黒線が-PDDA によるシミュレーション結果で、色の付いた線が+PDDA でのシミュレーション結果。KaiA を紫の破線の時間に添加した。添加後の  $KaiA_2/KaiC_6$  の比率について右に示す。1.33→3.0 において-PDDA では周期が消失しているのに対して+PDDA では周期が延長しているものの消失してはいない。(b) *in vitro* での実験結果。シミュレーションと同様に紫の破線の時間で KaiA を添加した。シミュレーションでは PDDA の有無による差が顕著に表れていた 1.33→3.0 では振動が維持されており、+PDDA による予測結果が正しいことがわかる。

## 4.4 まとめ

van Zon らの提唱した KaiC-KaiA 間の親和性の変化による KaiC 六量体間のリン酸化状態の同調について確かめるために、解離・結合速度定数がリン酸化状態によって変化するように仮定した。この定数を脱リン酸化過程において KaiC 六量体間のサブユニット交換を考慮したモデルに適用することで振動に必要な PDDA の強さを確認した。その後、KaiC のプロトマーごとに S432 と T432 のふたつのリン酸化サイトが存在する系について KaiC のリン酸化状態に依存して変化する解離定数を定義し、モンテカルロ法を用いてシミュレーションを行った。その結果、van Zon らの提唱したリン酸化過程における KaiC リン酸化状態の同調性については、高速 AFM による観察で得られた PDDA の変化量では発生することはなく、PDDA が KaiC 六量体間のリン酸化状態同調機能に大きく寄与しないことが明らかとなった。他方、PDDA によって KaiC-pS/pT から KaiC-pS/T への遷移が潤滑に行われることが明らかとなり、概日リズムの頑強性に関与していることが推測された。次に、KaiA と KaiC の濃度比を変動させてシミュレーションを行ったところ、PDDA によって KaiC リン酸化状態が振動する Kai タンパク質の濃度の許容範囲が広がることが明らかとなった。実際の細胞内において環境の明暗等の影響によって KaiC の数は 5000~20000 個ほどまで変動することが知られており、KaiA もまた濃度を変動させる[94]–[96]。PDDA は Kai タンパク質による概日リズムが生体内での濃度変化に対しても振動を維持し続けるためノイズ耐性としての役割を担っていることが明らかとなった。

## 第5章 総括

### 5.1 結論

高速 AFM 観察により、Kai タンパク質の複合体形成を直接可視化することに成功した。基板への化学修飾によって KaiC の吸着方向の制御に成功し、KaiA もしくは KaiB との複合体形成の動態を明らかにした。KaiC-KaiA 間相互作用は結合解離を繰り返していることを見出し、KaiC-KaiA の親和性は KaiC のリン酸化状態に依存して概日周期的に変化していた。また、KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体の観察から、Kai タンパク質による概日リズムと複合体形成の関係を明らかにした。

高速 AFM による観察で明らかになった KaiC-KaiA 間相互作用の KaiC リン酸化状態依存性が Kai タンパク質による概日周期に与える影響について調べるために高速 AFM 実験で得られたパラメータで数理シミュレーションを行った。KaiA と KaiC のリン酸化状態依存的な親和性の変化は、Kai タンパク質の濃度変動に対して概日リズムを安定に維持するために必要であり、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。

#### 5.1.1 KaiC-KaiB 間相互作用

KaiC の吸着方向を制御した観察中に KaiB を添加することによって KaiB が KaiC の CI リング側に結合することを明らかにした。さらに、チオレドキシン型構造を持つ変異体 KaiB を用いた観察により、安定した KaiC-KaiB 複合体の形成の観察に成功した。KaiC-KaiB 間の複合体形成を安定して観察できるようになったことから、この KaiB が KaiC 六量体を構成するプロトマーに協同的に結合し、六量体上に KaiB が複数結合することで複合体構造が安定化していることが示唆された。また、リン酸化状態の異なる KaiC と KaiB の結合状態を観察したところ、KaiB は KaiC が pS/T 状態の時に最も強く結合することが明らかとなり、KaiC-pS/T が KaiC の脱リン酸化を促進するスイッチとなっていることが示唆された。

### 5.1.2 KaiC-KaiA 間相互作用

KaiA と KaiC 六量体の複合体形成を観察し、従来言われている通り KaiC の CII リング側に結合することが確認された。さらに、KaiC-KaiA 間の相互作用は先行研究で考えられていたような静的な結合はなく、1 秒以下で結合と解離を繰り返すダイナミックな相互作用であることが明らかとなった。この結合と解離の時定数は KaiC のリン酸化状態に依存して大きく変化し、概日リズムと同期して変動していることが分かった。さらに、KaiC 六量体内のテイルの本数を変化させた試料を準備し、KaiC-KaiA 間の親和性を計測したところ、KaiA は KaiC に 4 本以上のテイル構造が存在するときに安定して結合することが明らかとなった。また、概日リズムの温度補償性の分子メカニズムを明らかにすべく、40°C の溶液温度での観察も実施した。室温と 40°C では、リン酸化状態の KaiC への KaiA の結合時間に大きな変化は見られなかったが、結合する頻度が 5 倍程度増加していた。KaiC-KaiA 複合体を形成しているトータルの時間が長くなることで、上昇による KaiC の脱リン酸化を打ち消すように結合することが示唆された。しかしながら、脱リン酸化状態 KaiC に対しては 40°C で結合時間の大幅な短縮が見られ、これがどのように概日リズムの温度補償能に寄与しているかは明らかにできなかった。

### 5.1.3 KaiC-KaiB-KaiA 三者複合体

KaiC への結合能が高い変異体 KaiB-G88A/D90R を用いて KaiC-KaiA-KaiB 三者複合体の観察に成功した。KaiC 六量体の CI リング面に結合した KaiB にさらに KaiA が結合する様子が観察できた。このことから、概日発振中に KaiC がリン酸化状態になると KaiA が KaiB にトラップされて溶液中にある KaiA の濃度が実効的に減少し、CI リング面に結合する KaiA の数が減ることで KaiC の自己脱リン酸化が進行していくと考えられる。これら、Kai タンパク質複合体の高速 AFM 観察の結果を基に概日リズムと複合体形成の関係について新たにモデルを提案した。

#### 5.1.4 数値シミュレーション

高速 AFM 観察で得られた KaiC のリン酸化状態に応じた KaiA と KaiA の結合時定数を用いて概日リズムの数値シミュレーションを行った。van Zon の数理シミュレーションで示唆されていた KaiC 六量体間でのリン酸化状態の同調は、実験結果で得られたパラメータでは発生せず、PDDA がリン酸化の同調には大きく寄与していないことが明らかになった。しかしながら、シミュレーションによって PDDA の別の役割が示唆された。PDDA の有無により、Kai タンパク質の濃度変動に対する概日リズムの安定性が変化し、PDDA により KaiC と KaiA の濃度比が 3 倍程度になっても概日リズムが安定に維持することがわかり、PDDA は概日リズムの頑強性を担保する役割を担っていることが明らかになった。

## 5.2 今後の展望

本研究によって Kai タンパク質間相互作用のダイナミクスの詳細が明らかにでき、Kai タンパク質による概日リズムと複合体形成について多くのことが分かったしかしながら、現状では KaiC の CI もしくは CII リング側のどちらか一方のみしか観察ができないため概日リズムを刻んでいる状態をありのままに観察することは不可能であった。KaiC 六量体リングを側面で基板に吸着し、CII リング、CI リングの両側を同時に観察することで、概日リズムを刻んでいる Kai タンパク質間の相互作用をより深く理解できると期待される。

温度補償性の分子機構についても明らかにすべく昇温環境での実験環境も整え、KaiC と KaiA 間の相互作用について手がかりになる結果は得られたが、リン酸化状態と脱リン酸化状態にある KaiC と KaiA の温度依存的相互作用についての一貫した理解を得るまでには至らなかった。今後、KaiB と KaiC、あるいは三者複合体の形成過程についても高温下で観察する必要がある。ごく最近の研究で温度補償性を変化させる KaiC 変異体が発見されたという報告があることから[97]、この変異体と高温観察によって温度補償性の分子機構を明らかにできることが期待される。

Kai タンパク質はそれだけで概日リズムを刻むが、シアノバクテリアは実際には KaiC のリン酸化リ

リズムに加えて転写翻訳フィードバックによって概日時計を構成している[98]。転写翻訳フィードバックにはいくつかのタンパク質が関与しているが、その中でも明暗によって周期のリセットを行う SasA[99]は KaiB と KaiC への結合部位を共有していることが知られていることから、今後 SasA と KaiC、KaiB 等、関連タンパク質との相互作用観察もシアノバクテリアの概日リズムの全貌を明らかにするには必要となろう。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、名古屋大学理学研究科の内橋貴之教授には終始丁寧に適切なご指導ご鞭撻を賜りました。研究だけでなく、公私ともお世話になりましたことを深く感謝申し上げます。また、主任指導教員である金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所の古寺哲幸教授には博士課程の途中から名古屋大学で研究を行っていたこともあり、研究だけでなく事務手続き等でも大変お世話になったことを深く感謝申し上げます。共同研究先である Vanderbilt 大学の森哲也博士、同大学の Carl H. Johnson 教授には、本研究を行うにあたりタンパク質の精製をして頂いた他、Kai タンパク質について丁寧に指導を賜りましたことを深く感謝申し上げます。同じく共同研究先である Spring Hill 大学の Mark Byrne 准教授には本研究で得られた結果からのシミュレーションについてご教授いただき、深く感謝申し上げます。金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所の紺野宏記准教授、奈良先端科学技術大学院大学構造生命科学研究室の春山隆允博士には生化学的手法についてご指導賜りましたことを深く感謝申し上げます。高速 AFM による観察について助言を頂きました、金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所の柴田幹大准教授に深く感謝申し上げます。事務手続きでは大変お世話になりました金沢大学数物科学類秘書の森廣美さん、金沢大学生物物理学研究室秘書の松本文さんに深く感謝申し上げます。

分子科学研究所生命創成探求センターの渡辺大輝特任助教には本研究についてだけでなく、高速 AFM の装置、開発についてご指導賜りました。また、研究だけでなく公私共に大変お世話になりましたことを深く感謝申し上げます。名古屋大学に移ってから 2 年間と短い期間でしたが一緒に研究を行った名古屋大学生体分子動態機能研究室の Christian Ganser 博士、共に名古屋大学に移り昨年同研究室を卒業した小財稔矢君には公私共にお世話になりましたこと、感謝申し上げます。

また、1 年という短い期間でしたが、同研究室で一緒に研究を行った戸叶貴也君、伊藤史也君、ありがとうございます。また、研究だけでなく様々な相談を受けて頂き、共に過ごした金沢大学生物物理学研究室の皆様にご感謝申し上げます。



最後に、博士課程まで進学することを快く承諾し、ご支援、ご協力していただきました両親に深く感謝し、謝辞とさせていただきます。

## 参考文献

- [1] J. C. Dunlap, J. J. Loros, and P. J. Decoursey, *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sinauer Associates, 2003.
- [2] 仁田澤, マメから生まれた生物時計—エルヴィン・ビュニングの物語. 学会出版センター, 2009.
- [3] J. Aschoff, “Circadian Rhythms in Man,” *Science*, vol. 48, pp. 1427–1432, 1965.
- [4] R. J. Konopka and S. Benzer, “Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 68, no. 9, pp. 2112–2116, 1971.
- [5] J. C. Hall, M. Rosbash, P. Reddy, W. A. Zehring, D. A. Wheeler, V. Pirrotta, and C. Hadfield, “Molecular analysis of the *period* locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms,” *Cell*, vol. 38, no. 3, pp. 701–710, 1984.
- [6] T. A. Bargiello, F. R. Jackson, and M. W. Young, “Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*,” *Nature*, vol. 312, no. 5996, pp. 752–754, 1984.
- [7] W. A. Zehring, D. A. Wheeler, P. Reddy, R. J. Konopka, C. P. Kyriacou, M. Rosbash, and J. C. Hall, “P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*,” *Cell*, vol. 39, no. 2 Pt 1, pp. 369–376, 1984.
- [8] P. E. Hardin, J. C. Hall, and M. Rosbash, “Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels,” *Nature*, vol. 343, pp. 536–540, 1990.
- [9] A. Sehgal, A. Rothenfluh-Hilfiker, M. Hunter-Ensor, Y. Chen, M. P. Myers, and M. W. Young, “Rhythmic Expression of timeless: A Basis for Promoting Circadian Cycles in *period* Gene Autoregulation,” *Science*, vol. 270, no. 5237, pp. 808–810, 1995.
- [10] M. P. Myers, K. Wager-Smith, C. S. Wesley, M. W. Young, and A. Sehgal, “Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*,” *Science*, vol. 270, no. 5237, pp. 805–808, 1995.
- [11] R. Allada, N. E. White, W. V. So, J. C. Hall, and M. Rosbash, “A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*,” *Cell*, vol. 93, pp. 791–804, 1998.
- [12] J. E. Rutila, V. Suri, M. Le, W. V. So, M. Rosbash, and J. C. Hall, “Cycle is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*,” *Cell*, vol. 93, no. 5, pp. 805–814, 1998.
- [13] S. A. Cyran, A. M. Buchsbaum, K. L. Reddy, M.-C. Lin, N. R. J. Glossop, P. E. Hardin, M. W. Young, R. V. Storti, and J. Blau, “vrille, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock,” *Cell*, vol. 112, pp. 329–341, 2003.
- [14] J. C. Dunlap, “Molecular Bases for Circadian Clocks,” vol. 96, pp. 271–290, 1999.
- [15] T. K. Sato, S. Panda, L. J. Miraglia, T. M. Reyes, R. D. Rudic, P. McNamara, K. A. Naik, G. A.

- Fitzgerald, S. A. Kay, and J. B. Hogenesch, "A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock," *Neuron*, vol. 43, no. 4, pp. 527–537, 2004.
- [16] P. Emery, W. V. So, M. Kaneko, J. C. Hall, and M. Rosbash, "CRY, a *Drosophila* Clock and Light-Regulated Cryptochrom, Is a Major Contributor to Circadian Rhythm Resetting and Photosensitivity," *Cell*, vol. 95, pp. 669–679, 1998.
- [17] M. F. Ceriani, "Light-Dependent Sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME," *Science*, vol. 285, no. 5427, pp. 553–556, 1999.
- [18] H. Tei, H. Okamura, Y. Shigeyoshi, C. Fukuhara, R. Ozawa, M. Hirose, and Y. Sakaki, "Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene," *Nature*, vol. 389, no. 6650, pp. 512–516, 1997.
- [19] Z. S. Sun, U. Albrecht, O. Zhuchenko, J. Bailey, G. Eichele, and C. C. Lee, "RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene," *Cell*, vol. 90, no. 6, pp. 1003–1011, 1997.
- [20] G. T. J. Van Der Horst, M. Muijtjens, K. Kobayashi, R. Takano, S. Kanno, M. Takao, J. de Wit, A. Verkerk, A. P. M. Eker, D. van Leenen, R. Buijs, D. Bootsma, J. H. J. Hoeijmakers, and A. Yasui, "Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms," *Nature*, vol. 398, pp. 627–630, 1999.
- [21] D. P. King, Y. Zhao, A. M. Sangoram, L. D. Wilsbacher, M. Tanaka, M. P. Antoch, T. D. L. Steeves, M. H. Vitaterna, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, F. W. Turek, and J. S. Takahashi, "Positional Cloning of the Mouse Circadian *Clock* gene," *Cell*, vol. 89, pp. 641–653, 1997.
- [22] M. Ikeda and M. Nomura, "CDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 233, no. 1, pp. 258–264, 1997.
- [23] J. B. Hogenesch, W. K. Chan, V. H. Jackiw, R. C. Brown, Y. Z. Gu, M. Pray-Grant, G. H. Perdew, and C. A. Bradfield, "Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 13, pp. 8581–8593, 1997.
- [24] M. Akashi and T. Takumi, "The orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. 441–448, 2005.
- [25] N. Preitner, F. Damiola, Luis-Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht, and U. Schibler, "The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator," *Cell*, vol. 110, no. 2, pp. 251–260, 2002.
- [26] H. R. Ueda, W. Chen, A. Adachi, H. Wakamatsu, S. Hayashi, T. Takasugi, M. Nagano, K. Nakahama, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Iino, Y. Shigeyoshi, and S. Hashimoto, "A transcription factor response element for gene expression during circadian night," *Nature*, vol. 418, no. 6897, pp. 534–539, 2002.

- [27] S. Honma, T. Kawamoto, Y. Takagi, K. Fujimoto, F. Sato, M. Noshiro, Y. Kato, and K. Honma, “*Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian molecular clock,” *Nature*, vol. 419, pp. 841–844, 2002.
- [28] R. D. O. Brien, “Endogenous Circadian Rhythm in Cytoplasm of *Acetabularia* : Influence of the Nucleus,” *Science*, vol. 146, 1964.
- [29] N. Grobbelaar, T. C. Huang, H. Y. Lin, and T. J. Chow, “Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 37, no. 2, pp. 173–177, 1986.
- [30] A. Mitsui, S. Kuamazawa, A. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao, and T. Arai, “Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically,” *Nature*, vol. 323, pp. 720–722, 1986.
- [31] T. Kondo, C. A. Strayer, R. D. Kulkarni, W. Taylor, M. Ishiura, S. S. Golden, and C. H. Johnson, “Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 12, pp. 5672–5676, 1993.
- [32] Masahiro Ishiura, Shinsuke Kutsuna, Setsuyuki Aoki, Hideo Iwasaki, Carol R. Andersson, Akio Tanabe, Susan S. Golden, Carl H. Johnson, and Takao Kondo, “Expression of a Gene Cluster *kaiABC* as a Circadian Feedback Process in Cyanobacteria,” *Science*, vol. 281, no. 5382, pp. 1519–153, 1998.
- [33] Y. Xu, T. Mori, and C. H. Johnson, “Cyanobacterial circadian clockwork: Roles of KaiA, KaiB and the *kaiBC* promoter in regulating KaiC,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 9, pp. 2117–2126, 2003.
- [34] J. Tomita, J. Tomita, M. Nakajima, T. Kondo, and H. Iwasaki, “No Transcription-Translation Feedback in Circadian Rhythm of KaiC Phosphorylation,” *Science*, vol. 251, no. 2005, pp. 251–255, 2014.
- [35] M. Nakajima, M. Nakajima, K. Imai, H. Ito, T. Nishiwaki, Y. Murayama, H. Iwasaki, T. Oyama, and T. Kondo, “Reconstitution of Circadian Oscillation of Cyanobacterial KaiC Phosphorylation in Vitro,” *Science*, vol. 308, no. 5720, pp. 414–416, 2005.
- [36] H. Ito, H. Kageyama, M. Mutsuda, M. Nakajima, T. Oyama, and T. Kondo, “Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 14, no. 11, pp. 1084–1088, 2007.
- [37] C. H. Johnson, M. Egli, and P. L. Stewart, “Structural insights into a circadian oscillator,” *Science*, vol. 322, no. 5902, pp. 697–701, 2008.
- [38] R. Pattanayek, J. Wang, T. Mori, Y. Xu, C. H. Johnson, and M. Egli, “Visualizing a circadian clock protein: Crystal structure of KaiC and functional insights,” *Mol. Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 375–388, 2004.
- [39] T. Nishiwaki, H. Iwasaki, M. Ishiura, and T. Kondo, “Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 1, pp. 495–499, 2000.

- [40] F. Hayashi, H. Suzuki, R. Iwase, T. Uzunaki, A. Miyake, J. R. Shen, K. Imada, Y. Furukawa, K. Yonekura, K. Namba, and M. Ishiura, “ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC,” *Genes to Cells*, vol. 8, no. 3, pp. 287–296, 2003.
- [41] M. J. Rust, J. S. Markson, W. S. Lane, D. S. Fisher, and E. K. O’Shea, “Ordered Phosphorylation Governs Oscillation of a Three-Protein Circadian Clock,” *Science*, vol. 318, no. November, pp. 809–812, 2007.
- [42] T. Nishiwaki, Y. Satomi, Y. Kitayama, K. Terauchi, R. Kiyohara, T. Takao, and T. Kondo, “A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria,” *EMBO J.*, vol. 26, no. 17, pp. 4029–4037, 2007.
- [43] K. Terauchi, Y. Kitayama, T. Nishiwaki, K. Miwa, Y. Murayama, T. Oyama, and T. Kondo, “ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 41, pp. 16377–16381, 2007.
- [44] H. Kageyama, T. Nishiwaki, M. Nakajima, H. Iwasaki, T. Oyama, and T. Kondo, “Cyanobacterial Circadian Pacemaker: Kai Protein Complex Dynamics in the KaiC Phosphorylation Cycle In Vitro,” *Mol. Cell*, vol. 23, no. 2, pp. 161–171, 2006.
- [45] J. S. Van Zon, D. K. Lubensky, P. R. H. Altena, and P. Rein, “An allosteric model of circadian KaiC phosphorylation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 18, pp. 7420–7425, 2007.
- [46] R. Pattanayek, D. R. Williams, S. Pattanayek, Y. Xu, T. Mori, C. H. Johnson, P. L. Stewart, and M. Egli, “Analysis of KaiA-KaiC protein interactions in the cyano-bacterial circadian clock using hybrid structural methods,” *EMBO J.*, vol. 25, no. 9, pp. 2017–2028, 2006.
- [47] S. Ye, I. Vakonakis, T. R. Ioerger, A. C. LiWang, and J. C. Sacchettini, “Crystal Structure of Circadian Clock Protein KaiA from *Synechococcus elongatus*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 19, pp. 20511–20518, 2004.
- [48] K. Hitomi, T. Oyama, S. Han, A. S. Arvai, and E. D. Getzoff, “Tetrameric architecture of the circadian clock protein KaiB: A novel interface for intermolecular interactions and its impact on the circadian rhythm,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 19, pp. 19127–19135, 2005.
- [49] C. H. Johnson, C. Zhao, Y. Xu, and T. Mori, “Timing the day: What makes bacterial clocks tick?,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 15, no. 4, pp. 232–242, 2017.
- [50] Y. Kitayama, T. Nishiwaki-Ohkawa, Y. Sugisawa, and T. Kondo, “KaiC intersubunit communication facilitates robustness of circadian rhythms in cyanobacteria,” *Nat. Commun.*, vol. 4, pp. 1–13, 2013.
- [51] R. Tseng, N. F. Goularte, A. Chavan, J. Luu, S. E. Cohen, Y. Chang, J. Heisler, S. Li, A. K. Michael, S. Tripathi, S. S. Golden, A. Liwang, and C. L. Partch, “Structural basis of the day-night transition in a bacterial circadian clock,” *Science*, vol. 355, no. 6330, pp. 1174–1180, 2017.
- [52] I. Vakonakis and A. C. LiWang, “Structure of the C-terminal domain of the clock protein KaiA in complex with a KaiC-derived peptide: implications for KaiC regulation,”

- Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, vol. 101, no. 30, pp. 10925–10930, 2004.
- [53] S. B. Williams, I. Vakonakis, S. S. Golden, and A. C. LiWang, “Structure and function from the circadian clock protein KaiA of *Synechococcus elongatus* : A potential clock input mechanism,” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, vol. 99, pp. 15357–15362, 2002.
- [54] T. Uzumaki, M. Fujita, T. Nakatsu, F. Hayashi, H. Shibata, N. Itoh, H. Kato, and M. Ishiura, “Crystal structure of the C-terminal clock-oscillator domain of the cyanobacterial KaiA protein,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 623–631, 2004.
- [55] Y. G. Chang, S. E. Cohen, C. Phong, W. K. Myers, Y. I. Kim, R. Tseng, J. Lin, L. Zhang, J. S. Boyd, Y. Lee, S. Kang, D. Lee, S. Li, R. D. Britt, M. J. Rust, S. S. Golden, and A. Li Wang, “A protein fold switch joins the circadian oscillator to clock output in cyanobacteria,” *Science*, vol. 349, no. 6245, pp. 324–328, 2015.
- [56] J. Snijder, J. M. Schuller, A. Wiegard, P. Lössl, N. Schmelling, I. M. Axmann, J. M. Plitzko, F. Förster, and A. J. R. Heck, “Structures of the cyanobacterial circadian oscillator frozen in a fully assembled state,” *Science*, vol. 355, no. 6330, pp. 1181–1184, 2017.
- [57] J. Snijder, R. J. Burnley, A. Wiegard, A. S. J. Melquiond, A. M. J. J. Bonvin, I. M. Axmann, and A. J. R. Heck, “Insight into cyanobacterial circadian timing from structural details of the KaiB-KaiC interaction,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 4, pp. 1379–1384, 2014.
- [58] S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito, and Y. Maéda, “Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome,” *Mol. Cell*, vol. 29, no. 6, pp. 703–716, 2008.
- [59] S. A. Villarreal, R. Pattanayek, D. R. Williams, T. Mori, X. Qin, C. H. Johnson, M. Egli, and P. L. Stewart, “CryoEM and molecular dynamics of the circadian KaiB-KaiC complex indicates that KaiB monomers interact with KaiC and block ATP binding clefts,” *J. Mol. Biol.*, vol. 425, no. 18, pp. 3311–3324, 2013.
- [60] Y.-G. Chang, R. Tseng, N.-W. Kuo, and A. LiWang, “Rhythmic ring-ring stacking drives the circadian oscillator clockwise,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 42, pp. 16847–16851, 2012.
- [61] J. L. Martin, “Thioredoxin -a fold for all reasons,” *Structure*, vol. 3, no. 3, pp. 245–250, 1995.
- [62] J. Snijder, J. M. Schuller, A. Wiegard, P. Lössl, N. Schmelling, I. M. Axmann, J. M. Plitzko, F. Förster, and A. J. R. Heck, “Structures of the cyanobacterial circadian oscillator frozen in a fully assembled state,” *Science*, vol. 1184, no. March, pp. 1181–1184, 2017.
- [63] M. Sugiyama, H. Yagi, K. Ishii, L. Porcar, A. Martel, K. Oyama, M. Noda, Y. Yunoki, R. Murakami, R. Inoue, N. Sato, Y. Oba, K. Terauchi, S. Uchiyama, and K. Kato, “Structural characterization of the circadian clock protein complex composed of KaiB and KaiC by inverse contrast-matching small-angle neutron scattering,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. August, pp. 2–8, 2016.
- [64] T. Nishiwaki, Y. Satomi, M. Nakajima, C. Lee, R. Kiyohara, H. Kageyama, Y. Kitayama, M. Temamoto, A. Yamaguchi, A. Hijikata, M. Go, H. Iwasaki, T. Takao, and T. Kondo, “Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942,”

- Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 38, pp. 13927–13932, 2004.
- [65] X. Qin, M. Byrne, T. Mori, P. Zou, D. R. Williams, H. Mchaourab, and C. H. Johnson, “Intermolecular associations determine the dynamics of the circadian KaiABC oscillator,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 33, pp. 14805–14810, 2010.
- [66] T. Mori, D. R. Williams, M. O. Byrne, X. Qin, M. Egli, H. S. Mchaourab, P. L. Stewart, and C. H. Johnson, “Elucidating the ticking of an in vitro circadian clockwork,” *PLoS Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 841–853, 2007.
- [67] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P. G. Righetti, “Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis,” *Electrophoresis*, vol. 25, no. 9, pp. 1327–1333, 2004.
- [68] M. M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [69] C. Joo, H. Balci, Y. Ishitsuka, C. Buranachai, and T. Ha, “Advances in Single-Molecule Fluorescence Methods for Molecular Biology,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 51–76, 2008.
- [70] W. J. Greenleaf, M. T. Woodside, and S. M. Block, “High-Resolution, Single-Molecule Measurements of Biomolecular Motion,” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 36, no. 1, pp. 171–190, 2007.
- [71] J. L. S. Milne and S. Subramaniam, “Cryo-electron tomography of bacteria: Progress, challenges and future prospects,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 9, pp. 666–675, 2009.
- [72] V. Lučić, A. Rigort, and W. Baumeister, “Cryo-electron tomography: The challenge of doing structural biology in situ,” *J. Cell Biol.*, vol. 202, no. 3, pp. 407–419, 2013.
- [73] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, “Atomic Force Microscope,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933, 1986.
- [74] T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito, and A. Toda, “A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 22, pp. 12468–12472, 2001.
- [75] T. Ando, T. Uchihashi, and T. Fukuma, “High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes,” *Prog. Surf. Sci.*, vol. 83, no. 7–9, pp. 337–437, 2008.
- [76] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando, “Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy,” *Nature*, vol. 468, pp. 72–76, 2010.
- [77] T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando, and H. Noji, “High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Rotary Catalysis of Rotorless F1-ATPase,” *Science*, vol. 333, no. 6043, pp. 755–758, Aug. 2011.
- [78] M. Shibata, H. Nishimasu, N. Kodera, S. Hirano, T. Ando, T. Uchihashi, and O. Nureki,

- “Real-space and real-Time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [79] Y. Martin, C. C. Williams, and H. K. Wickramasinghe, “Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale,” *J. Appl. Phys.*, vol. 61, no. 10, pp. 4723–4729, 1987.
- [80] G. Meyer and N. M. Amer, “Novel optical approach to atomic force microscopy,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 53, no. 12, pp. 1045–1047, 1988.
- [81] M. Kitazawa, K. Shiotani, and A. Toda, “Batch fabrication of sharpened silicon nitride tips,” *Japanese J. Appl. Physics, Part 1 Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.*, vol. 42, no. 7 B, pp. 4844–4847, 2003.
- [82] M. Wendel, H. Lorenz, and J. P. Kotthaus, “Sharpened electron beam deposited tips for high resolution atomic force microscope lithography and imaging,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 67, no. 1995, p. 3732, 1995.
- [83] H. Iwasaki, T. Nishiwaki, Y. Kitayama, M. Nakajima, and T. Kondo, “KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 99, no. 24, pp. 15788–15793, 2002.
- [84] R. Tseng, Y. G. Chang, I. Bravo, R. Latham, A. Chaudhary, N. W. Kuo, and A. Liwang, “Cooperative KaiA-KaiB-KaiC interactions affect KaiB/SasA competition in the circadian clock of cyanobacteria,” *J. Mol. Biol.*, vol. 426, no. 2, pp. 389–402, 2014.
- [85] R. Pattanayek, D. R. Williams, S. Pattanayek, T. Mori, C. H. Johnson, P. L. Stewart, and M. Egli, “Structural model of the circadian clock KaiB-KaiC complex and mechanism for modulation of KaiC phosphorylation,” *EMBO J.*, vol. 27, no. 12, pp. 1767–1778, 2008.
- [86] Y.-G. Chang, N.-W. Kuo, R. Tseng, and A. LiWang, “Flexibility of the C-terminal, or CII, ring of KaiC governs the rhythm of the circadian clock of cyanobacteria,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 35, pp. 14431–14436, 2011.
- [87] S. Matsui, T. Kureha, S. Hiroshige, M. Shibata, T. Uchihashi, and D. Suzuki, “Fast Adsorption of Soft Hydrogel Microspheres on Solid Surfaces in Aqueous Solution,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 56, no. 40, pp. 12146–12149, 2017.
- [88] M. Nakajima, H. Ito, and T. Kondo, “In vitro regulation of circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial clock protein KaiC by KaiA and KaiB,” *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 5, pp. 898–902, 2010.
- [89] M. J. Rust, J. S. Markson, W. S. Lane, D. S. Fisher, and E. K. O. Shea, “Ordered Phosphorylation Governs Oscillation of a Three-Protein Circadian Clock,” *Science*, vol. 318, pp. 809–812, 2007.
- [90] M. Egli and Carl H. Johnson, “A circadian clock nanomachine that runs without transcription or translation,” vol. 5, pp. 732–740, 2013.
- [91] C. Phong, J. S. Markson, C. M. Wilhoite, and M. J. Rust, “Robust and tunable circadian rhythms from differentially sensitive catalytic domains,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 3, pp. 1124–



- 1129, 2013.
- [92] J. Lin, J. Chew, U. Chockanathan, and M. J. Rust, “Mixtures of opposing phosphorylations within hexamers precisely time feedback in the cyanobacterial circadian clock,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 37, pp. E3937–E3945, 2014.
- [93] K. Oyama, C. Azai, K. Nakamura, S. Tanaka, and K. Terauchi, “Conversion between two conformational states of KaiC is induced by ATP hydrolysis as a trigger for cyanobacterial circadian oscillation,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. May, pp. 1–11, 2016.
- [94] X. Qin, M. Byrne, Y. Xu, T. Mori, and C. H. Johnson, “Coupling of a core post-translational pacemaker to a slave transcription/translation feedback loop in a circadian system,” *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 6, 2010.
- [95] A. T. D. Imoh and N. Ansell, “Resilient circadian oscillator revealed in individual cyanobacteria,” *Nature*, vol. 430, pp. 81–85, 2004.
- [96] J. R. Chabot, J. M. Pedraza, P. Luitel, and A. Van Oudenaarden, “Stochastic gene expression out-of-steady-state in the cyanobacterial circadian clock,” *Nature*, vol. 450, no. 7173, pp. 1249–1252, 2007.
- [97] 久美子伊藤 (三輪), “シアノバクテリアの概日時計タンパク質KaiCが 1日を計る仕組み,” vol. 24, no. 1, pp. 23–29, 2018.
- [98] H. Iwasaki and T. Kondo, “The current state and problems of circadian clock studies in cyanobacteria,” *Plant Cell Physiol.*, vol. 41, no. 9, pp. 1013–1020, 2000.
- [99] H. Iwasaki, S. B. Williams, Y. Kitayama, M. Ishiura, S. S. Golden, and T. Kondo, “A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria,” *Cell*, vol. 101, no. 2, pp. 223–233, 2000.