

研究課題別評価書

1. 研究課題名

時間と共に離合集散を繰り返す分子機械のX線小角散乱・動的構造解析

2. 氏名

秋山 修志

3. 研究のねらい

本研究課題の目的は、形状・数を変化させながら離合集散する分子機械の研究手法としてX線小角散乱が有用であることを提案し、それを藍藻の生物時計を題材とした研究を通じて実証することである。

藍藻は生物時計を備えた単細胞生物であり、その時計タンパク質(KaiA、KaiB、KaiC)とATPを試験管内で混合すると、KaiC のリン酸化状態が概日周期で振動する。この興味深い生命現象を解明するべく、時計タンパク質の構造生物学的研究が精力的に進められてきた。今日、3種の時計タンパク質についてX線結晶構造が解明されている。しかし、静的な構造情報を個々についてどれほど深めても、それらがどう自己組織化し、概日振動が生み出されるのか解明することはできない。

自律振動の発現には Kai タンパク質複合体の形成が重要であると予測されるが、それらが離合集散するため、複合体の構造や組成については不明である。離合集散系の構造解析はどのようにすれば良いだろうか。離合集散する Kai タンパク質同士の相互作用が本質的に強固とは考えにくく、複合体を結晶化するためには何らかの方法で反応をトラップする必要がある。ダイナミクス計測という点で NMR は魅力的であるが、KaiC は分子量が大きく扱いづらい。

X線小角散乱から得られる情報は低分解能であるが、タンパク質分子の大きさ・形状の時間発展を水溶液中で検証できる。本研究を通じてX線小角散乱の測定・解析技術を向上させ、離合集散系を解明するための計測分析技術として成熟させる。

4. 研究成果

最初に、Kai タンパク質 3 種の離合集散ダイナミクスを丁寧に計測した。KaiA、KaiB、KaiC を ATP と混合して反応を開始させ、各測定時刻に一定量の試料を反応溶液より抽出した。その一部をX線小角散乱測定に、残りを KaiC リン酸化状態の定量に使用した。入射X線と同方向に散乱されたX線の強度 $I(0)$ は、試料の重量平均分子量に比例するため、Kai タンパク質の会合状態や蓄積量の変化に敏感である。 $I(0)$ は劇的に変化し、 24.4 ± 0.2 h の周期で力強く振動することが明らかとなった(図1・○)。この結果は、KaiC のリン酸化状態と同様に(図1・□)、Kai タンパク質間の相互作用もまた概日振動していることを示しており、溶液中でタンパク質が離合集散することを直接的に証明することに成功した。

次に、2 種間相互作用(KaiAC、KaiBC、KaiAB複合体)に焦点を当てた研究を行い、複雑な3種間相互作用を解明するためのデータを収集した。一定量のKaiCに様々な量のKaiA(もしくはKaiB)を混合し、30度で十分に平衡化させた後にX線小角散乱測定を行った。系に加えたKaiA全濃度に対して $I(0)$ をプロットしたところ(図2・□)、 $I(0)$ は初めに急激な増加を示し、そのあと滑らかな曲線を描きつつ緩やかな単調増加へと至った。一方、KaiBとKaiCの組み合わせで

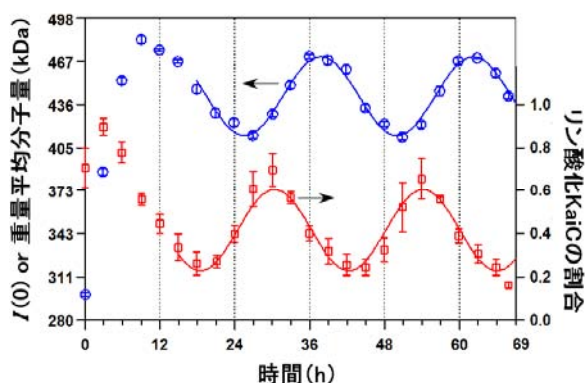


図1 Kai タンパク質の離合集散と KaiC リン酸化状態

KaiA、KaiB、KaiC を混合し、リン酸化 KaiC の割合(□)を SDS-PAGE で、原点散乱強度 $I(0)$ (○)をX線小角散乱で定量した。 $I(0)$ は試料の重量平均分子量に比例する。

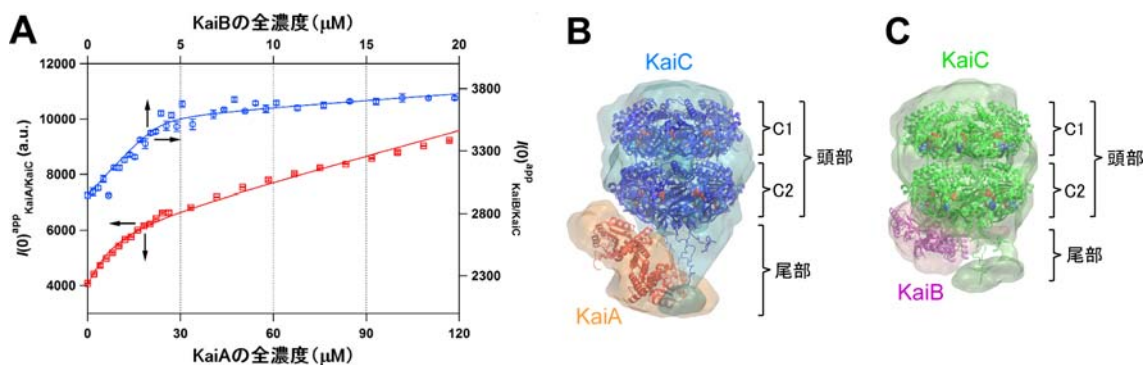


図2 Kai タンパク質複合体のX線小角散乱モデル

A: X線小角散乱を用いた滴定実験。一定量の KaiC に KaiA(□)もしくは KaiB(○)を滴定し、 $I(0)$ の変化を追跡した。実線は1対1結合モデルの理論曲線を示す。B: KaiAC 複合体の低分解能モデル。図中、リボンモデルは小角散乱モデルに当てはめたX線結晶構造を表す。C: KaiBC 複合体の小角散乱モデル。

は(図2A・○), $I(0)$ は急勾配の直線的増加の後、約4 μM (~1当量)のKaiB濃度で鋭い屈曲点を生じて飽和に達した。これら滴定曲線の解析から、KaiAとKaiCの解離定数(K_d)が 4.7 ± 0.7 μM , KaiBとKaiCの組み合わせでは $K_d = 0.12 \pm 0.08$ μM と求められ、結合比はともに1対1となった。以上の結果は、KaiBCの相互作用がKaiACの組み合わせよりも約40倍強いことを示す。また、同様の実験をKaiAとKaiBの組み合わせで行い、直接的な2者間相互作用がないことを確認した。

1対1結合モデルと K_d に基づいて複合体の散乱曲線を見積り、各々の散乱曲線を説明する低分解能モデルを構築した。KaiAC複合体は150 x 150 x 110 Åの大きさからなる。KaiCは全体積の80%を占め(図2B・青色)、球状の頭部と短い尾部で構成される。興味深いことに、頭部の中央には空洞が観察され、KaiCの結晶構造を一意的にフィットすることができた。KaiCの頭部はC1とC2と呼ばれるドメインで構成されており、KaiAに相当する残り20%の電子密度(図2B・橙色)はC2ドメインと尾部近傍に局在化していた。KaiBC複合体は140 x 130 x 100 Åの寸法からなり、KaiAC複合体よりもわずかにコンパクトであった。KaiAC複合体と同様にKaiCに特徴的な電子密度(図2C・緑色)が確認でき、全体積の13%にあたるKaiBの電子密度(図2B・紫色)はC2ドメインと相互作用していることが示された。

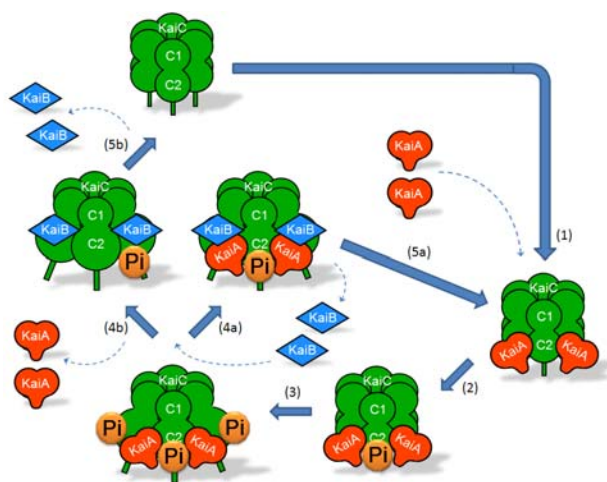


図3 Kai タンパク質の離合集散モデルの概略

(1)脱リン酸化 KaiC へ KaiA が結合する。(2~3)KaiC がリン酸化される。(4a)KaiAC 複合体に KaiB が結合し、KaiABC 複合体が形成される。(4b)KaiAC 複合体に KaiB が接近し、結合していた KaiA と入れ替わって KaiBC 複合体を形成する。(5a~5b)KaiC が脱リン酸化された後、KaiB が解離する。

2種間および3種間相互作用の計測データを用い、3つの歯車が何時どのように噛み合わさって機能するかを詳しく検証した。実験データを最も矛盾なく説明することができたのは、図3に示されるような反応サイクルであった。重要な知見の一つは、KaiCと相互作用を形成するタイミングがKaiAとKaiBで大きく異なり、両者の性質がウサギとカメのように対照的である点である。KaiAは勢いよくスタートダッシュを切ってKaiCへと結合し、速やかにKaiCをリン酸化する(図3-1), KaiBはリン酸化が終了した頃に遅れてやってきてKaiCと結合し(図3-4a,4b), 徐々に脱リン酸化しつつKaiCより解離する(図3-5a,5b)。 $I(0)$ の位相がKaiCリン酸化状態の位相より4分の1周期遅れていた理由は(図1), このような対照的な相互作用に起因している。

もう一つの発見は、KaiAとKaiBの切り

替え機構である。最初に KaiAC 複合体が生じ(図 3-1), KaiC が十分にリン酸化を受けた後に KaiB がやってくるが, X線小角散乱モデルは2通りのシナリオを示唆する。1つは KaiB が KaiA の近傍に結合し(図 3-4a), KaiABC 複合体を形成して KaiA を阻害する場合である。もう一つの可能性は(図 3-4b), KaiB が KaiA を押しのけて入れ替わる可能性である。複合体モデルをよく観察すると, KaiC に対する結合位置が KaiA と KaiB で類似している(図 2B, C)。KaiBC 複合体は KaiAC 複合体よりも安定であるため, 図 3-4b の反応は熱力学的に十分可能である。

KaiABC 複合体, KaiB C 複合体の状態では共に KaiA の機能が抑制されている。脱リン酸化が進行した後に KaiB が解離し(図 3-5a,5b), サイクルは元に戻る。我々の実験データは, 反応系路上に枝分かれが存在することを示唆し, KaiBC と KaiABC 複合体が同時期に蓄積するという生化学研究の結果に構造的基盤を与えるものである。

X線小角散乱を用いた本研究により, 複合体構造と離合集散ダイナミクスが可視化され, Kai タンパク質が時を刻む機構の一端が明らかとなった。今後, $I(0)$ だけでなく散乱曲線全体を利用した実験と解析を進め, 発振機構がより詳細に解明されるよう努めたい。

5. 自己評価

本課題には二つの目標がある。一つは, 自律振動系に含まれる全化学種の「構造」と「濃度の時間変化」を決定すること, すなわち反応の時間・空間発展を可視化することである。 $I(0)$ を通して離合集散ダイナミクスを高精度に記録し, 「濃度の時間変化」を解明することに成功した。この点については十分に目的を達成できたと考える。

一方, 「構造」については一部の化学種について決定することができなかった。滴定実験を行った平衡状態では KaiA と KaiC, また KaiB と KaiC は 1 対 1 の複合体を形成していた(図 2B, C)。しかし, 振動ダイナミクスの実験データは 2 対 1 の高次複合体が関与することを示している。このような理由から, 本研究期間中に究極の目的を達成するに至らなかった点が残念である。今後, KaiC のリン酸化状態を調整しつつ, ストップ・フロー等を用いた時間分解 X 線小角散乱を行い, 短寿命の高次複合体を補足し構造決定する必要がある。

もう一つの目的は, 藍藻の生物時計を題材とした研究を通して, X線小角散乱の測定・解析技術を向上させることである。これについては主に二つの進展があった。第一に, 長時間にわたる定量的なダイナミクス計測を現実的なものとすることができた。Kai タンパク質の生理的濃度は決して高くなく, 合計でも 1 mg/ml を超えない希薄溶液である。放射光を用いた計測でも数 mg/ml の試料を要することを考えれば, 測定が容易でないことは明らかである。また, この希薄溶液から発せられる信号の約 6%が時間変化として観察されるわけで, その微弱な揺らぎを数日にわたって安定に計測しなければならない。

この目的を達成する上で, SPring-8 が供給する安定したビームは必要不可欠であった。それに加え, 試料調製, ビーム強度補正, 検出器選定といった点で試行錯誤があった(BL45 XU)。これらの努力と研究成果について, 海外の著名な研究者より称賛の言葉を頂き, また国際学会での講演に招待頂けたことは, 現在でも大きな励みとなっている。また, この過程で積み重ねた技術基盤は, 生物時計に代表される概日性, より長時間にわたるダイナミクス計測に役立つと考える。

第二に, 結晶性の良くないタンパク質複合体の構造解析法へ一つの可能性を提示することができた。Kai タンパク質の結晶構造が発表されて4年経つが, 複合体の結晶構造は未だに報告されていない。本質的に弱く・交換性の高い相互作用を可視化する技術の一つとして, X 線小角散乱が有望であることを示した点は評価に値すると考える。以上を総合すると, 想定外の結果や困難も多数あったが, 3 年間にわたって独創的なさきがけ研究を展開することができたと考える。

6. 研究総括の見解

藻類の生物時計タンパク質(KaiA, KaiB, KaiC)が ATP と反応して概日振動が生ずる構造生物学的研究である。溶液中で離合集散を繰り返すこれらのタンパク質の動態を X 線小角散乱測定によって見事に解析したことは極めて高く評価される。測定技術の工夫、試料の取り扱い

はもとよりいろいろなモデル反応系を想定して緻密な解析を行っている。完成度は高いが残された課題もあり更に完成度を高めていただきたい。本研究者はこの研究で国内外においていくつかの賞を受賞されていることを付け加えておきたい。

7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・S. Yamada, S. Akiyama, H. Sugimoto, H. Kumita, K. Ito, T. Fujisawa, H. Nakamura and Y. Shiro, “The Signaling Pathway in Histidine Kinase and the Response Regulator Complex Revealed by X-ray Crystallography and Solution Scattering”, J. Mol. Biol. 362, 123-139 (2006).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, “Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome”, Molecular Cell, 29, 703-714 (2008).

(2) 特許出願 なし

(3) 受賞

・S. Akiyama, XIII International Conference on Small-angle Scattering, 2006 SAS Young Scientist Prize (2006 年 7 月).

・秋山 修志, 日本生物物理学会 若手奨励賞(2007 年 12 月).

・秋山 修志, 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2008 年 4 月).

(4) 著書

・秋山 修志, “X線小角散乱でみた蛋白質の構造変化・離合集散”, 生物物理, 47, 133-138 (2007).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, “Real-time Small-angle X-ray Scattering Observation of Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Periodosome”, SPring-8 Research Frontiers 2007, 24-25, (2008).

・秋山 修志, “リアルタイムX線小角散乱で観察した藍藻時計タンパク質の離合集散ダイナミクス”, 放射光, 21, 305-312 (2008).

・秋山 修志, “リアルタイムX線小角散乱でみた藍藻時計タンパク質の離合集散ダイナミクス”, 生物物理, in press (2009).

(5) 学会発表

学会発表(国際)

・S. Akiyama, K. Ito, Y. Maéda and T. Kondo, “Small-angle X-ray Scattering Studies on Assembling-Disassembling Complexes of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins”, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006/11/12~16).

・A. Nohara, K. Ito, Y. Maéda, T. Kondo and S. Akiyama, “Real-Time SAXS Observation of Assembling-Disassembling Cycles of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins”, Fifth East

Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006/11/12~16).

•S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, “Real-time SAXS Observation of Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins”, The 67th Okazaki Conference (2007/11/10-12).

•S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, “Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome”, IUCr2008 Satellite Meeting (2008/8/23-24).

•S. Akiyama, “Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Clock Proteins”, 日独先端科学(JGFoS)シンポジウム (2008/10/31-11/2).

学会発表(国内)

•秋山 修志, 野原 淳志, 伊藤 和輝, 前田 雄一郎, “X線小角散乱でみたシアノバクテリア時計タンパク質の離合集散ダイナミクス”, 第 34 回 生体分子科学討論会 (2007/6/23).

•野原 淳志, 前田 雄一郎, 伊藤 和輝, 西脇 妙子, 景山 伯春, 近藤 孝男, 秋山 修志, “X線小角散乱を用いたシアノバクテリア由来の時計蛋白質KaiCの構造変化”, 第45回日本生物物理学会年会 (2007/12/23).

•秋山 修志, 野原 敦志, 伊藤 和輝, 前田 雄一郎, 近藤 孝男, “X線小角散乱計測より推察した藍藻時計タンパク質の構造変化と発振機構”, 第 35 回生体分子科学討論会 (2008/6/27).

•秋山 修志, 野原 敦志, 伊藤 和輝, 前田 雄一郎, 近藤 孝男, “リアルタイムX線小角散乱を利用した藍藻時計タンパク質の離合集散計測”, 第 15 回日本時間生物学会学術大会 (2008/11/8-9).

•S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito, Y. Maeda, T. Nishiwaki and T. Kondo, “Small-angle X-ray Scattering Study on Cyanobacterial Clock Proteins”, 第 46 回日本生物物理学会年会 (2008/12/3).

(6)招待講演

招待講演(国際)

•S. Akiyama, S. Yamada, H. Sugimoto, H. Kumita, K. Ito, T. Fujisawa, H. Nakamura and Y. Shiro, “Signal Transduction Pathway in Histidine Kinase and Response Regulator Complex Revealed by Joint Usage of Crystallography and Small-Angle X-ray Scattering”, XIII International Conference on Small-angle Scattering (2006/7/11).

•S. Akiyama, “Real-time SAXS Observation of Assembling-Disassembling Complexes of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins”, 9th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation(2007/8/12-16).

•S. Akiyama, “Real-time Small-Angle X-ray Scattering Study of Assembly and Disassembly Cycles of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins”, American Crystallographic Association 2008 Annual Meeting (2008/6/2).

•S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, “Real-time SAXS Observation of Assembly

and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Clock Proteins”, IUCr2008 (2008/8/27).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito, Y. Maeda and T. Kondo, “Real-time SAXS Observation of Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Clock Proteins”, NSRRC Workshop X-ray Crystallography / Spectroscopy (2008/10/9).

招待講演(国内)

・秋山 修志, 野原 淳志, 伊藤 和輝, 前田 雄一郎, “リアルタイムX線小角散乱でみたシアノバクテリア時計蛋白質の離合集散ダイナミクス”, 第 45 回日本生物物理学会年会 若手奨励賞講演 (2007/12/21).

・秋山 修志, “時分割X線小角散乱によるシアノバクテリア時計タンパク質の離合集散ダイナミクス計測”, ERL サイエンス研究会1 (2008/3/17).

(B)その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・T. Uzawa C. Nishimura, S. Akiyama, K. Ishimori, S. Takahashi, H. J. Dyson and P. E. Wright, “Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultra-fast H/D exchange coupled with 2D NMR”, PNAS, 105, 13859–13864 (2008).

・K. Inaba, M. Suzuki, K. Maegawa, S. Akiyama, K. Ito and Y. Akiyama, “A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of E. coli”, J. Biol. Chem., 283, 35042–35052 (2008).

(2)招待講演

招待講演(国内)

・秋山 修志, “蛋白質の構造変化の仕組みを探る ～ X線小角散乱 ～”, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の構造変化の仕組みを探る」(2008/3/3).

・秋山 修志, “X線小角散乱に流行の兆し ～ 基礎的な注意点とこれからの展望 ～”, 第 21 回生物無機化学夏季セミナー (2008/8/2).