

## 階層分子システム解析研究部門

秋山 修志 (教授) (2012年4月1日着任)

向山 厚 (助教)  
古池 美彦 (助教)  
DUBERN, Lucie (インターンシップ)  
LEDOIGT, Magali (インターンシップ)  
SIMON, Damien (大学院生)  
鷺尾 みどり (技術支援員)  
杉坂 かな恵 (技術支援員)  
大原 さとみ (技術支援員)  
山本 優里桂 (技術支援員)  
谷浦 愛子 (技術支援員 (派遣))  
蜂須賀 円 (技術支援員 (派遣))  
鈴木 博子 (事務支援員)

A-1) 専門領域：生物物理学, 時間生物学

A-2) 研究課題：

- a) タンパク質時計が奏でる概日リズムの分子科学的解明
- b) X線溶液散乱による生体分子システムの動的構造解析

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) シアノバクテリアをモデル系とした概日時計研究に取り組み、独自性の高い数々の研究 (Furuike *et al.*, *Sci. Adv.* 2022; Furuike *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2022; Furuike *et al.*, *Commun. Phys.* 2022; ; Mukaiyama *et al.*, *Biochem. J.* 2022; Simon *et al.*, *Biophys. Physicobiol.* 2022; Ito-miwa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020; Mukaiyama *et al.*, *Sci. Rep.* 2018; Abe *et al.*, *Science* 2015) や国際基調講演 (SRBR 2022; 5<sup>th</sup> Asian Forum on Chronobiology 2021; ELSI Symposium 2020; V-WCC 2019) をとおして、「概日時計システムの周波数特性が、ごく限られた種類の構成因子にエンコードされている」という新概念を提示した (長瀬研究振興賞 2022; 日本学術振興会賞 2016; 文部科学大臣表彰若手科学者賞 2008; 日本生物物理学会若手奨励賞 2007; 2006 SAS Young Scientist Prize from IUCr)。その間、複数の研究プロジェクト (さきがけ研究 [2005 ~ 2008 年度], 若手研究 (A) [2010 ~ 2012 年度], 基盤研究 (B) [2013 ~ 2015 年度], 基盤研究 (S) [2017 ~ 2021 年度], 基盤研究 (S) [2022 ~ 2026 年度] 等) で代表者を務め、国内外の研究コミュニティの拡大に尽力するとともに (S. Akiyama, *Biophys. Physicobiol.* 2021; S. Akiyama, *Circadian Rhythms in Bacteria and Microbiomes* 2021; S. Akiyama, *Biophys. Rev.* 2020; Mukaiyama *et al.*, *Biol. Rhythms* 2019; Akiyama *et al.*, *Biol. Clocks* 2017; S. Akiyama, *Cell. Mol. Life. Sci.* 2012), 直近では以下に詳述する波及効果の高い成果 (4 件) を輩出してきた。一つ目は、KaiC に隠されたアロステリック制御の解明である (Furuike *et al.*, *Sci. Adv.* 2022; Furuike *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2022; Mukaiyama *et al.*, *Biochem. J.* 2022)。複雑多様なアロステリック制御は細胞機能に振動現象をもたらす非線形性の源であるため、時計タンパク質のアロステリック構造転移を解明するための努力が続けられてきた。しかし、これまでに報告されている KaiC の全構造は、リン酸化修飾の有無に依らず構造が同一であり、概日リ

リズムを駆動するアロステリーについては理解が進んでいなかった。我々は、S431とT432のリン酸化修飾サイクルを網羅する4つの異なる状態のKaiCを結晶化し、検出された複雑多様なアロステリーを詳細に分析することで、KaiCの振動性に必須となる最小単位のアロステリーを特定した。

二つ目は、KaiCの温度補償性に関する成果である (Furuike *et al.*, *Commun. Phys.* 2022)。時計タンパク質は、酵素活性を生理的な温度範囲で一定に保つ温度補償能を有する。他方、酵素を構成するアミノ酸は高温でより頻繁に揺らぎ、それに伴って酵素活性が上昇する傾向が一般的にみられる。よって、温度補償能を有する概日時計タンパク質のダイナミクスが特殊な制御を受けている可能性があるが、それを実験的に証明した例は皆無である。我々は、温度補償型ATPaseであるKaiCのダイナミクスに及ぼす温度の影響を中性子準弾性散乱法で精査した。その結果、KaiCが揺らぎを利用しつつ、高温下でC1-ATPase活性が上昇しないように自律制御していることが明らかとなった。酵素が自らの活性を高めるためだけでなく、恒常性を実現する自律的手段として揺らぎを積極的に利用していることを示す独自性の高い研究成果である。

三つ目は、超短周期(0.6 d = 15 h)から超長周期(6.6 d = 158 h)にわたる多様なリズムを表出せしめる同一サイト(Y402)点変異群の発見である (Ito-miwa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020)。温度補償された600%に及ぶ周期長変化を説明する発振モデルは皆無であり、本発見を機に、既存モデルの根本的な書き換えを迫られるであろう。本発見は、概日リズムの基本設計を原点に立ち返って議論しなおすきっかけを世界中の研究者に与え得るだけでなく、概月リズム(海洋生物の産卵、人間の月経周期)や概年リズム(動物の冬眠/繁殖、植物の花芽形成)の設計原理にも指針を与え得るもので、関連分野でも相当の関心を集めている。

四つ目は、概日時計の絶対的な遅さの起源解明である (Furuike *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2022; Simon *et al.*, *Biophys. Physicobiol.* 2022; Abe *et al.*, *Science* 2015)。概日時計は、ゆっくりとした秩序ある細胞ダイナミクスを生み出すが、高速で動く生体高分子で構成されているため、全体としての遅さの原因は不明であった。我々は、周期を規定するC1-ATPaseの遅さが、加水分解に用いられる水分子の隔離や、高い活性化エネルギーを有するペプチド異性化に起因していることを解明した。本成果は国内外の化学誌 (ChemistryWorld June 2015, 現代化学 2015)、専門家評価コメント (<http://smc-japan.org/?p=4072>)、国内の新聞記事(毎日新聞、日本経済新聞)等で取り上げられ、学術的な新規性が世界的に高く評価されている。

それ以外にも、名古屋大学卓越大学院プログラム(トランスフォーマティブ化学生命融合研究大学院プログラム)との連携活動として、同大学農学部の吉村崇教授らとの共同研究を実施して成果を取りまとめた (Maruyama *et al.*, *PLoS ONE* 2022)。

- b) 生体分子システム(時計タンパク質、抗酸化酵素、受容体など)のX線溶液散乱を記録し、散乱データと結晶構造の比較や低分解能モデルの構築を通して、分子システムの動的構造解析を行った (Okumura *et al.*, *Structure* 2021)。

#### B-1) 学術論文

**Y. FURUIKE, D. OUYANG, T. TOMINAGA, T. MATSUO, A. MUKAIYAMA, Y. KAWAKITA, S. FUJIWARA and S. AKIYAMA**, "Cross-Scale Analysis of Temperature Compensation in the Cyanobacterial Circadian Clock System," *Commun. Phys.* **5(1)**, 75 (2022). DOI: 10.1038/s42005-022-00852-z

**Y. FURUIKE, A. MUKAIYAMA, D. OUYANG, K. ITO-MIWA, D. SIMON, E. YAMASHITA, T. KONDO and S. AKIYAMA**, "Elucidation of Master Allosteric Essential for Circadian Clock Oscillation in Cyanobacteria," *Sci. Adv.* **8(15)**, eabm8990 (2022). DOI: 10.1126/sciadv.abm8990

**Y. FURUIKE, A. MUKAIYAMA, S.-I. KODA, D. SIMON, D. OUYANG, K. ITO-MIWA, S. SAITO, E. YAMASHITA, T. NISHIWAKI-OHKAWA, K. TERAUCHI, T. KONDO and S. AKIYAMA**, “Regulation Mechanisms of the Dual ATPase in KaiC,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119(19)**, e2119627119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2119627119

**A. MUKAIYAMA, Y. FURUIKE, E. YAMASHITA and S. AKIYAMA**, “Highly Sensitive Tryptophan Fluorescence Probe for Detecting Rhythmic Conformational Changes of KaiC in the Cyanobacterial Circadian Clock System,” *Biochem. J.* **479(14)**, 1505–1515 (2022). DOI: 10.1042/bsj20210544

B-4) 招待講演

**S. AKIYAMA**, “Molecular Aspects of Circadian Clock Evolution,” Seminar, Nagoya, 2022年9月.

秋山修志, 「どうして生物の24時間リズムは安定なのか?」, 2022年度量子ビームサイエンスフェスタ, つくば市, 2023年3月.

秋山修志, 「概日時計システムに夜明けを告げる時計タンパク質の自律的な複合体解離」, 日本化学会第103回春季年会, 野田市, 2023年3月.

古池美彦, 「原子分解能でみた概日時計の朝夕昼夜」, 日本生物物理学会年会 若手奨励賞選考会, 函館, 2022年9月.

古池美彦, 「放射光X線で照らす時計タンパク質KaiCの概日振動メカニズム」, SPring-8 シンポジウム 2022 Young Scientist Award 受賞講演, 兵庫県相生町, 2022年9月.

**S. AKIYAMA**, “Molecular Aspects of Circadian Clock Evolution Inspired by the Example of Cyanobacteria,” SRBR 2022 Biennial Conference, Amelia Island (USA), May 2022.

**S. AKIYAMA**, “Autonomous Disassembly of Circadian Clock System at Dawn,” The 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan, Hakodate (Japan), September 2022.

B-6) 受賞, 表彰

秋山修志, (公財)長瀬科学技術振興財団 長瀬研究振興賞 (2022).

古池美彦, 日本生物物理学会若手奨励賞 (2022).

古池美彦, 日本結晶学会進歩賞 (2022).

古池美彦, SPring-8 ユーザー協同体 The SPRUC 2022 Young Scientist Award (2022).

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本時間生物学会 評議員 (2017–). (向山 厚)

学会の組織委員等

第61回(2023年)日本生物物理学会年会実行委員 (2022–). (向山 厚)

文部科学省, 学術振興会, 大学共同利用機関等の委員等

日本学術会議連携会員 (2020–2024).

SPring-8長期利用分科会委員 (2019–).

学会誌編集委員

*Biophysics and Physicobiology*, Editorial Board Members (2021–2025).

日本蛋白質科学会アーカイブ編集委員 (2017–). (向山 厚)

## 理科教育活動

港区立みなと科学館講演会講師 (2022). (古池美彦)

### B-8) 大学等での講義, 客員

名古屋工業大学, 非常勤講師, 2022年7月–2023年3月.

理化学研究所, 客員研究員, 2021年4月–2024年3月.

理化学研究所, 客員技師, 2021年4月–2024年3月. (古池美彦)

理化学研究所, 客員研究員, 2021年4月–2024年3月. (向山 厚)

### B-9) 学位授与

SIMON, Damien, 「Disassembly Mechanism of Circadian Clock Proteins in Cyanobacteria」, 2022年9月, 博士(理学).

### B-10) 競争的資金

長瀬科学技術振興財団研究助成, 「単純化指向型アプローチによるシアノバクテリア概日時計システムの源振動解明」, 秋山修志 (2022年度).

武田科学振興財団 2022年度生命科学研究助成, 「概日時計タンパク質 KaiC における構造多型の操作と解析」, 秋山修志 (2022年度–2026年度).

科研費挑戦的研究(萌芽), 「月面閉鎖生態系の構築を目指した改変型シアノバクテリアの設計」, 秋山修志 (2022年度–2023年度).

科研費基盤研究(S), 「概日時計の複雑多様性の単純化」(代表: 秋山修志), 古池美彦(研究分担者), 向山 厚(研究分担者) (2022年度–2026年度).

科研費若手研究, 「時計タンパク質の絡み合ったアロステリック運動を読み解く」, 古池美彦 (2022年度–2024年度).

科研費学術変革領域研究(B), 「時間タンパク質学」(計画研究), 「生命の時間を宿す機能的 KaiC ホモログの探索技術の開発」, 向山 厚 (2021年度–2023年度).

科研費基盤研究(C), 「原始概日時計の試験管内再構成」, 向山 厚 (2022年度–2024年度).

科研費学術変革領域研究(B), 「時間タンパク質学: 時を生み出すタンパク質特性の総括」(代表: 吉種光), 向山 厚(研究分担者) (2021年度–2023年度).

### C) 研究活動の課題と展望

2017年度から取り組んできた基盤研究(S) [統合的多階層アプローチによるシアノバクテリア生物時計システムの新展開: 2017 ~ 2021年度]が終了し, Kai タンパク質時計の普遍性と多様性の解明, ATPase /リン酸化構造基盤の解明, 温度補償性と揺らぎの関係性の解明, いずれにおいても当初の目標を上回る新発見があった(最終年度検証結果: A)。2022年度からは, 基盤研究(S) [概日時計の複雑多様性の単純化: 2022 ~ 2026年度], 挑戦的研究(萌芽) [月面閉鎖生態系の構築を目指した改変型シアノバクテリアの設計研究: 2022 ~ 2023年度], 長瀬科学技術振興財団 2022年度助成 [単純化指向型アプローチによるシアノバクテリア概日時計システムの源振動解明: 2022年度], 武田科学振興財団生命科学研究助成 [概日時計タンパク質 KaiC における構造多型の操作と解析への助成: 2022年度~]を中心に, 波及効果の大きい論文として公表できるよう, 今の質を堅持しつつも更にペースを上げて研究を進める。