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）

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) KaiC はシアノバクテリア概日時計システムの中核をなす時計タンパク質である。これまでの研究（*Science* 2015，*BIOPHYSICS* 2015，*Biophyis. Physicobiol.* 2016，*Sci. Rep.* 2018）を通して，

① KaiC の ATP 加水分解活性（ATPase）がシステムの発振周期（約 24 時間）を規定する重要な因子であること，

② KaiC の ATPase が抑制的制御を受けて低活性化（12 ATP d^{-1}）かつ温度補償（温度非依存）されていること，

③ ATPase の遅い時間スケールを分子システム全体に波及させる巧妙な仕組みが整備されていること，

等を明らかにしてきた。しかしながら，これら①～③を実現している構造基盤が KaiC のどこに位置しているのか依然として不明であった。そこで 2019 年度は，KaiC にアミノ酸置換を網羅的に導入した変異体ライブラリを作製し，そこから上記①～③の項目に影響を及ぼす時計変異体を効率的にスクリーニングする系を構築した。

変異体ライブラリを効率的に調製するための工夫として，変異体 KaiC の発現および精製の手順を大幅に見直した。具体的には，発現系のスケールダウン，並列処理を指向した精製工程のブロック化，アフィニティ・タグの最適化などに取り組み，これらの相乗効果によって複数のライブラリ候補を並列かつ迅速に調製できるようになった。他方，ライブラリから時計変異体を選別するための指標である ATPase 活性についても，計測手法の効率化と高感度化を実施した。これらの創意工夫により，全体として従来比 10 倍以上のスループットを実現し，多数の周期変異体や温度補償変異体を発見するに至った（*Int. J. Mol. Sci.* 2019）。これ以外にも，KaiC の進化系統樹に基づいたライブラリ・スクリーニング系を新たに確立した（*Int. J. Biol. Macromol.* 2019）。両スクリーニング法から得た結果をもとに，アミノ酸変異の「空間配置」と「機能への影響」の相関関係が整理され，①～③を実現している構造基盤が同定されるものと期待される。

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（*Nat. Chem. Biol.* 2019，*Free Radical Biol. Med.* 2019）。

B-1) 学術論文

D. OUYANG, Y. FURUIKE, A. MUKAIYAMA, K. ITO-MIWA, T. KONDO and S. AKIYAMA, “Development and Optimization of Expression, Purification, and ATPase Assay of KaiC for Medium-Throughput Screening of Circadian Clock Mutants in Cyanobacteria,” *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2789–2800 (2019). doi: 10.3390/ijms20112789

M. OKUMURA, K. NOI, S. KANEMURA, M. KINOSHITA, T. SAIO, Y. INOUE, T. HIKIMA, S. AKIYAMA, T. OGURA and K. INABA, "Dynamic Assembly of Protein Disulfide Isomerase in Catalysis of Oxidative Folding," *Nat. Chem. Biol.* **15**, 499–509 (2019). doi: 10.1038/s41589-019-0268-8

A. MUKAIYAMA, D. OUYANG, Y. FURUIKE and S. AKIYAMA, "KaiC from a Cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 Retains Functional and Structural Properties Required as the Core of Circadian Clock System," *Int. J. Biol. Macromol.* **131**, 67–73 (2019). doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.051

B-4) 招待講演（* 基調講演）

S. AKIYAMA, "Keynote Lecture "Frontiers of the Intermolecular Interactions Analysis of Biomolecules promoted by BioSAS," PF Workshop, Tsukuba (Japan), September 2019.* (*Keynote Lecture*)

S. AKIYAMA, "ATPase-Based in vitro Screening for KaiC Clock Mutants in Cyanobacteria," XVI Congress of the European Biological Rhythms Society, Lyon (France), August 2019.

S. AKIYAMA, "Cyanobacterial circadian clock system through the chemistry of rhythm, structure, and evolutionary diversity," V World Congress of Chronobiology, Suzhou (China), April 2019.* (*Keynote Lecture*)

秋山修志, "Biochemistry and Structure of Circadian Clock Protein, KaiC," 第92回日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 横浜, September 2019.

秋山修志,「地球の自転周期がエンコードされたタンパク質，KaiC」, 第13回分子科学討論会, 名古屋大学, 名古屋, September 2019.

B-6) 受賞，表彰

S. AKIYAMA, The Protein Society Annual Poster Board Award (2002).

S. AKIYAMA, 2006 SAS Young Scientist Prize (2006).

秋山修志, 日本生物物理学会若手奨励賞 (2007).

秋山修志, 平成20年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2008).

阿部　淳, 日本生物物理学会中部支部優秀発表賞 (2014).

向山　厚, 日本時間生物学会学術大会優秀ポスター賞 (2015).

秋山修志, 日本学術振興会賞 (2016).

秋山修志，向山　厚, 文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム平成28年度利用6大成果賞 (2017).

D. OUYANG, V World Congress of Chronobiology (Suzhou, China), The poster presentation award (2019).

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本生物物理学会理事 (2019–2020).

日本生物物理学会委員 (2011–2014).

日本生物物理学会代議員 (2017–2018).

日本生物物理学会分野別専門委員 (2010, 2012, 2015, 2016, 2017).

日本生物物理学会中部支部長 (2013–2015).

学会の組織委員等

第18回日本時間生物学会学術大会実行委員 (2011).

第12回日本蛋白質科学会年会組織委員 (2012).

第50回日本生物物理学会年会実行委員 (2012).

The Winter School of Sokendai/Asian CORE Program (Jan. 13–16, 2015), Organizer (2015).

Ｘ線溶液散乱講習会主催 (2015–).

Okazaki Conference 2017 on Grand Challenges in Small-angle Scattering, Organizer (2017).

文部科学省，学術振興会，大学共同利用機関等の委員等

SPring-8長期利用分科会委員 (2019–).

SPring-8利用研究課題審査委員会 (2011–2018).

学会誌編集委員

日本生物物理学会「生物物理」会誌編集委員 (2009–2011, 2013–2014).

日本生物物理学会「生物物理」会誌副編集委員長 (2016–2017).

日本放射光学会「放射光」会誌編集委員 (2013–2015).

日本結晶学会「日本結晶学会」会誌編集委員 (2010–2012).

B-10) 競争的資金

科学技術振興機構さきがけ研究,「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」, 秋山修志 (2005年–2009年).

科研費若手研究(B),「異常分散・Ｘ線小角散乱を利用した無配向生体高分子の２原子間距離計測」, 秋山修志 (2007年–2010年).

科研費若手研究(A),「時を生み出すタンパク質KaiCにおけるATPase自己抑制･温度補償機構」, 秋山修志 (2010年–2013年).

科研費挑戦的萌芽研究,「多チャンネル・セルを用いたハイスループットＸ線小角散乱」, 秋山修志 (2012年–2014年).

科研費若手研究(B),「溶液中における時計タンパク質KaiCの動態解析」, 向山　厚 (2013年–2014年).

科研費基盤研究(B),「時計タンパク質の固有周波数の分子科学的解明」, 秋山修志 (2013年–2015年).

科研費挑戦的萌芽研究,「時限機能付き薬剤輸送システムの開発」, 秋山修志 (2014年–2016年).

科研費新学術領域研究（研究領域提案型),「Ｘ線小角散乱と液中高速AFMの相補利用による分子時計の離合集散計測」, 秋山修志 (2014年–2016年).

科研費基盤研究(A),「生物時計システムの周期と温度補償制御ロジックの構造化学的解明」, 秋山修志 (2017年–2019年).

科研費基盤研究(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」, 秋山修志 (2017年–2021年).

C)　研究活動の課題と展望

概日時計システムの第１の性質にあたる遅さの起源については研究の見通しが立った。第２の性質に相当する温度補償性は概日時計に共通して観察される特徴であり，概日リズムが一般的な化学振動子と区別して扱われる理由の一つでもある。化学の世界では，「遅さ」と「温度補償性」は通常相容れない現象であるが，KaiCのATP加水分解反応は極端に遅く（12 d^{-1}）かつ温度補償制御されている（$Q_{10} = 1.0$）。基盤研究(S)の計画に沿って温度依存変異体の網羅的スクリーニングや構造ベースでの設計を行い，原子スケールの情報をもとに第１と第２の性質を互いに矛盾なく説明できるモデルを構築したい。