

# 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

秋山修志 名古屋大学大学院 理学研究科生命理学専攻 〒464-8602 愛知県名古屋市中種区不老町  
科学技術振興機構さきがけ  
理化学研究所播磨研究所 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

**要旨** 藍藻は生物時計を備えた単細胞生物であり、3種類の時計タンパク質からなるシンプルな自律振動系を持つ。時計タンパク質が時を刻む様子を X 線小角散乱でリアルタイム計測した結果を紹介し、時計の針を安定に進める仕組み、シンプルさの奥に潜む複雑さ、そして他の生命現象にも共通する今後の課題について考察する。

## 1. はじめに

無数の生体高分子がひしめく細胞内、そこは常に乗車率 200%の通勤ラッシュ状態である。我々は、どれほど通勤ラッシュで混雑していても、通行人と肩がぶつかっても、毎日同じ道りを経て目的地にたどり着く。これは、「定刻までに出勤する」という強い意志を持っているからである。興味深いのは、本来意志を持たないはずのタンパク質が、雑音の多い込み入った環境でもそつなく仕事をこなす点である。

たとえば大腸菌の場合、タンパク質や核酸といった生体高分子が細胞内に占める体積は全体の30% (~300 g/L)にも達する<sup>1)</sup>。細胞質はドロドロの状態にあり、希薄溶液を用いた生化学的な実験条件よりも著しく高精度である(拡散速度が低下する)。また、顕著な排除体積効果により、特定の生体高分子が感じる濃度(有効濃度)は実際よりも高くなる。よって、細胞質中を漂うタンパク質分子にしてみれば、繰り返される生体高分子や水分子との衝突により、その一瞬一瞬は摩擦や雑音に満ちたものとなる。にもかかわらず、タンパク質はあたかも意志を持っているかのごとく、特定の分子を選択的に補足したり、細胞内の特定部位に局在化したり、ある時刻に一斉に一方へ運動を開始したりする。このように本質的に乱雑である環境から、時間的・空間的に秩序ある現象が生じるのを目の当たりにすると、そこに何らかの意志(生命)を感じずにはいられない。本稿で紹介する藍藻の生物時計はその典型例であり、その時計タンパク質が“あたかも意思をもつかの如く”離合集散する様子を X 線小角散乱で観察した結果<sup>2)</sup>について解説する。

## 2. 藍藻の時計タンパク質

生物時計を改めて意識するのは、飛行機で海外出張したときである。あの耐えがたい日中の眠気、だるさ、夜間の覚醒…、我々が時計の発する概日リズム(24時間周期)を指針に昼夜環境サイクルへ適応しつつ生活していることの証である。これまでにバクテリアから哺乳類に至る様々な生物で時計が詳しく研究され<sup>3)</sup>、現在のところ、転写・翻訳振動モデルが広く受け入れられている。

その概要は次のようなものである(Fig. 1A)。時計遺伝子が転写され(①)、その mRNA が核外へと拡散する(②)。mRNA が翻訳され時計タンパク質が作り出される(③、④)。まるでサケが産卵のために生まれ育った川をさかのぼるがごとく、時計タンパク質の一部は再び核内へと移動し始める(⑤)。そして、自分自身を生み出す源である時計遺伝子の転写を阻害し(⑥)、時計タンパク質の増産にストップをかける。分解によって核内の時計タンパク質濃度が低くなると(⑦)、再び時計遺伝子の転写が再活性化され、次のサイクルが回り始める。転写・翻訳振動モデルの本質は、タンパク質や核酸といった多種多様な分子が関わっていること、そして概日振動を生み出すループが時間的・空間的スケールの異なる複数の生命現象により構成されている点である。

藍藻の生物時計が興味深いのは、転写・翻訳振動モデルを必要としない点である(Fig. 1B)。日本人研究者の努力により発見された3種類の藍藻時計タンパク質は、“回転”の“回”にちなんで KaiA, KaiB, KaiC と命名されている<sup>4)</sup>。KaiA は KaiC をリン酸化し、KaiB は KaiA の機能を抑制することで KaiC の脱リン酸化を促す(KaiC は単独で自己脱リン酸化できる)。ATP 存在下、3種類の時計タンパク質を細胞内と同様の濃度・比率(KaiA: 0.05 mg/ml,

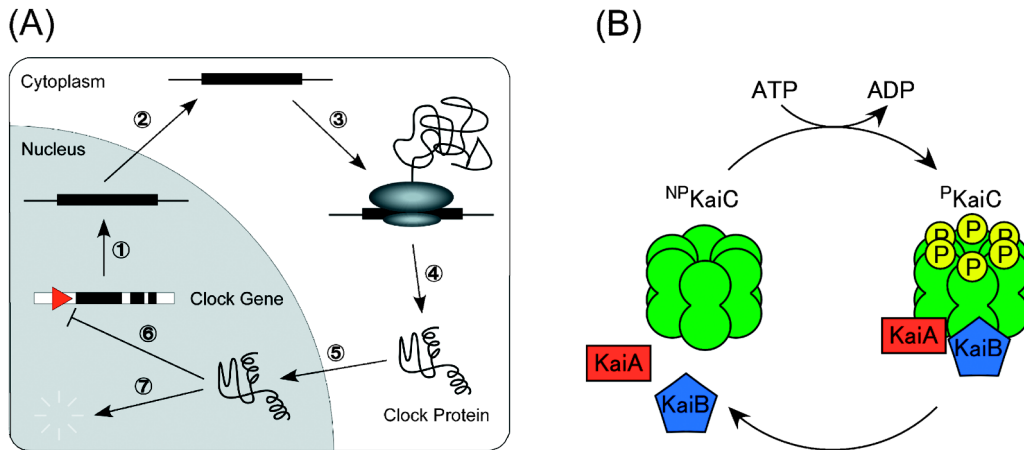


Fig. 1 Schematic drawings of biological clocks. (A) Transcriptional and translational oscillatory model. (B) Assembly and disassembly of *in vitro* Kai oscillator.

KaiB: 0.05 mg/ml, KaiC: 0.20 mg/ml) で混合し, KaiC のリン酸化状態が試験管内で概日振動することを証明して見せた中嶋らの論文<sup>5)</sup>は圧巻の一言に尽きる。複雑かつ巧妙に作られた哺乳類の生物時計に対し, たった3つのタンパク質で機能する藍藻の発振回路はシンプルな美しさを秘めている。

このように興味深い生命現象を前に構造生物学者がじっとしているはずもなく, 当然ながら厳しい競争が繰り広げられている。既に, Kai タンパク質の各々について結晶構造が報告されており, 時計を構築する個々の歯車の構造は明らかとされている。しかし, 歯車の構造がどれほど鮮明にわかっても, その静的な描像のみから時計が動くメカニズムを読み取ることは困難である。それ故, 歯車同士の噛み合わせ, すなわち Kai タンパク質の複合体構造とその時間発展の解明が切望されてきた。

大きさや形を時間変化させる系(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。NMR は魅力的な手法であるが, KaiC は分子量が大きく扱づらい。負染色・電子顕微鏡法は使えそうだが, 対象が概日周期とはいえリアルタイム計測は難しい。従来の構造生物学的切り口のみで切り拓くことのできない空白領域があるように思われた。

### 3. タンパク質溶液試料の X 線小角散乱

究極の離合集散系を前に, 著者は X 線小角散乱を選択した。その主な動機は以下の通りである。

#### 3.1 生理的条件下でのリアルタイム計測へのこだわり

KaiC がリン酸化型と脱リン酸化型のあいだを概日周期で往來するのであるから, KaiA : KaiC 相互作用と

KaiB : KaiC 相互作用の切り替えが時計を動かす重要な役割を担っていると考察される。この相互作用の切り替えを詳しく研究するためには, Kai タンパク質の離合集散を実時間で観察することが必要不可欠である。溶液試料を扱った X 線小角散乱の最大の長所は, 温度・pH といった条件の変更が容易なことに加え, 試料の時間発展を追跡できる点である。3種類の Kai タンパク質を生理的な水溶液中で混合し, 散乱パターン随時間変化から離合集散メカニズムが検証できると期待される。

#### 3.2 空間分解能への妥協

生理的環境での測定, 時間変化測定といった長所に対し, X 線小角散乱には空間分解能が制限されるという短所が常につきまとう。あるサイズを持った入射 X 線を溶液試料に照射すると, 照射体積×露光時間の空間に含まれていた全タンパク質分子の信号が検出器に記録される。タンパク質分子は溶液中で自由に拡散運動しているため, 空間サイズが十分に大きければ, そこに含まれていたタンパク質分子は入射 X 線に対して等確率的に任意方向として扱える。結果として観測されるのは, タンパク質 1 分子の散乱を球面上で全立体角にわたり積分した量と同等になる(散乱ベクトルを球座標の天頂角方向にとり, 座標定義された電子密度を  $0 \sim 4\pi$  まで積分)。この空間平均(粒子平均)により詳細な構造情報が失われ, 検証できる空間分解能に制限が生じる。

制限の度合は実験データとして記録された散乱角度範囲や粒子形状にも依存するが, おおむね数十 Å である。これは, 小さなタンパク質分子 1 個分, 大きなタンパク質であればドメイン程度の大きさに相当する。よって X 線小角散乱は, 構造が既知であるドメインや小タンパク質の空間配置を解明する際に威力を発揮する。

Kai タンパク質の場合, 個々の結晶構造は既に解き明かされている。よって, 離合集散する Kai タンパク質複合

体の形状を明らかにできれば、そこに既存の結晶構造をあてはめることによって、相互作用の切り替え機構を詳細に検証できると期待される。

### 3.3 分子量変化の検出

Kai タンパク質の離合集散を検出する重要なパラメータとして原点散乱強度  $I(0)$  と呼ばれる量がある。 $I(0)$  は入射 X 線と同方向に散乱された X 線の強度であり、散乱体の分子量にとっても敏感である。デバイの散乱式<sup>6)</sup>によると、 $N$  個の原子からなるタンパク質分子の  $I(0)$  は、各原子の原子散乱因子 ( $f_i \equiv$  電子数) の総和の 2 乗に比例する。

$$I(0) \propto \frac{c}{M_w} (f_1 + f_2 + \dots + f_{N-1} + f_N)^2$$

ここで、 $c$  は試料濃度 (mg/ml)、 $M_w$  はタンパク質の分子量である。タンパク質を構成する主要元素 ( $_1\text{H}$ ,  $_6\text{C}$ ,  $_7\text{N}$ ,  $_8\text{O}$ ,  $_{16}\text{S}$ ) について、その原子量は電子数の 2 倍とほぼ等しい ( $\sum f_i = M_w/2$ )。よって、タンパク質濃度が 0.1% (1 mg/ml) ときの原点散乱強度  $I(0)^{0.1\%}$  は、

$$I(0)^{0.1\%} = \frac{I(0)}{c} \propto \frac{M_w}{4} \quad (1)$$

となりタンパク質の分子量に比例するが、形状に依存しない。よって、異なるタンパク質分子が混在する希薄溶液の場合、観測値は各々の粒子 ( $j$ ) についての重量濃度平均となる。

$$I(0)^{0.1\%}_{\text{app}} = \frac{I(0)_{\text{app}}}{c_{\text{total}}} \sum_j \frac{c_j}{c_{\text{total}}} I(0)^{0.1\%}_j \quad (2)$$

上式は、 $I(0)^{0.1\%}_{\text{app}}$  が Kai タンパク質の会合状態や蓄積量変化についての情報に富むことを示している。

### 3.4 多様な実験条件への適応

Kai タンパク質複合体の結晶化は単体に比べて難しく、本質的に会合定数が低いいため更に困難を極める。 $I(0)^{0.1\%}$  は分子量と直結した量であるため (1 式)、タンパク質 A をタンパク質 B で滴定しながら希薄溶液中で  $I(0)_{\text{app}}$  を測定することができれば、A と B の会合比や解離定数 ( $K_d$ )、そして上手くいけば複合体の散乱曲線が決定される<sup>7)</sup>。空間分解能を犠牲にした分、生理的な溶液条件で多様な実験を展開できるという恩恵を享受できる。

## 4. Kai タンパク質の離合集散ダイナミクス

### 4.1 離合集散のリアルタイム計測

安定した試料調製技術が確立した後、直ちに 3 種類の Kai タンパク質が混在する系のリアルタイム計測に着手した。高純度精製した KaiA (0.15 mg/ml)、KaiB (0.15 mg/ml)、KaiC (0.60 mg/ml) を ATP と混合し (細胞内濃度の 3 倍量)、30 度で振動反応を開始させた (時刻ゼロ)。各測定時刻に一定量の試料を反応溶液より取り分け、その一部を X 線小角散乱に、残りを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による KaiC のリン酸化定量に使用した。

散乱曲線は“生きている”かのごとく劇的に変化した。反応開始直後 (0~6 h)、散乱ベクトル ( $S = 2 \sin \theta / \lambda$ ) の小さな小角領域で強度が増加し、一方で中~広角の散乱強度が徐々に減少した (Fig. 2A)。この変化は約 8 h で一旦穏やかとなり、散乱曲線は次に逆方向へと変化した (Fig. 2B)。逆向きの変化は 20 h で穏やかとなり、小角領域の強度が増加するモードが再び立ち上がった。散乱曲線は

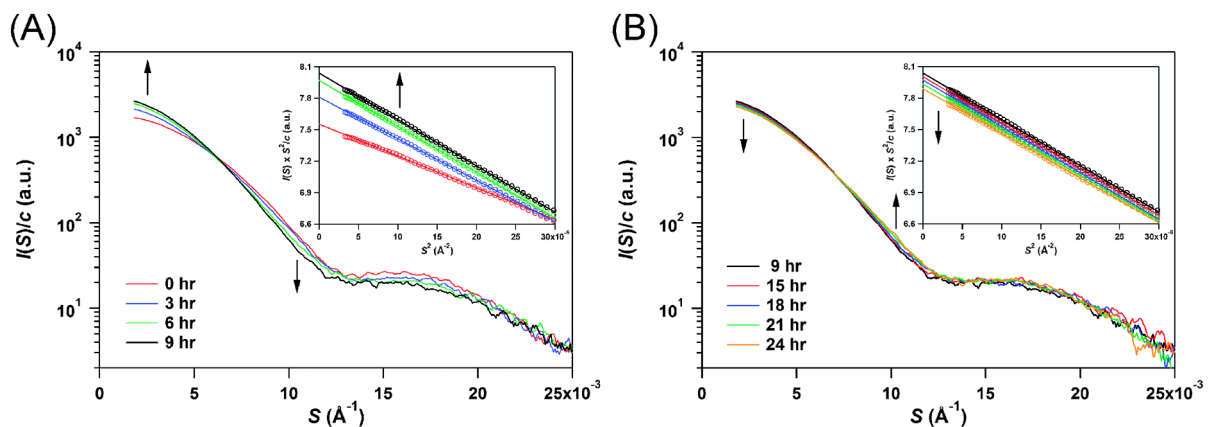


Fig. 2 Time-resolved small-angle x-ray scattering patterns of a ternary mixture of Kai proteins. The scattering vector,  $S$ , on the horizontal axis is equal to  $S = 2 \sin \theta / \lambda$ , where  $2\theta$  is the scattering angle and  $\lambda$  is the wavelength of incident x-ray.  $I(S)$  corresponds to the scattering intensity recorded at  $S$ . (A) Assembly process from 0 to 9 hr. (B) Disassembly process from 9 to 24 hr. Insets represent Guinier plots of the scattering curves.

明らかに振動していた。

$I(0)_{app}^{0.1\%}$  の時間変化を検証するため Guinier 解析を行った。S が十分に小さい領域において、散乱強度の自然対数 ( $\ln I(S)$ ) は、散乱体の種類によらず散乱ベクトルの 2 乗 ( $S^2$ ) に対して直線近似される (Guinier 近似)。

$$\ln I(S)^{0.1\%} \approx \ln I(0)^{0.1\%} - \frac{4\pi^2 R_g^2}{3} S^2 \quad (3)$$

よって、振動過程の  $\ln I(S)$  を  $S^2$  に対してプロットし (Figs. 2AB, Inset), 近似直線の勾配から分子の回転半径 ( $R_g$ ) が、そして切片から  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  が決定される。

3 つの Kai タンパク質を混合した直後 (2 分) の  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  は約 1900 であった (Fig. 3,  $\square$ )。別の実験から求めた単体の  $I(0)^{0.1\%}$  を考慮すると ( $I(0)_{KaiA}^{0.1\%} = 460$ ,  $I(0)_{KaiB}^{0.1\%} = 236$ ,  $I(0)_{KaiC}^{0.1\%} = 2200$ ), 3 つの Kai タンパク質が会合することなく混在した場合, (2 式) より  $I(0)_{app}^{0.1\%} = 460 \times (0.15/0.90) + 236 \times (0.15/0.90) + 2200 \times (0.15/0.90) \approx 1580 < 1900$  と計算される。よって、混合から測定までの不感時間 (約 2 分) に、何かしらの速い会合反応が起こっていることが示唆された。

その後,  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  は劇的に増加し, 約 9 時間でピークを迎え減少へと転じた。反応開始から 18 時間以降では,  $24.4 \pm 0.2$  h の周期を持つ美しい正弦振動が現れた。 $I(0)_{app}^{0.1\%}$  は試料の重量平均分子量に比例するため (2 式), この結果は時計タンパク質が非定常的に離合集散を繰り返すことを示す直接的証拠となった。

#### 4.2 ウサギとカメの関係が生み出す $\pi/2$ の位相差

興味深いことに,  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  は KaiC のリン酸化状態とは異なる位相で振動していた。リン酸化を受けた KaiC の割合 ( $Phos^{app}$ ) は,  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  とほぼ同じ周期の振動を示したが ( $23.8 \pm 0.5$  h), その位相は  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  よりも  $\pi/2$  進んでいた (Fig. 3,  $\blacksquare$ )。

位相差の原因を探るため, KaiA もしくは KaiB を含まない系について同様の実験をおこなった。KaiA (0.15 mg/ml) と KaiC (0.60 mg/ml) のみを含む系では,  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  が不感時間内で急激に増加し (Fig. 3,  $\circ$ , 全く会合していなければ  $I(0)_{app}^{0.1\%} \approx 1800$ ),  $Phos^{app}$  は  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  より少し遅れて増加して一定レベルに達した (Fig. 3,  $\bullet$ )。全ての過程が完了するまでに 3 時間とかからない速やかな反応であることが理解される。一方, KaiB (0.15 mg/ml) と KaiC (0.60 mg/ml) の反応はとても緩やかなものであった。 $I(0)_{app}^{0.1\%}$  は徐々に増加し (Fig. 3,  $\triangle$ , 全く会合していなければ  $I(0)_{app}^{0.1\%} \approx 1850$ ), 反応開始後 8 時間で減少に転じた。その際,  $Phos^{app}$  はゆっくりと単相で減少し (Fig. 3,  $\blacktriangle$ ), その変化は  $I(0)_{app}^{0.1\%}$  が減少する遅い過程と同期していた。

以上の結果は, KaiC と相互作用するタイミングが

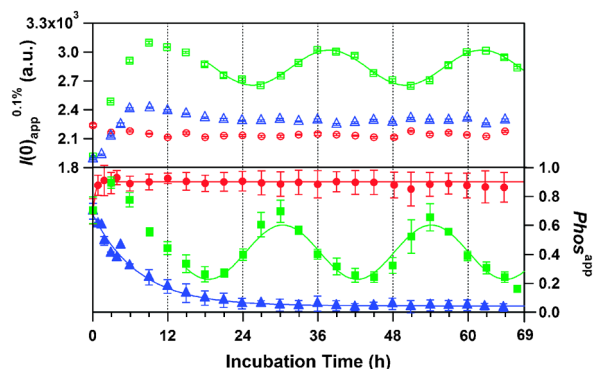


Fig. 3 Time-dependent changes of apparent forward scattering intensity,  $I(0)_{app}^{0.1\%}$ , and fraction of phosphorylated KaiC ( $Phos^{app}$ ). Green squares, red circles and blue triangles correspond to the data for a ternary mixture, a binary mixture without KaiB and a binary mixture without KaiA, respectively. Solid lines represent sine-wave or exponential functions fitted to the data.

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ことを示す。3 者が混在した場合, KaiA が勢いよくスタートダッシュを切って KaiC と結合し, 速やかに KaiC をリン酸化する ( $Phos^{app}$  のピーク  $\approx 1$  h, Fig. 3,  $\blacksquare$ )。KaiB は KaiC のリン酸化が終わった頃に遅れてやってきて KaiC と結合し ( $I(0)_{app}^{0.1\%}$  のピーク  $\approx 8$  h, Fig. 3,  $\square$ ), 穏やかに脱リン酸化を促しつつ KaiC から解離する。2 つのピークの差はおよそ 7 時間となり, 観察された位相差 ( $\pi/2 = 6.6 \pm 0.9$  h) を説明することができる。以降, 位相差を生み出す反応初期 (0~18 h) をシンクロ相, それ以降の安定した領域 (18 h~) を振動相と呼ぶ。

ウサギとカメの仮説が的を射たのであれば, ゆっくりと確実に追い付いてくる KaiB と KaiC の相互作用は, KaiA と KaiC のペアより熱力学的に安定であると予測される。この点を検証するため, X 線小角散乱を用いた滴定実験を行い KaiC に対する親和性を KaiA と KaiB で比較した。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散乱曲線を計測した。各測定の  $I(0)_{app}$  を KaiA の全濃度に対してプロットしたところ (Fig. 4,  $\square$ ),  $I(0)_{app}$  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 の組み合わせの場合 (Fig. 4,  $\circ$ ),  $I(0)_{app}$  は急勾配で直線的に増加し, 約 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  $4.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$ , KaiB と KaiC の組み合わせでは  $0.12 \pm 0.08 \mu\text{M}$  と求められ, とともに結合比が 1 対 1 であることが明らかとされた。以上の結果は, KaiB : KaiC の相互作用が KaiA : KaiC より約 40 倍強いことを示し, 先の  $\pi/2$  の位相差に関する仮説を支持する。

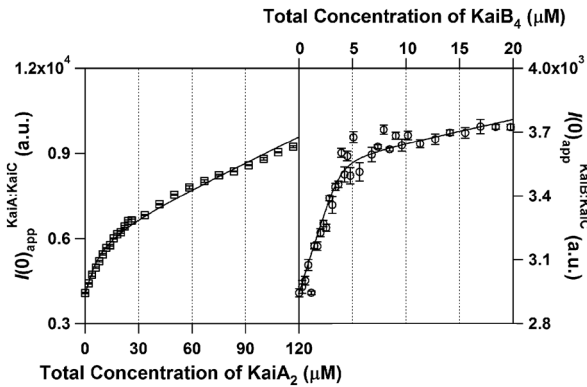


Fig. 4 Titration curves of apparent forward scattering intensities,  $I(0)_{app}$ . Solid lines correspond to the least-squares fitting to the data using a 1:1 binding scheme.

#### 4.3 複合体の低分解能像が示唆する反応モデル

上述の反応モデルと  $K_d$  をもとに、滴定実験データから KaiA : KaiC および KaiB : KaiC 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像を計算した。計算手法やソフトウェアの詳細については本稿の趣旨でないため、原著論文<sup>8)</sup>や総説<sup>9)</sup>を参照頂きたい。

KaiA : KaiC 複合体は  $150 \times 150 \times 110 \text{ \AA}$  の大きさからなる。KaiC は全体積の80%を占め (Fig. 5AB, 青色)、「球状の頭部」と「短い尾部」で構成される。頭部の中心には空洞が観察され、そのおかげで KaiC の結晶構造を一意的に当てはめることができた。KaiC の頭部は C1 と C2 と呼ばれる二つのドメインで構成されており、KaiA に相当する20%の電子密度 (Fig. 5AB, オレンジ色) は C2 ドメインと尾部近傍に局在化していた。

KaiB : KaiC 複合体は  $140 \times 130 \times 100 \text{ \AA}$  の寸法からなり、KaiA : KaiC 複合体よりもわずかにコンパクトであった。KaiC に特徴的な電子密度が確認でき (Fig. 5CD, 緑色)、全体の13%の体積にあたる KaiB の電子密度は C2 ドメインと相互作用していた (Fig. 5CD, 紫色)。

以上の小角散乱データおよび低分解能モデルをもとに、Kai タンパク質の離合集散メカニズムについて考察する。KaiA が KaiC に結合する速度は KaiB に比べて十分に速いため、最初に KaiA : KaiC 複合体が生じる (Fig. 6, a)。KaiC が十分にリン酸化を受けた後、反応を脱リン酸化へと切り替えるために KaiB がやってくるが、ここで2つのシナリオが想定される。1つは KaiB が KaiA の近傍に結合し (Fig. 6, b)、KaiA : KaiB : KaiC 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、KaiB が結合している KaiA を押しつけて入れ替わる可能性である (Fig. 6, c)。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 (Fig. 5)。滴定実験からも明らかであるが、KaiB : KaiC 複合体は KaiA : KaiC 複合体より安定であるため、この入れ替わりは熱力学的に十分可能な反応である。KaiA : KaiB : KaiC

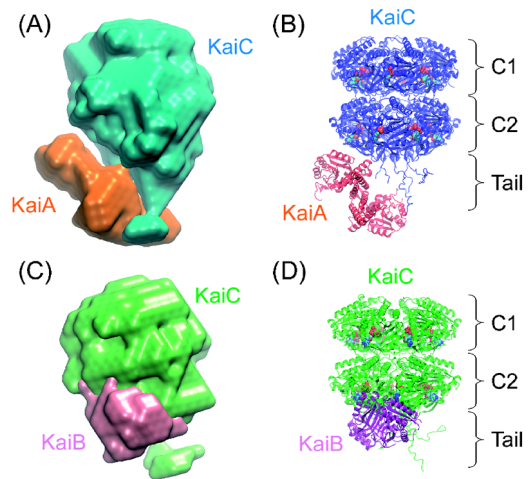


Fig. 5 Low-resolution models of Kai complexes. (A) Low-resolution envelope of KaiA:KaiC complex restored from SAXS data. (B) Superimposed crystal structures of KaiA and KaiC to low-resolution model of KaiA:KaiC complex. (C) Low-resolution envelope of KaiB:KaiC complex restored from SAXS data. (D) Superimposed crystal structures of KaiB and KaiC to low-resolution model of KaiB:KaiC complex.

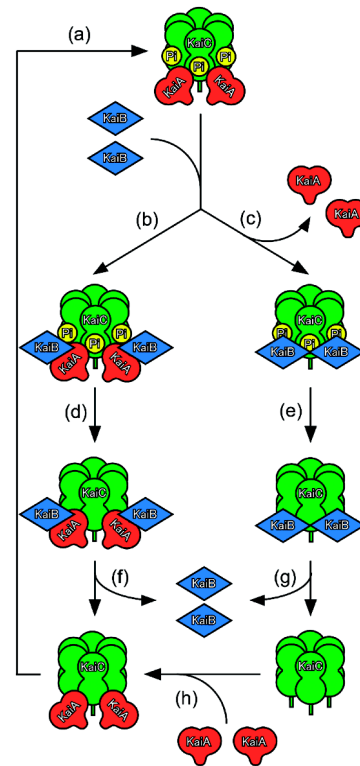


Fig. 6 *In vitro* assembly and disassembly scheme of the Kai proteins. KaiA, KaiB and KaiC particles are schematically illustrated by using orange plums, blue diamonds, and green barrels, respectively.

複合体, KaiB : KaiC 複合体の状態では共に KaiA の機能が抑制されているため、脱リン酸化が進行し (Fig. 6, d & e), その後に KaiB が解離してサイクルは元に戻る (Fig.

## 6, f & g)。

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、生化学的な実験結果について合理的な説明を与える。2段階のプルダウンアッセイを用いた生化学的解析結果によると<sup>109</sup>, KaiA : KaiB : KaiC 複合体が蓄積する前かほぼ同時期に KaiB : KaiC 複合体が蓄積する。経路の枝分かれ無しに、このような反応順序を説明するのは容易でない。

### 4.4 雑音に強い振動相, 敏感なシンクロ相

冒頭で触れたように、種々の生命現象は細胞内の雑音を乗り越え、ときには雑音を巧みに利用しながら進行する。

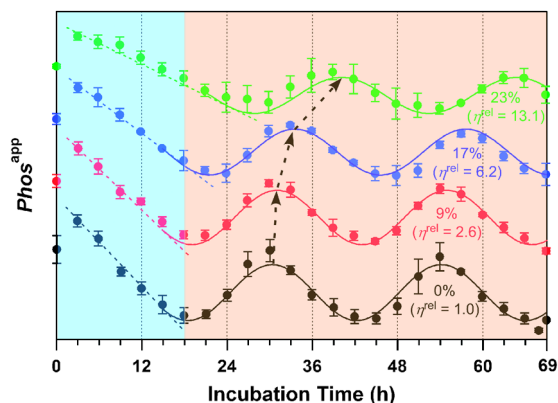
**Fig. 6** に示される Kai タンパク質の離合集散はどうであろうか。溶媒の粘度, 浸透圧, 排除体積効果などが Kai タンパク質の振動反応に及ぼす影響を検証した。

顕著な変化が観察されたのは, Ficoll70 と呼ばれる球状ポリマーを添加して系の溶媒粘度に変調を与えたときである。Ficoll70 の添加量に応じ (溶媒粘度の増加),  $Phos^{app}$  の第1ピークに続く減少過程が減速され (**Fig. 7**, 点線), その結果として振動相の位相は後退する傾向にあった (**Fig. 7**, 矢印)。興味深いのは, この位相後退がシンクロ相 (0~18 h) で生じており, 振動相 (18 h~) の周期や位相そのものは粘度の影響を受けない点である (位相のずれを保ったまま概日振動を継続)。以上の結果は, シンクロ相のみが溶媒粘度に敏感であることを示す。

一般的な化学反応において, 「溶媒粘度への依存」と「遅い反応」というキーワードは互いに相容れない。系の粘度が高まれば, 種々の Kai タンパク質分子の並進拡散速度は低下する。よって反応が拡散律速であれば, 系の粘度増加に応じて減速が観察されても良い。しかし, 現実に行っているのは時間オーダーの反応で,  $10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  程度の拡散定数を持つ Kai タンパク質同士が衝突して複合体が生成するといった単純な反応では説明がつかない。

相反する2つのキーワードを同時に説明するためには, 「特別な条件」もしくは「検索」といった点を考慮する必要がある。例えば, 反応は拡散律速であるが, 単純に2つのタンパク質が衝突すれば良いのではなく, 「①ある特定の状態にある, ②複数の分子が, ③決まった配向で衝突して初めて反応が進む」という確率的制限を課せば, 溶媒粘度に依存した遅い反応として説明できるのではなかろうか。伊藤らの研究結果によると<sup>111</sup>, 複数の KaiC 分子が情報をやり取りする過程が各サイクルに存在し, その反応は KaiC のリン酸化状態に大きく依存している。その情報交換が行われるタイミングは, Ficoll70 によって減速される脱リン酸化ステップの初期段階であると考えられている<sup>109</sup>。

決して忘れてはならないのは, シンクロ相のみが溶媒粘度に依存している点である。時計の機能に対して積極的に作用していた離合集散は, シンクロ相から振動相への移行



**Fig. 7** Effects of Ficoll70 on rhythmic changes of phosphorylated fraction of KaiC ( $Phos^{app}$ ). Dotted lines indicate linear functions fitted to the data in the synchronizing stage (light blue). Solid lines represent sine-wave functions fitted to the data in the oscillatory stage (orange). Black dotted arrows illustrate Ficoll70-dependent shifts of the oscillatory phases. Each oscillatory curve is offset for clarity of presentation.

に伴い, その役割を従属的なものへと変化させている。ここで, シンクロ相における離合集散を通じて何らかのペースメーカー的存在が構築され, 振動相では成熟したペースメーカーが逆に離合集散タイミングを制御するという考察に至る。

このような観点のもとに, KaiA : KaiC および KaiB : KaiC 複合体の構造を再度眺めると, KaiC が時を刻むためのペースメーカーであるという仮説に至る。**Fig. 5** が示すように, KaiA や KaiB は KaiC の C2 ドメインや尾部と相互作用している。リン酸化を受けるアミノ酸は KaiC の C2 ドメインに局在化しており, 尾部の根元は KaiC に結合した ATP の近傍にアンカーされている。よって **Fig. 5** の複合体構造は, 「KaiA や KaiB がタイミングを見計らって KaiC に結合した状態」とも解釈できるが, むしろ「KaiC が自身のリン酸化状態に応じた C2 ドメイン~尾部の構造変化によって, KaiA や KaiB を呼び寄せたり, また突き放したりしつつ離合集散タイミングを制御するのに最適化された構造」と解釈すべきであろう。そうすると, 雑音の多い込み入った環境で正確に時を刻むことができる謎の一端が理解される。

## 5. まとめと今後の展望

### 5.1 真のペースメーカーを追求めて

初期の離合集散により生み出される Kai 発振回路のペースメーカーとは一体どのようなものであろうか。KaiA や KaiB が KaiC へ呼び寄せられるのであれば, その信号の源であるリン酸化状態がペースメーカーであろうか<sup>12</sup>。最近の報告では<sup>13</sup>, KaiC の ATPase 活性がペースメーカーとしての役割を担っている点が指摘されている。

今後, ペースメーカーである KaiC の発するタイミング

信号, 即ち KaiC の構造変化を捉えることが重要な課題の一つとなる。これまでに KaiC の結晶構造が幾つか報告されているが, それらの構造は全て同じ構造であるといってもよい。この事実は, 期待される KaiC の構造変化が小さく, 弱い相互作用によって保たれていることを示唆する。なんとか結晶構造解析が解けても, 核心部分に手が届かないという状況は Kai タンパク質に限ったことでなく, 現在の生物物理学や構造生物学が抱える共通の課題でもある。いま X 線小角散乱に求められているのは, 溶液中でのみ起こる小さな構造変化を捉えるためのアイデア・技術革新, そして結晶構造の前後一コマについての情報を得ることではなかろうか。

## 5.2 放射光利用の重要性

概日周期のダイナミクスであれば, 実験室系の X 線小角散乱装置で十分に計測できると思われるかもしれない。実験室系で実際に計測したわけではないが, かなり厳しい戦いになると著者は予測する。

まず, 時間分解能の観点から測定が難しい。いま仮に,  $y(t) = \sin(2\pi t/24)$  という正弦振動反応を考える。最も急激な時間変化を示す  $t=24$  での勾配は,  $y'_{t=24} = 2\pi/24 = \sim 0.26$  となる。これは, 露光・積算している僅か20分のあいだに信号が9%も変化することを示しており, とてもリアルタイム計測とは言えない。計測中の信号変化率を1%以下に抑える条件は, 露光時間2分以内と逆算される。よほどの高濃度試料を用いない限り, 実験室系でこの条件をクリアすることは難しい。

また, 測定感度でも困難が伴う。自律振動は3種類の Kai タンパク質を混合して誘導するが, その生理的濃度は低く, 合計でも  $1 \text{ mg/ml}$  を超えない希薄溶液である。放射光を用いた計測でも数  $\text{mg/ml}$  の試料を使用することが一般的であることを考えれば, 測定が容易でないことは理解いただけるであろう。また, この希薄溶液から発せられる微弱な信号のわずか6%程度が時間変化として観察されるわけであるが (Fig. 3), 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。目的を達成するためには, 高いレベルでビームの安定性が要求される。

本稿で紹介した実験データは, 全て SPring-8 の理研構造生物学ビームライン I (BL45XU) で取得したものである<sup>14)</sup>。2004年より本格的に導入されたトップアップ運転の恩恵は大きく<sup>15)</sup>, 散乱を安定に計測する上で助けとなった。その他にも, 試料調製, ビームサイズ調整, ビーム強度補正, 検出器選定<sup>16)</sup>といった点で多くの試行錯誤があった。異なる日に調製した試料を異なる日のビームタイムで計測し, 再現性の高い70時間連続データを得るまでに2年を要した。本研究の遂行に放射光を用いた X 線小角散乱計測が必要不可欠であったことを重ねて強調したい。

## 謝辞

本研究を遂行するあたり, 共同研究者として尽力下さった野原淳志氏(名大院・理), 伊藤和輝博士(理研・播磨), 前田雄一郎教授(名大院・理)に感謝します。Kai タンパク質については, 近藤孝男教授(名大院・理)と研究室の皆様方大変お世話になりました。本成果は, JST の進める戦略的創造研究推進事業, さきがけ「生命現象と計測分析」によって得られました。X 線小角散乱実験は RIKEN SPring-8 Center の承認のもと, SPring-8 の理研構造生物学ビームライン (BL45XU) にて実施されました (課題番号: 20070097)。

## 参考文献

- 1) R. J. Ellis: *Trends Biochem. Sci.* **26**, 597 (2001).
- 2) Akiyama *et al.*: *Mol. Cell* **29**, 703 (2008).
- 3) Bell-Pedersen *et al.*: *Nature Rev. Genet.* **6**, 544 (2005).
- 4) Ishiura *et al.*: *Science* **281**, 1519 (1998).
- 5) Nakajima *et al.*: *Science* **308**, 414 (2005).
- 6) P. Debye: *Ann. Phys. (Leipzig)* **46**, 809 (1915).
- 7) Yamada *et al.*: *J. Mol. Biol.* **362**, 123 (2006).
- 8) D. I. Svergun: *J. Appl. Crystallog.* **25**, 495 (1992).
- 9) D. I. Svergun: *J. Appl. Crystallog.* **40**, s10 (2007).
- 10) Kageyama *et al.*: *Mol. Cell* **23**, 161 (2006).
- 11) Ito *et al.*: *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**, 1084 (2007).
- 12) Nishiwaki *et al.*: *EMBO J.* **26**, 4029 (2007).
- 13) Terauchi *et al.*: *PNAS* **104**, 16377 (2007).
- 14) Fujisawa *et al.*: *J. Appl. Crystallog.* **33**, 797 (2000).
- 15) Tanaka *et al.*: *J. Jpn. Soc. Synchrotron Rad. Res.* **18**, 57 (2005).
- 16) Amemiya *et al.*: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 2290 (1995).

## ● 著者紹介 ●



### 秋山修志

名古屋大学大学院 理学研究科生命理学  
専攻 講師  
科学技術振興機構さきがけ (領域: 生命  
現象と計測分析)  
E-mail: akiyama@bio.nagoya-u.ac.jp  
専門: X 線小角散乱, 生物物理学  
【略歴】

2002年京都大学大学院工学研究科分子  
工学専攻博士課程修了, 博士 (工学)。  
2002年京都大学大学院工学研究科 日  
本学術振興会特別研究員PD, 2003年  
理化学研究所 播磨研究所 基礎科学特  
別研究員, 2005年10月より科学技術振  
興機構さきがけ 専任研究者, 2008年8  
月より現職。

---

---

# Assembly and Disassembly of Cyanobacterial Clock Proteins Studied by Real-time Small-angle X-ray Scattering

**Shuji AKIYAMA** Division of Biological Science, Graduate School of Science,  
Nagoya University, Nagoya 464-8602, Japan  
PRESTO, JST, Saitama 332-0012, Japan  
RIKEN SPring-8 Center, Harima Institute Hyogo 679-5148, Japan

**Abstract** In the presence of ATP, three Kai proteins from cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 are repeatedly assembled and disassembled into heteromultimeric complexes in a circadian fashion. A mechanism, by which the clock activity persists stably even under noisy and crowded conditions, was discussed on the basis of real-time observations of the assembly and disassembly dynamics with small-angle X-ray scattering.

---