

# 時間生物学と放射光科学の接点

秋山修志

自然科学研究機構 分子科学研究所 協奏分子システム研究センター  
〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38番地

## 要旨

古代より、私たちの生活と「時間」は切り離せない関係にある。天球をめぐる天体の運動や水の流れ、これらをもって暦や時間という概念を生み出し、それをもってまた他の現象の頻度を計測してきた。今日、私たちに時間を知らせてくれる存在はクォーツ時計や小型端末に置き換わりつつあるが、ふと視線を自分の手元に移せば、手のひらにある1つ1つの細胞にも計時機能を有するシステム（生物時計）が埋め込まれていることに気づく。細胞内で繰り広げられる生命活動の順序やタイミングは生物時計（24時間周期のリズム）の支配下にあり、その仕組みに支障をきたすと広範囲の生理活性調節に影響が及ぶため、結果として様々な病気の引き金となる。本解説では、個体や細胞の時間を司る「時計」のようなタンパク質分子が実在すること、そしてその立体構造に地球の自転周期が原子スケールでエンコードされていること紹介する。

## 1. はじめに

「秋山さん、結晶構造解析は大事ですよ。  
構造を調べるための基盤的な手法やからね。」

その人は紫煙をくゆらせながら私に諭すようにそう言った。2008年、さきがけ研究の成果を論文発表<sup>1)</sup>し、手ごたえを感じつつも今後の方向性を思案していたころである。当時、私はタンパク質や核酸といった生体高分子を対象に、それらが水溶液中に分散した状態のX線小角散乱計測に取り組んでいた。冒頭の言葉に対し、「自分は結晶構造解析はやるまい、分解能は低くとも生理的な溶液条件下での構造解析にこそ意味があるのだ」と思ったことを記憶している。それから8年が経過し、現在私はX線小角散乱を継続しつつも、X線結晶構造解析にかなりの研究時間を割くようになった。ある瞬間に考え方が変わったというよりも、自分の研究を突き詰めていくうちに気が付けばそうになっていたというのが実際である。

私は時間生物学と呼ばれる生物学の中の一分野に身を投じているのだが、この分野における最終回答に近づくために、どうしても対象となるタンパク質分子の構造を原子レベルで議論する必要が生じたのである。本解説では、時を刻むタンパク質分子を題材に、私がどのような経緯でX線小角散乱からX線結晶構造解析へと展開することになったのか、そして何が明らかになったのか、今後の課題として何が残されているのかを紹介したい。

## 2. 生物が有する計時システムの基本構造

地表付近では、地球の自転に伴って温度や湿度を含めた

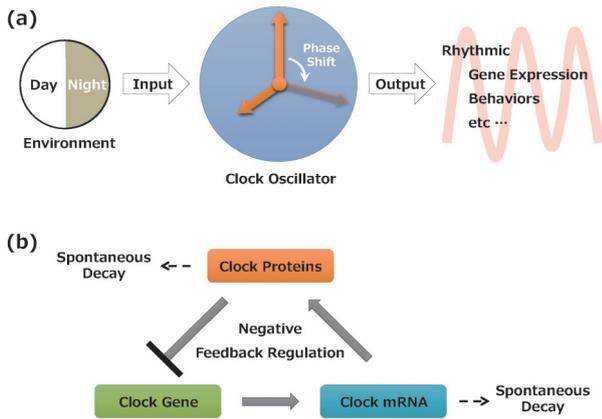
多くの環境因子が24時間周期で変動する。多くの生命は生物（体内）時計と呼ばれるタイミング制御システムを備えており、それが発する概日（約24時間）周期のリズムを指針に昼夜環境サイクルと同調しつつ生息している。地球の自転周期を宿したこのシステムがどのような形状をしており、どのような仕組みで動いているのか——私はこれらを是が非でも解明したい。

未解明な点が多い生物時計であるが、次に挙げる3つの特徴が生物種を超えて保存されている<sup>2)</sup>。

1. 概日周期での自律的発振
2. 周期の温度補償性
3. 同調能

一つ目の特徴は、外界から刺激のない恒常的条件であっても24時間周期で自律的に発振することである。例えば、連続的な暗所もしくは明所であっても概日周期で時を刻む。二つ目は、周期が外界温度の影響を受けにくい点である。通常化学反応が温度依存的に加速されるのに対し、時計の振動数（周期の逆数）は夏でも冬でも変わらず一定である。そして三つ目は、外界からの信号（温度や光など）に応答して自身の位相を変化させ、環境サイクルに同調できる点である。

これらの特徴は生物時計の基本構造 [Fig. 1(a)] と次のように対応付けられる。概日周期のリズムを生み出す振動子がコアとして存在し、その上流に入力系、下流に出力系が配置されている。入力系では光や温度が受容され、その情報（振幅、位相など）が振動子へと伝達される。入力系からの情報に応じて振動子の位相が前後にシフトし、これが結果として同調作用へとつながる。振動子の位相(時刻)



**Fig. 1** (Color online) Models of Circadian Clock System. (a) Overall framework of circadian clock. (b) Transcriptional and translational oscillation model.

情報は分子間相互作用を介して出力系へと渡され、そこでリズム的な遺伝子発現へと変換されるため、結果として個体（生命システム）の行動や代謝などが24時間周期で制御される。以降では、振動子の性質や構造に焦点を絞って解説する。

### 3. 生物時計の分子モデル

振動子の分子モデルをめぐって、今日まで多様な生物種について研究がなされてきた<sup>3,4)</sup>。その結果、遺伝子に記された情報を写し取る過程（転写）、転写された情報からタンパク質分子を作り出す過程（翻訳）、これらが複雑にネットワーク化されたものが時計のコア≒振動子であると受け入れられている。

転写・翻訳振動モデルとも称されるこの仕組みは、**Fig. 1(b)**のように機能する（と考えられている）。まず、計時機構と関連のある特定の遺伝子（時計遺伝子）が転写され、その転写産物（mRNA）が細胞の核の外へと拡散する。mRNAには時計遺伝子の情報が写し取られているので、これに基づいて（時計）タンパク質が作り出される。その後、時計タンパク質は他の分子との相互作用を経て核内へと輸送され、そこで自身を生み出す源である時計遺伝子の転写を阻害する（自分で自分の首を絞める）。この段階で時計タンパク質の増産が滞るため、時計タンパク質の量はそれ以降ほぼ一定になりそうなものであるが、細胞内では自然分解作用によって減少へと転じる。分解が進んで核内の時計タンパク質が少なくなると、抑制されていた時計遺伝子の転写が再開され次のサイクルが回り始める。

この反応サイクルを周期的に活性化・不活性化せしめているのは自己抑制制御（負のフィードバック制御）である。時計遺伝子の転写を起点に、時計タンパク質分子が核内に戻って自己抑制するまでには一定の時間を要する。この時間遅れが顕著になると、負のフィードバック制御は安定性

を失って発振する。次のような例を想像するとイメージが湧くのではなかろうか。少し古めの湯沸かし器から湯を取り出す場合、出てくるお湯に片手をかざして温度を確認しつつ、もう片方の手で温度調節つまみを回転させる。最初は水の温度が低いので思い切って調節つまみを高温側に回すのだが、しばらくたって高くなりすぎた水温を下げるために、今度は調節つまみを低温側へと回す。しかし次は温度が下がり過ぎてしまって、再び調節つまみを高温側に回す、そしてまた……。目的温度と水温の差をもとに、調節つまみを介してヒーター（もしくは水量）を負にフィードバック制御しているわけである。このときの水温を時間に対してプロットすると減衰型の振動曲線となり、最終的には目的とする温度付近へと収束する。何かを一定に保とうとする（定値）制御と時間遅れが共存すると、発振の可能性が高まる一例である。

このような要因で発振に至る場合、周期の長さはフィードバック制御の時間差（時定数）に相関する。これを転写・翻訳振動モデルに当てはめて考えると、時計遺伝子の転写～自己抑制までの時間差によって生物時計の周期が規定されるという解釈になる。しかしながら、転写や翻訳が分の時間スケールで進行する生命現象である<sup>5)</sup>ことを考慮すると、そのような（概日時間スケールに比べて）速い過程の積み重ねで安定した時間差を作り出すことがはたして可能であるのか——その現実性を疑問視する声もある。

### 4. 生物時計のブラック・ボックス

時計遺伝子が発見された当初は<sup>6)</sup>、シアノバクテリアの生物時計も例外なく転写・翻訳振動モデルによって説明されていた。しかしその解釈は、2005年の近藤らの大発見<sup>7,8)</sup>により根底から覆されることとなる。彼らは、シアノバクテリアから取り出した3種類の時計タンパク質をアデノシン三リン酸（ATP）と混ぜ合わせるだけで、試験管内に24時間周期の安定したリズムを作り出すことに成功したのである（**Fig. 2**）。この自律振動子は実際に細胞内で機能しており、第2節に挙げた3つの特徴を有することが確認されている<sup>8,9,10)</sup>。転写・翻訳に依存しない発振系の存在が証明されると同時に、生物時計のブラック・ボックスが開かれた瞬間であった。

3種類の時計タンパク質は、“回転”の“回”にちなんでKaiA, KaiB, KaiCと命名されている。KaiCを含め一部のタンパク質は無機リン酸による化学修飾を受け、その結果として構造や機能を変化させる。リン酸化修飾は可逆的であることが多く、その有無によってアミノ酸配列が同じタンパク質であっても機能や構造に多様性が生じる。KaiA, KaiB, KaiCをATPと一緒に試験管内で混合すると、KaiCはリン酸化状態と脱リン酸化状態の間を概日周期で往来する（Kaiタンパク質時計、**Fig. 2**）。その際、KaiAはKaiCの自己リン酸化を促し、KaiBはKaiAの機

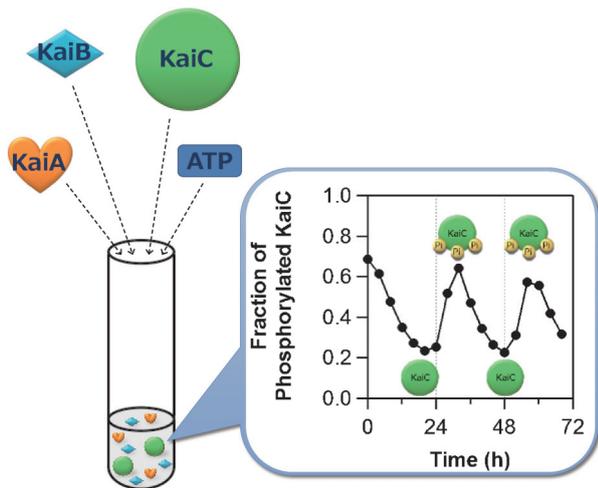


Fig. 2 (Color online) *In vitro* reconstruction of cyanobacterial circadian clock.

能を抑制することで KaiC を自己脱リン酸化へと導くことが生化学的な実験で解明された<sup>11-16)</sup>。

Kai タンパク質時計が再構成されると、研究の舞台は3種の Kai タンパク質間の相互作用へと移った。免疫沈降を用いた生化学的な相互作用解析<sup>17,18)</sup>、X線小角散乱<sup>1,19)</sup>や電子顕微鏡<sup>20,21)</sup>を駆使した生物物理学的解析、実験データに沿うように分子間相互作用をモデリングしたシステムバイオロジーとしての研究<sup>22)</sup>——これらの研究は3種の Kai タンパク質をシステムとして捉え、分子間相互作用を精査し、もしくはモデリングすることで発振の仕組みに迫ろうという試みであった。

これらの研究を通じて生物時計への理解は深まった。3種の Kai タンパク質がヘテロ複合体を形成し、その蓄積濃度だけでなく化学的組成や立体構造までもが概日周期で変化することが実験的に確かめられた(詳細は文献<sup>23)</sup>などを参照されたい)。しかし一方で、そもそもナノ秒~分の時間スケール<sup>24-26)</sup>で運動し得るタンパク質分子を部材にどのように概日時間を実現しているのか、役者が3種類の分子に絞られたにも関わらず、その答えは出ていなかった<sup>27)</sup>。

## 5. KaiC の ATPase 活性

我々は X 線小角散乱を用いることで、KaiC の構造がリン酸化状態に依存して変化することを突き止めた<sup>19)</sup>。構造変化から時間スケールの謎に迫れると期待しての研究であったが、KaiC の分子形状変化は24時間スケールを想起させるほど大規模でも複雑でもなかった(少なくとも観察した分解能では)。何が24時間を決めているのか、KaiC がその鍵を握ることは間違いないのだが、糸口をつかめずにいた。

そこで私は、一旦、構造から距離を置いて KaiC の酵素

活性に目を向けることにした。KaiC には自分自身をリン酸化・脱リン酸化する反応の他に、ATP を加水分解する活性(ATPase)を有している。KaiC の ATPase 活性がどのような役割を持つのか不明な点も多かったが、当時、寺内ら<sup>28)</sup>は ATPase 活性が生物時計の周期と関連していることを報告していた。

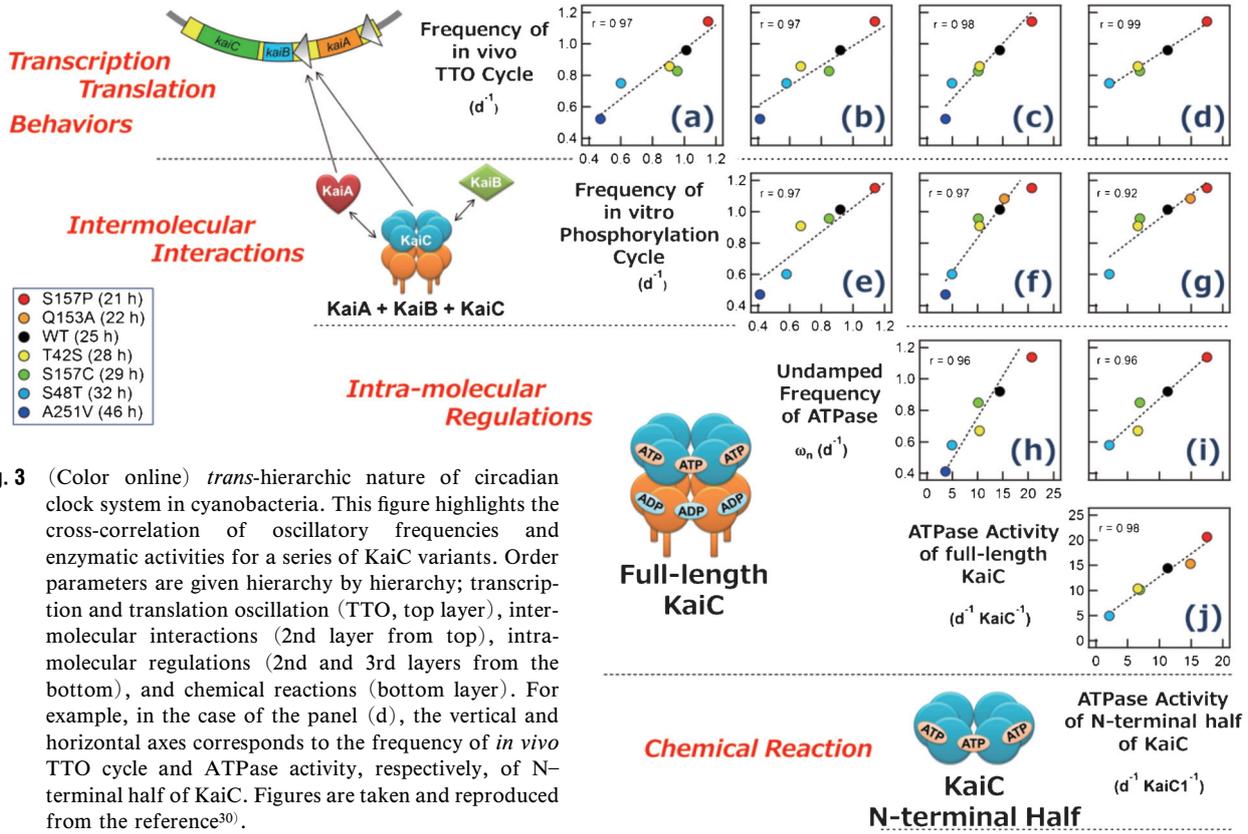
時間スケールの謎に迫るため、私たちは寺内ら<sup>28)</sup>の研究成果を基盤に、「KaiC の中で最も遅く、かつ細胞内の生物時計の周期と1対1で対応するような化学反応」を探すことにした。KaiC は519個のアミノ酸からなり、6本のポリペプチド鎖が非共有結合的に会合した6量体を形成している<sup>29)</sup>。1~254番目の部分はN末端側、255~519番目の部分はC末端側と呼ばれ、律速となる ATPase の活性中心はN末端側に位置していた。この ATPase 活性の遅さが空間スケールの異なる多重の階層を越えて伝播され(Fig. 3)、最終的には細胞レベルにおける遺伝子の転写・翻訳のリズムを規定していることが判明した<sup>30)</sup>。

## 6. どうしてそんなに遅いのか

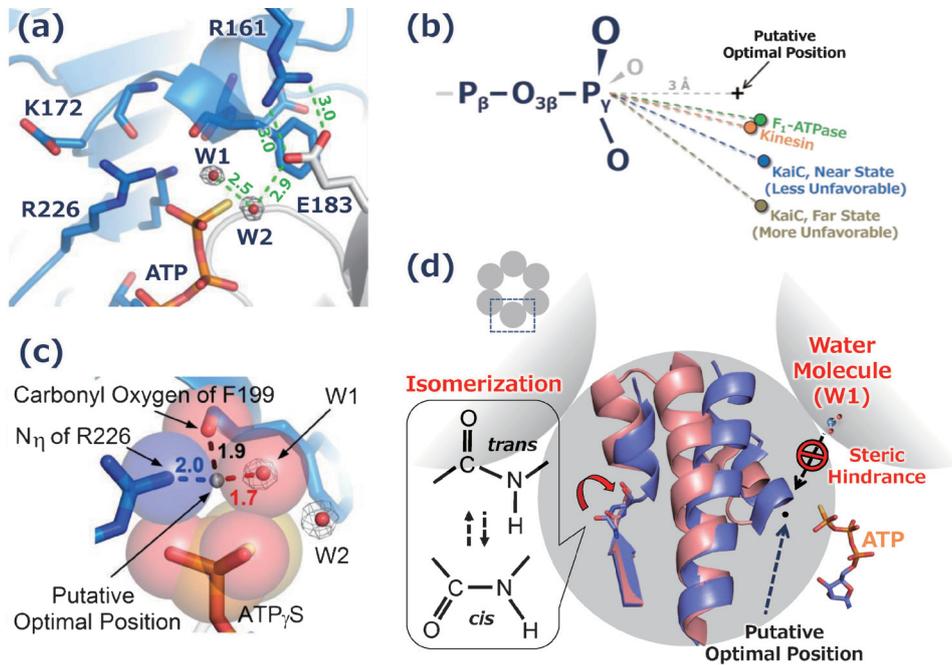
私たちの研究チームは ATPase の構造解析に全精力を注ぎ込んだ。ATP を加水分解する反応は、その名の通り ATP に水分子を加えてアデノシン二リン酸(ADP)とリン酸(Pi)に分解する反応である。反応性を議論するには ATP を求核攻撃する水分子(求核性水分子)の位置決定が要となり、構造解析の空間分解能も水分子が同定できる程度まで高める必要があった。振り返ってみると9年もの時間を費やしていた<sup>30)</sup>。

KaiC の求核性水分子(W1)は他の水分子(W2)と水素結合を介して隣接しており[Fig. 4(a)], その ATP に対する位置や配向は他に類を見ないものであった。W1 の酸素原子は、ATP の末端リン酸基( $\gamma$ )のリン原子( $P_\gamma$ )から3.9 Å の位置に確認され、高い ATPase 活性を有する F<sub>1</sub>-ATPase<sup>31)</sup>やキネシン<sup>32)</sup>の求核性水分子(2.3~3.8 Å)よりも遠くに位置していた[Fig. 4(b)]。一般的に、求核性水分子が  $P_\gamma$  と酸素原子( $O_{3\beta}$ )を結ぶ直線上に位置すると反応に有利だとされるが(至適位置, Fig. 4(b)の十字), KaiC の W1 は至適位置からより大きく逸脱していた( $\angle W1-P_\gamma-O_{3\beta} = 154 \sim 158^\circ$ )。KaiC の ATPase が F<sub>1</sub>-ATPase やキネシンの10<sup>2</sup>分の1~10<sup>6</sup>分の1と低活性であることから、求核性水分子を至適位置から隔離することが、著しく低い活性を実現している構造的要因の一つであると結論される。

KaiC が加水分解反応を進めるためには、W1 を至適位置に移動させなくてはならないが、結晶構造はそれが容易でないことを物語っている。ATP を結合した状態の構造を詳しく観察すると[Fig. 4(c)], 化学的に至適とされる位置の近傍には他のアミノ酸の側鎖や主鎖が配置されており、分子動力学計算の結果からも、これらが立体障害とな



**Fig. 3** (Color online) *trans*-hierarchical nature of circadian clock system in cyanobacteria. This figure highlights the cross-correlation of oscillatory frequencies and enzymatic activities for a series of KaiC variants. Order parameters are given hierarchy by hierarchy; transcription and translation oscillation (TTO, top layer), intermolecular interactions (2nd layer from top), intra-molecular regulations (2nd and 3rd layers from the bottom), and chemical reactions (bottom layer). For example, in the case of the panel (d), the vertical and horizontal axes corresponds to the frequency of *in vivo* TTO cycle and ATPase activity, respectively, of N-terminal half of KaiC. Figures are taken and reproduced from the reference<sup>30</sup>.



**Fig. 4** (Color online) Atomic-scale origins of slowness in cyanobacterial clock protein, KaiC. (a) Crystal structure of ATP $\gamma$ S (adenosine 5'-( $\gamma$ -thiotriphosphate))-bound KaiC. Two water molecules labeled as W1 and W2 are stabilized by a hydrogen-bond network (green dotted line). (b) Schematics of the positions of the attacking water molecules (W1). Cross indicates a putative optimal position of W1 for attacking P $\gamma$  atom of  $\gamma$ -phosphate of ATP. (c) Zoomed-in view of W1 and residues nearby ATP $\gamma$ S. Spheres represent van der Waals radii. W1 is sequestered from the optimal position. (d) Structural changes of KaiC from ATP-bound (pre-hydrolysis, blue) to ADP-bound (post-hydrolysis, pink) states. Steric hindrances as in the panel (c) are canceled through the transition that is interlocked with a *cis*-to-*trans* isomerization of the polypeptide chain. Figures are taken and reproduced from the reference<sup>30</sup>.

るため W1 が至適位置に入り込めないことが確認されている。では、KaiC が実際に加水分解するときには何が起きているのであろうか？

その答えは加水分解後の状態、すなわち ADP を結合した構造から読み取ることができた。W1 の至適位置への侵入を拒んでいた立体障害は、複数の水素結合の切断を伴う劇的な構造変化により解消され [Fig. 4 (d)], それにより ATP の求核攻撃が可能となる。驚くことに、立体障害を解消する構造変化が容易に起こらないよう、やや遠方の位置にあるポリペプチド主鎖のシス-トランス異性化によって強固に固定化されていることがわかった。ポリペプチド鎖の異性化は、タンパク質分子の示すダイナミクスのうち最も遅いタイムスケールにあたり、局所的な異性化反応であっても  $14 \sim 16 \text{ kcal mol}^{-1}$  の活性化エネルギーを要することがわかった。

$F_1$ -ATPase やキネシンといったモータータンパク質は KaiC よりも高い ATPase 活性を有するが、それらでさえ求核攻撃の過程には  $11 \sim 17 \text{ kcal mol}^{-1}$  の活性化エネルギーが必要となる<sup>33,34,35</sup>。上記からも明らかのように、KaiC の W1 はこれらの例よりも至適位置から逸脱しており、かつ W1 の侵入を妨げる立体障害を解消するためには主鎖の異性化と共役した大規模な構造転移を起こす必要がある。相関プロットによると [Figs. 3 (d) and 3 (i)], 24 時間周期に相当する加水分解速度は  $12 \text{ ATP d}^{-1}$  ( $0.5 \text{ h}^{-1}$ ) となる。アレニウスの式をもとに活性化エネルギーを推定すると、およそ  $22 \text{ kcal mol}^{-1}$  となり ( $A = 10^{12} \text{ s}^{-1}$ ,  $T = 303.15 \text{ K}$ ), 上述のような構造的要因 [Fig. 4 (d)] が一体となることで極めて低く安定した ATPase 活性が実現されていることが伺える。

## 7. 2 度目のゲーム・チェンジ？

この遅い ATPase は KaiC の固有振動数を規定する重要な素反応である。KaiA と KaiB が共存する環境では、KaiC の ATPase 活性はリズムに概日周期で増減する [Fig. 5 (a)]。KaiC 単独では安定に発振することはできないが、その活性の緩和過程は単調なものでなく、減衰型の

振動成分を示した。この結果は、KaiC そのものに（継続的に振動することはできないが）振動するための最低限の要素が詰め込まれていることを暗示している。ひとまず私はどれくらいの周期に対応する緩和現象なのかを見積もることにした。2 次の伝達関数<sup>36</sup>) を仮定して緩和曲線を解析したところ、固有振動数 ( $\omega$ ) が  $0.91 \text{ d}^{-1}$ , ダンピング係数 ( $\xi$ ) が  $1.06$  と見積もられた。この結果は、1 日におよそ 1 回振動するための固有振動数が KaiC に内包されているのだが、それが容易に発振しないよう（一定値になるよう）何らかによって強く封じ込まれていることを示唆する。

N 末端の ATPase 活性は  $\omega$  の値と見事に相関していた [Fig. 3 (i)]。更に驚くべきは、 $\omega$  が細胞内リズムの振動数をも決定している点である。周期の異なる KaiC 変異体を複数用意し、それぞれについて KaiC 単独の  $\omega$  を試験管内で定量した。次に、対応する KaiC 変異体を導入したシアノバクテリア株について、時計遺伝子の転写・翻訳活性の振動数を決定した。これらの振動数を比較したところ [Fig. 3 (b)], 見事なまでの一致が確認された。N 末端の ATPase に見られた非凡な構造的要因は、コアとなる時計タンパク質の固有振動数を規定し、延いては個体のリズムを規定していることが明らかとなった [Fig. 3 (d)]。

$\omega$  の正体を巡って今日でも議論は絶えないが、どうやら温度補償性と深く関わっていきそうである。ATPase の緩和曲線を異なる温度で調べたところ、十分に時間が経過した定常状態の活性は温度補償されているが、そこに至るまでの緩和は温度依存的事実であることが確認された [Fig. 5 (b)]。この結果は、KaiC には自己の ATPase 活性を一定に維持しようとする制御が備わっており、その制御の時定数  $\omega$  が概日周期にチューニングされていることを意味する。KaiA や KaiB との相互作用は、KaiC にとってみれば定値制御を攪乱する要因であるとも考えられる。分子間相互作用や温度など種々の外乱を受けた KaiC は、次の定常状態を目指して Fig. 5 (a) に示されるような周波数  $\omega$  に相当した緩和を始めるとも推測される。

このような観点から KaiC の結晶構造を眺めると、幾つか興味深い点に気が付く。W1 には 2 種類の配置があり、一つは 6 節で紹介した  $P_\gamma$ -W1 距離が  $3.9 \text{ \AA}$  の状態 (near state), もう一つは  $P_\gamma$ -W1 距離が  $4.3\text{--}4.6 \text{ \AA}$ ,  $\angle W1\text{--}P_\gamma\text{--}O_{3\beta}$  が  $141\text{--}143^\circ$  と至適位置からより大きく逸脱した状態 (far state) である [Fig. 4 (b)]。Near state と far state, どちらも一般的な ATPase に比べて加水分解には不向きな構造であると言えるが、後者は前者よりも更に低活性と推測できる。これまでの私たちの観察の範囲ではあるが、6 量体を構成する全サブユニットの活性中心が片方の状態に統一されていることもあれば (Fig. 6), 他の条件では両者が 6 量体内に混在する場合も確認されている。活性の異なる 2 状態の比率や空間配置を 6 量体内で調整し、6 量体全体として ATPase を一定に保とうとする制御の片鱗が見えつつあるのかもしれない。

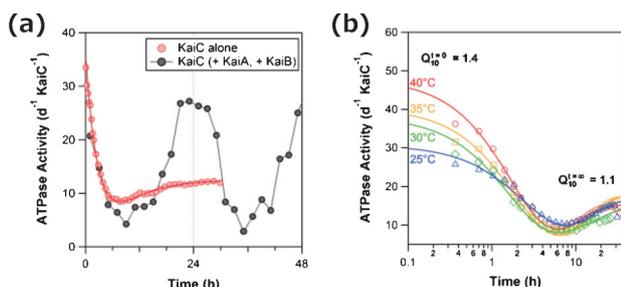
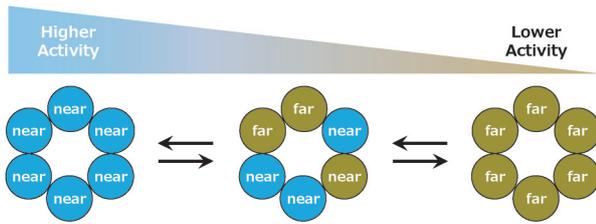


Fig. 5 (Color online) Unusually slow (a) and temperature-compensated relaxation (b) of KaiC ATPase.



**Fig. 6** (Color online) Potential homeostatic regulation of KaiC ATPase. Circles labeled with “near” and “far” stand for near- and far-states, respectively, of KaiC. The position of W1 in the near state is closer to the ideal position than that in the far state in as in Fig. 4(b).

## 8. 残された課題

生物時計の温度補償性は、多くの研究者の関心を惹きつけてやまない不思議な現象である<sup>27)</sup>。遅い反応それ自体は効率の悪い化学反応で説明できるが、そのような反応系は大きな活性化エネルギーを有するため、温度上昇に従って著しく加速されるのが一般的である。24時間スケールに匹敵する遅さの根源を原子スケールで見つけることができたが、残念ながら温度補償性を同時に説明するには至っていない。一見、互いに排他的となる「遅い反応」と「温度補償性」を統一的に説明することが残された課題である。

ここに切り込むためには、やはり鍵となる構造が必要になるであろう。構造では何もわからないという意見もあるかもしれないが、このケースで私はそうは思わない。変異によって活性が野生型より低くなった、もしくは高くなった——このような議論においては確かに構造情報があると便利だが必須ではない。しかし、時間生物学における最終問題「24時間（と温度補償性）がどのように決められているのか」に対する最終回答は、「野生型より短周期になった、もしくは長周期になった」といった類（変化）の論ではなく、「この構造からあの構造に移る際の活性化エネルギーが何 kcal mol<sup>-1</sup>だから…」というように24時間という絶対的な数値とエネルギー（情報）のやり取りを具体的に結び付ける必要がある。私には、そのために鍵となる因子の構造情報が必須となる気がしてならない。

## 9. おわりに

シアノバクテリアの時計遺伝子が1998年に発見され<sup>6)</sup>、それを報じる論文では転写・翻訳モデルに沿った解釈がなされている。2005年の近藤らの発見により、少なくともシアノバクテリアでは転写・翻訳モデルが根底から覆されることとなる<sup>7,8)</sup>。これは大きなゲーム・チェンジであり、時間生物学分野の研究者はもちろん、タンパク質の構造や物性を研究している研究者にも大きなインパクトをもって伝えられた。それから6年後の2011年、ヒト赤血球内に転写翻訳を介さないタンパク質の振動現象が発見さ

れている<sup>37)</sup>。Konopka 等によるショウジョウバエの時計遺伝子 Period の発見<sup>38)</sup>から45年を迎えるが、現在は、「タンパク質時計システム」と「転写翻訳を介した振動機構」が相補的に共存していると解されつつある。他の生物種についてもタンパク質時計の探索や研究が進捗し、その重要性や注目度が高まるものと予期される。

私たちは、2度目のゲーム・チェンジの真っ只中にいるのかもしれない。Kai タンパク質時計の周期は、3種類ある Kai タンパク質の1種類の構造にエンコードされている。原子スケールで構成因子を精査し、見つけた構造的要因と何桁も異なる空間スケールでのリズム特性の因果関係を検証している。階層性の階段を昇っては降り、そして降りては昇りながら最終回答へと近づいていく——その特定数が何によって決まるのか気になるところであるが、それはさておき、階層性を強く帯びた生物時計システムの研究には放射光科学が重要である。

原子や分子のスケールよりも高階層で起こる振動現象を追いかける際も放射光の果たす役割が大きいであろう。24時間の周期性を宿した KaiC が細胞内にどのような空間配置で分布し、込み入った環境下でどのように情報を交換して同調しているのか…。シアノバクテリアではクロマチンの高次構造が24時間周期で変化するが、どのようにして概日時計の位相情報を受け取り、このような大規模な構造転移を引き起こしているのか…。細胞内の特定部位をピンポイントで計測したり、細胞全体のリズムをイメージングするなど、多重の階層にわたる概日時計システムの統合的計測に放射光が役立つのではと期待する。

結晶構造解析を実際に行うことで、X線小角散乱をこれまでとは違った観点からみることができるようになり、私自身のなかで幅が広がった感がある。よく考えてみると、冒頭の言葉の主も X線小角散乱から入って、その後結晶構造解析へと研究を展開している。その言葉の意図が、今は少しわかるような気がする。

## 謝辞

シアノバクテリアの時計タンパク質に関する研究は、名古屋大学理学研究科の近藤孝男特任教授、大阪大学蛋白質研究所の山下栄樹助教、分子科学研究所の阿部淳博士、向山厚助教、森俊文助教、斉藤真司教授との共同研究成果です。X線小角散乱は SPring-8 BL45XU にて、X線結晶構造解析は創薬等支援技術基盤プラットフォームの支援のもと同施設 BL44XU にて行いました。関係者の皆様方にご場をお借りして御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda: Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome, *Mol. Cell* **29**, 703 (2008).
- 2) C. S. Pittendrigh: Temporal organization—reflections of a

- Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 16 (1993).
- 3) M. W. Young and S. A. Kay: Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 702 (2001).
  - 4) D. Bell-Pedersen, V. M. Cassone, D. J. Earnest, S. S. Golden, P. E. Hardin, T. L. Thomas and M. J. Zoran: Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 544 (2005).
  - 5) B. Schwanhäusser, D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen and M. Selbach: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337 (2011).
  - 6) M. Ishiura, S. Kutsuna, S. Aoki, H. Iwasaki, C. R. Andersson, A. Tanabe, S. S. Golden, C. H. Johnson and T. Kondo: Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**, 1519 (1998).
  - 7) J. Tomita, M. Nakajima, T. Kondo and H. Iwasaki: No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* **307**, 251 (2005).
  - 8) 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* **308**, 414 (2005).
  - 9) 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.* **14**, 1084 (2007).
  - 10) T. Yoshida, Y. Murayama, H. Ito, H. Kageyama and T. Kondo: Nonparametric entrainment of the in vitro circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial KaiC by temperature cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 1648 (2009).
  - 11) 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* **99**, 15788 (2002).
  - 12) 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. USA* **101**, 13927 (2004).
  - 13) Y. Kitayama, H. Iwasaki, T. Nishiwaki and T. Kondo: KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J.* **22**, 2127 (2003).
  - 14) Y. Xu, T. Mori and C. H. Johnson: Cyanobacterial circadian clockwork: roles of KaiA, KaiB and the *kaiBC* promoter in regulating KaiC. *EMBO J.* **22**, 2117 (2003).
  - 15) 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.* **26**, 4029 (2007).
  - 16) 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* **318**, 809 (2007).
  - 17) 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* **23**, 161 (2006).
  - 18) H. Kageyama, T. Kondo and H. Iwasaki: Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC, and SasA in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* **278**, 2388 (2003).
  - 19) Y. Murayama, A. Mukaiyama, K. Imai, Y. Onoue, A. Tsunoda, A. Nohara, T. Ishida, Y. Maéda, K. Terauchi, T. Kondo and S. Akiyama: Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution. *EMBO J.* **30**, 68 (2011).
  - 20) 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.* **5**, e93 (2007).
  - 21) 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.* **27**, 1767 (2008).
  - 22) J. S. van Zon, D. K. Lubensky, P. R. Altena and P. R. ten Wolde: An allosteric model of circadian KaiC phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7420 (2007).
  - 23) 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 (2008).
  - 24) M. Karplus: Aspects of protein reaction dynamics: deviations from simple behavior. *J. Phys. Chem. B* **104**, 11 (2000).
  - 25) A. Tousignant and J. N. Pelletier: Protein motions promote catalysis. *Chem. Biol.* **11**, 1037 (2004).
  - 26) C. L. Brooks III: Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics. *Adv. Chem. Phys.* **71**, 1 (1988).
  - 27) S. Akiyama: Structural and dynamic aspects of protein clocks: How can they be so slow and stable? *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 2147 (2012).
  - 28) 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. USA* **104**, 16377 (2007).
  - 29) A. Mukaiyama, M. Osako, T. Hikima, T. Kondo and S. Akiyama: A protocol for preparing nucleotide-free KaiC monomer, *BIOPHYSICS* **11**, 79 (2015).
  - 30) J. Abe, T. B. Hiyama, A. Mukaiyama, S. Son, T. Mori, S. Saito, M. Osako, J. Wolanin, E. Yamashita, T. Kondo and S. Akiyama: Atomic-scale Origins of Slowness in the Cyanobacterial Circadian Clock, *Science* **349**, 312 (2015).
  - 31) W. Bowler, M. G. Montgomery, A. G. Leslie and J. E. Walker: Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution, *J. Biol. Chem.* **282**, 14238 (2007).
  - 32) L. Parke, E. J. Wojcik, S. Kim and D. K. Worthylake: ATP hydrolysis in Eg5 kinesin involves a catalytic two-water mechanism. *J. Biol. Chem.* **285**, 5859 (2010).
  - 33) M. J. McGrath, I. F. Kuo, S. Hayashi and S. Takada: Adenosine triphosphate hydrolysis mechanism in kinesin studied by combined quantum-mechanical/molecular-mechanical metadynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 8908 (2013).
  - 34) B. L. Grigorenko, A. V. Rogov, I. A. Topol, S. K. Burt, H. M. Martinez and A. V. Nemukhin: Mechanism of the myosin catalyzed hydrolysis of ATP as rationalized by molecular modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7057 (2007).
  - 35) S. Hayashi, H. Ueno, A. R. Shaikh, M. Umemura, M. Kamiya, Y. Ito, M. Ikeguchi, Y. Komoriya, R. Iino and H. Noji: Molecular mechanism of ATP hydrolysis in F1-ATPase revealed by molecular simulations and single-molecule observations. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8447 (2012).
  - 36) G. F. Franklin, J. D. Powell, A. Emami-Naeini: *Feedback Control of Dynamic Systems* (Pearson, Upper Saddle River, ed. 7, 2014).
  - 37) A. B. Reddy and J. S. O'Neill: Circadian clocks in human red

- blood cells, *Nature* **469**, 498 (2011).  
 38) R. J. Konopka and S. Benzer: Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2112 (1971).

## 著者紹介



## 秋山修志

自然科学研究機構 分子科学研究所  
 協奏分子システム研究センター 教授

E-mail: akiyamas@ims.ac.jp

専門：生物物理学，X線小角散乱，時間生物学

## 【略歴】

1997年京都大学工学部卒，1999年京都大学大学院工学研究科修士課程修了，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）。日本学術振興会特別研究員，理化学研究所基礎科学特別研究員，科学技術振興機構さきかけ「生命現象と計測分析」研究員（専任），名古屋大学大学院理学研究科講師/准教授を経て2012年4月より現職，および総合研究大学院大学・教授。2013年4月より協奏分子システム研究センター長。

## Interplay of chronobiology & synchrotron radiation research

**Shuji AKIYAMA** Research Center of Integrative Molecular Systems (CIMoS)  
 Institute for Molecular Science (IMS), National Institutes of Natural Sciences (NINS)  
 38 Nishigo-Naka, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Japan.

**Abstract** This review focuses on recent progress in the field of chronobiology in which researchers have addressed a long standing question: How is the 24-hour period of biological rhythms (clocks) is determined? The origins of slow but ordered dynamics of clock systems are discussed with the present and future interplay of chronobiology and synchrotron radiation research in mind.