

変化し続ける概日時計研究のかたち

秋山 修志^{1,2}✉ · 古池 美彦^{1,2} · 向山 厚^{1,2}

1: 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

2: 総合研究大学院大学 物理科学研究科 機能構造分子科学専攻

運動の数をもって時間となす—アリストテレスの著書「自然学」¹における時間に関する記述である。日時計、クォーツ時計、そして原子時計、大きさも精度も様々であるが、私たちは運動をもとに時間という概念を作り出し活用してきた。そしてこの考え方は概日時計にも当てはまりそうである。扱っている系や手法による差異こそあれ、個体の行動、細胞の運動、ときには生体分子のリズミクな状態変化をもとに時間を計っている。本稿では、時を刻むタンパク質が存在していること、そしてそのタンパク質の構造や運動に地球の自転周期（24時間の時定数）がエンコードされていることを紹介し、最後に分野の将来展望について述べたい。

1. はじめに

概日時計の研究の歴史は、個体の行動リズムを規定する遺伝子（時計遺伝子）の発見²に端を発し、時計遺伝子がコードするタンパク質（時計タンパク質）の安定性が転写・翻訳サイクルにおいて重要な役割を担うことが示され、そして今や、時計タンパク質の原子構造をもとに計時機構が議論されるまでに至っている。対象とする空間スケールは個体から器官、組織、細胞、分子システム、分子、原子…にまで及び（図1）、その結果として扱う時間スケールも日から時間、分、秒、サブミリ秒…へと広がりを見せつつある。これは、生理学によって拓かれた分野が分子生物学にとどまらず、生化学、生物物理学、構造生物学、理論科学などを巻き込みつつ発展してきた経緯を表している。時空間マルチスケール化そして学際化が進むにつれて、概日時計研究のかたちも多様化している。

何をもって「概日時計を理解した」と言えるであろうか。この問いに回答できるということは、現状として計測手法が未整備であったり技術的課題が残されていたりするとしても、研究の最終到達点が明確にイメージできていることに他ならない。筆者ら自身にとっても依然として難しい問いであるが、困ったときには概日時計に共通して観察される3つの性質（概日時計の3性質）に立ち戻るよう心掛けている。

概日時計の振動体は恒常的条件下でも約24時間の周期で発振し（①自律的発振）、かつ周期長がほとんど温度依存性を示さない（②温度補償性）。環境（光

や温度など）の周期的変動が入力系を介して振動体へと伝えられ、それに呼応するように振動体は位相を前後にシフトさせて同調する（③同調能）。これら3つの性質を過不足なく説明するモデルを提唱することは、概日時計研究において目指すべき到達点の一つでなかろうか³。

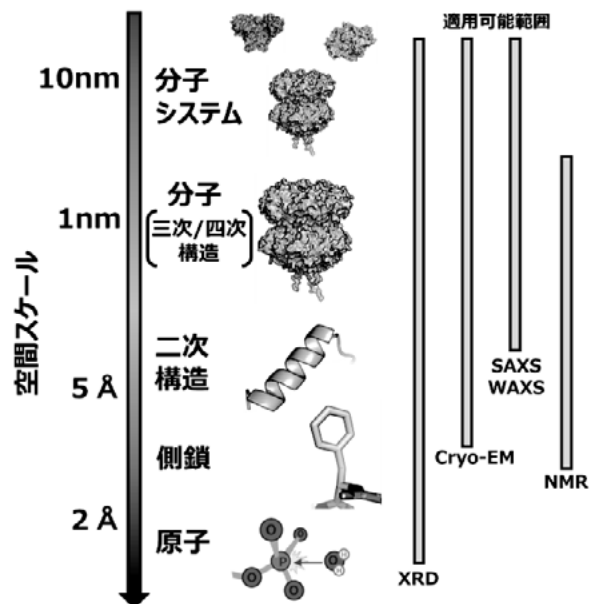


図1 タンパク質の階層構造（左側）と解析手法（右側）の関係 XRD（X線結晶構造解析）、Cryo-EM（クライオ電子顕微鏡による単粒子解析）、S/WAXS（溶液散乱）、NMR（核磁気共鳴法）など、手法により適用できる空間スケールに特徴がある。

✉ akiyamas@ims.ac.jp

2. シアノバクテリアの概日時計システム

その研究は、概日時計の3性質の発現に関わる最小の構成単位(源振)を探索し、システム全体の生理学的な振る舞いと源振との関係性を追求する方向に発展してきた。時計遺伝子(*kai*)が日本人研究者を中心とした研究グループによって1998年にクローニングされると⁴、わずか6年後の2004年までに、3種ある時計タンパク質(*KaiA*、*KaiB*、*KaiC*)それぞれの単独結晶構造が報告された^{5,8}。その後、3種の*Kai*タンパク質とATPを混合することにより、2005年に*KaiC*のリン酸化サイクルが試験管内で再構成され⁹、そして2007年にATPaseサイクル¹⁰が見出された。

再構成系の登場にともない、研究の舞台は*Kai*タンパク質の分子間相互作用へと移された。対象となるタンパク質の種類が限定され、試料の供給体制が整備されたときの生化学の突破力は他に類を見ないものがある。シアノバクテリアの研究においてもそれは例外ではなく、*Kai*タンパク質の相互作用に関する重要課題の大部分を優秀な生化学者がスピード感をもって解決している¹¹⁻¹³。それらに続くように、NMR^{14,15}、溶液散乱^{16,17}、X線結晶構造解析や電子顕微鏡^{18,19}などを駆使した研究成果が発表され、生化学のみで解明できなかった部分を生物物理学や構造生物学が補完してきた。2017年には*KaiABC*複合体の部分構造がクライオ電子顕微鏡²⁰およびX線結晶構造解析²¹により同定され、いまでは、源振(*KaiABC*系)と入出力系の相互作用についても構造生物学的に研究されている²¹。

これらの研究により、*Kai*タンパク質がどのような化学量論比や空間配置で複合体を形成し、それらが時計の位相と連動してどのように時間変化するのかが解明された。空間分解能や結合比の観点からは十分な理解に達していないケースも散見するが、源振の分子間相互作用に関する課題はほぼ何かしらの方法で研究され、一定の成果が挙げられたと言える。微力ながら筆者らもその一部に関わってきたのだが、ではこれで概日時計の3性質は過不足なく説明されたのだろうか？

複合体の構造が明らかになると、結合相手や結合比の変化を織り込んだ反応モデルを構築することができる。分子を記号で略記し、それらの離合集散サイクルが観察結果に沿うように反応速度や各種パラメータを最適化することは、多様化しつつある概日時計研究のかたち(到達点)のひとつである。ただ残念ながらこの場合、構造データは専ら結合様式や結合比の同定のためにだけ用いられ、原子スケールの情報(座標)

は全くと言ってよいほど活用されていない。

3. 私たちが目指すかたち

リン酸化/ATPaseサイクルの安定発振には*KaiA*と*KaiB*の共存が必須であるが、*KaiC*単独でもATPase活性は減衰振動のような緩和を示し、まったく発振できないわけでもないことに私たちは気が付いた(図2)²²。減衰型の振動成分を幾つかの仮定のもとで解析したところ、およそ 0.91 d^{-1} の固有振動数(ω_N)に該当することが判明した。*KaiC*の周期変異体を使って観察対象を広げたところ、 ω_N は*in vitro*リン酸化サイクル(*KaiA/KaiB*共存下)の周波数だけでなく(図3D)、*in vivo*転写・翻訳サイクルの周波数とも高い相関を示した(図3B)。やはり、*KaiC*には地球の自転頻度(1回/日)で駆動される運動が内包されているのである。

ω_N は定常状態におけるATPase活性と高い相関を示した。例えば、アミノ酸変異によって*KaiC*のATPase活性が2倍に向上すると、 ω_N や転写時計の振動数も2倍となった(図3CEF)。*KaiC*は定常状態で約12個のATPを1日に加水分解するが、この活性は既知のモータータンパク質($10^3 \sim 10^7 \text{ d}^{-1}$)に比べて著しく低い。 ω_N を規定するATP加水分解反応を原子スケールで理解し、第1の性質にあたる24時間(絶対的な遅さ)の起源を解明したい—これが私たちの目指す概日時計研究のかたちであった。

ATP加水分解とは、水分子(W_1)をATPの末端リン酸(P_γ)に作用させてアデノシン二リン酸(ADP)とリン酸(P_i)に分解する反応である(図4)。もう少し化学的に説明すると、水分子($\text{H}-\text{O}-\text{H}$)の酸素原子が保有する電子対を P_γ に接近(求核攻撃)させて P_i を切り離す過程($\text{S}_\text{N}2$ 反応)であり、反応性を議

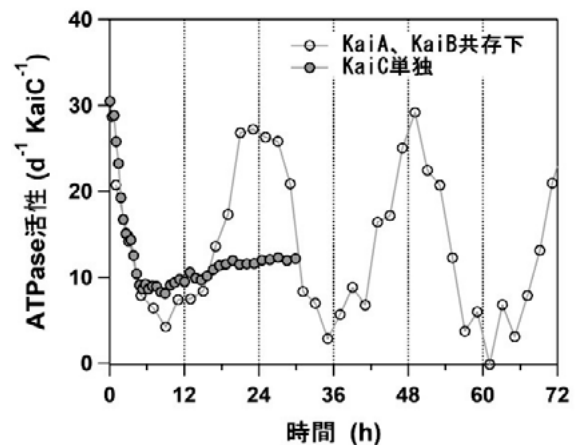


図2 *KaiC*のATPase活性のダイナミクス
*KaiC*単独であっても、ATPase活性の緩和過程に減衰型の振動成分が観察される。

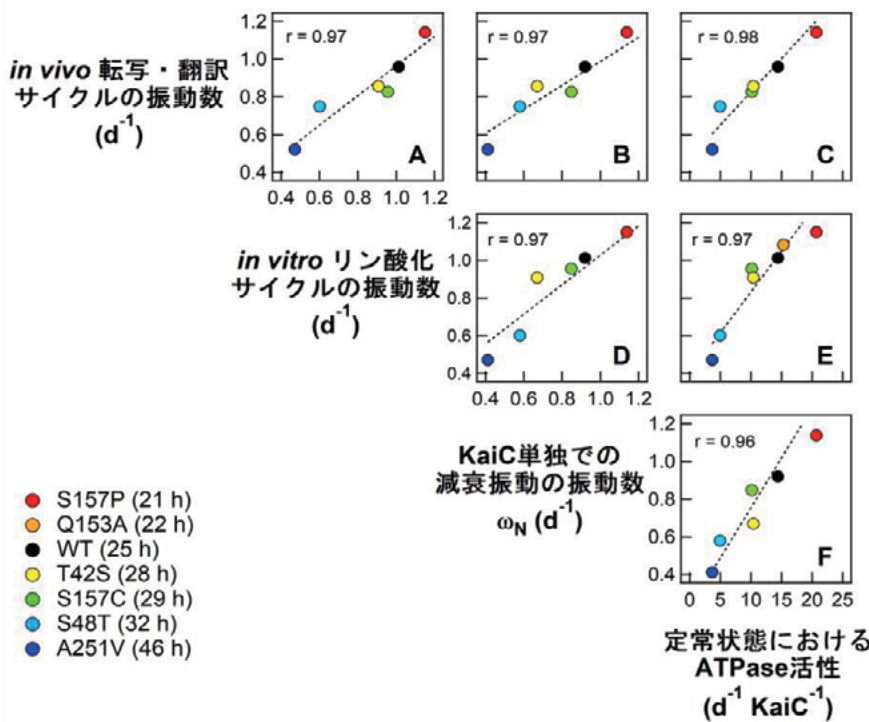


図3 シアノバクテリア生物時計システムの階層相関プロット
KaiC 周期変異体 (株) の『運動』の頻度を周波数もしくは活性として評価し、それらを空間スケールごとにプロットして階層間の相関を検証した。例えば、パネル D の縦軸は KaiC リン酸化サイクルの周波数 (KaiA と KaiB 共存下)、そして横軸は ATPase 活性の減衰振動成分の周波数 (KaiC 単独) に対応する。

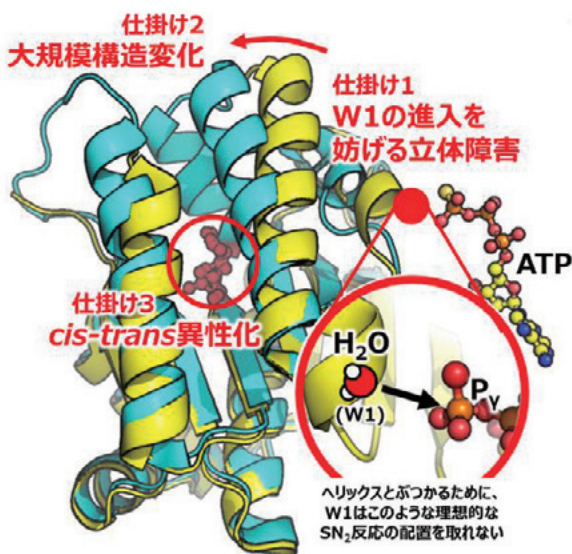


図4 KaiC の ATPase を抑制する 3 つの仕掛け
P_γ 周辺の立体障害、大規模な構造変化 (黄→シアン)、ペプチド結合の異性化 (cis-trans)、これら 3 つの抑制的制御を受けて KaiC の ATPase は低活性化する。

論するうえで ATP に対する W1 の配置が重要となる。私たちが長い年月をかけて解いた原子座標をもとに理論化学的な計算を実施したところ、P_γ 周辺に W1 の攻撃を妨げる立体障害 (第 1 の仕掛け) が設けられていることがわかった。この立体障害を取り除くために KaiC は大規模な構造変化 (第 2 の仕掛け) を余儀なくされるが、それが容易く起こらないように、Asp145-Ser146 間のペプチド結合に第 3 の仕掛け (cis-trans 異性化) が施されている。ペプチド結合

の異性化はタンパク質分子の運動の中でもかなり遅い部類にあたり、今回のケースでも 14~16 kcal mol⁻¹ の活性化エネルギーを要することを見出した。P_γ 周辺の立体障害、それを解消するための大規模な構造変化、ペプチド結合の異性化によるインターロック、これら 3 つの抑制的制御を受けて KaiC の ATPase は低活性化し、それによって 24 時間という遅い時間スケールを実現しているようである。

KaiC 内部で生み出された遅い時間スケールの運動は、一体どのようにして分子間相互作用の階層 (図 3D) へと伝搬されるのであろうか? タンパク質とリガンド (タンパク質を含む) の相互作用が特異である場合、両者の立体構造が結合反応の前後で不変であることは稀で、新たに形成された水素結合やファンデルワールス相互作用などに伴って立体構造を再構築する。ここで重要なのはできあがった複合体の構造を観察するばかりではなく、複合体形成の途上段階に着目してはじめて明らかになることもあるという点である。構造変化のタイミングが結合イベントの前か後かによって、反応は大きく違った様相を見せる。Conformational Selection と呼ばれる分子認識機構 (CS 機構、図 5A) は、構造変化が結合よりも先に起こるとする反応モデルで、例えば、KaiB が結合に適した KaiC のある状態を選択的に認識して結合するといったイメージを描くことができる。このとき KaiBC 複合体の結合イベントは KaiC の状態/構造に依存した形で記述できる。他方、Induced Fit 機構 (IF

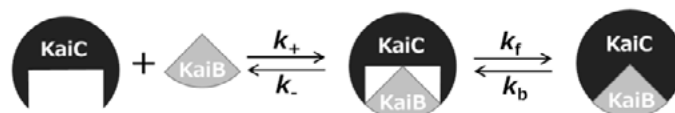
A Conformational Selection (CS) 機構

リガンド (KaiB) が特定の構造を「選択」して結合



Induced Fit (IF) 機構

結合したリガンド (KaiB) に合わせて構造変化



B

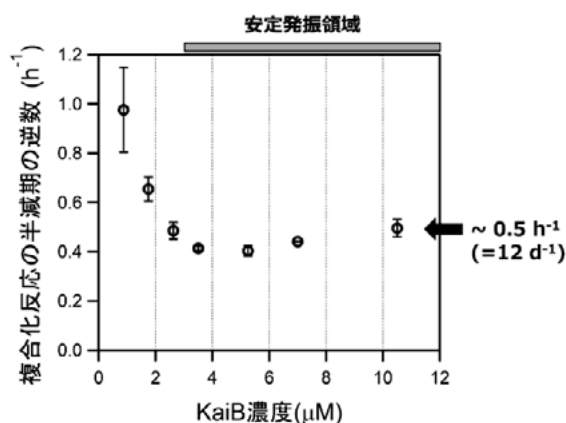


図5 分子認識における結合と構造変化のタイミング

(A) CS 機構と IF 機構の対比。リガンド (KaiB) 濃度が飽和したときの複合体生成速度は、CS 機構であれば k_f に、そして IF 機構であれば $(k_f + k_b)$ になる。(B) 複合体生成速度の KaiB 濃度依存性。KaiC リン酸化サイクルが安定して観察される KaiB 濃度領域 (図上部の灰色部分) では、KaiC に対して KaiB が飽和しており、その速度は定常状態における KaiC の ATPase 活性 ($0.5 \text{ h}^{-1} = 12 \text{ d}^{-1}$) に近い。

機構、図 5A) は結合が構造変化に先行する反応モデルであり、例えば、まず KaiB と KaiC が遭遇して互いの構造を保持したまま複合化し、次の段階で KaiC (場合によっては KaiB も) がより安定な複合体の状態を求めて構造を変化させる。

どちらのモデルにおいても、結合を伴う過程が濃度依存的になることは共通しており、 μM 程度の濃度域であれば問題なく秒以下のオーダーで完結する。だが同じ速度定数を用いたとしても (図 5)、構造変化過程と結合過程が前後するだけで複合体形成速度の KaiB 濃度依存性に差が生じる。KaiB 濃度が飽和している条件では、IF 機構寄りの場合には $(k_f + k_b)$ の速度で、そして CS 機構寄りであれば k_f の速度で複合体が形成される。 k_f が遅い ATP 加水分解反応と共役した KaiC の構造変化 (図 4) にあたるとすると、どちらの反応機構を選択するかによって下流に伝搬される反応速度に差が生じる。

KaiB と KaiC の相互作用を蛍光分光法で詳しく調べたところ、やはり CS 機構が決定的な役割を果たしていることがわかった²³。実験の詳細は省略するが、KaiBC 複合体の形成は KaiC の遅い ATPase とリン酸化状態によりゲーティングされており、KaiB は加水分解産物である ADP を結合したリン酸化型 KaiC を選択して結合する。リン酸化/ATPase サイクルが安定発振する濃度域では、複合化反応の律速段階が KaiC の ATP 加水分解反応 (図 5B) となることも確認された。KaiC には遅い時間スケールの緩和を生み出すだけでなく、それを特別な相互作用を介して他の

分子種に伝搬し、最終的にシステム全体へと波及させていく仕組みが備わっている。

このように、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ちつつある。では、第 2 の性質はどうであろうか。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、概日時計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ある。遅い化学反応ほど温度依存的になるため、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。他方、KaiC の ATP 加水分解反応は極端に遅く (12 d^{-1}) かつ温度補償制御下にある ($Q_{10} = 1.0 \sim 1.1$)。この非凡な特性の背景に「概日時計としての特別な何か」が存在するという想定のもと、我々は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 (図 6)、そしてそれらの構造解析に日々取り組んでいる。次に目指す到達点は、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することである。

4. ショウジョウバエやマウスの概日時計システム

ショウジョウバエやマウスといった時間生物学における高等モデル生物は筆者らが直接扱っている研究対象ではないが、Kai タンパク質研究者の目線から当該分野がどのように見えているのかを、生物物理学や構造生物学の視点を交えつつ紹介したい。転写時計を見据えるのであれば、転写から自己抑制までの時間遅れ (遅さ) を生み出す構造基盤や反応機構が標的となるだろう。実際、転写・翻訳サイクルに組み込まれ

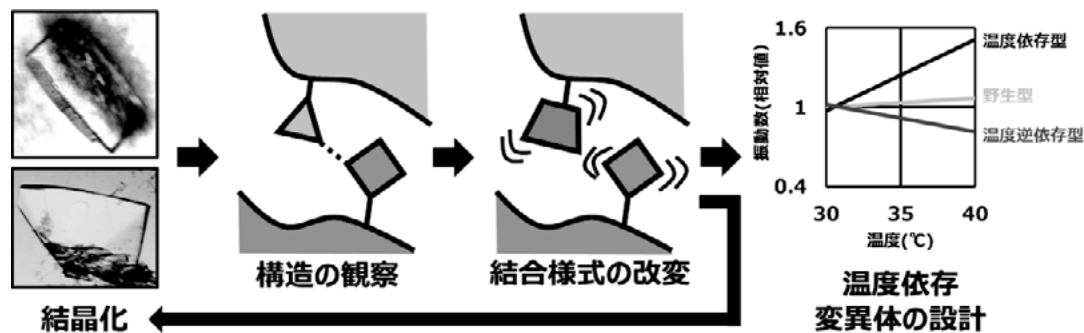


図6 構造情報をもとにした KaiC 温度依存変異体の設計概念図

た時計タンパク質を中心に研究が進められており、これまでにショウジョウバエ (*Drosophila*) の PERIOD タンパク質 (dPER)²⁴、マウスの PERIOD タンパク質 (mPER1, mPER2, mPER3)^{25,26}、そして CLOCK/BMAL1 複合体²⁷などの立体構造が解明されている。これらのタンパク質には bHLH (basic helix-loop-helix) モチーフや PAS (Per-Ahr/Arnt-Sim) ドメインといった転写調節因子を特徴づける構造ユニットが保存されている。PAS ドメインを介した二量体界面の相互作用が類似タンパク質 (mPER1-3) で異なること^{25,26}、周期変異が二量体界面付近に位置すること^{24,27}など、構造情報を時計タンパク質の安定性と関連させつつ解析がなされている。

bHLH-PAS ファミリーに属さない Cryptochrome (CRY) は、ショウジョウバエ (dCRY) とマウス (mCRY) の系で機能に違いがある。dCRY は青色光を受容してリズムの位相変化を促す。dCRY の X 線結晶構造の空間分解能は 2.3 Å であり^{28,29}、これはアミノ酸側鎖の位置/配向や水素結合などを高精度で議論するに足る空間分解能である。励起された FAD からの電子移動過程や FAD 光還元など、構造情報をもとにした研究が展開されている。dCRY の機能を考えると、第3の性質にあたる同調能と原子スケールの情報をどのように結び付けるかが今後のポイントになるであろう。

他方、mCRY は mPER とヘテロ複合体 (mCRY1/mPER2) を形成して負の転写制御を行う。mCRY1/mPER2 の X 線結晶構造は 2.45 Å の空間分解能で解かれ^{30,31}、二量体界面に位置する亜鉛イオンや、その近傍で mCRY1 内に形成されたジスルフィド結合など、原子スケールの構造解析をもとに細胞内レドックスとの関係性が示唆されている。

さらに、mCRY 単体についての研究も活発である。近年では概日時計に影響を及ぼす薬剤 (KL001) をスクリーニングし、mCRY と KL001 が結合した状態で

の共結晶化に成功した例がある^{32,33}。KL001 はプロテアソームによる mCRY の分解を抑制する効果があり、結果として概日時計を長周期化する。細胞内の mCRY は類似した F ボックス型ユビキチンリガーゼの FBXL3 により不安定化され、そして FBXL21 により安定化されることが知られており³⁴、KL001 が両者のバランスに変調を与えたのだとすると興味深い例であると言えよう。

ほぼ時を同じくして、大出らは CRY のリン酸化修飾部位を網羅的に同定し、そこにアミノ酸変異を導入して周期長への影響を調べている³⁵。周期長を変化させたアミノ酸変異を mCRY の結晶構造にマッピングした結果は美しく、タンパク質構造に慣れ浸しんだ著者にとっては思わずため息が漏れるほどである。アミノ酸変異は P-loop と C-lid と呼ばれる領域に局在しており、さらに先述の KL001 の結合部位とも近接しているのだ！これらの領域に負電荷が累積することで効果が顕著になることも議論されており、原子スケールの構造情報が有効活用された研究例である。

もう一つの主戦場、リン酸化酵素カゼインキナーゼ (Ck18) から目も離せない。Ck18 は mPER2 をリン酸化して安定化し、分解を抑制することで周期を長くする機能を有する。mPER2 は Ck18 によってリン酸化修飾を受ける部位を複数有するが、最も N 末端に位置する Ser659 の修飾が最初に起こり、かつそれが他のリン酸化部位を含めた反応全体の律速段階になることが実時間 NMR 解析で示されている³⁶。最近の研究成果によると、Ck18 には C 末端 16 残基の配列が異なるアイソフォームが存在し、異なるリン酸化活性を示す³⁷。リン酸化活性のより低い Ck181 が PER2 をより不安定化、そしてリン酸化活性の高い Ck182 が PER2 をより安定化することで周期長を調整しているようだ。Ck18 の C 末端は、それ単独で安定な立体構造 (α ヘリックスや β シートからなる球状ドメイン) を形成しない天然変性領域であると示唆さ

れており、mPER2を含む他の時計タンパク質との複合化時に相手の形状に合わせた構造を形成するのかもしれない。Ck16が注目を浴びる別の理由は、そのリン酸化活性が温度補償されているためである。篠原らの研究成果によると、高温下ではATP結合型Ck16と基質の相互作用が不安定化するのと同時にADP結合型Ck16と生成物の相互作用が安定化し、これらが温度上昇に伴う加速分を相殺するように作用して補償制御を実現している³⁸。in vitroモデル系におけるCk16の反応は分オーダーであり、KaiCよりも1~2桁くらい速いため、両者の温度補償制御にどれくらい類似点があるのか注意深く検証していきたい。

4. おわりに

論文等に掲載された時計タンパク質の構造が部分的にしか明らかになっていないことがあり、疑問を感じたことがあるのではないだろうか。とくに哺乳類の系に散見するが、これは全長試料のリコンビナント発現系が確立されていないか、されていても全長試料の精製や結晶化に技術的な制約があるためである。結晶構造解析に限らず構造解析には幾つかのボトルネックがある。様々な技術革新がなされてきた今日においてもなお、分子が結晶化する過程を過去の経験から予測することは困難であり、結晶化条件の網羅的スクリーニングに頼らざるを得ない。また一般的に、ループ状の柔軟な構造を多分に保持するタンパク質分子は、球状に折り畳まれたものよりも結晶化が容易でなくなる。論文に掲載されている部分構造は、全長から切り出す領域を微調整しながら結晶化スクリーニングをした苦勞の結果であると受け止めてよい。人類はこれ以外の方法で分子をÅの精度で整列させる術を持ち合わせておらず、少なくとも現状では、自然の叡智にすがらざるを得ないのである。

シアノバクテリアの系に比べると、哺乳類の時計タンパク質は長鎖で（mCLOCKは855アミノ酸、mCRY1は606アミノ酸、mPER2は1,257アミノ酸）かつ天然変性領域（Ck16のC末端など）を多分に含んでいる。時間遅れ（遅さ）や温度補償の核心に迫るためには、これらの巨大タンパク質が柔軟性を保ちつつ絡み合った超分子複合体を調製し、その単離を経て構造解析することが求められる。今日、電子顕微鏡を用いた単粒子解析の技術革新は目覚ましいものがあるが、柔軟でヘテロな系への対応は、トモグラフィー技術の更なる発展を待つ必要があるだろう。息の長い大変な仕事だが目標は明確である。

あくまでも一般論だが、構造生物学者は新しい未知

の構造を最初に解いて、それを主要な国際学術誌に論文掲載したいと考えるものである。特別な思い入れや学術的興味がない限り、既に構造が解かれている系に多大な労力を注ぐことは稀である。KaiCの場合、その全体構造は2004年のMolecular Cell誌に報じられ、その後、リン酸化変異体や複合体構造についての報告が続いた。構造や動態に関する研究を継続しているのは、我々を含めて、いずれもシアノバクテリアの概日時計に並々ならぬ関心を持つ研究グループである。概日時計の研究は他に比べて時間がかかる傾向があるので、好きじゃないと続かない面もあるだろう。

近い将来、概日時計の論文を出版するうえで、時計タンパク質の構造や動態に関する実験データが求められるケースが増えてくるかもしれない。哺乳類の系はその傾向が強まるような気がする。構造既知の系に専門家を引き込むのは容易でないため、今後の展開の速さにもよろうが、概日時計に興味のある研究者自身が専門家の指導のもとに汗をかくか、今から若手を指導して育成するしかない。「全長試料の安定供給が整備されてから」や「KaiCのカウンターパートが見つかったから」のような対応では世界に勝つことは難しい。我々の研究グループでは、X線結晶構造解析や溶液散乱などの講習会を定期的に行っている。スキルアップを目指す学生やポスドク、サンプル持ち込み、いつでも歓迎である。

以上本稿では、生物物理学や構造生物学の観点から概日時計を研究する意義について著者の見解を織り交ぜつつ、シアノバクテリアの概日時計の研究の方向性について概説した。前述のとおり、私たちの次の目標は第1と第2の性質を互いに矛盾なく原子スケールで説明することである。哺乳類の系においても、CRYやPERの安定性、ヘテロ複合体による負の制御とそれを解除する仕組み、Ck16のリン酸化活性…など、第1そして第2の性質の解明に向けて時計タンパク質の構造と動態に関する研究が国内外で活発化している。互いに切磋琢磨しつつ、これらの重要な課題にコミュニティ全体としてどこまで迫り切れるのか今後の展開に期待が高まる。

謝辞

歐陽東彦博士、阿部淳博士をはじめとする研究グループの同僚、そして近藤孝男博士（名古屋大学）、山下栄樹博士（大阪大学）、斎藤真司博士（分子科学研究所）、森俊文博士（分子科学研究所）、甲田信一博士（分子科学研究所）をはじめとする多くの共同研究者に御礼申し上げます。読み易さを優先する意図から科

学的な説明を一部省略して記述しました。詳細については他の総説³⁹などを参照して頂ければ幸いです。

参考文献

1. アリストテレス(著), 出隆(翻訳), 岩崎允胤(翻訳). アリストテレス全集3 自然学. 岩波書店(1968).
2. Konopka, R. J. & Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2112-2116 (1971).
3. Akiyama, S. Structural and dynamic aspects of protein clocks: How can they be so slow and stable? *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 2147-2160 (2012).
4. Ishiura, M. *et al.* Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**, 1519-1523 (1998).
5. Ye, S., Vakonakis, I., Ioerger, T. R., LiWang, A. C. & Sacchettini, J. C. Crystal structure of circadian clock protein KaiA from *Synechococcus elongatus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 20511-20518 (2004).
6. Garcés, R. G., Wu, N., Gillon, W., & Pai, E. F. Anabaena circadian clock proteins KaiA and KaiB reveal a potential common binding site to their partner KaiC. *EMBO J.* **23**, 1688-1698 (2004).
7. Pattanayek, R. *et al.* M. Visualizing a circadian clock protein: crystal structure of KaiC and functional insights. *Mol. Cell* **15**, 375-388 (2004).
8. Hitomi, K., Oyama, T., Han, S. G., Arvai, A. S., & Getzoff, E. D. Tetrameric architecture of the circadian clock protein KaiB—A novel interface for intermolecular interactions and its impact on the circadian rhythm. *J. Biol. Chem.* **280**, 19127-19135 (2005).
9. Nakajima, M. *et al.* Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* **308**, 414-415 (2005).
10. Terauchi, K. *et al.* ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16377-16381 (2007).
11. Nishiwaki, T. *et al.* A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J.* **26**, 4029-4037 (2007).
12. Rust, M. J., Markson, J. S., Lane, W. S., Fisher, D. S. & O'Shea, E. K. Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock. *Science* **318**, 809-812 (2007).
13. Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Ochiai, E. & Kondo, T. Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 4455-4460 (2014).
14. Chang, Y. G., Kuo, N. W., Tseng, R. & LiWang, A. Flexibility of the C-terminal, or CII, ring of KaiC governs the rhythm of the circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 14431-14436 (2011).
15. Chang, Y. G., Tseng, R., Kuo, N. W., & LiWang, A. Rhythmic ring-ring stacking drives the circadian oscillator clockwise. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 16847-16851 (2012).
16. Akiyama, S., Nohara, A., Ito, K. & Maéda, Y. Assembly and disassembly dynamics of the cyanobacterial periodosome. *Mol. Cell* **29**, 703-716 (2008).
17. Murayama, Y. *et al.* Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock protein KaiC in solution. *EMBO J.* **30**, 68-78 (2011).
18. Hayashi, F. *et al.* ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Cells* **8**, 287-296 (2003).
19. Pattanayek, R. *et al.* Analysis of KaiA-KaiC protein interactions in the cyanobacterial circadian clock using hybrid structural methods. *EMBO J.* **25**, 2017-2028 (2006).
20. Snijder, J. *et al.* Structures of the cyanobacterial circadian oscillator frozen in a fully assembled state. *Science* **355**, 1181-1184 (2017).
21. Tseng, R. *et al.* Structural basis of the day-night transition in a bacterial circadian clock. *Science* **355**, 1174-1180 (2017).
22. Abe, J. *et al.* Atomic-scale origins of slowness

- in the cyanobacterial circadian clock. *Science* **349**, 312-316 (2015).
23. Mukaiyama, A. *et al.* Conformational rearrangements of the C1 ring in KaiC measure the timing of assembly with KaiB. *Sci. Rep.* **8**, 8803 (2018).
 24. Yildiz, O. *et al.* Crystal structure and interactions of the PAS repeat region of the *Drosophila* clock protein PERIOD. *Mol. Cell* **17**, 69–82 (2005).
 25. Kucera, N. *et al.* Unwinding the differences of the mammalian PERIOD clock proteins from crystal structure to cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 3311-3316 (2012).
 26. Hennig, S. *et al.* Structural and functional analyses of PAS domain interactions of the clock proteins *Drosophila* PERIOD and mouse PERIOD2. *PLoS Biol.* **7**, e1000094 (2009).
 27. Huang, N. *et al.* Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex. *Science* **337**, 189-194 (2012).
 28. Zoltowski, B. D. *et al.* Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome. *Nature* **480**, 396–399 (2011).
 29. Czarna, A. *et al.* Structures of *Drosophila* cryptochrome and mouse cryptochrome1 provide insight into circadian function. *Cell* **153**, 1394–1405 (2013).
 30. Schmalen, I. *et al.* Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by zinc binding and disulfide bond formation. *Cell* **157**, 1203–1215 (2014).
 31. Nangle, S. N. *et al.* Molecular assembly of the period-cryptochrome circadian transcriptional repressor complex. *eLife* **3**, e03674 (2014).
 32. Oshima, T. *et al.* C-H activation generates period-shortening molecules that target cryptochrome in the mammalian circadian clock. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7193–7197 (2015).
 33. Lee, J. W. *et al.* Development of small-molecule cryptochrome stabilizer derivatives as modulators of the circadian clock. *Chem. Med. Chem.* **10**, 1489–1497 (2015).
 34. Hirano, A. *et al.* FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**, 1106–1118 (2013).
 35. Ode, K. L. *et al.* Knockout-rescue embryonic stem cell-derived mouse reveals circadian-period control by quality and quantity of CRY1. *Mol. Cell* **65**, 176–190 (2017).
 36. Narasimamurthya, R. *et al.* CK1δ/ε protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 5986-5991 (2018).
 37. Fustin, J. M. *et al.* Two Ck1δ transcripts regulated by m6A methylation code for two antagonistic kinases in the control of the circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 5980-5985 (2018).
 38. Shinohara, Y. *et al.* Temperature-sensitive substrate and product binding underlie temperature-compensated phosphorylation in the clock. *Mol. Cell* **67**, 783–798 (2017).
 39. 秋山修志. 時間生物学と放射光科学の接点. *放射光* **29**, 56-63 (2016).