

「植物の機能と制御」

平成12年度採択研究代表者

近藤 孝男

(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

「光合成生物の生物時計：その分子機構と環境適応」

1. 研究実施の概要

現在、生物時計(概日時計)の分子機構が急速に解明されつつある。我々はシアノバクテリアの *kaiABC* 時計遺伝子を発見し、これと KaiABC 蛋白質による基本フィードバックループを解明した。しかし、なぜ「時計」として機能できるほど安定した 24 時間振動(概日特性)を実現できるのかは全く不明である。我々は最も有利なシアノバクテリアの実験系で他の生物に先駆け概日特性を実現するからくりを理解することを目指し、*kaiABC* 遺伝子の発現制御、KaiABC 蛋白質の生化学的ダイナミクス、光による同調機構を集中的に解析した。その結果、シアノバクテリアでは時計蛋白質による発現制御はゲノムワイドに行われており、真核生物のプロモーター特異的な制御とは異なっていること、また KaiABC 蛋白質は夜間に大きな複合体を形成していること、KaiC リン酸化のリン酸化の変動の重要性、さらに KaiA-KaiC の相互作用がこれを支配していること、など、多くの重要な性質を明らかにし、目標とした概日特性解明のための足場を固めることが出来た。この成果に基づき、さらに解析を進めれば、研究目的を達成できるであろう。

一方、概日時計の植物における機能を解析するため、日長測定機構(光周性)の解析に優れているウキクサで新たな試みをはじめた。まずウキクサから多くのシロイヌナズナの光周性遺伝子のホモログを見出し、その発現が日長により変動していることを見出した。またウキクサの形質転換を試み、有望な成果を得つつある。

2. 研究実施内容

13 年度の概日時計の研究の動向

昨年に引き続き哺乳類や昆虫での概日時計の研究は、各国で様々なレベルで、活発に進行しているが、概日時計の基本モデルが提出され、その基本的性質や関与する分子が同定された一昨年の急速な展開に比べると、比較的落ち着いた状況である。むしろ、研究は活発に行われているが、これまで明らかになった基本モデルが実際にどのような生化学的基礎で時を刻んでいるかという問題はいまだどの生物でも明らかになっておらず、むしろ最近の研究では単純なモデルでは、振動発生までは説明できても、周期の長さやその安定性を説明するためには、細胞内の複雑なシステムの理解が必要であることが再認識されるようになっている。

ここ1年間の動きの焦点は以下の3点であろう。

- ・ 多重フィードバック系の解明 多くの生物で概日時計のフィードバックは単純のフィードバックループではなく、多くのループが重なって作用していることが明らかになった。この点で種を越えた多様性も認識されてきている。
- ・ 末梢時計の解析 多くの動物で中枢の時計機構の他に末梢も自律的な時計機構をもつことが示され、個体のシステムとして概日時計の解析が進められている。
- ・ 植物の時計と光周性機構の解析 植物の概日時計関連遺伝子の解析も進んでいるが、引き続き、決定的な振動機構の解明は実現していない。一方、光周性に関与する遺伝子の解析も進んでいる。しかし、いずれも現象を説明するには至っていない。

13 年度の研究の進展 –シアノバクテリアの概日時計–

我々はシアノバクテリアの概日時計の特性を実現している分子機構を解明するため、1) *kai* 遺伝子の発現制御、2) Kai 蛋白質の細胞内動態とその生化学的機能、3) 光による概日時計同調のメカニズムの三点について研究を集中した。その結果、それぞれの部分で大きな進展があり、以下の成果については既に論文を準備中である。また、この他にも、我々が掲げた課題を解明するための基本的方法の確立、基礎的な現象の整理など今後の解析を可能とする足場を固めることができた。

- ・ KaiC 蛋白質によるゲノム全域にわたる遺伝子発現の抑制を見出し、概日振動のためのフィードバックが *kai* 遺伝子特異的な制御によるものでないことを示した。
- ・ 大腸菌由来のプロモーターの制御により、フィードバックが起こし、概日振動を発生させることが出来た。この2つの成果はシアノバクテリアのこれまでのモデルに大きな変更をもたらすものである。
- ・ Kai 蛋白質が細胞内で大きな複合体を形成していることを明らかにし、夜間に KaiC を中心とした大きな複合体を形成していることを明らかにした。
- ・ 細胞内の時計蛋白質の分布を調べ、KaiC 蛋白質は膜面分と核様体に多く存在することを明らかにした。
- ・ KaiC 蛋白質のリン酸化が KaiA 蛋白質により大きく促進されることを明らかにし、この2つの蛋白質が協同して *kaiBC* の発現を促進していることを示唆した。また KaiC 蛋白質のリン酸化が複数あり、最大 4 種類のリン酸化が行なわれていることを見出した。さらに主要なリン酸化部位を見出した。
- ・ DNA 複製の開始に不可欠な DnaA が KaiC と相互作用することを見出した。
- ・ 光パルスによるリセットの解析が可能な方法を確立し、多くのリセット変異体を同定した。
- ・ 以前報告した光パルスによるリセットに係る CikA が KaiC 蛋白質によるフィードバックに必要なことを示した。

13 年度の研究の進展 –植物の概日時計–

このプロジェクトではウキクサの形質転換の試みとアラビドプシスで報告されている花成誘導に係る遺伝子ウキクサでのホモログの単離を試みた。残念ながらウキクサの形質転換はまだ成功していないが、現在種子を大量に作り、これをアグロバクテリアで感染させることを試みている。一方、ホ

モログの単離は多くの遺伝子について成功しており、現在その発現を調査して、機能を確認している。これまでのところ GI や FT 遺伝子の発現が光周性反応に対応する興味深い現象が確認されている。またウキクサでは生理学的リズムの測定が可能なので、得られた花成関連遺伝子の変化を PCR 法を利用して追跡し、概日時計による計時機構の解析を進める予定である。

今後の計画

シアノバクテリアの概日時計については、引き続き、Kai 蛋白質および時計関連蛋白質の生化学的解析が概日振動の解明の鍵に握ることは明らかで、13 年度に得られた多くの成果を発展させることが、プロジェクトの中心となろう。研究の主力は以下の 4 点である。

a) Kai 蛋白質 (特に KaiC) の生化学的機能と蛋白質の細胞内動態の解析

KaiC 蛋白質の細胞内動態、合成分解の制御、リン酸化の分子機構の解明を進める。また変異体を用い周期と対応する生化学的要因を同定を目指す。

b) *kai* 遺伝子の発現制御機能の解明

昨年解析で示唆された KaiC がゲノムに対して作用している可能性を検証する。

c) 光による概日振動の同調機構の解明

概日時計のリセットは光パルスによる位相変位と不可避的な光合成活性の変動による代謝変動による周期の変化が重要である。前者についてはこの解析が可能な実験プロトコルを開発したので、その解明を進める。また、昨年解析で得られた CikA と KaiC の共同による *kaiBC* 発現抑制について調査する。

d) 植物の概日時計機構の解析と光周性の解明

今年度は種子での形質転換を中心に試みる。一方、ウキクサからクローニングした光周性花芽誘導に重要な機能をもつ遺伝子の発現(mRNA)を調査し、生理学的リズムのデータと対比させ、限界日長測定機構を探る

3. 研究実施体制

近藤グループ

① 研究分担グループ長名 (所属、役職)

近藤孝男 (名大院理学研究科生命理学専攻 教授)

② 研究項目

光合成生物の生物時計: その分子機構と環境適応

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Taniguchi Y, Yamaguchi A, Hijikata A, Iwasaki H, Kamagata K, Ishiura M, Go M and Kondo T: Two KaiA-binding domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC, FEBS lett. 496: 86-90, (2001)

(2) 特許出願

1. 国内出願 1件
2. 外国出願 なし