

「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

概日時計（生物時計）の分子機構は昨年に引き続き、様々なモデル生物で急速に解明されつつある。我々はシアノバクテリアのkaiABC時計遺伝子とKaiABC蛋白質による基本フィードバックループが、どのようにして「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リン酸化にKaiAとKaiBが拮抗的に作用しており、このリン酸化の制御が概日振動発生に極めて重要であることを示すことが出来た。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から、シロイヌナズナの光周性遺伝子のホモログ（APRR1/TOC1, GI, CO, FT, AG）をクローニングした。これらの発現を解析し、概日リズムや日長条件依存的なパターンを明らかにするとともに、短日型ウキクサと長日型ウキクサで発現様式が異なる遺伝子を明らかにできた。さらに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

#### シアノバクテリアの概日時計

概日時計の分子機構解明を目指した研究は、様々なモデル生物で、活発に進行しているが、どのような生化学的基礎で概日時計が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いない。我々は当初の計画に従い、この点を明らかにすべくシアノバクテリアの概日時計の中核であるKai蛋白質について分子生物学的解析を続け、その分子レベルの機能について多くの成果を得た。

#### 1) KaiAによるKaiC蛋白質のリン酸化

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 (*PNAS*, 2002)。またKaiC蛋白質の主要なリン酸化部位を見出し、質量分析による残基の決定作業も進展している。

#### 2) Kai蛋白質の細胞内ダイナミックスの解明

KaiC蛋白質の分布をゲル濾過法で解析し、KaiCが夜間に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た (*J. Biol. Chem*, 2003)。この複合体形成には6量体となったKaiCが不可欠で複合体が*kaiBC*の発現調節に不可欠であることを示した。

#### 3) KaiBの機能の解明

KaiCの自己脱リン酸化作用を発見し、KaiBはKaiAに拮抗的に脱リン酸化を促進することを明らかにした。また、KaiBの細胞内分布パターンに顕著な概日リズムを見出し、KaiC蛋白質のリン酸化における3つのKai蛋白質の協働を示した (*EMBO J* 2003)。この成果によりこれまで全く未知であったKaiBの機能を位置づけることができた。

#### 4) KaiC蛋白質による包括的遺伝子発現制御

プロモータートラップ法によりシアノバクテリアの遺伝子発現が高振幅型と低振幅型にわけられることを見だし、さらに、KaiC蛋白質によるゲノム全域にわたる遺伝子発現の振動の抑制を示した。一方、大腸菌由来のプロモーターの制御による*kaiBC*発現フィードバックにより概日振動を発生させることが出来た。この2つの成果はKaiC蛋白質はそのプロモーターを特異的に制御するのではなく、ゲノム全域に渡り遺伝子発現を制御することを示しており、これまでのシアノバクテリアの時計モデルに大きな変更をもたらした (投稿準備中)。

#### 5) その他の成果

- ・細胞内の時計蛋白質の分布を調べ、KaiC蛋白質は膜画分と核様体に多く存在することを明らかにした。
- ・鉄道虫のルシフェラーゼを用い、同時に二つの遺伝子の発現パターンをモニターできる二波長リアルタイムモニター系の開発に成功した (特許出願予定、投稿準備中)。

#### まとめ

14年度の研究からシアノバクテリアの概日時計のシナリオを解明することができた。引き続き、概日振動の解明の鍵に握るKai蛋白質および時計関連蛋白質の生化学的解析 (特にKaiCのリン酸化) を中心として、プロジェクトを進める。一方 14年度の成果は、細胞内の複雑なシステムの理解が必要であることを示唆した。今後はKaiCによる包括的遺伝子発現制御機構を解明し、概日時計を中心とした細胞全体としてのホメオスタシスの理解することも目指す。

#### ウキクサの概日時計と光周性

概日時計および光周的花芽誘導関連遺伝子、*TOC1*, *GI*, *CO*, *FT*, *AG*のウキクサホモログを短日ウキクサと長日ウキクサからクローニングし、その全長配列を決定した。概日時計や光

周性に影響を与える日長条件下での基本的な発現様式を解析した結果、*FT*、*AG*両ホモログは花芽形成のマーカー遺伝子となりうること、*CAB*の発現リズムは概日時計の良い指標となることを明らかにした。また、*GI*、*TOC1*ホモログについては、アラビドプシスやイネとほぼ同じ発現リズムを示した。これらの発現様式は短日、長日ウキクサの違いによらなかった。しかし、お互いにオーソログと考えられる*FT*では、長日ウキクサの位相が短日ウキクサより3時間程度遅れていることが示唆された。一方、レポーター遺伝子を用いた詳細な発現解析を行うためにウキクサの形質転換法の確立を目指している。カルスを介した方法によって形質転換組織の作製に成功した。現在、形質転換個体の再生に向けた取り組みを行っている。

### 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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### （1）論文発表

- Nishimura H, Nakahira Y, Imai K, Tsuruhara A, Kondo H, Hayashi H, Hirai M, Saito H, and Kondo T. (2002) Mutations in KaiA, a clock protein, extend the period of circadian rhythm of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Microbiology*, 148, 2903- 2909
- Iwasaki, H., T. Nishiwaki, Y. Kitayama, M Nakajima and T. Kondo. (2002) KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in Circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 15788-15793
- Kageyama H, T. Kondo and H. Iwasaki (2003) Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC and SasA in cyanobacteria *J. Biol. Chem.* 278 2388-2395
- Kitayama Y., H. Iwasaki, T. Nishiwaki and T. Kondo. (2003) KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J* 22: 2127-2134,
- Katayama M, Kondo T, Xiong J, Golden SS. (2003) ldpA encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependent modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* 185:1415-22

#### （2）特許出願

H14年度特許出願件数：2件（研究期間累積件数：3件）