

「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生命理学専攻 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

概日時計の分子機構は15年度も、昨年に引き続き、様々なモデル生物で活発に展開されており、多くの情報が得られているが、研究の進展とともに概日時計の基本的性質を裏つける分子機構の複雑さが判明し更なる解析の必要性が認識されている。我々は昨年までに、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てきた。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。今年度はこのKaiCのリン酸化の生化学的解析と、リン酸化KaiCの機能を解析した。その結果、KaiCのリン酸化部位の決定し、KaiCと核様体（真核生物の染色体）の機能について重要な成果を得た。またシアノバクテリアではKai時計蛋白質はプロモーター特異的な制御ではなく、ゲノム全体を制御していることを明らかにした。

一方、昨年度までに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が、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ため、パーティクルガンによる一過的な遺伝子導入を試み、この方法によって遺伝子の発現のモニターを可能とした。

2. 研究実施内容

シアノバクテリアの概日時計

(1) 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見いだした。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。

(2) KaiC蛋白質のリン酸化

KaiC蛋白質のリン酸化レベルが概日振動を示すことを見だし、このリン酸化部位の可能性のあるスレオニンを変化させることで概日振動が失われることから、KaiC蛋白質のリン酸化が概日振動の重要な要因であることを報告したが、今年度は大阪大学高尾教授との共同研究で質量分析法によるリン酸化残基を決定を試み2ヶ所のリン酸化部位を決定し、このリン酸化部位を変更させることで、リン酸化が起こらないこと、遺伝子発現の制御機能が失われることを確認した。

(3) KaiC蛋白質及びその複合体の機能

上記2つの成果を結びつけるためにKaiC蛋白質及びその複合体の機能を解析した。まず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。また核様体の分離を試み、その沈降係数が日周変動を示すことを見だし、KaiC蛋白質及びその複合体が核様体の状態を変えていることを示唆した。

(4) KaiC蛋白質の合成と分解

KaiC蛋白質の時間的変動機構を解明するため、その合成、分解を詳細に測定し、合成量はmRNAから6時間遅れた振動を示し、分解は真夜中に抑制されていることを明らかにした。これは、KaiC蛋白質の制御が転写、翻訳、翻訳後いずれの過程でも制御されていることを調節されていることを示している。

ウキクサの概日時計と光周性

昨年までに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が、これらの遺伝子発現を詳細に調べるため、パーティクルガンによる遺伝子の導入を試み、この方法によって一週間程度の遺伝子発現の追跡を可能とした。またこの方法により二つの遺伝子を同時導入することによって、遺伝子の発現を制御することを可能とした。これらの方法により、今後、概日リズム、光周性関連の遺伝子を詳細に解析し、光周性計時機構の解析を行う。

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

- Nakahira Y, Katayama M, Miyashita H, Kutsuna S, Hideo Iwasaki H, Oyama T, Kondo T. Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. Proc. Natl. Acad. Sci. (2004) 101:881-5.
- Kitayama Y., Kondo T., Nakahira Y., Nishimura H., Ohmiya Y., Oyama T. (2004) An in vivo dual-reporter system of cyanobacteria using two railroad warm luciferases with different color emissions. Plant Cell Physiol., 45:109-113
- Nakamichi N., Ito S., Oyama T., Yamashino T., Kondo T., Mizuno T. (2004) Characterization of plant circadian rhythms by employing *Arabidopsis* cultured cells with bioluminescence reporters. Plant Cell Physiol. 45:57-67

（2）特許出願

H15年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：4件）