

「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

我々のシアノバクテリアの概日時計の分子機構解明に向けた研究は16年度もKai蛋白質の生化学的機能解明に向けて行なわれた。16年度の研究は主にKaiCのリン酸化について3つの大きな成果を挙げることが出来た。すなわち、1) KaiCのリン酸化部位を大阪大学との共同研究で明らかにし、その部位の変異によりリン酸化および概日振動が完全に停止することを確認した。2) 連続暗条件下では、シアノバクテリアの時計遺伝子の発現は直ちになくなってしまいうにも拘らず、時計蛋白質KaiCのリン酸化に約1日周期の顕著なリズムが継続することを発見し、従来の転写・翻訳モデルを否定し、KaiCのリン酸化サイクルが生物時計の発振メカニズムであることを示した。この成果は概日時計の原理についてこれまで考えを一変する重要なものである。3) このサイクルが3つのKai蛋白質とATPを試験管内で混ぜれば可能であることを発見した。この構成でも、温度が変わっても時計の早さが変化しないという生物時計の最も重要な性質は失われていなかった。また周期が変わった突然変異体の蛋白質を使うと、試験管内の時計も同様に变化した。これらの事実は我々が試験管内で再構成した概日振動が実際に細胞内で機能していることを示すものである。このように16年度の成果は概日時計研究にとってコペルニクス的転回と言うべきもので、シアノバクテリアのみならず、ヒトをも含めた高等生物の概日時計研究にも非常に大きなインパクトを与えるものである。さらに、このシステムを物理化学的に解明すれば、生物が時間を測定する原理について最終的な解答を得ることも期待できる。

またウキクサを使った光周性計時機構の解明については一過的遺伝子導入法の確立によって重要な基礎データを蓄積した。またKaiC蛋白質による遺伝子発現制御についても東京大学でin vitro転写系の整備が行われ、今後KaiCのリン酸化サイクルの機能について解明する基礎を整備した。

2. 研究実施内容

シアノバクテリアの概日時計

(1) KaiC蛋白質のリン酸化部位

KaiCは、自己リン酸化能および自己脱リン酸化能を持ち、そのリン酸化は昼に低く夜に

高い概日リズムを示す。またKaiCのリン酸化はKaiAによって促進され、KaiBによって抑制されること、およびシアノバクテリアのリズム変異体の中にKaiCのリン酸化に異常が見られるものがいくつか見ついていることから、その概日振動発生における重要性が示唆されてきた。今回質量分析によりKaiCのリン酸化部位がセリン431およびそのとなりのスレオニン432であることが明らかとなった。これらの残基をアラニンに置換した二重変異株においては、KaiCのリン酸化が完全に消失すると同時に概日リズムも無周期となることから、リン酸化は概日振動発生に必須であると考えられる。KaiCはKaiA、KaiBおよびSasAと共に、大部分の遺伝子発現が最も抑制される時刻に特異的な高次複合体を形成することが知られていたが、二重変異株においては、この複合体が形成されていなかった。またKaiCはシアノバクテリアの全ての遺伝子の転写を抑制するが、二重変異型KaiCは十分な抑制効果を示さなかった。これらの結果よりKaiCのリン酸化は他の時計タンパク質との相互作用を調節することにより、KaiCの転写抑制作用を制御しているものと考えられる。

(2) 遺伝子発現を伴わないKaiC蛋白質のリン酸化リズムの発見

シネコッカスは光合成が生育に必須であるため、連続暗条件下では成育できない。連続暗条件下では代謝活性が極端に落ち、kai時計遺伝子群の転写も全て速やかに停止するとともに、そのmRNAも数時間以内に消失し、Kai蛋白質群の合成も停止した。しかし、すでに細胞内に存在するKaiC蛋白質は、暗条件下で安定化し、そのリン酸化リズムは、3日間以上にわたり、約1日周期で安定に継続することを見出した。

さらにKaiC蛋白質のリン酸化リズムを詳細に検討したところ、

- 1) Kai遺伝子群およびその他の遺伝子の転写翻訳の影響を完全に除くため、過剰量の転写阻害剤や翻訳阻害剤を加え、細胞内の総mRNA量をほぼゼロレベルにした条件下でも、KaiCのリン酸化リズムの発現は正常に維持されていた。
- 2) 生物時計は、温度条件に関わりなく約24時間周期で正確に振動している。これは「温度補償性」と呼ばれ、生物時計の重要な特徴の一つだが、連続暗期中のKaiCのリン酸化リズムも通常時と同じく温度補償されていた。
- 3) さらに、試験管内でKai蛋白質KaiCの自己リン酸化・脱リン酸化の反応を調べたところ、その反応速度は温度変化に比較的影響を受けにくく、生物時計の温度補償性の鍵を担っていると考えられた。

以上の結果から、KaiC蛋白質の自己リン酸化・脱リン酸化は、Kai蛋白質同士の蛋白質複合体反応の中で中心的な役割を果たし、生物のなかで時間を刻む鍵を握っているものと結論した。これは従来生物時計のメカニズムとして常識とされていた転写翻訳フィードバック・モデルを覆し、時計遺伝子発現の制御を伴わなくても生物時計が動くという新しい振動機構を提案した。

(3) 試験管内でのKaiCのリン酸化サイクルの再構成

どのようにしてKaiCのリン酸化サイクルが成立するのか？このためには細胞内の多くの要素や細胞内の環境が不可欠で、それらの共同作業で24時間振動が発生すると想定するのが普通であり、我々もそのように考えていた。事実、これまで多くの生物での試みにもか

かわらず、細胞外で生物時計を観測できた例は知られていない。しかし、驚くべきことに、今回我々はこのサイクルが最小限の構成で、すなわち3つのKai蛋白質とATPを試験管内で混ぜれば、可能であることを発見した。さらにこの構成でも、温度が変わっても時計の早さが変化しないという生物時計の最も重要な性質は失われていなかった。また周期の変わった突然変異体の蛋白質を使うと、試験管内の時計も突然変異体の周期に従って変化した。これらの事実は我々が作った<試験管内での生物時計>は、実際に細胞内で機能していることを示すものである。この<試験管内での生物時計>は言うまでもなく世界初のものであり、時間を計るという複雑なメカニズムが3つの蛋白質に組み込まれていることを証明したものである。この発見は生物時計研究にとってコペルニクスの転回と言うべきもので、ヒトをも含めた高等生物の時計研究にも非常に大きなインパクトを与えるものである。

(4) シアノバクテリアのin vitro転写系

シアノバクテリアSynechococcus PCC 7942において、kai遺伝子群による転写レベルでのグローバルな遺伝子発現調節の分子機構を明らかにするため、シアノバクテリアのRNAポリメラーゼを精製の上、in vitroの転写アッセイ系を構築し、この系に精製したKai蛋白質標品を加えることで、Kai蛋白質の機能解明を可能とするための解析を行った。kaiBCプロモーターからの転写を再現性良くモニターできるin vitro転写系を構築し、各Kai蛋白質を様々な組み合わせで加えて転写活性を測定した結果、どのKai蛋白質も転写活性に直接的な影響を与えないことが分かった。また、ゲルシフト解析も同時に行い、これらKai蛋白質が直接プロモーターDNAに作用していない結果が示された。

今年度の解析で、生物時計の中心振動体を構成するKaiタンパク質群が直接転写制御に関与していないことが示されたため、その情報を下流に伝達する因子の存在が予想される。そこで、候補として考えられる因子による遺伝子発現への影響を引き続きin vitro転写系を用いて検討を進める。

ウキクサの概日時計と光周性

昨年までに開発したパーティクルガンによる遺伝子の導入をもとに解析を行った。特に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、この方法を使い、アラビドプシスで報告されている時計遺伝子の発現制御がウキクサ内で起こっていることを確認した。またウキクサの光周性に係わるcoやftのオーソログのクローニングを試みたがこれについてはこれまでのところ、成功していない。またイネのcoやftオーソログのについてウキクサ内で発現を調査したが、光周性に対応した変化は見られなかった。今後は異なった方法でこれらのオーソログの単離を試みる。

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

田中グループ

① 研究分担グループ長名（所属、役職）

田中 寛（東京大学分子細胞生物学研究所 助教授）

② 研究項目

in vitro転写系によるKai（時計）蛋白質の機能解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- Imai K, Nishiwaki T, Kondo T, Iwasaki H. Circadian Rhythms in Protein Synthesis and Degradation of a Master Clock Protein KaiC in Cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 279:36534-9, 2004
- Nishiwaki T, Satomi Y, Nakajima M, Lee C, Kiyohara R, Kageyama H, Kitayama Y, Temamoto M, Yamaguchi A, Hijikata A, Go M, Iwasaki H, Takao T. and T. Kondo. Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 13927-32 (2004)
- Nakamichi N, Ito S, Oyama T, Yamashino T, Kondo T and Mizuno T. Characterization of plant circadian rhythms by employing Arabidopsis cultured cells with bioluminescence reporters. *Plant Cell Physiol.* 45: 57-67 (2004)
- Iwasaki H, Kondo T. Circadian timing mechanism in the prokaryotic clock system of cyanobacteria. *J. Biol. Rhythms* 19: 436-444 (2004)
- Tomita, J, Nakajima M, Kondo T and Iwasaki H. No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* 307: 251-254 (2005)
- Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, Oyama T and Takao Kondo. Reconstitution of Circadian Oscillation of Cyanobacterial KaiC Phosphorylation in vitro. *Science* 308, 414-5 (2005)
- Kiyohara, Y.B., Katayama, M., and T. Kondo. A Novel Mutation in kaiC Affects Resetting of the Cyanobacterial Circadian Clock. *J. Bacteriol.* 187: 2559-2564 (2005)