

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名「光合成生物の生物時計:その分子機構と環境適応」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

近藤 孝男 (名古屋大学大学院理学研究科 教授)

主たる研究代表者

田中 寛 (東京大学分子細胞生物学研究所 助教授(平成16年4月~))

3. 研究内容及び成果

3-1. 研究課題全体の研究内容

地球に生息するほとんどすべての生物にとって昼夜の変化は最も重要な環境変動であろう。生命はこの変動に単に従属して生活するのではなく、環境の変動を予測しより効率的な生命活動を実現するため、進化の過程で約 24 時間周期の時計機構(概日時計または生物時計)を細胞内に備えるようになったと考えられている。概日時計の存在は、恒常条件下でも約 24 時間周期で生理活性が変動する概日(サーカディアン)リズムとして、単細胞生物から高等動植物に至るまで普遍的に確認されている。我々はこの概日時計の分子機構およびその生理機能を解明することを目標とし最も分子レベルでの解析に適したシアノバクテリアで解析を行ってきた。

3-2. 研究成果

近藤グループ

シアノバクテリアの概日時計の研究はこれまでその分子遺伝学上の利点を活かし、速やかにその時計遺伝子のクローニング、振動モデルの作成を進めることが出来た。これまでの我々の研究はシアノバクテリアでは概日振動の発生が kaiABC 時計遺伝子のフィードバック発現制御に起因することを示唆している。しかし概日振動のプロセスを「矢印」で結んだだけでは、進化適応の所産である概日時計を理解したとは言えない。我々の仮説のようにフィードバックループが概日振動の発生原因であったとしても、その振動が安定した 24 時間周期となる生化学的根拠はまったく説明されていない。概日時計の特性こそがその環境適応機能の前提であってみれば、その生化学的基礎を解明することが重要であろう。従って、戦略的基礎研究の課題は、概日時計を機能的な時計たらしめている物質的メカニズムを理解するものであり、その振動が概日時計の特性である安定した 24 時間の振動となることの生化学的に理解することをめざし、kai 遺伝子の発現制御機構、Kai 蛋白質の細胞内動態、Kai 蛋白質の生化学的性質、あるいは振動を補佐する他の要素についての解析に重点をおいた。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

- シアノバクテリアに生物発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子を移入することで概日時計の動きを生物発光として測定し、シアノバクテリアの概日時計が高等真核生物のものと同一生理学的性質を持つことを示した。
- さらに自動微弱光測定装置と画像解析ソフトウェアを開発し、寒天培地上の 10000 コロニーの概日リズムの同時測定を実現した。
- これを利用し、多くの時計変異体を分離し、3つの遺伝子からなる時計遺伝子群 kaiABC をクローニングした。kai は、他の生物の時計遺伝子とは相同性を持たない新規遺伝子であったが、50 種以上の様々な突然変異体がこの領域に変異を持ち、遺伝子の破壊によりリズムは全く消失したため、概日時計の中核遺伝子であると結論した。
- kai 遺伝子の発現はリズムを示し、kaiBC の発現は KaiC による負のフィードバック制御を受け、逆に、KaiA により促進された。これらの実験結果は kaiC 発現とその制御がシアノバクテリアの概日振動の発生原因であることを示唆していた。
- これら3つの Kai 蛋白質が細胞内で夜間に巨大複合体を形成すること、KaiC が ATP/GTP 結合能を持ち、その活性が振動に不可欠であること、KaiC 蛋白質は細胞内レベル、リン酸化レベルともに明瞭なリズムを示し、KaiA によりリン酸化が促進されること、KaiB が KaiA に拮抗的に脱リン酸化を促進すること、などの結果が得られ、これらを基に細胞内でおこる KaiC 蛋白質のリン酸化サイクルのシナリオを明らかにした。
- さらに阪大との共同研究で KaiC のリン酸化部位を決定し、このリン酸化が振動発生に不可欠であることを示した。
- これらの研究成果は KaiC 蛋白質のリン酸化サイクルの重要性を示しているが、それはあくまでも kai 遺伝子発現の転写翻訳フィードバックループの重要な要因として理解されていた。しかし、最近 KaiC リン酸化サイクルが転写翻訳の停止する暗期中でも継続することを見いだした。
- さらに試験管内で (in vitro で) 3つの Kai 蛋白質と ATP を混合するのみで KaiC リン酸化サイクルが発生することを示した。さらにこれらのリズムはいずれも温度補償されており、その周期は様々な KaiC の周期変異体と一致した。これらの結果は KaiC リン酸化サイクルそのものが概日振動発生の基本的メカニズムであることを示した概日時計研究のコペルニクス的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。
- 今後、どのようなからくりで3つの蛋白質が安定した24時間振動を発生させるかについて構造生物学、蛋白質物理化学的方法で解析すれば、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が期待できよう。なお、この3つの蛋白質はごくわずかなエネルギーで時間情報を計測し蓄えることが出来る。これはこれまで全く注目されてこなかった蛋白質の新しい機能であるといえよう。

#### 田中グループ

in vitro 転写系を用いた解析により、生物時計の中心振動体を構成する Kai タンパク

質群は直接転写制御に関与していないことが示された。そのため、概日時計の情報を下流に伝達する因子の存在が予想された。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検討することを目的として、主にプロモーターDNA への結合実験を中心とした解析を行った。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

○Kai 蛋白質は何れも転写制御に直接関与していないことが示されたことから、その情報を下流に伝達する因子による調節が重要であるとの見方が強まった。その最有力候補として考えられるレスポンスレギュレーターの1種である蛋白質が、どのような遺伝子をターゲットとしているかを明らかにするため、約40のプロモーター候補についてゲルシフト解析により結合の検討を行った。しかしながら、大腸菌で大量発現させた組換えレスポンスレギュレーター蛋白質とDNAの間で有効な結合は認められなかったため、ゲノム全体を対象としてレスポンスレギュレーター蛋白質が結合するプロモーター領域を探索するための新たなin vitro、およびin vivoでのスクリーニング系の開発を現在実施中。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

| 論文発表 |    | 招待:口頭 |    | ポスター |    | 報道 | 特許 |
|------|----|-------|----|------|----|----|----|
| 国内   | 国外 | 国内    | 国外 | 国内   | 国外 |    |    |
| 13   | 24 | 15    | 12 | 30   | 16 | 13 | 6  |

○論文数は多いとは言えないが、レベルの高い学術雑誌に発表された論文が多いことは評価に値する。特に、時計の発信体に関する論文は、概日時計の世界観を変えたものとして、歴史に残る成果と高く評価できる(Science(2005))。

○もともと本プロジェクトは知財(工業的所有権)とはほとんど関係のないところでなされた研究であり、本項目について評価することの意味があるとは思われないが、こうした基礎的なところでも、分析システムの開発などで出願(6件)していることを評価したい(内PCT出願1件)。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

○総合的には、シアノバクテリアの概日時計の分子機構解明において、KaiC のリン酸化の発見、Kai 複合体(KaiABC)とATPのみによるKaiCのリン酸化日周リズムの再構成という研究の発展は、時計研究の歴史に残る成果であり、これだけで本プロジェクトで採択したことの意義があると考えられる。このKaiCのリン酸化活性は通常の酵素とは異なり極めて反応速度が遅いと言う特徴があり、この知見は大変興味深く、今後の解明が待たれる。また、概日時計によるゲノムワイドな遺伝子発現制御機構の発見も今後の研究の展開が期待できるものである。一方、ウキクサを用いた高等植物の計時機構

の解明は、形質転換の困難さ等から、これからの課題として残っている。

- 科学的技術への貢献に関しては、当初3つの Kai タンパク質の相互作用と転写制御が研究の中心と考えられていたが、研究の発展により、時計の本体としての KaiC のリン酸化の重要性が解明されてきた。この歴史的発見は、ウキクサを用いた高等植物の計時機構解明の遅れを補って余りある成果である。生物の概日時計の分子機構については、ショウジョウバエ、ヒトなどの機構からは想像もされていなかった KaiC のリン酸化、KaiABC というタンパク質複合体と ATP のみによる概日リズムの再構成が発見されたことは、この分野の進展に極めて大きなインパクトを与え、非常に注目すべき成果であり、極めてオリジナリティーの高い研究展開である。このことは、これまでの常識的不可能を可能にした発見であり、論理的であるとともに、極めて美しい成果である。
- 今後の展開としては、KaiABC がどのようなメカニズムで24時間の振動を発生させるかについては未解決な部分も多く、時計の発信機構として KaiABC 複合体の構造解析を含めた Kai 複合体のリン酸化/脱リン酸化メカニズムの解明に期待したい。また、発振体からゲノムワイドな遺伝子発現制御への分子機構の解明は今後の展開が期待できるものである。さらに、シアノバクテリアでの知見を基盤にして、動物や高等植物とのメカニズムの共通性、あるいは、相違の解明が期待される。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

- 受賞歴としては、第17回井上研究奨励賞（岩崎秀雄）；日本時間生物学会学術奨励賞（2003）（岩崎秀雄）；○中日文化賞（2005）（近藤孝男）の3件。
- KaiABC による試験管内での概日時計の再構成は極めて画期的な成果である。本研究はSORSTに採択され、研究が続行されていることより、今後さらに大きな成果がでると期待したい。