

# 平成17年度科学研究費補助金（学術創成研究費）研究進捗状況報告書

ふりがな		こんどう たかお		所属研究機関 ・部局・職	名古屋大学・大学院理学研究 科・教授	
研究代表者 氏名		近藤 孝男				
研究 課 題 名	和文	概日時計により統合されるシアノバクテリアの細胞システムの時間的統合				
	英文	Temporal integration of cellular system by circadian clock in cyanobacteria				
研究経費 (直接経費) 18年度以降は内約額 単位:千円	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
	63,600	81,000	61,700	57,000	54,400	317,700
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)			
近藤 孝男	名古屋大学・大学院理学研究 科・教授	時間生物学	研究統括 生理学的解析			
岩崎 秀雄	早稲田大学・理工学術院電 気・情報生命工学科・助教授	分子生理学	シアノバクテリアの分子生物学的解析			
小山 時隆	名古屋大学・大学院理学研究 科・助手	分子生物学	シアノバクテリアとウキクサの分子生物学的 解析			
杉田 護	名古屋大学・遺伝子実験 施設・教授	遺伝子解析学	シアノバクテリアのゲノム解析			
<p><b>当初の研究目的</b> (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)</p> <p>ほとんどすべての生物は、概日(生物)時計とよばれる体内時計機能を備え、積極的に環境の変動を予測し、効率的な生命活動を実現している。我々はこれまでに概日時計の中心である <i>kai</i> 時計遺伝子を発見し、<i>kai</i> 遺伝子が作る Kai 蛋白質が <i>kai</i> 遺伝子自身を抑制すること(フィードバック制御)を見いだした。この制御により <i>kai</i> 遺伝子の活動(発現)が変動を繰り返す、時を刻んでいると考えている。しかし、最近の解析によると概日時計は予想外に多くの遺伝子を制御する時間コーディネーターであることが明らかになり、概日時計の特徴である安定な24時間振動を実現している仕組みも生命活動のネットワークを理解してはじめて解明できると考えられている。この計画では最近得られた全ゲノム情報を利用して、細胞内で発現しているすべての遺伝子の動きを調査し、それをシステムとして解析し、生命活動が概日時計によって昼と夜の環境変化にいかにかに調和しているかを理解し、細胞内のさまざまなプロセスの複雑なネットワークの結果実現されているであろう概日時計の秘密を理解することを目指す。</p> <p>計画では概日時計をもつ最も簡単な生物シアノバクテリアを使い、すべての遺伝子発現をDNAチップと生物発光によるリアルタイム測定を併用して解析する。後者は生物発光酵素ルシフェラーゼを目的の遺伝子の活動と連動して作らせ、遺伝子活動(発現)のパイロットランプとして利用するものである。生きた細胞から連続的に測定できるので大変精度の高い測定が可能で、この計画の大きな特徴である。複雑で動的な生命活動を分子レベルの情報に基づいてシステムチックに理解しようとする試みはシステム生物学と呼ばれるが、本計画は概日時計を中心として最も解析の容易なシアノバクテリアでこれを試みるものである。従ってこのプロジェクトの成果は、シアノバクテリアの概日時計のみでなく、広く生命科学全般に意味をもつことを期待している。</p>						

## これまでの研究経過

本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。

本計画は以下の点から「創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究」の観点到に主眼を置いているといえよう。

- 1) 概日時計を核とした細胞活動の時間的統合を理解しようとするものである。
- 2) DNAチップに加え、全遺伝子の生物発光リアルタイムモニターを可能とし、昼夜の細胞活動の包括的解析しようとする。
- 3) 上記の解析にもっとも適したシアノバクテリアを使用しシステム生物学的解析を狙うこと

研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

### 包括的遺伝子発現解析の整備

#### 1) *Synechococcus elongatus* の GeneChip (DNA マイクロアレイ) の作製

杉田らによって解読された *S. elongatus* のゲノム DNA 配列をもとに、DNA microarray (Affymetrix 社の GeneChip) をデザインし、2538 個の coding regions (ORF) に加え、tRNA や低分子 RNA のコード領域、intergenic 領域、tRNA のアンチセンス鎖を含めたチップを作製した。作製した DNA マイクロアレイは、従来のものに比べて格段に定量性・再現性に優れており、遺伝子間の発現量比較も現実的なものとなった。現在までに、当研究室の概日リズムに関する発現解析のほか学内外の4つの研究グループの解析にも提供している。いずれも既知の発現パターンが再現できている上、新たな知見が数多く得られている。またこれらのデータは web からアクセス可能なデータベース (現在は部分公開) として整備している。

#### GeneChip を用いた概日リズム解析の研究成果

マイクロアレイを用いて様々な環境・測定条件下でのゲノムワイドな発現プロファイルを体系的に調査し、時計による転写制御の解明を試みた。野生株においてはほぼ 25% にあたる 700 弱の遺伝子に有意な概日蓄積リズムが認められ、約 7 割が主観的夕暮れ時にピークをもち、2 割ほどが主観的夜明けにピークを示した。さらに、高振幅遺伝子群のほとんどは主観的夕暮れ時にピークを持つこと、既知の *purF* 遺伝子以外にも多くの夜明け発現遺伝子があること、7 種のシグマ因子の中で、3 つが高振幅リズム発現をすること、呼吸鎖系遺伝子群に主観的夕暮れに概日発現する遺伝子が多いことなどが明らかになった。一方、*kaiABC* 遺伝子群を欠く変異株では、再現性のある概日発現振動は見られず、*kai* 遺伝子群が転写レベルのリズムを駆動する必須遺伝子群であることが再確認された。また、*kaiC* あるいは *kaiBC* の過剰発現下ではほとんどの遺伝子群の発現が主観的夜明け (CT 0) のレベルで停止することが明らかになった。

#### 2) 生物発光包括的遺伝子発現リアルタイム解析

##### プロモーターライブラリーのデザインと作製状況

全遺伝子のプロモーター領域に対する発光レポーターコンストラクトを以下のように作製した。

- (1) 全ての ORF に対して開始コドン上流部分の 600-1,000 bp を PCR を用いて増幅する。
- (2) Gateway システムを用いて、上記 PCR 産物をエンタリークローンに変換する。
- (3) Gateway システムを用いて、上記エンタリークローンを発光レポーターコンストラクトに変換する。
- (4) 上記発光レポーターコンストラクトを用いてシアノバクテリアに発光レポーター株を作製する。

これまでに発現制御領域をもつエンタリークローンと *luxAB* 遺伝子を発光レポーターとする発光レポーターコンストラクトの全 ORF に対するセットをほぼ完成した (完成率 95%)。さらにこれらのコンストラクトを用いて形質転換することで、既に 800 弱の発光レポーター株を作製している。これらの発光レポーター株の中から 300 余りの株を生物発光の検討に用いた。

##### 生物発光によるリアルタイム解析

生物発光測定機器は 288 チャンネルのシステムを追加し、576 試料の同時測定を可能とした。またフィルター交換装置を導入し、2 波長での測定を可能とした。これまでにほぼ連続する 312 の ORF に対応する発光レポーター株をほぼ同一の条件下で生育させ、生物発光の動態を比較した。(1) 発光量、(2) 発光 (リズム) 波形・位相、(3) 刺激応答性を主な注目点とした。中間結果では 1) 発光量は株ごとに大きく異なりべき乗則に従った発光分布を示した。2) 発光する全ての発光レポーター株には概日リズム成分が観察された。3) 野生型は明開始で一過的なピークをもち、暗開始まで発光量が上昇する。暗期後一過的な発光上昇を示し、いくつかは暗誘導のかかるものもあった。*kaiABC* 欠失株背景では、その多様性が失われていた。*kaiABC* 遺伝子 (概日時計) が明暗周期下で広範囲な発現制御機構に関わっていることが示唆された。

## シアノバクテリアの概日時計機構の解明

## 1) KaiCによる包括的遺伝子発現制御

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、これまでの時計モデルに大きな変更をもたらした(PNAS, 2003)。

## 2) KaiCのリン酸化の解析

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、KaiBによって抑制され、概日振動発生における重要性が示唆されてきた。質量分析によりKaiCのリン酸化部位がセリン431およびスレオニン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(PNAS, 2004)。

## 3) KaiCによる転写・翻訳フィードバックの成立過程の解析

KaiCタンパク質発現のフィードバック抑制を理解するため、*kaiBC*の発現誘導後のKaiCタンパク質の蓄積量とKaiCのリン酸化レベル、*kaiBC*プロモーター活性の変化を測定した。その結果はKaiCタンパク質量が*kaiBC*プロモーター活性を抑制すると仮定すると説明困難であったが、リン酸化型KaiC量が*kaiBC*プロモーター活性を制御しているとする説明できることを示した(投稿準備中)。

## 4) KaiCによる遺伝子発現機構の解析

*Syenchococcus* の37個の二成分制御系遺伝子のなかでレスポンスレギュレーターをコードする*rpaA*破壊により全ての遺伝子発現リズムが消失した。さらにKaiC, SasA, RpaAの3つの蛋白質を同時にATPと共に混ぜ、リン酸基の転移を調べたところ、KaiC蛋白質によってSasAからRpaAへのリン酸基の転移活性が上昇することがわかった(投稿準備中)。

## その他

上記のように本研究は予定したように順調に推移しているが、これに加え、我々は16年度後半にシアノバクテリアの概日時計の作業仮説であった時計遺伝子の転写翻訳モデルを否定する実験事実を見出し、2報の論文をScienceに掲載した。この成果は、当研究開始時はおろか半年までは想定していなかったものだが、今後の研究に大きな意味を持つものである。この詳細は特記事項で説明する

## 特記事項

これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。

## KaiCリン酸化サイクルによる計時機構の発見

多くの生物でそれぞれの時計遺伝子(生物時計の発振に不可欠な遺伝子群)が発見され、時計遺伝子から作られる時計蛋白質がそれ自身の遺伝子発現を抑制するというフィードバック制御が、生物が時間を測定すると原理とされてきた(転写・翻訳モデル)。我々もシアノバクテリアで*kai*時計遺伝子が発見し、その発現にフィードバック制御を見だし、このモデルが該当すると考えてきた。

## 暗期中のKaiCリン酸化サイクル

しかし我々は遺伝子発現が強く抑制される連続暗条件下で、シアノバクテリアの時計遺伝子*kaiC*のmRNAは直ちになくなってしまいうにも拘わらず、時計蛋白質KaiCのリン酸化が約1日周期の顕著なリズムを継続することを発見し、従来の転写・翻訳モデルを否定し、時計蛋白質間の相互作用に基づくKaiCのリン酸化サイクルが生物時計の発振メカニズムがあることを示した。この成果は生物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。

## 試験管内での生物時計

では、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。シアノバクテリアは核を持たない原核生物だが、細胞内は決して単純ではない。事実、これまで多くの生物での試みにも拘わらず、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、試験管内の時計も周期が変化した。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。<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。

**研究成果の発表状況**

〔 この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。 〕

- Kageyama H, T. Kondo and H. Iwasaki Circadian Formation of Clock Protein Complexes by KaiA, KaiB, KaiC and SasA in Cyanobacteria J. Biol. Chem. 278 2388-2395 (2003)
- Kitayama Y., H. Iwasaki, T. Nishiwaki and T. Kondo. KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. EMBO J 22.: 2127-2134, (2003)
- Katayama M, Kondo T, Xiong J, Golden SS. IdpA 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 (2003)
- Nakahira Y, Katayama M, Miyashita H, Kutsuna S, Hideo Iwasaki H, Oyama T, Kondo T. Global repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. Proc. Natl. Acad. 101:881-5. (2004)
- Kitayama Y, Kondo T., Nakahira N, Nishimura H, Ohmiya Y and Oyama T An *in vivo* dual-reporter system of cyanobacteria using two railroad-worm luciferases with different color emissions. Plant and Cell Physiol. 45:109-113. (2004)
- 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)
- Iwasaki H, Kondo T. Circadian timing mechanism in the prokaryotic clock system of cyanobacteria. J. Biol. Rhythms 19: 436-444 (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)
- 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 Cyanobacterial Circadian Clock. J. Bacteriol. 187: 2559-2564 (2005)
- Kondo T: Circadian system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 第11国際原核光合成生物シンポジウム 東京 2003年8月24日-29日
- Kondo T: Circadian System of cyanobacteria, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 the 58<sup>th</sup> Yamada Conference Light sensing and signal transduction in plant photomorphogenesis Okazaki 2004年6月6日-9日