

「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

現在、生物時計（概日時計）の分子機構が急速に解明されつつある。我々は生物発光遺伝子レポーターを利用したシアノバクテリアでの解析によって、*kaiABC* 遺伝子・KaiABC蛋白質による基本ループやSasAによる増幅ループを解明した。しかし、いずれの生物の時計モデルにおいても、なぜ「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）を生じるかは全く不明である。今後、多くの生物でこの問題の分子レベルでの解明を目指し解析が進むと思われるが、我々は最も有利なシアノバクテリアの実験系で他の生物に先駆け概日特性を実現する原理を理解することを目指している。一方、シアノバクテリアの概日時計と植物の概日時計が二成分情報伝達系を介して、類似していることが明らかになった。そこで、シアノバクテリアの概日時計で得られた成果や方法を利用して植物の概日時計とそれを利用した日長測定機構（光周性）の解明も狙う。

2. 研究実施内容

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。今年度はこのモデルを分子レベルで充実させ、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、これまでの解析を継続するとともに、今後の生化学的解析にむけて実験設備を整備した。また概日振動が生理学的意味を持つためには不可欠である日々の昼夜交代への同調機構の解明をめざす。また本プロジェクトのもう一つの課題である植物の概日時計の解析については、今後の試みのための準備を行った。

(1) シアノバクテリアの概日時計

1) KaiC蛋白質の細胞内動態

Western解析により3つのKai蛋白質がいずれもmRNAのリズムに比べ8時間ほど遅れた位相で振動することを確認した。また、この時、KaiC蛋白質は2つのバンドになるが、フォスファターゼの処理により高分子量のバンドが消失するのでKaiC蛋白質は細胞内でリン酸化されていることが示された。このリン酸化のレベルも概日振動を示し、さらに、いくつかの突然変異体ではこのリン酸化レベルの異常が確認され、概日振動の過程でKaiC蛋白質のリン酸化が重要なステップであることが示された。

さらに、KaiC上にはKaiAと結合する2つの領域が特定され、この領域には多くの時計突然変異がマップされ、結合の強さが突然変異により変化することが確認されている。また、kaiA遺伝子上の時計変異のサプレッサーがkaiC遺伝子のこの領域にみいだされている。これらのデータはKaiA, KaiC蛋白質間の相互作用が概日振動の性質に大きな影響を持つことを示している。事実、KaiAの共存によりKaiCのリン酸化が著しく促進されることがシアノバクテリアの細胞内でも、*in vitro*でも確認され、KaiCとKaiAの共役による振動活性化が示唆されている。この事実はKai蛋白質による周期の決定機構の解析の糸口になるであろう。

今後、シアノバクテリアの細胞内での相互作用の変動、翻訳速度、分解速度の時間変動や細胞内分布およびリン酸化の時間変動を調査する。またKai蛋白質のリン酸化などのタンパク質修飾を、SDS-PAGEや二次元電気泳動によるバンドシフト、フォスファターゼなどをもちいた修飾検定、被修飾アミノ酸残基の決定などを調査する。さらにこれを様々な変異体で比較することで、24時間周期を成立させる要因を探りたい。なお昨年度の予備的調査ではKaiCは細胞内で数100kDの大きな複合体を形成していることが確認されている。

2) Kai蛋白質（特にKaiC）の生化学的機能

KaiCの配列には2つのATP/GTP結合モチーフ（Walker's p-loop）が見出されている。またKaiCの配列は重複構造をとっており、2つのp-loopも夫々対応する位置にあることが確認された。さらにCIとCIIは相互作用すること、単独でもkaiBCの発現を抑制することが確認された(4)。また、KaiCのP-loopによって、KaiC蛋白質はATPと結合することも確認されている。またこのモチーフへ変異を導入するとこのATP結合能も概日リズムも消失してしまい、KaiC蛋白質のATPとの結合が概日周期の決定に重要であることが示された(5)。さらに*in vitro*でKaiCがそのセリン/スレオニン残基を自己リン酸化することも見出されている。KaiCには既知のキナーゼ・モチーフは存在せず、新規の自己リン酸

化蛋白質(autokinase)と考えられる。シアノバクテリアでは今までにSer/Thr autokinaseの報告例はなく、その意味でも貴重な知見を提供するものである。

3) 概日振動を構成する要素の探索

シアノバクテリアの概日振動を理解するためには、さらに多くの概日振動発生系に關与する分子の同定も不可欠である。我々はすでに酵母のtwo-hybrid法を用いて、KaiC結合蛋白質の探索を行い、二成分情報伝達系(two-component regulatory system)のセンサー(ヒスチジン)キナーゼSasAを同定した。sasA遺伝子破壊株では、*kaiBC*の発現量が著しく低下し、概日振動の強さも大きく低下した。一過的なsasAの過剰発現は概日時計の位相変化をもたらし、さらに、sasAの構成的な過剰発現により、時計機能は完全に停止した。これらの知見は、KaiCがSasAの活性を制御するいっぽう、SasAが*kaiBC*の発現を調節することで安定な概日振動を実現していることを強く示唆している。SasAがない状態でも*kai*に基づく振動は持続しているが、その振幅は生理的な意味を持たないと思われ無いほど弱く、SasAは*kai*に基づく振動の重要な増幅装置として機能している。さらに、名古屋大学生命農学研究科の水野猛博士らの協力でSasAに対応する応答因子(レスポンスレギュレーター)を見だし、現在その機能を解析中である。

4) *kaiABC*時計遺伝子群の発現制御機構

*kaiBC*遺伝子の発現の自己制御が振動発生の骨格と考えられる。*kaiBC*遺伝子上流にはすでに転写の活性化および抑制に必要な領域が見いだされている。酵母のone-hybrid法などでこのシスエレメントを制御する転写因子を探索したが、これまでのところ見いだされていない。一方、KaiC蛋白による発現抑制が多くの遺伝子でみられること、*kaiBC*遺伝子上流部を他のプロモーターに置き換えても、発現レベルを調節することでリズムがみられることなどが、明らかとなった。従って、今後、フィードバックの中心となる*kaiBC*遺伝子の活性化と抑制に係る機構を理解するためには、転写の基本機構(RNAPolymerase, sigma factors, DNAのunfoldingなど)の解析も必要である。

5) 光による概日振動の同調機構の解明

光による同調は概日時計の基本的要件である。位相変位を引き起こす暗パルスの替りに単色光を照射することで、この光刺激を受容する光受容体の分光学的性質を調査した。この作用スペクトルは450nmと660nmに極大をもつ光合成型のものであった。これは、光合成に依存するシアノバクテリアでは、光合成活性の変動による不可避的な代謝の影響が概日時計の光同調に重要であることを示唆している。今後、光合成などの生理学的活性の測定を充実させ、その上で同調機構の分子遺伝学的解析を進める。なお、米国の共同研究者(Golden博

士ら)はこの効果を仲介すると思われる遺伝子*cikA*を見いだしている。なお、我々は分子遺伝学的解析により、*kaiB*の変異体ではこの位相同調に異常のあるものが見いだし、*KaiB*が環境情報の伝達に係わっていることが示した。シアノバクテリアでは、時計機構の中心機構がすでに明らかになっているので、環境要因による*kai*遺伝子や蛋白質の変動を特定し、その機構を解明できれば、その成果は植物の同調機構の解明の基礎ともなる。

一方、明暗の切り替え刺激による位相変位も、動物の場合のように環境同調に重要であることが考えられる。リズム測定が連続明を必要とするため、光合成生物ではこれまでこの解析は充分行われていない。そこで明暗の切り替え刺激の効果を解析するため、暗期中に与えた光パルスによる位相変位を可能とする条件を見いだした。今後、この作用についても、位相変異の異常体の分離などの分子遺伝学的解析を進める。

6) 概日時計システムによる細胞活動の統御

これまで、概日時計システムは環境情報 ->入力系と>概日振動発生系<出力系近>生理的リズムという一方向のモデルが考えられてきた。しかし、最近、事情はこれまでの単純な図式だけではないことが明らかになってきた。例えば、光入力系が概日振動発生系(周期を決定する機構)と相互作用をすることで安定した振動を発生させる可能性や、出力系が入力系の感度を制御している可能性、あるいは複数の概日振動発生機構が存在しそれらの相互作用が存在する可能性などが検討されている。アノバクテリアでも*SasA*が入力系として振動を安定させている可能性や、主時計に制御される従時計の存在が検討されている。またほとんどの遺伝子発現が概日時計の制御下されるので、入力系の変動も当然考えられる。今後はこれまで概日システムの周辺機構と考えられてきた、これらのプロセスも概日システム全体として解析することが必要となってくるであろう。

(2) 植物の概日時計機構の解析と光周性の解明

植物の光周性の分子遺伝学的解析はアラビドプシスで進展しているが、アラビドプシスは光周性が厳密ではないので、日長測定と花成確立いずれも明確に解析することが困難である。そこで厳密な光周性をしめすウキクサで分子生物学的解析をおこなえるようカルスや種子での形質転換を試みる。一方、この試みと並行しアラビドプシスで光周性花芽誘導に重要な機能をもつことが明らかになっている*co,ft, ag*などの遺伝子をウキクサで探索し、その発現と日長との関連を調査する予定である。また概日時計の発振機構については、アラビドプシスの応答因子(*APRR*)の機能を共同研究で解析する。

なおこの報告は平成12年4月以降の研究をまとめており、2000年10月の

CRESTプロジェクト開始以前のものも含まれている。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Iwasaki, H., Williams SB, Kitayama Y, Ishiura, M., Golden SS and T. Kondo : A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell* 101: 223-233(2000)

Schmitz, O, M Katayama, S. B. Williams, T. Kondo, S. S. Golden. CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science* 289 : 765-768(2000)

Taniguchi Y, Yamaguchi A, Hijikata A, Iwasaki H, Kamagata K, Ishiura M, Go M and Kondo T: Two KaiA-binding domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC , *FEBS lett.* 496: 86-90(2001)Reviews

Kondo T. and Ishiura M. Circadian clock of cyanobacteria. *BioEssays*(2000)22 : 10-15

Iwasaki H, Kondo T(2000)The current state and problems of circadian clock studies in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.*41: 1013-1020