

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19349

研究課題名(和文)概日時計を介するUV適応体制と細胞代謝の時間的調整

研究課題名(英文)Temporal metabolic coordination of UV-resistance system via the circadian clock

研究代表者

岩崎 秀雄 (Iwasaki, Hideo)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：00324393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：UV抵抗性の概日制御は、いくつかの真核藻類で報告されているが、その分子機構は不明のままである。私たちは、特殊な実験条件をデザインすることで、単細胞シアノバクテリアがUV耐性を示すことを実証した。時計遺伝子kaiABCの破壊はこのリズムを消失させ、kaiC遺伝子上の周期長変異の導入は、UV耐性リズムの周期長変化をもたらした。さらに分子遺伝学的解析、薬理的解析、分子生物学的解析を駆使し、グリコゲン代謝とUV耐性リズムの相関を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UV耐性の概日リズムは、その重要性が指摘されていながらも報告例は少なく、具体的な分子機構は明らかになってきませんでした。今回、細胞内のエネルギーフロー(グリコゲン代謝)とUV耐性にトレードオフが見出されたことは、UV耐性の獲得には相当な負荷がかかること、それ故に常にUV耐性を高い状態で維持するよりも、高い時刻と低い時刻を時間的に分業することでエネルギーの消費を避けていると考えられるようになりました。これらの知見は、概日システムの進化やUV耐性リズムの合理性を考えるうえで重要な知見と考えられます。

研究成果の概要(英文)：Circadian control of UV resistance has been reported in several eukaryotic organisms, from algae to higher organisms, although the underlying mechanisms remain unknown. Here, we demonstrate that the unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 exhibits a circadian rhythm in resistance to UV-C and UV-B light, which is higher during subjective dawn and lower during subjective dusk. Nullification of the clock gene cluster kaiABC or the DNA-photolyase phr abolished rhythmicity with constitutively lower resistance to UV-C light, and amino acid substitutions of KaiC altered the period lengths of the UV-C resistance rhythm. Based on further experiments, we showed that UV-C resistance is weakened by directing more metabolic flux to the glycogen catabolic pathway. Thus, glycogen and its downstream energy metabolism likely affect the circadian control of UV-C resistance through unknown mechanism(s).

研究分野：時間生物学

キーワード：シアノバクテリア UV耐性 kaiABC グリコゲン代謝 概日リズム *Synechococcus*

1. 研究開始当初の背景

生物は地球の自転による 24 時間周期の環境変動に適応するために概日時計を持つと考えられている。時間生物学黎明期の泰斗、故 Colin Pittendrigh 博士は「生物は UV 照射量の多い昼間には DNA 複製や細胞分裂などの UV 感受性の高い活動を避け、夜間にそれらの活動を行うために概日時計を獲得した」とする仮説を提案したことで知られる。実際、いくつかの植物や真核緑藻の UV 耐性は概日変動し、昼間に高く、夜間に低いことが 2005 年前後に示されている。しかしその後報告は途絶え、これらの生物の概日時計システムが未だ明らかでない部分が多いことから、概日時計による UV 耐性の制御機構の詳細は不明のままである。

単細胞性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 は、概日時計を持つ最も単純なモデル生物として知られ、申請者も発見に関与した時計遺伝子 *kaiA*、*kaiB*、*kaiC* を中心とした概日システムを持ち、その制御下に全ゲノムの半数に上る遺伝子群が連続明条件下で 24 時間周期の概日転写振動を示す。私たちは、概日時計システムの研究が進み、かつ簡便な遺伝子操作が可能な *Synechococcus* は概日時計と UV 耐性の関係を研究するために適したモデル生物と考え、研究に着手した。なお、このプロジェクトについては、2005 年頃に緑藻 *Chlamydomonas* の UV 耐性リズムを報告した米国の Carl Johnson 教授をはじめ、既に同様の試みが 10 年以上前に行われていたにも関わらず UV 耐性リズムを示すに至らず、研究が滞っていたことを申請者はリアルタイムで知っており、新しい切り口での検証が必要であった。

2. 研究の目的

Synechococcus をモデルとして用い、申請時点で萌芽的に申請者の研究室の大学院生が発見した「特殊な条件下での UV 耐性リズム」(後述)が確実な概日リズムと言えることを示す必要があった。そのうえで、Kai タンパク質に基づく概日時計がどのようにしてこの UV 耐性リズムを調節するのか、その制御経路を明らかにしようと試みた。その過程で概日システムの出力系因子とグリコゲン代謝に関わる因子が浮上したため(後述)、分子生物学的解析および薬理的解析を援用してグリコゲン代謝と UV 耐性リズムの関係性を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

UV 耐性リズムに関わる実験条件のデザイン：

本研究の最も重要かつ独創的なステップは、UV 耐性リズムの検出のための実験条件を整備したことにある。私たちは、三種類の光条件を用いた。一つ目は 12 時間明：12 時間暗の明暗サイクルであり、二つ目は概日リズムをリセットする 2 回の明暗サイクル後の連続明条件(恒明条件)であり、それぞれの条件で一定時間後(たとえば、0 時間後、4 時間後、8 時間後など)に UV を当て、その後の生存率・成長率を検討するものである。三つめは、2 回の明暗サイクル後に連続明条件に移すが、UV を当てたのちに一定時間の暗期(基準は 6 時間：3 時間程度までは短縮可能)を施すというものだ。これは、光回復酵素(photoiyase)の作用を低下させることで UV 耐性の変化を増幅させる効果がある(後述)。この三つ目のスケジュール(UV+D 処理と呼ぶ)を確立することが決定的に重要であった。

UV 耐性の検討法：

多数の条件を検討する必要から、寒天培地上のコロニー成長の様子を画像解析することでアッセイを簡便化、定量化した。この手法に関しては論文の査読者から疑念が評されたため、通常の液体培養を用いた生存解析をパラレルに行ない、同様の結果が得られたため信頼できるものと考えられた。

分子遺伝学的解析：

主観的黄昏時に UV+D 処理(上記参照)すると UV 耐性が低下することが分かったため、Tn5 トランスポゾンのランダム挿入変異処理を行ってこの耐性が変化するもの(耐性が低下しないもの)をスクリーニングした。再現性のあった 4 株についてトランスポゾン変異を同定した。

グリコゲン代謝関連解析：

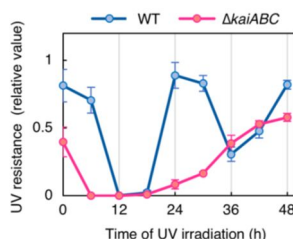
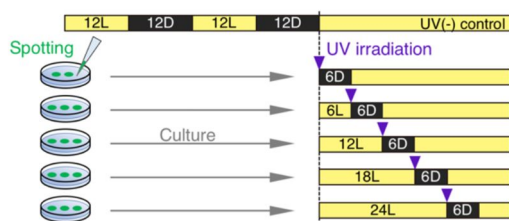
分子遺伝学的に得られた原因遺伝子以外にも、グリコゲン代謝の主要遺伝子の破壊株や、合成生物学的に糖の取り込みを人工的に制御できる株を用いて UV 耐性リズムの変化を検討するとともに、細胞内グリコゲン量の動態を定量化した。

4. 研究成果

シアノバクテリアの概日 UV 耐性リズムの実証

まずは UV 耐性と概日リズムの関係を調べるのが重要であった。上述の事情で、すぐに思

いくつか通常の検討方法（連続明条件下で野生株に UV パルスを施し、その後の生存率を測定する方法）ではうまくいかないことは明らかだった。実際、そのままでは概日リズムは観察されなかった。そこで、まずは UV 耐性と時計遺伝子の関連を調べるため、*kaiABC* 遺伝子破壊株における UV 耐性を検討した。すると、*kaiABC* 遺伝子破壊株では、どの時間に UV を照射しても、野生株よりも生存率が低下する（耐性が低下する）ことが分かった。そこで明暗サイクル下で検討すると、野生株では黄昏時および夜間に耐性が低下することが分かった。次に、夜間における暗期の影響を考慮し、上述の UV+D 処理を連続明条件下で施したところ、以下のように明瞭な概日 UV 耐性リズムを初めて検出することに成功した。この成果に対しては、論文



の査読者から真に概日リズムの影響なのか、暗期を含む特殊な条件による副作用の可能性はないか指摘されたため、周期の異なる *kaiC* 遺伝子上の短周期変異株

でも検討したところ、予想通り UV 耐性リズムの周期長も変化することを示すことができた。また、UV+D の暗期には光回復過程が含まれるのではないかと考え、光回復酵素遺伝子 *phr* を破壊したところ、UV 耐性はどの時間帯でも著しく低下し、概日リズムも観察できなくなった。

分子遺伝学的解析：UV 耐性リズムを調節する仲介因子のスクリーニング

トランスポゾンのランダム挿入変異を行い、UV 耐性が低下する時刻でも UV+D 処理後に生えてくる変異株をスクリーニングしたところ、概日システムの出力系因子 *sasA*, *rpaA* およびグリコゲン代謝に関わる *glgP* 遺伝子にトランスポゾンの挿入が認められた。これらの株では、いずれも UV+D 条件における UV 耐性は構成的に上昇し、耐性リズムは消失した。興味深いことに、*sasA*, *rpaA* 遺伝子破壊株ではグリコゲン蓄積リズムも消失することが知られていたため、概日システムがグリコゲン代謝を制御し、それに連動して UV 耐性リズムが惹起されるのではないかと仮説を立てた。

グリコゲン代謝と概日 UV 耐性リズムの関連性

glgP 以外のグリコゲン代謝の主要因子の遺伝子破壊株のシリーズを作成し、UV+D 条件下の UV 耐性リズムを検討したところ、その多くで UV 耐性リズムに強い影響が認められた。詳細に検討したところ、糖代謝のフローがグリコゲンの消費（分解）に偏る条件（暗期を含む）には UV 耐性が低下し、グリコゲン消費が抑えられるように調節されるタイミングでは UV 耐性が促進されるのではないかと考えられた。その妥当性を検討するため、合成生物学的に細胞外グルコースを人為的に取り込むことを可能にした株（UCDavis の Atsumi 教授よりご提供いただいた）を用いて検討したところ、グルコースを取り込ませてエネルギー産生を強制的に上昇させると実際に UV 耐性がどの時刻でも軒並み低下することが示された。さらに、UV+D 条件の暗処理中に脱共役剤 CCCP を投与して ATP 合成を阻害させると主観的黄昏時の UV 耐性の低下が改善されることも明らかにした。以上の結果は、UV 耐性とグリコゲンを介するエネルギー産生にはトレードオフの関係があるとの作業仮説を強力に支持するものである。

以上の成果は、大学院生の川崎洸司を筆頭著者、申請者を責任著者とする原著論文として現在投稿、査読中であり、近いうちに詳細を公表できるものと思う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kawamoto Naohiro, Ito Hiroshi, Tokuda Isao T., Iwasaki Hideo | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Damped circadian oscillation in the absence of KaiA in <i>Synechococcus</i> | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 2242 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16087-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hisamoto Shumpei, Hosaka Natsumi, Matsunami Yuka, Iwasaki Hideo | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 Route reassessment by transporter ants improves speed and directional accuracy of cooperative transport in <i>Formica japonica</i> | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Ethology | 6. 最初と最後の頁 107 ~ 116 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10164-019-00626-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 戸井田一磨, 榎田和花奈, 上坂一馬, 井原邦夫, 藤田祐一, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 糸状性シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> の運動性の制御に関する分子遺伝学的探索 |
| 3. 学会等名 藍藻の分子生物学2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 河本尚大, 伊藤浩史, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 Correlation between rates of KaiB・KaiC complex formation and period lengths of kaiA-less damped circadian oscillation |
| 3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中村嘉博, 川崎洸司, 羽谷慶汰, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 シアノバクテリアの概日時計を介した細胞分裂制御メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 時間生物学フォーラム東京 2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松並由佳, 川崎洸司, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 シアノバクテリアにおける暗期特異的な高振幅転写パターンの解析 |
| 3. 学会等名 時間生物学フォーラム東京 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 川崎 洸司, 小島 崇, 細川 徳宗, 高野 壮太郎, 岩崎 秀雄 |
| 2. 発表標題 高振幅な概日発現振動を示すシグマ因子の転写出力系での機能の解析 |
| 3. 学会等名 CyanoClock 2.0 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 戸井田一磨, 上坂一馬, 井原邦夫, 藤田祐一, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 糸状性シアノバクテリア <i>Leptolyngbya boryana</i> の運動性を制御する新たな因子 |
| 3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 板木大知, 河本尚大, 北山陽子, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 Analysis on rhythmic gene expression without KaiC phosphorylation cycle in the kaiCEE mutant cells |
| 3. 学会等名 第25回日本時間生物学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 久本峻平, 保坂菜摘, 松並由佳, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 アリの協調運搬の型を分ける要因~モデルとデータベースによる予測と検証 |
| 3. 学会等名 第37回動物行動学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 久本峻平, 保坂菜摘, 松並由佳, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 協調運搬の型を分ける要因は何か? |
| 3. 学会等名 第61回日本蟻類研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岩崎秀雄, 板木大知, 川崎洸司, 河本尚大, 江蔵隼弥, 中村嘉博, 松並由佳 |
| 2. 発表標題 再現性の確認しづらい現象たちについて |
| 3. 学会等名 Cyano Clock 1.0 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 川崎洸司, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 紫外線耐性の概日制御: ストレス耐性とエネルギー代謝のトレードオフ仮説から考える適応戦略 |
| 3. 学会等名 Cyano Clock 1.0 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 河本尚大, 岩崎秀雄 |
| 2. 発表標題 SynechococcusにおけるKaiA非存在下での計時メカニズム |
| 3. 学会等名 Cyano Clock 1.0 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Naohiro Kawamoto, Hideo Iwasaki et al. |
| 2. 発表標題 ircadian Characteristics and a Possible Mechanism of a Damped Transcriptional Oscillation without KaiA |
| 3. 学会等名 SRBR2018 (Society for Research on Biological Rhythms) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koji Kawasaki, Hideo Iwasaki |
| 2. 発表標題 Circadian Control of UV-Resistance in Cyanobacteria, Possibly Based on a Trade-off Between Energy Production and Stress Response |
| 3. 学会等名 SRBR2018 (Society for Research on Biological Rhythms) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 AKI INOMATAら (岩崎分担執筆) | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 美術出版社 | 5. 総ページ数 176 |
| 3. 書名 AKI INOMATA: Significant Otherness 生きものと私が出会うとき | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 岩崎秀雄研究室 http://www.waseda.jp/sem-iwasakilab/ |
|--|

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|