

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21770008

研究課題名（和文） 概日時計タンパク質プロクロロコッカスのホモログ研究

研究課題名（英文） Study of Circadian Clock protein homolog in Prochlorococcus

研究代表者

姓名 伸介（KUTUNA SINNSUKE）

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：30315824

研究成果の概要（和文）：

KaiCタンパク質のウエスタンブロット解析により発現を確認することができた。一方大腸菌によるプロクロロコッカスの形質転換を試みたが、安定した形質転換体を得ることはできなかった。そこでアンチセンスオリゴヌクレオチドによるKaiCタンパク質発現レベルの抑制に取り組んだ。発現レベルはわずかに抑制された。しかし生育面での明確な生理作用の結果は得られていない。より分解活性に耐性の修飾オリゴであるLNAでも同様の解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

KaiC protein was detected in Prochlorococcus cell. Transformation of the cell with E. coli conjugation was not established. Therefore, a knock-down method as inhibition of translation technique was applied. Natural oligonucleotide had a weak effect on Prochlorococcus KaiC. Now artificial oligonucleotide LNA is being examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
平成2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：若手研究（B）

科研費の分科・細目：5701

キーワード：概日時計 タンパク質 藍藻 プロクロロコッカス

## 1. 研究開始当初の背景

2005年 KaiA, B, Cタンパク質とATPによって試験管内での概日時計再構成実験が行われ、世界で初めて概日時計の実体があきらかとなった。すなわち概日時計はタンパク質とATPだけで再構成できることが示された（中島ら 2005 Science）。この実験系で KaiA は再構成のための必須要素である。この KaiA KaiB KaiC の3種類はシネココッカスのものであり、多くの藍藻種に保存されている。海洋性プロクロロコッカスには KaiB KaiC

の設計図である kaiB kaiC 遺伝子の2つしかゲノムには存在せず、その機能と発現はいまだ不明である。大腸菌発現・精製したプロクロロコッカス KaiC、KaiB を ATP とともに試験管で混合して KaiC のリン酸化がおきることが報告された（Axmman J. Bacteriol. 2009）、しかしそのリン酸化は概日サイクルを示さない。またシネココッカス KaiA をそこに添加してもその反応に影響はなかった。試しに私はプロクロロコッカス KaiC の2次構造をウェブ上の解析ソフトで推定し、シネ

ココッカスのものと比較した。KaiC は CI と CII という非常によく似た (DNA レベルでも相同性が高い) ドメインからなる鉄アレイのような形をしている (林ら *J. Biol. Chem.* 2004)。C 末端側には A ループと呼ばれる数十アミノ酸残基からなるループ構造がある。このループ構造は KaiC との相互作用に必要である (Kim *PNAS* 2008)。上述の比較では CI, CII はプロクロコッカスとシネココッカスのものともによく似ていた。しかし A-loop はプロクロコッカスでは長さ とヘリックスの数にバラエティに富んでいた。このことからプロクロコッカスでは、進化のなかで KaiA を失うとともに KaiC の A-loop もその形と役割を変えていることが示唆された。

kaiA 遺伝子が進化の中で失われたプロクロコッカスにはシネココッカスのような振動型の概日時計は存在しないと考えられている。しかしながら、kaiB, kaiC 遺伝子が保存された遺伝子群として多くのプロクロコッカスに存在するにもかかわらず、その役割は明らかにされていない。

私はシネココッカスの kaiA kaiB kaiC の研究をこれまでに行い、おもに遺伝子発現とその役割を明らかにしてきた (石浦ら 1998 *Science*)。また新規の遺伝子として概日時計の周期調節遺伝子をクローニングし pex と命名した。DNA 配列の相同性からはその生化学的性質がわからなかったが、結晶構造解析の結果、winged-helix 構造の転写調節であることを明らかにした (有田ら *J. Biol. Chem.* 2007)。そしてそのターゲットが kaiA 遺伝子のプロモーターであることを明らかにした (杵名ら 2007 *J. Bacteriol.*)。謎の多いプロクロコッカスの概日時計タンパク質ホモログを生化学的、分子生物学的手法で研究することでいまだ謎の多い Kai タンパク質の進化への理解を深めることができよう。

## 2. 研究の目的

まずシネココッカスであきらかにされたことがプロクロコッカスでどこまで保存されているかを明らかにすることが必要である。またシネココッカスでは自由自在な遺伝子組換えが可能であるが、プロクロコッカスでは遺伝子導入が安定しない。そこで本研究では、まず、kaiB と kaiC 遺伝子の発現をノーザン法とウエスタン法で解析した。プロクロコッカスでは遺伝子操作が確立されていないことが、分子遺伝学研究の妨げとなっている。これを解決すべく形質転換系の確立に取り組む。また同じ理由から遺伝子ノックダウン系の確立に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### 藍藻の細胞と培養

プロクロコッカスは米国の CCMP のストックコレクションから入手した NATL1A および 2 の 2 種類を用いた。小笠原および伊豆大島の海水をベースとした Pro99 培地を使用した。100-300 ルクスの弱い光の日周期的環境下で、倍量希釈を繰り返した。この環境下での細胞分裂速度は 2 日間であった。

### Total RNA の抽出

O. D. 730 = 0.25 の細胞培養を 30mL 遠心して得た細胞沈殿から RNA を PureLink Micro-to-Midi total RNA Purification System で抽出した。

### ゲノム DNA の抽出

藍藻培養からシネココッカスで用いられているフェノール法でゲノム DNA を抽出した。

### kai 遺伝子のクローニング

ゲノム DNA から PCR で kaiB kaiC の遺伝子を増幅し、pGEM-T ベクターにクローニングした。塩基配列をシーケンス解析により確認した。

### ノーザン法

Total RNA 20ug を変性アガロースゲルを使った電気泳動法で分画した。この RNA をナイロンメンブレンに転写した。これと上の kaiC 遺伝子から転写した DIG 標識 kaiC アンチセンス RNA をハイブリダイゼーションした。

### ウエスタンブロット法

プロクロコッカス細胞沈殿を TBS バッファーに懸濁し、超音波破碎により 1-5ug のタンパク質をアクリルアミドゲル電気泳動で分画した。ナイロンメンブレンに転写後 KaiC 抗体で検出した。

### 多量体解析

本研究費で購入した島津ゲル濾過システムとゲル濾過カラム superdex200 をつかった KaiC-KaiB 多量体解析を行った。

### 大腸菌を介した形質転換

プロクロコッカス細胞の遺伝子組換えを形質転換によって行った。遺伝子組換え可能領域を探索し、抗生物質耐性遺伝子マーカーを組み込んだ。

### 遺伝子発現ノックダウン系

kaiC mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチドをプロクロコッカス細胞培養に添加し、KaiC の発現レベルを解析した。

## 4. 研究成果

プロクロコッカス細胞の培養は一般に安

定しないことが知られているが、いくつかの株を培養したところ、本研究室の培養環境では NATL1A がもっとも安定に培養できることがわかった。また分裂時間は2日間であることもわかった。濁度は低くとも A730 で1程度までは達した。

濁度 0.25 程度ならば安定して細胞分裂することがわかったので、細胞から RNA を抽出精製した。リボソーム RNA はほとんど分解されていなかったことから、実験に供することのできる品質のものであるといえる。

フェノール法で細胞からゲノム DNA を抽出した。kaiB と kaiC それぞれの遺伝子領域を PCR 法で増幅し、シーケンスベクターにクローニングした。シーケンス解析により目的の2つの遺伝子をそれぞれクローニングしたことを確認した。次に DIG 標識された kaiB kaiC 遺伝子のアンチセンス mRNA を試験管内転写によって得た。

先述の total RNA を変性ゲルで分画してから、プラス電荷のナイロンメンブレンに転写した。これに準備しておいたアンチセンス RNA プローブをハイブリダイズしたのち、プローブを抗 DIG 抗体と化学発光によって検出した。

次に抗 KaiC 抗体によって KaiC タンパク質の検出を試みた。細胞を超音波破碎して得た細胞粗抽出 1-5ug を SDS ポリアクリルアミドゲルで分画した。これをナイロンメンブレンに転写した。抗 KaiC 抗体と化学発光法によって KaiC タンパク質を検出した。シネコッカスと同様なリン酸化が起きているかどうかは現時点では確認できていない。アクリルアミドゲルの濃度の最適化が必要であろう。明暗サイクルにおいて発現量が変化しているのかも今後の課題である。

次に多量体を形成しているかどうかを調べるために粗抽出タンパク質を Superdex200 でサイズ分画するゲル濾過を行った。得られた画分をアセトン沈殿で濃縮した。これを変性バッファーに溶解した還元サンプルを SDS アクリルアミドゲルで電気泳動した。その後 KaiC 抗体でウエスタンブロット解析した。多くのバンドが得られたが、どれが有意な KaiC 複合体であるかが今後の課題である。試験管内で発現精製した KaiC と KaiA の複合体形成パターンとの比較が解決策の一つであろう。また後述の遺伝子ノックアウト法で KaiC の発現を強力に抑制できる実験系を確立してから再挑戦する。

プロクロロコッカスの形質転換系を確立するために抗生物質耐性遺伝子マーカーとともに生物発光遺伝子は大腸菌に入れた。この大腸菌を LB-Pro99 培地でプロクロロコッカスに1週間培養して接合させた。その後 Pro99 培地にて培養することで大腸菌を排除した。得られたプロクロロコッカスに遺伝子

が組み込まれて遺伝子が機能しているかどうかを生物発光によって調べたが、有意な発光を示さなかった。プロクロロコッカスの分裂時間が2日間と長いいため形質転換できていないことが考えられる。

そこで、形質転換実験は一時停止し、遺伝子発現ノックダウン系に着手した。ウエスタンブロットで KaiC タンパク質を検出することができるようになったので、このタンパク質の発現レベルを指標として遺伝子発現ノックアウト効果を得ることにした。シネコッカスにおいてこの遺伝子の発現は大量発現しているわけではなく、プロクロロコッカスでも同様であると仮定した。したがって大量発現しているほかの遺伝子よりはアンチセンスによる遺伝子発現効果が出やすいと考えられる。まず通常の kaiC アンチセンスオリゴヌクレオチドを翻訳開始コドンカバーするように設計した。これをプロクロロコッカス培養にいった。12時間後に培養を回収してウエスタンブロットを行った。KaiC の発現レベルはわずかに低下していることが確認された。現在より安定したアンチセンス効果を得るために人工修飾オリゴヌクレオチドのひとつ LNA のアンチセンスオリゴヌクレオチドをつかって実験を繰り返している。

この2年間でプロクロロコッカスの培養面での課題はクリアできたと考える。また発現解析も十分可能であることが分かった。これまでプロクロロコッカスの生理面での指標が乏しいことが概日研究面での課題であった。昨年(2010年) Osburne らは、UV 耐性の遺伝学的解析系を確立している。今後私が kaiC の発現を十分低いレベルまで落とすことができれば、KaiC タンパク質の生理的役割と UV 耐性との関係として明らかにできると期待する。今年(2011年) Science に KaiC タンパク質の試験管内リン酸化リズムのリセットに ATP と ADP 濃度の変化が関わっていることが報告されている。プロクロロコッカスの KaiC も同じように ATP 濃度変化によって時刻調節されているのかどうか興味深い。昨年2つの真核生物細胞(緑藻オクトコッカスと赤血球)ではリン酸化ではなく、酸化還元のリズムが概日リズムを示すことがネーチャーで報告されているのだが、依然として KaiC タンパク質はトピックとして位置づけられていることが分かる。プロクロロコッカスの KaiC の機能がどのようなものなのかは生化学的にも進化の面でも興味深い。本研究室ではこれからまず KaiC の発現プロファイルを明らかにするとともに、遺伝子ノックダウン系を並行して確立して KaiC の生理的役割を明らかにする。またプロクロロコッカス KaiC の A-loop の機能が未知であるが、シネコッカスにおいては KaiA との相互作用にとって必要で、KaiC リン酸化を促進している。

プロクロコッカスには KaiA がないにも関わらず、この A-loop は失われていないのでその機能を試験管内再構成実験で確認できるだろう。予想としてこの配列を除去した KaiC は自己リン酸化が進まないことがあげられる。もちろん KaiA 以外のリン酸化促進因子がプロクロコッカスでは機能していて KaiC に A-loop を介して促進していることも考えられる。

5. 主な発表論文等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杏名 伸介 (KUTUNA SINNSUKE)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学

研究科・准教授

研究者番号：30315824

(2) 研究分担者

( ) なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

( ) なし

研究者番号：