

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570066

研究課題名(和文) 時計機能を持つ細胞を創る

研究課題名(英文) In vivo reconstitution of circadian system by heterologously expression of the cyanobacterial Kai proteins

研究代表者

寺内 一姫 (Terauchi, Kazuki)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70444370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアの生物時計を構成するKaiA, KaiB, KaiCは、試験管内で時計再構成可能である極めてユニークなタンパク質である。この3つのタンパク質を、本来生物時計をもたない生物に導入することで、時計機能を付与することを目的とする。この試みを通して、細胞内で時計が遺伝子発現の生体リズムを生み出すため制御機構を明らかにする。大腸菌(*Escherichia coli*)および緑色硫黄細菌(*Chlorobium tepidum*)において、3つのタンパク質発現を試み、リン酸化の概日リズム形成に必要な条件を見出した。

研究成果の概要(英文)：The cyanobacterial circadian oscillator composed of only three proteins, KaiA, KaiB, and KaiC sustains an ordered pattern of KaiC phosphorylation. In vitro reconstitution of the KaiC phosphorylation cycle, achieved by simple mixing of the three Kai proteins with ATP provided a means of studying the detailed mechanisms of the Kai-proteins oscillator. The expressions of many genes showed the circadian rhythm in the cyanobacterium *Synechococcus elongates* PCC 7942. In this study, we examined whether the cyanobacterial circadian clock composed of Kai proteins operate in a heterologous host. Three kai genes of the cyanobacterium *S. elongates* PCC 7942 were introduced to *Escherichia coli* or *Chlorobium tepidum*, and KaiA, KaiB, KaiC proteins were co-expressed in the cells. The regulation of the molar ratio of three Kai proteins in the cell was found to be important for the exhibition of circadian rhythm in a heterologous host.

研究分野：植物分子生理

キーワード：シアノバクテリア 生物時計

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物時計は地球上のほとんどの生物が保持しており、細胞内で約 24 時間周期のリズムを生み出すことで様々な生理現象や機能を制御する重要な機構である。原核生物であるシアノバクテリアは、生物時計を保持している最も単純な生物として知られている。シアノバクテリアの生物時計は、KaiA、KaiB、KaiC の 3 つの時計タンパク質で構成されている。この 3 つの時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC を ATP と混ぜ、一定温度に保持すると、KaiC のリン酸化状態が 24 時間周期で振動するという画期的な発見がなされた[] (図 1)。この生物時計再構成系は、時間を計測するという複雑なメカニズムがタンパク質に組み込まれていることを明確に示した初めての発見である。

この生物時計再構成系を用いて、時計タンパク質 KaiC が時計の中核(発振子)であり、その ATP 加水分解活性が時計の 24 時間を決定する中心活性であること、リン酸化の変動は KaiC 分子内で進行し、KaiA および KaiB はそのリズムの安定化に寄与することが明らかにされている[]。24 時間周期で、KaiC の ATP 加水分解活性とリン酸化状態が変動する。それに伴い、KaiC の構造も 24 時間周期で変動する[]。これらの発見は、どのようにして生物時計の周期長が温度に依存せず維持されているのかという長年の問への解答となりつつある。

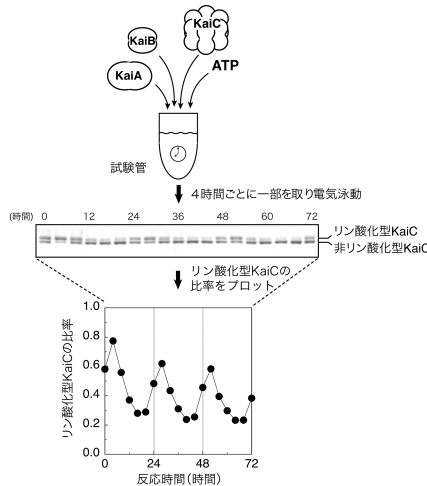


図 1. タンパク質による生物時計再構成系
3つのKaiタンパク質とATPにより24時間周期で振動する

(2) シアノバクテリアにおいてゲノムの全遺伝子の 30%以上の転写物レベルが概日リズムを示し、生物時計はゲノム全体にわたってグローバルに遺伝子発現を制御していることが DNA マイクロアレイ解析によりわかってきた[]。しかし、3つの Kai タンパク質からなる時計本体から遺伝子発現にいたる、いわば出力系を構成する情報伝達経路については不明な点が多く残されている。

シアノバクテリア生物時計は、時計遺伝子

kaiA にコードされる KaiA と *kaiBC* オペロンにコードされる KaiB、KaiC の 3 つの時計タンパク質から構成される。シアノバクテリアにおいて、KaiC を過剰発現させると *kaiBC* プロモーター(*PkaiBC*)の活性が抑制される、KaiC の負のフィードバック制御が観察される[]。一方、KaiA を過剰発現させると *PkaiBC* が活性化される。細胞内での遺伝子フィードバック制御の分子レベルでの機構はほとんど知られていない。

(3) 研究代表者は、Kai タンパク質による分子時計機能をシアノバクテリア以外の生物に移植する試みによって、発振子である時計本体から生体リズムを生じるための最小ユニットを検証することが可能ではないかという着想を得た。研究開始時点で、同様の先行研究はまったく知られておらず、Kai タンパク質による生物時計をシアノバクテリア以外の他生物内で機能させるという研究はほとんどない。

<引用文献>

- Nakajima, et al. (2005). Science 308:414.
- Terauchi, et al (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:16377.
- Nishiwaki, et al (2007) EMBO J. 26:4029.
- Murayama et al. (2011) EMBO J. 30:68 - 78.
- Ito et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA106:14168.
- Ishiyama, et al. (1998) Science, 281:1519-1523

2. 研究の目的

本研究では、生物時計を本来もたない大腸菌などに生物時計遺伝子を導入し、時計機能をもった新たな細胞の創成を目指す。この試みを通して、Kai タンパク質以外に概日リズムの駆動と出力に必要とされる未同定の因子を特定する。以下の 3 点の達成を目指す。

生物時計をもたない異種生物に生物時計タンパク質を導入し時計機能を付与する。

生物時計の出力系から概日的な遺伝子発現にいたる転写制御機構を明らかにする。

1 および 2 の成果を統合し、細胞が概日リズムを刻むための最小ユニットを探索する。

3. 研究の方法

大腸菌 (*E. coli*) および光合成細菌では、これまで概日リズムの報告はなく、またゲノム解析でも時計遺伝子ホモログは見出されていない。本研究ではこの 2 種の生物でシアノバクテリア由来の KaiA、KaiB、KaiC タンパク質を発現させる。そのために個々の生物に適した発現ベクターにシアノバクテリア時計遺伝子 *kaiABC* を導入したプラスミドを構築し遺伝子導入した。

(1) 生物時計をもたない大腸菌内での KaiABC の時計機能の導入

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 由来の *kaiABC* 遺伝子クラスターを発現ベクターに組み込んだ。当初は、*kaiA* を *tet* プロモーター発現下におき、さらに *strep* タグが融合する発現系とした。

生物時計再構成系の結果より、3 つの Kai タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC は 1:3:3 のモル比で混ぜ合わせることでリン酸化振動が生じる。したがって、大腸菌内においても生物時計を再構成するためには、3 つの Kai タンパク質のモル比を制御する必要があると考えた。発現比率を制御するために、プロモーターを変更した発現ベクターも構築した。

構築したプラスミドを導入した細菌内で、3 つのタンパク質を発現させ、ウエスタンブロット法により確認した。ウエスタンブロット法に用いる 3 つの Kai タンパク質の特異的抗体をそれぞれ作製した。

Kai タンパク質が時計として機能することは、数日間連続培養した細胞内における KaiC リン酸化状態の変動を分析することで評価した。

大腸菌の培養条件の検討

大腸菌の生育状況が大きく影響することが、研究途中で示唆されたため、培地や生育温度を検討した。培地は、LB 培地と M9 最小培地を用い、温度は、25 から 37 まで数点で検討した。3 つの Kai タンパク質のモル比を制御するために、誘導剤であるアンヒドロテトラサイクリン (AHT) と IPTG の濃度の影響を検討した。

(2) 生物時計をもたない光合成細菌内での KaiABC の時計機能の導入

緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* (*C. tepidum*) は還元型の硫黄化合物を電子源として利用する絶対嫌気性の独立栄養細菌である。*C. tepidum* は生育至的溫度が 48 の好熱性であり、好熱性という性質から生化学的研究に適している。倍化時間が約 2 時間と生長が非常に速く、分子生物学的な研究にも適した形質を有している。2002 年に全ゲノム配列の解読が終了し、また緑色硫黄細菌で唯一形質転換系が確立されている。

時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC の発現は、広宿主域プラスミドを利用した緑色硫黄細菌 *C. tepidum* の外来遺伝子発現系を利用して、シアノバクテリア *S. elongatus* PCC7942 由来の *kaiABC* 遺伝子クラスターを発現ベクターに組み込んだ。

C. tepidum 形質転換体は、過去に緑色硫黄細菌で使用された遺伝子の水平伝播機構を利用した接合法により作製した。

C. tepidum の培養には主に CL 液体培地あるいは CP 寒天培地を用いた。液体培地による培養にはフタ付き試験管、CP 寒天培地の培養には嫌気ジャーを用いた。植菌操作後は混入した酸素を除くために、暗所で 2 時間以上静置してから水槽における 40 での光照射(白熱球: 70 μ mol/m²/s of PAR)を用いて培養した。

緑色硫黄細菌の連続培養条件を検討した。*C. tepidum* の倍加時間は約 2 時間であるため、約 24 時間周期である KaiC のリン酸化リズムをモニターするには倍加時間を著しく延長する必要があると考えられた。培養における照射光量または温度条件を変更することで倍加時間がどのように変化するのか観察した。

細菌内での KaiABC の時計機能の評価は大腸菌の場合と同様に実施した。

4. 研究成果

(1) *kaiABC* 遺伝子の発現ベクターを持つ大腸菌に発現誘導剤を添加後、数時間後に集菌し、粗抽出液からウエスタンブロット法により、KaiA、KaiB、KaiC をそれぞれ検出した。精製した Kai タンパク質のシグナルと比較すると、KaiA、KaiB、KaiC とともに、精製タンパク質とシグナルが同位置にあることから、大腸菌細胞内で Kai タンパク質が発現していると考えられた。

kaiABC 遺伝子の発現ベクターを持つ大腸菌と *kaiC* 遺伝子単独の発現ベクターを持つ大腸菌に発現誘導剤を添加後、培養液の吸光度を一定に保ちつつ、連続的に培養を行った。4 時間毎に集菌し、ウエスタンブロット法によりリン酸化型と非リン酸化型の KaiC を検出した。

この検出結果より、リン酸化型の KaiC の比率を求めたところ、*kaiC* 遺伝子単独の発現ベクターを持つ大腸菌細胞内の KaiC は、リン酸化状態は低い状態で変動しなかったのに対し、*kaiABC* 遺伝子の発現ベクターを持つ大腸菌細胞内では、リン酸化型と非リン酸化型の KaiC が共存することが観察され、KaiC のリン酸化状態は経時的にゆるやかな変化を示した。

(2) 安定したリズム形成には、さらに条件検討する必要があると考えられたので、以下の 3 点を検討した。

第一に、培養状態の安定性に注目した。連続的培養において培地供給量が安定しない場合には、KaiC のリン酸化状態が安定しないため、時計構築には大腸菌の細胞状態が大きく影響することが示唆された。当初の研究では液体 LB 培地を用いていたが、M9 最小培地を使用することで、大腸菌の培養状態を安定に維持したまま実験を行うことに成功した。

第二に、細胞内での KaiA、KaiB、KaiC のモル比に注目した。ウエスタンブロットの結果から各タンパク質の発現量を計算し、その比率を求めた。KaiB と KaiC に対して KaiA が過剰に発現することが明らかとなった。発現用のテトラサイクリン誘導型プロモーター *Ptet* は *kaiA* の上流に配置されていることが原因であると考えられた。当初、作成したシアノバクテリア *S. elongatus* PCC7942 の時計遺伝子 *kaiABC* を導入した大腸菌は、KaiBC の発現量は積極的に制御せず、シアノバクテリア由来のプロモーターを用いた。

シアノバクテリア細胞内では、3 つの Kai タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC は 1:30:30 のモル比で存在すると報告されており、また試験管内では 1:3:3 のモル比で混ぜ合わせることでリン酸化振動が生じることがわかっている。従って、大腸菌内の再構成系においても、KaiA、KaiB、及び KaiC の発現量を積極的に調節する必要があること示唆された。

そこで、発現モル比をコントロールするために、*kaiA* をテトラサイクリン誘導型プロモーター *Ptet* の制御下におき、*trc* プロモーターを *kaiBC* の前方に導入することで 3 つの Kai タンパク質の発現量の制御を試みた。

次に、誘導剤の濃度を変更して、3 つの Kai タンパク質の発現量比を検討し、また KaiC のリン酸化状態を検証した。その結果、3 つの Kai タンパク質のモル比を試験管再構成系の比率に近づけることができた。しかし、この条件では、KaiC のリン酸化状態に振動は認められなかった。そこで、さらに KaiA の発現量を減らし、シアノバクテリア細胞内の 1:30:30 に近づけることにした。その結果、約 24 時間の KaiC のリン酸化リズムを再構成できることを見出した。しかしながら、現時点では振幅が小さいため、さらに条件を検討する必要があると考えられた。

(3) 光合成細菌の形質転換体において、3 つの時計タンパク質が細胞内で発現していることが確認された。たまた、KaiC のリン酸化状態の変動も確認され、温度による同調が可能であることを示唆する結果が得られた。

(4) KaiABC タンパク質発現ベクターを導入した大腸菌に、レポーター遺伝子を導入した。この大腸菌において、Kai タンパク質を発現させた場合の遺伝子発現解析を実施した。その結果、KaiC だけでなく、3 つの Kai タンパク質が発現している場合においてのみ、レポーター活性の変化が認められた。

(5) 以上の結果から、Kai タンパク質による生物時計を異種生物に移植するための、第一歩である 3 つのタンパク質を活性のある状態で共発現することに 2 種の生物において成功した。さらに、概日リズム形成には、3

つの時計タンパク質のモル比を、*in vitro* 再構成系ではなく、細胞内の Kai タンパク質のモル比を再現することが重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Y. Hiraide, K. Oshima, T. Fujisawa, K. Uesaka, Y. Hirose, R. Tsujimoto, H. Yamamoto, S. Okamoto, Y. Nakamura, K. Terauchi, T. Omata, K. Ihara, M. Hattori, Y. Fujita, Loss of cytochrome c_{II} stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. DOI: 10.1093/pcp/pcu165, Plant and Cell Physiology, 56, 334-345, 2015 (査読有)

[学会発表](計 20 件)

横井川侑大, 浅井智広, 寺内一姫, 緑色硫黄細菌におけるシアノバクテリア時計遺伝子の異種発現, 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会, 2015.3.7, 神戸大学六甲キャンパス(兵庫県)

水谷直哉, 松田宏矢, 安部さゆり, 浅井智広, 寺内一姫, 大腸菌におけるシアノバクテリア時計遺伝子の発現とその制御解析, 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会, 2015.3.7, 神戸大学六甲キャンパス(兵庫県)

吉村真史, 寺本高啓, 浅井智広, 寺内一姫, 難波秀利, 太田俊明, 糸状シアノバクテリアの元素選択的観察, 第 28 回日本放射光学会年会, 2015.1.12, 立命館大学 BKC キャンパス(滋賀県)

寺内一姫, シアノバクテリアの概日時計から学ぶ, 微細藻類研究会 2014, 2014.12.23, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

Koya Matsuda, Sayuri Abe, and Kazuki Terauchi, *In vivo* reconstitution of the cyanobacterial circadian clock in *Escherichia coli*, Ninth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, 2013.6.29, 立命館大学 BKC キャンパス(滋賀県)

安部さゆり, 松田宏矢, 寺内一姫, 大腸菌におけるシアノバクテリア生物時計の再構築, 第 60 回日本生化学会近畿支部例会, 2013.5.18, 大阪大学吹田キャンパス(大阪府)

Sayuri Abe, Koya Matsuda, Katsuaki Oyama, Kazuki Terauchi, *In vivo* reconstitution of circadian system by heterologously

expression of the cyanobacterial Kai proteins in *Escherichia coli*, The 14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, 2012.8.7, Porto (Portugal)

Sayuri Abe, Kazuki Terauchi, A synthetic approach to elucidate the role of a transcription-translation feedback loop in the circadian system of the cyanobacterial clock proteins, Eighth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments, 2012.6.23, エポック立命 21(滋賀県)

Sayuri Abe, Katsuaki Oyama, Kazuki Terauchi, A synthetic approach for generation of a circadian system by production of the cyanobacterial Kai proteins in *Escherichia coli*, The 5th international symposium on Molecular Science of Fluctuations towards Biological Functions, 2012.1.7, Todaiji Culture Center (Nara)

〔図書〕(計 1 件)

寺内一姫他, コロナ社 生命科学1「タンパク質と生物時計」2012年, 215(90-93)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.collabo.sk.ritsumeai.ac.jp/index.php?c=laboratory&laboratory_pk=4

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺内 一姫 (TERAUCHI, Kazuki)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号 : 70444370

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

浅井 智広 (Azai, Chihiro)

立命館大学・生命科学部・助教