

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370020

研究課題名(和文)シアノバクテリア概日時計転写出力系の多様性形成過程の実験的検証

研究課題名(英文) Experimental evaluation of diversification process of cyanobacterial circadian output systems

研究代表者

小山 時隆 (Oyama, Tokitaka)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30324396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアの概日時計システムは他の生物と比較して非常に単純である。3つの時計タンパク質で1日を刻む時計を中心に、周期的な遺伝子発現制御系を出力として持っている。多様なシアノバクテリアにおいて、時計システムは高く保存されているが、一部のグループでシステム構成の簡略化が起こっている。その簡略化・多様化の機能的、生理学的な本質を追求するために、概日リズム研究モデルである淡水性 *Synechococcus* PCC 7942 を解析用の研究プラットフォームとして活用した実験系の構築をおこない、時計関連タンパク質の細胞内および試験管内(無細胞系)での挙動の詳細な解析を可能にした。

研究成果の概要(英文)：Cyanobacterial circadian clock systems are uncomplicated; the circadian oscillator is composed of only three clock proteins, and its output is the circadian regulation of gene expression. Among various cyanobacteria, circadian clock system is highly conserved but several groups lack its components. In order to elucidate diversification of the clock components at functional and physiological levels, novel experimental methods were developed using the model cyanobacterium, *Synechococcus* PCC 7942 as a research platform for chronobiology. Then, detailed analyses for behavior/function of clock-related proteins were achieved.

研究分野：生物学

キーワード：概日時計 シアノバクテリア 遺伝子発現 時計タンパク質

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアの概日時計システムは真核生物の概日時計システムと比較して、構成要素の種類が少ないという点でシンプルであり、24時間の周期性をだす振動体本体は3個の時計タンパク質(KaiA, KaiB, KaiC)で構成される。振動体本体の実体解明が契機となって、時計の発振と時計からの出力とを分離して解析・理解することが可能となった。その結果、時間情報を転写制御に伝達する出力系が3つのパスウェイからなることが明らかとなった。つまり、Kaiタンパク質時計の下流で働く *kaiBC* の概日リズム発現(転写)調節経路は *labA* 経路と *cikA* 経路という転写を抑制する経路に加えて、転写を促進する *sasA* 経路があり、これら3つの経路のみで、基本的な遺伝子発現リズムの時刻情報を伝達していることが明らかとなった。

これらの成果は、シアノバクテリアの概日時計研究のモデルとなっている淡水性 *Synechococcus elongatus* PCC 7942(以下 *Synechococcus 7942*)を用いた研究に基づいている。一方で、*kaiA*, *kaiB*, *kaiC* は広くシアノバクテリアのゲノムに保存されているが、*Prochlorococcus* 類のゲノムには *kaiA* が無い。興味深いことに、*Prochlorococcus* 類には概日時計出力系である *labA* と *cikA* がゲノムに存在しない。*Prochlorococcus* 類はゲノムの大きさ(全遺伝子数)が他のシアノバクテリアに比して小さくなっていることなどから、この仲間では一部の時計関連遺伝子が欠失したと考えられている。*Prochlorococcus* 類は海洋(大洋、比較的深海域)に生息する海洋性ピコプランクトンであるが、同様の海洋性 *Synechococcus* 類(*Synechococcus 7942* とは系統的に離れている)では、*kaiA* は残っているものの、*labA* と *cikA* を欠失している。これらのことから、*kaiA* の欠失と *labA* と *cikA* の欠失は直接リンクしているものではないことが示唆されていた。しかし、これら一部の時計関連遺伝子を欠失しているシアノバクテリアにおいて保持されている時計遺伝子(*kaiB*, *kaiC*)産物の分子機能や生理学的役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、概日時計システムの多様性形成(進化)過程に対して、実験的にアプローチすることで、時計関連タンパク質の機能変遷、アミノ酸配列の多様性と機能多様性との相関、時計システム以外での生理学的役割の探求を目的とした。また、様々なシアノバクテリア由来の時計関連遺伝子を解析するために必要な実験系の開発も目的とした。

3. 研究の方法

概日リズム研究のモデルとなっている *Synechococcus 7942* を解析用研究プラットフォームとして活用することで、遺伝子操作・培養が困難な海洋性シアノバクテリアの概日時計関連因子の機能解析を試みた。時計遺伝子である *kaiBC* のプロモーター活性を概日リズムの指標とし、生物発光レポーターを利用して、概日時計の時間情報に由来する転写出力変動を生物発光変動として簡便に測定した。生物発光測定は自動化された装置を用いて容易に行うことができる。

海洋性シアノバクテリアの時計関連遺伝子(群)を *Synechococcus 7942* 株に導入し、人為的に発現させる系として、IPTGで誘導可能な *trc* プロモーター系をベースにした発現系を用いた。導入される株は発光レポーターをゲノムにもつ擬似野生株を基本とするが、各種時計関連遺伝子欠損変異株を用いることで、導入した遺伝子と内在の時計関連遺伝子との遺伝的関連性を解析することができた。また、愛媛大の中平洋一氏、戸澤譲氏らと共同で、テオフィリンによる mRNA レベルの構造変化を誘導し、高効率な翻訳抑制/抑制解除機構を可能にするリボスイッチの、シアノバクテリアでの応用可能性を検証した。

海洋性シアノバクテリアで保持されている時計遺伝子の中で、*kaiB* 遺伝子はサイズが小さい。この利点をいかして、多種のシアノバクテリアの *kaiB* 遺伝子はデータベースの配列情報に基づき遺伝子全合成により各種発現コンストラクトを作成し、様々な KaiB の機能の比較を効率良く行った。

時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC および ATP の混合溶液による試験管内の自律的概日リズム発振動態を非侵襲的に分析するため蛍光相関分光法(FCS)を用いた。KaiB タンパク質に蛍光ラベルを人工アミノ酸/無細胞タンパク合成系を用いて導入し、合成された蛍光 KaiB プローブを試験管内の概日時計システムに少量混ぜることで、KaiB と KaiC 複合体の相互作用に見られる概日リズムを直接的に観測した。

4. 研究成果

(1)シアノバクテリアにおける導入外来遺伝子の人為的な発現量制御法の開発

多種多様な(外来)時計関連遺伝子の分子機能・生理学的役割を解明するためのプラットフォームとして *Synechococcus 7942* 株を利用するためには、導入遺伝子の発現レベル、タイミングを人為的に制御する系が必須となる。テオフィリンによって、mRNA から翻訳

をスタートさせる系（リボスイッチ）が、*Synechococcus* 7942 株の時計関連遺伝子の機能解析に効率良く利用できることを実証した。愛媛大の中平らが開発したリボスイッチと IPTG 誘導可能な *trc* プロモーター系と組み合わせることにより、*kaiC* 欠損株の概日リズム欠損表現型を相補できる人為的導入 *kaiC* の厳密な発現量調整に、添加テオフィリン濃度を調整することで成功した。

上記のリボスイッチは、発現抑制の解除をベースにした翻訳レベルのすぐれた制御系であるが、絶対的な発現レベルの向上も外来時計関連遺伝子の解析には有用である。従来の *trc* プロモーター系は IPTG 添加で mRNA やタンパク質蓄積量を添加前より数十倍増加させることができる。この系にさらに翻訳効率を増加させる配列を加えることで、従来の系よりタンパク質蓄積量を 10 倍以上増加させる系の構築に成功した。この系では IPTG 無添加の状態におけるタンパク質蓄積量が従来の系における誘導後の蓄積量と同じ程度であった。

これら複数の外来遺伝子発現系のいずれかを用い、さらに誘導用の薬剤（IPTG もしくはテオフィリン）の添加濃度を調整することで、シアノバクテリアに導入した外来タンパク質発現量をほぼゼロから圧倒的過剰量まで連続的に調整することを可能にした。

(2) Kai タンパク質時計の外部環境変動に対する応答様式を蛍光相関分光法を用いてモニタリングする手法の開発

本研究スタート時に蛍光相関分光法 (FCS) を利用することで、試験管内での Kai タンパク質時計の挙動を時計タンパク質間の相互作用動態として自動観測する系の開発に成功した。この系の応用として、外部入力のある状態における Kai タンパク質時計の挙動を自動観測・分析することに成功した。Kai タンパク質時計のエネルギー源である ATP およびその反応生成物 / 関連基質である ADP の濃度変動に対する Kai タンパク質間相互作用の応答様式、応答性の時刻依存性、時刻合わせに与える影響の定量的評価に成功した。この技術は概日リズムのような長期間のタンパク質間相互作用の自動観測を可能にしており、さらに外部入力がある条件下での測定をも可能にしたことで、Kai タンパク質時計に直接相互作用する出力系因子（*SasA*, *CikA* など）の時計発振時の挙動を自動観測する系へ発展させる基盤になると期待された。

(3) KaiB タンパク質に見られる配列の多様性と生理学的役割の多様性の評価

3 つの時計タンパク質 (*KaiA*, *KaiB*, *KaiC*) のなかで、淡水性の *Synechococcus* 7942 株

と海洋性シアノバクテリアとの間にみられる KaiB アミノ酸配列置換の時計発振および時計出力系へ与える影響評価を *kaiBC* プロモーターの概日活性変動を指標に行った。まず、海洋性シアノバクテリアの KaiB 配列は *Synechococcus* 7942 株の中で概日振動系および時計（転写）出力系に大きな影響を及ぼせることを明らかにした。次に、KaiB アミノ酸配列にみられる個々のアミノ酸置換の転写出力レベルへの影響を詳細に解析した。その結果、個々のアミノ酸置換は必ずしも表現型（転写出力レベルおよび概日振動）へ大きな影響を与えないことがわかった。アミノ酸置換の概日リズム表現型に与える影響が、タンパク質の量的（安定性や翻訳効率）、あるいは質的（活性）な違いなのかの検証を、各種の人工プロモーター下で発現量を調節する系を用いて行った。その結果、大過剰量の *KaiB* が *Synechococcus* 7942 株の中で出力系を含めた概日時計システムに大きな影響を及ぼすことを新たに明らかにした。この結果は、時計タンパク質の蓄積量と機能との相関については、より詳細な解析・実験系が必要なことを示唆した。さらに、この系を用いて、ゲノム配列情報が明らかとなっている多様なシアノバクテリア由来の KaiB の *Synechococcus* 7942 株での生理学的機能を調査した。その結果、少なくとも *kaiA* を有するシアノバクテリア由来の KaiB については、シアノバクテリア内での生理学的機能の保存性が高いことを示唆した。

海洋性シアノバクテリアで欠損している時計出力系遺伝子に相当する *Synechococcus* 7942 株の遺伝子を欠損した変異体を作成し、さらにそれら変異体における多様な時計関連遺伝子の過剰発現の効果を *kaiBC* プロモーター活性に見られる表現型に注目して解析した。欠損している遺伝子が転写抑制系の因子をコードしていることからわかるように、これらの欠損変異があると時計下流の転写レベルは高い状態で維持されていた。これらの変異体にさらに、海洋性シアノバクテリア由来の時計関連遺伝子や各種配列置換遺伝子を導入することで、海洋性シアノバクテリアと *Synechococcus* 7942 株とに見られる時計関連因子のアミノ酸配列および遺伝子構成の多様化時に生じた可能性のある分子メカニズムの変化を考察した。これらの解析を通して、中心的な時計遺伝子（*kai* 遺伝子群）と転写出力系の遺伝子との間の遺伝的な上位（下位）の関係性を示すことに成功した。この遺伝的関係性は、海洋性シアノバクテリアが時計関連遺伝子を欠失していく過程を考察する上で、重要な情報となっている。

これらの研究手法の開発と解析を通して、海洋性シアノバクテリアにおいて保持されている *kaiB*, *kaiC* 遺伝子の時計発振機能と下流の転写制御機能の保存性について、時計

関連遺伝子群の進化過程も含めて議論する素地を築くことに成功した。

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 2 件)

Effects of adenylates on the circadian interaction of KaiB with the KaiC complex in the reconstituted cyanobacterial Kai protein oscillator. *Biosci., Biotech., Biochem.* 78: 1833-1838 (2014) Goda K, Kondo T, Oyama T (査読有)
DOI 10.1080/09168451.2014.940833

Theophylline-dependent Riboswitch as a Novel Genetic Tool for Strict Regulation of Protein Expression in Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 54: 1724-1735 (2013) Yoichi Nakahira Y, Ogawa A, Asano H, Oyama T, Tozawa Y (査読有)
DOI 10.1093/pcp/pct115

〔学会発表〕(計 5 件)

廣田 周平、北川 徳明、浅野 宏幸、小山 時隆 シアノバクテリアの概日時計タンパク質 KaiB の分子機能とアミノ酸配列の種間比較 第 56 回植物生理学会年会 2015 年 3 月 16 日～3 月 18 日 東京農業大学 (東京都)

北川 徳明、廣田 周平、浅野 宏幸、小山 時隆 海洋性シアノバクテリア *Synechococcus*, *Prochlorococcus* における *kaiB* 遺伝子の機能多様化の解析 第 21 回日本時間生物学会学術大会 2014 年 11 月 8 日～11 月 9 日 九州大学 (福岡市)

中平 洋一、小川 敦司、浅野 宏幸、小山 時隆、戸澤 譲 人工リボスイッチを用いたラン藻のための新規遺伝子発現制御技術 第 55 回植物生理学会年会 2014 年 3 月 18 日～3 月 20 日 富山大学 (富山市)

中平 洋一、小川 敦司、浅野 宏幸、小山 時隆、戸澤 譲 人工リボスイッチを基盤としたラン藻のための新規遺伝子発現制御技術 第 55 回植物生理学会年会 2013 年 12 月 3 日～12 月 6 日 神戸ポートアイランド (神戸市)

浅野宏幸, 六車一志, 小山時隆 海洋性シアノバクテリア *Prochlorococcus* の時計遺伝子機能の推定 第 19 回日本時間生物学会学術大会 2012 年 9 月 15 日 北海道大学学術交流会館 (札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://cosmos.bot.kyoto-u.ac.jp/clock/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 時隆 (OYAMA TOKITAKA)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：30324396