

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770154

研究課題名(和文)低温環境下の概日リズムの普遍的振る舞い

研究課題名(英文)Universality of circadian behavior under low temperature conditions

研究代表者

伊藤 浩史 (ITO, HIROSHI)

九州大学・芸術工学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20512627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：24時間周期の生命現象である概日リズムは、周期の温度補償性を有している。本研究プロジェクトにおいては、ほとんど分子メカニズムが未解明である周期の温度補償性に関して、分岐理論の観点から観察・考察を試みた。

様々な生物種の低温下の概日リズムを観察し、低温下でリズムが停止するときの分岐現象の種類を調べたところ、KaiCリン酸化リズム、哺乳類培養細胞・シロイヌナズナ・ショウジョウバエ概日リズムにおいてHopf分岐を介してリズムが消失することを明らかにした。Hopf分岐点近傍では周期が比較的变化せず、振幅が変化することが知られているため、温度補償性のメカニズムと関係していることが推察される。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythms are oscillatory phenomena with a 24 hours period. One of the prominent characteristics is temperature compensation of period. We focused on temperature compensation, of which molecular mechanism remain unclear, in terms of bifurcation theory.

We had observed circadian rhythms of some organisms under low temperature conditions, and determined the type of bifurcation for the abolishment of circadian rhythms. It had been showed that circadian rhythms of KaiC phosphorylation, fibroblast Arabidopsis and fruits flies were nullified through Hopf bifurcation. Hopf bifurcation under low temperature might relate with temperature compensation because the system near Hopf bifurcation point have low sensitivity to the control parameter.

研究分野：時間生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：概日リズム 温度補償性 シアノバクテリア KaiC

1. 研究開始当初の背景

生命現象の中で約 24 時間周期のリズムは「概日リズム」と呼ばれている。概日リズムは生体内のどこから発生しているのか？という疑問は 100 年以上にわたって議論されてきた。1980 年代以降の分子遺伝学的解析による結論は、リズムは 1 細胞の中に存在し遺伝子間の制御ネットワークがリズムを作り出している、というものである。1998 年頃同時期に各モデル生物で破壊すると概日リズムがなくなる遺伝子が報告され、その後リズムを生み出す分子ネットワークの同定が進んだ。2011 年現在極めて多数の因子が絡みあう詳細なネットワークが報告されている。

その結果わかったことは、哺乳類と昆虫の間では因子の共通性が見られるものの、カビ、バクテリア、植物とは因子がそれぞれ全く異なり、ネットワークの形にも期待したほど共通性が見られないということである。分子生物学的研究を続ける限り今後は同定された因子の個別の解析が主流になっていくと予想される。このような流れは特にヒトの体内時計のメカニズムを知り病気の治療法を模索するなどの応用上有用である。

一方で概日リズムには未発見の普遍的なメカニズムは残されていないのだろうか？というのが本研究計画の着想である。非線形動力学と呼ばれる物理の一分野はこの種のリズムに関する普遍的な事実を抽出する学問分野である。この分野で用いられる**分岐理論**と呼ばれる理論を本研究計画は下敷きとする。分岐理論は、あるシステムのパラメータを変えた時にリズムが消失したとすると、そのメカニズムは大別して二つの理由にわけられる、と主張する。(右図参照)

一つは**ホップ分岐**と呼ばれるタイプである。パラメータの変化と共にリズムの振幅が小さくなり最終的には振幅が維持できなくなることでリズムが消失する。リズムが止まる付近では振り子に似た振る舞いを示し、振り子同様周期はあまり変化しない。

もう一つは**サドルノード分岐**と呼ばれるタイプである。パラメータの変化と共に遅くなるプロセスが生じる。その周期が延びていき、最終的には無限大の周期となる。このタイプは細胞周期のチェックポイントが似ている現象である。進まないプロセスが生じた為にある状態でトラップされてしまうのがリズム消失の要因である。リズムの消失するシナリオは他にもあるが、基本的にはこの二つしかない。本研究計画ではパラメータとして温度に着目する。昔から知られている事実として、

低温環境下では概日リズムが消失するという報告がされている。概日リズムの分野を創始した Pittendrigh はショウジョウバエやゴキブリ、マメなどの実験結果を基に”多くの生物は冷やすと主観的昼の状態ではリズムが停止する”(Pittendrigh, “Molecular basis of circadian rhythms” 1976)と述べている。彼の主張はその後支持するような論文がある(ウキクサ Kondo *et al. Plant Cell Physiol.* 1980, カビ Fransis *et al. Plant Cell Physiol.* 1979 など)。彼の主張はチェックポイントのように昼の位相で停止しているということなので、分岐理論の観点からはサドルノード分岐を支持していることになる。

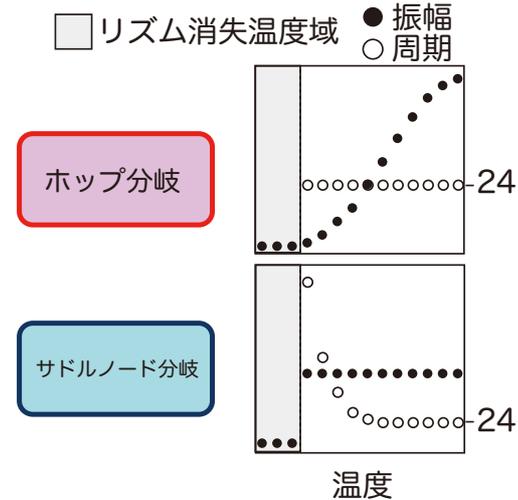


図 2 リズム消失の二つのシナリオ

2. 研究の目的

様々な生物種の低温下での概日リズムを生物発光を用いて測定することによって、分岐現象を見極める。

3. 研究の方法

以下の概日リズムを計測し、周期と振幅を求める。

- (i) KaiC リン酸化リズム
  - (ii) シアノバクテリア生物発光リズム
  - (iii) 哺乳類培養細胞生物発光リズム
  - (iv) ショウジョウバエ生物発光リズム
  - (v) シロイヌナズナ生物発光リズム
- ヒートシンクを二つ用意し、温度勾配を形成するような装置を作成した。(図 1 参照)

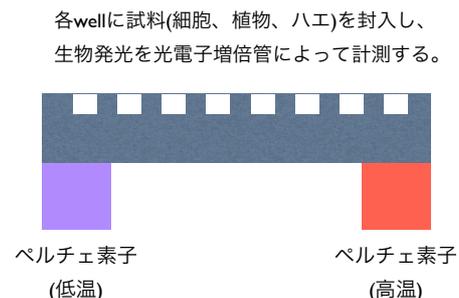


図 1 : 温度勾配装置

#### 4. 研究成果

(i) 試験管内に精製されたシアノバクテリア時計タンパク質 KaiA, B, C を ATP と混合し、30°C でインキュベーションすることによって、KaiC リン酸化リズムが再構成される。これを様々な温度で確認することで、20°C 付近で、Hopf 分岐を介して概日リズムが消失することを確認した。また減衰振動が起こることも確認した。(図 2)

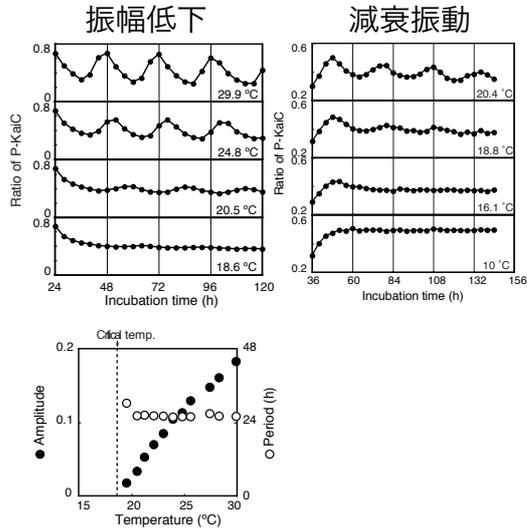


図 2：低温下のKaiCリン酸化リズム

(ii) シアノバクテリア連続培養系を構築し、様々な温度で概日リズムの観察を行った。その結果、(i)の生化学反応とほぼ同じ温度である 20°C で概日リズムが消失することを見いだした。また振幅は減少し、周期が変わらないことから Hopf 分岐を介したリズム消失現象であることをつきとめた。(図 3)

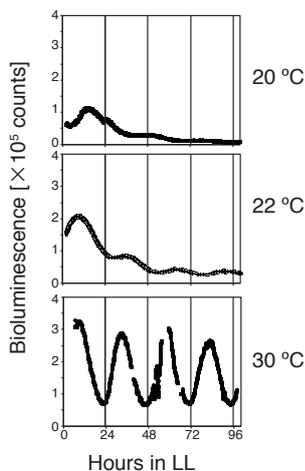


図 3：低温下のシアノバクテリア概日リズム

(iii) 温度勾配装置を作成し、多チャンネルで並列的に様々な温度下にある哺乳類培養

細胞の概日リズムの測定系を作成した。24°C 付近でリズムの振幅は減少し、周期が変わらないことから Hopf 分岐を介したリズム消失であることをつきとめた。本研究は京都府立大学八木田和弘教授との共同研究である。(図 4)

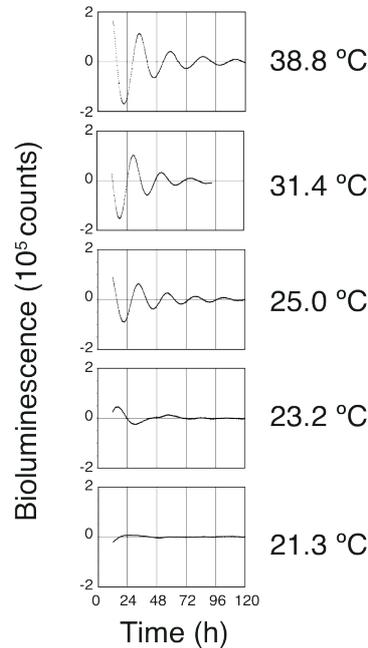


図 4：哺乳類培養細胞概日リズム

(iv) (iii)と同じく、温度勾配装置を作成し、多チャンネルで並列的に様々な温度下にあるショウジョウバエ個体の概日リズムの測定系を作成した。5°C 付近でリズムの振幅は減少し、周期が変わらないことから Hopf 分岐を介したリズム消失であることをつきとめた。本研究は熊本大学桑和彦准教授・富田淳研究員との共同研究である。

(v) シロイヌナズナの生物発光測定系を作成した。パイロット実験として、いくつかの温度で概日リズムを測定したところ 9°C 付近でリズムが消失することがわかった。

以上の成果は全ての生物が Hopf 分岐を介して概日リズムが消失しうることを示唆している。

これらの成果をまとめた論文を現在準備中である。

今後は、植物の生物発光の詳細な観察、アカパンカビ、ゼニゴケなどのさらに幅広い生物種の生物リズムの観察を行う。

#### 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 3 件)

① Kawasaki Y, Ito H\*, Kajimura H.

(\*corresponding author)  
Equilibrium frequency of endosymbionts in multiple infections based on the balance between vertical transmission and cytoplasmic incompatibility  
PLoS ONE, 9, e94900 (2014)

②Lu Y, Nishio K, Matsuda S, Toshima Y, Ito H, Konno T, Ishihara K, Kato S, Hashimoto K, Nakanishi S  
Regulation of the cyanobacterial circadian clock by electrochemically-controlled extracellular electron transfer  
Angew Chem Inter Ed 126(8)  
2240-2241 (2014)

③Goda K, Ito H, Kondo T, Oyama T.  
Fluorescence correlation spectroscopy to monitor Kai protein-based circadian oscillations in real time  
Journal of Biological Chemistry 287,  
3241-3248 (2012)

[学会発表] (計 6 件)

①Reconsideration of low temperature limit of circadian Rhythms  
村山依子、伊藤浩史、近藤孝男、岩崎秀雄  
The 2012 Meeting of the Society for Reserach on Biological Rhythms  
2012.5.19-22 USA, Florida, Destin

② Cyanobacaterial circadian clcoks is nullified under low temperature via Hopf bifurcation  
伊藤浩史  
Artificial Life and Robotics 2013.1.30-2.1 韓国・デジョン市

③低温下における概日リズムの普遍性  
伊藤浩史  
時間生物学会年会 2012..9.15-16

物理モデル：シアノバクテリアにおける分岐現象と制御  
村山依子、伊藤浩史  
時間生物サテライトシンポジウム

生物リズムと温度  
伊藤浩史  
九州山口リズム研究会 第三回

[図書] (計 1 件)  
伊藤浩史  
生物リズムを学び楽しむために  
種生物学研究 in press

[その他]  
ホームページ等

研究成果などは以下の HP で公開している。  
<http://www.design.kyushu-u.ac.jp/~hito/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 浩史 (ITO, Hiroshi)  
九州大学・芸術工学研究院  
研究者番号：20512627