

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04332

研究課題名(和文)概日時計を介する明暗サイクル下でのシアノバクテリアの生存戦略

研究課題名(英文)Cyanobacterial strategy for survival under diurnal cycles with the clock system

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞性シアノバクテリア，概日時計研究の最も単純なモデル生物である。期間中に以下の結果を得た

Kai蛋白質リン酸化振動の*in vitro*再構成系では，低温でリズムを停止する過程で自由継続リズムから減衰振動に移行し，周期の安定性を保証するHopf分岐に従うことを明らかにした。従来必須の時計遺伝子とされてきた*kaiA*遺伝子の機能欠失株が転写レベルの減衰振動を示すことを見いだした。特殊な実験プロトコルを導入することでシアノバクテリアがUV耐性リズムを示すこと，糖代謝と密接な関連があることを示した。

研究成果の概要(英文)：The unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* provides an excellent model to study circadian systems. We have demonstrated (i) Hopf bifurcation underlying the *in vitro* reconstituted KaiC phosphorylation cycle at low temperature, ensuring damped oscillation resonated to external 24-h period cycles, (ii) a damped oscillation in transcriptional regulation even in the absence of KaiA, and (iii) circadian UV-resistance rhythms associated with carbon metabolism.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム シアノバクテリア KaiC 明暗サイクル 減衰振動

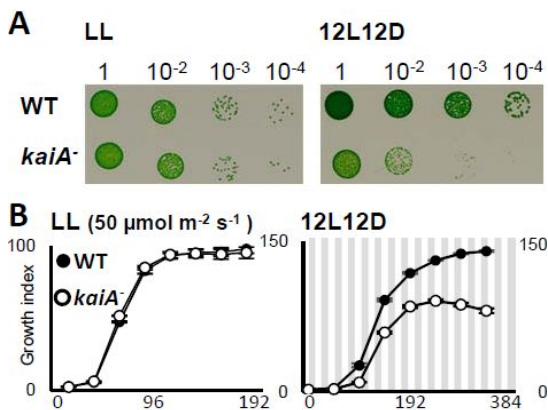
1. 研究開始当初の背景

概日リズムは多くの生物に見られる内因性の生物リズムであり、日周期的に訪れる環境変化（明暗や温度変化）に対する適応体制として重要な意義を持つと考えられている。しかしながら、その生態学的・生理的な意味やそのメカニズムが明らかにされている例は極めて少ない。たとえば、多くの生物の概日リズム変異体では、予想に反して明暗サイクル下で必ずしもその生育が抑制されない。

これに対し、シアノバクテリアでは、野生株と概日時計の周期長変異株を競合的に共培養した場合、明暗サイクルの周期長に近い株が生き残りやすい（生態学的な適応価が高い）ことが知られている。いっぽう、現在明らかになっている周期長変異株、あるいはその原因遺伝子群である *kaiABC* 時計遺伝子クラスターのノックアウト株では、どのような明暗サイクル下でも単独培養では生存に影響は見られないと考えられていた。

2. 研究の目的

研究開始前、私たちは3つの時計遺伝子群のうち *kaiA* 遺伝子の機能欠損株 (*kaiA* 株) は、短日条件下（明期8時間、暗期16時間：以下 L8）で著しい生育遅延をきたすことを見出した。さらに、*kaiC* 遺伝子の過剰発現株においても強く生育抑制がみられることが明らかとなった。



これらの変異株と野生株の間で、連続明条件下ではほとんど生育速度に差は見られなかった。本研究は、これらの概日時計変異体の生長抑制現象と、後述する暗条件下におけるゲノムワイドな劇的な発現抑制の解析を通じて、シアノバクテリアの概日システムと明暗応答が明暗サイクル下での生存戦略に果たす役割とそのメカニズムを明らかにすることを研究着手時の主眼とした。

さらに、研究の展開に伴い、関連する興味深い知見が得られ、研究計画全体を拡張し、以下の課題に取り組むこととした。

kaiA 機能欠損株の短日条件下の生育の詳細な解析と遺伝的背景を明らかにする。

kaiA 機能欠損株で我々が見出した、転写レベルの減衰振動の基本的な性質を明らかにする。

新たに見出した UV 感受性リズムに関する基礎的なデータを取得する。

in vitro 再構成系を用い、概日時計が低温で停止する際、どのような変遷を辿るかを物理学的知見を踏まえて実証的に明らかにする。

3. 研究の方法

12時間明12時間暗のLDサイクル、8時間明16時間暗の短日条件、さらに連続明条件下で野生株、*kaiA* 機能欠損株の生長曲線を詳細に検討するとともに、*kaiA* 機能欠損株で見られる成長阻害を抑圧する（成長を促進する）サプレッサー変異株をスクリーニングし、原因遺伝子との関連を調査する。

自作の高精度の恒温槽を用い、in vitro 再構成系（KaiA, KaiB, KaiC を特定のモル比でATPとともにインキュベートし、KaiCの自己リン酸化振動をSDS-PAGEで解析）の振動を高分解能で解析する。臨界温度におけるリン酸化振動の変化を解析し、特にサドルノード分岐（時計が停止する際、振動スピードが低下し=周期が無限に延長し、特定の位相で時計が停止する分岐）あるいはホップ分岐（周期は維持したまま低振幅化し、特異点で停止）のどちらかを判定する。

4. 研究成果

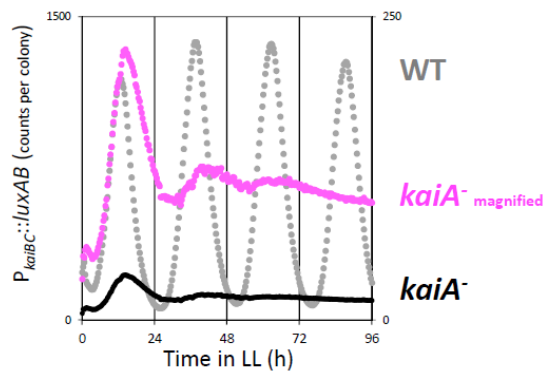
生長に関する *kaiA*-null 変異のサプレッサー変異株を多数取得した。野生株並みに明暗サイクル下の生長が回復するものは、時計関連遺伝子群にマッピングされ、ゲノムワイドな発現プロファイルとの対応でうまく解釈できることを示すと同時に、時計出力系因子として私たちが発見した RpaA との関連も議論した。

野生株並みほどでないものの、条件的に成長が回復するサプレッサーは、代謝関連遺伝子群にマッピングされ、KaiA-RpaA を介した時計の出力が、代謝の時間的統合を介して明暗サイクルに調和した生態学的優位性の獲得につながっていると知見を得た（投稿中）。

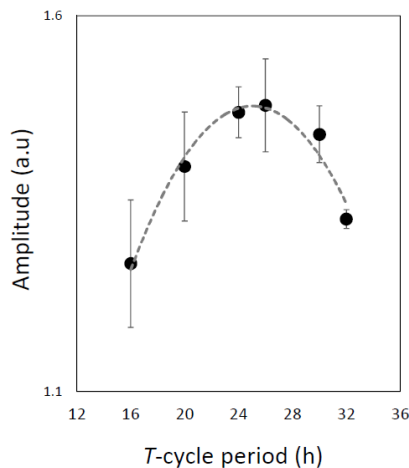
従来必須の時計遺伝子とされてきた *kaiA* 遺伝子の機能欠損株においても、ある条件下では概日リズム特性を一部保持する減衰振動を見いだした。この減衰振動に関して、詳細な共鳴実験や位相応答解析を行い、概日振動に近い固有の振動数を持つ減衰振動であること、野生株よりも大きな光位相応答を示すことなどを明らかにした。

この減衰振動のメカニズムを明らかにするために、*kaiA* と他の概日時計関連遺伝子との二重欠損変異株を作製し、発光レポーター

解析を行ったところ *kaiB*, *kaiC*, *sasA* が *kaiA* 機能欠損バックグラウンドでの減衰型転写振動に必須であることが明らかになった。また, *KaiC* のリン酸化状態を常に模倣した変異型 *KaiC* を発現する *kaiC^{EE}* と *kaiA* の二重変異株を作製しても, *kaiA* 株と類似した減衰振動型の発光プロファイルが観察された。以上の結果は, *kaiA* 株における減衰型の概日的な転写振動は *KaiC* のリン酸化振動を必要としないことを示しており, *kaiBC* 遺伝子発現の転写翻訳フィードバックループを介して起こっている可能性が示唆された(河本ら, 投稿準備中)。



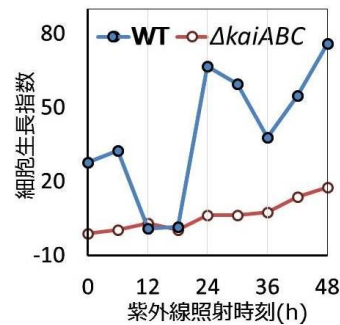
kaiA 機能欠損株における *kaiBC* プロモーター活性の減衰振動(灰色は野生株, 黒が *kaiA* 機能欠損株, マゼンタは縦軸を拡大したプロファイル)



kaiA 機能欠損株の減衰振動の共鳴実験。外力周期が 24 時間付近で, もっとも高い振幅を示した。

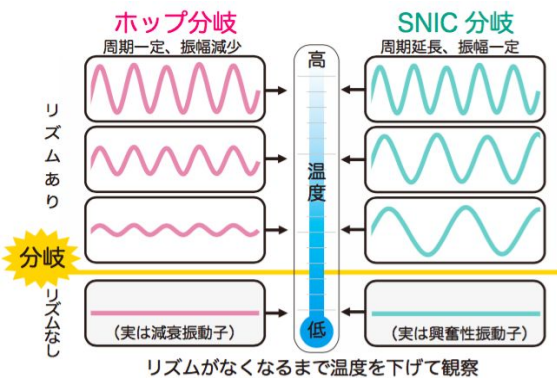
Synechococcus elongatus PCC 7942 の紫外線 (UV-C) 耐性が概日変動を示すことを原核生物では初めて見出した。本研究では, その制御の詳細な分子メカニズムを明らかとするため, トランスポゾン挿入変異ライブラリーを用いた紫外線耐性変異株のスクリーニングを行った。その結果, グリコーゲン分解に関わる遺伝子 *glgP* の欠損が全時刻で紫外線耐性を高い状態に保ち, 紫外線耐性の概日変動の消失を引き起こすことを明らかと

した。その他にも概日時計の出力系に關与し, 二成分制御系を構成する *sasA*, *rpaA* の変異も紫外線耐性の向上をもたらした。先行研究より *sasA*, *rpaA* の両遺伝子の欠損もまたそれぞれグリコーゲン代謝に影響を与えることが報告されていた。以上の結果からグリコーゲン代謝が紫外線耐性に何らかのメカニズムで影響を与えており, 紫外線耐性の維持とグリコーゲン分解を介したエネルギー産生がトレードオフの関係にある可能性が考えられた。(川崎ら, 投稿準備中)。



Kai 蛋白質リン酸化振動の *in vitro* 再構成系を用いて, 低温でリズムを停止する条件を詳細に検討した結果, 臨界温度以下では自由継続リズムは減衰振動に移行し, その分岐は Hopf 分岐に従うことを明らかにした。

今回の発見では冷やすことによって自律振動をしていた体内時計が減衰振動になることを示した。従来, 体内時計研究では自律振動に着目していたが, 減衰振動も考える必要があることを今回の発見は示唆している。進化の過程でどのように自律振動を獲得していったのかは興味深い今後の問題である。(伊藤浩史博士との共同研究, PNAS, 2017)。



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5件)
1) Murayama Y, Kori H, Oshima C, Kondo T, Iwasaki H, Ito H. (2017) "Low temperature nullifies the circadian clock in cyanobacteria through Hopf bifurcation" *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:5641-5646.

doi: 10.1073/pnas.1620378114. (査読あり)

2) 岩崎秀雄 (2017) 「生物時計の分子メカニズム研究の展開: 転写翻訳フィードバックループ・モデルを巡って」(総説) 科学 (岩波) 1121-1129. (査読なし)

3) 水島 昇, 杉本亜砂子, 吉森 保, 岩崎秀雄 (2017) 「いま学会・研究コミュニティのあり方を議論しよう」 実験医学 36(13) 2190-2195

4) Takano S, Tomita J, Sonoike K, Iwasaki H (2015) "The initiation of nocturnal dormancy in *Synechococcus* as an active process" *BMC Biology*, 13: 36 DOI:10.1186/s12915-015-0144-2 (査読あり)

5) Ishihara J, Tachikawa M, Iwasaki H, Mochizuki A (2015) "Mathematical study of pattern formation accompanied by heterocyst differentiation in multicellular cyanobacterium" *J. theor. Biol.* 371:9-23 (査読あり)

[学会発表](計 11 件)

1) 岩崎秀雄 「シアノバクテリアの概日時計の万年野党的探究」 藍藻の分子生物学 2017 (2017.12.1, かずさ DNA 研究所 X 招待講演)

2) 川崎洸司, 中村嘉博, 羽谷慶汰, 岩崎秀雄 「Identification of genes for circadian cell division control in cyanobacteria」 日本時間生物学会 2017.10.28, 京都大学

3) 河本尚大, 馬場響子, 藪谷俊介, 細川徳宗, 岩崎秀雄 「Mutational analysis on growth defects by *kaiA*-nullification under short-day conditions」 日本時間生物学会 2017.10.28, 京都大学

4) Hideo Iwasaki "aPrayer: the Memorial Monument to the Souls of Artificial Cells/Lives" La vie à l'œuvre: Nouvelles écologies, bioart, biodesign, 2017.10.16 パリ国際狩猟博物館 (招待講演)

5) Hideo Iwasaki "Damped circadian oscillation in the absence of KaiA" International Symposium: Circadian Clock of Cyanobacteria during 1991-2017, 2017.3.12. Nagoya University (招待講演)

6) 岩崎秀雄 「シアノバクテリアの時計細胞システムを巡って: 北山陽子さんが遺したもの」 北山陽子メモリアルシンポジウム 「光合成生物の概日時計機構」 2017.3.11, 名古屋大学 (招待講演)

7) 河本尚大, 藪谷俊介, 細川徳宗, 岩崎秀雄 「単細胞生物シアノバクテリアの *kaiA* 機能欠損株における減衰振動について」 時間生物フォーラム東京 2016, 2016.3.16, 早稲田大学

8) 川崎洸司, 岩崎秀雄 「シアノバクテリアの概日時計と紫外線耐性」 時間生物フォーラム東京 2016, 2016.3.16, 早稲田大学

9) 川崎洸司, 岩崎秀雄 「Circadian control of UV resistance in cyanobacteria」 日本時間生物学会学術大会 2015.11.21 東京大学

10) 川崎洸司, 岩崎秀雄 「*Synechococcus elongatus* PCC 7942 の概日 UV 耐性リズムの制御メカニズムの解析」 藍藻の分子生物学 2015, 2015.11.6, かずさ DNA 研究所

11) 河本尚大, 藪谷俊介, 細川徳宗, 岩崎秀雄 「*Synechococcus elongatus* PCC 7942 の *kaiA* 機能欠損株における減衰振動について」 藍藻の分子生物学 2015, 2015.11.6, かずさ DNA 研究所

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 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