

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19247

研究課題名(和文)体内時計の進化と共生の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular biological analysis of circadian clock diversity

研究代表者

寺内 一姫 (Terauchi, Kazuki)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70444370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：地球に生息する生命は体内時計を備え、24時間周期の昼夜環境に合わせ巧みに生活している。哺乳類、高等植物、昆虫、菌類、原核生物などにおいて体内時計の分子レベルでの解析が進められ、時計タンパク質は異なる進化的起源から固有の進化を経て創出されていることが知られている。その多様性は生物の進化を考える上で非常に興味深い。

体内時計をもつ最も単純な生物であるシアノバクテリアはkaiABC遺伝子が体内時計の中核をなす3つのKaiタンパク質をコードしている。本研究では、最も原始的な体内時計ともいえるKaiタンパク質の解析と他生物への移植を試みることで、Kaiタンパク質の多様性と進化について考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物界全体におけるKaiタンパク質の分布は、シアノバクテリアと一部の細菌に限られ、植物は異なる時計システムを有する。植物の葉緑体の起源は、シアノバクテリアの祖先生物の細胞内共生によると提唱されているが、内部共生過程においてKai時計システムが欠落したことを示唆している。本研究により、Kaiタンパク質は異生物内においても機能的に働くことが明らかになった。つまり、何らかの宿主生物自身が有する固有のシステムと、Kai時計システムが和合できない理由があると考えられた。また、時計タンパク質のホモログは、時計としての機能はもたず、時計機能を補助する役割をもち、進化の過程で多様性が生じたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Life on Earth is equipped with circadian clock, which allows it to adapt its life cycle to the 24-hour day and night environment. The circadian clocks of mammals, higher plants, insects, fungi, and prokaryotes are being analyzed at the molecular level. It is known that clock proteins have been created through a unique evolutionary process from different evolutionary origins. The diversity of circadian clock is very interesting for the evolution of organisms.

Cyanobacteria, the simplest organisms with circadian clock, have a kaiABC gene as the core of their circadian clock. The three Kai proteins that form the circadian clock are encoded by kaiABC genes. In this study, we analyzed Kai proteins, which can be considered the most primitive circadian clock, and transfer them to other organisms. The diversity and evolution of Kai proteins were discussed by trying them out.

研究分野：微生物生理学

キーワード：体内時計 シアノバクテリア 概日時計

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上に生息する生命は 24 時間周期の昼夜環境に合わせ巧みに生活している。動物、植物、あるいはバクテリアもその細胞内に時計をもち、一日の生活をプログラムしている。細胞内の重要な生命システムである体内時計は、バクテリアから植物、ヒトにいたるすべての生物においてみられる生命システムであり、体内時計の分子機構について、これまで哺乳類、高等植物、昆虫、菌類、原核生物などにおいて多くの時計遺伝子が同定され解析が進められている。その結果、各生物がもつ時計タンパク質は一次配列に有意な相同性が見いだせず、各生物が固有の遺伝子セットを有することが明らかになってきた。すなわち、時計タンパク質は異なる進化的起源から固有の進化を経て創出されており、その多様性は生物の進化を考える上で非常に興味深い。

体内時計をもつ最も単純な生物であるシアノバクテリアは、分子レベルで体内時計を解析できる恰好の生物となっている。シアノバクテリアでは *kaiABC* 遺伝子とその体内時計の中核をなす 3 つの Kai タンパク質をコードしている^[1]。これら 3 つのタンパク質により試験管内で概日時計を再構成できることから、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が初めて明確に示された^[2]。

植物の葉緑体の起源は、シアノバクテリアの祖先生物の細胞内共生によると提唱されているが、生物界全体における Kai タンパク質の分布は、シアノバクテリアと一部の細菌に限られ、植物もまったく異なる時計システムを有する。さらに、植物の葉緑体 DNA よりも多くの遺伝子がコードされている紅藻や灰色植物の葉緑体 DNA においてもその痕跡は認められない。これは、Kai 時計システムが、シアノバクテリアの内部共生による葉緑体の成立の過程において欠落したことを示唆しており、ホスト生物自身が有する固有の体内時計システムとは和合できない何らかの理由があると考えられる。

また、光合成微生物においても Kai タンパク質の分布は限られ、シアノバクテリア以外では一部の光合成細菌にホモログが存在するのみである^[3]。一方で、Kai タンパク質はシアノバクテリアにおいて広く分布し、複数コピーをもつ種も存在する。シアノバクテリアは、約 30 億年前から地球上に存在するといわれているが、*kai* 遺伝子の進化と体内時計成立の機構は極めて興味深い。

2. 研究の目的

異種生物による共生関係は自然界において普遍的な現象であり、生物進化を促進する大きな原動力となってきた。本研究においては、共生という普遍的な生命現象によって駆動される進化を、体内時計という観点で生命の多様性が生み出された原理を明らかにすることを目的とする。また、光合成微生物における Kai タンパク質の分布とその機能解析により Kai タンパク質の進化を考察する。

3. 研究の方法

(1) 異種生物へのシアノバクテリア体内時計の移植

絶対嫌気性の緑色硫黄光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum* において、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の *kaiABC* を強制発現させた。形質転換法はすでに確立されている方法を用いた^[4]。形質転換体を 48 時間培養し一定時間毎にサンプルを分取した。形質転換体細胞内の Kai タンパク質の量および KaiC のリン酸化状態を、Kai タンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブロット法により観察した。KaiC のリン酸化状態は、リン酸化および非リン酸化型 KaiC の量比を求め、その比率の変動を指標に体内時計が機能していることを評価した。3 つの Kai タンパク質の発現量を、精製タンパク質を基準に算出し、それら 3 つの細胞内発現比率を検討した。また、培養の光条件により時計の同調を促進した。

(2) シアノバクテリアと他生物の共生系構築の試みおよび生物リズム測定

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 に発光バクテリア由来のルシフェラーゼ遺伝子 *luxAB* を導入した株を野生型として、その生物発光量をモニターすることで、概日リズムを測定した^[4]。今回、測定プログラムを新規に作成した。シアノバクテリア生育に必須である窒素源の取り込みが不良である変異株に *luxAB* を導入した形質転換体を作製した。

(3) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の KaiC3 の機能解析

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の KaiC3 を大腸菌内で発現させ、アフィニティクロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製タンパク質を得た。温度 25°C から 35°C において KaiC3 の ATPase 活性を測定した。測定は、分解した ADP 量を HPLC で分離することで評価した^[5]。*Synechocystis* sp. PCC 6803 にある 3 つの KaiB も精製し、KaiC3 の活性への影響を観察した。

4. 研究成果

(1) 異種生物へのシアノバクテリア体内時計の移植

絶対嫌気性の緑色硫黄光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum* において、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の *kaiABC* を強制発現させた。その結果、絶対嫌気的な細胞内環境であっても機能的な Kai タンパク質発現すれば、シアノバクテリアの細胞内と同様に KaiC のリン酸化状態が周期的に変動することがわかった (図)。さらに、この株において、明暗条件が同調に十分に効果的であることがわかった。このことは、シアノバクテリア以外の生物においても、Kai タンパク質からなる時計が、細胞内では光によって同調可能であることを示唆している。これまでの結果と併せて、異種生物において KaiC のリン酸化状態を概日的に周期変動させることが可能であると結論づけた。

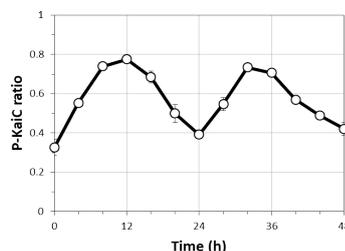


図. *C. tepidum* における KaiABC 発現株での KaiC リン酸化状態

(2) シアノバクテリアと他生物の共生系構築の試みおよび生物リズム測定

新たに作成した測定プログラムを用いて、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の生物発光を 5 日間にわたりモニターした。野生型 *Synechococcus* においては、約 25 時間の概日リズムが得られた。2つの窒素同化の遺伝子欠損株において発光バクテリア由来のルシフェラーゼ遺伝子 *luxAB* 導入を試みた。予想に反してひとつの株において形質転換体を得ることができなかった。また、形質転換体を得られた株において生物発光を測定したところ、野生型と同じ概日リズムパターンを示した。今回検討した条件においては、窒素条件が概日振動に大きな影響を与えることは認められず、窒素条件を元にした共生関係における概日時計解析を実施するには、さらなる条件検討が必要であると考えられた。

(3) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の KaiC3 の機能解析

モデル生物として解析される *Synechocystis* sp. PCC 6803 には、KaiC ホモログが 3 つ存在する^[6]。うちひとつ KaiC1 は概日時計の振動子であるが、他の 2 つについての知見は少ない。そのうちのひとつ KaiC3 について解析した。KaiC3 の ATP 加水分解は温度に依存しており、シアノバクテリアの概日振動子の特徴を欠いていた (図)。KaiC3 は KaiB3 および KaiC1 や KaiB1 と結合し、細胞内において KaiC1 を中心とする概日振動体との相互作用が示唆された^[7]。

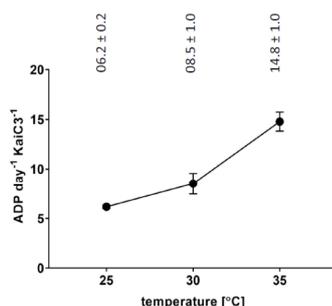


図. KaiC3 における ATP 加水分解活性の温度依存性

<引用文献>

- [1] Ishiura, M. et al. Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* 281, 1519-1523 (1998).
- [2] Nakajima, M. et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 308, 414-415 (2005).
- [3] Ma, P. et al. Evolution of KaiC-dependent timekeepers: a proto-circadian timing mechanism confers adaptive fitness in the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *PLoS Genet.* 12, e1005922 (2016).
- [4] Azai, C. et al. A heterogeneous tag-attachment to the homodimeric type 1 photosynthetic reaction center core protein in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Biochim Biophys Acta.* 1807:803-812 (2011).
- [5] Terauchi, K. et al. ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 16377-16381 (2007).
- [6] Wiegard, A. et al. Biochemical analysis of three putative KaiC clock proteins from *Synechocystis* sp. PCC 6803 suggests their functional divergence. *Microbiology* 159, 948-958 (2013).
- [7] Wiegard, A. et al. *Synechocystis* KaiC3 Displays Temperature and KaiB dependent ATPase activity and is important for growth in darkness. *J Bacteriol.* 202, e00478-19 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wiegard A., Kobler C., Oyama K., Dorrich K. A., Azai C., Terauchi K., Wilde A., Axmann M. I.	4. 巻 202
2. 論文標題 Synechocystis KaiC3 Displays Temperature and KaiB dependent ATPase activity and is important for growth in darkness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Bacteriol.	6. 最初と最後の頁 e00478-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00478-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Teramoto T., Azai C., Terauchi K., Yoshimura M., Ohta T.	4. 巻 177
2. 論文標題 Soft X-ray imaging of cellular carbon and nitrogen distributions in heterocystous cyanobacterium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 52-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1104/pp.17.01767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitahara R., Oyama K., Kawamura T., Mitsuhashi K., Kitazawa S., Yasunaga K., Sagara N., Fujimoto M., and Terauchi K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pressure accelerates the circadian clock of cyanobacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48693-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagata K., Oyama K., Ota A., Azai C., Terauchi K.	4. 巻 66
2. 論文標題 Mutation of alanine-422 in KaiC leads to a low amplitude of rhythm in the reconstituted cyanobacterial circadian clock	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 140-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2323/jgam.2020.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井唱太郎、横井川侑大、足立実音、寺内一姫、浅井智広
2. 発表標題 緑色硫黄光合成細菌におけるシアノバクテリア生物時計の細胞内再構成
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本恵、三林芳太郎、浅井智広、寺内一姫
2. 発表標題 シアノバクテリア時計タンパク質KaiCの嫌気条件下での概日振動
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺内一姫
2. 発表標題 Kai タンパク質による再構成系の温故知新
3. 学会等名 CyanoClock 1.0 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大山克明、浅井智広、太田敦、藤本恵、高嶋優歩、山田貴淳、寺内一姫
2. 発表標題 Kai タンパク質の精製-より大量の精製タンパク質をより安定に得るためのケーススタディ-
3. 学会等名 CyanoClock 1.0
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井唱太郎、横井川侑大、足立実音、寺内一姫、浅井智広
2. 発表標題 緑色硫黄光合成細菌におけるシアノバクテリア時計タンパク質の強制発現
3. 学会等名 第8回日本光合成学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井 唱太郎、横井川 侑太、足立 実音、寺内 一姫、浅井 智広
2. 発表標題 シアノバクテリア生物時計のin vivo再構成には何が必要か?: 緑色硫黄光合成細菌におけるケーススタディ
3. 学会等名 CyanoClock2.0
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺内 一姫
2. 発表標題 シアノバクテリアの概日時計in vitroとin vivo解析
3. 学会等名 CyanoClock2.0 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浅井 智広 (Azai Chihiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	酒井 唱太郎 (Sakai Shotaro)		
研究協力者	横井川 侑大 (Yokoigawa yuudai)		
研究協力者	足立 実音 (Adachi Mine)		
研究協力者	ヴィガード アニカ (Wiegard Anika)		