

光合成生物の生物時計： その分子機構と環境適応

名古屋大学大学院理学研究科 教授 近藤 孝男

1 研究実施の概要

地球に生息するほとんどすべての生物にとって昼夜の変化は最も重要な環境変動であろう。生命はこの変動に単に従属して生活するのではなく、環境の変動を予測しより効率的な生命活動を実現するため、進化の過程で約 24 時間周期の時計機構（概日時計または生物時計）を細胞内に備えるようになったと考えられている。概日時計の存在は、恒常条件下でも約 24 時間周期で生理活性が変動する概日（サーカディアン）リズムとして、単細胞生物から高等動植物に至るまで普遍的に確認されている。我々はこの概日時計の分子機構およびその生理機能を解明することを目標とし最も分子レベルでの解析に適したシアノバクテリアで解析を行ってきた。

生物発光によるシアノバクテリアの概日リズム解析と時計遺伝子 *kaiABC* の発見

概日時計を解明するためには、分子遺伝学的解析が容易な実験系が不可欠である。我々は、図 1 に示すように、シアノバクテリアに生物発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子を移入することで概日時計の動きを生物発光として測定し、シアノバクテリアの概日時計が高等真核生物のものと同じ生理学的性質を持つことを示した。さらに自動微弱光測定装置と画像解析ソフトウェアを開発し、寒天培地上の 10000 コロニーの概日リズムの同時測定を実現した。これを利用し、多くの時計変異体を分離し、3 つの遺伝子からなる時計遺伝子群 *kaiABC* をクローニングした。*kai* は、他の生物の時計遺伝子とは相同性を持たない新規遺伝子であったが、50 種以上の様々な突然変異体がこの領域に変異を持ち、遺伝子の破壊によりリズムは全く消失したため、概日時計の中核遺伝子であると結論した。調査してみると *kai* 遺伝子の発現はリズムを示し、*kaiBC* の発現は KaiC による負のフィードバック制御を受け、逆に、KaiA により促進された。これらの実験結果は *kaiC* 発現とその制御がシアノバクテリアの概日振動の発生原因であることを示唆していた（図 1）。

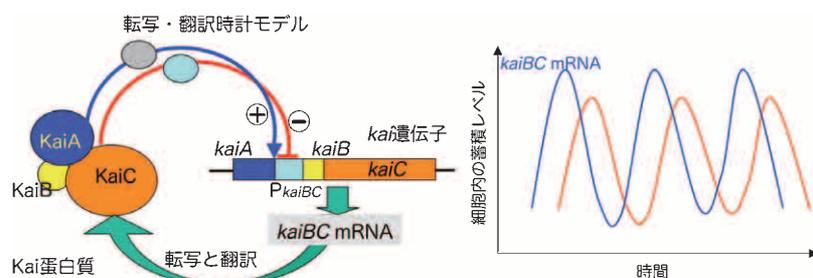


図 1 シアノバクテリアの転写・翻訳モデル

kaiBC オペロンは転写。翻訳され、3 つの蛋白質が合成される。KaiC が（間接的に）*kaiBC* の発現を抑制し、遅れて KaiC が低下する。すると再び *kaiBC* の発現は上昇に転ずる

Kai 蛋白質の機能 - 概日特性の基礎

概日時計が進化適応の所産であるとすれば、その周期が安定した約 24 時間振動（概日特性）となる機構こそがその核心であろう。Kai 蛋白質の単一のアミノ酸変異が概日振動の周期や振幅を大きく変化させることは、Kai 蛋白質とそのパートナーの生化学的機能が概日振動の特性を規定する主要因であることを強く示唆する。そこで Kai 蛋白質の生化学的解析を進め、この問題に答えることを本研究の主目的とした。

KaiC 蛋白質のリン酸化リズム

一連の地道な生化学的解析により、3つの Kai 蛋白質が細胞内で夜間に巨大複合体を形成すること、KaiC が ATP/ GTP 結合能を持ち、その活性が振動に不可欠であること、KaiC 蛋白質は細胞内レベル、リン酸化レベルともに明瞭なリズムを示し、KaiA によりリン酸化が促進されること、KaiB が KaiA に拮抗的に脱リン酸化を促進すること、などの実験結果が得られ、これらを基に細胞内でおこる KaiC 蛋白質のリン酸化サイクルのシナリオを明らかにした。さらに阪大との共同研究で KaiC のリン酸化部位を決定し、このリン酸化が振動発生に不可欠であることを示した。

試験管内で KaiC 蛋白質のリン酸化サイクルの再構成

これらの研究成果は KaiC 蛋白質のリン酸化サイクルの重要性を示しているが、それはあくまでも *kai* 遺伝子発現の転写翻訳フィードバックループの重要な要因として理解されていた。しかし最近の我々は KaiC リン酸化サイクルが転写翻訳の停止する暗期中でも継続することを見いだした (図2)。

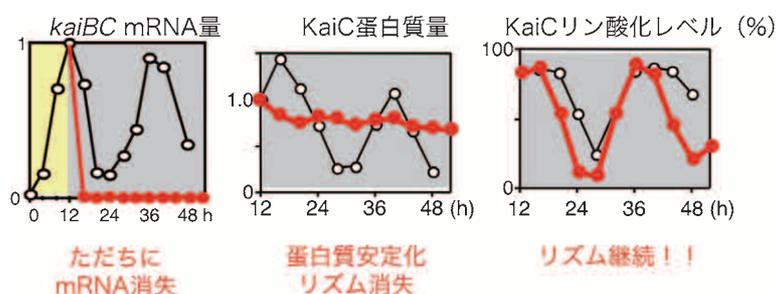


図2 連続明と連続暗中之でのシアノバクテリア細胞内での *kai* 遺伝子発現、KaiC 量、KaiC のリン酸化の変動。

さらに試験管内で (*in vitro* で) 3つの Kai 蛋白質と ATP を混合するのみで KaiC リン酸化サイクルが発生することを示した (15) (図3)。さらにこれらのリズムはいずれも温度補償されており、その周期は様々な KaiC の周期変異体と一致した。これらの結果は KaiC リン酸化サイクルそのものが概日振動発生の基本的メカニズムであることを示した概日時計研究のコペルニクスの転回と言うべきもので、ヒトをも含めた高等生物の時計研究にも非常に大きなインパクトを与えるものである)。

従って本研究の成果として、シアノバクテリアの概日時計について図4に示すモデルを提案することが出来た。今後、どのようなからくりで3つの蛋白質が安定した24時間振動を発生させるかについて構造生物学、蛋白質物化学的方法で解析すれば、生物が時間を測定する原



図3 KaiA,KaiB,KaiC と ATP を試験管内で混合し2時間置きに電気泳動したもの。KaiC はリン酸化により2つバンドに別れるが約24時間周期で変動している。

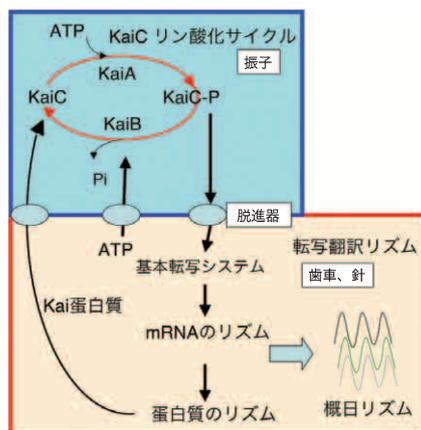


図4 シアノバクテリアの概日システム 青色の部分が振子に相当する KaiC リン酸化サイクル。これは試験管内でも振動する。ベージュの部分歯車や針に相当する転写翻訳リズム。この2つは相互に影響しあって機能する。

理について最終的な解答を得ることが期待できよう。なお、この3つの蛋白質はごくわずかなエネルギーで時間情報を計測し蓄えることが出来る。これはこれまで全く注目されてこなかった蛋白質の新しい機能であるといえよう。

田中グループ

Kai 蛋白質は何れも転写制御に直接関与していないことが示されたことから、その情報を下流に伝達する因子による調節が重要であるとの見方が強まった。その最有力候補として考えられるレスポンスレギュレーターの種類である蛋白質が、どのような遺伝子をターゲットとしているかを明らかにするため、約40のプロモーター候補についてゲルシフト解析により結合の検討を行った。しかしながら、大腸菌で大量発現させた組換えレスポンスレギュレーター蛋白質と DNA の間で有効な結合は認められなかったため、ゲノム全体を対象としてレスポンスレギュレーター蛋白質が結合するプロモーター領域を探索するための新たな *in vitro*、および *in vivo* でのスクリーニング系の開発を行った。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

研究の背景

恒常条件下でも約24時間周期で生理活性が変動する現象、概日リズム（サーカディアンリズム）は原核生物から高等動植物に至るまで普遍的に見られ、生物が昼夜交替する地球上の環境に適応するために機能している。昼夜交替がいかに普遍的な環境変化であるかを考えれば、このリズムを制御する概日時計が重要な環境適応装置であり、その分子機構の解明なくしては真の意味での環境適応の理解はないといえよう。この装置の核心である24時間周期の概日振動発生機構の解明をめざして、1970年代にショウジョウバエとアカパンカビにおいて時計突然変異体が得られ、その後10-15年を費やして1980年代後半に概日時計遺伝子 (*per* および *frq*) クローニングされた。さらに1990年代に入り、*per* および *frq* 遺伝子の転写 → 翻訳 → 核移行 → 転写制御を骨格としたフィードバックループが時計モデルとして提出された。

ショウジョウバエとアカパンカビの概日時計の解析は、1995年頃までに *tim* の発見とその核移行や光リセットの可能性などで充実していった。次の大きな進展は概日時計モデルが哺乳類で提出されたことである。哺乳類では1997年にマウスで *clock* がクローニングされたが、その機能は不明であった。ところが程・岡村らは1997年にショウジョウバエの *per* 遺伝子の哺乳類ホモログ *mper* を見出した。さらに1998年になって米国の研究グループは哺乳類の *Clock* と *BMAL1* がショウジョウバエでクローニングされていた *Jrk* と *Cyc* のホモログでありこれらの二量体が *per* 遺伝子の発現を促進することを見出した。この成果はショウジョウバエと哺乳類の概日時計が基本的には相同なものであること、さらにそれまで謎であった *per* 遺伝子の発現を促進し振動を持続させるメカニズムを説明できるものであった。

一方1990年ごろ、それまで概日時計を持つとは考えられていなかった原核生物シアノバクテリアで概日リズムが報告された。これらの報告は、先入観もあってなかなか受け入れられなかったが、我々はこれに注目し、生物発光レポーターを利用し、真核生物と全く機能的に同等な概日時計がシアノバクテリアでも機能していることを示した (PNAS 1993)。この発光シアノバクテリアは一方で概日時計の最も効率のよい実験系としても高く評価された。この報告とその可能性を実証したシアノバクテリアの突然変異体の分離 (Science 1994) は、原核生物の概日時計の本格的な分子遺伝学的解析として、以下に参照する真核生物の概日時計の分子レベルでの原著論文のほとんどに引用されている)。一連の成果に基づき、我々はシアノバクテリアのモデルを1998年に報告した (Science 1998)。この報告は *kai* 遺伝子群のクローニング、その遺伝子破壊や過剰発現による無周期性の確認、転写活性の振動、発現の負のフィードバック、さらに *kaiC* 発現の促進因子の発見などをすべて含み、ショウジョウバエや哺乳類では10-20個の論文を費やしている内容を含んだ報告であり、シアノバクテリアの概日時計の理解を一挙に真核生物と同等以上に進めたものとして高く評価されている。特に Dunlap の1999年の総説では3つの時計モデル (原核生物、菌類、動物) が、異なった分子群により、類似したフィードバック構造をとっているものとして詳しく解説されている。

研究目的

シアノバクテリアの概日時計の研究はこれまでその分子遺伝学上の利点を活かし、速やかにその時計遺伝子のクローニング、振動モデルの作成を進めることが出来た。これまでの我々の研究はシアノバクテリアでは概日振動の発生が *kaiABC* 時計遺伝子のフィードバック発現制御に起因することを示唆している。しかし概日振動のプロセスを「矢印」で結んだだけでは、進化適応の所産である概日時計を理解したとは言えない。我々の仮説のようにフィードバックループが概日振動の発生原因であったとしても、その振動が安定した24時間周期となる生化学的根拠はまったく説明されていない。概日時計の特性こそがその環境適応機能の前提であつてみれば、その生化学的基礎を解明することが重要であろう。従って、戦略的基礎研究の課題は、概日時計を機能的な時計たらしめている物質的メカニズムを理解するものであり、その振動が概日時計の特性である安定した24時間の振動となることの生化学的に理解することをめざし、*kai* 遺伝子の発現制御機構、*Kai* 蛋白質の細胞内動態、*Kai* 蛋白質の生化学的性質、あるいは振動を補佐する他の要素についての解析に重点をおいた。

これらの生化学的解析により *KaiC* リン酸化の概日振動がその機能と密接に結びついていることを明らかにすることが出来た。さらに4-5年次にはこの *KaiC* リン酸化サイクルが転写・翻訳とは独立に生じ、概日振動の発生原因であることを解明することが出来た。これにより、

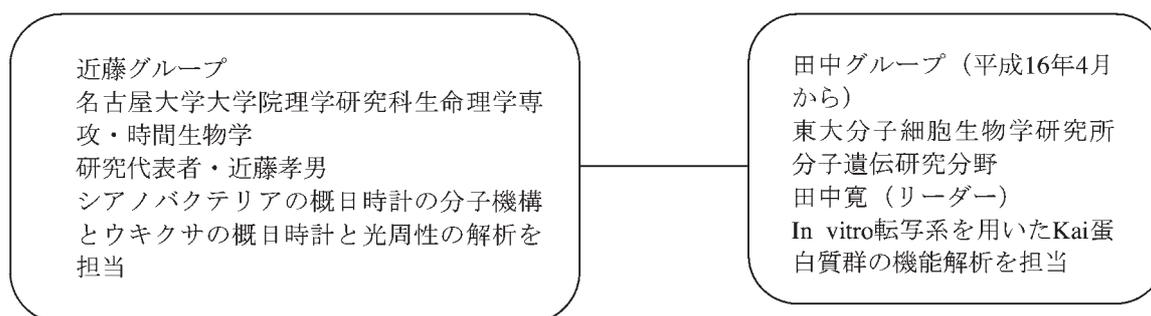
3つの Kai 蛋白質による振動メカニズムの解明や KaiC リン酸化サイクルによる遺伝子発現の制御機構の解明が今後の課題として、クローズアップされてきた。前者についてはこの解明のための新たな解析法の整備をおこない、今後の発展の基礎を固めることが出来た。後者については、*in vitro* 転写系での解析が不可欠となってきたので、これを遂行するため、田中グループの協力を得た。

一方、概日時計の植物における機能を解析するため、日長測定機構（光周性）の解析に優れているウキクサで花芽誘導関連遺伝子のクローニング、遺伝操作のための種子の作製、形質転換法開発の試みを行った。

田中グループ

H16年度に行った *in vitro* 転写系を用いた解析により、生物時計の中心振動体を構成する Kai タンパク質群は直接転写制御に関与していないことが示された。そのため、概日時計の情報を下流に伝達する因子の存在が予想された。そこで、候補として考えられる因子による遺伝子発現への影響を検討することを目的として、主にプロモーター DNA への結合実験を中心とした解析を行った。

(2) 実施体制



本研究は名古屋大学の近藤（研究代表者）チーム単独で提案され遂行され、実施された。なお、研究期間の終わりの1年半については *in vitro* 転写系での解析のため、東京大学田中チームの密接な協力を得た。

3 研究実施内容及び成果

3. 1 シアノバクテリアの概日時計の分子機構とウキクサの概日時計と光周性の解析 (名古屋大学 近藤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

我々のシアノバクテリアの概日時計の分子機構解明に向けた研究は Kai 蛋白質の生化学的機能解明に向けて行なわれた。16年度の研究は主に KaiC のリン酸化について3つの大きな成果を挙げることが出来た。すなわち、1) KaiC のリン酸化部位を大阪大学との共同研究で明らかにし、その部位の変異によりリン酸化および概日振動が完全に停止することを確認した。2)

連続暗条件下では、シアノバクテリアの時計遺伝子の発現は直ちになくなってしまうにも拘らず、時計蛋白質 KaiC のリン酸化に約 1 日周期の顕著なリズムが継続することを発見し、従来の転写・翻訳モデルを否定し、KaiC のリン酸化サイクルが生物時計の発振メカニズムあることを示した。この成果は概日時計の原理についてこれまで考えを一変する重要なものである。

3) このサイクルが 3 つの Kai 蛋白質と ATP を試験管内で混ぜれば可能であることを発見した。この構成でも、温度が変わっても時計の早さが変化しないという生物時計の最も重要な性質は失われていなかった。また周期が変わった突然変異体の蛋白質を使うと、試験管内の時計も同様に变化した。これらの事実は我々が試験管内で再構成した概日振動が実際に細胞内で機能していることを示すものである。このように 16 年度の成果は概日時計研究にとってコペルニクスの転回と言うべきもので、シアノバクテリアのみならず、ヒトをも含めた高等生物の概日時計研究にも非常に大きなインパクトを与えるものである。さらに、このシステムを物理化学的に解明すれば、生物が時間を測定する原理について最終的な解答を得ることも期待できる。

またウキクサを使った光周性計時機構の解明については一過的遺伝子導入法の確立によって重要な基礎データを蓄積した。

以下、主要な成果について解説する。

シアノバクテリアの概日時計

(1) シアノバクテリア時計関連蛋白質が形成する高次複合体

Kai 蛋白質の分布をゲル濾過法で解析し、KaiC が夜間に細胞内で大きな複合体を形成し、昼間は解離していることを明らかにした (J. Biol. Chem, 2003)。この複合体形成には 6 量体 KaiC が必要で、この複合体形成が *kaiBC* の発現調節に不可欠であることを示した (図 5、6)。

(2) KaiC 蛋白質のリン酸化リズムの発見

KaiC 蛋白質のリン酸化レベルが概日振動を示すことを見いだした (図 7)。このリン酸化部位の可能性のあるスレオニンを変化させることで概日振動が失われることから、KaiC 蛋白質のリン酸化が概日振動の重要な要因であることを示唆した (Proc. Natl. Acad. Sci 2002)。

(3) KaiA 蛋白質による KaiC 蛋白質のリン酸化

細胞内においても、試験管内でも KaiC 蛋白質のリン酸化が KaiA 蛋白質により大きく促進されることを明らかにした (図 7)。この KaiA による促進に KaiC が必要であることも示され、この 2 つの蛋白質が協同して *kaiBC* の発現を促進しており、振動持続のための正のフィードバックを起していることが示唆された。これらの生化学的な事実は *kaiA* の点突然変異と *kaiC* に見いだされたその抑制変異の解析からも裏付けられた。これらの事実をもとに KaiA と KaiC の共同によるフィードバック機構を提案した。(Proc. Natl. Acad. Sci 2002)

(4) KaiB の機能の解明

KaiC の自己脱リン酸化作用を発見し、KaiB は KaiA に拮抗的に脱リン酸化を促進することを明らかにした。また、KaiB の細胞内分布パターンに顕著な概日リズムを見出し、KaiC 蛋白質のリン酸化における 3 つの Kai 蛋白質の協働を示した (図 8) (EMBO J 2003)。この成果によりこれまで全く未知であった KaiB の機能を位置づけることができた (図 8)。

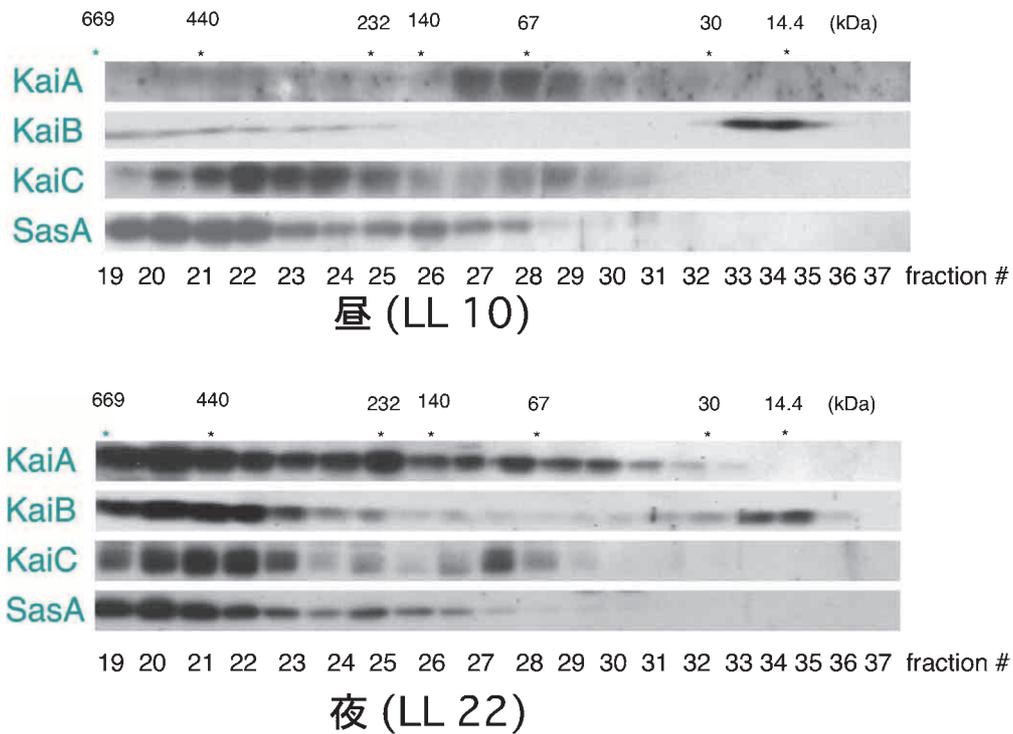


図5 シアノバクテリアの細胞抽出液のゲルろ過による解析。
Kai 蛋白質, SasA は主観的夜に 400~600 kDa の高次複合体を形成する

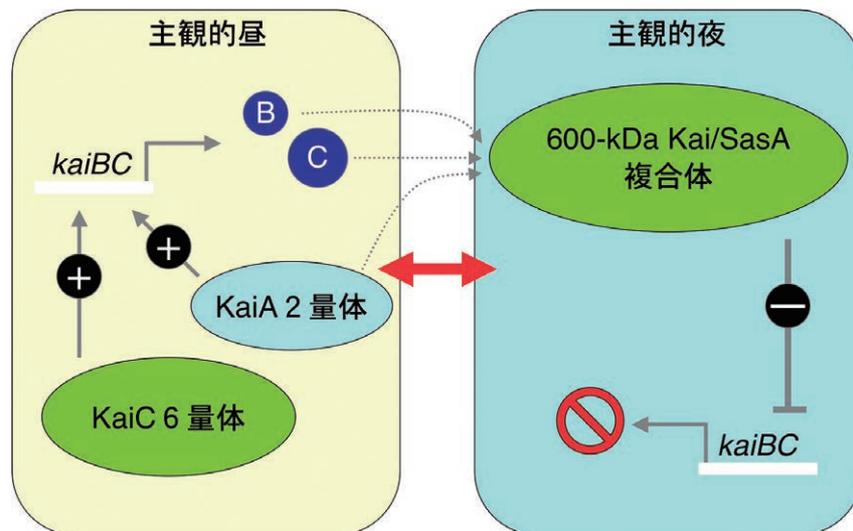


図6 Kai 蛋白質の細胞内動態。主観的昼には Kai 蛋白質は解離しており、夜には大きな複合体が形成される。この構造変化に伴い *kai* 遺伝子の発現が制御されていると想定される。詳しくは J. Biol. Chem. 278 2388-2395 参照

Regulation of KaiC phosphorylation by KaiA and KaiB

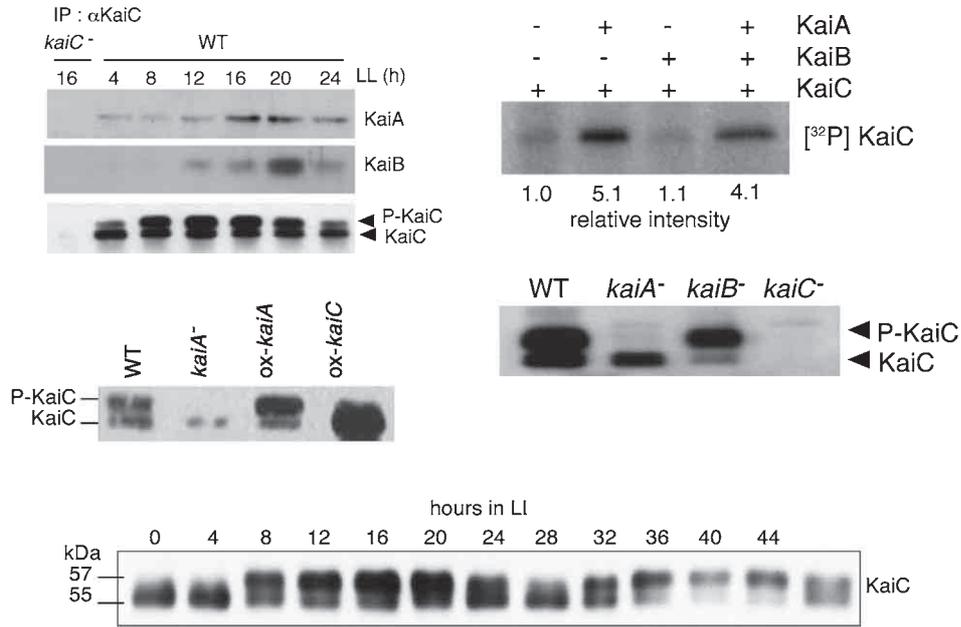


図7 KaiA 蛋白質による KaiC 蛋白質リン酸化の制御
 A; KaiC 蛋白質量とその概日リン酸化リズム。 B) フォスファターゼによるリン酸化の確認。 C) *kaiA* 欠損株における KaiC 蛋白質リン酸化の低下。 D) *kaiA* 過剰発現株における KaiC 蛋白質リン酸化の上昇。 E) *kaiA* 変異株における KaiC 蛋白質リン酸化の変化。詳しくは . PNAS 99: 15788-15793 参照

in vivo Kai protein association in a day

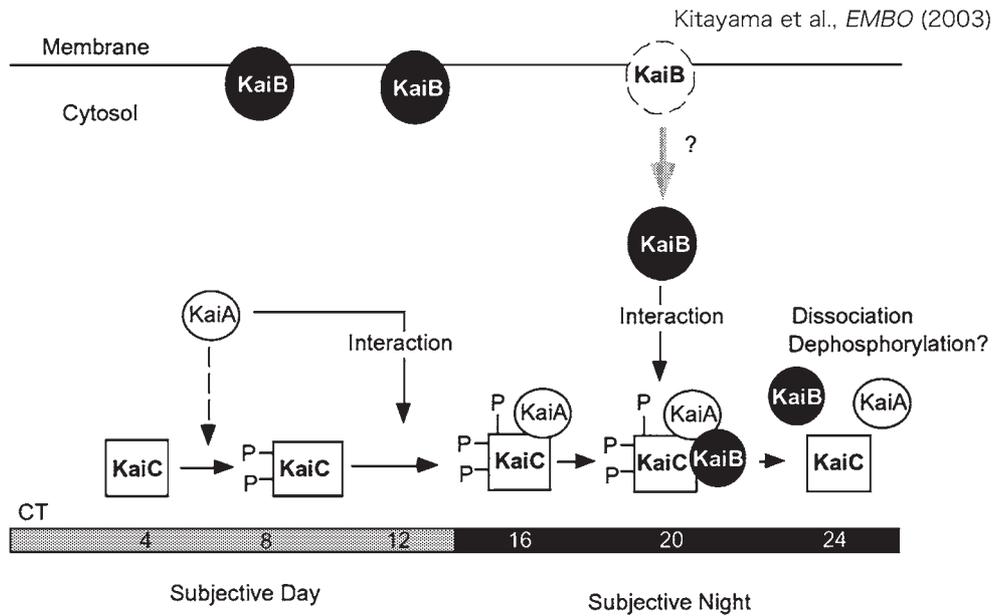


図8 3つの Kai 蛋白質による KaiC リン酸化のシナリオ。詳しくは . *EMBO J* 22.: 2127-2134

(5) KaiC 蛋白質のリン酸化部位

阪大高尾博士らの質量分析により KaiC のリン酸化部位が KaiC のリン酸化部位がセリン 431 およびそのとなりのスレオニン 432 であることが明らかとなった。これらの残基をアラニンに置換した二重変異株においては、KaiC のリン酸化が完全に消失すると同時に概日リズムも無周期となることから、リン酸化は概日振動発生に必須であると考えられる。KaiC は KaiA、KaiB および SasA と共に、大部分の遺伝子発現が最も抑制される時刻に特異的な高次複合体を形成することが知られていたが、二重変異株においては、この複合体が形成されていなかった。また KaiC はシアノバクテリアの全ての遺伝子の転写を抑制するが、二重変異型 KaiC は十分な抑制効果を示さなかった。これらの結果より KaiC のリン酸化は他の時計タンパク質との相互作用を調節することにより、KaiC の転写抑制作用を制御しているものと考えられる。

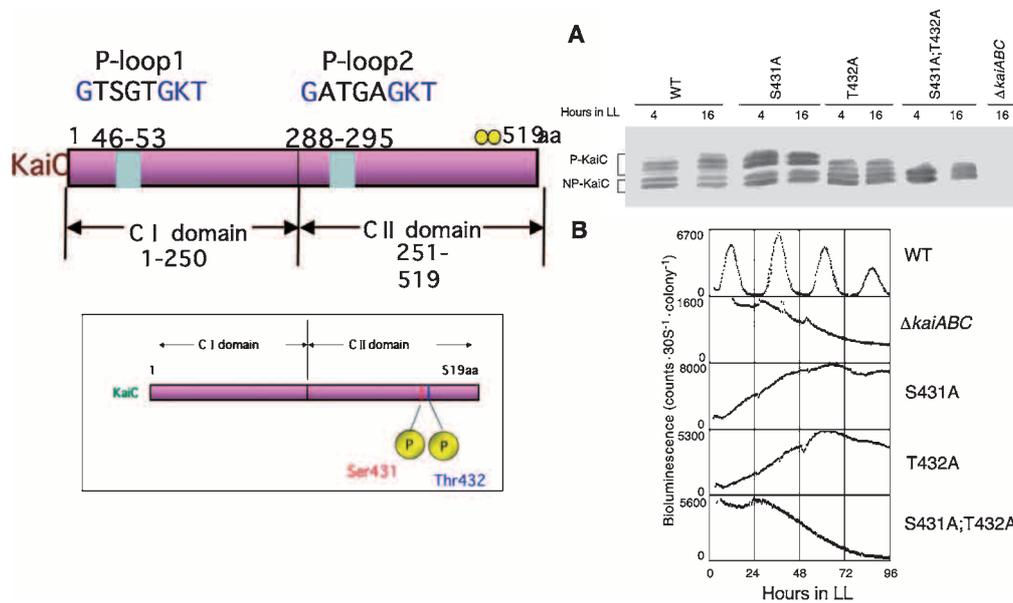


図9 KaiC のリン酸化部位

質量分析により決定されたリン酸化部位をアラニンに変更した。A:2つのリン酸化部位を変異させることでリン酸化 KaiC バンドが消失した。B: この変異によって概日リズムは完全に失われた。

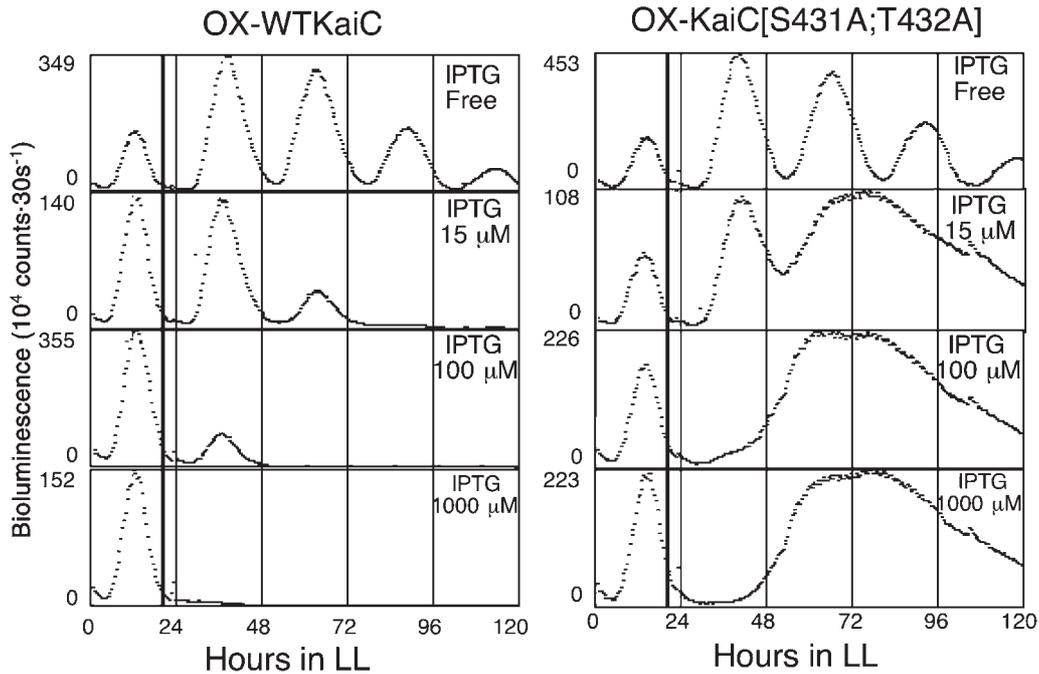


図10 リン酸化部位の突然変異体の KaiC。2つの部位を変異させるとリン酸化 KaiC は生成されない。また生物発光リズムも消失する。

(6) 遺伝子発現を伴わない KaiC 蛋白質のリン酸化リズムの発見

シネココッカスは光合成が生育に必須であるため、連続暗条件下では育成できない。連続暗条件下では代謝活性が極端に落ち、kai 時計遺伝子群の転写も全て速やかに停止するとともに、その mRNA も数時間以内に消失し、Kai 蛋白質群の合成も停止した。しかし、すでに細胞内に存在する KaiC 蛋白質は、暗条件下で安定化し、そのリン酸化リズムは、3日間以上にわたり、約1日周期で安定に継続することを見出した (図11)。

さらに KaiC 蛋白質のリン酸化リズムを詳細に検討したところ、

1) Kai 遺伝子群およびその他の遺伝子の転写翻訳の影響を完全に除くため、過剰量の転写阻害剤や翻訳阻害剤を加え、細胞内の総 mRNA 量をほぼゼロレベルにした条件下でも、KaiC のリン酸化リズムの発現は正常に維持されていた。

2) 生物時計は、温度条件に関わりなく約24時間周期で正確に振動している。これは「温度補償性」と呼ばれ、生物時計の重要な特徴の一つだが、連続暗期中の KaiC のリン酸化リズムも通常時と同じく温度補償されていた (図12)。

3) さらに、試験管内で Kai 蛋白質 KaiC の自己リン酸化・脱リン酸化の反応を調べたところ、その反応速度は温度変化に比較的影響を受けにくく、生物時計の温度補償性の鍵を担っていると考えられた。

以上の結果から、KaiC 蛋白質の自己リン酸化・脱リン酸化は、Kai 蛋白質同士の蛋白質複合体反応の中で中心的な役割を果たし、生物のなかで時間を刻む鍵を握っているものと結論した。これは従来生物時計のメカニズムとして常識とされていた転写翻訳フィードバック・モデルを覆し、時計遺伝子発現の制御を伴わなくても生物時計が動くという新しい振動機構を提案した。

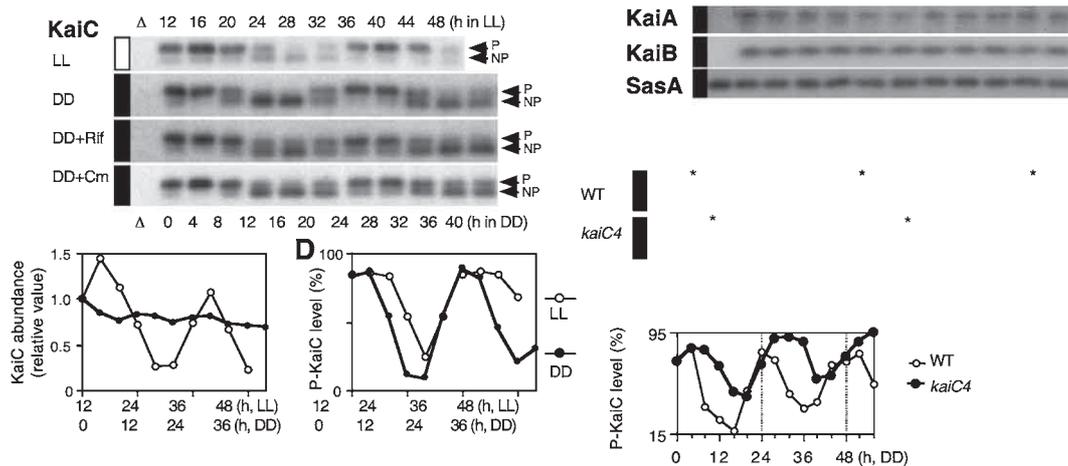


図 11 暗期中の KaiC リン酸化リズム

連続明と連続暗中でシアンバクテリア細胞内での *kai* 遺伝子発現、KaiC 量、KaiC のリン酸化の変動を示す。

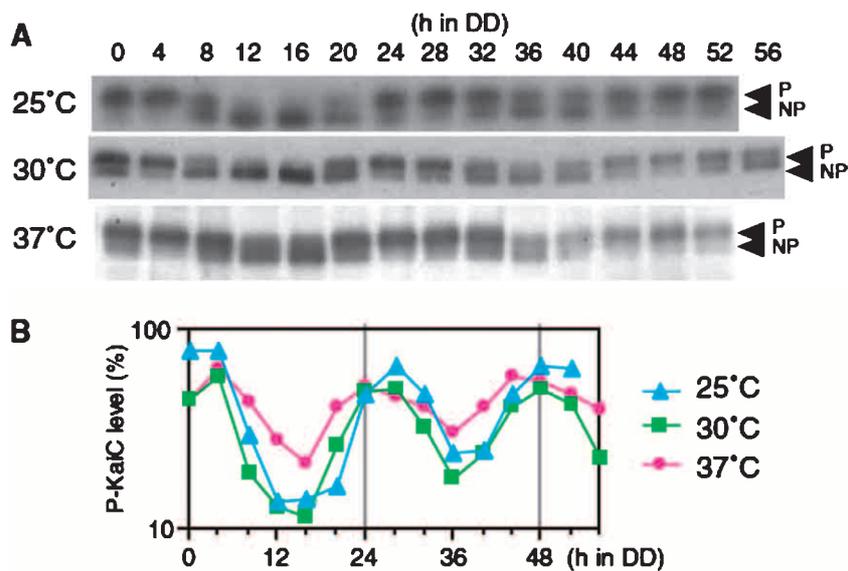


図 12 暗期中の KaiC リン酸化リズムの温度補償

(7) 試験管内での KaiC のリン酸化サイクルの再構成

どのようにして KaiC のリン酸化サイクルが成立するのか？このためには細胞内の多くの要素や細胞内の環境が不可欠で、それらの共同作業で 24 時間振動が発生すると想定するのが普通であり、我々もそのように考えていた。事実、これまで多くの生物での試みにもかかわらず、細胞外で生物時計を観測できた例は知られていない。しかし、驚くべきことに、今回我々はこのサイクルが最小限の構成で、すなわち 3 つの Kai 蛋白質と ATP を試験管内で混ぜれば、可能であることを発見した。さらにこの構成でも、温度が変わっても時計の早さが変化しないという生物時計の最も重要な性質は失われていなかった。また周期の変わった突然変異体の蛋白質を使うと、試験管内の時計も突然変異体の周期に従って変化した。これらの事実は我々が作った「試験管内での生物時計」は、実際に細胞内で機能していることを示すものである。このく

試験管内での生物時計は言うまでもなく世界初のものであり、時間を計るという複雑なメカニズムが3つの蛋白質に組み込まれていることを証明したものである。この発見は生物時計研究にとってコペルニクス的転回と言うべきもので、ヒトをも含めた高等生物の時計研究にも非常に大きなインパクトを与えるものである。

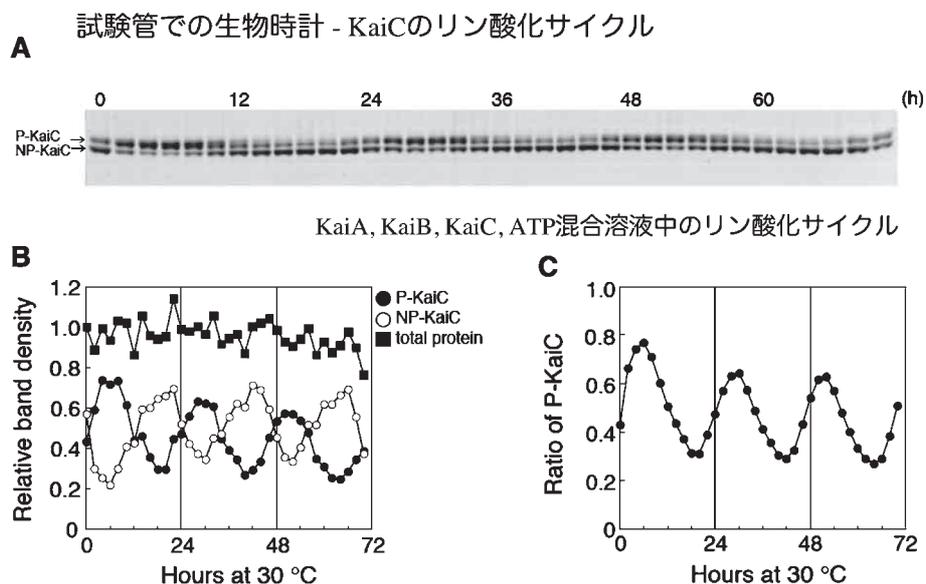


図13 試験管内での生物時計再構成。KaiC, KaiA, KaiB, ATPを混合し、2時間置きにサンプリングした。72時間にわたるKaiCのリン酸化パターンの変動。上のバンドはリン酸化KaiC

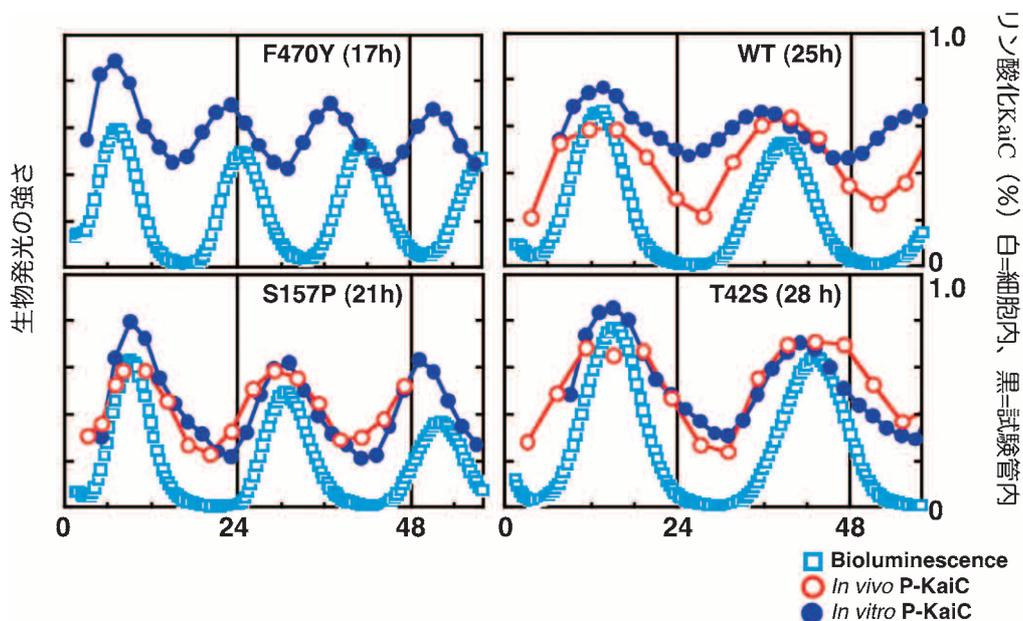


図14 KaiC突然変異体の生物発光リズムと突然変異KaiCによるin vitroリン酸化リズム

(8) KaiC 蛋白質による包括的遺伝子発現制御

プロモータートラップ法によりシアノバクテリアの遺伝子発現が高振幅型と低振幅型にわけられることを見だし、さらに、KaiC 蛋白質によるゲノム全域にわたる遺伝子発現の振動の抑制を見出した(図 15)。一方、大腸菌由来のプロモーターの制御による *kaiBC* 発現フィードバックにより概日振動を発生させることが出来た(図 16)。この 2 つの成果は KaiC 蛋白質はそのプロモーターを特異的に制御するのではなく、ゲノム全域に渡り遺伝子発現を制御することを示しており、これまでのシアノバクテリアの時計モデルに大きな変更をもたらした(図 17)。

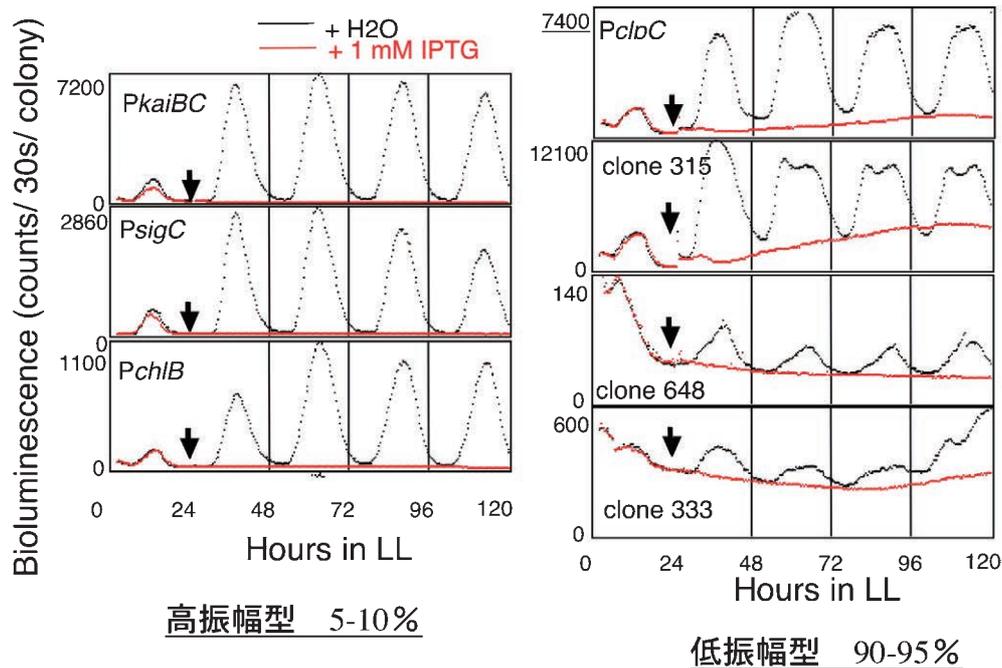
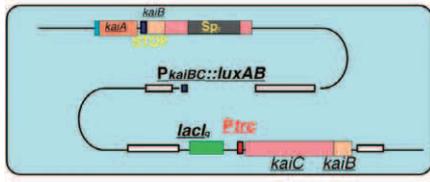


図 15 KaiC によるゲノムワイドな制御

プロモータートラップによるシアノバクテリアの様々な遺伝子発現と KaiC 蛋白質の過剰発現による抑制。黒は KaiC 蛋白質の過剰発現しないもの、赤は KaiC 蛋白質の過剰発現状態。どの遺伝子でもリズム的な部分は KaiC により完全に抑制される

$P_{kaiBC}::luxAB$ $\Delta kaiBC + P_{trc}::kaiCB$



生物発光

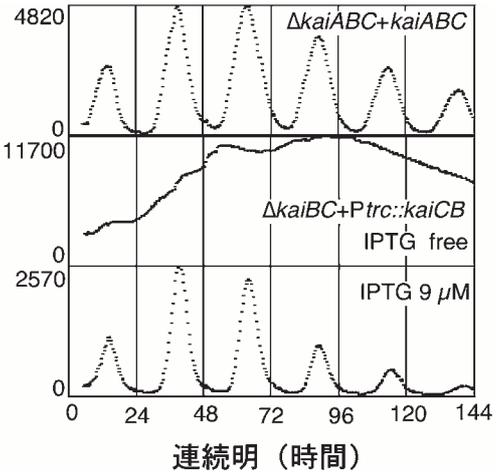


図 16 *kaiBC* 欠損株での概日振動の再構成。

kaiBC 欠損株に大腸菌の誘導プロモーター *P_{trc}* により制御された *kaiBC* を発現させる。誘導物質 IPTG を適当な濃度にするると振動が生起する。

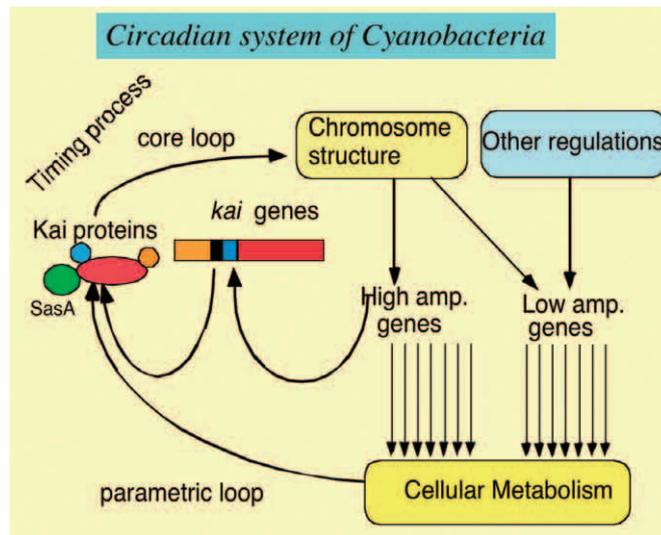


図 17 シアノバクテリアの概日時計による包括的遺伝子発現制御

(9) 二つの遺伝子発現のリアルタイムモニター法

鉄道虫のルシフェラーゼを用い、同時に二つの遺伝子の発現パターンをモニターできる二波長リアルタイムモニター系の開発に成功した (図 18)。

二波長生物発光測定系の開発

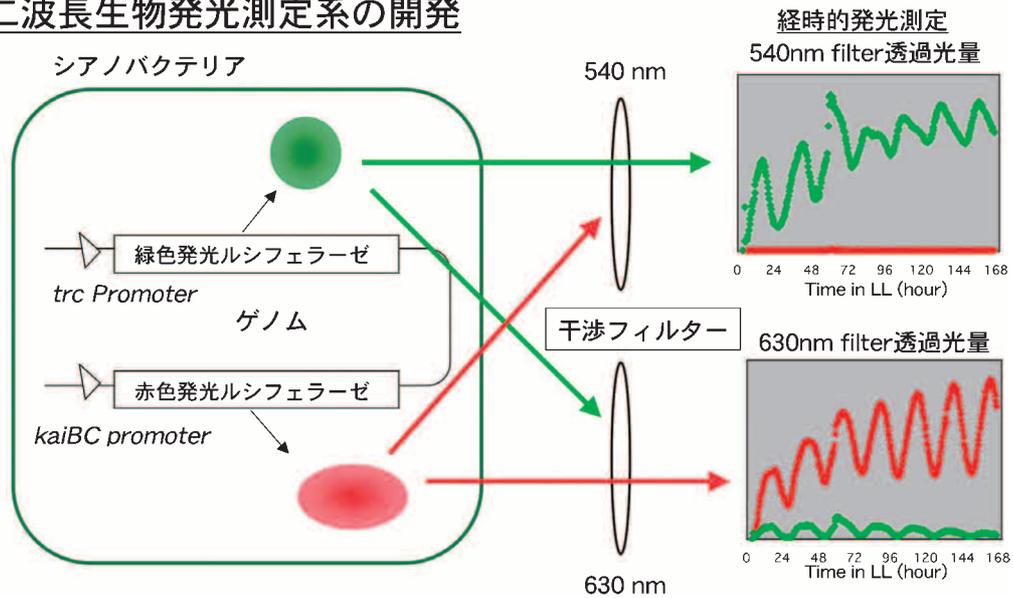


図 18 鉄道虫由来のルシフェラーゼを用いてシアノバクテリアの細胞から同時に二種類のプロモーター活性のリアルタイム測定を行った

ウキクサの概日時計と光周性

TOC1, GI, CO, FT, AG のウキクサホモログを短日ウキクサと長日ウキクサからクローニングし、その全長配列を決定した。概日時計や光周性に影響を与える日長条件下での基本的な発現様式を解析した結果、*FT, AG* 両ホモログは花芽形成のマーカー遺伝子となりうることを、*CAB* の発現リズムは概日時計の良い指標となることを明らかにした。また、*GI, TOC1* ホモログについては、アラビドプシスやイネとほぼ同じ発現リズムを示し、その発現様式は短日、長日ウキクサの違いによらなかった。一方、レポーター遺伝子を用いた詳細な発現解析を行うためにウキクサの形質転換法の確立を目指した。しかし、当初計画した形質転換については未だ安定した方法が確立されていないことは残念なことである。

そこでパーティクルガンによる遺伝子の導入をもとに解析を行った (図 19)。特に二つの遺伝子を同時導入することによって、遺伝子の発現を制御することを可能とし、この方法を使い、アラビドプシスで報告されている時計遺伝子の発現制御がウキクサ内で起こっていることを確認した。

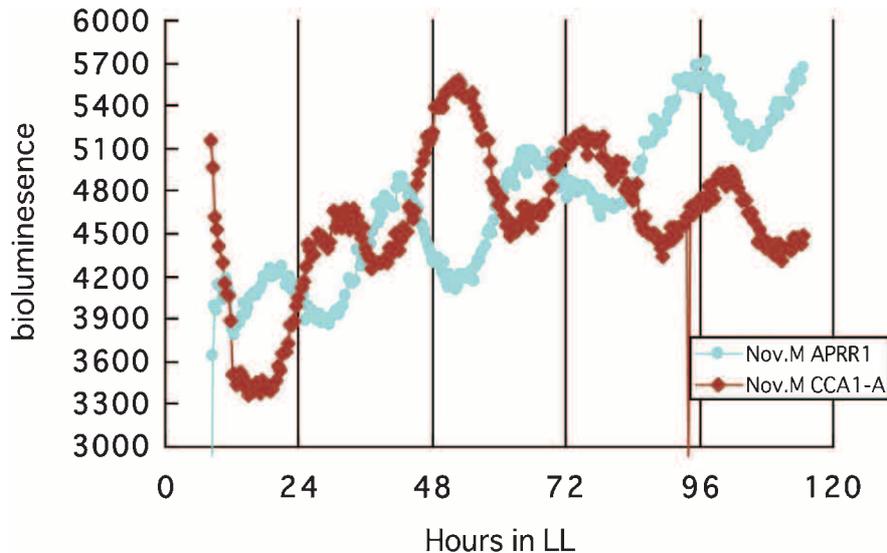


図19 パーティクルガンによるルシフェラーゼレポーターの導入。
APRR1 及び CCA1 のプロモーター領域とルシフェラーゼ (ホタル) の融合コンストラクトをパーティクルガンでウキクサに導入した。ルシフェリンを与えた培地で、導入直後から5日間発現がモニターできる。図7 鉄道虫のルシフェラーゼによる2つの遺伝子発現のリアルタイムモニター。干渉フィルターにより同一細胞からの2つの遺伝子発現が連続して測定できる

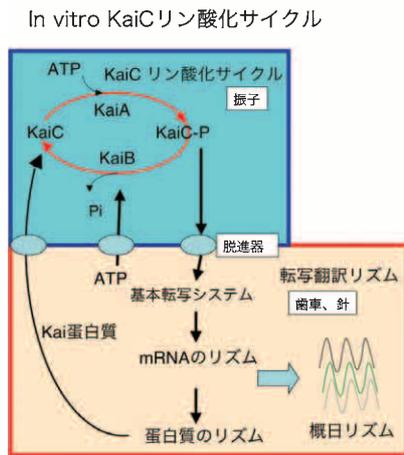
(2) 研究成果の今後期待される効果

シアノバクテリア

本プロジェクトの成果でいわば生物時計の本質は「裸」になったといえよう。我々は、機械式時計の振り子に相当するものがこの KaiC 蛋白質のリン酸化であること解明した。もちろん、振り子が本体であることが判っても、その原理（等時性）がすぐに判るわけではない。このためにはその運動を詳細に調べ、運動方程式をとかなければならない。我々はこの作業を KaiC 蛋白質のリン酸化サイクルで、既に始めているが、さらに、このシステムを構造生物学、蛋白質物理化学的方法で解析すれば、生物が時間を測定する原理について最終的な解答を得ることが期待できる。

もう一つの重要な課題は、もう一度細胞にもどり、生きた細胞のなかで KaiC 蛋白質のリン酸化がどのように遺伝子発現を制御し、生命の活動を地球の環境変化に適合させているかを解明することである。生きた細胞のなかでは KaiC 蛋白質はリズムに合成分解されており、KaiC 蛋白質のリン酸化はより動的に機能しており、生物時計の同調と長期間の安定性の向上を実現している筈である。これは機械時計で言えば、脱進器（振り子の動きを歯車に伝えると同時にゼンマイのエネルギーを振り子に与える装置）に相当するものであるが、この理解ももう一つの重要な課題である。

別の興味深い点は、シアノバクテリアで見つかった生物時計の原理がヒトも含めた高等生物の生物時計にも当てはまるかという問題である。これは現在、予想することは困難であるが、今後多くの研究者によって、検討が進むと思われる。もし当てはまれば、生物時計（体内時計）



- シアノバクテリアの概日時計
- 1 「振り子」の仕組み
KaiCリン酸化サイクルが時間を刻む。
KaiCリン酸化サイクルは試験管内で3つのKai蛋白質のみで機能する
どのような仕組みタンパク質が24時間を刻むか？
どのようにして安定な振動を実現しているのか
分子生物学、生化学的研究、数理モデルも併用
 - 2 「脱進器」の働き
KaiCリン酸化サイクルはどのように細胞内遺伝子発現を制御するか
KaiCリン酸化サイクルはどのようにリセットされているか。
分子生物学、分子遺伝学、生化学的研究、
 - 3 「歯車、針」のシステム
シアノバクテリアの概日システム
シアノバクテリアは概日時計をどのように利用しているのか
シアノバクテリアの一日を理解する。
-シアノバクテリアの時計はシステム生物学の絶好のモデル
発光レポーターによるフィードバックメカニズムの解析
システム生物学、生理学、シミュレーション、データベース
 4. ウキクサを使った光周性花芽誘導の解析
ウキクサはどのようにして長日、短日を認識しているのか、
ウキクサは最も鋭敏な光周性を示す
パーティクルガンによる遺伝子発現のモニター

図 20 この研究によって得られたシアノバクテリアの時計モデルと今後の課題

の応用に道が拓けるだろう。

さらに我々の発見は情報素子としての蛋白質の新たな機能を理解することにもつながることも重要な点である。残念ながら目で見える針は備えていないが、今回の KaiC リン酸化サイクルは、おそらく懐中時計として使える。即ちこの3つの蛋白質はごくわずかなエネルギーで時間情報を計測し蓄えることが出来る。これはこれまで全く注目されてこなかった蛋白質の新しい機能であるといえよう。この機能の解明があらたな蛋白質のナノシステムデザインへの応用の可能性を持っていることを指摘しておきたい。

ウキクサ

ウキクサの形質転換は様々な試みにも係わらず、安定した実用レベルの方法を確立できなかった。しかし、ウキクサの光周性の生理学的性質はアラビドプシスでは得られないものなので、今後はパーティクルガンによる遺伝子の導入をもとに解析を進めたい。

3. 2 In vitro 転写系を用いた Kai 蛋白質群の機能解析 (東京大学 田中グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

近藤グループのこれまでの研究により、概日時計のシグナルを下流に伝達する2成分制御系の存在が示され、シアノバクテリア 7942 株に 19 種存在するレスポンスレギュレーター (RR) 蛋白質が、転写制御に関与している可能性が示唆された。そこで、この RR 蛋白質のターゲットとなる遺伝子を探索することを目的とし、プロモーター DNA と精製 RR 蛋白質間の結合をゲルシフト解析により調べた。対象プロモーターとしては、kaiA・kaiBC といった時計の中心振動体を形成する遺伝子、シグマ因子をはじめとした転写制御因子、複製や翻訳に関わる因子、また代謝酵素や酸化還元に関わる蛋白質、さらには機能未知の因子についても検討を行った。しかしながら、その何れにおいても有効な DNA-蛋白質間の結合は認められなかった。以上の結果から2つの可能性が考えられた。まず1点目として、上記のゲルシフト解析で主要なター

ゲット候補として選んだ遺伝子の中に RR 蛋白質の本来のターゲットプロモーターが含まれていなかった可能性がある。ゲルシフト解析は DNA と蛋白質間の結合を 1 対 1 で調べる方法であり、全てのプロモーターに対して調べるのは困難である。そこで、ゲノム全体を対象としてスクリーニングを行う方法として最近開発された SELEX 法を用いて、RR 蛋白質が結合する領域の探索を進めている。またもう一つの可能性としては、大腸菌で発現させた組み換え RR 蛋白質にはプロモーター DNA への結合活性が十分になく、本来の結合活性を見落としている可能性がある。そのため、上記の *in vitro* での解析と並行して *in vivo* でのスクリーニングの必要性があると考えられた。そこで、クロマチン-免疫沈降 (ChIP) 法を利用して、シアノバクテリアの細胞内で RpaA が実際に結合しているターゲット DNA を特定することを目指して現在準備を進めている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

概日時計の振動とリズムな遺伝子発現調節との間を結ぶシグナル伝達系の解析はあと一歩でその全貌が明らかになるところまで進んだと言える。上記の *in vitro*、及び *in vivo* でのスクリーニングによりレスポンスレギュレーター蛋白質のターゲットが特定できれば、Kai 蛋白質群によって構成される中心振動体からのシグナルが転写制御に伝わるメカニズムを *in vitro* で再現できるものと期待できる。

4 研究参加者

研究グループ名：近藤グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期	備考
近藤孝男	名大院理学研究科生命理学専攻	教授	研究統括、リズム解析	12年11月～17年10月	
岩崎秀雄	名大院理学研究科生命理学専攻	助手	時計蛋白質の生化学的解析	12年11月～17年3月	
小山時隆	名大院理学研究科生命理学専攻	助手	時計遺伝子の発現解析・植物の時計	12年11月～17年10月	
大川妙子	名大院理学研究科生命理学専攻	CREST 研究員	時計蛋白質の生化学的解析	12年11月～17年10月	
片山光徳	名大院理学研究科生命理学専攻	CREST 研究員	概日時計の同調機構の解析	12年11月～13年12月	
中平洋一	名大院理学研究科生命理学専攻	CREST 研究員	時計遺伝子の発現解析	12年11月～14年3月	
寺内一姫	名大院理学研究科生命理学専攻	CREST 研究員	概日時計の同調機構の解析	14年8月～17年10月	
中嶋正人	名大院理学研究科生命理学専攻	CREST 研究員	時計遺伝子の生化学的解析	14年5月～17年10月	
Ali Azam Talukder	名大院理学研究科生命理学専攻	CREST 研究員	時計遺伝子の発現解析	13年4月～17年6月	
北山陽子	名大院理学研究科生命理学専攻	大学院生	時計蛋白質の生化学的解析	12年11月～17年10月	

富田淳	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	時計蛋白質の生化学的解析	12年11月～ 17年10月	
今井圭子	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	時計遺伝子の発現解析	13年4月～ 17年3月	
清原洋太	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	概日時計の同調機構の解析	13年4月～ 17年3月	
景山伯春	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	時計蛋白質の生化学的解析	14年4月～ 17年10月	
三輪久美子	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	植物の時計・光周性	14年4月～ 17年10月	
高井直樹	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	時計遺伝子の発現解析	15年4月～ 17年10月	
芹川雅之	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	植物の時計・光周性	16年4月～ 17年10月～	
村山依子	名大院理学研究 科生命理学専攻	大学院生	時計遺伝子の発現解析	16年4月～ 17年10月～	
近藤尚代	名大院理学研究 科生命理学専攻	CRES 技術員		15年4月～ 17年10月	
田村昌弘	名大院理学研究 科生命理学専攻	CRES 技術員		17年4月～ 17年10月	
近藤正代	名大院理学研究 科生命理学専攻	研究補助員		12年11月～ 17年10月	

田中グループ (田中 寛)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
田中 寛	東京大学分子細胞生物学研究所	助教授	シアノバクテリア試験管内転写系の構築	16年4月～ 17年10月	
華岡光正	東京大学分子細胞生物学研究所	CREST 研究員	シアノバクテリア試験管内転写系の構築	16年4月～ 17年10月	
小山内崇	東京大学分子細胞生物学研究所	大学院生	シアノバクテリア試験管内転写系の構築	16年4月～ 17年10月	

5 成果発表等

(1) 論文発表 (国内 13 件、海外 24 件)

Original papers

Nishiwaki T, Iwasaki, H., Ishiura, M. and T. Kondo: Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. (2000) 97: 495-499.

Iwasaki, H., Williams SB, Kitayama Y, Ishiura, M., Golden SS and T. Kondo: A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell* 101: 223-233 (2000)

Schmitz, O, M Katayama, S. B. Williams, T. Kondo, S. S. Golden. CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science* 289: 765-768 (2000)

Taniguchi Y, Yamaguchi A, Hijikata A, Iwasaki H, Kamagata K, Ishiura M, Go M and Kondo T: Two KaiA-binding domains of cyanobacterial circadian clock protein KaiC, *FEBS Lett.* 496: 86-90, (2001)

Nishimura H, Nakahira Y, Imai K, Tsuruhara A, Kondo H, Hayashi H, Hirai M, Saito H, and Kondo T. Mutations in KaiA, a clock protein, extend the period of circadian rhythm of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Microbiology* (2002), 148, 2903–2909

Iwasaki, H., T. Nishiwaki, Y. Kitayama, M Nakajima and T. Kondo. KaiA-Stimulated KaiC Phosphorylation in Circadian Timing Loops in Cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 15788-15793 (2002)

Kageyama H, T. Kondo and H. Iwasaki Circadian Formation of Clock Protein Complexes by KaiA, KaiB, KaiC and SasA in Cyanobacteria *J. Biol. Chem.* 278 2388-2395 (2003)

Kitayama Y., H. Iwasaki, T. Nishiwaki and T. Kondo. KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J* Vol. 22, 2127-2134, (2003)

Katayama M, Kondo T, Xiong J, Golden SS. (2003) IdpA encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependent modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* 185:1415-22

Imai K, Nishiwaki T, Kondo T, Iwasaki H. Circadian Rhythms in Protein Synthesis and Degradation of a Master Clock Protein KaiC in Cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 279:36534-9, 2004

Nishiwaki T, Satomi Y, Nakajima M, Lee C, Kiyohara R, Kageyama H, Kitayama Y, Temamoto M, Yamaguchi A, Hijikata A, Go M, Iwasaki H, Takao T. and T. Kondo. Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 13927-32 (2004)

Nakahira Y, Katayama M, Miyashita H, Kutsuna S, Hideo Iwasaki H, Oyama T, Kondo T. Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004) 101:881-5.

Kitayama Y., Kondo T., Nakahira Y., Nishimura H., Ohmiya Y., Oyama T. (2004) An in vivo dual-reporter system of cyanobacteria using two railroad warm luciferases with different color emissions.

Plant Cell Physiol., 45:109-113

Nakamichi N, Ito S, Oyama T, Yamashino T, Kondo T and Mizuno T. Characterization of plant circadian rhythms by employing Arabidopsis cultured cells with bioluminescence reporters. Plant Cell Physiol. 45: 57-67 (2004)

Tomita, J, Nakajima M, Kondo T and Iwasaki H. No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. Science 307: 251-254 (2005)

Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, Oyama T and Takao Kondo. Reconstitution of Circadian Oscillation of Cyanobacterial KaiC Phosphorylation in vitro. Science 308, 414-5 (2005)

Kiyohara, Y.B., Katayama, M., and T. Kondo. A Novel Mutation in kaiC Affects Resetting of the Cyanobacterial Circadian Clock. J. Bacteriol. 187: 2559-2564 (2005)

Kutsuna S, Nakahira Y, Katayama M, Ishiura M and Kondo T. Transcriptional regulation of the circadian clock operon *kaiBC* by upstream regions in cyanobacteria. Mol. Microbiol. (2005) 57:1474-1484 (2005)

Reviews

Kondo T. and Ishiura M. Circadian clock of cyanobacteria. BioEssays (2000) 22:10-15

Iwasaki H, Kondo T. (2000) The current state and problems of circadian clock studies in cyanobacteria. Plant Cell Physiol. 41: 1013-1020

Iwasaki H, Kondo T. (2000) The current state and problems of circadian clock studies in cyanobacteria. Plant Cell Physiol. 41: 1013-1020

Iwasaki H, Kondo T. (2002) "Histidine kinases in the cyanobacterial circadian system" Histidine Kinases (Eds. M. Inouye and R. Dutta), Academic Press

Kondo T. (2002) Molecular Basis for Circadian Oscillation in Cyanobacteria. In Circadian organization Eds K. Honma and S. Honma, Hokkaido Univ. Press

近藤孝男 (2002) 植物にとっての昼と夜—生物時計について 「植物が未来を拓く」 67-90 ページ 共立出版

近藤孝男 (2002) 概日時計による生命活動の統合 数理科学 468 : 19-24

岩崎秀雄 (2002) シアノバクテリアの概日リズムの発振機構について 日本時間生物学会誌 8 (1): 5-10

岩崎秀雄 (2003) シアノバクテリアの概日リズム制御機構研究の新展開 細胞工学 22: 1309-1314

岩崎秀雄 (2003) 時を刻むバクテリア 「生命誌 2003 愛づるの話」(中村桂子 編) 72-75 ページ, JT 生命誌研究館

岩崎秀雄 (2004) シアノバクテリアの時計研究の舞台裏 時間生物学 10: 3-11

小山時隆 (2004) 『高等植物』、岡村均・深田吉孝編『時計遺伝子の分子生物学』15-27 ページシュプリンガー・フェアラーク東京株式会社

近藤孝男 (2004) 『シアノバクテリア』、岡村均・深田吉孝編『時計遺伝子の分子生物学』1-14 ページシュプリンガー・フェアラーク東京株式会社

上田泰己・近藤孝男 序: 動的で複雑な生命現象のシステム生物学 細胞工学 Vol 22, No.12, 1306-1308 (2003) 岩崎秀雄 (2004) 「シアノバクテリアの生物時計研究の舞台裏」時間生物学 10: 3-11

北山陽子 (2004) 「シアノバクテリア概日時計タンパク質 KaiA, KiaB, KaiC の解析」時間生物学 Vol.10, No.2 総説

小山時隆、近藤孝男 『レポーター遺伝子による解析・6-1-1 ルシフェラーゼ』、島本功・岡田清孝・田畑哲之監修『モデル植物の実験プロトコール』秀潤社 (2005年3月出版)

Iwasaki H, Kondo T. Circadian timing mechanism in the prokaryotic clock system of cyanobacteria. J. Biol. Rhythms 19: 436-444 (2004)

近藤孝男 Kai「私が名付けた遺伝子」実験医学 23: No13, 2017-22 (2005)

近藤孝男 KaiC のリン酸化サイクルが刻むシアノバクテリアの概日時間 実験医学 23: No13, 2017-22 (2005)

(2) 口頭発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演 (国内 15 件、海外 12 件)

岩崎秀雄, 近藤孝男, シアノバクテリアの概日時計機構: 時計蛋白質間の遺伝学的・生化学的クロストーク日本生化学会 (シンポジウム「時計遺伝子研究の新たなる展開」) 横浜 2000年10月

岩崎秀雄 二成分情報伝達系と概日時計: シアノバクテリアの振動安定化因子としてのヒスチジンキナーゼ, SasA 日本分子生物学会 (ワークショップ「植物における His-Asp リン酸化リレーの展開」), 2000年12月, 神戸

Hideo Iwasaki and Takao Kondo, US/Japan Conference on Molecular Chronobiology, Kyoto, Japan, Cooperative functions of KaiA and KaiC clock proteins in cyanobacterial circadian feedback process, December, 2000

Hideo Iwasaki, Takeshi Mizuno and Takao Kondo, SasR, a possible response regulator for the circadian amplifier SasA, is essential for cell growth in cyanobacteria. Keystone Symposia “Molecular Clocks” , Tahoe City, USA, March, 2001

Takao Kondo Molecular basis for circadian oscillation in cyanobacteria. Keystone Symposia “Molecular Clocks” , Tahoe City, USA, March, 2001

Mitsunori Katayama, Jun Tomita, Yota Kiyohara and Takao Kondo Molecular analysis of circadian oscillator and light input pathways in cyanobacteria. VII th cyanobacterial workshop, Montrey, USA, August 30, 2001.

Hideo Iwasaki, Yoichi Nakahira, Mitsunori Katayama and Takao Kondo Re-examination of the Kai-based circadian feedback process in cyanobacteria. International Symposium on Molecular Clock Awaji-Kobe 2001, Kobe, Japan, September 29, 2001.

Takao Kondo Molecular basis for circadian oscillator of cyanobacteria. Japan-Germany Binational Seminar Functional Genomics of Cyanobacteria-Impact to Plant Biology, Okazaki, Japan, October 6-10, 2001.

岩崎秀雄, 中平洋一, 片山光徳, 近藤孝男 「シアノバクテリアにおける kai 時計遺伝子作用モデルの再検討」 日本時間生物学会 (ワークショップ「生物リズムの理論的基礎と多様性」), 2001 年 11 月, 山口

岩崎秀雄 「シアノバクテリアの Kai 時計蛋白質の生化学的解析」
シンポジウム「生体時計の分子機構」, 2002 年 2 月, 神戸

岩崎秀雄 「生物時計の謎：分子達の織りなすフィードバック・ループ」
生化学若手の会夏の学校, 2002 年 8 月, 神戸

大川 (西脇) 妙子、岩崎秀雄、Ali Azam Talukder、北山陽子、富田淳、今井圭子、景山伯春、近藤孝男 シアノバクテリアの概日時計機構：Kai タンパク質の生化学的解析 第 75 回日本生化学会大会 京都 2002 年 10 月 15 日

Takao Kondo. Genome-wide circadian system of cyanobacteria driven by feedback loop by Kai proteins 日本分子生物学会年会 横浜 2002 年 12 月 11 日 -14 日

岩崎秀雄・近藤孝男 生物発光レポーターを用いたシアノバクテリアの概日システムの解析 日本分子生物学会年会 横浜 2002 年 12 月 11 日 -14 日

Takao Kondo Discussion leader. Gordon Research Conference, Chronobiology, Barga Italy, May 11-17, 2003

近藤孝男 シアノバクテリアの概日時計 日本睡眠学会 2003年6月12日 名古屋

岩崎秀雄「シアノバクテリアの概日リズムの解析」第41回日本生物物理学会シンポジウム「生物リズムの時空間ダイナミクス」2003年9月, 新潟

岩崎秀雄「シアノバクテリアの生物時計システムの分子基盤」第18回生体・生理工学シンポジウム, 2003年10月, 新潟

Takao Kondo: Circadian system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 第11国際原核光合成生物シンポジウム 東京 2003年8月24日-29日

近藤孝男 「シアノバクテリアの一日」高遠シンポジウム 2004年8月12日高遠

岩崎秀雄・富田淳・中嶋正人・近藤孝男「転写・翻訳に依存しない概日振動現象の発見」日本時間生物学会, 2004年11月

岩崎秀雄「バクテリアの生物時計モデルにおける転写・翻訳の役割について」日本生物物理学会シンポジウム, 2004年12月

Takao Kondo: Circadian System of cyanobacteria, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 the 58th Yamada Conference Light sensing and signal transduction in plant photomorphogenesis Okazaki 2004年6月6日-9日

近藤孝男 KaiC phosphorylation cycle as the pacemaker of cyanobacterial circadian clock. 韓国光化学・光生物学会 12回 2005年6月9日 大田・韓国

Takao Kondo KaiC phosphorylation cycle as the pacemaker of cyanobacterial circadian clock The 3rd Japan-Germany Joint Seminar June 5-10, 2005 Tomiura, Japan

近藤孝男 KaiC phosphorylation cycle as the pacemaker of cyanobacterial circadian clock 日本数理生物学会 15回大会 2005年9月 横浜

Takao Kondo KaiC Phosphorylation Cycle *In Vitro* as the Pacemaker of the Cyanobacterial Circadian Clock” Gordon Research Conference Chronobiology July 31 - August 5, 2005, Salve Regina University, Newport, RI

②ポスター発表、口頭発表 (国内30件、海外17件)

Nishiwaki T. et al US/Japan Conference on Molecular Chronobiology, Kyoto, Japan, Circadiana

rhythms in abundance and phosphorylation of the Kai clock proteins of cyanobacteria December, 2000

Katayama M. et. al. US/Japan Conference on Molecular Chronobiology, Kyoto, Japan, Analysis of photic input pathways in the cyanobacterial circadian system December, 2000

Hideo Iwasaki, Takeshi Mizuno and Takao Kondo Keystone Symposia “Molecular Clocks”, Tahoe City, USA, SasR, a possible response regulator for the circadian amplifier SasA, is essential for cell growth in cyanobacteria. March, 2001

竹内しのぶ、小山時隆、近藤孝男 シアノバクテリアの kaiAkaiC 二重突然変異体を用いた概日時計周期決定機構の解析 植物生理学会 岡山 2001年3月28日-30日

今井圭子、中平洋一、岩崎秀雄、西脇妙子、近藤孝男 多数の KaiC 変異体によるシアノバクテリアの概日振動発生機構の解析 植物生理学会 岡山 2001年3月28日

中平洋一、片山光徳、岩崎秀雄、近藤孝男 シアノバクテリア kai 時計遺伝子の転写制御 日本植物生理学会 2002 年年会 岡山 2002年3月28日

Jun Tomita, Mitsunori Katayama, Yota Kiyohara and Takao Kondo Analysis of Photic Resetting Mechanism of Circadian Clock in Cyanobacteria. International Symposium on Molecular Clock Awaji-Kobe 2001, Kobe, Japan, September 29, 2001.

Yohko Kitayama, Hakuto Kageyama, Taeko Nishiwaki, Hideo Iwasaki, Takao Kondo Biochemical properties of circadian clock proteins, KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. International Symposium on Molecular Clock Awaji-Kobe 2001, Kobe, Japan, September 29-October 1, 2001.

Yoichi Nakahira, Mitsunori Katayama, Hideo Iwasaki and Takao Kondo Transcriptional regulation of the kaiABC clock genes in cyanobacteria. International Symposium on Molecular Clock Awaji-Kobe 2001, Kobe, Japan, September 30, 2001.

景山伯春、岩崎秀雄、近藤孝男 ゲル濾過クロマトグラフィーによるシアノバクテリア時計蛋白質複合体の解析 日本生化学会 京都 2001年10月28日

岩崎秀雄、中平洋一、片山光徳、近藤孝男 シアノバクテリアにおける kai 時計遺伝子作用モデルの再検討 日本時間生物学会 山口 2001年11月14日

清原洋太、片山光徳、富田淳、近藤孝男 シアノバクテリア概日時計の光入力に影響を与える kaiC 突然変異体の解析 日本時間生物学会 山口 2001年11月14日

今井圭子、中平洋一、近藤孝男 多数の KaiC 変異体によるシアノバクテリアの概日振動発生機構の解析 日本時間生物学会 山口 2001年11月14日

北山陽子、西脇妙子、近藤孝男 シアノバクテリアの時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC の細胞内における局在について 分子生物学会 横浜 2001年12月9日-12日

中平洋一、片山光徳、岩崎秀雄、近藤孝男 シアノバクテリアの概日時計遺伝子 kaiABC の転写制御 第24回日本分子生物学会年会 横浜 2001年12月10日

Keiko Imai, Taeko Nishiwaki, Hideo Iwasaki and Takao Kondo Circadian Change in the Rate of KaiC Protein Synthesis in the Cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Society for Research on Biological Rhythms, Jacksonville, USA, May 22-26, 2002

Yoko Kitayama, Taeko Nishiwaki, Hideo Iwasaki and Takao Kondo Intracellular Concentrations, Subcellular Localization and Cellular Distribution of Clock Components in cyanobacteria: 1. Society for Research on Biological Rhythms, Jacksonville, USA, May 22-26, 2002

Ali Azam Talukder and Takao Kondo Intracellular Concentration, Subcellular Localization and Cellular Distribution of Clock Components in cyanobacteria: 2. Society for Research on Biological Rhythms, Jacksonville, USA, May 22-26, 2002

Yota Kiyohara, Mitsunori Katayama, Jun Tomita and Takao Kondo Analysis on Photic Input Pathways of the Cyanobacterial Circadian System Using Brief Light Pulses. Society for Research on Biological Rhythms, Jacksonville, USA, May 22-26, 2002

三輪久美子、小山時隆、近藤孝男 光周期的花芽誘導に関連した遺伝子のウキクサホモログの単離と発現解析 シロイヌナズナワークショップ2002 千葉 2002年10月10-11日

景山伯春、近藤孝男、岩崎秀雄：シアノバクテリアにおける時計蛋白質複合体の性質と形成制御 第75回日本生化学会大会 京都 2002年10月15-17日

片山光徳、中平洋一、近藤孝男 KaiC による包括的遺伝子発現制御とシアノバクテリアの概日システム 日本時間生物学会 名古屋 2002年11月14日-15日

小山時隆、三輪久美子、近藤孝男 ウキクサの光周性を分子レベルで再検討する試み 日本時間生物学会 名古屋 2002年11月14日-15日

木藤良沢、近藤孝男、岩崎秀雄 シアノバクテリアの概日リズム関連ヒスチジンキナーゼ群の解析 日本時間生物学会 名古屋 2002年11月14日-15日

大川（西脇）妙子、手間本実央子、山口晶大、岩崎秀雄、郷通子、近藤孝男 シアノバクテリア時計タンパク質 KaiC のリン酸化 第9回日本時間生物学会名古屋大会 名古屋 2002年11月15日

景山伯春、近藤孝男、岩崎秀雄：シアノバクテリア時計蛋白質複合体の細胞内における動態

第9回日本時間生物学会 名古屋 2002年11月14日

木藤良沢、近藤孝男、岩崎秀雄 DNAマイクロアレイを用いたシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の振動安定化因子 SasA の解析 日本分子生物学会年会 横浜 2002年12月11日-14日

三輪久美子、小山時隆、近藤孝男 光周的花芽誘導に関連した遺伝子のウキクサホモログの単離と発現解析 日本分子生物学会大25回年会 横浜 2002年12月11-14日

北山陽子、西脇妙子、岩崎秀雄、近藤孝男 シアノバクテリアの時計蛋白質 KaiC のリン酸化制御機構 日本分子生物学会／横浜 2002.12.11-14

竹内しのぶ、小山時隆、近藤孝男 シアノバクテリアの *kaiABC* 二重突然変異体を用いた概日時計の周期決定機構の解析 日本分子生物学会年会 横浜 2002年12月11日-14日

Jun Tomita and Takao Kondo Phase-Dependent Response of the Clock Protein KaiC to the Dark Pulse in Cyanobacteria ドイツ生化学および分子生物学会「生物のリズム：概日時計の分子機構」 2003年3月 モスバッハ, ドイツ

北山陽子、小山時隆、中平洋一、Vadim Viviane, 近江谷克裕、近藤孝男 鉄道虫ルシフェラーゼを用いた二波長測定系による概日遺伝子発現の解析 日本植物生理学会／大阪 : 2003. 3.27-29

伊藤友一、三輪久美子、近藤孝男、小山時隆 光周性・概日時計関連遺伝子 TOC1/APRR1 ファミリーの長日性ウキクサと短日性ウキクサからのホモログ単離とその発現解析 日本植物生理学会／大阪 : 2003. 3.27-29

Jun Tomita, Yota Kiyohara and Takao Kondo Analysis of Light-Resetting Mechanism of the Circadian Clock in Cyanobacteria. 第11国際原核光合成生物シンポジウム 東京 2003年8月24日-29日

Taeko Nishiwaki, Reiko Kiyohara, Mioko Temamoto, Hideo Iwasaki and Takao Kondo. Investigation for the Role of KaiC Phosphorylation in Circadian Clock System of *Synechococcus Elongatus* PCC7942 第11国際原核光合成生物シンポジウム 東京 2003年8月24日-29日

Kazuki Terauchi, Mitsunori Katayama, Yuichi Fujita and Takao Kondo Circadian Rhythm of the Facultative Filamentous Cyanobacterium *Plectonema boryanum* 第11国際原核光合成生物シンポジウム 東京 2003年8月24日-29日

小山時隆、三輪久美子、芹川雅之、近藤孝男 ウキクサの概日時計と光周性から分かる植物の時間と光環境変化の結びつき 第26回日本分子生物学会年会 神戸 2003年12月10日-13日

北山陽子、岩崎秀雄、小山時隆、近藤孝男 シアノバクテリアの概日時計システムの解析
日本分子生物学会年会 神戸 2003年12月10-13日

Yohko Kitayama, Takao Kondo, Yoshihiro Ohmiya, Tokitaka Oyama Real time monitoring of circadian gene expression of cyanobacteria by dual-reporter system with rail-road worm luciferases.
1st world congress of chronobiology, Sapporo, 2004年9月

岩崎秀雄・小山時隆・近藤孝男「シアノバクテリアの概日時計のシステム解析に向けて」第4回ランソウ研究会, 2003年12月, 岡崎

岩崎秀雄「シアノバクテリアの概日時計システムの解析」基生研研究会, 2004年2月

岩崎秀雄「転写翻訳フィードバックに依存しないサーカディアン振動現象の発見」JST 領域探索プログラム研究会『制御生物学の可能性を探る』, 新横浜, 2005年1月

岩崎秀雄「シアノバクテリアの概日リズムに関する二成分制御系因子群」二成分制御系研究会, 東京, 2005年3月

小山時隆、三輪久美子、芹川雅之、近藤孝男：ウキクサの概日時計と光周性から分かる植物の時間と光環境変化の結びつき シンポジウム（植物と光：光受容体と情報伝達の分子基盤）日本分子生物学会年会（神戸、ポートアイランド）2003年12月12日

小山時隆、三輪久美子、芹川雅之、近藤孝男 Conserved expression profiles of circadian clock-related genes between two Lemna plants showing long-day- and short-day photoperiodic flowering responses. Society for Research on Biological Rhythms (Whistler, British Columbia, Canada) 2004年6月24日

J. Tomita, H. Iwasaki and T. Kondo: Responses of KaiC Protein and kaiBC mRNA to a Phase-shifting Dark Pulse in Cyanobacteria. 9th Meeting of Society for Research on Biological Rhythms, Whistler, British Columbia, Canada, June, 2004

富田淳、岩崎秀雄、近藤孝男：シアノバクテリアの時計タンパク質 KaiC の暗パルスに対する応答性。第27回 日本分子生物学会年会、神戸、2004年12月

(3) 特許出願

①国内出願 (5 件)

発明の名称：発光観測装置、発光体選別装置、及び発光体の選別方法

発明者：近藤孝男

出願人：科学技術振興事業団

出願日：2001年4月11日

出願番号：特願 2001-113216

発明の名称：バクテリア自動サンプリング装置

発明者：近藤孝男

出願人：科学技術振興事業団

出願日：2003年4月10日

出願番号：特願 2003-125946

発明の名称：生細胞を用いた外部刺激に対する影響評価システム

発明者：近藤孝男

出願人：科学技術振興事業団

出願日：2004年3月30日

出願番号：特願 2004-097852

発明の名称：生細胞を用いた外部刺激の影響評価方法およびその方法を行うためのキット、
並びに外部刺激に対する影響評価キット

発明者：近藤孝男

出願人：科学技術振興事業団

出願日：2004年8月27日

出願番号：PCT/JP2004/012403

発明の名称：タンパク質による時間測定およびその記憶装置

発明者：近藤孝男

出願人：科学技術振興事業団

出願日：2005年10月14日

出願番号：特願 2005-

(4) 受賞等

岩崎秀雄 第17回井上研究奨励賞 2001年2月2日

「藍色細菌の概日時計蛋白質の同定およびその機能解析」

岩崎秀雄 日本時間生物学会学術奨励賞 2003年9月11日

近藤孝男 中日文化賞 平成 17 年 5 月 31 日

新聞報道

1. 平成 16 年 11 月 19 日掲載 日本経済新聞、「体内時計、仕組み解明」
2. 平成 16 年 11 月 19 日掲載 日刊工業新聞、「体内時計遺伝子、1 日周期でリズム刻む」
3. 平成 16 年 11 月 19 日掲載 読売新聞、「たんぱく質、深く関与」
4. 平成 16 年 11 月 19 日掲載 中日新聞、「生物時計の指揮者発見」
5. 平成 16 年 11 月 19 日掲載 東京新聞 (1 面)、「体内時計、タンパク質が本体」
6. 平成 17 年 4 月 15 日掲載 中日新聞、「生物時計、試験管内で再現」
7. 平成 17 年 4 月 15 日掲載 毎日新聞、「体内時計、試験管で作れた」
8. 平成 17 年 4 月 15 日掲載 日本経済新聞、「体内時計を再現」
9. 平成 17 年 4 月 15 日掲載 朝日新聞、「試験管で生物時計」
10. 平成 17 年 5 月 16 日掲載、産経新聞「生物時計、3 つの蛋白質、振り子役、時刻む」
11. 平成 17 年 4 月 15 日掲載 日刊工業新聞 (1 面)、「試験管内で生物時計」
12. 平成 17 年 7 月 7 日発行、JST-News 誌 Vol2, No.2, (p 12-13)、「生物時計の仕組みが見えてきた」
13. 平成 17 年 7 月 7 日発行、Newton, (p 12-13)、「世界初、試験管で出来た生物時計」

③その他

(5) その他特記事項

なし

6 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2002 年 3 月 22 日	Workshop on cyanobacterial circadian clock	Vanderbilt Univ. Nashville, Tennessee, USA	10 名	シアノバクテリアの概日時計共同研究の打ち合わせ
2003 年 9 月 9 日	Symposium: Circadian Systems in Photosynthetic Organisms (JSC and CREST-JST symposium)	札幌	100 人程度	第一回時間生物学世界大会で国際シンポジウムを開催
2003 年 12 月 11 日 -14 日	概日システム	神戸	150 名	分子生物学会 26 回大会で国際シンポジウムを開催

(2) 招聘した研究者等

招聘

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
C. H. Johnson (Vanderbilt University, Professor)	Symposium 講演のため	北海道大学	2003年9月7日から11日まで
C. R. McClung (Dartmouth College, Professore)	Symposium 講演のため	北海道大学	2003年9月7日から11日まで
David E. Somers, (Ohio State University, Associate Prof.)	Symposium 講演のため および研究打ち合わせ	北海道大学 名古屋大学	2003年9月7日から13日まで
Natalia Ivleva 博士 Postdoctoral Fellow, Dept. of Biology, Texas A&M University	CikA の発現解析の共同研究	名古屋大学	2004年1月26日～2月9日

7 結び

自己評価

このプロジェクトではシアノバクテリアの概日時計の分子機構の解明とウキクサの光周性の解析を計画した。シアノバクテリアの計画は転写翻訳モデルに捕らわれず、概日時計の生理学的特質の理解を目標にした。解析は見かけの効率がよいと思われる分子生物学的方法では本質に迫ることは出来ないと考え、生化学的方法を中心とした。このため、地道な研究基盤の整備に時間と取ったが、幸い概日時計の本質が KaiC のリン酸化サイクルにあることを解明できたのは予期した以上の成果であったと考えている。また KaiC による包括的遺伝子発現制御の発見もシステムとして概日時計を解析する道を開いたものだと考えている。

上記の *in vitro* の KaiC のリン酸化サイクル実験系の確立は今後、概日時計機構を解明する大きな転換点であり、様々な方法を駆使し、生命の時間測定の原理の解明に向けて道を開いたといえよう。我々は他の研究室が蛋白質の立体構造の解明をおこなうなか、現象から乖離することを嫌いあえてこれを避けてきたが、今後はこれも含め、数理的な方法も導入し、解析を続けていきたい。また KaiC のリン酸化サイクル実験系生命科学のみならず、蛋白質の化学としても新たな可能生を持っていることも指摘しておきたい。

ウキクサの解析についても多くの光周性遺伝子を単離することが出来たが、光周性の詳細な解析は今後の課題である。形質転換についてもまだ実用的なレベルに達していないが多くの蓄積をしておき、今後の解析に利用することが出来るであろう。

植物の研究領域

戦略的創造研究で植物の研究領域が設定された意義を高く評価している。植物の解析は地球環境が重視される現在、極めて重要であり、今後も継続されることを希望している。なお、概日時計の研究分野では現在は圧倒的に動物の研究が中心であるが、植物の概日時計の研究の意義を主張するため、これらの学会等でシンポジウムを企画し、動物分野の研究者と植物の研究者の相互交流を図ってきた。

プロジェクトの規模、

私は、研究は基本的には研究代表者の研究室を中心として行なわれるものであり、研究支援についてもこれを基本とするべきであると考えている。従って多くの有力研究室が共同して行う形は必ずしも、最前のもと考えていない。CRESTにおいてこのような形のプロジェクトが採択されたことは有り難いことだと考えている。

秋田のサテライトラボ

我々にとって秋田のサテライトラボの企画は大変貴重なものであり、多くのサンプルを効率良く解析していただいたことに感謝している。