

藍色細菌の概日時計

岩崎秀雄, 石浦正寛, 近藤孝男
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

1. はじめに
 2. 窒素固定型藍色細菌の生物時計～Huangらの研究を中心として
 3. 生物発光を利用した藍色細菌の実験系の開発
 4. プロモータートラップ法による遺伝子発現リズムの解析
 5. 藍色細菌の生物時計遺伝子群の同定
 6. 入力系の解析
 7. 出力系の解析
 8. 細胞分裂周期との関わり
 9. 概日時計の進化
 10. おわりに
- 付. 関連する総説の紹介

1. はじめに

概日リズムを生じる生物時計の分子機構を明らかにするためには、分子遺伝学的手法によって生物時計の構成因子を特定し、解析していくことが有効である。既にショウジョウバエやアカパンカビを用いた分子遺伝学的な研究により3つの時計遺伝子が同定され、多くの成果が得られている。しかし生物時計の分子機構を包括的に理解するためには、より能率のよい実験系を用いた系統的な時計遺伝子の解析が必要であろう。そのためには出来るだけ遺伝子操作が容易で単純な生物を用い、多くの個体(クローン)のリズムを同時に自動測定できる系を開発しなくてはならない。生物時計の存在が知られる最も単純な生物は原核生物の藍色細菌(シアノバクテリア)である。筆者らは藍色細菌にルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、生物時計の運行を生物発光リズムとして自動測定することを可能にした。また寒天培地上の

多数のコロニーのリズム測定法を開発し、多数の生物時計変異体を得た。さらに時計変異体の野生型ゲノムライブラリーの導入による遺伝的相補により、3つの新規時計遺伝子をクローニングすることに成功し、現在その解析を進めている。この総説では筆者らによる分子遺伝学的解析を中心に、藍色細菌の概日リズム研究全般について出来るだけ網羅的に紹介する。

2. 窒素固定型藍色細菌の概日リズム～Huangらの研究を中心として

藍色細菌は原核生物の主要グループのひとつであり、細胞質中に光合成の明反応の場となるチラコイドをもち、酸素発生の光合成を行う。機能的にも構造的にも植物の葉緑体とよく対応することから、共生説においては葉緑体の系統的な起源と考えられている(65)。また、始原藍色細菌は35億年ほど前に地球上に現れ、大気中の酸素を発生させたと考えられる。従来、概日リズムは真核生物に特有の機能であり、原核生物には存在しないと考えられてきた。たとえば1970年代に藍色細菌でも概日リズムを見つけようとする試みがなされたが、成功を見なかった(91)。しかし十年ほど前から、いくつかの藍色細菌において概日リズムが報告されるようになった。

最初の報告は、単細胞性藍色細菌の窒素固定活性のリズムであった(25, 71)。窒素固定はいくつかの原核生物にのみ見られる機能であり、大気中の分子状窒素をアンモニアに還元するプロセスである。窒素固定反応を触媒する窒素固定酵素は酸素に高い感受性を示し、酸素により容易かつ不可逆的に破壊される。光合成に依存する藍色細菌の中にも窒素固定するも

のがあり、光合成によって生じる酸素から窒素固定系を守るためのいくつかの戦略を進化の過程で獲得してきた(5, 20)。たとえば糸状(多細胞性)藍色細菌の中には異型細胞(ヘテロシスト)と呼ばれる特殊な細胞を分化させ、窒素固定酵素活性をこの細胞でのみ発現させるものがある。異型細胞は光合成系 II を欠き、厚い細胞壁を発達させることで外部からの酸素侵入を防いでおり、光合成と窒素固定の空間的な分業を可能にしている。しかし単細胞性の窒素固定型藍色細菌ではこうした細胞分化は不可能であり、二つの代謝系の両立は大きな謎であった(20)。1980年代になると、単細胞性藍色細菌あるいは異型細胞を分化させずに窒素固定を行う糸状藍色細菌のいくつかの系統で、その窒素固定活性が LD サイクルの暗期にのみ高くなるとの報告が相次いだ(たとえば文献 76, 87, 88)。これらの発見によって窒素固定系の働く時期を時間的に光合成を行う時期から分離するとの見解が注目されるようになった。しかしこうした知見は明暗サイクル条件下で得られたものであり、概日リズムによる制御として考えられてはいなかった。

1986年になって二つのグループが、連続明条件下でも窒素固定型の単細胞性藍色細菌において窒素固定活性リズムが持続することを発表した。そのうち、Mitsui らは海産性の *Synechococcus* sp. Miami 43511 および 43522 という系統を用い、光合成による酸素発生、呼吸による酸素取り込み、窒素固定酵素活性、細胞分裂周期、炭水化物合成のリズムを示した(71)。しかし彼らも概日リズムによる制御を考慮せず、細胞分裂が約 24 時間ごとにおこることから、細胞分裂周期が光合成と窒素固定を時間的に分離する機構であると結論し、それ以降もこの観点に沿って研究を展開した。この結論については、後述するように細胞分裂周期と概日時計の関係という観点から再考の余地がある。

一方、台湾の Huang らは淡水性の *Synechococcus* sp. RF-1 という系統(30)を暗期にさらさずに連続明条件下で培養しても窒素固定リズムは検出されないが、LD 条件に移すと暗期にピークをもつ窒素固定活性リズムが出現し、さらに連続明条件下でもこのリズムが継続することを見出した(25)。彼らは、この現象が概日時計の光による同調とそれに続く恒常条件下でのリズムの継続であると正しく認識した。また、1989年には Sweeney と Borgese が海産の単細胞性藍色細菌 *Synechococcus* sp. WH7803(窒素固定は行わない)において温度補償性を伴う 24 時間周期の細胞分裂リズムが存在することを報告している(90)。

こうした知見は真核生物にのみ概日リズムが存在するとの当時の定説をくつがえすものであり、それゆえに藍色細菌の概日時計の存在を疑問視する見解も根強く残った(たとえば文献 47)。しかし Huang らは *Synechococcus* sp. RF-1 を用いて精力的に解析を行い、既に 20 篇におよぶ報告(10, 11, 13-16, 24-27, 29-39)で概日時計の存在を明らかにしてきた。*Synechococcus* sp. RF-1 の窒素固定活性リズムは 22~33°C の範囲で温度補償されており(38)、主に転写レベルで制御されていることが強く示唆されている(32, 34)。窒素固定活性自体にはカルシウムイオンが必要であるが(12)、mRNA 量のリズムには必要ないらしい(32)。また、この系統では少なくとも 8 種類のアミノ酸の取り込みにも概日リズムが見られる(10)。このリズムは窒素固定活性リズムとは逆の位相関係にあり、21~37°C の範囲で温度補償されている。さらに、0°C 6 時間の低温パルスによる大まかな位相反応曲線も報告されている(10)。複数の蛋白質の合成速度にも概日リズムがあり(29)、最近そのうちのひとつ(COP23 と命名)のアミノ酸配列およびコード遺伝子の塩基配列が明らかにされた(11)。これら *Synechococcus* sp. RF-1 のリズムは明暗サイクルだけでなく低温/

高温サイクルによっても位相のリセットを受ける(37, 29)。また、光合成活性の概日リズムを示唆する報告もある(82)。一方、海産の単細胞性藍色細菌 *Cyanothece* sp. ATCC 51142 では、窒素固定活性、光合成活性(炭水化物合成量)に加え、電子顕微鏡による観察から炭水化物を多く含む細胞内顆粒の形成にも概日リズムが見られることが報告されている(85)。さらに、Roenneberg らは別種の高産の単細胞性藍色細菌 *Trichodesmium thiebautii* で光合成活性(酸素放出)の概日リズムを報告している(81)。

このように藍色細菌の様々な系統で生物時計が存在することが確認されてきたが、これらの系統では遺伝子操作を援用することは出来ない。それどころか培養や寒天培地上でのコロニー形成といった基本的な取り扱い自体が著しく困難なものも含まれている。ゲノムサイズの小さい原核生物を用いて分子遺伝学的解析を行う利点は、システムが単純であるとともに、寒天培地上の多数のコロニーをスクリーニングすることで容易にミュータントを得られることにある。生物時計の分子遺伝学的な解析を行う場合には、膨大な数の個体(クローン)のリズムを再現性よく自動測定することが必要となる。しかし1993年に筆者らが発光レポーターを用いた系(後述)を開発するまでは、藍色細菌におけるリズムの測定はいずれも煩雑で、大量のサンプルを処理したり、安定した結果を得ることは非常に困難であった。それにも関わらず、1993年に Huang らは *Synechococcus* sp. RF-1 の生物時計変異体の分離に成功している(39)。彼らはニトロソグアニジン処理した細胞のコロニー一つ一つを窒素を含まない液体培地に移植し、恒明条件下および明暗サイクル条件下での生育速度について野生型と比較した。生育速度の遅くなったクローンの窒素固定活性リズムおよびアミノ酸取り込みリズムを測定し、4つの突然変異体を報告した。うち二つ(M-17, M-32)は恒明条件下で窒素固定リズムが消失す

るが、アミノ酸の取り込みのリズムは正常である。残りの二つ(CR-1, CR-2)は窒素固定活性、アミノ酸取り込みともに無周期であった(39)。また、顕著な蛋白質合成リズムも見られない(Huang, 未発表;文献 35 に引用)。*Synechococcus* sp. RF-1 の無周期型突然変異体の分離は確かに先駆的な成果であった。しかし前述の理由(遺伝子操作が適用できない、リズム測定が煩雑)から、それに続く本格的な分子遺伝学的解析や緻密な生理学的解析を行うことは困難であり、突然変異体を十分に活かして生物時計の分子機構の核心に迫ることは今のところ期待できそうにない。また、彼らの変異体の分離法では生育速度を指標とする一次スクリーニングを行うため、生育に影響しないような時計の変異体を得ることは出来ない。

3. 生物発光を利用した藍色細菌の実験系

藍色細菌ではいくつかの系統で容易に高度な遺伝子操作(形質転換、遺伝子破壊など)を適用することができる(92)。そこで筆者らはこれらの藍色細菌を用いて生物時計の分子遺伝学的解析に適した実験系の構築を試みた。もし藍色細菌に普遍的に生物時計が見られるなら、窒素固定をしない系統においても何らかの生理活性に概日リズムを観察できる可能性がある。前述の非窒素固定型の *Synechococcus* sp. WH7803 で見られた細胞分裂リズム(90)はその唯一の例であったが、この系統でも遺伝子操作は適用できない。筆者らは単細胞性藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC 7942 という系統を用いて遺伝子操作により概日時計の運行をモニターする系を構築することにした。この系統は淡水産の桿菌で窒素固定を行わない。ゲノムサイズは2.7 Mb で大腸菌のそれよりも小さく、遺伝子の数は約3,000程度であろうと推定されている(44)。自然に外来のDNAを取り込む性質があり(naturally transformable)、さらに

大腸菌との接合を利用すればより高い効率での形質転換が可能である。また、高頻度で相同的遺伝子組替えがおこるため、染色体上の特定の座位への遺伝子ターゲティング、遺伝子の置換や破壊が容易で、すでに分子遺伝学的解析の材料として広く用いられている(92)。

概日リズムの突然変異体を網羅的に分離するためには、出来るだけ容易にリズムが測定出来ることが必須条件である。そのための最も理想的なリズムのマーカーとして生物発光が考えられた。高感度の光検出システムを用いれば、容易に発光を長時間連続的に自動測定することが可能だからである。しかも高い精度で再現性よく測定することが出来るため、緻密な生理学的解析も可能である。単細胞性渦鞭毛藻 *Gonyaulax* の生物発光リズムが概日時計研究に果たしてきた重要な貢献を見てもそのことは明らかだろう(43, 75)。折しも 90 年代初頭は、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いて、*in vivo* で特定の遺伝子発現をモニタリングしようとする試みが本格化しつつある時期であった。Wolk らは発光細菌のルシフェラーゼ遺伝子 *lux* をレポーターとして用いることで、窒素固定型糸状藍色細菌 *Anabaena* の窒素固定遺伝子の異型細胞特異的発現をモニターすることに成功した(19, 96, 97)。一方、Kay らは、概日時計に制御されるクロロフィル結合蛋白質遺伝子 *cab* のプロモーター領域の下流にホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子 *luc* を連結することで、発光リズムを示すシロイヌナズナ *Arabidopsis* の形質転換体を作製した(67)。

筆者らは、発光細菌 *Vibrio harveyi* のルシフェラーゼ遺伝子 *luxAB* の翻訳領域の上流に、*Synechococcus* sp. PCC 7942 の *psbAI* 遺伝子プロモーター領域を連結した。*psbAI* 遺伝子は、光合成系 II (PSII) の中核蛋白質 D1 をコードし、藍色細菌内で非常に強く発現する(58)。作製したレポーター融合遺伝子は、相同的遺伝子組替えによって薬剤耐性マーカーとともに

藍色細菌染色体上の特定のターゲティング部位 (neutral site I) に挿入された(54)。neutral site は外来の DNA 断片を挿入しても挿入自体の影響が見られないゲノム上の座位である。*luxAB* 遺伝子にコードされるルシフェラーゼは還元型フラビンモノスクレオチド (FMN_{H₂})、長鎖のアルデヒド(デカナール)および酸素を基質とする反応を触媒し、490 nm の生物発光を示す。脂溶性のデカナールは揮発性でもあり、気相を介して容易に細胞膜を透過する。したがって培養容器中にデカナールを充満させれば、単純な拡散によって常に一定レベルの基質を細胞内に供給することができる。作製した形質転換体 (AMC149 と命名) を明暗サイクル (LD) 条件下で培養したのち、連続明 (LL) に移した。デカナール供給条件下で培養液の生物発光を光電子倍增管を用いて連続測定したところ、10 日にわたって約 24 時間周期の顕著な生物発光リズムを確認することが出来た(54)。発光強度は夜明けの位相(主観的昼のはじめ)に最小、黄昏の位相(主観的昼のおわり)に最大となる。このリズムは 4 時間の暗パルス投与により、時期特異的な位相変位をきたす。また、25°C、30°C、36°C の各温度条件下での測定結果から、発光リズムの周期の温度補償性も確認された(54)。

AMC149 のリズムは本当に *psbAI* 遺伝子の発現リズムを反映しているのだろうか。たとえばルシフェラーゼの基質となる藍色細菌細胞内の酸素や還元型 FMN の量が光合成リズムに伴って概日変動している可能性も考えられよう。しかし *psbAI* 遺伝子の mRNA 量(54, 59)、*luxAB* 遺伝子の mRNA 量、ルシフェラーゼ蛋白質量は全て発光リズムと同様の概日リズムを示した(59)。このことから AMC149 の発光リズムは第一義的に *psbAI* の発現リズムを正確に反映するものと結論できた。この発光レポーターを利用したリズムモニタリング法は *Synechococcus* sp. PCC 7942 だけでなく、他

の形質転換の可能な藍色細菌にも適用することが出来る。すでに筆者らは球状の *Synechocystis* sp. PCC 6803 (2) や、糸状で窒素固定型の *Anabaena* sp. PCC 7120 において成功している。なお、*Synechocystis* sp. PCC 6803 は昨年ゲノムの全塩基配列が発表された系統である(45)。

続いて筆者らは、多数のクローンの時計表現型をスクリーニングするために、寒天培地上の各コロニーの発光リズムを同時測定できる系を構築した。AMC149 は低ノイズの冷却 CCD カメラで測定可能な発光強度をもつ。そこでデカナールの投与法を改良したうえで、高感度の冷却 CCD カメラによって寒天培地上の各コロニーからの生物発光リズムを測定することに成功した。コロニーの発光リズムの周期は液体培養のそれと同じであり、持続性や再現性はむしろ優れていた(50)。続いて冷却 CCD カメラ、試料交換装置、制御コンピューターからなる多プレート生物発光測定装置を作製した。試料交換制御、検出器の制御、データの取り込みと解析のためのソフトウェアは独自に開発した。これにより 12 枚のシャーレを順次自動的に連続撮影することが出来る。1 枚のシャーレあたり 1,000 個程度のコロニーを解析できるため、同時に 12,000 におよぶコロニーの概日リズムの自動測定が可能となった(55)。

4. プロモータートラップ法による遺伝子発現リズムの解析

筆者らが構築した系は *psbAI* 遺伝子の発現リズムを生物発光リズムとしてとらえるものであった。では、藍色細菌ではどの程度の遺伝子の発現が概日時計によって制御されているのだろうか。多くの真核生物では、80 年代後半から生物時計に制御される遺伝子が相次いで報告されている(たとえば文献 4, 6, 63, 77, 95)。前述の窒素固定型の *Synechococcus* sp. RF-1 でも同調後 LL 条件下でいくつかの遺伝子の

mRNA 量に概日リズムが見られる。窒素固定酵素の二つのサブユニットの一つをコードする *nifK* は主観的夜に発現する(32)。これは夜間特異的な窒素固定酵素活性をよく説明する。また Chow と Tabita は、もう一つの窒素固定酵素サブユニットをコードする *nifH* と炭酸固定酵素 RuBisCO をコードする *rbcSL* オペロンが LD 条件下ではそれぞれ暗期、明期特異的に発現するのに対し、LL 条件下ではともに主観的夜のはじめに発現のピークがあると報告している(16)。ただし、この報告の LL での結果には再現性に問題があるのではないと思われる。また、最近 Huang らは *Synechococcus* sp. RF-1 の機能未知の膜結合蛋白質をコードする遺伝子 *cop23* の発現リズムを報告したが(11)、その位相関係は *nifK* mRNA のリズムと異なり、*Synechococcus* sp. PCC 7942 の *psbAI* 遺伝子のもと同じであった。しかし特定の生物で生物時計による遺伝子発現の制御がどの程度一般的なものであるのかを調べることは従来まったく不可能なことであった。筆者らは、藍色細菌の高い相同組替え率、ゲノムサイズの小ささ、さらに前述の多プレート生物発光測定装置による発光パターンのスクリーニングを利用して、いわゆるプロモータートラップによって概日時計に制御される遺伝子群の包括的解析を試みた。

まず *Synechococcus* sp. PCC 7942 のゲノム DNA のランダムな断片をルシフェラーゼ遺伝子翻訳領域の上流に連結した融合遺伝子ライブラリーを作製し、藍色細菌のゲノムに挿入した。形質転換体の多くは発光を示さないが、プロモーター領域を含む断片を挿入されたクローンはその活性強度に応じて生物発光を示す。冷却 CCD カメラシステムを用いてこのような発光クローンをまず約 800 コロニー分離し、その発光パターンを調べてみると、驚いたことにそのすべてに概日リズムが見られた(62)。*Synechococcus* sp. PCC 7942 では予想外に多

くの遺伝子が生物時計に制御されていることとなる。発光リズムの位相関係を調べてみると、多数が AMC149 と同じ位相だった。*psbAI* と同じく光合成系 II の D1 蛋白質をコードするが光誘導性の異なる *psbAII* 遺伝子、グルタミン合成酵素をコードし光誘導性を欠く *glnA* 遺伝子、リズムを示さないであろうと期待して試した rRNA 遺伝子 *rrnA* のいずれもが、*psbAI* と同様のプロモーター活性を持っていることも明らかになった(62)。しかし 10-20%のクローンは AMC149 とは異なる位相関係の発光リズムを示した。たとえば AMC287 と命名したクローンは AMC149 とはちょうど逆位相のリズムを示す。このクローンでは、レポーター遺伝子の上流に、プリン合成系の遺伝子 *purF* のプロモーター領域が挿入されていた(61, 62)。*purF* 遺伝子の mRNA 量が概日リズムを示し、*psbAI* 遺伝子 mRNA のそれと逆位相関係にあることも確認された(61)。*purF* 遺伝子のすぐ上流には同じくプリン合成系の別の酵素をコードする *purL* 遺伝子が位置している。この二つの遺伝子は多くのほかの細菌ではオペロンを形成し共転写される。しかし *Synechococcus* sp. PCC 7942 では別個のプロモーターによって制御され、*purL* は(*purF* とは異なり)*psbAI* と同じ位相の発現リズムを示す(61)。最近、筆者らは *Synechocystis* sp. PCC 6803 でも同様のプロモータートラップを用いて位相関係の異なる複数の遺伝子群を同定した(青木ら, 1995 年植物学会年会)。

遺伝子のプロモーター活性に概日リズムが見られても、必ずしもその mRNA 量、コード蛋白質量や活性のリズムに反映されるとは限らない。概日時計以外によるなんらかの制御、それぞれの mRNA の安定性や転写後修飾、蛋白質の合成速度、安定性や修飾などが考えられるからだ。実際、前述のように rRNA をコードする *rrnA* 遺伝子のプロモーター活性には顕著な概日リズムが見られるが(62)、mRNA 量はサーカ

ディアン時間を通じてそれほど変化しない(23)。*Synechococcus* sp. PCC 7942 では概日時計が大多数の遺伝子のプロモーターを制御する。その中には細胞内での産物の振動に直接反映されるものもあろうし、一方では機能に応じて細胞内での産物レベルを一定に保つ遺伝子群もあるのだろう。

藍色細菌以外ではプロモータートラップをもちいた詳細な生物時計制御遺伝子群の探索は行われていない。最近 Kay らはホタルルシフェラーゼ遺伝子を CMV(カリフラワー・モザイクウイルス)35S プロモーターに連結して形質転換した *Arabidopsis* の生物発光に弱い概日リズムが見られる、と報告した(9)。また、緑藻 *Chlamydomonas* においても光合成系の遺伝子だけでなく、チトクローム *c* やチューブリンをコードする遺伝子の発現までが概日時計に支配されていることも明らかになった(41; Jacobshagen および Johnson, 私信)。したがって真核生物でも概日時計による転写制御が予想以上に一般的な可能性もある。

5. 藍色細菌の生物時計遺伝子群の同定と解析

リズムを駆動する概日時計は入力系を通じて環境刺激によるリセットを受け、環境変動と同調した細胞内の生理学的振動を確保し、出力系に時刻情報を伝えると考えられる。前述した藍色細菌の多くの遺伝子発現リズムは、概日時計からの出力を反映するものであろう。筆者らの最大の目的は概日時計の構成因子を同定し、その解析を通じてリズム発生の分子機構を明らかにすることにある。そこで、まず生物時計の変異体を得るため、AMC149 を変異源 EMS (ethyl methanesulfonate)で処理し、約 500,000 クローン(コロニー)の細胞を多プレート生物発光測定装置を用いてスクリーニングした。その結果今までに約 100 クローンにのぼる発光リズム変異体を分離することに成功している(55;

近藤ら, 未発表)。これらの変異は 16 時間周期から 60 時間におよぶ様々な周期の変異, 無周周期型, 低振幅型, 位相変化型, 波形の歪みなどあらゆるタイプの時計異常表現型を含み, 従来ほかの生物で得られていた時計の変異体に比べて遥かに多様であった。またこれらの変異形質は極めて安定しており, また生育も野生型と殆ど変わらない。

続いて, 筆者らは遺伝子相補に基づく周期突然変異の原因遺伝子のクローニングを試みた。このため新たに作製したターゲティング用ベクターとランダムな野生型藍色細菌のゲノム DNA 断片を用いてライブラリーを構築し, 複数の時計突然変異体を形質転換した。この際野生型の遺伝子断片は neutral site II と呼ばれる特定の領域に部位特異的に挿入され, 本来の遺伝子座は破壊されない。各突然変異体に関して約 15,000 クローンライブラリー挿入細胞をスクリーニングしたところ, 野生型と同様の発光リズムを示すクローンが複数分離された。そして最終的に相異なる 4 つの長周期型変異体 (*p30*, *p38*, *p48*, *LP60*; 文献 55) の各相補クローンから, 挿入されたそれぞれの遺伝子断片をプラスミドレスキュー法によって大腸菌に回収することに成功した。これらの各 DNA 断片は, 多様な表現型を示す複数の生物時計変異体を相補することが出来る。そこでサザンブロット解析や制限地図の作製を行ったところ, これら 4 つの断片が藍色細菌ゲノム上の同一の遺伝子座位に由来することが明らかとなった。さらに, 今まで得られている生物時計変異体からランダムに 50 クローン選んでこの領域 (*p48* 領域) を含むゲノム断片を遺伝子移入したところ, 殆どすべてが相補されることがわかった。続いて欠失クローンを用いた相補活性領域の限定と周辺領域の塩基配列決定を並行して行った結果, 生物時計の発現に大きく影響することが推察される領域にはオペロンを構成すると思われる 3 つの隣接したオープンリーディング・フレー

ム (ORF) *D*, *E*, *F* (仮称) が見つかった。実際, 今までに 40 クローンにのぼる生物時計変異体のマッピングを試みたが, そのすべてがその 3 つの ORF 上に落ちていた。とりわけ *F* 遺伝子上には短周期型, 長周期型, 無周周期型などあらゆる変化をもたらす生物時計変異がマッピングされた。また *F* 遺伝子を破壊した株やこれらの遺伝子を過剰発現させた株では概日性リズムが消失した (Ishiura, Aoki, Kutsuna, Andersson, Iwasaki et al., 投稿準備中)。したがって, 得られた 3 つの遺伝子が生物時計の発現に密接に関与していることは明らかである。これらの遺伝子は相異なる蛋白質をコードし, そのアミノ酸配列中に既知の機能蛋白質との相同性は見出せない。ショウジョウバエ, アカパンカビの時計遺伝子産物 (PER, TIM, FRQ) との類似性もまったくない。

F 遺伝子上にマッピングされた複数の無周周期型突然変異体は, LD サイクルによっても, また高温・低温サイクルによっても概日リズムの発現が見られない。したがって *F* 遺伝子は入力系因子ではなく時計本体の構成因子であろう。また, プロモータートラップ法を無周周期型変異体に適用し, 広範な遺伝子発現リズムに対する影響を調べてみた。野生型ではすべての発光クローンが概日リズムを示すのに対して無周周期型変異体をもとにした発光クローンは一切リズムを示さなかった (近藤ら, 未発表)。この結果は *F* 遺伝子が出力系の因子ではないことを強く示すものといえる。

新たにクローニングした時計遺伝子群は新規のものであるため, コード蛋白質のアミノ酸配列からはその作用機構を推定することが出来ない。しかし, オペロンを構成することからなんらかの形で協調的に機能している可能性が高い。筆者らは酵母の two-hybrid 系と *in vitro* の系で最近これらの遺伝子の翻訳産物同士が様々な組み合わせで相互作用することを見出した (岩崎ら, 1996 年時間生物学会年会)。また,

最近 *D* 遺伝子上の時計変異のサブレッサーを *F* 遺伝子上に同定することにも成功した。藍色細菌内でも時計蛋白質が相互作用して概日リズムの発現に関与しているのではないかと考えられる。

いっぽう、ルシフェラーゼ・レポーターを用いて時計オペロンのプロモーター活性を測定したところ、顕著な概日リズムを示した(匿名者, 1997 年植物生理学会年会)。このリズムは時計遺伝子上にマッピングされた時計の変異によって影響を受ける。すなわち、短周期型、長周期型、無周期型の変異株では時計遺伝子のプロモーター活性はそれぞれ同様の周期の変化、リズムの消失を示す。この事実は、生物時計遺伝子にコードされる生物時計蛋白質がなんらかの形で自らの遺伝子の発現をコントロールしていることを意味している。これが概日リズムの発生に本質的なのか、単なる結果に過ぎないのかはまだ不明である。もし本質的だとすれば、ショウジョウバエの *per*(28, 98, 99) と *tim*(86, 99), アカパンカビの *frq*(3) の作用機構として提案されてきた時計蛋白質のネガティブ・フィードバック・モデルとよく符合する。このモデルでは、時計蛋白質が間接的もしくは直接的に自らをコードする遺伝子の発現を抑制することで時計蛋白質量のリズムを説明する。ショウジョウバエ(28, 99), アカパンカビ(17)の系では、時計遺伝子の mRNA 量のリズムとコード蛋白質量のリズムの間に数時間のタイムラグ(位相のずれ)が見られる。これは分子レベルの概日振動の安定化に寄与するとされ、一義的には時計蛋白質の核移行の制御によって確保されるとの仮説が提案されている(28, 83, 86, 99)。これらショウジョウバエ、アカパンカビの時計蛋白質分子の振動モデルは藍色細菌の生物時計遺伝子群の機能解析をするうえで作業仮説としては有効であろう。ただし核をもたない藍色細菌にそのまま適用できないこともまた明らかである。なお、ヤマユガの脳の時

計細胞では PER, TIM 相同蛋白質が核移行せずに細胞質内に局在すると最近報告されており(84), 時計遺伝子の作用機構が生物種によってどの程度共通しているのに興味深い。その意味でも藍色細菌の生物時計遺伝子の機能解析は重要であると言えよう。

6. 入力系の解析

藍色細菌の概日時計の位相合わせをもたらす要因として、光情報以外に次のようなものが報告されている。*Synechococcus* RF-1 では低温刺激によって位相変位がおこり(10), 温度サイクル(24, 29, 37)や DCMU(光合成系阻害剤)の添加除去サイクル(32)によって概日リズム発現が誘導される。AMC149 においても同様に温度サイクルによる概日リズムの同調(近藤ら, 未発表)が観察されている。また、最近筆者らの研究室の井上, 岡本は暗パルス, 温度パルスによる AMC149 の発光リズムの位相応答を詳しく調べ、この藍色細菌の生物時計の位相応答が多く我真核生物のそれと同じであることを示した(井上ら, 1997 年植物生理学会年会)。また, Sherman らは定常状態の培養液を新たな培地で希釈することで単細胞性藍色細菌 *Cyanotheca* sp. ATCC 51142 の窒素固定活性と炭水化物量の概日変動が誘導されると報じている(85)。したがって光受容体, 温度センサーなど複数の外界刺激応答分子が位相合わせに関与していると思われる。

藍色細菌の概日時計の位相合わせに必要な光の波長特性については、今のところ *Synechococcus* RF-1 に関する Chen らによる報告(13)があるのみである。この系統では白色光で培養したのち 12 時間の暗期を与えて再び連続白色光照射下に戻すことで窒素固定活性リズムが発現する。しかし白色光の代わりに赤色光(680 nm)条件下で培養したのち暗処理をし、再び連続赤色光下に移しても窒素固定リズムが誘導され継続する。それに対し、白

色光で培養したのち暗期の代わりに赤色光を与えてもリズムは誘導されない。680 nm とはクロロフィル *a* の吸収波長であり、先述の DCMU 処理サイクルによるリズム誘導の観察も加味して、Chen らは光合成系の暗パルスによる遮断によってリズムが誘導されると考えている。高等植物では赤色光と近赤外光による可逆的光応答を担うフィトクロームが概日時計の光入力系に関与しており(64)、時計を同調させるための暗処理期間中に近赤外光パルスを与えるとしばしばリズムの位相変位がもたらされる(たとえば文献 77)。そこで Chen らは *Synechococcus* RF-1 を赤色光で培養したのち暗条件に移し、その間のさまざまな時間帯に 30 分間の近赤外光(730 nm)を与えてみたが、その後のリズムの位相の乱れは一切おこらなかった。この結果から、藍色細菌ではフィトクローム類似物質は時計の位相応答に関与していないと推論している(13)。

Synechococcus sp. PCC 7942 ではまだ時計入力系の変異体と結論できるものは得られていないが、*Synechococcus* RF-1 の前述の無周期型変異体 CR-1、CR-2(39)に関しては興味深い観察がある。CR-2 は明暗サイクル、温度サイクルのいずれによっても概日リズムの同調が見られないのに対し、CR-1 は明暗サイクルには同調しないが温度サイクルにより窒素固定リズムおよび蛋白質合成リズムが見られるというのだ(Huang, 私信)。このことから、Huang は CR-1、CR-2 はそれぞれ光入力系、時計本体の変異体ではないかと考えている。

光応答伝達系一般に関して、高等植物の豊富な解析に比べて藍色細菌での分子生物学的研究はかなり遅れている。しかし最近 Grossman らは *Fremyella diplosiphon* という種を用いて、藍色細菌としては初めて光受容体をコードする遺伝子のクローニングに成功した(46)。この種は赤色光と緑色光の比率に応じて、集光色素の構成成分を可逆的に変化させ

ることで高い光吸収効率を確保している。分子遺伝学的手法を用いて明らかにされた光受容体遺伝子 *RcaE* のコード蛋白質は高等植物のフィトクロームおよびエチレン受容体と相同な領域を持っていた。全ゲノム塩基配列が明らかになった *Synechocystis* sp. PCC 6803(45)もフィトクローム類似遺伝子を持っている。また、植物の青色光受容体遺伝子と類似する配列も見つかった。したがってこれらの藍色細菌の光受容体遺伝子候補を利用することで分子遺伝学的に藍色細菌の生物時計の光入力系を明らかにしていくことが期待できよう。なお *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、一日に約 5 分間の光パルスさえ与えれば暗条件下で従属栄養的に生育させることが可能である(1)。AMC149 と同様にルシフェラーゼ・レポーターを導入した *Synechocystis* の形質転換体は連続明条件下で発光リズムを示すが(2)、連続暗条件下でも発光リズムをとらえることが出来た(Aoki, Kondo, Wada and Ishiura, *J. Bacteriol.* 投稿中)。この特性は時計の光応答性の詳細な解析に有利である。

筆者らが主として用いている *Synechococcus* sp. PCC 7942 では Golden らが光応答性遺伝子群の研究を精力的におこなっており、少なくとも赤色光、青色光特異的な効果が報告されている(22, 58, 94)。したがって *Synechococcus* sp. PCC 7942 においても複数の光波長特異的な受容体が存在するのは明らかである。*Synechococcus* sp. PCC 7942 における時計の光入力系の解析はまだ始まったばかりであるが、上記の知見と筆者らの開発した系を用いることでその分子機構を明らかにしていくことが可能であろう。

7. 出力系の解析

Synechococcus sp. PCC 7942 では、前述のように大多数の遺伝子のプロモーターが概日時計に制御されている。それらの多くのプロモ

ーター領域およびそれを制御する転写因子の解析をすることにより、広範な遺伝子発現リズムの包括的な理解が期待できよう。筆者らは既出力系に関わる因子の一つとして RNA ポリメラーゼのシグマ因子のメンバーを特定している(93)。これは AMC149 のゲノムに薬剤耐性マーカーをランダムに挿入してスクリーニングすることで分離された低振幅型突然変異体 M16 (周期は 24 時間で野生型と同じ)の原因遺伝子として同定された。この遺伝子 *rpoD2* の破壊株では *psbAI* の発現リズムは低振幅型になるが、*purF* の発現リズムは野生型と変わらない。また、前述のプロモータートラップの際に得られた、AMC149 と同じ位相の発光リズムを示す 3 種類のレポーター株それぞれの *rpoD2* を破壊したところ、そのうちの一つの発光リズムの振幅が落ち、残りの二つに関しては変化が見られなかった。したがって、RpoD2 蛋白質は生物時計の本体ではなく出力系の構成要素であり、*psbAI* と同じ位相で概日発現する遺伝子の一群を制御するものと考えられる。

Synechococcus RF-1 では転写レベルの包括的な解析はなされていないが、多くのポリペプチドの合成速度に概日変動が見られることがわかっている(29)。速度が最大となる位相はポリペプチドによって異なり、概ね 4 つの位相に分かれた。前述のように、*Synechococcus* sp. PCC 7942 では大多数の遺伝子のプロモーターが概日時計に制御されていることから、*Synechococcus* RF-1 でもそうした広範な転写レベルの制御が行われている可能性がある。真核生物の場合と異なり、原核生物では転写と翻訳の場が核膜によって分断されておらず、むしろカップリングしている。したがって、転写レベルの制御はより直接的に蛋白質合成に影響するはずである。このことを考えれば、*Synechococcus* RF-1 で見られた多数の蛋白質の合成速度リズムは、一義的には転写レベルの制御に由来しているかも知れない。

個々の遺伝子発現リズムと、光合成や後述する細胞分裂周期などの生理過程に見られるリズムとの間を埋める作業は今後の大きな課題である。

8. 細胞分裂周期との関わり

細胞分裂周期は概日リズムとならぶ代表的な生体振動であり、その関連性が注目され、多くの解析がなされてきた(18)。その過程で概日時計は細胞分裂周期とは独立であり、むしろしばしば細胞分裂周期を制御することが明らかになってきた。その一方で、細胞膜や核などの細胞構造を重視した概日時計のモデルがしばしば提案されている(たとえば文献 78)。また、先述のように近年ショウジョウバエ、アカパンカビで提案された時計遺伝子のフィードバック・モデルでも時計蛋白質の核移行が重要なステップとして認識され、必然的に核構造に依存する。とすれば細胞構造を大幅に変更し、多くの生体内物質濃度に影響する細胞分裂過程と概日時計機構との関連性は今なお重要な問題である。

従来、細胞分裂周期が概日周期よりも短い細胞では概日リズムは発現しないという見方が支配的であった(80)。たとえば *Tetrahymena* やミドリムシ *Euglena* では分裂周期が一日よりも短い細胞では概日リズムが観察されなかった(18)。藍色細菌でも、概日リズムが観察されてきたのは 24 時間周期で分裂する細胞(71)、倍加時間(doubling time; 以下 DT)の遅い細胞(90)、定常状態ないし分裂停止状態の細胞(29, 72)においてのみであった。前述の筆者らの AMC149 のリズムも、もっぱら指数増殖期を過ぎ定常状態に近くなった状態での観察である。しかし *Synechococcus* sp. PCC 7942 は指数増殖期には DT が概日周期よりも短くなる。そこで筆者らは、寒天培地上およびバッチ液体培養中で DT 約 10 時間で指数増殖を続ける AMC149 の発光パターンを高感度の光電子

倍增管を用いて測定した。その結果発光は指数的増加とともに顕著な概日振動を示した(53)。さらに DT5-6 時間または 10 時間での増殖を保ちつつ細胞密度を一定に保つ連続培養でも、光合成系の遺伝子 *psbA1*, *psbA11* の mRNA 量の概日変動を確認した。また、Johnson らも DT 約 10 時間で増殖する AMC149 の連続培養を用い、同様に生物発光の概日リズムを示した(74)。

これらの結果は藍色細菌では概日振動が細胞分裂に影響を受けないことを示している。しかしこれは概日時計と細胞分裂が相互に独立であることを意味するものではない。実際、Johnson らは DT 約 10 時間で指数増殖する *Synechococcus* sp. PCC 7942 の連続培養を用い、概日周期の特定の位相では細胞分裂が起こらないことを明らかにした(74)。では DNA の複製についてはどうだろうか。真性細菌では一般的に *dnaN* 遺伝子にコードされる DNA ポリメラーゼ III が DNA 複製に関与しており、染色体複製開始点は *dnaN* 遺伝子座の近傍に存在する。Liu と Tsinoremas は *Synechococcus* sp. PCC 7942 の染色体複製開始点と思われる遺伝子領域を *dnaN* 遺伝子座のすぐ上流に特定し、ルシフェラーゼ・レポーターを用いて *dnaN* 遺伝子の発現が概日時計に制御されることを見出した(60)。このことから、彼らは DNA 複製が概日時計に制御される可能性を指摘していた。原核生物にはゲノムを細胞あたり多コピー持つものが少なくない。*Synechococcus* sp. PCC 7942 の場合も細胞あたり複数コピーのゲノムを保持している(7)。Johnson らは前述の連続培養を用いて細胞あたりのゲノム数の変動、細胞サイズの変動を測定し、前述の細胞分裂のパターンを加味して、藍色細菌ではサーカディアン時間を通じて DNA 複製は一定の速度で持続的に行われることを見出した(74)。真核生物とは異なり、原核生物では細胞分裂周期と染色体の複製が必ずしも完全にカップリング

しているわけではなく、脱共役しているものも多い(7)。

このように、概日周期よりも短い倍加時間で増殖する細胞でも概日時計が遺伝子発現、細胞分裂を制御することが明らかとなったことは、概日時計についての従来の基本的理解に変更を促すものとして重要である。一方筆者や Johnson らとは異なり、Mitsui らは前述の 1986 年の報告(71)以来 *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 を用いた一連の研究(57, 69-73, 89)で一貫して藍色細菌の様々な生理活性リズムを細胞分裂周期に依存する制御と見なして研究を進めた。前述のように彼らは明暗サイクル同調後、連続明条件下でこの藍色細菌の光合成活性(酸素放出)、窒素固定活性、炭水化物量、細胞分裂が連続明条件下で約 24 時間周期で変動することを見出した(71)。さらに彼らはグリコゲン合成量(57, 69)や集光色素フィコシアニン合成(89)、NADPH 生成およびグルコース 6-リン酸脱水素酵素活性(Ikemoto and Mitsui, 未発表;文献 73 に引用)、不飽和脂肪酸合成(Kabata and Mitsui, 未発表;文献 73 に引用)などにも約 24 時間周期のリズムを見出している。1993 年、彼らは *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 の細胞分裂、窒素固定活性、酸素放出のリズムを従来の 30°C ではなく 24°C, 36°C で測定した結果を報告した。それによれば、連続明条件下 30°C ではこうした生理活性リズムの周期は約 20-24 時間だが、24°C では 25-30 時間に、36°C では 6-10 時間となり、いずれも培養の倍加時間と同じであった(73)。この結果から、彼らは光合成、窒素固定のリズムは明らかに細胞分裂周期に依存するものであると結論した。しかし、その後彼らは分裂が停止した *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 の培養中にも窒素固定活性、光合成活性の日周変動を見出し(72)、彼らは細胞分裂周期と第二の内因性的リズム機構の双方が関与していると推論した。しかし、彼らの観察し

たリズムがすべて概日時計に制御されているものであったと考えることも出来よう。とすれば1993年の観察は、観測温度条件下での(概日時計の基本特性である)周期の温度補償性の破綻を意味する。24°Cと30°Cにおける周期の差異は実験誤差範囲とも思われることから、*Synechococcus* sp. Miami BG 043511では36°Cはもはや温度補償性の有効範囲外なのかも知れない。

9. 概日時計の進化

藍色細菌から高等動物に至るまで、概日リズムの生理的特性は驚くほど共通している。その一方で、今までにショウジョウバエ、アカパンカビ、そして藍色細菌で明らかにされた時計遺伝子がコードするアミノ酸配列には明確な類似性は認められない。原核生物の時計と真核生物の時計は、もともと共通の時計のプロトタイプから派生してきたものなのだろうか、あるいは進化の過程で独立に獲得されたものなのだろうか。前述のように、ショウジョウバエとアカパンカビの時計遺伝子の作用機構モデルは核を前提としていた。このモデルが真核生物の時計に一般的かつ基本的であれば、核をもたない原核生物では真核生物とは異なる時計を持っているなければならない。

いっぽう、共生説では藍色細菌は植物葉緑体の系統的祖先と考えられている。もしそうであれば、植物の概日時計には藍色細菌の時計と共通の機構、構成要素が保持されている可能性もあろう。緑藻 *Chlamydomonas* では、葉緑体ゲノムにコードされる多くの遺伝子の発現が概日制御されることも最近わかってきた(40)。この点で、シロイヌナズナ *Arabidopsis* を用いた Kay らによる生物時計の分子遺伝学的解析は非常に興味深い。彼らはクロロフィル結合蛋白質をコードする *cab* 遺伝子のプロモーター領域の下流にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を連結して *Arabidopsis* を形質転換し、発光リズム

を示すクローンを作製した(67)。続いてその発光リズムを指標として EMS 処理した実生をスクリーニングし、既に10を超える様々な時計の突然変異体を分離している(66; Kayら、私信)。そのうち *toc1* 突然変異は *cab* 遺伝子の発現リズム、葉の就眠運動リズムがともに短周期(21時間)になる(66, 68)。*toc1* 遺伝子についてはマッピングと染色体歩行による同定作業がかなり進んでおり(Strayer and Kay, 私信)、その他の時計変異(66)のマッピングも現在行われつつある。したがって近い将来、植物の時計遺伝子と藍色細菌の時計遺伝子の比較によって新たな知見が得られるかも知れない。

また、筆者らが同定した *Synechococcus* sp. PCC 7942 の生物時計遺伝子群の、他の生物種における類似遺伝子の探索も現在行っている。既に明らかになっている藍色細菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の全ゲノム配列の中には複数コピーの類似遺伝子が存在し、翻訳アミノ酸配列の相同性は極めて高い。また、最近筆者らは糸状多細胞性で窒素固定型の *Anabaena* sp. PCC 7120、好熱性藍色細菌 *Synechococcus vulcanus* からも非常に保存性の高い類似遺伝子をクローニングし、解析を進めている(宇津巻ら、1997年植物生理学会年会)。筆者らの同定した時計遺伝子は少なくとも藍色細菌では広く一般的に存在すると思われる。その他の原核生物、真核生物においても類似遺伝子が存在するかどうか興味深い。

10. おわりに

筆者らは藍色細菌を用いて新たな実験系を開発し、従来の時計研究の障害の多くを取り除くことが出来た。すでに3つの時計遺伝子群をクローニングし、その解析を進めている。また、筆者らの開発したリズムの測定系のメリット(安定性、高い時間分解能)を活かして新たな生理学的解析も開始しつつある。まだ前途は遠いが、藍色細菌を用いた解析は概日時計の分子

機構の包括的な解明のための最も有望なアプローチの一つである。

現在多くの生物で概日時計の分子遺伝学解析が精力的に行われている。しかしながら日本ではこの新しい流れはまだ十分に浸透しているとは言いがたい。また、植物や微生物を用いた時計の解析も欧米に比べて非常に少ないのが現状である。これは藍色細菌を用いた時計の解析の中間報告であるが、この機会に少しでも多くの方々が生物時計の分子遺伝学的解析、あるいは植物や微生物を用いた時計の解析に興味を持っていただければ幸いである。

付. 関連する総説の紹介

藍色細菌の生物時計研究一般に関しては、最近筆者らが書いたもの(23)がもっとも充実しており、現段階での未発表データもいくつか載せている。この英文総説では必ずしも藍色細菌の生物時計研究のすべての報文を紹介したわけではない。本総説では現在までに出版された藍色細菌の生物時計の論文を一応網羅したつもりであり、いくつかの情報も新たに追加した。筆者らの不注意で万一抜けている論文があれば、是非御連絡いただきたい。筆者らの *Synechococcus* sp. PCC 7942 を用いた概日時計の分子遺伝学的解析については、もっとコンパクトにまとめたものもある(42, 45, 49)。*Synechococcus* sp. RF-1 の生物時計研究については Huang と Grobbelaar による総説(文献 35)がある。

窒素固定型の単細胞性藍色細菌一般については最近出版された詳細な総説(5)を参照されたい。*Synechococcus* sp. PCC 7942 における光誘導性遺伝子群の解析については Golden による文献(22)がある。また、藍色細菌の分子生物学的研究一般に関しては Bryant 編(8)、培養や具体的な実験技術などに関しては Packer および Glazer 編(79)の総説をそれぞれあげておく。

藍色細菌の和文の総説としては以下の筆者らの手になるものがある。文献(51, 52)では筆者らの分子遺伝学的解析のアウトラインを簡潔に紹介した。また文献(56)では、主に筆者らが開発したルシフェラーゼ・レポーターを用いた遺伝子発現の測定系の技術的側面について解説した。

謝辞:ここに紹介した *Synechococcus* sp. PCC 7942 の生物時計の解析は当研究室のプロジェクトであるが、Susan S. Golden(Texas A&M Univ.), Carl H. Johnson(Vanderbilt Univ.)両博士にも協力していただいている。本稿を書くにあたって、未発表のデータを引用させていただいた沓名伸介氏、青木撰之博士(現・名古屋大学人間情報学研究所)をはじめとする筆者らの研究室のメンバーに感謝する。また、*Synechococcus* sp. RF-1 の生物時計の報文リストを作成するにあたり、Tan-Chi Huang 博士(中央研究院植物研究所, 台湾)に御協力頂いた。また、同博士には *Synechococcus* sp. RF-1 の無周期型変異体の表現型について未発表のデータを教えていただいた。ここに厚く御礼申し上げる。

引用文献

1. Anderson SL, and McIntosh L (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.* 173, 2761-2767
2. Aoki S, Kondo T, and Ishiura M (1995) Circadian expression of the *dnaK* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 177, 5606-5611
3. Aronson BD, Johnson KA, Loros JJ, and Dunlap JC (1994) Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation

- of the clock gene *frequency*. *Science* 263, 1578-1584
4. Bell-Pedersen D, Shinohara ML, Loros JJ, and Dunlap JC (1996) Circadian clock-controlled genes isolated from *Neurospora crassa* are late night- to early morning-specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13096-13101
 5. Bergman B, Gallon JR, Rai AN, and Stal LJ (1997) N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 139-185
 6. Beter J and Kloppstech K (1994) Circadian rhythmicity in the expression of genes in higher plants. *Mol. Biol.* 13, 203-219
 7. Binder BJ and Chisholm SW (1990) Relationship between DNA cycle and growth rate in *Synechococcus* sp. strain PCC 6301. *J. Bacteriol.* 172, 2313-2319
 8. Bryant DA ed. (1994) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht)
 9. Carre I and Kay SA (1995) Multiple DNA-protein complexes at a circadian regulated promoter element. *Plant Cell* 7, 2039-2051
 10. Chen T-H, Chen T-L, Hung L-M, and Huang T-C (1991) Circadian rhythm in amino acid uptake by *Synechococcus* sp. RF-1. *Plant Physiol.* 97, 55-59
 11. Chen H-M, Chien C-Y, and Huang T-C (1996) Regulation and molecular structure of a circadian oscillating protein located in the cell membrane of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. *Planta* 199, 520-527
 12. Chen T-H, Huang T-C, and Chow T-J (1988) Calcium requirement in nitrogen fixation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. RF-1. *Planta* 173, 253-256
 13. Chen T-H, Pen S-Y, and Huang T-C (1993) Induction of nitrogen-fixing circadian rhythm in *Synechococcus* sp. RF-1 by light signals. *Plant Sci.* 92, 179-183
 14. Chou H-M, Chow T-J, Tu J, Wang H-R, Chow H-C, and Huang T-C (1989) Rhythmic nitrogenase activity of *Synechococcus* sp. RF-1 established under various light-dark cycles. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 30, 291-296
 15. Chou H-M and Huang T-C (1991) Ultrastructure of the aerobic, nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria *Synechococcus* sp. RF-1. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 92. *Algol Studies* 64, 53-59
 16. Chow T-J and Tabita FR (1994) Reciprocal light-dark transcriptional control of *nif* and *rbc* expression and light-dependent posttranslational control of nitrogenase activity in *Synechococcus* sp. RF-1. *J. Bacteriol.* 176, 6281-6285
 17. Dunlap DC (1996) Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu. Rev. Genet.* 30, 579-601
 18. Edmunds LN Jr (1988) *Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks*. (Springer Verlag, NY)
 19. Elhai F and Walk CP (1991) Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J.* 9, 3379-3388
 20. Gallon JR (1981) The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. *Trends Biochem. Sci.* 6, 19-23
 21. Gallon JR, Perry SM, Rajab TMA, Flayeh KAM, Yunes JS, and Chaplin AE (1988)

- Metabolic changes associated with the diurnal pattern of N_2 fixation in *Gloeothece*. J. Gen. Microbiol. 134, 3079-3087
22. Golden SS (1995) Light-responsive gene expression in cyanobacteria. J. Bacteriol. 177, 1651-1654
 23. Golden SS, Ishiura M, Johnson CH, and Kondo T (1997) Cyanobacterial circadian rhythms. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 48, 327-354
 24. Grobbelaar N and Huang T-C (1992) Effect of oxygen and temperature on the induction of a circadian nitrogenase activity rhythm in *Synechococcus* sp. RF-1. J. Plant Physiol. 140, 391-394
 25. Grobbelaar N, Huang T-C, Lin H-Y, and Chow T-J (1986) Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* sp. RF-1. FEMS Microbiol. Let. 37, 173-177
 26. Grobbelaar N, Li W-T, and Huang T-C (1992) Relationship between the nitrogenase activity and dark respiration rate of *Synechococcus* sp. RF-1. FEMS Microbiol. Let. 83, 99-102
 27. Grobbelaar N, Lin H-Y, and Huang T-C (1987) Induction of a nitrogenase activity rhythm in *Synechococcus* sp. RF-1. Curr. Microbiol. 15, 29-33
 28. Hardin PE, Hall JC, and Rosbash M (1990) Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature 343, 536-540
 29. Huang T-C, Chen H-M, Pen S-Y, and Chen T-H (1994) Biological clock in the prokaryotic *Synechococcus* RF-1. Planta 193, 131-136
 30. Huang T-C and Chow T-J (1986) New type of N_2 -fixing unicellular cyanobacterium (blue-green alga). FEMS Microbiol. Let. 36, 109-110
 31. Huang T-C and Chow T-J (1988) Comparative studies of some nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria isolated from rice field. J. Gen. Microbiol. 137, 3089-3097
 32. Huang T-C and Chow T-J (1990) Characterization of the rhythmic nitrogen-fixing activity of *Synechococcus* sp. RF-1 at the transcriptional level. Curr. Microbiol. 20, 23-26
 33. Huang T-C and Chow T-J (1991) Setting of the circadian N_2 -fixing rhythm of the prokaryotic *Synechococcus* sp. RF-1 while its *nif* gene is repressed. Plant Physiol. 96, 324-326
 34. Huang T-C, Chow T-J, and Hwang I-S (1988) The cyclic synthesis of the nitrogenase of *Synechococcus* RF-1 and its control at the transcriptional level. FEMS Microbiol. Let. 50, 127-130
 35. Huang T-C and Grobbelaar N (1995) The circadian clock in the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. Microbiol. 141, 535-540
 36. Huang T-C, Lay K-C, and Tong S-R (1991) Resetting the endogenous circadian N_2 -fixing rhythm of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. Bot. Bull. Acad. Sinica 32, 129-133
 37. Huang T-C and Pen S-Y (1994) Induction of a circadian rhythm in *Synechococcus* RF-1 while the cells are in a "suspended state". Planta 194, 436-438
 38. Huang T-C, Tu J, Chow T-J, and Chen T-H (1990) Circadian rhythm of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. Plant Physiol. 92, 531-533

39. Huang T-C, Wang S-T, and Grobbelaar N (1993) Circadian rhythm mutants of the prokaryotic *Synechococcus* sp. RF-1. *Cur. Microbiol.* 27, 249-254
40. Hwang S, Kawazoe R, and Herrin DL (1996) Transcription of *tufA* and other chloroplast-encoded genes is controlled by a circadian clock in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 996-1000
41. Jacobshagen S and Johnson CH (1994) Circadian rhythm of gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*: circadian cycling of mRNA abundances of *cab*, and possibly of β -tubulin and cytochrome *c*. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 142-152
42. Johnson CH, Golden SS, Ishiura M, and Kondo T (1996) Circadian clocks in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 21, 5-11
43. Johnson CH and Hastings JW (1986) The elusive mechanism of the circadian clock. *Am. Scientist.* 74, 29-36
44. Kaneko T, Matsubayashi T, Sugita M, and Sugiura M (1996) Physical and gene maps of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301 genome. *Plant Mol. Biol.* 31, 193-201
45. Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, and Tabata S (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109-136.
46. Kehoe D and Grossman AR (1996) Similarity of chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273, 1409-1412
47. Kippert F (1991) Essential clock proteins/circadian rhythms in prokaryotes -What is the evidence? *Bot. Acta* 104, 2-4
48. Kondo T (1996) Molecular Genetic Approaches to the circadian clock of cyanobacteria. In *Circadian Organization and Oscillatory Coupling*. ed. Honma, K. and Honma, S. (Hokkaido University Press, Sapporo)
49. Kondo, T., Golden, S.S., Johnson, C.H. and Ishiura, M. (1994) Circadian rhythms of cyanobacteria expressed from a luciferase reporter gene. In *Evolution of Circadian Clock*. ed. Hiroshige, T. and Honma, K. (Hokkaido University Press, Sapporo)
50. Kondo, T. and Ishiura, M. (1994) Circadian rhythms of cyanobacteria: monitoring the biological clocks of individual colonies by bioluminescence. *J. Bacteriol.* 176, 1881-1885
51. 近藤孝男, 石浦正寛 (1994) 「藍色細菌の概日性時計: 生物発光レポーターを利用した分子遺伝学」蛋白質核酸酵素 39, 2792-2802
52. 近藤孝男, 石浦正寛 (1995) 「バクテリアの生物時計: 時計遺伝子を目指して」バリエイ 10(6), 37-40
53. Kondo T, Mori T, Lebedeva NV, Aoki S, Ishiura M, and Golden SS (1997) Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria. *Science* 275, 224-227
54. Kondo T, Strayer CA, Kulkarni RD, Taylor W, Ishiura M, Golden SS, and Johnson CH

- (1993) Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5672-5676
55. Kondo T, Tsinoremas NF, Golden SS, Johnson CH, Kutsuna S, and Ishiura M (1994) Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* 266, 1233-1236
56. 近藤孝男, 山口登, 石浦正寛 (1996) 「ルシフェラーゼ遺伝子による遺伝子発現のリアルタイムモニター」 *生物物理* 208, 289-292
57. Kumazawa S and Mitsui A (1992) Photosynthetic activities of a synchronously grown aerobic N_2 -fixing unicellular cyanobacterium, *Synecho-coccus* sp. Miami BG 043511. *J. Gen. Microbiol.* 13, 149-153
58. Li R and Golden SS (1993) Enhancer activity of light-responsive regulatory elements in the untranslated leader regions of cyanobacterial *psbA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11678-11682
59. Liu Y, Golden SS, Kondo T, Ishiura M, and Johnson CH (1995) Bacterial luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 177, 2080-2086
60. Liu Y and Tsinoremas NF (1996) An unusual arrangement for the putative chromosome replication origin and circadian expression of *dnaN* in *Synecho-coccus* sp. strain PCC 7942. *Gene* 172, 105-109
61. Liu Y, Tsinoremas NF, Golden SS, Kondo T, and Johnson CH (1996) Circadian expression of genes involved in the purine biosynthetic pathway of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 20, 1071-1081
62. Liu Y, Tsinoremas NF, Johnson CH, Lebedeva NV, Golden SS, Ishiura M, and Kondo T (1995) Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev.* 9, 1469-1478
63. Loros JJ, Denome SA, and Dunlap JC (1989) Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science*, 243, 385-388
64. Lumsden PJ (1991) Circadian rhythms and phytochrome. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42, 351-371
65. Margulis L (1993) *Symbiosis in Cell Evolution*. 2nd ed. (Freeman & Company, NY), pp. 452
66. Millar AJ, Carre IA, Strayer CA, Chua N-H, and Kay SA (1995) Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 267, 1161-1163
67. Millar AJ, Short SR, Chua N-H, and Kay SA (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4, 1075-1087
68. Millar AJ, Straume M, Chory J, Chua N-H, and Kay SA (1995) The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 267, 1163-1166
69. Mitsui A, Cao S, Takahashi A, and Arai T (1987) Growth synchrony and cellular parameters of the unicellular nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Synecho-coccus* sp. strain Miami BG 043511 under continuous illumination. *Physiol. Plant.* 69, 1-8
70. Mitsui A and Kumazawa S (1988) Nitrogen fixation by synchronously growing

- unicellular aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 484-490
71. Mitsui A, Kumazawa S, Takahashi A, Ikemoto H, Cao S, and Arai T (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* 323, 720-722
 72. Mitsui A and Suda S (1995) Alternative and cyclic appearance of H₂ and O₂ photoproduction activities under non-growing conditions in an aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Curr. Microbiol.* 30, 1-6
 73. Mitsui A Suda S, and Hanagata N (1993) Cell cycle events at different temperatures in aerobic nitrogen-fixing marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. Miami BG 043511. *J. Mar. Biotechnol.* 1, 89-91
 74. Mori T, Binder B, and Johnson CH (1996) Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10183-18186
 75. Morse DS, Fritz L, and Hastings JW (1990) What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. *Trends Biochem. Sci.* 15, 262-265
 76. Mullineaux PM, Gallon JR, and Chaplin AE (1981) Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles. *FEMS Microbiol. Let.* 10, 245-247
 77. Nagy F, Kay SA, and Chua N-H (1988) A circadian clock regulates transcription of the wheat *Cab-1* gene. *Genes Dev.* 2, 376-382
 78. Njus D, Sulzman FM, and Hastings JW (1974) Membrane model for the circadian clock. *Nature* 248, 116-120
 79. Packer L and Glazer AN ed (1988) *Methods Enzymol.* 167 (*Cyanobacteria*)
 80. Pittendrigh CS (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 17-54
 81. Roenneberg T and Carpenter EJ (1993) Daily rhythm of O₂-evolution in the cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* under natural and constant conditions. *Marine Biol.* 117, 693-697
 82. Rojek R, Harms C, Hebel M, and Grimme LH (1994) Cyclic variations of photosynthetic activity under nitrogen fixing conditions in *Synechococcus* sp. RF-1. *Arch. Microbiol.* 162, 80-84
 83. Saez L and Young MW (1996) Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins Period and Timeless. *Neuron* 17, 911-920
 84. Sauman I and Reppert SM (1996) Circadian clock neurons in the silkworm *Anthearea pernyi*: novel mechanisms of period protein regulation. *Neuron* 17, 889-900
 85. Schneegurt MA, Sherman DM, Nayar S, and Sherman LA (1994) Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J. Bacteriol.* 176, 1586-1597
 86. Sehgal A, Price J, Man B, and Young MW (1994) Circadian behavioral rhythms and molecular oscillations of *per* RNA abolished by a new *Drosophila* mutation, *timeless*. *Science* 270, 808-810
 87. Stal LJ and Krumbein WE (1985) Nitrogenase activity in the non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp.

- grown under alternating light-dark cycles. Arch. Microbiol. 143, 67-71
88. Stal LJ and Krumbein WE (1987) Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Arch. Microbiol. 149, 76-80
 89. Suda S, Kumazawa S, and Mitsui A (1992) Change in the H₂ photoproduction capacity in a synchronously grown aerobic nitrogen-fixing cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Miami BG 043511. Arch. Microbiol. 158, 1-4
 90. Sweeney BM and Borgese MB (1989) A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, the cyanobacterium *Synechococcus* WH7803. J. Phycol. 25, 183-186
 91. Taylor WR (1979) *Studies on the bioluminescent glow rhythm of Gonyaulax polyedra*. Dissertation. University of Michigan
 92. Thiel T (1994) Genetic analysis of cyanobacteria. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. ed. Bryant DA (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), pp. 581-611
 93. Tsinoremas NF, Ishiura M, Kondo T, Tanaka K, Takahashi H, Johnson CH, and Golden SS (1996) A sigma factor that modifies the circadian expression of a subset of genes in cyanobacteria. EMBO J. 15, 2488-2495
 94. Tsinoremas NF, Shaefer MR, and Golden SS (1994) Blue and red light reversibly control *psbA* expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. J. Biol. Chem. 269, 16143-16147
 95. Van Gelder RN, Bae H, Palazzolo MJ, and Krasnow MA (1995) Extent and character of circadian gene expression in *Drosophila melanogaster*: identification of twenty oscillating mRNAs in the fly head. Curr. Biol. 12, 1424-1436
 96. Wolk CP, Cai Y, and Panoff J-M (1991) Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5355-5359
 97. Wolk CP, Elhai J, Kuritz T, and Holland D (1993) Amplified expression of a transcriptional pattern formed during development of *Anabaena*. Mol. Microbiol. 7, 441-445
 98. Zeng H, Hardin PE, and Rosbash M (1994) Constitutive overexpression of the *Drosophila period* protein inhibits *period* mRNA cycling. EMBO J. 13, 3590-3598
 99. Zeng H, Qian Z, Myers MP, and Rosbash M (1996) A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. Nature 380, 129-135