

## シアノバクテリアの概日リズムの 発振機構モデルの新たな展開

岩崎 秀雄

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 日本科学技術事業団 (JST CREST)

シアノバクテリアは、概日リズムの知られる最も単純な生物であり、概日システムの基本的メカニズムを生理学的あるいは分子遺伝学的に解析する上で好個の材料である<sup>1)</sup>。シアノバクテリアの概日リズム制御の中核と考えられる *kaiABC* 遺伝子群の作用機構として、KaiC による *kaiBC* オペロンの自己抑制ループ・モデルが提案されている。このモデルの妥当性を検討する中で、おぼろげながらユニークな概日制御機構の可能性が浮かび上がってきた。

### 1. *kai* 遺伝子群による単純フィードバック・ループ・モデル

*kaiA*, *kaiB*, *kaiC* の三つからなる *kai* 遺伝子群は、生物発光レポーターを利用した多数のリズム変異株の原因遺伝子群として、石浦・杓名・近藤らによって同定された<sup>2)</sup>。各遺伝子を破壊すると概日リズムは観察されなくなり、時計の必須因子と考えられる。またアミノ酸残基の置換により、極めて多様なリズム異常を誘導することからも、これらの遺伝子が時計制御の本質に関わることは明らかである。

*kaiB* と *kaiC* はオペロンを構成して共転写されるのに対し、*kaiA* は単独で発現する<sup>2)</sup>。*kaiA* mRNA, *kaiBC* mRNA は、ともに連続明8時間目 (LL 8) あたりをピークとする概日発現を示す。*kaiBC* の転写は、*kaiA* 遺伝子破壊株で抑制され、*kaiA* 過剰発現株では逆に促進されて無周期化する。このことから KaiA は *kaiBC* 発現活性化因子と考えられる。い

っぼう、*kaiBC* 発現は *kaiC* 遺伝子の構成的過剰発現により強く抑制されることから、KaiC は *kaiBC* 発現抑制因子と考えられた<sup>2)</sup>。KaiB と KaiC は mRNA リズムに数時間遅れて、LL15-16 をピークとする概日蓄積リズムを示す<sup>3)</sup>。また、KaiC の一過的な過剰発現誘導は、時刻依存的な位相シフトをもたらす<sup>2,3)</sup>。

これらの知見は、ショウジョウバエの *period* (*per*) やアカパンカビの *frequency* (*frq*) の作用機構モデルとして90年代前半に提案されたモデルによく符合する<sup>4)</sup>。つまり、特定の時計関連抑制因子 (PER, FRQ, KaiC) の遺伝子発現が自分自身によって抑制されるのに対し、活性化因子 (dCLK::CYC, WC-1::WC-2, KaiA) によって促進される。抑制因子の転写が誘導されてから、自身の発現抑制に至るまでに適当なタイムラグが措置されることにより、正負調節のシーソーバランスが保たれ、抑制因子の転写が約24時間周期で振動するというわけだ。

抑制型の時計蛋白質の蓄積が、mRNAリズムから数時間遅れて発振するのは、正負調節のタイムラグを反映すると考えられている。真核生物の時計モデルでは、このタイムラグを生ずるための調節機構として、PER, TIM, FRQなどの核移行の調節、リン酸化を介する安定性の制御などが想定されている<sup>4)</sup>。ここではこの段階のモデルを単純フィードバック・ループ・モデルと呼ぼう。真核生物では、このモデルはその後interlockedフィードバックモデル(二つのフィードバックループのカップリング・モデル)、あるいは(より本質的な視点の変更を伴う)Zeitnehmerモデル(従来基本振動とされてきた時計遺伝子転写ループを、時計に制御される入力系因子として扱うモデル)として展開している。このあたりの事情は最近、総説にまとめたので参照していただきたい<sup>5)</sup>。以下、シアノバクテリアにおける単純フィードバック・ループ・モデルの再検討の一端を紹介しよう。

## 2. KaiA-KaiCの正負調節カップリング・モデル

単純フィードバックモデルでは、抑制因子(たとえばPER, FRQ, KaiC)の機能欠失株では、自身の転写が恒常的に高いレベルで維持されることが予想される。これに最も妥当しているのはアカパンカビの場合であり、FRQの機能欠失株*frq<sup>0</sup>*では内在性の*frq*遺伝子の発現レベルが、野生株での発現ピークレベル程度で維持される<sup>6)</sup>。ショウジョウバエの場合は必ずしもそうはならず、*per<sup>0</sup>*系統では*per* mRNAの蓄積レベルはむしろ低下する。これは、Hardinらの修正モ

デル(interlockedフィードバックモデル)では、*per*が活性化因子*dClk*の発現を活性化する機能を担っているとの修正条項によって一応解釈されている(*per<sup>0</sup>*系統では*dClk*の発現が低下することになり、結果として*per*の発現も抑制される)<sup>7)</sup>。ただし、*per<sup>0</sup>*系統での*per*プロモーター活性はかなり高いとの報告もあり、今ひとつ意見の一致を見ていないように思われる節もある<sup>8,9)</sup>。

シアノバクテリアの*kaiC*欠失株の場合、*kaiC*プロモーター活性は野生株での発現レベルのピークレベルではなく、中間から若干下のレベルで維持される。したがって、KaiC以外にも*kaiBC*の抑制因子が存在するか、もしくはKaiC自身が何らかの形で*kaiBC*発現の活性化に関与する可能性が考えられた。

もともとKaiCが抑制因子と考えられたのは、KaiCの過剰発現により、*kaiBC*発現が顕著に抑制されたためである<sup>2)</sup>。そこで、筆者らは同様の実験を*kaiA*の機能欠失株で行った。その結果、野生株と異なり*kaiC*の過剰発現はむしろ緩慢な転写促進効果を示した。つまり、ある条件ではKaiCは転写活性化にも関与しうるらしい。いっぽう、野生株では*kaiA*を構成的に過剰発現すると*kaiBC*の転写が促進される。この実験を*kaiC*の機能欠失株で行うと、それほど顕著な転写促進効果が見られなかった。このことから、KaiAによる転写活性化にKaiCが関与している可能性が高い。もし、この考え方でよければ、KaiAとKaiCは協調して*kaiBC*発現調節ループに関与していることになる。また、KaiCがなんらかの形で*kaiBC*の発現を正に調節しているとすれば、従来の単純なネガティブ・フィードバックに加え、ポジティブ・フ

イードバックがカップリングしたようなモデルを想定することができる（岩崎ら、準備中）。

では、蛋白質レベルでKaiAとKaiCの協調はどのようにして起こるのだろうか。いまのところ、KaiA、KaiB、KaiCの蛋白質の生化学的な作用機構はまったく不明である。しかしながら、いくつか断片的に生化学的性質が報告されている。その一つは、Kai蛋白質が様々な組み合わせで相互作用できるという知見である<sup>10)</sup>。これは、酵母two-hybrid系、*in vitro*、シアノバクテリア細胞抽出液を用いた免疫沈降法などによって示されており、いくつかのリズム変異によってKai蛋白質同士の相互作用強度が変化することも知られている<sup>10, 11)</sup>。第二の注目すべき性質はKaiC蛋白質のリン酸化である。KaiCは*in vivo*でCT16をピークとするリン酸化リズムを示す（西脇ら、準備中）。さらに、KaiCは*in vitro*で自己リン酸化能を示す<sup>12)</sup>。今のところ*in vivo*と*in vitro*のリン酸化の関係や、リン酸化の生理的意義は不明だが、KaiCの機能に密接に関与するものと期待できよう。そこで、KaiCの自己リン酸化アッセイの際に、等モル量のKaiAを添加すると、KaiCのリン酸化レベルが劇的に上昇した。KaiAによるKaiCのリン酸化促進効果は*in vivo*でも見られた。すなわち、*kaiA*欠失株においてリン酸化型KaiCは著しく減少しており、ほとんど確認できない。さらに、*kaiA*の様々なリズム変異体でKaiCのリン酸化レベルが大きく影響を受けていた。こうした事実は、KaiAとKaiCは蛋白質レベルの相互作用・翻訳後修飾制御を介して機能協調し、転写レベルの自己発現制御ループに関与していることを強く示唆

している。

### 3. SasA-KaiCによる二次ループ・モデル

KaiCはKaiA、KaiBのほかにSasAと呼ばれるヒスチジン・キナーゼと複合体を形成することが分かっている<sup>13)</sup>。ヒスチジン・キナーゼはバクテリアの主要情報伝達形式two-component系（二成分情報制御系）の構成因子である。この因子は、センサー領域で特定のシグナルやリガンドを関知し、ヒスチジン残基の自己リン酸化と共役応答因子へのリン酸化転移を介して、遺伝子発現など特定の生理活性を調節する役割を担う。SasAのセンサー領域はKaiBに相同性があり、KaiCが結合することができる。このことから、おそらくKaiC依存的なSasAのキナーゼ活性調節があるものと期待されている。その一方で、*sasA*破壊株で*kaiBC*の発現レベルが低下し、概日リズムは著しく低振幅化し、3時間ほど短周期化する。このことから、SasAとKaiCは互いに活性を制御するループ構造をなす可能性が高い。*sasA*破壊株では、概日発現遺伝子の多くは無周期化してしまう。SasAの構成的過剰発現は概日リズムを消失させ、また一過的な過剰発現は時刻依存的な時計の位相シフトを引き起こす。SasAは、KaiABCを中核とする基本振動発生の必須因子ではない。むしろ、KaiCを介して基本振動因子とカップリングする二次ループを形成することにより、基本振動を安定化させているのではないかと私たちは考えている。

興味深いことに、*sasA*破壊株におけるリズムの不安定化には、光照度依存性が観察されている<sup>13)</sup>。光照度が高いと無

周期化するが、低照度条件下では低振幅・短周期のリズムを観察できる。したがって、*sasA*は概日リズムの光照度補償とでも言うべき光調節機構（入力系）に参与していると思われる。さらに、*sasA*破壊株は連続明条件下では野生株と変わらず正常に生育できるが、明暗サイクル下では著しく増殖が抑制される。この性質は*kai*とは独立しており、*SasA*は概日制御以外にも明暗サイクル下での何らかの代謝に重要な機能を担っていると考えられる<sup>13)</sup>。

#### 4. グローバルな転写システムを介する高次ループ・モデル

今まで紹介してきたモデルは、すべて*kaiBC*プロモーター活性の制御機構を中心として考えられてきたものである。確かに*kaiBC*は顕著な高振幅発現リズムを示すが、そうしたリズムを示すのはなにも時計遺伝子に限ったことではない。逆に、シアノバクテリアではほぼすべての遺伝子のプロモーター活性に概日リズムが見られる<sup>14)</sup>。これはプロモーター・トラップという巧妙な手法によって明らかにされた。まず、ランダムなゲノムDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子に連結した融合レポーター・ライブラリーをシアノバクテリアに導入する。もし、プロモーターがその断片に含まれていればルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘発し、形質転換体は発光する。得られた発光クローンの発光パターンの経時変化を見ると、すべてのクローンに関して概日リズムが見られたのである<sup>14)</sup>。本来概日リズムを示さない大腸菌の最小プロモーター領域でさえ、シアノバクテリアに一旦組み込まれれば顕著な概日リズム発現を引

き起こす<sup>15)</sup>。したがって、シアノバクテリアではなんらかの基本転写機構ないし、それに影響を与える基本代謝機構自体が振動していると考えられるべきであろう。このとき、*kaiBC*の発現リズムはどのような意味を持つのだろうか？

まず、よく知られているショウジョウバエの例と比較して考えてみよう。ここでは概日発現する遺伝子は、DNAチップ解析によって調べられた限りで全ゲノム遺伝子の約5%程度らしい。したがって、基本転写システム自体が振動していると仮定する必要はない。むしろ個別の遺伝子に特異的な発現制御メカニズムが重要になってくる。事実、*per*や*tim*の発現制御は、bHLH-PAS族の（特異的）転写因子であるdCLK::CYC複合体による特定の*cis*エレメント（E-box）の制御を中核として理解されている<sup>16)</sup>。シアノバクテリアでも、従来は*per*の制御のように*kaiBC*の発現制御を中心としてモデルが構築されてきた。しかし、それはどの程度妥当なのだろうか？

片山らはKaiC蛋白質による*kaiBC*プロモーターへの抑制効果が、どの程度プロモーター特異的な応答なのかを検証した。プロモーター・トラップと誘導性過剰発現系をうまく組み合わせて調べた結果、*kaiC*過剰発現は、*kaiBC*のみならず多数のプロモーター活性に対してことごとく抑制的に作用することが見出された。抑制レベルは常に野生株における発現レベルの谷のレベルまでであった。このため、完全に発現がゼロレベルまで抑制される遺伝子は全体の数パーセントにとどまり、*kaiC*の構成的過剰発現株でも生育にはとりあえず支障がないらしい。いずれにせよ、この結果はKaiC蛋白質が自身のプロモーターにのみ働くの



ではなく、むしろゲノムワイドに作用することを強く支持している（中平・片山ら、準備中）。

そうすると、*kaiBC*プロモーター内の特定の *cis* エlementが *kaiBC* の発現リズムを引き起こすために必要なのかどうか問題となる。中平らは、*kaiBC* のプロモーターを大腸菌由来の誘導性プロモーターに置換しても、あるレベルで *kaiBC* を誘導させれば、ほぼ完全な高振幅リズムが維持できることを発見した（中平・片山ら、準備中）。つまり、*kaiBC* の発現リズム、ひいては概日リズムの発生には、*kaiBC* の特定の *cis* 領域はかならずしも必要ではない。*frq* 遺伝子を特定の誘導性プロモーターに置換したアカパンカビでは、さまざまなレベルで *frq* を誘導させてもリズムが回復することはない。ショウジョウバエでは、*tim* または *per* を特定の構成的プロモーターによって発現させてもリズムが観察される。しかし、得られたリズムはかなり低振幅になってしまう。さらに、その場合でも他方 (*tim* または *per*) の E-box による制御は維持されていることが必要と考えられている。

以上の結果から、私たちは Kai 蛋白質は特定の *cis* 配列ではなくなんらかの基本転写機構を直接または間接的に制御することによりゲノムワイドな概日発現を誘導し、その一環として *kaiBC* へのフィードバック制御が含まれると考えている。この際、興味深いことは KaiC 蛋白質が DNA 修復系の RecA 蛋白質や DNA ヘリカーゼの DnaB などの DNA 結合型 ATPase と弱い相同性を持つという事実である<sup>16, 17)</sup>。たとえば、KaiC が RecA や DnaB のように染色体 DNA の高次構造（トポロジー）に影響することによ

ってゲノムワイドな概日制御を実現しているといった可能性は魅力的である。原核生物においても、ゲノム DNA はヒストン様蛋白質や様々な DNA 結合蛋白質などとともに核様体 (nucleoid) とよばれる構造をとっている。この中には転写因子も存在し、大腸菌などでは、代謝変化に伴う染色体 DNA の高次構造レベルの制御が（特異的あるいは非特異的に）遺伝子発現を調節していることが知られている<sup>18)</sup>。シアノバクテリアから進化したと考えられる植物葉緑体のゲノム DNA の高次構造レベルで概日リズムが観察され、オルガネラ DNA 上の広範な概日遺伝子発現に重要であるとの指摘もある<sup>19)</sup>。したがって、この「染色体振動モデル」もあながち的はずれではないかも知れず、少なくとも現段階での有力な作業仮説の一つとして検討する価値があるだろう。

今回は詳しく述べなかったが、シアノバクテリアの概日システムは予想以上に深く必須の生体維持機構（たとえば染色体や基本転写装置）と結びついており、光合成などの代謝との関係性も今後の重要なテーマとなりつつある<sup>1, 5)</sup>。今回紹介した知見が、時計機能に特化した遺伝子群による従来の分子機構モデルから、細胞全体を対象とするシステムバイオロジーとしての概日リズム研究への橋渡しの契機のひとつとなることを期待している。

本研究は、名古屋大学の近藤研究室にて、近藤孝男教授、中平洋一（現・京都府立大学）、片山光徳（現・東京大学）、西脇妙子、北山陽子の各氏、および Susan Golden（Texas A&M 大学）、Stan Williams（Texas A&M 大学）両氏

との共同研究として行われました。多くの未発表データを拝借させて頂きました、これらの素晴らしい共同研究者の皆様にご心からお礼申し上げます。

また、いつも刺激的・生産的な議論・助言をいただいている松本顕（九州大学）、上田泰己（東京大学、山之内製薬）、小山時隆（名古屋大学）の各氏にも感謝いたします。

- 15) Katayama M et al.: J. Bacteriol. 181: 3516-3524 (1999)
- 16) Leipe DD et al.: Genome Res. 10: 5-16 (2000)
- 17) Mori T and Johnson CH: Semin. Cell Dev. Biol. 12: 271-278 (2001)
- 18) Ishihama A: Annu Rev. Microbiol. 54: 499-518 (2000)
- 19) Salvador ML et al: Mol. Cell. Biol. 18: 7235-7242 (1998)

### 参考文献

- 1) Iwasaki H and Kondo T: Plant Cell Physiol. 41: 1013-1020 (2000)
- 2) Ishiura M, et al.: Science 281: 1519-1523 (1998)
- 3) Xu Y et al.: EMBO J. 19: 3349-3357 (2000)
- 4) Young MW and Kay S: Nature Rev. Genet. 2: 702-715 (2001)
- 5) 岩崎秀雄・近藤孝男: 細胞工学 20: 801-807 (2001)
- 6) Aronson BD et al.: Science 263: 1578-1584 (1994)
- 7) Glossop NR et al.: Science 286: 766-768 (1999)
- 8) Brandes, C et al.: Neuron, 16: 682-692 (1996)
- 9) Stanewsky, R. et al: EMBO J. 16: 5006-5018 (1997)
- 10) Iwasaki H et al: EMBO J. 18: 1137-1145 (1999)
- 11) Taniguchi Y et al.: FEBS Lett. 496: 86-90 (2001)
- 12) Nishiwaki T et al.: PNAS 97: 495-499 (2000)
- 13) Iwasaki H et al.: Cell 101: 223-233 (2000)
- 14) Liu Y et al: Genes Dev. 9: 1469-1478 (1995)