

藍色細菌の生物時計の分子遺伝学的研究

Molecular genetic approach to clock genes in cyanobacteria

代表研究者 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所助手 石浦正寛
Assist. Prof., National Institute for Basic Biology
Masahiro ISHIURA

協同研究者 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所助手 近藤孝男
Assist. Prof., National Institute for Basic Biology
Takao KONDO

We have used a luciferase reporter gene and continuous automated monitoring of bioluminescence to demonstrate unequivocally that cyanobacteria exhibit circadian behaviors that are fundamentally the same as circadian rhythms of eukaryotes. A promoterless segment of the *Vibrio harveyi* luciferase structural genes (*luxAB*) was introduced downstream of the promoter for the *Synechococcus psbA1* gene, which encodes D1 protein of the photosystem II. This reporter construct was introduced into chromosome of *Synechococcus* sp. PCC7942 by homologous recombination, a strain for which genetic transformation is well established, and bioluminescence was monitored under conditions of constant illumination following entrainment to light and dark cycles. The reporter strain, AMC 149, expressed a rhythm of bioluminescence which satisfies the criteria of circadian rhythms: persistence in constant conditions, phase resetting by dark/light signals, and temperature compensation of the period. We also observed rhythmic changes in levels of the native *psbA1* message following light/dark entrainment. The behavior of this prokaryote disproves the dogma that circadian mechanisms must be based on eukaryotic cellular organization. Moreover, the cyanobacterial strain described here provides an efficient experimental system for molecular analysis of the circadian clock.

研究目的

多くの生物の生命活動はほぼ24時間周期のリズムを呈し、このリズムは生物時計により制御されている。人間もその例外ではなく、生物時計の支配の下で日々の営みを行っている。技術革新が進み、高度に文明化した現代社会では、人間は自らの生物時計の進行に反する生活を余儀なくされ、その結果多くの人々が自律神経失調に悩まされている。典型的な例は、夜間勤務や24時間交替勤務による癒しがたい疲労感、ジェットラグによる時差ボケである。今後さらに急速に高度化する技術社会において、ますます人間は24時間社会や地球的社会への迅速な対応を余儀なくされる。しかるに人間はあくまでヒトという生物時計に支配された動物の一種にすぎず、よりいっそう

不適応に苦しむことが予想される。生物時計の本体を分子レベルで解明し、調節の可能性と適応の限界とを認識することが重要である。学問的にも、生物時計は哺乳動物では行動学や中枢神経系の、ヒトでは生理学や病理学、臨床薬理学、外科学、あるいは行動心理学上の重要テーマである。植物でも光周性とも関連して生物時計は重要である。

現在ではこれまでの研究により、ヒトも含めた生物に共通の生物時計の存在が想定されている。しかし、従来の生理学的手法だけでは、生物時計を分子レベルで解明することはほとんど不可能であり、また時計の本体が全く不明の現状では、生化学的手法の適用も有効ではない。1980年代に入って、時計の突然変異体を分離して遺伝子から

時計の本体に迫ろうとする研究がアカパンカビやショウジョウバエで始まった。最近になって、より下等な真核生物である酵母や原核生物である藍色細菌（藍藻）でも同様の生物時計現象が確認されつつある。酵母や藍色細菌はゲノムサイズも小さく、遺伝子操作も容易であり、遺伝子クローニングで時計遺伝子の構造と機能の解明に迫ることが従来の真核生物よりも容易と考えられる。普遍的な生物時計の存在を想定するならば、下等生物の単純な実験系から始めて、最終的にはヒトの時計に至るアプローチが考えられる。ところが、これまでに分離された時計の突然変異体は余りに数が少なく（アカパンカビとショウジョウバエで総計 13 個の遺伝子座が報告されている）、突然変異から時計の全体像を捉えるには至っていない。これは、時計に異常のある突然変異体を一度に多数検定できる簡便な測定系がないことが最大の原因である。したがって、酵母や藍色細菌などで時計の突然変異体を同時に多数検定できる簡便な自動測定系を開発して、多種多様な突然変異体を多数分離することが当面最大の課題である。

本研究計画では、藍色細菌で生物時計を分子遺伝学的に研究する一環として、1) まずバクテリアのルシフェラーゼ遺伝子 (*luxAB*) を時計のレポーターとして藍色細菌のゲノムに組み込み、時計の進行を生物発光リズムとしてフォトマル（光電子倍增管）で連続的に追跡することを試み、これに成功した。2) ついで、この藍色細菌に付加した人工的な生物発光リズムを詳細に解析することにより、原核生物にも真核生物と同様の生物時計が存在することを疑問の余地なく証明した。今後の研究の展開で、我々が開発した生物発光を利用した藍色細菌の生物時計の実験系は非常に効率の良い有用な実験系となるであろう。

研究経過

近年、バクテリアやホタルのルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして利用し、遺伝子発現を生物発光として直接モニタしようとする斬新な試みがなされつつある。一方、単細胞性の藻類の一種である夜光虫 (*Gonyaulax*) では生物発光が概日性リズムを示し、フォトマルを使った自動測定系が

すでに確立されている。我々は、これらの知見を統合して、まず遺伝子工学的に藍色細菌のゲノムにバクテリアのルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、いわゆる「人工夜光虫」とも呼ぶべき生物を作成し、生物時計の研究に応用することを試み、それに成功した。

研究成果

我々が研究材料に選んだ藍色細菌は単細胞性で遺伝子移入が容易な *Synechococcus* sp. PCC7942 (以下 R2 と呼ぶことにする) である。R2 ではこれまで光合成系の遺伝子の解析が精力的に行われてきた。生物時計に制御された遺伝子の候補としては、まず光合成系 II (PSII) の反応中心の主要蛋白質 D1 をコードする *psbAI* 遺伝子を選んだ。これはこの蛋白質が光合成に多量に必須であるにもかかわらず、明条件下（光合成条件下）では急速に分解される不安定な蛋白質であることによる。すなわち、D1 蛋白質の合成と分解は明暗条件に強く影響されるので、生物時計の支配下にある可能性が高いと我々は推定した。さらにレポーター遺伝子として、*Vibrio harveyi* のルシフェラーゼをコードする *luxAB* 遺伝子を用いた。ホタルのルシフェラーゼではなくバクテリアルシフェラーゼを選んだ理由は、基質 *n*-decanal に膜透過性があり、生細胞に害なく直接与えることが可能だからである。まず *psbAI* のプロモータ (*PpsbAI*) の下流に *luxAB* のコード領域を連結し、*PpsbAI*-*luxAB* ハイブリッド遺伝子を作成した。R2 は相同的遺伝子組換え能が非常に高く、R2 ゲノム DNA の一部を有するプラスミドを細胞内に移入すると、例えばそれが R2 で自己増殖可能なプラスミドであっても、R2 でプラスミドを安定に保持することはできない。相同部分が短い場合には、プラスミド DNA 全体が相同部分を介してゲノムに挿入され、相同部分が長い場合には、プラスミドとゲノムの相同部分同士の間で置換が起こる。R2 では一般に挿入よりは置換の方がはるかに高頻度で起こることが知られている。そこで、このハイブリッド遺伝子を、ゲノム上の特定の位置、即ち DNA 断片を挿入しても細胞の生育に全く影響を与えない、オペロンとオペロンの連結部位（以

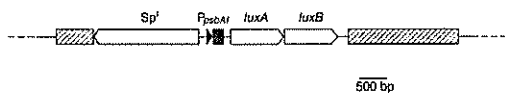


図1. AMC 149株のニュートラルサイトに挿入された *PpsbAI-luxAB* ハイブリッド遺伝子の構造。Sp^I, オメガカセット: *PpsbAI*, *psbAI* プロモータ; *luxA*, *luxA* のコード領域; *luxB*, *luxB* のコード領域; 斜線部分, ニュートラルサイトの隣接領域。矢印は遺伝子の方向を示す。

後ニュートラルサイトと呼ぶ)に挿入することを考えた。まずこのようなニュートラルサイトを含む R2 ゲノム領域をプラスミドベクターにクローニングし、ニュートラルサイトにハイブリッド遺伝子を挿入した。さらに置換体の選択を薬剤処理で容易に行うために、スペクチノマイシン/ストレプトマイシン抵抗性遺伝子を有するオメガカセットをハイブリッド遺伝子の上流のニュートラルサイトに挿入した。得られたプラスミドを R2 に遺伝子移入し、スペクチノマイシンあるいはストレプトマイシンで選択し、オメガカセットに連結したハイブリッド遺伝子がニュートラルサイトに挿入されたトランスフォーマントを得た(図1参照。以後このトランスジェニック R2 を AMC149 株と呼ぶ)。AMC149 の生育は調べた限りでは R2 と同じであった。

AMC149 を生理条件下で液体静置培養しながら、フォトマルで生物発光を連続的に自動測定した。得られた生物発光は比較的強くフォトマルで容易に測定できた。細胞を予め 12 時間明-12 時間暗 (12L-12D) の明暗周期下で培養し、時計をこの周期に同調させてから、恒明条件 (LL) 下で培養しながら生物発光を連続的に測定した。すると、30°C で培養した場合には、およそ 24 時間周期の発光リズムが少なくとも 1 週間以上の長期にわたって観測された(図2)。発光の最初の山は恒明条件へ移行後 12 時間後に、その後の山は 24 時間間隔で認められた。明暗周期を反転させた場合には、ちょうど逆相のリズム(山が谷に、谷が山に)が得られた。この結果は、発光リズムが内在性の概日性リズムであることを示唆している。

さらに、明暗周期の代わりに 4 時間の単一の暗

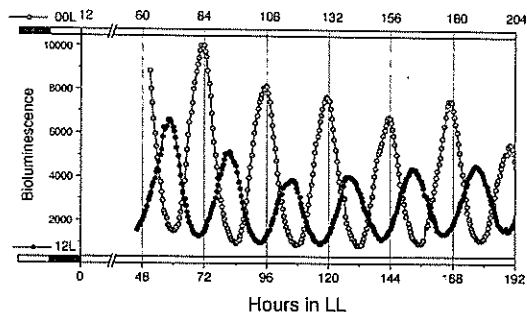


図2. 恒明条件下における AMC149 の生物発光リズム。細胞はあらかじめ 12 時間位相の異なる二つの 12L-12D 明暗周期で培養し、恒明条件 (LL) 下で生物発光を連続測定した。

パルスがリズムの位相を変えることができるかどうかを、恒明条件下のさまざまな時点で検討した。暗パルスの位相に対する効果は、パルスを与える時点の関数であり、暗パルスは位相の前進あるいは後退をもたらした。明暗パルスにより位相変位が起こる事実は、このリズムが概日性リズムであることを示している。

次に周期がどのように温度に依存するかを検討した。細胞をそれぞれ 25, 30, 36°C で培養し、リズムの周期を測定した。周期はそれぞれ、25.5, 24, 23 時間であった。Q₁₀ を計算すると、およそ 1.1 の値が得られた。この値は周期がほとんど温度に依存しないこと、すなわち周期の温度補償性を示している。この生理学的特性は真核生物の概日性リズムの重要な特性の一つである。

発光リズムが実際には何に由来しているかを明らかにするため、リズムの山と谷の時点で細胞抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。活性は山で高く、谷で低かった。したがって、生物発光リズムは一応細胞内のルシフェラーゼ蛋白質量の変動を反映していると考えられる。このことは、今後さらに抗体を使ったウェスタンブロットティングによって確認する必要があると考えている。ルシフェラーゼの mRNA 量をノーザンブロットティングで調べたところ、ほぼ発光リズムに相当する mRNA 量のリズムが得られた。以上の結果は、*PpsbAI/luxAB* ハイブリッド遺伝子の発現が概日性リズムを呈することにより、生物発

光の概日性リズムが生じたことを意味している。さらに、野生株の R2 で *psbAI* mRNA の変動を調べたところ、これも同様のリズムを示すことが判明した。このことは、*psbAI* 本来の発現が生物時計に支配されていることを示しており、その生理学的意義を今後明らかにする必要がある。

今後の課題と発展

最近になって原核生物（バクテリア）である藍色細菌にも真核生物と同様の生物時計が存在することを示唆するデータが報告されるようになってきた。しかしながら、決定的なデータが少ないこともあり、これまで多くの生物時計研究者は、原核生物の生物時計には懐疑的であった。

すでに述べてきたように、我々は、生物時計のレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を遺伝子工学的に藍色細菌のゲノムに組み込み、得られたトランスジェニック細菌の生物発光をフォトマルで自動計測することにより、藍色細菌の生物時計の自動測定系を確立することに成功した。この系を使うことにより、藍色細菌の生物時計の生理学的特性を詳細に解析することが初めて可能になった。その結果、真核生物で認められる生物時計の三つの生理学的特性、すなわち恒条件下でのリズムの自由継続性、明暗刺激によるリズムのリセット（位相合わせ）、温度補償性がすべて藍色細菌の生物発光リズムでも認められ、藍色細菌にも典型的な生物時計が存在することが確定的になった。最近の我々の研究によると、遺伝子発現の生物時計による制御は R2 では *psbAI* だけではなく、多様な遺伝子で認められる。また、*Synechocystis* sp. PCC6803 や *Anabaena* sp. PCC 7120 などの藍色細菌でも一般的に認められる現象であることが明らかになってきた。このことが他の細菌にどの程度普遍化できるか大変興味深い。この点についても今後研究を深めて行きたい。藍色細菌と真核生物で時計の分子機構が同一であると言う証拠はまだ得られていないが、少なくとも機能的に非常によく似た機構が存在することは明らかである。生物時計の進化を考える上でこれは非常に重要な知見である。また生物時計の

分子機構を解明する上でも大変重要である。すなわち、現時点では藍色細菌にも真核生物と同様の時計機構が存在するとの作業仮説を立てて、研究を進めることができる。このような立場に立つならば、まず分子遺伝学的な研究が容易な藍色細菌で時計の分子機構を解明し、その知見に基づいて、真核生物の機構に迫ることができるはずである。我々はこのような立場に立って、藍色細菌で精力的に研究を進めている。手順は次のように行う。1) 発光リズムを寒天上のコロニーで自動測定する。2) 多数のプレートを同時に自動計測し、各コロニーの発光リズムを自動的に解析できる、多検体生物発光自動計測システムを開発する。3) 発光リズムの生理学的特性に変異を示す突然変異体を分離する。4) 突然変異を相補する遺伝子をクローニングして、解析する。5) この遺伝子産物の構造と機能を分子遺伝学的に解析する。6) このような手法で時計の分子機構を藍色細菌で系統的に理解する。7) 真核生物で遺伝子ホモログを探索し、藍色細菌での知見を真核生物に応用する。我々は既に (1) から (3) までの段階を完了し（論文投稿中：Kondo, T. and Ishiura, M.: Circadian rhythms of cyanobacteria: Monitoring the biological clock of individual colonies by bioluminescence. To *J. Bacteriol.*）、藍色細菌で生物時計の分子遺伝学的研究を推進する基盤を確立した。これまでに真核生物で知られている周期に関する多様な突然変異のすべてに対応する多種多様な突然変異体を我々は既に分離している。現在、これらの変異を相補する遺伝子のクローニングに精力的に取り組んでいる。早晚遺伝子のクローニングが達成されるであろう。これからの研究の展開に注目して頂ければ幸いである。

発表論リスト

- 1) Kondo, T., Strayer, C. A., Kulkarni, R. D., Taylor, W., Ishiura, M., Golden, S. S., and Johnson, C. H.: Circadian rhythms in prokaryotes: Luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 5672-5676 (1993).