

論文の内容の要旨

論文題目 Circadian Rhythms and Cell Division Cycles in Cyanobacteria
(シアノバクテリアにおける概日リズムと細胞分裂サイクル)

氏名 盛 徹也

概日性リズムと細胞分裂はともに生物に普遍的に見られる周期振動現象である。概日性リズムは、単細胞原生動物から高等動植物まで調べられた限りほとんど全ての真核生物に存在する。これまでの研究から概日性リズムが細胞分裂によるものでないことは明らかであるが、概日性リズムの位相進行が細胞分裂中も持続するかどうかは議論の対象となってきた。これまでのところ細胞分裂周期が概日周期より短い培養条件において概日リズムは記録されていない。真核生物では、時計遺伝子の発現や細胞核膜を介した時計タンパク質の輸送が計時機構の重要なプロセスと考えられており、細胞分裂は概日時計に影響をおよぼすと考えられている。近年、原核生物である光合成細菌のシアノバクテリアにおいても広範な生理・生化学現象に概日性リズムが存在することが明らかになってきた。また分子遺伝学的手法を用いた研究によりシアノバクテリア概日時計の分子メカニズムの解明が急速に進みつつある。そこで本研究では、シアノバクテリア (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) における細胞分裂周期と概日時計の関係性および概日時計の分子メカニズムについて検討を行った。

まず本論文の第1章では、概日時計の特徴やこれまでの研究の推移などについて概括的に論じた。

第2章では、細胞分裂周期が概日周期より短い培養条件において細胞分裂のタイミングが概日時計

によって制御されるかどうかを検討した。シアノバクテリアの培養液は、平均世代時間が約10時間になるように新鮮培地によって連続的に希釈された。この連続希釈培養における細胞分裂（細胞数密度）、DNA含量、細胞サイズ、および遺伝子発現のレベル（光合成遺伝子のプロモータ活性をルシフェラーゼレポーターでモニター）を経時的に測定した。培養液を24時間明暗周期(12時間明期、12時間暗期)の照明条件下に置いたとき細胞分裂は明期中にのみおこり、暗期には完全に停止した。この細胞分裂のパターンは培養を連続照明下に移した後も持続し、細胞分裂頻度が低くなるあるいは分裂が停止する位相が約24時間の周期で観察された。これまでに光合成遺伝子の発現リズム（生物発光でモニター）の周期が野生株よりも短いあるいは長い突然変異株が多数単離されている。そこで短周期株および長周期株における細胞分裂リズムの周期を調べたところ、細胞分裂リズムの周期はそれぞれ短縮および伸長していた。これらの結果は、細胞分裂のタイミングが概日時計の調節下にあることを示唆する。また平均世代時間が約10時間の連続希釈培養において光合成遺伝子のプロモータ活性（生物発光）の変化にも概日性リズムが観察された。このことは、遺伝子発現および細胞分裂のタイミングを調節する概日時計の位相進行が細胞分裂による細胞の形態的・代謝的变化に影響を受けずに安定して継続することを示唆している。

第3章では、前章で示した細胞分裂のリズムが *kaiC* 遺伝子を必須とする概日時計の調節下にあるかどうか、*ftsZ* 遺伝子の発現調節による細胞分裂のタイミング制御の可能性、細胞分裂が完全に停止した条件下においても概日時計の位相進行が持続するかどうかについて検討した。まず、細胞分裂のリズムが *kaiC* 遺伝子を必須とする概日時計の調節下にあるかどうかを調べるために *kaiC* 遺伝子欠損株を作成し、細胞分裂頻度の変化を調べた。*kaiC* 遺伝子欠損株を野生株と同じ条件で培養すると、24時間明暗照明下では野生株とほぼ同様の分裂パターンを示した。しかしながら培養を連続照明下に移すと細胞分裂頻度のリズムは完全に消失した。このことはシアノバクテリアにおける細胞分裂のタイミングが *kaiC* 遺伝子を必須とする概日時計の調節下にあることを示唆している。次に、概日時計による細胞分裂周期の制御メカニズムを明らかにするために細胞分裂遺伝子である *ftsZ* 遺伝子をクローニングしその発現パターンを調べた。*S. elongatus* の *ftsZ* 遺伝子は、393アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしており、翻訳産物のアミノ酸配列は他のバクテリアおよび高等植物の葉緑体に存在する FtsZタンパク質に対して高い相同性を示した。シアノバクテリア *ftsZ* 遺伝子は、明暗周期の下では細胞分裂のおこる明期に発現し、細胞分裂が停止する暗期に発現は見られなかった。同遺伝子の恒常下における発現パターンを調べるために同遺伝子のプロモータ領域をバクテリアルシフェラーゼ遺伝子に融合したレポーターコンストラクトを作成し、野生株シアノバクテリアに導入した。レポーター

株は連続照明下で生物発光のリズムを示し、その周期は他のプロモータ融合レポーター株の発光リズムおよび細胞分裂リズムの周期と同様約24時間であった。生物発光のリズムは主観的夜のはじめ（CT12前後）に最大位相、主観的朝のはじめ（CT0前後）に最小位相を示した。連続照明下において細胞分裂は主観的夜のはじめにその頻度が低下することから、概日時計による細胞分裂のタイミングの調節は *ftsZ* 遺伝子の周期的発現制御を介して行われるものではないことが示唆される。大腸菌等において FtsZ タンパク質は細胞分裂における隔壁形成に重要な役割を担うタンパク質であり、その過剰発現は細胞分裂を阻害することが知られてい

る。そこで細胞分裂を阻害した条件下における概日性リズムの有無を調べるために、*ftsZ* 遺伝子を過剰発現させたルシフェラーゼレポーター株における生物発光量の変化をモニターした。FtsZ の過剰発現により細胞分裂は完全に阻害され細胞はフィラメント状になったが、生物発光によりモニターされた *psbAI*、*kaiBC* および *ftsZ* 遺伝子のプロモータ活性はリズムを示した。このことは、概日性リズムの位相進行が細胞分裂には依存しないことを示唆する。

第4章では、概日時計の計時機構における時計遺伝子の周期的発現の重要性について検討を行った。シアノバクテリア *kai* 遺伝子クラスタにある *kaiA*、*kaiB* および *kaiC* 遺伝子は概日時計の発現に必須の時計タンパク質である KaiA、KaiB および KaiC タンパク質をコードしている。これまでの研究から時計遺伝子の周期的発現とその遺伝子産物である時計タンパク質による時計遺伝子の発現に対する阻害的制御（負のネガティブフィードバック）が概日時計の計時機構に重要であると考えられている。しかしながらシアノバクテリアにおいては、時計タンパク質の細胞内レベルの変動は明らかになっていない。そこで、KaiA、KaiB および KaiC タンパク質それぞれに特異的な抗体を作成し、ウェスタンブロッティング法により時計タンパク質の蓄積量の変化を調べた。その結果、恒常下において KaiB および KaiC タンパク質の蓄積量が強固な概日性リズムを示した。次に細胞内における KaiC タンパク質のレベル変動が計時機構に重要であるかどうかを検討するため、薬剤誘導可能なプロモータを使って KaiC タンパク質を様々な時刻に異ったレベルで発現させ概日性リズムの位相に及ぼす影響を調べた。生物発光でモニターした概日性リズムの位相は、発現を誘導した時刻および発現のレベルに依存して変化した。また KaiC タンパク質の発現誘導による位相シフトは同タンパク質の合成をタンパク質合成阻害剤で阻害することによりほぼ完全に抑制された。シアノバクテリアでは光合成によるエネルギー供給が絶たれた連続暗黒下およびタンパク合成阻害剤によって著しくタンパク合成を阻害した条件下においても概日時計が正常に継続することが確認された。そしてそれらの条件下においても KaiC タンパク質の蓄積量にリズムが観察された。これらのデータは、KaiC タンパク質の周期的な発現がシア

ノバクテリアにおける時計メカニズムの重要な要素であることを強く示唆するものである。

以上、本研究では、シアノバクテリアの（１）細胞分裂のタイミングが概日時計の制御下にあること、（２）概日時計の位相進行は細胞分裂周期が概日周期より短い培養条件下および分裂が完全に停止した条件下においても安定して継続し細胞分裂周期には依存しないこと、さらに（３）分子レベルでは時計タンパク質 KaiC の周期的発現変動が計時メカニズムにとって本質的であることを明らかにした。