

「植物共生細菌における時計遺伝子オルソログ *kaiCBR* を介した制御機構の解明」
 京都先端科学大学 バイオ環境学部 井口 博之

1. 研究の背景と目的

自然環境には約 24 時間周期の昼夜変化があり、それに伴って温度、光量、水分量などの変化が生じている。この昼夜変化に効率的に適応するための生体システムに概日時計がある。概日時計は、昼／夜にそれぞれ必要となるレベルに遺伝子発現を調節するために、自発的な昼夜サイクルの発現リズムを刻む。ヒト、植物、酵母、バクテリアなどに分布しているが、それぞれの生物で利用される因子は全く異なる。

植物葉上環境は、昼夜変化の直接的な影響、およびそれに起因する植物代謝の日周変化の影響を受けると考えられるため、そこに生息する微生物は昼夜変化への影響を強く受け、対応が必要となる（図1）。原核生物で概日時計を持つことが知られているのはシアノバクテリアだけであるが、その時計の中枢を担う *kaiC* 遺伝子のオルソログが細菌に広く分布している。申請者は植物共生細菌 *Methylobacterium extorquens* が保有する *kaiC* 遺伝子の植物葉上での機能に興味を持ち研究を進めてきた。本菌は2つの *kaiC* 遺伝子オペロン (*kaiC1-kaiB2-kaiB1-kaiR1*, *kaiC2-kaiR2*) を保有し（図1）、各 *kaiC* が正／負の制御機能を持って UV 耐性と熱耐性のレベルを協調的に調節し、植物上での生育に寄与することを報告している（Iguchi et al., Environ Microbial Rep. 2018）。

シアノバクテリアでは KaiC、KaiB、KaiA の3種のタンパク質の相互作用により KaiC のリン酸化レベルが3段階に調節され、時計のリズムが生じる（図2）。ところが *M. extorquens* は、各2コピーずつの KaiC、KaiB、KaiR を持ち（各組の identity は40%程度）、シアノバクテリアには不在の因子 KaiR も存在することから、これら合計6因子を介しどのようにして協調的な制御を行っているのかは全く不明である。またこれまでの解析は *in vitro* が主となっており、植物葉上での Kai の機能状況も不明である。24 時間のうちのいつ、またどういった葉上の環境条件で *kai* 遺伝子の発現や KaiC のリン酸化状態が高まっているか不明である。そこで、植物共生細菌 *M. extorquens* における2コピーの Kai を介した制御機構と葉面環境における *kai* 遺伝子の機能の解明を目指して研究を行った。

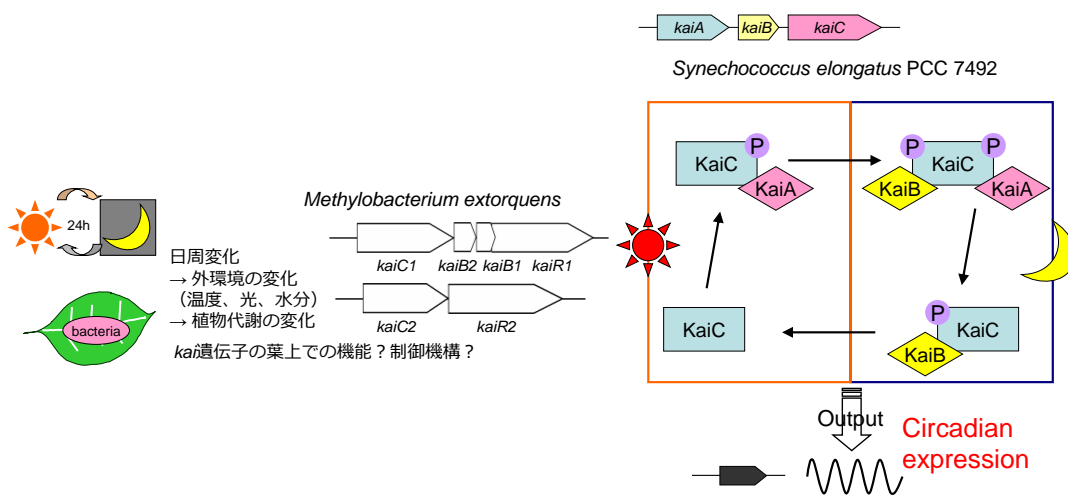


図1. *M. extorquens* の *kai* 遺伝子と葉上で求められる日周変化への対応

図2. シアノバクテリアの時計遺伝子を介した概日リズム発現

2. 研究方法・研究内容

Kai タンパク質間の相互作用の解析を酵母 two-hybrid 法により行った。タカラバイオ社から販売されている酵母 two-hybrid システムを用い、付属のプラスミドを用いて酵母内でエピトープタグを結合した KaiC、KaiB、KaiR タンパク質を生産させた。western blot により正常なタンパク質の生産を確認した。two-hybrid した株（KaiC と他の Kai タンパク質とを共発現）が選択培地で生育できたことを以て、相互作用有りと判断した。

KaiR と相互作用するタンパク質を探索するため、pull-down アッセイを行った。*M. extorquens* において、高発現プロモーターが入った pCM80 に *kaiR* 遺伝子とエピトープタグ配列を導入して発現させた。*M. extorquens* の生産するタンパク質に対して pull-down 実験を行った。抽出されたタンパク質を MS 解析することにより、KaiR と相互作用する制御下流の遺伝子（タンパク質）を同定しようとした。

各 *kai* 遺伝子が KaiC1/KaiC2 いずれの制御系へ帰属しているか明らかにするため、各 *kai* 遺伝子破壊株の表現型を調べた。*kaiC1*、*kaiC2* による制御が判明している UV 耐性を指標として各破壊株が $\Delta k ai C 1$ 、 $\Delta k ai C 2$ のいずれと同じ表現型を表すか、および相互作用の結果と合わせて、いずれの制御系へ帰属しているかを示そうとした。

葉上における *kai* 遺伝子の機能を明らかにするため、シロイヌナズナ葉上での *kai* 遺伝子の発現状況を調べた。*kaiC* 遺伝子プロモーターとレポーター遺伝子を連結させたレポーター系を構築した。これを導入した *M. extorquens* をシロイヌナズナ葉上で生育させ、レポーターのレベルを経時的に測定した。KaiC のリン酸化レベルを調べるため、phos-tag アクリルアミドを用いた電気泳動を行い、western blot によりリン酸化バンドを検出した。

3. 研究成果

(3-1) Kai タンパク質間の相互作用

酵母 two-hybrid システムを用いて各 *kai* 遺伝子を酵母内で発現させたところ、western blot により各 KaiC、KaiB、KaiR の生産を微量ではあるが確認できた。続いて two-hybrid アッセイを行い、評価培地での生育が確認できたことから、KaiC と KaiR が相互作用することが明らかになった（図3）。

次に *M. extorquens* において発現を試みたところ、両 KaiC は生産させられたが、KaiR をうまく生産させられなかった。そこで可溶化を促進するエピトープタグを検討し、HA を用いることで KaiR1 の生産に成功した。KaiR2 の生産は未達成で続く検討が必要であるが、まずは KaiR1 を用いて pull-down アッセイを進めようとした。pull-down アッセイの実験条件を確立するために、相互作用が判明した KaiR1 と KaiC1 で実験を行った。抗 HA 抗体ビーズに KaiR1 を結合させ、そこに KaiC1 が相互作用して結合するか調べたが、pull-down の溶出液に KaiC1 は検出されなかった。Kai タンパク質間の結合が弱いと考え、タンパク質クロスリンカーの使用も試みたが、検出されなかった。今後、実験条件をさらに検討して進めていく予定である。



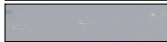

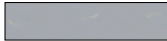
Prey	Bait	
KaiC1	KaiC2	
	KaiB1	
	KaiB2	
	KaiR1	
	KaiR2	

図3. 酵母 two-hybrid 法の結果：
KaiC1 と相互作用するタンパク質

(3-2) *kai* 遺伝子破壊株の表現型

kai 遺伝子破壊株の表現型から各 *kai* 遺伝子の制御系の帰属を調べるため、表現型が現れやすい培養条件を検討した。制御系の種類として、アミノ酸配列の系統樹で異なるクレードに属する KaiC1 と KaiC2 の 2 つの制御系の存在を考えている。検討した条件で野生株と各遺伝子破壊株の UV 耐性を比較した結果、 $\Delta kaiC2$ と $\Delta kaiR2$ が同じ表現型を示し、上記相互作用の結果も含めて同じ制御経路に属していると考えられた。系統樹の形状から KaiC2 と KaiR2 は同じ系統進化をとったことが示唆されており、本結果を裏付けることができる。一方で、 $\Delta kaiC1$ と $\Delta kaiR1$ が異なる表現型を示し、相互作用の結果から説明できず複数の因子が関与する複雑な制御がある可能性が示唆された。

(3-3) *kai* 遺伝子の葉上での発現レベル

葉上における *kai* 遺伝子発現のモニタリングには、測定の簡便さと高感度を理由としてレポーターとしてルシフェラーゼを用いることにした。様々なルシフェラーゼ遺伝子が販売されているため、発現と感度を達成できるものを検討した。luc+, Eluc, Rluc の中で、luc+のみが活性を示した。さらに発光試薬の製品と反応条件を検討し、ルミノメーターを用いて葉上から回収した小数の *M. exorquens* の発光を検出できるようになった。

本実験系を用いて、シロイヌナズナ葉上に生育させた *M. exorquens* の発現モニタリングを行った。明 12 時間/暗 12 時間のサイクルで生育させたところ、 P_{kaiC1} は明暗で発現レベルに差は認められなかった。 P_{kaiC2} は暗に高く、明に低くなっていた。このことから *kaiC2* は夜に発現レベルが高いと考えられる。*kaiC2* の転写は熱と浸透圧で誘導されることがわかっている。それ故に、夜に葉上の浸透圧が上昇して *kaiC2* 発現を誘導しているのか、もしくは未知の因子が夜に誘導あるいは昼に抑制しているのかと考えられ、今後その *kaiC2* 発現に影響を与える葉上の因子の同定を進めていく。

(3-4) KaiC の葉上でのリン酸化レベル

KaiC のリン酸化レベルを検出するため、まず液体培養の *M. exorquens* 菌体から抽出したタンパク質を試料として、phos-tag アクリルアミドを用い電気泳動および western blot 法による条件検討を行った（図 4）。

続いて、シロイヌナズナ葉上に生育させた *M. exorquens* の KaiC を western blot で検出する方法を検討した。5~10 の植物個体から菌を回収、細胞破碎後に TCA 沈殿で濃縮、超高感度化学発光検出試薬を使用することで KaiC バンドを検出できた。

両検討した条件にて、葉上に生育させた *M. exorquens* の KaiC リン酸化レベルの検出を試みた結果、ノイズが多く見られたがバンドを認めることができた。今後、よりクリアなリン酸化バンドを見られるようタンパク抽出・精製方法を検討した後、昼夜や各栽培ステージから菌を回収して葉上での KaiC リン酸化状態の変化を調べていく予定である。

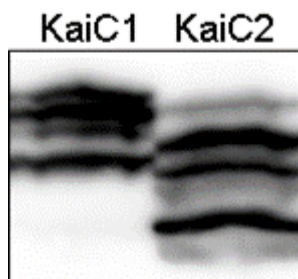


図 4. 液体培養から抽出した KaiC1 と KaiC2 のリン酸化バンド。リン酸化状態の違いにより 4 本のバンドが見える。

4. 生活や産業への貢献および波及効果

概日時計は地球の日周期に効率的に適応するための非常に高度且つユニークな機能であり、用いられる因子は異なるものの高等生物から細菌にまで分布することから、時計機能・遺伝子の進化や制御メカニズムは広く関心が持たれている。本研究で対象とした *kai* 遺伝子は細菌に分布し、時計とそれ以外の機能に進化したと考えられている。それ故に、本研究を深化させることによって、細菌における新奇の環境適応システムに関する知見提供のみならず、時計との差異の理解を深めることで時計遺伝子の進化の理解につながり、さらには生物時計の人工創出の道にもつなげていけると考えている。

植物共生細菌は環境に低負荷な農薬・生長促進剤として有望であり、申請者は選抜した *Methylobacterium* 菌株を水田のイネに散布することでイネ籾増収を達成している。しかし環境変動が激しい自然環境中では散布した微生物の植物への定着効率が低いという問題があった。本研究により、本菌の *kai* 遺伝子は環境シグナルや植物因子に応答して自身のストレス耐性を調整し、葉上での生育を有利に進めるのに寄与していると考えられる。このように *kai* 遺伝子など微生物が持つ環境適応能力についての理解深化を進めていくことで、植物定着能力の高い細菌株の選抜や、効果的な接種タイミングなど接種方法の開発に資する成果となり、農業における微生物資材の利用拡大につながることを期待できる。