

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14782

研究課題名(和文) カサノリにおける生物発光リアルタイム測定～生物時計PT0の解明に向けて

研究課題名(英文) Realtime monitoring of bioluminescence reporter in Acetabularia for analysis of circadian rhythms

研究代表者

石浦 正寛 (Ishiura, Masahiro)

名古屋大学・遺伝子実験施設・名誉教授

研究者番号：20132730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物時計には細胞核における遺伝子の転写を介さずに自律振動する機構が備わっている。本研究では、その機構の研究に有用であると期待されるカサノリ (*Acetabularia ryukyuensis*) において、ルシフェラーゼレポーターを用いた概日リズムの測定系の確立を試みた。ルシフェラーゼレポーターの確立にはいくつかの問題があったが、クロロフィル遅延蛍光の測定系によって、目的の自律振動を観察することに成功した。さらに、リン酸化がその機構に関わっていることを示唆する結果を得た。この測定系および知見は、転写を介さない生物時計の自律振動機構の解明に有用である。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks can oscillate without gene transcriptions in the cell nucleus but its mechanisms remain unknown. In this study, we tried to develop a luciferase-based monitoring system to monitor the oscillation in *Acetabularia* which is expected to contribute to the studies on the oscillatory system. Because of some difficulties in the development of luciferase reporter, we failed to detect significant luciferase signal from *Acetabularia* cells. However, on the other hand, we succeeded in monitoring of the oscillation by measuring the delayed light emission of chlorophylls. In addition, we found that the oscillation is sensitive to a phosphatase inhibitor, suggesting importance of phosphorylation in the oscillatory mechanism. This monitoring system will be useful for studies on the uncharacterized oscillatory mechanism in *Acetabularia*.

研究分野：生物時計

キーワード：生物時計

1. 研究開始当初の背景

概日リズムはほとんど全ての生物に見られる約 24 時間周期のリズムであり、生物時計によって作り出される。生物時計の機能に必須の遺伝子は時計遺伝子と呼ばれ、これまでにいくつかの生物種で同定されている。驚くべきことに、時計遺伝子は進化の過程で保存されていない。その一方で、生物時計の様々な性質は保存されている。構成要素は異なるが、そこには何らかの共通のメカニズムが存在するはずである。

いくつかの生物種で時計遺伝子の解析が進んだ結果、時計遺伝子が転写・翻訳され、その産物が時計遺伝子自身の発現にフィードバック制御をかける transcriptional-translational feedback loop (TTFL) が、共通のメカニズムとして見えてきた。しかし、このメカニズムがなぜ 24 時間で振動するのかは解らず、これが根源的な振動体であるかどうかは疑問が残った。一方で、TTFL を介さない概日リズムの存在が明らかになり始めた。原核生物のシアノバクテリアでは、転写や翻訳の阻害剤の存在下で TTFL が機能していなくとも、特定の現象の概日リズムが観察出来ることがわかった (Tomita J et al. Science. 2005, 307:251-4)。また、真核生物においても、核の存在しない赤血球(転写が起こらないため TTFL は存在しない)においても概日リズムが観察出来ることがわかった (O'Neill JS and Reddy AB. Nature. 2011, 469:498-503)。これらの TTFL を介さない時計メカニズムは post-translational oscillator (PTO) と呼ばれている。現在は、TTFL と PTO は互いに影響し合いながら時計として機能していると考えられている。

PTO という新しいメカニズムの存在が注目される中で、古い実験結果(Sweeney BM and Haxo FT. Science. 1961, 134:1361-3)が再度脚光を浴びている。カサノリは真核生物のアオサ藻の一種で、全長数 cm にもなる巨大単細胞生物である。「仮根」と呼ばれる部分に細胞核が局在しており、仮根を切除することで簡単に除核が出来る。Sweeneyらは除核したカサノリでも概日リズムを観察出来ることを発見した。除核によって転写は起こらないため、TTFL は機能しない状態である。つまり、半世紀近く前に、既に PTO の存在を示していたのである。

2. 研究の目的

PTO の解析に適したカサノリにおいて、ルシフェラーゼレポーターによる概日リズムのリアルタイム測定法を確立する。

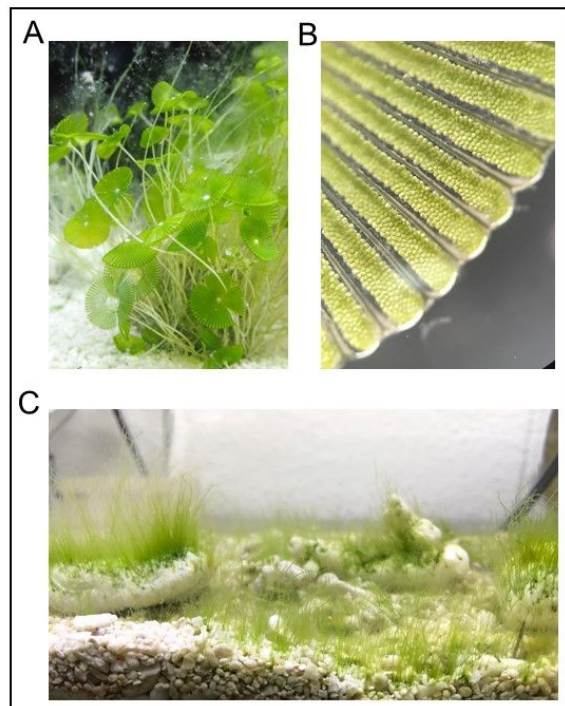
3. 研究の方法 / 4. 研究成果

当初の計画では、地中海産の *Acetabularia*

acetabulum の利用を検討していたが、細胞外部の石灰化が強く起こり不透明になるため、細胞内のルシフェラーゼ発光が大幅に減弱することが懸念された。そこで、石灰化があまり起こらないため透明度が高く、且つ、国内で採取出来るカサノリ (*Acetabularia ryukyuensis*) とホソエガサ (*Acetabularia caliculus*) の 2 種で研究を行った。

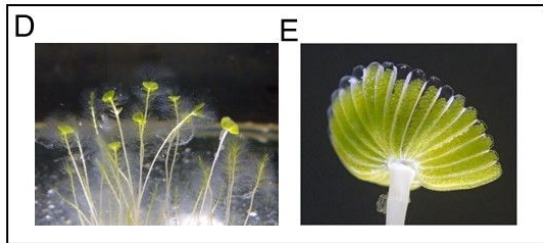
・培養条件の検討

様々な人工海水 (海産微細藻類用ダイゴ人工海水 SH 和光純薬) Coral pro salt [Red Sea]、レイシーマリン [IWAKI]、マリンソルトプロ [Tetra]、LIVESea Salt [DELPHIS]、SeaLife [MARINETECH]、および光条件 (白色蛍光灯、各波長の LED) を検討した。温度は 22-25、明暗サイクルは明期 12 時間 / 暗期 12 時間を保った。その結果、*A. ryukyuensis* は白色蛍光灯 ($45\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) と青色 LED ($5\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) の混合光下で、人工海水マリンソルトプロを用いた場合が生育、シスト (胞子嚢) 形成ともに良好であった (図 A、B)。シストをカサから回収し、海水で洗浄後、暗所で数ヶ月間保管した。保管したシストは同じ条件の水槽に播種することで約 3 週間後にカサノリの芽生えが肉眼で観察された (図 C)。



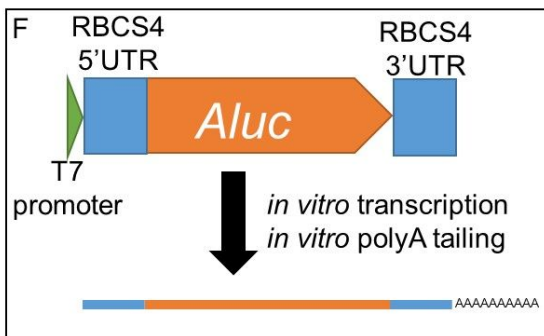
A. caliculus は約 $300\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の白色 LED 下で Coral pro salt を用いた場合において、生育、シスト形成が良好であった(図 D, E)。しかし、次世代の芽生えが安定して観察出来る条件はまだ特定出来ていない。

以降の研究は *A. ryukyuensis* を用いて進めた。



・レポーター遺伝子の作製と細胞への移入

カサノリは、やや特殊な遺伝コードを持ち、停止コドンの UAA と UAG がグルタミンをコードすることが知られている (Schneider et al. Mol. Gen. Genet. 218, 445-452)。また、他のコドンに関しても、ホタルルシフェラーゼの配列はカサノリでの使用に適さないと考え、全てのコドンのカサノリで使用頻度の高いコドンに置き換えた、カサノリ・ルシフェラーゼ遺伝子 (*Aluc*) を人工合成した。これに *RBCS4* 遺伝子の 5'UTR と 3'UTR を付加し、T7 promoter の下流に連結した。*in vitro* 転写および poly A 付加反応により、レポーター mRNA を合成した(図 F)。



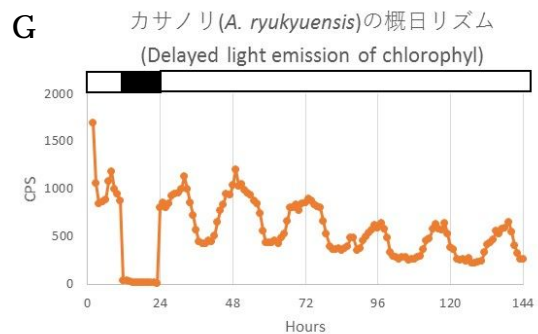
このレポーター mRNA をパーティクルボンバードメント法、およびマイクロインジェクション法により、幼若期の *A. ryukyuensis* の細胞に移入した。移入直後から 1 週間程度の期間、生物発光のリアルタイム測定を行ったが、いずれの方法でも、有意な発光は検出されなかった。

当初の本研究の目的である、カサノリにおけるルシフェラーゼレポーター系の確立は、達成出来なかった。カサノリにおいては形質転換法がまだ十分には確立されていない。形質転換に関わる研究環境の整備が必要である。具体的には、カサノリで利用出来る抗生物質耐性遺伝子の検討や、エ

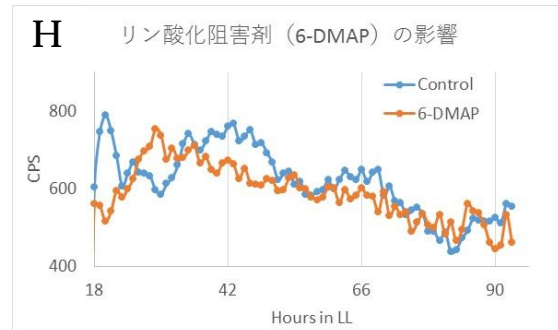
クトロレーション法による配偶子への遺伝子移入などである。

・クロロフィル遅延蛍光によるリズム測定

本研究で行った生物発光測定の条件検討の際に、核を含まないカサノリの細胞片においてクロロフィル遅延蛍光が比較的安定して検出出来ることを発見した。そこで、細胞片のクロロフィル遅延蛍光の概日リズムの測定を行ったところ、明瞭なリズムが数日にわたって観察出来た(図 G)。これは、核に依存しない PTO に制御された概日リズムと考えられる。



さらに、このリズムはリン酸化阻害剤に感受性を持つことを明らかにした(図 H)。この測定系および知見は、今後の PTO 研究において極めて重要である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Murakami R, Hokonohara H, Che DC, Kawai T, Matsumoto T, Ishiura M: Atomic force microscopy analysis of SasA-KaiC complex formation involved in information transfer from the KaiABC clock machinery to the output pathway in cyanobacteria. Genes Cells. 2018 Apr;23(4): 294-306. doi: 10.1111/gtc.12574. 査読あり
2. Kinoshita A, Niwa Y, Onai K, Yamano T, Fukuzawa H, Ishiura M, Matsuo T: *CSL*

encodes a leucine-rich-repeat protein implicated in red/violet light signaling to the circadian clock in *Chlamydomonas*. PLoS Genet. 2017 Mar 23;13(3):e1006645. doi: 10.1371/journal.pgen.1006645. 査読あり

3. Murakami R, Mutoh R, Ishii K, Ishiura M.: Circadian oscillations of KaiA-KaiC and KaiB-KaiC complex formations in an in vitro reconstituted KaiABC clock oscillator. Genes Cells. 2016 Aug;21(8): 890-900. doi: 10.1111/gtc.12392. 査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石浦 正寛 (Ishiura, Masahiro)
名古屋大学・遺伝子実験施設・名誉教授
研究者番号: 20132730

(2) 研究分担者

松尾 拓哉 (Matsuo, Takuya)
名古屋大学・遺伝子実験施設・講師
研究者番号: 00452201