

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06720

研究課題名（和文）概日時計リセット機構から探る緑藻の新奇光受容伝達経路

研究課題名（英文）Novel light signaling pathway in green algae explored by circadian clock resetting mechanism

研究代表者

松尾 拓哉（Takuya, Matsuo）

名古屋大学・遺伝子実験施設・講師

研究者番号：00452201

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、緑藻クラミドモナスの概日時計をリセットする分子機構の解明を目指した。順遺伝学的解析から、2つの新しい関連遺伝子を同定した。それらは陸上植物のEvening complex (EC)の構成タンパク質として知られる、Early flowering 3 (ELF3)とELF4であった。さらに、逆遺伝学的解析により、既知の青色光受容体であるクリプトクロムのうち植物型のクリプトクロムであるpCRYがこの現象に関与することを突き止めた。これらの結果から、緑藻の概日時計のリセット機構の概要が見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、緑藻クラミドモナスの概日時計のリセット機構に関わる因子の同定に成功した。その結果、陸上植物の概日時計システムとの類似点や相違点が明らかになった。緑色植物の光応答や概日時計システムの進化を考察する上で重要な知見の一つとなると期待される。近年、緑藻を含む微細藻類の有効活用が様々な分野で検討されている。緑藻の基礎生物学的知見の蓄積は、緑藻の可能性を最大限に引き出す上で必要不可欠である。本研究の知見は、緑藻を活用する際の光条件や時刻を検討する上で有益な情報となると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the molecular mechanisms that reset the circadian clock in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Using forward genetic analysis, we identified two related genes. They were Early flowering 3 (ELF3) and ELF4, which are known to be components of the Evening complex (EC) in land plants. Furthermore, reverse genetic analysis revealed that pCRY, a plant-type cryptochrome among the known blue light receptors, is involved in this phenomenon. These results provide an overview of the resetting mechanism of the circadian clock in green algae.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 緑藻 クラミドモナス 光応答

1. 研究開始当初の背景

緑藻は様々な光応答を示す。モデル緑藻のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の研究からいくつかのセンサー光受容体が見つかった。それらはいずれも、紫外線から緑色光までの波長域に吸収極大をもつ光受容体である。一方、クラミドモナスは赤などの長波長域の光に対する応答も示す。その代表例が概日時計のリセットである。リセットには可視光域のほぼ全ての波長の光が有効であるが、とりわけ赤色光の効果が大きい (Kondo et al., 1991, *Plant Physiol.*, 95:197-205)。

植物の赤色光受容体としてフィトクロムが知られている。多くの真核藻類でゲノム解析が進んだ結果、真核藻類にはフィトクロムを持つものと持たないものが存在することが分かってきた (Duanmu et al., 2014, *PNAS*, 111:15827-32)。クラミドモナスはフィトクロムを持たないため (Merchant et al., 2007, *Science*, 318:245-50) どのようにして赤色光に応答しているのかはほとんど解っていない。

研究代表者らは、これまでの研究において、クラミドモナスの概日時計のリセットの背景にある分子機構を明らかにした (Niwa et al., 2013, *PNAS*, 110:13666-71)。それは時計タンパク質 Rhythm of chloroplast 15 (ROC15) の光による急速な分解である。ROC15 は陸上植物の概日時計に関わる LUX と類似した GARP 型の転写因子である。ROC15 の分解は、概日時計のリセットと同様に可視光のほぼ全域が有効で、やはり赤色光が特に効果的である。細胞が光を浴びると ROC15 のリン酸化が起こり、その後、プロテアソームにより分解される。

研究代表者らは、この現象に関わる遺伝子を同定するため、ROC15 の光誘導性分解に異常を来す変異体をスクリーニングし、いくつかの変異体の分離に成功した。それらのうちのひとつでは、赤色光応答が完全に消失し、紫色光応答も減弱したが、青色光応答は正常であった。このことは、赤色光と紫色光に特化した光受容体伝達経路が存在することを示している。同定した遺伝子がコードするタンパク質は、哺乳類の RAS-MAPK シグナル伝達に関わる Shoc2 というロイシンリッチリピートタンパク質と相同性があることから、その遺伝子を *Chlamydomonas Shoc2-like Leucine rich repeat protein (CSL)* と命名した (Kinoshita et al., 2017, *PLoS Genet.*, 13(3):e1006645)。現時点においては、CSL は光受容体そのものではなく、赤/紫色光のシグナル伝達の過程に関わっていると推測される。

2. 研究の目的

研究代表者のこれまでの研究を継続し、緑藻の概日時計をリセットする光受容体伝達経路の解明を目指す。上記の通り、緑藻における赤色光応答は未知の領域であり、新しい分子やメカニズムの発見につながると期待される。また、緑藻の概日時計のリセット機構は、時計タンパク質の急速な分解を引き金としている点において、昆虫 (ショウジョウバエ) の概日時計と共通している。この研究で得られる知見は、赤色光応答機構や概日時計リセット機構の進化の解明に寄与すると期待される。また、赤色光は組織透過性が高いため、もし新規の光受容体が見つければ、光遺伝学の新しいツールとして期待される。

3. 研究の方法

新規関連因子の探索

これまでの研究に引き続き、ROC15 の光応答に異常を示す変異体を分離する。変異体の原因遺伝子は Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) 法により特定し、野生型遺伝子による遺伝子相補実験で確認する。

また、CSL の相互作用タンパク質から新規関連遺伝子を探索する。CSL は全長がタンパク質間相互作用に関わるロイシンリッチリピートから成ること、また、哺乳類ホモログである Shoc2 は RAS/RAF タンパク質のスキヤフォールドタンパク質であることから、CSL は他のタンパク質と相互作用して機能すると推測される。そこで、まず、クラミドモナス細胞粗抽出液からタグ抗体を用いて CSL を含むタンパク質複合体を精製し、ショ糖密度勾配超遠心法により分子量を決定することで、複合体形成の有無を確認する。予想通り、他のタンパク質と複合体を形成しているならば、質量分析法により複合体の構成タンパク質を決定する。

pCRY の解析

クラプトクロムは真核生物に広く保存された青色光受容体である。クラプトクロムは動物型、植物型の2つを持ち、pCRYはその植物型である。pCRY自身は青色光受容体であり、*in vitro*において青色光により自己リン酸化される (Immel et al., 2007, J. Biol. Chem., 282:21720-8)。一方、*in vivo*においては赤色光、青色光のいずれにおいてもリン酸化され、その後、急速に分解される (Reisdorph and Small, 2004, Plant Physiol., 134:1546-54)。本研究では、pCRY 変異株を Chlamydomonas Library Project より入手し、ROC15 の光応答を解析する。

4. 研究成果

新規関連因子の探索

ROC15 の光誘導性分解を指標として、この光応答に関わる遺伝子を順遺伝学的スクリーニングし、新たに二つの関連遺伝子を同定した。一つは、2398 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。相同性検索の結果、このタンパク質は陸上植物の Early flowering 3 (ELF3) と極めて弱いながらも類似性を示すことがわかった。この遺伝子の変異体において、ROC15 の光応答は可視光域のほぼ全域で消失しており、また、光照射後に起こる ROC15 のリン酸化は起こらないことを明らかにした。一方、概日的に誘導されるリン酸化は正常に起こった。また、恒常条件下における概日リズムにも大きな異常が観られなかった。これらのことから、この遺伝子は概日時計の振動機構には関わっておらず、光情報の概日時計への入力に関わることが示された。この研究成果は、PLoS Genetics 誌に掲載された。

同定されたもう一つの遺伝子は upstream ORF (uORF) を持っていた。この遺伝子領域を含む DNA 断片を変異体に移入した結果、ROC15 の光応答の回復が確認された。次に、uORF、もしくはメインの ORF の開始コドンに変異を入れた DNA 断片を移入した結果、uORF の開始コドンに変異を導入した場合にのみ表現型の回復が見られなかったため、uORF が ROC15 の光応答に関連していることが明らかとなった。コードタンパク質の相同性検索の結果、この uORF は陸上植物の Early flowering 4 (ELF4) のホモログをコードすることが明らかとなった。この変異体は上記の ELF3 ホモログの変異体と同様に、ROC15 の光応答が可視光域のほぼ全域で消失しており、また、光照射後に起こる ROC15 のリン酸化も起こらなかった。ただし、その後2回目の光照射を行うと光に応答し、ROC15 の量が急減することがわかった。また、恒常条件下における概日リズムに大きな異常は観られなかった。

陸上植物では、LUX (GARP 転写因子)、ELF3、ELF4 の3者は Evening complex (EC) と呼ばれるタンパク質複合体を形成し、概日時計の環境応答やリズムの生成、情報の出力など幅広く関与することが知られている。本研究の結果は、緑藻においても EC が存在することを示唆する。ただし、緑藻においては概日時計の環境応答により特化していると思われる。

タグを融合した CSL を発現する細胞を作製し、CSL の含まれるタンパク質複合体を精製し、構成因子を同定した。その結果、ヘムやクロロフィルの合成系に関わるタンパク質と相互作用していることがわかった。CSL の色素合成系への関与が示唆される。

pCRY の解析

pCRY 変異体における ROC15 の光応答を解析した結果、ROC15 の分解およびリン酸化のいずれもが起こらないことを見出した。pCRY は青色光受容体であるが、驚いたことに、pCRY 変異株では可視光域のほぼ全域で ROC15 の光応答が消失していた。また、*in vivo* における pCRY 自身の光誘導性リン酸化と分解は、CSL 変異バックグラウンドにおいて観察されなかった。さらに、pCRY の変異株では概日リズムの長周期化や低振幅化などの異常が観られ、光応答だけではなく概日時計の振動機構にも関わっていることがわかった。

以上のように、本研究により ROC15 の光誘導性分解に関わる光シグナル伝達機構について、いくつかの新たな知見が得られた。得られている知見から推測すると、赤色光情報は CSL の関わる経路を介して pCRY に伝達されると共に、pCRY はそれ自身が光受容体として青色光を受容することで、光情報経路のハブとして機能していると思われる。その後 EC 様の複合体に情報が伝達され、概日時計のリセットに至るのではないかと推測される。本研究は、緑色植物の光応答や概日時計システムの進化を考察する上で重要な知見の一つとなると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsuo T, Iida T, Ohmura A, Gururaj M, Kato D, Mutoh R, Ihara K, Ishiura M	4. 巻 16
2. 論文標題 The role of ROC75 as a daytime component of the circadian oscillator in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genet.	6. 最初と最後の頁 e1008814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fustin JM, Ye S, Rakers C, Kaneko K, Fukumoto K, Yamano M, Versteven M, Grunewald E, Cargill S, Tamai TK, Xu Y, Jabbur ML, Kojima R, Lamberti M, Yoshioka-Kobayashi K, Whitmore D, Tammam S, Howell PL, Kageyama R, Matsuo T, Stanewsky R, Golombek D, Johnson CH, Kakeya H, Ooijen GV, Okamura H	4. 巻 3
2. 論文標題 Methylation deficiency disrupts biological rhythms from bacteria to humans.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0942-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tokutsu R, Fujimura-Kamada K, Matsuo T, Yamasaki T, Minagawa J	4. 巻 10
2. 論文標題 The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga <i>Chlamydomonas</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. commun.	6. 最初と最後の頁 4099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11989-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gururaj M, Ohmura A, Ozawa M, Yamano T, Fukuzawa H, Matsuo T	4. 巻 18
2. 論文標題 A potential EARLY FLOWERING 3 homolog in <i>Chlamydomonas</i> is involved in the red/violet and blue light signaling pathways for the degradation of RHYTHM OF CHLOROPLAST 15	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genet.	6. 最初と最後の頁 e1010449.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中井 皇太、松尾 拓哉、片山 琉太、中野 侑希、渡邊 智基、山本 祐莉、青木 摂之
2. 発表標題 クラミドモナスの多段階リン酸リレー系関連遺伝子と概日時計の機能的関係ー進化的観点からー
3. 学会等名 第4回名古屋生物リズム研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Malavika Gururaj, Ayumi Ohmura, Mariko Ozawa, Takuya Matsuo
2. 発表標題 A forward genetic screen for genes involved in light resetting of the Chlamydomonas circadian clock
3. 学会等名 19th International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾拓哉
2. 発表標題 哺乳類時計から緑藻時計へ
3. 学会等名 第2回時間タンパク質学領域会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井康平、松尾拓哉
2. 発表標題 カサノリにおける遅延蛍光の概日リズム測定系の確立
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾拓哉
2. 発表標題 カサノリの概日時計研究の再興へ向けて
3. 学会等名 学術変革領域B「時間タンパク質学」キックオフシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Malavika Gururaj, Ayumi Ohmura, Mariko Ozawa, Takashi Yamano, Hideya Fukuzawa, Takuya Matsuo
2. 発表標題 Forward genetic screen reveals a potential EARLY FLOWERING 3 homolog in Chlamydomonas is involved in the light signaling pathways for the degradation of RHYTHM OF CHLOROPLAST 15
3. 学会等名 第15回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井康平、Cheng Jen-Yin、松尾拓哉
2. 発表標題 Acetabularia ryukyuensisにおける遅延蛍光の概日リズム測定系の確立
3. 学会等名 第5回名古屋リズム研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾拓哉
2. 発表標題 緑藻は転写抑制により目覚める
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾拓哉
2. 発表標題 転写に依存しない概日振動体の研究における緑藻植物の可能性
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾拓哉
2. 発表標題 クラミドモナスの概日時計をリセットする光受容伝達機構
3. 学会等名 第14回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gururaj M, Kinoshita A, Matsuo T
2. 発表標題 Identification of a gene critical for the light induced degradation of circadian clock protein ROC15 in Chlamydomonas reinhardtii
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Cheng JY, Kinoshita A, Matsuo T: Plant-like cryptochrome is involved in the red & blue light signaling pathways and the oscillator of the circadian clock in Chlamydomonas
2. 発表標題 Plant-like cryptochrome is involved in the red & blue light signaling pathways and the oscillator of the circadian clock in Chlamydomonas
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村芳樹、小林優介、浜地貴志、松尾拓哉、鹿内利治
2. 発表標題 葉緑体局在型DNAリガーゼの同定とその欠損株における葉緑体核様体異常
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 得津隆太郎、鎌田（藤村）このみ、松尾拓哉、山崎朋人、皆川純
2. 発表標題 花成計時因子CONSTANSは緑藻の強光適応を制御する
3. 学会等名 第10回日本光合成学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村芳樹、小林優介、浜地貴志、松尾拓哉、田草川真理、鹿内利治
2. 発表標題 葉緑体核様体形態のDNA構造による制御
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 得津隆太郎、鎌田（藤村）このみ、松尾拓哉、山崎朋人、皆川純
2. 発表標題 花成計時因子CONSTANSは緑藻の強光適応を制御する
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井康平, Jen-Yin Cheng, 村中智明, 松尾拓哉
2. 発表標題 カサノリ研究の再興：タンパク質ダイナミクスに基づいた概日システムの解明へ向けて
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾拓哉
2. 発表標題 真核生物の概日振動メカニズムを緑藻から探る
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 地宗 克洋、松尾 拓哉、中井 阜太、山本 祐莉、崔 鶴宇、中野侑希、田内 和久ラザルス、羅 嘉傑、片山 琉太、鈴木 智紀、渡邊 智基、大塚 徹寛、青木 摂之
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスにおける概日時計と多段階リン酸リレーとの関わりについて
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾拓哉
2. 発表標題 巨大単細胞緑藻で探る1日を規定するタンパク質特性
3. 学会等名 第12回 都医学研シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------