

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23770005

研究課題名（和文）

緑藻クラミドモナスにおける生物時計機構の解析

研究課題名（英文）

Analysis of the circadian clock in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

研究代表者

松尾 拓哉 (MATSUO TAKUYA)

名古屋大学・遺伝子実験施設・助教

研究者番号：00452201

研究成果の概要（和文）：緑藻クラミドモナスは最近時計遺伝子が同定された生物である。本研究では、クラミドモナスの時計遺伝子、時計タンパク質の解析を行った。その結果、時計タンパク質の細胞内局在、時計遺伝子間の遺伝学的相互作用、時計タンパク質複合体、時計タンパク質の光応答に関する新しい知見が得られた。これらの知見は、緑藻の生物時計機構の分子基盤の理解に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：The clock genes of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* have been identified recently. In this study, we analyzed the clock genes and proteins and found new characteristics of them in their genetic interactions, intracellular localizations, protein complex formations, and light responses. These findings are important for understanding of the molecular basis of algal circadian clock.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：生物時計

1. 研究開始当初の背景

生物時計は細胞内に備わった分子装置で、様々な生命現象の起こるタイミングを最適な時刻に調節している。現在までに、藍色細菌（シアノバクテリア）、高等植物（シロイヌナズナ）、菌類（アカパンカビ）、昆虫（ショウジョウバエ）、哺乳類（マウス）で生物時計を構成する遺伝子群（時計遺伝子群）が発見され、それぞれ精力的に分子機構の研究が進められている。

単細胞性の緑藻であるクラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）は、優れたモデル生物であるが、最近まで生物時計の分子基盤の理解は全く進んでいなかった。

我々はクラミドモナスの時計遺伝子を決定すべく、一連の研究を行った。まず最初

に、生物時計によって制御されることが知られていた葉緑体遺伝子 *tufA* のプロモーターとホタルのルシフェラーゼ遺伝子（葉緑体ゲノムにコドン最適化したもの）を連結して、クラミドモナスの葉緑体ゲノムに組み込んだ。これにより、生物時計の活動を光の強度として可視化することに成功した（Matsuo et al., *Mol Cell Biol*, 2006, 26:863-70）。次にその発光強度の概日リズムを指標として、約16,000の変異体をスクリーニングし、105個のリズム変異体を分離した。それらから、30個の原因遺伝子（原因遺伝子座）を同定することに成功し、それらのうち6つは緑藻の生物時計において極めて重要な役割を持つ「時計遺伝子」であることを明らかにした。6つのタンパク

質の中には、機能ドメインが高等植物の生物時計や光周性花成制御に関わる転写因子と類似したものが4つ含まれていた (ROC15、ROC40、ROC66、ROC75)。残りの2つはF-boxタンパク質 (ROC114) と新奇タンパク質 (ROC55) で、いずれも緑藻にしか見られないタンパク質であった。これらの結果から、緑藻の生物時計は陸上植物とある程度共通した因子と緑藻独自の因子とが複合した時計であることを明らかにしたと共に、クラミドモナスを生物時計研究の新たな、そして最も単純な真核生物モデルとして確立することに成功した。

2. 研究の目的

本研究課題では申請者らのこれまでの研究を進展させ、緑藻の時計遺伝子、時計タンパク質の解析を行った。

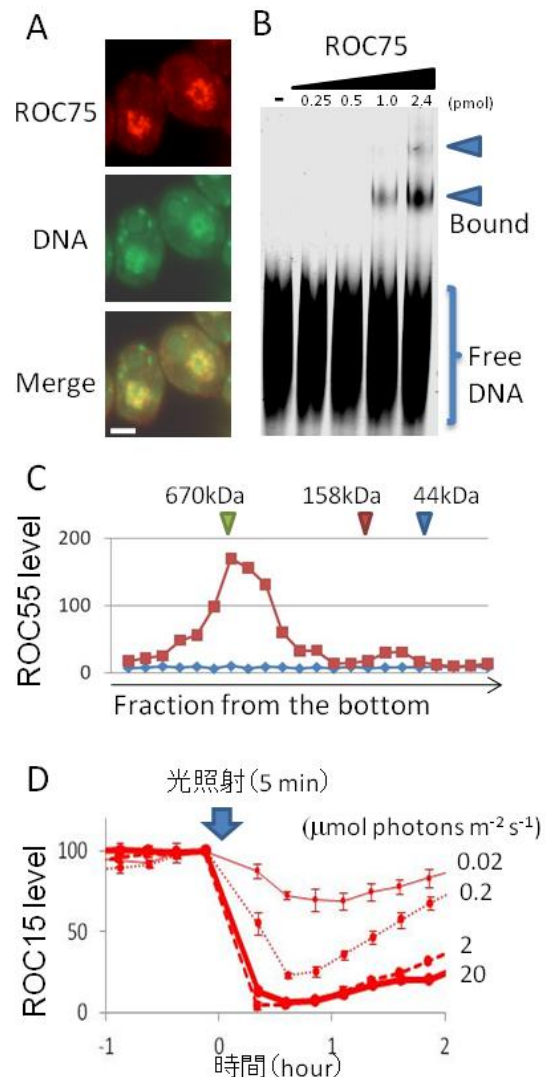
3. 研究の方法

本研究では、クラミドモナスの時計遺伝子のゲノム断片に、各種タグやレポータータンパク質の配列をインフレームで挿入し、それらを指標として解析を行った。タグ融合遺伝子が時計遺伝子としての機能を保持していることは、ルシフェラーゼレポーターを用いた概日リズムの測定により確認した。

4. 研究成果

- 1) DNA結合モチーフを持つ時計タンパク質であるROC15、ROC40、ROC66、ROC75にHAタグを融合し、クラミドモナス細胞に発現させた。免疫細胞染色によりそれらの細胞内局在を解析した結果、ROC15、ROC40、ROC66、ROC75は細胞核に局在することが明らかになった (図A)。
- 2) ROC75遺伝子変異株における他の時計遺伝子の発現を解析した結果、ROC75の変異によりROC40 mRNAの発現が上昇することを明らかにした。
- 3) ROC75タンパク質のDNA結合ドメインを、大腸菌で発現させ精製し、ROC40遺伝子上流領域のDNA断片との結合を解析した結果、ROC75はROC40遺伝子上流領域の特定の配列に結合することを明らかにした (図B)。
- 4) ロイシンリッチリピートを持つROC55 (188kDa) にルシフェラーゼを融合したROC55-LUCタンパク質をクラミドモナス細胞に発現させた。細胞粗抽出液を、ショ糖密度勾配超遠心法により分画し、各分画のルシフェラーゼ活性を測定した結果、ROC55は約670kDaのタンパク質複合体を形成していることが明らかになった (右図C)。
- 5) ROC15-LUCの生物発光測定、および

ROC15-HAのウェスタンブロット解析の結果、クラミドモナス細胞に光を照射するとROC15は急速に減少することを明らかにした (右図D、ルシフェラーゼアッセイ)。この現象は青色から赤色の幅広い波長の光で誘導され、特に赤色光に対して高い感受性を持つことを明らかにした。また、これはユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解によるもので、F-boxタンパク質であるROC114が関わっていることを明らかにした。さらに、ROC15の欠損がクラミドモナスの生物時計の位相リセット機構の異常を引き起こすことを明らかにした (PNAS論文改訂中2013)。



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8件)

1. Matsuo T, Iida T, Ishiura M (2012): *N-terminal acetyltransferase 3 gene is essential for robust circadian rhythm of*

bioluminescence reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biochem Biophys Res Commun**, 418, 342-346

2. Matsuo T, Ishiura M (2011): *Chlamydomonas reinhardtii* as a new model system for studying molecular mechanisms of the circadian clock. **FEBS Lett.**, 585, 1495-1502
3. J Valencia S, Bitou K, Ishii K, Murakami R, Morishita M, Onai K, Furukawa Y, Imada K, Namba K, Ishiura M (2012): Phase-dependent generation and transmission of time information by the KaiABC circadian clock oscillator through SasA-KaiC interaction in cyanobacteria. **Genes Cells** 17: 398-419.
4. Murakami R, Mutoh R, Iwase R, Furukawa Y, Imada K, Onai K, Morishita M, Yasui S, Ishii K, J. Valencia S., Uzumaki T, Namba K, and Ishiura M (2012): The roles of the dimeric and tetrameric structures of the clock protein KaiB in the generation of circadian oscillations in cyanobacteria. **J Biol Chem** 287: 29506-29515.
5. Akai M, Onai K, Morishita M, Mino H, Shijuku T, Maruyama H, Arai F, Itoh S, Hazama A, Checchetto V, Szabò I, Yukutake Y, Suematsu M, Yasui M, Ishiura M, Uozumi N (2012): Aquaporin AqpZ is involved in cell volume regulation and sensitivity to osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **J Bacteriol**, in press.
6. Asada Y, Mutoh R, *Ishiura M., *Mino H. (2011): Nonselective excitation of pulsed ELDOR using multi-frequency microwaves. **J Mag Res.**, 200-205.
7. Akai M, Onai K, Kusano M, Sato M, Redestig H, Toyooka K, Morishita M, Miyake H, Hazama A, Checchetto V, Szabo I, Matsuoka K, Saito K, Yasui M, Ishiura M, *Uozumi N. (2011): Plasma membrane aquaporin AqpZ protein is essential for glucose metabolism during photomixotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **J Biol Chem**. 286:25224-25235.
8. Mutoh R, Mino H, Murakami R, Uzumaki T, *Ishiura M. (2011): Thermodynamically induced conformational changes of the cyanobacterial circadian clock protein

KaiB. Appl Mag Res. 40:525-534.

[学会発表] (計 13 件※代表者のみ)

招待講演

1. 松尾拓哉、石浦正寛：生物時計研究の新しいモデル生物：緑藻クラミドモナス、京都大学大学院薬学研究科、医薬創成情報科学講座、システムバイオロジーセミナー、2011年10月3日、京都大学薬学部、京都
2. 松尾拓哉、石浦正寛：緑藻の生物時計：起源、分子機構、時計研究モデルとしての可能性、第18回日本時間生物学会、2011年11月25日、名古屋大学野依記念学術交流会館、名古屋
3. 松尾拓哉：緑藻の時計 ～陸上植物との類似点と相違点～、第19回日本時間生物学会学術大会、2012年9月15日、北海道大学学術交流会館B会場、札幌
4. 松尾拓哉：緑藻を24時間稼働する工場に、JST 推薦シーズ新技術説明会、2013年2月18日、JST 東京別館、市ヶ谷

一般講演

5. 石黒彩由奈、松尾拓哉、丹羽由実、飯田高広、石浦正寛：クラミドモナスの時計タンパク質 ROC55 は約 670 kDa の複合体の一部である、第9回クラミドモナスワークショップ、2011年11月25日、自然科学研究機構基礎生物学研究所、岡崎コンファレンスセンター、岡崎、ポスター
6. 丹羽由実、松尾拓哉、立川誠、小内清、石浦正寛：クラミドモナスの時計タンパク質 ROC15 は光依存的に減少する、第9回クラミドモナスワークショップ、2011年11月25-26日、自然科学研究機構基礎生物学研究所、岡崎コンファレンスセンター、岡崎、ポスター

7. 飯田高広、松尾拓哉、加藤大策、武藤梨沙、石浦正寛：時計遺伝子 *ROC75* による *ROC40* の発現制御、第9回クラミドモナスワークショップ、2011年11月25-26日、自然科学研究機構基礎生物学研究所、岡崎コンファレンスセンター、岡崎、ポスター
8. 石浦正寛、松尾拓哉、小内清：葉緑体で機能するホタルルシフェラーゼ遺伝子とそれを用いた葉緑体遺伝子発現のリアルタイムモニタリング、第4回名古屋大学医学・バイオ系知財フェア、2011年12月16日、名古屋大学医学部、名古屋、ポスター
9. Matsuo T, Niwa Y, Onai K, Iida T, Kato D, Ishiura M: Characterization of the *Chlamydomonas* circadian clock protein ROC15, 15th Conference on the Cell & Molecular Biology of *Chlamydomonas*, June 6, 2012, Kongresshotel, Potsdam, Germany (Selected oral presentation)
10. Niwa Y, Matsuo T, Onai K, Kato D, Ishiura M: Light-induced rapid degradation of the *Chlamydomonas* clock protein ROC15, 15th Conference on the Cell & Molecular Biology of *Chlamydomonas*, June 6, 2012, Kongresshotel, Potsdam, Germany (Poster)
11. 松尾拓哉：クラミドモナスの遺伝子同定法、クラミドモナス研究連絡会、2012年8月31日、基礎生物学研究所、岡崎、口頭発表
12. 丹羽由実、松尾拓哉、小内清、加藤大策、石浦正寛：Light-induced rapid degradation of the *Chlamydomonas* clock protein ROC15, IGER Annual meeting 2012、2013年1月10日、ポスター
13. 丹羽由実、松尾拓哉、小内清、加藤大策、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスにおける概日時計の位相リセッティング機構、日本植物生理学会、2013年3月21-23日、ポスター

[その他]

ホームページ等

<http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~ishiura-g/Chlamy/Chlamy%20clock.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾拓哉 (MATSUO TAKUYA)

名古屋大学・遺伝子実験施設・助教

研究者番号：00452201

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

石浦正寛 (ISHIURA MASAHIRO)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：20132730