

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2014
課題番号：24657002
研究課題名(和文) タンパク質量のリアルタイムモニタリング

研究課題名(英文) Real-time monitoring of protein levels

研究代表者

石浦 正寛 (Ishiura, Masahiro)

名古屋大学・遺伝子実験施設・研究員

研究者番号：20132730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ルシフェラーゼレポーターを用い、生きた細胞においてタンパク質量をリアルタイム測定する手法の開発と、その手法の生物時計研究への応用を試みた。モデル系として、緑藻クラミドモナスの時計タンパク質を用いた。その結果、クラミドモナスの時計タンパク質ROC15, ROC40, ROC66, ROC75のタンパク質量を反映するレポーターの作製に成功した。さらに、このレポーターシステムを用いて、ROC15の光誘導性の分解機構を見出し、その性質の詳細な解析を行うことに成功した。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a monitoring system for protein levels in vivo in real time and to apply the system to studies for the circadian clock. For this purpose, we used clock proteins of the green alga *Chlamydomonas* as a model. As a result, we succeeded in monitoring of levels in ROC15, ROC40, ROC66, and ROC75 *Chlamydomonas* clock proteins in vivo in real time. In addition, we succeeded in analyzing properties of the clock proteins by using this system.

研究分野：生物時計

キーワード：生物時計 リアルタイム測定

1. 研究開始当初の背景

ルシフェラーゼレポーターは感度・定量性・簡便性に優れ、遺伝子発現の活性を測定する技術として生命科学の多岐にわたる分野で利用されている。特に、この技術を生細胞に適用し、さらにゲノム解析のスケールにまで大規模化した「生物発光リアルタイム測定システム」(JST 先端計測分析技術・機器開発事業、平成 17~21 年度、チームリーダー：石浦正寛)は、次世代シーケンサーの登場で新時代を迎えた遺伝学において鍵となるシステムである。しかし、ルシフェラーゼを用いたこれまでのレポーターアッセイは、専らプロモーターの活性に着目したものであった。近年めざましく理解の進んでいる転写後制御の重要性や、ゲノム配列解読後のタンパク質の動態の理解の重要性の観点から、今後はタンパク質の量的変動を正確に測定できるレポーターが不可欠である。

我々の研究グループは、シアノバクテリア、高等植物、緑藻の生物時計遺伝子を世界に先駆けて同定し、植物界全体の生物時計の理解に向けて研究を進めてきた (Ishiyama et al., *Science*, 1998, 281:1519-23; Onai and Ishiyama, *Genes Cells*, 2005, 10:963-72; Matsuo et al., *Genes Dev.*, 2008, 22:918-30)。これらの研究においては、従来のプロモーター活性に着目した生物発光リアルタイム測定法を活用してきた。この手法は、概日リズム測定の大規模化を可能にし、時計変異体の順遺伝学的スクリーニングを実現させた。さらに、時計遺伝子の転写レベルでの制御機構の解析に絶大な威力を発揮し、時計遺伝子間の転写制御のフィードバックループ構造の解明に大きく貢献した。現在、生物時計研究は転写レベルでのフィードバック制御の解析が一段落し、時計タンパク質の研究が主流となりつつある。そのため、時計タンパク質の経時的な動態を正確にレポートする手法が待望されている。

2. 研究の目的

本研究は、緑藻クラミドモナスの時計タンパク質をモデルとして、従来のプロモーターのレポーターに代わる、「タンパク質量レポーター」を開発し、時計タンパク質量のリアルタイムモニタリングを目指した。

3. 研究の方法

クラミドモナスの時計遺伝子 ROC15、ROC40、ROC66、ROC75 のゲノム DNA 断片をクローニングし、各遺伝子の終始コドンの直前に、ルシフェラーゼのコード配列

を挿入した。ルシフェラーゼコード配列のコドンは、クラミドモナスの核ゲノムのコドン使用頻度に最適化した。これらのレポーター遺伝子をクラミドモナスの核ゲノムに挿入した。

生物発光の検出には高感度生物発光測定装置 (JST 先端計測分析技術・機器開発事業「生物発光リアルタイム測定システム」成果品) を用いた。

4. 研究成果

作製したレポーター株の生物発光の変動は、それぞれの時計タンパク質量を変動とほぼ同じパターンを示したことから、各時計タンパク質量を示すレポーターとして有用であることがわかった (Niwa et al., *PNAS*, 2013, 110:13666-13671)。

また、様々な光条件下で上記レポーターの生物発光を測定した結果、ROC15 ルシフェラーゼレポーター (ROC15-LUC) の生物発光は、細胞が外界からの光を浴びた直後に急速に減少することを見出した。詳細な解析の結果、この生物発光の減少は、ユビキチンプロテアソーム系による ROC15 タンパク質の分解を反映したものであることが明らかになった (Niwa et al., *PNAS*, 2013, 110:13666-13671)。

レポーターの完成により、ROC15 タンパク質の光誘導性分解の特徴を詳細に解析することが可能となった。そこでこの現象を引起こす光の波長特性を調べた結果、赤色光が極めて有効であることがわかった。クラミドモナスにおいては赤色光を主として吸収する光受容体はまだ見つかっていないため、この結果は未知の光受容体伝達経路の存在を示唆している (Niwa et al., *PNAS*, 2013, 110:13666-13671)。

そこで我々は、生物発光リアルタイム測定システムを活用して、ROC15 の光誘導性分解に異常を来す変異体の分離を行い、10 変異体を分離することに成功した。それらの中には、赤色光特異的に異常を示す変異体も含まれていた (未発表)。

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 11 件)

Nanatani K, Shijuku T, Takano Y, Zulkifli L, Yamazaki T, Tominaga A, Souma S, Onai K, Morishita M, Ishiyama M, Hagemann M, Suzuki I, Maruyama H, Arai F, Uozumi N; Comparative Analysis of kdp and ktr Mutants Reveals Distinct Roles of the Potassium Transporters in the Model Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 197:676-87, 2015

Iida T, Mutoh R, Onai K, Morishita M,

Furukawa Y, Namba K, Ishiura M; Importance of the monomer-dimer-tetramer interconversion of the clock protein KaiB in the generation of circadian oscillations in cyanobacteria. *Genes Cells*. 20:173-190, 2015

Fujita S, Matsuo T, Ishiura M, Kikkawa M; High-throughput phenotyping of chlamydomonas swimming mutants based on nanoscale video analysis. *Biophys J.*, 107, 336-345, 2014

Ishii K, Terauchi S, Murakami R, Valencia Swain J, Mutoh R, Mino H, Maki K, Arata T, Ishiura M; Site-directed spin labeling-electron spin resonance mapping of the residues of cyanobacterial clock protein KaiA that are affected by KaiA-KaiC interaction. *Genes Cells*. 19:297-324, 2014

Niwa Y, Matsuo T, Onai K, Kato D, Tachikawa M, Ishiura M; Phase-resetting mechanism of the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 13666-13671, 2013

Mutoh R, Nishimura A, Yasui S, Onai K, Ishiura M; The ATP-mediated regulation of KaiB-KaiC interaction in the cyanobacterial circadian clock. *PLoS One*. 8:e80200, 2013

Yonekura M, Aoki N, Hirose T, Onai K, Ishiura M, Okamura M, Ohsugi R, Ohto C; The promoter activities of sucrose phosphate synthase genes in rice, OsSPS1 and OsSPS11, are controlled by light and circadian clock, but not by sucrose. *Front Plant Sci*. 5:398-419, 2013

Nanatani K, Shijuku T, Akai M, Yukutake Y, Yasui M, Hamamoto S, Onai K, Morishita M, Ishiura M, Uozumi N; Characterization of the role of a mechanosensitive channel in osmotic down shock adaptation in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Channels* 7:238-242, 2013

Valencia S J, Bitou K, Ishii K, Murakami R, Morishita M, Onai K, Furukawa Y, Imada K, Namba K, Ishiura M; Phase-dependent generation and transmission of time information by the KaiABC circadian clock oscillator through SasA-KaiC interaction in cyanobacteria. *Genes Cells* 17398-419, 2012

Murakami R, Mutoh R, Iwase R, Furukawa Y, Imada K, Onai K, Morishita M, Yasui S, Ishii K, Valencia S J, Uzumaki T, Namba K, and Ishiura M; 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, 2012

Akai M, Onai K, Morishita M, Mino H, Shijuku T, Maruyama H, Arai F, Itoh S, Hazama A, Checchetto V, Szab I, Yukutake Y, Suematsu M, Yasui M, Ishiura M, Uozumi N; Aquaporin AqpZ is involved in cell volume regulation and sensitivity to osmotic stress in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*. 194: 6828-6836, 2012

〔学会発表〕(計15件)

木下亜有美、松尾拓哉、丹羽由実、山野隆志、福澤秀哉、石浦正寛：緑藻クラミドモナスの時計タンパク質 ROC15 の光誘導性分解に関わる遺伝子の同定、第56回日本植物生理学会年会、2015年03月16日～2015年03月18日、東京農業大学世田谷キャンパス

木下亜有美、松尾拓哉、丹羽由実、山野隆志、福澤秀哉、石浦正寛：クラミドモナスの時計タンパク質 ROC15 の光誘導性分解に関わる遺伝子の同定、微細藻類研究会 2014、2014年12月22日～2014年12月23日、岡崎コンファレンスセンター

木下亜有美、松尾拓哉、丹羽由実、山野隆志、福澤秀哉、石浦正寛：クラミドモナスの時計タンパク質 ROC15 の光誘導性分解に関わる遺伝子の解析、第21回日本時間生物学会学術大会、2014年11月08日～2014年11月09日、九州大学医学部百年講堂

松尾拓哉、加藤大策、武藤梨沙、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスの時計タンパク質 ROC75 の解析、第11回クラミドモナス研究会「Go! Microalgae」, 2014年10月03日～2014年10月04日、高知市文化プラザかるぼーと

丹羽由実、松尾拓哉、小内清、加藤大策、立川誠、石浦正寛：クラミドモナスの概日時計の時刻調節機構、第11回クラミドモナス研究会「Go! Microalgae」, 2014年10月03日～2014年10月04日、高知市文化プラザかるぼーと

木下亜有美、松尾拓哉、丹羽由実、山野隆志、福澤秀哉、石浦正寛：クラミドモナスの時計タンパク質 ROC15 の光誘導性分解に関わる遺伝子の解析、第11回クラミドモナス研究会「Go! Microalgae」, 2014年10月03日～2014年10月04日、高知市文化プラザかるぼーと

丹羽由実、木下亜有美、松尾拓哉、小内清、加藤大策、立川誠、石浦正寛：単細胞緑藻

クラミドモナスの概日時計における ROC15 タンパク質の役割、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 03 月 18 日～2014 年 03 月 20 日、富山大学五福キャンパス

丹羽由実、松尾拓哉、小内清、立川誠、加藤大策、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスにおける生物時計の位相リセッティング機構、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 03 日～2013 年 12 月 06 日、神戸国際会議場

松尾拓哉、加藤大策、武藤梨沙、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスの時計タンパク質 ROC75 の解析、第 10 回クラミドモナス研究会、2013 年 11 月 29 日～2013 年 11 月 30 日、自然科学研究機構基礎生物学研究所

木下亜有美、松尾拓哉、丹羽由実、石浦正寛：クラミドモナス時計タンパク質 ROC15 の光誘導性の分解に関わる遺伝子の同定、第 10 回クラミドモナス研究会、2013 年 11 月 29 日～2013 年 11 月 30 日、自然科学研究機構基礎生物学研究所

丹羽由実、松尾拓哉、小内清、加藤大策、立川誠、石浦正寛：Phase-resetting mechanism of circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*、第 10 回クラミドモナス研究会、2013 年 11 月 29 日～2013 年 11 月 30 日、自然科学研究機構基礎生物学研究所

松尾拓哉、加藤大策、武藤梨沙、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスの時計タンパク質 ROC75 の解析、第 20 回日本時間生物学会年会、2013 年 11 月 09 日～2013 年 11 月 10 日、近畿大学 11 月ホール

木下亜有美、松尾拓哉、丹羽由実、石浦正寛：クラミドモナス時計タンパク質 ROC15 の光誘導性の分解に関わる遺伝子の同定、第 20 回日本時間生物学会年会、2013 年 11 月 09 日～2013 年 11 月 10 日、近畿大学 11 月ホール

小内清、石浦正寛：植物の遺伝子発現や動態のリアルタイム計測 ～計測システムの開発から実例まで～、第 167 回農林交流センターワークショップ「植物科学・作物育種におけるフェノーム解析 ～だれでも使える画像解析入門から先端技術まで～」、2012 年 11 月 12 日～2012 年 11 月 12 日、つくば 情報 通信共同利用館、つくば、(招待講演)

小内清、石浦正寛：生物発光リアルタイムモニタリング、第 12 回 名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー「リアルタイムモニタリング、イメージング 個体レベルから原子レベルまで」、2012 年 11 月 29 日

～2012 年 11 月 29 日、名古屋大学理学南館大講堂(坂田・平田ホール) 名古屋、(招待講演)

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・研究員
名古屋大学・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・助教
研究者番号：00452201