

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291075

研究課題名(和文)植物時計の分子基盤～起源・進化・多様性

研究課題名(英文)The molecular basis of circadian clock in plants: The origin, evolution, diversity

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：藍色細菌(シアノバクテリア)から我々ヒトに至るまで、ほぼ全ての生物は生物時計を持っています。生物時計に重要な遺伝子は時計遺伝子と呼ばれますが、時計遺伝子は進化の過程であまり保存されていません。本研究では、藍色細菌、緑藻、高等植物の3つの光合成生物の生物時計に着目して解析を行いました。その結果、これらの生物時計の共通点と相違点が明らかになってきました。この成果は、生物時計の進化の解明に寄与します。

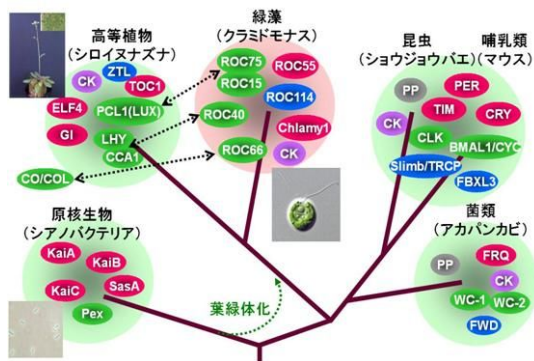
研究成果の概要(英文)：From cyanobacteria to human, most organisms on the earth have the circadian clock. However, clock genes, essential genes for the clock, are not conserved during evolution of organisms. In this study, we analyzed the three circadian clocks from cyanobacteria, green algae, higher plants, and revealed common and different features of these clocks. This outcome contributes to understanding the evolution of circadian clocks.

研究分野：ナノ生物学、ゲノム機能学

キーワード：生物時計 植物 進化

1. 研究開始当初の背景

生物時計は藍色細菌(シアノバクテリア)から我々ヒトに至るまで、ほぼすべての生物がもつ計時機構である。これは地球の自転に伴う昼夜の環境変化に適応するために、生物が進化の過程で獲得した機構である。生物時計の構成因子をコードする遺伝子(時計遺伝子)は、1984年にショウジョウバエで *period* が同定されて以来、様々なモデル生物で次々と同定されてきた。その中で驚いたことは、時計遺伝子が進化の過程で保存されていないことであった。生物時計は、24時間という極めて長周期の振動や温度補償性など、生化学的に際立った特性があり、そのような特性が異なる分子で作られている事実は大変興味深い。また、このような多様性がどのように生じたのか、なぜ生じたのかなど、生物時計の進化的な側面は未解明である。



研究代表者は、これまで光合成生物の生物時計の研究を行ってきた。まず、藍色細菌において、生物発光を指標としたリズム測定系を開発し (Kondo et al., 1993, PNAS)、変異体を分離し (Kondo et al., 1993, Science)、時計遺伝子を同定した (Ishiura et al., 1998, Science)。その後、分子生物学、生化学、構造生物学の手法を駆使し、藍色細菌の生物時計の分子・原子機構の解明を進めてきた。次に、高等植物(シロイヌナズナ)にも実験系を拡張し、リズム測定系の開発と変異体の分離 (Onai et al., 2004, Plant J)、時計遺伝子の同定に成功した (Onai and Ishiura, 2005, Genes Cells)。さらに、近年では緑藻(クラミドモナス)の生物時計の解析も進め、測定系の開発 (Matsuo et al., 2006, Mol Cell Biol)、変異体の分離・時計遺伝子同定に成功した (Matsuo et al, 2008, Genes Dev)。これらの研究から以下の二点が明らかになった。1) 緑藻と高等植物の時計タンパク質(時計遺伝子のコードするタンパク質)のアミノ酸配列の保存性は高くないが、いくつかの時計タンパク質において同じモチーフおよびモチーフ構成が見られる (Matsuo et al, 2008, Genes Dev; Matsuo and Ishiura, 2010, Int Rev Cell Mol Biol; Matsuo and Ishiura, 2011, FEBS lett)。2) 藍色細菌の時計タンパク質は緑藻・高等植物のいずれの時計タンパク質とも相同性がない。これらから生物進化における植物時計の歴史は次の

ように推測される。藍色細菌の時計遺伝子は真核生物への共生により葉緑体化した後に失われた。緑藻や高等植物の生物時計は共通の起源を持つが、その後、ある程度多様化した。

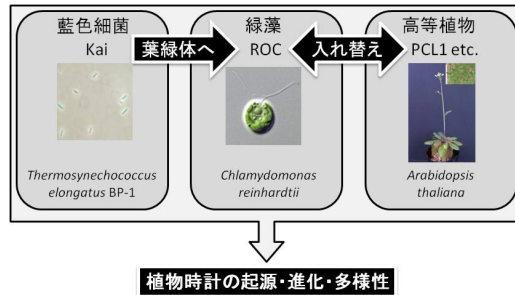
2. 研究の目的

本研究では、藍色細菌、緑藻、高等植物の生物時計の解析を進めると共に、緑藻を基盤として、それらの時計の互換性を明らかにすることで、植物時計の起源や進化・多様性に関する理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

藍色細菌時計は生化学、構造生物学の手法を用いて解析を行った。緑藻時計に関しては、時計遺伝子 *ROC75* の解析を中心に、遺伝学的手法を用いて行った。

緑藻の葉緑体に藍色細菌の時計遺伝子を移入し、葉緑体の概日リズムへの影響を調べた。また、緑藻の *ROC75* 遺伝子と高等植物の *PCL1* 遺伝子の緑藻時計における互換性に関して解析を行った。

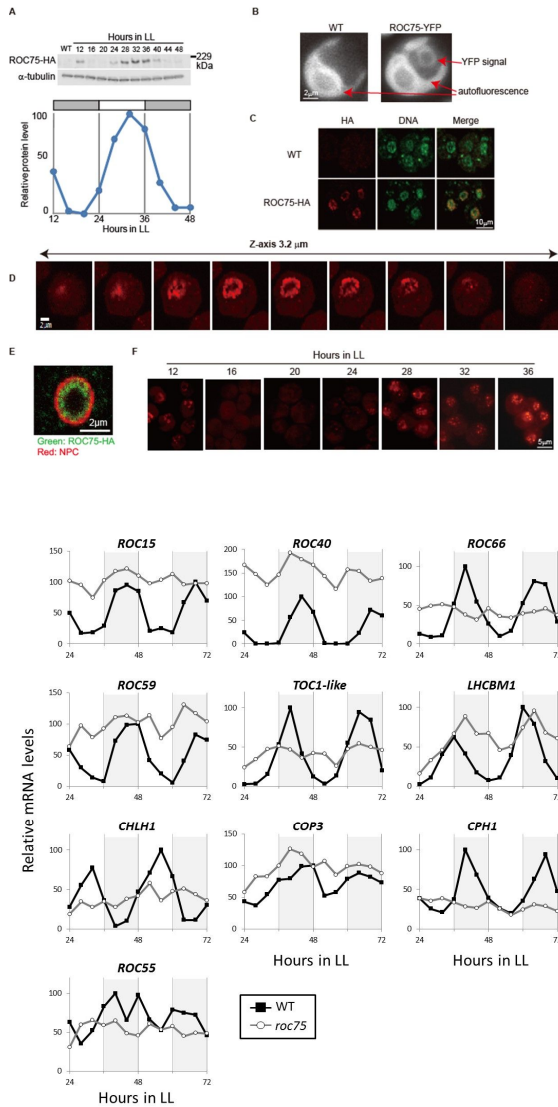


4. 研究成果

緑藻時計の解析

高等植物の生物時計において、GARP型DNA結合モチーフを持つ転写因子 *PCL1* が、リズム発振において非常に重要な役割を持つことが明らかになっている (Onai and Ishiura, 2005, Genes Cells)。クラミドモナスにおいてGARP型転写因子をコードする時計遺伝子は *ROC15* と *ROC75* の2つである。最近の研究から、*ROC15* は生物時計の光リセットに重要な役割を持つことが明らかになってきた (Niwa et al., 2013 PNAS)。一方 *ROC75* は、恒暗条件下においてリズムが消失する変異体から同定されて遺伝子であることから、*PCL1* と同様にリズム発振機構に重要であることが示唆されていた (Matsuo et al, 2008, Genes Dev)。そこで本研究では、*ROC75* に関して詳細な解析を行った。その結果、*ROC75* タンパク質は主観的昼に発現する核局在タンパク質であり、他の時計遺伝子を含む多くの遺伝子の発現を、主観的昼に抑制することを明らかにした (論文投稿準備中)。これらの特徴は、*PCL1* と対照的であった。*PCL1* タンパク質は evening complex と呼ばれる主観的夕暮れから主観的夜に形成されるタンパク質複合体の構成因子で、その時間帯に多くの遺伝子の抑制に関与している。しかし一方で、*ROC75* は *PCL1* と類似した配列を認識す

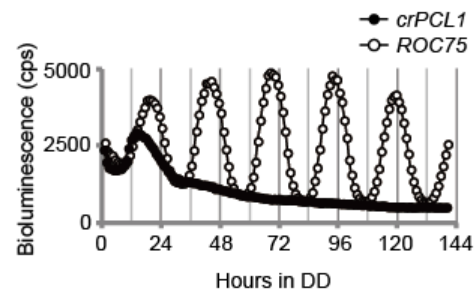
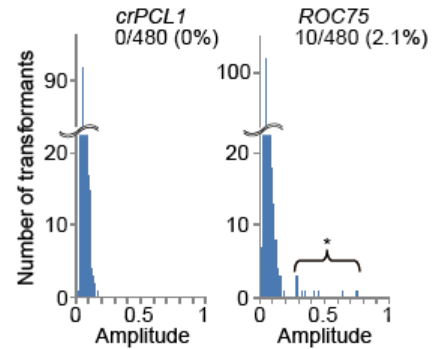
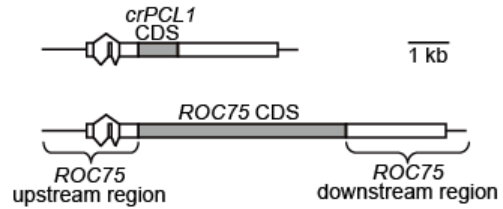
ることを Electrophoresis mobility shift assay により明らかにした。これらの結果から、緑藻と高等植物の生物時計の共通点と相違点が見えてきた。



緑藻時計と陸上植物時計の互換性

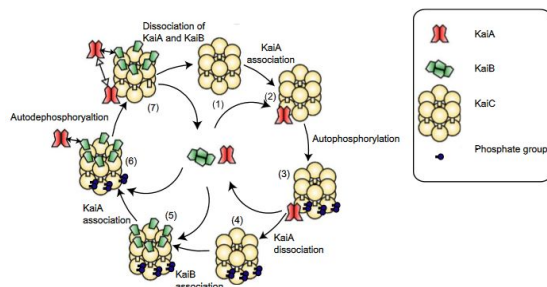
シロイヌナズナの *PCL1* をクラミドモナスの核ゲノムで発現させ、緑藻時計の構成因子として機能するか検討した。*PCL1* コード配列のコドンクラミドモナスの核ゲノムに最適化し、クラミドモナス *ROC75* のプロモーターおよびターミネーターの制御下で主観的昼に発現ピークを持つように発現させた。しかし、この融合 *PCL1* 遺伝子では *ROC75* の欠損変異を相補することは出来なかった。おそらく、現在の緑藻と高等植物間では、時間的な制御以外にも機能分化が起こっていると考えられる。実際、時計遺伝子間の相互作用に関して、シロイヌナズナとクラミドモナスでは異なることが明らかになりつつある。そのひとつが GARP 転写因子 (*PCL1* および *ROC75*) と、Myb 転写因子遺伝子 (*LHY/CCA1* および *ROC40*) の関係である。クラミドモナスでは、*ROC75* は直接的に *ROC40* の転写抑制をするが、シロイヌナズナ

では、*PCL1* と *CCA1/LHY* の間に *PRR* 遺伝子が介在し、間接的に転写を活性化する。つまり、高等植物と緑藻では両者の遺伝学的関係は逆転している。



藍色細菌時計の解析

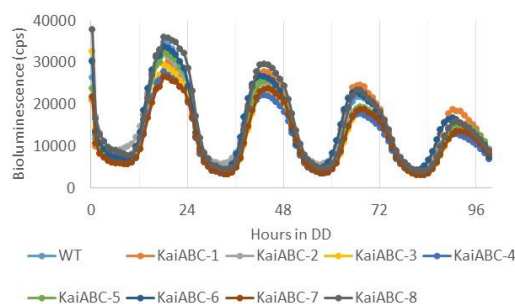
藍色細菌の概日時計のメカニズムに関して、以下の点を明らかにした。1) ATP を介した KaiB-KaiC 間の相互作用機序、2) KaiA-KaiC 間の相互作用機序、3) リズム生成時における KaiB 単量体 - 二量体 - 四量体相互変換の重要性、4) 試験管内再構成した KaiABC 振動体における KaiA-KaiC、KaiB-KaiC 複合形成リズム。これらの成果から、リズム発振時における KaiA、KaiB、KaiC 三者の複合体形成モデルを提唱した。



葉緑体時計

クラミドモナスの葉緑体ゲノムに藍色細菌

菌の *kaiABC* 遺伝子を発現させた。クラミドモナスの *psbB/T/H* オペロンのコード配列をそれぞれ *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* に置換したキメラ遺伝子（各コード配列はコドン最適化）を作製し、*psbD* 遺伝子上流の遺伝子間領域に挿入した。葉緑体の遺伝子発現リズムを生物発光レポーターで測定した結果、*kai* 発現株の葉緑体リズムは、野生型と比較して有意な差が認められなかった。おそらく Kai 振動体の時間情報が葉緑体ゲノムの遺伝子発現に伝達されていないためと思われる。このシステムは、今後、Kai 振動体の時間情報の出力機構を解析するためのシステムとして大いに期待できる。



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 10 件、全て査読あり)

1. 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.** 13(3), e1006645, 2017
2. 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.** 21(8), 890-900, 2017
3. 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(3), 173-90, 2015
4. 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(4), 297-324, 2014
5. 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(11), e80200, 2013

6. 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

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 石浦正寛; クラミドモナスからクラミドモナスへ、第 10 回クラミドモナス研究会、2013 年 11 月 29 日~30 日、自然科学研究機構基礎生物学研究所、岡崎、招待講演
2. 小内清, 石浦正寛; 生物発光リアルタイム測定解析システムの開発と活用・普及促進、JASIS 2013 コンファレンス、2013 年 9 月 5 日、幕張メッセ国際会議場、招待講演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

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

(3)連携研究者

小内 清 (Onai, Kiyoshi)
京都大学農学研究科・特任准教授
研究者番号：00402454

三野 広幸 (Mino, Hiroyuki)
名古屋大学理学研究科・准教授
研究者番号：70300902

難波 啓一 (Namba, Keiichi)
大阪大学生命機能研究科・教授
研究者番号：30346142

池上 貴久 (Ikegami, Takahisa)
横浜市立大学生命医学研究科・教授
研究者番号：20283939

(4)研究協力者