

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440179

研究課題名(和文) 緑藻の生物時計の分子基盤

研究課題名(英文) The molecular basis of circadian clock in algae

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトからシアノバクテリアまで、地球上のほとんどの生物は概日時計を持っています。本研究では、池などに住む緑藻の一種であるクラミドモナスを用いて、概日時計の分子メカニズムの研究を行いました。その結果、光がクラミドモナスの概日時計をリセットするメカニズムや、陸上植物の概日時計との共通点や相違点が明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：From cyanobacteria to human, most organisms on the earth have the circadian clock. In this study, we investigated a molecular basis of the clock by using Chlamydomonas, a freshwater alga, as a model. We revealed molecular mechanisms of resetting of the algal clock by light, and common and different features of clocks between algae and land plants.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 緑藻 時計遺伝子

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することで、生物が外界の周期的な変化(昼夜変化)に適応することを可能にしている。現在までに、原核生物(シアノバクテリア)、陸上植物(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、しばしば「Green Yeast」と呼ばれ、真核細胞の生物時計モデル系として有用である。研究代表者らは、クラミドモナスにおいて時計遺伝子の網羅的同定に成功し、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。またこれにより、クラミドモナスを時計遺伝子研究の新たな、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

クラミドモナスの時計遺伝子とその産物(時計タンパク質)の解析を進めることで、真核生物の生物時計の分子基盤の理解を進めると共に、光合成生物がもつ生物時計の共通性と多様性の理解を深めることを目的とした。

具体的には、DNA結合モチーフを持つ時計遺伝子産物であるROC75のターゲット遺伝子の探索と、同じくDNA結合モチーフを持つ時計遺伝子産物であるROC15の生物時計のリセットとの関わりに関する解析を中心に行った。

3. 研究の方法

(1)ROC75のターゲット遺伝子の探索

クロマチン免疫沈降法(ChIP)によりDNA-ROC75タンパク質複合体を精製し、次世代シーケンサー(SOLiD 5500 [Life Technologies])を用いて結合DNAを網羅的に同定した。まず、クラミドモナスのROC75遺伝子の変異株にヘマグルチニンエポープ配列(HA)をタグとして融合したROC75タンパク質を発現させ、生物発光リズムが回復した株を作製した。その細胞をグルタルアルデヒド処理してDNAとタンパク質を架橋し、超音波破碎によりDNAを断片化した後、抗HA抗体で免疫沈降した。脱架橋後、DNAを精製し、SOLiD5500のプロトコールに従ってライブラリー化・シーケンシングを行った。

(2)ROC15と生物時計のリセット機構

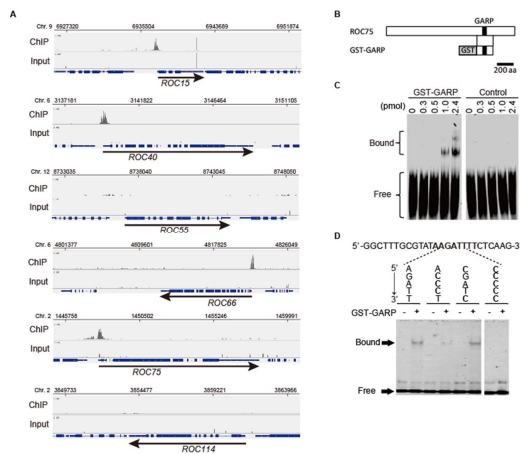
ROC15を欠損する変異株において位相シフトが正常に起こるかどうかを調べた。具体的には、様々な波長および強度の光パルスを与え、生物発光リズム(*tufA-luc*)の位相シフ

トの程度(時間)を調べた。また、この研究を進展させ、ROC15の光誘導性の分解に関する変異体の分離および遺伝子同定を行った。

4. 研究成果

(1)ROC75のターゲット遺伝子の探索

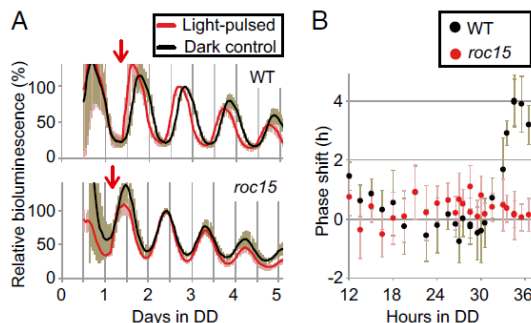
ChIP-seq解析の結果、100以上の遺伝子がROC75のターゲット遺伝子として検出された。特徴としては、まず、他の時計遺伝子(ROC15、ROC40、ROC66、ROC59)が検出された。また、ROC75自身も検出された。さらに、シロイヌナズナで時計遺伝子として知られる*TOC1*と類似した遺伝子も検出された。その他の遺伝子としては、光合成関連遺伝子、クロロフィル合成関連遺伝子、光受容タンパク質遺伝子などが検出された。



ROC75はGARP型の転写因子であり、ROC40はSingle Myb型の転写因子である。それぞれ、シロイヌナズナの時計遺伝子ではPCL1(LUX)およびCCA1/LHYに相当すると考えられる。本研究の結果から、これらの転写因子間の関係が緑藻と陸上植物で異なることが明らかになった。すなわち、緑藻ではGARP転写因子が直接Myb転写因子遺伝子を制御するが、陸上植物ではそれらの間にPRR遺伝子が介在している。

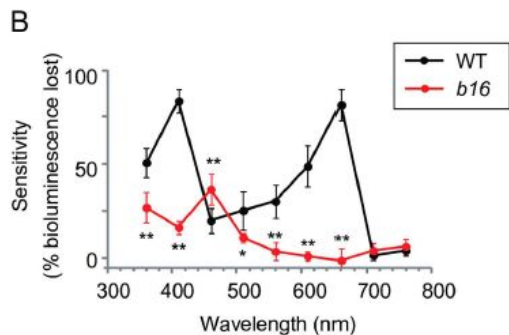
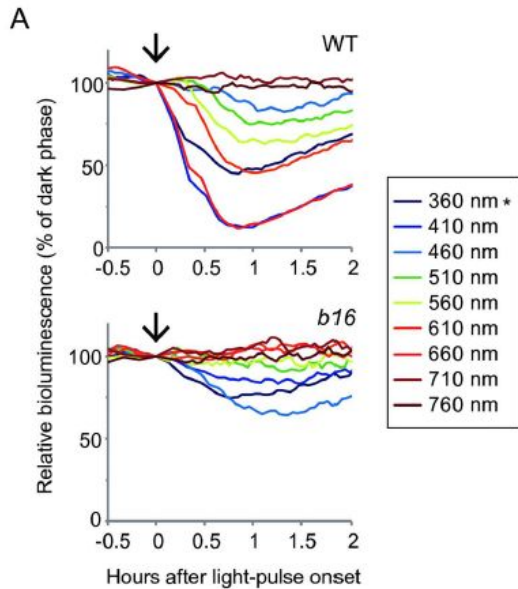
(2)ROC15と生物時計のリセット機構

ROC15を欠損する変異株において生物時計の位相シフトを解析した。

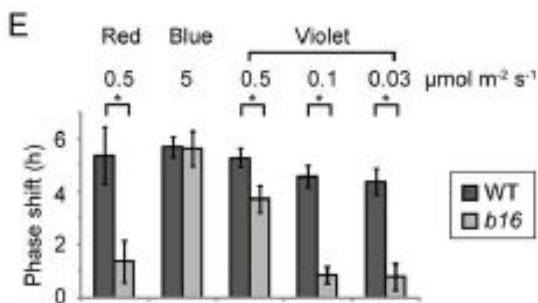


その結果、この変異体では生物時計の位相シフトが極めて異常であり、位相前進領域においては、ほとんどシフトを示さないことが明らかになった。

本研究では、ROC15 と生物時計のリセット機構に関してさらに解析を行った。まず、ROC15 とルシフェラーゼの融合レポータータンパク質を発現する株を用いて、ROC15 の光誘導性分解に異常を来した変異体を分離した。ランダム変異を導入した約 14000 個体からスクリーニングし、10 個の変異体を得た。そのうちの 1 つは、赤、および紫領域の光に対する応答に異常が見られたが、青色光に対しては正常な応答を示した。

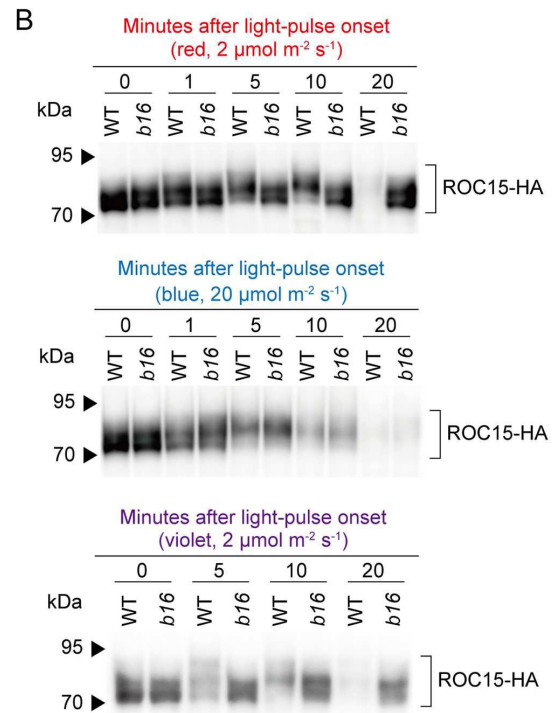
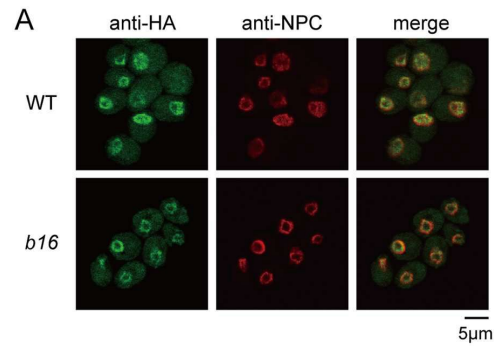


さらに、光による位相応答を調べた結果、ROC15 の光応答と同様に、赤色光、紫色光に対して応答の異常が見られた。

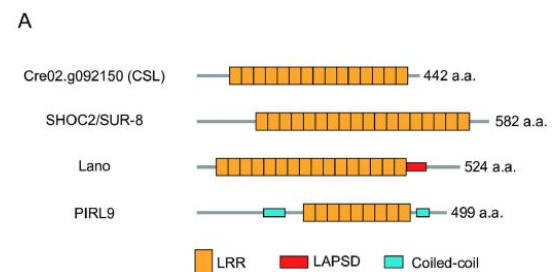


そこで、この変異体において ROC15 の光応答を分子レベルで解析した。その結果、ROC15 タンパク質の細胞内局在は正常であるが、光照射後におけるタンパク質のリ

ン酸化が起こらない異常を持つことが明らかになった。



この変異体において変異の起こった遺伝子を同定したところ、ヒトから酵母で保存された SHOC2 と呼ばれる Ras/Raf シグナル伝達機構に関わるロイシンリッチリピートタンパク質と類似したタンパク質をコードすることが明らかとなった。



クラミドモナス等の緑藻において、ROC15 の光応答のような波長特性を示す光シグナル伝達経路はこれまで見つかっていなかった。本研究は緑藻の新しい光応答機構の解明に繋がる研究である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7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. Goncalves EC, Koh J, Zhu N, Yoo MJ, Chen S, Matsuo T, Johnson JV, Rathinasabapathi B*; Nitrogen starvation-induced accumulation of triacylglycerol in the green algae: evidence for a role for ROC40, a transcription factor involved in circadian rhythm. **Plant J.**, 85,743-57, 2016
3. Ryo M, Matsuo T*, Yamashino T*, Ichinose M, Sugita M, Aoki S*; Diversity of plant circadian clocks: Insights from studies of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Physcomitrella patens*. **Plant Signal Behav.**, 11, e1116661, 2016
4. 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
5. 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21件)

1. Matsuo T; The circadian clock in the unicellular green alga *Chlamydomonas*. RNA and CLOCK 2015 International Symposium Epigenetic Landscape in Biological Rhythms, March 25-26, 2015, Yumebutai, Awaji, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

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・講師
研究者番号：00452201

(2)研究分担者

(3)連携研究者

石浦 正寛 (Ishiura, Masahiro)
名古屋大学・名誉教授
研究者番号：20132730

井原 邦夫 (Ihara, Kunio)
名古屋大学・遺伝子実験施設・准教授
研究者番号：90223297

(4)研究協力者