

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657001

研究課題名（和文）

細胞内3ゲノムの遺伝子発現同時リアルタイム測定系の開発

研究課題名（英文）

Real-time monitoring system for gene expressions of the intracellular three genomes.

研究代表者

石浦 正寛 (Masahiro Ishiura)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：20132730

研究成果の概要（和文）：

本研究では、単細胞性緑藻クラミドモナスを用いて核と葉緑体の遺伝子発現を同時に、且つリアルタイムに測定するための基盤技術の開発に成功した。この成果は、光合成やバイオエネルギーの研究への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Our study succeeded in developing a basic technology for simultaneous and real-time monitoring of the nuclear and chloroplast gene expressions in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. This technology will be applied to studies on the photosynthesis and the creation of new bioenergy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物額

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム機能・発現

1. 研究開始当初の背景

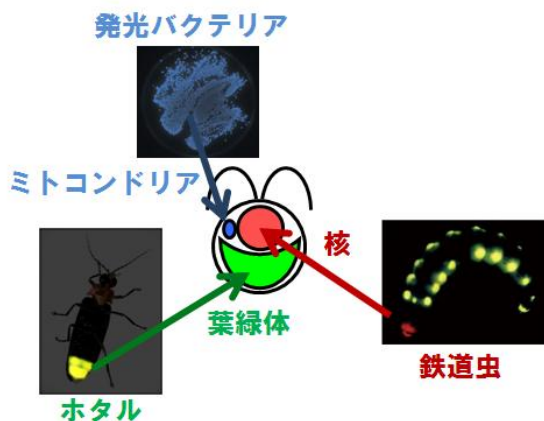
細胞内の3ゲノム（核ゲノム、葉緑体ゲノム、ミトコンドリアゲノム）は相互に影響し合っている。葉緑体やミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子の発現は、核から供給される発現制御タンパク（ σ 因子など）に制御されている。一方、オルガネラから核への逆行的な遺伝子発現の制御シグナルが存在することも知られている（ミトコンドリアシグナル、プラスチドシグナル）。これらのシグナルによって細胞内の3ゲノムの遺伝子発現はダイナミックに変化することで、時には協調的、また必要に応じて解離して働き、細胞全体として調和の取れた生命活動を営んでいる。

ルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を用いて、遺伝子発現をリアルタイムに観察する手法は現在までに多くの研究分野において様々な生物種に応用されている。それらの多くは核ゲノムの遺伝子発現のモニタリングである。また、葉緑体の遺伝子発現のリアルタイム測定に関してもいくつか例がある。一方、ミトコンドリアに関してはこれまでに例がない。我々は単細胞緑藻のクラミドモナスにおいて、葉緑体の遺伝子発現のリアルタイム測定に成功した (Matsuo et al. *Mol Cell Biol*, 2006, 26:863-870)。さらにそのリアルタイム測定系を用いて、核が生物時計を介して葉緑体の遺伝子発現を制御する機構の一端を明らかにした (Matsuo et al., *Genes Dev*,

2008, 22:918-30)。

2. 研究の目的

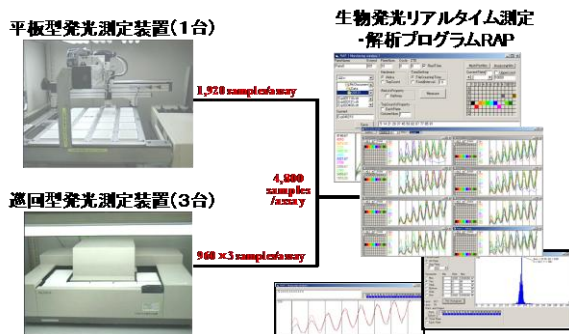
クラミドモナスは Green yeast と称される優れたモデル生物であり、核、葉緑体、ミトコンドリアの全てに関して形質転換が出来る現時点では唯一の生物である。我々は、クラミドモナスのこの特性を利用すれば3ゲノム同時リアルタイム測定が可能になるのではないかと考えた。すなわち、すでに開発済みの葉緑体に加え、核とミトコンドリアにそれぞれ異なる波長で発光する生物発光レポーターを導入すれば、細胞内3ゲノムの遺伝子発現を同時にリアルタイム測定することが可能になると考え、本研究を提案した。



3. 研究の方法

遺伝子コンストラクトの作製、遺伝子人工合成、クラミドモナスの形質転換・交配等は定法に従って行った (Matsuo et al. Mol Cell Biol, 2006, 26:863-870, Matsuo et al., Genes Dev, 2008, 22:918-30)。

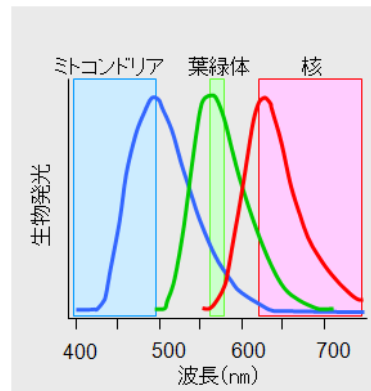
生物発光測定は下図の生物発光自動測定システムを用いて行った (Matsuo et al. Mol Cell Biol, 2006, 26:863-870)。



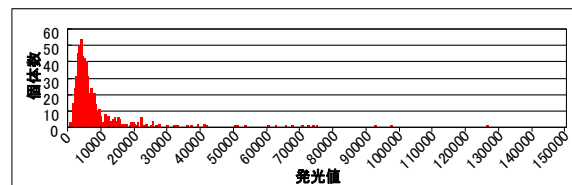
4. 研究成果

本研究ではまず、既存の葉緑体レポーターの発光量の増強に取り組んだ。本研究では異なる3色のルシフェラーゼ発光を光学フィルターを使ってどのオルガネラ由来の発光か

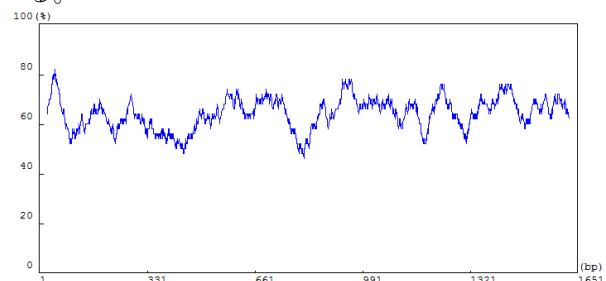
を識別するため、十分な発光量があることが望ましいためである。



既存のレポーター株を遺伝的バックグラウンドの異なる株 (137c 株, 6145c 株, S11-32a 株) と交配し、子孫の中から特に強く発光する株を選別した。その結果を下図に示す。子孫の発光値は数百 CPS から 10 万を超えるものまで幅広く分布し、最大の発光値は 126500CPS であった。この値は従来の葉緑体発光細胞の平均発光値 1291.34 ± 40.54 CPS のおよそ 100 倍である。



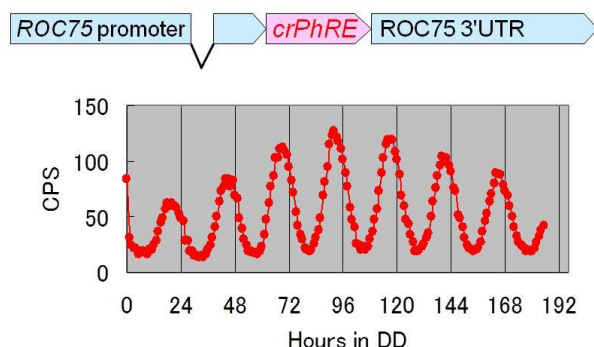
次に核に導入する鉄道虫由来の赤色ルシフェラーゼの開発に取り組んだ。クラミドモナスの核ゲノムの遺伝子は、極めて GC リッチな配列を特徴としており、鉄道虫のルシフェラーゼは発現しないと予想された。そこで遺伝子人工合成技術により、クラミドモナスの核ゲノムに最適化した赤色ルシフェラーゼ (*crPhRE*) を作製した。作製した *crPhRE* はコード配列の全体にわたって GC に富んだ配列で (下図)、全体の GC 含量は 64% である。



この赤色ルシフェラーゼコード配列に、クラミドモナスの時計遺伝子 *Rhythm of Chloroplast 75(ROC75)* のプロモーターと 3' UTR 配列を連結したキメラ遺伝子を作製し

た。この遺伝子をクラミドモナス細胞にパロモマイシン耐性を付与するマーカー遺伝子 *AphVIII* と混合して、クラミドモナスを共形質転換した。形質転換はエレクトロポレーション法によって行った (Matsuo et al., *Genes Dev*, 2008, 22:918-30)。

得られた形質転換体の生物発光を測定した結果、下図に示すとおり、極めて明瞭な *ROC75* 遺伝子発現の概日リズムが測定できた。このことは本研究で作製したクラミドモナス用赤色ルシフェラーゼが遺伝子発現レポーターとして有用であることを示している。



次にミトコンドリアに導入するルシフェラーゼとして、バクテリア型の *LuxAB* を選択した。これは青色に発光するルシフェラーゼで、葉緑体の緑色ルシフェラーゼ、核の赤色ルシフェラーゼと光学フィルターで切り分けが可能であると期待されるためである。ミトコンドリアゲノムの形質転換は可能であるが効率はまだ良くないため、まず、核ゲノムに発現させて、クラミドモナスにおいてこのレポーターが利用可能かどうかを検討した。

LuxAB は *LuxA* と *LuxB* のサブユニットから成る発光タンパク質である。レポーターとしては単分子で機能することが望ましいので、*LuxA* と *LuxB* をフレキシブルリンカー (GGSGGGGSGG) で連結した融合タンパク質としてデザインし、さらにクラミドモナス用にコドン最適化した *CrLuxAB* を人工遺伝子合成により作製した。大腸菌でこの融合タンパク質を発現させ発光能を保持していることを確認した。その後、クラミドモナスの時計遺伝子の制御下で発現させたが、クラミドモナス細胞においては有意な発光は確認できなかった。

[まとめ]

本研究では、核と葉緑体の遺伝子発現同時測定の基礎となる技術の開発に成功した。これは、他に例のない極めてユニークな実験系である。しかし、研究開始当初ではわからな

かった問題点がいくつか明らかになり、目標であった細胞内3ゲノムの同時遺伝子発現測定には至っていない。今後、クラミドモナスで利用可能な青色レポーターを探索することが重要な課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件) 7を除きすべて査読有

1. 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.
2. 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 Comm**. 418, 342-346.
3. Asada Y, Mutoh R, Ishiura M, Mino H (2011): Nonselective excitation of pulsed ELDOR using multi-frequency microwaves. **J Magnetic Resonance** 213: 200-205.
4. Mutoh R., Mino H., Murakami R., Uzumaki T., Ishiura M (2011): Thermodynamically induced conformational changes of the cyanobacterial circadian clock protein KaiB. **Applied Magnetic Resonance** 40:525-534
5. 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.
6. Matsuo T, Ishiura M (2011):

Chlamydomonas reinhardtii as a new model system for studying the molecular basis of the circadian clock. **FEBS lett.** 585: 1495-1502.

7. 小内清、石浦正寛 (2011): 生物発光リアルタイム測定解析システム = 有用生物株や有用遺伝子の網羅的な高速探索のための新システム =、光アライアンス「特集: 生物フォトン研究の最前線」(3月号)、22: 20-26.
8. 小内清、石浦正寛 (2010): 生物発光リアルタイム測定システムの歴史と展望 ~ 生物発光からゲノム学・生物物理学への潮流へ、*生物物理* 50: 141-145.
9. Matsuo T, Ishiura M (2010): New insights into the circadian clock in *Chlamydomonas*. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 280, 281-314.

[学会発表] (計 10 件)

1. 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、招待講演
2. 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、招待講演
3. 石浦正寛: 藍色細菌と植物の生物時計の分子遺伝学的研究: 時計分子装置のリアルタイム測定、構造、機能、日本遺伝学会第 83 回大会、日本遺伝学会木原賞受賞講演、2011 年 9 月 21 日、京都大学、京都、招待講演
4. Matsuo T, Ishiura M: Identification and analysis of circadian clock genes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas* and *Phaeodactylum* Workshop "Specific Light Driven Reactions in Unicellular Model Algae" 2011, March 25-27, Jena, Germany, 国際会議招待講演
5. Matsuo T, Iida T, Kunii Y, Kato D, Tachikawa M, Ishiura M: Analysis of the circadian clock genes *ROCs* in *Chlamydomonas reinhardtii*, The 14th international *Chlamydomonas* conference, June 7 -June 10, 2010, Wheaton College,

Norton, Massachusetts, USA, Selected oral presentation

6. 村上怜子、石浦正寛: 藍色細菌 Kai 生物時計分子装置の時間発振中の構造変化、超異分野交流会、東京、上智大学、2011 年 3 月 19 日、招待講演
7. Risa Mutoh, Hiroyuki Mino, Reiko Murakami, Yuki Asada, Tatsuya Uzumaki, Kentaro Ishii, Masahiro Ishiura: Protein interactions in the in vitro cyanobacterial Kai clock system revealed by ESR analysis, Asia-Pacific EPR/ESR Symposium, October 10-14, 2010, International Convention Center, Jeju, Republic of Korea, Poster
8. 河合都妙、小内清、石浦正寛、中村研三: 生物発光リアルタイム測定解析システムによる高等植物の油脂合成制御因子の網羅的探索、科学技術交流財団「ハイスループットスクリーニングシステムと次世代 DNA シーケンサーの相乗的応用」第 1 回研究会、2010 年 7 月 23 日、名古屋大学野依記念学術交流会館、名古屋、招待講演
9. 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 = 有用生物株や有用遺伝子の網羅的な高速探索のための新システムの開発 =、科学技術交流財団「ハイスループットスクリーニングシステムと次世代 DNA シーケンサーの相乗的応用」第 1 回研究会、2010 年 7 月 23 日、名古屋大学野依記念学術交流会館、名古屋、招待講演
10. 石浦正寛: 生物発光リアルタイム測定法の開発と生物時計研究への応用、(財)岩手生物工学研究センター第 165 回公開セミナー、2010 年 5 月 28 日、(財)岩手生物工学研究センター、北上市、招待講演

[その他]

<http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~ishiura-g/>

6. 研究組織
- (1)研究代表者
石浦 正寛 (Masahiro Ishiura)
名古屋大学・遺伝子実験施設・教授
研究者番号: 20132730
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
松尾 拓哉 (Takuya Matsuo)
名古屋大学・遺伝子実験施設・助教
研究者番号: 00452201