

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18570004

研究課題名（和文） ヒメツリガネゴケを用いた概日時計機構の解析

研究課題名（英文） Molecular-genetic study of the circadian clock mechanism using the moss *Physcomitrella patens* as a model plant.

研究代表者

青木 摂之 (Setsuyuki Aoki)

名古屋大学・大学院情報科学研究科・講師

研究者番号：30283469

研究成果の概要：

モデル基部植物ヒメツリガネゴケを用いて、被子植物の時計遺伝子のホモログの網羅的な同定・クローニングを行った。それらのうち *CCA1/LHY* ホモログのプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結し、コケゲノムに移入し、従来より効果的な発光リズムレポーター株を作出した。このレポーター株をホストとして用いた逆遺伝学的解析により、*CCA1/LHY* や *PRR* などの被子植物の時計遺伝子のホモログの機能を調査し、コケの時計を構成すると思われる遺伝子ネットワークの一部を明らかにし、被子植物の時計機構の分子モデルとの比較を行った。また、コケの色素体シグマ因子遺伝子のひとつ *PpSIG5* の逆遺伝学的解析により、*PpSIG5* タンパク質がコケ概日システムの出力系の重要な調節因子である可能性を示唆する結果を得た。さらに、コケプロトプラストを用いた、時計遺伝子の日周条件下での発現制御解析のためのトランジェントアッセイ系の開発を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,400,000	0	2,400,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	360,000	3,960,000

研究分野：生物学

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：概日リズム、時計遺伝子、植物の概日時計の進化、ヒメツリガネゴケ

1. 研究開始当初の背景

植物の概日時計の分子機構はシロイヌナズナを中心とするモデル被子植物のみにおいて研究されてきていた。一方で、コケ、シダ・トクサ類、小葉類、裸子植物からなる、より基部に近い植物群においては、時計機構の解析はおろか、概日リズムの観察すら稀で

あった。このため、植物の時計機構の起源と進化は完全な謎であった。

ヒメツリガネゴケは、1) 従来より遺伝学的解析に用いられ、培養をはじめとする基本実験系が確立されている；2) 最近、遺伝子ターゲティングをはじめとする高度な分子遺伝学的手法が整備されつつある；3) ゲノ

ム情報が蓄積しつつある；といった実験上の大きな利点を持ち、また基部植物である蘚類に属するため、進化的な観点からの研究に非常に適するモデル植物である。このコケを用いて概日時計の遺伝子レベルの研究を推進すれば、謎であった植物時計の起源と進化の解明に肉薄できると期待された。

2. 研究の目的

モデル基部植物ヒメツリガネゴケを用い、概日時計の遺伝子レベルでの研究を推進し、コケの時計機構の枠組みを明らかにする。その成果を被子植物において得られている関連する成果と比較し、植物時計の起源と進化に関する知見を得る。

3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケにおいて被子植物シロイヌナズナの時計遺伝子のホモログ遺伝子を網羅的に同定・クローニングする。それらのうち高振幅なリズム発現を示す遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をつなぎ、これをゲノムに移入することにより効果的なリズム発現レポーター株を作出する。この株を用い、逆遺伝学を中心とする時計遺伝子ホモログの機能解析を行う。また、やはり逆遺伝学的方法により、はっきりしたリズム発現を示す *PpSIG5* 遺伝子（色素体シグマ因子をコードする）の概日システムにおける機能を調べる。さらに、プロトプラストを宿主細胞に用いて、時計遺伝子の機能解析のための実験系を確立し、おもに時計遺伝子ネットワークの制御関係を解析する。これらによりコケの時計の分子機構の枠組みを明らかにし、被子植物の研究成果との比較解析を行う。

4. 研究成果

(1) *CCA1/LHY* のコケ・ホモログ *PpCCA1a* のプロモーターを用いて、従来の発光レポーターよりも高振幅で持続性の高い発光リズムを示すレポーター株 *PpCCA1b::luc+* を作出した。

(2) *PpCCA1b::luc+* 株を宿主として用い、*PpCCA1a*、*PpCCA1b* それぞれの一重破壊株、そして両者の二重破壊株を作出した。

(3) (2) の各種破壊株を解析し、コケの *CCA1/LHY* ホモログがアラビドプシスの *CCA1/LHY* の機能的なカウンターパートであることを明らかにした。

(4) 被子植物の *PRR* 遺伝子群のホモログを4つ (*PpPRR1-4*) クローニングし、それらの系統解析と発現プロファイル解析を詳細に行った。

(5) コケの色素体シグマ因子をコードする遺伝子の一つ *PpSIG5* の破壊株を作出し、この株において *psbD* 遺伝子の日内発現プロフ

ファイルを解析することにより、*PpSIG5* タンパク質が概日時計の出力調節因子である可能性が高いことを明らかにした。また *PpSIG5* は、アラビドプシスの *SIG5* と同様なストレス応答調節機能を持っていることを示し、*SIG5* が陸上植物において広く保存されているストレス応答機能を持つ重要因子であることを明らかにした。

(6) コケ・プロトプラスト細胞を宿主として用い、候補時計遺伝子の日周サイクル条件下での機能を調べるためのトランジェント・アッセイ系を確立した。

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4件)

- ① Stefan A. Rensing, Daniel Lang, Andreas Zimmer, Astrid Terry, Asaf Salamov, Harris Shapiro, Tomoaki Nishiyama, Pierre-Francois Perroud, Erika Lindquist, Yasuko Kamisugi, Takako Tanahashi, Keiko Sakakibara, Tomomichi Fujita, Kazuko Oishi, Tadasu Shin-I, Yoko Kuroki, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Shinichi Hashimoto, Kazuo Yamaguchi, Sumio Sugano, Yuji Kohara, Asao Fujiyama, Aldwin Anterola, Setsuyuki Aoki, Neil Ashton, W. Brad Barbazuk, Elizabeth Barker, Jeffrey Bennetzen, Robert Blankenship, Sung Hyun Cho, Susan Dutcher, Mark Estelle, Jeffrey A. Fawcett, Heidrun Gundlach, Kosuke Hanada, Alexander Heyl, Karen A. Hicks, Jon Hughes, Martin Lohr, Klaus Mayer, Alexander Melkozernov, Takashi Murata, David Nelson, Birgit Pils, Michael Prigge, Bernd Reiss, Tanya Renner, Stephane Rombauts, Paul Rushton, Anton Sanderfoot, Gabriele Schween, Shin-Han Shiu, Kurt Stueber, Frederica L. Theodoulou, Hank Tu, Yves Van de Peer, Paul J. Verrier, Elizabeth Waters, Andrew Wood, Lixing Yang, David Cove, Andrew C. Cuming, Mitsuyasu Hasebe, Susan Lucas, Brent D. Mishler, Ralf Reski, Igor Grigoriev, Ralph S. Quatrano, Jeffrey L. Boore. The genome of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* (2008) 319(5859):64-69. 査読有
- ② Kazuhiro Ichikawa, Akane Shimizu, Ryo Okada, Santosh B. Satbhai, and Setsuyuki Aoki. The plastid sigma factor *SIG5* is involved in the diurnal regulation of the chloroplast gene *psbD* in the moss

Physcomitrella patens. FEBS Letters (2008) 582(3):405-409. 査読有

- ③ Kazuhisa Okamoto, Masahiro Ishiura, Tatsuharu Torii and Setsuyuki Aoki. A compact multichannel apparatus for automated real-time monitoring of bioluminescence. Journal of Biochemical and Biophysical Methods (2007) 70(4):535-538. 査読有
- ④ Setsuyuki Aoki. The moss *Physcomitrella patens* as a potential model plant for studying circadian rhythms Bryological Research (2006) 9(2):50-59. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① 岡田龍、Santosh Satbhai、近藤紗代、青木撰之「ヒメツリガネゴケにおける *CCA1/LHY* 相同遺伝子 *PpCCA1a* と *PpCCA1b* の機能解析」第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋大学共通教育棟、名古屋市
- ② Santosh Satbhai, Ryo Okada, Yuki Tezuka, Setsuyuki Aoki. "Characterization of the *PRR (Pseudo-Response Regulator)* Genes in the Moss *Physcomitrella patens*." 第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋大学共通教育棟、名古屋市
- ③ Santosh B. Satbhai, Ryo Okada, Yuki Tezuka, Tomonori Ito and Setsuyuki Aoki. "Characterization of Homologs of the *PRR (Pseudo Response Regulator)* Genes in the Moss *Physcomitrella patens*" Keystone Symposia: Plant Sensing, Response and Adaptation to the Environment, January 11-16, 2009, Big Sky Resort, Big Sky, Montana, USA.
- ④ Ryo Okada, Santosh B. Satbhai, Sayo Kondo and Setsuyuki Aoki. "Functional Analysis of the *CCA1/LHY* Homolog Genes *PpCCA1a* and *PpCCA1b* in the Moss *Physcomitrella patens*" The 8th NIBB-EMBL Joint Meeting-Evolution: Genomes, Cell Types and Shapes, November 21- 23, 2008, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan
- ⑤ Santosh Satbhai, Ryo Okada, Yuki Tezuka, Tomonori Ito and Setsuyuki Aoki. "Characterization of Homologs of the *PRR (Pseudo-Response Regulator)* Genes in the Moss *Physcomitrella patens*" The 8th NIBB-EMBL Joint Meeting-Evolution: Genomes, Cell Types and Shapes, November

21- 23, 2008, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan

- ⑥ Ryo Okada, Kazuhiro Ichikawa, Santosh B. Satbhai and Setsuyuki Aoki. "Characterization of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1/LATE ELONGATED HYPOCOTYL* homolog genes *PpCCA1a/PpCCA1b* and the clock-controlled nuclear-encoded plastid sigma factor gene *PpSig5* in the moss *Physcomitrella patens*." (poster) IPR Seminar 2008-The Ins and Outs of Chloroplasts, October 14-15, 2008, Icho Kaikan (3F Lecture Hall), Institute for Protein Research, Osaka University
- ⑦ 岡田龍、Santosh B. Satbhai、近藤紗代、青木撰之「ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* における *CCA1* 相同遺伝子の機能解析」日本遺伝学会第 80 回大会、2008 年 9 月 3~5 日、名古屋大学 IB 情報館、名古屋市
- ⑧ Santosh B. Satbhai、岡田龍、手塚裕紀、伊藤智規、青木撰之「ヒメツリガネゴケの *Pseudo-Response Regulator (PRR)* 遺伝子ホモログの同定と解析」日本遺伝学会第 80 回大会、2008 年 9 月 3~5 日、名古屋大学 IB 情報館、名古屋市
- ⑨ 岡田龍、近藤紗代、青木撰之「ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)における *CCA1* 相同遺伝子の解析」基礎生物学研究所研究会テクニカルワークショップ「コケ植物の実験生物学」、2007 年 12 月 22~23 日、岡崎コンファレンスセンター中会議室、岡崎市
- ⑩ 青木撰之、岡田龍、Santosh B. Satbhai、手塚裕紀「ヒメツリガネゴケの時計関連遺伝子ホモログの系統解析」基礎生物学研究所研究会テクニカルワークショップ「コケ植物の実験生物学」、2007 年 12 月 22~23 日、岡崎コンファレンスセンター中会議室、岡崎市
- ⑪ 青木撰之、岡田龍、手塚裕紀、市川和洋、Santosh B. Satbhai「ヒメツリガネゴケの生物時計関連遺伝子群の解析」日本遺伝学会第 79 回大会、2007 年 9 月 19~21 日、岡山大学創立 50 周年記念館(津島キャンパス)、岡山市
- ⑫ Setsuyuki Aoki, Ryo Okada, Yuki Tezuka, Kazuhiro Ichikawa and Santosh B. Satbhai. Characterization of circadian clock-related

genes in the moss *Physcomitrella patens*.
The 2nd World Congress of Chlonobiology,
November 4-6, 2007, Keio Plaza Hotel,
Tokyo.

- ⑬ 岡田龍、近藤紗代、伊藤智規、青木撰之
「ヒメツリガネゴケにおける CCAI 相同
遺伝子の解析第 47 回日本植物生理学会
年会、2007 年 3 月 28 日～3 月 30 日、愛
媛大学、松山
- ⑭ 青木撰之、岡田龍、近藤紗代、手塚裕紀、
伊藤智規「ヒメツリガネゴケ
(*Physcomitrella patens*) の時計遺伝子群
の解析」第 47 回日本植物生理学会年会、
2007 年 3 月 28 日～3 月 30 日、愛媛大学、
松山
- ⑮ 青木撰之、岡田龍、近藤紗代、手塚裕紀、
市川和洋、伊藤智規「ヒメツリガネゴケ
における時計遺伝子ホモログの解析」第
13 回日本時間生物学会学術大会、2006 年
11 月 30 日～12 月 2 日、東京国際フォー
ラム
- ⑯ 青木撰之、岡田龍、近藤紗代、手塚裕紀、
市川和洋、伊藤智規「ヒメツリガネゴケ
の概日時計遺伝子ホモログの解析」日本
遺伝学会第 78 回大会、2006 年 9 月 25
日～9 月 27 日、つくば国際会議場 (エポ
カルつくば)、つくば
- ⑰ 青木撰之「概日時計の適応的意義—植物
の場合—」シンポジウム「生物時計の多
様性と生態機能に関する研究のトピック
ス」、2006 年 9 月 13 日～15 日、琉球大
学・熱帯生物圏研究センター・瀬底実験
所、沖縄

〔図書〕 (計 5 件)

- ① Circadian clocks in *Synechocystis* PCC 6803,
Thermosynechococcus elongatus,
Trichodesmium spp. and *Prochlorococcus*
spp.. (2008) Setsuyuki Aoki and Kiyoshi
Onai. In *Bacterial Circadian Systems*
(Chapter 16), Edited by Jayna Ditty,
Shannon Mackey and Carl H. Johnson.
Springer. (In press) pp. 259-282.
 - ② Chloroplasts. (2008) Mamoru Sugita and
Setsuyuki Aoki. In the Moss *Physcomitrella*
patens (Chapter 8), Edited by Celia Knight,
Pierre-Francois Perroud and David Cove.
Blackwell Publishing. (In press)
 - ③ 植物の概日時計の多様性と意義. (2008)
青木撰之、「リズム生態学：体内時計の多
様性とその生態機能」pp. 161-182、清水
勇・大石正編、東海大学出版会
 - ④ 概日時計と社会性昆虫 (Circadian clock
and social insects). (2008) 青木撰之、時
間生物学事典」、pp. 182-183、石田直理
雄・本間研一編、朝倉書店
 - ⑤ 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・
培養—ヒメツリガネゴケ. (2008) 杉田護、
青木撰之、「光合成研究法」伊藤繁ほか編、
北海道大学低温科学研究所 (In press)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
青木 撰之 (Setsuyuki Aoki)
名古屋大学・大学院情報科学研究科・講師
研究者番号：30283469