

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19870009
 研究課題名(和文) 藻類の時計遺伝子および葉緑体概日リズム制御因子の網羅的同定
 研究課題名(英文) A global analysis for identifying algal circadian clock genes and circadian regulators for the chloroplast
 研究代表者
 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

研究成果の概要：本研究では単細胞緑藻クラミドモナスを用いて藻類の時計遺伝子および葉緑体の概日リズム制御因子の網羅的同定を行った。葉緑体ゲノムに組み込んだルシフェラーゼレポーターの概日リズムを指標として「葉緑体概日リズム変異体」を多数分離し、概日時計に重要な遺伝子(時計遺伝子)や葉緑体の概日リズム制御に関わる遺伝子を同定することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：生物時計、時計遺伝子、クラミドモナス、葉緑体、生物発光、順遺伝学

1. 研究開始当初の背景

生物時計はほぼ全ての細胞に備わっている機能である。現在までに、いくつかの生物種で生物時計を構成する遺伝子(時計遺伝子)が見つかっている。原核生物である藍色細菌では *kaiA*, *kaiB*, *kaiC*、高等植物のシロイヌナズナでは *toc1*, *lhy*, *cca1*, *pc11*、菌類アカパンカビでは *frq*, *wc-1*, *wc-2*、マウスやショウジョウバエなどの高等動物では *per*, *tim*, *bmal1(cycle)*, *clock* 等である。いずれの生物でもそれらの遺伝子群が転写のフィードバックループを形成しているという点で共通しているが、アミノ酸の配列自

体は全く保存されていない。生物時計の特性には温度の変化に対してほとんど影響を受けないこと(温度補償性)や24時間という極めて長い周期で振動することなど、生化学的に際立った特性がある。そのような特性が全く異なる遺伝子で作られているという点は非常に興味深い。より多くの生物種で生物時計を構成している遺伝子群を同定することが出来れば、生物時計システムの本質および進化に関する理解を大きく前進させる。これまでに時計遺伝子がクローニングされていない概日リズムモデル生物の中で、次に新規な時計遺伝子を発見できる最有力候補は

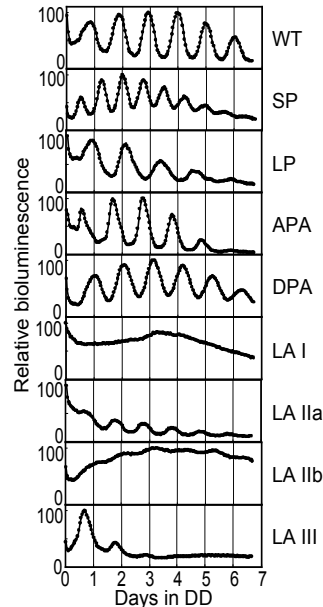
クラミドモナスであった。

2. 研究の目的

我々はこれまで研究においてルシフェラーゼレポーターを用いた生物発光概日リズム測定系をクラミドモナスの葉緑体で確立した (Mol. Cell.

Biol., 2006, 26, 863-870)。

さらに、その葉緑体の生物発光リズムを指標にして 115 個の概日リズム変異体の分離に成功した。本研究では、分離したリズム変異体の原因遺伝子を網羅的に同定する。これらの変異体は遺伝子タギング法により作製したものであり、ゲノム情報を利用することで原因遺伝子を容易に同定することが可能である。次に、同定した多数の遺伝子を「時計遺伝子」と「葉緑体概日リズム制御因子」に分類する。時計遺伝子とはその生物で見られる様々な概日リズム現象の根源にある生物時計を構成する遺伝子であるのに対し、ここで言う葉緑体概日リズム制御因子とは生物時計の時間情報を葉緑体に伝える役割を担った遺伝子のことを指す (我々の行った研究により、葉緑体のリズムは核にコードされた生物時計の制御下にあることが証明されている [Mol. Cell. Biol., 2006, 26, 863-870])。



3. 研究の方法

3. 研究の方法

1) タグ遺伝子 (ハイグロマイシン耐性マーカー) とリズム変異との連鎖の確認

115 個の変異体を野生株と交配し、得られた子孫に関してリズム変異とハイグロマイシン耐性が連鎖しているかどうか調べた。ほぼ 100% の確率で連鎖する変異体のみを次の解析に進めた。このような変異体はタグ遺伝子をゲノム上の一カ所に持ち、それがリズム変異の原因となっていると予測される。(連鎖する確率は次ページ①参照)

2) タグ遺伝子のコピー数確認

連鎖が確認できた変異体に関してサザン解析によるタグ遺伝子のコピー数の確認を行った。

3) TAIL-PCR による破壊された遺伝子の同定

Thermal asymmetric interlaced

(TAIL)-PCR でタグ遺伝子の上流および下流のゲノム配列を決定した。その配列を Joint Genome Institute (JGI) のリリースしたゲノム配列 (Chlamydomonas ver3.0) で検索し、破壊された遺伝子を決定した。

4) 遺伝子相補による確認

破壊された遺伝子を含む BAC クローンから入手した。目的の遺伝子を含む領域を制限酵素で切り出し、変異体に移入して、リズム変異が相補されることを確認した。

5) 核生物発光レポーター株との交配

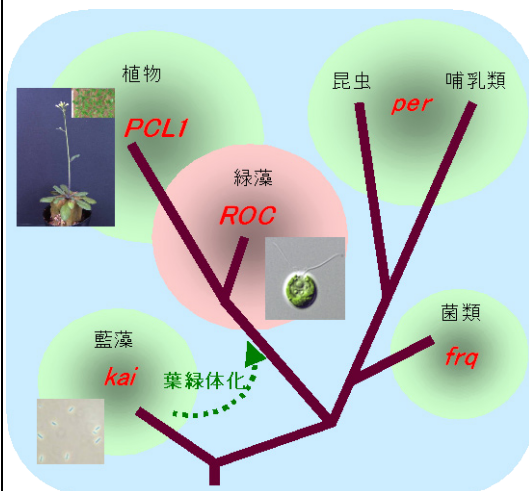
我々の作製したクラミドモナスの核生物発光レポーター株 (*ROC15::LucNC* および *ROC75::LucNC*) を使用した。これらの株とリズム変異体を交配した。

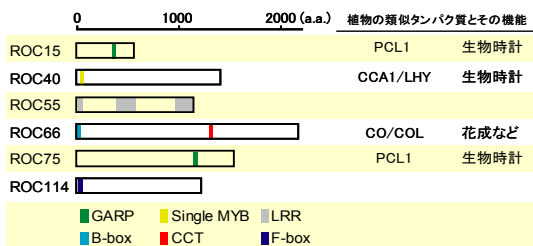
6) 原因遺伝子の分類

得られた次世代のうち発光し且つハイグロマイシン耐性のクローンを選別し生物発光リズムを測定した。

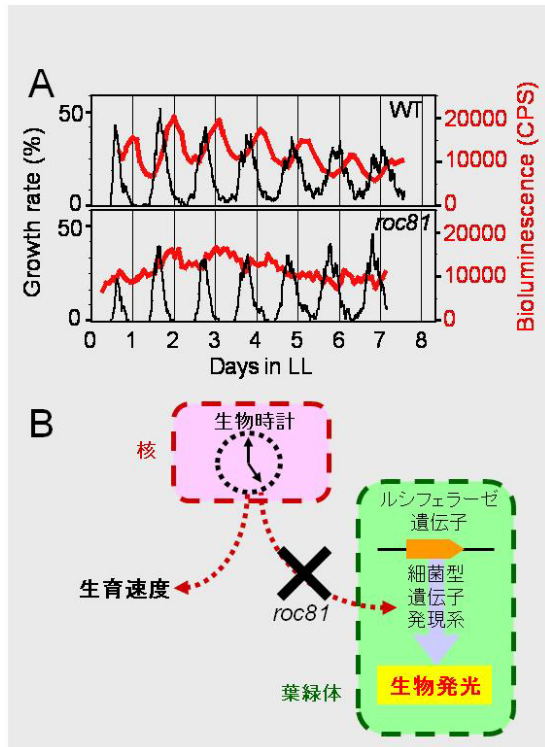
4. 研究成果

1) 我々は上記の方法を用いて葉緑体レポーターの概日リズムが異常になった変異体を 105 個分離することに成功した。さらに、それらの原因遺伝子 (*Rhythm of Chloroplast [ROC]* 遺伝子) 30 個を同定することに成功し、そのうち 6 個は生物時計を構成する時計遺伝子であることを示した。6 つの遺伝子のコードするタンパク質の中には機能ドメインと予測される部分が高等植物の時計遺伝子や花成制御遺伝子の産物と極めて類似したものが 4 つ含まれていた。また、残りの 2 つは他の生物には見られない緑藻独自のものであった。これらの結果から、緑藻の生物時計は高等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が明らかになった。





2) さらに、葉緑体の生物発光に特異的なリズム変異体 (*roc81*) を分離することに成功し、この原因遺伝子も同定した。



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2件)

① Matsuo T, Okamoto K, Onai K, Niwa Y, Shimogawara K, Ishiura M (2008): A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes Dev.* 22:918-930、査読有り

② 松尾拓哉、石浦正寛 (2008) 真核生物における生物時計の新しい実験系：クラミドモナス、蛋白質核酸酵素 (ショートレビュー)、53:1873-1880、査読なし

[学会発表] (計8件)

① 松尾拓哉、飯田高広、立川誠、丹羽由美、石浦正寛：時計遺伝子研究の新しい実験系～クラミドモナス、シンポジウム、第7回クラミドモナスワークショップ、2009年3月

25-26日、名古屋大学野依記念学術交流館、名古屋、口頭発表

② 松尾拓哉、岡本和久、小内清、丹羽由美、下河原浩介、石浦正寛：全ゲノム情報を利用した遺伝子タギング法による網羅的な遺伝子同定、名古屋大学遺伝子実験施設シンポジウム「新たなDNA解析 一次世代DNA解析のすべてとDNA解析の新分野への展開」、2008年12月16日、名古屋大学環境総合館、名古屋、口頭発表

③ 松尾拓哉、石浦正寛：生物発光リアルタイム測定システムの実用例：クラミドモナスにおける時計遺伝子の網羅的クローニング、第2回科学技術交流財団研究会、2008年11月6日、名古屋大学環境総合館、名古屋、口頭発表

④ 松尾拓哉、岡本和久、小内清、丹羽由美、下河原浩介、石浦正寛：時計タンパク質の核移行と核におけるリズム発振機能～単細胞緑藻クラミドモナスにおける時計遺伝子の網羅的同定～、特定領域研究「核ダイナミクス」班会議、2008年10月27-29日、京都ガーデンパレス、京都、口頭発表

⑤ 松尾拓哉、岡本和久、小内清、丹羽由美、下河原浩介、石浦正寛：緑藻の生物時計～クラミドモナスにおける時計遺伝子の網羅的同定、日本遺伝学会第80回大会ワークショップ、2008年9月3-5日、名古屋大学、名古屋、口頭発表

⑥ Matsuo T, Okamoto K, Onai K, Niwa Y, Shimogawara K, Ishiura M: Systematic identification of circadian clock components in the *Chlamydomonas reinhardtii*, The 13th international Chlamydomonas conference, May 27 - Jun 1, 2008, Hyeres-les-Palmiers, France, Oral presentation

⑦ 松尾拓哉、岡本和久、小内清、丹羽由美、石浦正寛：生物発光を指標とした変異体スクリーニングとゲノム情報を利用した原因遺伝子の網羅的同定：第6回クラミドモナス研究会、2007年11月23-24日、高知工科大学、高知、口頭発表

⑧ 松尾拓哉、岡本和久、小内清、丹羽由美、石浦正寛：ハイスループット生物発光リアルタイムモニタリング法による変異体のスクリーニングと原因遺伝子の網羅的同定～クラミドモナスの概日時計遺伝子へのアプローチ～、日本遺伝学会第79回大会ミニシンポジウム、2007年9月19-21日、岡山大学理

学部・岡山大学創立 50 周年記念館、岡山、
口頭発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし