

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370001

研究課題名(和文)

植物時計の全体像と分子機構

研究課題名(英文)

Circadian clock of higher plants, green algae, and cyanobacteria

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)：

藍色細菌、緑藻(クラミドモナス)、高等植物(シロイヌナズナ)で生物時計の解析を進めた。

1. 藍色細菌の KaiABC 時計タンパク質複合体の相互作用部位を同定した。2. クラミドモナスの ROC 時計タンパク質の機能解析を行った。また、核の遺伝子発現を連続的に観察するために核レポーター株を作製した。3. 開発した圧倒的な処理能力のある生物発光リアルタイムモニタリングシステムを用いて、シロイヌナズナでの大規模突然変異体分離を行った。

研究成果の概要(英文)：

We studied circadian clocks in cyanobacteria, green algae, and higher plants. 1) in cyanobacteria, we identified the amino acid residue necessary for KaiA-KaiB; 2) in green algae, we found the interaction between DNA and clock proteins. We examined the complex formation among clock proteins. Additionally, we constructed bioluminescence reporter strains for monitoring nuclear gene expression. 3) We developed an automated, high-throughput, bioluminescence-monitoring and analyzing system. The system is a powerful tool for large-scale screening of mutants followed by large-scale detailed analysis of gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：ゲノム機能・発現、生物時計、

1. 研究開始当初の背景

ヒトや高等植物を含むほとんどの生物で、その活動や種々の生理活性がほぼ24時間周期のリズムを示す。このリズムを概日リズムと呼び、リズムを発生させる細胞内分子機構を生物時計と呼ぶ。

ゲノム研究の結果、植物系の生物時計は構成分子が進化段階で互いに異なっているこ

とが分かりつつある。藍色細菌の生物時計分子装置は3つの時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC のみからなる動的なタンパク質複合体であり、それが時計発振装置である。藍色細菌は生物時計研究の最先端に位置している。植物の時計遺伝子はこれまでほとんど同定されていなかったが、最近我々は、クラミドモナスとシロイヌナズナでも生物発光リアルタイムモニタリング系を開発し、時計遺伝

子（時計関連遺伝子を含む）の網羅的同定・クローニングに成功した。

2. 研究の目的

藍色細菌の時計分子装置の時計発振には、時計装置の周期的な化学修飾（例えばリン酸化）を含めた構造変化と、それに伴う酵素活性の変化、酵素反応の結果がもたらす次の構造変化のサイクルが重要と考えている。時計装置のこのような動的構造変化を NMR や ESR で解析し、生物時計の特徴である 1) 時計の自由継続性（恒常条件下で自律的にほぼ 24 時間周期のリズムを継続発振する）、2) 周期の 24 時間への調節、3) 周期の温度補償性（時計発振の周期はほとんど温度に影響されない）を司る分子機構を解明する。

藍色細菌と同様に、クラミドモナスとシロイヌナズナでも分子遺伝学的研究から始めて、構造生物学的解析や生化学的解析を進め、時計分子装置の構造と機能を解明する。また、両者で時計遺伝子や時計関連遺伝子を比較して、植物時計の構成分子の多様性と進化について考察する。

3. 研究の方法

(1) 藍色細菌の時計タンパク質、時計関連タンパク質、及びそれらの複合体の構造解析

- ① 時計発振の分子機構の解明に不可欠な KaiA-KaiB-KaiC 複合体の構造解析を進め、複合体の相互作用部位を同定し、Kai タンパク質複合体が周期的に会合・解離する分子機構を解明する。また、複合体構造の変化に伴う個々のタンパク質の構造変化について解析する。
- ② 時計関連タンパク質 SasA の構造および機能の解明を進め、KaiA-KaiB-KaiC 複合体が発振する時間情報を SasA がどのように受け取り、遺伝子発現系へ伝達するかを解明する。

(2) クラミドモナス時計タンパク質の解析

- ① 以前に同定した 30 個の時計遺伝子（時計関連遺伝子を含む）の機能解析を行う。同定した遺伝子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と類似したものが 4 つ含まれており（ROC15 および ROC75 は時計タンパク質 PCL1 に極めて類似した GARP モチーフを持つ。ROC40 は同じく時計タンパク質 LHY および CCA1 に類似した MYB ドメインを持つ）、これらの機能ドメインが実際に DNA 結合に関わるか否かを

検証する。また、これらの時計タンパク質が細胞内でどのような複合体を形成しているかを、時計タンパク質にタグを付けてクラミドモナスで発現させ、解析する。

- ② 核からミトコンドリアや葉緑体への時間情報伝達の機構を解明するために、核ゲノムに生物発光遺伝子を組み込んだ核のレポーター株を作製する。
- (3) シロイヌナズナの時計タンパク質の解析
- ① シロイヌナズナとイネでは、時計タンパク質 PCL1 と時計関連タンパク質 PCLL (Onai *et al.*, 2005, Genes Cells) の全長と各ドメインを大腸菌あるいは小麦胚芽試験管内翻訳系で生産する。
- ② *pclI* を含めた 35 個の突然変異体のうちで、既知の時計遺伝子や時計関連遺伝子には変異を持たない新規のものが 7 つ見ついている。この 7 つの変異体の原因遺伝子をポジショナルクローニングして分子遺伝学的・分子生物学的にその機能を解析する。
- ③ ハイスループットの生物発光リアルタイムモニタリングシステムを開発し、原因遺伝子を網羅的にクローニングすることにより、時計遺伝子発現制御ネットワークを解明する。

4. 研究成果

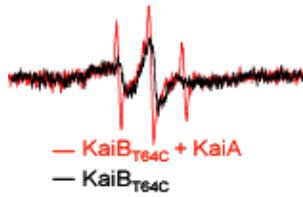
(1) 藍色細菌の生物時計

Kai タンパク質複合体の相互作用部位を ESR 解析により同定した。ESR はタンパク質の局所的な運動変化を検出するのに非常に有効なツールである。本研究は ESR 法を生物時計の研究に応用した初めての実験であり、それにより、結合が弱くゲル濾過クロマトグラフィーや Native PAGE 法では観察されなかった KaiA-KaiB 間相互作用を初めて証明し、相互作用部位を同定するのに成功した。また、これまであまり注目されてこなかった KaiB の構造と機能について研究を進め、KaiB が温度や塩濃度など様々な条件に応じて構造を変えること、この KaiB の構造変化に伴って KaiC に対する結合親和性を変えることなど、KaiB が非常に興味深い性質を持っていることを明らかにした。

また、時計関連タンパク質 SasA や Pex の解析を進め、これらがどのように KaiABC 時計分子装置と相互作用しているかの検証を進めた。

- ① スピンラベルを導入したアミノ酸残基近傍の構造変化を検出する電子スピン共鳴法 (ESR 法) によって、KaiA-KaiB 間の 1:1 の化学量論的相互作用を証明し、相互作用

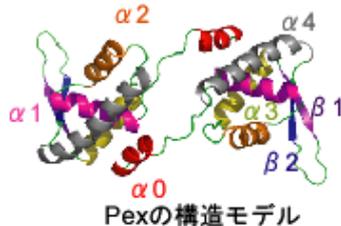
部位を同定した(Mutoh *et al.*, 2010)。



ESRによるKaiA-KaiB相互作用の検出

ナールに変化が生じるスピララベル導入部位をKaiB上のアミノ酸残基に4カ所(Mutoh *et al.*, 未発表データ)、KaiA上のアミノ酸残基に6カ所、また、KaiAの添加によってESRシグナルに変化が生じるスピララベル導入部位をKaiC上のアミノ酸残基に10カ所同定している (Ishii *et al.*, 未発表データ)。

- ② ESR解析により、KaiB構造が温度により変化することを明らかにした(Mutoh *et al.*, in press)。また、KaiB-KaiC間の結合親和性も、温度によって変化することを明らかにしており(Nishimura *et al.*, 未発表データ)、両者の相関についてさらなる解析を進めている。
- ③ オリゴマー構造の異なる変異体KaiBを分離し、その変異体KaiBは野生型に比べKaiCに対する結合親和性が高いことを明らかにした(Murakami *et al.*, 論文準備中)。KaiBのオリゴマー構造は塩濃度によって影響を受け変化することを明らかにしており(Yasui *et al.*, 未発表データ)、オリゴマー構造と機能の関わりについてさらなる解析を進めている。
- ④ SasAの機能解析を行い、KaiCのリン酸化状態およびSasAのリン酸化状態によって、SasA-KaiC複合体の結合親和性が変化することを明らかにした(Swain *et al.*, 論文準備中)。
- ⑤ KaiB-KaiCおよびSasA-KaiC複合体の電子顕微鏡解析をすすめている。
- ⑥ 時計関連タンパク質Pexの結晶構造を決定した。また、PexがkaiAの上流域に結合し、kaiAの発現を抑制するリプレッサーであることを明らかにした (Kurosawa *et al.*, 2009)。



Pexの構造モデル

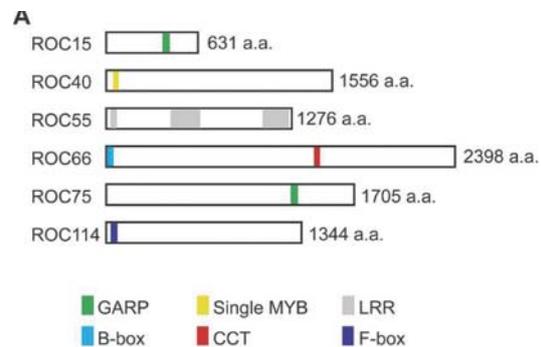
同様に、ESR法により、KaiB-KaiC間、KaiA-KaiC間の相互作用部位の同定を進めている。現在KaiCの添加によりESRシグ

(2) クラミドモナス時計タンパク質の解析

遺伝子のサーカディアン発現に欠陥を生じたクラミドモナス突然変異体を解析して同定した6つのROC時計遺伝子の研究を進めた。ROCタンパク質は、核に局在することが示され、核において遺伝子のサーカディアン発現を制御していることが示唆されているが、緑藻における生物時計はまだほとんど解明されていない。

我々は、核とゲノムを持つ細胞内小器官 (葉緑体およびミトコンドリア) の時間情報のネットワークを調べる上で、クラミドモナスをモデルとして確立させることを目指している。そのため、核、葉緑体、ミトコンドリアの遺伝子発現をそれぞれ異なる色の生物発光で同時にモニタリングする系の構築を目指している。本研究で、核と葉緑体の2つのレポーター系を作製し、続いて、ミトコンドリアの遺伝子発現をモニターするレポーター系の作製を試みている。

- ① 時計遺伝子 (ROC15, ROC40, ROC55, ROC66, ROC75, ROC114) の発現量の昼夜の変化を調べたところ、昼に高いもの、夜に高いもの、昼夜ほぼ一定のものが見られた (Matsuo *et al.*, 2008)。また、個々の遺伝子の欠損や過剰発現が、他の時計遺伝子の発現に与える影響を調べた。



- ② DNA結合モチーフを持つROC時計タンパク質が、DNAと結合するか否かを検証し、いくつかのROCタンパク質でDNAとの結合を確認した。また、ROCタンパク質の局在を調べたところ、多くのROCタンパク質は核に局在することがわかった (Iida *et al.*, 未発表データ)。
- ③ ROCタンパク質にルシフェラーゼを融合した融合タンパク質を、クラミドモナス細胞で発現させた。タンパク質を可溶化し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって分子サイズで分画し、どの画分がルシフェラーゼ活性を有しているか否かを調べたところ、ROCタンパク質の多くは高分子の画分に含まれることがわかった。

これは、ROCタンパク質が単独ではなく複合体を形成して細胞内に存在していることを示唆する (Ishiguro *et al.*, 未発表データ)。

- ④ ROCタンパク質複合体を精製するため、精製タグを融合させた時計タンパク質をクラミドモナス細胞で発現させ、融合タンパク質が時計として機能することを確認した (Iida *et al.*, 未発表データ)。タンパク質の発現量が低いため、精製タグの選択などによって発現量を増やす方法を検討している。
- ⑤ 核からミトコンドリアや葉緑体への時間情報の伝達機構を解明するため、クラミドモナスの核ゲノムの使用コドンに最適化した赤色ルシフェラーゼ遺伝子 (鉄道虫由来) を人工合成し、核ゲノムに組み込んで核のレポーター株を作製した (Niwa *et al.*, 未発表データ)。

(3) シロイヌナズナの生物時計の解明

- ① PCL1およびPCLLの大腸菌での発現・精製を試みた。どちらのタンパク質も精製後、分解が非常に速く、自己分解活性があるのではないかと考えられた。
- ② 圧倒的な処理能力のある生物発光リアルタイムモニタリング・スクリーニングシステムを、JST受託事業で開発し、シロイヌナズナにおいて、大規模突然変異体スクリーニングに応用した。

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)

研究業績

[雑誌論文] (計 11 件、全て査読有り)
査読有り (件)

1. Mutoh R, Mino H, Murakami R, Uzumaki T, Ishiura M (2011). *Applied Magnetic Resonance*. in press
2. 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) *J Biol Chem*. in press
3. 小内清、石浦正寛 (2011) 光アライアンス「特集：生物フォトン研究の最前線」3月号 20-26
4. Matsuo T, Ishiura M (2011) *FEBS lett.* 585, 1495-1502
5. Matsuo T, Ishiura M (2010) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 280, 281-314
6. 小内清、石浦正寛 (2010) 生物物理 50, 141-145

7. Mutoh R, Mino H, Murakami R, Uzumaki T, Takabayashi A, Ishii K, Ishiura M (2010) *Genes Cells*. 15, 269-280
8. Kurosawa S, Murakami R, Onai K, Morishita M, Hasegawa D, Iwase R, Uzumaki T, Hayashi F, Kitajima-Ihara T, Sakata S, Murakami M, Kouyama T, Ishiura M (2009) *Genes Cells*. 14, 1-16
9. Tsunekawa K, Shijuku T, Hayashimoto M, Kojima Y, Onai K, Morishita M, Ishiura M, Kuroda T, Nakamura T, Kobayashi H, Sato M, Toyooka K, Matsuoka K, Omata T, Uozumi N. (2009) *J Biol Chem*. 284, 16513-16521
10. Murakami R, Miyake A, Iwase R, Hayashi F, Uzumaki T, Ishiura M (2008) *Genes Cells*. 13, 387-395
11. Matsuo T, Okamoto K, Onai K, Niwa Y, Shimogawara K, Ishiura M (2008) *Genes Dev*. 22, 918-930

[学会発表] (計 90 件)

1. 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
2. Matsuo T, Iida T, Kunii Y, Kato D, Tachikawa M, and 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
3. 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
4. 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館、名古屋、招待講演
5. 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館、名古屋、招待講演
6. Kawai T, Onai K, Matsumoto T, Hashimoto M, Maeo K, Ishiura M, Nakamura K: Isolation of *Arabidopsis* mutants in the expression of a gene for oil synthesis by using high-throughput real-time bioluminescence monitoring system, VII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB 2010), July 4-9, 2010, Valencia Convention Center, Valencia, Spain, Poster
 7. Kawai T, Ona Ki, Hashimoto M, Maeo K, Ishiura M, Nakamura K: Large scale screening of *Arabidopsis* mutants in seed oil synthesis by using a high-throughput real-time bioluminescence monitoring system, 2nd Gordon Research Conference on "Plant Lipids, Structure, Metabolism & Function" (GRC on Plant Lipids), Jan 30-Feb 4, 2011, Hotel Galvez, Galveston, Texas, USA., 口頭発表
 8. Mutoh R, Mino H, Murakami R, Asada Y, Uzumaki T, Ishii K, Ishiura M: 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
 9. 小内清、大久保充宏、中村隆司、長谷川寛、白木央、石浦正寛: 生物発光リアルタイム測定システム、先端計測分析技術・機器開発事業 5周年記念シンポジウム、2009年12月8日-9日、東京、展示発表
 10. Onai K, Ishiura M: Real-time bioluminescence monitoring device for living plant, NU-TECH2010, Technology Showcase in RTP, North Carolina, Feb 10, 2010, 展示発表、国際展示
 11. Onai K, Ishiura M: Real-time bioluminescence monitoring system, PITTCON 2010, Feb 28-Mar 5, 2010, Orlando, Florida, 展示発表、国際展示
 12. 石井健太郎、村上怜子、武藤梨沙、Jonathan Valencia Swain、荒田敏昭、石浦正寛: The specific residues involved in KaiA-KaiC interaction revealed by SDSL-ESR analysis, International Symposium on Hydration and ATP Energy, 2010年3月8-10日、秋保温泉岩沼屋、仙台、ポスター発表、国際シンポジウム
 13. 武藤梨沙、村上怜子、石井健太郎、宇津巻竜也、石浦正寛: The ATPase activity of KaiC, International Symposium on Hydration and ATP Energy, 2010年3月8-10日、秋保温泉岩沼屋、仙台、ポスター発表、国際シンポジウム
 14. 小内清、岡本和久、石浦正寛: 生物発光リアルタイム測定システム—有用遺伝子の網羅的な超高速探索へ向けて—、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、招待講演
 15. 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、招待講演
 16. 小内清、石浦正寛: 生物発光リアルタイム測定システムの開発と応用—有用遺伝子の網羅的な超高速探索へ向けて—、(財)岩手生物工学研究センター第154回公開セミナー、2009年7月13日、(財)岩手生物工学研究センター、北上市、招待講演
 17. 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、科学技術交流財団研究交流クラブ第126回定例会、2009年9月7日、名古屋銀行協会ホール、名古屋市、招待講演
 18. 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, Hyères-les-Palmiers, France, 国際会議招待講演
 19. 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応用例: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、科学技術交流財団「光計測技術と生物発光リアルタイム測定システムの応用」第2回研究会、2008年11月6日、名古屋大学環境総合館、名古屋、招待講演
 20. 小内清、岡本和久、石浦正寛: 生物発光リアルタイム測定システムの現状と展望—有用遺伝子の超高速探索へ向けて—、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、招待講演
 21. 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、招待講演

出願年月日：2010.03.11
国内外の別：日本

〔図書〕（計0件）

○取得状況（計0件）
なし

〔産業財産権〕

〔その他〕

○出願状況（計4件）

ホームページ等

1. 名称：分配装置、及び分配方法

発明者：小内清、石浦正寛、白木央、大久保充宏、神谷聡、八木良樹、岡悦男、戎晃司

権利者：中立電機株式会社、椿本興業、マイクロニクス株式会社

種類：特許

番号：特願特願 2010-095985

出願年月日：2010.04.19

国内外の別：日本

2. 名称：測定処理を高速化した発光測定装置

発明者：小内清、石浦正寛、白木央、太田武司、大久保充宏、川角康之

権利者：国立大学法人名古屋大学、中立電機株式会社

種類：特許

番号：特願 2010-070074

出願年月日：2010.03.25

国内外の別：日本

3. 名称：高感度発光測定装置

発明者：小内清、石浦正寛、白木央、大久保充宏、伊藤英樹、中村隆司、長谷川寛

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2010-070075

出願年月日：2010.03.25

国内外の別：日本

4. 名称：植物の種子油脂生産性を増大させる遺伝子及びその利用方法

発明者：中村研三、河合都妙、橋本実佳、石浦正寛、松田雅敏、小内清

権利者：トヨタ自動車株式会社、株式会社コンボン研究所、国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2010-054484

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

報道関連

1. 2010年10月23日に中日新聞、静岡新聞、中部経済新聞、25日に日刊工業新聞等に、生物発光を利用して、生きたままの細胞において遺伝子発現を高感度に測定できる自動測定装置の実用化に関して記事が掲載された。

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教授

研究者番号：20132730

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし