

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770004

研究課題名(和文)

新たな生物時計モデル・クラミドモナスの時計遺伝子、時計タンパク質の解析

研究課題名(英文)

Analysis of clock genes and proteins in Chlamydomonas: a new model system for studies on the circadian clock.

研究代表者：

松尾 拓哉 (MATSUO TAKUYA)

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(和文)：

本研究では、我々が生物時計研究の新たなモデル生物として確立した単細胞性緑藻クラミドモナスの時計遺伝子・時計タンパク質の解析を行った。時計遺伝子 *ROC75* の過剰発現、発現抑制実験から、時計遺伝子間 (*ROC75* と *ROC40*) の遺伝学的相互作用を明らかにした。また、タグを融合した *ROC75* タンパク質を発現する細胞を用いて、*ROC75* の発現リズムと核局在を明らかにした。さらに、*ROC75* の DNA 結合ドメインが *ROC40* プロモーター領域に結合することも明らかにした。これらの結果から、*ROC75* は時間特異的に発現し、核の周辺領域 (Nuclear periphery) に局在する転写制御因子であり、*ROC75* による *ROC40* 遺伝子の発現制御はクラミドモナスの生物時計機構において重要な機構であることが示唆された。この成果は、緑藻の生物時計の理解に大きく貢献するとともに、高等植物と、緑藻の生物時計の共通点と相違点を明らかにし、植物時計の進化を探る上で重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：

We analyzed clock genes and proteins in the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* that is a new model system for circadian clock research. We revealed a genetic interaction between *ROC75* and *ROC40* through experiments of overexpression and RNA interference of *ROC75* gene. Moreover, We expressed *ROC75* protein tagged with HA, YFP, and LUC in *Chlamydomonas*, and revealed that the *ROC75* protein level is regulated by the circadian clock, and is localized into the nuclear periphery. In an *in vitro* and *in vivo* assay, we demonstrated that *ROC75* binds to the promoter region of the *ROC40* gene. These results suggest that *ROC75* is a transcriptional regulator for *ROC40* gene, and the regulation may be important for the circadian clock mechanism in *Chlamydomonas*. These findings will provide new insights into the evolution of circadian clocks in the green plant lineage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：モデル生物、生物時計

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している。現在までに、藍色細菌、

高等植物、菌類、昆虫、哺乳類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は、酵母(Yeast)に例えて、「Green Yeast」とも呼ばれており、酵母のように分子遺伝学的研究の優れたモデル生物である(Goodenough, Cell, 1992)。とりわけ、酵母では出来ない研究(光合成、鞭毛運動など)において極めて強力なモデル生物として利用されている。酵母は明瞭な概日リズムを示さないのに対し、クラミドモナスは明瞭な概日リズムを示すので、真核細胞の生物時計モデル系としても大きな可能性を秘めている。

クラミドモナスの生物時計研究の歴史は比較的早く、1972年、1974年にBruceらが走光性の概日リズムを指標にしてリズム変異体を複数分離することに成功している(Bruce, Genetics, 1972, 1974)。また、1984年にはMergenhagenらも同様の手法でリズム変異体を分離した(Mergenhagen, Eur J Cell Biol, 1984)。しかし、当時は遺伝子クローニングを行える環境がまだ整備されていなかったため、それらの変異体の原因遺伝子は同定されなかった。

申請者らはクラミドモナスの葉緑体のゲノムに最適化したルシフェラーゼレポーター遺伝子を人工合成し、それをを用いることで葉緑体の遺伝子発現を生物発光としてリアルタイムに捉えることに世界で初めて成功した。また、この手法により葉緑体の遺伝子発現における概日リズムが核にコードされた生物時計遺伝子によって制御されていることを明らかにした(Matsuo et al., Mol Cell Biol, 2006)。さらに、そのリアルタイム測定法を利用した効率的な順遺伝学的遺伝子同定法を開発した。これは1)挿入変異体の作製、2)生物発光による表現型スクリーニング、3)Thermal asymmetric interlaced PCRによる原因遺伝子のマッピング、4)全ゲノム配列データベースに基づいた原因遺伝子の同定からなる。この方法を用いて葉緑体遺伝子の概日発現リズムに異常を来す突然変異体を105個分離し、それらの原因遺伝子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(Matsuo et al., Genes Dev, 2008)。それらの遺伝子がコードする6つの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生物時計や花成制御に関わる転写因子と極めて類似したものが4つ含まれていた(ROC15、ROC40、ROC66、ROC75)。残りの2つは他の生物には見られない緑藻独自のF-boxタンパク質(ROC114)と未知タンパク質(ROC55)であった。

2. 研究の目的

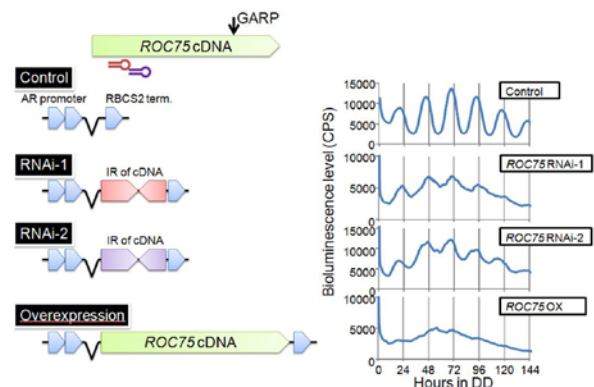
本研究課題では申請者らのこれまでの研究を進展させ、緑藻の生物時計の分子機構の解明を目指す。具体的には、1)時計遺伝子の過剰発現および発現抑制による時計遺伝子間の発現制御の解析、2)LUCタグを使った時計タンパク質複合体の解析、3)YFPタグを使った時計タンパク質の細胞内での空間的挙動の解析である。転写因子に関しては、4)クロマチン免疫沈降法でその因子が結合するプロモーターを同定する。これらの実験により、時計遺伝子が発現した後、時計タンパク質は何と複合体を形成し、細胞内の何処へ動くのか、転写因子はどの遺伝子のプロモーターに結合して制御するのか、また、各時計遺伝子間の遺伝学的な相互関係はどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

過剰発現遺伝子カセットを使った時計遺伝子の過剰発現およびRNAiによる発現抑制により、時計遺伝子の発現量が概日リズムや他の時計遺伝子の発現に及びず影響を明らかにする。その他の解析にはまず、遺伝子相補実験系を利用してタグ(LUC、YFP、HA)を融合した時計タンパク質を発現する株を作製する。そのタグを指標としてタンパク複合体の解析、結合プロモーターの同定、発現解析、細胞内局在解析を行う。

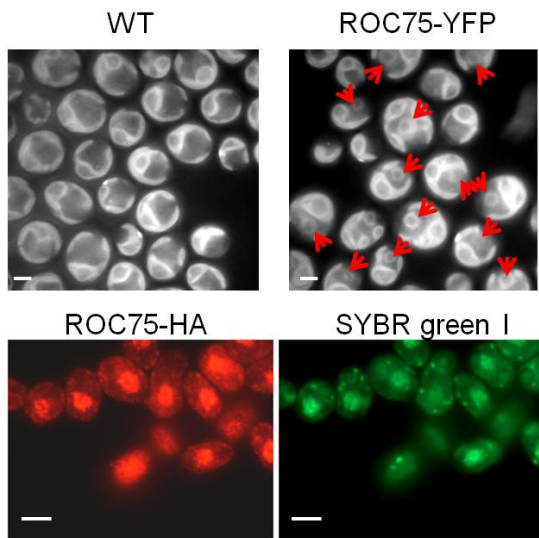
4. 研究成果

時計遺伝子ROC75に焦点を当て、過剰発現およびRNAiによる発現抑制の影響を調べた。その結果、ROC75の過剰発現、発現抑制のいずれも葉緑体の生物発光リズムの振幅を低下させることを明らかにした。また、ROC75の過剰発現、発現抑制ともに、時計遺伝子ROC40の発現量を上昇させることが明らかになった。

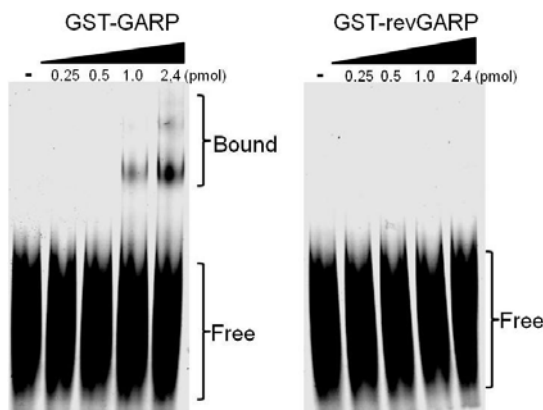


ROC75タンパク質の挙動を解析するために、HA エピトープタグ、および YFP タグを融合

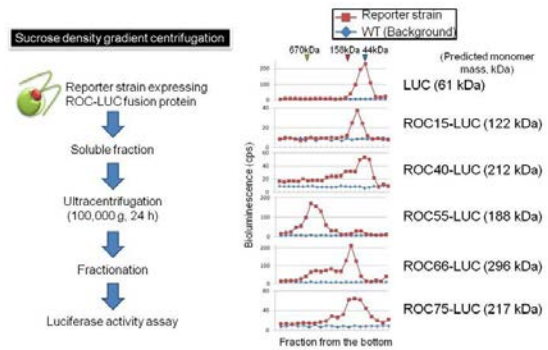
した ROC75 タンパク質を発現する細胞を作製し、時間振動中に ROC75 が細胞内でどのような挙動をするか調べた。まず、ウェスタンブロット解析の結果、ROC75 タンパク質の発現量は主観的昼の後半にピークを示す明瞭な概日リズムを示すことが明らかになった。また、ROC75 タンパク質は発現している時間帯において常に核膜の内側付近に存在することを明らかにした。



ROC75 タンパク質の ROC40 のプロモーター領域への結合能を調べるため、ROC75 タンパク質の DNA 結合ドメインである GARP ドメインをグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) と融合したタンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。その融合タンパク質と、ROC40 プロモーター領域の DNA 断片を用いた Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) により、ROC75 GARP ドメインは ROC40 プロモーター領域の AGATTTT 配列に結合することを明らかにした。また、クロマチン免疫沈降法により、*in vivo*において ROC75 が ROC40 プロモーター領域に結合することを確認した。



ROC75 タンパク質が細胞内で複合体を形成しているかどうかを調べるため、ルシフェラーゼタンパク質をタグとして融合した ROC75 タンパク質を発現する細胞を作製した。細胞粗抽出液の可溶性画分をショ糖密度勾配超遠心により分画し、各画分のルシフェラーゼ活性を測定することで、ROC75 タンパク質の細胞内における分子量を推定した。その結果、ROC75 タンパク質の一部は約 200kDa 以上のタンパク質複合体に含まれることが示唆された。



これらの結果から、ROC75 は時間特異的に発現し、核の周辺領域 (Nuclear periphery) に局在する転写制御因子であり、ROC75 による ROC40 遺伝子の発現制御はクラミドモナスの生物時計機構において重要な機構であることが示唆された。

この結果は、緑藻の生物時計の理解に大きく貢献するとともに、高等植物と、緑藻の生物時計の共通点と相違点を明らかにし、植物時計の進化を探る上で重要な知見である。

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. and Ishiura, M. (2010). New insights into the circadian clock in *Chlamydomonas*. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.**, 280, 281-314
2. Matsuo, T. and Ishiura, M. (2011). *Chlamydomonas reinhardtii* as a new model system for studying the molecular basis of the circadian clock. **FEBS lett.**, 585, 1495-1502

[学会発表] (計 18 件)

1. 松尾拓哉、飯田高広、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスの概日リズム変異株 *roc97* の原因遺伝子の同定、第 81 回日本遺伝学会年会、2009 年 9 月 18 日、信州大学理学部、松本、口頭発表
2. 飯田高広、松尾拓哉、石浦正寛：クラミ

- ドモナスの時計遺伝子 *ROC75* の解析、第 81 回日本遺伝学会年会、2009 年 9 月 18 日、信州大学理学部、松本、口頭発表
3. 丹羽由実、松尾拓哉、立川誠、小内清、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスにおける時計遺伝子生物発光レポーター株の作製、第 81 回日本遺伝学会年会、2009 年 9 月 18 日、信州大学理学部、松本、口頭発表
 4. 飯田高広、松尾拓哉、石浦正寛：Analysis of the circadian clock gene *ROC75* in *Chlamydomonas*、第 3 回 GCOE リトリート、2009 年 9 月 28-29 日、鈴鹿サーキットフラワーガーデンホテル、鈴鹿、ポスター
 5. 丹羽由実、松尾拓哉、立川誠、石浦正寛：The circadian rhythms of bioluminescence reporters for clock genes of *Chlamydomonas reinhardtii*、第 3 回 GCOE リトリート、2009 年 9 月 18 日、鈴鹿サーキットフラワーガーデンホテル、鈴鹿、ポスター
 6. 丹羽由実、松尾拓哉、立川誠、石浦正寛：The circadian rhythms of bioluminescence reporters for clock genes of *Chlamydomonas reinhardtii*、GCOE 国際セミナー、2009 年 11 月 17-18 日、名古屋大学野依学術交流館、名古屋、ポスター
 7. 松尾拓哉、石浦正寛：生物時計による RNA 制御機構、新学術領域（RNA 制御学）領域班会議、2010 年 1 月 9 日、スペースアルファ神戸、神戸、口頭発表
 8. 丹羽由実、松尾拓哉、立川誠、小内清、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスにおいてルシフェラーゼレポーターの概日リズムは転写後に調節される：第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 19 日、熊本大学、熊本、ポスター
 9. Takuya Matsuo, Takahiro Iida, Yuta Kunii, Daisaku Kato, Makoto Tachikawa, and Masahiro Ishiura: 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
 10. Takuya Matsuo, Kazuhisa Okamoto, Kiyoshi Onai, Yoshimi Niwa, Kosuke Shimogawara, Masahiro Ishiura: Systematic identification of circadian clock components in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, 第 4 回 GCOE リトリート、2010 年 9 月 13~14 日、豊橋日航ホテル、豊橋市、ポスター
 11. 丹羽由実、松尾拓哉、立川誠、小内清、石浦正寛：The circadian rhythms of bioluminescence reporters for clock genes in *Chlamydomonas reinhardtii*, 第 4 回 GCOE リトリート、2010 年 9 月 13~14 日、豊橋日航ホテル、豊橋市、ポスター
 12. 松尾拓哉、小松賢司、飯田高広、石浦正寛：葉緑体遺伝子発現制御因子群の mRNA 量は生物時計に制御される、第 82 回日本遺伝学会年会、2009 年 9 月 21 日、北海道大学理学部、札幌、口頭発表
 13. 飯田高広、松尾拓哉、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスの時計遺伝子 *ROC75* の解析、日本遺伝学会第 82 回大会、2009 年 9 月 21 日、北海道大学理学部、札幌、口頭発表
 14. 丹羽由実、松尾拓哉、立川誠、小内清、石浦正寛：単細胞緑藻クラミドモナスにおける時計遺伝子生物発光レポーター株の作製、第 82 回日本遺伝学会年会、2009 年 9 月 21 日、北海道大学理学部、札幌、口頭発表
 15. 松尾拓哉、飯田高広、丹羽由実、加藤大策、石黒彩由奈、國井雄太、石浦正寛：クラミドモナスにおける時計遺伝子・時計タンパク質の解析、第 8 回クラミドモナスワークショップ 2010 年 12 月 12 日、東京大学理学部、東京、口頭発表
 16. 丹羽由実、松尾拓哉、立川誠、小内清、石浦正寛：クラミドモナスの時計遺伝子生物発光レポーター株の作製およびその特徴、第 8 回クラミドモナスワークショップ、2010 年 12 月 12 日、東京大学理学部、東京、ポスター
 17. 松尾拓哉、石浦正寛：生物時計による RNA 制御機構、新学術領域（RNA 制御学）領域班会議、2011 年 1 月 6-7 日、京都ガーデンパレス、京都、口頭発表
 18. Matsuo, T.; 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
6. 研究組織
- (1)研究代表者
 松尾拓哉 (MATSUO TAKUYA)
 研究者番号：00452201