

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19282

研究課題名（和文）概日リズムがもたらす光合成最適化の分子機構の解明

研究課題名（英文）Revealing the molecular mechanism of photosynthesis optimization by circadian rhythms

研究代表者

得津 隆太郎（Tokutsu, Ryutaro）

京都大学・理学研究科・特定准教授

研究者番号：60613940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、概日リズムと光合成の間に存在するシグナル伝達機構の解明のため、概日リズム異常を示す変異体の表現型を相補するための形質転換用コンストラクトの作成、および形質転換による相補ラインを作出した。相補ラインに付与したエピトープタグを利用したクロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-seq）解析およびmRNA-seq解析の実施まで完了し、ChIP-seqとmRNA-seqに関する統合解析を行った結果、概日リズムと光合成機能最適化を関連付ける可能性を持つ因子を複数抽出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1990年代、分子遺伝学の発展を前に、光合成における概日リズムの重要性が報告された。しかし、そのような報告から20年以上経った今もなお、概日リズムがどのように光合成に寄与するのか、その分子機構の全容は明らかになっていない。応募者は最近の予備的実験から、光防御を制御する転写因子NF-Yが光依存的な概日リズム形成に寄与することを見出した。この現象は、従来行われてきた概日リズムの研究や集光アンテナ分子の発現制御研究から見出すことは難しく、これまで見過ごされてきた「光合成と概日リズムを結びつける」新たな分子機構と言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated complemented transformants of the mutant exhibiting abnormal circadian rhythms. Integrated analysis of the ChIP-seq and mRNA-seq data from the complemented transformants and the mutant revealed several factors that may link circadian rhythm and photosynthesis.

研究分野：植物分子・生理学

キーワード：概日リズム 光合成

1. 研究開始当初の背景

光合成反応は、地球生命を支える重要な生物反応である。しかし、自然界のような動的な光環境において光合成がどのようにして調整・最適化されているのか、その本質は未だ理解されていない。

光合成生物にとって光は必須である一方、強すぎる光は光合成装置を損傷させる。自然界の光環境に着目すると、地表における光は日周変動による強度・波長変化だけではなく、地球の自転(季節)に応じて日長までも変化する。そのため、植物は様々なタイムスケールで周期的に変化する光環境に応じて、光捕集と光防御のバランスを最適化しなければならない。このように、光合成の最適化(光捕集/光防御バランス)の仕組みは、光環境に応じて変調する生体周期に大きく依存すると考えられるが、光合成最適化の分子基盤を概日リズム・生体周期の観点から解き明かした前例はない。

研究代表者は、これまでの研究において、緑藻の光防御には陸上植物の花成タイミングを制御する転写因子複合体が必須であることを明らかにした(Tokutsu et al., 2019, *Nat. Commun.*)。陸上植物の花成タイミング(*Flowering Locus T* 遺伝子の発現)は、日長情報と概日リズムを利用した転写因子複合体により制御されている。そこで、研究代表者は研究協力者と共に、これら転写因子複合体の変異緑藻の生体周期性を確認した結果、変異緑藻は照射下において野生株と異なる生体周期を示すことを見出した。この結果から、応募者は「光合成の最適化は光環境情報を利用した生体周期形とその変調によって実現する」という作業仮説、およびそれを実証するための本研究構想に至った。

2. 研究の目的

前述した通り、光合成反応は地球生命を支える重要な生物反応である。しかし、自然界のような動的な光環境において光合成がどのようにして調整・最適化されているのか、その本質は未だ理解されていない。光合成に関わる主要機構である、光を積極的に利用する光捕集と過剰な光を安全に消去する光防御は、それぞれの分子機構についての理解は進んでいるものの、それらの機能制御についての分子基盤は不明である。本研究では、光捕集・光防御の機能制御メカニズムの理解を目標とし、現在得られている予備的結果を足がかりにして概日リズムと光合成(光捕集・光防御バランスの制御)の間に存在するシグナル伝達機構の解明を試みた。



3. 研究の方法

研究代表者はこれまでの研究において、陸上植物に保存される転写因子複合体が、緑藻の光防御に必須であることを報告した(Tokutsu et al., 2019, *Nat. Commun.*)。また、予備的な実験から、この転写因子複合体の変異が光依存的な概日リズムの形成・変調に異常を及ぼすことを見出しており、この予備結果に基づき本研究では転写因子複合体の変異体の解析を足がかりに概日リズムの形成・変調の分子機構を明らかにし、概日リズムによる光合成最適化メカニズムの全容解明を試みた。次に、より具体的な研究構想を記述する。

1. 転写因子複合体機能解析

転写因子複合体変異緑藻は光依存的に概日リズム異常を示す。そこで、エピトープタグ付き転写因子複合体を発現した緑藻を用いた ChIP-seq 解析および共免疫沈降プロテオーム解析を行う。これにより、転写因子複合体が直接制御する遺伝子および転写因子複合体と相互作用するタンパク質を同定し、各遺伝子・タンパク質発現パターンをモニタリングする。

2. 変異体作成と変異体の概日リズム・生体周期性の評価

転写因子複合体に直接制御される、あるいは協調する因子の変異株を作成した後、光依存的な概日リズム周期性を確認し、生物発光を利用して転写因子複合体変異体と類似する周期異常を示す変異体を選抜する。周期異常を示す変異体群について相補株を作成し、変異遺伝子と周期異常との因果関係を確定させる。

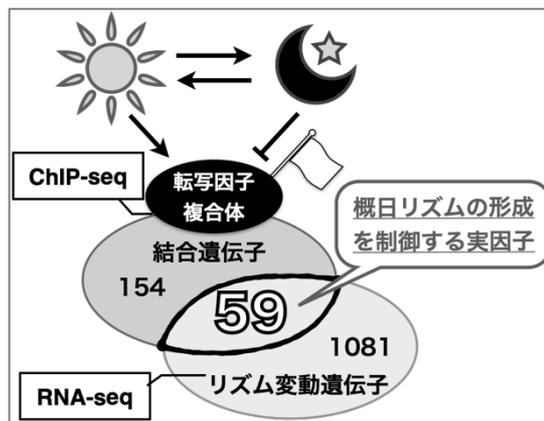
3. 生体周期異常を示す変異緑藻の光合成測定

クロロフィル蛍光測定による「光合成反応の定量解析法」を用い、概日リズム異常を示す緑藻変異体の光捕集・光防御表現型を定量的に評価する。

以上の結果をもとに、緑藻の光合成最適化に至る概日リズム形成のシグナル伝達系の全容の解明を試みた。

4. 研究成果

本研究の採択直前に研究代表者の所属変更があり、申請時に予定していた実験に必要な機器類へのアクセス性が低くなり、効率的な研究遂行に支障が出たため、当初の予定よりも研究成果の取得まで時間を要した。しかし、前述の方法・工程のうち、1については完了することができた。具体的には、概日リズム異常を示す変異体の表現型を相補するための形質転換用コンストラクトの作成、および形質転換による相補ラインの作出に成功し、当該遺伝子の細胞内局在の観察までを完了した。これらに加えて、相補ラインに付与したエピトープタグを利用したクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析に関する細胞破碎条件、ゲノム断片化条件の検討を完了し、実際に ChIP-seq 解析の実施を完了した。これに伴い、周期依存的な ChIP-seq 解析および mRNA-seq 解析の実施まで完了した。以上の解析をもとに、ChIP-seq と mRNA-seq に関する統合解析を行った結果、再現性の確認が必要ではあるものの、RNA-seq 解析により転写因子複合体依存的な概日リズム変動を示す 1140 遺伝子と、ChIP-seq 解析により転写因子複合体が概日リズム依存的に結合力を変化させる 213 遺伝子を見出すことができた (右図)。これらを統合的に解析することで、転写因子複合体の結合力と転写因子複合体による遺伝子発現に強い相関を示す 59 遺伝子の抽出に成功している。これら 59 遺伝子の中には既知の概日リズム形成因子も含まれており、上記解析手法の有効性を示している。今後は、この解析によって抽出された因子について、変異体の作出および概日リズム表現型解析、光合成機能解析を進めることで、概日リズムの形成機構および、それに伴う光合成機能調節の分子基盤の解明が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------