

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650128

研究課題名(和文) 真核生物の非転写・翻訳型概日振動体の解明に向けた新規の時計遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of circadian clock gene in eukaryotic cell

研究代表者

姓名 伸介(Kutsuna, Shinsuke)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・准教授

研究者番号：30315824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、原核生物型の時計を見出せる可能性を含めて、一般に概日研究で用いられている遺伝子発現の生物発光レポーターをあえて用いず、花卉運動の概日リズムを指標として新規の時計遺伝子の同定を目標とした。花卉運動突然変異体3つの概日時計遺伝子の発現をリアルタイムPCRで明らかにした。これらのいずれもが、時計遺伝子群(CCA1, LHY1, TOC1)の発現異常を示した。さらに、これらの変異が既存のフィードバック異常とはことなる点も明らかとなった。1つの変異体については、野生型との交配による変異マッピングを行い、染色体マーカーの間にあることが判明した。次世代シーケンス解析で候補塩基置換部位を検出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed flower movement under circadian clock. There are 3 of newly identified circadian flower movement mutants. These 3 mutants showed loss of flower closing and remarkable abnormality in circadian clock gene expression (CCA1, LHY1, and TOC1), suggesting the causative gene is a circadian clock gene. Genetic mapping experiment suggested the location of the mutation between 2 genetic molecular markers. There is no reported circadian clock gene in the genomic region. Whole genome sequencing analysis of the flower movement mutants determined several substitutions of base-pair among the suggested genetic marker region.

研究分野：時間生物学

キーワード：植物生理 遺伝子発現 概日時計

1. 研究開始当初の背景

これまで真核生物の概日リズムの振動機構は、いくつかの概日時計遺伝子とそれをもとに転写・翻訳される転写因子からなるフィードバック調節であると考えられてきた。一方、原核生物のラン藻では、時計遺伝子の転写フィードバック調節は、概日振動体の安定化や同調性にとって重要であるが、振動体そのものではない。なぜなら、細胞内すべての遺伝子の転写と翻訳が停止したなかでも、時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC からなる概日タンパク質複合体の自己リン酸化・脱リン酸化が 24 時間周期で起きるからである (富田 2005 Science)。この概日変化は試験管内でも再構成できる。(中島 2005 Science)。

この先駆的研究は、真核生物の研究にも多大な影響を及ぼした。例えば、遺伝子がほとんどなくなっているヒト赤血球における概日リズムや、緑藻の酸化還元酵素の概日リズムである。これらはネイチャーに掲載されており、その評判の良し悪しはあるものの、真核生物の細胞質における概日振動体の探索機運を端的に示している。

私は、以前ラン藻の概日時計研究に関わり、上述の時計タンパク質の同定に関わった。その経験から、想定されている真核生物の概日振動体を明らかにするには、未同定の振動体因子を探索し、それらの変異対立遺伝子を多数同定する必要があると考えている。

2. 研究の目的

真核生物の概日リズムの振動体とみなされてきた時計遺伝子群の転写・翻訳フィードバック調節について、その役割を修正する研究が始まっている。真の振動体として想定されているのが、細胞質で起きている未知同定タンパク質のリン酸化や酸化還元の自励振動である。この未同定概日時計因子を見出すには、光入力系を経由せず、時計因子を直接刺激する温度シフトを活用や、温度依存性リズム変異の探索、花卉運動リズム変異の解析といった、これまでとは異なった分子遺伝学的研究が必要である。本研究では、シロイヌナズナの花弁運動の研究から見つかった概日リズム消失変異体 3 系統の変異のマッピングをおこなう。

3. 研究の方法

私は、概日リズムの新しい指標として、シロイヌナズナの花弁の日周運動に着目した。その運動が連続恒条件下においても 23 時間周期で持続することを確認した。また、この周期は概日リズムに必要とされる温度補償性を示すことも確認した。さらに、時差のある環境サイクルに速やかに同調することも確かめた(図 1)。すなわち、この運動が概日時計の制御を受けた概日リズムであることを示した。そこで、名古屋大学の石浦グルー

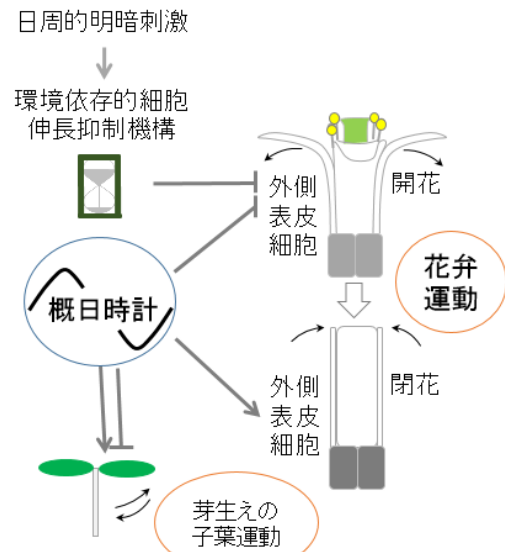


図 1 シロイヌナズナの花弁運動の概日リズムのモデル

プと水野グループからそれぞれ、概日リズム消失変異体 *pcl1-1* と *prp975* を譲り受け、それらの花卉運動にどのような異常があるのかを確かめることにした。そして、この二つの違いは、それぞれ概日リズムが昼あるいは夜の時間帯で停止していることがわかった。前者は、花弁が部分的に閉じ、運動が停止すること、後者は花弁がほぼ閉じず、やはりその後運動は停止したままであるという違いが明らかとなった。すなわち、概日リズムの異常は花弁が閉まる時刻に起きる。

次に私は新しい概日時計の変異体を探索するために、変異原 EMS で処理された種子から植物を育て、それらの花卉運動を定期的に観察した。およそ 1 万株の植物のなかから、花が閉じずにいつまでも咲いている株を 30 系統分離した。継代栽培するうちにほとんどの株の変異は消失した。だが 3 つは、10 世代以上経てもその突然変異が現れている。これらの花での概日時計遺伝子群の発現は、やはりリズムを失っていた。これらを *ycu1*, *2*, *3* と名付けた。現在その原因遺伝子をマッピングしている。

4. 研究成果

3 つの変異体が異なる遺伝子座の変異によるものであるかどうかを調べるために、変異体間の遺伝的掛け合わせを行った。得られた植物体の花卉運動は野生型と同じであった。いずれの組み合わせでも、野生型の表現型が得られたため、3 つの変異体が異なる遺伝子座の変異であることが判明した。そこで、これらの変異体を Y-shaped curvature at flower closure (*ycu1*, *2*, *3*) とそれぞれ命名した。さらに、各変異体の表現型を花と芽生えで解析して、運動異常のレベルに差がみられることをあきらかにした。すなわち、これらの芽生えの子葉の就眠運動の概日リズムがきわめて減弱したものが見つかった

けでなく、野生型との違いがみられないものがみつかったのである。また、芽生えから見つかった概日時計遺伝子群 (CCA1, LHY1, TOC1) の発現が、yuc 変異体のいずれでも有意に減少していることを明らかにした。この

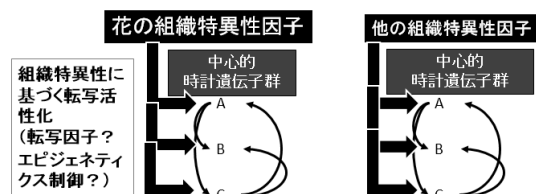


図2 花と芽生えの概日機構の比較

ことは、概日時計が発生の影響を受けないようにするために花特異的核内機構の存在を暗示するととらえることができよう。

さらに、私は、PCR 法を基盤とする分子マーカーによる変異部位のマッピングを実施した。上述のうち2つの変異体のゲノム配列を決定して得られた塩基置換部位が異なる場所をいくつか特定することができた。これらと、分子マーカーによるマッピングを突き合わせたところ一つの変異についてはいくつかの遺伝子を含むゲノム領域に限定することができた。これらの遺伝子に人工的に塩基挿入を施された植物の花卉運動がおかしくなっているかどうかを調べたところ部分的に異常が見出された。

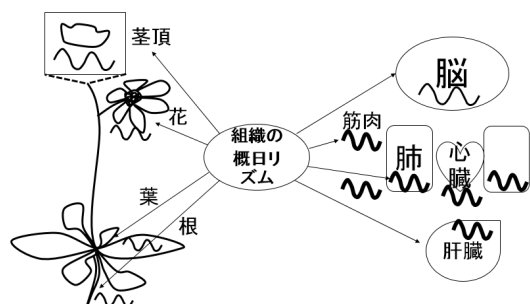


図3 組織・器官特異的概日時計

私は、研究目的として非転写・翻訳型の概日振動体因子の探索作業を置いた。すでに述べたが、yuc 変異体では転写レベルで顕著な減少が確認された。Yuc 遺伝子とその発現産物が転写因子なのか、エピジェネティクス因子なのかは不明であるが、こうした器官特異的異常は、近年注目されている器官・組織特異的概日時計とその相関現象(図3)の実像を分子遺伝学的に理解するうえで役に立つものと考えている。今後は、当該遺伝子の過剰発現株の作成や、発現部位の解析といった分子生物学的解析が必要である。

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 1件)

Takayuki Kobayashi, Yuji Obana, Naoyuki Kuboi, Yohko Kitayama, Shingo Hayashi, Masataka Oka, Naomichi Wada, Kyouhei Arita,

Toshiyuki Shimizu, Mamoru Sato, Robert A. Kanaly, Shinsuke Kutsuna, Analysis of the Fine-Tuning of Cyanobacterial Circadian Phase by Monochromatic Light and Long-Day Conditions Plant Cell Physiol, Oxford Academic 査読有、(2016) 57 (1): 105-114.D01:

<https://doi.org/10.1093/pcp/pcv177>

〔学会発表〕(計 2件)

査名伸介、瀬川祐貴、小池杏奈、小内清、石浦正寛、花卉運動突然変異体における概日時計遺伝子群の発現解析

日本時間生物学会

2016年11月11~13日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

査名伸介、瀬川祐貴、小池杏奈、小内清、石浦正寛、花卉運動突然変異体における概日時計遺伝子群の発現解析

日本遺伝学会

2016年9月24~26日、日本大学(静岡県・三島市)

〔図書〕(計 1件)

査名伸介、横浜市立大学論叢 日周性開花と概日時計の関係、平成29年3月6日、自然科学系列、第65巻、第1・2・3合併号

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

査名 伸介 (KUTSUNA, Shinsuke)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科
(八景キャンパス)・准教授

研究者番号: 30315824

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :

(4)研究協力者
()