

時系列データ統合解析プログラムの開発とこれによる生物時計ネットワークの網羅的解析

●石浦 正寛

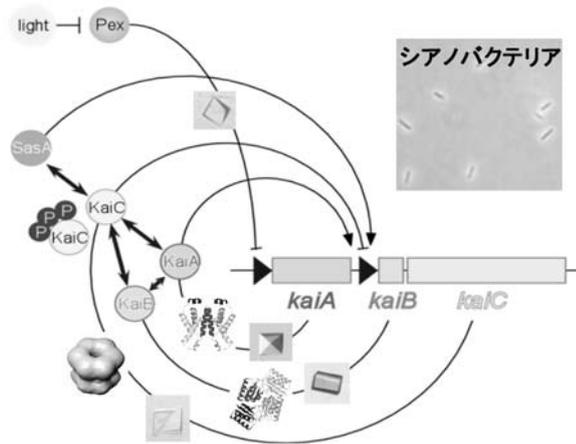
名古屋大学遺伝子実験施設

<研究の目的と進め方>

地球上に棲息するほぼすべての生物は生物時計を持っており、約 24 時間の周期的な生命活動を営んでいる。我々は、時計を持つことが知られている最も単純な生物である藍色細菌において、生物時計の中核遺伝子である時計遺伝子クラスター *kaiABC* と、時計機能を修飾する時計関連遺伝子 *sasA*、*pex* のクローニングに成功し、分子遺伝学的に解析してきた。さらにこれらのタンパク質を生化学的・生物物理学的、構造生物学的に解析している。また、高等植物（シロイヌナズナ）や緑藻（クラミドモナス）でも生物時計の解析を進めている。

時計タンパク質と時計関連タンパク質とから構成される生物時計は、遺伝子発現制御ネットワークやタンパク質間相互作用ネットワークと連携して細胞内で起こる様々な現象を概日制御している。このような生物時計システムの全体像を分子レベルで理解するためには、生物時計分子装置を中心に置いて転写・翻訳・分子間相互作用（核酸-タンパク質間、タンパク質間など）・代謝などの種々のネットワークを網羅的に解析できる手法が必要である。

本研究では、「生物発光リアルタイム測定システム」を中核の研究手法に用いて、すでに全ゲノム配列が決定されている藍色細菌から高等植物に至る植物系細胞の生物時計システムを網羅的・ゲノムワイド的に解明することを目指す。



< 2008 年度の研究の当初計画 >

1. 生物発光株のさらなる整備と発光データの取得
2. 生物発光データベースの構築とデータ解析プログラムの確立
3. 時計遺伝子間相互作用・ネットワークの解析
4. 生物時計を介した核・葉緑体・ミトコンドリア間の相互作用とクロストークの解析

< 2008 年度の成果 >

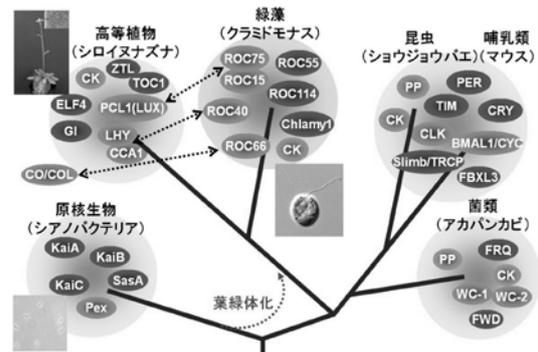
緑藻クラミドモナスにおいて生物発光株の整備を行い、未知であった緑藻の時計遺伝子を網羅的に同定することに成功した (Matsuo *et al.*, 2008)。

クラミドモナスの属する緑藻類は、進化の上で高等植物の祖先に当たる。また、緑藻の葉緑体は細胞内に共生した藍色細菌を起源とすると考えられている。これらのことから生物時計の進化を研究する上で極めて興味深い生物である。また、分子遺伝学・細胞生物学・生化学的な実験に適したモデル生物であり、酵母に例えて“Green Yeast”とも呼ばれる。しかし、生物時計の研究はあまり進んでおらず、時計遺伝子はまだ同定されていなかった。

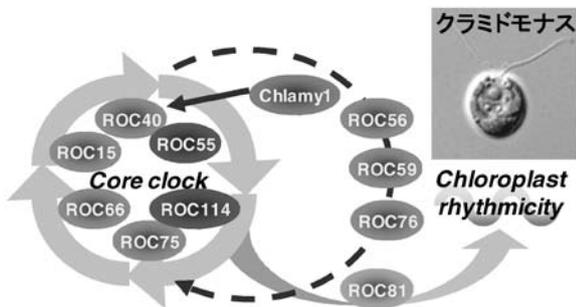
我々は、クラミドモナスの葉緑体に最適化したルシフェラーゼ遺伝子を開発し、生物発光リアルタイム測定システムを用いることで葉緑体の概日リズムを大規模に測定することに成功した。また、全ゲノム配列情報を利用した極めて効率的な順遺伝学的遺伝子同定法をクラミドモナスにおいて開発し、葉緑体の概日リズムに異常をもたらす遺伝子群 (*Rhythm of Chloroplast (ROC)* 遺伝子群) を同定することに成功した。さらに、それらのうち少なくとも 6 つはクラミドモナスの生物時計機構において中心的な役割を果たす時計遺伝子であることを明らかにした。6 つの時計遺伝子 (*ROC15*, *ROC40*, *ROC55*, *ROC66*, *ROC75*, *ROC114*) のうち 4 つ (*ROC15*, *ROC40*, *ROC66*, *ROC75*) は高等植物の時計遺伝子、または花成制御遺伝子と部分的に類似していた。一方 *ROC55* と *ROC114* は緑藻独自の遺伝子であった。これらの結果から、緑藻の生物時計は高等植物の特徴と独自の特徴を合わせ持った時計であることが明らかになった。

ROC	機能ドメインの配列が類似したタンパク質	機能
ROC15	高等植物 (PCL1)	時計
ROC40	高等植物 (CCA1/LHY)	時計
ROC55		
ROC66	高等植物 (CO or COL)	花成
ROC75	高等植物 (PCL1)	時計
ROC114		

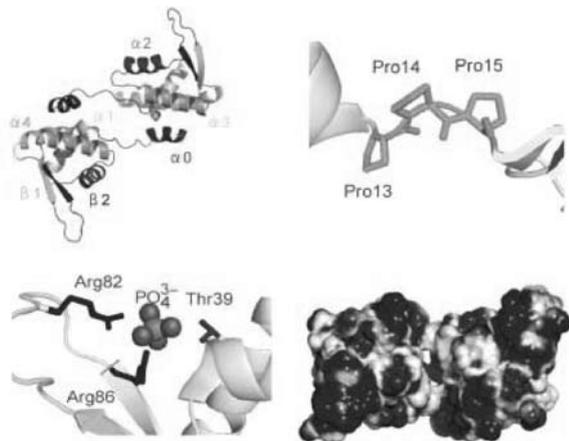
■ GARP ■ Single MYB ■ LRR
 ■ B-box ■ CCT ■ F-box



また、ROC81 遺伝子の変異体は葉緑体の概日リズムには異常が見られるが、その他の概日リズムは正常であることが明らかになった。これは、概日リズムの中核である生物時計自体は正常であるが、概日リズム情報を葉緑体へ伝達する途中段階に異常を来していることを示唆している。今後、核-葉緑体間の時間情報クロストークの解明への手がかりとなると期待される。



藍色細菌の時計関連タンパク質 Pex の立体構造を決定した。これに基づき、Pex はそのウイング領域を介して時計遺伝子 *kaiA* 上流領域へ結合して *kaiA* の発現を制御し、時計の進行に影響を与えていることを明らかにした (Kurosawa *et al.*, 2009)。



時計タンパク質 KaiC の N 末端および C 末端ドメインはそれぞれ微弱な ATPase 活性を持つこと、その活性は生物時計の基本的性質である温度補償性を示すことを明らかにした (Murakami *et al.*, 2008)。

<国内外での成果の位置づけ>

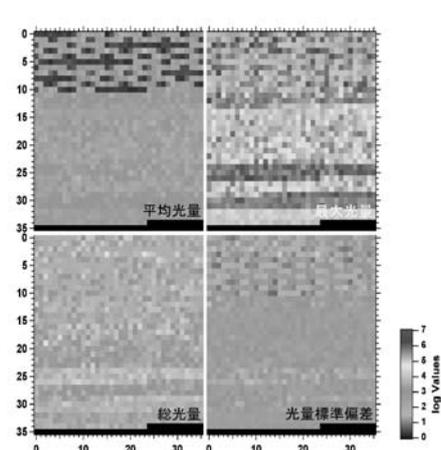
クラミドモナスの時計遺伝子の同定は世界で初めての成果である。この成果を含めると我々のグループは藍色細菌、緑藻、高等植物の時計遺伝子を世界に先駆けて同定してきたことになる。これらは植物時計の進化の解明において極めて重要な貢献である。また、クラミドモナスにおける時計遺伝子の同定は、生物時計の研究分野に最も単純な真核細胞モデルを提供する成果である。真核細胞モデルとしては酵母が非常に優れているが、酵母は概日リズムを示さないため生物時計の研究に利用できない。今後、真核細胞がリズムを発振する基本的なメカニズムを解明する上でクラミドモナスは重要なモデル生物になるに違いない。藍色細菌における成果は、今後、時計遺伝子および時計タンパク質間ネットワークを網羅的に解明する足がかりとなる成果である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

時系列データ統合解析プログラムのうち、本年度は基礎的パラメータ (総発光量、レベル、最大・最小、勾配、ピーク、遅延など)

の解析に関するモジュールを完成させた。

しかし、高次の波形パラメータの解析には完全には対応出来なかった。プログラムの検証のために必要な生物発光データベースの充実がまだ不十分であったためである。



<今後の課題>

時系列データ統合解析プログラムで高次の波形パラメータの解析 (相互相関関数法、平滑スプライン関数法、AIC法 (赤池情報量規準) など) を可能にする。そのためには共同研究を精力的に進め、生物発光データベースの充実をはかる。さらにクラスタ解析が必要とされる「データベースの効率的な汎用フォーマット」を開発し、他の遺伝子データベースと連携運用出来る環境を構築する。

藍色細菌・緑藻・高等植物における時計遺伝子間、時計タンパク質間のネットワークの理解をさらに進めるための生物材料・装置・プログラムの整備を進める。特にクラミドモナスにおいてはこれまでに整備した葉緑体のレポーターに加えて、核やミトコンドリアのレポーターを整備し (3色ルシフェラーゼレポーター)、生物時計を介した核・葉緑体・ミトコンドリア間の相互作用とクロストークの解析を進める。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0901091858
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) Functionally important structural elements of the cyanobacterial clock-related protein Pex. *Genes Cells*, 14: 1-16
2. 0801281303
Murakami, R., Miyake, A., Iwase, R., Hayashi, F., Uzumaki, T., and Ishiura, M. (2008) ATPase activity and its temperature compensation of the cyanobacterial clock protein KaiC. *Genes Cells*, 13: 387-395
3. 0801291017
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

2) データベース/ソフトウェア

なし

3) その他

1. 0901091918
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, 53:1873-1880