

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

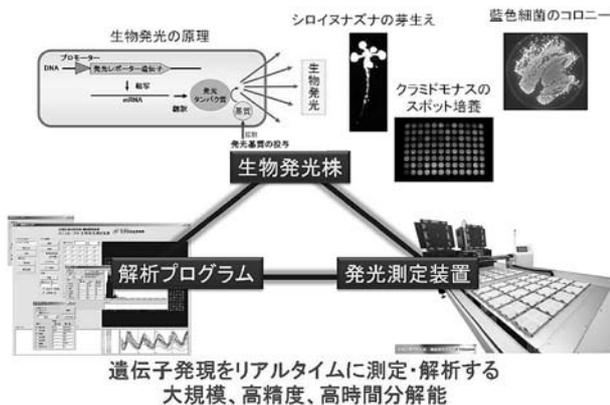
名古屋大学遺伝子実験施設

<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。



<研究開始時の研究計画>

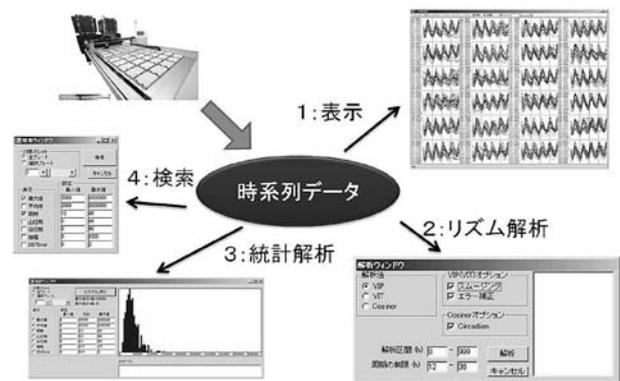
大量の生物発光データから概日リズムのパラメーターを抽出する時系列データ統合解析プログラムを作成する。

シアノバクテリア、クラミドモナス、シロイヌナズナにおいて様々な生物発光レポーター株を作製し、生物発光の測定を行う。得られた生物発光の時系列データを本研究で作成したプログラムで解析し、リズムパラメーターの様々な異常を検出する。

<研究期間の成果>

大量の生物発光データから概日リズムのパラメーターを抽出するプログラムが完成した。このプログラムは1) 時系列データの

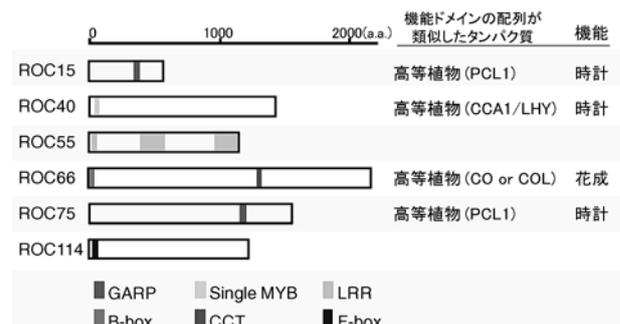
視覚化、2) コサイナー法およびVIP法 (Visual inspection peak)、VIT法 (Visual inspection trough) によるリズム解析、3) 解析結果の統計処理、4) データの検索が可能である。



作成したプログラムを利用し、未知であった緑藻クラミドモナス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., Genes Dev, 2008)。

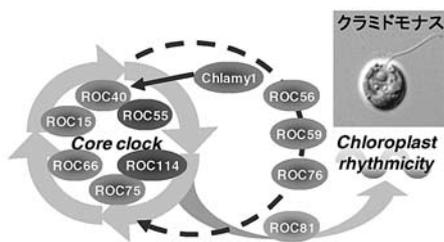
クラミドモナスの属する緑藻類は、進化の上では高等植物と共通の祖先をもつ。また、葉緑体は細胞内に共生した藍色細菌を起源とすると考えられている。これらのことから緑藻は生物時計の進化を研究する上で極めて興味深い生物である。また、分子遺伝学・細胞生物学・生化学的な実験に適したモデル生物であり、酵母に例えて“Green yeast”とも呼ばれる。しかし、生物時計の研究はあまり進んでおらず、時計遺伝子はまだ同定されていなかった。

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

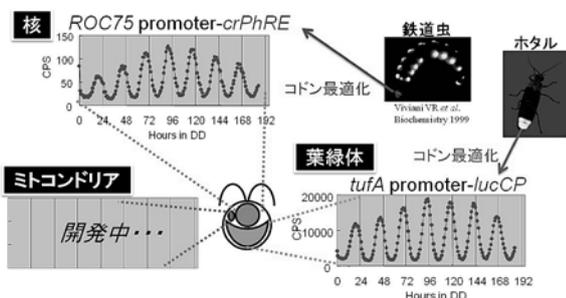


果たす時計遺伝子であることを明らかにした。6つの時計遺伝子 (ROC15, ROC40, ROC55, ROC66, ROC75, ROC114) のうち4つ (ROC15, ROC40, ROC66, ROC75) は高等植物の時計遺伝子、または花成制御遺伝子と部分的に類似していた。一方 ROC55 と ROC114 は緑藻独自の遺伝子であった。これらの結果から、緑藻の生物時計は高等植物の特徴と独自の特徴を合わせ持った時計であることが明らかになった。

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。



クラミドモナスにおいて葉緑体以外のオルガネラ (核、ミトコンドリア) に、それぞれ葉緑体とは異なる波長で発光する生物発光レポーターを移入することで、細胞内3ゲノムのクロストーク機構の解明を目指した。鉄道虫由来の赤色ルシフェラーゼ遺伝子をクラミドモナスの核ゲノムにコドン最適化し、それをを用いることで核の遺伝子発現を赤色の発光でレポートすることに成功した。



クラミドモナスの核ゲノムで利用可能な赤色ルシフェラーゼレポーター遺伝子を作製した。これにより、葉緑体ルシフェラーゼ (緑色) との2色レポーターの作製が可能になった。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究で作成したプログラムは、リズム解析に関しては世界最大規模のサンプル数に対応できるプログラムである。網羅的・ゲノムワイド的なリズム解析には必要不可欠である。

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。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ミトコンドリアで機能するレポーター遺伝子の作製が達成できなかった。クラミドモナスではミトコンドリアの形質転換は可能であるが、発現系の理解があまり進んでいないため、外来遺伝子を発現させるコンストラクトの作製には試行錯誤が必要である。

<今後の課題、展望>

Split ルシフェラーゼ等のタンパク質間相互作用を生物発光として検出する系を使うことで、生物発光リアルタイム測定システムをさらに広範囲の研究に応用できる。また、達成できなかったクラミドモナスのミトコンドリアレポーターを作製し、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。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

- 901091858 (論文)
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., Functionally important structural elements of the cyanobacterial clock-related protein Pex., *Genes Cells*, 14(1), 1-16 (2009)
- 801291017 (論文)
Matsuo, T., Okamoto, K., Onai, K., Niwa, Y., Shimogawara, K., Ishiura, M., A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system., *Genes Dev*, 22(7), 918-30 (2008)
- 801281303 (論文)
Murakami, R., Miyake, A., Iwase, R., Hayashi, F., Uzumaki, T., and Ishiura, M., ATPase activity and its temperature compensation of the cyanobacterial clock protein KaiC, *Genes Cells*, 13(4), 387-395 (2008)
- 702132031 (論文)
Okamoto, K., Ishiura, M., Torii, T., Aoki S., A compact multi-channel apparatus for automated real-time monitoring of bioluminescence., *J Biochem Biophys Method.*, 70(4):535-538 (2007)
- 801281758 (論文)
Kutsuna S., Kondo T., Ikegami H, Uzumaki T., Katayama M., Ishiura M., The circadian clock-related gene *pex* regulates a negative cis element in the *kaiA* promoter region, *J. Bacteriol.*, 189: 7690-7696 (2007)
- 702132029 (論文)
Hayashi, F., Iwase, R., Uzumaki, T., Ishiura, M., Hexamerization by the N-terminal domain and intersubunit phosphorylation by the C-terminal domain of cyanobacterial circadian clock protein KaiC., *Biochem Biophys Res Commun.*, 348:864-872 (2006)

2) 新聞発表、その他顕著なもの

- 901091918 (その他)
松尾拓哉、石浦正寛、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(14):1873-80, 2008年11月号