

## 緑藻の時計遺伝子、「光る葉緑体」を使って発見

～生物時計の進化の解明への糸口～

名古屋大学遺伝子実験施設の石浦正寛教授・松尾拓哉研究員を中心とする研究グループは、単細胞性の緑藻であるクラミドモナスの時計遺伝子を発見しました。

生物時計を構成する遺伝子である時計遺伝子は、これまでに動物、植物、菌類、原核生物で発見されてきました。しかし、それらの生物間では時計遺伝子に共通性は見出されず、生物がいかにして生物時計を獲得してきたのかという進化的な過程は大きな謎でした。

研究グループは「光る葉緑体」を持つクラミドモナスを作製し、葉緑体の発光を指標に生物時計のおかしくなった変異体を多数得ました。それらの原因遺伝子を網羅的に同定し、最終的に6個の時計遺伝子を決定しました。この研究は藻類の生物時計の構成因子を世界で初めて明らかにしたものです。

興味深いことに、決定した時計遺伝子のうちの3つには、植物の時計遺伝子と類似点がありました。今後より詳細な解析を行うことで、生物時計の進化に関する重要な知見が得られると期待されます。

本研究の成果は2008年3月11日付（米国東部時間）発行の米国科学雑誌（Genes & Development）に掲載されます。

### <研究の背景と経緯>

我々ヒトから原核生物の藍藻に至るまで、地球上に住むほぼ全ての生物が生物時計を持っています。生物時計は個々の細胞内にある分子装置で、1日の長さを極めて正確に刻むことが出来ます。生物時計を作るための遺伝子は「時計遺伝子」と呼ばれ、これまでに動物（哺乳類、昆虫）、植物（高等植物）、菌類（カビ）、原核生物（藍藻）で発見されました。しかし、時計遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列に生物間の共通性は見出されず、個々の生物がどのような進化的過程で生物時計を獲得してきたのかは大きな謎でした。

そこで我々のグループは、まだ時計遺伝子が同定されていない藻類に注目しました。藻類の中でも、進化の過程で藍藻の細胞内共生によって生じ、その後植物の直接の祖先となったとされる緑藻に注目しました。研究にはクラミドモナス（和名：コナミドリムシ）を用いました。クラミドモナスは、2本の鞭毛で泳ぎ、大きな1つの葉緑体で光合成を行うシンプルな単細胞性の緑藻です（図1A）。実験モデル生物として優れた性質を持っており、昨年末に全ゲノム配列も解読されました。まず我々は、生物時計の活性を容易に観察するために、葉緑体ゲノムにホタルの発光遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、「光る葉緑体」をもつクラミドモナスを作製しました（図1B、C）。葉緑体の活性は生物時計に制御されますので、葉緑体の発光の強さは1日周期で変動します（図1D）。このような1日周期の変動を概日リズムと呼びます。

## <研究の内容>

今回の研究では、遺伝子タギング法で核ゲノムの遺伝子を破壊し、葉緑体の発光を指標に概日リズムのおかしくなった105個の変異体を得ました(図2)。それらの変異体のうち、37の変異体の原因遺伝子を決定しました。同一の遺伝子の変異体も含まれていましたので、最終的に葉緑体の概日リズムに重要な30遺伝子を決定することに成功しました。それらのうち6遺伝子に関してさらに詳細な解析を行い、生物時計を構成する遺伝子、すなわち時計遺伝子であることを確認しました。我々はこれらの遺伝子を*ROC15*、*ROC40*、*ROC55*、*ROC66*、*ROC75*、*ROC114*と名付けました(*ROC*は*Rhythm of Chloroplast*の略)。

6遺伝子のうち4遺伝子は転写因子(*ROC15*、*ROC40*、*ROC66*、*ROC75*)、残りはF-boxタンパク質(*ROC114*)と機能の推定できないタンパク質(*ROC55*)をコードしていることがわかりました(図3)。興味深いことに、4つの転写因子のうち3つ(*ROC15*、*ROC40*、*ROC75*)は部分的に植物の時計遺伝子と類似していることがわかりました。また、もう一つ(*ROC66*)は同じく植物の花成遺伝子と類似点が見出されました。しかし、*ROC55* および *ROC114* に関しては他の生物のタンパク質と類似点は見つかりませんでした。これらの結果から、緑藻の生物時計は植物の特徴と独自の特徴を合わせ持っていることが明らかになりました。

## <今後の展開>

これまでの研究から、生物の世界には少なくとも4つのタイプの時計があることがわかっていました(図4)。我々哺乳類や昆虫が使っている*per*型、植物の*PCL1*型、菌類の*frq*型、藍藻の*kai*型です。今回の研究では新たに緑藻の時計*ROC*型を明らかにしました。興味深いことに*ROC*型の時計は植物の時計とある程度重複した部分を持っていることがわかりました。今後、クラミドモナスの時計遺伝子の解析を植物の時計と比較しつつ進めることで、進化の過程で生物時計の何が保存され、何が新たに獲得されてきたのかを明らかにできると期待されます。また、*ROC*型の時計を使っている生物がほかにどのくらいいるのかを調べることも重要です。今回の成果を足掛かりにしてより多くの生物で時計遺伝子を決定していけば、近い将来、生物時計獲得の進化的な経緯を解明できると期待されます。

## <用語説明>

### ・原核生物

細胞内に核膜で区分された核を持たない生物の総称。細菌。バクテリア。

反対に、核膜で区分された核を持つ生物を真核生物と呼ぶ。

### ・藍藻

酸素発生型(高等植物型)の光合成を行う原核生物。

### ・葉緑体

真核細胞内にあり、主に光合成を行う細胞内小器官。進化的な起源は真核生物の細胞内に共生した藍藻であると考えられている。その一つの証拠として、細胞内小器官であるにもかかわらず独自のゲノム（葉緑体ゲノム）を持っている。

- 遺伝子タギング法

遺伝子の同定法の一つ。まず、薬剤耐性遺伝子等をゲノム上にランダムに挿入して本来持っている遺伝子を破壊する。次に、目的の表現型を示した変異体を選択する。最後に、挿入した遺伝子を指標（タグ）にして破壊された遺伝子（原因遺伝子）を同定する。

- 転写因子

遺伝子の転写制御に関わるタンパク質の総称。

- F-box タンパク質

タンパク質間の相互作用に関与する F-box モチーフを持つタンパク質の総称。タンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼの構成因子で、基質特異性を決定すると考えられている。

- 花成遺伝子

植物が花を咲かせる過程を制御している遺伝子の総称。

### <論文名>

"A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system"

(体系的な順遺伝学的解析によるクラミドモナス概日時計システムの構成因子の同定)

### <お問い合わせ先>

石浦 正寛 (いしうら まさひろ)

名古屋大学 遺伝子実験施設 植物ゲノム解析分野 教授

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

名古屋大学遺伝子実験施設植物ゲノム解析分野

理学部地区 F 館 5 階 F501 号室

TEL: 052-789-4527 (dial-in)

FAX: 052-789-4526 (dial-in)

E-mail: ishiura@gene.nagoya-u.ac.jp

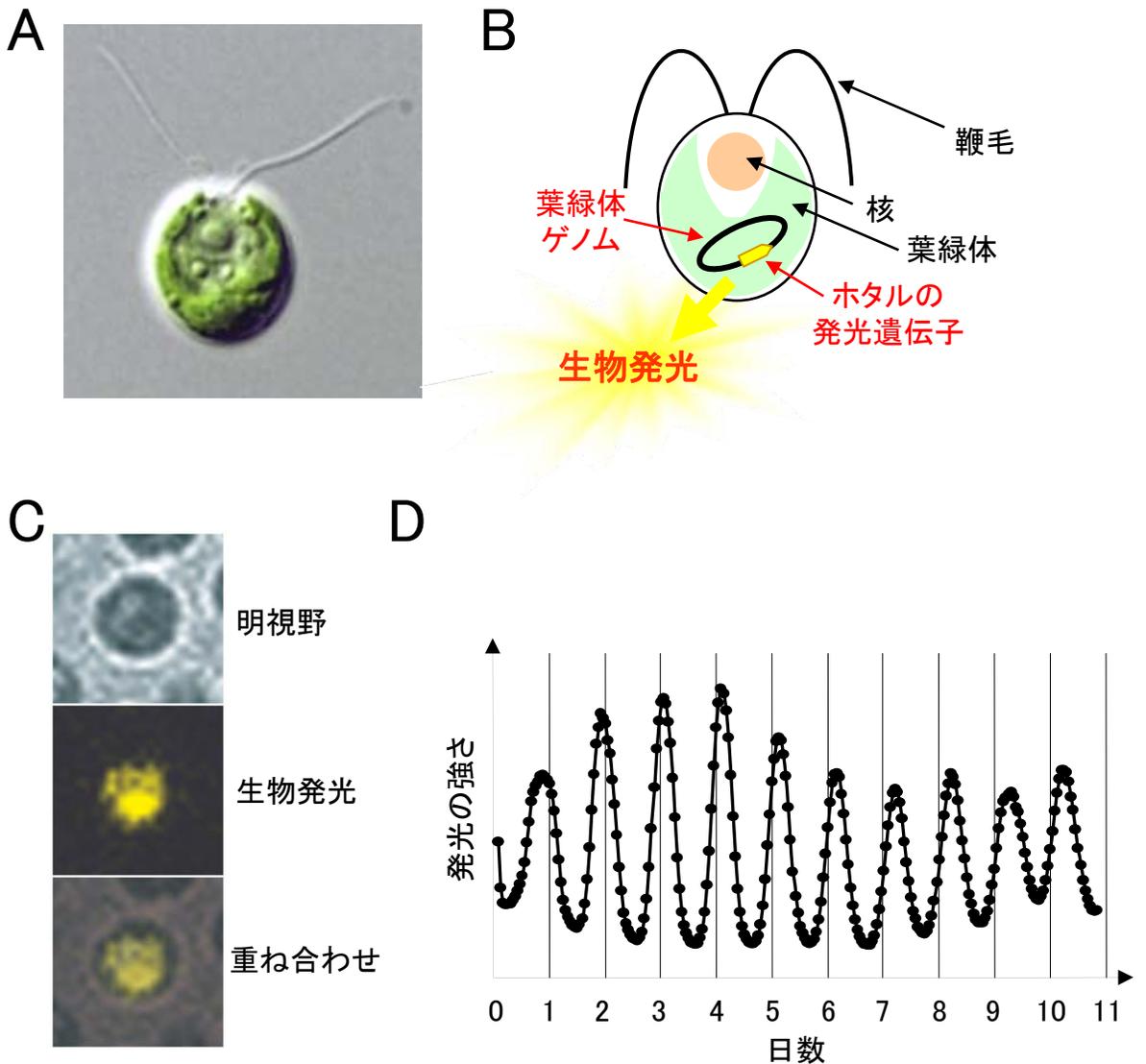


図1 「光る葉緑体」をもつクラミドモナス

A: クラミドモナスの写真。

B: クラミドモナスの模式図。

C: 葉緑体の発光画像。明視野: 照明を当て撮影した細胞の像。生物発光: 超高感度カメラで生物発光のみを撮影した像。重ね合わせ: 上記2つの画像を合成したもの。

D: 葉緑体発光の概日リズム。光や温度が一定の恒常条件下で葉緑体の発光を測定した結果を示した。環境が一定であっても生物時計の制御によって24時間周期で発光の強さが変動している。

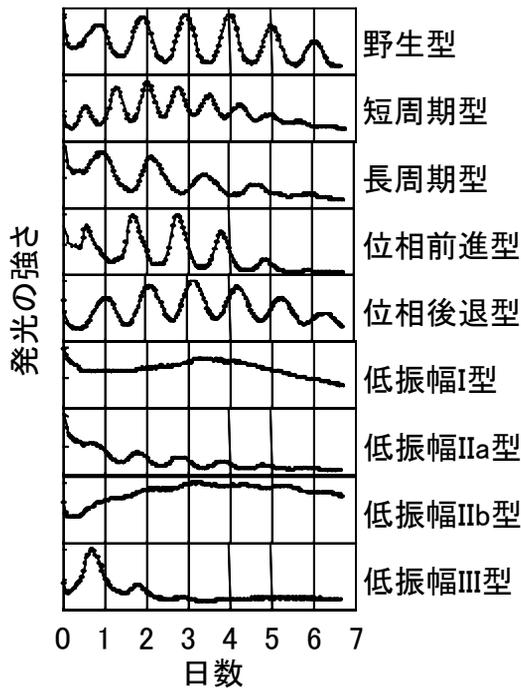


図2 概日リズム変異体の典型的な発光のパターン

- 野生型 : 正常な概日リズム
- 短周期型 : リズムの周期が短くなったもの
- 長周期型 : リズムの周期が長くなったもの
- 位相前進型 : リズムの位相(ピークの位置)が前進したもの
- 位相後退型 : リズムの位相(ピークの位置)が後退したもの
- 低振幅I型 : リズムが消失したもの
- 低振幅IIa型 : 低い発光レベルで弱いリズムを示したもの
- 低振幅IIb型 : 高い発光レベルで弱いリズムを示したもの
- 低振幅III型 : リズムが急速に弱くなったもの

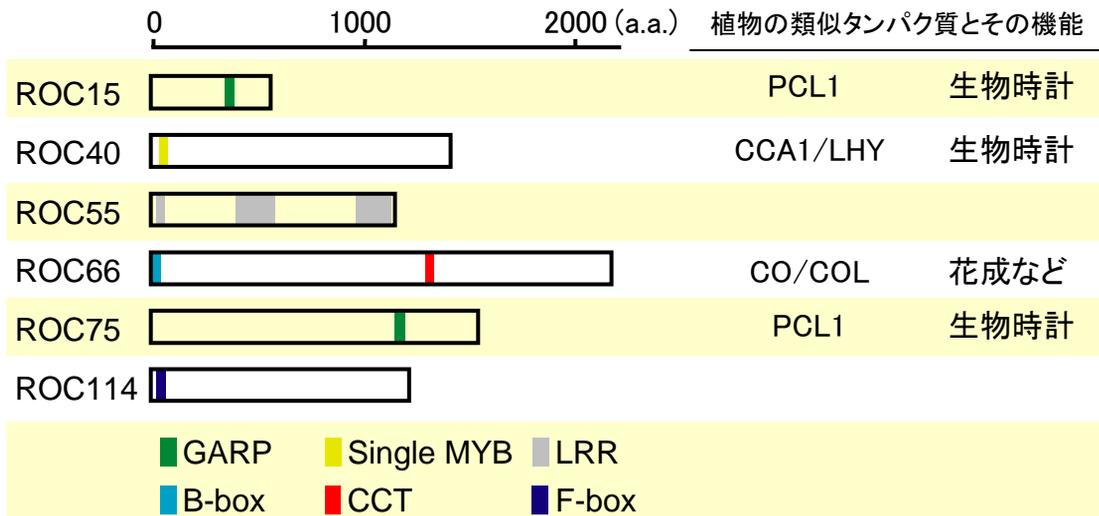


図3 クラミドモナスの生物時計の部品

クラミドモナスの時計遺伝子がコードするタンパク質を模式的に示した。

GARP、Single MYB、B-box: DNA結合ドメインの一種。タンパク質がDNAに結合する際に必要。

LRR: ロイシンリッチリピート。アミノ酸残基ロイシンが繰り返す特徴的な配列。さまざまなタンパク質に見られる。

CCT: 植物の花成遺伝子や時計遺伝子に見られる配列。

F-box: タンパク質の相互作用に関与する配列。これを持つタンパク質はF-boxタンパク質と呼ばれ、タンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼの構成因子と予想される。

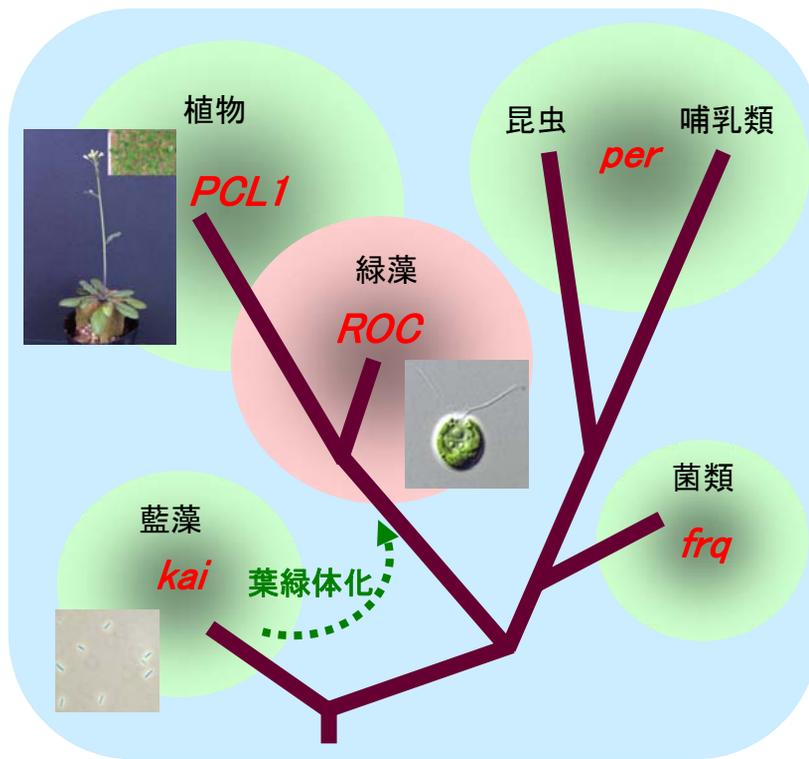


図4 生物の進化と生物時計

今回発見したものを含め、これまでに知られている生物時計を進化系統樹上に模式的に示した図。緑藻の時計ROC型と植物の時計PCL1型には重複した部分がある。