

国立大学法人名古屋大学

科学技術振興機構（JST）

## 緑藻の体内時計 ～時刻合わせの分子メカニズムを解明～

### <概要>

名古屋大学遺伝子実験施設の松尾拓哉助教、石浦正寛名誉教授らの研究グループは、緑藻の体内時計の時刻合わせの分子メカニズムを解明しました。

緑藻も我々人間と同じように体内時計を持っており、規則正しく活動しています。体内時計には、外の世界の時刻とのズレを修正（時刻合わせ）する機能が必ず付いています。緑藻の体内時計は光を浴びることによって時刻合わせが起こることが知られていましたが、その分子メカニズムは長年の謎でした。研究グループは今回、緑藻の一種であるクラミドモナス<sup>(注1)</sup>の時計遺伝子にホタルの発光遺伝子を人工的に融合した遺伝子を作製し、時計遺伝子の働きに応じて発する光を分析しました。その結果、緑藻が外界からの光を浴びたとき、体内時計の時刻合わせが起こる分子メカニズムの解明に成功しました。

緑藻はバイオ燃料の供給源としても期待されており、その活動は体内時計によって制御されています。本研究の成果は、緑藻の活動を人為的に制御できる可能性を示すもので、バイオ燃料生産の効率化に繋がると期待されます。

本成果は、2013年7月29日（米国東部時間）の週の米国科学アカデミー紀要（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）オンライン速報版に掲載されました。

なお、本研究は JST 先端計測分析技術・機器開発プログラムの一環として行われました。

### <研究の背景と経緯>

クラミドモナスのような単細胞性の緑藻が体内時計を持つことは古くから知られていました。また、その体内時計は、我々のものと同様に、光を浴びることで時刻合わせが起こることが解っていました。しかし、その分子メカニズムはこれまで全く解っていませんでした。

松尾助教・石浦名誉教授らの研究グループは、緑藻の一種であるクラミドモナスを用いて、体内時計の分子メカニズムの研究を世界に先駆けて進めています。これまでに、緑藻の体内時計を構成する時計遺伝子を6つ同定しました。今回の研究成果は、それらの時計遺伝子から作られる時計タンパク質を研究する過程で生まれたものです。



### <研究の内容>

研究グループはクラミドモナスの時計遺伝子とホタルの発光遺伝子（ルシフェラーゼ）の融合遺伝子を人工的に作製し、クラミドモナス細胞に組み込みました（図1-①、②）。作成した融合遺伝子からは、時計タンパク質とルシフェラーゼの融合タンパク質が作られます（図1-③）。そのため、この遺伝子を組み込まれたクラミドモナス細胞は、細胞内で作られた融合タンパク質の量に応じた強さで発光します（図1-④）。融合タンパク質の量は本来の時計タンパク質の量と一致しますので、細胞が放つ発光の強さを測定することで、生きたままの細胞で時計タンパク質の量的な変化を秒単位の時間分解能で知ることができます。ただし、この発光は人間の目では全く見えない程の極めて微弱なものですので、JST 先端計測分析技術・機器開発プログラム「機器開発タイプ」（平成17～21年度）および「ソフトウェア開発タイプ」（平成21～24年度）で開発した超高感度の発光測定装置（高感度生物発光測定装置 CL24-W）と測定解析ソフトウェアを用いて測定解析しました（図1-⑤）。

様々な条件下で細胞内の時計タンパク質の量の変化を調べた結果、クラミドモナスが光を浴びた時に、時計タンパク質の1つである ROC15<sup>(注2)</sup>の量が急速に減少することを発見しました（図2）。この減少はユビキチン-プロテアソーム系<sup>(注3)</sup>によるタンパク質分解によるもので、その系には別の時計タンパク質である ROC114<sup>(注4)</sup>が関わっていることを明らかにしました。また、ROC15を持たないクラミドモナス細胞では体内時計の時刻調節がうまくいかないことを確認しました（図3）。以上の結果から、クラミドモナスが光を浴びると、ROC114の関わるユビキチン-プロテアソーム系の働きにより ROC15の急速な分解が起こり、それが引き金となって、クラミドモナスの体内時計の時刻合わせが行われることが明らかになりました。

### <今後の展開>

今後は、光受容から ROC15の分解に至るまでの光情報の伝達経路の解明を目指します。ROC15の分解は赤色の光で特に強く起こります。しかし、クラミドモナスにおいて光情報としての赤色光を受容するメカニズムはよく解っていません。この研究を進めることで、未知の赤色光の受容・情報伝達メカニズムが明らかになると期待されます。

### <波及効果>

緑藻で時刻合わせのメカニズムをさらに解明することにより、緑藻の体内時計を自在にコントロール出来るようになると期待されます。最近、緑藻はバイオ燃料の供給源として注目されています。体内時計を緑藻の活動が盛んな時刻に調節することで、バイオ燃料生産の効率化が期待されます（図4）。

本研究で用いた、高感度生物発光測定装置を活用した研究手法は、生物種、タンパク質の種類を問わず広く適用できますので、今後、様々な生命現象の解明に貢献することが期待されます。



NAGOYA UNIVERSITY



図1 時計タンパク質量を発光として測定する方法の概略図

## 時計タンパク質の量を発光の強さに変換して測定する

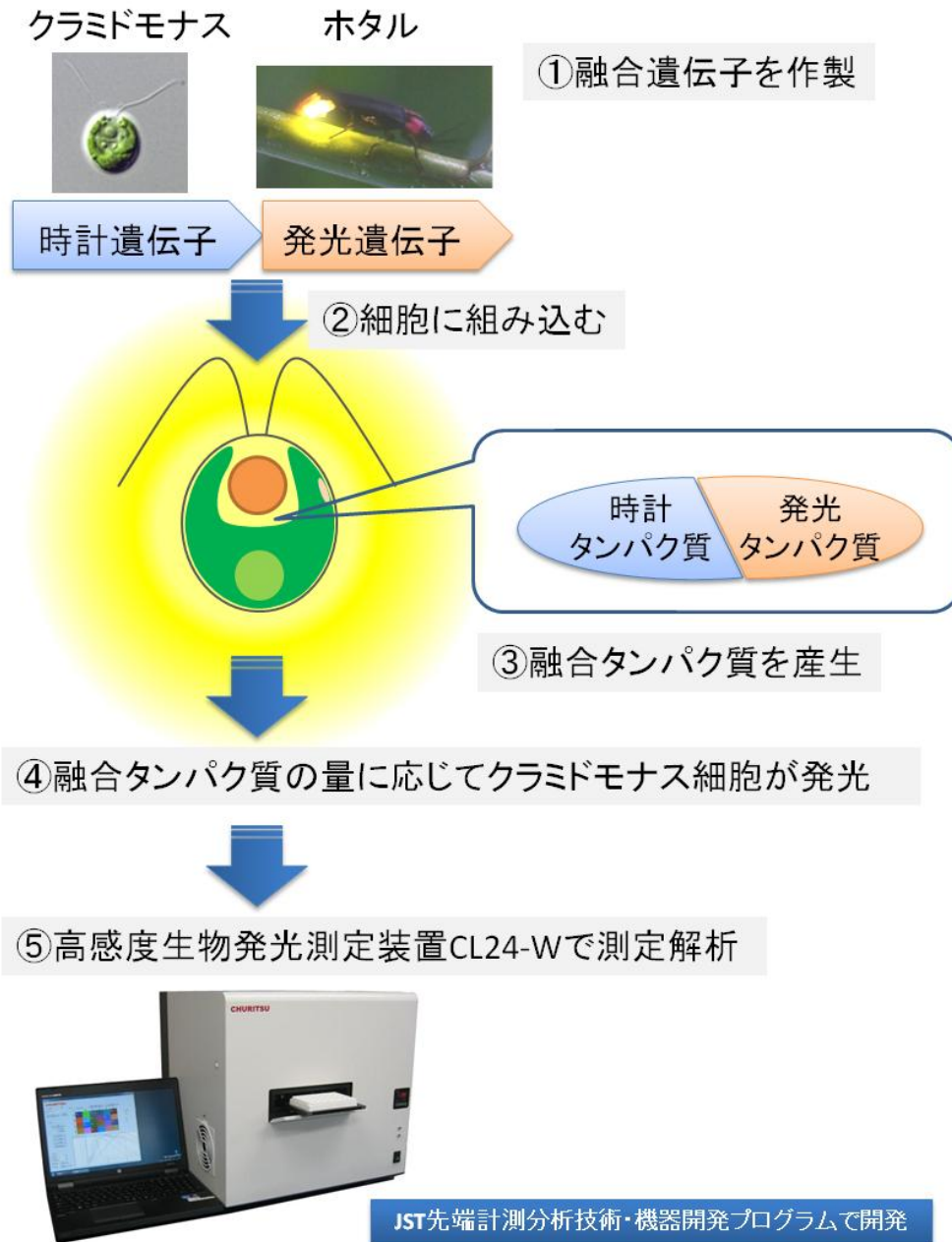


図 2

ROC15-ルシフェラーゼ融合タンパク質を産生する細胞が放つ発光。(左の図) 外からの光(光照射)を浴びた直後から細胞が放つ発光量が急速に減少した。減少の程度は、浴びる光の強さに依存した。(右の図) 発光の減少を秒単位の時間分解能で測定した結果を示す。刻々と発光が減少していく様子がわかる。

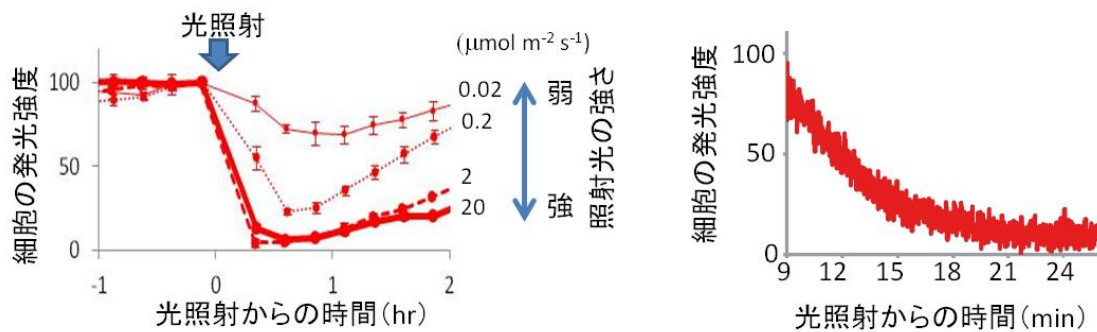
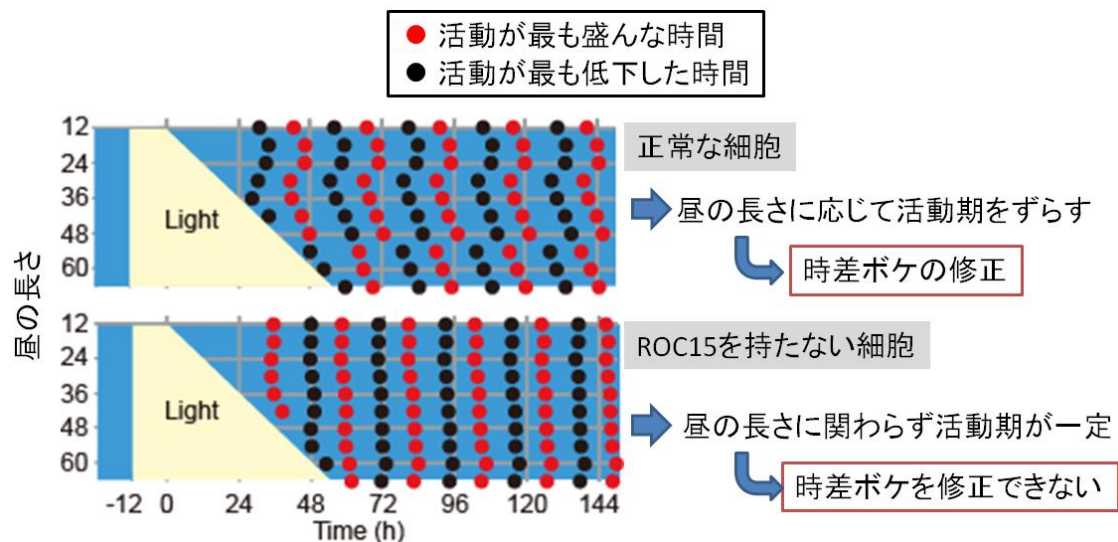


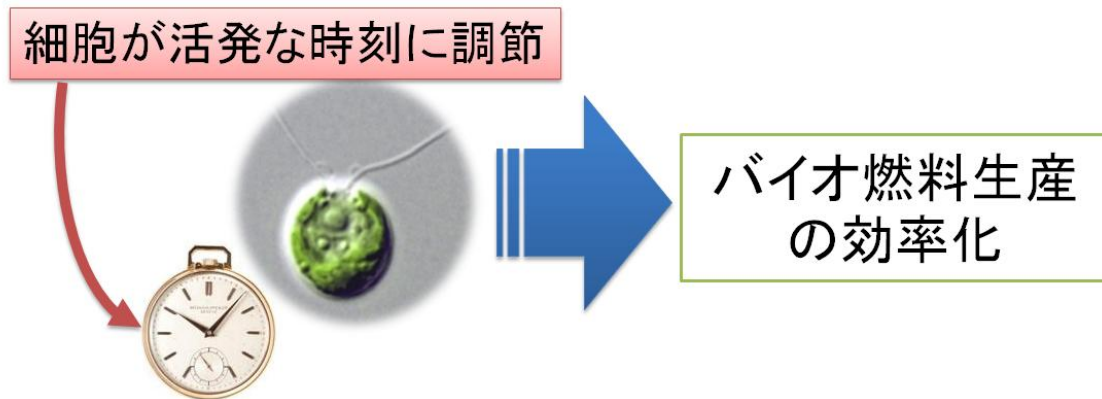
図 3

時差ボケの修正能力を調べる実験。昼の長さを通常の 12 時間から 6 時間ずつ 66 時間まで変化させたときに、翌日以降の細胞の活動（葉緑体の遺伝子発現）の時刻がどうなるかを調べた結果を示す。



## 図 4

体内時計のコントロールによるバイオ燃料生産の効率化の概略図。バイオ燃料を緑藻から抽出する前に、体内時計を細胞の活動が最も盛んな時刻にしばらく固定しておくことで、細胞が通常よりも多くのバイオ燃料を蓄積した状態を維持できる。



<用語説明>

注1) クラミドモナス

緑藻の一種。単細胞生物。湖沼、河川など身近な淡水域に生息。古くから体内時計の研究に利用されている。

注2) ROC15

緑藻の時計遺伝子の1つである *RHYTHM OF CHLOROPLAST 15 (ROC15)* から作られるタンパク質。遺伝子の転写を制御すると考えられている。

注3) ユビキチン-プロテアソーム系

タンパク質分解系の1つ。分解のターゲットとなるタンパク質にはユビキチンと呼ばれるタンパク質が指標として付加され（ユビキチン化）、その後、タンパク質分解工場であるプロテアソームと呼ばれる巨大タンパク質複合体へと運ばれ分解される。

注4) ROC114

緑藻の時計遺伝子の1つである *RHYTHM OF CHLOROPLAST 114 (ROC114)* から作られるタンパク質。タンパク質にユビキチンを付加する酵素（ユビキチンリガーゼ）の特徴を持つ。



NAGOYA UNIVERSITY



<発表雑誌>

雑誌名：『米国科学アカデミー紀要』（英語：Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）

論文タイトル：Phase-resetting mechanism of the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*