

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

## 主論文の要旨

論文題目

ヒメツリガネゴケにおける *CCA1/LHY* 相同遺伝子 *PpCCA1a* と *PpCCA1b* の機能解析

氏名

岡田 龍

## 論文内容の要旨

概日リズムは、恒常条件下でも約 1 日周期で継続する内因性の生体振動であり、環境の日周変化への適応現象である。概日リズムは自律発振機構である概日時計の働きにより生じる。この時計の仕組みは、複数の生物種でその構成要素である遺伝子(時計遺伝子と呼ばれる)が数多く単離され、精力的に研究されているが、未解明である。真核生物において、時計遺伝子は転写・翻訳を介して複雑に絡み合うネットワークを構成しており、これが時計の本体であると推測されている。この時計遺伝子ネットワークは、複数の転写調節のネガティブフィードバックループが互いにリンクした多重ループ構造をしており、その動的な振る舞いにより自律振動が生じると考えられている。動物界については、多様なモデル種で解析が行われ、時計遺伝子の共通性・多様性が調べられつつある。一方で、植物では従来より被子植物のモデル種シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*) 一種のみで遺伝子レベルの解析が行われてきた。このため、植物界における時計の進化・多様性・起源は全くの謎であった。そこで本研究では、植物の時計の進化を探るため、基部陸上植物群であるコケ植物の一種ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)を用い、シロイヌナズナの時計遺伝子 *CCA1/LHY* の類似遺伝子 *PpCCA1a/PpCCA1b* に焦点を当て、時計機構の研究を行った。

*CCA1* と *LHY* は単一リピートの Myb ドメインをもつ転写因子(単一 Myb 転写因子)をコードする互いにパラログ関係にある遺伝子である。*PpCCA1a* と *PpCCA1b* は *CCA1/LHY* との間で 4 つの保存領域を共有することから、*CCA1/LHY* のホモログ遺伝子であると考えられた。このことは、緑色植物の単一 Myb 転写因子配列の分子系統樹において、*PpCCA1a/PpCCA1b* が被子植物の *CCA1/LHY* ホモログ群とクラスター化したことから支持された。次に、*PpCCA1a* と *PpCCA1b* の経時的な発現を 12 時間の明期と 12 時間の暗期からなる明暗サイクル(12:12LD)、連続明(LL)、連続暗(DD)の各光条件で調べた。両遺伝子の発現はどの光条件でも互いによく似ており、12:12LDとDDでは明期(あるいは主観的明期)の始めにピークを伴うリズムを示した。また 12:12LDとDDでの両遺伝子の発現パターンは、それぞれの光条件と同じ条件での *CCA1/LHY* の発現パターンとよく似ていた。しかし一方 LL では、両遺伝子は無周期的な発現を示した。さらに、時計機構において重要な機能を持つとされるシロイヌ

ナズナの *PRR* 遺伝子群のコケ・ホモログ *PpPRRa* の発現を調べた結果、*PpCCA1a/PpCCA1b* と同様に、12:12LD と DD ではリズム発現を示すが、LL では無周期的な発現を示すことがなかった。*PpCCA1a/PpCCA1b* と *PpPRRa* が LL で無周期的な発現を示すことは、LL ではっきりしたリズム発現を示す被子植物におけるそれぞれのホモログとは対照的であった。

次に、ホタルの発光遺伝子ルシフェラーゼを用いて、*PpCCA1b* の転写変動を発光変化として観察できるレポーター株 (*PpCCA1b* レポーター株) を作製した。レポーター株からの発光変化を観察することにより、遺伝子の転写変動を非破壊的に、高感度・高時間分解能で詳細に調べることができる。発光変動として捉えた *PpCCA1b* の転写は、どの光条件でも mRNA レベルと同様の変動パターンを示した。*PpCCA1b* レポーター株を用いて、*PpCCA1b* の転写リズムの周期、位相、そして振幅を正確に評価できるようになった。そこで、このレポーター株をベースに、*PpCCA1a/PpCCA1b* の遺伝子破壊株 (KO 株) を作製し、両遺伝子の時計への機能的関与の可能性を探った。*PpCCA1a* と *PpCCA1b* 各遺伝子のシングル KO 株では DD での *PpCCA1b* の転写の概日リズムに影響はほとんどみられなかったが、ダブル KO 株ではこのリズムの短周期化と低振幅化がみられた。またダブル KO 株においては、DD での *PpPRRa* と *PpSig5* の mRNA 蓄積量の概日リズムにも短周期化と低振幅化がみられたので、*PpCCA1a/PpCCA1b* 両遺伝子の欠損は複数の出力のリズムに同様に影響することが分かった。これらの解析により、*PpCCA1a/PpCCA1b* が概日リズムの周期と振幅を調節する機能をもつ時計遺伝子であり、その機能は互いに重複していることがわかった。また、ダブル KO 株の表現型は、その程度は幾らか穏やかであるが *CCA1/LHY* 両遺伝子の機能欠損変異体の表現型とよく似ていた。従って、*PpCCA1a/PpCCA1b* は *CCA1/LHY* の構造上のホモログ遺伝子であるだけでなく、それらの機能的ホモログ遺伝子であることが分かった。このことは、コケと被子植物が分岐する前に、*CCA1/LHY* の時計機能がすでに確立されていたことを示す。上記の系統解析で *PpCCA1a/PpCCA1b* は、被子植物の *CCA1/LHY* ホモログとともに、緑藻類の単一 Myb 転写因子配列を姉妹群とする一つのグループを形成した。また、その緑藻類の配列のうち、クラミドモナスの *CrROC40* とオストレオコッカスの *OiCCA1* は時計に関連する機能をもつと報告されている。従って、植物の時計機構の起源は少なくとも緑藻類にまで遡ることが示唆される。

シロイヌナズナでは、三つあるいは四つのフィードバックループからなる時計機構モデルが提唱されている。*PpCCA1a/PpCCA1b* は概日リズムの周期と振幅の調節に関して *CCA1/LHY* と類似する機能を示したことから、コケにおいてもシロイヌナズナの時計機構がある程度保存されていることが示唆される。またこの考えは、*PpCCA1a/PpCCA1b* が、1) LD と DD で *CCA1/LHY* とよく似たパターンのリズム発現を示すこと、2) ネガティブフィードバック制御を示すことから支持される。しかしその一方で、コケのゲノムには *Zeitlupe* と *Gigantea* など幾つかの時計遺伝子の類似配列が見当たらなかった。従ってコケでは、シロイヌナズナの時計機構が完全に保存されているわけではないらしい。つまり、コケとシロイヌナズナの間時計機構の共通性は部分的なものであると考えられるが、植物界では少なくとも Myb 転写因子を共通部品とする遺伝子回路が時計の働きに重要である可能性は高い。

これまでにヒメツリガネコケで解析された全ての時計制御下遺伝子は、12:12LD と DD ではリズム発現を示すが、LL ではリズム発現を示さない。また本研究で解析した *PpCCA1a/PpCCA1b* と *PpPRRa* も LL でリズム発現を示さなかった。真核生物では、時計遺伝子の発現リズムが時計の振動過程そのものであると考えられている。*PpCCA1a/PpCCA1b* に

については、本研究においてコケの時計遺伝子であることがわかったので、コケの時計はLLで機能していない可能性が示唆される。そこで、LLにおけるコケの遺伝子発現の無周期性の原因についてリリースアッセイにより調べた。時計は環境サイクルに同調するため光シグナルに応答してその時刻をリセットする。リリースアッセイは、この時計の光応答性を利用した光生理学的な方法であり、LLでコケの時計が機能しているのかどうかを評価するのに用いられる。リリースアッセイの結果は、コケの時計がLLに移行した後すぐに一定位相にとどまることを示唆した。つまり、コケの時計は、被子植物の時計と異なりLLでは機能していないという考えが支持された。

コケでは概日時計の生理機能は全くわかっていない。そこで、さまざまな日長条件でコケのプロトネマ組織の成長を野生型株と*PpCCA1a/PpCCA1b*のKO株の間で比較し、時計がコケ組織の生育に対して示す影響を探った。短日条件では、*PpCCA1a/PpCCA1b*の各シングルKO株とダブルKO株のどちらも、野生型株との間でプロトネマ細胞の成長において差を示さなかった。一方で長日条件では、ダブルKO株のプロトネマ細胞は野生型株と比べてより早く成長した。また、長日条件で生育したプロトネマ細胞の特徴(サイズ、個々の細胞の形、細胞の分岐のパターン)にダブルKO株と野生型株の間で明確な違いはみられなかった。これらの結果により、*PpCCA1a/PpCCA1b*がプロトネマ細胞の成長速度を日長依存的に抑制する働きをもつことが明らかになった。

この研究により著者は、1)ルシフェラーゼレポーターアッセイ系をコケに適用することにより、シロイヌナズナの解析を補完する植物のリズム研究の新しい実験モデルを確立し、2)植物界では、Myb転写因子を共通部品とする遺伝子回路が時計機能の成立の上で重要であること、3)コケと被子植物ではLLでの概日リズムの持続性に違いがみられること、4)コケの時計は日長依存的な組織成長の制御因子であることを明らかにした。1)は、これからのコケの時計機構の解析においても大きな利点となると考えられる。また2)から3)までの結果は、ヒメツリガネゴケの時計機構は被子植物の時計機構に対して顕著な類似性と異質性を共に示すことを物語っており、緑色植物の概日時計の進化を考える上で重要な知見となると考えられる。







