

報告番号

※

第

号

## 主　論　文　の　要　旨

論文題目 クラミドモナスの生物時計位相リセット機構の解析

氏　名　　丹　羽　由　実

## 論　文　内　容　の　要　旨

私の研究室では、単細胞緑藻クラミドモナスの時計遺伝子が松尾らにより 6 個同定され、*RHYTHM OF CHROLOPLAST(ROC)*遺伝子と名付けられた(Matsuo *et al.*, 2008, *Genes & Development* 22:918-930)。私は、それら ROC 遺伝子がコードするタンパク質の発現をリアルタイムでモニタリングするための生物発光レポーター株を作製し、ROC タンパク質発現の詳細な特徴を調べた。ROC タンパク質レポーター株は、ROC 遺伝子領域のゲノム断片の ROC タンパク質コード領域にホタルルシフェラーゼコード配列を挿入したレポーター遺伝子をゲノムに組み込んだ株である (ROC15-LUC, ROC40-LUC, ROC66-LUC, ROC75-LUC)。レポーター株の示す生物発光リズムは、それぞれの ROC タンパク質の発現リズムとほぼ同じ位相を示すことから、作製したレポーター株が内在性の ROC タンパク質の変動をモニターするためのレポーターとして有用であることがわかった。このうち ROC15-LUC 株は、明暗条件下での生物発光が明期に入ると急速に減少し、暗期には再び増加する興味深い特徴を示すことを発見した。そこで私は ROC15 についてさらに詳細に調べることにした。ROC15-LUC の生物発光は、光照射によって急速に減少した。そこでこの現象を誘導する光についてその波長特性を調べた。その結果、この現象は青色光から赤色光まで幅広い波長の光で誘導されるが、赤色光が最も効果的であることが分かった。またその効果は緑色光、青色光の順に弱くなった。この特性は、クラミドモナスの走光性リズムの位相リセットの波長特性の結果(Kondo *et al.*, 1991, *Plant Physiology* 95:197-205)とよく似ており、生物時計の位相の調節には ROC15 が関わっている可能性が非常に高いと予想された。そこでこの ROC15 の変異株である *roc15* 株における位相リセットについて調べたところ、予想したとおり光による位相リセットに異常を示すことが確かめられた。

ROC15 の光照射による減少は、hemagglutinin(HA)タグを融合した ROC15 タンパク質のウェスタンプロット解析でも確かめることができた。またこの減少は、プロテアソーム阻害剤によって阻害された。さらにノーザンプロット解析によって *ROC15* mRNA も光照射によって半減することがわかったが、その減少の程度は、完全に消失するタンパク質ほどではなかった。したがって、ROC15 の光照射による減少は、主としてタンパク質分解によるものであると結論づけた。

一方、ROC 遺伝子群のうち、*ROC114* は F-box モチーフを持つタンパク質をコードし、SCF ユビキチンリガーゼのサブユニットと予想されていた。そこで、ROC15 タンパク質の分解と *ROC114* との関係を調べるために、*ROC114* 遺伝子の変異株である *roc114* 株における ROC15-LUC の生物発光を調べた。その結果、*roc114* 株では、ROC15-LUC は光を照射してもほとんど減少しなかった。このことから ROC15 は、F-box タンパク質 *ROC114* が関わるユビキチンープロテアソーム系で分解されると推測された。

以上のように私は、ROC15 タンパク質が光照射によって急速に分解されることを見出した。さらにその分解機構には F-box ドメインを持つタンパク質 *ROC114* が必須であることも明らかにした。この発見は生物時計の位相リセット機構を解明する大きな手がかりとなる。