研究報告書

「広範な藻類のもつ転写因子型光受容体の機能解析とその応用」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月~平成 26 年 3 月

研究者: 高橋 文雄

1. 研究のねらい

本研究のねらいは、まだ研究の進んでいない広範な藻類の光受容体の単離とその機能解析おこない、藻類の光受容反応を明らかにすることその応用につなげることである。

藻類は、水域の一次生産者であり、これらの成長増減の影響は水域生態系の崩壊に直結する。藻類は陸上植物と同様に、水中を透過する光を使って光合成をおこなって、成長している。また水中には青から緑の一部の光しか透過せず、これらの光を信号として用い、光形態形成や光運動(光走性)を行っていることも知られている。2007年に水域の藻類から、新規の青色光受容体オーレオクロムが発見された。オーレオクロムは、DNA結合能と光受容能を持ち合わせている興味深い光受容体である。しかし、有用な藻類(赤潮藻類や昆布やワカメを含む褐藻類)でのオーレオクロムの単離は、いまだ達成されておらず、応用を考える上ではこれらの光受容体オーレオクロムの単離は、必須である。またオーレオクロムは、DNA結合能をもつため、その下流の遺伝子群の探索やオーレオクロムを直接用いた応用も考えられる。本研究では、いまだ困難とされているこれらの藻類の分子基盤(遺伝子の発現情報)を作るとともに、分子生物学技術を用いたオーレオクロムの光依存的な DNA 結合の様式を調査することを目的とした。

光受容体の単離、光受容体の機能解析、光受容体を持つ藻類の光応答性の三点を組み合わせることによって、水域の問題となっている養殖技術や赤潮問題の解決の礎になる研究基盤技術の創生が大きなねらいである。

2. 研究成果

(1)概要

様々な藻類の青色光受容体オーレオクロムの単離し、そのオーレオクロムの構造変化をタンパク質レベルで確認し、光によって誘導もしくは減少する遺伝子群の特定を行った。オーレオクロムはまず光照射後、光受容モチーフであるLOV内の構造変化が起こり、その後N末端側にある転写因子モチーフの構造内に変化が生じ DNA に結合可能になることがわかった。また DNA に結合した後、様々な遺伝子(m-RNA)発現変化を起こしていることがわかった。オーレオクロムが遺伝子上流のプロモーター領域等に結合していることが示唆された。また青色光受容体オーレオクロムを持つ藻類の光応答反応について、実験室内で用いられる方法を開発し、多くの光誘導性の現象を発見した。褐藻類および赤潮などの鞭毛藻類などの形態が青色光依存的に光合成等に有効な形状を示すようになることがわかった。また陸上植物のみで効果を持つ植物ホルモン・オーキシン阻害剤で、根の形成が促されることもわかり、これらの成果は、藻類学のみならず植物科学の光生物学に大きな進展をもたらした。



(2)詳細

研究テーマ A「青色光受容体オーレオクロム等の単離」

海産の藻類はご存じの通り、多糖が多く含まれており、分子生物学的手法によって DNA・RNA(核酸)の単離が困難である。私はまず実験室内での培養系の確立をおこない、この多糖や核酸等の分解がおこらない条件をみつけ、核酸単離を行った。実験室内では光の条件等で多糖成分の分泌が抑えられ、または核酸抽出の際に液体窒素等を用いた急速凍結やフェノールを用いた固定を前処理することで、核酸を安定的に単離することが可能になった。また生態での藻類は、比較的多糖が少ない受精卵等(褐藻類は動物と同様に受精を行う)を用いることによって比較的簡易に核酸抽出が可能になった。

その結果、赤潮藻類等や褐藻類で青色光受容体の単離に成功した。オーレオクロムは 2007 年に単離されたものと同様にN末端側に bZIP

(basic leucine zipper)とよばれる転写因子構造を持ち、C 末端側には LOV (light-oxygen-voltage)とよばれる青色光受容モチーフを持っていた。遺伝子による系統解析の結果、オーレオクロムの青色光受容モチーフは、陸上植物が持つフォトトロピンの LOV2 モチーフに近縁であることがわかった(図1 論文 2、2013)。別々の進化を歩んできた陸上植物と藻類の LOV モチーフが近縁であることは、LOV という光受容能をもったモチーフは遺伝子進化を停止し、より保存された状態になったと考えられる。藻

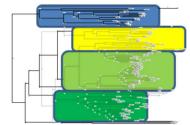


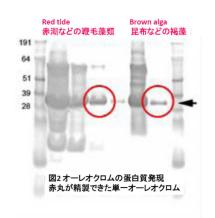
図1LOV motif系統樹 青:菌類 黄:Aureochrome 黄緑:PhototropinLOV2 緑:PhototropinLOV1

類の青色光受容体というだけなく光合成生物すべての青色光受容体の進化にせまった研究となった。

研究テーマB「青色光受容体オーレオクロムの機能解析」

オーレオクロムのタンパク質としての機能解析をおこない、最終的には光スイッチなどの応用を目指す研究の基盤を作ることを目的とした。藻類から直接的に青色光受容体を単離することを試みたが、核酸と違い大量に生成することは困難であった。そのため、オーレオクロム

遺伝子を大腸菌にベクターとして組み込み、タンパク質の大量発現方法の確立を試みた。この際、オーレオクロムは転写因子を持っていることから、大腸菌の核酸(DNA)に結合することがわかり、タンパク質の精製が困難であった。しかし、大腸菌の株や大腸菌の生育温度または発現させるときに使用する IPTG という試薬の濃度を精査することによって、発現を確認し、組み換えタンパク質精製することが出来るようになった(図2)。大腸菌を組み換えするベクターにはヒスチジン tag を用い、そして大腸菌の生育条件は低温 18°C(大腸菌は最適は 37°C)で行った。その後オーレオクロムの大量精



製を行い、生物物理的手法(分光法)によるオーレオクロムの構造解析を行った。まずは吸収



スペクトル測定と暗回復(Dark reversion)を測定した。2種の藻類から得られた吸収スペクトルは、青色領域に3点(380、450、480nm)の吸収極大を示した。さらに暗回復を観察すると、まず照射後青色の領域の吸収がなくなるが、その後10分以上かけて元の吸収極大のスペクトルを持つようになった。興味深いことに不動点が3点存在し、これらはLOVタンパク質内部のシステイン残基とシステインアダクトを形成していることがわかった(システインアダクト

を形成しないフラビン型の受容体は光を吸収後 red shift が起こる)。またLOV内に存在するフラビン類の種類を確認するとFMN(Flavin mononucleotide)であることもわかった。また陸上植物で解析されているLOVモチーフは比較的短寿命の暗回復が示されているに較べ、水域でとられたオーレオクロムの光受容 LOV モチーフは長寿命であることがわかった(図3)。このことから、少ない光を用いて海の中で活性状態を保っていることが推定された。これらの結果は水域の生物がどのように光の使用しているのかはじめて示した例である。さらにこの大量発現

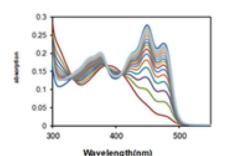


図3 オーレオクロムの吸収変化 青色照射後のスペクトル測定の結果 青色領域がなくなり暗回復して元の吸収 に戻る。三点の不動点が観察されること がオーレオクロムの特徴。

に成功したタンパク質を用い、熱拡散をみる Transient grating (TG)法、ヘリックスやシート構造変化を調べられる円偏光スペクトル、FTIR 法を用いて、オーレオクロム光照射時照射後の構造変化を推定した。TG 法によって、光受容初期に起こるシステインアダクトの形成速度が 2.8μ 秒であることがわかった。また円偏光スペクトルを用いた解析により、青色光受容後 LOV 内の α -helix が収縮し、その後 bZIP 内の α -helix が伸長することがわかった(論文 3、2013)。また FTIR 法を用いた解析では、低温条件において loop-loop 領域が変化することを発見し、LOV が C 末端に存在するものの変化を初めて観察した結果となった。陸上植物の LOV は N 末端に存在するため、別種の構造変化を示し、オーレオクロム光受容体の世界では初めての解析となった。さらに転写因子モチーフ bZIP 領域の DNA との相互作用解析をおこなったところ、他のオーレオクロムで決定したシス配列 (DNA 結合)と同様に TGACGT という配列に結合することがわかった (ACGT は回文配列である)。これらをもとに現在、ゲノムレベルでの探索も同時進行している。

さらにこれらシス配列を決定後、様々な光条件下(培養条件:青、赤、白色、暗所)での遺伝子発現の増減を、次世代シークエンスを用い解析を行った。光合成系の遺伝子の発現の増減も観察されたが特に興味深いのは動物を含めた生物すべてで関与していると考えられている second messenger cAMP(環状アデノシンーリン酸)に関与する転写因子が光条件によって増減していることがわかった(光合成真核生物ではあまり研究が進んでいない)。藻類でも cAMP の研究はほとんど行われておらず、今後の藻類における信号伝達系の研究の重要なデータが獲得できたと考えられる。他にも非常に興味深い遺伝子群の発現の増減が見られ、今後それらについても随時報告していく予定である。最後にオーレオクロムを使って、遺伝子発現制御を行う光スイッチ等の研究を行ったが、現状では m-RNA 発現機構の解明と DNA 結合能に関する研究のみが理解されただけで、最終報告に間に合わなかった。今後もこれらの応用研究も世界に向けて発信していく予定である。



研究テーマC「オーレオクロムを持つ藻類の光応答反応解析」

遺伝子の単離できたオーレオクロムを持つ藻類の光生理反応の解析を行った。この研究の目的は、オーレオクロムを介した生理反応を知ることによって、昆布やワカメ等の褐藻類の養殖技術の発展や赤潮藻類の撲滅につながる研究になると考えたためである。まず褐藻類の光反応性について、実験室内での長期培養を確立させ、様々な光条件下での形態形成反

応を観察した。褐藻類は、青色光のみで、陸上植物でいう葉器官(葉状体)を形成する(誘導可能)ことがわかった(図4)。光合成に効果のある赤色光条件下の培養では、葉器官は形成されず、根器官(仮根)が誘導されることも分かった。また陸上植物が持つ成長ホルモン・オーキシンの効果を調べたところ、青色光による誘導の代替えにはならなかった。しかし、オーキシンの細胞内輸送阻害剤を培地に加えると、青色光で誘導されるはずの葉器官が形成されず、反対

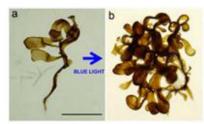


図4 褐藻類の青色光応答 20μmol/m²/sの光で培養すると 葉の再生が増大する

に根が誘導されることを発見した。いままでに藻類研究では報告されていない例で、植物ホルモン研究に一石を投じることになるだろうと考えている。また他の藻類では、赤潮藻類の一種では、青色光によって細胞の形状がかわり、細長くそしてさらに遊泳速度が速くなることがわかった(論文 4, 2012)。これらは赤潮形成するときに海面に上昇する際、光に向かって泳ぐだけでなく、光によって泳ぎやすくなるように形態を変化させることがわかった。また淡水域に存在する藻類も使い細胞内の葉緑体の運動も観察した。この藻類も同様に青色光のみに反応して、弱い光には葉緑体集合反応をみせ、強い光に関しては照射域からの逃避反応をみせることを観察した。この現象は、陸上植物でよく研究されており、非常に速い反応である。今回遺伝子を単離したオーレオクロムは転写因子であることから、このような早い反応にかかわってない可能性がある。未知の光受容体の可能性を示唆できる情報であろうと考える。

以上様々な藻類の応答反応を調べ、多くの現象を発見した。今後これらの光受容から光 応答までの全貌が明らかになることによって、日本だけなく世界の沿岸域の諸問題の解決の 礎になったと考えられる。

3. 今後の展開

さきがけ期間中になしえなかった2つ残したテーマが存在している。青色光受容体オーレオクロム自体をつかった光スイッチの研究である。オーレオクロムは直接 DNA に働きかけ、遺伝子の調節を行っている。大腸菌や酵母などを用いて、オーレオクロムを形質転換し、ある遺伝子(有用な遺伝子群)の発現を光で制御できる仕組みを作っていこうと考えている。また本研究では様々なオーレオクロム関連の基礎的な情報(生化学・生理)が得られた。さらに藻類の光応答に対する研究を生態と実験室内を組み合わせることによって様々な環境問題(赤潮等)や養殖技術の発展に寄与できるのではないかと考えられる。現在も進行中であるが、生態研究者との共同研究等を推進していきたいと考えている。

4. 評価

(1)自己評価



当初の狙いは、藻類の持つ光受容体の単離解析を行い、具体的な応用(養殖技術の革新や赤潮撲滅)を達成の予定であった。光受容体の単離や機能解析、実験室内での藻類の培養法の確立に関しては多くの知見を得られ、このさきがけの3年半で非常に進んだと考えられる。不可能と考えられていた藻類学の分子生物学基盤技術に新たなーページを加えたことは間違いない。また当初日本また世界では私しかしていなかった藻類光研究に、国内では5研究室、海外でも数研究室が追随した。これらの研究の本質が非常に興味深いことで、現在次々の新たな発見が見つかってくること考えられる。多くの研究者に追随されることで私自身もさらに多くの研究者と共同研究等を行い、この研究でリードできる体制になったと考えられる。応用研究面において、さきがけ研究内で2つのことが達成できなかった。まずオーレオクロムを用いた有用遺伝子の光スイッチによる発現・また実験室内から生態へ戻して本質的な応用研究が間に合わなかった。今後前述の協力体制を強化し、数年内にこれらの応用の達成を試みる予定である。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

植物は、光合成に太陽光を利用するのみならず、その効率化を行うために信号として利用している。さらに、形態を変化させたり、細胞内の小器官を移動させたりすることにも光を活用している。植物が、光を信号として受け取るのが光受容体で、藻類は陸上植物とは違った光受容体を持つ可能性が示唆されていたにも関わらず、その光受容体の実在は確認されていなかった。

高橋文雄研究者は、2007 年に藻類から新規青色光受容体発見し、オーレオクロムと名付け、 DNA 結合能と光受容能を持ち合わせていることを明らかにした。本さきがけ研究では、様々な藻類の青色光受容体オーレオクロムを単離し、そのオーレオクロムの構造変化をタンパク質レベルで確認、光によって誘導もしくは減少する遺伝子群の特定を行った。また青色光受容体オーレオクロムを持つ藻類の光応答反応について、実験室内で用いられる方法を開発し、多くの光誘導性の現象を発見した。

最近、エネルギー、食料、環境問題に対して水性植物を活用しようする研究が活発化している。 これらはすべて水性植物の太陽光利用に基づいている。藻類を研究対象として、光受容タンパクの様々な機能を明らかにしたことは、藻類学のみならず植物科学の光生物学に大きな進展を もたらし、赤潮対策の糸口にもなる可能性があり、今後の研究進展が多いに望まれる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- Usami H, Maeda T, Fujii Y, Oikawa K, Takahashi F, Kagawa T, Wada M, Kasahara M CHUP1 mediates actin-based light-induced chloroplast avoidance movement in the moss *Physcomitrella patens* Planta 236 1889-1897 (2012)
- Ishikawa M, Kataoka H, Takahashi F Analysis of Light-Dependent Cell Morphology and an Accumulation Response in *Ochromonas danica* Cytologia 77(4): 1–9 (2012)
- 3. Hisatomi O, Takeuchi K, Zikihara K, Ookubo Y, Nakatani Y, Takahashi F, Tokutomi



- S, Kataoka H Blue Light-Induced conformational changes in a Light-Regulated Transcription Factor, Aureochrome-1 Plant Cell Physiology 54: 93–106 (2013)
- 4. 石川美恵 高橋文雄 黄色植物フシナシミドロの光応答戦略 -転写因子として働く青色 光受容体オーレオクロム BSJ-Review 4:21-28 (2013)

(2)特許出願

研究期間累積件数:O件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際会議

- 1. <u>Takahashi F</u> Functional analysis and application of a photoactivated transcription regulator in diverse algae AS-JST joint workshop on innovative use of light and nano/bio materials(2011)
- 2. Ishikawa M, Gärtner W, Kataoka H, <u>Takahashi F</u> Photochemical analysis of *Ochromonas danica* Aureochrome. The 5th Asia and Oceania Conference on Photobiology(2011)
- 3. Hisatomi O, Takeuchi K, Murakami T, <u>Takahashi F</u>, Kataoka H Characterization of a light-induced transcription factor, AUREO1, expressed in *E. coli* The 5th Asia and Oceania Conference on Photobiology (2011)
- 4. Nozaki H, Yamada T , <u>Takahashi F</u>, Nakada T New Volvocacean algae progressively identified First International Volvox Conference (2011)

その他3回

国内会議(招待講演)

- 1. <u>高橋文雄</u> 植物はなぜ青色光を使うようになったか? 藻類の生存戦略 植物学会東北支部会 公開シンポジウム 石巻専修大学 (2010)
- 2. 片岡 博尚, <u>高橋文雄</u>, 石川美恵 転写因子として機能する藻類の青色光受容体オーレオクロム The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (2011)
- 3. 高橋文雄 二次共生藻の光応答反応について 微細藻類研究会(2013)

その他国内学会発表 10件

