

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06692

研究課題名(和文)黄緑藻の葉緑体光定位運動と新奇LOV光受容体

研究課題名(英文) Novel BL receptor-mediated chloroplast movement in Vaucheria

研究代表者

高橋 文雄 (Takahashi, Fumio)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：60332318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フシナシミドロは、葉緑体光定位運動を示す。光波長は青色光に限定されるが、その光受容体の存在は、未解決である。本研究ではトランスクリプトームデータベースから見出した新奇青色光受容体に着目し、生理学的解析と生化学的解析によって、葉緑体光定位運動を調査した。その結果、生理学的には、葉緑体光定位運動は原形質流動に非依存的な独自の運動を保持していた。また葉緑体光定位運動独自のアクチンフィラメントが存在することもわかった。新奇光受容体は、既存の光受容体のLOVドメインと同様に、フラビン結合に重要なアミノ酸は保持していたが、生化学的解析ではその結合能は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、植物生理学は、緑色植物をメインに行われている。それは農作物につながるからである。一方、私が扱った黄色植物は進化的に、また生態的にも違う分類群である。しかし、同じ光合成生物で、似通った現象が観察される。明確な解答には至らなかったが、同じ現象を別の光受容体を使って、生物ごとに対応していることが示唆された。様々な共生関係で植物は多様化してきている答えになる可能性があると考えられる。また本研究で扱った生物群は、褐藻などが含まれ、海域の農作物(水産物)の研究であるため、海産立国日本の応用研究の基盤になりうると確信している。

研究成果の概要(英文)：Vaucheria cells show chloroplast photo-orientation movement. Although the light wavelength is limited to blue light, the existence of photoreceptors for it remains unresolved. In the present, we focused on a novel blue light receptor isolated from a transcriptome database and investigated chloroplast photo-orientation movement through physiological and biochemical analyses.

As a result, physiologically, the chloroplast photo-orientation movement maintained a unique movement independent of cytoplasmic streaming. We also found that actin filaments unique to chloroplast photo-orientation movement exist. Similar to the LOV domain of existing photoreceptors, the novel photoreceptor retained amino acids important for flavin binding, but biochemical analysis did not show its binding ability.

研究分野：植物生理学

キーワード：青色光受容体 黄色植物 フシナシミドロ 葉緑体光定位運動

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉緑体光定位運動は、古くから記載があり、Gustav Senn(1908)は7つのタイプに分類した。その中で5つは緑色植物の葉緑体光定位運動で、残り2つは黄色植物(photosynthetic stramenopiles)と呼ばれる紅藻を細胞内共生して成立した分類群のものである。緑色植物において、葉緑体光定位運動の作用スペクトルや細胞骨格について詳細に調べられた。多くは青色光にメインピークを持ち(Zurzycki 1980)、シダやコケと一部の接合藻が赤色光領域にも反応があることが報告されている(Yatsushashi et al. 1985, Haupt 1982)。運動を司る細胞骨格は、被子植物やシダ、接合藻ではF-actinを用い、コケではF-actinと微小管を、緑藻では微小管のみを使うこともわかっている(Suetsugu and Wada 2008)。その後シロイヌナズナをモデルとした研究により光受容体やF-actinの動態に関与する因子が単離された。単離された光受容体はフォトトロピン(Phototropin=以下PHOT)で、LOV(Light-Oxygen-Voltage)と呼ばれる青色光受容ドメインを持ちC末端側には信号伝達の役目を果たすSerine/Threonine kinaseを持つ(Huala et al. 1997, Kagawa et al. 2001)。F-actinの制御にはCHUP1(CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1)と呼ばれるアクチンを重合可能なタンパク質が葉緑体外胞膜の存在することが報告された(Oikawa et al. 2003)。また赤色光の反応はファイトクロム(Phytochrome=PHY)もしくはPHYとPHOTのキメラ受容体ネオクロム(Neochrome)の関与が示された(Kawai et al. 2003, Suetsugu et al. 2005)。

一方、Sennに記載されている黄色植物フシナシミドロは、1960年代から作用スペクトルやF-actinによる動態が示された(Fischer-Arnold 1963, Blatt and Briggs 1980)。原形質流動が活発なため、F-actinが細網化して、原形質流動が停止することで、葉緑体が青色光照射域に滞在すると報告された(Blatt and Briggs 1980)。しかし50年以上経過した現在においても葉緑体光定位運動の光受容体の実体は未知のままである。2007年に私たちのグループが黄色植物専用の青色光受容体オーレオクロム(Aureochrome=以下AUREO)を単離した後も(Takahashi et al. 2007, Ishikawa et al. 2009, 高橋ら 2017)、葉緑体光定位運動の解析はほとんど進展はしなかった。AUREOは、N末端側にDNA結合するbZIP(basic leucine zipper)を持ち、C末端側にPHOTと同様に青色光受容ドメインであるLOVを持つ。AUREOは、転写因子として働くため、葉緑体光定位運動のような遺伝子発現を介さない迅速な応答に関与していないことが明らかである。そのため新規の青色怒り受容体が存在していることが示唆されている。

2. 研究の目的

最近、私たちのグループは、フシナシミドロのトランスクリプトーム解析によって、AUREOとは別の青色光受容体様のタンパク質を発見した。この新奇青色光受容体は、N末端から3つの機能ドメインと5つのLOVで構成されており、葉緑体光定位運動のメインスイッチであると考えられる。この青色光受容体は、新奇の構造であり、Sennが記載した葉緑体光定位運動の全貌が明らかになる可能性がある。またドメインが複数あることやLOVが5つあることは、構造科学的にも興味深い。本研究では、この新奇LOV受容体が葉緑体光定位運動のメインスイッチと考え、黄色植物の葉緑体光定位運動の全貌を解明することと緑色植物の葉緑体光定位運動と比較し、進化的考察を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

三つの項目の詳細な解析を行い、黄色植物の葉緑体光定位運動の全貌を明らかにする。

1. 葉緑体光定位運動の生理学的解析

1-1 葉緑体光定位運動における各種阻害剤の効果

ミオシンなどのモータータンパク質について、阻害剤等による解析を行う。また信号伝達に関わるN末端各種ドメイン(Rho-GEF, PH, RGS)についても、阻害剤等を用いて詳細に解析を行う。一細胞照射顕微鏡装置を用いて、弱光・強光における集合・逃避反応の解析を行う。

1-2 RNAiの効果

新奇青色光受容体のdsRNAを作製し、顕微注射によって注入し、生理的な反応を解析する。

2. 新規青色光受容体の生化学的解析

2-1 LOVドメインの光受容能の解析

先行研究によって、使用しているベクターや大腸菌を組み合わせ、光受容能を確認する。青色光による吸収スペクトルによるLOVの光サイクルを計算し、発色団の特定等を行う。

2-2 RGSドメインのG proteinとの結合解析

RGSは、G α , G β と結合することがシロイヌナズナや動物から報告されており、結合アッセイを行う。またRGSドメインとG β は、選択的スプライシングによって結合型が変わるため、RT-PCR等で調査する。

2-3 PHドメインとactin結合解析

PHドメインは、F-actin との結合が示されている。緑色植物 CHUP1 の F-actin 結合アッセイと同様な解析を行う。

3、基本構成要素の探索

3-1 G protein 信号伝達系と細胞骨格系の解析

G protein, Rho-GEF に関与すると考えられる PKC や IP3 などの構成要素について調査し、real time PCR または光条件ごとのトランスクリプトーム解析を行う。

3-2 細胞骨格および重合に関与するタンパク質の解析

緑色植物で報告されているものも含め、アクチン重合に関与する formin や ARP2/3(actin related protein)、WASP/WAVE(Wiskott-Aldrich syndrome protein)等調査する。加えてアクチン結合タンパク質も網羅的に解析する。

4 . 研究成果

まず葉緑体光定位の運動に着目して生理学的解析を行った。巨大な管状細胞であるフシナシミド口内で、多数ある葉緑体が単色光下でどのように動いているか詳細な観察を行った。背景光として青、緑、赤の波長を用い、運動の様子をタイムラプス撮影し、その速度と運動方向を特定した。その結果、教科書的では一方向で多条型の動きをされると考えられていたが、緑と赤の背景光を用いた場合、葉緑体は細胞長軸に対して、平行方向に動いているが、その動きは単純な一方向性の運動を示さず、往復運動をしている様子が観察された。一方、背景光に青色を使った場合、葉緑体の集合運動と同様にその場に留まっている様子が確認された。次に阻害剤の効果について解析を行った。ミオシンの阻害剤を用いると、原形質流動が停止し、葉緑体の運動が止まった。しかし、ミオシン阻害剤添加状態で局所的に青色光を照射すると、光定位運動が観察された。照射光の強度を変化させると、弱光での集合反応と強光での逃避反応がともに観察されることがわかった。信号伝達系の阻害剤を用いると、葉緑体の運動が停止した（原形質流動）。その後、マイクロビーム顕微鏡を使って葉緑体光定位運動を誘導すると集合・逃避運動ともに観察された。フシナシミド口の葉緑体光定位運動は、動物が保持する信号伝達系を用いている可能性が示唆された。

フシナシミド口の葉緑体光定位運動は、ミオシン依存の原形質流動とは別のアクチン経路で運動していることがわかった。またアクチン抗体による細胞内アクチンの可視化を行うと、細胞長軸に対して平行方向に配向していることがわかった。加えて、蛍光ファロイジンでの染色によって、葉緑体を囲むようにアクチンが局在していることも観察された。

次にトランスクリプトームで得られた新奇青色光受容体の生化学的解析（大腸菌や昆虫細胞による異種発現）を行った。遺伝子全長でのタンパク質発現を行ったが、タンパク質の発現はできているものの、発色団が結合している様子は見られなかった。そのため、アミノ酸による LOV タンパク質の系統解析を行った。その結果、既存の LOV 受容体の外群に局在することがわかった。フラビンに結合するアミノ酸はアラインメントの結果からすべて保存されていたものの、外群に位置していることは非常に興味深いことであった。

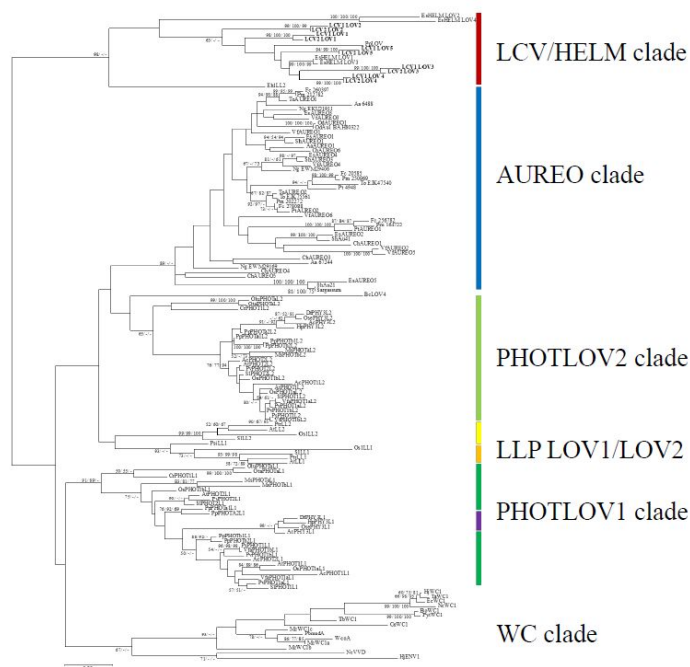


図1 新奇LOV光受容体の系統解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Y Hara, Y Otake, S Akita, T Yamazaki, F Takahashi, S Yoshikawa, S Shimada	4. 巻 70
2. 論文標題 Gene expression of a canopy-forming kelp, <i>Eisenia bicyclis</i> (Laminariales, Phaeophyceae), under high temperature stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 203-211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto K, Hamaji T, Kawai-Toyooka H, Matsuzaki R, Takahashi F, Nishimura Y, Kawachi M, Noguchi H, Minakuchi Y, Umen JG, Toyoda A, Nozaki H	4. 巻 118
2. 論文標題 Three genomes in the algal genus <i>Volvox</i> reveal the fate of a haploid sex-determining region after a transition to homothallism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 e2100712118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2100712118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto C, Takahashi F, Ooe Y, Shirahata H, Shibata A, Kasahara M	4. 巻 11
2. 論文標題 Distribution of adenylyl cyclase/cAMP phosphodiesterase gene, CAPE, in streptophytes reproducing via motile sperm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Repo	6. 最初と最後の頁 10054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89539-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shibata A, Takahashi F, Imamura N, Kasahara M	4. 巻 69
2. 論文標題 Characteristics of maltose transport system in the endosymbiont <i>Chlorella variabilis</i> of <i>Paramecium bursaria</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phyco Res	6. 最初と最後の頁 219-225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashida Y, Yamamoto C, Takahashi F, Shibata A, Kasahara M	4. 巻 135
2. 論文標題 Characterization of the cAMP phosphodiesterase domain in plant adenylyl cyclase/cAMP phosphodiesterase CAPE from the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Plant Res	6. 最初と最後の頁 137-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-021-01359-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Homma Y, Okuda S, Kasahara M, Takahashi F, Yoshikawa S, Uwai S	4. 巻 642
2. 論文標題 Phenological shifts and genetic differentiation between sympatric populations of <i>Sargassum horneri</i> (Fucales, Phaeophyceae) in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Ecology Progress Series	6. 最初と最後の頁 103-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3354/meps13332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本千愛、高橋文雄、山田和正、吉川伸哉、末次憲之、河内孝之、笠原賢洋
2. 発表標題 ゼニゴケ精子におけるcAMP合成・分解酵素遺伝子の機能
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田あいか、野間泉、松川将之、高橋文雄、笠原賢洋
2. 発表標題 共生藻によるミドリゾウリムシ光運動反応制御
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本千愛、高橋文雄、山田和正、吉川伸哉、末次憲之、河内孝之、笠原賢洋
2. 発表標題 ゼニゴケ cAMP 合成・分解酵素 CAPE は精子の前進遊泳に関する
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋文雄、稲葉隆太、朝田康暉、奥田修二郎、笠原賢洋
2. 発表標題 フシナシミドロにおける葉緑体光定位運動の再解析と新奇光受容体の関与について
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本千愛、高橋文雄、末次憲之、河内孝之、笠原賢洋
2. 発表標題 ゼニゴケ精子の運動性におけるcAMP合成・分解酵素CAPEの機能
3. 学会等名 日本植物学会 第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本千愛、高橋文雄、大江遥介、白畑陽都、柴田あいか、笠原賢洋
2. 発表標題 精子による生殖を行う植物はcAMP合成・分解酵素CAPEをもつ
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	笠原 賢洋 (Kasahara Masahiro) (70361748)	立命館大学・生命科学部・教授 (34315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------