

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21438

研究課題名（和文）海洋メタゲノム解析により単離された新型キメラ光受容体PHYCRYの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of chimeric photoreceptor gene, PHYCRY identified from marine metagenome data

研究代表者

嶋田 勢津子（Shimada, Setsuko）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40432033

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、海洋メタゲノムデータから発見され、ブラシノ藻の *Pycnococcus provasolii* 由来の赤色光受容体フィトクロム（PHY）と青色光受容体クリプトクロム（CRY）の構造を併せ持つ新型キメラ光受容体PHYCRYの遺伝子について分光学的解析を行い、PHY領域、CRY領域それぞれが、橙色光と遠赤色光、青色光を感知することを解明した。さらに、この遺伝子をDualchrome1（DUC1）と名付け、ブラシノ藻での発現解析、植物での相補解析などによる生物的機能解析、ブラシノ藻の全ゲノム配列の決定、光受容体遺伝子の系統解析を行い、機能解明を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果である新型のキメラ光受容体PHYCRYの分光学的性質、生物的機能解明により、赤色光受容体フィトクロムと青色光受容体クリプトクロムの光受容体の進化さらに緑色植物の進化について新知見を得ることが出来た。さらに、将来的に、新型キメラ光受容体の分光学的性質の解明が生物工学的応用につながることや、植物の相補解析結果が農業的な応用につながることを期待できると考えている。*P. provasolii*は様々な深さ、地域に生息していることから、この光受容体は海洋環境で増殖する上で重要な役割を果たしていると考えられる。本成果は今後のCO2固定の研究開発への寄与も期待できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this project, we tried to uncover function of a chimeric photoreceptor gene, PHYCRY composed of a red-light receptor, phytochrome and a blue-light receptor, cryptochrome in a prasinophyte, *Pycnococcus provasolii*. We found the PHYCRY detected both orange/far-red and blue light. Furthermore, we named this gene dualchrome1 (DUC1) and advanced functional analysis of PHYCRY by transcriptome analysis in *P. provasolii*, complement analysis for plant photoreceptors, determination of genome sequence of *P. provasolii* and phylogenetic analysis of photoreceptor genes.

研究分野：植物生理、光情報伝達

キーワード：光受容体 フィトクロム クリプトクロム 藻類 植物 ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

光受容体は、光環境の把握のため多様な進化を遂げてきた。新型の光受容体の発見は、光合成生物の進化的研究に大きなインパクトを与えるだけでなく、農業的や生物工学的な応用が期待される。これまでに、植物のキメラ型光受容体としてはシダのフィトクロムとフォトトロピンのキメラ光受容体 PHY3 が発見されていた(Kawai et al., 2003, Nature)。海洋中では長波長の赤色光はカットされ青色光のみになるため、海洋生物の青色光受容体は独自の進化を遂げていることが予想される。そこで、我々は水中の特殊な光環境に注目し、仙台湾での海洋メタゲノムデータから新規青色光受容体の単離を試みた。その結果、予測結合配列データから赤色光受容体フィトクロム(PHY)と青色光受容体クリプトクロム(CRY)の構造を併せ持つ新型キメラ光受容体 PHYCRY の遺伝子を発見した。我々は藻類トランスクリプトームデータを利用することで、PHYCRY 遺伝子が海洋浮遊性微細藻類であるプラシノ藻 *Pycnococcus provasolii* の遺伝子であることを特定した。さらに、我々は、環境研究所より *P. provasolii* の株を分譲してもらい、研究室で培養し解析を進め、*P. provasolii* のゲノム DNA から PHYCRY 遺伝子の全長を単離、RT-PCR により PHYCRY 融合遺伝子の転写を確認した。そこで、PHYCRY 遺伝子の特徴、分布、機能を知ることができれば、赤色光受容体フィトクロムと青色光受容体クリプトクロムの進化、さらに緑色生物の進化について新知見を得ることが出来ると考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本課題では、新型キメラ光受容体 PHYCRY の遺伝子について解析することで、赤色光受容体フィトクロムと青色光受容体クリプトクロムの進化について新知見を得ることができると考え、(1) 分光学的性質の解析、(2) 生物学的機能の解析(プラシノ藻、植物での相補解析)、(3) プラシノ藻の全ゲノム配列の決定、光受容体遺伝子の系統解析を行い、新型キメラ光受容体 PHYCRY の機能を明らかにすることを目的とした。

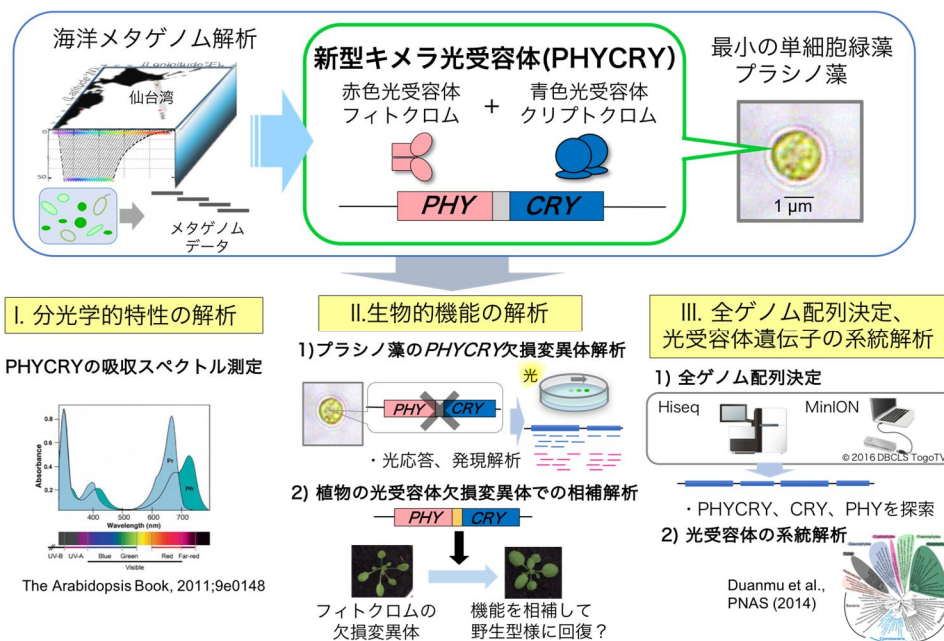


図 1. 本課題の概要

## 3. 研究の方法

### (1) 分光学的特性の解析

PHYCRY がどの波長の光を吸収しているのかを明らかにするため、PHY、CRY 部分のみのタンパク質を発色団と共に大腸菌で発現させ、吸収スペクトル測定を行った。PHYCRY の吸収波長を明らかにすることにより、PHYCRY の活性化に PHY 部分、CRY 部分がどのように関わっているか、どのタイプに属するかを解析した。

### (2) 生物学的機能の解析

#### プラシノ藻の PHYCRY 欠損変異体の解析

プラシノ藻での PHYCRY の役割を明らかにするため、近縁種で成功例のある相同組換え法、ゲノム編集法で PHYCRY 遺伝子の欠損変異体の作成を試みた。欠損変異体作成後に野生型と比較するため、プラシノ藻に忌避反応や増殖速度の変化など光に応答する形態があるかを観察し

た。さらに、光に応答して遺伝子レベルでどのような応答がみられるかを明らかにするため、単色光（暗所、遠赤、赤、橙、青）の照射後の遺伝子発現の変化を RNA-Seq 法で解析した。光受容体遺伝子、光誘導遺伝子、光情報伝達関連遺伝子などの発現変化に注目し解析を行った。

#### 植物の光受容体欠損変異体での機能相補解析

進化的な保存性を明らかにするため、光受容体欠損変異体が存在する種子植物のシロイヌナズナを用いて、PHYCRY が植物のフィトクロムとクリプトクロムの機能を相補できるかを解析した。PHYCRY の導入により、光受容体欠損変異体でみられる特徴的な芽生えの形態が相補され野生型様に戻るかを検証した。

さらに相補解析に加えて、シロイヌナズナのフィトクロムは光照射により細胞質から核へ移行、クリプトクロムは主に核に局在し、遺伝子の転写制御などに働いていることが報告されており、PHYCRY の生物学的機能の解明のため、細胞内局在の解析を行った。タバコの葉にアグロのインフィルトレーション法で、DUC1 の PHY 部分、CRY 部分、DUC1 全長の C 末に GFP を付加した遺伝子を導入し細胞内局在を観察した。

#### (3) プラシノ藻の全ゲノム配列の決定、光受容体遺伝子の系統解析

PHYCRY を保持するプラシノ藻 *P. provasolii* に PHYCRY 遺伝子以外に PHY や CRY 単体や下流因子が存在しているか、どのような特徴があるかを明らかにするため、MinION のロングリードと MiSeq のショートリードを組み合わせて全ゲノム配列の解読を行った。さらにゲノム情報を RNA-Seq 解析に利用した。

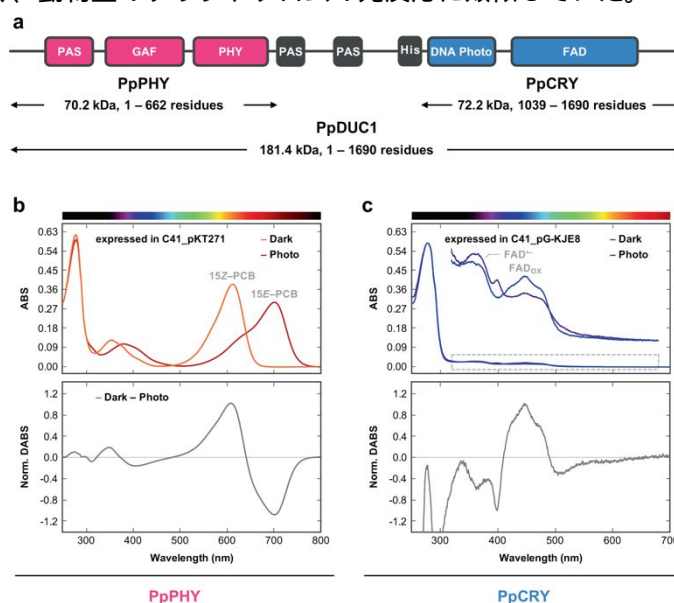
### 4. 研究成果

本課題では、新型キメラ光受容体 PHYCRY の機能を明らかにするため、以下のような研究成果を得ることができた。論文化にともない、PHYCRY 遺伝子について *Dualchrome1 (DUC1)* と名付け解析を進めた。

#### (1) 分光学的特性の解析

DUC1 の分光学的特性の解析については、共同研究者である静岡大学の伏見圭司氏（現在、神戸大学所属）成川礼氏（現在、都立大学所属）により実施された。まず、DUC1 の全長を大腸菌で発現し分光学的解析をすることを試みたが、解析が可能な発現タンパク質を得ることができなかった。そこで、PHY 領域と CRY 領域を分けて大腸菌に発現させ、それぞれの分光学的解析を進めた。

PHY 領域については、コドン最適化することで発現量が増加し、さらに開環テトラピロール色素を供給するプラスミドとの共発現により色素結合タンパク質を単離出来た。PHY 領域は、陸上植物のフィトクロムの赤色光と遠赤色光で可逆的に光変換するという特徴とは異なり、橙色光と遠赤色光で可逆的に光変換するという特徴を示した。こういった特徴は、報告のある他のプラシノ藻由来のフィトクロムの特徴と類似しており、特異な色調節機構の存在が示唆された。一方、CRY 領域については、シャペロンタンパク質と共発現することで、発色団であるフラビンが結合したタンパク質を単離することが出来た。CRY 領域は、FAD を非共有的に結合し、暗状態では青色光を吸収し、青色光照射により紫外光吸収型へと変換した。この特徴については、緑藻や植物ではなく、動物型のクリプトクロムの光反応に類似していた。



Makita et al., 2021, Nature Com.

図 2. DUC1 の分光学的特性の解析



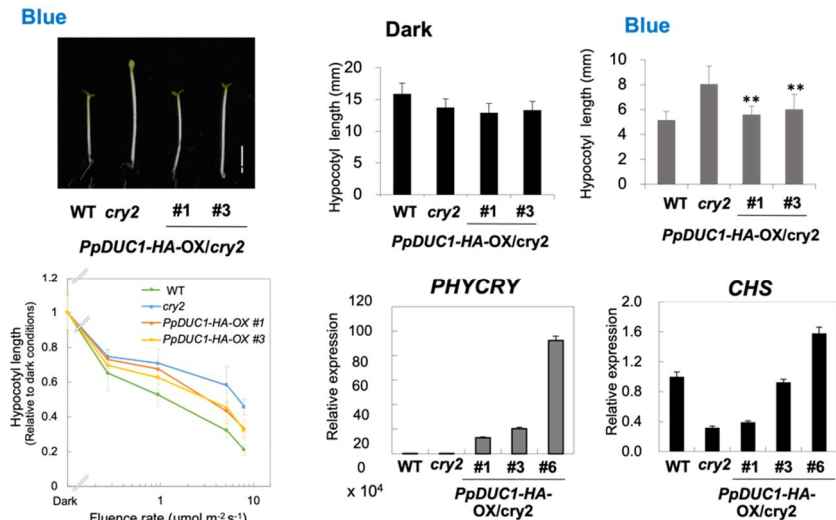
## (2) 生物的機能の解析

### ブラシノ藻の *PHYCRY* 欠損変異体の解析

*P. provasolii* における *DUC1* 欠損変異体の作成のため、まず、近縁種 *Ostreococcus tauri* で成功例のあった相同組換え法を試みた。相同組換えにより *P. provasolii* の *DUC1* の遺伝子部分にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されるコンストラクトを作成し、エレクトロポレーションにより導入を試みたが、抗生物質 G418 耐性株は得られなかった。蛍光物質のレポーターを用いて導入条件を検討したが、*P. provasolii* 自身もつ自家蛍光があり観察による判定が困難だった。プロモーター配列の検討、酵素タンパク質を直接導入するゲノム編集法で *PHYCRY* 遺伝子の欠損変異体の作成を試みたが形質転換株を得ることはできなかった。*P. provasolii* は近縁種と比較して細胞壁が厚くなっていることが報告されており、細胞壁を処理することにより導入ができないかを検討している。またルシフェリンをレポーターとして使用できないかを検討中である。欠損変異体を作成できたら、光照射後の遺伝子発現の変化を RNA-seq 法で解析する予定である。欠損変異体作成後に野生型と比較するため、ブラシノ藻に光に応答する形態があるかを観察した。その結果、忌避反応や単色光による増殖速度の変化などの形態は観察されなかった。また、*P. provasolii* に単色光（暗所、遠赤、赤、橙、青）照射後の遺伝子発現の変化を RNA-Seq 法で解析した。その結果、*DUC1* が吸収する橙色光で誘導される遺伝子群が存在していた。この結果によりブラシノ藻において、橙色光による遺伝子制御があることが示唆された。*P. provasolii* のゲノム中に *PHY* は存在していなかったことから、遺伝子誘導に *DUC1* が関わっている可能性が高いと考えている。

### 植物の光受容体欠損変異体での機能相補解析

相補解析については、シロイヌナズナの光受容体欠損変異体で相補解析を行うために *phyB*、*cry2* 欠損変異体へ HA tag を付加した *DUC1* 全長を導入した形質転換体を作製し、*DUC1* が発現していることを確認した。*cry2* 変異体では胚軸徒長の形態が見られるが、*cry2* 変異体の *DUC1*-HA 形質転換体において胚軸徒長の抑制が観察され、*DUC1*-HA の導入により部分的相補されたことが示唆された。花成遅延の形態に関しては *cry2* 変異体と有意差はみられなかった。*phyB* 変異体への *DUC1*-HA 導入形質転換体は、胚軸徒長の抑制を示さず相補されないことが示唆された。これらのことからシロイヌナズナで *DUC1* は *CRY* の情報伝達経路を使い情報伝達している可能性が高いと予測している。



Makita et al., 2021, *Nature Com.*

図 4. 植物の光受容体欠損変異体での機能相補解析

細胞内局在の解析については、植物のフィトクロムは光照射による局在の変化が報告されており、植物での *DUC1* の細胞内局在について解析を行なった。全長（*PHY-CRY*）、*PHY* 部分、*CRY* 部分にそれぞれ C 末に GFP を融合させたタンパク質をタバコの葉で発現させ、蛍光観察を行なった。その結果、*PHY-CRY*-GFP、*CRY*-GFP は主に核に、*PHY*-GFP に関しては細胞質に局在が観察された。*PHY-CRY*-GFP と *PHY*-GFP のいずれも植物のフィトクロムとは異なり、光照射による局在の変化は観察されなかった。*DUC1* は核局在し、核において情報伝達因子を調節している可能性が考えられた。

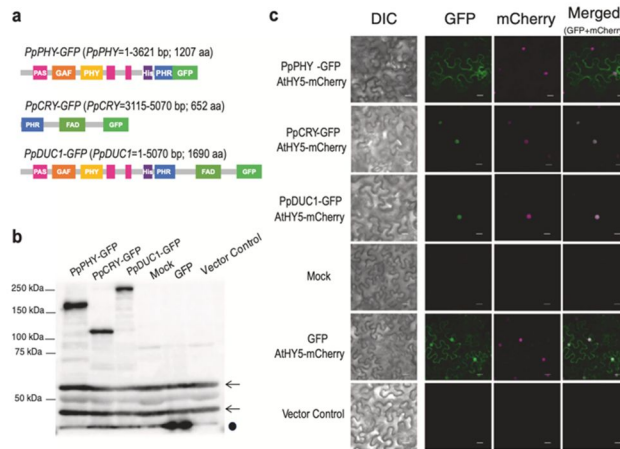


図 5. 植物での細胞内局在解析 Makita et al., 2021, *Nature Com.*

(3) プラシノ藻の全ゲノム配列の決定、光受容体遺伝子の系統解析

*P. provasolii* のゲノム中に PHYCRY 遺伝子の存在を確認し、関連遺伝子を網羅的に解析するために、NIES-2893 株のゲノム配列を決定した。そのゲノムは 23 Mbp であり、11,330 遺伝子がコードされていた。*P. provasolii* は、これまでゲノム配列が読まれていなかったが、今回、初めてゲノム配列が決定された。ゲノム中には PHYCRY 遺伝子の他に、5 つの Cry 遺伝子が存在し、Phy 遺伝子は見つからなかった。それら光受容体遺伝子の系統解析を行ったところ、PHYCRY 遺伝子の CRY 部分は *P. provasolii* の Cry 遺伝子と単系統群を形成し、PHY 部分は近縁種の *Nephroselmis* の Phy 遺伝子と単系統性を示した。このことは PHYCRY 遺伝子が *P. provasolii* の系統において、遺伝子融合によって生じたことを示唆する。

また、*P. provasolii* のゲノム中に光情報伝達因子の相同遺伝子が存在しているのか探索を行い、光情報伝達のポジティブ因子の分解調節を行なっている COP1、ハブ転写因子である HY5 の相同遺伝子は存在しているが、PIF, BIC, SPA などの因子の相同遺伝子は存在しないことが明らかになった。また、DUC1 以外の光受容体遺伝子が存在しているが明らかになった。さらに、*P. provasolii* のゲノム中には、light-harvesting complex (LHC) 遺伝子が重複しており、これらの遺伝子は単色の橙色光と青色光で転写制御され、DUC1 の関与の可能性が考えられる。

本課題では、新型キメラ光受容体 PHYCRY の機能の解析を進め、フィトクロムとクリプトクロムの進化について新知見を得ることができたと考えている。さらに農業的や生物工学的な応用が期待される。*P. provasolii* は様々な深さ、地域に生息していることから、この光受容体は海洋環境で増殖する上で重要な役割を果たしていると考えられる。本成果は今後の CO<sub>2</sub> 固定の研究開発にも寄与することが期待できる。

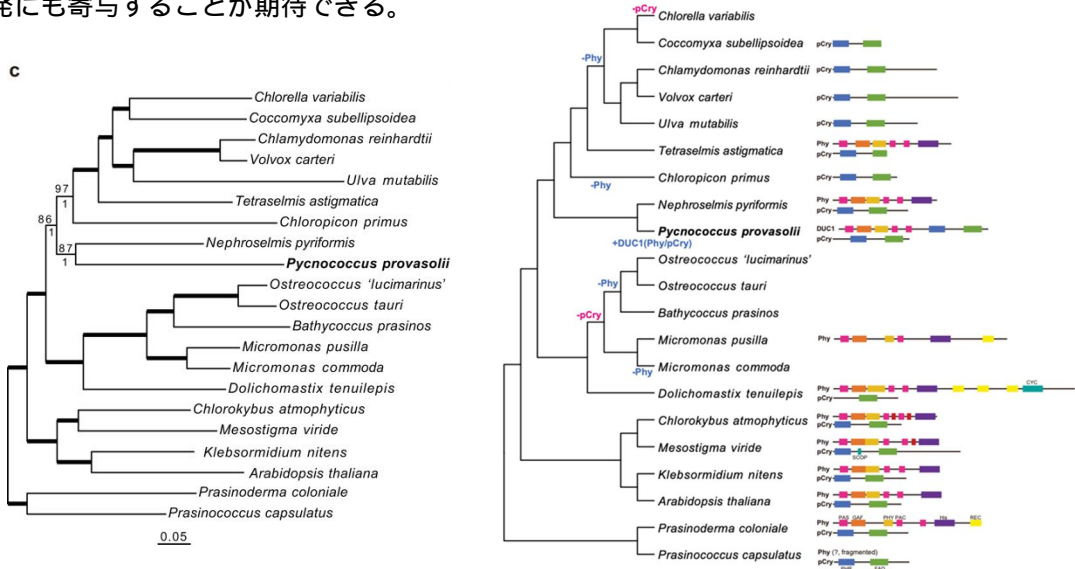


図 6. 全ゲノム配列の決定、光受容体遺伝子の系統解析

Makita et al., 2021, *Nature Com.*

<引用文献>

Makita, Y., Suzuki, S., Fushimi, K., Shimada, S., Suehisa, A., Hirata, M., Kuriyama, T., Kurihara, Y., Hamasaki, H., Okubo-Kurihara, E., Yoshitake, K., Watanabe, T., Sakuta, M., Gojbori, T., Sakami, T., Narikawa, R., Yamaguchi, H., Kawachi, M., & Matsui, M. (2021). Identification of a dual orange/far-red and blue light photoreceptor from an oceanic green picoplankton. *Nature communications*, 12(1), 3593.

Kawai, H., Kanegae, T., Christensen, S., Kiyosue, T., Sato, Y., Imaizumi, T., Kadota, A., & Wada, M. (2003). Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature*, 421(6920), 287–290.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Makita Yuko, Suzuki Shigekatsu, Fushimi Keiji, Shimada Setsuko, Suehisa Aya, Hirata Manami, Kuriyama Tomoko, Kurihara Yukio, Hamasaki Hidefumi, Okubo-Kurihara Emiko, Yoshitake Kazutoshi, Watanabe Tsuyoshi, Sakuta Masaaki, Gojobori Takashi, Sakami Tomoko, Narikawa Rei, Yamaguchi Haruyo, Kawachi Masanobu, Matsui Minami	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of a dual orange/far-red and blue light photoreceptor from an oceanic green picoplankton	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23741-5	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Minami Matsui, Yuko Makita, Shigekatsu Suzuki, Keiji Fushimi, Setsuko Shimada, Haruyo Yamaguchi, Tomoko Sakami, Rei Narikawa, Masanobu Kawachi
2. 発表標題 Characterization of a dual orange/far-red and blue light photoreceptor from an oceanic green picoplankton
3. 学会等名 International Symposium on Plant Photobiology (ISPP 2021)（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成川礼、伏見圭司、蒔田由布子、鈴木重勝、嶋田勢津子、陶久あや、平田愛美、栗山朋子、栗原志夫、濱崎英史、栗原（大窪） 恵美子、吉武和敏、渡辺剛、作田正明、五条堀孝、山口晴代、河地正伸、松井南
2. 発表標題 新規光受容体・Dualchromelは橙色光/遠赤色光と青色光を感知する
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 蒔田由布子、鈴木重勝、伏見圭司、嶋田勢津子、陶久あや、平田愛美、栗山朋子、栗原志夫、濱崎英史、栗原恵美子、吉武和敏、渡辺剛、坂見知子、作田正明、五條堀孝、成川礼、山口晴代、河地正伸、松井南
2. 発表標題 海洋メタゲノムデータからの新規光受容体の発見
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 嶋田勢津子, 蒔田由布子, 鈴木重勝, 伏見圭司, 陶久あや, 平田愛実, 栗山朋子, 栗原志夫, 濱崎英史, 栗原恵美子, 吉武和敏, 渡辺剛, 作田正明, 五條堀 孝, 成川 礼, 山口晴代, 河地正伸, 松井南
2. 発表標題 新規光受容体・Dualchromeの生物的機能解析
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 鈴木重勝, 山口晴代, 河地正伸
2. 発表標題 全ゲノム解析から明らかにする緑色植物初期分岐系統における遊泳細胞の誘導と進化
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会（オンライン東京）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 蒔田由布子, 鈴木重勝, 伏見圭司, 嶋田勢津子, 陶久あや, 栗山朋子, 栗原志夫, 濱崎英史, 平田愛実, 成川礼, 山口晴代, 河地正伸, 松井南
2. 発表標題 海洋メタゲノム配列からの新規光受容体の発見
3. 学会等名 生物多様性のDNA情報学
4. 発表年 2020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	蒔田 由布子  (Makita Yuko)  (80443026)	前橋工科大学・工学部・教授    (22303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 重勝  (Suzuki Shigekatsu)  (10785108)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・特別研究員    (82101)	削除：2021年3月8日

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