

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657025

研究課題名(和文) オーレオクロムが関与する褐藻の光反応の解明

研究課題名(英文) Search for photoresponses in phaeophytes mediated by aureochrome

研究代表者

片岡 博尚 (Kataoka, Hironao)

東北大学・学術資源研究公開センター・協力研究員

研究者番号：30108568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：褐藻のオーレオクロムの標的反応を解明するために、培養が容易で生活環が速く回転する、小型で単純な体制をもつ褐藻を探索した。ハロプテリス、シオミドロ、アミジグサ、およびヤハズグサを約15に保ったPES1培養液で培養し、種々強度、方向から青色光と赤色光で培養した。いずれの褐藻も、青色光では白色光と同じ成長を示したが、赤色光単独では、1 - 2週間で枯死した。青色光に赤色光を1:1で混在させても、成育に青色光単独と有意差はなかった。この結果は生存には青色光が必要不可欠なことを示すが、有性生殖や光形態形成、また、光屈性や背腹性誘導などの光方向依存性反応は発見できなかった。さらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：AUREOCHROME is conserved only in Ochrophytes, including phaeophyta (brown algae) and diatoms. To identify and further analyze target-responses of AUREOCHROME in phaeophytes, I obtained easily cultivable, rapid growing, short-lived marine phaeophytes from KURSIS, Kobe University. Halopteris congesta, Ectocarpus siliculosus, Dictyota dichotoma, and Dictyopteris latiuscula etc. have been cultured in small dishes filled with PES1-medium at ca. 15C under blue- and red monochromatic light (generated by LED) of various intensities and L/D cycles. All of them exhibit normal growth for 3-5 months only under blue- or white light, but died within 1-2 weeks under red light. This indicates that blue light is indispensable to survival and growth but not red light, even though red light penetrates the internal cells and supports photosynthesis. However, blue light did not cause sexual development, photomorphogenetic or phototropic response. Further research is nevertheless required.

研究分野：光生物学、植物生理学

キーワード：オーレオクロム 青色光 褐藻 LED 光形態形成反応

1. 研究開始当初の背景

片岡(本研究代表者)らは2007年に黄緑色藻(Xanthophyta, オクロファイ, あるいは自栄養ストラメノパイル)に属するフシナシミドロ(*Vaucheria frigida*)から新奇の青色光受容体オーレオクロム(AUREOCHROME-1, AUREOCHROME-2)を発見し、分子構造を解明した。オーレオクロムは1個の転写因子bZIPドメインを中央に、バクテリアから陸上植物に普遍的に存在する青色光センサーであるLOVドメイン1個をC末端側に持ち、青色光を吸収することにより、下流の(未知の)標的遺伝子の発現を制御する機能をもった珍しい光受容体であった。フシナシミドロでは青色光照射域での分枝発生や、有性生殖器官の分化を制御していることを解明した。その後、オーレオクロムは、褐藻や、ケイ藻を含むオクロファイトに共通、かつ特異的に保存されていることが分かった。一方、陸上植物を含む緑色植物はフォトロピンというLOV光受容体を持つが、オーレオクロムは持たない。

フシナシミドロは、しかし、オーレオクロムの作用機構を掘り下げて研究するには適していない。なぜなら、フシナシミドロは多核細胞なので、突然変異を利用することはできないし、遺伝子ゲノムも明らかになっていない。一方、褐藻やケイ藻は水域の一次生産、つまり光合成量のほとんどを担っており、地球環境に重要な役割を果たしている。ケイ藻は単細胞生物なので突然変異や遺伝子導入も可能であり、フランスのグループを中心に研究が進められている。一方、褐藻は日本では重要な食用であり、培養法や育種に関する知識が蓄積されているので、研究を進める意義がある。しかし、光で制御される生理反応の解析はほとんど無い。

2. 研究の目的

そこで、本研究の目的は実験室内の小さい容器で培養でき、短い成育期間と単純な体制を

もつ褐藻を見つけだし、オーレオクロムによって制御されている青色光反応を見つけ出すことである。コンブやワカメは巨大なため、室内では育てられない。ホンダワラの生殖器官が短日条件で誘導されるという興味深い実験がYoshikawaらによって成されているが、東北大学植物園のように、海から離れた実験室で、種々の光条件を同時に与えるような研究のためには、直径3-4cmの皿で培養でき、1ヶ月程度で生活環を回せるような材料を探さなければならない。また、ワカメなどの様に体表に粘膜を分泌するようなものも避ける必要がある。オーレオクロムの標的反応としては、青色光によってのみ制御される反応であるべきことは言うまでもないが、単純な成長や老化などの量的反応ではなく、光屈性、背腹性、光形態形成のような質的に反応であるのが望ましい。容易に肉眼で検出できる反応が理想的だが、それは実際に調べるしかない。

3. 研究の方法

材料:

単一藻培養として神戸大学の系統保存施設(KURSIS)で培養保存されている以下の褐藻種を用いた。

ハロプテリス

Halopteria congesta (KU1120)

Halopteria gracilescens (KU1118)

Halopteria filicina (KU1119)

シオミドロ

Ectocarpus siliculosus (KU1372、
KU1371)

アミジグサ

Dictyota dichotoma (KU1070)

ヤハズグサ

Dictyopteris latiuscula (KU1072)

方法:

上記いずれの褐藻種もPES I添加天然海水を入れたプラスチック皿中で温度

10-15、連続明(24L/0D)、長日(14L/10D)、短日(8L/16D)で1-5ヶ月培養した。培養液の蒸発を防ぐため、B5版大の透明プラスチック箱に入れた。培養液は約1ヶ月おきに入れ替えた。

光源にはCCS社のLED光源ISC201-2を2台、あるいは450nmLED、あるいは660nmLEDを45個組み込んだQFC45-100B、あるいはQFC45-100TRを用いて、青色光単独、赤色光単独、青色光:赤色光=1:1とした光を用いた。光強度はLICOR社LI-250Aで測定し、 $40-80 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (BL:RL-1:1の時は総量を等しくして)の範囲で照射した。一方向から照射するときは、皿を並べたB5版大の透明プラスチック箱を水平に近い入射角 80° から照射したので、光源からの距離にしたがって、強度は低下する。

1-数週間ごとに成長や、形態変化を肉眼で観察した。

4. 研究成果:

最初に用いた3種のハロプテリスを培養では*Halopteris congesta*だけが、長期にわたって、安定した成長を示したが、他の二種は早期に滅亡した。光環境や温度のやや大きな変動に耐えられなかったようである。*H. congesta*は赤色光単独では枯死したが、青色光単独では白色光と変わらない成長を維持した。しかし、ハロプテリスは、細胞列が二次元に成長することを理由に研究材料に選んだものの、元来が、他の藻類に着生する藻類であったため、成長に伴い藻体が半球状となり、細胞の形態を観察することは不可能であった。上からの光によっても球状となることから、光屈性もないと思われる。

そこで、これ以上ハロプテリスを対象とすることをあきらめ、新に海産褐藻のシオミドロ(*Ectocarpus*)を入手し、前培養を開始した。入手株は日本の研究者も参加しての国際的プロジェクトによってゲノム情報が解

明され、公開されたと同一の*Ectocarpus siliculosus* (Dilwyn) Lyngbyeの配偶体(KU1372)である。この株には4種のオーレオクロム遺伝子が存在することが明らかになっている。3ヶ月間、14、連続白色光下で育てたシオミドロを細切して、6cmペトリ皿に移し、青と赤の連続光で育てたが、やはり赤色光単独では成長しなかった。

ついで、2台の赤/青光を任意の比率で混合できるLED照明装置(CCS社ISC201-2)を用いて、長日条件(14L-10D)で培養した。青色光単独($40-80 \mu\text{mole/m}^2/\text{s}^1$)と、総光強度を等しくした赤/青混合光{青色光($30-40 \mu\text{mole/m}^2/\text{s}^1$) + 赤色光($40-60 \mu\text{mole/m}^2/\text{s}^1$)}で育てたところ、青色光と赤/青混合光での成長の間に差はほとんどなかった。明暗周期だけを短日(8L-16D)に変えても、両者の成長に差は認められなかった。

培養中に単為生殖をすると聞き、同一株の雌配偶体(KU1371)も入手し、同様の実験を行った。しかし、シオミドロについても今回の実験条件のもとでは、有性生殖の誘導を検出することも、特徴的な形態変化を誘起することもできなかった。

この結果は、海中では光は散乱しており、海水面の波により、絶えず揺らいでいるので、これら褐藻は光方向の感受が未発達なことを示しているのかもしれない。また、もう一つの可能性としては、複雑な光感受機構を持たない単純な体制を持つ褐藻を用いたため、顕著な青色光依存光形態形成反応を見つけられなかったのかもしれない。

そこで、やや大型で2叉分岐する葉状体として成長するアミジグサ(*Dictyota dichotoma*, KU1070)、およびヤハズグサ(*Dictyopteris latiuscula*, KU1072)を入手して、培養実験を開始した。自然界で

は、これらは直径 10 cm 以上に育つが、系統保存株は入手時にすでに、矮小化しており、特に、ヤハズグサは、葉状体が 1mm にも満たず、当実験には不適であることが明白であった。アミジグサでは実は、2008-2009 年当時の大学院生石川美恵と共同研究者高橋文雄が、類似の光反応の研究を行っており、葉状体の側壁からの分岐発生に青色光が有効との結果を得ている。また、ここで記述することはできないが、赤色光にも、暗黒とは異なる、ある興味深い作用を認めている（石川博士論文、詳しくは未発表）。したがって、それらの知見を追試によって再確認すべく、アミジグサの実験を開始したのである。しかし、この研究は 2015 年 4 月現在未完成であるため、ここで、結果を報告することはできない。

<引用文献>

Ishikawa, M., Takahashi, F., Nozaki, H., Nagasato, C., Motomura, T., Kataoka, H. 2009, Distribution and phylogeny of the blue-light receptors aureochromes in eukaryotes. *Planta* 230: 543-552.

Huisman, M. J. J. et al. 2013, AUREOCHROME1a-mediated Induction of the diatom-specific cyclin *dsCYC2* controls the onset of cell division in diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*). *Plant Cell* 25:215-228

Yoshikawa, S. et al. 2014, Photoperiodic regulation of receptacle induction in *Sargassum horneri* (Phaeophyceae) using clonal thalli. *Phycological Research* 62: 206-213

Cock, JM. et al. 2010, The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465: 617-621

Ishikawa, M. 2011, Evolutional and

physiological analysis of the blue light receptor of photosynthetic stramenopiles. Dissertation to Tohoku University.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Kataoka, H. Gustav Senn (1875 - 1945): The pioneer of chloroplast movement research. *Journal of Integrative Plant Biology*, 査読有、Vol. 57, 2015, pp. 4-13.

Hisatomi, H., Nakatani, Y., Takeuchi, K., Takahashi, F., Kataoka, H. Blue light-induced dimerization of monomeric aureochrome-1 enhances its affinity for the target sequence. *J Biol. Chem.*, 査読有、Vol. 289, 2014, pp.17379-17391.

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 Physiol.*, 査読有、Vol. 54. 2013, pp. 93-106.

Ishikawa, M., Kataoka, H., Takahashi, F. Analysis of light-dependent cell morphology and an accumulation response in *Ochromonas danica*. *Cytologia* 査読有、Vol. 77, 2012, pp. 465-473.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 2 件)

片岡博尚 光と藻類の生活史 In 光生物学事典. 飯野盛利編 朝倉書店、2015、(印刷中)

片岡博尚 グスタフ・ゼン著 葉緑体
の変形と転位運動 . {Senn (1908) Die
Gestalts- und Lageveränderung der
Pflanzen- Chromatophoren. Engelmann,
Leipzig.} 東北大学出版会、2015、
450 ISBN978-4-86163-255-6 C3045

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片岡 博尚 (KATAOKA,Hironao)

東北大学学術資源研究公開センター・植
物園・協力研究員

研究者番号 : 30108568