

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440156

研究課題名(和文) 褐藻の青色光応答反応の解析

研究課題名(英文) Analysis of photomorphogenesis in brown algae

研究代表者

高橋 文雄 (Takahashi, Fumio)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：60332318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：オーレオクロムは黄色植物専用の青色光受容体である。黄色植物は珪藻、褐藻や赤潮を形成するラフィド藻など多様な生物群が含まれており、青色光によって形態形成や運動反応を誘導されることが報告されている。本研究では、褐藻に着目し、オーレオクロム依存的な生理応答と遺伝子情報取得を主な課題として行った。2種の褐藻類において、青色光依存的な葉状体形成や生活環の変化が起こることがわかった。またトランスクリプトーム解析を行った結果、多数のオーレオクロムホモログが存在し、三つのグループに分かれることやオーレオクロムの発現に関しては、オーソログ間で差が見られた。下流の遺伝子群についても単色光による発現差がみられた。

研究成果の概要(英文)：Aureochrome is a blue-light receptor possessed only in photosynthetic stramenopiles. They contain diverse algae, such as diatoms, brown algae and red tide algae, and it has been reported that photomorphogenesis and photomovement are induced by blue light. In the present, we focused on aureochrome-dependent physiological responses and acquisition of transcript information by new generation sequencing in brown algae. In the two brown algae, blue-light-dependent the thallus formation and transition to sexual phase were observed. As a result of transcriptome, we found that brown algae have a number of aureochrome homologs and the homologs are divided into three groups by phylogenetic analysis. When we analyzed the gene expression profiles of aureochromes and other transcripts under various light conditions, differences in the level of expression between orthologs of aureochromes were confirmed. Furthermore, we also found the regulation of expression of some genes under various light.

研究分野：植物生理学

キーワード：オーレオクロム 褐藻 青色光受容体

1. 研究開始当初の背景

私たちは2007年に、新奇の転写因子型青色光受容体、オーレオクロム(AUREOCHROME)を発見した。オーレオクロムは、黄色植物しか持たない光受容体であることもわかってきた。その後黄緑藻や珪藻などでの生理実験および生物物理学的解析は進んだ。しかし、他の黄色植物である褐藻や赤潮藻の研究は立ち遅れていた。褐藻を用い、オーレオクロムの機能を類推することが課題である。

2. 研究の目的

オーレオクロムは、褐藻や珪藻を含む黄色植物(独立栄養ストラメノパイル)のみによく保存されているので、黄色植物共通の重要な機能を担っていると推定できる。オーレオクロムは黄色植物フシナシミドロでは青色光誘導分枝形成に関与しているが、褐藻はじめ他の黄色植物での機能は全く未解明である。本研究の目的は、室内実験で培養系を確立した褐藻ヤハズグサとアカモク(*Dictyopteria and Sargassum*)を用いて、どのような光反応がオーレオクロムによって制御されているかを明らかにし、黄色植物共通の標的応答を推定することである。

3. 研究の方法

褐藻ヤハズグサとアカモクを用い、詳細に光生理反応を解析し、オーレオクロム(以下AUREO)の作用を生化学・生理学的に分析し、そして機能解析する。具体的には、(1)ヤハズグサ・アカモクの光による生理現象を網羅的に解析する。(2)光受容体AUREOのオーソログを単離し、生化学的・生物物理学的特性を確認する。(3)形質転換系を作製し、過剰発現およびRNAiによるノックダウンを行いAUREOの光受容体としての機能解析を行う。具体的には以下を予定した。

①褐藻ヤハズグサとアカモクの光応答反応の解析

ヤハズグサとアカモクを用いて、生活環の制御や葉状体の再生の様子を比較解析する。ヤハズグサに関しては生活環の制御が不十分であるためアカモクで成功した暗期における光中断の実験を進める。ある程度の光応答反応は観察されているが、生活環の制御(アカモク)や葉の再生(ヤハズグサ)で見られた光応答反応が同一の光受容体(AUREO)を起点とする光形態形成の結果であるか否かについては、十分な検証が出来ていない。光応答反応についてLED光源を用いた詳細な定量的な解析(波長依存性・光強度依存性)を行うことにより両材料の光応答反応に関わる光受容体の生理的な特性を解明する。

②ヤハズグサとアカモクAUREOの単離

研究の目標で述べたとおり、この2種は褐藻が持つ粘性物質が比較的少なく、分子生物

学に向いている材料として選定している。これまでアカモクと同日ヒバマタのAUREOのほぼ全長を単離してきたが、完全長には至っていない。RT-PCR法によって、全長の単離を行う。複数のAUREOオーソログに関しては、さらにmRNAの大量取得法を確立させ、次世代シーケンスを行う。

③ヤハズグサとアカモクの次世代シーケンス解析

mRNAの大量単離法を確立後、取得したmRNAを用いて、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行う。アセンブル、アノテーション等には、然るべき研究者と共同で行う。すべての遺伝子が完全長で得られないことも理解している。そこで得られたトランスクリプトームデータとRT-PCRの複合法で他のオーソログも単離する。

④AUREOオーソログの分光学的解析

得られたヤハズグサとアカモクのAUREOタンパク質を大腸菌発現系を用いて合成し、分光学的解析等を行う。AUREOは光受容体であるがbZIPをN末端に持つ転写因子である。ゲルシフト法などを用いて、DNA結合配列(シス配列)のオーソログ間での差異や光依存的なDNA結合能力も確認する。

⑤褐藻類形質転換系に作製への取り組み

私たちは、黄色植物に属するフシナシミドロを用いて、顕微注射によるRNAi法を使って行ってきたが、褐藻類では試みてはいない。珪藻を用いたRNAi法が海外のグループから報告され、また形質転換法に関しても、エレクトロポレーション法によりGFP等の発現が報告されているので、様々な方法を試行する。

4. 研究成果

黄色植物に保存されている転写因子型光受容体AUREOは、黄緑藻フシナシミドロの青色光誘導分枝形成、また珪藻においては細胞分裂に関与しているが、褐藻含む他の黄色植物での機能は全く未解明である。本研究では、培養系を確立している褐藻を用いて、どのような青色光反応がAUREOによって制御されているか明らかにすることを目的とした。

研究で使用した褐藻2種ヤハズグサとアカモクの核酸単離法の開発と光依存的な生理実験を主に行った。褐藻類は特有の多糖が含まれているが複合的に核酸単離法を工夫することによってDNA、RNAの単離・大量取得が可能になった。特にアカモクに関しては4種の光条件下でのmRNAを単離し、次世代シーケンスを用いたトランスクリプトームが終了し、共同研究者によりデータベースの構築を終えた。トランスクリプトーム解析を行った結果、AUREO遺伝子がみつきり、オーソログの数は6つであった。他の黄色植物に属するフシナシミドロや珪藻と同様な遺伝子数であり、系統解析を行うと、3つの

グループに分かれることもわかった。また様々な光条件による AUREO 遺伝子の発現レベルを調査した結果、オーソログ間において暗期・明期で発現差が見られることもわかった。アセンブル・アノテーションを行った他の遺伝子について real time PCR を用い発現量解析を詳細に行った (投稿準備中)。

一方、アカモクとヤハズグサの光応答反応について生理学的解析を行っており、波長依存的な現象が見いだしている。生理現象に関しては、褐藻 2 種ともに成長が遅く、生理実験の再現性をとることに労力を注いだ。光依存的なアカモクの有性生殖とヤハズグサの再生実験は再現性が得られた。さらに詳細な生理実験を行った結果、植物ホルモン・オーキシンの輸送阻害剤が、青色光で誘導される葉状体形成を阻害した。また、葉状体形成時に必須な核分裂の日周期性を観察すると、明期開始直前に核分裂頻度が高まっていた。AUREO が間接的にオーキシシンに作用し、核分裂を誘導し、葉状体形成を促していると考えられた。

AUREO は遺伝子の上流のプロモーター領域に結合し、遺伝子の発現を調節していると考えられる。そこで遺伝子の上流配列情報を得るためにゲノム解析も同時に行ったが、DNA 結合 (シス) 配列を特定するようなデータは得られなかった。また褐藻の生化学的な解析に関しては GC コンテンツが高く、大腸菌を用いたタンパク質発現等では、芳しい結果が得られなかった。コドンユセージを変換したものを構築し、現在調査中である。

期間を通して、分子生物学的・細胞生物学的な課題は、達成できたが、生化学的や分子遺伝学的な研究に関して、解決しなくてはならない問題が残った。これらの問題が解決されれば、今後の褐藻研究または藻類の光生物学的研究の発展につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

(1)高橋文雄, 位田 康熙, 笠原賢洋
二次共生藻類から発見された青色光受容体
オーレオクロムとその機能. Bull. Plankton
Soc. Japan 64:72-76 (2017) 査読有

(2)Kasahara M, Suetsugu N, Urano Y, Yamamoto
C, Ohmori M, Takada Y, Okuda S, Nishiyama T,
Sakayama H, Kohchi, Takahashi F. An adenyl
cyclase with a phosphodiesterase domain in basal
plants with a motile sperm system. Sci Rep
6:39232 (2016) 査読有
DOI: 10.1038/srep39232.

(3)Shibata A, Takahashi F, Kasahara M, Imamura
N. Induction of maltose release by light in the
endosymbiont *Chlorella variabilis* of
Paramecium bursaria. Protist 167:468-478
(2016) 査読有
DOI: 10.1016/j.protis.2016.08.007.

(4)Takahashi F. Blue-light-regulated transcription
factor, Aureochrome, in photosynthetic
stramenopiles. J Plant Res 129: 189-197 (2016)
査読有

DOI: 10.1007/s10265-016-0784-5

(5)Nozaki H, Matsuzaki R, Yamamoto K,
Kawachi M, Takahashi F. Delineating a new
heterothallic species of *Volvox* (volvocaceae,
chlorophyceae) using new strains of "*Volvox*
africanus". PLOS One 10(11): e0142632. (2015)
査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0142632.

(6)Kimura K, Okuda S, Nakayama K, Shikata T,
Takahashi F, Yamaguchi H, Sakamoto S,
Yamaguchi M, Tomaru Y. RNA sequencing
revealed numerous polyketide synthase genes in
the harmful dinoflagellate *Karenia mikimotoi*.
PLOS One 10(11): e0142731 (2015) 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0142731.

(7)Amagai A, Takahashi F, Usui T, Abe T, Maeda
Y. Induction of macrocyst wall formation by
ZYG1 in *Dictyostelium discoideum*. Research J
of Develop Biol 1: Article 2 ISSN 2055-4796
(2014) 査読有

DOI : <http://dx.doi.org/10.7243/2055-4796-1-2>

(8)Takahashi S, Teranishi M, Izumi M, Takahashi
M, Takahashi F, Hidema J. Transport of rice
cyclobutane pyrimidine dimer photolyase into
mitochondria relies on a targeting sequence
located in its C-terminal internal region. Plant J
79:951-963 (2014) 査読有

DOI: 10.1111/tpj.12598.

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

DOI: 10.1074/jbc.M114.554618.

(10)Yang Y, Matsuzaki M, Takahashi F, Qu L,
Nozaki H. Phylogenomic analysis of "Red"
genes from two divergent species of the "Green"
secondary phototrophs, the chlorarachniophytes,
suggests multiple horizontal gene transfers from
the red lineage before the divergence of extant
chlorarachniophytes. PLOS One 9(6): e101158
(2014) 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0101158

[学会発表] (計 14 件)

(1) 吉川伸哉, 細川真美, 上井進也, 奥田修
二郎, 笠原賢洋, 高橋文雄. 褐藻類アカモク
の成熟に関する分子生物学的研究
平成 28 年度日本水産学会中部支部大会, 福
井, 福井県立大学小浜キャンパス. 2016. 12. 3

(2) 吉川伸哉, 細川真美, 上井進也, 奥田修
二郎, 笠原賢洋, 高橋文雄. 褐藻アカモクの
生殖器官形成に関わる分子機構の解明. 日本
植物学会第 80 回大会, 沖縄, 沖縄コンベン
ションセンター. 2016. 9. 16

(3) 高橋文雄、東出真衣、内田貴之、下村麻瑞、笠原賢洋. 褐藻ヤハズグサの光形態形成時におけるオーキシン阻害剤の効果. 日本植物学会第 80 回大会、沖縄、沖縄コンベンションセンター. 2016. 9. 16

(4) 吉川伸哉、細川真美、上井進也、奥田修二郎、笠原賢洋、高橋文雄. RNA-seq による褐藻アカモクの青色光受容体の解析. 日本藻類学会第 40 回大会、東京、日本歯科大学. 2016. 3. 19

(5) 野崎久義、井坂奈々子、西郷永希子、山本荷葉子、松崎令、高橋文雄. 日本の湖沼に生育するボルボックス節の 1 種について. 日本植物分類学会第 15 回大会、富山、富山大学. 2016. 3. 8

(6) 野崎久義、松崎令、山本荷葉子、高橋文雄. 琵琶湖産ボルボックス 2 種の形態・生殖・種分類. 日本植物学会第 79 回大会、新潟、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター. 2015. 9. 8

(7) 佐藤真希、谷口晴香、新田拓也、高橋文雄、笠原賢洋. シロイヌナズナ PHOT2 の光サイクルの遅延が生理反応に及ぼす影響の解析. 日本植物学会第 79 回大会、新潟、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター. 2015. 9. 7

(8) 位田康熙、池田美恵、笠原賢洋、高橋文雄. 黄金藻オクロモナス Aureochrome の光依存的な DNA 結合能の解析. 日本植物学会第 79 回大会、新潟、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター. 2015. 9. 7

(9) 佐藤真希、谷口晴香、新田拓也、高橋文雄、笠原賢洋. シロイヌナズナ PHOT2 の LOV ドメインの光サイクルが生理反応へ及ぼす影響の解析. 第 62 回日本生化学会近畿支部例会、滋賀、立命館大学. 2015. 5. 16

(10) 位田康熙、池田美恵、笠原賢洋、高橋文雄. 黄金色藻が持つオーレオクロムの光受容能および DNA 結合能の解析. 第 62 回日本生化学会近畿支部例会、滋賀、立命館大学. 2015. 5. 16

(11) 村上繁晃、新田拓也、高橋文雄、佐藤雅彦、笠原賢洋. ヒメツリガネゴケ VOZ の機能解析. 日本植物生理学会第 56 回大会、東京、東京農業大学. 2015. 3.17

(12) Yamamoto S, Yamamoto K, Nakai Y, Takahashi E, Kasahara M. Light-dependent chloroplast localization in phot-overexpressing protoplasts of *Physcomitrella* and *Arabidopsis*. Marchantia Workshop 2014 in Hyogo. Kobe University. 2014. 12. 8

(13) Nakamura Y, Fujii Y, Takahashi E, Kasahara M. Photochemical properties of LOV domains of phototropins from *Physcomitrella patens*. Marchantia Workshop in Hyogo. Kobe University. 2014. 12. 8

(14) Takahashi E, Okuda S, Kasahara M. Transcriptome changes for *Vaucheria frigida* in response to various light conditions. 16th International Congress on Photobiology in Cordoba, Argentina. 2014. 9. 8

〔図書〕(計 1 件)

(1) 高橋文雄 朝倉書店 「光と生命の事典」光の情報利用光環境応答章分担 “オーレオクロム” (2016) pp. 156-157 (442 pp.) 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://research-db.ritsumei.ac.jp/Profiles/103/0010297/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋文雄 (TAKAHASHI, Fumio)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：60332318

(2) 研究分担者

吉川伸哉 (YOSHIKAWA, Shinya)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：20405070

(3) 連携研究者

笠原賢洋 (KASAHARA, Masahiro)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70361748