

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650093

研究課題名(和文) 走光性符号を指標にした緑藻クラミドモナス新奇光合成変異株の単離と解析

研究課題名(英文) Isolation of novel-type photosynthesis mutants of Chlamydomonas by phototaxis-based screening

研究代表者

若林 憲一 (Wakabayashi, Ken-ichi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：80420248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：遊泳する光合成微生物にとって、適切な光環境に移動することは重要な生存戦略である。以前我々は、このような「光合成を行う生物の光行動」の研究に適した単細胞緑藻クラミドモナスを用いて、細胞内が酸化になると正、還元になると負の走光性を示すことを見出した。細胞内の酸化還元状態は光合成活性によって大きく変化する。そこで我々は、走光性の正負のスイッチングが異常な新しい変異株を単離・解析すれば、従来の光合成研究で得られない光合成に関する知見が得られると考えた。我々は3種の新たな変異株を単離し、うち1つが高い光合成活性をもつことを見出した。

研究成果の概要(英文)：For phototrophic microorganisms, it is important to inhabit under suitable light environment for phototaxis. Previously, we found that *Chlamydomonas reinhardtii*, a model organism to study photo-behavioral responses, shows positive phototaxis when cell is oxidized, and negative phototaxis when it is reduced. We came up with the idea to use this phenomenon as a new criterion for screening of novel-type photosynthesis mutants. In this research, we isolated three types of phototaxis-sign mutants, and one of them shows significantly high photosynthetic activity.

研究分野：細胞運動

キーワード：走光性 光合成 レドックス 鞭毛

## 1. 研究開始当初の背景

光合成微生物にとって、光合成のために適した光環境に移動することは重要な生存戦略である。我々は長年淡水性単細胞緑藻クラミドモナスを用いて、緑藻の鞭毛運動調節機構を研究してきた。クラミドモナスは、鞭毛、光合成、そして光行動の分野でそれぞれ重要なモデル生物として分野を牽引している。

我々は研究の過程で、鞭毛運動の原動力を生むモータータンパク質ダイニンの活性が細胞内のレドックス（酸化還元）状態で調節されることを見出した(Wakabayashi and King, 2006 J Cell Biol)。細胞内レドックス状態は光合成活性によって大きく変化する。さらにその研究を発展させ、クラミドモナスの走光性の符号（光源に向かう正の走光性か、光源から逃げる負の走光性か）が細胞内レドックス状態変化に応じて切り替わることを見出した(Wakabayashi et al., 2011 PNAS; 図1)。クラミドモナスは、細胞のレドックス恒常性維持のために、自ら泳ぐことで受ける光の強さを変え、光合成活性を調節している可能性がある。



図1：クラミドモナス培養液をディッシュにいれ、右から光を当てた。上段は正の走光性を示しやすい野生株の1種。下段は強い負の走光性を示す変異株 *agg1* である。左の薬剤なしの条件ではそれぞれ正・負の走光性を示すが、真ん中の酸化処理ではともに正、右の抗酸化処理ではともに負の走光性を示す。

この成果に着想を得て、クラミドモナスの走光性変異株の中には、鞭毛運動や光受容の異常が原因であるもの以外に、「細胞内レドックス状態に影響を与える光合成電子伝達」に異常のある株が存在する可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

クラミドモナス走光性符号変異株のうち、運動性および光受容能に異常のないものを大規模にスクリーニングするという新たなアプローチで、光合成電子伝達経路を中心とする「細胞内レドックス状態に影響を与える新しい因子」を同定する。

## 3. 研究の方法

クラミドモナス野生株に対し、紫外線照射もしくは抗生物質耐性遺伝子挿入の2通りの方法でランダムに変異を導入する。得られた変異株ライブラリに対して、活性酸素薬剤を加えて細胞内を酸化的にする、あるいは活性酸素消去剤を加えて細胞内を還元的にする。それぞれ野生株では正、負の走光性を誘導するが、そのようにならない変異株を単離する。

その後、PCR多型を用いた遺伝子マッピングや次世代シーケンスを用いた全ゲノム解析によって変異遺伝子を同定する。

## 4. 研究成果

大きく2つのパターンの変異株を得ることができた。1つは「活性酸素消去剤を加えても正の走光性を示す」タイプ。もう1つがその逆で「活性酸素を加えても負の走光性を示す」タイプである(図2)。前者は2種、後者は1種が得られた。実験の過程では、他にも「運動性があるにも関わらず全く走光性を示さない」タイプや「常に野生型と逆の符号を示す」タイプのミュータントが得られたが、これらは他のプロジェクトに寄与する可能性のほうが高かったため、本研究計画にお

いてはそれ以上の追求はしなかった。

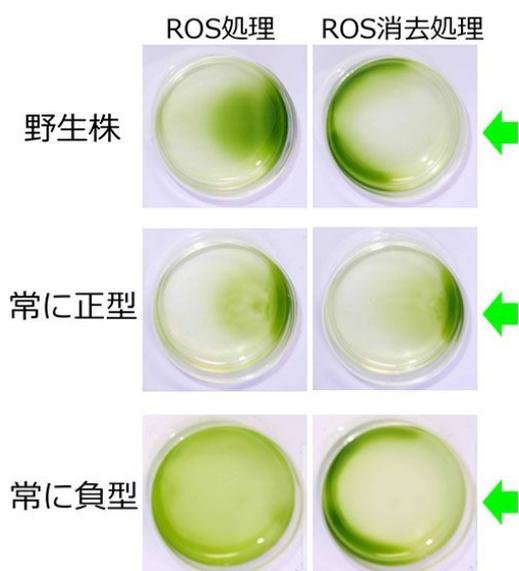


図 2 : 新たに単離した走光性ミュータント。左は活性酸素(ROS)添加群、右が ROS 消去剤の添加群である。野生株はそれぞれ正、負の走光性を示すが、2 段目の株はどちらも正、3 段目の株はどちらも負の走光性を示した。

合計 3 株についてすべて次世代シーケンスによる全ゲノムの解析を行った。野生株ゲノムとの比較により、それぞれに原因遺伝子候補のリストを作成することができたが、期間内に同定には至らなかった。今後、レスキュー実験によって解明する。

この 3 株は、それぞれ光合成活性が野生株と異なった。とくに「常に正」型の 1 つは、酸素発生効率が非常に高かった。この結果は、走光性ミュータントを単離することによって確かに光合成ミュータントが得られることを示唆するものである。この手法が、従来の光合成研究におけるスクリーニング手法では得られない新しいタイプの光合成ミュータントを得ることにつながると期待して、現在さらなる光合成表現型の解析を進めてい

る。

今回の挑戦的な研究計画へのサポートをいただき、以上のような成果を得ることができた。心から御礼申し上げます。

## 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 )

1.

Ide, T., Mochiji, S., Ueki, N., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Hirono, M., Wakabayashi, K. (2016) ( 査読あり )

Identification of the *agg1* mutation responsible for negative phototaxis in a "wild-type" strain of *Chlamydomonas reinhardtii*  
*Biochemistry and Biophysics Reports* 7:379-385  
doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.07.016

2.

Ueki, N., Ide, T., Mochiji, S., Kobayashi, Y., Tokutsu, R., Ohnishi, N., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Tanaka, K., Minagawa, J., Hisabori, T., Hirono, M., Wakabayashi, K. (2016) ( 査読あり )

Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in *Chlamydomonas reinhardtii*  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:5299-304  
doi: 10.1073/pnas.1525538113

( 東京工業大学、法政大学、基礎生物学研究所より合同プレスリリース、科学新聞 4 面に記事掲載。米国光学ポータルサイト *Azo Optics* に記事掲載。平成 28 年度東京工業大学手島精一記念研究賞 ( 研究論文賞 ) 受賞論文。)

3.

Wakabayashi, K., Kamiya, R. (2015)(査読あり)  
Axonemal motility in Chlamydomonas  
*Methods in Cell Biology* 127:387-402  
doi: 10.1016/bs.mcb.2014.12.002.

4.

Owa, M., Furuta, A., Usukura, J., Arisaka F.,  
King, S.M., Witman, G.B., Kamiya, R.,  
Wakabayashi, K. (2014) (査読あり)  
Cooperative binding of the outer arm docking  
complex underlies the regular arrangement of  
outer arm dynein in the axoneme  
*Proceedings of the National Academy of Sciences  
of the United States of America* 111:9461-6.  
doi: 10.1073/pnas.1403101111  
(東京工業大学、東京大学より合同プレスリ  
リース、科学新聞1面に記事掲載)

[学会発表](計 35 件)

1.

緑藻クラミドモナスとボルボックスの走光  
性のしくみ  
若林憲一  
第34回エアロアクアバイオメカニズム学会  
定例講演会 2016.3.23 東京工業大学大岡  
山キャンパス西5号館、(東京、目黒区)

2.

緑藻クラミドモナスの走光性メカニズム -  
光受容と鞭毛運動の連関 -  
若林憲一  
日本プランクトン学会春季シンポジウム「光  
環境を巡る植物プランクトンの生理生態学  
的最前線」 2016.3.14 東京大学本郷キャン  
パス 理学部1号館(東京、文京区)

3.

「発生プログラムの時空間制御を担うカル  
シウム振動シグナルの新展開」

"Calcium-dependent photobehavior of the  
unicellular green alga *Chlamydomonas  
reinhardtii*"

若林憲一

第38回日本分子生物学会年会・第88回日  
本生化学会大会合同大会 2015.12.1~4 神戸  
ポートアイランド(兵庫、神戸市)

4.

緑藻クラミドモナスを用いた真核鞭毛の構  
築と運動調節の研究  
若林憲一  
第36回つくば藻類・プロテリストフォーラ  
ム、2015年4月20日、筑波大学(茨城、つ  
くば)

5.

チャンネルロドプシンに依存した緑藻クラミ  
ドモナスの光行動  
若林 憲一  
大阪大学蛋白質研究所セミナー「光運動反  
応・光センサー蛋白質・光遺伝学」～渡辺  
正勝先生追悼記念～  
2015年3月10-11日、大阪大学蛋白質研究所  
本館(大阪、

6.

Sign-Control of Chlamydomonas Phototaxis by  
Redox Poise  
Ken-ichi Wakabayashi  
16th International Congress on Photobiology  
Universidad Nacional de Cordoba, (Cordoba,  
Argentina) Sep.8-12, 2014

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

東工大 久堀・若林研究室

[http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori\\_HomePage/index.html](http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori_HomePage/index.html)

若林憲一 researchmap

[http://researchmap.jp/k\\_wakabayashi/](http://researchmap.jp/k_wakabayashi/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

若林 憲一 (Ken-ichi, Wakabayashi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：80420248

### (2)研究分担者

島袋 勝弥 (Katsuya, Shimabukuro)

宇部工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：70618446

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

久堀 徹 (Toru, Hisabori)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

植木 紀子 (Noriko, Ueki)

東京工業大学・科学技術創成研究院・博士研究員

井手 隆広 (Takahiro, Ide)