

令和元年6月14日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14752

研究課題名(和文) クラミドモナス走光性を指標にした植物レドックス恒常性維持分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for redox homeostasis studied by Chlamydomonas phototaxis

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内には還元的に保たれるレドックス恒常性が機能している。しかし、呼吸活性や光合成活性の変化によって酸化的になったり、過剰に還元的になったりと変化する。我々は、緑藻クラミドモナスの細胞内が酸化的になると正の走光性、過剰に還元的になると負の走光性を示すことを指標にして、走光性と細胞内レドックス状態の関係が崩れているミュータントの単離に成功した。これらの株には光合成活性が低下するという異常があった。残念ながら期間中に原因遺伝子の同定にはいたらなかったが、葉緑体の中で起きている現象が細胞の運動方向を規定するという興味深い現象を見出すことができた。今後原因遺伝子の解明を急ぐ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、葉緑体チラコイド膜で起きている現象(還元力伝達の遅滞)が、細胞全体が示す運動方向の異常につながるという新奇現象を見出したことが大きな意義である。この分子メカニズムを明らかにすることができれば、野外における有用藻類培養の効率化や、有害藻類の駆除などに応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Redox homeostasis maintains the cellular redox (reduction-oxidation) balance moderately reduced. However, changes in respiratory and photosynthetic activities can lead to oxidized- or excessively reduced state. We succeeded in the isolation of a mutant in which the relationship between phototaxis and intracellular redox state is disrupted in the green alga Chlamydomonas; normally, oxidized cells shows positive phototaxis and reduced cells show negative phototaxis. Those mutants show positive phototaxis even when they are reduced. These strains had an abnormality in which photosynthetic activity decreased. Unfortunately, we were not able to identify the causative gene during this period, but we were able to find an interesting phenomenon in which events occurring in chloroplasts define the direction of cell movement. In the future, the ministry will expedite efforts to identify the genes responsible for the disease.

研究分野：細胞運動生理学

キーワード：走光性 レドックス 鞭毛・繊毛 緑藻

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

光合成生物にとって環境の光強度は生存に関わる重要な因子である。刻一刻と変化する光強度に対応するため、植物葉緑体は細胞内で位置を変える光定位運動を行う。一方、鞭毛を使って水中を泳ぐことができる緑藻類は、正または負の走光性を示すことによってもっと広い範囲で自らの受ける光強度を変化させることができる。しかし、この走光性の正と負が切り替わる分子メカニズムは長い間大きな謎とされていた。

しばらく前に申請者らは、光合成や鞭毛運動のモデル生物である緑藻クラミドモナスの細胞内が酸化的だと正の、還元的だと負の走光性を示すことを明らかにした(Wakabayashi and King, J Cell Biol 2006; Wakabayashi et al., 2011 PNAS)。これは藻類の走光性の正負の符号切り替えを完全に人為的に制御した最初の報告である。

この反応の生理的意義を考えると、「レドックス(酸化還元)恒常性」というキーワードにたどり着く。全ての生物は、細胞内の酸化還元(reduction-oxidation, redox)状態を「ほどほどに還元的」に保つ恒常性が働いている。クラミドモナスの上記の行動は、細胞内が酸化的なときにはより光を浴びて細胞内を還元的に、逆に光が強すぎて還元力が余っているときには暗い方へ逃げて細胞内を酸化的にする適応行動だと考えられる。走光性は光合成による「エネルギー獲得」のための適応行動だと考えられてきたが、実は細胞内のレドックス環境を整えるための行動という側面があると申請者は着想した。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究は以下の2つを目的とした。

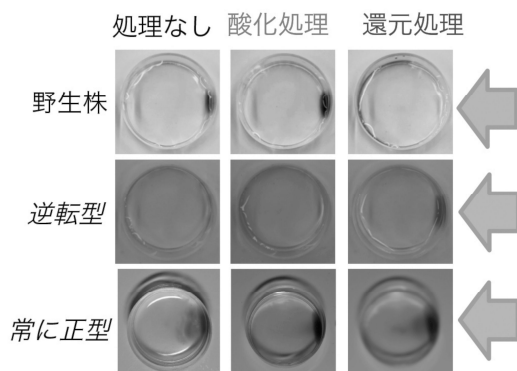
1. クラミドモナスのレドックス恒常性維持に関わる分子群の同定。クラミドモナスの走光性正負切り替えミュータントを新たに単離し、その原因遺伝子を明らかにする。これらは葉緑体や細胞質のレドックス電位センシングや、その情報を鞭毛へ伝えるシグナル因子であると考えられる。

2. 植物に共通したレドックス恒常性維持因子の同定。上記遺伝子群の中で、植物葉緑体の光定位運動に関わるものを探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) クラミドモナスへのランダム変異導入と、走光性符号異常変異株の単離・解析

クラミドモナス野生株に対し、1) UV 照射 2) 薬剤耐性遺伝子挿入 の2つの異なる方法によりランダム変異を導入した。単一コロニーをまとめて培養したのち、膜透過性酸化剤および還元剤で処理し、緑色光の照射後の遊泳方向を確認し、野生株と異なる走光性を示す株を濃縮した(下図)。



表現型が明瞭なクローン株を選別したのち、i) PCR 多型マーカーを用いた遺伝子マッピング(AFLP 法) ii) 次世代シーケンスによる全ゲノム解読を用いて変異箇所の同定を試みた。

#### 4. 研究成果

細胞内が還元的であるにもかかわらず強い正の走光性を示す 2 株を単離することに成功した。これらを便宜的に ap(always positive)1, ap2 株と呼ぶ。

これらの株について、光合成活性を PAM 法により検出したところ、2 株とも効率が顕著に低いことが見出された。具体的には葉緑体チラコイド膜上での電子伝達が非効率になっていることを示唆する結果が得られた。さらに他の表現型を調べたところ、増殖速度が野生型に比べて低いこと、またフラッシュ光を浴びたときに見せる光驚動反応(一時的に遊泳を停止あるいは後退遊泳を行う)が長時間化すること、という 2 つの顕著な表現型が見出された。これらは細胞内活性酸素(ROS)量が増えていることを示唆しており、走光性が正に偏ることとも矛盾しない。つまり、ap1, ap2 株は光合成電子伝達の非効率化により、「詰まった」過剰還元力が酸素に渡され、ROS を過剰に発生している株だと考えることができる。走光性の表現型をきっかけにして、細胞内レドックス状態変化に関わる変異株を得ることができ、この研究計画について一定の成功を収めることができた。

次にこれらの株の原因遺伝子探索を試みた。ap1, ap2 株ともに AFLP 法で変異箇所の染色体を絞ったが、次世代シーケンスの結果、明瞭に 1 アミノ酸置換がみられたのは ap2 株のみであった。ap1 株については、クラミドモナスのデータベースがまだ不完全であるため、その領域に変異が存在している可能性が高い。ap2 株に認められた変異遺伝子がコードしていたのは、機能不明の細胞質局在が予想されるタンパク質であった。しかし、この遺伝子の全長が 6 kb 以上と非常に長いものであった。相補実験を試みたが表現型相補株を得ることはできなかった。これは、全長が長いためにそもそも発現ベクターが正常に核ゲノムに取り込まれていない可能性と、ベクターはとりこまれているがそもそも遺伝子が間違いであるという 2 つの可能性があるが、研究期間内にこの問題を解決するには至らなかった。

総じて、走光性を指標にして細胞内レドックス状態に異常のある株を得るという成果を挙げることができたが、そこから分子レベルの知見を得ることは叶わなかった。今後さらに ap2 株の遺伝子解析を行うこと、さらには他の、変異原因遺伝子が追跡しやすい方法で変異を導入した同様の表現型の変異株を単離することによって、細胞内レドックス恒常性のメカニズムに迫っていけると考えられる。

なお、本研究期間に、副産物として細胞内のレドックス状態の定量化や、近縁藻類の走光性に関する成果を挙げることができた。本研究計画を遂行する中で、クラミドモナスの走光性アッセイを簡便化・定量化する技術を磨き上げることができたことによる成果である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

(すべて査読あり)

1.

Sugiura, K., Nishimaki, Y., Owa, M., Hisabori, T, Wakabayashi, K. (2018)

Assessment of the flagellar redox potential in *Chlamydomonas reinhardtii* using a redox-sensitive fluorescent protein, Oba-Qc.

***Biochemical and Biophysical Research Communications*** 503: 2083-2088

doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.163

2.

Ueki, N., Wakabayashi, K. (2018)

Detergent-Extracted Volvox model exhibits an anterior-posterior gradient in flagellar Ca<sup>2+</sup> sensitivity

***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** 115:E1061-E1068.

doi: 10.1073/pnas.1715489115.

3.

Ueki, N., Wakabayashi, K. (2017)  
Phototaxis assay for *Chlamydomonas reinhardtii*  
**Bio-protocol** 7:e2356.  
doi: 10.21769/BioProtoc.2356

4.

若林憲一、植木紀子、井手隆広 (2018)  
クラミドモナス走光性における眼点カロテノイドの役割  
**植物科学の最前線 (BSJ-Review)** 9:90-101  
doi: 10.24480/bsj-review.9b6.00138

〔学会発表〕(計 15 件)

1.

More (or less) light: Phototaxis in *Chlamydomonas* and *Volvox* (招待講演)  
Ken-ichi Wakabayashi  
**Gordon Research Conference “Photo-sensing and signaling cascade”**  
2018年3月4~7日、Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lucca (Barga), Italy

2.

Flagellar movement during phototaxis in *Chlamydomonas* and *Volvox* (招待講演)  
Ken-ichi Wakabayashi  
**International Workshop Dynein 2017**, 2017年10月29-11月1日 淡路夢舞台国際会議場

3.

Functional analysis of outer-arm dynein subunits in the planarian *Schmidtea mediterranea*  
Ayaka Kyuji, Ramila Patel-King, Toru Hisabori, Ken-ichi Wakabayashi, Stephen M. King  
**International Workshop Dynein 2017**, 2017年10月29-11月1日 淡路夢舞台国際会議場

4.

Modulation of flagellar motility during phototactic turning in *Chlamydomonas*  
Masako Nakajima, Noriko Ueki, Ken-ichi Wakabayashi  
**The 28th CDB Meeting, Cilia and Centrosomes: Cilia and Centrosomes: Current Advances and Future Directions**, 2016年11月27~29日、理研CDB

(他 11 件)

〔図書〕(計 1 件)

1.

Ueki N, Wakabayashi, K.  
Dynein-mediated photobehavioral responses  
**Dyneins: Structure, Biology and Disease 2nd ed. Volume 1** (Stephen M. King 編), Elsevier Inc.  
2017年発行、総頁数 652 頁のうち 369-386 頁を分担執筆

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

1.

研究室ホームページ

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

2.

Researchmap

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

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：久堀 徹

ローマ字氏名：Toru Hisabori

研究協力者氏名：吉田 啓亮

ローマ字氏名：Keisuke Yoshida

研究協力者氏名：植木 紀子

ローマ字氏名：Noriko Ueki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。