

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17084001

研究課題名（和文） 黄色植物で発見された新奇 bZIP-LOV 蛋白質の構造と機能の解明

研究課題名（英文） Analysis of structure and function of the novel bZIP-LOV protein discovered in stramenopile algae

研究代表者

片岡 博尚 (KATAOKA HIRONAO)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：30108568

研究成果の概要（和文）：

黄色植物とは褐藻、黄緑色藻や珪藻などの葉緑体をもつストラメノパイルを指す。黄色植物は地球上の一次生産の約半分を担っている。我々は黄緑色藻フシナシミドロから新奇の転写因子 bZIP ドメインと青色光センサー LOV ドメインをもつ青色光受容体を発見し、オーレオクロムと名づけた。オーレオクロムは青色光で活性化する転写因子で、黄色植物だけに保存されていた。フシナシミドロでは枝原基や生殖器官の形成を制御しているが、褐藻など他の黄色植物での機能はまだ不明である。オーレオクロムの青色光センサーである LOV ドメインの系統樹を求めたところ、黄色植物は共通の祖先から進化したことが分かった。緑色植物と黄色植物でそれぞれ特異的に進化した異なる青色光受容体が働いていることは植物の進化を考える上で興味深い。

研究成果の概要（英文）：

Brown algae, diatoms and xanthophyceae are main constituents of stramenopile algae. Stramenopile algae are the main primary producers in ocean. From a stramenopile alga, *Vaucheria* (Xanthophyceae), we discovered the novel blue light receptor aureochrome. Aureochrome was found to be a new type of bZIP-LOV protein, and was found to be a blue light-activated transcription factor. It probably mediates the blue-light-induced branching and regulates the sexual development in *Vaucheria*. Aureochromes are common and specific to stramenopile algae, but not existed in green plants. Function of aureochromes in other stramenopile algae is not known to date.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	33,600,000	0	33,600,000
2006 年度	23,000,000	0	23,000,000
2007 年度	11,200,000	0	11,200,000
2008 年度	10,300,000	0	10,300,000
2009 年度	10,300,000	0	10,300,000
総計	88,400,000	0	88,400,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード：オーレオクロム 青色光受容体 黄色植物 bZIP-LOV LOV 蛋白 フシナシミドロ 転写因子 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

1975年、片岡はフシナシミドロが陸上植物と同様、青色光を敏感に感じて光屈性や光形態形成反応を示すことを明らかにしている。陸上植物の光屈性の受容体フォトトロピンがBriggsたちによって1997年に発見され、その研究が飛躍的に進歩しつつあった2003年ころ、高橋はフシナシミドロもフォトトロピンの青色光センサーであるLOVドメインをもつことを発見し、この遺伝子の単離に成功した。本特定領域研究はその遺伝子産物である新奇のbZIP-LOV蛋白の研究を始めることを可能にした。

2. 研究の目的

(1) まず、このbZIP-LOV蛋白が青色光センサーとして機能するのか、もしそうなら、どのように機能するのかを明らかにし、(2) ついで、フシナシミドロのどの青色光反応がこの光受容体で制御されているかを明らかにする。そのためには、この遺伝子の機能を破壊したときに、消える青色光反応を特定する必要がある。フシナシミドロの青色光受容体であることが確認できれば、さらに(3) 他の黄色植物もそれをもっているか、黄色植物はフォトトロピンを持たないのかなど、この光受容体の起源と進化に迫るのが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

(1) フシナシミドロ mRNA から LOV 断片をクローニングし、RACE 法を用いて全長アミノ酸配列を得る。サザン法により、イントロンの位置と数、ゲノム中のコピー数などの情報を得る。

(2) 全長蛋白を大腸菌で発現させ、蛋白を精製する。得た蛋白や LOV 断片の吸収スペクトル、蛍光スペクトルを解析して、青色光照射により、LOV がフラビン(FMN)と一過性に共有結合を形成するか否かを確かめる。特定のシステイン残基との間の可逆的共有結合が確認できて始めて、青色光受容体として機能するといえる。

(3) 蛋白の中央部にある bZIP 領域が点差品詞として機能することを *in vitro* DNA 結合アッセイで調べる。特定の塩基配列を認識し、結合することが確認されたら、ついで、LOV が吸収した青色光のエネルギーが bZIP に伝わり、青色光依存的に bZIP と DNA の結合活性が変化するかをゲルシフトアッセイで調べる。

(4) フシナシミドロは多核細胞なので、個の蛋白がどの光反応を制御するかを知る目的で、突然変異体を使う実験法は成り立たない。そこで、窮余の一策として、RNAi が使えるか否かを検討する。この蛋白を作る mRNA

の2本鎖を合成し、10 mm 程度に切った断片に顕微注射する。パーティクルガンを使うよりはるかに大量の RNA を注射でき、注射した RNA は瞬時に細胞質全体に拡散するので、RNAi が起こるなら極めて有利な実験系となる。

(5) 褐藻やケイ藻を含むフシナシミドロ以外の黄色植物、および、黄色植物に近縁の植物群にオルソログを探索する。培養株から RT-PCR を用いて単離するか、ゲノム解析の終わったものから BLAST 解析で探索し、系統関係を調べる。

4. 研究成果

(1) フシナシミドロの光形態形成反応を司る新奇の青色光受容体を世界で初めて発見した。この受容体は転写因子 bZIP ドメインと FMN を結合する光感受ドメイン LOV を1個ずつもつ小さいタンパクで、フシナシミドロには少なくとも2個のホモログが見つかった。後に、ケイ藻のゲノムや褐藻ヒバマタや黄金色藻オクロモナスなど、他の黄色植物にも orthologs を見つけたので、黄色植物共通の光受容体にふさわしい名前、オーレオクロム(AUREOCHROME1, AUREOCHROME2, 以下 AUREO1, AUREO2 と略記することもある)に改名した。



オーレオクロム1と2の構造

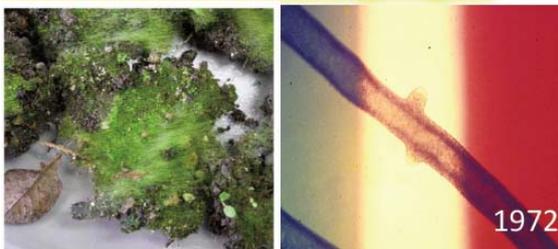
(2) オーレオクロムは青色光を吸収すると、特徴的なシステイン残基が1分子のFMNの4位の炭素原子と共有結合を形成する。この結合は暗黒下で約5分の半減期で離れ、再び青色光で励起される。すなわち、典型的なLOV光受容体としての機能を有することがわかった。

(3) AUREO1では、LOVドメインが青色光を吸収すると、未知の過程を経て光エネルギーが前方の転写因子 bZIP ドメインに伝えられ、ある下流遺伝子のプロモーター領域の TGACGT という特異的配列に結合することが強く示唆された。AUREO2 が結合する特異的な配列は見つからなかったが、AUREO1 と相互作用するなどの機能を持つ可能性は高い。

(4) AUREO1 と 2 の 2 本鎖 RNA 混合物を注射したフシナシミドロは異常な形態の枝を6ヶ月以上に亘って再生し続けた。6ヶ月後、青色光照射部位に枝が発生する光形態形成反応が著しく減退した。これらの細胞には AUREO1 と 2 の mRNA は検出されなかった。すなわち、RNAi が長期間持続した。AUREO2 だけ破壊すると、未熟ながら、多数の生殖器官が叢生した。これは AUREO1 と 2 が協調して、フシナシミドロ光反応や生殖器官発達を制御していることの明確な証拠である。

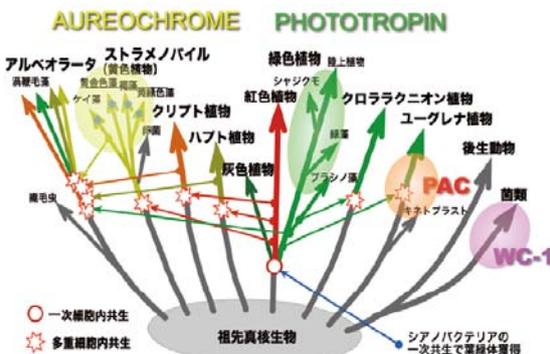
(5) オーレオクロムはどこから来たのであ

ろうか？フシナシミドロは褐藻に近いが、淡水や陸上生活を主とする黄色植物である。ならば、他の黄色植物でも AUREO が働いているかも知れない。黄色植物でゲノム情報が公開されているケイ藻と卵菌類で、BLAST 検索をしたところ、ケイ藻には少なくとも 3 個のオーレオクロムの orthologs が見つかった。そこで、青色光による受精卵の極性誘導で有名な褐藻ヒバマタや、ラフィド藻など、多くの黄色植物から mRNA を抽出しオーレオクロムを探したところ、全ての黄色植物で 2 個以上のオーレオクロムの orthologs を得、それらの全長配列を決定した。系統樹を求めたところ、全てのオーレオクロムは単一の起源から進化したことが分かった。さらに、AUREO1 AUREO2 が過去に分岐して、現在まで、よく保存されていることから、オーレオクロムは黄色植物共通の重要な青色光受容体として機能していることを示唆する。フシナシミドロでは 1975 年に片岡が発見した青色光形態形成反応がオーレオクロムの標的反応であることをつきとめることができた。しかし、褐藻以外の黄色植物では顕著な青色光反応が見つかっていない。ケイ藻のゲノム中に LOV 蛋白があることは気づかれていたが、生理学が欠如していたため、それが光受容体であると確認できなかったのである。



フシナシミドロの青色光で誘導される分枝発生

(6) 葉緑体を捨ててしまった卵菌類にはオーレオクロムは見つからず、近縁のクリプト藻やハプト藻、それに紅藻類や緑藻、緑色植物にも、オーレオクロムは存在しなかった。逆に、緑色植物に広く分布し、光屈性、葉緑体運動、気候開口などを司っているフォトトロピンはどの黄色植物にも見つからない。菌



黄色植物だけがオーレオクロムをもつ類は WC-1 などの 10V 光受容体をもつが、WC-1

は菌類以外には見つからない。これらの大系統群毎が独自に進化した LOV ドメインをもつ青色光受容体を保持していることは、真核生物の進化を考える上で、極めて興味深い。

最近、原核生物であるバクテリアでも各種の LOV ドメインをもつ青色光受容体が重要な機能を果たしていることが明らかになってきた。

(7) 展望：オーレオクロムの研究がすすめば、黄色植物の生理・生態解明に大きく貢献するだろう。また、オーレオクロムが任意の遺伝子の発現を青色光でスイッチするナノ分子素子として医学や工学で使われるようになるかも知れない。しかし、オーレオクロムの研究はやっと端緒についたばかりである。フシナシミドロは多核細胞である不便さがつきまとう。一方、形質転換法が開発されているケイ藻をオーレオクロムの研究に使うには、まず標的青色光反応を見つける必要がある。褐藻ヒバマタでは逆にゲノム解析や形質転換法の開発が待たれるだろう。オーレオクロム蛋白の構造解析は、国内外の共同研究者によって始まりつつある。しかし、オーレオクロムによって発現制御される遺伝子群の解明にはまだ今後十数年以上かかるだろう。このような日本から発進できた研究への投資を切望する。

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) 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. 査読有.

2) Takahashi, F., Yamagata, D., Ishikawa, M., Fukamatsu, Y., Ogura, Y., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kikuyama, M., Wada, M., Kataoka, H. (2007) AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. *PNAS* 104 (49) : 19625-19630. 査読有.

3) Takahashi, F., Okabe, Y., Sekimoto, H., Ito, M., Kataoka, H., Nozaki, H. (2007) Origin of the secondary plastids of Euglenophyta and Chlorarachniophyta as revealed by an analysis of the plastid-targeting nuclear-encoded gene psb0. *J. Phycol.* 43 : 1302-1309. 査読有

4) Shi, C., Kataoka, H., Duan, D. (2005)

Effects of blue light on gametophyte development of *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta). *Chinese J. Oceanology and Limnology* 23:323-329. 査読有.

[学会発表] (計 22 件)

- 1) Kataoka, H., Takahashi, F., Ishikawa, M.
The blue light receptor AUREOCHROME is specific to stramenopile algae. Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology "Biology of Sensing" Celebrating Dr. Winslow R. Briggs. (Kyoto, 2-3. Dec. 2009).
- 2) Ishikawa, M., Takahashi, F., Kataoka, H.
Phylogenic position of the bZIP-LOV photoreceptor aureochrome. International Congress on Photobiology (Düsseldorf, 18-23, June 2009)
- 3) 石川美恵, 高橋文雄, 片岡博尚.
STRAMENOPILE専用の青色光受容体オーレオクロム (AUREOCHROME). 日本藻類学会第33回大会. (沖縄, 2009年3月26-29日).
- 4) Ishikawa, M., Takahashi, F., Kataoka, H.
AUREOCHROME, the newly discovered blue light receptor specific to Stramenopile algae. International Symposium on Protistology-Evolution and Diversity. (Tsukuba, 8-9, Nov. 2008).
- 5) Kataoka, H., Takahashi, F., Ishikawa, M.
Aureochrome, the blue light-activated transcription factor, is conserved in Stramenopile algae. 34th Meeting of the American Society for Photobiology. (Burlingame, CA, 20-25 June 2008)
- 6) Kataoka, H. AUREOCHROME: the newly discovered blue-light receptor of Stramenopiles. Gordon Conference on Photosensory Receptors & Signal Transduction. (Ventura, CA, 27. Jan-1. Feb. 2008.
- 7) Kataoka, H., Takahashi, F., Ishikawa, M.
A newly discovered blue light receptor of heterokonts. 10th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (Gmunden, Austria, 10-13. Sept. 2007).
- 8) 片岡博尚, 高橋文雄. 黄色植物特有の bZIP-LOV 青色光受容体オーレオクロムを発. 第48回日本植物生理学会年会シンポジ

ウム「LOV光受容体研究の新展開と展望」.
(松山, 2007年 3月28-30日)

- 9) 石川美恵, 高橋文雄, 野崎久義, 長里千香子, 本村泰三, 片岡博尚. フシナシミドロで発見したAUREOCHROMEは黄色植物 (Stramenopiles)に共通の青色光受容体である. 第48回日本植物生理学会年会. (松山, 2007年 3月28-30日).

[図書] (計 2 件)

- 1) 片岡博尚, 高橋文雄, 石川美恵 (2009)
黄色植物専用の青色光受容体オーレオクロム. 蛋白質核酸酵素 3月号 54: 267-275
- 2) 片岡博尚, 高橋文雄, 石川美恵 (2007)
フシナシミドロ光形態形成運動の青色光受容体. 遺伝 11月号 61: 20-22, NTS出版.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 遺伝子発現制御方法, それに用いる遺伝子組み換え用ベクターおよび遺伝子発現制御キット

発明者: 清末 知宏, 小倉 康裕, 深松 陽介, 片岡 博尚, 高橋 文雄

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2007-217666

出願年月日: H19年8月23日

国内外の別:

国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 遺伝子発現制御方法, それに用いる遺伝子組み換え用ベクターおよび遺伝子発現制御キット

発明者: 清末 知宏, 小倉 康裕, 深松 陽介, 片岡 博尚, 高橋 文雄

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2009-50175

取得年月日: H21年3月12日

国内外の別:

国内

[その他]

1) 日刊工業新聞 2007年11月6日報道

2) 河北新報 2007年11月7日報道

3) Reuter 通信 2007年11月6日配信

4) 東日本放送スーパーJチャンネル取材
2007年11月7日放送

ホームページ等

1) <http://www.ige.tohoku.ac.jp/outou/outou-j/kataoka-j.html>

2)http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/biomolecular/ts_kataoka.html

3)<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/200901012903909010>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 博尚(KATAOKA HIRONAO)
(東北大学・大学院生命科学研究科・准教授)
研究者番号：30108568

(2) 研究分担者

新免 輝男(SHIMMEN TERUO)
(兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授)
研究者番号：80114510

研究分担者

菊山 宗弘(KIKUYAMA MUNEHIRO)
(新潟大学・大学院自然科学研究科・教授)
研究者番号：90131010

研究分担者

高橋 文雄(TAKAHASHI FUMIO)
(東北大学・大学院生命科学研究科・研究支援者)
研究者番号：60332318

(3) 連携研究者

石川 美恵(ISHIKAWA MIE)
(東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生, 日本学術振興会特別研究員)

連携研究者

菊山 宗弘(KIKUYAMA MUNEHIRO)
(新潟大学・大学院自然科学研究科・教授)
研究者番号：90131010

連携研究者

本村 泰三(MOTOMURA TAIZO)
(北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授)
研究者番号：30183974