

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07891

研究課題名(和文)赤潮藻シャットネラが有する青色光受容体オーレオクロームの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of aureochrome in red tide alga, Chattonella

研究代表者

高橋 文雄 (Takahashi, Fumio)

立命館大学・生命科学部・講師

研究者番号：60332318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：赤潮藻類シャットネラは、光依存的な増殖や日周鉛直運動を示し、その結果として赤潮を形成することが報告されている。しかしその光受容の分子メカニズムはほとんどわかっていない。本研究では、光受容機構および光受容体の解析と生理学現象との統合に焦点をあてて研究を行った。その結果、増殖に関する遺伝子が他の生物と同様に備わっており、加えて光依存的な増殖時にそれらの遺伝子の発現が調整されていることがわかった。また鞭毛の運動に関する因子も他の鞭毛生物と同様に保持しており、それらが日周鉛直運動に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で扱った藻類シャットネラは、赤潮を形成し、日本近海で養殖魚貝類を斃死させる。新聞等での扱いは少ないが毎年億単位の被害が報告されている。古くから生理的な手法を用いて、赤潮の軽減をはかっているが、防除策は見つかっていない。そのため遺伝子などの分子メカニズムを知ることで、この機構の本質情報が得られると考えられる。本研究での分子メカニズムの知見と生理学を組み合わせることで、今後の赤潮防除の新規方法が見つかることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The red tide alga Chattonella has been reported to exhibit light-dependent growth and diurnal vertical movement, resulting in the formation of red tide. However, little is known about the molecular mechanism of photoresponses. In this study, we focused on the analysis of photoresponses, such as proliferation and diurnal vertical movement, and photoreceptors. As a result, it was found that Chattonella retains cyclin genes related to proliferation, and in addition, the expression of those genes was regulated during light-dependent proliferation. It also retains factors related to flagellar motility, suggesting that they are involved in diurnal vertical movement.

研究分野：光生物学

キーワード：オーレオクロム シャットネラ 形質転換 日周鉛直運動 細胞分裂

## 1. 研究開始当初の背景

世界中の沿岸域において、海産ラフィド藻(単細胞生物、体長:10~50 μm程度)は、しばしば海面の色を変化させるほど増殖して(赤潮)魚類を斃死させ、水産業に甚大な被害を及ぼす。そのため、ラフィド藻の赤潮発生メカニズム解明とそれに基づく動態予測技術や被害軽減技術の開発は長年にわたり水産学上の重要な課題として位置づけられている。従前の研究により、主要な有害種について増殖や生活環に関する多くの知見が蓄積されているが、未だ赤潮動態を予測できるほど詳細な発生メカニズムは明らかになっていない。

本研究で用いた海産ラフィド藻 *Chattonella antiqua* (以降、シャットネラ)は遊泳運動により、昼間は表層に集積して光を浴びて光合成を行うことで活発に増殖すると考えられている。そのため、ラフィド藻の赤潮発生メカニズムを考える上で、細胞分裂や遊泳運動に及ぼす光環境の影響は極めて重要な研究対象だと言える。しかし、光応答解析は暗室や単色光源など特殊な実験設備を要することや細胞周期や遊泳運動の解析には昼夜連続実験など多大な労力が必要となることなどから、知見は極めて少ない。

また一般に、光合成生物は、光をエネルギー源としてだけでなく、様々な運動や形態形成の信号として使用している。特に水圏に生息する生物(光合成生物含む)は主に青色領域の波長帯の光(青色光)を特殊なタンパク質(以降、青色光受容体)で感知し、細胞内でこの信号を活用することが知られている。これまでラフィド藻シャットネラについて、大型スペクトログラフなどの単色光源や独自に開発した遊泳運動自動観測システムを用いて様々な光環境における生物応答を解析してきた。その結果、分裂速度が他の単色光と比べて青色光下で高いこと、日周鉛直移動リズム(上昇あるいは下降開始時刻)が夜明け前あるいは日没後の微弱な青色光によって変化すること、昼間の強い青色光の照射によって負の走光性(光から逃げる行動)が誘導されることを見出してきた。また、トランスクリプトームを用いた分子生物学的な解析により、シャットネラから青色光受容体オーレオクロームの相同遺伝子を見出していった。オーレオクロームは光合成を行う黄色植物\*にのみ分布しており、青色光を特異的に吸収して活性化する転写因子として働くことが知られている。黄緑藻フシナミドロでは分枝形成の制御、ラフィド藻シャットネラに近縁の海産珪藻では細胞周期における位相変化(DNA合成の制御)に関与することなどが報告されている(\*黄色植物 昆布やワカメなどの褐藻や珪藻を含む分類群)。

このように、我々の研究により、シャットネラについて、細胞分裂や遊泳運動といった赤潮を形成するために極めて重要な生理現象が青色光によって制御されていて、青色光を感知する青色光受容体が存在することが明らかとなった。これらの研究成果を受けて、青色光受容体の機能、特に細胞分裂や遊泳運動との関係を解析すれば、ラフィド藻の生理生態について理解を深め、その赤潮発生メカニズムの解像度を飛躍的に向上させる可能性が示唆されてきている。

しかし、生理学的な現象や分子データの拡充は進展したが、それを連結するようなデータは得られていない。また分子データから類推されたタンパク質の機能についても解析されておらず、以上のことが喫緊の課題であると言える。

## 2. 研究の目的

本研究では、3つの計画を実施し、シャットネラにおける受光~生理応答のシグナル伝達について概要を把握し、オーレオクロームの関与の有無を明らかにすることを目的とした。なお、オーレオクロームは転写因子(DNA結合)としてのドメイン構造を有することや上述した他生物での知見を考慮し、本研究課題ではシャットネラの青色光で誘導される生理応答(以降、青色光応答)のうち、受光~応答にある程度の要する細胞周期と鉛直移動リズム制御を主たる解析対象とする。

計画1として、青色光に対する応答の薬理的・分子生物学的解析:生理活性阻害剤等の薬剤を投与して青色光応答を観察。オーレオクローム遺伝子の発現量と青色光応答と同時計測を行い、生理学的な解像度を上げることを目標とした。加えて関連遺伝子群の単離し、系統解析または発現解析を行うことを目標とした。

計画2として、オーレオクロームの生化学的・物理学的性状の解析:オーレオクロームのホモログ(相同体)を単離精製・大量生産。吸光スペクトル、光受容部位やDNAとの結合部位の特性を同定することを目的とした。

計画3として 形質転換による機能解析を行うために形質転換系法の確立を目標とした。オーレオクロームの過剰発現あるいはノックダウン後に青色光応答を観察し、それらに関与するかどうかを確認することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、3年間で実施することで、受光~青色光応答の概要を把握し、シャットネラにおけるオーレオクロームの機能を明らかにすることを目指した。オーレオクロームは転写因

子でもあり、他生物では受光～生理応答に長い時間を要する傾向にある。そこで、本研究課題ではまず、細胞周期や鉛直移動リズム制御といったある程度時間を要する青色光応答へのオーレオクロームの関与を検証する。細胞周期の解析にはフローサイトメトリーを用いた手法および顕微測光法と定量 PCR を用いたサイクリンなどのマーカー遺伝子の発現解析法を併用し、日周鉛直移動の解析には独自に開発した遊泳運動自動解析システム（赤外光で証明して CCD カメラで撮影）を用いた。加えて生化学的手法によるタンパク質の機能解析と分子遺伝学的手法による遺伝子発現などの解析を用い、赤潮形成の基礎分子メカニズムの統合することを行った。

以下が行った計画ごとの方法を示した。

#### (1) 計画1 生理応答とそれらに関する遺伝子群の同定と発現

シャットネラの光応答として、増殖の指標とされる分裂周期の特定を行った。まず細胞増殖の日周性を確認するために、明暗周期(明期 12 時間:暗期 12 時間)4 時間ごとの細胞数を数えた。加えて経時的に、核を蛍光試薬によって染色し、その蛍光強度によって細胞周期の同定を行った。加えて、DNA 合成期の特定を行うために、EDU と呼ばれるチミンアナログを DNA に取り込ませ、その蛍光強度による合成時期の特定を行った。

シャットネラのもう一つの光応答として鞭毛による運動機構を調査した。明暗周期における鞭毛形態や鞭毛打について高速カメラを用いて解析した。

##### 遺伝子群の特定

明暗時のトランスクリプトーム解析を行い、以上の細胞分裂や鞭毛に関する遺伝子をカタログ化し、系統解析を行い分類した。トランスクリプトームの発現量をもとに、経時的に mRNA を取得し、各々の遺伝子発現パターンを real time PCR によって解析した。

#### (2) 計画2 青色光受容体の特性

オーレオクロームの生化学的・物理学的性状の解析を行った。オーレオクロームのホモログを単離精製し、cDNA を作製した。その後大腸菌に遺伝子導入を行い、タンパク質の大量精製方法の調製を行った。得られた組換えタンパク質において、光受容ドメインに関しては吸収・蛍光スペクトルを測定した。DNA 結合部位等に関しては、オリゴヌクレオチド結合解析によって DNA 結合モチーフを調査した。

#### (3) 計画3 形質転換法の開発

まずはオーレオクロームを過剰発現あるいはノックダウンして青色光応答を観察することで、その機能を確定可能である。シャットネラは、核酸を単離することが可能であるが、いまだ遺伝子導入や突然変異体の作製の報告はない。そこでまずは一過的な遺伝子導入方法の確立が必須である。まず遺伝子導入をする際に現在用いられている手法(培養法など)が可能かどうか調査した。その後遺伝子導入法(形質転換)を構築することを目指した。海水の塩濃度から低塩濃度に置換し生存可能か調査した。また顕微注射に用いられるような不動細胞の作製も試みた。

## 4. 研究成果

### (1) シャットネラの生理応答

過去の知見から、明期の光が重要であることがわかっていたが、本研究では、明期の光を単色光(青・緑・赤)で照射し、その増殖変化を観察した。その結果、すべての光の波長で、増殖することがみられたため、光合成によるエネルギーや信号の影響が考えられた。そのため光合成阻害剤を用いて、増殖を調査したところ、増殖抑制されたため、光合成によるエネルギーまたは信号が、赤潮の増殖に寄与していることがわかった。

次のシャットネラの小規模空間での日周鉛直運動を観察し、日周周期ごとの鞭毛長を調査した結果、明暗周期で鞭毛長が変化していることがわかった。また、明暗周期ごとの遊泳速度の変化も観察された。

上記の結果( )を踏まえて、増殖に関する因子サイクリンと鞭毛長に関する遺伝子を、トランスクリプトームデータベースから探索した。増殖に関するサイクリン遺伝子は、多種存在していた。しかし珪藻が保持する DNA 合成に関するサイクリン D タイプは存在しなかった。明暗条件下におけるサイクリン遺伝子の発現パターンを解析すると、増殖と一致して DNA 合成・分裂期に関する遺伝子の上昇がみられることもわかった。加えて日周鉛直運動の遊泳に関与すると考えられる鞭毛の基本構造遺伝子および鞭毛の輸送タンパク質も動物と同様に保持していることがわかった。

### (2) シャットネラ光受容体の分子・生化学的解析

トランスクリプトームデータベースから、光受容体の探索を行った結果、青色光受容体であるオーレオクロームが6つ、DNA 修復酵素とクリプトクロムは多数見つかった。オーレオクロームのみ遺伝子発現の調査を行ったが、明暗周期を問わず発現の差異はなかった。光受容体は光依存せず定常的に発現していることがわかった。オーレオクローム遺伝子を系統解析によってグループ分けを行うと、3種類のグループに分けられたため、それぞれのグループのオーレオクロームの光受容体を、大腸菌を用いた生化学的解析によって確認した。トランスクリプトームデータベースの遺伝子を単離し、大腸菌用の発現ベクターに導入し、大腸菌での異種発現を試みた。その結果、すべてのホモログで発現・精製ができなかった。シャットネラの遺伝子は GC(グアニ

ン、シトシン)の含量が高いため、大腸菌と相性が悪かったと考えられる。そのため、各オーレオクロム遺伝子を大腸菌用にコドン进行调整し、ベクターに再度導入した。それらによってタンパク質の発現・精製が可能になった。精製したオーレオクロムタンパク質を分光学解析に用いた。興味深いことに、3つのグループの光受容能はすべて保持していることがわかったが、その光受容能感受性に差があることがわかった。次にDNA結合配列を確認したところ、先行研究と同様に4塩基の回文配列に結合していることがわかった。

### (3) シャットネラ形質転換系の確立

現在、様々な生物群で遺伝子導入法が開発されているが、基本的に低塩濃度条件下でのエレクトロポレーションまたは圧力を使った遺伝子銃のような手法が用いられている。遺伝子重銃は、水生生物にとって乾燥が厳しいので、溶液中で行えるエレクトロポレーション法の確立を目指した。エレクトロポレーションは低塩濃度で行うため、海産の生物であるシャットネラを、低塩濃度の耐性を持たせられるか培養法を確立させた。海水に含まれる塩によって細胞は、浸透圧を保持しているので、それに見合う浸透圧を糖や糖アルコールによって置換可能か調整した。その結果糖アルコールによって、数日間であるが生存確認可能であった。その際シャットネラは、鞭毛が短くなり細胞が丸くなることもわかった。海水に復帰させた場合、一時間程度で鞭毛を伸長し、遊泳可能になることも観察された。さらに通電させた後にも復帰した細胞が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Homma Y, Okuda S, Kasahara M, Takahashi F, Yoshikawa S, Uwai S	4. 巻 642
2. 論文標題 Phenological shifts and genetic differentiation between sympatric populations of <i>Sargassum horneri</i> (Fucales, Pheophyceae) in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Ecology Progress Series	6. 最初と最後の頁 103-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3354/meps13332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shikata T, Takahashi F, Nishide H, Shigenobu S, Kamei Y, Sakamoto S, Yuasa K, Nishiyama Y, Yamasaki Y, Uchiyama I	4. 巻 10
2. 論文標題 RNA-seq analysis revealed genes related to photoreception, nutrient uptake, and toxicity in a noxious red-tide raphidophyte <i>Chattonella antiqua</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 1764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.01764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takano T, Higuchi S, Ikegaya H, Matsuzaki R, Kawachi K, Takahashi F, Nozaki H	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of 13 <i>Spirogyra</i> Species (Zygnemataceae) by Traits of Sexual Reproduction Induced Under Laboratory Culture Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43454-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto K, Kawai-Toyooka H, Hamaji T, Tsuchikane Y, Mori T, Takahashi F, Sekimoto H, Ferris PJ, Nozaki H	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular evolutionary analysis of a gender-limited MID ortholog from the homothallic species <i>Volvox africanus</i> with male and monoecious spheroids	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS One	6. 最初と最後の頁 e0180313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0180313. eCollection 2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 高橋文雄、赤松健司、紫加田知幸、笠原賢洋
2. 発表標題 赤潮藻シャットネラの光依存的な細胞分裂とその制御因子の解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本千愛、大江遥介、白畑陽都、柴田あいか、高橋文雄、笠原賢洋
2. 発表標題 植物cAMP 合成・分解酵素遺伝子CAPE の単離と系統分布
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤帆乃香、高橋文雄、笠原賢洋
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケcAMP 合成・分解酵素CAPE の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間由莉、奥田修二郎、笠原賢洋、高橋文雄、吉川伸哉、上井進也
2. 発表標題 褐藻アカモクの季節集団間に見られる遺伝的分化について
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto C, Takahashi F, Ooe Y, Shirahata H, Shibata A, Suetsugu N, Kohchi T, Kasahara M
2. 発表標題 Characterization of plant cyclic AMP function in Marchantia polymorpha
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋文雄、田中正紀、吉川伸哉、笠原賢洋
2. 発表標題 アカモクが持つオーレオクロムのphotocycleについて
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間由莉、奥田修二郎、笠原賢洋、高橋文雄、吉川伸哉、上井進也
2. 発表標題 新潟県沿岸のアカモクにおける季節集団間の遺伝的分化の解析
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原淑乃、山崎誠和、高橋文雄、吉川伸哉、寺田竜太、鳶田智
2. 発表標題 海洋植物の遺伝子発現に注目した健全性診断システムの開発
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本千愛、高橋文雄、末次憲之、河内孝之、笠原賢洋
2. 発表標題 ゼニゴケの生殖時期におけるサイクリックAMPの機能解析
3. 学会等名 日本植物生理学会第60回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋文雄
2. 発表標題 黄色植物が保持する青色光受容体オーレオクロムの機能と応用展望
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋文雄
2. 発表標題 植物の青色光応答と青色光受容体の多様性
3. 学会等名 第7回日本細胞性粘菌学会例会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshikawa S, Hosokawa M, Uwai S, Okuda S, Kasahara M, Takahashi F
2. 発表標題 Molecular analysis of receptacle formation in <i>Sargassum horneri</i>
3. 学会等名 The 8th Asian Pacific Phycological Forum (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Takahashi F, Inden Y, Shikata T, Kasahara M
2. 発表標題 Biochemical analysis of aureochrome in the raphidophycean algae <i>Chattonella antiqua</i>
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akamatsu K, Shikata T, Kasahara M, Takahashi F
2. 発表標題 Analysis of light-induced cell division in the raphidophyte <i>Chattonella antiqua</i>
3. 学会等名 International Symposium on Plant Photobiology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋文雄、位田康熙、紫加田知幸、笠原賢洋
2. 発表標題 赤潮藻シャットネラが持つオーレオクロムの生化学的解析
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本間由莉、奥田修二郎、笠原賢洋、高橋文雄、吉川伸哉、上井進也
2. 発表標題 新潟県沿岸におけるアカモク集団の遺伝的分化の解析
3. 学会等名 日本藻類学会第42回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紫加田知幸、吉浦康寿、吉浦美和、伏屋玲子、高橋文雄、山崎康裕、西出浩世、内山郁夫
2. 発表標題 赤潮藻Chattonelliaの魚毒性に関する研究 : トラフグ鰓の応答とNADPHオキシダーゼ遺伝子の系統解析
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	紫加田 知幸  (Shikata Tomoyuki)  (40603048)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(廿日市)・主任研究員    (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------