

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657011

研究課題名（和文） オーレオクロムは褐藻のどの光反応の受容体か

研究課題名（英文） For what brown algal photoresponse is Aureochrome functioning as the receptor?

研究代表者

片岡 博尚 (KATAOKA HIRONAO)

東北大学・学術資源研究公開センター・協力研究員

研究者番号：30108568

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はオーレオクロム（AUREOCHROME）が発見されたフシナシミドロ（*Vaucheria*）以外の黄色植物（光合成をするストラメノパイル）で、オーレオクロムが仲介する青色光反応を探索することにある。褐藻は学問的にも産業的にも最も重要な黄色植物なので、できるだけ容易に培養でき、単純な体制を持つ *Halopteris* 属を中心に、青色光で制御される生理過程を探したところ、その成長自体が強く青色光に依存しており、赤色光単独では生存できないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Although the blue light (BL) receptor, AUREOCHROME we discovered regulates photomorphogenesis in *Vaucheria*, in brown algae, which are biologically and industrially far more important than others, nothing is known about AUREOCHROME's function. I chose *Halopteris* after surveying small brown algal species easily cultivable and having simplest organization. Culturing *H. congesta* in a long-day condition with monochromatic blue- or red LED lamps, I found that only BL permits the alga's growth but not the red light.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

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、光受容体、青色光反応、褐藻、*Halopteris*, LOV、bZIP、フシナシミドロ

1. 研究開始当初の背景

申請者らは2007年に青色光受容体オーレオクロムを黄色植物（ストラメノパイル、Stramenopile）、黄緑色藻に属するフシナシミドロ（*Vaucheria*）から発見した

(Takahashi et al. 2007)。オーレオクロムは青色光によって活性化される転写因子で、フシナシミドロでは青色光で照射域に誘導される分枝の発生や有性生殖器官の形成を制御する光受容体であった。その後、オ

ーレオクロムは褐藻やケイ藻を含む黄色植物(ストラメノパイル藻)だけに高度に保存されていることを明らかにした (Ishikawa et al. 2009)。では、オーレオクロムはフシナシミドロ以外の黄色植物でどのような役割を担っているのだろうかという問いが本研究を立ち上げる動機であった。

黄色植物の生理学は非常に立ち後れているが、生態的重要性からも生理学的意義からも褐藻とケイ藻が本研究の研究対象とするにふさわしい。褐藻類ではヒバマタ (*Fucus*) 類の受精卵からの仮根の分化方向が青色光によって決定されるが、その反応の光受容体は未知である。しかし、*Fucus* は室内培養ができず、且つ受精卵を採取できる時期が1ヶ月以内に限られているなど、生理実験には不向きである。一方、ケイ藻にはオーレオクロム遺伝子が最低3個含まれており、ゲノム情報も公開され、遺伝子組み換えも可能との報告があるものの、明白な青色光反応が何一つ知られていない。反応が不明ではその受容体は探しようがない。

そこで、できるだけ単純な体制を持ち、小さく、人工海水を用いて室内培養が可能な褐藻類を材料として青色光反応を探索し、光反応の実験材料として確立することがオーレオクロムの機能を探るには最適であろうと判断した。

2. 研究の目的

Halopteris 属の褐藻は円筒状細胞が疎らに分岐しながら縦に繋がり、数 cm の扇形の藻体となるような単純な体制を持ち、人工海水で比較的容易に室内で培養できる。本研究の目的は、*Halopteris* 属の数種を実験室で培養し、その成長や形態形成に関する青色光依存性を解析する事によりオーレオクロムの標的反応を見つけ出すことである。

3. 研究の方法

(1) 材料

本研究の材料として用いる褐藻は、実験室で培養が可能であり、円筒形の細胞が一列に繋がったようなできるだけ単純な体制を

持ち、成長や形態形成が容易に観察できることが必要である。さらに、将来分子生物学の実験に用いることを考えると、多くの褐藻がもつ粘液物質が少ないことも必要条件となる。ヒバマタやコンブ、ワカメなどは、残念ながら、これらのいずれの要件も満たさない。このことが、まさにこれまで褐藻類の生物学の発展を阻害してきたが、光受容体オーレオクロムの制御する光反応を手掛かりにして、褐藻類やケイ藻類の生物学を発展させることが期待できる。そこで、この目的に合致する褐藻として *Halopteris* 属を選んだ。

(2) 培養条件の確立

神戸大学海藻類系統株コレクション (KU-MACC) からドイツ Konstanz の Müller コレクションから分譲されたクロガシラ科の褐藻 *Halopteris congesta* (Reinke) [KU-1120]、及び同属の *H. filicina* (Grateloup) [KU-1119]、*H. gracilescens* (J. Agardh) [KU1118] を入手し、PESI 培養液をいれたエーレンマイヤーフラスコ中、 $14 \pm 1^\circ\text{C}$ の低温培養庫内で、白色蛍光灯 (約 $40 \mu\text{mole m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)、16 時間明/8 時間暗で前培養した。1ヶ月後、それぞれ 5ml の PESI を満たした 6 穴滅菌プラスチック皿 (Nunc) に植え、赤と青の単色光での培養を開始した。上記培養庫の中に赤 (660nm、 $110 \mu\text{mole m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) と青 (450 nm、 $110 \mu\text{mole m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) の 46 個集合 LED ランプ 4 台を設置し、互いの光源から遮蔽した棚の下に 6 穴皿を置き、16 時間明/8 時間暗の周期で培養を開始した。培養庫のスペースが限られているため、白色光培養や青・赤混合光での培養を同時に平行して行うことはできなかった。

4. 研究成果

(1) 最適材料の決定

上記培養条件で最も成長が早く、培養液蒸発による塩濃度上昇に耐えた *Halopteris congesta* (Reinke) [KU-1120] が今後の実験に適していることがわかった。3ヶ月後白色光下においた前培養の本種は疎らにぶんきした枝が全て扇形にそろって伸び、生育地の正常な形態と区別できないほどに成長したが、他の2種は成長が極めて遅く、3

ヶ月後にもほとんどその体積を増さなかった。そのため、以後の培養実験には *H. congesta* のみを用いることにした。しかし、このことは、あくまで今回の場用条件の下での結果であり、他の2種には、それぞれもっと適した培養条件があるものと推測される。

(2) 青色光の有効性

青色光で育った *H. congesta* は直径 3 cm の 6 穴皿の底面に平行に、要から約 10mm 長の扇型に藻体が成長した。疎らに分岐した枝が軸からほぼ並行に伸びて、生育地で見られる形態と同じ美しい形態を取った。

その褐色の色彩も白色光と青色光でちがいはなかった。一方、赤色光下に置いたものは、成長速度が極めて遅く、3, 4ヶ月後には藻体の一部が白化し、枯死してしまったことから、赤色光単独では生活を維持できないことが分かった。*Halopteris* の生態は詳しく知らないが、深い海底には赤色光は届かないが、青-緑色光は届くので、生育条件に近い青色光単独での成長が正常に近いことは容易に理解できる。そして、青色光が光合成だけでなく、細胞の先端成長、分枝形成、扇形への形態形成を制御していることも確認できる。オーレオクロムは青色光受容体であり、褐藻には赤色光受容体はみつかっていないことを考えると、オーレオクロムが、成長や形態形成を司っている可能性が高い。

(3) 標的反応を決定するには

フシナシミドロでの結果を考えると、オーレオクロムが光屈性、分枝誘導、分枝面決定、背腹性、生殖器官形成のどれかの光受容体であることが示唆される。しかし、それを確かめるには、反応経過を連続して観察、測定するだけでなく、候補反応が少なくとも数日以内に起こり、反応の大きさが光強度と線形関係にあることが必要である。しかし、現在のところ、まだ反応の連続観察も成功していない。青色光の明暗周期を数段階に変えることや、青色光と赤色光を混合することで成長や形態形成を加速できるかも実験的に検討する必要がある。また、細胞が 20-30 μm と小さいこと、培養スペースが限られていること、海水培養液

が蒸発しやすいことも実験を困難にしている。

(4) 今後の展望と別課題との関係

Halopteris がオーレオクロム標的反応の探索に適した材料であることが分かったのが、本研究の唯一の成果ではあるが、その特定には至っていない。詳細な観察を行うための準備作業中である。大震災の影響を克服するためにも数ヶ月を要した。しかし、オーレオクロムの構造解析を進める別の研究課題では共同研究者たちによる一定の進展があった。それらの成果を取り入れた新たな研究を開始している。

また、本研究期間中にカヤモノリ (*Scytosiphon*) のゲノム情報が、国際的な研究プロジェクトによって公開された。カヤモノリも比較的小型でその生活環が青色光によって制御されていることが知られている褐藻の一つである。もちろん、オーレオクロムの遺伝子が保存されている。*Halopteris* と同時にカヤモノリからもオーレオクロム遺伝子を単離し、その全長配列を決定する研究を計画中である。*Halopteris* からオーレオクロムの標的反応を特定するには、オーレオクロム遺伝子を RNAi などの手段でノックダウンし、反応が消滅するか、遅滞することを確かめる実験が不可欠である。カヤモノリやフシナシミドロとオーレオクロム遺伝子の配列を比較しつつ、ノックダウン実験を設計することが大いに役立つはずである。そこでカヤモノリの新たな青色光反応の探索も後続研究課題に盛り込む予定でいる。

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 2 件)

1. Toyooka, T., Hisatomi, O., Takahashi, F., Kataoka, H., Terazima, M. Photoreactions of *Aureochrome-1* Biophysical Journal, 査読有り, (2011) 100: 2801-2809.
2. Yokoyama, A., Takahashi, F., Kataoka, H., Hara, Y., Nozaki, H. Evolutionary analysis of the nuclear-encoded photosynthetic gene *psbO* from tertiary plastid-containing algae in Dinophyta J.

Phycology 査読有り, (2011) 47: 407-414.

[学会発表] (計 7 件)

1. Hisatomi, O., Takeuchi, K., Takahashi, F., Kataoka, H. Expression and characterization of recombinant Aureochrome-1. The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing 2012年 3月 19-21日 奈良.
2. 石川美恵、高橋文雄、片岡博尚. ”黄色植物フシナシミドロ“の光適応戦略—転写因子として働く光受容体オーレオクロム. 日本植物学会第 75 回シンポジウム 「光合成生物の多様な光応答戦略」. 2011年 9月 18日 東京.
3. Kataoka, H., Takahashi, F., Ishikawa, M. Aureochrome, the algal blue-light receptor that functions transcription regulator. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society: Elsevier sponsored symposium: Lessons from Photobiology. 2011年 9月 16日 横浜.
4. Hisatomi, O., Takeuchi, K., Takahashi, F., Kataoka, H. Photoreaction of a light-regulated transcription factor, AUREO1. 生物物理学会第 49 回年会. 2011年 9月 16日 姫路.
5. Ishikawa, M., Gärtner, W., Kataoka, H., Takahashi, F. Photochemical analysis of *Ochromonas danica* Aureochrome. The 5th Asia and Oceania conference on Photobiology. 2011年 7月 30日-8月 1日 奈良.
6. Hisatomi, O., Takeuchi, K., Murakami, T., Takahashi, F., Kataoka, H. Characterization of a light-induced transcription factor, AUREO1, expressed in *E. coli*. The 5th Asia and Oceania conference on Photobiology. 2011年 7月 30日-8月 1日 奈良.
7. Kataoka, H., Takahashi, F., Ishikawa, M. Stramenopile blue-light receptor Aureochrome. 2nd Channelrhodopsin Conference: Channelrhodopsin and Light-gated enzymes. 2010年 5月 26日 Hiddensee, Germany.

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/gardstud/Hironao.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 博尚 (KATAOKA HIRONAO)

東北大学・学術資源研究公開センター・

協力研究員

研究者番号 : 30108568

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :