

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：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291058

研究課題名(和文) 緑藻クラミドモナスの光合成ステート・走光性連関の分子基盤

研究課題名(英文) Interactions between the state transitions and phototaxis in the green alga *Chlamydomonas*

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) 8,600,000円

研究成果の概要(和文)：光合成をする微生物にとって、適切な光強度の環境下に移動することは重要な生存戦略である。単細胞緑藻クラミドモナスは光合成、細胞運動、光行動反応などの分野でモデル生物とみなされており、この分野の研究に適している。我々は以前、細胞の中の酸化還元(レドックス)状態が細胞が示す走光性の正と負を切り替えていることを見出した。本研究はその分子機構を明らかにすることを目的として行われ、酸化・還元と走光性の正・負の関係が崩れたミュータントの原因遺伝子の解明、培養条件によって変化する鞭毛内酸化還元電位の定量などの成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Phototaxis is a cellular behavior in that cells move toward or against from the light source (positive or negative phototaxis, respectively). For phototrophic microorganisms, switching between positive and negative phototaxis is crucial to inhabit under suitable light intensity for photosynthesis. A unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is a model organism for photo-behavioral responses. Previously, we found that cellular redox (reduction-oxidation) signal regulates this switching. In this research, to elucidate the sign-switching mechanism, we identified causative genes of mutants that show different sign of phototaxis. In parallel, we estimated intra flagellar redox potentials under different light conditions.

研究分野：細胞運動の生物学

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

鞭毛をもつ多くの緑藻類は、生存に最適な光環境（光合成を行える程度に光が強く、強光ストレスを受けない程度に光が弱い環境）を求めて、光源に向かって（遠ざかって）泳ぐ「正（負）の走光性」を示す。これまで走光性のメカニズムは、クラミドモナスを用いた研究によって (i) 眼点のチャンネル型ロドプシンが光受容して膜を興奮させる (ii) 鞭毛膜が興奮してカルシウム流入し、カルシウム応答性の異なる2本の鞭毛の打つバランスが変わって方向転換することが示されてきた。しかし、この一連の運動システムで走光性の正・負をスイッチさせる因子は不明だった。

我々は以前、鞭毛運動の原動力を生み出すモータータンパク質「ダイニン」にレドックス（酸化還元、reduction-oxidation）感受性タンパク質がサブユニットとして含まれていることをヒントに、クラミドモナスの鞭毛運動がレドックス調節されることを見出した (Wakabayashi and King, 2006. J Cell Biol.)。細胞内の酸化・還元状態が変わると、鞭毛打頻度や、方向転換のために行う鞭毛波形変換持続時間などの運動パラメーターが変化する。そして、その際上記のダイニンサブユニットが相互作用するタンパク質を変えるのである。

その研究の延長として、さらに走光性の正・負がレドックスで調節されていることを見出した。クラミドモナスは、細胞内が酸化的になると正、過還元的になると負の走光性を示す (Wakabayashi et al., 2011. PNAS)。これは、細胞内レドックス状態を還元的に保つ「レドックス恒常性」維持のために、移動によって受ける光強度を変化させ、細胞内レドックス状態に影響を与える光合成活性を調節する行動だと考えられる。

2. 研究の目的

この発見により、これまで謎だった「クラミドモナス走光性の正・負の調節」の分子機構を明らかにする上での具体的な「問い」を設定することができた。即ち

- (1) 細胞内の何がレドックス状態を変えるのか。
 - (2) どのような分子がレドックス状態変化を感受するのか。
 - (3) その分子がレドックス状態を感受したのち、どのようにして情報が鞭毛に伝わるのか。
- である。それぞれの問いに対応する研究方法を下記のように設定した。

3. 研究の方法

(1) について、「光合成ステート遷移」が原因の1つである可能性があった (図1)。

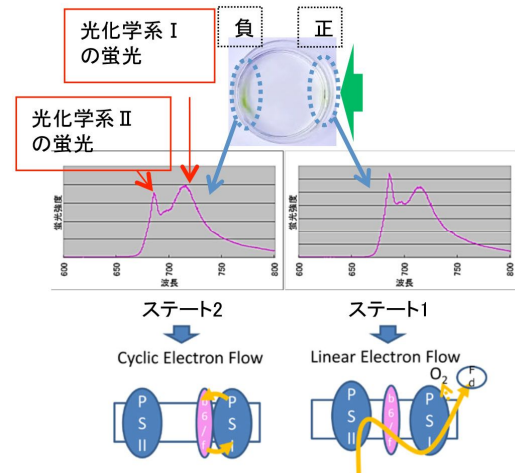


図1： 正・負の走光性により凝集したクラミドモナス細胞の低温蛍光スペクトルの典型例。(上) 野生株が正と負の走光性をともに示す光条件で右から光を当てた。(中) 正の走光性を示した細胞は光化学系(PS)IIの蛍光 > PSIの蛍光 即ちステート1であり、負の走光性を示した細胞はPSIIの蛍光 < PSIの蛍光でステート2であった。(下) 左から、ステート2、ステート1での電子の流れ(黄色)の概念図。

この予備的結果のさらなる検証を行い、

「光合成の電子伝達経路のスイッチが、走光性符号のスイッチになるか」を検証する。

(2) について、走光性符号変化の様式が野生株と異なる既知の、また新たに単離した未知のミュータントを得ていた。それらの原因遺伝子を同定することで、細胞内のレドックス状態変化を感知する分子メカニズムの解明を目指した。

(3) について、細胞内のレドックス状態は、主には光合成活性変化で生じると思われる。異なる光条件下で培養した細胞の鞭毛内酸化還元電位を、新たに開発された機能性蛍光タンパク質 Oba-Qc(oxidation-balance sensed quenching protein, CFP-based)を用いて計測する。

4. 研究成果

(1) クラミドモナスの走光性ステート遷移と走光性符号の関係

結論から言えば、「ステート遷移との因果関係はない」ということになった。

予備的結果で得られていた、「正の走光性を示している細胞はステート1, 負の走光性を示している細胞はステート2である」という再現性は得られた。しかし、仮説であった「ステート遷移が走光性の符号を変える」、つまり走光性符号スイッチの要因としてのステート遷移はいくつかの実験により否定された

まず、ステート遷移異常株 *stf7* の表現型解析である。この株はステート1でロックされた状態になっている。予想が合っていれば、この株は正の走光性しか示さないということになるが、実際には負の走光性を示すことがあった。

次に、ステート誘導実験である。クラミドモナスに 735 nm の遠赤外線照射することによってステート1を、470 nm の青色光照射することによってステート2を誘導する

ことができる。これも、ステート遷移 = 走光性符号スイッチの原因であれば、それぞれ正、負の走光性を誘導することになる。しかし、実際にはそのようにならなかった。また、その「予想通りにならなかった符号」について、特に法則性を見出すことはできなかった。

つまり、ステート遷移と走光性符号には、相関関係はある。つまり、細胞内に活性酸素が多く生じている状態だと、光合成はステート1になっており、また正の走光性が誘導される。活性酸素量が少ないとき、光合成はステート2になっており、負の走光性が誘導される。その大元の「走光性符号を入れ替えるほどの活性酸素の量の変化」を呼び起こすことこそが我々の知りたかったものであるが、ステート遷移もその傘下にある「結果」の一部であって、直接の原因ではなかった。今後は、光合成における電子伝達の経路など、活性酸素の量を変化させる要因をさらに細かく絞って検証する。

(2) 走光性符号異常ミュータントの解析

2つのミュータントの原因遺伝子同定に成功した。

1. 強い負の走光性ミュータント *agg1*

クラミドモナス CC-124 株は世界的に最もよく使われている野生株であり、数多くのミュータントの親株となっているが、同時に「強い負の走光性を示す」ミュータントでもあり、室内灯にも反応して負の走光性を示し、試験管の底に凝集(aggregate)することから *agg1* ミュータントと呼ばれていた(図2)。

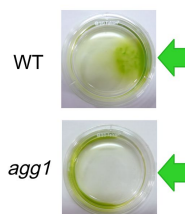


図2: 培養液をディッシュにいれて右から光を当てた。WT(野生株)は正の走光性を示しているが、*agg1* 株は負の走光性を示している。

我々は研

究分担者の廣野雅文教授（法政大）による遺伝子マッピングと、次世代シーケンスによる全ゲノム解析を組み合わせた独自の手法によって、*agg1* の原因遺伝子を同定した(Ide et al., 2016. Biochem Biophys Rep.)。この遺伝子解析は世界との競争に晒されていたため、詳細な遺伝子産物解析には至らなかったが、機能未知であり、配列解析からはミトコンドリアで機能するタンパク質である可能性が高い。呼吸活性を調節して細胞内レドックス環境を偏らせる可能性、あるいはそれ自体がレドックスセンサーとして働いており、走光性のスイッチをする活性酸素量の閾値が変化している可能性などを今後検証する。

2. 走光性符号逆転ミュータント *ips1*

我々は、クラミドモナス野生株にランダムに変異を導入し、野生株と走光性符号の挙動が異なる変異株群を単離した。そのうちの1つ *ips1* は、野生株が正なら負、負なら正と、常に逆符号(inverse phototactic sign)の走光性を示す(図3)。

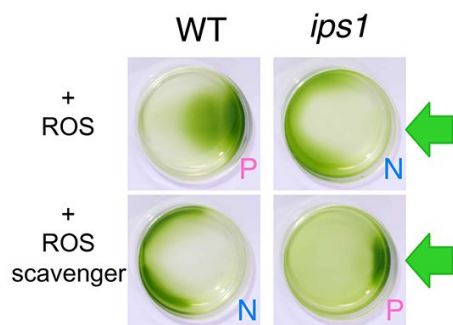


図3：活性酸素（上）または活性酸素消去剤（下）を加えた培養液をディッシュに入れて右から光を当てた。WT（野生株）はそれぞれ正、負の走光性を示しているが、*ips1* 株は逆符号の走光性を示している。

1.と同様の解析をした結果、*ips1* の原因遺伝子はカロテノイド色素生合成経路の一部であるフィトエン合成酵素であり、活性部位

に点変異があることがわかった。これは既に報告のある変異株の allele であることがわかったため、*ips1* の名前を *lts1-211* とすることにしたい。

カロテノイド色素は、クラミドモナスの光受容体を裏打ちする位置の顆粒層に存在し、光反射板として機能する。光受容体との位置関係によって、クラミドモナス細胞は細胞の外から入射する光だけを認識する高指向性光受容をする。*lts1-211* は、この色素を失った結果細胞内を透過する光も認識するようになり、かつ細胞が凸レンズとして振る舞うことから光源方向を誤認していることがわかった(Ueki, Ide et al., 2016 PNAS)。これは細胞の光方向認識の初期過程の重要な知見となった。

(3) 鞭毛内酸化還元電位の測定

細胞内酸化還元電位は、これまでさまざまな細胞で、さまざまな手段で計測されてきた。しかし、その重要なツールである酸化還元電位感受性蛍光タンパク質は、多くの場合 pH にも感受性であるため、その正確さが問われていた。

研究協力者である久堀教授、杉浦博士らが開発した Oba-Qc は生理的な pH レンジで蛍光強度がほとんど変化しないというメリットをもつ一方で、1 波長励起であり定量に向かないというデメリットももっていた。そこで我々は Oba-Qc を鞭毛の周期性を司るタンパク質との融合タンパク質として発現させることで、発現量を制御するというアイデアで Oba-Qc のデメリットを解消した。その結果、鞭毛内の酸化還元電位の測定に成功した(図4)。意外なことに、通常還元的といわれている明条件のほうが、酸化的といわれている暗条件よりも酸化還元電位が高い = 酸化的であった。これは今後光合成と酸化還元電位の関係を考える上で重要な知見になると考えられる(Nishimaki et al., in preparation)。

	明条件	暗条件
蛍光像		
還元率	0.29 (n=10)	0.68 (n=10)
酸化還元電位 (mean ± S.E. mV)	-243.8 ± 7.1 (n=10)	-289.5 ± 6.4 (n=10)

図4：クラミドモナス鞭毛に酸化還元電位感受性蛍光タンパク質 Oba-Qc を発現させ、*in vitro* で描いた校正曲線をもとに酸化還元電位を測定した。

最後に、研究計画開始当初の第一目標であった「ステート遷移と走光性符号の連関」についてネガティブな結果となったが、それをきっかけとして立案したその他の研究によって重要かつ意外なくつかの発見をすることができた。期間中に複数のメディア掲載を受け、また論文賞の受賞をしたことから、それらの発見の重要性は客観的にも評価していただけたものと考えている。延長期間も含めて4年間の科研費の援助に心から感謝する。

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 8 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)
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.

Owa, M., Furuta, A., Usukura, J., Arisaka F., King, S.M., Witman, G.B., Kamiya, R., Wakabayashi, K. (2014)

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 51 件)

1. "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)

2.

Sign-Control of Chlamydomonas Phototaxis by Redox Poise

Ken-ichi Wakabayashi

16th International Congress on Photobiology
Sep.8-12, 2014 Universidad Nacional de Cordoba, Cordoba (Argentina)

3.

Regulation of flagellar beating studied using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Ken-ichi Wakabayashi

The 17th SANKEN International Symposium 2014

Joined with The 2nd International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project

“HUMAN SENSING” considering from the behavior of substances ranging from molecules to organisms

Jan. 21-22 2014 Ichō-kaikan, (Osaka, Suita)

4.

Structure and properties of the Outer Dynein Arm Docking Complex in Chlamydomonas

Ken-ichi Wakabayashi

International workshop Dynein2013

Oct.31-Nov.3 2013 Orbis Hall, (Hyogo, Kobe)

〔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

若林憲一 researchmap

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

廣野 雅文 (Masafumi Hirono)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：10212177

(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

杉浦 一徳 (Kazunori Sugiura)

東京工業大学・科学技術創成研究院・博士研究員

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)

東京工業大学・資源化学研究所・博士研究員