

緑藻クラミドモナスの走光性レドックス調節の分子機構

Molecular basis of redox regulation in *Chlamydomonas* phototaxis

(日本動物学会推薦)

代表研究者 東京工業大学 若林 憲一 Tokyo Institute of Technology Ken-ichi WAKABAYASHI

The unicellular green alga *Chlamydomonas* shows positive or negative phototaxis depending on the light intensities, circadian rhythms, etc. Switching of the phototactic sign is important for the cells to stay under proper light conditions for photosynthesis. However, its mechanism has been unclear. Recently, we showed that the cellular redox poise determines the phototactic sign: cells show positive phototaxis after treatment with reactive oxygen species (ROS), whereas they show negative phototaxis after treatment with ROS quenchers. To understand the regulatory mechanism of this redox-dependent sign-control, we isolated a new mutant that responds to the treatment with redox reagents in an opposite manner to that of wild type and named it *ips1* (inverse phototactic sign 1). Using next-generation sequencing, we identified a mutation in a gene that functions in a carotenoid biosynthesis pathway. Interestingly, *ips1* mutant cells do not have the eyespot. Currently we are analyzing how eyespot-less mutant cells show opposite sign of phototaxis.

研究目的

細胞には細胞質酸化還元状態を「やや還元的」状態に保つレドックス(reduction-oxidation)恒常性が働いている。このことは、タンパク質・脂質などの不可逆的酸化変性を防ぐなど、生体機能の維持にとって重要な役割を果たしていると考えられる。一方で、呼吸活性や光合成活性などの理由で、細胞内は一過的・局所的に酸化的または過剰に還元的に変化し得る。この変化がシグナルとなり、転写因子の活性化など様々な細胞の機能を調節する(レドックス調節と呼ばれる)ことが近年次々に判明している。

我々は緑藻クラミドモナスを用いて鞭毛運動の調節機構について研究してきた。クラミドモナスは淡水性単細胞緑藻であり、2本の鞭毛を巧みに操って走光性を示す。しかし、クラミドモナスがどのような条件で正の走光性(光源に向かう)と負の走光性(光源から逃げる)を入れ替えるのか、長い間謎であった。我々は以前、細胞質レドックス状態変化に応じて鞭毛運動が調節を受けること(文献1)、さらに酸化的に傾くと細胞が正の走光性を、過還元傾向に傾くと負の走光性を示すことを明らかにした(文献2)。これらはレドックスが細胞

行動に関わることを示した初めてのケースである。光合成活性が細胞内レドックス状態を変化させることが知られているため、走光性には細胞ごと葉緑体を動かすことによって受容する光強度を変化させて細胞内レドックス状態を維持する、「レドックス恒常性」のためのフィードバック行動としての側面があるのではないかと考えられる。しかし、この調節の分子メカニズムは全くわかっていない。

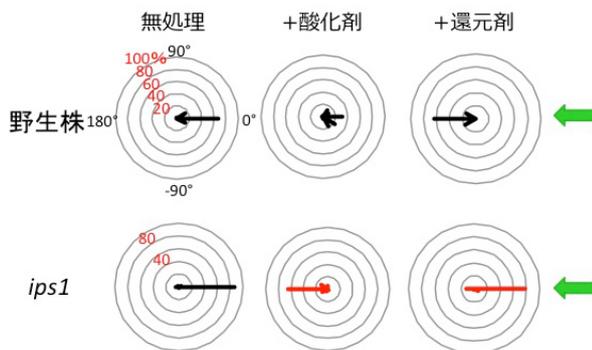
我々は、細胞のレドックス状態のセンシングから始まって鞭毛運動調節を行うまでのシグナリング経路の分子の実態を、新たに単離したクラミドモナスのレドックス感受性突然変異株の解析によって明らかにすることを目的として研究を行ってきた。

研究経過

(1) クラミドモナスの新奇走光性符号異常株の単離と解析

クラミドモナス野生株に紫外線照射による変異導入を行ったのち、「酸化処理をしても負の走光性を示す」という基準で新奇ミュータントのスクリーニングを行った。得られた株に対して数度親株との戻し交配を行ったのち、*ips1*(inverse phototactic sign 1)と名

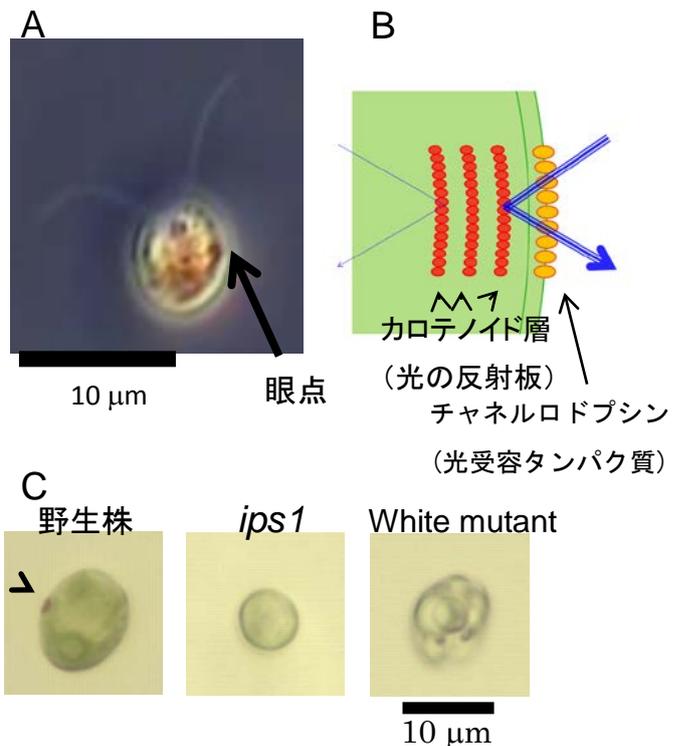
づけた。*ips1* 株の走光性を観察したところ、通常は野生株と同様に正の走光性を示すが、酸化処理によって負の走光性を、還元処理によって正の走光性を示すという、「レドックス薬剤への応答性が野生株と逆」であることを確かめた。この変異株の原因遺伝子が、細胞内のレドックス状態のセンシングにかかわる可能性が高いと考え、遺伝子解析を行った。



走光性の定量結果。0° の方向から光を当てた際の、各角度に泳いだ細胞の割合を極型ヒストグラムで示した。*ips1* 株は酸化・還元処理をすると野生株と逆方向に泳ぐ。

ips1 株の原因遺伝子を同定するために、まず東京大学大学院理学系研究科・廣野雅文准教授との共同研究により、PCR 多型を用いた遺伝子マッピングを行った。この結果、ある染色体上の数百 kb の範囲にまで遺伝子の存在可能性のあるエリアを絞ることができた。次いで、基礎生物学研究所・重信秀治特任准教授との共同研究で、次世代シーケンス法による *ips1* 株の全ゲノム解読を行った。マッピングで絞った領域について、*ips1* 株、その親株、公開されているクラミドモナスゲノムデータの相互比較を行った結果、カロテノイド生合成に関わる遺伝子に 1 アミノ酸残基の置換が生じていることを見出した。

クラミドモナス細胞には、眼点とよばれる赤い点状の器官のすぐ近傍の細胞膜に、光受容タンパク質「チャンネル型ロドプシン」が存在する。眼点はカロテノイド色素を含んだ顆粒が配列した構造であり、これらが光の反射板として機能することで、チャンネル型ロドプシンは「細胞の外側から差す光」のみに反応する高指向性を持つと考えられている。*ips1* 株を細胞レベルで詳細に観察すると、眼点が存在しないことが明らかになった。



A. クラミドモナスの位相差顕微鏡像。2本の鞭毛、1つの眼点をもつ。B. 眼点の模式図。光受容体チャンネルロドプシンを裏打ちするようにカロテノイド顆粒層が存在する。C. クラミドモナス細胞の明視野顕微鏡像。野生株に見える眼点(矢じり)が、*ips1* と White mutant には見えない。

ips1 株はその後解析を続けているが、残念ながら野生型遺伝子導入によるレスキュー実験が成功していない。点変異の遺伝子産物が存在するため、たとえ野生株遺伝子を導入しても、ドミナント・ネガティブな表現型を示している可能性が高い。しかし、基礎生物学研究所の皆川純教授、得津隆太郎助教との共同研究により、*ips1* 株の細胞内カロテノイド量が野生株と比べて著しく低いことを逆相 UPLC 法によって確認することができた。眼点が存在しないことと合わせて、*ips1* 株がカロテノイド生合成異常株であるという状況証拠がかたまりつつある。

(2) クラミドモナスの負の走光性を示す *agg1* 変異株の解析

公開されている変異株ライブラリーに、*agg1* と呼ばれる「強い負の走光性を示す」株が存在する。(室内照明により、培養液をいれた試験管の底に凝集 aggregate することからそう呼ばれる。) この株は通常は野生株と逆の負の走光性を示すものの、レドックス薬剤処理後は野生株と同じ符号の走光性を示す。このことから、*agg1* 株は走光性符号を入れ替える酸化還元レベル(電位)の閾値が著しく酸化側に偏っている、センシング異常の変異株であると考えられる。

ips1 株と同様にして遺伝子マッピングおよび次世代シーケンスを行ったところ、機能未知の遺伝子にトランスポゾンが挿入されていることがわかった。この遺伝子の cDNA を調製し、*agg1* 株に導入したところ、表現型を相補して正の走光性を示すようになった。現在、この遺伝子産物の局在などについて詳細に調べている。

(3) 新奇走光性異常突然変異株の単離

当初より研究計画にあった *ips1*, *agg1* 株の原因遺伝子同定に成功したが、まだこれらの遺伝子が直接細胞内レドックスセンシングおよびシグナリング経路に寄与しているかどうか分からない。これらの研究を続けることと並行して、新たに変異株を単離することとした。これまでに「走光性」と「レドックス」を組み合わせた変異株スクリーニングを行った研究例はないため、これまでに見つからなかった新しい変異株が得られると考えられる。

クラミドモナス野生株に、抗生物質パロモマイシン耐性遺伝子である *aphVIII* の発現ベクターをもちいて形質転換した。*aphVIII* 配列が挿入された部位に存在する遺伝子が破壊され、その株はパロモマイシン耐性を獲得する。現在、耐性獲得株ライブラリーに対して走光性観察を行い、符号異常株のスクリーニングが進行中である。

考察

これまでに見つかったカロテノイド生合成経路変異株は、通称ホワイトミュータントと呼ばれる(文献 3)。これらは明所で培養すると致死であり、暗所で培養すると緑色色素を欠いた白い細胞をもつ。先行

研究においては、ホワイトミュータントは走光性を示さないことが発表されていた。本研究で単離・解析した新たなカロテノイド生合成変異株 *ips1* は、光の下でも緑色の野生株とほとんど変わらない細胞を形成し、暗闇ではホワイトミュータントにやや似た薄緑の細胞色を示す。そして、レドックス薬剤処理後の符号こそ逆であるものの、はっきりとした走光性を示す。我々の観察から、ホワイトミュータントは著しく運動性が低下しているため、走光性を示さないように誤認されていた可能性がある。

ips1 株の走光性符号逆転表現型の原因として、カロテノイドの量が問題なのか、あるいは眼点の存在が問題なのか。既に単離されている眼点欠失株の走光性符号を調べたところ、予備的な結果では *ips1* 株と同じく走光性符号が逆になった。このことから、後者の「眼点の欠失」が主な原因である可能性がある。これまでは、眼点が光の反射板として存在することが走光性の発現に重要な役割を果たすと考えられてきたため、この知見は藻類の走光性発現のメカニズムの理解に再考を促すものである。

では、なぜ符号が逆になるのだろうか。仮に細胞自体が凸レンズのような役割を果たすとしたら、細胞がある方向から浴びた光は細胞の反対側に収束する。そのような場合、カロテノイド層の有無によって、チャンネル型ロドプシンが「光が強い」と感じる側が細胞の外側と内側で入れ替わるはずである。(たとえばチャンネルロドプシン側に光源がある場合、カロテノイド層があれば光源側にチャンネルロドプシンがあるときのみ光受容されるが、眼点がないと細胞が回転して反対側にチャンネルロドプシンが存在するときに「より強い光」を受容することになる。) そのようなメカニズムで眼点欠失が走光性符号を入れ替えている可能性がある。ただ、実際には走光性符号が逆転するのは「レドックス薬剤を投入したときのみ」であり、薬剤なしでは野生株も他の眼点欠失株も正の走光性を示す。眼点に存在するカロテノイドがレドックス制御に直接関わる可能性も残っている。今後、*ips1* や他の眼点欠失ミュータント細胞の詳細な運動解析によって、光を感じて遊泳方向を変化させる際の細胞の挙動を明らかにしていきたい。さらに新奇の変異株も解析して、細胞内レドックス状態センシングと運動方向変化までの機序を分子レベルで記述することに挑戦していきたい。

参考文献

1. Wakabayashi, K., and King, S.M. (2006)
Modulation of *Chlamydomonas reinhardtii*
Flagellar Motility by Redox Poise
Journal of Cell Biology 173:743-54
2. Wakabayashi, K., Misawa, Y., Mochiji, S., and
Kamiya, R. (2011)
Reduction-oxidation poise regulates the sign of
phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*
*Proceedings of the National Academy of Sciences of
the United States of America* 108:11280-4
3. McCarthy, S.S., Kobayashi, M.C., Niyogi, K.K.
(2004)
White mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* are
defective in phytoene synthase.
Genetics 168:1249-57

研究の発表

口頭発表

1. Ken-ichi Wakabayashi (招待講演)
Regulation of flagellar beating studied using the
unicellular green alga *Chlamydomonas
reinhardtii*
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 Icho-kaikan, Suita,
Japan
2. 持地翔太、井手隆広、山口勝司、重信秀治、
神谷律、廣野雅文、○若林憲一
クラミドモナス走光性符号異常ミュータン
トの解析

生体運動研究合同班会議 千葉 (千葉大学)
2014年1月10-12日

3. 持地翔太、井手隆広、山口勝司、重信秀治、
神谷律、廣野雅文、○若林憲一
クラミドモナス走光性符号異常ミュータン
トの次世代シーケンスによる解析
第10回クラミドモナス研究会 岡崎 (基礎
生物学研究所) 2013年11月29-30日
4. Ken-ichi Wakabayashi (招待講演)
Redox Regulation of Cell Motility in the Green
Alga *Chlamydomonas reinhardtii*.
The 25th CDB meeting “Cilia and
Centrosomes: from Fertilization to Cancer”
June 17-18 2013 RIKEN CDB, Kobe, Japan
5. 若林憲一 (招待講演)
緑藻クラミドモナスの走光性符号調節
第3回微細藻類研究会 岡崎 (岡崎カンフ
ァレンスセンター) 2013年6月13-14日
6. 若林憲一 (招待講演)
緑藻クラミドモナスの運動とレドックス制
御
第54回日本植物生理学会年会 (招待講演)
岡山 (岡山大学) 2013年3月21日
7. 若林憲一
クラミドモナスの鞭毛運動マシナリー
第85回日本生化学会大会 福岡 (福岡国際
会議場) 2012年12月15日

誌上発表

1. 荒井 祐介, 若林 憲一, 吉川 雅英, 奥 寛雅,
石川 正俊 暗視野顕微鏡法におけるクラミ
ドモナスの三次元トラッキング 日本ロボ
ット学会誌 Vol. 31 (2013) No. 10 p.
1028-1035