

黄色植物フシナシミドロの光応答戦略

-転写因子として働く青色光受容体オーレオクロム-

石川 美恵¹, 高橋 文雄^{1,2}

1. 東北大学大学院 生命科学研究所
〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

2. 科学技術振興機構 さきがけ
〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

Light-responsive strategy in stramenopile alga, *Vaucheria* -Blue-light receptor, AUREOCHROME, act as a transcription factor-

Key words: Aureochrome; Blue-light receptor; Stramenopiles; transcription factor; *Vaucheria*

Mié Ishikawa¹ & Fumio Takahashi^{1,2}

1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
2-1-1, Katahira, Aoba-Ku, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan
2. PRESTO, Japan Science and Technology Agency
4-1-8, Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

筆者らの研究グループは、黄色植物フシナシミドロ (*Vaucheria*) から転写因子である bZIP ドメインと LOV ドメインを持つ青色光受容体オーレオクロム (Aureochrome) を発見した。本総説では、オーレオクロムの機能とその系統関係について紹介する。

1. はじめに-青色光応答反応と青色光受容体の発見-

植物にとって、光は光合成を行いエネルギーを獲得するためだけではなく、運動、発生、生殖といった生命活動をコントロールする信号 (情報) として必須である。植物の光応答反応の有効波長は、赤色光・遠赤色光と青色光であり、種子発芽の調節や胚軸成長の抑制は赤色光・遠赤色光反応である。また、植物が光の方向に向かって屈曲する光屈性、弱い光または強い光で細胞内の葉緑体が光に向かって集合/逃避する葉緑体光定位運動、気孔の開口などは代表的な青色光反応である。

赤色光・遠赤色光反応の受容体は、1959年、トウモロコシの黄化芽生えから抽出され (Butler *et al.* 1959)、フィトクロム (Phytochrome) と名付けられた。フィトクロムの発見から、赤色

M. Ishikawa & F. Takahashi- 1

光・遠赤色光反応はより詳細な研究がされている (長谷 2001)。一方で、青色光応答反応の光受容体の実体は不明のまま、生理学的、細胞学的、生化学的な解析が続けられてきた (飯野 2001)。1993年に、シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) 突然変異体の解析から最初の青色光受容体クリプトクロム (Cryptochrome) が発見され (Ahmad and Cashmore 1993)、その後 1990年代後半には光屈性の青色光受容体としてフォトリポピン (Phototropin) が同定された (Huala *et al.* 1997, Christie *et al.* 1998)。フォトリポピンは光受容ドメインである二つの LOV (Light-Oxygen-Voltage) ドメインと C 末端側のセリン/スレオニンキナーゼからなり、光屈性だけではなく葉緑体光定位運動や気孔の開口、葉の展開などへの関与がその後明らかになった (Kagawa *et al.* 2001, Kinoshita *et al.* 2001, Sakamoto and Briggs 2002)。1990年代の青色光受容体の発見によって、青色光反応の研究は、それまでの生理学的、細胞学的な解析から分子生物学的な解析へと進展した。フォトリポピンの光受容ドメインである LOV ドメインは、chromophore としてフラビンモノヌクレオチド (FMN) を結合し、青色光を受容する。LOV ドメインは、菌類やバクテリアの青色光受容体にもみられ、真核生物から原核生物まで広く存在していることが明らかになっている (Crosson *et al.* 2003)。生命は海中で誕生し、長い時間をかけて多様化し、陸上に進出してきた。青-緑の波長域の光しか届かない海中で誕生した生命が、青色光受容システムを発達させてきたことは当然の成り行きかもしれない。

2. フシナシミドロの青色光受容体オーレオクロム

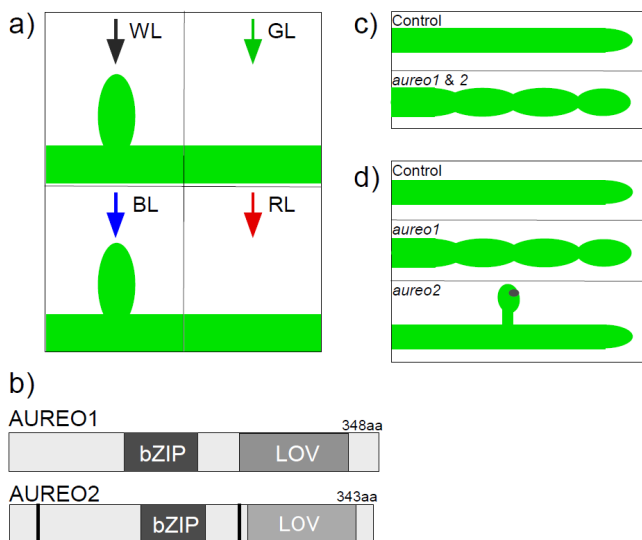


図 1. フシナシミドロオーレオクロム

a) フシナシミドロ青色光形態形成反応。WL, BL 照射で枝を形成。GL, RL では枝は形成されない。b) オーレオクロムの構造。AUREO2 は 2 か所のイントロン(黒線)がある。c) RNAi 実験 1. AUREO1,2 とともにノックダウン。d) RNAi 実験 2. AUREO1,2 をそれぞれノックダウン, *aureo2* には有性生殖器官が発達。

(Takahashi *et al.* 2001)。

私たちは、シロイヌナズナのフォトリポピン発見をきっかけとして、フシナシミドロでの

フシナシミドロは黄色植物門黄緑色藻綱に属する藻類であり、自然界では湖沼、沿岸から河口域、湿った土壤にまでひろく生息している。管状の多核細胞であり、その細胞から分枝が起こり、活発に先端成長しマット状に生育する。

フシナシミドロが、陸上植物同様の光屈性、葉緑体光定位運動を示すことは 100 年以上前に既に記載されていた (Oltmanns 1892, Senn 1908)。1975 年には、Kataoka がフシナシミドロの細胞に青色光を照射すると、照射域からの分枝が誘導できることを明らかにし (図 1a, Kataoka 1975)、その後もフシナシミドロの青色光反応の生理学的解析は続けられてきた (Blatt and Briggs 1980,

光受容体探索を始めた。果たして、フシナシミドロの青色光応答反応もフォトトロピンによって制御されているのだろうか？それとも他の光受容体が制御しているのか？まずは、フォトトロピンの LOV ドメインをもとに、フシナシミドロから LOV ドメインの単離を試みた。フシナシミドロからフォトトロピンは見つからなかったが、それまでの光受容体とは全く異なる構造の青色光受容体を発見した (図 1b, Takahashi *et al.* 2007)。この光受容体は N 末端側に転写因子である bZIP ドメイン, C 末端側に LOV ドメインを持つ新しいタイプの光受容体であり, ラテン語の aureus (金, 金色の) からオーレオクロム (Aureochrome) と名付けた。2つのフシナシミドロオーレオクロム (オーレオクロム 1, 2) は, フシナシミドロ細胞内で二量体を形成し, 青色光を受容することで特定の遺伝子発現を制御すると考えられる。

フシナシミドロオーレオクロムを RNAi 処理しノックダウンさせると, フシナシミドロの形態に異常が見られ, 青色光を照射しても枝の形成は起こらなかった (図 1c)。ところが, オーレオクロム 2 のみをノックダウンすると, 有性生殖器官が形成された (図 1d)。これは, 正常な細胞では, オーレオクロム 2 が枝原基から有性生殖器官への分化を抑制していることを示しているのかもしれない。この実験から, オーレオクロムが青色光形態形成反応の光受容体であることが明らかになった。

フシナシミドロではオーレオクロムの機能が明らかになったが, 陸上植物での青色光受容体研究が飛躍的に進展しているのに比べ, 黄色植物での研究はフシナシミドロでの解析があるのみである。私たちは, フシナシミドロを含む黄色植物には青色光応答反応を持つものが数多くあること, 陸上植物を含む緑色植物とは全く異なる進化過程を持つことに注目し, 黄色植物およびその近縁生物でのオーレオクロムの単離を試みた。

3. オーレオクロムは黄色植物のみが保持する

黄色植物とは聞き慣れない名前であるが, 我々日本人には非常になじみが深い。海藻のコンブやワカメから植物プランク

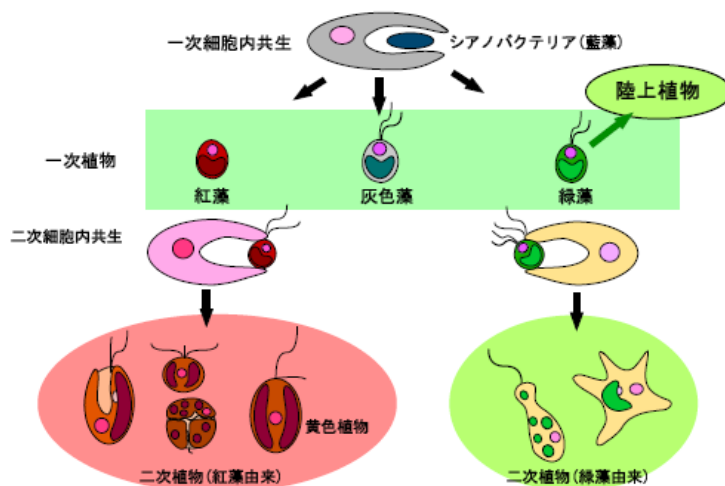


図 2. 一次植物と二次植物

不等長な 2 本の鞭毛を持ち, この遊泳細胞の長い鞭毛 (前鞭毛) に管状の鞭毛小毛がみられる。高校の教科書では植物とは光合成を行う (葉緑体を持つ) 生物と述べており, 生物の分類は, モネラ界, 原生生物界, 植物界, 動物界, 菌界の五つである (五界説)。電子顕微鏡に

トンと呼ばれる単細胞のケイ藻類まで, 非常に多様な生物が含まれる。水圏の一次生産者として繁栄しており, 地球上の炭素循環にも多大な影響を持つ。黄色植物は光合成を行うが, 近縁な葉緑体を持たず光合成を行わない仲間も含めストラメノパイル (Stramenopiles: Stramenen = 麦わら, pilus = 毛) と呼ばれる。

ストラメノパイルの遊泳細胞は,

よる微細構造の解析や分子生物学の発達にともない、現在の植物は緑色植物、紅色植物（紅藻）、灰色植物（灰色藻）の三系統のみをさすことが多い。これら三系統は全てシアノバクテリア（ラン藻）由来の葉緑体を持っている点で共通している（一次植物）。一方、コンブ、ワカメなどの黄色植物は、従属栄養性の真核生物が、一次植物である紅藻を細胞内に共生させることで、二次的に光合成能力を獲得した生物である（二次植物）。同様の二次植物には、クリプト植物やハプト植物があり、ミドリムシは緑藻起源の葉緑体を持つ二次植物である（図2）。このような進化的背景を踏まえ、私たちは、オーレオクロムがフシナシミドロだけではなく、ストラメノパイル、さらには他の紅藻由来の二次植物にも共通の光受容体ではないかと考え、オーレオクロムオルソログの探索を行った。LOV 縮重プライマーを用いた RT-PCR と RACE 法、公開されているゲノム情報を元に BLAST 検索を行い、ストラメノパイルの主要な 6 綱（光合成型 5 綱、非光合成型 1 綱）と近縁生物でのオーレオクロムの有無を明らかにした（表 1）。オーレオクロムは、ストラメノパイルのうち光合成を行う藻類、すなわち黄色植物のみから見つかった。ストラメノパイルのうち光合成を行わないミズカビ（*Saprolegnia*）や *phytophthora* からは検出できず、ハプト植物やクリプト植物、そしてこれら

ストラメノパイル	オーレオクロムの有無
光合成を行う（黄色植物）	
黄緑色藻 <i>Vaucheria f rigida</i>	あり
褐藻 <i>Fucus distichus ssp. evanescens</i>	あり
ケイ藻 <i>Thalassiosira pseudonana</i>	あり (BLAST)
<i>Paheodactylum tricorutum</i>	あり (BLAST)
ラフィド藻 <i>Chattonella antiqua</i>	あり
ペラゴ藻 <i>Aureococcus anophagefferens</i>	あり (BLAST)
光合成を行わない	
卵菌 <i>Saprolegnia f erax</i>	未検出
<i>Phytophthora</i> 3種	なし (BLAST)
クリプト植物 <i>Cryptomonas tetrapyrenoidosa</i>	未検出
ハプト植物 <i>Prymnesium parvum</i>	未検出 (LOVのみあり)
紅色植物 <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	なし (BLAST)

表 1. オーレオクロムの有無

らの生物の葉緑体の起源である紅藻シアニディオシゾン（*Cyanidioschyzon*）ゲノムからもオーレオクロムは見つからなかった。これらの単離したオーレオクロムは、bZIP ドメイン、LOV ドメイン共に良く保存されていた。転写因子である bZIP ドメインでは、塩基性アミノ酸に富む basic region とその中に含まれる DNA 結合領域、ロイシンジッパーを構成する 7 アミノ酸ごとに含まれるロイシンが良く保存されていた。LOV ドメインでも、光受容機能に必要な FMN とのを結合に関与する 11 個のアミノ酸に重大な置換はほとんど見られず、良く保存されていた。おそらく新しく単離されたオーレオクロムも二量体を形成し、青色光を受容すると考えられる。

このことから、オーレオクロムは黄色植物、つまり光合成を行うストラメノパイルに共通の光受容体だと言える（Ishikawa *et al.* 2009）。しかし、この光受容体がどのように成立したのかはまだ謎である。

4. LOV 光受容体は独立に進化

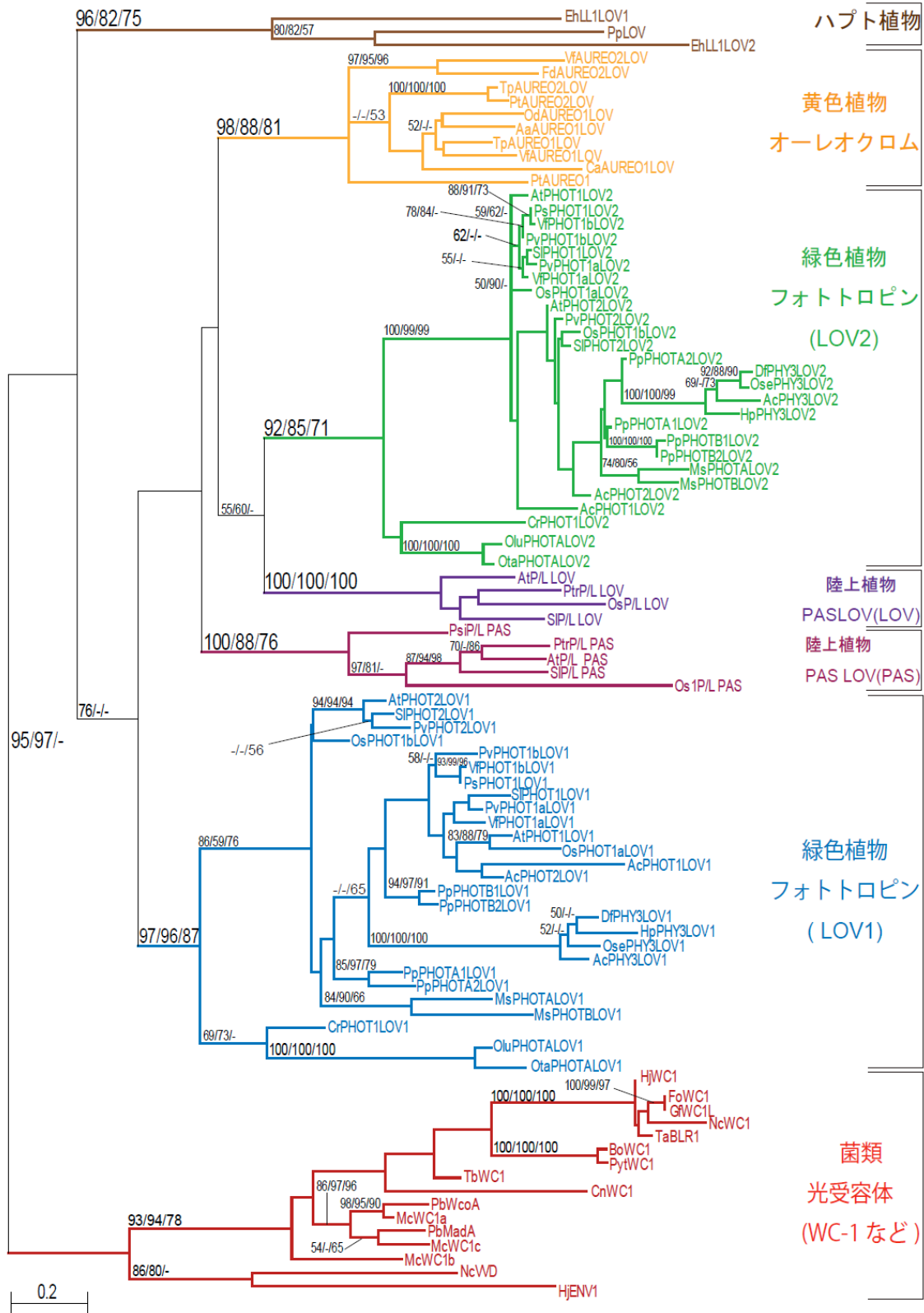


図 3. LOV ドメインを用いた最尤法系統樹

黄色植物 10 OTU, 緑色植物 63 OTU, ハプト植物 3 OTU, 外群は菌類(16 OTU)を用いた。ブートストラップ値は 1000 回反復, 50%以上の値のみを ML/NJ/MP の順に示す。(Ishikawa *et al.* 2009 改変)

M. Ishikawa & F. Takahashi- 5

LOV ドメインは系統にまたがって保持されている。どのように LOV ドメインは進化してきたのか？菌類の WC-1, 緑色植物のフォトトロピンと機能未知の PASLOV ドメイン (LLP. Kasahara *et al.* 2010) , 黄色植物のオーレオクロム, およびハプト植物の LOV ドメインの計 6 つを用い, 系統解析を行った。解析方法は, 最尤法 (ML), 近隣結合法 (NJ), 最節約法 (MP) の 3 つの方法で行い, 図 3 に ML で構築した系統樹を示す。6 つの異なる LOV ドメインはそれぞれ単独でクレードを形成しており, それぞれの枝の分岐は高い信頼度 (ML では全て 85% 以上) で支持された。つまり, LOV ドメインをもつ光受容体は, かなり早い段階でそれぞれ独立に進化してきたと考えられる。

それぞれの LOV クレードの分岐順序については今回の解析では明らかにならなかったが, オーレオクロム LOV クレードは, フォトトロピンの LOV2 クレードと隣り合う位置に現れた点が興味深い。アミノ酸配列の比較でも, オーレオクロムの LOV ドメインはフォトトロピンの LOV1 と LOV2 のうち LOV2 により配列が似ており, 11 個のアミノ酸比較でも, オーレオクロム LOV はフォトトロピン LOV2 に近かった (Ishikawa *et al.* 2009)。シロイヌナズナやホウライシダ (*Adiantum capillus-veneris*) では, フォトトロピン LOV1 ドメインを削り LOV2 ドメインのみにした場合も, 光受容体として機能することが報告されている (Christie *et al.* 2002, Kagawa *et al.* 2004) 。未知の祖先型 LOV ドメインは, 現在のフォトトロピンの LOV2 ドメインやオーレオクロムの LOV ドメインに非常に似ていたのではないかと推測している。

5. 今後の展開

オーレオクロムが黄色植物の光受容体であることが明らかになったが, それが各々の生物でどのように機能しているのかは未解明であり, 今後の重要な研究課題である。黄色植物では, *Fucus* の青色光による受精卵の極性誘導反応が最も歴史が古く, 詳細な生理学的, 細胞学的解析がなされているが, その光受容体の実体が何であるかは不明のままである (Kropf 1992)。単離されたオーレオクロムは, フォトトロピンやフシナシミドロオーレオクロムとの配列比較から, 光受容能をもつ, すなわち光受容体として機能できると推定している。*Ochromonas* のオーレオクロム LOV ドメインの光受容能や bZIP ドメインが結合する *cis* 配列を決定している。オーレオクロムの解析を通して, *Fucus* の極性誘導反応を始めとした黄色植物の青色光応答反応への理解がさらに深まると期待している。

6. 参考文献

- Ahmad, M., & Cashmore, A.R. 1993. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162-166.
- Blatt, M.R., & Briggs, W.R. 1980. Blue-Light-induced cortical fiber reticulation concomitant with chloroplast aggregation in the alga *Vaucheria sessilis*. *Planta* 147:355-362.
- Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W., & Hendricks, S.B. 1959. Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 45:1703-1708.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., & Briggs, W.

- R. 1998. *Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282:1698-1701
- Christie, J.M., Swartz, T.E., Bogomolni R.A., & Briggs, W.R. 2002. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J.* 32:205-219
- Crosson, S., Rajagopal, S., & Moffat, K. 2003. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42:2-10
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I., Larsen, E., & Briggs, W.R. 1997. *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120-2123
- 飯野 盛利 2001. 青色光受容体研究のたどってきた道. 和田正三・徳富哲・長谷あきら・長谷部光泰 (監修) 植物の光センシング. pp.88-98. 秀潤社. 東京.
- 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
- Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., & Wada, M. 2001. *Arabidopsis* NPL1: A phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291:2138-2141
- Kagawa, T., Kasahara, M., Abe, T., Yoshida, S., & Wada, M. 2004. Function analysis of Phototropin2 using fern mutants deficient in blue light-induced chloroplast avoidance movement. *Plant Cell Physiol.* 45: 416-426
- Kasahara, M., Torii, M., Fujita, A., & Tainaka, K. 2010. FMN binding and photochemical properties of plant putative photoreceptors containing two LOV domains, LOV/LOV proteins. *J. Biol. Chem.* 285: 34765-34772
- Kataoka, H. 1975. Phototropism in *Vaucheria geminata* II. The mechanism of bending and branching. *Plant Cell Physiol.* 16:439-448
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., & Shimazaki, K. 2001. phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414:656-660
- Kropf, D.L. 1992. Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes. *Microbiol. Mol. Biol.* 56: 316-339
- 長谷 あきら 2001. フィトクロム研究のたどってきた道. 和田正三・徳富哲・長谷あきら・長谷部光泰 (監修) 植物の光センシング. pp.34-35. 秀潤社. 東京.
- Oltmanns, F. 1892. Über die photometrischen Bewegungen der Pflanzen. *Flora* 75:183-266
- Senn, G. 1908. Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren. Wilhelm-Engelmann, Leipzig
- Sakamoto, K., & Briggs, W.R. 2002. Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell.* 14:1723-1735
- Takahashi, F., Hishinuma, T., & Kataoka, H. 2001. blue light -induced branching in *Vaucheria*. Requirement of nuclear accumulation in the irradiated region. *Plant Cell Physiol.* 42: 274-285
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 49:19625-19630