

氏名	Yari Kamrani, Yousef
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	総研大甲第 2044 号
学位授与の日付	平成 30 年 9 月 28 日
学位授与の要件	生命科学研究科 基礎生物学専攻 学位規則第6条第1項該当
学位論文題目	Study on the molecular mechanisms for high-light acclimation in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
論文審査委員	主査 教授 長谷部 光泰 教授 皆川 純 教授 上野 直人 教授 鹿内 利治 京都大学 理学研究科

(Form 3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full: Yari Kamrani, Yousef

Title Study on the molecular mechanisms for high-light acclimation in the green alga  
*Chlamydomonas reinhardtii* 緑藻クラミドモナスにおける強光順化の分子機構の研究

*Chlamydomonas reinhardtii* is a ~10- $\mu$ m, unicellular green alga which can be easily grown and uniformly exposed to different light intensities in the laboratory. Each *C. reinhardtii* cell contains a single chloroplast; the photosynthetic apparatus of this alga has many similarities with land plants, which makes it ideal for studying responses to excess light. Strong light intensity leads to harmful overexcitation of the photosystems; in *C. reinhardtii*, LHCSR3 is required for a quick protective response, known as energy-dependent quenching (qE). However, regulation of LHCSR3 gene expression remains to be clarified. Since the majority of photoacclimation analyses has been conducted under the controlled laboratory conditions, physiological responses to natural environmental changes have not been well investigated. In land plants and green algae, light-dark cycles are required to synchronize circadian clocks to multiple physiological responses. However, clock response to high light has been the subject of speculation. Previously, 105 circadian rhythm insertional mutants were isolated as *rhythm of chloroplast (roc)* mutants in *C. reinhardtii*. Very recent research also showed blue light perceived by PHOT (blue light photoreceptor phototropin) mediates the photoprotection of the photosynthetic machinery and gene regulation of LHCSR3 in *C. reinhardtii*. Downstream of PHOT, this signal integrates with another regulatory signal from the chloroplast that carries information about the amount of absorbed light that is not used for CO<sub>2</sub> fixation. This signal relies on photosynthetic electron transfer via an as-yet-unknown mechanism, and further relies on photosynthetic electron flow, which ultimately affects accumulation of LHCSR3 transcript. The aim of my research was to determine how these mechanisms are involved and coordinated in the regulation of LHCSR3 gene under high-light acclimation in *C. reinhardtii*. As a first step I characterized 105 *roc* series mutants by qE values under strong blue and red light and I report ROC75, a putative transcriptional factor as a key component of the central circadian clock, which showed a significantly higher qE value and LHCSR3 protein accumulation than the

(Form 3)

wild type when grown under red light. Further, *LHCSR3* mRNA in *roc75* mutant exhibited a circadian rhythm, with its basal expression level higher than in the wild-type. I therefore conclude that *ROC75* acts as an attenuator for the circadian clock that controls *LHCSR3* expression with red light as a negative stimulus. For the second step, I investigated that calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dependent mechanisms are more substantial to both PHOT-dependent and photosynthetic signaling pathways. However, we know very little about the nature of cytosolic calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) elevation in green algae. Therefore, I introduced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  imaging into *C. reinhardtii* to monitor  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  variations, using confocal microscopy. I found that PHOT was involved in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increases induced by blue light, as  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increased after a few seconds of blue light exposure in the wild-type cells but not in *phot* mutant. Moreover, to elucidate more in details of one of the downstream elements of PHOT, I analyzed the effect of cAMP on  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in the presence or absence of an inhibitor of phosphodiesterase. Based on these results, I conclude PHOT and photosynthesis signals might converge on blue light dependent  $\text{Ca}^{2+}$  release to the cytosol to control *LHCSR3* expression. To reveal additional factors involved in the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling dependent regulation of *LHCSR3*, a high throughput forward genetic approach was used to screen mutants using bioluminescence derived from a luciferase reporter gene fused to a full-length sequence of *LHCSR3* gene. 15 mutants have been isolated, and the genes were identified, which should be characterized in more detail in the future studies. In summary, my findings regarding the involvement of a circadian component into the photoprotection mechanisms provides a new viewpoint for thinking about the adaptive significance of the circadian clock. Herein I present the first evidence of involvement of circadian components into photoprotection in *C. reinhardtii*. From the second and third projects, my findings imply that cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  is important factor for the integrated signal between PHOT and photosynthesis pathways to control *LHCSR3* expression.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 Yari Kamrani, Yousef

Title  
論文題目 Study on the molecular mechanisms for high-light acclimation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

強光は、光合成光化学系にとって有害となるクロロフィルの過剰励起を引き起こす。単細胞緑藻クラミドモナスにおいて、クロロフィルの過剰励起状態は、LHCSR3 タンパク質などを利用した qE クエンチングと呼ばれる物理反応によって安定に消去される。LHCSR3 タンパク質は強光そのものの刺激に伴って発現誘導されるが、これまでの研究から、光合成活性に起因する葉緑体からのレトログレードシグナル(光合成電子伝達シグナル)と青色光受容体フォトトロピン以下のリン酸カスケードが必要なことが知られていたが、より詳細な機構は不明であった。本論文では、まず既存の概日リズム関連変異株の解析、さらに新規スクリーニング系を構築した上での独自の LHCSR3 発現変異株の単離と解析を行った。また、Ca<sup>2+</sup>ライブイメージングと細胞内生理解析を組み合わせることで、クラミドモナス細胞が強光シグナルを受けてから、LHCSR3 遺伝子発現に至るまでのシグナル伝達系を解析した。

出願者は、第一に、概日リズム変異株のうち野生株と比べて特に qE クエンチングが大きい roc75 変異株の解析を行った。単色光実験と変異株の実験より、未知赤色光受容体と植物型青色光受容体であるクリプトクロムが ROC75 転写調節因子を正に制御しており、さらに ROC75 が LHCSR3 発現の概日リズム振幅を縮小する作用を持つことを明らかにした。第二に、細胞内 Ca<sup>2+</sup>インジケータを利用して、青色光刺激直後の細胞内基底レベルの Ca<sup>2+</sup>濃度変化が野生株とフォトトロピン欠損株で異なることを明らかにした。これは青色光刺激がフォトトロピンによって受容され、そのシグナルが下流で Ca<sup>2+</sup>濃度変化を引き起こすことを示唆しており、続いて得られた阻害剤実験、代謝物定量実験の結果と合わせ、フォトトロピンからのシグナルが、ER 上のレセプターにおいて、葉緑体からの光合成電子伝達シグナルである Ca<sup>2+</sup>と合流することで、CICR (Calcium-Induced-Calcium-Release) を引き起こし、それが Ca<sup>2+</sup>インジケータによって捉えられたとの仮説を提出した。第三に、LHCSR3 プロモーターの下流にルシフェラーゼをマーカーとして配列させた独自スクリーニング系を構築し、これを利用して新規の LHCSR3 発現変異株 6 種の単離を報告した。その中で特にカルシウムシグナルとの関連からも注目されるトランスポーター変異株について、より詳細な解析を行った。同トランスポーターは植物細胞での機能は解析されていないが、動物細胞のミトコンドリアでは Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターとして機能していることから、出願者は葉緑体のチラコイド膜上でも Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターとして機能し、強光条件において葉緑体からの Ca<sup>2+</sup>光合成電子伝達シグナル増加に関与し、LHCSR3 発現量を増加させるとの作業仮説を提唱した。

クラミドモナスにおける光保護反応においては、LHCSR3 は主要な役割を果たしている

ことが知られている。その遺伝子発現制御に関しては、葉緑体からの光合成電子伝達シグナルと青色光受容体フォトトロピンシグナル以外のシグナル伝達系の詳細は不明であった。本論文において出願者は、遺伝学と細胞生物学を融合させることにより、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンの関与、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ アンチポーター関与の可能性、概日リズム因子 ROC75 の関与の3つの新しい発見をし、検証可能で具体的なシグナル伝達モデルを提出した。本論文は、光合成研究全般において重要な貢献であり、学位授与にふさわしいものであると審査委員全員が一致して結論した。

---