
Review

ミドリムシにおける光センシングの分子機構

伊関峰生

総合研究大学院大学 葉山高等研究センター
〒240-0193 神奈川県三浦郡葉山町 (湘南国際村)

はじめに

ミドリムシ（本稿では*Euglena gracilis*や*E. viridis*等、光応答の研究に頻用されてきた*Euglena*の総称として用いる）は、理科の教科書にも登場する馴染みの深い原生動物で、植物的側面と動物的側面を併せ持つ生物の例として紹介されることも多い。実際、ミドリムシの仲間（ユーグレナ類）の多くは植物と同様に光独立栄養を営んでおり、なおかつ鞭毛運動によって自ら移動する能力を持つが故に、自らを好適な光環境に置くための光センシング・システムを発達させ、それを有効に利用しているものと思われる。ミドリムシの行動レベルでの光応答（光運動反応）は、大きく分けて3つの現象にカテゴライズされている。すなわち、走光性（phototaxis）、光驚動反応（photophobic response）、光キネシス（photokinesis）、である（Diehn et al., 1977）。走光性は入射する光の方向に依存した指向運動で、光源へ向かう場合を正の走光性、光源から逃げる場合を負の走光性と呼ぶ。一方、光驚動反応や光キネシスは光の方向とは無関係で、前者は光強度の急な変化に応じて運動方向を転換する現象、後者は光強度に応じて異なる運動速度を示す現象である。これらの光運動反応は、微生物の光感覚の好適な例として、古くより研究対象とされてきたが、光センサーの実体を含

めてその分子機構については殆ど未解明のままであった。本稿では、近年筆者らが発見したミドリムシの光回避センサーである光活性化アデニル酸シクラーゼの話題を中心に、ミドリムシの光センシング機構について概観してみたい。

光驚動反応

ミドリムシが光に集まることは古くEngelman (1882)が記載しており、彼は顕微鏡下で光のスポットに泳ぎ込んだミドリムシは何も変化しないが、スポットから泳ぎ出ようとしたミドリムシは光の境界で方向転換するため結果的にスポットの中に集積することを観察している。つまり、明所から暗所への移動に伴う急な光強度の減少に反応して方向転換することが光に集まる現象の素反応となっている。このような、急な光強度の減少への反応をステップダウン光驚動反応と称す。一方、急な光強度の増大に対する反応はステップアップ光驚動反応と称され、こちらは光回避の素反応となる。光集合・光回避といった現象は光の方向とは無関係だが、指向性を持つ応答現象、すなわち走光性にも光驚動反応が寄与するという考え方も古くからあり、Jennings (1904)は、ミドリムシが螺旋を描いて運動するために、その運動に伴う周期的な光減少の刺激に呼応して背面に向けてわずかな方向転換（ステップダウン光驚動反応）を繰り返すことにより、少しずつ光の方向に向かうことになると考えた。

Tel/Fax: +81-46-858-1564

E-mail: iseki_mineo@soken.ac.jp

Received: 24 December 2006

光受容部位（副鞭毛体）

ミドリムシを顕微鏡で観察すると、細胞前端近くにオレンジ色の明瞭な構造体のみとめられる。これは眼点（stigma）で、カロテノイドを含む多数の顆粒から成り、細胞質中に存在する。一方、前端部から突出する鞭毛の基部近くには膨らんだ部分があり、副鞭毛体（PFB, paraflagellar bodyあるいはPAB, paraxonemal body）と呼ばれている。副鞭毛体は、副鞭毛棒（paraxonemal rod: 9+2構造の鞭毛軸糸と平行する繊維構造で、キネトプラスト類やユーグレナ類で特徴的にみられる）に接して存在するタンパク質性の構造体で、鞭毛膜および陥入部の膜を介しながらも常に眼点に近接する位置関係を保っている（図1）。副鞭毛体を最初に記載したのはWager (1900)であり、彼は光を受容した眼点は何らかの仕組みで副

鞭毛体を刺激することにより鞭毛の運動変化を起こすのではないかと考えた。しかしながら、既にその時点から眼点が光受容部位であるかどうかについては議論があり、Mast (1911)はスズ箔の影を投影した顕微鏡下でミドリムシの運動を観察し、影に泳ぎ込んだミドリムシは眼点が影に入る前に応答することから、光に高い感受性を持つ部位は眼点そのものではなく、眼点の凹面に近い位置にあるとした。すなわち、背面から光が入射した際に眼点はその高感受性部位に影を投射することで急な光強度の減少をもたらし、運動方向の転換（ステップダウン光驚動反応）が起こる。そしてJenningsの言うように、一方向から入射する光に対して僅かずつ方向転換を繰り返す結果、その光に向かって進行することになるのである。ここで言う高感受性部位こそが副鞭毛体であり、副鞭毛体がミドリムシの光受容部位であることは長く信じられて今日に至っている(Colombetti et al., 1982; Lebert, 2001)。

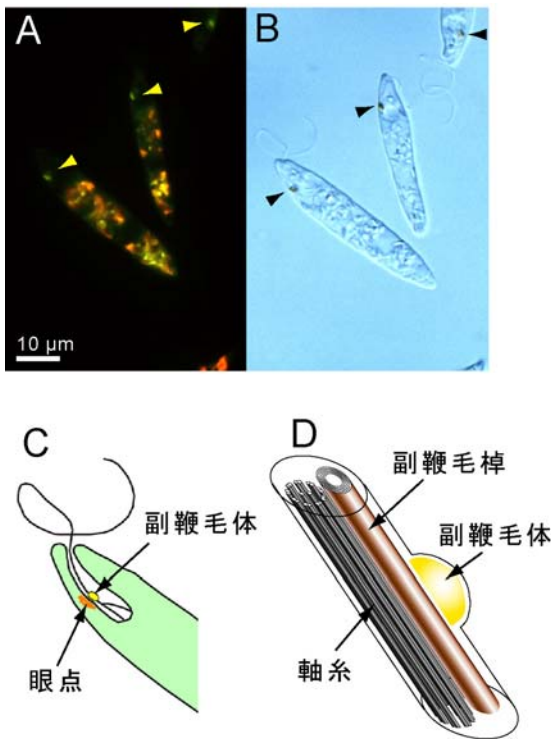


図1 ミドリムシ (*Euglena gracilis*) の副鞭毛体
 A 落射蛍光像 (Blue-Violet励起)。矢印は副鞭毛体を示す。B 明視野像。矢印は眼点を示す。C 副鞭毛体と眼点の位置関係を示す模式図。D 副鞭毛体周辺の構造模式図。カラー写真はpdf (http://www.soc.nii.ac.jp/jsproto/journal/jjp40/jjp_j.html) を参照されたし。

作用スペクトル

ある光応答現象に関わる光センサーを同定しようと考えたとき、第一の手掛かりはその現象の作用スペクトルである。作用スペクトルは、特定の光応答現象を引き起こすのに必要な光子数の逆数を波長に対してプロットしたもので、注意深く測定された作用スペクトルは光センサーの吸収スペクトルと合致する筈である。ミドリムシの波長感受性に関する最初の記載はEngelman (1882)によるもので、彼は微小分光装置を用いて0.45-0.5 μm の青色光にミドリムシが最も良く集まることを報告している。その後、100年余の間に多くの作用スペクトルの報告があり、それらの微細な形状は必ずしも一致しないが、いずれも紫外～青色域の光が有効である事を示している

(Bünning and Schneiderhöhn, 1956; Diehn, 1969; Checucci et al., 1976)。この波長域に吸収を持つ生体色素としてはフラビンがあり、光センサーの候補としてフラビントタンパク質があげられていた。Matsunaga et al. (1998)は、基礎生物学研究所の大型スペクトログラフ (Watanabe et al., 1982) を刺激光源として、複数の運動解析装置 (Takahashi, 2001) を用いて個々の細胞の動きに注目した解析を行うことで、ミドリムシの光驚動反応について詳細な作用スペクトルを決定した。それによれば、ステップアップ光驚動反応では、450 nm付近の青色域および380 nm付近のUV-A域にブロードなピークが見られるほか、280 nm付近のUV-B/C領域に顕著なピークがみとめられた。この形状はフラビンの吸収スペクトルに比較的良好

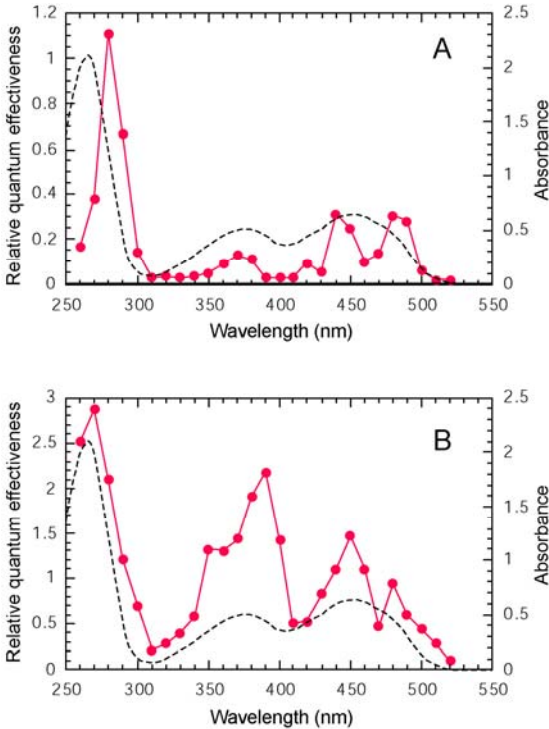


図2 ミドリムシ光驚動反応の作用スペクトル
 A ステップアップ光驚動反応の作用スペクトル (実線) とFADの吸収スペクトル (破線)。B ステップダウン光驚動反応の作用スペクトル (実線) とFADの吸収スペクトル (破線)。(Matsunaga et al., 1998より)

合致しており、フラビンの関与を示唆する。一方、ステップダウン光驚動反応においても同様のピークが現れるものの、UV-A領域のピークがステップアップ光驚動反応のそれに比べて大きい点に違いがみとめられ、フラビン以外の他の色素 (例えばブテリン等) も関与している可能性が示唆された (図2)。

副鞭毛体の分析

副鞭毛体が光受容部位であるならば、そこに存在する色素タンパク質が光センサーであると考えるのは至極当然である。Benedetti and Checcucci (1975) は、蛍光顕微鏡下で副鞭毛体が緑色の自家蛍光を発することを見出した。さらにBenedetti and Lenci (1977) は、顕微分光蛍光測定により副鞭毛体の蛍光スペクトルを測定し、フラビンに特徴的な530 nm付近

のブロードなピークを検出している。また、Ghetti et al. (1982)は波長可変色素レーザーを用いて副鞭毛体の励起スペクトルを測定し、作用スペクトルに類似した周囲に肩を持つ450 nmのピークを報告している。これらのことからフラビンが光受容色素として機能している可能性が強く示唆され、その後、単離した副鞭毛体の蛍光分析 (Schmidt et al., 1990)、液体クロマトグラフィーによる色素タンパク質の分析 (Brodhun and Häder, 1990, 1995) に関する報告が相次いで出されたものの、光センサー本体の同定には至らなかった。その原因はおそらく副鞭毛体の単離法にあり、これらの報告では高カルシウム法等に基づく鞭毛単離を行うことで鞭毛に付着している副鞭毛体を得たとしているが、このような方法では極めて収率が低く、副鞭毛体の殆どは細胞体に残されるのである。そこで筆者らは、細胞破碎と密度勾配遠心による古典的な細胞分画を試み、生化学的に分析可能なレベルの副鞭毛体標品を得ることに成功するとともに、そこから新規フラビントタンパク質を同定した (Iseki et al., 2002)。その概要を次項に記す。

光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC)

筆者らは*Euglena gracilis*の副鞭毛体標品を界面活性剤を含むバッファに溶解し、530 nmの蛍光を指標として液体クロマトグラフィーで分離することにより400 kDa相当のフラビントタンパク質を含む画分を得た。この画分を熱変性させて遊離した色素の蛍光スペクトルはフラビンのそれに一致し、さらに、特徴的なpH依存性を示すことからフラビン種はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) であると同定された。また、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離すると、105 kDaと90 kDaの2本のバンドがほぼ同強度で得られることから、このフラビントタンパク質は2種類のサブユニットから成る、おそらくは四量体であると推測された。それぞれのサブユニットをコードするcDNAの塩基配列から導かれたアミノ酸配列は互によく似ており、2種類の機能ドメインが交互に2つずつ並んだ特徴ある構造を示した (図3; F1, F2, C1, C2)。F1とF2の配列は、紅色光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides*において光合成関連遺伝子の活性化因子として記載されたAppA (Gomelsky and Kaplan, 1995) のN末端領域に類似したもので、AppAはこの領域で1分子のFADを結合している (Gomelsky and Kaplan, 1998)。その後AppAも光センサーとして機能することが明らかにされ (Braatsch et al., 2002; Masuda & Bauer, 2002)、幾つかのバクテリアゲノム配列上に見出された類似の配列と併せて現在では

BLUF (sensors of blue light using FAD)ドメインと称されている (Gomelsky and Klug, 2002)。一方、C1とC2は、クラスIIIアデニル酸シクラーゼの触媒ドメインに類似しており、副鞭毛体標品から精製したフラビンタンパク質の酵素活性を実際に測定してみると、確かにアデニル酸シクラーゼ活性を示すことがわかり、さらには青色光照射下ではその活性が劇的に

に増大することが明らかとなった。アデニル酸シクラーゼは細胞内信号伝達物質として機能するcAMPを生成する酵素で、生物界に広く存在するが、このように光で活性化されるアデニル酸シクラーゼは他に全く知られておらず、ミドリムシから得られたこのフラビンタンパク質は光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC, Photoactivated Adenylyl Cyclase) と名づけられた。

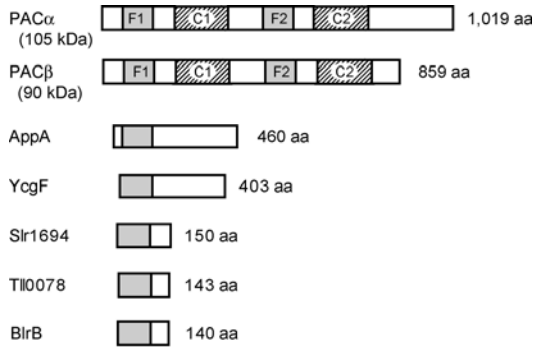


図3 光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) および類似のフラビン結合領域 (BLUFドメイン) を持つタンパク質の一次構造模式図。

AppA, 紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の光合成遺伝子発現制御因子; YcgF, 大腸菌の機能未知タンパク質; Slr1694, シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の走光性制御因子; Tll0078, シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の機能未知タンパク質; BlrB; *R. sphaeroides* の機能未知タンパク質。

PACの細胞機能

筆者らは、線虫 (Fire et al., 1998) やトリパノソーマ (Ngô et al., 1998) で確立されていたRNAiの手法をミドリムシに適用することにより、PACの機能解明を試みた。各サブユニットの配列に相当する二本鎖RNAを *in vitro* 合成し、エレクトロポレーションによってミドリムシに導入すると、内在的なPACのmRNAが検出されなくなるとともに、副鞭毛体が消失した。このことは、PACが副鞭毛体の主要な構成成分である事を意味する。また、これらの細胞のステップダウン光驚動反応は通常と変わらないが、ステップアップ光驚動反応は全く示さなくなることから、PACは光回避のセンサーとして機能することが示唆された (図4、Iseki et al., 2002)。さらに、Yoshikawa et al. (2005)は、ミドリムシから精製したPACの光活性化特性を詳細に検討し、照射光量依存性や波長依存性がミドリムシの光驚動反応のそれらと同様であることを示すと同時に、光照射によって

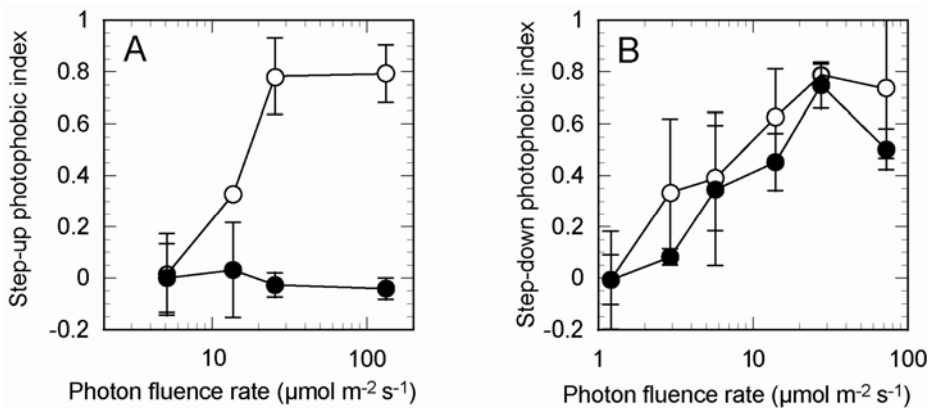


図4 RNAi処理したミドリムシの光驚動反応
A ステップアップ光驚動反応の光量-反応曲線。B ステップダウン光驚動反応の光量-反応曲線。それぞれPACの二本鎖RNAを導入した細胞 (白丸) およびコントロールとして緩衝液を導入した細胞 (黒丸) のデータを示す。(Iseki et al., 2002より)

細胞内cAMPレベルが一過的に上昇することを明らかにした。これにより、光回避センサーとしてのPACの機能は確立されたと言ってよい。一方、Ntefidou et al. (2003)は、RNAi処理したミドリムシは光驚動反応ばかりでなく、指向性のある運動すなわち走光性も示さなくなることを報告し、PACそのものあるいはPACに類似したタンパク質が走光性センサーとして機能する可能性を示唆している。しかしながら、前述のMastらの仮説に基づけば、走光性自体が光驚動反応を素反応とし、副鞭毛体および眼点という構造に依存していることから、副鞭毛体を失ったRNAi処理細胞では走光性を示さないのは当然とみることも可能である。独立した走光性センサーの存在を想定すべきかどうかについては依然議論の余地が残されている。また、Ntefidou and Häder (2005)は、*E. gracilis*の複数の株からPACのcDNAを単離し、それらに多様性があることを指摘するとともに、株によってはPACが副鞭毛体に局限せず、鞭毛全域に分布していることと併せて、機能に関するPACの役割分担が存在すると論じている。

光活性化のメカニズム

生物の光センサーは、いずれも光で励起された発色団の変化が何らかの形でアポタンパク質の構造的変化をもたらすことにより光受容の過程を実現しているものと考えられる。このような発色団あるいはタンパク質部分の構造変化は分光学的解析により追跡することが可能だが、PACの場合はミドリムシから精製可能な量が極めて少ないうえ、大腸菌等の大量発現系を用いた組換えタンパク質を得ることも困難であったため、この分野での研究の進展は非常に遅れた。一方、同じBLUFドメインを持つバクテリア由来のタンパク質では比較的容易に組換えタンパク質が得られたこともあって、赤外分光やNMRによる解析、さらにはX線結晶構造解析まで急速に進んだ。主に扱われているのは、前述した光合成細菌の遺伝子発現抑制に関わる光センサーAppA (Masuda and Bauer, 2002; Laan et al., 2003; Anderson et al., 2005)、シアノバクテリアの走光性の制御因子であるPixD (Slr1694)およびそのホモログ (Masuda et al., 2004; Okajima et al., 2005; Kita et al., 2005; Yuan et al., 2006)、大腸菌由来の機能未知タンパク質YcgF (Rajagopal et al., 2004; Hasegawa et al., 2006)、光合成細菌由来の機能未知タンパク質BlrB (Jung et al., 2005)である(図3)。紫外/可視吸収で見た場合にこれらに共通する特徴は、青色光照射に伴って吸収スペクトルがわずかに長波長側にシフトし、その

後暗所で元に戻るフォトサイクルを示すことで、AppAで初めて見出されたこの現象は、フラビン環と周辺アミノ酸との水素結合ネットワークの変化によってもたらされるものと解釈されている。Ito et al. (2005)は、PAC α のF2を部分タンパク質として大腸菌で発現させ、精製したタンパク質がバクテリアのBLUFタンパク質と同様のフォトサイクルを示すことを報告した。また、BLUFドメインに共通に保存され、光反応に重要と考えられているアミノ酸残基を置換すると長波長シフトが見られなくなることから、PACの光受容初期過程はバクテリアのBLUFタンパク質のそれと本質的には共通であると考えられる。一方、F1についてはBLUFドメインとして特徴的なアミノ酸残基は良く保存されているにも関わらず、大腸菌で発現させた場合には一切フラビンが結合せず、その役割に関しては未解明のままである。

数ある光センサータンパク質の中でPACの際立った特徴はアデニル酸シクラーゼ活性を有するという点である。光受容の初期過程を経て如何にして酵素が活性化されるかという問題は極めて興味深い。Yoshikawa et al. (2005)は、PACの活性化は純粋に光量依存的な反応であり、光が照射されている間のみ活性が上昇することを示した。これに分光学的な解析を加えることができれば、光受容から酵素の活性化に至る全てのプロセスの解明に近づくことが可能となるが、現状では完全な活性を保持したPACを大量に得ることは困難であり、良好な発現系の開発あるいは微量でも可能な分析法の開発を待たねばならない。最近、Ntefidou et al. (2006)は昆虫培養細胞の発現系を用いて活性のあるPACを得たと報告しているが、残念ながら定量的な活性評価がなされておらず、得られたタンパク質の吸収スペクトルも示されていないため、この系に実用性があるかどうかは今後の展開次第である。

PACの進化的起源

ミドリムシは進化の過程においてPACというユニークな光センサーをどのように獲得してきたのだろうか？現在、数多くの生物でゲノム解析が進行し、データベース上には無数の配列が登録されているが、PACの全長と類似性を持つタンパク質は全く存在していなかった。Ntefidou et al. (2003)は、*E. gracilis*の近縁種で二次的に葉緑体を失って従属栄養化したと考えられている*Astasia longa* (*Euglena longa*)からPACサブユニットのオーソログを検出し、AIPAC α 、AIPAC β と名付けた。Koumura et al. (2004)は、さらに探索範囲を広げて*E. stellata*,

Khawkinea quartana, *Colacium sideropus*, *Eutreptia viridis*, *Eutreptiella gymnastica*からもオーソログを検出するとともに、アデニル酸シクラーゼ触媒ドメインの配列を用いて系統解析を行った。その結果、ユーグレナ類と祖先を一にすると考えられているトリパノソーマのアデニル酸シクラーゼとは系統的に異なることが示唆され、しかも捕食栄養性（バクテリア食）の *Petalomonas cantuscygni* ではオーソログが見つからず、光独立栄養あるいはそれらが葉緑体を失って従属栄養化したユーグレナ類のみに見られることから、PACは二次共生による葉緑体獲得時あるいはそれ以降に出現したものと推測された。未発表だが、筆者らは他に光独立栄養性の *E. anabaena*, *E. mutabilis*, *E. viridis*, *Trachelomonas intermedia* からオーソログを検出している一方、捕食栄養性（藻類食）の *Peranema trichophorum* からは検出できていない事実もこのことを支持する。

異種細胞におけるPACの機能発現

PACはGタンパク質等のトランスデューサーを介することなく、光で直接活性化されるアデニル酸シクラーゼである。この特徴は当初から細胞工学的な応用を期待させるに十分なものであった。すなわち、PACを異種細胞に発現させることにより、その細胞のcAMPレベル、ひいてはその細胞の機能を光で人為的にコントロールしようという発想である。Han et al. (2004)は、AppAのBLUFドメインをPAC α のF1で置き換えた改変タンパク質を導入することにより、AppA欠損突然変異株の機能相補が見られることを報告し、BLUFドメインが独立したモジュールとして機能し得ることを示した。最近、Schröder-Lang et al. (2007)は、PACとサイクリックヌクレオチド依存性チャンネル (CNGC) を共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に光を照射することによりチャンネルの開閉を光依存的に制御できることを示すとともに、哺乳類培養細胞でも光照射によりCNGCを介したCa²⁺流入が増大することを示した。さらにはショウジョウバエの脳に発現させた場合には、光照射により毛づくろい行動が変化することも示し、個体レベルでもPACを用いた機能制御の可能性が示された。また、軟体動物アメフラシの側神経節の感覚ニューロンに発現させた場合には、光照射によりcAMPを注入した場合と同様の活動電位の形状変化が見られることも示されている (Nagahama et al., 2007)。

今後の課題と展望

ミドリムシの光応答現象は古くから研究対象とされてきたものの、その分子機構に関する研究は、まだ緒についたばかりである。PACの発見によりステップアップ光驚動反応すなわち光回避のセンサーは明らかとなったが、ステップダウン光驚動反応すなわち光集合に関わるセンサーは未同定のまま残されている。また、PACの活性化により上昇した細胞内cAMPレベルがどのように鞭毛運動の変化を導くかについては全く情報が得られていない。このことは、ミドリムシが現代生物学における実験材料としては不利な状況にあること、例えば、有性生殖が知られておらず遺伝的な解析ができない、形質転換系が確立されていない、ゲノム解析が進んでいない、等の問題と無縁ではない。これらの問題をできるだけ早期に解決することが光センシングの分子機構解明に向けての近道のように思える。

一方、細胞工学ツールとしてのPACの応用は、急速に実現可能性が高まりつつある。可視光というマイルドな刺激で局所的にcAMPレベルをコントロールすることができれば、従来の阻害剤やケージド化合物に代わってcAMP関連現象の解析に大きな威力を発揮するものと期待される。

引用文献

- Anderson, S., Dragnea, V., Masuda, S., Ybe, J., Moffat, K. and Bauer, C. (2005) Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 44, 7998-8005.
- Benedetti, P. A. and Checcucci, A. (1975) Paraflagellar body (PFB) pigments studied by fluorescence microscopy in *Euglena gracilis*. *Plant Sci. Lett.* 4, 47-51.
- Benedetti, P. A. and Lenci, F. (1977) In vivo microspectrofluorometry of photoreceptor pigments in *Euglena gracilis*. *Photochem. Photobiol.* 26, 315-318.
- Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. and Klug, G. (2002) A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* 45, 827-836.
- Brodhun, B. and Häder, D.-P. (1990) Photoreceptor proteins and pigments in the paraflagellar body of the flagellate *Euglena gracilis*. *Photochem. Photobiol.* 52, 865-871.
- Brodhun, B. and Häder, D.-P. (1995) A novel procedure to isolate the chromoproteins in the paraflagellar body of

- the flagellate *Euglena gracilis*. J. Photochem. Photobiol. B 28, 39-45.
- Bünning, E. and Schneiderhöhn, G. (1956) Über das Aktionsspektrum der phototaktischen Reaktionen von *Euglena*. Arch. Microbiol. 24, 80-90.
- Checucci, A., Colombetti, G., Ferrara, R. and Lenci, F. (1976) Action spectra for photoaccumulation of green and colorless *Euglena*: evidence for identification of receptor pigments. Photochem. Photobiol. 23, 51-54.
- Colombetti, G., Lenci, F. and Diehn, B. (1982) Responses to photic, chemical, and mechanical stimuli. In: The Biology of *Euglena* III. Buetow, D. E. (ed.). Academic Press, pp.169-195.
- Diehn, B. (1969) Action spectra of the phototactic responses in *Euglena*. Biochim. Biophys. Acta 177, 136-143.
- Diehn, B., Feinleib, M., Haupt, W., Hildebrand, E., Lenci, F. and Nultsch, W. (1977) Terminology of behavioral responses of motile microorganisms. Photochem. Photobiol. 26, 559-560.
- Engelman, Th. W. (1882) Über Licht- und Farbenperception niederster Organismen. Pflügers Arch Ges Physiol. 29, 387-400.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811.
- Ghetti, F., Colombetti, G., Lenci, F., Campani, E., Polacco, E. and Quaglia, M. (1985) Fluorescence of *Euglena gracilis* photoreceptor pigment: an *in vivo* microspectrofluorometric study. Photochem. Photobiol. 42, 29-33.
- Gomelsky, M. and Kaplan, S. (1995) *appa*, a novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. J. Bacteriol. 177, 4609-4618.
- Gomelsky, M. and Kaplan, S. (1998) AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. Identification of a novel FAD binding domain. J. Biol. Chem. 52, 35319-35325.
- Gomelsky, M. and Klug, G. (2002) a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. Trends Biochem. Sci. 27, 497-500.
- Han, Y., Braatsch, S., Osterloh, L. and Klug, G. (2004) A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101,12306-12311.
- Hasegawa, K., Masuda, S. and Ono, T. A. (2006) Light induced structural changes of a full-length protein and its BLUF domain in YcgF(Blrp), a blue-light sensing protein that uses FAD (BLUF). Biochemistry. 45, 3785-3793.
- Iseki M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T. and Watanabe, M. (2002) A blue-light activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. Nature 415, 1047-1051.
- Jennings, H. S. (1904) Contributions to the study of the behavior of lower organisms. Carnegie Institution of Washington.
- Ito, S., Murakami, A., Sato, K., Nishina, Y., Shiga, K., Takahashi, T., Higashi, S., Iseki, M. and Watanabe, M. (2005) Photocycle features of heterologously expressed and assembled eukaryotic flavin-binding BLUF domains of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor in *Euglena gracilis*. Photochem. Photobiol. Sci. 4, 762-769.
- Jung, A., Domratcheva, T., Tarutina, M., Wu, Q., Ko, W. H., Shoeman, R. L., Gomelsky, M., Gardner, K. H. and Schlichting, I. (2005) Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: insights into blue light-mediated signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102, 12350-12355
- Kita, A., Okajima, K., Morimoto, Y., Ikeuchi M. and Miki, K. (2005) Structure of a Cyanobacterial BLUF Protein, Tll0078, Containing a novel FAD-binding blue light sensor domain. J. Mol. Biol. 349, 1-9.
- Koumura, Y., Suzuki, T., Yoshikawa, S., Watanabe, M. and Iseki, M. (2004) The origin of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), the *Euglena* blue-light receptor: phylogenetic analysis of orthologues of PAC subunits from several euglenoids and trypanosome-type adenylyl cyclases from *Euglena gracilis*. Photochem. Photobiol. Sci. 3, 580-586.
- Laan, W., van der Horst, M. A., van Stokkum, I. H. and Hellingwerf, K. J. (2003) Initial characterization of the primary photochemistry of AppA, a blue-light-using flavin adenine dinucleotide-domain containing transcriptional antirepressor protein from *Rhodobacter sphaeroides*: a key role for reversible intramolecular proton transfer from the flavin adenine dinucleotide chromophore to a conserved tyrosine? Photochem. Photobiol. 78, 290-297.
- Lebert, M. (2001) Phototaxis of *Euglena gracilis* - flavins and pterins. In: Comprehensive Series in Photosciences 1: Photomovement. Häder, D.-P. (ed.). Elsevier, Am-

- sterdam, pp. 297-341.
- Mast, S. O. (1911) Light and the behavior of organisms. John Wiley & Sons, New York
- Masuda, S. and Bauer, C. (2002) AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. Cell 110, 613-623.
- Masuda, S., Hasegawa, K., Ishii, A. and Ono, T. (2004) Light-Induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of *Synechocystis* sp. PCC6803. Biochemistry. 43, 5304-5313.
- Matsunaga, S., Hori, T., Takahashi, T., Kubota, M., Watanabe, M., Okamoto, K., Masuda, K. and Sugai, M. (1998) Discovery of signaling effect of UV-B/C light in the extended UV-A/blue-type action spectra for step-down and step-up photophobic responses in the unicellular flagellate alga *Euglena gracilis*. Protoplasma 201, 45-52.
- Nagahama, T., Suzuki, T., Yoshikawa, S. and Iseki, M. (2007) Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into *Aplysia* sensory neurons. Neurosci. Res. 59, 81-88.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K. and Ullu, E. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14687-14692.
- Ntefidou, M., Iseki, M., Watanabe, M., Lebert, M. and Häder, D.-P. (2003) Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. Plant Physiol. 133, 1517-21.
- Ntefidou, M. and Häder, D.-P. (2005) Photoactivated adenylyl cyclase (PAC) genes in the flagellate *Euglena gracilis* mutant strains. Photochem. Photobiol. Sci. 4, 732-739.
- Ntefidou, M., Ludtke, T., Ahmad, M. and Häder, D.-P. (2006) Heterologous Expression of Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC) Genes from the Flagellate *Euglena gracilis* in Insect Cells. Photochem Photobiol. 82, 1601-1605.
- Okajima, K., Yoshihara, S., Fukushima, Y., Geng, X., Katayama, M., Higashi, S.-I., Watanabe, M., Sato, S., Tabata, S., Shibata, Y., Itoh, S. and Ikeuchi, M. (2005) Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. J. Biochem. 137, 741-750.
- Rajagopal S, Key, J. M., Purcell, E. B., Boerema, D. J. and Moffat, K. (2004) Purification and initial characterization of a putative blue light-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. Photochem Photobiol. 80, 542-547.
- Schmidt, W., Galland, P., Senger, H. and Furuya, M. (1990) Microspectrophotometry of *Euglena gracilis*: Pterin- and flavin-like fluorescence in the paraflagellar body. Planta 182, 375-381.
- Schröder-Lang, S., Schwarzel, M., Seifert, R., Strunker, T., Kateriya, S., Looser, J., Watanabe, M., Kaupp, U. B., Hegemann, P. and Nagel, G. (2007) Fast manipulation of cellular cAMP level by light *in vivo*. Nat. Methods. 4, 39-42.
- Takahashi, T. (2001) Computer-aided analysis of movement responses of microorganisms. In: Image Analysis: Methods and Applications, 2nd edition. Häder, D.-P. (ed.). CRC Press, pp.423-434.
- Wager H. (1900) On the eye-spot and flagellum in *Euglena viridis*. Journ. Lin. Soc. London, Zool. 27, 463-481.
- Watanabe, M., Furuya, M., Miyoshi, Y., Inoue, Y., Iwahashi, I. and Matsumoto, K. (1982) Design and performance of the Okazaki Large Spectrograph for photobiological research. Photochem. Photobiol. 36, 491-498.
- Yoshikawa, S., Suzuki, T., Watanabe, M. and Iseki, M. (2005) Kinetic analysis of the activation of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor for photomovements of *Euglena*. Photochem. Photobiol. Sci. 4, 727-731.
- Yuan, H., Anderson, S., Masuda, S., Dragnea, V., Moffat, K. and Bauer, C. (2006) Crystal structures of the *Synechocystis* photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling. Biochemistry 45, 12687-12694.