

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01799

研究課題名(和文) 陸棲シアノバクテリアにおいて発見した新規紫外線吸収色素の生合成経路の解明

研究課題名(英文) Characterization of biosynthetic pathways for the glycosylated mycosporine-like amino acids in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*.

研究代表者

坂本 敏夫 (SAKAMOTO, Toshio)

金沢大学・自然システム学系・准教授

研究者番号：70324069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：陸棲シアノバクテリア *Nostoc commune* (イシクラゲ) は、非常に強い乾燥耐性を示す。本研究では、本生物がもつ機能性分子のうちマイコスポリン様アミノ酸(MAA)に着目して解析した。イシクラゲはMAAの違いによって4種類の化学型に分類され、化学型と遺伝子型が一致した。それぞれの遺伝子型について培養株を分離し、国立環境研究所NIESコレクションに寄託した。イシクラゲ(遺伝子型A)からmys遺伝子群を単離した。D-Ala-D-AlaリガーゼをコードするmysD遺伝子をもち、*Nostoc*型の生合成経路によりポルフィラ-334およびシノリンを産生することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Mycosporine-like amino acids (MAAs) are water-soluble pigments that absorb UV radiation of 280 to 340 nm. The terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* is classified into four groups representing genetically different chemotypes by differences in their MAA derivatives. The mysABCD genes responsible for MAA biosynthesis were characterized in genotype A *N. commune*. The presence of the mysABCD gene cluster in *N. commune* strain KU002 supported its porphyra-334 producing capability via the *Nostoc*-type mechanism, although *N. commune* strain KU002 mainly produces the arabinose-bound derivative of porphyra-334. It can be postulated that *N. commune* additionally acquired the glycosylation of porphyra-334 to adapt to terrestrial environments. Further studies are necessary to elucidate the gene(s) involved in the glycosylation of porphyra-334.

研究分野：植物生理生化学

キーワード：多機能性分子 極限環境生物 抗酸化物質 紫外線

1. 研究開始当初の背景

水は生命にとって欠くことのできない最も重要な物質である。しかしながら、乾燥状態となっても無代謝で100年以上の長期にわたって生命を維持し、吸水することによって短時間のうちに生命活動を再開する生物が存在する。無水生活様式(anhydrobiosis)として古くから知られている生命現象である。

申請者は、光合成原核生物である陸棲シアノバクテリア *Nostoc commune* (和名: イシクラゲ) を研究材料に用いて、その極限的な乾燥耐性のメカニズムを研究してきた。イシクラゲが示す極限的な乾燥耐性について、光合成活性を指標にした生理学的な現象記載を手始めにして研究を開始し、無水生活様式の分子機構の解明を目指す研究段階へと発展させてきた。これまでの研究成果として、本生物が示す無水環境下における生命維持機構には細胞外多糖、トレハロース、紫外線吸収物質および抗酸化物質が深く関わっていることを見いだしている。また、イシクラゲには遺伝的な多型があり、これらは形態的には区別できないが、4種類の遺伝子型に大別されることを発見した。

イシクラゲがもつ機能性分子のひとつにマイコスポリン様アミノ酸(MAA)がある。MAAは310から330nm付近の紫外線(主にUV-B)を吸収する水溶性の紫外線吸収色素であり、動植物を含む多くの生物で産生されることが知られている。これまでに、およそ20種類の化学構造が異なるMAAが報告されている。申請者がイシクラゲにおいて発見したMAAは、糖鎖を結合しており、MAA配糖体と呼ぶべき新規の化合物であった。

MAA配糖体は、イシクラゲの藻体に乾燥重量あたり0.1%程度含まれ、これは光合成色素(クロロフィル及びカロテノイド)に匹敵する量である。さらに、これらのMAA配糖体は、抗酸化活性を示すことから、紫外線に対する防御物質であるとともに抗酸化物質としても役割をもつ多機能性分子と考えられる。本生物が示す極限的な環境耐性能に深く関与し、陸棲化の過程で獲得したと考えているが、その生合成経路および生理機能の詳細は未解明である。

2. 研究の目的

イシクラゲが産生するMAA配糖体の生合成に関与する遺伝子群を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

金沢大学のキャンパス内に豊富に自生している陸棲シアノバクテリア *Nostoc commune* (イシクラゲ) を採集して材料に用いた。本生物は、生理活性物質や酵素タンパク質を抽出して精製するために必要となる試料をキログラム単位で確保できること、さらに近縁種 *Nostoc punctiforme* のゲノム情報が活用できることなどから、無水生活様式を営む光

合成生物のモデルとして有利な条件を備えている。比較対照とする水棲シアノバクテリアとして、白山市獅子吼で採集した *Nostoc verrucosum* (アシツキ) を用いた。本生物は、万葉集に収録されている和歌に詠まれているなど、我が国で古来より食用となる藻類として知られている。*N. commune* と同様に多量の細胞外多糖をもつなどの共通点があるが、乾燥耐性を示さない。アシツキ培養株として *N. verrucosum* strain KU005 (NIES-2539) を用いた。

(2) イシクラゲ培養株の分離

金沢大学角間キャンパスに生育しているイシクラゲを採集し窒素源を抜いた寒天培地を用いて培養した。培地上に生育したイシクラゲのコロニーを分離して植え継ぐことを繰り返して、混在している他の微生物を取り除いた。

遺伝子型の異なる4種の培養株を分離し、国立環境研究所NIESコレクションに寄託した。株番号は次の通りである: NIES-2538 (*N. commune* strain KU002, 遺伝子型A), NIES-3989 (*N. commune* strain KU006, 遺伝子型B), NIES-3990 (*N. commune* strain KU007, 遺伝子型C) および NIES-3991 (*N. commune* strain KU008, 遺伝子型D)。

(3) 遺伝子型解析

採集地点の異なる複数のイシクラゲ試料について16S rRNAをマーカー遺伝子として用い、PCRダイレクトシーケンス法により遺伝子型を解析した。

(4) MAA型解析

N. commune の粉末を30%メタノール溶液に懸濁して攪拌した後、遠心分離によって上清を分画し、粗抽出液とした。溶媒を減圧濃縮して除去し100%メタノールに溶解した後、不溶物を遠心分離により取り除いた。上清に水を加えて20%メタノールとなるように希釈した後、20%エタノールに不溶成分を遠心分離により取り除いた。この抽出液のUV吸収スペクトラムを分光光度計を用いて測定し、吸収極大波長を決定した。続いて逆相カラムを装着した液体クロマトグラフィーを用いて、抽出液に含まれているMAAを分離・同定した。

(5) 新規MAAの抽出・精製

遺伝子型Cの *N. commune* のコロニーを野外から採集し、メタノールに懸濁して攪拌した後、一晚室温で静置してMAAを抽出した。抽出液をろ過した後、溶媒を減圧濃縮して除去し水に溶解した。水に不要な成分をろ過で取り除いた後、クロロホルム:メタノール:水(1:1:1)の条件で分配し、メタノール-水層を回収した。溶媒をメタノールに置換して不溶物を取り除いた後、さらに溶媒を水に置換して不溶物を除去した。続いて逆相カラム

を装着した液体クロマトグラフィーを用いて MAA を精製した。湿重量 500 g の試料を出発材料とした場合におよそ 7.5 mg の MAA を精製標品として得ることができた。

(6) 化学構造解析

金沢大学学際科学実験センター遺伝子研究施設において MALDI-TOF MS 解析をタンデム質量分析計 (4800 plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer)を用いて行った。検出された分子イオンフラグメントについて、可能な場合はさらに MS/MS 解析を行った。金沢大学学際科学実験センター機器分析研究施設において精密質量分析を質量分析装置 (JMS-T100TD)を用いて行い、組成式の予測を行った。金沢大学学際科学実験センター機器分析研究施設において核磁気共鳴装置 (JEOL ECA-600)を用いて重水 (D₂O)中の NMR スペクトラムを測定した。

(7) *mysABCD* 遺伝子の同定

データベースに公開されている *mysABCD* 遺伝子に関する塩基配列情報およびイシクラゲについてこれまでに得られている断片的なゲノム情報に基づいて標的遺伝子を増幅するための PCR プライマーを設計した。イシクラゲおよびアシツキから抽出したゲノム DNA をテンプレートに用いて、標的遺伝子を PCR により増幅し塩基配列を決定した。

4. 研究成果

本研究課題の成果は次の3点である。

(1) イシクラゲの多型を MAA 化学型の違いとして記載することができ、それぞれの遺伝子型について培養株を国立環境研究所 NIES コレクションに寄託することができた。

(2) イシクラゲ (遺伝子型 A) と *Nostoc verrucosum* (アシツキ) から MAA 生合成を司る *mys* 遺伝子群を単離し比較解析を行った。どちらも D-Ala-D-Ala リガーゼをコードする *mysD* 遺伝子をもち、*Nostoc* 型の生合成経路によりポルフィラ-334 およびシノリンを産生する。イシクラゲでは *mysABCD* 遺伝子がクラスターを形成しているのに対して、アシツキでは *mysABC* 遺伝子と *mysD* 遺伝子がゲノム上で離れた位置に存在するという違いが見られた。

(3) 遺伝子型 C から新規 MAA 誘導体を単離・精製した。精製した新規 MAA の分子量は 756 Da, 精密質量分析から予測された組成式は C₃₄H₅₂N₄O₁₅ であった。化学構造解析の結果、新規 MAA がこれまでに遺伝子型 B において見いだした 1050 Da MAA 配糖体のアグリコンであることが分かった。この新規 MAA の慣用名を *nostoc-756* と命名した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Inoue-Sakamoto, K., Tanji, Y., Yamaba, M., Natsume, T., Masaura, T., Asano, T., Nishiuchi, T. and Sakamoto, T. (2018) Characterization of extracellular matrix components from the desiccation-tolerant cyanobacterium *Nostoc commune*. J. Gen. Appl. Microbiol. 64:15-25. 査読あり
doi 10.2323/jgam.2017.03.001
<https://kanazawa-u.repo.nii.ac.jp/>

Inoue-Sakamoto, K., Nazifi, E., Tsuji, C., Asano, T., Nishiuchi, T., Matsugo, S., Ishihara, K., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H. and Sakamoto, T. (2018) Characterization of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc verrucosum*. J. Gen. Appl. Microbiol. in press. 査読あり
doi 10.2323/jgam.2017.12.003
<https://kanazawa-u.repo.nii.ac.jp/>

Sakamoto, T., Hashimoto, A., Yamaba, M., Wada, N., Yoshida, T., Inoue-Sakamoto, K., Nishiuchi, T. and Matsugo, S. (2018) Four chemotypes of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* characterized by differences in the mycosporine-like amino acids. Phycol. Res. in press. 査読あり
<https://kanazawa-u.repo.nii.ac.jp/>

[学会発表](計12件)

坂本香織・坂本敏夫「陸棲藍藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) の細胞外マトリクスに局在する抗酸化酵素・タンパク質の解析」日本藻類学会第42回大会(東北大学)2018年3月23日-25日

坂本敏夫・橋本茜・和田直樹・吉田尚之・松郷誠一「陸棲藍藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) で見いだされた新規マイコスポリン様アミノ酸の化学構造解析」日本藻類学会第42回大会(東北大学)2018年3月23日-25日

坂本敏夫「陸棲藍藻イシクラゲの多型」かずさDNA研究所研究会「藍藻の分子生物学2017」かずさアカデミアホール2017年12月1日-2日

鈴木俊介・坂本香織・坂本敏夫「陸棲藍藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) の細胞外 Dps タンパク質と抗酸化システム」日本植物学会第81回大会 東京理科大学(野田キャンパス)2017年9月8日-10日

坂本敏夫・坂本香織「陸棲藍藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) の多型」日本植物学会第81回大会 東京理科大学(野田キャンパス)2017年9月8日-10日

坂本香織・坂本敏夫「陸棲藍藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) の細胞外マトリクスにおける抗酸化システム」日本藻類学会第4

1 回大会 高知大学 2017 年 3 月 23-日-25 日

坂本敏夫・坂本香織・橋本 茜・橋本伸太郎・和田直樹・松郷誠一「陸棲藍藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) の遺伝子型と化学型が一致する」日本藻類学会第 4 1 回大会 高知大学 2017 年 3 月 23-日-25 日

坂本敏夫「陸上生活するラン藻-イシクラゲ-」京都大学生態学研究センター研究集会「シアノバクテリアの生態学：その先端と将来」京都大学生態学研究センター 2016 年 9 月 5 日-6 日

坂本香織・兼崎 友・吉川博文・坂本敏夫「*Nostoc* 属ラン藻のマイコスポリン様アミノ酸(MAA)生合成遺伝子の比較解析」日本藻類学会第 4 0 回大会 東京歯科大学 2016 年 3 月 18 日-20 日

橋本 茜・和田直樹・西内巧・坂本敏夫・松郷誠一「陸棲ラン藻 *Nostoc commune* 由来の新規マイコスポリン様アミノ酸誘導体の単離」日本藻類学会第 4 0 回大会 東京歯科大学 2016 年 3 月 18 日-20 日

坂本敏夫・坂本香織・和田直樹・松郷誠一「陸棲ラン藻 *Nostoc commune*(イシクラゲ) の多型」日本藻類学会第 4 0 回大会 東京歯科大学 2016 年 3 月 18 日-20 日

Toshio Sakamoto, Minami Yamaba, Ehsan Nazifi, Naoki Wada, Seiichi Matsugo: Discovery of the Mycosporine-like Amino Acid Chemotypes in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*.

15th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP2015) チュービンゲン大学(ドイツ)2015 年 8 月 2 日-6 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://photon.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 敏夫 (SAKAMOTO, Toshio)
金沢大学・理工研究域自然システム学系・准教授
研究者番号：7 0 3 2 4 0 6 9

(2)研究分担者

松郷 誠一 (MATSUGO, Seiichi)
金沢大学・理工研究域自然システム学系・教授
研究者番号：3 0 1 4 8 1 2 6

(2)研究協力者

坂本 香織 (SAKAMOTO, Kaori)
金沢工業大学・バイオ・化学部・准教授
研究者番号：1 0 3 6 7 4 4 3

和田 直樹 (WADA, Naoki)

金沢大学・理工研究域自然システム学系・助教

研究者番号：2 0 4 6 4 0 5 0