

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18743

研究課題名(和文) 海洋性藻類における浸透圧適合溶質DMSP合成経路の環境応答

研究課題名(英文) Environmental stress response of biosynthetic pathway of osmoprotectants in marine microorganisms.

研究代表者

景山 伯春 (Hakuto, Kageyama)

名城大学・理工学部・准教授

研究者番号：40444369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアや海洋性の微細藻類の塩ストレス耐性機構を明らかにすべく、分子生物学的な解析を行った。その結果、以下に挙げる知見が得られた。(1) 海洋性藻類のDMSP合成経路の責任因子候補を得ることができた。(2) 塩ストレス環境下において、耐塩性シアノバクテリアのマイコスポリン様アミノ酸(M2G)の生合成と硝酸塩の過剰供給の関係を示した。(3) M2GがDNA保護機能と高い抗酸化作用を有することを明らかにした。(4) 耐塩性シアノバクテリアのセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの過剰発現により、淡水性シアノバクテリアに耐塩性を付加できた。など。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of salt tolerance in cyanobacteria and marine microalgae, we analyzed them at molecular level. As a result, novel findings below were observed. (1) Candidate enzyme for DMSP synthetic pathway in marine microalgae was obtained. (2) Nitrate oversupply affected glycine betaine and mycosporine-2-glycine synthesis in response to changes of salinity in a halotolerant cyanobacterium. (3) DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine were observed. (4) Overexpression of halophilic serine hydroxymethyltransferase in fresh water cyanobacterium results in enhanced salinity tolerance. etc.

研究分野：光合成細菌の生化学

キーワード：環境ストレス シアノバクテリア 浸透圧適合溶質

## 1. 研究開始当初の背景

藻類やシアノバクテリアなどの海洋性生物は、ジメチルスルフォニオプロピオン酸 (DMSP) やグリシンベタインなどの浸透圧適合溶質を細胞内に蓄積することで塩ストレス環境に適応する。海洋性微細藻類の DMSP の合成経路については未解明の部分が多く残されている。また、シアノバクテリアにおける浸透圧適合溶質の合成経路についてはこれまでによく解析されてきたが、全貌が解明されているわけではない。

## 2. 研究の目的

(1) 海洋性生物において、DMSP はメチオニンを前駆体として、4 ステップの酵素反応を経て生合成されることがわかっていたが、各ステップの責任酵素の分子同定の報告は無かった。そこで、海洋性微細藻類を用いてこれらの責任酵素の同定を試みた。

(2) シアノバクテリアの耐塩性機構の理解を深めるべく、浸透圧適合溶質の生合成に関連する遺伝子の解析を行った。また、耐塩性シアノバクテリアが生産するマイコスポリン様アミノ酸の機能解析を行った。さらに、シアノバクテリアのアルカン生合成と環境ストレス応答との関係を調査した。

## 3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティックな手法を用いて海洋性微細藻類の DMSP 合成酵素の候補因子を選択した。候補因子の組換え蛋白質を調製し、機能解析を行った。

(2) 主に遺伝子操作によるアプローチによって、シアノバクテリアの耐塩性機構およびその他の機構を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 海洋性微細藻類の DMSP 生合成経路の4段階の反応経路のうちの1反応を触媒する酵素を同定した。現在論文投稿準備中である。

(2) 塩ストレスや窒素欠乏などの環境ストレス処理により、シアノバクテリアのアルカン合成効率が向上した。また、耐塩性シアノバクテリアのアルカン合成酵素を淡水性シアノバクテリアに導入することで、アルカンの合成効率を向上させた。これらの成果は *Current Microbiology* 誌に発表した。また、シアノバクテリア細胞からのアルカン抽出法について、*Bio-protocol* 誌に論文として発表した。

(3) クロレラ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 より油滴蛋白質 Caleosin を単離した。caleosin 遺伝子が、塩ストレスによって誘導されることを示した。また、Caleosin 蛋白質がヘム含有蛋白質であることを明らかにした。これらの成果は *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 誌に発表した。

(4) 耐塩性シアノバクテリア *Aphanothece halophytica* が生産するマイコスポリン様アミノ酸 Mycosporine-2-glycine の細胞内蓄積量が、塩ストレス環境下で硝酸の過剰供給により顕著に増加することを明らかにした。これらの結果とあわせて、グリシンベタインの細胞内蓄積量との関連を議論し、*FEMS Microbiology Letters* 誌に発表した。

(5) *Aphanothece halophytica* から精製した Mycosporine-2-glycine を用いて、この物質が UV 吸収機能や浸透圧調節機構だけでなく、DNA 保護機能や高い抗酸化活性を有することを明らかにし、*Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 誌に論文として発表した。

(6) *Aphanothece halophytica* よりグリシンベタイン合成に関わる因子としてセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを単離した。この遺伝子を導入することで、淡水性シアノバクテリアに耐塩性が付与されることを見出した。これらの結果は *Archives of Microbiology* 誌に発表した。

(7) その他に、ライスの developmentally regulated plasma membrane polypeptide (DREPP2) の解析を行い、*Protoplasma* 誌へその結果を発表した。また、好塩性微生物が産生する有用物質についての総説が *AIMS Microbiology* 誌に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Rungaroon Waditee-Sirisattha, Hakuto Kageyama, Yoshito Tanaka, Minoru Fukaya, and Teruhiro Takabe. Overexpression of halophilic serine hydroxymethyltransferase in fresh water cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 results in increased enzyme activities of serine biosynthetic pathways and enhanced salinity tolerance. *Arch. Microbiol.* 199 (1): 19-25 (2017) 査読有  
DOI: 10.1007/s00203-016-1271-z

Vipaporn Cheewinthamrongrod,

Hakuto Kageyama, Tanapat Palaga, Teruhiro Takabe, Rungaroon Waditee-Sirisattha. DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacterium in A375 human melanoma cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B* 164: 289-295 (2016) 査読有  
DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.037

Rungaroon Waditee-Sirisattha, Hakuto Kageyama, and Teruhiro Takabe Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiology* 2 (1): 42-54 (2016) 査読有  
DOI: 10.3934/microbiol.2016.1.42

Hakuto Kageyama, Rungaroon Waditee-Sirisattha, Sophon Sirisattha, Yoshito Tanaka, Aparat Mahakhant, and Teruhiro Takabe. Extraction and Quantification of Alkanes in Cyanobacteria. *Bio-protocol* 5 (24): e1684 (2015) 査読有

Rungaroon Waditee-Sirisattha, Hakuto Kageyama, Minoru Fukaya, Vandna Rai, and Teruhiro Takabe. Nitrate and amino acid availability affects glycine betaine and mycosporine-2-glycine in response to changes of salinity in a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362 (23): fnv198 (2015) 査読有  
DOI: 10.1093/femsle/fnv198

Nana Yamada, Cattarin Theerawitaya, Hakuto Kageyama, Suriyan Cha-um, and Teruhiro Takabe Expression of developmentally regulated plasma membrane polypeptide (DREPP2) in rice root tip and interaction with Ca<sup>2+</sup>/CaM complex and microtubule. *Protoplasma* 252 (6): 1519-1527 (2015) 査読有  
DOI: 10.1007/s00709-015-0781-x

Pairpilin Charuchinda, Rungaroon Waditee-Sirisattha, Hakuto Kageyama, Daisuke Yamada, Sophon Sirisattha, Yoshito Tanaka, Aparat Mahakhant, and Teruhiro Takabe. Caleosin from *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 is salt-induced and heme-containing

protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79 (7): 1119-1124 (2015) 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2015.1010480

Hakuto Kageyama, Rungaroon Waditee-Sirisattha, Sophon Sirisattha, Yoshito Tanaka, Aparat Mahakhant, and Teruhiro Takabe. Improved Alkane Production in Nitrogen Fixing and Halotolerant Cyanobacteria via Abiotic Stresses and Genetic Manipulation of Alkane Synthetic Genes. *Curr. Microbiol.* 71 (1): 115-120 (2015) 査読有  
DOI: 10.1007/s00284-015-0833-7

[学会発表](計3件)

Kageyama H: Further progress on the research of improved alkane production in cyanobacteria by abiotic stress. Japan-Thailand Collaboration Symposium (Meijo University and TISTR) The 4th Symposium of Perspective Innovation and Achievement of Algal Biofuel R&D (4th PIAB) (2016) Pathum Thani, Thailand

Waditee-Sirisattha R, Kageyama H, Sirisattha S, Charuchinda P, Mahakhant A, and Takabe T: Isolation and functional characterization of caleosin gene from the green microalgae *Chlorella vulgaris*. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, INNOVATIVE BIOTECHNOLOGY (TSB2015) (2015) Bangkok, Thailand

Kageyama H, Waditee-Sirisattha R, Sirisattha S, Tanaka Y, Mahakhant A, and Takabe T: Alkane Production in Nitrogen-Fixing and Halotolerant Cyanobacteria. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, INNOVATIVE BIOTECHNOLOGY (TSB2015) (2015) Bangkok, Thailand

[図書](計1件)

Hakuto Kageyama, Rungaroon Waditee-Sirisattha, Yoshito Tanaka, and Teruhiro Takabe. Osmoprotectant and Sunscreen Molecules from Halophilic Algae and Cyanobacteria. (book chapter) *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*, Elsevier (Eds., Rajesh. P. Rastogi, Datta Madamwar, Ashok Pandey)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

景山 伯春 (KAGEYAMA, Hakuto)

名城大学・理工学部・准教授

研究者番号：40444369

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )