

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06638

研究課題名(和文)大型藻類生活環をコントロールする分化誘導低分子の最適構造および関連遺伝子の解析

研究課題名(英文) Structure-activity relationship study of differentiation-inducing molecules that control the life cycle of large algae

研究代表者

山本 博文 (Yamamoto, Hirofumi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：70461366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：かつて日本中の沿岸で養殖されていたアサクサノリ(*Neopyropia tenera*)は、今や絶滅危惧1種藻類(CR+EN)に指定されている。近年、海水温の上昇や水質変化が引き金となって、養殖海苔の水揚げ量は「右肩下がり」に歯止めが掛からない。このような状況のもと、報告者は、アサクサノリ生活環を好循環させる低分子有機化合物を構造活性相関研究を通じて探索した。そして、光学活性なヒダントイン誘導体が効果的な単孢子分化誘導活性を示すことを見出した。本申請研究では、この新知見のさらなる進展と実養殖への応用を目指して陸上養殖も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海苔の養殖はドリユー女史がその生活環を明らかにしたことで始まった。しかし、その生活環における世代交代のメカニズムや発現因子等については不明で、その後の技術開発が進まない要因の一つになってきた。特に、無性生殖サイクルにおいては、これまでも養殖技術への応用を念頭に様々な研究グループや自治体が注目してきたが、鍵となる単孢子への分化を誘導する条件や効果的な物質の特定には至っていない。したがって、本研究成果から得られた単孢子分化誘導物質と、それを利用したアサクサノリ単孢子の採苗、葉状体への培養などの研究成果は、学術的領域から実養殖まで広範囲に影響を与える社会的インパクトの高い成果である。

研究成果の概要(英文)： *Neopyropia tenera* was once cultivated along the coasts of Japan. However, *N. tenera* is now listed as an endangered species (CR+EN) of red algae. In recent years, the amount of harvested seaweed has continued to decline due to rising seawater temperatures and changes in water quality. Under these circumstances, we have been searching for small organic molecules that promote the normal life cycle of *N. tenera*. As a result, it was found that the optically active hydantoin derivative exhibits effective monospore differentiation-inducing activity against *N. tenera*. In this research, the structure-activity relationship study of the hydantoin derivative and land-based aquaculture of *N. tenera* were carried out with the aim of further advancing this new knowledge and applying it to actual aquaculture.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：構造活性相関 化学合成 分化誘物質 アサクサノリ

1. 研究開始当初の背景

現行、海苔の原料はアサクサノリ (*Neopyropia tenera*) と同属 (アマノリ属) のスサビノリ (*N. yezoensis*) である。70 年以上前に、イギリスの藻類学者ドリユー女史がその生活環を明らかにしたことで、沖合での網養殖が始まった。しかし、その後の養殖技術に関する進展は乏しく、現在も、その生活環に準じた有性生殖法が汎用されている。具体的には、春に成熟した葉状体から受精した果胞子を採苗し、それを貝殻等に着生させて糸状体 (胞子体) へと天然培養する。その後、秋に形成されてくる殻胞子嚢から、葉状体形成能のある殻胞子を採苗して、種網に着生させることで葉状体へと育苗する。したがって、海苔の養殖は、その準備期間を加えると丸一年の長期戦である。さらに、その培養等に関わる全ての工程に天然海水を用いるため、海水の質の影響を著しく受けることになる。絶滅危惧種のアサクサノリにおいても、スサビノリとほぼ同様の生活環の中で生殖と成長を繰り返している。したがって、近年の激変した海水変化に対応できなくなったと示唆される。水産業界を例に観ても、かつて養殖されていたアサクサノリは、戦後、生命力と生産性に勝るスサビノリに完全に駆逐された。近年では、衰退を続ける水産業界の復興のためにも、香気・味に優れたアサクサノリの再養殖が切望されているが、未だ現代の気候変動に対応した十分な養殖技術は確立されていない。

2. 研究の目的

安定したアサクサノリの養殖や技術開発を推進するためには、その基となる海藻の種苗 (5 mm 程度の葉状体) を簡便かつ安定に培養できることが必須である。しかし、現行の技術では、水質に敏感なうえ、通年的に異型世代交代を繰り返すアサクサノリの種苗を継続的かつ大量に培養することが困難である。報告者らは、この課題を克服する方法として、通常的生活環の中では殆ど観られない無性生殖に着目し、アサクサノリ葉状体から単胞子への分化誘導物質を探索してきた。アサクサノリ単胞子はそのまま発芽して葉状体 (クローン体) へと成長するため、単胞子から種苗を作れると、これまで懸案であった培養にかかる時間、労力、リスクの課題を一挙に克服できるはずである。この作業仮説に基づいて、報告者は平成 29 年度に採択された文部科学省選定私立大学ブランディング事業「藻類成長因子を用いた海藻養殖技術イノベーション」(令和元年度終了) の代表研究者として探索研究を展開し、本学生薬研究所に設置された天然化合物ライブラリーの中から、単胞子分化誘導活性を示すヒダントイン誘導体を発見した。しかし、このヒダントイン誘導体に関しては、光学活性な S 体のみに活性が観察されることや官能基の必要性など、未だ構造化学の見地から不明な点が多い。そこで、本開題研究では、未開拓な領域であるアサクサノリ無性生殖サイクルの解明と実養殖への応用を目指して、ヒダントイン誘導体の構造活性相関研究を実施した。

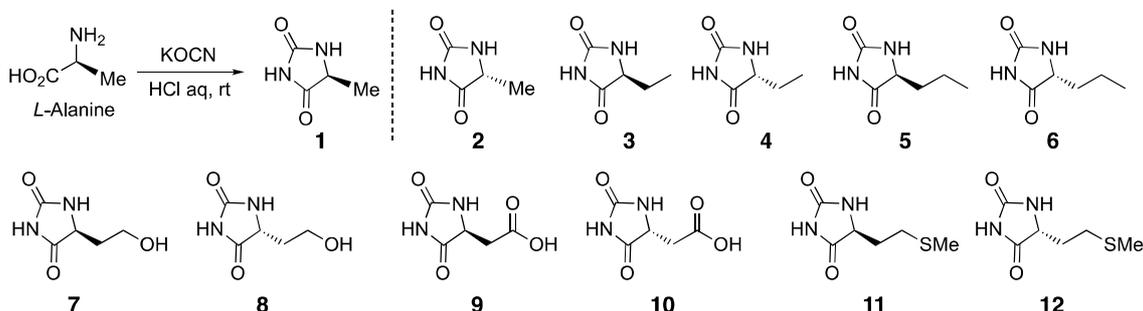
3. 研究の方法

報告者らがこれまでに行ったアッセイ試験の結果では、アサクサノリ葉状体にヒダントイン誘導体を 1.0~10.0 μM 添加して成熟させると、通常形成される果胞子よりも単胞子への分化が優先する。したがって、本申請研究においても、系統的にヒダントイン誘導体を化学合成し、アサクサノリ葉状体に添加して成熟させることで、単胞子への分化率を確認する。そして、単胞子の分化誘導において最適な構造特性を絞り込むと共に、そこから採苗した単胞子を用いて最終藻体まで陸上養殖する。

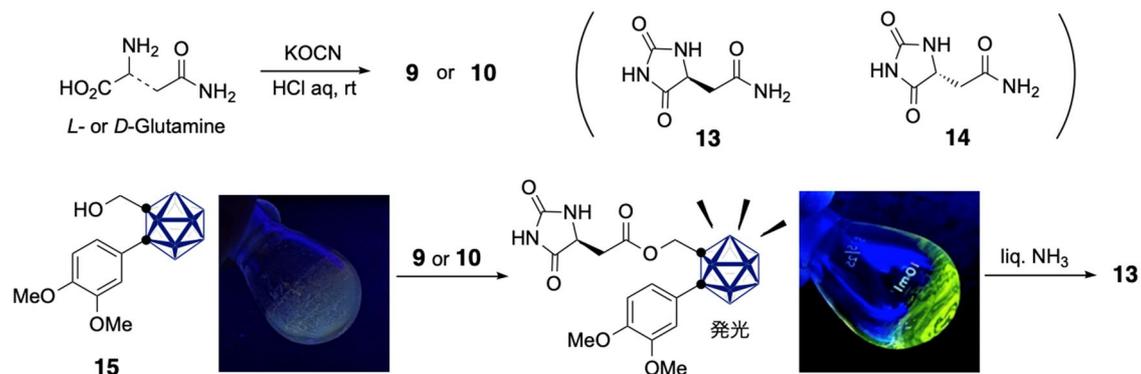
4. 研究成果

まず、当初の計画に従って、ヒダントイン誘導体を系統的に合成した。既知のヒダントイン合成法を利用することで、下図に示した化合物 1-12 を、アラニンをはじめとした各種の対応する光学活性 L-および D-アミノ酸から合成した。

図 1) 合成したヒダントイン誘導体

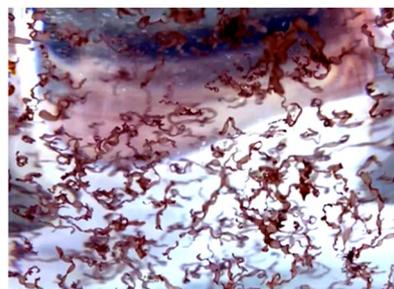
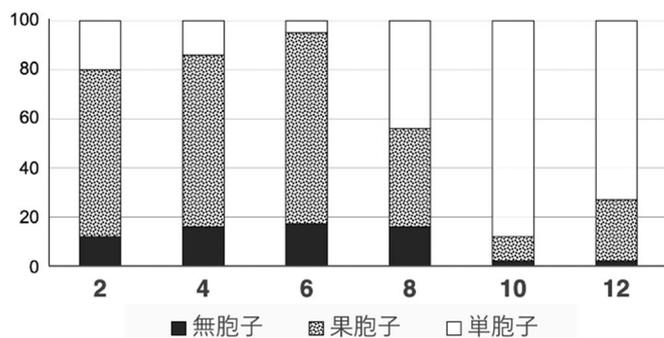


ついで、これまでの知見から最も効果的な単孢子分化誘導活性を示すと考えられた 13, 14 の合成に着手した。本化合物においても、前述した方法と同様に、光学活性な L-および D-グルタミンからの合成を試みた。しかし、生成物は予想に反して、側鎖のアミド基が加水分解した 9, 10 が生成した。その後、反応温度や酸の添加量など条件を異にした反応についても検討を行ったが、主生成物は 9, 10 であった。そこで、グルタミンからの合成を断念し、9, 10 から 13, 14 へと導くことを計画した。



本課題研究で合成を計画したヒダントイン誘導体は、どれも複雑な構造ではない。しかし、既存の発色剤（アニス試薬やニンヒドリン試薬等）では呈色が難しく、UV 吸収も極めて低いことから、薄層クロマトグラフィー等の簡易的な方法では、その有無を確認することが困難である。そこで、まず分子の存在を目視で確認する工夫として、報告者らが別途に開発中のカルボラン分子 15 に、9, 10 を縮合した。カルボラン分子 15 はそのままの状態では発光しないものの、15 の側鎖水酸基がカルボン酸と縮合すると発光する縮合応答性の発光分子である。予想通り、15 に光学活性な 9, 10 をそれぞれ縮合すると 365 nm の UV-A（ブラックライト）照射下で、黄緑色の蛍光を発することが確認できた。その後は、この蛍光を頼りにカラム精製し、液体アンモニアを用いて、エステル部位をアミノリシスすることで、目的のアミド構造を持つ化合物 13, 14 へと導いた。アミノリシス後は、生成物 13, 14 が高い水溶性を示すことから、分液操作による水相を回収するだけで目的物のみを高純度を得ることができた。

合成した全ての化合物は、アサクサノリ葉状体を用いて単孢子分化誘導活性を確認した。培地には滅菌した天然海水を使用し、作業は全てクリーンベンチで行った。栄養強化液、器具等は全て滅菌済みのものを用いた。培養条件は、温度 20 度、光量 (PPFD): $145 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光周期: 12/12 h (明/暗) で、独自調製した培養液を用いた。2.0 mm のコルクポーターでアサクサノリ葉状体 (配偶体) から葉片を作成し、 $0.1 \sim 10.0 \mu\text{M}$ のヒダントイン誘導体を順次添加し、静置培養した。測定は 3 日毎に倒立顕微鏡により単孢子および精子嚢の形成、殻胞子の形成、枯死について観察した。その結果の一部を下表に示した。当初、構造的に最も期待値が高かった 13 及び 14 は、開始 3 日で色調が変化し、6 日で枯死する結果となった。その一方で、最も良好な結果を示した化合物は 10 であった。ただし、化合物 10 は分子型として添加すると、13 や 14 と同様に、枯死を誘導した。カルボキシ基をナトリウム塩とすることが大切で、酸性官能基を中和して添加すると、良好な単孢子誘導活性を示した。さらに、化合物 10 の添加により得られた単孢子は採取し、室内培養することで、正常な葉状体が形成されることも確認した。



室内培養した葉状体

現在、前述した方法を用いて培養したアサクサノリ葉状体を種苗として、陸上養殖と関連遺伝子の解析を継続中である。今後も絶命危惧種アサクサノリの保全と安定養殖法の開発に向けて研究を継続したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋桃香、加来裕人、浅川義範、山本博文
2. 発表標題 アサクサノリ生活環の分化をコントロールする新規天然化合物について（2）
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（横浜）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 猪野純乃、加来裕人、山崎直人、江角朋之、兼目裕充、浅川義範、山本博文
2. 発表標題 アサクサノリ生活環の分化をコントロールする新規天然化合物について
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y. Kinoshita, K. Tanaka, H. Yamamoto, Y. Sato, T. Sakurai, T. Yamasaki, M. Hiraoka.
2. 発表標題 A novel approach for biomass production by controlled switching between unicellular and multicellular growth modes in marine macroalgae.
3. 学会等名 International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (AlgalBBB 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎直人、猪野純乃、加来裕人、岡直宏、山本博文
2. 発表標題 アサクサノリの陸上養殖に向けた分化誘導分子の探索
3. 学会等名 第6回 徳島マリンサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡直宏, 児玉吉平, 浜野龍夫, 山本博文
2. 発表標題 鳴門産アサクサノリの陸上養殖技術の開発
3. 学会等名 第6回 徳島マリンサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

サイエンスの力で地域を元気にしたい！
https://www.bunri-u.ac.jp/info/news/marine_science.html
 藻類成長因子を用いた海藻栽培技術イノベーション
<http://www.bunri-u.ac.jp/brand17/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関