

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07582

研究課題名(和文) 紅藻スサビノリに特有な乾燥耐性付与タンパク質の同定

研究課題名(英文) Identification of specific proteins involved in the desiccation-tolerance of the red alga *Pyropia yezoensis*

研究代表者

山口 健一 (YAMAGUCHI, Kenichi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号：90363473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：乾ノリ(寿司海苔やおむすび海苔など)の原藻となる紅藻スサビノリは、潮間帯に生育するアマノリ属の一種で、強い乾燥耐性をもつ。これまでに、本種の乾燥耐性に関する諸因子は未同定であり、乾燥耐性の分子機構は不明である。本研究では、乾燥変性保護作用をもつタンパク質がスサビノリ葉状体の熱可溶性画分に含まれていることを見出し、高等植物の後期胚形成主要(LEA)タンパク質と弱い配列相同性を有する2種のLEA様タンパク質を同定した。これらのLEA様タンパク質発現レベルは、アマノリ属の潮間帯生育種において顕著であったが、漸深帯生育種においては極めて低かった。

研究成果の概要(英文)：The red alga *Pyropia yezoensis*, which is used to prepare nori-sheets (sushi-nori, omusubi-nori, etc.), inhabits the intertidal zone and is highly tolerant to desiccation. By far, factors involved in the desiccation tolerance of this species have been unidentified, and molecular mechanisms of the desiccation tolerance are still unclear. In this study, we found that heating-soluble fraction extracted from the thalli of *P. yezoensis* contains protective activity against dehydration-induced inactivation of desiccation-sensitive enzymes, and identified two LEA (late embryogenesis abundant)-like proteins that showed weak sequence similarity with higher plant LEA proteins. The expression levels of these LEA-like proteins were prominent in the intertidal species of *Pyropia*, whereas those were very low in the subtidal species.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：スサビノリ 乾燥耐性 LEA 熱可溶性

## 1. 研究開始当初の背景

紅藻スサビノリは、我が国の伝統水産加工食品“海苔”の原藻となるアマノリ属の中でも強い乾燥耐性をもつ。本種は、乾燥下で強い凍結耐性や熱耐性も有し、多収性で栄養価や呈味性にも優れるため養殖・加工・流通に適している。近年は、養殖ノリ生産量の99%以上を本種が占める。一般にはあまり知られていないが、高品質のスサビノリは“畑の肉”といわれるサイズにも勝る大量のタンパク質を含んでおり(乾重量の40%以上)、食用海藻の中で傑出している。その豊富なタンパク質の大部分は、巨大に発達した葉緑体中の多量体酵素(集光・光化学系、炭酸固定酵素ルビスコ、およびタンパク質合成装置リボソーム)に由来する。一般に多量体酵素は脱水や熱により崩壊・変性しやすいが、不思議なことに80℃の熱処理を受けた乾ノリ中で、これら多量体は安定性を保っている。我々は、高等植物の葉緑体リボソームが耐熱菌のrRNA安定化タンパク質ホモログや葉緑体特異的リボソームタンパク質をもつことから、スサビノリの葉緑体リボソームが乾燥や熱に耐えるための安定化タンパク質をさらに付加的にもつ可能性を考え、バイオインフォマティクスとプロテオミクスによる組成解析を行った。しかし予想に反し、解析結果は常温菌(大腸菌)のオーソログのみから成るシンプルな組成を示唆した(Yamaguchi, 2017)。また、200℃で焙焼された乾ノリにアデニル酸デアミナーゼが失活せずに保存されており、咀嚼時に酵素反応でイノシン酸が生じ、遊離アミノ酸のグルタミン酸と相乗した旨味が現れるという驚くべき「焼ノリの呈味発現のからくり」があるが、水和した酵素は45℃で失活する(Nakashima *et al.*, *Fish. Sci.* 2000; Minami *et al.*, *Mar. Biotechnol.* 2011)。このようなことから、ノリの多量体酵素そのものが安定性をもつのではなく、多量体酵素を乾燥下で安定化させる未同定の可溶性因子が存在すると考えるに至った。緑色植物では、LEAとよばれる一群のタンパク質が乾燥耐性に重要な鍵因子であり、脱水中の生体分子の変性・凝集を防ぐと考えられている。LEAの名は、ワタ種子の胚発生後期、乾燥に伴い発現するLEA遺伝子(Late Embryogenesis Abundant)の発見に因む。LEAの多くは、親水性アミノ酸に富み疎水性コアをもたないため、熱可溶性である。水中でランダムに延びた“天然変性”状態であるが、脱水下では $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ 構造をとるといふ、タンパク質の一般的概念とは正反対の性質をもつ。紅藻スサビノリにおいては、これまでにLEAタンパク質が見いだされたという報告はない。また、乾燥耐性の強い昆虫(ネムリユスリカ)では乾燥過程でのLEAタンパク質の発現に加えて大量に蓄積する非還元糖のトレハロースが脱水耐性に大き

く寄与するが、スサビノリはトレハロースをもたず、乾燥中に蓄積もしない。我々は、スサビノリの熱アルコール可溶画分から、緑色植物のLEAとは配列相同性がないが、N末端20残基にLEA様の天然変性領域と化学保護作用(薬物誘導性肝細胞傷害抑制作用)をもつタンパク質PYP1を見出している(Choi *et al.*, 2015)。そこで、ホモロジー検索が困難な新規性の高いLEA様タンパク質が他にも複数種存在するのではないかという着想に至り、スサビノリ葉状体の熱水抽出によりLEA様タンパク質の画分が可能かを試みたところ、80~120℃で加熱しても熱凝集しない熱可溶性(Heating-soluble: HES)タンパク質が大量にあることを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、HESタンパク質群について、(1)抽出条件の最適化、(2)乾燥変性保護試験、(3)HESタンパク質の同定、(4)主要HESタンパク質のアミノ酸配列解析、(5)乾燥感受性のアマノリ属数種を用いた比較生化学的解析を行い、スサビノリ特有の乾燥耐性付与タンパク質を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

## (1) 抽出条件の検討

乾ノリ(全型 3 g)をミル粉碎(IKA Mill control, 25,000 rpm, 1 min)し、300 mLの超純水で抽出を行った(4℃, 60 min)。抽出液を遠心分離(15,000  $\times g$ , 4℃, 30 min)後、得られた上清を加熱処理(20~100℃, 60 min)し、再度同遠心操作により上清を得て、これをHES画分とした。HES画分中に含まれる酸性多糖(ポルフィラン)は、塩化セチルピリジニウム(CPC)の終濃度が0.33%となるように2%(w/v)CPC溶液を添加し、遠心分離(15,000  $\times g$ , 4℃, 30 min)により沈殿物として除去し、得られた上清をHESタンパク質画分とした。

## (2) 乾燥変性保護試験

乾燥変性保護作用が知られているBSA(牛血清アルブミン)をコントロールとして、HES画分およびHESタンパク質画分について、脱水感受性のLDH(乳酸脱水素酵素、ウサギ筋肉由来)に対する保護作用を観察した。サンプルの終濃度が0.1~500 mg/mLとなるように希釈系列を作製し、96穴プレートのウェルに各濃度のサンプルと25 nM LDH酵素溶液(140 kDaの4量体酵素として、25 mM Tris-HCl, pH 7.5にて調製)をそれぞれ25  $\mu$ L加え、10分間振盪撹拌した。その後Speed-vacにより乾燥させた(20℃, 1 h)。乾燥後、50  $\mu$ Lの超純水を加えて再水和させ、10分間振盪撹拌した。LDHの活性測定は、LDHアッセイ混合液(0.44 mg/mL NBT, 0.54 mg/mL  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, 40 U/ml ジアホラーゼ, 50 mM lactic acid lithium salt in 10 mM Tris-HCl, pH 8.5)を調製し、各ウェルに50  $\mu$ L加えて振盪撹拌し、プレートリーダーを用

いて 560 nm の吸光度を測定することにより求めた。

### (3) HES タンパク質の同定

HES タンパク質画分の二次元電気泳動による分離は、Khandakar *et al.* (2013) の方法に従った。ゲル内トリプシン消化と MALDI-QIT-TOF 質量分析計を用いた MS/MS イオンサーチ法によるタンパク質同定は Choi *et al.* (2015) の方法に従って行った。

### (4) HES タンパク質の化学構造解析

MS/MS イオンサーチ法により特定されたコンティグの塩基配列を基に、RACE 法によって遺伝子クローニングを行い、塩基配列の解析から全アミノ酸配列を推定した。

### (5) 比較生化学的解析

大腸菌発現系(pCold ベクター)により HES タンパク質の組換えタンパク質を発現させ、ウサギ免疫によりこれらの抗体を作成した。アマノリ属の潮間帯生育種と漸深帯生育種から調製した HES 画分を SDS-PAGE で分離し、抗 HES タンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法により HES タンパク質の発現量を比較した。

## 4. 研究成果

乾海苔(スサビノリ)の水抽出液を 30~100 で加熱処理(60分)して得られた水溶性タンパク質を SDS-PAGE 分離および質量分析したところ、90 以上の高温処理によっても熱凝集・沈殿しない熱可溶性(Heating-soluble: HES)タンパク質があることがわかった(図1)。HES タンパク質のうち、71 kDa と 46 kDa のタンパク質をそれぞれ HES1 および HES2 と命名した。100 の処理では、HES2 の分解により生じたと考えられるフラグメント(HES2 frag.1,2)が増加する傾向が見られたので、90 で 60 分間処理した可溶性画分を HES 画分として、以後の実験に用いた。

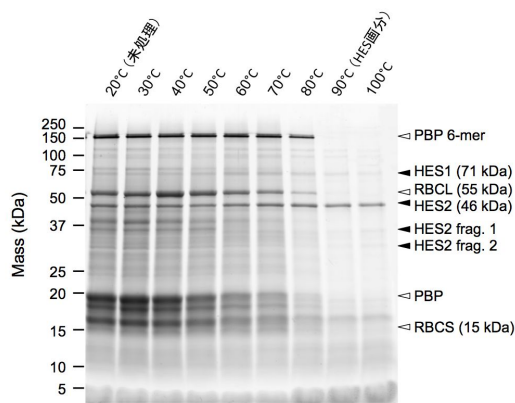


図1 加熱処理後の水溶性タンパク質

HES: 熱可溶性タンパク質; PBP: フィコビリタンパク質; RBCL: ルビスコ大サブユニット; RBCLs: ルビスコ小サブユニット

HES 画分の LDH に対する *in vitro* の乾燥変性保護作用を調べたところ、BSA よりも強い保護作用を示した(図2)。また、CPC 処理に

よって、酸性多糖成分を除去した HES タンパク質画分においても HES 画分と同程度の保護作用を示したことから、乾燥変性保護作用をもつ成分は HES タンパク質であることが強く示唆された。

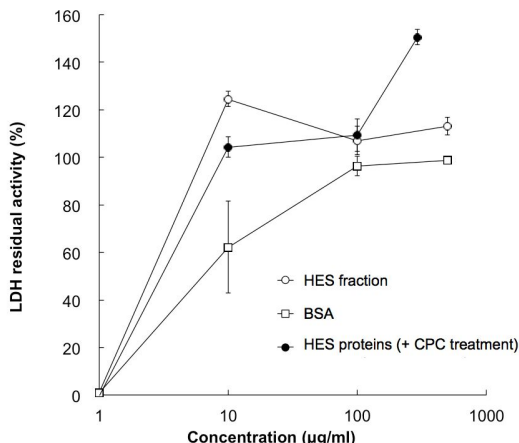


図2 HES 画分と HES タンパク質の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)に対する乾燥変性保護作用

二次元電気泳動により HES タンパク質を分離し、主要なスポットについて MS/MS イオンサーチ法による同定を行なった。LEA 様タンパク質として、新たに 22 kDa のタンパク質が同定され、これを HES3 と命名した(図3)。

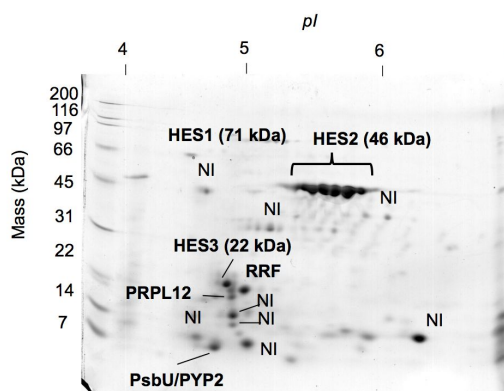


図3 HES タンパク質の二次元電気泳動による分離と質量分析によるタンパク質の同定

HES タンパク質には、LEA 様のタンパク質(HES1, HES2, および HES3)の他、葉緑体翻訳関連タンパク質(PRPL12 や RRF; Yamaguchi, 2011; Yamaguchi, 2017)、光合成装置安定化タンパク質(PsbU/PYP2; Choi *et al.*, 2015)が含まれていることがわかった(図3)。MS/MS イオンサーチ法では遺伝子の特定ができなかったケースも多くあった(NI と示されたスポット)。これは、アマノリのゲノム情報が現状ドラフトレベルであること(ペプチドの観測質量がゲノム配列から算出された理論質量に帰属しないこと)に起因しているか、翻訳後修飾により複雑な構造をもつタンパク質の可能性があり、今後の研究が必要である。

HES1 と HES3 については、PSI-BLAST により、高等植物(ニンジン)のグループ3 LEA タンパク質(DC8)と弱い配列相同性を有することが示された。HES2 については、既知の LEA タンパク質とは配列相同性を示さなかったが、その物理化学的特性 (Ala, Gly, Asx/Glx, Lys/Arg, Thr/Ser に富み、Cys および Trp を欠く) が LEA タンパク質や天然変性タンパク質と類似しており、新規性の高いアマノリ特有の LEA 様タンパク質と考えられた。

HES1 と HES3 は、アマノリ属の潮間帯生育種において顕著に発現しており、漸深帯生育種においては全く発現していないか低い発現レベルであることがわかった(図4)。一方、HES2 では、潮間帯生育種と漸深帯生育種との間にその発現量の差は見られなかった(図4)。以上のことから、アマノリの乾燥耐性には、LEA 様のタンパク質(少なくとも HES1 と HES3)が寄与しているものと推察した。

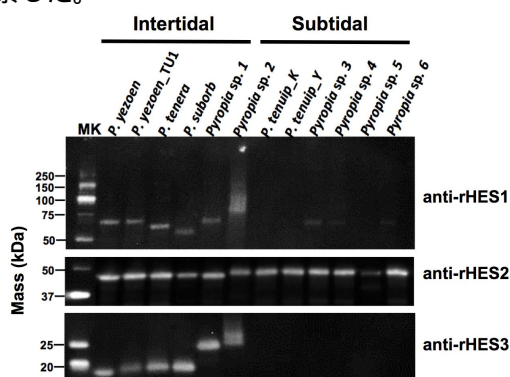


図4 アマノリ属の潮間帯生育種(Intertidal)と漸深帯生育種(Subtidal)における HES1, HES2, および HES3 の発現量の比較

#### <参考文献>

Choi YH, Yamaguchi K, Oda T, Nam TJ. Chemical and mass spectrometry characterization of the red alga *Pyropia yezoensis* chemoprotective protein (PYP): protective activity of the N-terminal fragment of PYP1 against acetaminophen-induced cell death in Chang liver cells. *Int. J. Mol. Med.*, 35, 271-276 (2015).

Khandakar J, Haraguchi I, Yamaguchi K, Kitamura Y. A small-scale proteomic approach reveals a survival strategy, including a reduction in alkaloid biosynthesis, in *Hyoscyamus albus* roots subjected to iron deficiency. *Front. Plant Sci.*, 4, 1-13 (2013).

Yamaguchi K. Preparation and proteomic analysis of chloroplast ribosomes. *Methods. Mol. Biol.*, 775, 241-264 (2011).

#### 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 1 件)

Yamaguchi K. Isolation of Plastid Ribosomes. *Methods Mol. Biol.* 1511, 249-266 (2017) 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

山口健一, 尾島佑, 崔允熙, 南澤正, 小田達也 (2018) 海産紅藻スサビノリの化学保護作用をもつタンパク質群の MALDI-QIT-TOF 質量分析:MS/MS イオンサーチとトップダウン解析 第2回京都生体質量分析研究会シンポジウム年次集会(KBMSS 2018), 京都大学, 京都府京都市, 2018.2.3~2018.2.3

Yamaguchi K, Choi YH, Nam TJ, Kuwano K, Oda T. Proteomic Characterization of Bioactive Proteins from Nori (*Pyropia yezoensis*). ISNFF 2017, The 10<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods. GSCO, Gunsan, Korea, 2017.10.22~2017.10.25 (招待講演)

尾島佑, 山口健一, 山脇萌美, 桑野和可, 小田達也 (2017) 海藻タンパク質の抽出に有効な酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム法 第41回タンパク質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 休暇村南阿蘇, 熊本県阿蘇郡, 2017.8.31~2017.9.2

山口健一, 久留崇寛, 尾島佑, 脇山貴文, 島祐理, 山岡拓也, 山倉那央, 三輪泰彦, 桑野和可, 小田達也 (2017) スサビノリ葉状体の脱水耐性関連候補タンパク質群の同定 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大学, 京都府京都市, 2017.3.17~2017.3.20

森田友梨, 三輪泰彦, 山口健一, 小田達也, 山岸幸正 (2016) 紅藻スサビノリの LEA 様タンパク質をコードする遺伝子の解析 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 2016.11.30~2016.12.02

山口健一, 久留崇寛, 山倉那央, 尾島佑, 桑野和可, 三輪泰彦, 小田達也 (2016) 紅藻スサビノリ葉状体由来熱可溶性タンパク質のプロテオーム解析 日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会, 長崎大学, 長崎県長崎市, 2016.9.15~2016.9.16

山口健一, 山脇萌美, 桑野和可, 小田達也 (2016) 乾ノリ由来色素体リボソームのプロテオーム解析 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌市白石区, 2016.3.28~2016.3.28

〔図書〕(計 0 件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 健一 (YAMAGUCHI, Kenichi)  
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (水産)  
准教授  
研究者番号：90363473

(2)研究分担者

桑野 和可 (KUWANO, Kazuyoshi)  
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (水産)  
准教授  
研究者番号：60301363

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

三輪 泰彦 (MIWA, Yasuhiko)  
福山大学・生命工学部海洋生物科学科・教授