

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05724

研究課題名(和文)陸棲シアノバクテリアがもつ新規紫外線吸収物質の生理機能解析

研究課題名(英文) Physiological role of novel UV-absorbing substances in the terrestrial cyanobacterium

研究代表者

坂本 敏夫 (Sakamoto, Toshio)

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：70324069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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、紫外線に対する防御機構の一つとしてマイコスポリン様アミノ酸(MAA)をもつ。中国産食用イシクラゲ「地皮菜」において *Nostoc-756* が検出され、化学型Cであった。一方、遺伝子型は、既知の4型とは一致しなかった。乾燥状態で長期間保存していたイシクラゲを用いて、光合成活性が保持されている限界を検証した。室温で8年保存した乾燥コロニーを水和すると光合成活性を回復する例があった。イシクラゲと和紙を複合化して「光合成をする紙」を作製した。MAA合成に関与する *mys* 遺伝子群の一部をクローニングすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中国産「地皮菜」についての解析結果は、新たな多様性を示唆しており、今度、地球規模でイシクラゲの多型を調べていく必要がある。イシクラゲが示す乾燥耐性について長期保存の限界を実験的に検証し、乾燥状態で最長8年間保存したサンプルでも光合成活性を回復する例が示された。この結果は、本生物における光合成活性の寿命を学術的に検証した論文として初めての記載である。イシクラゲを利用して「光合成をする紙」を作製する試みは、芸術作品の素材とすることを想定しているが、さらに研究を進めてストレス環境下で光合成装置を保護するしくみの解明や生物活性を長期に乾燥保存する技術開発へ活かされていくであろうと期待する。

研究成果の概要(英文)：Mycosporine-like amino acids (MAAs) are UV-absorbing pigments. The terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* is classified into four chemotypes by differences in their MAA derivatives. The dry thalli are sold as a food in China under the name of Di Pi Cai. *Nostoc-756*, mycosporine-2-(4-deoxygadusolyl-ornitine), was found to be a main MAA in Di Pi Cai. Molecular genetic features of Di Pi Cai did not exactly match those of genotypes found in Japan, which suggests the global diversity of *N. commune*. Recovery of photosynthesis in a short time after rehydration was examined using our laboratory stocks of *N. commune* thalli after long-term storage in a desiccated state. Although there was an exceptional case in which photosynthetic oxygen evolution recovered after 8 years of storage at room temperature, the ability to recover photosynthesis can be maintained for several years. The trial to develop "paper with photosynthesis capability" was successful to be used as a material for works of art.

研究分野：植物生理生化学

キーワード：環境耐性 極限環境生物 光合成 天然物 無水生活様式

## 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。陸棲シアノバクテリア *Nostoc commune* (和名: イシクラゲ) は陸上の環境に適応しており、極限的な乾燥耐性を示す。申請者は、これまでイシクラゲを研究材料とし、無水生活様式のメカニズムを研究してきた。生物が水を失って休眠し、生命活動を再開できる状態で維持するしくみを物質レベルで解明することが、最終的に到達することを目指す学術的「問い」である。

イシクラゲは、休眠孢子などを形成することなく、光合成を営む栄養細胞が非常に強い乾燥耐性を獲得して陸上環境に適応している。遺伝的多型があり 4 種類に大別されるが、これらを形態的に区別することは困難である。イシクラゲは紫外線に対する防御機構の一つとしてマイコスポリン様アミノ酸 (MAA) をもつ。MAA は 310 から 340 nm の領域に吸収極大を示す紫外線吸収色素である。イシクラゲは MAA の違いによって 4 種類の化学型に分けられる。化学型の違いは遺伝子型の違いと一致する。また、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」と総称すべき新規天然物であった。MAA 配糖体は、紫外線防御に加えて抗酸化活性を示すことが分かり、多機能性分子としてイシクラゲの極限的な乾燥耐性に深く関与すると考えられる。

シアノバクテリアのゲノム解析の知見が蓄積しており、複数のシアノバクテリアで MAA の生合成経路を司る *mys* 遺伝子群が明らかにされている。申請者は、これまでの研究により遺伝子型 A のイシクラゲおよび *Nostoc verrucosum* (和名: アシツキ) において、MAA の一つポルフィラ-334 の生合成に関わる *mysABCD* 遺伝子クラスターを明らかにしている。研究開始当初 A 型以外の 3 遺伝子型については未着手であった。また、MAA 骨格に糖鎖を付与する遺伝子は解明されていない。

イシクラゲが MAA 配糖体をもつ生物学的な意義の解明は未着手の研究課題である。本研究課題は、申請者が発見した新規天然物について、申請者自身がさらに研究を進展させ、生合成経路と生理機能を解明する研究と位置づけられる。MAA 配糖体をもつ生理生態学的な役割が解明できれば、微生物生態学の発展に寄与することができるばかりでなく、天然物に関する新たな知見が付け加えられるものとする。

## 2. 研究の目的

遺伝子型 B、C および D のイシクラゲから *mys* 遺伝子群を単離する。単離した遺伝子を形質転換型シアノバクテリアに導入して形質転換体を作製する。形質転換体が環境ストレス耐性能を獲得したか否かを生理学的手法により評価する。また、イシクラゲが示す極限的な環境耐性能の詳細を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *mys* 遺伝子群の単離

材料として以下の培養株を用いた。

*Nostoc commune* strain KU002 (NIES-2538) 遺伝子型 A

*Nostoc commune* strain KU006 (NIES-3989) 遺伝子型 B

*Nostoc commune* strain KU007 (NIES-3990) 遺伝子型 C

*Nostoc commune* strain KU008 (NIES-3991) 遺伝子型 D

これらは国立環境研究所微生物系統保存施設に寄託している。

遺伝子型 B および遺伝子型 C がもつ *Nostoc-756* 生合成に関わる *mysABDC2C1* 遺伝子クラスターが別種のシアノバクテリアにおいて報告されている。これらの遺伝子の塩基配列情報に基づいて *mysABDC2C1* 遺伝子を増幅する PCR プライマーを設計し PCR 法を用いて標的遺伝子を増幅してクローニングする。遺伝子型 D がもつパリスン-スレオニンの生合成経路には、マイコスポリン骨格からグリシンを脱離する反応が想定される。別種のシアノバクテリアにおいて報告されている *mys* 遺伝子群の塩基配列情報に基づいて PCR プライマーを設計し PCR 法を用いて *mys* 遺伝子群を増幅してクローニングする。

### (2) イシクラゲにおける MAA の多様性の探索

外国産イシクラゲの試料として中国で食品として販売されている「地皮菜 (Di Pi Cai)」を用いた。PCR ダイレクトシーケンシングを用いて 16S rDNA の塩基配列を決定し「地皮菜」の遺伝子型解析をした。また、「地皮菜」抽出物を LC 分析して MAA 化学型解析をした。また、主要な MAA を精製して質量分析した。

### (3) イシクラゲにおける光合成活性の寿命

これまでイシクラゲ研究を進めてきた成果物として、採集日を記した乾燥標本を研究室に保存

している。15年以上、室温または-20℃の冷凍庫で保存していた試料を用いて水和後に光合成活性を回復するか否か調べた。水から二酸化炭素までの光合成電子伝達を評価するためクラーク型酸素電極を用いて酸素発生速度を測定した。光合成色素に変化が見られるか否か検証するため、抽出液をLC分析した。また、ビタミンE（ $\alpha$ -トコフェロール）含量をLC分析によって定量した。

(4) 「光合成をする紙」の検証

イシクラゲと和紙を複合化した「光合成をする紙」の試作品の提供を受けた。水和後に光合成活性を回復するか否か調べるため、クラーク型酸素電極を用いて光合成的酸素発生能を測定した。抽出物をLC分析してMAA化学型解析をした。

4. 研究成果

(1) *mys* 遺伝子群の単離

標的遺伝子の一部を単離することができた。現在、引き続き遺伝子全長を単離する実験を進めている。これまでに単離しているイシクラゲおよびアシツキの *mysABCD* 遺伝子において、1本の長鎖DNAとしてはクローニングすることができておらず、いくつかのDNA断片としてクローニングしている。PCRの細部の条件、クローニングする際に用いるベクターの選択など、実験条件の細部を検討する必要がある、と考えている。

(2) イシクラゲにおけるMAAの多様性の探索

地皮菜の遺伝子型は、これまで見いだされた4型とは一致しなかった（図1）。一方で、主要なMAAとして *Nostoc-756* が検出された（図2）。化学型としてはC型と同定された。外国産イシクラゲと比較することによって新たな多様性が示唆され、今度、日本国内で見いだされた4型が地球規模ではどのような分布を示すか、明らかにしていく必要がある。

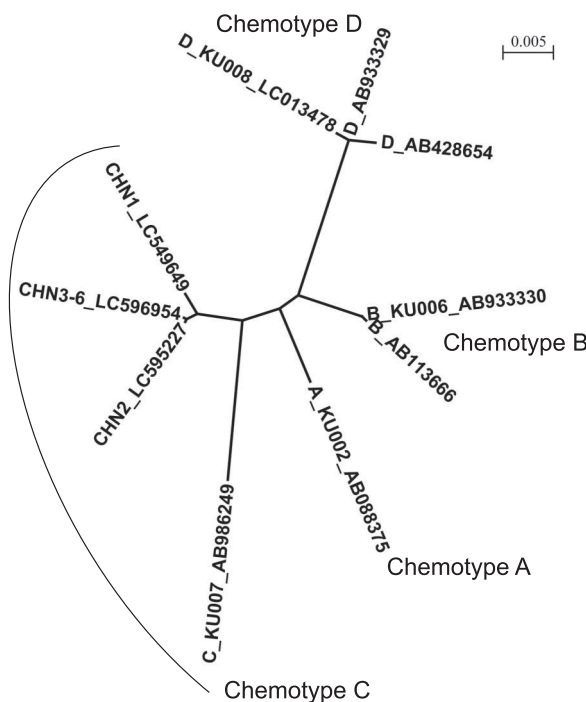


図1 地皮菜（CHN1-6）と日本産イシクラゲ（遺伝子型A-D）の分子系統解析結果 Wei et al (2021) doi: 10.2323/jgam.2021.03.003

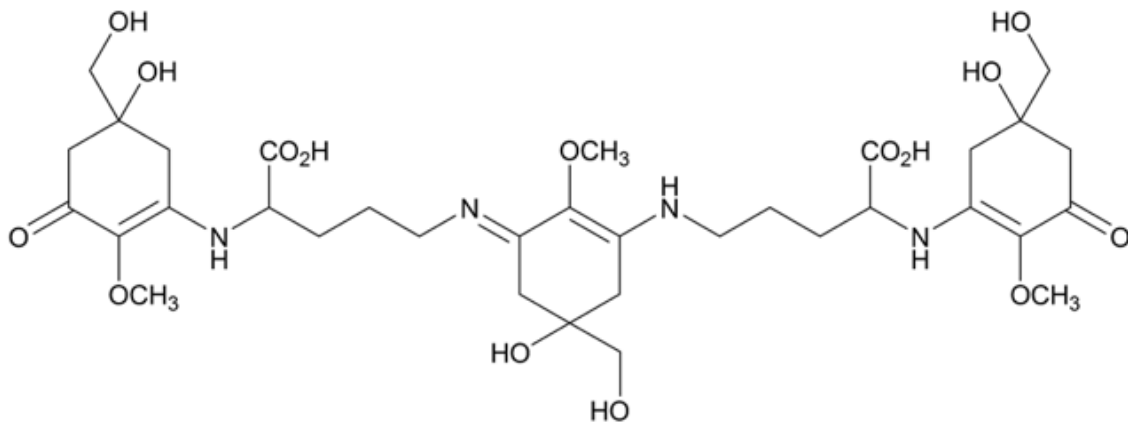


図2 Nostoc-756 の化学構造 Sakamoto et al (2019) doi: 10.1111/pre.12333

### (3) イシクラゲにおける光合成活性の寿命

室温で8年以上乾燥保存したサンプルでは、水和後に呼吸活性は回復したが、光合成活性は回復しなかった。8年間室温で乾燥保存したサンプルで光合成活性を回復する例が1例だけ示された。含まれている光合成色素およびビタミンEを分析したところ、 $\beta$ -カロテンと $\alpha$ -トコフェロールが特異的に失われていることがわかった。その他のカロテノイドおよびクロロフィルに顕著な変化は見られなかった。これまでの経験から2年程度光合成活性が維持されることが分かっていたが、長期に乾燥状態で室温保存した場合、徐々に損傷を受け、水和後直ちには光合成活性が回復しないことが実験的に示された。 $-20^{\circ}\text{C}$ で15年以上保存したサンプルでは光合成活性が保持されていた。低温で保存した場合、光合成色素の組成および $\alpha$ -トコフェロール含量に顕著な変化は見られなかった。低温で保存することによって光合成活性が維持されていたことから、損傷を受ける速度は保存条件に依存することが分かった。イシクラゲが示す極限的な乾燥耐性と水和によって光合成活性が回復するメカニズムを今後さらに解析していく必要がある。

### (4) 「光合成をする紙」の検証

「光合成をする紙」は、和紙の原料となるコウゾの繊維とイシクラゲの葉状体の小片から構成されており、吸水させることによって光合成的酸素発生能を回復した。「光合成をする紙」の抽出液には複数のMAAが検出された。これによりMAAを保持した状態で和紙と複合化されており、また、含まれているイシクラゲは複数の化学型の混合物であることが実験的に示された。ここでの試みは芸術作品の素材とすることを想定しているが、今後研究を進めることによりストレス環境下で光合成装置を保護するしくみの解明や生物活性を長期に乾燥保存する技術開発へ活かされていくであろうと期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wei Yang, Nishiuchi Takumi, Sakamoto Toshio	4. 巻 67
2. 論文標題 Characterization of mycosporine-like amino acids in the edible cyanobacterium <i>Nostoc commune</i> (Di Pi Cai) from China	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 260 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2021.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Toshio, Wei Yang, Yuasa Koki, Nishiyama Yoshitaka	4. 巻 68
2. 論文標題 Recovery of photosynthesis after long-term storage in the terrestrial cyanobacterium <i>Nostoc commune</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2022.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshio Sakamoto
2. 発表標題 Longevity of Photosynthesis under Desiccated State
3. 学会等名 17th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本敏夫
2. 発表標題 イシクラゲの光合成活性は長期間乾燥状態で維持されている
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------