

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05350

研究課題名(和文) 低水分環境において誘導される陸棲シアノバクテリアの乾燥耐性機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of drought tolerance mechanisms involved in the process of dehydration in a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01.

研究代表者

安部 智子 (Abe, Tomoko)

東京電機大学・理工学部・准教授

研究者番号：40553524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高い過酷環境耐性を備える *Nostoc* sp. HK-01 の環境耐性機構、とくに乾燥耐性におけるストレス耐性機構の解明を目的として研究を行ってきた。*Nostoc* sp. HK-01 が産生する細胞外物質(ES; Extracellular substance)中の紫外線吸収物質について明らかにし、紫外線曝露後のES未除去細胞の生存率がES除去細胞の生存率と比較して有意に高いことを示した。また、*Nostoc* sp. HK-01 の湿潤-乾燥サイクルにおける遺伝子発現解析を行い、本株の乾燥耐性に関与する可能性のある遺伝子を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nostoc sp. HK-01 では、栄養細胞以外に、休眠細胞や連鎖体、異型細胞の存在が報告されている。休眠細胞の乾燥耐性については勢力的に研究が進められてきたが、細胞群全体の耐性についてはほとんど明らかにされていない。細胞外物質に含まれる機能性物質の存在および細胞の水分量に相関する遺伝子発現を明らかにしたことから、細胞群全体の遺伝子発現や発現した代謝系からの物質が、細胞群全体としての乾燥耐性に寄与している可能性を示した。本株の乾燥耐性全容を明らかにすることは、全生物の細胞や組織に対する乾燥耐性機能の付与や食品の長期保存方法の発展に、また、様々な生物のストレス耐性機構の解明に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Research has been conducted to elucidate the mechanisms of environmental tolerance of *Nostoc* sp. HK-01, which is highly tolerant to harsh environments, particularly stress tolerance in terms of desiccation tolerance. UV-absorbing substances in the extracellular substance (ES) produced by *Nostoc* sp. HK-01 were identified and the survival rate of cells with ES after UV irradiation was significantly higher than that of cells without ES. Gene expression analysis during the wet-dry cycle of *Nostoc* sp. HK-01 was also carried out to detect genes that may be involved in the desiccation tolerance of HK-01.

研究分野：応用微生物学

キーワード：シアノバクテリア 環境応答 過酷環境耐性 紫外線耐性 遺伝子発現解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリアの多くは水中に棲息しているが、陸上に棲息する種も存在する。陸棲の *Nostoc* 属は湿った場所でよく生育するが、晴天時の無水環境下にも耐えなければならず、中には細胞が乾燥した状態で長期間の生存が可能であることが知られている種もある。本研究に用いる菌株 *Nostoc* sp. HK-01 は、陸棲シアノバクテリアの中でも特に乾燥に高い耐性を備えた株として、研究分担者の加藤らにより単離された [*Microbes Environ.*, **18**, 82-88. (2003)]. 本株の休眠細胞の乾熱耐性については申請者らが研究を進めてきたが、湿潤状態から乾燥状態への移行過程における藻塊全体としての乾燥耐性の変化や耐性功能に関連する物質群の詳細は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

陸棲シアノバクテリア *Nostoc* sp. HK-01 において、細胞内低水分状況下 (乾燥時) における機能性物質の探索および乾燥過程において誘導される遺伝子 (代謝系) を同定、また、それらの相関を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 材料と培養方法

分担者の加藤らが単離した (2003) 陸棲シアノバクテリア *Nostoc* sp. HK-01 (NIES-2109) をすべての実験に用いた。*Nostoc* sp. HK-01 の培養にはシアノバクテリアの培養で汎用される BG-11 培地を用い、常光下、25°C で振とう培養した。

2) FDA (Fluorescein diacetate) 染色による生存細胞の観察

FDA 染色手法により生存細胞を調べた。生存細胞の観察は、蛍光フィルター-NIBA (励起波長 470~490 nm) を備えた正立型蛍光顕微鏡を用いた。

3) 細胞外物質 (Extracellular substances, ES) の抽出と分画

500 mL 容量の坂口フラスコを用い、*Nostoc* sp. HK-01 を 150 mL の BG-11 液体培地中で 20 週以上培養して得られた培養液から、細胞を取り除き、ES 画分を得た。確実に細胞を除いた後の培養液を、減圧下濃縮乾固した。ES 粗抽出物を、極性に従い分離した後、各画分の機能を調べた。

4) RNA の抽出と解析

15 日間培養した *Nostoc* sp. HK-01 の細胞を使用した。乾燥開始直後 (新鮮重量 100%) と乾燥開始後 24 時間 (新鮮重量 50%)、乾燥開始後 48 時間 (新鮮重量 10%) の細胞を採取した。採取した細胞をそれぞれ Trizol® 中で海砂を加えて磨り潰し、トータル RNA を抽出した。抽出液に DNase を加えて 90 分間反応後、トータル RNA を精製した。RNA-Seq 解析 (株式会社生物技研に委託) を行った。また、精製した RNA をテンプレートとして逆転写酵素反応を 1 時間行い、cDNA を調製した。RNA-Seq 解析により検出された各候補遺伝子 (Nos-AS1~9)、および *Nostoc* sp. HK-01 の類縁株である *Anabaena* PCC7120 の乾燥過程において発現量の変化が報告されたショ糖の合成に関わる遺伝子、トレハロースの合成に関わる遺伝子のプライマーを用いて定量 PCR 反応を行った。

5) タンパク質の抽出と二次元電気泳動

乾燥直後の細胞群と乾燥開始後 24 時間の細胞群、乾燥後に加水した後 24 h 後の細胞群をそれぞれ超音波破碎してタンパク質を抽出し、アセトン沈殿により精製した。Immobiline Drystrip (Cytiva) に精製したタンパク質溶液を浸透させ、一次元目、二次元目の電気泳動を行った。銀染色 II キットワコーを用いて染色し、得られたスポットを比較した。

4. 研究成果

1) ES の紫外線保護機能

ES の紫外線保護機能について、細胞を取り巻く ES の存在の有無により調べた。ES 未除去乾燥細胞の生存率は ES 除去乾燥細胞の生存率よりも高いことが示された (図 1)。この結果は、本株の ES が特徴的に紫外線 (UV-C) に対する細胞保護機能を具備する事実を示した。本株の ES は、光反射機能は示さず、特に紫外線 C 波を著しく吸収する機能を具備することを本研究で明らかにした。

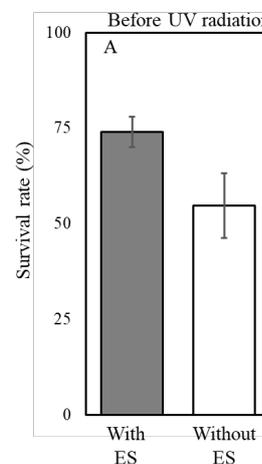


図1 ES除去および未除去乾燥細胞の生存率
Eco-Engineering 35, 13-23.
Fig.6より改変

2) 分化に及ぼす ES の影響

本株の乾燥状態の休眠細胞は、乾燥環境に曝された後も加水することで発芽し栄養細胞に分化し増殖する。栄養細胞はその後、生育環境中の何らかの刺激に応答することで、運動性を示すホルモゴニアや窒素固定に特化したヘテロシスト等に分化し生育場所を広げ増殖すると考えられる。ES 除去細胞に、異なる濃度の ES 抽出物を与えたところ、ある一定の濃度において、栄養細胞からホルモゴニア形態に分化することが確認された。これらの結果は、本株の ES がアキネートから栄養細胞への分化（発芽）に加え、栄養細胞からホルモゴニアへの分化を制御する機能を備えることを明らかにした。

3) 乾燥過程におけるトランスクリプトーム解析

乾燥過程で発現量が変化する遺伝子を網羅的に探索するため RNA-Seq を用いて解析した。Total RNA は TriZol 試薬を用い、海砂で藻塊をすりつぶして抽出した。Total RNA は解析機関に送り、RNA-Seq 解析を委託した。乾燥開始直後（新鮮重量 100%）と乾燥過程（新鮮重量 50%）との遺伝子発現を比較して、発現増加した遺伝子は 267 固、減少した遺伝子は 23 固であった。発現が顕著に増加した遺伝子には 2 種の Heat shock protein 遺伝子が含まれており、類縁株である *Nostoc sp.* PCC7120 の乾燥過程と類似の傾向を示した。発現増加した遺伝子には機能未知のものも 4 種類検出された。

4) 定量 PCR

RNA-Seq の結果をもとに、定量 PCR で個別の遺伝子発現を確認した。乾燥誘導遺伝子のコントロールとして *Nostoc sp.* PCC7120 で乾燥により発現誘導されるショ糖合成、トレハロース合成に関わる遺伝子を用い、本株においては候補となる 9 種類の遺伝子 (Nos-AS1~9) を候補として遺伝子発現変化を定量 PCR で評価した。乾燥直後（新鮮重量 100%）、乾燥中期（新鮮重量 50%）、乾燥後（新鮮重量 10%）の細胞から RNA を抽出し、逆転写後に定量 PCR に用いた。その結果、乾燥過程

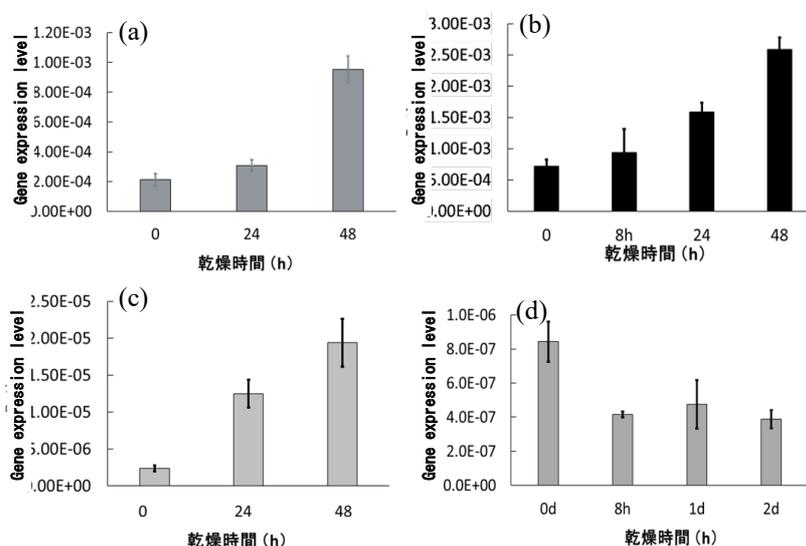


図2 乾燥過程における遺伝子発現量の比較
(a) Nos AS-1遺伝子, (b) Nos AS-2遺伝子,
(c) ショ糖合成遺伝子, (d) トレハロース合成遺伝子

で 4 種類の遺伝子およびショ糖合成に関する遺伝子の発現増加が認められた(図 2)。なお、本株ではトレハロース合成酵素の遺伝子の発現増加が検出されなかったが、本株ではショ糖合成に関わる遺伝子よりも定量 PCR での発現量が低いため定量 PCR では変動を十分に検出できなかった可能性が高い。また、PCC7120 は細胞外高分子物質が少なく、本株は細胞外高分子物質が多いため、新鮮重量で比較した場合、本株の細胞外高分子物質中の水分の減少が大きく細胞の水分減少が大幅に抑制されたため、PCC7120 で起こる細胞内の水分減少によるトレハロース合成酵素遺伝子の発現増加が本株では見られなかったと推測される。

5) 乾燥および蘇生過程におけるプロテオーム解析

乾燥開始直後（新鮮重量 100%）と乾燥開始後 24 時間（新鮮重量 50%）におけるタンパク質の発現量を比較するため、二次元電気泳動でパターンを比較した。細胞の乾燥開始直後から乾燥 24 時間までの間に発現が増加または減少したタンパク質のスポットが、10、20、150 kDa 付近に確認された。確認されたスポットのうち乾燥により新たに検出されたスポットは 3 点、消失したスポットは 2 点であった。乾燥後（新鮮重量 10%）と加水後 24 時間の細胞におけるタンパク質の電気泳動パターンの比較では、加水後に減少するスポットが 2 点、加水後 24 時間で増加するスポットが 6 点確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Midori Ong, Miku Tokita, Hiroshi Katoh, Tomoko Abe, Sayaka Takahashi, Hajime Mita, Kazumichi Nakagawa, Toshisada Suzuki, Kaori Tomita-Yokotani	4. 巻 35
2. 論文標題 Contribution of extracellular substances to cell protective abilities against UV radiation and differentiation of germination, vegetative cells and hormogonia, during their life cycle in Nostoc sp. HK-01	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eco-Engineering	6. 最初と最後の頁 13-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11450/seitaihogaku.35.13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柴崎 健豪、オン 碧、鴫田 未来、横谷 香織、加藤 浩、安部 智子
2. 発表標題 乾燥環境下における陸棲シアノバクテリア Nostoc sp. HK-01 の遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 オン碧、鴫田未来、加藤浩、鈴木利貞、安部智子、横谷香織
2. 発表標題 陸棲シアノバクテリアNostoc sp. HK-01の乾燥と湿潤時の細胞外物質の役割
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鴫田未来、オン碧、加藤浩、安部智子、横谷 香織
2. 発表標題 Nostoc sp. HK-01乾燥藻体の加水後の休眠細胞 - 発芽時の活性酸素除去機能 -
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 オン碧、鵜田未来、加藤浩、鈴木利貞、安部智子、横谷 香織
2. 発表標題 乾燥と湿潤を繰り返す陸棲シアノバクテリアNostoc sp. HK-01の細胞外物質の役割
3. 学会等名 植物化学調節学会第 57 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鵜田未来, オン碧、加藤浩、安部智子、横谷香織
2. 発表標題 シアノバクテリアNostoc sp. HK-01の発芽と 細胞内ROS消去機能
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第36回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaori Tomita-Yokotani, Midori Ong, Miku Tokita, Hiroshi Katoh, Tomoko Abe, Shunta Kimura, Hirofumi Hashimoto, Kintake Sonoike, Masayuki Ohmori, Akihiko Yamagishi, Hajime Mita, Tanpopo member.
2. 発表標題 Relationship between the cells layer thickness and wavelength of sun light in a cyanobacterium, Nostoc sp. HK-01, in especially UV radiation
3. 学会等名 COSPAR 2022 44th Scientific Assembly (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鵜田未来、オン碧、安部智子、加藤浩、横谷香織
2. 発表標題 過酷環境耐性を備えたシアノバクテリアの生存戦略 - 活性酸素除去機能からの検証 -
3. 学会等名 2022生態工学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 8. 柴崎 健豪、田中 博子、加藤 浩、富田-横谷 香織、オン 碧、安部 智子
2. 発表標題 陸棲シアノバクテリア Nostoc sp. HK-01の低水分環境において誘導される遺伝子の発現解析
3. 学会等名 JpGU Meeting 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 博子、安部 智子、加藤 浩、オン 碧、富田-横谷 香織
2. 発表標題 陸棲藍藻 Nostoc sp. HK-01の低水分環境において誘導されるタンパク質の解析
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2021年大会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	横谷 香織 (Yokotani Kaori) (10217531)	筑波大学・生命環境系・客員研究員 (12102)	
研究 分担者	加藤 浩 (Katoh Hiroshi) (30378327)	三重大学・地域イノベーション推進機構・助教 (14101)	

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