

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510227

研究課題名（和文）陸棲シアノバクテリアが営む無水生活様式を司る機能性分子の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of anhydrobiosis in the terrestrial cyanobacterium

研究代表者

坂本 敏夫（SAKAMOTO TOSHIO）

金沢大学・自然システム学系・准教授

研究者番号：70324069

研究成果の概要（和文）：

陸棲シアノバクテリア (*Nostoc commune*) は、非常に強い乾燥耐性を示す光合成生物である。本研究では、無水環境下における生命維持機構に関わる機能性分子のひとつとしてマイコスポリン様アミノ酸 (MAA) を解析した。本生物がもつ新規 MAA は、糖を結合した特異な化学構造をもち、抗酸化活性を示す多機能性分子であることを明らかにした。また、遺伝子型ごとに含まれている MAA 配糖体の違いが発見され、*N. commune* は 3 種類の型に大別されることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are water-soluble pigments that absorb UV radiation of 280 to 340 nm. In this study, novel MAAs were purified from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*, and their chemical structures were characterized. These unique glycosylated MAAs have multiple roles as a UV protectant and an antioxidant relevant to anhydrobiosis in this organism. Moreover, glycosylated MAA patterns could be a feasible chemotaxonomic marker for the characterization of the morphologically indistinguishable *N. commune*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：植物生理生化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生理活性物質，極限環境生物，抗酸化，紫外線

1. 研究開始当初の背景

人体を構成する物質のおよそ 65% が水で

ある事実からも明らかのように、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、100 年以上の長期に

わたって乾燥状態に耐えて生命を維持し、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) と呼ばれる生命現象である。研究代表者は、酸素発生型の光合成を営む原核生物である陸棲シアノバクテリア *Nostoc commune* (和名: イシクラゲ) を材料とし、本生物が示す極限的な乾燥耐性のメカニズムを研究している。

陸棲シアノバクテリアは、極寒の南極大陸や中国の砂漠地帯などの過酷な環境にも耐えることができるため、地球上にコスモポリタンとして分布するユニークな生物である。その一方で、駐車場や芝生の中など、私たちの身近な場所でよく見られる路傍の生物でもある。生物学的に興味深い生物ではあるが、極限的な乾燥耐性のメカニズムの詳細は明らかではない。

これまでに研究代表者は光合成活性の測定や生体染色法などの生理学的な手法を用いて、本生物が営む無水生活様式を現象面から詳細に解析し、さらに物質レベルでの解明をめざして生体物質化学的手法を取り入れ、複合的視点から研究を進めてきた。

一般に、乾燥などのストレス条件下で無制限に光合成が進行すれば、大量の活性酸素が発生することになる。従って、乾燥によって水が失われていく過程で光化学反応系をすみやかに停止すると同時に、光化学反応系を構成するタンパク質や生体膜などが損傷しないように保護するしくみが必要不可欠であると考えられる。無水生活様式のメカニズムには非還元二糖であるトレハロースが深く関与していると考えられており、陸棲シアノバクテリアでも乾燥の過程でトレハロースが蓄積する。さらに抽出物中に含まれる抗酸化活性を調べている過程で、既知の抗酸化物質であるカロテノイドなどに加えて、それまで紫外線吸収物質として解析を進めていたスキトネミンおよびマイコスポリン様アミノ酸(MAA)が含まれている画分に強い抗酸化活性を示すことを見いだした。こうした背景のもとに、紫外線吸収物質を抽出・精製して化学構造解析をするとともに、機能解析のひとつとして精製標品を用いて抗酸化活性を調べることを着想した。

2. 研究の目的

本研究課題は、陸棲シアノバクテリアに含まれている紫外線吸収物質および抗酸化物質に着目し、これらの機能性分子の極限的な乾燥耐性における役割を明らかにすることを目的とする。光合成原核生物という単純な系で無水生活様式のメカニズムを物質レベ

ルで解明する研究として位置づけられる。さらに無水生活様式を示さない近縁種との比較を通じて、水棲シアノバクテリアが無水生活様式を獲得して陸棲化した過程の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

金沢大学のキャンパス内に豊富に自生している陸棲シアノバクテリア *Nostoc commune* (イシクラゲ) を採集して材料に用いた。本生物は、生理活性物質や酵素タンパク質を抽出して精製するために必要となる試料をキログラム単位で確保できること、さらに近縁種 *Nostoc punctiforme* のゲノム情報が活用できることなどから、無水生活様式を営む光合成生物のモデルとして有利な条件を備えている。比較対照とする水棲シアノバクテリアとして、白山市獅子吼で採集した *Nostoc verrucosum* (アシツキ) を用いた。本生物は、万葉集に収録されている和歌に詠まれているなど、我が国で古来より食用となる藻類として知られている。*N. commune* と同様に多量の細胞外多糖をもつなどの共通点があるが、乾燥耐性を示さない。

(2) 遺伝子型の解析

Nostoc 属ラン藻は有効な識別形質が少ないことに加えて、生育環境によって形態が著しく変化する場合があり、形態的な違いによる区別が困難である。そこで、マーカー遺伝子として 16S rRNA, *petH*, *groESL* および *nrtP* を選び、採集地点の異なる複数の試料について PCR ダイレクトシーケンス法により、それぞれの遺伝子を増幅して塩基配列を決定し、遺伝子型の解析を行った。

(3) 紫外線吸収物質の抽出・精製

N. commune の粉末を蒸留水に懸濁して攪拌した後、遠心分離によって上清を分画し、抽出液とした。抽出液に 70% となるようにエタノールを加え、70% エタノールに不溶な成分を沈殿させて分離した。ろ過した後、減圧濃縮した。続いて逆相カラムを装着した液体クロマトグラフィーを用いて MAA を精製した。回収した MAA 画分をゲルろ過カラムを用いてさらに精製した。30 g の乾燥粉末を出発材料とした場合、およそ 1 mg の MAA を精製標品として得ることができた。

(4) 化学構造解析

MALDI-TOF MS 解析をタンデム質量分析計 (ABI 4800 plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer) を用いて行った。マトリックスとして 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を用いた。検出された分子イオンフラグメントについて、可能な場合はさらに MS/MS 解析を行った。

重水 (D₂O) 中の NMR スペクトラムを核磁気共鳴装置 (JOEL ECA400) を用いて測定した。内部標準として 3-(trimethylsilyl) propanoic acid (TMP) を用いた。

赤外吸収スペクトルをフーリエ変換赤外分光光度計 (Nicolet NEXUS 470 FT-IR) を用いて KBr 錠剤法により測定した。紫外および可視光領域の吸収スペクトルを分光光度計 (Hitachi U-2800) を用いて測定した。

(5) 抗酸化活性の評価

ABTS (2', 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ラジカル消去活性を測定し, *in vitro* の系での抗酸化活性を定量した。ABTS 有機ラジカル溶液に試料を添加して反応させ, 734 nm の吸光度変化を分光光度計を用いて測定した。また, フリーラジカルモニター (JOEL JES-FR30EX) を用いてラジカルの減少量を直接測定した。対照として, 水溶性ビタミン E 誘導体であるトロロックス

(6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) を用いた。

4. 研究成果

本研究課題では次の 3 点の研究成果をあげた。

(1) 新規紫外線吸収物質の発見と抗酸化活性の同定

陸棲シアノバクテリア *Nostoc commune* (イシクラゲ) は, 2 種類の紫外線吸収物質をもつことが知られており, ひとつはシアノバクテリアでのみ報告されているスキトネミンである。380 nm 付近の紫外線 (UV-A) を特異的に吸収する。もうひとつの紫外線吸収物質は Mycosporine-like amino acid (MAA) である。スキトネミンよりも短波長の紫外線 (UV-B) を吸収する。本研究では, *N. commune* から抽出・精製したスキトネミンが強い抗酸化活性を示すことを明らかにした。また, 分子量 478 Da, 1050 Da, 508 Da および 613 Da の新規 MAA 配糖体を抽出・精製することに成功し, これらの化学構造を解明した。さらに, これらの MAA 配糖体は, 抗酸化活性を示した。以上の結果は, *N. commune* で見いだされるこれらの紫外線吸収物質は, 紫外線防御だけでなく酸化ストレスに対する防御にも働く多機能性分子であることを示す。

(2) 水棲シアノバクテリアとの比較解析

細胞外マトリクスを持つ水棲シアノバクテリア *Nostoc verrucosum* (アシツキ) と *N. commune* との間で比較解析を行った。その結果, *N. verrucosum* は, 乾燥耐性を示さないが乾燥ストレス処理に反応して非還元二糖トレハロースを蓄積すること, これまで細胞外マトリクスタンパク質として *N. commune*

だけで報告されていた WspA を持つこと, および細胞外多糖の化学的性質は類似しているが, 構成単糖の組成は異なることを明らかにした。*N. verrucosum* がもつ MAA を抽出・精製して解析を行った。その結果, *N. verrucosum* は, 紅藻で報告されているポルフィラー-334 をもつことが明らかとなった。これまでに *N. commune* がポルフィラー-334 配糖体をもつことを明らかとしており, *N. verrucosum* は MAA に糖鎖を付加する機構をもたないことを示唆する。以上の結果は, *N. verrucosum* は祖先的な形質をもつシアノバクテリアであること, 今後さらに研究を進めて, *N. commune* の陸棲化の機構を探索する上で重要な比較対照となることを示す。

(3) 陸棲シアノバクテリアの多様性

国内外の約 140 地点から採集した *N. commune* の試料について遺伝子型の解析を実施した。この結果, 外見上区別することが困難な *N. commune* に遺伝的多様性が発見され, 日本国内における *N. commune* は 4 種類の遺伝子型に大別されることが分かった。さらに解析を進めて, これらの遺伝子型と含まれている MAA 配糖体のタイプの違いとの間の関連を調べた。その結果, 遺伝子型ごとに含まれている MAA 配糖体に違いが発見され, *N. commune* は MAA 配糖体の違いに基づいて 3 種類の型に大別されることが分かった。以上の結果は, 形態的な特徴に乏しい陸棲シアノバクテリアにおいて, 遺伝的多様性のみならず 2 次代謝産物の組成が異なるという予期せぬ生物学的な多様性があることを示す。

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 4 件)

- ① Matsui, K., Nazifi, E., Hirai, Y., Wada, N., Matsugo, S. and Sakamoto, T. (2012) The cyanobacterial UV-absorbing pigment scytonemin displays radical-scavenging activity. *J. Gen. App. Microbiol.* 58:137-144. 査読有, DOI: 10.2323/jgam.58.137
- ② Arima, H., Horiguchi, N., Takaichi, S., Kofuji, R., Ishida, K., Wada, K. and Sakamoto, T. (2012) Molecular genetic and chemotaxonomic characterization of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* and its neighboring species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79:34-45. 査読有, DOI:10.1111/j.1574-6941.2011.01195.x
- ③ Matsui, K., Nazifi, E., Kunita, S., Wada, N., Matsugo, S. and Sakamoto, T.

(2011)

Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*.

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 105:81-89.

査読有,

DOI:10.1016/j.jphotobiol.2011.07.003

- ④ Sakamoto, T., Kumihashi, K., Kunita, S., Masaura, T., Inoue-Sakamoto, K. and Yamaguchi, M. (2011)
The extracellular-matrix-retaining cyanobacterium *Nostoc verrucosum* accumulates trehalose, but is sensitive to desiccation.
FEMS Microbiol. Ecol. 77:385-394.
査読有,
DOI:10.1111/j.1574-6941.2011.01114.x

[学会発表] (計 13 件)

- ① 坂本敏夫, ラン藻の作る細胞外多糖の生理的機能, 日本植物学会第 76 回大会, 2012 年 9 月 15 日-9 月 17 日, 兵庫県立大学・書写キャンパス (兵庫県)
- ② Toshio Sakamoto, Glycosylated mycosporine-like amino acids from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*, August 5-10, 2012, 14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Porto Palácio Congress Hotel & Spa, Porto, Portugal.
- ③ Ehsan Nazifi, Characterization of a novel glycosylated mycosporine-like amino acid purified from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*, 日本藻類学会第 36 回大会, 2012 年 7 月 13 日-7 月 15 日, 北海道大学学術交流会館 (北海道)
- ④ 山場みなみ, 陸棲ラン藻 *Nostoc commune* におけるマイコスポリン様アミノ酸の多様性, 日本藻類学会第 36 回大会, 2012 年 7 月 13 日-7 月 15 日, 北海道大学学術交流会館 (北海道)
- ⑤ 辻智栄理, 水棲ラン藻 *Nostoc verrucosum* (アシツキ) の紫外線吸収色素, 日本藻類学会第 36 回大会, 2012 年 7 月 13 日-7 月 15 日, 北海道大学学術交流会館 (北海道)
- ⑥ 坂本敏夫, 陸棲シアノバクテリア (イシクラゲ) の細胞外多糖とその生理機能, 第 4 回 高資源循環ポリマーセンターシンポジウム (招待講演), 2012 年 3 月 13 日-3 月 14 日, 北陸先端科学技術大学院大学・品川キャンパス (東京都)
- ⑦ 山場みなみ, 陸棲ラン藻 *Nostoc commune*

のもつ紫外線吸収色素と遺伝子型の多様性, ラン藻の分子生物学 2011, 2011 年 12 月 2 日-12 月 3 日, かずさアカデミアホール (千葉県)

- ⑧ 辻智栄理, 水棲ラン藻 *Nostoc verrucosum* (アシツキ) の紫外線吸収色素, ラン藻の分子生物学 2011, 2011 年 12 月 2 日-12 月 3 日, かずさアカデミアホール (千葉県)
- ⑨ Ehsan Nazifi, Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*, ラン藻の分子生物学 2011, 2011 年 12 月 2 日-12 月 3 日, かずさアカデミアホール (千葉県)
- ⑩ 坂本敏夫, 陸棲ラン藻の起源を探る, ラン藻ゲノム研究交流会, 2011 年 7 月 2 日, 東京大学・駒場キャンパス (東京都)
- ⑪ 松井慧, 陸棲ラン藻 *Nostoc commune* (和名:イシクラゲ)における紫外線吸収色素と抗酸化活性, 日本藻類学会第 35 回大会, 2011 年 3 月 27 日-28 日, 富山大学 (富山県)
- ⑫ 丹治康範, *Nostoc* 属ラン藻のストレス耐性と細胞外多糖の解析, 日本藻類学会第 35 回大会, 2011 年 3 月 27 日-28 日, 富山大学 (富山県)
- ⑬ Toshio Sakamoto, Deactivation of photosynthesis and accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*, The 15th International Congress on Photosynthesis. August 22-27, 2010. Beijing Friendship Hotel, Beijing, China.

[その他]

ホームページ等

「金沢大学理工学域 自然システム学類 生物学コース 生命機構講座 坂本研究室」
<http://photon.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
坂本 敏夫 (SAKAMOTO TOSHIO)
金沢大学・自然システム学系・准教授
研究者番号: 70324069
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
松郷 誠一 (MATSUGO SEIICHI)

金沢大学・自然システム学系・教授
研究者番号：30148126