

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570115

研究課題名(和文) 藻類におけるカロテノイドを用いた化学分類と系統分類

研究課題名(英文) Chemotaxonomy using carotenoids and phylogenetic classification of algae

研究代表者

高市 眞一 (Takaichi, Shinichi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40150734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 原核生物の中ではシアノバクテリアの2属にのみ β -カロテンが存在する。立体構造は *Prochlorococcus* では藻類・陸上植物と同じ(6'R)-型であったが、*Acaryochloris* は他の生物からは見つかっていない逆の(6'S)-型であった。

シアノバクテリアが一次共生した紅色植物門はイデコゴメ亜門と紅藻亜門に分けられ紅藻亜門はさらに6綱に分けられる。単細胞性の4綱は β -カロテンとゼアキサンチンのみを、1綱はこれらに加えてアンテラキサンチンをもっていた。一方、多細胞性の2綱は主成分がルテインであった。系統分類と生合成酵素・経路について検討をした。

研究成果の概要(英文)： Among prokaryotes, only two genera of cyanobacteria have β -carotene. β -Carotene had opposite chirality, (6 S) in *Acaryochloris* and normal (6 R) in *Prochlorococcus*. This is the first natural occurrence of (6 S)- β -carotene. All the zeaxanthin in these species were usual (3R,3 R)-chirality.

Carotenoid compositions in Rhodophyta are divers. Rhodophyta is divided into two groups, unicellular (Cyanidiophyceae, Porphyridiophyceae, Stylonematophyceae and Rhodellophyceae) and macrophytic algae (Compsopogonophyceae, Bangiophyceae and Florideophyceae). All of unicellular algae contained only β -carotene and zeaxanthin (ZEA-type). Compsopogonophyceae contained ZEA-type and additional antheraxanthin (ANT-type), while Bangiophyceae contained ZEA-type and additional β -carotene and lutein (LUT-type). Consequently, relation between carotenoid compositions and phylogenetics of Rhodophyta was found. Therefore, diverse carotenoid compositions can be explained presence or absence of the enzymes.

研究分野：植物生理学

キーワード：カロテノイド 系統分類 藻類 紅色植物 シアノバクテリア β -カロテン

1. 研究開始当初の背景

近年、生物の系統分類には rRNA 遺伝子などの塩基配列を比較した分子系統分類が取り入れられている。藻類においてもようやく分類の全体像が描けるようになってきた。しかし、この方法では生物の一面しか見ることができない。

色素(クロロフィルとカロテノイド)は光合成に必須で全ての藻類が持ち、多種多様なために化学分類にも用いられてきた。最も重要なクロロフィル類は、分子種も少なく光合成生物では分子系統分類とほぼ一致しているが、一部の藻類に特有なクロロフィル c_1 , c_2 , c_3 はお互いの分離が難しいため、藻類における分布がまだ確定していないのが現状である。一方、カロテノイドはアメリカの H.H. Strain が 1930 年代から 1950 年代にかけて、多くの藻類を分析し化学分類を試みた。さらにノルウエーの S. Liaaen-Jensen グループを中心に 1960 年代から 1980 年代に、藻類の分類にカロテノイドによる化学分類を取り入れようとした。ただし、当時はまだ藻類の系統分類が充分でなく、また天然物化学的な発想でカロテノイドの化学構造を用いて分類するため、分類群毎にいくつかの特徴的なカロテノイドの存在が示唆された程度で、生合成経路や酵素の視点が充分でなかった。

2. 研究の目的

多種多様なカロテノイドを持つ藻類について、カロテノイドを化学分類の指標として、化学構造だけではなく生合成経路も加味して、カロテノイドの分布と系統分類との関係を整理する。その中で α -カロテンとその誘導体(ルテイン、シフォナキサンチンなど)の分布が、一部の光合成生物(一部の藻類と陸上植物)に限られていることを確認する。特に原核生物の中ではシアノバクテリアの 2 属のみに β -カロテンが存在することを見いだしたので、その性質を検討する。また多細胞性紅藻とクリプト藻は α -カロテン類を持つが、単細胞性紅藻は持たないことを見いだしたので、これが紅藻とクリプト藻に普遍的な現象か分析例を増やし、二次三次共生との関連性を検討する。

3. 研究の方法

紅藻、クリプト藻、渦鞭毛藻、シアノバクテリアを中心に色素分析をした。多くの共同研究者と相談しながら分析する種を決め、培養を依頼した。逆相 HPLC による各色素の溶出時間と吸収スペクトルから、含有色素の概要をつかんだ。 β -カロテンとその誘導体、あるいは精密な同定の必要があるカロテノイドを含有する種については、今までに蓄積した経験を生かしてカロテノイドを分離精製し、同定した。最終的な構造決定には NMR(核磁気共鳴)分析が、また立体異性決定には CD(円偏光二色性)分析が必須である。上記藻類および関連した藻類で分析すべき種につい

ては、実験結果を見ながら随時追加して、色素、特に β -カロテン類の分布を系統的に解析した。得られたデータを元にカロテノイドによる生合成経路・酵素も加味した化学分類と分子系統分類との関係を検討した。

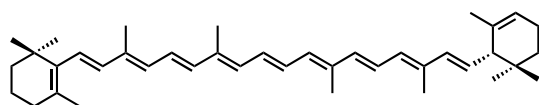
4. 研究成果

壮大な研究課題名を掲げたが、この研究期間(3年)で全てに手を出すことは難しいので、主に次の 3 藻類に関する研究をおこなった。今後、藻類全体を対象を広げる予定である。

シアノバクテリアの β -カロテン

大部分のシアノバクテリアはクロロフィル a のみを持つが、例外的なクロロフィル組成が 4 属のシアノバクテリアで知られている。クロロフィル d を主成分とする *Acaryochloris* (2 株)、シビニルクロロフィル a/b を持つ *Prochlorococcus* (3 株)、クロロフィル a/b を持つ *Prochlorothrix* (1 株) と *Prochloron* (3 種のホヤから採取) を入手して、カロテノイド組成について比較検討をおこなった。

既報の通り *Acaryochloris* と *Prochlorococcus* にのみ β -カロテンを検出した。 β -カロテンの C-6' 立体配置は *Prochlorococcus* では藻類や植物などと同じ (6'R)-type を示したが、*Acaryochloris* では前例のない逆の立体配置 (6'S)-type を示した。両属共に通常の (3R,3'R)-ゼアキサンチンと微量の β -カロテンが検出された。*Prochlorothrix* と *Prochloron* では (3R,3'R)-ゼアキサンチンと β -カロテンが検出され、 β -カロテンを全く検出できなかった。これはクロロフィル b を持つ真核光合成生物(藻類と陸上植物など)が例外なく β -カロテンあるいはその誘導体(ルテイン、シフォナキサンチンなど)を持つこととは対照的であった。また *Acaryochloris* のリコペン- β -シクラーゼの単離・同定を試みている。



(6'S)- α -Carotene

S Takaichi, et al. (2012) Opposite Chirality of α -Carotene in Unusual Cyanobacteria with Unique Chlorophylls, *Acaryochloris* and *Prochlorococcus*, *Plant Cell Physiol.* 53 (11): 1881-1888

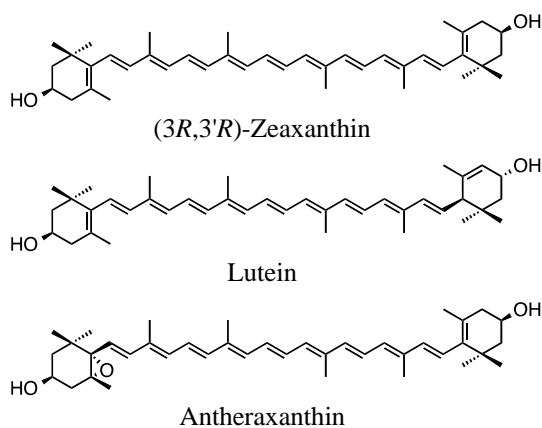
紅色植物におけるカロテノイド分布と系統分類

シアノバクテリアが一次共生したと考えられている紅色植物門は、最近の系統分類ではイデコゴメ亜門と紅藻亜門に分けられ、紅藻亜門はさらにチノリモ綱、オオイシソウ綱、ベニミドロ綱、ロデラ藻綱、ウシケノリ綱、真正紅藻綱の 6 綱に分けられている。

単細胞性のイデユコゴメ亜門（イデユコゴメ綱）チノリモ綱、ベニミドロ綱、ロデラ藻綱は β -カロテンとゼアキサントンのみを、オオイシソウ綱はこれらに加えてアンテラキサントンをもっていた。一方、多細胞性のウシケノリ綱、真正紅藻綱は主成分のルテインに加えて β -カロテンと β -カロテンとゼアキサントンをもっていた。ただし、真正紅藻綱のサンゴモ目とオゴノリ目の一部の種はルテイン類をもたずにアンテラキサントンをもっていた。

単細胞性の 4 綱ではリコペンがリコペン- β -シクラゼにより β -カロテンに、次いで β -ヒドロキシラーゼによりゼアキサントンの変化し、オオイシソウ綱ではさらにゼアキサントンのエポキシダーゼによりアンテラキサントンに変化すると考えられる。一方、多細胞性の 2 綱では上記に加えてさらに存在するリコペン- β -シクラゼによりリコペンから β -カロテンができ、 β -ヒドロキシラーゼによりルテインができると考えられる。系統分類と生合成酵素・経路について検討をしている。上記の遺伝子・酵素の獲得により生合成経路が変化したと考えられる。

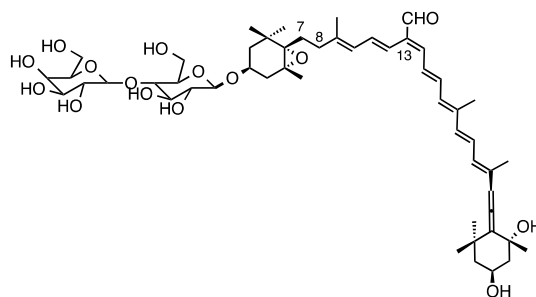
近縁の灰色植物門は β -カロテンとゼアキサントンのみを、クリプト植物門はさらに三重結合を含むアロキサントンなどを含むので、アセチレン合成酵素を持つはずであるが起源は不明である。投稿中。



渦鞭毛藻のカロテノイド

紅藻が二次共生したと考えられている渦鞭毛藻の多くは、他の生物には見られない C_{37} のペリジニン主成分とし、またカロテノイド・ラクトシド P457 も必ず少量含むことを見いだした。

二次共生の渦鞭毛藻に、さらに藻類が共生をした三次共生の渦鞭毛藻においては共生藻のカロテノイドに置き換わる例が多い。底生性渦鞭毛藻を分析したところ、フコキサントンの変化したハロシンチアキサントン 3'-アセテート、ペリジニンが変化したピロキサントンと思われるカロテノイドを見いだした。これらは海産の貝類には見ついているが、藻類からは初めての発見である。カロテノイドの同定と生合成経路を検討中である。



13-*cis*-P457

T Wakahama, et al. (2012) Structural confirmation of a unique carotenoid lactoside, P457, in *Symbiodinium* sp. strain NBRC 104787 isolated from sea anemone and its distribution in dinoflagellates and various marine organisms, *J. Phycol.* 48 (6): 1392-1402

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)(全て査読有)

H Arima, N Horiguchi, S Takaichi, et al. (2012) Molecular genetic and chemotaxonomic characterization of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* and its neighboring species, *FEMS Microbiol. Ecol.* 79 (1): 34-45, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01195.x

H Masukawa, M Mochimaru, S Takaichi (2012) Characterization of Carotenogenesis Genes in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, *Methods Mol. Biol.* 892: 297-306, <http://www.springer.com/gp/book/9781617798788>

S Takaichi, M Mochimaru, H Uchida, et al. (2012) Opposite Chirality of α -Carotene in Unusual Cyanobacteria with Unique Chlorophylls, *Acaryochloris* and *Prochlorococcus*, *Plant Cell Physiol.* 53 (11): 1881-1888, doi: 10.1093/pcp/pcs126

T Wakahama, A Lazxa-Martínez, AIBHM Taha, et al. (11 番目) (2012) Structural confirmation of a unique carotenoid lactoside, P457, in *Symbiodinium* sp. strain NBRC 104787 isolated from sea anemone and its distribution in dinoflagellates and various marine organisms, *J. Phycol.* 48 (6): 1392-1402, DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01219.x

S Takaichi (2013) Distributions, biosyntheses and functions of carotenoids in algae, *Agro FOOD Industry Hi-Tech* 24 (1): 55-58, <http://www.teknoscienze.com/pages/default.aspx#.VUNOVaZenao>

S. Takaichi (2014) General methods for identification of carotenoids, *Biotechnol. Lett.*, 36 (6): 1127-1128, DOI: 10.1007/s10529-014-1479-4

Y Kusama, S Inoue, H Jimbo, S Takaichi et al. (2015) Zeaxanthin and echinenone protect the repair of photosystem II from inhibition by singlet oxygen in *Synechocystis* sp. PCC 6803, Plant Cell. Physiol. 56 (5): 906-916, doi:10.1093/pcp/pcv018

〔学会発表〕(計 61 件)

高市真一、内田博子、村上明男、広瀬裕一、持丸真里、土屋徹、三室守：シアノバクテリアのβ-カロテン：分布と立体異性：第 53 回日本植物生理学会年会：2012.3.16-18：京都産業大学（京都）

高市真一、奥山英登志：カロテノイドから見た藻類の分類：渦鞭毛藻を中心に：第 20 回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー：2012.6.30-7.1：大阪大学（大阪）

S Takaichi, H Uchida, A Murakami, E Hirose, M Mochimaru, T Tsuchiya, M Mimuro: α-Carotene found only in unusual chlorophyll-containing cyanobacteria, *Acaryochloris* and *Prochlorococcus*, among Prokaryotes: 14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes: 2012.8.5-10: Porto (Portugal)

若浜貴宏、奥山英登志、眞岡孝至、高市真一：渦鞭毛藻におけるカロテノイド配糖体：P457 の再同定と分布：第 26 回カロテノイド研究談話会：2012.9.13-14：函館国際ホテル（北海道）

M Ichinomiya, S Yoshikawa, M Kamiya, K Ohki, S Takaichi, A Kuwata: Isolation and characterization of Parmales from the Oyashio region, Western North Pacific: First Asian Marine Biology Symposium: 2012.12.13-17: Phuket (Thailand)

草間友里、井上修平、高市真一、西山佳孝：光化学系 II の光阻害におけるカロテノイドの保護作用：第 54 回日本植物生理学会年会：2013.3.21-23：岡山大学（岡山）

高市真一：カロテノイドから見た光合成の進化：第 21 回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー：2013.7.6-7：名古屋工業大学（名古屋）

S Takaichi, H Uchida, E Hirose, M Mochimaru, A Murakami: Carotenoid composition including α-carotene of unusual cyanobacteria with unique chlorophylls: *Acaryochloris* (Chl a/d), *Prochlorococcus* (DV-Chl a/b), *Prochlorothrix* (Chl a/b) and *Prochloron* (Chl a/b): The 16th International Congress on Photosynthesis Research: 2013.8.11-16: St. Louis (USA)

高市真一、横山亜紀子、内田博子、村上明男：紅色植物門のカロテノイド組成と生合成経路：日本植物学会第 77 回大会：2013.9.13-15：北海道大学（北海道）

高市真一：カロテノイドと抗酸化作用(ワ

ークショップ：活性酸素の生理機能とその制御機構)：日本遺伝学会第 85 回大会：2013.9.19-21：慶応大学（横浜）

山田規子、田中歩、高市真一、堀口健雄：底生性渦鞭毛藻における生活形態依存的に生成される光合成色素の多様性とその機能：日本藻類学会第 38 回大会：2014.3.14-18：東邦大学（千葉）

高市真一：カロテノイドの分離同定方法：第 22 回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー：2013.7.6-7：名古屋工業大学（名古屋）

高市真一、横山亜紀子、内田博子、村上明男、持丸真里：紅色植物門の系統分類とカロテノイド生合成経路の多様性：日本植物学会第 78 回大会：2014.9.12-14：明治大学（川崎）

加藤翔太、加瀬大地、大谷津知世、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、篠村知子：強光ストレス下における微細藻類 *Euglena* のカロテノイドの機能の解明：植物科学調節学会第 49 回大会：2014.10.17-19：京都大学（京都）

加藤翔太、加瀬大地、大谷津知世、高市真一、石川孝博、朝比奈雅志、高橋宣治、篠村知子：ユーグレナのカロテン合成系遺伝子の単離と機能解析：第 56 回日本植物生理学会年会：2015.3.16-18：東京農業大学（東京）

高市真一、持丸真里、横山亜紀子、内田博子、村上明男：紅色植物門におけるカロテノイドの多様性と合成遺伝子：第 56 回日本植物生理学会年会：2015.3.16-18：東京農業大学（東京）

〔図書〕(計 3 件)

高市真一、エヌ・ティー・エス、藻類ハンドブック、2012、231-237、ISBN 978-4-86469-002-7

S Takaichi, Springer, Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes, 2013, 3251-3283, <http://www.springer.com/gp/book/978364221439>

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕(計 1 件)

高市真一、Web 版光合成事典(編集委員、執筆)71 項目(全約 2500 項目)、2015、<http://photosyn.jp/pwiki/index.php?FrontPage>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高市 真一 (TAKAICHI, Shinichi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40150734