

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850134

研究課題名(和文) マガキから見出された細菌特有の適合物質エクトインの蓄積機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of the storage mechanisms and the physiological roles of ectoine in the Pacific oyster

研究代表者

細井 公富 (HOSOI, Masatomi)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：70410967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：LC-MS/MSによるエクトインの分析法を確立し、本法によりマガキがエクトインを蓄積していることが明らかとなった。また、マガキには、細菌類には見られないエクトインの構造類似体が複数存在していることが示された。細菌類の既知生合成酵素遺伝子がマガキから検出されなかったことから、マガキには未知のエクトイン生合成経路が存在する可能性がある。さらに、様々な海洋無脊椎動物がエクトイン類似体を蓄積していることが明らかとなった。これらの組織蓄積量は適合物質として有意な濃度であることから、様々な海洋無脊椎動物において、エクトイン類似体が浸透圧をはじめとしたストレス適応のために利用されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of ectoine in the Pacific oyster was confirmed by LC-MS/MS analysis. Some kinds of novel ectoine analogues were detected in the oyster. The homologous genes of the enzymes related to ectoine synthesis in bacteria were not detected by the degenerated RT-PCR on the oyster RNA, and by the homology search on the oyster genome, indicating that oyster might possess the unknown synthetic pathway of ectoine, or take ectoine and its analogues directly. The ectoine analogues identified from the oyster were also accumulated in various marine invertebrates in the range from approximately 100 to 1000 ng/g tissue, in which the ectoine analogues were probably effective as compatible solute.

研究分野：海洋生化学

キーワード：エクトイン 浸透圧適応 マガキ 適合物質

1. 研究開始当初の背景

エクトインは、1985年に好塩性細菌である *Ectothiorhodospira halochloris* から同定された2つの窒素を含む六員複素環式化合物である。現在では様々な好塩性細菌が生合成・蓄積することが明らかとなっており、高い親水性と保水性およびそれらに起因する細胞内分子構造の維持機能から、これらの細菌が高塩分・高温・乾燥などの各種ストレスに適應するために適合物質として利用されると考えられている。また、エクトインのこのような機能性を利用し、スキンケア製品や日焼け止め製品に産業利用されている。さらに、試験研究レベルでは、消化管や呼吸器において抗炎症効果があることが知られているほか、酵素などタンパク質性分子の安定化剤として利用されている。

本研究の対象生物であるマガキ *Crassostrea gigas* は、水温や塩分変化の激しい環境に固着して生息することから、高い環境適應能を持つことが知られている。さらに、世界的に重要な水産資源種であることから、水産学および海洋動物学的観点から、その環境適應機構についてこれまで多くの研究がなされてきた。なかでも、浸透圧(塩分)適應に関しては、特に多くの研究がなされ、外部浸透圧環境に順應するための適合物質(オスモライト)として、タウリンをはじめとした数種の遊離アミノ酸を利用することが知られている。これまでに研究代表者は、タウリンをはじめとしたオスモライトの蓄積機構についての研究を行ってきており、マガキの高浸透圧ストレス応答機構解明の一環として、キャピラリー電気泳動-質量分析(CE-MS)による低分子代謝物の一斉解析(メタボローム解析)を行い、マガキ組織からエクトインと推定されるピークを検出した。これは、エクトインが細菌以外の生物にも利用されていることを示唆する最初の結果である。

2. 研究の目的

前述の通り、真核生物では初めて、マガキがエクトインを蓄積している可能性が示唆されたことから、マガキにおけるエクトイン蓄積の確認とその生理的意義の検証を行うために、以下に挙げる項目について解析を行った。

(1) エクトインの分析法の確立とマガキにおける蓄積の検証

CE-MSで検出されたエクトイン候補ピークが本当にエクトインであるのか確認するため、より高精度な分析(液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析: LC-MS/MS)によるエクトイン分析・定量法の確立を行った。

(2) マガキが蓄積するエクトインの起源についての検討

マガキに蓄積したエクトインの由来についての情報を得るために、エクトイン生合成遺伝子のクローニングおよびアフィニティークロマトグラフィーによるエクトイン結合性タンパク質の探索を行った。

(3) 海洋無脊椎動物および藻類におけるエクトイン類縁体の蓄積

マガキ以外の海洋生物がエクトインを蓄積しているかどうか検証するために、種々の海洋動物および藻類を対象にエクトイン蓄積の有無とその蓄積量の定量を行った。

3. 研究の方法

(1) マガキ組織を80%エタノール中でホモジナイズすることによりエクトインを含む抽出液を得た。得られた抽出液をLC-MS/MS(API2000)に供し、選択イオンモニタリング(Selected ion monitoring, SIM)およびMS/MSスペクトルによる同定を行うとともに、選択反応モニタリング(Selected reaction monitoring, SRM)により定量を行った。さらに、本分析の過程で新規に見出されたエクトインの構造類縁体についても、同様に解析を行った。

(2) 細菌類のエクトイン合成関連酵素遺伝子の配列に基づいた縮重RT-PCR法により、マガキ組織由来RNAからエクトイン合成酵素遺伝子のクローニングを試みた。また、エクトインを固定化したアガロースビーズを用いて、マガキから抽出したタンパク質に対してアフィニティークロマトグラフィーを行い、エクトイン結合性タンパク質の探索を行った。

(3) 本研究の過程で、マガキ以外の海洋無脊椎動物および藻類においてもエクトインの蓄積が確認されたため、種々の生物を対象に上述(1)で確立した分析法を用いてエクトイン蓄積量の定量を行った。

4. 研究成果

(1) エクトインの分析法の確立とマガキにおける蓄積の検証

主な成果

研究開始当初、LC-MS/MSによるエクトイン分析法の報告はなかったため、まず、クロマトグラフィーの分離条件、イオン化および質量分析の条件を検討し、分析法の確立を行った。

た。分析対象は、エクトインおよびその水酸化物であるヒドロキシエクトインである。ヒドロキシエクトインは、エクトインと同様に細菌類が蓄積する適合物質であり、その生理的機能はエクトインとほとんど同じであると考えられている。

分析条件を検討した結果、エクトインおよびヒドロキシエクトインの同定および定量分析が以下の分離条件を用いて可能となった（分離カラム：Intrada Amino Acid(100 x 3 mm id., 3 μm)、溶離液：(アセトニトリル：ギ酸 = 1000 : 1) : 100mM ギ酸アンモニウム = 80 : 20、流速：0.2 ml/min、カラム温度：35 ℃)。次に、上記分離条件のもとでSIMを行い、マガキ抽出物からエクトイン ($m/z=143$) およびヒドロキシエクトイン ($m/z=159$) 標品の保持時間と一致するピークを検出することができた。さらに、同ピークのMS/MSスペクトルは、標品のものとはほぼ同一であることが確認されたことから、これらのピークをそれぞれエクトインおよびヒドロキシエクトインと同定した。つまり、マガキがエクトインとヒドロキシエクトインを蓄積することを高精度に確認することができた。

また、 $m/z=143$ および $m/z=159$ のSIM分析の過程で、エクトイン、ヒドロキシエクトイン標品と保持時間が一致するピークの外に、ともに複数のピークが検出された。どちらの分析においても、エクトインおよびヒドロキシエクトインの標品ピークの近傍に複数のピークが現れたため、それらのMS/MSスペクトルを確認した。その結果、それぞれ2つのピークは、そのMS/MSスペクトルが標品のものと類似性が高かった（複数の主要なプロダクトイオンが共通して確認された）ことから、これらをエクトインおよびヒドロキシエクトインの構造類縁体であると判断した。

さらに、細菌代謝物由来の試料ではこの類縁体は検出されなかったことから、これらの化合物はマガキに特有の新規化合物であると考えられた。また、これらをつくめたエクトイン類縁体は、分析したマガキ組織（外套膜、鰓、閉殻筋、肝膵臓・消化管を含む体幹部組織）の全てで検出された。

成果の位置付けと今後の展望

LC-MS/MSによるエクトインおよびヒドロキシエクトインの分析法を確立し、本法によりマガキにおけるエクトインおよびヒドロキシエクトインの蓄積を初めて明らかにした。さらに、マガキに特有の構造類縁体の存在が示唆された。このことは、マガキが細菌とは異なる独自の生合成経路を持つ可能性を示唆している。新規に見出された類縁体の構造解析を進め、これらの生理機能についても研究を進める必要がある。

(2) マガキが蓄積するエクトインの起源

主な成果

細菌が持つ複数のエクトイン生合成酵素遺伝子の配列に基づいた縮重 RT-PCR により、酵素遺伝子のクローニングを試みた。しかしながら、有意な相同性を持つ遺伝子断片を得ることはできなかった。この結果は、エクトインを生合成する細菌がマガキ組織内に存在しないことを示唆する。さらに、公開されているマガキゲノムのドラフトシーケンズに対して、エクトイン生合成酵素の相同性検索を行ったが、これまでに、有意な類似性を示す遺伝子を見出すことはできていない。これらの結果から、マガキが蓄積するエクトインは、摂餌などにより外部から直接摂取・蓄積されている、あるいは、細菌とは異なる生合成経路によってマガキ自身が生合成を行っている可能性が考えられる。前述した通り、マガキには細菌には見られない類縁体が複数存在することを考慮すると、マガキ自身が生合成している可能性が高いと現時点では考えている。

さらに、アフィニティークロマトグラフィーによるエクトイン結合性タンパク質の探索により、エクトイン固定化ビーズに結合するタンパク質のバンドが SDS-PAGE 上で複数検出された。これらは、マガキにおけるエクトインの生合成・代謝や輸送などに関するタンパク質である可能性がある。

成果の位置付けと今後の展望

既知の生合成酵素に類似する遺伝子が検出されなかったことから、マガキが蓄積するエクトインは、少なくともマガキ組織内で細菌が合成したものではなく、外部からの直接摂取したものか、あるいはマガキ自身が細菌とは異なる経路で生合成している可能性が示唆された。構造類縁体の存在とエクトイン結合性タンパク質の存在は、マガキにおける未知のエクトイン生合成経路の存在を示唆している。現在、検出された結合タンパク質の構造解析を進めており、この仮説の検証を行っていく。

(3) 海洋無脊椎動物および藻類におけるエクトイン類縁体の蓄積

主な成果

マガキ以外の無脊椎動物（軟体動物：ヒザラガイ類・腹足類・二枚貝類・頭足類、節足動物、棘皮動物、脊索動物）、藻類（褐藻、紅藻、緑藻）および脊椎動物（魚類）について、エクトイン類縁体の蓄積を検証した。その結果、分析したすべての海洋無脊椎動物において、エクトイン・ヒドロキシエクトインおよびマガキで見つかったそれらの類縁体の蓄積が確認された。分析した種の中でもっとも高い蓄積量を示したのはマガキで、エクトイン類縁体の総蓄積量は約 1000 ng/g 組織であった。また、もっとも蓄積量の小さかつ

たヒザラガイでは約 100ng/g 組織であった。

植物培養細胞を用いた既報論文では、70ng/g 以上のエクトイン蓄積により塩分ストレスに対する耐性が増大することが報告されている。このことから、海洋無脊椎動物においても塩分等のストレスへの適応においてエクトイン類縁体が有意な生理的役割を担う可能性が示唆された。一方、魚類ではエクトイン類は痕跡程度しか検出されず、海藻類および淡水性二枚貝類においても、その蓄積量はごくわずかであった。また、海洋無脊椎動物に蓄積する類縁体の組成は種によって様々であり、分類群による傾向を見出すことはできなかった。

成果の位置付けと今後の展望

様々な海洋無脊椎動物においてエクトイン類縁体の蓄積が確認されたことから、これらの生物で広くエクトイン類縁体を適合物質として利用されていることが明らかとなった。淡水性の貝類ではごく僅かしか検出されなかったことも、エクトイン類縁体の適合物質としての利用を裏付けている。今後、類縁体の構造を明らかにし、より多くの種の蓄積プロファイルを明らかにすることで、海洋無脊椎動物におけるエクトイン類縁体の利用について体系的な解明を進める。

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)

[学会発表](計2件)

細井公富・安井葉月・水田尚志・横山芳博、マガキに蓄積するエクトイン類縁体の定量、平成 28 年度日本水産学会中部支部大会(2016 年 12 月 3 日、福井県立大学(福井県小浜市))

細井公富・安井葉月・水田尚志・横山芳博、マガキから検出されたエクトイン類縁体、平成 27 年度日本水産学会秋季大会(2015 年 9 月 24 日、東北大学(宮城県仙台市))

6. 研究組織

(1)研究代表者

細井 公富 (HOSOI Masatomi)

公立大学法人 福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：70410967