

## 陸棲ラン藻における極限的な乾燥耐性の分子機構

著者	坂本 敏夫
雑誌名	平成19(2007)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2006-2007
ページ	13p.
発行年	2009-01-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/47895">http://hdl.handle.net/2297/47895</a>

# 陸棲ラン藻における極限的な乾燥耐性の分子機構

課題番号 18608001

平成 18 年度～平成 19 年度 科学研究費補助金（基盤研究（C））

## 研究成果報告書

平成 21 年 1 月

研究代表者 坂本 敏夫

金沢大学 自然科学研究科 准教授

金沢大学附属図書館



1300-05149-3

# 陸棲ラン藻における極限的な乾燥耐性の分子機構

課題番号 18608001

平成 18 年度～平成 19 年度 科学研究費補助金（基盤研究（C））

## 研究成果報告書

平成 21 年 1 月

研究代表者 坂本 敏夫

金沢大学 自然科学研究科 准教授

金沢大学附属図書館



1300-05149-3

著 者 寄 贈

## はしがき

2000年11月に私一人で始まったイシクラゲの研究も満8年を迎えました。このプロジェクトに参加いただいた学生諸君を数えてみたら総勢20名、平均在籍期間は2年ほどです。第1世代として、中森華さん、平井洋介君、宮川洋之君、堀口法臣君、高荷弥生さん、田丸義之君の6名が本研究課題の採択に至るまでの基礎的な研究を成し遂げました。有馬宏美さん、葛葉聡美さん、組橋敬理君、近藤あずささん、畠中裕二君、ファティヒ モルシー君、吉田尚之君、以上第2世代の7名が中心となって本研究課題を実施しました。本研究課題で得られた研究成果は、第3世代の安藤裕美さん、池田翔君、政浦卓哉君、平谷栄梨さん、松井慧君、松村智加さん、国田晋平君、以上7名がさらに発展させて新たな局面を切り開いています。当研究室の牽引役であった吉田君とモルシー君がそれぞれ博士課程を平成19年度中に修了することができましたので、平成21年度からは、この2人の大先輩を知らない「完全な第4世代」を迎えることとなります。本研究成果が私ひとりのものではなく、学生諸君とともに到達した成果であることを冒頭に述べ、感謝の意を表したいと思います。

本研究課題に先立ってイシクラゲが示す極限的な乾燥耐性の分子機構として細胞外多糖の役割があるかどうかを田丸君が実験的に検証したことが重要であったと思います。本研究では、モルシー君が行った細胞外マトリクスの構成タンパク質の解析と吉田君が行ったトレハロースの蓄積機構の解析が重要な研究成果でした。これによって表面的に頭で考えて想定できる可能性は十分に検証することができたと考えています。

イシクラゲが示す乾燥耐性の決定的な要因を捕まえることが今後の課題です。そのために地道な研究を継続することは当然のこととして、それに加えて「セレンディピティー」が求められるのかもしれません。

2009年1月  
研究代表者 坂本敏夫

## 研究組織

研究代表者：坂本敏夫（金沢大学 自然科学研究科 准教授）

研究分担者：なし

## 交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	3,000,000	0	3,000,000
平成19年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	210,000	3,910,000

本研究経費の配分を受けて、エバポレイティブ光散乱検出装置を導入することができた。これによりトレハロースを分析定量することが可能となった。

極限的な乾燥耐性にトレハロースが関与するか否かについて実験的に検証することは本研究課題の重要な研究目的のひとつであった。設備を導入して研究目的を達成できたことから、科学研究費補助金を有効に活用できたと考えており、感謝とともにここに申し添える。

## 研究発表

### (1) 学術論文

- 1) Nomura, C.T., Sakamoto, T. and Bryant, D.A. (2006) Roles for heme-copper oxidases in extreme high-light and oxidative stress response in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Arch. Microbiol.* 185:471-479.
- 2) Chintalapati, S., Prakash, J. S. S., Gupta, P., Ohtani, S., Suzuki, I., Sakamoto, T., Murata, N. and Shivaji, S. (2006) A novel delta-9 acyl-lipid desaturase, DesC2, from cyanobacteria acts on fatty acids esterified to the *sn*-2 position of glycerolipids. *Biochemical J.* 368:207-214.
- 3) Inoue-Sakamoto, K., Gruber, T.M., Christensen, S.K., Arima, H., Sakamoto, T. and Bryant, D.A. (2007) Group 3 sigma factors in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 are required for growth at low temperature. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53:89-104.
- 4) Morsy, F.M., Nakajima, M., Yoshida, T., Fujiwara, T., Sakamoto, T. and Wada, K. (2008) Subcellular localization of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in phycobilisome retaining oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynth. Res.* 95:73-85.
- 5) Morsy, F.M., Kuzuha, S., Takani, Y. and Sakamoto, T. (2008) Novel thermostable glycosidases in the extracellular matrix of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54:243-252.
- 6) Sakamoto, T., Inoue-Sakamoto, K., Persson, S. and Bryant, D.A. (2008) Transcription factor NtcB specifically controls the nitrate assimilation genes in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Phycol. Res.* 56:223-237.
- 7) Sakamoto, T., Yoshida, T., Arima, H., Hatanaka, Y., Takani, Y. and Tamaru Y. (2009)

Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Phycol. Res.* 57:66-73.

- 8) Yoshida, T. and Sakamoto, T. (2009) Water-stress induced trehalose accumulation and control of trehalase in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* IAM M-15. *J. Gen. Appl. Microbiol.* in press

## (2) 学会発表

吉田尚之, 坂本敏夫

「陸棲ラン藻におけるトレハロース代謝の制御機構」

第49回日本植物生理学会, 2008年3月20日-22日

札幌コンベンションセンター

坂本敏夫

「陸棲ラン藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) の極限的な乾燥耐性」

かずさDNA研究所研究会「ラン藻の分子生物学2007」

2007年12月3日-4日, かずさアカデミアホール

Morsy, F.M., Kuzuha, S., Takani, Y. and Sakamoto, T.

「Characterization of a fasciclin-like protein with glucopyranosidase activity in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*.」

第71回日本植物学会, 2007年9月6日-9日

東京理科大学野田キャンパス

組橋敬理, 坂本敏夫

「細胞外多糖を持つ *Nostoc* 属ラン藻における乾燥ストレス耐性」

第71回日本植物学会, 2007年9月6日-9日

東京理科大学野田キャンパス

坂本敏夫

「陸棲ラン藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) におけるトレハロースの動態」  
第71回日本植物学会, 2007年9月6日—9日  
東京理科大学野田キャンパス

坂本敏夫

「陸棲シアノバクテリアの遺伝的多様性」  
シンポジウム シアノバクテリアの多様性とゲノム  
第71回日本植物学会, 2007年9月6日—9日  
東京理科大学野田キャンパス

畠中裕二, 坂本敏夫

「陸棲ラン藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) における光合成と窒素代謝の環境  
ストレス耐性」  
第31回日本藻類学会, 2007年3月23日-25日  
神戸大学

Sakamoto, T., Arima, H., Tamaru, Y. and Yoshida, T.

「Desiccation Tolerance of the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*.」  
12<sup>th</sup> International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, August 27-September 1,  
2006, Pau, France.

Inoue-Sakamoto, K., Tamaru, Y. and Sakamoto, T.

「Profiling of Intracellular Proteins during Desiccation and Rehydration in the  
Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*.」  
12<sup>th</sup> International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, August 27-September 1,  
2006, Pau, France.

有馬宏美, 堀口法臣, 石田健一郎, 高市真一, 坂本敏夫

「*Nostoc* 属ラン藻におけるカロテノイドの多様性と分子系統解析」  
第70回日本植物学会, 2006年9月13日-16日  
熊本大学

吉田尚之, 有馬宏美, 高荷弥生, 田丸義之, 坂本敏夫

「陸棲ラン藻*Nostoc commune* (イシクラゲ) のストレス応答におけるトレハロースの役割」

第70回日本植物学会, 2006年9月13日-16日

熊本大学

### (3) 図書

該当なし

### 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

該当なし

# 本研究の成果と今後の課題

## 1 細胞外マトリクスの構造と機能

野外に生育する陸棲ラン藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) のコロニーは細胞と細胞外マトリクスからなる。本研究課題に先立って、細胞外マトリクスを人為的に取り除くと乾燥耐性が失われることを明らかにしており、細胞外マトリクスには乾燥の過程および乾燥状態において細胞を保護する役割があることが実験的に示されていた (Tamaru et al. 2005)。

細胞外マトリクスをもつ水棲ラン藻 *Nostoc verrucosum* (アシツキ) についてストレス耐性を調べ、水棲ラン藻においても細胞外マトリクスが乾燥耐性に機能しているのかどうかを検証した。並行して *Nostoc* 属ラン藻の分子系統解析を行い、イシクラゲとアシツキの間の系統関係についての研究を実施し、この比較解析の有効性について議論するための研究を実施した。この成果については、別の機会に詳述する。

イシクラゲとアシツキの比較研究によって、アシツキは凍結耐性を示すが、乾燥耐性を示さないことが分かった。これにより細胞外マトリクスの有無は極限的な乾燥耐性を示すための必要条件の1つに過ぎないことが生物学的に示された。また、どちらのラン藻も凍結耐性を示したことから、乾燥耐性と凍結耐性は異なるメカニズムが働いていると考えられる。

イシクラゲとアシツキの間で含水量、色素量に違いは見られなかった。また、細胞外マトリクスはアルシアンブルーによって染色される酸性ムコ多糖を含み、ウロン酸量に違いは見られなかった。現在、細胞外マトリクスから多糖を抽出し、イシクラゲとアシツキの間で化学構造の比較を行っている。また、細胞外マトリクスの構成タンパク質の違いの有無を調べている。

細胞外マトリクスと細胞を再構成して乾燥耐性を付与することができるかどうかについて調べていくことが、将来の課題として残されている。これまでの試みにより単純に混合するだけでは再構成できないことが分かっており、再構成を成功させるためには多面的な可能性の検討が必要であると考えている。

## 2 イシクラゲの細胞外多糖類分解酵素

イシクラゲを2日間程度水にさらすとコロニーが溶解することが観察される。細胞外マトリクスを自己分解する酵素をもっていることが考えられる。そこで本研究では、長期間水にさらされたコロニーにおいて細胞外マトリクスが分解され、生きた細胞が水中に放出される現象について解析した。この研究を進める過程で、細胞外マトリクスに存在する耐熱性を示す新規の $\beta$ -グルコシダーゼおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼを発見し、それぞれ精製して生化学的解析を行った。

野外から採集したイシクラゲのコロニーを水和し、室温でスターラーを用いて連続的にかき混ぜる処理を与えた。処理日数ごとに顕微鏡を用いて細胞の様子を観察した。また、糖にニトロフェノールを結合した人工基質を用いてグリコシド結合を加水分解する酵素の活性を測定した。

水和後1から3日間で糸状体の長さはほぼ半分以下に短くなるものの、細胞の形態などに大きな変化は見られなかった。乾重量あたりのクロロフィル量は大きく変化しなかった。溶解液中に検出される光合成活性および呼吸活性はコロニーが溶解するにつれて上昇し、生理活性を持った細胞が緩衝液中に遊離してくると考えられる。本研究で用いた5種類の人工基質すべてについて加水分解活性が見られ、コロニーが溶解するにつれて溶解液中に検出されるグリコシダーゼ活性が上昇した。この結果は、*N. commune* は細胞外多糖類を加水分解する酵素を持っているおり、それらがコロニーの分解に関わっている可能性を強く示唆する。加熱処理により $\beta$ -グルコシダーゼ活性が失活しないことから、耐熱性酵素があることが明らかとなった。

そこで、耐熱性 $\beta$ -グルコシダーゼを精製して生化学的解析を行なった。本酵素は分子量およそ20kDa、アミノ末端配列解析から多くの生物で細胞外マトリクスに存在するタンパク質として知られているファシクリンタンパク質であることが分かった。続いてイシクラゲに特徴的なタンパク質として知られている水ストレスポリペプチドWspAを精製し酵素活性を調べたところ耐熱性 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示すことが分かった。これらのタンパク質は細胞外マトリクスにおいて重要な役割をもつと考えられる。これにより機能が不明確であった細胞外マトリクスタンパク質の役割の一部を解明することができた。

細胞外マトリクスが極限的な乾燥耐性のメカニズムにおいて重要であり、細胞外マトリクスタンパク質がその役割の一端を担っている可能性がある。特に、耐熱性グリコシダーゼ活性を示す細胞外マトリクスタンパク質と細胞外多糖との間の分子間相互作用を解析することを通じて、今後、新たな知見が得られてくるものと期待する。

### 3 トレハロースの蓄積機構

イシクラゲは休眠孢子などを形成することなく強い乾燥耐性を獲得して陸上に適応している。乾燥時に生命を維持するために必要であると考えられている非還元2糖トレハロースが関与しているかどうかについて解析を行なった。本研究経費によって現有する HPLC システムにエバポレイティブ光散乱検出器を導入することができ、トレハロースを定量できる研究設備の整備ができたことを申し添える。

野外から採集した *N. commune* のコロニーを熱水で抽出して分析したところ、トレハロースが検出された。トレハロース量は乾燥したコロニーで高く、水和したコロニーではほとんど検出されなかった。また、水和したコロニーを塩ストレス処理した場合、トレハロース量は著しく上昇した。以上の結果は、コロニーから水が失われて乾燥する過程で細胞内の溶質の濃度が上昇し、このことに応答してトレハロース量の上昇が起きる、というメカニズムを示唆する。トレハロースとは別の非還元2糖であるショ糖も検出されたが、乾燥によって顕著にショ糖量が上昇することは見いだされなかった。これらの結果は、トレハロースが本生物において重要なストレス応答物質であることを示す。

乾燥ストレスによってトレハロースが蓄積される機構を明らかにするために、トレハロース合成酵素およびトレハロース加水分解酵素（トレハラーゼ）の活性制御を解析した。イシクラゲにおいてトレハロース合成酵素遺伝子 *treZ*, *treY*, およびトレハラーゼ遺伝子 *treH* がひとつの転写単位を構成していた。これらの遺伝子の転写産物量は乾燥ストレス処理によって大きく変化することはなく、転写レベルの制御ではないことが示された。細胞抽出液を調製して生化学的解析をおこなったところ、トレハロース合成酵素は反応溶液中の塩濃度に影響さ

れず高い活性を示したが、トレハラーゼは塩濃度の上昇に伴って活性が阻害されることが分かった。これらの結果は、トレハラーゼがトレハロース量の調節において鍵酵素として働いており、非ストレス条件下ではトレハラーゼ活性が高く保たれており、乾燥または塩ストレス条件下ではトレハラーゼ活性が阻害をうけることによって合成と分解のバランスが合成へと大きく傾き、その結果としてトレハロースを蓄積するという機構を強く示唆する。

水棲ラン藻 *Nostoc verrucosum* (アシツキ) は凍結耐性を示すが、乾燥耐性を示さない。アシツキにおいても乾燥ストレス処理によってトレハロースの蓄積が誘導されることが分かった。アシツキとイシクラゲの間で蓄積されるトレハロース量に違いは見られなかった。この結果は、極限的な乾燥耐性と強く結びつけられて考えられているトレハロースが極限的な乾燥耐性を示すための必要条件に過ぎないことを示す。イシクラゲが示す極限的な乾燥耐性の決定的な要因はトレハロースを蓄積することができるかどうかではない。決定的な要因を解明するためには今後のさらなる解析が必要である。

#### 4 紫外線吸収色素が抗酸化物質として関与する可能性の検討

野外で生育するイシクラゲは晴天時に乾燥にさらされるばかりでなく、温度、凍結、強光、紫外線などの環境ストレスにも絶えずさらされており、これらのストレスに対する防御機構をもつと考えられる。イシクラゲは紫外線に対する防御機構として2種類の紫外線吸収色素をもつことが知られており、UV-Aに対する吸収色素としてスキトネミン、また、UV-Bに対する吸収色素としてマイコスポリン様アミノ酸 (MAA) を生産する。

これまでの研究により、それぞれの紫外線吸収色素を抽出精製する手法を確立している。本研究では、イシクラゲから精製したMAAについて、HPLCを用いてC18逆相カラムからの溶出位置を比較検討し、新規の化学構造をもつ可能性が示唆された。現在、共同研究者によってイシクラゲMAAの化学構造解析を進めて頂いている。

イシクラゲは乾燥の過程で直射日光にさらされることもあるため、酸化ストレスに対する強い耐性をもつことが推測できる。そこで本研究では、酸化スト

レス耐性機構を明らかにすることを目的として、イシクラゲに含まれる抗酸化物質の性質を調べた。

アルコール類と水を抽出溶媒として用いた。抗酸化活性は ABTS ラジカル消去法および DPPH 法によって測定した。標準抗酸化物質としてビタミン E 様物質である Trolox を用いた。アルコールに可溶だが水に不溶な抗酸化物質、水に可溶だがアルコールに不溶な抗酸化物質が検出された。この結果は化学的性質が異なる少なくとも 2 種の抗酸化物質があることを示唆する。また、水溶性の抗酸化物質は耐熱性を示したことから、化学的に安定な物質であると推測される。

紫外線吸収色素であるスキトネミンと MAA が抗酸化活性をもつ、と記載した例があるため、それぞれの精製標品を用いて抗酸化活性があるかどうかについて検証した。その結果、これら 2 つの紫外線吸収色素どちらにも抗酸化活性が検出された。カロテノイドが抗酸化活性をもつことはよく知られており、実際にイシクラゲ抽出物中に含まれているカロテノイドに由来する抗酸化活性が検出できる。現在、コロニーに含まれている抗酸化活性の総量に対するスキトネミンと MAA の効果の割合について、定量的な解析を行なっている。

## 5 今後の研究課題

イシクラゲが示す極限的な乾燥耐性のメカニズムを解明するために、これから取り組まなければならない研究課題をあげる。

- 1 乾燥過程において光合成電子伝達活性を停止しくみ
- 2 紫外線吸収色素の生合成経路とそれに関わる遺伝子の解明
- 3 乾燥耐性を司る決定的な要因を探り当てる。乾燥耐性を別種のラン藻に人為的に付与できることを示してそれを検証する。

技術的には、イシクラゲを効率よく形質転換する実験系の開発と環境ストレスに対する応答に関してトランスクリプトーム解析およびメタボローム解析が必要であると考えられる。