

## 陸棲藍藻Nostoc sp. HK-01 の乾燥藻体の乾熱耐性

著者	木村 駿太
発行年	2018
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2017
報告番号	12102甲第8610号
URL	<a href="http://doi.org/10.15068/00152201">http://doi.org/10.15068/00152201</a>

陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の  
乾燥藻体の乾熱耐性

2018 年 1 月

木村 駿太

陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の  
乾燥藻体の乾熱耐性

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生物機能科学専攻  
博士（農学）学位論文

木村 駿太

目次		i
略語		iii
序章		1
	熱が生物に与える影響	2
	生物が備える熱耐性	3
	陸棲藍藻とは	9
	陸棲藍藻が備える乾熱耐性機能の候補要因	11
	陸棲藍藻 <i>Nostoc</i> sp. HK-01	13
	本研究の内容と目的	14
	Tables and Figures	17
第1章	<i>Nostoc</i> sp. HK-01 の乾熱耐性における 細胞形態および細胞外多糖の関与	21
	1-1 序論	22
	1-2 材料及び方法	25
	1-2-1 材料	25
	1-2-2 藻体の準備	25
	1-2-3 細胞形態の観察	26
	1-2-4 FDA 染色液の調製	26
	1-2-5 FDA 染色法による生存率評価	27
	1-2-6 細胞外多糖 (EPS) の除去処理と確認	28
	1-2-7 EPS 除去処理後の藍藻の乾熱曝露	28
	1-3 結果	28
	1-4 考察	33

Table and Figures	41
第 2 章 <i>Nostoc</i> sp. HK-01 の休眠細胞に蓄積する低分子化合物の探索	61
2-1 序論	62
2-2 材料及び実験方法	64
2-2-1 生物材料および化学物質	64
2-2-2 休眠細胞含有率の算出	64
2-2-3 細胞内物質の分析	65
2-2-4 アミノ酸分析	66
2-3 結果	67
2-4 考察	69
Figures and Table	72
第 3 章 陸棲藍藻 <i>Nostoc</i> sp. HK-01 の休眠細胞に蓄積される 低分子化合物のタンパク質凝集抑制活性	86
3-1 序論	87
3-2 材料及び実験方法	92
3-2-1 化学物質	92
3-2-2 タンパク質凝集量の評価	92
3-2-3 酵素活性の評価	93
3-3 結果	93
3-4 考察	94
Figures and Table	97

総合考察	111
Figures	123
謝辞	126
参考文献	127

#### 略語 (Abbreviation)

A	Adenine
Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartic acid
ATP	Adenosine triphosphate
BPG	Bisphosphoglycerate
C	Cytosine
CcStP	Corynebacterium callunae starch phosphorylase
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
CPS	Capsular polysaccharides
CtXR	Candida tenuis xylose reductase
Cys	Cysteine
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPA	Dipicolinic acid

DW	Distilled water
EPS	Extracellular polysaccharides
Exp.	Experiment
FBP	Fructose 1, 6-bisphosphate
FBPald	FBP aldolase
FBPase	Fructose-1, 6-bisphosphatase
FDA	Fluorescein diacetate
F6P	Fructose 6-phosphate
G	Guanine
GAP	Glyceraldehyde 3-phosphate
Gln	Glutamine
Glu	Glutamic acid
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid
HSP	Heat Shock Protein
LDH	Lactate Dehydrogenase
Leu	Leucine
Ile	Isoleucine
ISAS	Institute of Space and Astronautical Science
ISECG	International Space Exploration Coordination Group
JAXA	Japan Aerospace Exploration Agency
L	Large subunit
LC-ESI-MS	Liquid chromatography-electro spray ionization-mass spectrometry
LEA	Late embryogenesis abundant
LEO	Low Earth Orbit
MDH	Malate Dehydrogenase

MeOH	Methanol
MG	Mannosylglycerate
NaCl	Sodium chloride
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NHK	Nippon Housou Kyoukai (Japanese Broadcasting Corporation)
NIES	National Institute for Environmental Studies
OS-MAA	Origosaccharide mycosporine amino acids
O <sub>2</sub>	Dioxygen
PCR	Polymerase chain reaction
PFK	Phosphofructokinase
PfMDH	Pseudomonas fluorescens mannitol 2-dehydrogenase
ROS	Reactive Oxygen Species
RPS	Released polysaccharides
Rubisco	Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase
S	Small subunit
SASP	Small acid-soluble spore proteins
SD	Standard deviation
SE	Standard error
Ser	Serine
sp.	Species
T	Thymine
TMAO	Trimethylamine- <i>N</i> -oxide
UV	Ultraviolet
Val	Valine



## 序章

## 熱が生物に与える影響

物質の間で移動することができるエネルギーである熱は、タンパク質、デオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid: DNA）および脂質膜などの生物組織に影響を与える（Cossins and Bowler, 1987; Somero, 1997）。タンパク質、DNA および脂質膜が熱から受ける影響に関するこれまでの情報を、Table 0-1 に示す。

タンパク質が 50~80°C を超える温度で凝縮し不可逆に変性することや、タンパク質の変性温度が生物の生育温度の上限と密接に関わることは、多数の報告により知られている（Table 0-1; 上田, 1997; Akamuna *et al.*, 1998; 赤沼・山岸, 2009; 平野・白木, 2011; Matsuura *et al.*, 2015）。タンパク質の構造安定性に主要な役割を果たしている水素結合、静電相互作用およびファンデルワールス力が高温により不安定化することから、タンパク質の温度感受性は高い（Somero, 1997）。

加熱は、DNA の二本鎖構造を一本鎖構造に解離させることおよび、一本鎖切断あるいは二本鎖切断を生じることが知られている（Table 0-1; 澤井ら, 1995; Setlow, 2006; 田中, 2010; 横谷, 2010; 藤原, 2011; 佐藤・跡見, 2015）。二本鎖が一本鎖に解離する温度は、DNA の塩基配列、DNA の濃度および溶液中の塩濃度に依存するが、ほとんどの二本鎖は約 90°C で一本鎖に解離することが知られている（田中, 2010）。大腸菌 *Escherichia coli* において、放射線感受性株と加熱感受性株との間に相関が認められたことから、*E. coli* は熱を受けた際、放射線を受けた際と同様に、DNA 損傷により死に至ることが示されている（Bridges *et al.*, 1969; 松本・鏡石, 1970）。Setlow らのグループは、DNA 修復に関わるタンパク質であ

る *recA* および *a/b-type small, acid-soluble spore proteins (SASP)* を持たない古草菌 *Bacillus subtilis* 変異株において芽胞の乾熱耐性が著しく低下した結果から、古草菌の芽胞が熱により死に至る主な原因は乾熱による DNA ダメージの蓄積であると述べている (Setlow and Setlow, 1995, 1996; Setlow, 2006)。

生物の構成単位である細胞は、リン脂質を主成分とする細胞膜 (脂質膜) により、外部と隔離されている (Singer and Nicolson, 1972; 松本・金品, 2006)。リン脂質は親水性側を外側に、疎水性側を内側に備えた二分子膜構造体 (ラメラ構造) により脂質膜を構築している (松本・金品, 2006)。脂質膜の流動性は、温度に応じて変化し、膜タンパク質の安定性および酵素活性に影響を与えることが知られている (Somero, 1997)。脂質膜は、通常ゲルあるいは液晶相のラメラ構造を形成しているが (木村, 1990; 松本・金品, 2006)、*bilayer-hexagonal* 相転移温度以上で、親水性側を内側に、疎水性側を外側に備えたヘキサゴナル構造を形成することが報告されている (Table 0-1; De Kruijff *et al.*, 1980; Somero, 1997; 梅田・榎本, 1999; 國枝, 2002)。細胞膜として不適當であるヘキサゴナル構造の形成により、細胞は死に至ることが知られている (Table 0-1; Somero, 1997)。以上のように通常多くの生物は、タンパク質、DNA および脂質膜が熱により損傷するため高温環境で生存できない。

生物が備える熱耐性

湿熱耐性あるいは乾熱耐性を備える生物が確認され、それぞれ報告されてい

る (Table 0-2)。湿熱耐性を備える生物のグループとして超好熱菌 (Hyperthermophile) や好熱性藍藻 (Thermophilic cyanobacteria) が知られている (Table 0-2)。超好熱菌は至適生育温度が 80°C以上の微生物の総称で、その多くが古細菌 (Archaea) のドメインに属している (Stetter, 1982; Fiala and Stetter, 1986; 佐藤・跡見, 2015)。古細菌 *Pyrolobus fumarii* は、113°Cの高温環境で生育できることが報告されている (Blöchl *et al.*, 1997)。メタン生成菌 *Methanopyrus kandleri* strain 116 は、122°Cの高温環境で生育できることが報告されている (Takai *et al.*, 2008)。超好熱菌は、熱に対してタンパク質を安定化させる高温適応戦略を備えている。膜タンパクを除くほとんどのタンパク質で、親水性残基は表面に、疎水性残基は内部に集まる (赤沼・山岸, 2009)。Dong ら (2008) は、*Thermococcus kodakaraensis* の Ribonuclease HIII (Tk-RNase HIII) の疎水コアを形成するアミノ酸 Ile または Leu を Ala に置換した 9 種の変異体を作成した結果、Tk-RNase HIII の熱安定性が変化したことから、疎水コアを形成するアミノ酸が、超好熱菌のタンパク質の熱安定性に重要であることを示している。超好熱菌、好熱菌および常温菌由来のタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ比較すると、超好熱菌および好熱菌の Asn、Asp、Cys、Gln および Ser の割合は常温菌に比べて低く、Arg、Glu および Val の割合は高いことから、荷電性アミノ酸の Glu や Arg が形成するイオン結合が高温環境におけるタンパク質の安定化に寄与していると考えられている (赤沼・山岸, 2009; Taylor and Vaisman, 2010; 佐藤・跡見, 2015)。Chakravarty と Varadarajan (2000) は、8 種の好熱菌由来の可溶性タンパク質と 12 種の常温菌由来の相同タンパク質の立体構造を比較した結果、表面に露出したループが

短鎖化され、立体構造が小型化している傾向を示した。立体構造の小さいタンパク質は、熱容量変化が小さいことから安定な温度範囲が広いことが知られている (Razvi and Scholtz, 2006; 赤沼・山岸, 2009)。タンパク質の 4 次構造が熱耐性に関わる例も知られている。Ribulose 1,5-biophosphate、二酸化炭素と水から 2 分子の 3-phosphoglycerate を生成する反応を触媒し、植物や藍藻などでカルビン回路における鍵酵素である Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は、古細菌においても DNA やヌクレオシドの分解に関わることが知られているが、アミノ酸残基を変異させた Rubisco を作成すると 4 次構造が変化し、耐熱性が低下することが示されている (Maeda *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2007; 佐藤・跡見, 2015; Aono *et al.*, 2015)。超好熱菌は熱に対して DNA を安定化させる高温適応戦略を備えている。超好熱菌のゲノム DNA の安定化機構のひとつとして、ATP (adenosine triphosphate) 依存的な DNA topoisomerase のひとつである、reverse gyrase による安定化が挙げられる (Kikuchi and Asai, 1984)。Reverse gyrase は、DNA 構造の巻き数を増やすはたらきを示すこと、細菌、古細菌に関係なく、超好熱菌に分類される微生物はすべて reverse gyrase を有していること、および *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 の reverse gyrase 遺伝子の破壊株は高温環境における生育が低下したことから、熱環境における生育に重要であると考えられている (Kikuchi and Asai, 1984; Forterre, 2002; Atomi *et al.*, 2004; 佐藤・跡見, 2015)。また、古細菌の Euryarchaeota 門には真核生物の histone と似た 1 次構造のタンパク質が存在し、*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 から抽出した histone 様タンパク質 HpkA を添加することにより、HpkA 濃度や spermine や potassium chloride と

の共添加により活性は異なるが、DNA の解離温度が 16~29 °C 上昇したことが報告されている (Higashibata *et al.*, 2000; 佐藤・跡見, 2015)。超好熱菌は、熱から脂質膜を保護する高温適応戦略を備えている。真核生物や細菌の脂質膜は、脂肪酸由来の直鎖の炭化水素が glycerol とエステル結合している一方、古細菌の脂質膜は、枝分かれ構造をもつ isoprenoid が glycerol とエーテル結合しており、エーテル結合はエステル結合に比べて化学的に安定であることから、脂質膜の安定性を高めていると考えられている (Woese *et al.*, 1990 ; Van de Vossenberg *et al.*, 1998; 佐藤・跡見, 2015)。超好熱菌の脂質膜の、温度順化による安定化も知られている。Crenarchaeota 門に属する *Acidilobus sulfurireducens* は、培養温度を 65 から 81°C と昇温することで、Euryarchaeota 門に属する *Thermococcus kodakaraensis* は、培養温度 60 から 93°C と昇温することで流動性の低い脂質膜成分の割合が増加することが報告されており、脂質膜を熱に対してより強固で安定な状態に維持していると考えられている (Matsuno *et al.*, 2009; Boyd *et al.*, 2011; 佐藤・跡見, 2015)。光合成生物の藍藻において、50°C を超える温度環境で生育する好熱性藍藻が知られている。地熱地帯から採取された *Synechococcus cf. lividus* は 73~74°C、*Cyanothece cf. minervae* は 62°C、*Chlorogloeopsis* は 64°C、*Leptolyngbya* spp. は 62°C 以下、*Fischerella cf. laminosus* は 58°C、*Leptolyngya cf. amphigranulata* は 56°C 以下、*Geitlerinema cf. terebriformis* は 55°C、*Spirulina cf. labyrinthiformis* は 51°C、*Calothrix* spp. は 53~55°C、*Pleurocapsa* spp. は 57°C で生育することが知られている (Table 0-2; Ward *et al.*, 2012)。Rothschild と Mancinelli (2001) は、75°C を超える温度は chlorophyll を変性させ、光合成生物の光合成機能を損なわせると述

べている。100°Cを超えるような熱環境で生育できる藍藻は未だ発見されていない（小池, 2014）。2002年にかずさDNA研究所により全ゲノム解析が完了した好熱性藍藻 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 は、タンパク質の熱安定性が高いことから、光化学系の結晶化による光化学系 I および II の立体構造解析が達成された生物材料として知られている（Jordan *et al.*, 2001; Zouni *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002）。好熱性藍藻は熱ショックタンパク質（heat shock protein; HSP）を備えている（Tanaka and Nakamoto, 1999; 仲本, 2002; 佐々木ら, 2004）。HSP は熱をはじめとしたストレスに応答して合成され、タンパク質の変性を防ぐ働き、ストレスにより変性したタンパク質の疎水性表面に結合してこれらの凝集を抑える働き、および変性したタンパク質を正常なタンパク質に再生させる分子シャペロンとしての働きが、藍藻、大腸菌、酵母、ハエ、ニワトリおよびヒトなどの生物グループにおいて幅広く知られている（Ritossa, 1962; 永田・平芳, 1987; 仲本, 2002）。藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の HSP を過剰発現させた変異体において、致死温度における生存率、光合成電子伝達活性および色素タンパク質である *phycocyanin* の熱安定性が顕著に増加することから、高温環境において、HSP による藍藻の光合成の防御機能が示唆されている（Nakamoto *et al.*, 2000; 仲本, 2002）。

乾熱耐性を備える生物のグループとして、古草菌 (*Bacillus subtilis*)、クマムシ (*Tardigrades*)、ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) およびイシクラゲ、ハッサイと呼ばれる陸棲藍藻 (*Nostoc*) が知られている (Table 0-2)。古草菌は芽胞と呼ばれる水含有率の低い胞子に分化することで、90~120°Cの乾熱に対して

耐性を備えることが報告されている (蜂須賀, 1980; Gerhardt and Marquis, 1989; Setlow, 2006)。枯草菌の芽胞にはジピコリン酸 (dipicolinic acid; DPA) および small acid-soluble spore proteins (SASP) が顕著に蓄積していることから、DPA および SASP が生体成分の保護に関与していると考えられている (Setlow, 2006; 尾花, 2012)。クマムシ (*Tardigrades*) は、クリプトビオシス (cryptobiosis) あるいは樽 (tun) と呼ばれる無代謝状態に入る過程で、trehalose をはじめとした適合溶質 (compatible solute) を蓄積して水に代わり生体成分や細胞膜などを保護することや、筋肉やアクアポリンを用いて能動的な脱水を行うことで、90~110°Cの乾熱後に蘇生することが示唆されている (Kikawada *et al.*, 2005; 奥田, 2006; 黄川田, 2009; Hengherr *et al.*, 2009; Welnicz *et al.*, 2011; Horikawa and Arakawa, 2015)。ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) の幼虫はクリプトビオシスに入る過程で trehalose および glycerol を適合溶質として蓄積することで、70~90°Cの高温に曝された後に蘇生することが報告されている (奥田, 2006; Sakurai *et al.*, 2008; 古木ら, 2009)。インクラゲと呼ばれる陸棲藍藻 *Nostoc commune* の乾燥藻体は、80°C、1時間の乾熱後に加水されると、熱非曝露の対照と比較して  $67 \pm 14\%$  の O<sub>2</sub> 放出能を示すことから、乾熱に生存していることが報告されている (Tamaru *et al.*, 2005)。ハッサイと呼ばれる陸棲藍藻 *Nostoc flagelliforme* の乾燥藻体は、85°C、24時間の乾熱後に加水すると、その呼吸量は熱非曝露の対照と比較して影響を受けないことが報告されている (Mei and Cheng, 1990; Gao, 1998)。*Nostoc commune* の藻塊から乾燥耐性を指標に単離された陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体は、esterase 活性を指標とした生存率において、熱非曝露の対照を 100%としたと



き、100°C、6 時間の乾熱後に  $97.1 \pm 11.5 \%$ 、100°C、10 時間の乾熱後に  $36.4 \pm 9.88 \%$  を示し、また 100°C、10 時間の乾熱後に Chlorophyll 蛍光を指標とした光合成機能を示すことが報告されている (Katoh *et al.*, 2003; 五十嵐, 2013)。しかし、これら陸棲藍藻の乾熱耐性に関わる特別な細胞形態や細胞内外の機能物質などの、具体的なしくみは未だ明らかにされていない (Table 0-2)。

陸棲藍藻とは

藍藻 (blue green algae) はシアノバクテリア (cyanobacteria) とも呼ばれ、酸素発生型の光合成を行う原核生物である (Fig. 0-1; Setchell, 1895; 井上, 2006; 池内, 2007; 大森, 2009; NASA Astrobiology Institute)。藍藻は細菌 (bacteria) に属するが、chlorophyll を持つ点、光エネルギーを化学エネルギーに変換する光化学系反応中心を 2 種類持つ点および水を分解して酸素を発生する点から光合成細菌と区別して扱われる (園池, 2012)。藍藻は世界ではじめて酸素発生型の光合成を行い、約 30 億年前から長い時間をかけて地球の大気を酸化的環境に変えた生物であると考えられている (池内, 2007; 井上, 2007; 大森, 2009)。藍藻が酸素発生型の光合成能を獲得した進化的過程の詳細は明らかにされていないが、 $\text{NAD}^+$  (nicotinamide adenine dinucleotide) を還元できる点から光化学系 I に類似する緑色イオウ細菌や heliobacteria の光化学系と、 $\text{NAD}^+$  を還元できる点から光化学系 II に類似する緑色非イオウ細菌や紅色非イオウ細菌の光化学系を合体させたことで酸素発生を可能にしたと考えられている (池内, 2007)。藍藻は光合成能だけ

でなく、大気中の窒素ガスを固定してアンモニア態の窒素に変える窒素固定能を備えた種も存在する（大森, 2006, 2009; 池内, 2007）。窒素固定を行う生物は共生的窒素固定生物と非共生的窒素固定生物に分けられる。共生的窒素固定生物はマメ科植物と共生する根粒菌 (*Rhizobium*)、ハンノキなどマメ科以外の植物と共生する放線菌 (*Frankia*) およびシダ植物であるアズラと共生する藍藻 (*Nostoc*) などが知られている。一方、非共生的窒素固定生物は好気性バクテリア (*Azotobacter*)、通性嫌気性バクテリア (*Klebsiella*)、嫌気性非光合成バクテリア (*Clostridium*)、嫌気性光合成バクテリア (*Rhodospirillum*) および藍藻 (*Nostoc*、*Anabaena*、*Tolypothrix*、*Calothrix*) などが知られている（渡辺, 1992; 大森, 2009）。現在知られている生物のうち、酸素発生型の光合成能と窒素固定能を併せ持つ生物は藍藻のみである。現在藍藻の分類は、*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* における、細胞の形態から5つのサブセクションに分ける分類が広く受け入れられている（Table 0-3; Garcia-Pichel, 2010）。藍藻は2000種以上が知られており、それらの生息域は海洋中、淡水中および陸上まで及ぶ（大森, 2006; 宮下, 2006）。陸上に生息する陸棲藍藻は、数十年から百年ほどの間乾燥に曝されても、加水することで蘇生する機能を備えていることが知られている（Cameron, 1962; 大森, 2006; Hu *et al.*, 2012）。陸棲藍藻は太古の地球において、酸素発生型の光合成能と窒素固定能により多量の有機物を陸地の表面に蓄積し、微生物および高等植物が生育できる環境を整えたと考えられている（大森, 2006, 2009; 池内, 2007）。陸棲藍藻は現在もアジア、ヨーロッパ、アメリカ、アフリカおよび南極の陸地に普遍的に生息している（Hill *et al.*, 1994; Tamaru *et al.*, 2005）。火山噴

火後の貧栄養な土地にも先駆的に現われることが確認されている（大森・犬伏, 2004）。陸棲藍藻は 10~80 kg/year/ha の窒素を固定し、陸地への窒素供給に貢献している（De, 1939; 松口, 1976; Granhall, 1981; Venkataraman, 1981; 小野・古賀, 1984; 渡辺, 1992; Vaishampayan *et al.*, 2001; 佐伯・豊田, 2003; Prasanna and Nayak, 2007; Thajuddin and Subramanian, 2010; 豊田・Kyaw, 2011）。Srinivasan (1979) は、藍藻を 2 ヶ月前から土壤に添加し、肥料を添加しなかった条件と比較して穀物収量が 1,158 Kg/ha (33.6%) 増加したと報告している（Srinivasan, 1979; Venkataraman, 1981）。陸棲藍藻は、土壤表面に施用すると有機態炭素・窒素の増加、水分蒸発抑制、地温調節、Ca<sup>2+</sup>の増加および pH 調節の効果を示す（大森・犬伏, 2004; Obana *et al.*, 2007）。植物の生育に必要な環境が整えられることから、荒廃土壤修復や砂漠化抑制への応用が期待されている（大森・犬伏, 2004; Obana *et al.*, 2007）。Gao (1998) は、陸棲藍藻の生息地は日照りにより 66°C の高温に至ることを報告している。陸棲藍藻が日照りに曝される過酷な陸地環境で生存するために、乾熱耐性は極めて重要な機能である。

#### 陸棲藍藻が備える乾熱耐性機能の候補要因

陸棲藍藻の乾熱耐性機能に関わる可能性のある候補要因として、特別な細胞形態への分化、細胞外多糖 (extracellular polysaccharides ; EPS) の関与および適合溶質 (compatible solute) の蓄積が考えられる。

藍藻において、光合成を行うネンジュ状の栄養細胞 (vegetative cell)、運動性

の連鎖体 (hormogonia)、窒素固定を行う異型細胞 (heterocyst) および休眠細胞 (akinetete) に分化する種が報告されている (Potts, 2002; Katoh *et al.*, 2003; Liu and Chen, 2003; Garcia-Pichel, 2010)。陸棲藍藻 *Nostoc* PCC 7524、水棲藍藻 *Anabaena cylindrica* を用いた研究において、細胞形態により低温や乾燥に関する耐性が異なることが報告されている (Yamamoto, 1975; Sutherland *et al.*, 1979)。陸棲藍藻の乾熱耐性においても細胞形態により耐性が異なる可能性が考えられる。

細胞外多糖 (extracellular polysaccharides ; EPS) は藍藻細胞から放出される粘性物質で、*Nostoc commune*、*Nostoc* sp. CCME、*Anabaena* sp. PCC 7120 および *Nostoc* sp. HK-01 を用いた研究において、UV、自然乾燥および塩ストレスに対する耐性への EPS の寄与が報告されている (Bertocchi *et al.*, 1990; Ehling-Schuls *et al.*, 1997; De Philippis and Vincenzini, 1998; Tamaru *et al.*, 2005; Knowles and Castenholz, 2008; Mager *et al.*, 2011; Yoshimura *et al.*, 2012)。陸棲藍藻の乾熱耐性においても、EPS が耐性に関与している可能性が考えられる。

二糖の trehalose や sucrose は、適合溶質として細胞内に蓄積し、水の代わりに生体成分や細胞膜を保護することで、乾燥耐性に関与すると考えられている (Crowe *et al.*, 1998; Potts, 1999; 奥田, 2006)。Herskovitz ら (1991) は乾燥耐性を備えた藍藻、*Phormidium autumnale*, strain LPP4 および *Chroococidiopsis* sp. は乾燥に応答して trehalose と sucrose を蓄積するのに対し、乾燥感受性の藍藻 *Plectonema boryanum* および *Synechococcus* strain PCC 7942 は蓄積しないことを報告している。Higo ら (2006) は藍藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 が乾燥に伴い trehalose および sucrose を蓄積することを報告し、また、trehalose 合成遺伝子の破壊株は

trehalose の蓄積量および再加水後の生存率が低下することから、trehalose あるいは sucrose が適合溶質として働いている可能性を示している。このように藍藻の乾燥耐性に関与する適合溶質は、陸棲藍藻の乾熱耐性に関与している可能性が考えられるが、まだその詳細な要因について明らかにされていない。

#### 陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01

陸棲藍藻の一種 *Nostoc* sp. HK-01 は、Katoh ら (2003) により乾燥耐性を指標に *Nostoc commune* の藻塊から単離された株である (NIES-2109)。*Nostoc* sp. HK-01 は、全ゲノム解析が完了しモデル藍藻として扱われている *Anabaena* sp. PCC 7120 と、16S rDNA の塩基配列から近縁種であると報告されているが、8 ヶ月間乾燥後の藻体を用いた寒天培上培養実験において、*Anabaena* sp. PCC 7120 はコロニーを形成しない一方、*Nostoc* sp. HK-01 はコロニーを形成することから、*Anabaena* sp. PCC 7120 よりも乾燥耐性が優れていることが示されている (Kaneko *et al.*, 2001; Katoh *et al.*, 2003; 大森ら, 2006; Yoshimura *et al.*, 2006)。

*Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体は、前述したように 100°C の乾熱に 10 時間曝露した後も未曝露の藻体の 40% 程度の細胞が生存することおよび光合成能が正常に働いていることが報告されている (五十嵐, 2013)。Arai らのグループは、*Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体を  $10^{-5}$  Pa の真空に 2 週間曝露した後も未曝露の藻体と変わらずに増殖する高真空耐性を報告している (Arai *et al.*, 2008; 新井, 2009; Arai, 2009)。藤代 (2012) は、*Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体を 538 Gy の重粒子線 (He

線) に曝露した後も未曝露の藻体の 70%程度の細胞が増殖する重粒子線耐性を報告している。Tomita-Yokotani ら (2013) および Kimura ら (2014) は、*Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体を  $170 \text{ J cm}^{-2}$  の VUV (172 nm) および  $12 \text{ J cm}^{-2}$  の UVC (254 nm) に曝露した後も未曝露の藻体の 90%程度の細胞が増殖する紫外線耐性を報告している。味岡 (2014) は、*Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体を 5 kGy の  $\gamma$  線に曝露した後も未曝露の藻体の 95%程度の細胞が増殖する  $\gamma$  線耐性を報告している。*Nostoc* sp. HK-01 は、乾燥藻体における上記の環境耐性が評価されたことから、国際宇宙ステーションにおける宇宙実験の実験生物として採択され、2015 年 5 月から宇宙曝露が行われている (たんぼぼ計画 HP, 山岸ら, 2007; Yamagishi *et al.*, 2008; Yokobori, 2013; SpaceRef, 2015; Kawaguchi *et al.*, 2016; Cottin *et al.*, 2017)。極めて優れた環境耐性を備えた陸棲藍藻である *Nostoc* sp. HK-01 は、詳細な生活環は明らかにされていないが、栄養細胞、連鎖体、異型細胞および休眠細胞への分化が認められていることから (Katoh *et al.*, 2003)、各細胞形態に焦点を当てた詳細な実験が可能な種であると考えられる。さらに *Nostoc* sp. HK-01 はゲノム解析が進められており (未発表)、今後藍藻の耐性研究のモデル生物となる可能性が考えられる。*Nostoc* sp. HK-01 は、陸棲藍藻の乾熱耐性を解明するための生物材料として非常に適していると考えられる。

## 本研究の内容と目的

陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体の  $100^{\circ}\text{C}$  10 時間の乾熱に対する耐性は五

十嵐ら（2013）により証明されたが、水の沸点にあたる 100℃に 10 時間曝しても再加水により蘇生し、生化学的機能を損傷することなく生存を可能としている、その具体的なしくみはまだ明らかにされていない。本研究は、陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性を備えた細胞形態と機能分子およびその分布について調べた後、同定された成分の生体分子保護活性を調べることで、*Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性機能の全容解明のための重要な基礎情報を得ることを目指した。

第 1 章は、*Nostoc* sp. HK-01 の細胞形態に注目し、*Nostoc* sp. HK-01 の生活環の各細胞形態の観察を再検証し、乾熱耐性と細胞形態の相関を調べた。湿熱曝露後に細胞形態ごとの生存率を算出することおよび、乾燥過程に細胞形態が変化するかを検証することで、熱に耐える準備が熱耐性の高い細胞形態への分化時に行われているのか、または乾燥過程に行われているのか調べた。また *Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性が、*Nostoc commune* と同様に細胞外多糖に依存するかどうかを、細胞外多糖を取り除き、熱曝露して調べた。

第 2 章は、*Nostoc* sp. HK-01 の細胞内低分子化合物の分析を行い、耐性に関与する細胞に蓄積されている低分子化合物を探索した。藻体から得られた抽出物（水溶性）を HPLC（High-Performance Liquid Chromatography）および LC-ESI/MS（Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry）を用いて分離・分析した。耐性に関与する細胞に蓄積する成分は、LC-ESI/MS 分析により、各抽出物成分量が著しく異なる分子量を詳細に解析することで得た。

第 3 章は、タンパク質の熱凝集抑制活性を指標に *Nostoc* sp. HK-01 の耐性に関与する細胞に蓄積されている低分子化合物が、熱曝露後の *Nostoc* sp. HK-01 の蘇

生に必要な高分子保護をするか否かについて、モデル酵素の乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase; LDH) を用いて確認した。

総合考察は、第 1 章から第 3 章までの研究結果および考察から導き出された *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体の熱耐性について、将来の応用利用の可能性も含めて総合的に考察した。

本研究により *Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性機能の全容解明のための重要な基礎情報が得られれば、陸地における一連の生存戦略の推測が可能となる。さらに *Nostoc* sp. HK-01 だけでなく他の陸棲藍藻の乾熱耐性をはじめとした環境耐性の解明への波及効果が期待でき、地上の物質循環に多大な影響を与えている陸棲藍藻の、過酷な陸地環境で生存するための機能の解明および将来の応用の可能性が示されると考えられる。



**Table. 0-1.** Effects of heat on protein, DNA (deoxyribonucleic acid) and lipid membrane.

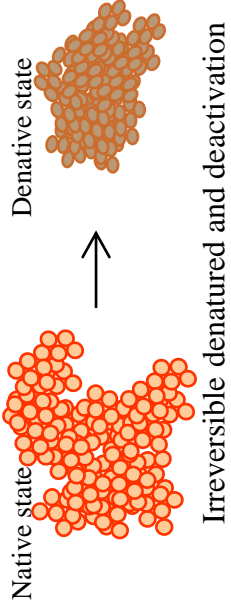
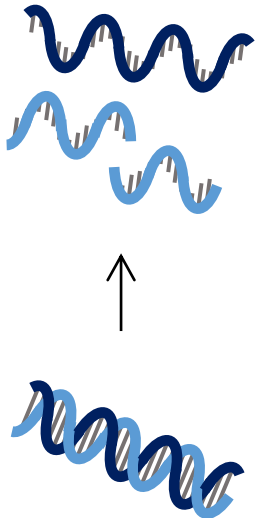
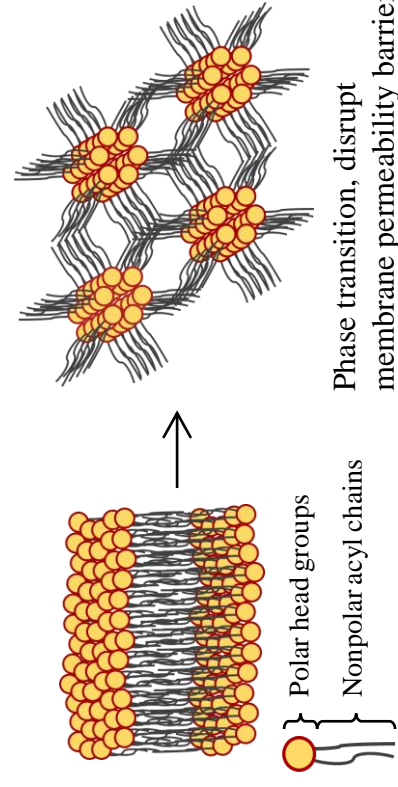
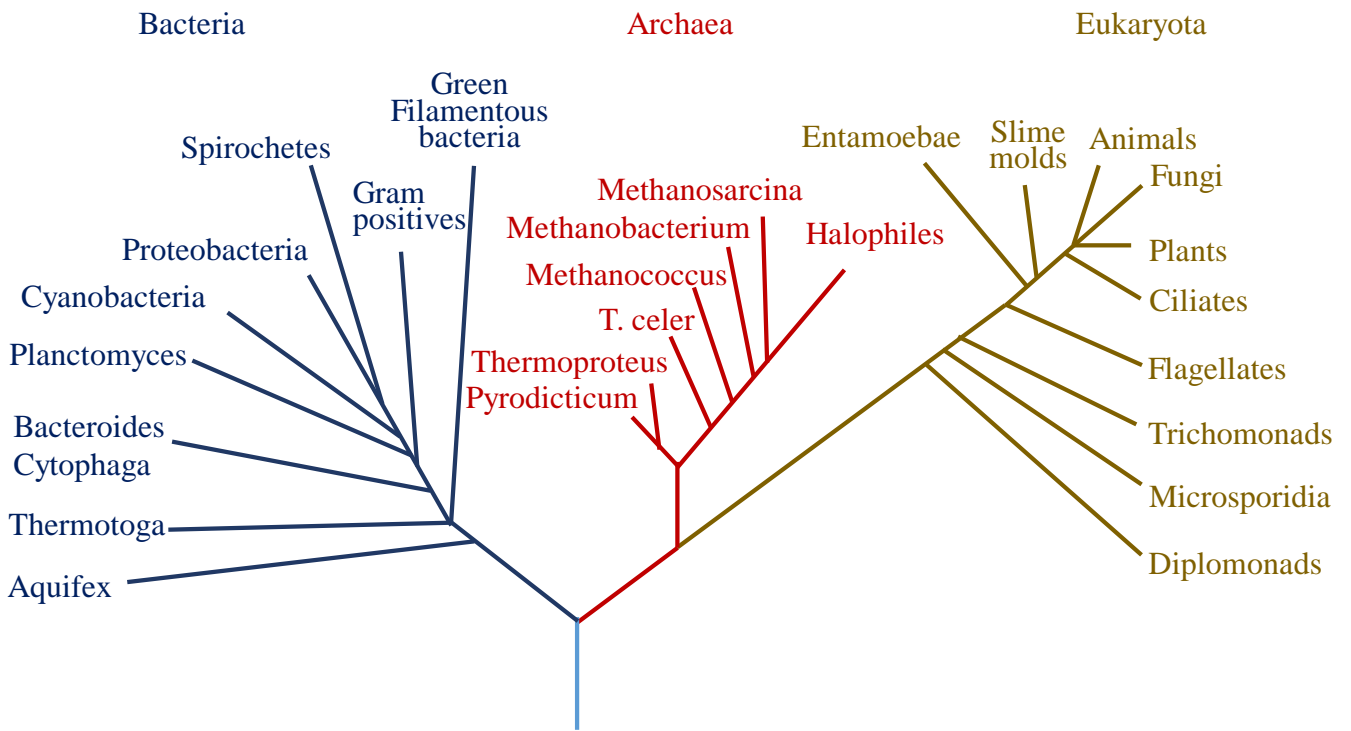
	Effect of heat	References
Protein	 <p>Native state</p> <p>Denative state</p> <p>Irreversible denatured and deactivation</p>	Somero, 1997; Akanuma and Yamagishi, 2009 (In Japanese); Hirano and Shiraki, 2011 (In Japanese).
DNA	 <p>Unbinding of double helix structure and DNA damage</p>	Bridges <i>et al.</i> , 1969 ; Setlow, 2006; Tanaka, 2010 (In Japanese); Sato and Atomi, 2015 (In Japanese);
Lipid membrane	 <p>Phase transition, disrupt membrane permeability barriers</p> <p>Polar head groups</p> <p>Nonpolar acyl chains</p>	Somero, 1997; Umeda and Enomoto 1999 (In Japanese)

Illustration cite Somero, 1997; Umeda and Enomoto 1999.

**Table. 0-2.** Species which have heat tolerance.

	Species	Tolerant temperature	Reported mechanism	References
Wet heat tolerance	Hyperthermophile	80~122°C	Thermally-stable protein, Reverse gyrase, Low-fluidity lipid membrane and protection of Metabolic intermediate.	Atomi <i>et al.</i> , 2004; Takai <i>et al.</i> , 2008; Matsuno <i>et al.</i> , 2009; Boyd <i>et al.</i> , 2011; Sato and Atomi, 2015 (In Japanese).
	Thermophilic cyanobacteria	51~74°C	Thermally-stable protein, Heat shock protein	Tanaka and Nakamoto, 1999; Jordan <i>et al.</i> , 2001; Zouni <i>et al.</i> , 2001; Nakamura <i>et al.</i> , 2002; Ward <i>et al.</i> , 2012
Dry heat tolerance	<i>Bacillus subtilis</i>	90~120°C	Dehydrated Spore. Accumulation of dipicolinic acid (DPA), small acid-soluble spore proteins (SASP)	Hachisuka, 1980 (In Japanese); Setlow, 2006
	<i>Tardigrades</i>	60~110°C	Cryptobiosis (Tun formation). Accumulation of trehalose as compatible solute, active dehydration	Hengherr <i>et al.</i> , 1993; Okuda, 2006 (In Japanese); Horikawa and Arakawa, 2015
	<i>Polypedilium vanderplanki</i>	70~90°C	Cryptobiosis. Accumulation of Trehalose and glycerol as compatible solute.	Okuda, 2006 (In Japanese); Sakurai <i>et al.</i> , 2009
	<i>Nostoc</i>	60~over 100°C	Unrevealed.	Mei and Cheng, 1990; Gao, 1998; Tamaru <i>et al.</i> , 2005; Igarashi, 2013(In Japanese)



**Fig. 0-1.** Phylogenetic tree of life (modification from NASA Astrobiology Institute <https://astrobiology.nasa.gov/>)

**Table. 0-3.** Subsections of cyanobacteria, according to the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (modification from Garcia-Pichel, 2010).

Subsection	Traditional order	Definitory criteria
Subsection I	Chroococcales	Unicellular, nonfilamentous. Cells occurring singly or in aggregates. Cell division by binary fission in 1, 2, or 3 planes, symmetric or asymmetric, or by budding
Subsection II	Pleurocapsales	Unicellular, nonfilamentous. Cells occurring singly or in aggregates. Reproduction by multiple fission without growth, yielding beaocytes (cells smaller than the parent cell), or by binary and multiple fission
Subsection III	Oscillatoriales	Filamentous, binary fission in one plane, yielding uniseriate trichomes without true branching. No heterocysts or akinetes formed
Subsection IV	Nostocales	Filamentous, division occurring only in one plane to yield uniseriate trichomes without true branching. Heterocysts formed when combined nitrogen is low
Subsection V	Stigonematales	Filamentous, division occurring periodically or commonly in more than one plane, yielding multiseriate trichomes, truly branched trichomes, or both. Heterocysts formed when combined nitrogen is low

## 第 1 章

*Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性における  
細胞形態および細胞外多糖の関与

## 1-1 序論

陸棲藍藻は、乾燥状態で 60~100°Cの乾熱に対する耐性を備えていることが報告されている (Mei and Cheng, 1990; Gao, 1998; Tamaru *et al.*, 2005; 五十嵐, 2013)。乾熱耐性は、日照りにより 66°Cの高温に至る陸地で藍藻が生存するために極めて重要な機能であると考えられる (Gao, 1998)。しかし、陸棲藍藻の乾熱耐性機能の詳細はまだ明らかにされていない (序章)。陸棲藍藻において、光合成を行うネンジュ状の栄養細胞 (vegetative cell) から、運動性の連鎖体 (hormogonia)、窒素固定を行う異型細胞 (heterocyst) および休眠細胞 (akinetete) に分化する種が報告されている (Potts, 2002; Katoh *et al.*, 2003; Liu and Chen, 2003; Garcia-Pichel, 2010)。藍藻の休眠細胞は、乾燥や低温に対して耐性の高い細胞形態であることが知られている。陸棲藍藻 *Nostoc* PCC 7524 の栄養細胞は、暗所、4°C下で保管すると 7 日以内に死滅したが、休眠細胞は 15 ヶ月の保管後に蘇生したことが報告されている (Sutherland *et al.*, 1979)。水棲藍藻の *Anabaena cylindrica* の栄養細胞は、15 日の乾燥で死滅したが、休眠細胞は 5 年間の乾燥後に発芽したことが報告されている (Yamamoto, 1975)。藍藻の休眠細胞は、高温耐性を備えていないとされている (Sutherland *et al.*, 1979; Adams and Duggan, 1999; Garcia-Pichel, 2010; Kaplan-Levy *et al.*, 2010)。 *Anabaena cylindrica* ATCC29414 の休眠細胞の 60°C、50 時間の乾熱後の発芽が Hori ら (2003) により報告されているが、藍藻の乾熱耐性と細胞形態の関係は検証されていない。陸棲藍藻の乾熱耐性において、各細胞形態で耐性が異なる可能性が考えられるが、全ての細胞に熱耐性が具備されるのか、あるいは特別の細胞形態や生活環

の時期があるかなど、細胞形態と乾熱耐性の関係はまだ明らかにされていない。100℃、10時間の乾熱耐性が証明されている陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 において、栄養細胞、連鎖体、異型細胞および休眠細胞への分化は報告されているが、その生活環の詳細、細胞形態と乾熱耐性の関係および、熱に耐える準備が行われている時期は、まだ報告されていない (Kato *et al.*, 2003; 五十嵐, 2013)。

藍藻細胞から分泌される粘性物質として知られる細胞外多糖 (extracellular polysaccharides; EPS) は (Bertocchi *et al.*, 1990; Mager and Thomas, 2011)、藍藻の各種環境耐性に関与することが報告されている。*Nostoc commune* Vaucher DRH1 において、315 nm よりも短波長の UV-B 照射により、EPS 中に origosaccharide mycosporine amino acids (OS-MAA) が誘導合成されることが報告されている (Ehling-Schuls *et al.*, 1997)。312 および 335 nm に極大吸収波長のある色素である OS-MAA は、UV-A/B を吸収することで細胞を保護していると示唆されている (Scherer *et al.*, 1988; Böhm *et al.*, 1995)。Tamaru ら (2005) は、*Nostoc commune* の藻体に EPS の除去処理の後、EPS 除去藻体の乾燥耐性を検証した結果、一晩室温乾燥した EPS 除去藻体の再加水後の光合成能は、EPS 未除去藻体を 100% としたとき  $33 \pm 12\%$  まで低下することを報告している。Tamaru ら (2005) は、EPS 除去処理で細胞がダメージを受けていないことを光合成能から確認していることから、EPS を除去することで乾燥耐性が著しく低下したことを示している。Knowles と Castenholz (2008) は、*Nostoc* sp. CCMEE 6160 から分離した EPS を真核藻類 *Chlorella* sp. CCMEE 6038 および藍藻 *Chroococcidiopsis* sp. CCMEE 5056 の藻体に添加すると、湿度 17% で 5 日間乾燥後の生存率が EPS 未添加の藻

体と比較してそれぞれ  $14.4 \pm 2.6\%$  および  $20.9 \pm 0.7\%$  増加することを、蛍光顕微鏡観察により報告している。Yoshimura ら (2012) は、200 mM の塩条件で増殖が阻害される *Anabaena* sp. PCC 7120 に *Nostoc* sp. HK-01 から分離した EPS を添加すると、塩条件下における生育が増加したことを報告している。このように陸棲藍藻の UV、自然乾燥、および塩耐性への関与が報告されている EPS は、陸棲藍藻の乾熱耐性に関しても貢献している可能性が考えられる。五十嵐 (2013) は、乾熱曝露後の断面構造写真から *Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性に EPS が関与している可能性を指摘しているが、陸棲藍藻の乾熱耐性における EPS の貢献は、まだ検証されていない。

本章は、*Nostoc* sp. HK-01 の生活環の詳細を検証した後、乾熱曝露後に細胞形態ごとの生存率を算出することで、熱耐性の高い細胞形態が明らかになると考えた。湿熱曝露後に細胞形態ごとの生存率を算出することおよび、乾燥過程に細胞形態が変化するかを検証することで、熱に耐える準備が熱耐性の高い細胞形態への分化時に行われているのか、または乾燥時に行われているのかが明らかになると考えた。また陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の EPS が乾燥状態の陸棲藍藻の乾熱耐性に検証するか検証した。EPS が乾熱耐性に貢献しているならば、藍藻藻体から EPS を除去した場合、乾熱耐性は、EPS 除去処理を行わない場合と比較して著しく損なわれると考えられる。EPS の除去は、近縁種の *Nostoc commune* において報告されているが (Tamaru *et al.*, 2005; Knowles and Castenholz, 2008; Kosugi *et al.*, 2012)、*Nostoc* sp. HK-01 において EPS 除去は報告されていない。本章は、*Nostoc* sp. HK-01 の EPS 除去処理方法について、合わせて検討した。



## 1-2 材料および方法

### 1-2-1 材料

陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 (NIES-2109) を、本実験材料として用いた。*Nostoc* sp. HK-01 は、日本の兵庫県立大学の構内 (N34.928516, E134.445362) の土壌から採取された *Nostoc commune* 藻塊から、Katohら (2003) により乾燥耐性を指標として単離された後、埼玉大学大森研究室で維持されていた株を用いた。

### 1-2-2 藻体の準備

BG-11 液体培地 (Table 1-1; Rippka *et al.*, 1979) で温度 26 °C、常光下 ( $74.3 \pm 24.3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) で往復振盪培養 (120 rpm, 振幅 3 cm) した *Nostoc* sp. HK-01 を、湿潤藻体として各実験に用いた。湿潤藻体 300  $\mu\text{L}$  をシャーレに添加し、温度 23°C で自然乾燥させ、乾燥藻体として各実験に用いた。乾燥は、蓋を開けた条件、蓋を閉めた条件、蓋を閉めてシャーレ内に 200  $\mu\text{L}$  の蒸留水を添加した条件、蓋を閉めてシャーレ内に 500  $\mu\text{L}$  の蒸留水を添加した条件および、蓋を閉めてシャーレ内に 900  $\mu\text{L}$  の蒸留水を添加した条件で行い、乾燥までの時間の異なる藻体を用意した。重量を継時的に計測し、乾燥を確認した。蓋を閉めた条件で乾燥させ、重量が安定した後、暗所、相対湿度 30% で 2 週間保管した乾燥藻体を、100°C に温度を調節した乾燥機 (WFO-450, Eyela, Tokyo, Japan) 内に備えて 2 時間の熱曝露を行い、乾熱曝露後藻体として各実験に用いた。湿潤藻体 300  $\mu\text{L}$  を 50°C あるいは 100°C に温度を調節したサーモブロック (ND-M01, Nissin, Tokyo,

Japan) に備え、1 時間の熱曝露を行い、湿熱曝露後藻体として各実験に用いた。

### 1-2-3 細胞形態の観察

培養過程における細胞形態の観察は、*Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体約 300  $\mu\text{g}$  を、BG-11 を 40 mL 入れた 100 mL 容坂口フラスコに備え、温度 26°C、常光下 ( $74.3 \pm 24.3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) で 30 日間振盪培養 (120 rpm) し、培養 24 時間ごとにスライドガラスに適量取り出し、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 (BX50, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。乾燥後の細胞形態の観察は、乾燥藻体に約 20  $\mu\text{L}$  の蒸留水を添加し、ミクロスパーテルを用いてスライドガラスに適量取り出し、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 (BX50, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。撮影したそれぞれの顕微鏡写真から  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  区画を無作為に 3 区画選び、区画内の細胞を細胞形態ごとにカウントした。

### 1-2-4 FDA 染色液の調製

Fluorescein diacetate (FDA, Dojindo, Kumamoto, Japan) を、生存確認のための染色剤として用いた (Jones and Senft, 1985; Mori *et al.*, 2002; Arai *et al.*, 2008)。FDA を、dimethylsulfoxide 0.5 mL 中に 1 mg 溶かした。その後、0.2 mL acetone に溶かし、調製後 5°C に保ち、0.04 mL FDA-stock 溶液とした。0.04 mL FDA-stock 溶液を 10 mL Dulbecco's Phosphate Buffered Saline と混合し、0.002% FDA-stain 溶液として各実験に用いた。

#### 1-2-5 FDA 染色法による生存率評価

一連の操作を Fig. 1-1 に示す。準備した各 *Nostoc* sp. HK-01 藻体に BG-11 を 500  $\mu\text{L}$  加え、常光下 ( $23.6 \pm 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) で 2 日間静置した。藍藻懸濁液 200  $\mu\text{L}$  を小チューブ (Violamo Micro Tube, AsOne, Osaka, Japan) に取り分けた。FDA-stain 溶液 100  $\mu\text{L}$  を加え、37°C、500 rpm で 10 分間水平偏芯震動した (M・BR-022UP, Taitec, Saitama, Japan)。5 分間、遮光下で氷冷した後各試料をスライドガラスに適量取り出し、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 (BX50, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。FDA は生細胞内の esterase により加水分解され蛍光性の fluorescein となるため、生細胞のみが緑色蛍光を発する (Fig. 1-2)。撮影した顕微鏡写真から視野 (40  $\mu\text{m}^2$ ) を無作為に選択し、青色励起光により緑色蛍光を発した生細胞および全藍藻細胞数を数えた。生存率は、栄養細胞、異型細胞および連鎖体からなる糸状体 (trichome) と、休眠細胞 (akinete) それぞれにおいて算出した。糸状体の生細胞数 (a)、全糸状体細胞数 (b)、休眠細胞の生細胞数 (c)、および全休眠細胞数 (d) を、各実験において計 250 細胞以上カウントした。糸状体の生存率 (%) は  $(a) / (b) \times 100$ 、休眠細胞の生存率 (%) は  $(c) / (d) \times 100$ 、全細胞の生存率は  $\{ (a) + (c) \} / \{ (b) + (d) \} \times 100$  から算出した。休眠細胞含有率は  $(d) / \{ (b) + (d) \} \times 100$  から算出した。全細胞の生存率と休眠細胞含有率の関係は、ピアソンの相関係数を用いて調べた。

#### 1-2-6 細胞外多糖 (EPS) の除去処理と確認

EPS の除去処理は、Tamaru ら (2005) の方法を参考とした。一連の操作を Fig. 1-3 に示す。*Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体を小チューブ (Violamo Micro Tube, AsOne, Osaka, Japan) に備え、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) で一晩、遮光下で加水した。25 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) で二度洗浄した後、 $2,000 \times g$ 、10 min、 $20^{\circ}\text{C}$  の遠心により細胞を集めた。EPS 除去は、アストラブルー (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) 染色後の顕微鏡観察により確認した (Tamaru *et al.*, 2005; 細沼ら, 2009)。アストラブルーは、EPS の構成物質として知られる酸性ムコ多糖の硫酸基とカルボキシル基に結合して青色を呈色する (Hill *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 2003; Tamaru *et al.*, 2005; 細沼ら, 2009; Kosugi *et al.*, 2012)。

#### 1-2-7 EPS 除去処理後の藍藻の乾熱曝露

EPS 除去処理後の藍藻を、遠心エバポレーター (MV-100, Tomy, Tokyo, Japan) を用いて遮光下で乾燥した (加熱せず、減圧のみ)。乾燥藍藻 (約  $30 \mu\text{g}$ ) を小チューブ (Violamo Micro Tube, AsOne, Osaka, Japan) に備えた。 $100^{\circ}\text{C}$  に温度を調節した乾燥機 (WFO-450, Eyela, Tokyo, Japan) で、0~12 時間の乾熱曝露を行った。EPS を除去していない乾燥藍藻は、同様に乾熱曝露を行い、対照とした。

### 1-3 結果

$100^{\circ}\text{C}$  10 時間の乾熱耐性が証明されている *Nostoc* sp. HK-01 において、細胞形

態と乾熱耐性の関係および、熱に耐える準備をしている時期を明らかにするために、継時的に細胞形態を観察することで、生活環の詳細をはじめに検証した。*Nostoc* sp. HK-01 の各細胞形態を継時的に観察した顕微鏡写真を Fig. 1-4 に示す。培養開始後 0 日（初期値）は、休眠細胞のみが観察された。培養開始後 1~2 日で休眠細胞から発芽して栄養細胞となり、培養開始後 2~4 日で栄養細胞が伸長する様子が確認された（Fig. 1-3, 0~4 day）。培養開始後 6~7 日で運動性の連鎖体への分化が、8 日で異型細胞（arrows）への分化が、培養開始後 14 日で休眠細胞に分化する様子がそれぞれ観察された（Fig. 1-3, 6~8 day）。緑色の顆粒を含む若い休眠細胞（矢尻）は、14~19 日で徐々に増加し、培養開始後 20~23 日で成熟して培養開始時の休眠細胞と同様、緑色の顆粒の存在しない黄褐色の細胞形態に分化した後、その一部は培養開始後 23~34 日に再び発芽する様子が観察された（Fig. 1-3, 14~24 day）。Fig. 1-5 に培養過程の *Nostoc* sp. HK-01 の細胞数の変化を示す。培養初期の細胞数は  $2.1 \times 10^6$  cells だった。7 日間培養後は  $1.2 \times 10^8$  cells に増加した。8 日以降は栄養細胞の連鎖体や異型細胞への分化により糸状体中の細胞数の測定が困難だった。各細胞形態の割合の継時変化を Fig. 1-6 および Table 1-2 に示す。休眠細胞の割合は、培養開始後 1~4 日で急激に減少した。一方、栄養細胞の割合は、培養開始後 1~4 日で著しく増加した。培養開始後 6 日で認められた連鎖体の割合は、培養開始後 10~11 日に 20% を超えたが、培養開始後 13~24 日はおよそ 1% だった。異型細胞は、8 日以降 3~9% 確認された。いくつかの休眠細胞が再び培養開始後 14 日以降に確認された。

全ての細胞形態に熱耐性が具備されるのか、特別な細胞形態があるのか明らか

かにするために、生活環における細胞形態ごとの乾熱耐性を検証した。湿潤藻体、自然乾燥藻体および乾熱後藻体の FDA 染色後の顕微鏡写真を Fig. 1-4 に示す。ここでは栄養細胞、異型細胞および連鎖体を合わせて糸状体 (trichome) と表現する。各状態の藻体において、細胞形態が混在する様子が確認された。湿潤藻体において、糸状体 (trichome) の生存が確認された (Fig. 1-7, A-a-1, A-b-1, A-a-2 and A-b-2, arrows)。糸状体 (長径 2~6  $\mu\text{m}$ ) よりも大きい細胞形態である休眠細胞 (akinetete, 長径 4~8  $\mu\text{m}$ ) の生存も同様に確認された (Fig. 1-7, A-a-3 and A-b-3, arrowheads)。湿潤藻体においてすべての細胞形態が生存していることが確かめられた。自然乾燥藻体において、多くの休眠細胞の生存と (Fig. 1-7-B, arrowheads)、ごくわずかな糸状体細胞の生存が確認された (Fig. 1-7, B-a-3 and B-b-3, arrows)。100°C、2 時間の乾熱後藻体において、糸状体細胞の生存は認められなかった (Fig. 1-7, C-a-1 and C-b-1, arrows)。一方、休眠細胞は生存していた (Fig. 1-7, C-a-2, C-b-2, C-a-3 and C-b-3, arrowheads)。FDA 染色後の顕微鏡観察により算出した、乾熱後の細胞形態ごとの生存率を Fig. 1-8 に示す。細胞群中のそれぞれの細胞形態の生存率は、初期値である湿潤状態を初期値 (糸状体:  $100.0 \pm 15.0\%$ ; 休眠細胞:  $100.0 \pm 28.1\%$ ) とした。糸状体の生存率は、自然乾燥により著しく低下し ( $3.4 \pm 3.4\%$ )、100°C 2 時間の乾熱後には検出限界以下を示した ( $0.0 \pm 0.0\%$ )。一方、休眠細胞の自然乾燥後および 100°C 2 時間の乾熱後の生存率は、それぞれ  $80.0 \pm 24.0\%$  および  $81.1 \pm 15.5\%$  を示し、初期値と比べて有意な差は認められなかった。藻体中の休眠細胞の含有率と、藻体の生存率の相関を調べた結果を Fig. 1-9 に示す。湿潤藻体において、藻体中の休眠細胞の含有率と生存率

の間に相関は認められず、休眠細胞の有無に関わらず全ての細胞形態が生存していることが示された (Fig. 1-9A;  $r = -0.2$ )。一方、自然乾燥藻体および熱曝露後藻体において、藻体中の休眠細胞の含有率と生存率の間に確かな相関が認められたことから、休眠細胞を多く含む細胞群ほど生存率が高いことが明らかになった (Fig. 1-9B and C;  $r = 0.73$ ,  $p < 0.001$  in both)。

湿潤状態の藻体を徐々に乾燥させた際の重量の変化を Fig. 1-10 に示す。蓋を開けた条件は、乾燥開始後 6 時間で重量の変化が無くなることを確認した (Fig. 1-10-1)。蓋を閉めた条件は、乾燥開始後 24 時間で重量の変化が無くなることを確認した (Fig. 1-10-2)。蓋を閉めてシャーレ内に 200  $\mu\text{L}$  の蒸留水を添加した条件は、乾燥開始後 37 時間で重量の変化が無くなることを確認した (Fig. 1-10-3)。蓋を閉めてシャーレ内に 500  $\mu\text{L}$  の蒸留水を添加した条件は、乾燥開始後 51 時間で重量の変化が無くなることを確認した (Fig. 1-10-4)。蓋を閉めてシャーレ内に 900  $\mu\text{L}$  の蒸留水を添加した条件は、乾燥開始後 71 時間で重量の変化が無くなることを確認した (Fig. 1-10-5)。乾燥過程に熱に耐える準備が行われているかどうか、すなわち細胞形態が変化するかどうか検証するため、それぞれの乾燥藻体から細胞群を採取し、休眠細胞含有率を測定した結果を Fig. 1-11 に示す。乾燥開始時の休眠細胞含有率は 0~7.4 % を示した (Fig. 1-11A)。6 時間で乾燥した藻体中の休眠細胞含有率は 0.3~3.9%、24 時間で乾燥した藻体中の休眠細胞含有率は 0.3~9.6%、37 時間で乾燥した藻体中の休眠細胞含有率は 1.4~18.8%、51 時間で乾燥した藻体中の休眠細胞含有率は 1.5~8.7%、71 時間で乾燥した藻体中の休眠細胞含有率は 1.3~15.5%を示した (Fig. 1-11B)。乾燥までの時間と休眠細

胞含有率の関係は、正の傾きの近似直線 ( $y = 0.054x + 2.7$ ) は示されたが、明らかな相関は認められなかった ( $n = 30, r^2 = 0.077$ )。

*Nostoc* sp. HK-01 の湿潤藻体を熱曝露した顕微鏡写真を Fig. 1-12 に示す。各状態の藻体において、細胞形態が混在する様子が確認された。熱未曝露の藻体において、休眠細胞および糸状体の生存が確認された。50°C、1 時間の熱曝露後の藻体において、多くの休眠細胞の生存が認められた一方、糸状体の生存は認められなかった。100°C、1 時間の熱曝露後の藻体において、休眠細胞および糸状体の生存は認められなかった。湿潤藻体を熱曝露した後の生存率の算出結果を Fig. 1-13 に示す。湿潤状態の休眠細胞は、50°C、1 時間の熱曝露後に  $116.6 \pm 3.8\%$  の生存が認められた一方、湿潤状態の栄養細胞は、50°C、1 時間の熱曝露後に生存が認められなかった。休眠細胞は、湿潤状態においても糸状体と比べて高い熱耐性を備えていることが示された。100°C、1 時間の熱曝露後の生存は、湿潤状態の休眠細胞および湿潤常態の糸状体において、共に認められなかった。

*Nostoc* sp. HK-01 の EPS が乾熱耐性に貢献しているかどうか明らかにするために、EPS 除去後再び藍藻藻体を乾燥し、100°C 各時間乾熱した後 FDA 染色により生存率を算出した。*Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体から EPS 除去処理が十分に行われたか確認するために、EPS 除去処理藍藻および未処理藍藻をアストラブルー染色し、顕微鏡観察を行った。EPS 除去未処理藍藻の細胞塊は、青色染色が確認された (Fig. 1-14A)。一方、EPS 除去処理藍藻の細胞塊は、青色染色が確認されなかった (Fig. 1-14B)。乾熱後の生存率の初期値は、対照となる EPS 未除去藍藻は  $100.0 \pm 15.9\%$  を示したのに対し、EPS 除去藍藻は  $119.7 \pm 10.9\%$  を



示した。4 時間乾熱後の生存率は、対照において  $60.7 \pm 3.6 \%$  を示したのに対し、EPS 除去藍藻は  $89.4 \pm 24.6 \%$  を示した、12 時間乾熱後の生存率は、対照において  $26.2 \pm 4.7 \%$  を示したのに対し、EPS 除去藍藻は  $37.0 \pm 27.5 \%$  を示した。EPS 未除去藍藻、EPS 除去藍藻ともに、乾熱に伴い生存率が低下する傾向が認められた (Fig. 1-15)。生存細胞は全て休眠細胞であることを顕微鏡観察から確認した (data not shown)。EPS 未除去藍藻と EPS 除去藍藻における生存率を比較すると、全ての乾熱時間において有意な差は認められなかった (Fig. 1-15;  $p > 0.05$ )。

#### 1-4 考察

*Nostoc* sp. HK-01 の生活環の詳細、細胞形態と乾熱耐性の関係、熱に耐える準備が行われている時期および細胞外多糖と乾熱耐性の関係を検証した。培養開始後 1~4 日において、休眠細胞の急激な減少に伴い、栄養細胞が著しく増加した結果は、休眠細胞が栄養細胞に分化することを示している (Fig. 1-6 and Table 1-2)。栄養細胞の増加の後、培養開始後 6 日以降に連鎖体が認められた結果は、栄養細胞が連鎖体に分化することを示している (Fig. 1-6 and Table 1-2)。異型細胞および休眠細胞が、栄養細胞の糸状体に点在して認められた結果は (Fig. 1-4)、栄養細胞が異型細胞および休眠細胞に分化することを示している。栄養細胞連鎖体の割合が顕著に増減する結果および、異型細胞の割合が 8 日以降 3-9% 確認された後に顕著な減少は認められなかった結果は (Fig. 1-6 and Table 1-2)、藍藻

の連鎖体への分化は可逆的で、藍藻の異型細胞への分化は不可逆的であることを示すこれまでの報告と一致している (Adams and Duggan 1999; Dworkin, 2006; Mateo *et al.*, 2011)。休眠細胞が発芽、伸長して栄養細胞になり、栄養細胞がさらに連鎖体、異型細胞および休眠細胞に分化する *Nostoc* sp. HK-01 の一連の生活環を明らかにした (Fig. 1-16)。乾燥および乾熱後の藻体中の細胞の生存率を細胞形態ごとに算出した結果、乾熱後に休眠細胞のみが生存していたことから (Fig. 1-8)、陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の生活環において、休眠細胞のみが乾熱に耐性を備える細胞形態であることが示された。藍藻の休眠細胞は、乾燥と低温に耐性を示すが、高温耐性は備えていないとされていた (Yamamoto, 1975; Sutherland *et al.* 1979; Adams and Duggan 1999; Garcia-Pichel, 2010; Kaplan-Levy *et al.*, 2010)。唯一、Hori ら (2003) は、水棲藍藻 *Anabaena cylindrica* ATCC29414 を用いた研究で、休眠細胞の 60°C、50 時間の乾熱後の発芽を報告しているが、藍藻の乾熱耐性と細胞形態の関係はこれまで検証していなかった。本章は、*Nostoc* sp. HK-01 の生活環を示した上で (Fig. 1-16)、陸棲藍藻の乾熱耐性は休眠細胞にのみ備わることをはじめて明らかにした (Fig. 1-7, 1-8 and 1-9)。

本章結果から、*Nostoc* sp. HK-01、*Nostoc flagelliforme*、*Nostoc punctiforme* をはじめとした休眠細胞に分化する陸棲藍藻は、その生活環のなかで休眠細胞に分化することで、66°Cの熱に曝される過酷な陸地環境で生存していることが考えられる。成熟した休眠細胞の代謝活性は、非常に低いか、検出限界以下であることが知られている (Adams and Duggan, 1999; Kaplan-Levy *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2016)。Leprince ら (1999) と Hoekstra ら (2001) は、代謝を抑制すること

が乾燥過程における活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) による酸化ダメージを避ける上で重要であると述べている。植物では、乾燥過程における ROS の蓄積は、主に CO<sub>2</sub> 固定量の減少により電子伝達系から電子が漏出して O<sub>2</sub> 分子に接触することで起こることが知られている (Leprince *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000; Hoekstra *et al.*, 2001)。ROS は、大規模な過酸化および膜脂質のエステル分解を引き起こす (Hoekstra *et al.*, 2001)。休眠細胞が代謝を抑制するメカニズムの詳細はまだ解明されていないが、本章において休眠細胞が優れた乾燥および熱耐性を示した結果からも、代謝活性の抑制は、*Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性に重要な役割を果たしていると考えられる (Fig. 1-7, 1-8 and 1-9)。藍藻の休眠細胞は、他の細胞形態と比べて厚い細胞壁を備え、glycogen および cyanophycin の顆粒を蓄積することが知られている (Adams and Duggan 1999; Garcia-Pichel, 2010; Kaplan-Levy *et al.*, 2010)。乾燥、低温および乾熱に対する休眠細胞の高い耐性機能の詳細はまだ明らかにされていないが、他の細胞形態との代謝、構造および蓄積物質の違いが、休眠細胞の耐性機能をもたらしていると推測できる。

80°C、1 時間の乾熱耐性が報告されている *Nostoc commune* は、休眠細胞への分化は報告されていない (Cameron 1962; Tamaru *et al.*, 2005)。Potts (1999) は、乾燥時の *Nostoc commune* 細胞の水分含有率が古草菌の芽胞より低く保たれており、細胞内に蓄積された trehalose や sucrose が適合溶質として水分子と置き換わることで脱水時のタンパク質、脂質膜および DNA を保護すると述べている。Hill ら (1997) は、細胞外多糖 (Extracellular polysaccharides; EPS) が膜小胞の相転移温度 (T<sub>m</sub>) を低く保つことで *Nostoc commune* 乾燥時の膜融合を防いでいる

と述べている。*Nostoc commune* は、休眠細胞への分化に依存しない乾燥・乾熱耐性機能を備えていると考えられる。しかし、*Nostoc commune* の乾燥藻体の再加水後の光合成能は、80°C1時間の乾熱後に  $67 \pm 14\%$  に低下した一方で (Tamaru *et al.*, 2005)、休眠細胞に分化する *Nostoc flagelliforme* の、乾燥藻体の再加水後の呼吸量は 85°C、24時間の乾熱に曝されても影響を受けず、光合成能は 45°C、24時間の乾熱に曝されても影響を受けないことが報告されている (Mei and Cheng, 1990; Gao, 1998)。休眠細胞に分化する *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体の再加水後の生存率は、熱未曝露の藻体を 100%としたとき、100°C 6時間の乾熱後に  $97.1 \pm 11.5\%$  を、100°C、10時間の乾熱後に  $36.4 \pm 9.9\%$  をそれぞれ示し、また光合成能は 100°C、10時間の乾熱後に正常に機能することが報告されている (五十嵐, 2013)。これらの報告から、*Nostoc flagelliforme* や *Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞に分化する陸棲藍藻は、*Nostoc commune* の休眠細胞に分化しない陸棲藍藻よりも高い温度に対する耐性を示す傾向にあることが認められる。本章において、乾燥後および乾熱後の *Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞含有率と藻体中の生存率に相関が認められた結果は (Fig. 1-9C)、休眠細胞への分化は、陸棲藍藻が陸地において曝される乾熱に耐えるための重要な要素であることを支持している。

乾燥過程に休眠細胞への分化が行われているかどうか調べるために、乾燥までの時間と休眠細胞含有率の関係を検証した結果、明らかな相関は認められなかった (Fig. 1-10 and 1-11)。藍藻が休眠細胞に分化する条件は、光の制限や低温、栄養塩の制限などが一部報告されているが、生物種によって異なり (Adams and Duggan, 1999; Kaplan-Levy *et al.*, 2010; Sukenik *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2016)、

*Nostoc* sp. HK-01 ではまだ報告されていないが、乾燥による休眠細胞への分化の促進は、本研究では見出されなかったことから (Fig. 1-10 and 1-11)、乾燥以外の環境によって休眠細胞への分化が促進されていると考えられる。

湿潤状態の藻体に 50°C および 100°C の熱を 1 時間曝露した後、生存率を算出した結果は、休眠細胞が、湿潤状態においても栄養細胞と比べて高い熱耐性を備えていることを示した (Fig. 1-12 and Fig. 1-13)。休眠細胞は栄養細胞から分化するが (Fig. 1-16)、その分化の過程で熱に耐えるための準備が行われていることが示唆された。一方、乾燥状態の休眠細胞は、100°C、10 時間の熱曝露後に生存するが (五十嵐, 2013)、湿潤状態の休眠細胞は、100°C、1h の熱曝露後に生存が認められなかった (Fig. 1-13)。休眠細胞は代謝活性が極めて低いことが知られており (Adams and Duggan, 1999; Kaplan-Levy *et al.*, 2010)、乾燥の過程で熱に耐えるための活発な代謝が行われている可能性は低いと考えられる。厚さ 1 m、面積 1 m<sup>2</sup> の物体の両端に 1°C の温度差があるとき、その物体 1 m<sup>2</sup> を通して 1 秒間に流れる熱量を示す熱伝導率  $\lambda$  は、液体の水 (0°C) において 0.556 W/m $\cdot$ °C、空気 (0°C) において 0.024 W/m $\cdot$ °C である (Ingersoll *et al.*, 1954; 萩・村上, 1975; 大塚, 1999; Holman, 2009)。湿潤状態は液体状態の水に囲まれていることから、空気に囲まれている乾燥藻体と比較して細胞に熱が伝わり易いと考えられる。バチルス属細菌の *Bacillus subtilis* および *Bacillus anthracis*、クロストリジウム属細菌の *Clostridium botulinum*, *Clostridium welchii* および *Clostridium tetani* において、湿熱は乾熱よりも高い致死効果を示すことが報告されている (Fox and Eder, 1969; Sykes, 1969; 蜂須賀, 1980; Setlow, 2006)。*B. subtilis* 胞子の生存率が 10% に

低下する曝露時間（D 値; decimal reduction time）は、湿熱 100℃において 32 min である一方、乾熱 100℃において 24,900 min あることが報告されている（Fox and Eder, 1969; Nicholson *et al.*, 2000）。*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞は乾燥状態で 100℃、10 時間の熱後に約 4 割の細胞が蘇生するが（五十嵐, 2013）、湿潤状態で 100℃、1 時間の熱で死滅した結果は、バチルス属やクロストリジウム属と同様に、湿熱は乾熱よりも致死効果が高いことを示している。*Nostoc* sp. HK-01 が 100℃、10 時間の乾熱に耐えるためには、休眠細胞への分化時に乾熱に耐えるための準備をした後、乾燥状態に置かれることが重要であると考えられる。

EPS 未除去藍藻と EPS 除去藍藻における生存率は、全ての乾熱時間において有意差が認められない結果が得られたことから（Fig. 1-15）、*Nostoc* sp. HK-01 の EPS の休眠細胞の乾熱耐性への貢献が低いことが示された。EPS は、*Nostoc commune*、*Nostoc* sp. CCMEE、*Anabaena* sp. PCC 7120 および *Nostoc* sp. HK-01 を用いた研究において、UV、塩ストレスおよび自然乾燥に対する耐性へ寄与することが報告されている（本章序論; Bertocchi *et al.*, 1990; Ehling-Schuls *et al.*, 1997; De Philippis and Vincenzini, 1998; Tamaru *et al.*, 2005; Knowles and Castenholz, 2008; Mager *et al.*, 2011; Yoshimura *et al.*, 2012）。一方、本章における EPS の乾熱耐性への寄与が低い結果は、UV、乾燥および塩に対する耐性と異なり、EPS は細胞への熱の伝達を防ぐことはできないことを示唆する（Fig. 1-17）。EPS が本株の休眠細胞の乾熱耐性のしくみへの貢献が極めて低いことおよび、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の乾熱耐性のしくみには細胞外物質（群）ではなく細胞内物質（群）が貢献している可能性が強く示された。EPS 除去処理藍藻の細胞塊は、アスト

ラブルーの青色染色が確認されなかった結果から (Fig. 1-14B)、近縁種の *Nostoc commune* における EPS 除去方法 (Tamaru *et al.*, 2005) を改変して用いることで、*Nostoc* sp. HK-01 の細胞塊から EPS を除去できることが示された (Fig. 1-3 and 1-14)。*Nostoc commune* の多糖構造の繰り返し構造は予測されているのに対し (Kajiyama and Kobayashi, 2003)、*Nostoc* sp. HK-01 の EPS は、単糖構成は報告されているが、多糖構造は明らかにされていない (Table 1-4, Yoshimura *et al.*, 2012)。アストラブルーによって本株の EPS が染色された結果は (Fig. 1-14)、*Nostoc* sp. HK-01 の EPS は酸性ムコ多糖を含む構造であることを示唆した。五十嵐 (2013) は、100°C、10 時間の乾熱が *Nostoc* sp. HK-01 の生存限界であり、100°C、11 時間以上の乾熱は生存が認められないと報告している。しかし本章で EPS 除去および未除去藍藻ともに 100°C、12 時間の乾熱後に生存が認められた結果は (Fig. 1-15)、*Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性の生存限界は再検証の必要があることおよび、スクリーニングによりさらに高乾熱耐性を備えた株を単離できる可能性があることを示した。

本章は、*Nostoc* sp. HK-01 の詳細な生活環を明らかにした後、乾熱耐性は休眠細胞のみに備わることをはじめて示した。乾燥による休眠細胞への分化促進は認められなかった。休眠細胞は湿潤状態においても他の細胞形態よりも優れた熱耐性を備えていた。*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の乾熱耐性が EPS を除去しても損なわれないことを明らかにし、細胞内に熱耐性に関わる機能分子が具備されている可能性を示した。これらの結果は、休眠細胞への分化が、休眠細胞に分化する陸棲藍藻が日照りに曝される陸地環境で生存するための極めて重要な

準備期間であることをはじめて明らかにした。

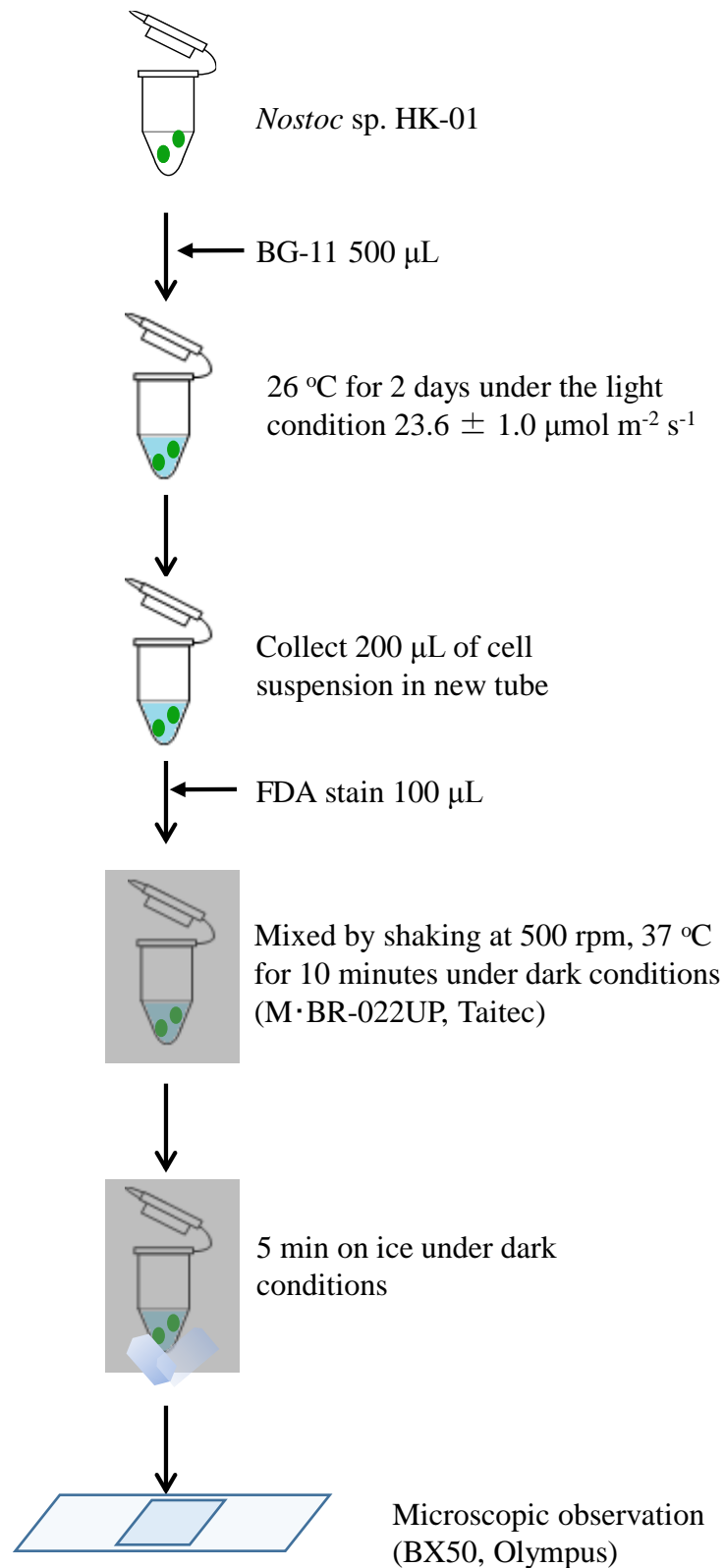


**Table 1-1.** Composition of standard mineral medium, BG-11  
(modification from Rippka *et al.*, 1979).

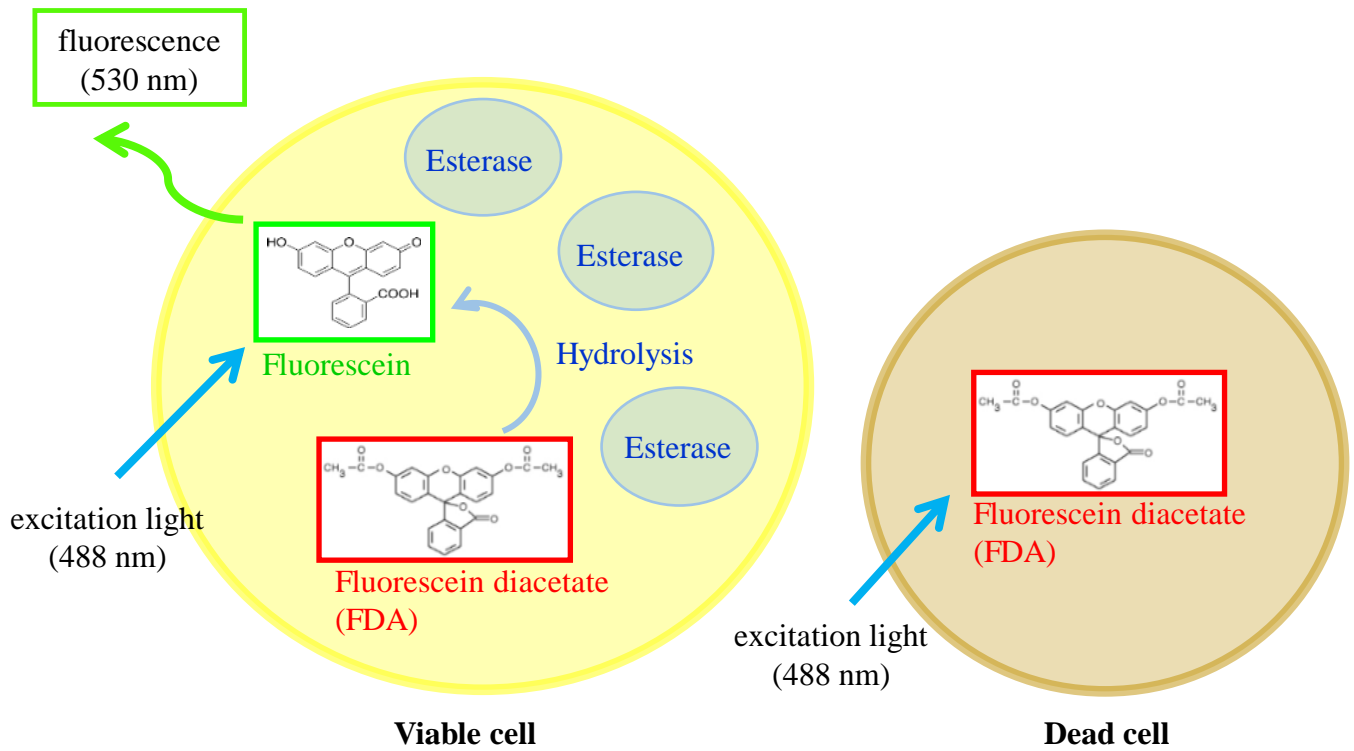
Ingredient	Amount (g/L) in medium
	BG-11
NaNO <sub>3</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.04
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA (disodium magnesium salt)	0.001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
Trace metal mix A5+Co*	1 mL/L
Deionized water	1,000 mL

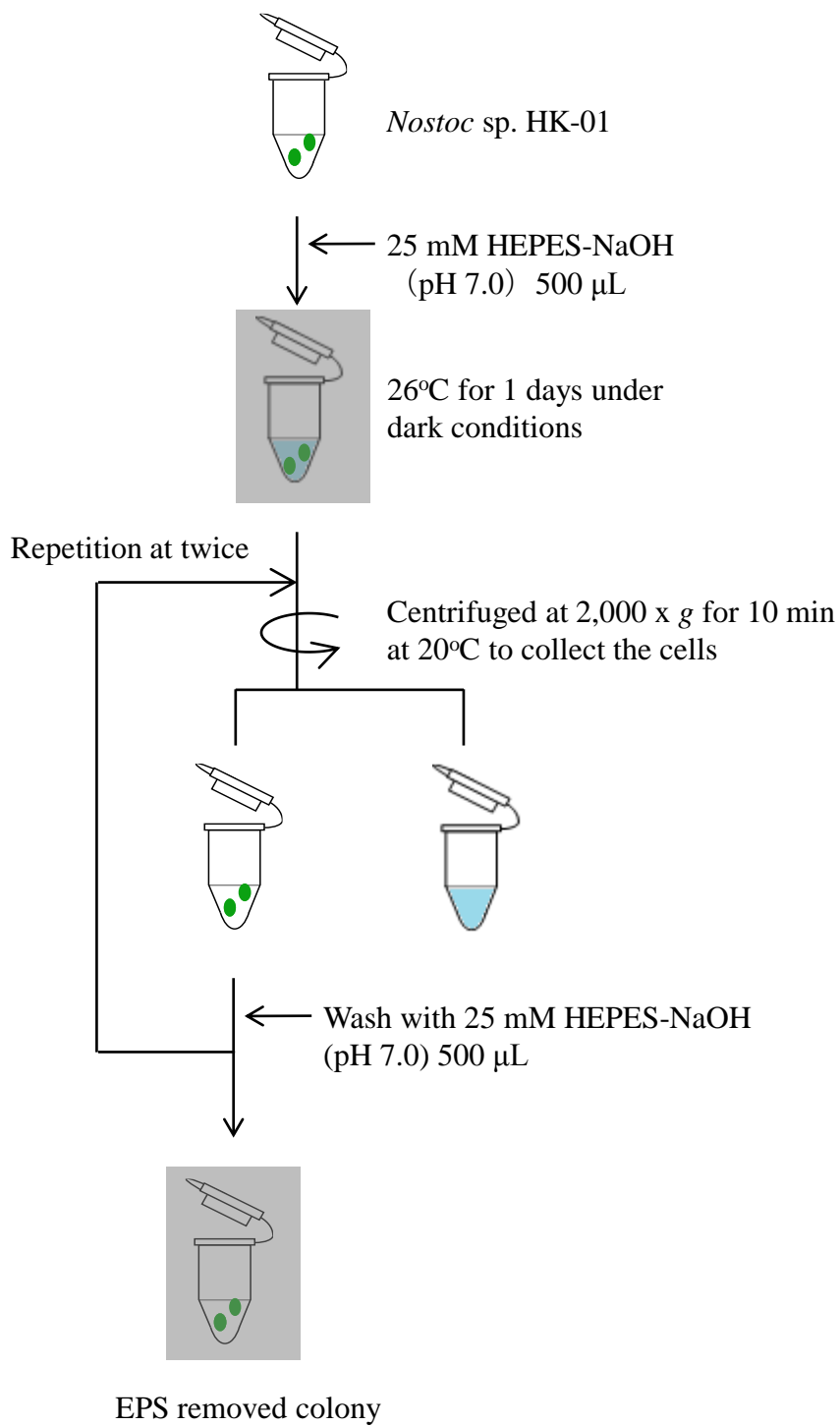
*A5+Co	
Ingredient	Amount (g/L distilled water)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.39
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.049



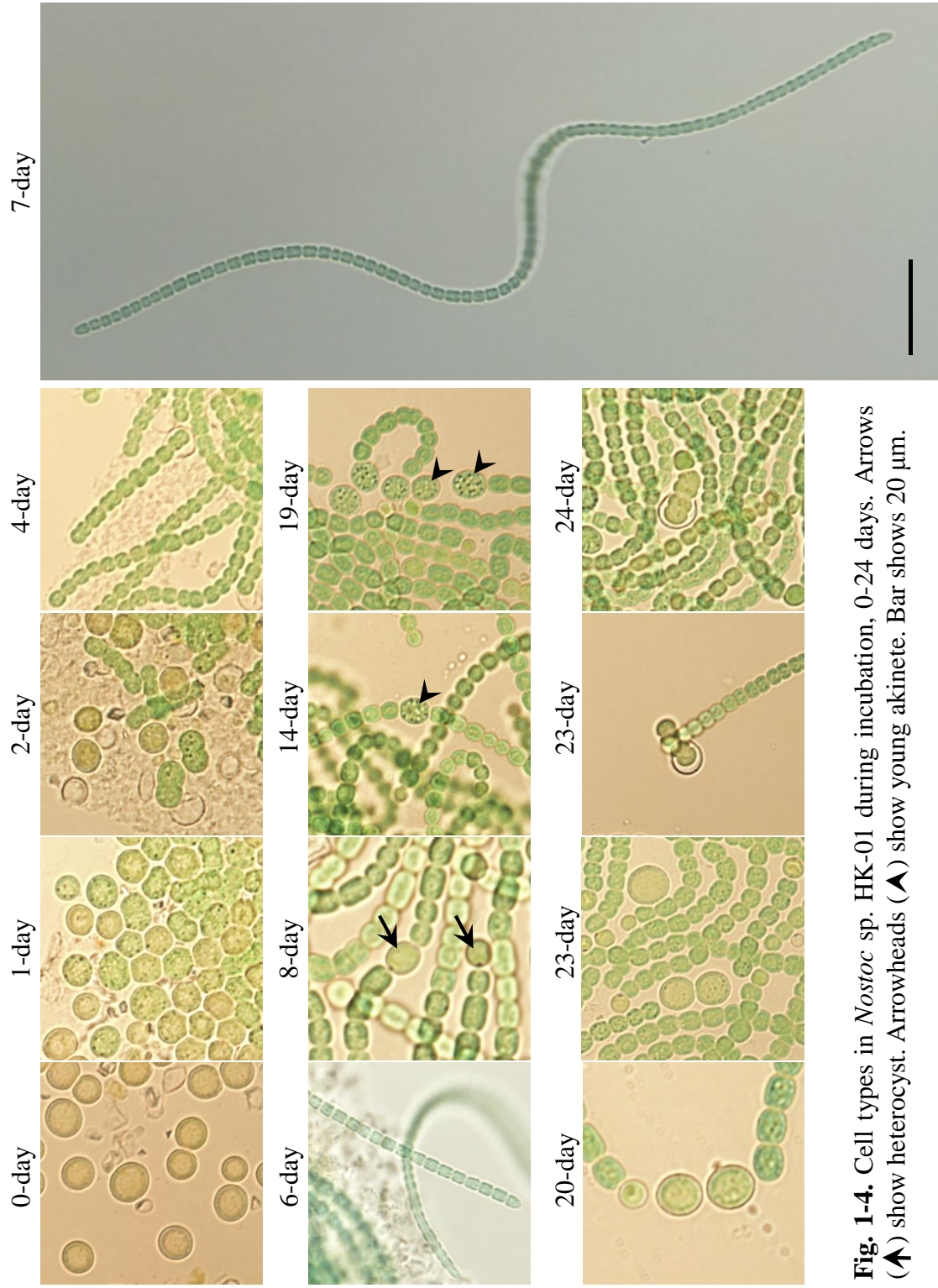
**Fig. 1-1.** FDA (fluorescein diacetate) staining method.



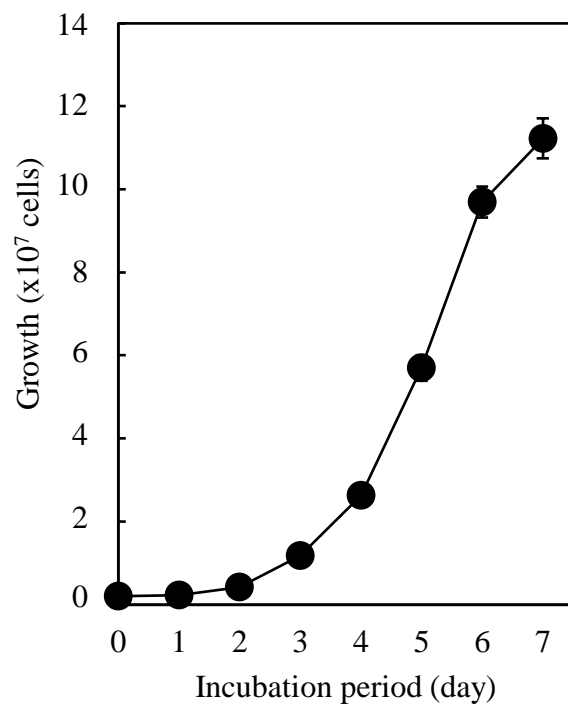
**Fig. 1-2.** Principle of the FDA (fluorescein diacetate) staining method.



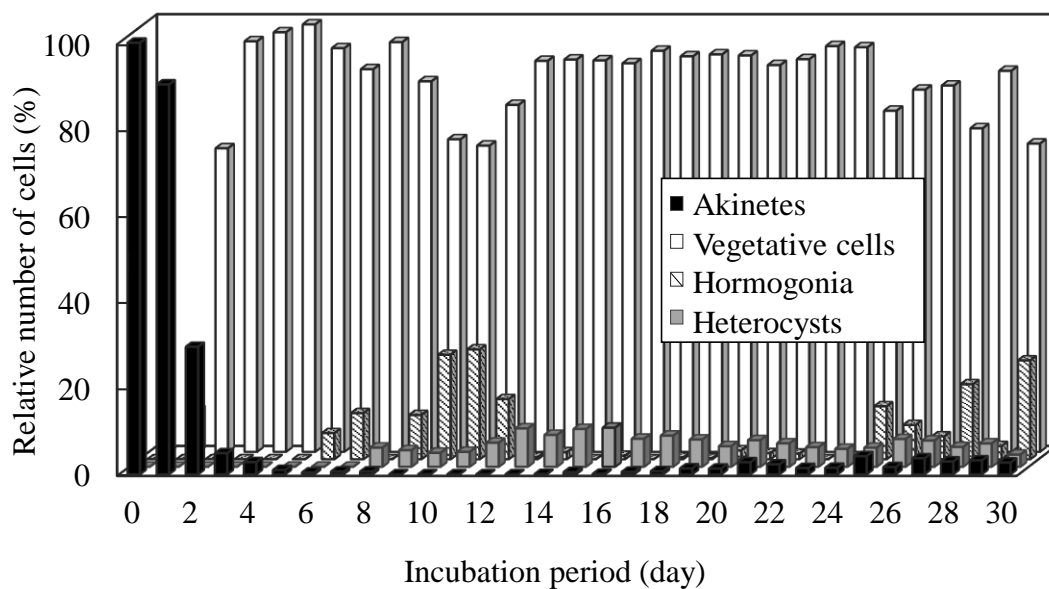
**Fig. 1-3.** Preparation of colonies without EPS (extracellular polysaccharides).



**Fig. 1-4.** Cell types in *Nostoc* sp. HK-01 during incubation, 0-24 days. Arrows (↗) show heterocyst. Arrowheads (↖) show young akinete. Bar shows 20 µm.



**Fig. 1-5.** Growth of *Nostoc* sp. HK-01 during an incubation period of 7 days.

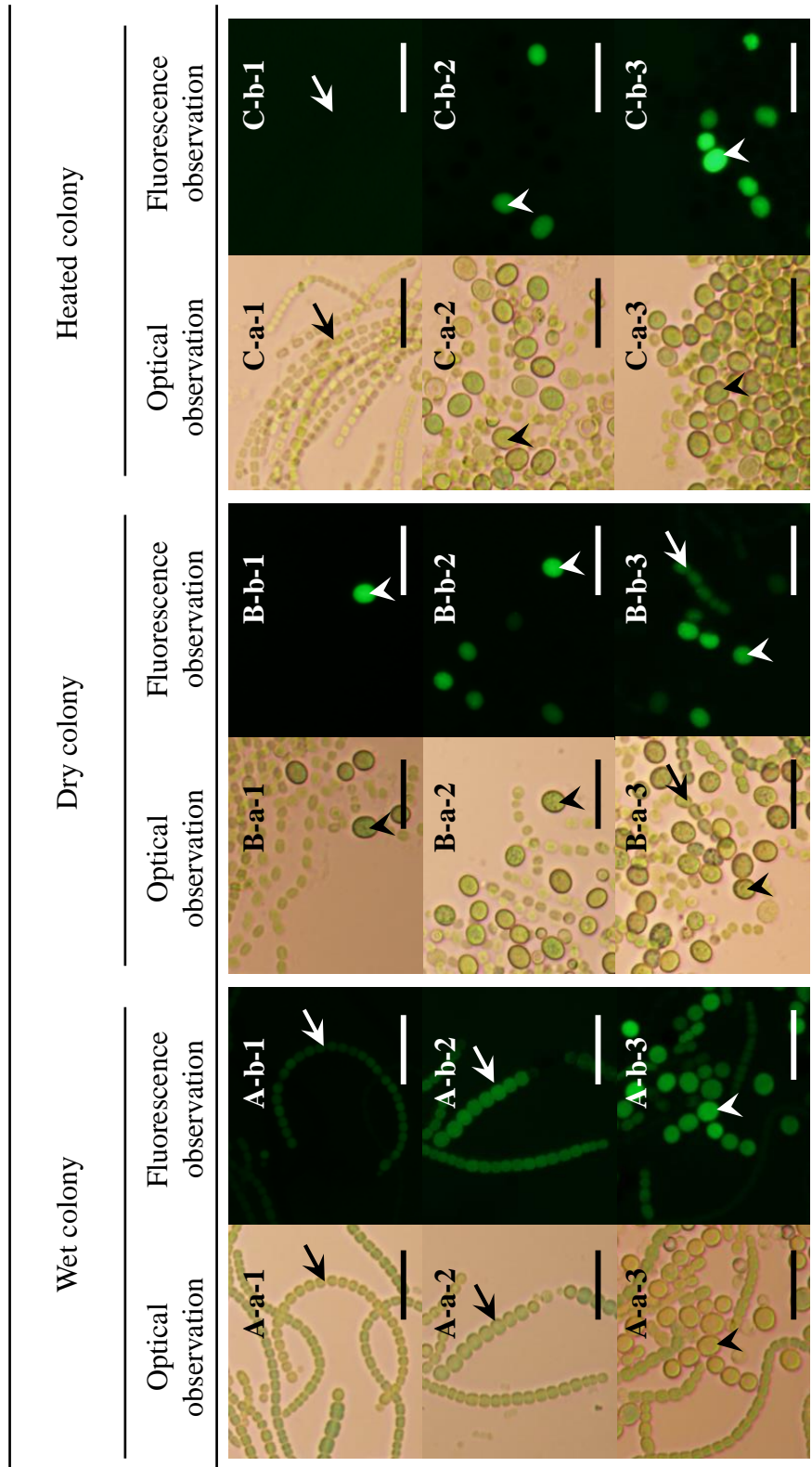


**Fig. 1-6.** Relative number of each cell types during incubation period of 30 days. ■ : Akinetes. □: Vegetative cells. ■: Hormogonia. ▨: Heterocysts. The values are shown in Table 1.

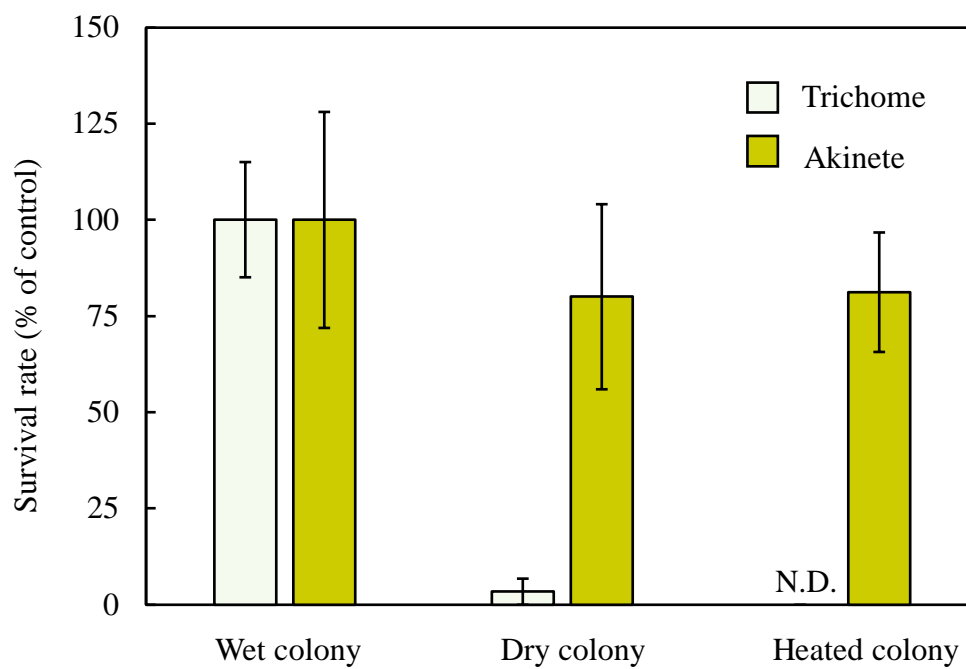
**Table 1-2.** Relative numbers of each cell type of *Nostoc* sp. HK-01 the during incubation period. Each value means average  $\pm$  standard error (n = 6). The graph is shown in Fig. 2.

Incubation period (Day)	Cell types			
	Akinetes	Vegetative cells	Hormogonia	Heterocysts
0	100.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
1	90.4 $\pm$ 2.5	9.6 $\pm$ 2.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
2	29.6 $\pm$ 4.4	70.4 $\pm$ 4.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
3	4.9 $\pm$ 1.9	95.1 $\pm$ 1.9	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
4	2.8 $\pm$ 1.8	97.2 $\pm$ 1.8	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
5	1.0 $\pm$ 0.4	99.0 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
6	0.4 $\pm$ 0.2	93.1 $\pm$ 3.9	6.1 $\pm$ 3.8	0.0 $\pm$ 0.0
7	0.6 $\pm$ 0.4	88.9 $\pm$ 6.3	10.7 $\pm$ 6.3	0.0 $\pm$ 0.0
8	0.6 $\pm$ 0.3	94.9 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	4.5 $\pm$ 0.5
9	0.0 $\pm$ 0.0	85.9 $\pm$ 3.6	10.3 $\pm$ 3.8	3.9 $\pm$ 0.6
10	0.0 $\pm$ 0.0	72.4 $\pm$ 7.7	24.3 $\pm$ 8.3	3.3 $\pm$ 0.9
11	0.0 $\pm$ 0.0	71.0 $\pm$ 3.1	25.5 $\pm$ 3.5	3.5 $\pm$ 0.9
12	0.0 $\pm$ 0.0	80.4 $\pm$ 2.4	14.0 $\pm$ 3.2	5.6 $\pm$ 1.4
13	0.0 $\pm$ 0.0	90.6 $\pm$ 1.4	0.5 $\pm$ 0.5	8.9 $\pm$ 1.4
14	0.1 $\pm$ 0.1	90.9 $\pm$ 1.4	1.6 $\pm$ 1.6	7.4 $\pm$ 0.5
15	0.5 $\pm$ 0.2	90.7 $\pm$ 1.1	0.0 $\pm$ 0.0	8.8 $\pm$ 1.0
16	0.1 $\pm$ 0.1	90.0 $\pm$ 1.0	0.8 $\pm$ 0.8	9.1 $\pm$ 0.7
17	0.6 $\pm$ 0.2	92.9 $\pm$ 0.8	0.0 $\pm$ 0.0	6.5 $\pm$ 0.9
18	0.7 $\pm$ 0.3	91.6 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.4
19	1.4 $\pm$ 0.4	92.1 $\pm$ 0.9	0.2 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.6
20	1.3 $\pm$ 0.5	91.8 $\pm$ 2.0	2.1 $\pm$ 1.3	4.8 $\pm$ 0.4
21	2.8 $\pm$ 1.0	89.6 $\pm$ 1.3	1.4 $\pm$ 1.4	6.2 $\pm$ 0.3
22	2.3 $\pm$ 0.9	91.0 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 1.3	5.4 $\pm$ 0.5
23	1.5 $\pm$ 0.3	94.0 $\pm$ 0.8	0.0 $\pm$ 0.0	4.6 $\pm$ 0.6
24	1.5 $\pm$ 1.1	93.7 $\pm$ 1.7	0.6 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.6
25	4.2 $\pm$ 1.2	79.1 $\pm$ 5.0	12.3 $\pm$ 5.7	4.4 $\pm$ 0.5
26	2.8 $\pm$ 0.5	83.9 $\pm$ 6.3	1.4 $\pm$ 6.5	6.4 $\pm$ 1.0
27	2.3 $\pm$ 0.9	84.9 $\pm$ 2.0	5.3 $\pm$ 1.8	6.1 $\pm$ 0.7
28	1.5 $\pm$ 0.7	75.0 $\pm$ 4.9	17.4 $\pm$ 5.6	4.6 $\pm$ 0.5
29	1.5 $\pm$ 0.6	88.3 $\pm$ 1.7	3.1 $\pm$ 1.4	5.4 $\pm$ 0.5
30	4.2 $\pm$ 0.8	71.4 $\pm$ 14.8	23.0 $\pm$ 15.8	2.8 $\pm$ 0.8

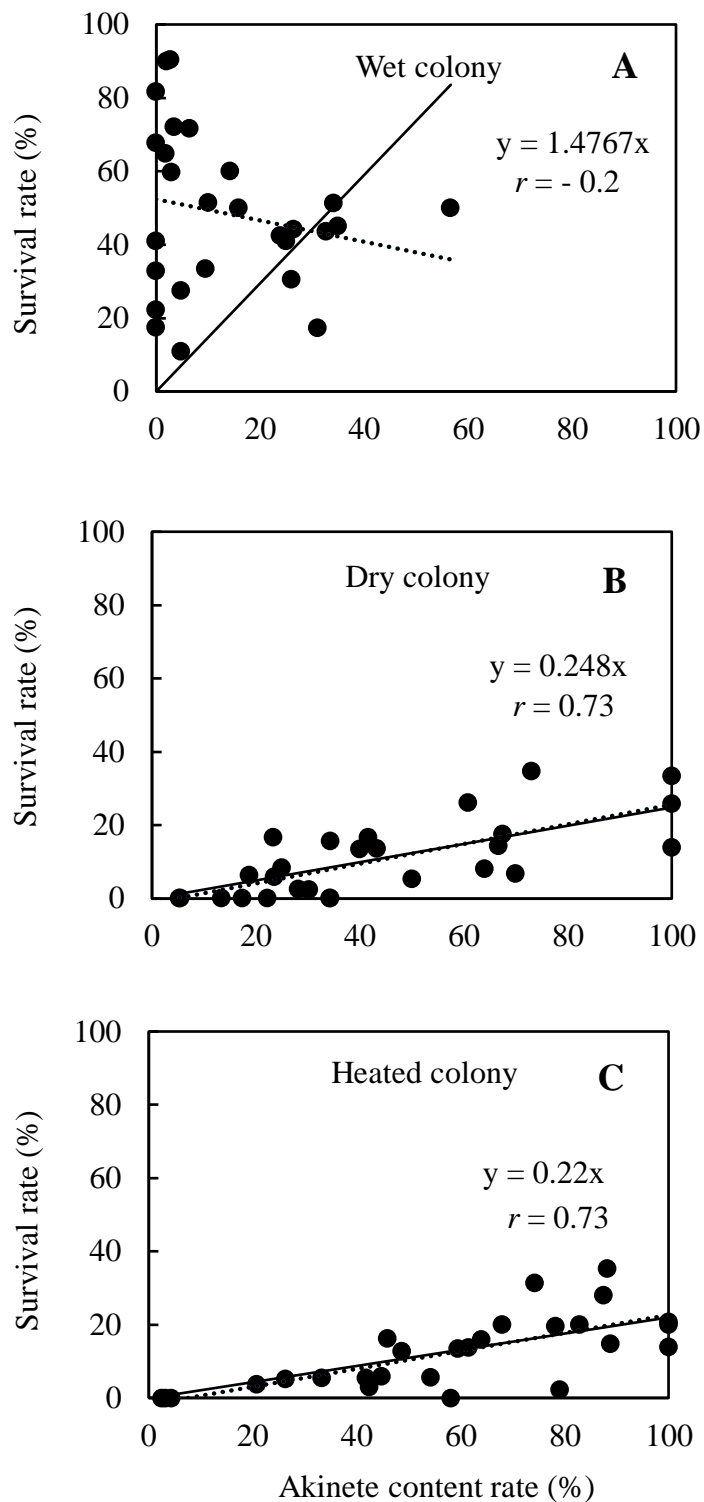




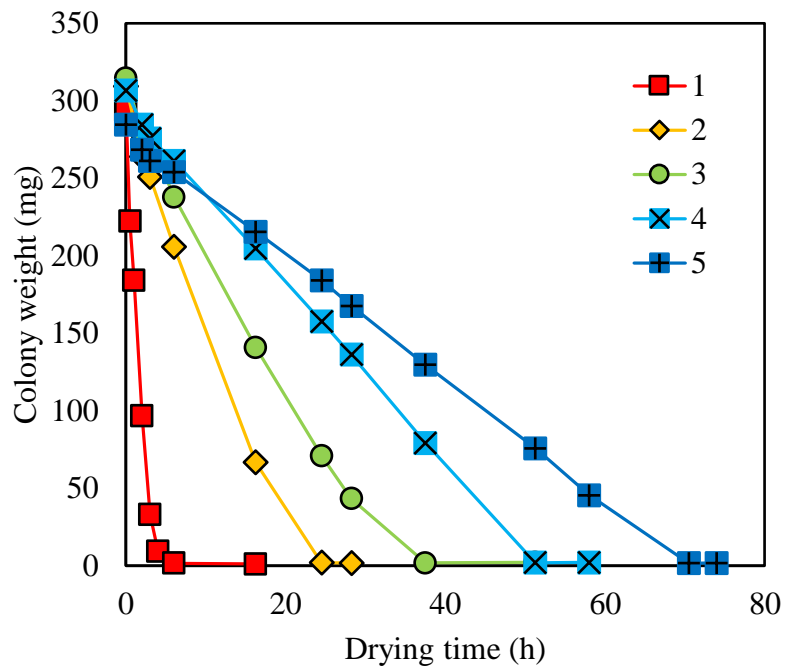
**Fig. 1-7.** Microscopic observation of *Nostoc* sp. HK-01 with FDA (fluorescein diacetate) staining method. A: wet colony, B: dry colony, C: heated (100°C, 2 h) colony. a: Optical observation, b: The same viewing field of fluorescence observation. 1, 2 and 3 means different viewing fields. Arrows (↖) show trichome. Arrowheads (↗) show akinete. Bars show 10 μm.



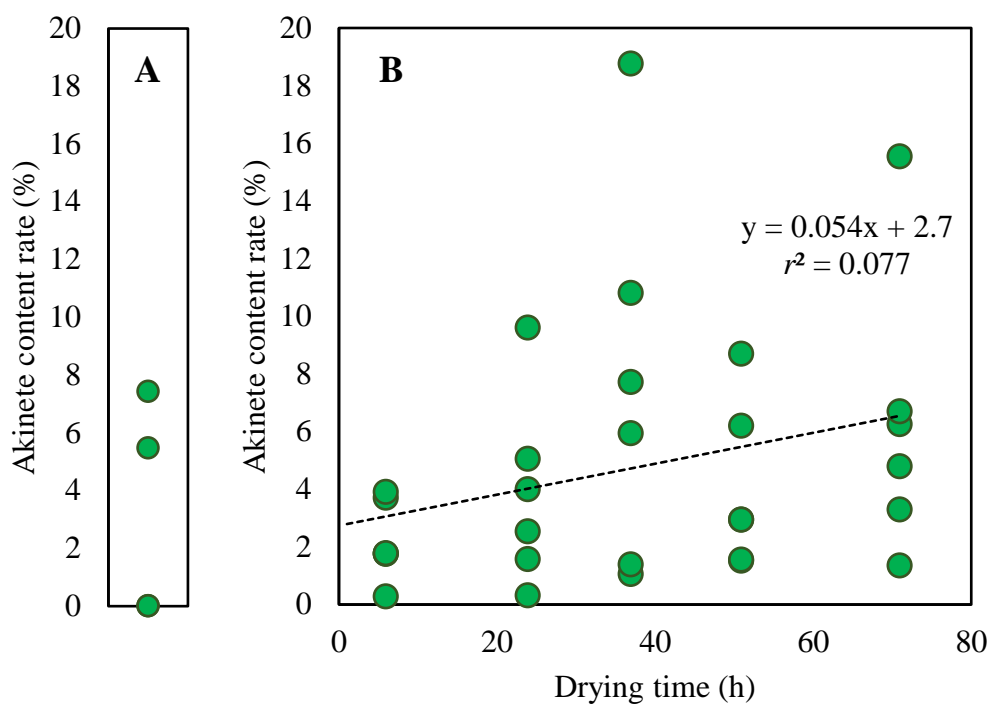
**Fig. 1-8.** Survival rates of *Nostoc* sp. HK-01 in wet, dry and heated (100°C, 2h) colonies. Trichome includes vegetative cells, heterocysts and hormogonia. Bars show average  $\pm$  SE (n = 3). N.D. = Not detected.



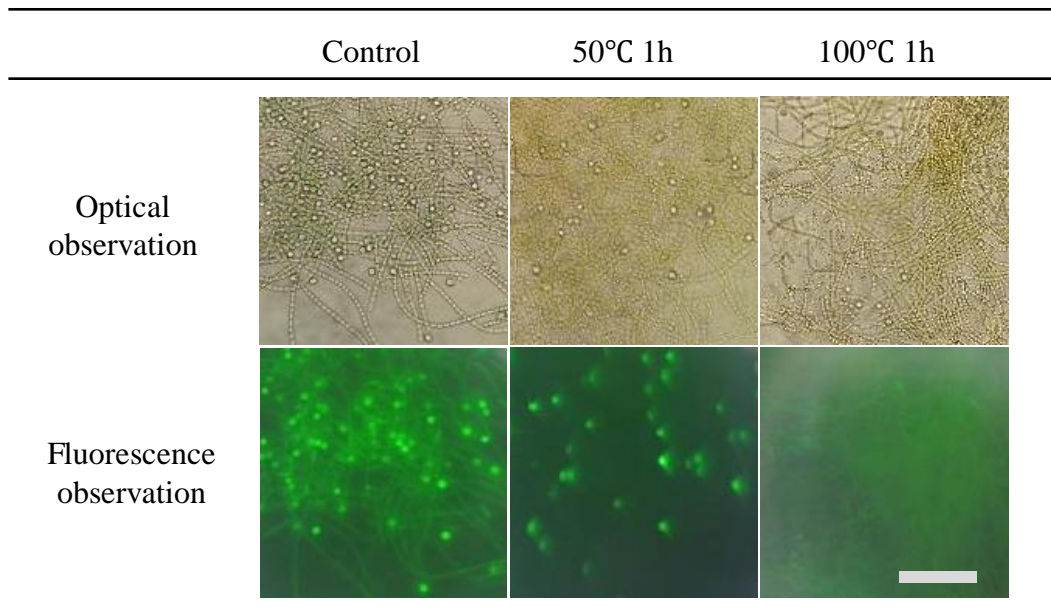
**Fig. 1-9.** Correlation between akinete content rate and survival rate in *Nostoc* sp. HK-01 (n = 27). A: wet colony B: dry colony C: heated (100 °C, 2 h) colony.



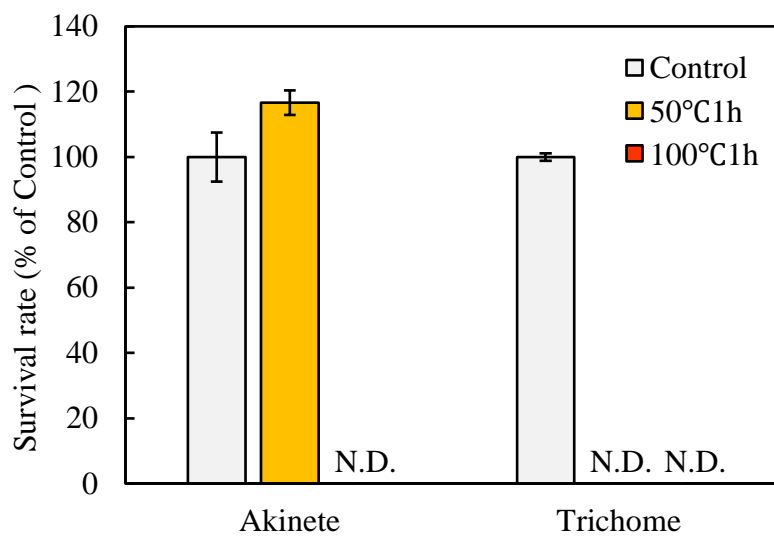
**Fig. 1-10.** Colony weights of *Nostoc* sp. HK-01 during drying process in plates. 1: Plate cover opened. 2: Plate cover closed. 3: Cover closed, 200 $\mu$ L of water added to inside of plate. 4: Cover closed, 500 $\mu$ L of water added to inside of plate. 5: Cover closed, 900 $\mu$ L of water added to inside of plate.



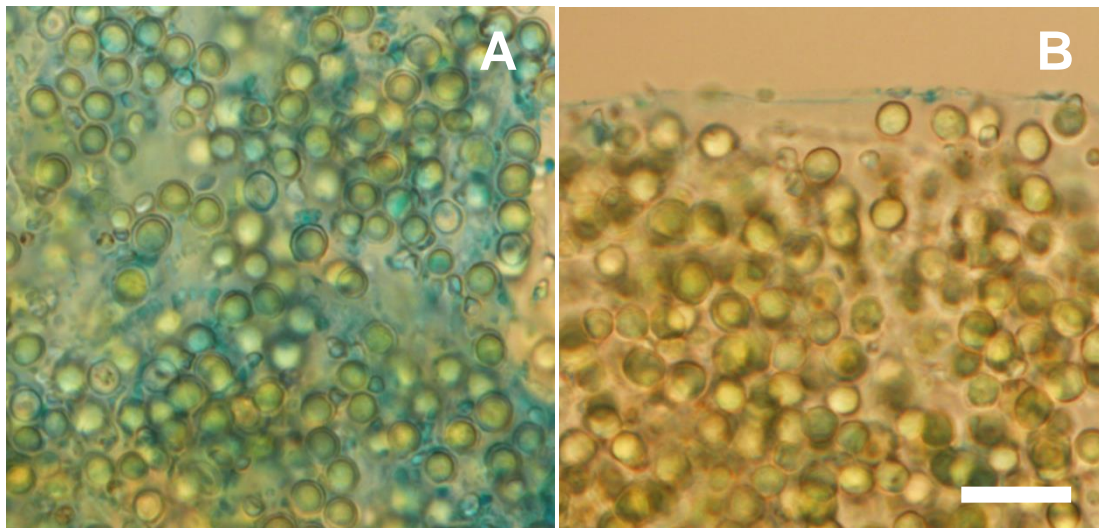
**Fig. 1-11.** A: Akinete content rates at initial stage of drying process (n = 3). B: Correlation between akinete content rates of *Nostoc* sp. HK-01 and time to dry of their colonies (n = 30).



**Fig. 1-12.** Microscopic observation of *Nostoc* sp. HK-01 with FDA (fluorescein diacetate) staining method after exposure to wet heat (50°C 1h or 100°C 1h). Bar shows 50  $\mu$ m.

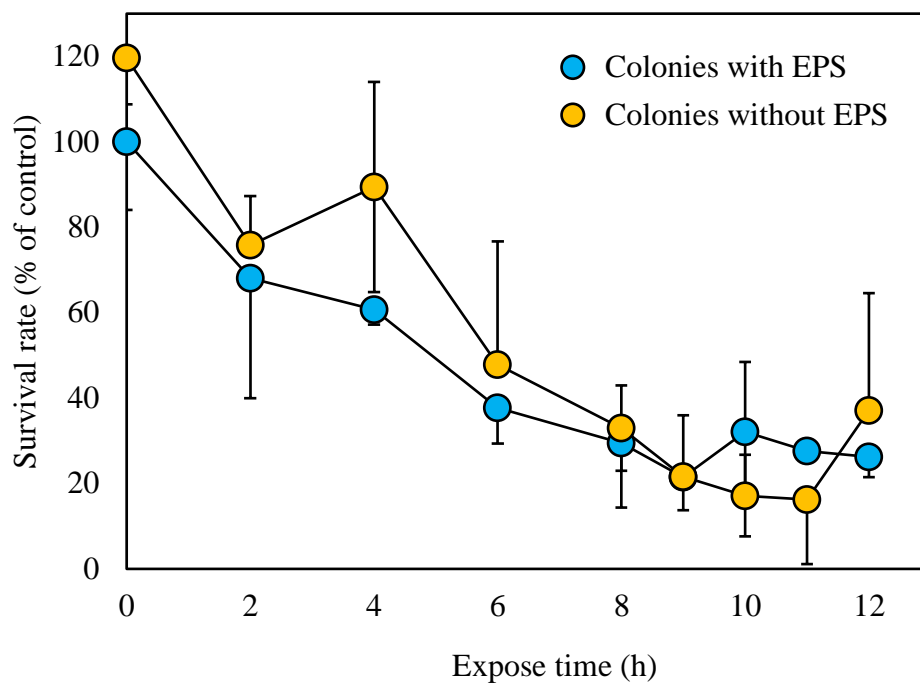


**Fig. 1-13.** Survival rate of *Nostoc* sp. HK-01 calculated with FDA (fluorescein diacetate) staining method after exposure to wet heat, 50°C for 1 hour or 100°C for 1 hour (n = 3). N.D. mean Not detected.

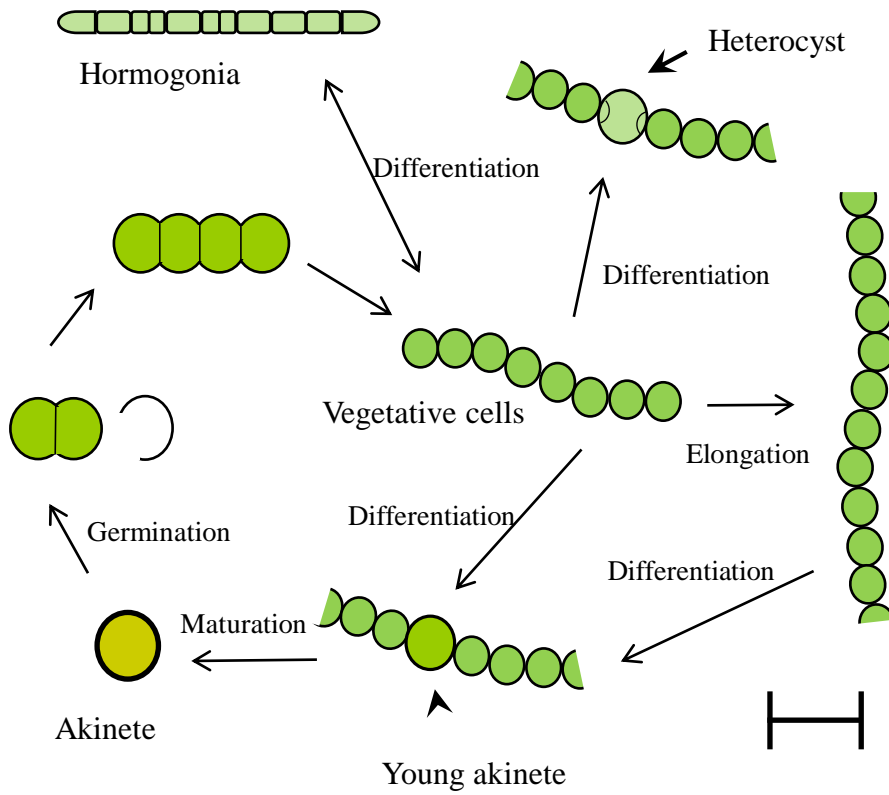


**Fig. 1-14.** Microscopic observation of *Nostoc* sp. HK-01 after the astra-blue staining. A: colonies with EPS, B: colonies without EPS. Bar shows 20  $\mu$ m.





**Fig. 1-15.** Survival rates of colonies without EPS (extracellular polysaccharides) of *Nostoc* sp. HK-01 after the dry heat (100°C) exposure. Bars show average  $\pm$  SE (n = 3).

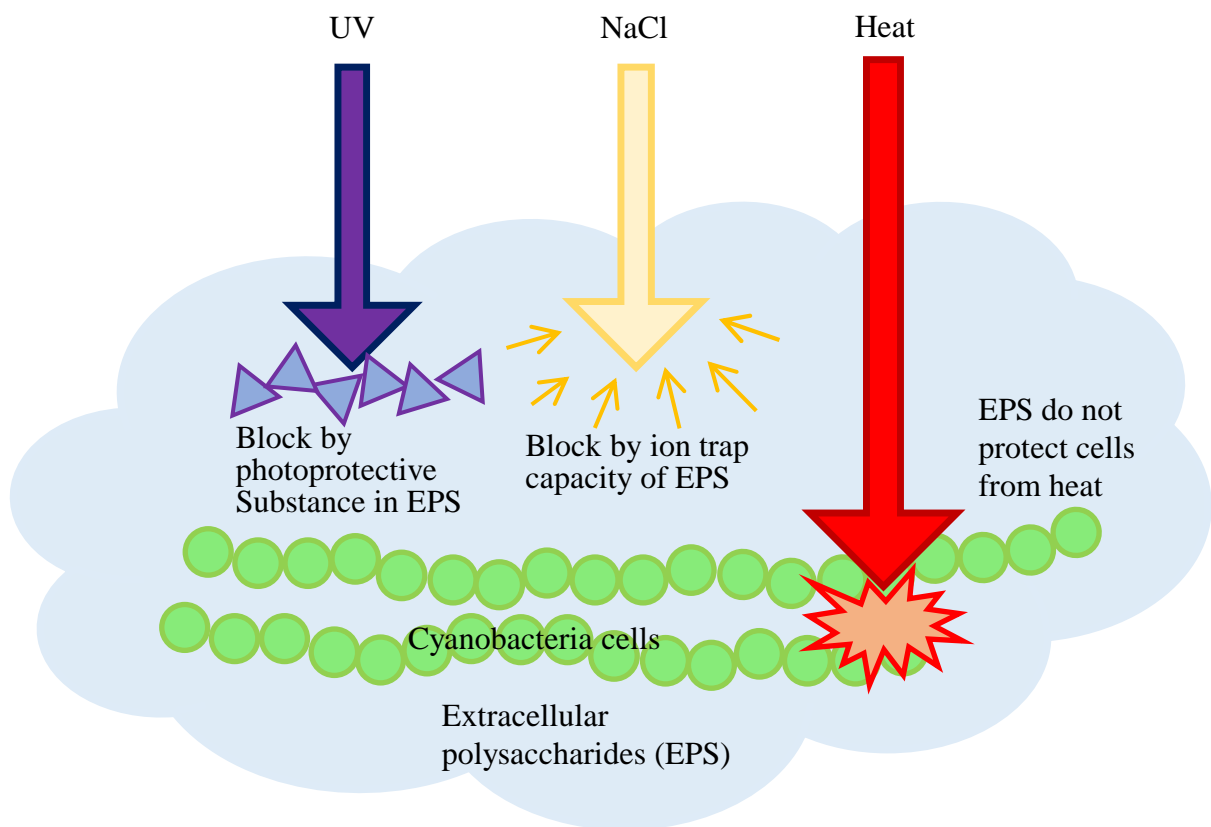


**Fig. 1-16** Cell cycle of *Nostoc* sp. HK-01. Arrow (▲) shows heterocyst. Arrowhead (▲) shows young akinete. Bar shows *ca.* 10  $\mu$ m.

**Table 1-4.** Monosaccharide composition (%) of EPS (extracellular polysaccharides) in *Nostoc* sp. HK-01. CPS; Capsular polysaccharides, RPS; Released polysaccharides (modification from Yoshimura *et al.*, 2012).

Sugar	RPS	CPS
Fuc	20.4	25.0
Rha	0.0	1.7
Ara	7.4	1.6
Gal	13.0	21.4
Glc	29.2	11.8
Man	12.9	10.8
Xyl	9.3	5.8
GalA	0.0	5.6
GlcA	7.8	16.4

Fuc; fucose, Rha; rhamnose, Ara; arabinose, Gal; galactose, Glc; glucose, Man; mannose, Xyl; xylose, GalA; galacturonic acid, GlcA; glucuronic acid



**Fig. 1-17.** Mechanism of protection of cells by EPS (extracellular polysaccharides) from harsh environments. UV (purple) tolerance reported by Scherer *et al.*, 1988; Böhm *et al.*, 1995; Ehling-Schuls *et al.*, 1997. NaCl (yellow) tolerance reported by Yoshimura *et al.*, 2012. Dry heat (red) is based on this study (Fig. 2-4).

## 第 2 章

*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞に蓄積する低分子化合物の探索

## 2-1 序論

陸棲藍藻は、乾燥状態で 60~100°Cの乾熱に対する耐性を備えていることが報告されている (Mei and Cheng, 1990; Gao, 1998; Tamaru *et al.*, 2005; 五十嵐, 2013)。乾熱耐性は、日照りにより 66°Cの高温に至る陸地で藍藻が生存するために極めて重要な機能であると考えられる (Gao, 1998; 序章)。しかし、陸棲藍藻の乾熱耐性機能の詳細はまだ明らかにされていない (序章)。第 1 章は、100°C、10 時間の乾熱耐性が証明されている陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の (五十嵐, 2013)、その乾熱耐性は、休眠細胞 (akinetete) にのみ備わること明らかにした。さらに *Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の乾熱耐性は細胞外多糖 (extracellular polysaccharides; EPS) を除去しても損なわれないことから、乾熱耐性のしくみには細胞外物質 (群) ではなく、細胞内物質 (群) が貢献していることを示した (第 1 章)。

休眠細胞内に備わり、乾熱耐性に関わる機能分子の候補として、適合溶質 (compatible solute) と呼ばれる物質 (群) の関与が考えられる。適合溶質は、乾燥時に細胞内に蓄積し、水分子の代わりにタンパク質、DNA や脂質膜を保護する物質を示す (Crowe *et al.*, 1998; Potts, 1999, 2001; 奥田, 2006)。適合溶質の蓄積は、藍藻、酵母、細菌孢子、アルテミア、クマムシ、ネムリユスリカ、下等植物および高等植物の生物グループにおいて幅広く知られている (HersHKovitz *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1994; Crowe *et al.*, 1998; Blomberg, 2000; Hoekstra *et al.*, 2001; Potts, 1999, 2001, 2002; Elbein *et al.*, 2003; Higo *et al.*, 2006; Hengherr *et al.*, 2008, 2009; Sakurai *et al.*, 2008; Jönsson and Persson, 2010)。クマムシ (*Tardigrades*) は、

クリプトビオシス (cryptobiosis) あるいは樽 (tun) と呼ばれる無代謝状態に入る過程で trehalose を蓄積し、trehalose が適合溶質 (compatible solute) として水に代わり生体成分や細胞膜などを保護することや、能動的な脱水を行うことで、90~110°Cの乾熱後に蘇生することが報告されている (奥田, 2006; Hengherr *et al.*, 2009; Welnicz *et al.*, 2011; Horikawa and Arakawa, 2015)。ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) は、クリプトビオシスに入る過程で trehalose および glycerol を適合溶質として蓄積することで、70~90°Cに曝された後に蘇生することが報告されている (奥田, 2006; Sakurai *et al.*, 2008; 古木ら, 2009)。藍藻の細胞に蓄積する適合溶質として、細胞形態ごとの蓄積は明らかにされていないが、trehalose および sucrose が報告されている。Hershkovitz ら (1991) は、乾燥耐性を備えた藍藻、*Phormidium autumnale* および *Chroococcidiopsis* sp. は乾燥に応答して trehalose と sucrose を蓄積するのに対し、乾燥感受性の藍藻 *Plectonema boryanum* および *Synechococcus* strain PCC 7942 は蓄積しないことを示している。Higo ら (2006) は、藍藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 が乾燥に伴い trehalose および sucrose を蓄積することおよび、trehalose 合成遺伝子の破壊株は trehalose の蓄積量および再加水後の生存率が低下することを示している。陸棲藍藻の休眠細胞において、何らかの適合溶質を蓄積することで乾燥時の細胞内タンパク質、DNA および脂質膜を保護し、乾熱耐性を具備している可能性が考えられる。藍藻の休眠細胞は、他の細胞形態と比べて厚い細胞壁を備え、glycogen および cyanophycin の顆粒を蓄積することが知られているが (Adams and Duggan 1999; Garcia-Pichel, 2010; Kaplan-Levy *et al.*, 2010)、適合溶質として機能し、生体分子

を保護する物質の休眠細胞への蓄積は明らかにされていない。

本章は、100°C、10 時間以上の乾熱耐性を備えた休眠細胞に分化する陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 を材料に用い、休眠細胞に特異に蓄積する物質を探索した。高速液体クロマトグラフィー (High-Performance Liquid Chromatography; HPLC) および高速液体クロマトグラフィー質量分析 (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry; LC-ESI/MS) を用いて単離・同定後に定量した。生体分子に水の代わりに水素結合する適合溶質は、水溶性画分に含まれていると考えられることから、休眠細胞に特異に蓄積する物質の探索は水溶性画分から行った。

## 2-2 材料および方法

### 2-2-1 生物材料および化学物質

Katoh ら (2003) により乾燥耐性を指標に単離、同定された陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 を BG-11 液体培地で温度 26°C、常光下 ( $74.3 \pm 24.3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) で往復振盪培養 (120 rpm, 振幅 3 cm) した。Betaine (Wako, Osaka, Japan)、glycine (Wako, Osaka, Japan)、sucrose (Wako, Osaka, Japan)、trehalose は (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) および glucosylglycerol (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) を用いた。

### 2-2-2 休眠細胞含有率の算出



*Nostoc* sp. HK-01 を BG-11 液体培地で温度 26°C、常光下 ( $74.3 \pm 24.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で往復振盪培養 (120 rpm, 振幅 3 cm) した。液体培養後、休眠細胞含有率の異なるいくつかの *Nostoc* sp. HK-01 の藻体を得た。休眠細胞含有率のカウントは、顕微鏡 (BX50, Olympus, Tokyo, Japan) およびトーマ血球計算板 (Nippon Rinsho Kikai Kogyo, Tokyo, Japan) を用いて、視野中の全細胞数および休眠細胞数を算出した。休眠細胞数 / 全細胞数  $\times 100$  から休眠細胞含有率 (%) を算出した ( $n = 3$ )。

### 2-2-3 細胞内物質の分析

細胞内分析の一連の操作を Fig. 2-1 に示す。液体培養後の *Nostoc* sp. HK-01 細胞懸濁液 500  $\mu\text{L}$  を小チューブ (Violamo Micro Tube, AsOne, Osaka, Japan) に移した。3500 (Kubota) を用いて  $12,000 \times g$  で 5 分間遠心分離し上清を除いた後 80% エタノールを加え、Thermo Block (ND-M01, Nissin, Tokyo, Japan) に備えて 65°C で 2 時間静置した後、BioMasher II (Nippi, Tokyo, Japan) を用いてホモジナイズし、細胞を破碎した。 $12,000 \times g$  で 5 分間遠心分離した後、上清を小チューブ (Violamo Micro Tube, AsOne, Osaka, Japan) に移した。細胞の破碎操作は、計 3 回行った。得られた上清は、遠心濃縮器 (MV-100, Tomy, Tokyo, Japan) を用いて濃縮・乾固した。約 1 mL の蒸留水を加え、Sep-Pak Plus C<sub>18</sub> Cartridges (Waters, Milford, Massachusetts, USA) を用いて 0、50、100% メタノール画分に分画した。ウォーターバス (BM200, Yamato, Tokyo, Japan) およびアスピレーター (CA-1110, Eyela, Tokyo, Japan) を備えたロータリーエバポレーター (RE200, Yamato, Tokyo,

Japan) を用いて 0%メタノール画分を濃縮・乾固し、濃度調整した後 Millex-LH 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) を用いてフィルターろ過した。各サンプルを LC-ESI-MS システム (Waters micromass ZQ, 2690 Separation Module, 996 Photodiode Array, Waters, Milford, Massachusetts, USA) に供し、以下の条件で分析した。Column: TSKgel Amide80 (Particle size: 3  $\mu\text{m}$ , Dimension: 2.0 mm, I.D. $\times$ 15 cm, Tosoh)、Column Temp. : 30 $^{\circ}\text{C}$ 、Solvent :  $\text{CH}_3\text{CN}$  (80/20) 、Flowrate : 0.2 mL/min. 。質量分析条件は  $\text{ES}^+$  Source、Capillary : 3.5 KV、Cone : 30 V、Extractor : 5 V、RF Lens : 0.1 V、Source Temp. : 120 $^{\circ}\text{C}$ とし、Gasflow は Desolvation : 300 L  $\cdot$  hr $^{-1}$ 、Cone : 50.0 L  $\cdot$  hr $^{-1}$  とした。

#### 2-2-4 アミノ酸分析

AccQ•Tag Amino Acid Analysis Method (Waters, Milford, Massachusetts, USA) を用いてアミノ酸分析を行った。休眠細胞含有率の異なる複数の藻体を、80%メタノールを用いて破碎した。抽出物はウォーターバス (BM200, Yamato, Tokyo, Japan) およびアスピレーター (CA-1110, Eyela, Tokyo, Japan) を備えたロータリーエバポレーター (RE200, Yamato, Tokyo, Japan) を用いて 38 $^{\circ}\text{C}$ で濃縮・乾固した。抽出物は 6N HCl と共に 110 $^{\circ}\text{C}$ 、6 時間加熱し (Thermo Block, ND-M01, Nissin, Tokyo, Japan)、酸加水分解した。抽出物を 38 $^{\circ}\text{C}$ で濃縮・乾固し、酸を取り除いた。酸加水分解で得られた水画分を 0.45- $\mu\text{m}$  filter (Tosoh, Tokyo, Japan) に供した後、再度 38 $^{\circ}\text{C}$ で濃縮・乾固した。20  $\mu\text{L}$  の HCl (20 mM)、60  $\mu\text{L}$  の AccQ Fluor Borate Buffer および 20  $\mu\text{L}$  の AccQ Fluor Reagent (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl

carbamate) を加え、55°Cで 10 分加熱し、アミノ酸の誘導體化を行った。各サンプルを、474 Scanning Fluorescence Detector (Waters, Milford, Massachusetts, USA) を備えた HPLC システムに供し、以下の条件で分析した。Column : AccQ•Tag Amino Acid Analysis Column (particle size, 4  $\mu\text{m}$ ; and dimensions, 3.9 mm in diameter  $\times$  15 cm, Waters) ; eluted with eluent A (aqueous buffer)、Eluent B (100% acetonitrile)、および Eluent C (MilliQ water) ; flow rate, 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> ; detection at Ex: 250 nm, Em: 395 nm。グラジエントは AccQ•Tag Amino Acid Analysis Method の instruction manual のグラジエントテーブルに従い、100%の Eluent A から分析を開始し、0.5 分以降は 99% の Eluent A と 1% Eluent B、18 分以降は 95%の Eluent A と 5%の Eluent B、19 分以降は 91%の Eluent A と 9%の Eluent B、29.5 分以降は 83%の Eluent A と 17%の Eluent B、33 分以降は 60%の Eluent B と 40%の Eluent C、36 分以降は 100%の Eluent A (all ratios are volume per volume) で行った。

### 2-3 結果

*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞に蓄積する物質を明らかにするため、休眠細胞含有率の異なる藻体を用いて細胞内物質を分析した。休眠細胞含有率 5 および 60% の藻体から抽出した水溶性画分をポジティブモードの LC-ESI/MS に供した。得られたマスキロマトグラムを、質量分析用ソフトウェア MassLynx (Waters, Milford, Massachusetts, USA) を用いて m/z: 70-1000 を解析し、Retention time 9.7、11.4 および 13.7 min において、休眠細胞含有率 60%の藻体で、休眠細胞含有率

5%と比較して高度に検出される物質を見出した (Fig. 2-2, 2-3 and 2-4)。これらピークのマスマスペクトルを解析し、物質の同定を試みた。Retention time 9.7 min は、glucosylglycerol:  $C_9H_{18}O_8$  (MW: 254.23) に特異的な分子イオン ( $[M+H]^+$  255,  $[M+Na]^+$  277,  $[M+CH_3CN+Na]^+$  318) と一致した (Fig. 2-2 and 2-5)。Retention time 11.4 min は、betaine:  $(CH_3)_3NCH_2CO_2$  (MW: 117.15) に特異的な分子イオン ( $[M+H]^+$  118,  $[M+Na]^+$  140,  $[M+K]^+$  156,  $[M+CH_3CN+Na]^+$  181) と一致した (Fig. 2-3 and 2-6)。Retention time 13.7 min は、sucrose:  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (MW: 342.30) に特異的な分子イオン ( $[M+Na]^+$  365) と一致した (Fig. 2-4 and 2-7)。Hershkovitz ら (1991) および Higo ら (2006) により藍藻細胞への蓄積が報告されている trehalose について確認したところ、休眠細胞に特異な蓄積は認められなかったが、Retention time 19.1 min に、trehalose:  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (MW: 342.30) に特異的な分子イオン ( $[M+Na]^+$  365) を見出した (Fig. 2-4 and 2-8)。標品の保持時間が同様であることをそれぞれ確認した。

休眠細胞含有率 5、40 および 75%の藻体の細胞を破碎し、HPLC システムおよび AccQ・Tag Amino Acid Analysis Method (Waters, Milford, Massachusetts, USA) を用いてアミノ酸の分析を行った。Retention time 17.1-17.3 min に、標品と同様の glycine のピークが認められた (Fig. 2-9)。

Glucosylglycerol、betaine、sucrose、trehalose および glycine の 5 物質を、休眠細胞含有率の異なる藻体でそれぞれピーク面積から定量した。Glucosylglycerol は、休眠細胞含有率 5%において  $0.5 \pm 0.2$  ng/  $1.0 \times 10^8$  cells、休眠細胞含有率 60%において  $29.5 \pm 10.8$  ng/  $1.0 \times 10^8$  cells が認められた (n=3, Fig. 2-10)。Betaine は、

休眠細胞含有率 5%において  $5.8 \pm 0.7 \text{ ng} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$ 、休眠細胞含有率 60%において  $17.9 \pm 2.4 \text{ ng} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$  が認められた (n=3, Fig. 2-11)。Sucrose は、休眠細胞含有率 5%において  $6.2 \pm 0.2 \text{ } \mu\text{g} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$ 、休眠細胞含有率 60%において  $17.1 \pm 2.6 \text{ } \mu\text{g} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$  が認められた (n=3, Fig. 2-12)。Trehalose は、休眠細胞含有率 5%において  $0.11 \pm 0.06 \text{ } \mu\text{g} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$ 、休眠細胞含有率 60%において  $0.03 \pm 0.02 \text{ } \mu\text{g} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$  が認められた (n=3, Fig. 2-13)。Glycine は、休眠細胞含有率 5%において  $0.3 \text{ } \mu\text{g} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$ 、休眠細胞含有率 40%において  $8.4 \text{ } \mu\text{g} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$ 、休眠細胞含有率 75%において  $17.5 \text{ } \mu\text{g} / 1.0 \times 10^8 \text{ cells}$  と算出され、休眠細胞含有率 (%) と glycine の量 ( $\mu\text{g}$ ) の間には正の傾きの近似直線 ( $y = 0.239x - 0.656, r^2 = 0.997$ ) が示された (n = 5, Fig. 2-15)。これらの結果から、glucosylglycerol、betaine、sucrose および glycine は、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞に特異に蓄積していることを見出した (Fig. 2-11, 2-12, 2-13 and 2-15)。Trehalose は、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞への特異な蓄積は認められなかった (Fig. 2-14)。

#### 2-4 考察

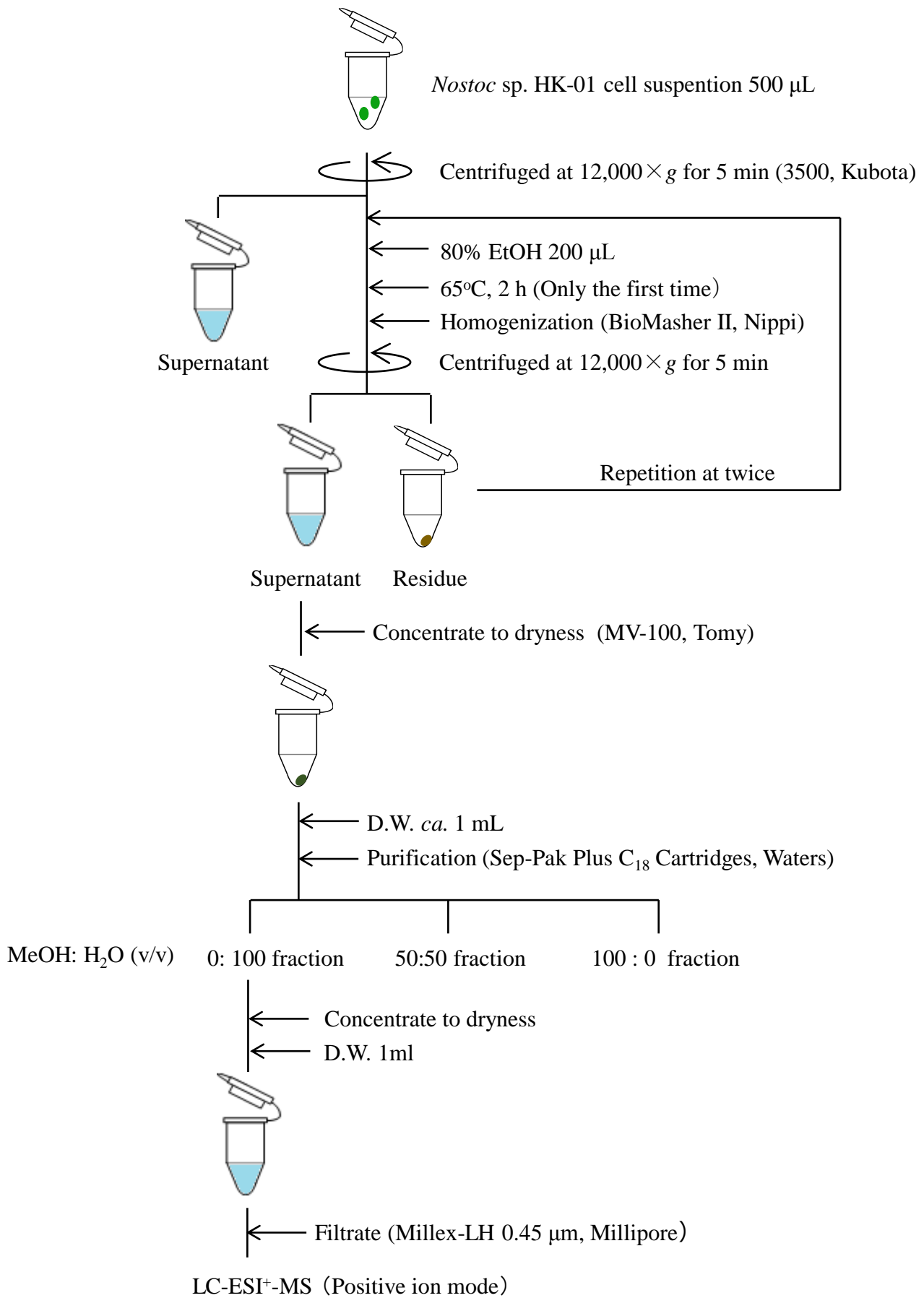
Sucrose、glycine、betaine および glucosylglycerol は、休眠細胞含有率の高い藻体から休眠細胞含有率の低い藻体よりも有意に多量に検出された (Fig. 2-11, 2-12, 2-13, 2-15)。休眠細胞含有率の高い藻体の  $1.0 \times 10^8 \text{ cells}$  あたりの sucrose および glycine の蓄積量は、glucosylglycerol、betaine および trehalose と比較して約

1000 倍多く認められた。藍藻の休眠細胞は他の細胞形態と比べて厚い細胞壁を備え、glycogen および cyanophycin の顆粒を蓄積することが知られているが (Adams and Duggan, 1999; Garcia-Pichel, 2010; Kaplan-Levy *et al.*, 2010)、適合溶質として機能し、タンパク質、DNA および脂質膜を保護する物質の休眠細胞への蓄積は明らかにされていなかった。適合溶質として知られる低分子糖の水酸基は、水分子の代わりに細胞の脂質膜やタンパク質など高分子の極性基に水素結合し、脱水時の細胞の安定性を高めていると考えられている (Crowe *et al.*, 1998; Hoekstra *et al.*, 2001; Elbein *et al.*, 2003)。適合溶質は、還元性を示さず多量に蓄積しても細胞に害を与えにくいことが重要と考えられている (黄川田, 2009; 伊藤ら, 2014)。熱による細胞死は、タンパク質、DNA および脂質膜の変性によると考えられている (序章)。Potts (1999) は、sucrose はタンパク質、脂質膜だけでなく DNA を乾燥から保護するはたらきも備えていると述べている。本章で示された低分子化合物が適合溶質として働き、生体分子を保護することで、休眠細胞の乾熱耐性に貢献している可能性が考えられる。

本研究結果から、休眠細胞含有率 60% の藻体において 1 細胞あたりの sucrose 量はおよそ 0.17 pg であることおよび、休眠細胞含有率 75% の藻体において 1 細胞あたりの glycine 量はおよそ 0.18 pg であることが算出された。*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の 1 細胞あたりの乾燥重量は、0.25-0.4 ng であろうと推定されている (オンら, 2017)。*Anabaena variabilis* の akinete は、 $2.06 \times 10^{-10}$  g の固形分と 63% の水を含むことが報告されている (Braune and Sanke, 1979; Potts, 1994)。*Aphanizomenon ovalisporum* の休眠細胞の湿重量の平均は、0.4 ng と報告されてい

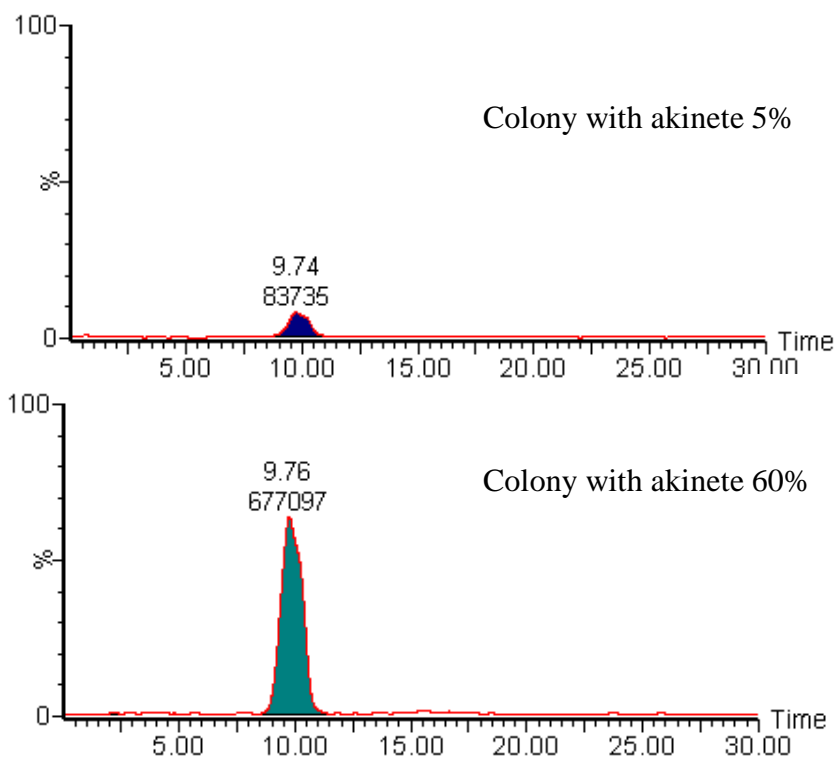
る (Sukenik *et al.*, 2013, 2015)。休眠細胞内の乾燥重量の測定や含水量の分析を行うことで、細胞内の適合溶質濃度の算出が可能となると考えられる。

本章は、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞に蓄積される水溶性物質を探索し、細胞破碎後の水溶性画分から sucrose、glycine、betaine、glucosylglycerol および trehalose の 5 種を同定した。HPLC および LC-ESI/MS による定量結果から、特に sucrose、glycine、betaine および glucosylglycerol が休眠細胞に蓄積されていることをはじめて明らかにした。これらの蓄積量の違いは、休眠細胞が乾熱耐性を備える要因のひとつであると考えられる。休眠細胞で同定された sucrose、glycine、betaine および glucosylglycerol が実際に適合溶質として機能しているか検証することで、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の乾熱耐性のしくみの解明に繋がると考えられる。

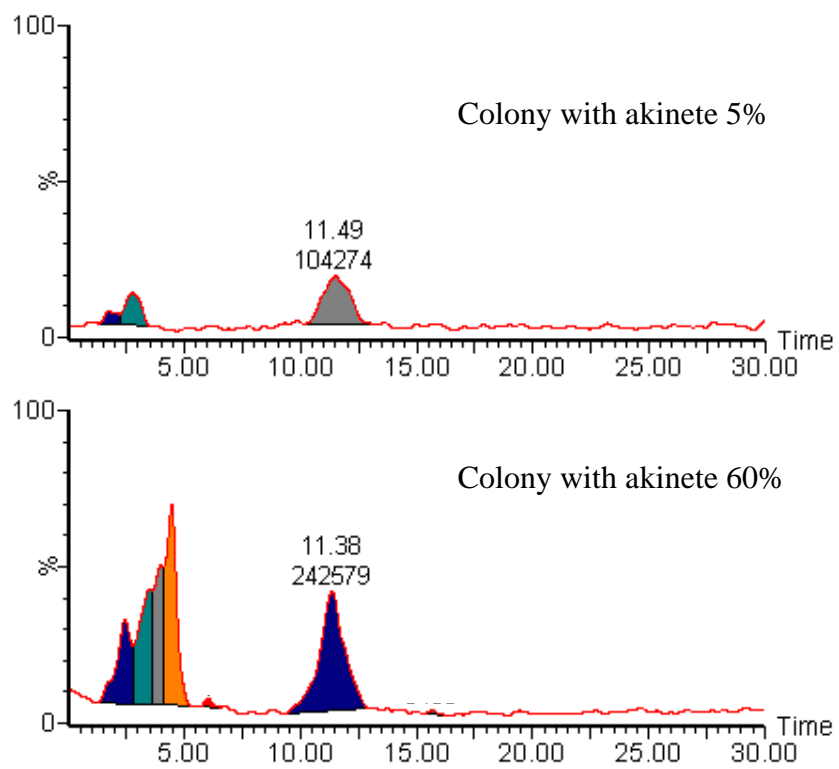


**Fig. 2-1.** Extraction and analysis of water-soluble contents from *Nostoc* sp. HK-01 cells.

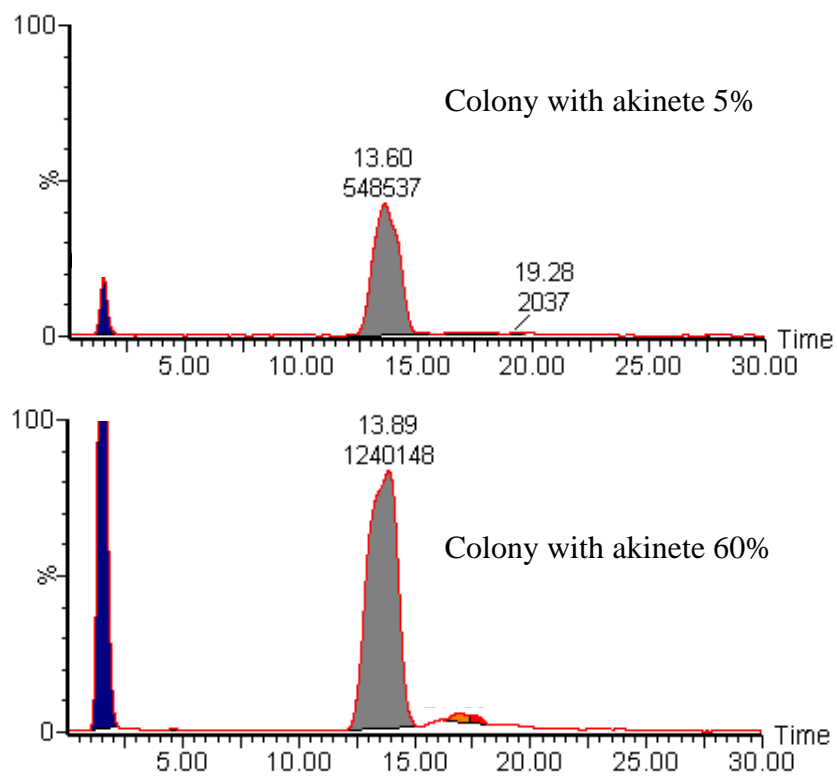




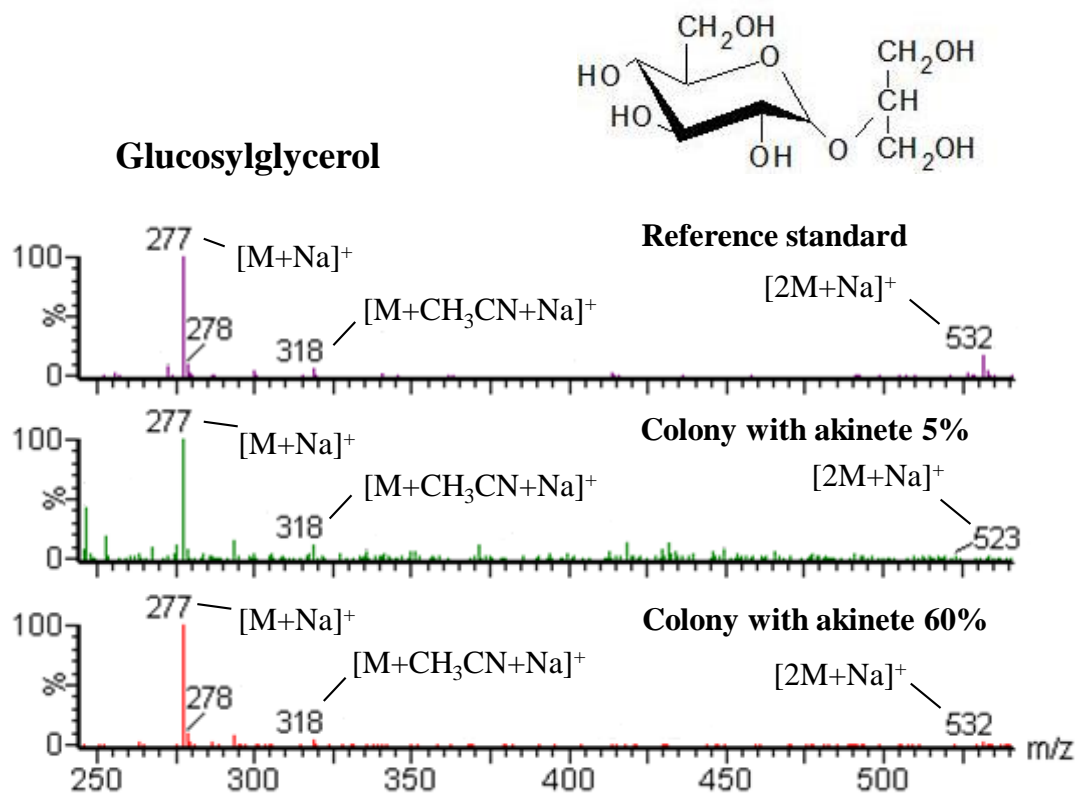
**Fig. 2-2.** Mass chromatograms at  $m/z$  277 of cell extracts of *Nostoc* sp. HK-01.



**Fig. 2-3.** Mass chromatograms at  $m/z$  118+140+181+257 of cell extracts of *Nostoc* sp. HK-01.

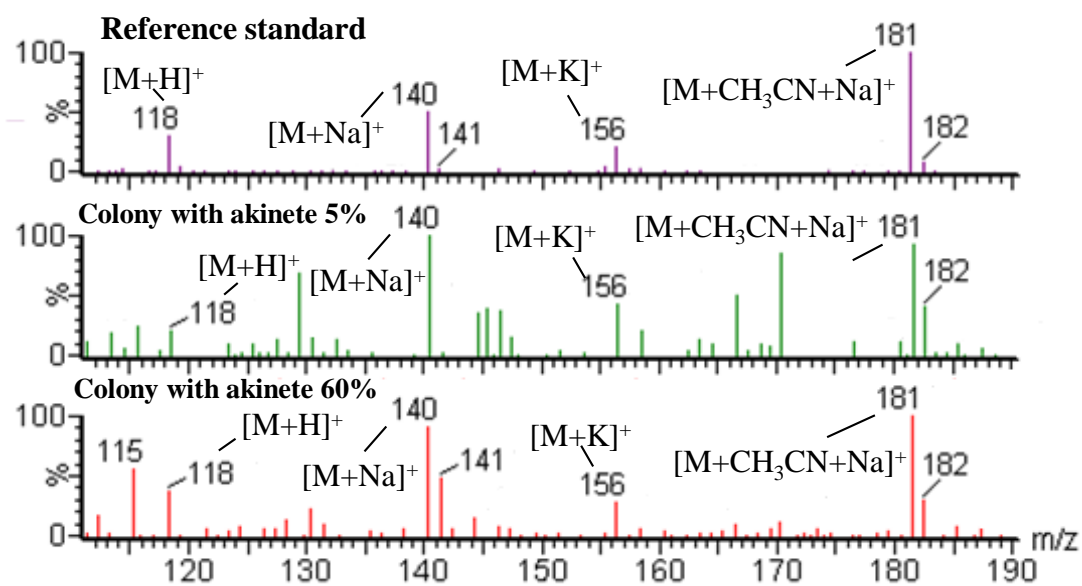
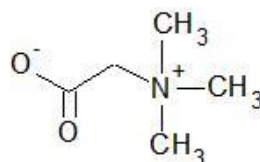


**Fig. 2-4.** Mass chromatograms at  $m/z$  365 of cell extracts of *Nostoc* sp. HK-01.

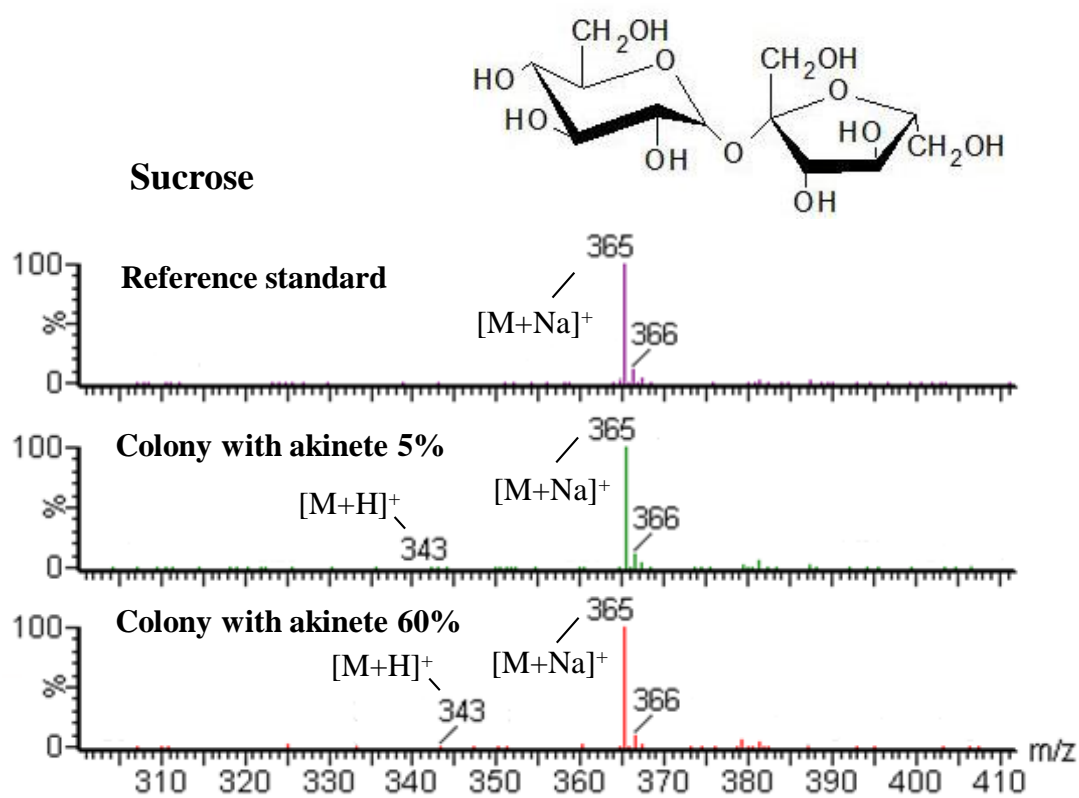


**Fig. 2-5.** Mass spectra at retention time of 9.7 min of reference standard and cell extracts of *Nostoc* sp. HK-01.

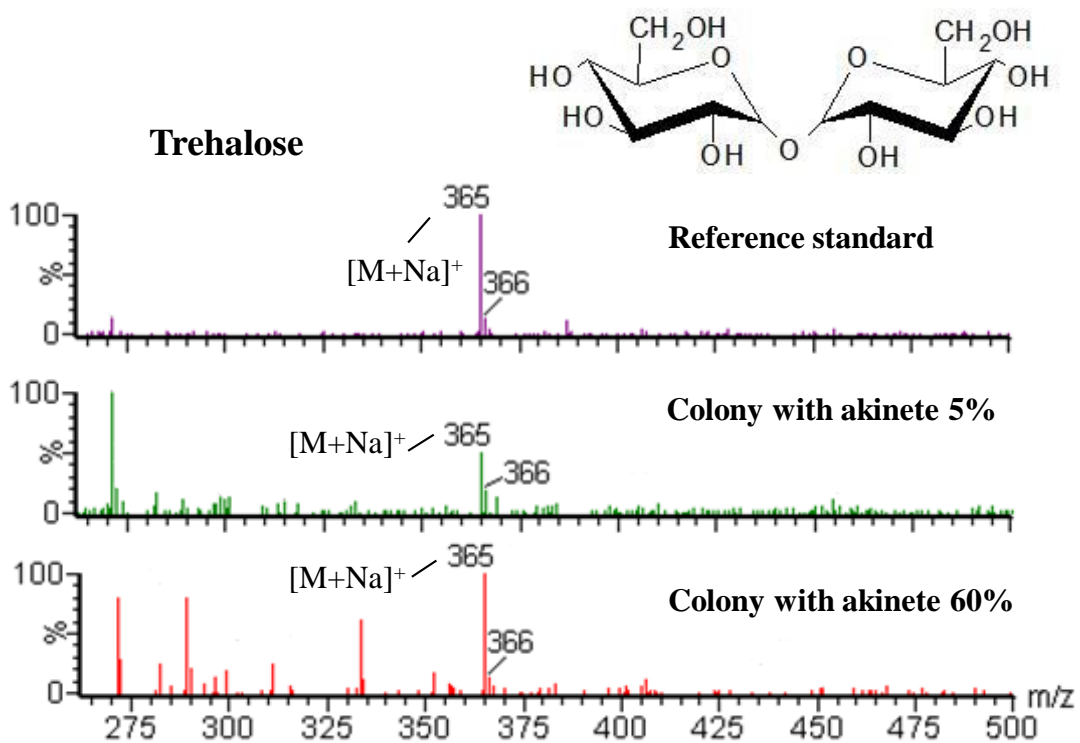
## Betaine



**Fig. 2-6.** Mass spectra at retention time of 11.4 min of reference standard and cell extracts of *Nostoc* sp. HK-01.

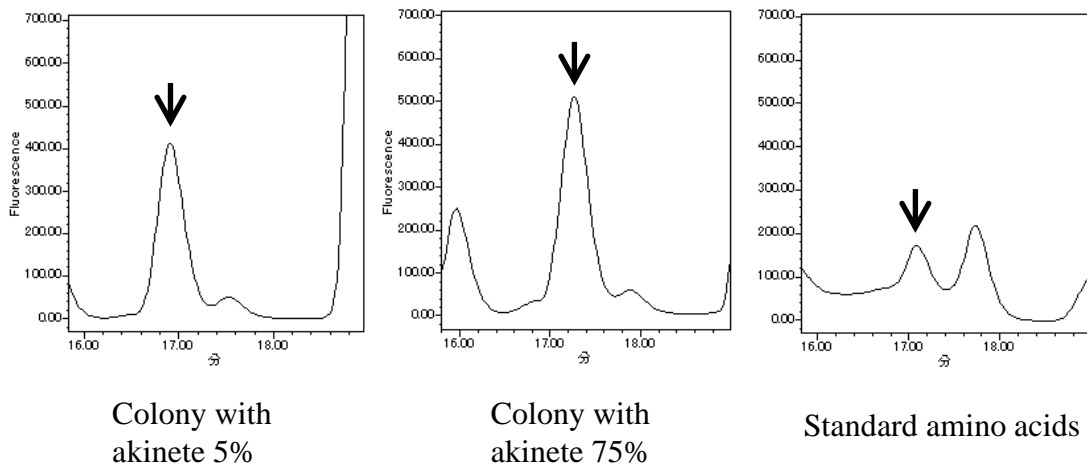
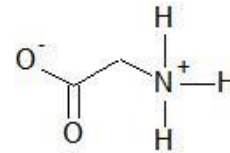


**Fig. 2-7.** Mass spectra at retention time of 13.7 min of reference standard and cell extracts of *Nostoc* sp. HK-01.



**Fig. 2-8.** Mass spectra at retention time of 19.1 min of reference standard and cell extracts of *Nostoc* sp. HK-01.

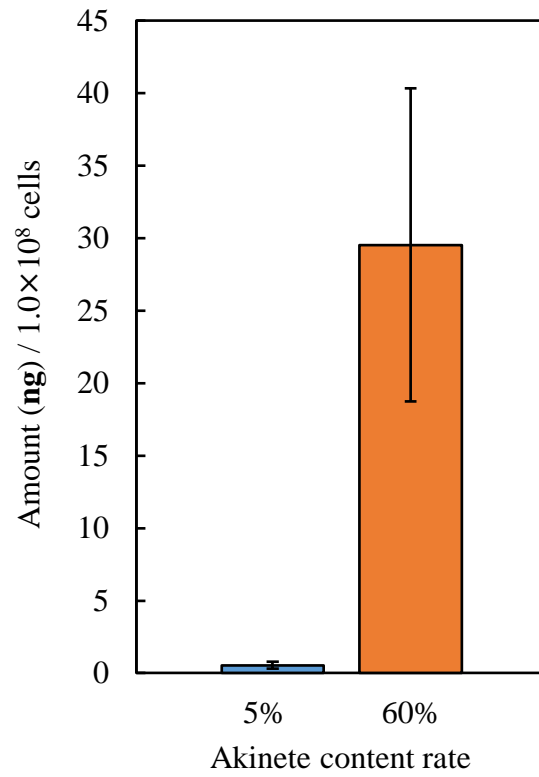
## Glycine



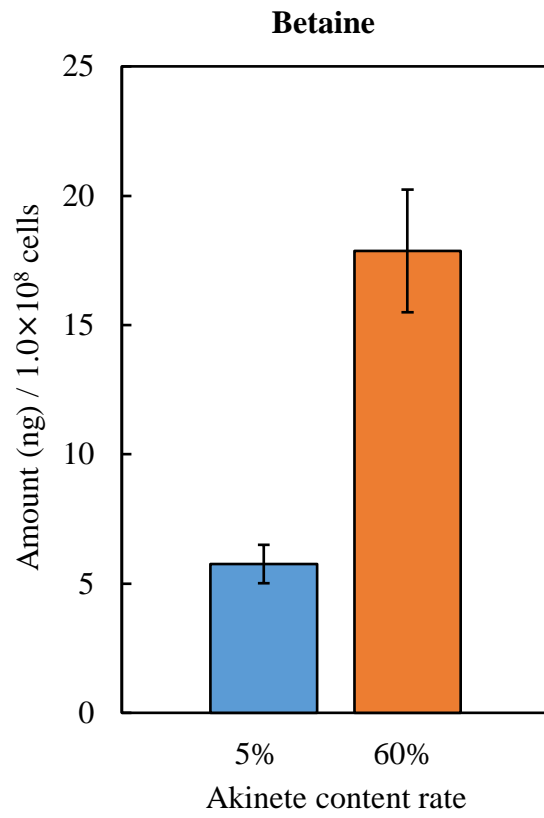
**Fig. 2-9.** HPLC chromatograms at retention time of 16-19 min of cell extracts of *Nostoc* sp. HK-01. Arrows show glycine.



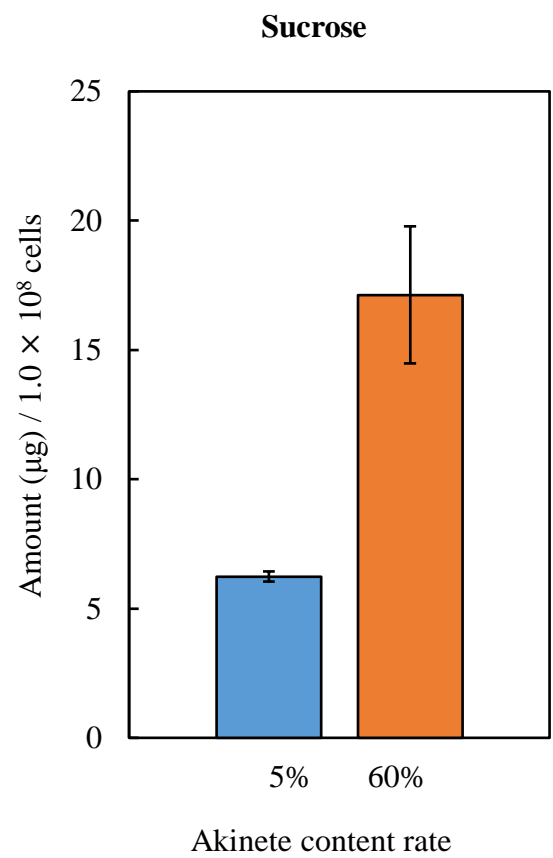
### Glucosylglycerol



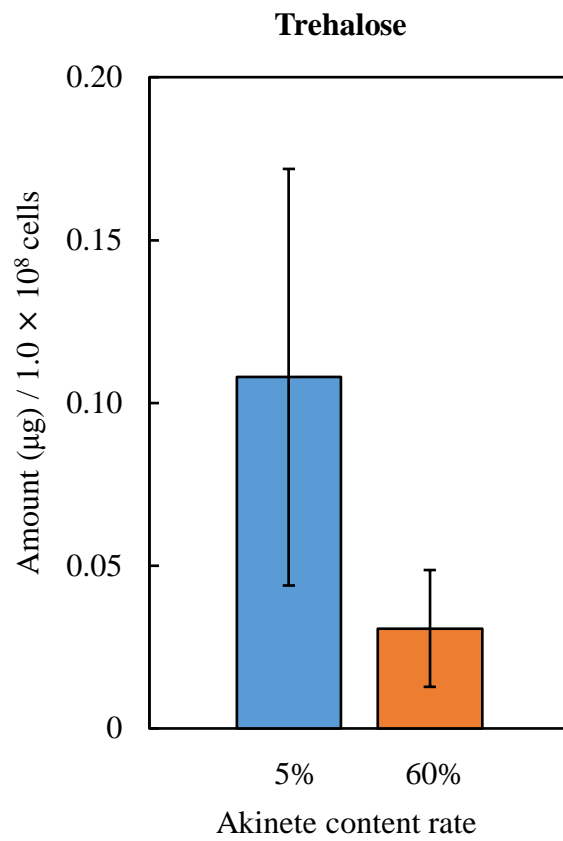
**Fig. 2-10.** The quantity of glucosylglycerol per  $1.0 \times 10^8$  cells in colonies of *Nostoc* sp. HK-01 (n=3).



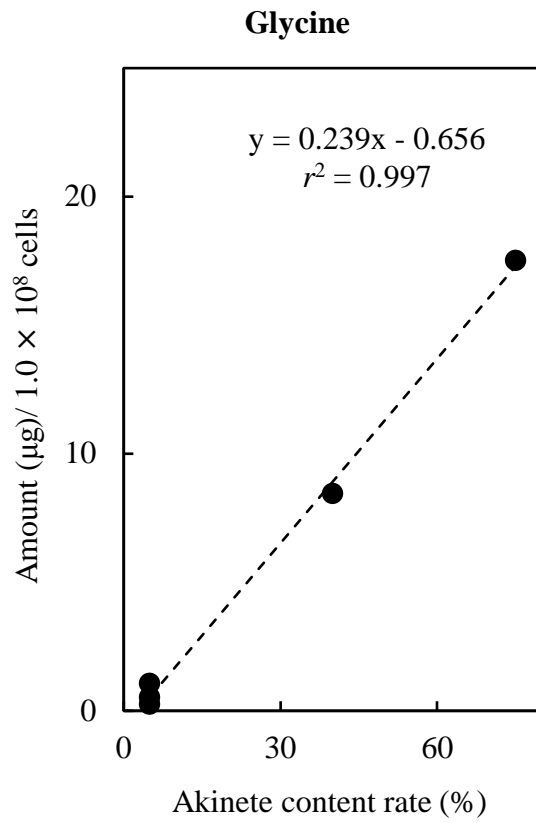
**Fig. 2-11.** The quantity of betaine per  $1.0 \times 10^8$  cells in colonies of *Nostoc* sp. HK-01 (n=3).



**Fig. 2-12.** The quantity of sucrose per  $1.0 \times 10^8$  cells in colonies of *Nostoc* sp. HK-01 (n=3).



**Fig. 2-13.** The quantity of trehalose per  $1.0 \times 10^8$  cells in colonies of *Nostoc* sp. HK-01 (n=3).



**Fig. 2-14.** The quantity of glycine per  $1.0 \times 10^8$  cells in colonies of *Nostoc* sp. HK-01.

## 第3章

*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞に蓄積される低分子化合物の  
タンパク質熱凝集抑制活性

### 3-1 序論

陸棲藍藻は乾燥状態で 60~100°Cの乾熱に対する耐性を備えていることが報告されている (Mei and Cheng, 1990; Gao, 1998; Tamaru *et al.*, 2005; 五十嵐, 2013)。乾熱耐性は、日照りにより 66°Cの高温に至る陸地で藍藻が生存するために極めて重要な機能であると考えられる (Gao, 1998; 序章)。100°C10 時間の乾熱耐性が証明されている陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の (五十嵐, 2013)、その乾熱耐性は、休眠細胞 (akinetes) にのみ備わること、および、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の乾熱耐性は細胞外多糖 (extracellular polysaccharides; EPS) を除去しても損なわれないことから、乾熱耐性のしくみには細胞外物質 (群) ではなく、細胞内物質 (群) が貢献していることを示した (第 1 章)。休眠細胞から glucosylglycerol、betaine、sucrose、trehalose および glycine を同定し、特に trehalose を除く 4 種が休眠細胞に特異に蓄積していることを示した (第 2 章)。

休眠細胞内に備わり、乾熱耐性に関わる機能分子の候補として、適合溶質 (compatible solute) の関与が考えられる。適合溶質は乾燥時に細胞内に蓄積し、水分子の代わりにタンパク質、DNA や脂質膜を保護する物質を示す (Crowe *et al.*, 1998; Potts, 1999, 2001; 奥田, 2006)。適合溶質が水の代わりにタンパク質や脂質膜に水素結合し、結合水の代わりに果たすことで乾燥時の構造を保護しているとする考え方は水置換説、また適合溶質が脱水に伴い流動性を失ってガラス化し、タンパク質や脂質膜の高次構造を封じ込めて保護しているとする考え方はガラス状態説と呼ばれ、この 2 つが相補的に作用して高分子を保護していると考えられている (Crowe *et al.*, 1998; 櫻井, 2001; 奥田, 2006)。Fig. 3-1 に適合溶質

による乾燥時の細胞保護のモデルを示す。細胞内のタンパク質や脂質膜は水分子により構造を保持しているが、乾燥や熱による水分子の損失に伴い変性・失活するため、細胞は死滅する (Fig. 3-1, Sensitive)。一方、休眠細胞のタンパク質や脂質膜は、蓄積した適合溶質により乾燥時も構造が保護され、生存する (Fig. 3-1, Tolerant)。

藍藻の休眠細胞は他の細胞形態と比べて厚い細胞壁を備え、glycogen および cyanophycin の顆粒を蓄積することが知られているが (Adams and Duggan 1999; Garcia-Pichel, 2010; Kaplan-Levy *et al.*, 2010)、適合溶質として機能し、生体分子を保護する物質の休眠細胞への蓄積は明らかにされていない。Nostoc sp. HK-01 の休眠細胞から sucrose、glycine、betaine、glucosylglycerol および trehalose が同定され、特に trehalose を除く 4 種が休眠細胞に蓄積していることが示されているが (第 2 章)、これら化合物の適合溶質としての機能の詳細は明らかにされていない。

適合溶質の機能を調べる方法として、タンパク質の凝集量あるいは酵素活性を測定する方法が広く用いられている (Carpenter and Crowe, 1988; Göller and Galinski, 1999; Diamant *et al.*, 2001; Table 3-1 ~ 3-6)。Göller と Galinski (1999) は、無添加条件の lactate dehydrogenase (LDH) 活性が 42.5°C を最大に低下するのに対し、1 M の hydroxyectoine あるいは 1 M の betaine 添加条件は、最大活性を示す温度が 47.5°C にシフトすることを報告している。0.33 M の ammonium sulphate 添加条件における最大活性を示す温度は 55°C で、かつ無添加条件と比較して最大時の活性は 165% を示し、これら化合物の添加によるタンパク質の熱安定性あ



るいは酵素活性の向上が認められている。LDH を凍結・融解サイクルに供した際、無添加条件における LDH 活性は 1 回の凍結・融解サイクル後に 56% に低下し、5 回の凍結・融解サイクル後に 0% を示した。1 M の ammonium sulphate、NH<sub>4</sub>Cl および NaCl 添加条件における LDH 活性は 1 回の凍結・融解サイクル後に 1-14%、5 回の凍結・融解サイクル後に 0% を示し、凍結・融解耐性を低下させることが示されている。一方、1 M の *N* $\epsilon$ -acetyllysine 添加条件における LDH 活性は 1 回の凍結・融解サイクル後に 97%、5 回の凍結・融解サイクル後に 85% を示した。1 M の sucrose、trehalose および trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) 添加条件における LDH 活性は 1 回の凍結・融解サイクル後に 96~99%、5 回の凍結・融解サイクル後に 70~73% を示した。1 M の betaine 添加条件における LDH 活性は 1 回の凍結・融解サイクル後に 81%、5 回の凍結・融解サイクル後に 38% を示したことから、これら化合物によるタンパク質の凍結・融解耐性向上活性が認められている (Göller and Galinski, 1999)。Borges ら (2002) は、0.5 M の Di-myoinositol phosphate および mannose 添加条件において無添加条件と比較して 50°C 30 分までの湿熱後の LDH 活性が低下する一方、0.5 M の mannosylglycerate、hydroxyectoine、diglycerol phosphate、ectoine、KCl、mannosylglyceramide、trehalose、K-glycerate、glucose、methyl-mannoside、mannosylglycerate、mannosylglyceramide および glucosylglycerol 添加条件において、無添加条件と比較して 50°C 30 分までの湿熱後の LDH 活性が高く保たれることを示している。glycerol 添加条件は、無添加条件とほぼ同様に、加熱後の LDH 活性は低下した。Borges ら (2002) は、0.5 M の KCl 添加条件の加熱後は無添加条件とほぼ同様の LDH 凝集量を示した一方、

0.5 M の mannosylglycerate (MG) および trehalose 添加条件において無添加条件と比較して 50°C30 分までの湿熱後の LDH 凝集量が低下することを報告している。Sawangwan ら (2010) は、0.5 M の glucosylglycerol、glucosylglycerate および  $\alpha,\alpha$ -trehalose を 4 種のタンパク質; LDH、pseudomonas fluorescens mannitol 2-dehydrogenase (PfMDH)、corynebacterium callunae starch phosphorylase (CcStP) および candida tenuis xylose reductase (CtXR) に加え、LDH を 40°C で 60 分まで、PfMDH を 30°C で 60 分まで、CcStP を 35°C で 300 分まで、CtXR を 30°C で 360 分まで加温して酵素の残存活性を測定した結果、PfMDH に対する glucosylglycerol 添加条件以外はいずれも無添加条件よりも高い酵素活性を示したと報告している。CtXR を 40°C で 300 分まで加温したとき、glucosylglycerol および  $\alpha,\alpha$ -trehalose 添加時は無添加時と同様の酵素活性を示したが、glucosylglycerate 添加時は高い酵素活性を示した (Sawangwan *et al.*, 2010)。Sawangwan ら (2010) は、CtXR を 30°C で 300 分加温した後の酵素活性は、glucosylglycerol、glucosylglycerate および trehalose を 0.1 M または 0.5 M 添加した条件と同様の酵素活性を示したと述べているが、無添加条件との比較はしていない。PfMDH (50  $\mu$ g/mL) の凍結乾燥・融解サイクル後の残存活性は、無添加条件ではおよそ 10% を示すが、glucosylglycerol、 $\alpha,\alpha$ -trehalose および glucosylglycerate を 0.0025-0.75 M の濃度で添加したとき、glucosylglycerol 添加条件は 0.025 M で約 90%、 $\alpha,\alpha$ -trehalose 添加条件は 0.5 M で約 75% の活性を示し、glucosylglycerate 添加条件は 0.5 M でのみ約 75% の活性が示されている (Sawangwan *et al.*, 2010)。Diamant ら (2001) は 0~4.3 M の betaine、glycerol、

trehalose および proline を 0.5  $\mu$ M の malate dehydrogenase (MDH) に添加して 44°C で加温後に残存活性を測定し、それぞれ 2 M, 3.2 M、1.3 M、4.3 M でほぼ 100% の活性が保たれることを示したが、proline (0~45 分) を除いて時間依存は示していない。Diamant ら (2001) は 5 M urea および 10 mM dithiothreitol で変性させた MDH (50 $\mu$ M) を 0~4.3 M の betaine、proline、trehalose あるいは glycerol と共に 37°C に加温することで活性が復活することを示した。Hincha と Hagemann (2004) は liposome を 28°C、暗所、相対湿度 0% で 24 時間乾燥し、sucrose、trehalose、2-O-( $\alpha$ -Dglucopyranosyl)-glycerol、sorbitol を 0-20 mg/mL 添加条件において liposome からの carboxyfluorescein の漏出および膜融合の抑制を指標に、脂質膜が安定化されることを示した。一方、betaine の活性は示されなかった。Carpenter ら (1986) は凍結・融解後の phosphofructokinase (PFK) の活性を測定し、0~500 mM の trehalose、sucrose、maltose、trimethylamine-N-oxide、glycine、proline、4-hydroxyproline、glucose、glycerol および inositol 添加条件では活性が保たれ、500 mM 添加条件で最大の活性を示すことを示した。0.6 mM ZnSO<sub>4</sub> 存在下では効果が向上し、かつ 100 mM 未満で最大活性を示すことを示した。このように sucrose、glycine、betaine、glucosylglycerol および trehalose の生体分子保護活性の一部が明らかにされているが、sucrose、glycine、1 M 未満の betaine、0.5 M 未満の glucosylglycerol および 0.5 M 未満の trehalose の熱耐性への関与は示されておらず、さらに、加熱時間、濃度の網羅的な検証は例がない (Table 3-1 ~ 3-6)。生体内でこれら化合物が活性を示すか考察するうえで、活性濃度は非常に重要な情報である。

本章は、タンパク質の凝集量および酵素活性を指標に、100°C10 時間以上の乾熱耐性を備えた陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞で同定された sucrose、glycine、betaine、glucosylglycerol および trehalose の生体分子の保護活性を検証した後、生体内で活性を示す可能性を、蓄積量と濃度の関係から考察した。休眠細胞に特異に蓄積している化合物を添加することでタンパク質の熱耐性が増加すれば、熱耐性に関与する適合溶質である可能性が示される。タンパク質は、適合溶質の活性測定モデル酵素として用いられている乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase; LDH) を用いた (Borges *et al.*, 2002)。

### 3-2 材料および方法

#### 3-2-1 化学物質

Betaine (Wako, Osaka, Japan)、glycine (Wako, Osaka, Japan)、sucrose (Wako, Osaka, Japan)、trehalose は (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) および glucosylglycerol (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) を用いた。それぞれの化合物はアッセイ用バッファー (Protein Aggregation Assay Kit, PROTEOSTAT®, Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA) に溶解し、それぞれの実験濃度に調製して用いた。

#### 3-2-2 タンパク質凝集量の評価

Protein aggregation assay kit (Enzo Life Sciences, Inc., New York, USA) を用いた。200 µg/mL に濃度を調整した LDH (lactate dehydrogenase, Roche, Berlin, Germany)

に各試料を加えた。Thermo Block (ND-M01, Nissin, Tokyo, Japan) を用いて 50°C、60 min 加熱後、凝集タンパク質と結合して蛍光 (Ex: 500 nm, Em: 603 nm) を発する detection reagent (Enzo Life Sciences, Inc., New York, USA) を加えた。室温、暗所で 15 min 静置後、マイクロプレートリーダー (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて蛍光 (Ex: 500nm, Em: 603nm) を測定した。

### 3-2-3 酵素活性の評価

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いた。1 µg/mL に濃度を調整した LDH (lactate dehydrogenase, Roche, Germany) を thermo block (ND-M01, Nissin, Tokyo, Japan) を用いて 50-70°C、0-60 min 加熱した。LDH 50 µL に working solution 50µL を加えた。室温、暗所で 30 min 静置後、stop solution 25 µL を加えた。マイクロプレートリーダー (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて吸光 ( $\lambda = 490 \text{ nm}$ ) を測定した。

### 3-3 結果

Glucosylglycerol、betaine、sucrose、trehalose および glycine の 5 物質についてタンパク質の熱凝集抑制活性を調べた。タンパク質凝集量を示す蛍光強度 (Ex: 500 nm, Em: 603 nm) は、50°C90 分加熱後に、LDH に何も加えていない対照条件において 21.0 だった。50 mM の glucosylglycerol を添加したとき 22.2、100 mM の glucosylglycerol を添加したとき 23.8 だった (Fig. 3-2)。50 mM の betaine を添

加したとき 18.6、100 mM の betaine を添加したとき 14.4 だった (Fig. 3-3)。50 mM の sucrose を添加したとき 13.8、100 mM の sucrose を添加したとき 12.5 だった (Fig. 3-4)。100 mM の trehalose を添加したとき 19.7、250 mM の trehalose を添加したとき 16.7 だった (Fig. 3-5)。50 mM の glycine を添加したとき 17.3、100 mM の glycine を添加したとき 15.1 だった (Fig. 3-6)。Betaine、sucrose、trehalose および glycine の、タンパク質凝集抑制活性が認められた (Fig. 3-3, 3-4, 3-5 and 3-6)。Glucosylglycerol の、タンパク質凝集抑制活性は認められなかった (Fig. 3-2)。タンパク質凝集量と酵素活性の相関関係を調べた。蛍光強度が 5.7 のとき酵素活性は 79.7%、蛍光強度が 7.0 のとき酵素活性は 56.8%、蛍光強度が 23.5 のとき酵素活性は 5.3% だった。明らかな相関関係が確認された (Fig. 3-7:  $y=172.54e^{-0.133x}$ ,  $r^2=0.9852$ )。

#### 3-4 考察

低分子化合物によるタンパク質保護活性の一部が明らかにされていたが (本章序論)、sucrose、glycine、1 M 未満の betaine、0.5 M 未満の glucosylglycerol および 0.5 M 未満の trehalose の熱耐性への関与は示されていなかった。LDH を 50°C で加熱し、その凝集量を測定した結果、betaine および trehalose を 100 mM 以上で、sucrose および glycine を 50 mM 以上添加した際に、熱凝集を抑制する活性を示すことを見出した (Fig. 3-3, 3-4, 3-5 and 3-6)。タンパク質凝集抑制活性の結果および細胞内定量の結果 (第 2 章) を Table 3-7 にまとめた。休眠細胞含有率の高い藻体の  $1.0 \times 10^8$  cells あたりの glucosylglycerol、betaine および trehalose

の蓄積量はそれぞれ  $29.5 \pm 10.8$  ng、 $17.9 \pm 2.4$  ng および  $30 \pm 20$  ng だった（第2章）。Glucosylglycerol はタンパク質凝集抑制活性が認められなかった。Trehalose の蓄積は休眠細胞に特異的ではなかった。休眠細胞含有率の高い藻体の  $1.0 \times 10^8$  cells あたりの sucrose および glycine の蓄積量はそれぞれ  $17.1 \pm 2.6$   $\mu$ g および  $17.5$   $\mu$ g で、glucosylglycerol、betaine および trehalose と比較して約 1000 倍多く認められた。Sucrose、glycine はタンパク質凝集抑制活性を備えていた。蓄積量が多いことおよびタンパク質保護活性を備えていることから、*Nostoc* sp. HK-01 の水溶性画分に含まれる低分子化合物では、sucrose と glycine が乾熱耐性に高い貢献を果たしている可能性が見出された。

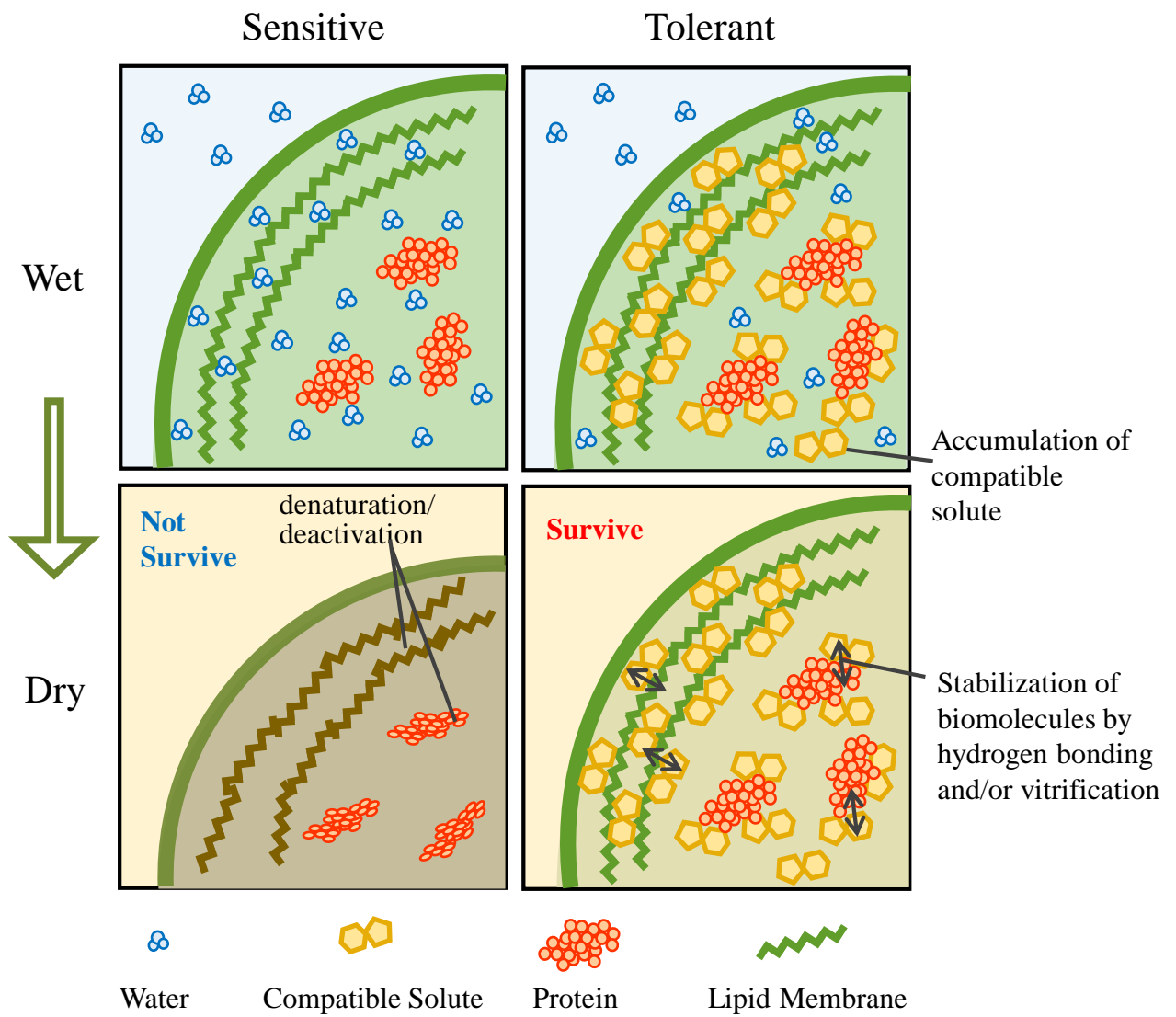
適合溶質によるタンパク質の凝集抑制のメカニズムについていくつかの報告がある。タンパク質は、変性状態の自由エネルギーが天然状態の自由エネルギーを下回るとき変性する（Chi *et al.*, 2003; 平野・白木, 2011）。低分子化合物の添加がタンパク質の凝集を抑制することはいくつか報告されている（Carpenter and Crowe, 1988; Göller and Galinski, 1999; Diamant *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2002, Shiraki 2002; Sawangwan *et al.*, 2010）。適合溶質はタンパク質の表面張力に作用する（Potts, 1994; Tsumoto *et al.*, 2004）。アルギニンは、タンパク質の変性温度は下げないが、凝集における中間体を不安定化させることで凝集を抑制していると示唆されている（Tsumoto *et al.*, 2004; 平野, 2015）。糖は水素結合によりタンパク質の流動性を減少させることで、失活を抑制することができる（Mensink *et al.*, 2017）。低分子糖の水酸基は、水分子の代わりに細胞の脂質膜やタンパク質など高分子の極性基に水素結合し、脱水時の細胞の安定性を高めていると考え

られている (Crowe *et al.*, 1998; Hoekstra *et al.*, 2001; Elbein *et al.*, 2003)。変性状態が不安定になると、相対的に天然状態が安定化する (赤沼・山岸, 2009)。ミスフォールディング研究は応用利用が先行しており (白木, 2004)、なぜ凝集が抑制されるかはまだ十分に説明されていないが (Borges *et al.*, 2002; 吉澤 2015)、これらの化合物は天然状態のタンパク質の自由エネルギーを減少、あるいは変性状態のタンパク質の自由エネルギーを増加させている可能性が考えられる (Chi *et al.*, 2003)。

熱耐性に関与する betaine、glycine および sucrose の蓄積量が休眠細胞の含有率で大きく異なることが示されている (第 2 章; Fig. 2-12, 2-13, 2-15)。これらの蓄積量の違いは、休眠細胞が乾熱耐性を備える要因のひとつであると考えられる。betaine、glycine、sucrose および trehalose のタンパク保護機能は、生理的に至適な濃度になり、活性を示していると考えられる。

本章は、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の抽出物から同定された sucrose、glycine、betaine、glucosylglycerol および trehalose の 5 種の水溶性物質のうち、glucosylglycerol を除く 4 種がタンパク質保護機能を備えることおよび、その活性濃度に関する情報を、実験的に示した。定量の結果から、sucrose と glycine が、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の乾熱耐性に関わる機能物質の候補であることをはじめに見出した。





**Fig. 3-1.** The possibility of cell stabilization by compatible solute at water loss. Illustration cites Hoekstra *et al.*, 2001.

**Table 3-1.** Biomolecule protection by sucrose. LDH: Lactate Dehydrogenase, PFK: Phosphofructokinase.

Compounds	Conditions	Protected substances	Methods	Concentration in experiment	Results	References
Sucrose	Freeze-thawed	LDH	Enzymatic activity (fluorescence at 344 nm)	1 M	Activity of LDH with no additives, after a freeze-thawed cycle was 56%, after 5 cycles was 0%. In the Activity of LDH with 1M of sucrose, after a freeze-thawed cycle was 96%, after 5 cycles was 73%.	Göller and Galinski, 1999
		PFK	Enzymatic activity (Fructose 1,6-bisphosphate-coupled assay; Bock and Frieden, 1974)	0-500 mM	Activity of PFK with no additives, after a freeze-thawed cycle was 0%. Activity of PFK with 500 mM of sucrose, after a freeze-thawed cycle was 75%. Activity of PFK with 500 mM of sucrose and 0.6 mM of ZnSO <sub>4</sub> , after a freeze-thawed cycle was 90%.	Carpenter <i>et al.</i> , 1986
	Air-dried	Liposome	Leakage of the soluble fluorescence marker; carboxyfluorescein (CF) from the vesicles. Membrane fusion determined by a membrane lipid mixing assay	0-20 mg/mL	Leakage of CF and membrane fusion were prevented with 0-20mg/mL of sucrose.	Hincha and Hagemann, 2004

**Table 3-2.** Protein protection by glycine. PFK: Phosphofructokinase.

Compounds	Conditions	Protected substances	Methods	Concentration in experiment	Results	References
Glycine	Freeze-thawed	PFK	Enzymatic activity (Fructose 1,6-bisphosphate coupled assay; Bock and Frieden, 1974)	0-500 mM	Activity of PFK with no additives, after a freeze-thawed cycle was 0%. Activity of PFK with 500 mM of glycine, after a freeze-thawed cycle was 15%. Activity of PFK with 20 mM of glycine and 0.6 mM of ZnSO <sub>4</sub> , after a freeze-thawed cycle was 80%.	Carpenter <i>et al.</i> , 1986

**Table 3-3.** Protein protection by betaine. LDH: Lactate Dehydrogenase, MDH: Malate Dehydrogenase.

Compounds	Conditions	Protected substances	Methods	Concentration in experiment	Results	References
Betaine	Temperature (5-65°C)	LDH	Enzymatic activity (fluorescence at 344 nm)	1 M	Activity of LDH with no additives decreased over 42.5°C. The temperature at which maximum LDH activity was observed shifted to 47.5°C in the presence of 1 M of betaine.	Göller and Galinski, 1999
	Freeze-thawed	LDH	Enzymatic activity (fluorescence at 344 nm)	1 M	Activity of LDH with no additives, after a freeze-thawed cycle was 56%, after 5 cycles was 0%. In the Activity of LDH with 1M of betaine, after a freeze-thawed cycle was 81%, after 5 cycles was 38%.	Göller and Galinski, 1999
	Urea-unfolded	MDH	Enzymatic activity (NADH monitored at 340 nm; Diamant <i>et al.</i> , 1995)	0-3.5 M	Activity of MDH (50 µM), which is denatured by 5 M urea and 10 mM dithiothreitol, was refolded by warming at 37°C with 0-3.5 M of betaine.	Diamant <i>et al.</i> , 2001

**Table 3-4.** Protein protection by glucosylglycerol. LDH: Lactate Dehydrogenase, CcStP: Corynebacterium callunae starch phosphorylase, CtXR: Candida tenuis xylose reductase, PfMDH: Pseudomonas fluorescens mannitol 2-dehydrogenase

Compounds	Conditions	Protected substances	Methods	Concentration in experiment	Results	References
Glucosylglycerol	Heat (50°C)	LDH	Enzymatic activity	0.5 M	After heating at 50°C for up to 30min, activity of LDH with 0.5 M of glucosylglycerol was higher than LDH with no additives.	Borges <i>et al.</i> , 2002
	Heat (30-40°C)	LDH CcStP CtXR	Enzymatic activity (NADH was measured by absorption: $\lambda = 340$ nm)	0.5 M	LDH after heating at 40°C for up to 60 min, CcStP after heating at 35°C for up to 300 min and CtXR after heating at 30°C for up to 360 min, activities of each enzyme with 0.5 M of glucosylglycerol were higher than with no additives.	Sawangwan <i>et al.</i> , 2010
	Lyophilization and re-hydration	PfMDH	Enzymatic activity (NADH was measured by absorption: $\lambda = 340$ nm)	2.5-750 mM	Activity of PfMDH (50 $\mu$ g/mL) with no additives, after a freeze-thawed cycle was 10%. Activity of PfMDH (50 $\mu$ g/mL) with 25 mM of glucosylglycerol, after a freeze-thawed cycle was 90%.	Sawangwan <i>et al.</i> , 2010

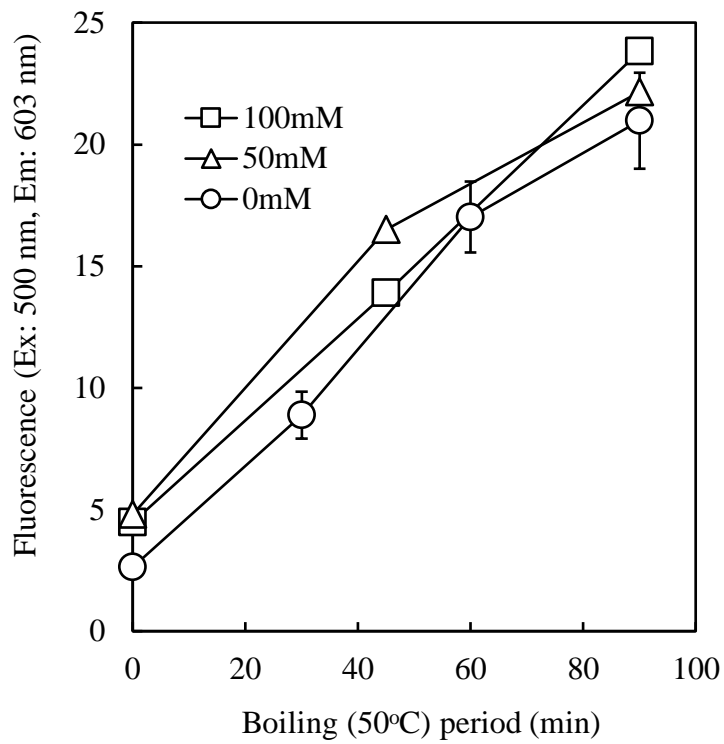
**Table 3-5.** Biomolecule protection by trehalose (1). LDH: Lactate Dehydrogenase, CcStP: *Corynebacterium callunae* starch phosphorylase, CtXR: *Candida tenuis* xylose reductase, PfMDH: *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase, MDH: Malate Dehydrogenase, PFK: Phosphofructokinase,

Compounds	Conditions	Protected substances	Methods	Concentration in experiment	Results	References
Trehalose	Heat	LDH	Enzymatic activity and aggregation (light scattering measurements with excitation and emission at 320 nm)	0.5 M	After heating at 50°C for up to 30min, activity of LDH with 0.5 M of trehalose was higher than LDH with no additives. After heating at 50°C for up to 30min, amount of aggregated LDH with 0.5 M of trehalose was less than that with no additives.	Borges <i>et al.</i> , 2002
		LDH CcStP CtXR PfMDH	Enzymatic activity (NADH was measured by absorption: $\lambda = 340$ nm)	0.5 M	LDH after heating for 40°C upto 60 min, PfMDH after heating for 30°C upto 60 min, CcStP after heating for 35°C upto 300 min and CtXR after heating for 30°C upto 360 min, activities of each enzyme with 0.5 M of trehalose were higher than with no additives.	Sawangwan <i>et al.</i> , 2010
		MDH	Enzymatic activity (NADH monitored at 340 nm; Diamant <i>et al.</i> , 1995)	0-1.3 M	Activity of MDH with no additives, after heating at 44°C was 0%. Activity of MDH with 1.3 M of trehalose, after heating for 44°C was approximately 100%.	Diamant <i>et al.</i> , 2001
Freeze-thawed		LDH	Enzymatic activity (fluorescence at 344 nm)	1 M	Activity of LDH with no additives, after a freeze-thawed cycle was 56%, after 5 cycles was 0%. Activity of LDH with 1M of trehalose, after a freeze-thawed cycle was 96%, after 5 cycles was 73%.	Göller and Galinski, 1999
		PFK	Enzymatic activity (Fructose 1,6-bisphosphate-coupled assay; Bock and Frieden, 1974)	0-500 mM	Activity of PFK with no additives, after a freeze-thawed cycle was 0%. Activity of PFK with 500 mM of trehalose, after a freeze-thawed cycle was 75%. Activity of PFK with 30 mM of glycone and 0.6 mM of ZnSO <sub>4</sub> , after a freeze-thawed cycle was 100%.	Carpenter <i>et al.</i> , 1986

**Table 3-6.** Biomolecule protection by trehalose (2). PfMDH: *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase, MDH: Malate Dehydrogenase.

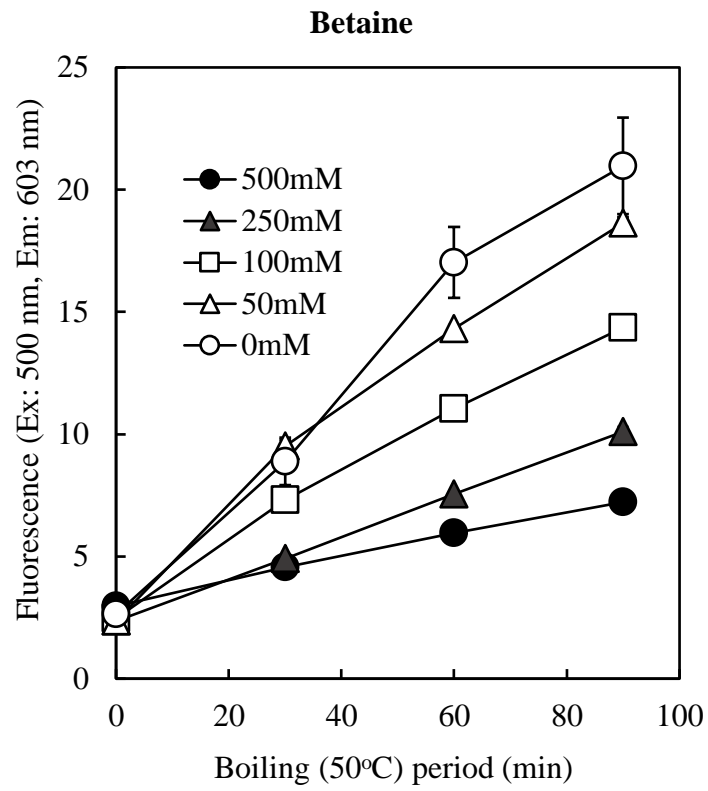
Compounds	Conditions	Protected substances	Methods	Concentration in experiment	Results	References
Trehalose	Lyophilization and re-hydration	PfMDH	Enzymatic activity (NADH) was measured by absorption: $\lambda = 340$ nm)	2.5-750 mM	Activity of PfMDH (50 $\mu$ g/mL) with no additives, after a freeze-thawed cycle was 10%. Activity of PfMDH (50 $\mu$ g/mL) with 0.5 M of $\alpha, \alpha$ -trehalose, after a freeze-thawed cycle was 75%.	Sawangwan <i>et al.</i> , 2010
	Urea-unfolded	MDH	Enzymatic activity (NADH) monitored at 340 nm; Diamant <i>et al.</i> , 1995)	0-1.3 M	Activity of MDH (50 $\mu$ M), which is denatured by 5 M urea and 10mM dithiothreitol, was refolded by warming for 37°C at 0-1.3M of trehalose.	Diamant <i>et al.</i> , 2001
	Air-dried	Liposome	Leakage of the soluble fluorescence marker; carboxyfluorescein (CF) from the vesicles. Membrane fusion determined by a membrane lipid mixing assay	0-20 mg/mL	Leakage of CF and membrane fusion were prevented with 0-20mg/mL of trehalose.	Hincha and Hagemann, 2004

### Glucosylglycerol

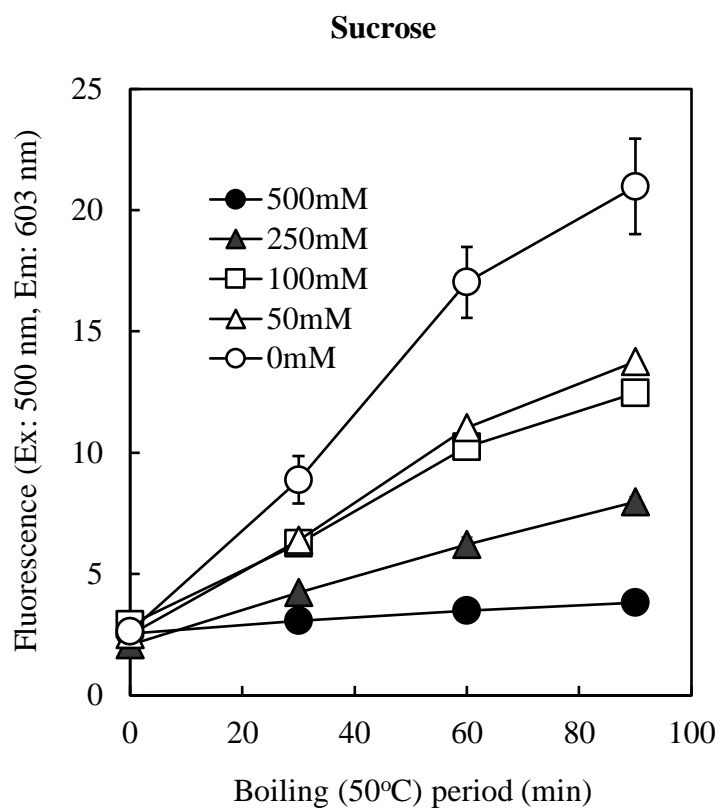


**Fig. 3-2.** Effects of glucosylglycerol on the aggregation of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LDH boiled at 50°C. (a): glucosylglycerol. (b): betaine. (c): glycine. (d): sucrose. (e): trehalose.

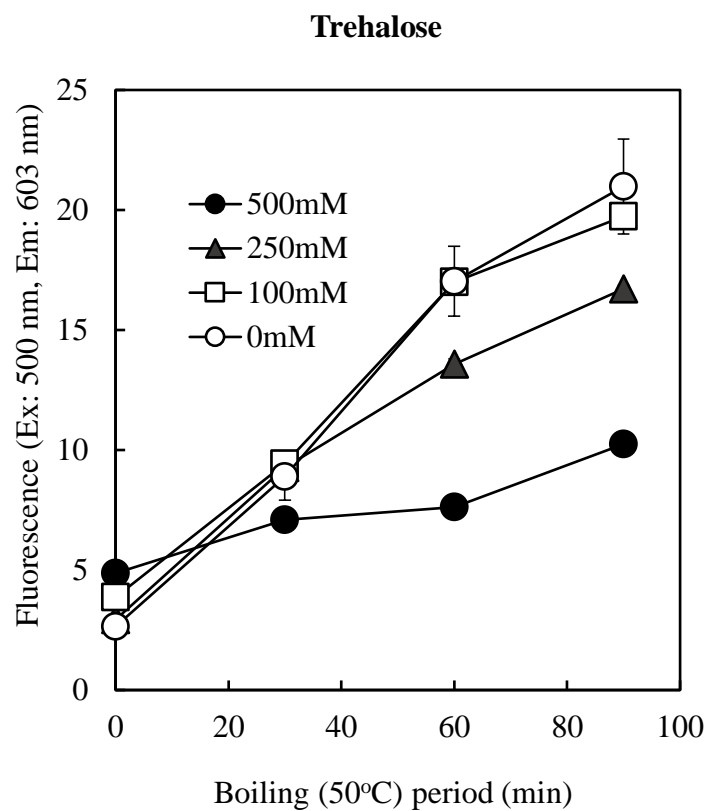




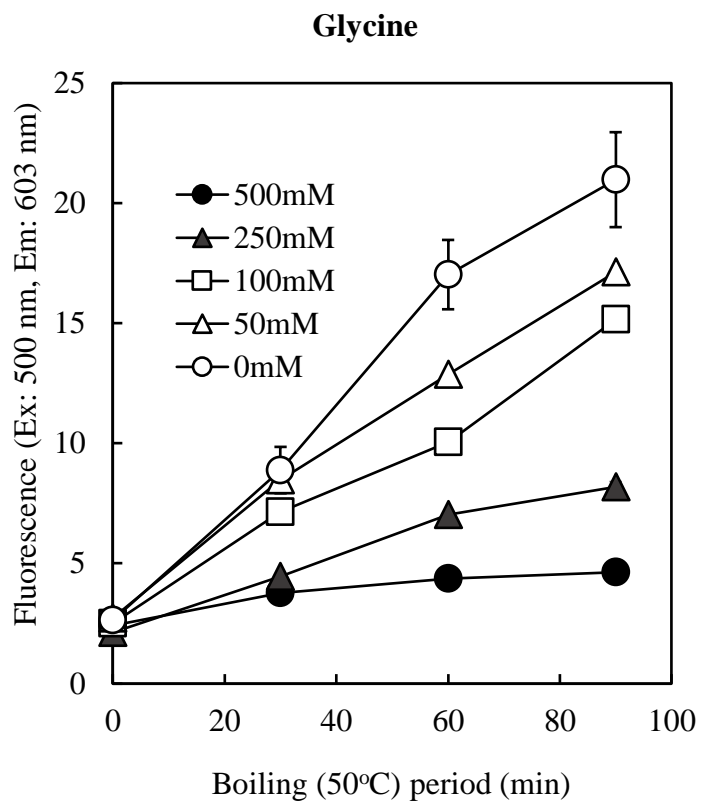
**Fig. 3-3.** Effects of betaine on the aggregation of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LDH boiled at 50°C.



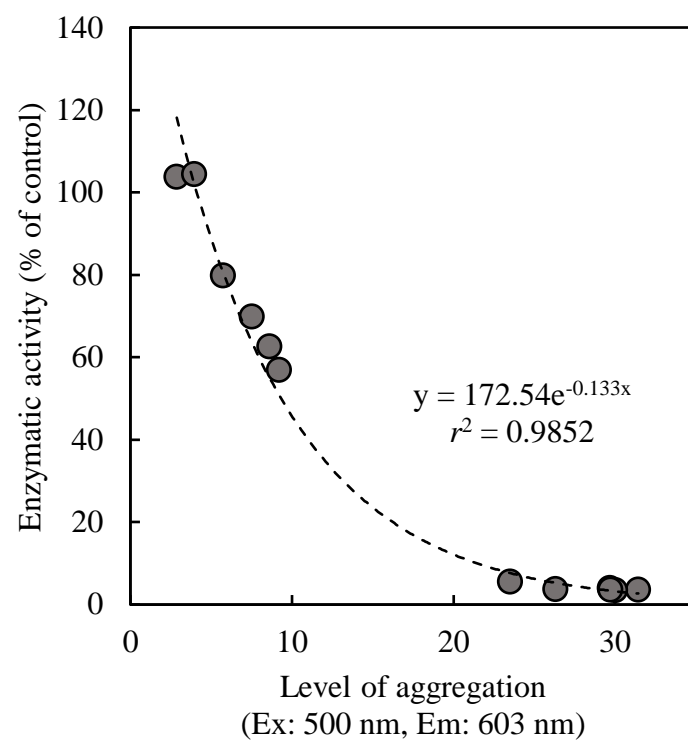
**Fig. 3-4.** Effects of sucrose on the aggregation of 200 µg/mL LDH boiled at 50°C.



**Fig. 3-5.** Effects of trehalose on the aggregation of 200 µg/mL LDH boiled at 50°C.

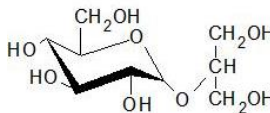
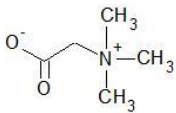
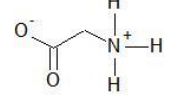
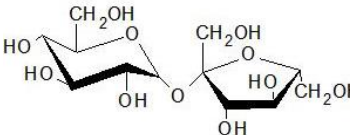
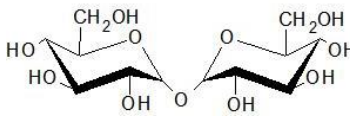


**Fig. 3-6.** Effects of glycine on the aggregation of 200 µg/mL LDH boiled at 50°C.



**Fig. 3-7.** Correlation between enzymatic activity (% of control) and the level of LDH aggregation (n=12).

**Table 3-7.** Compatible solutes in akinetes of *Nostoc* sp. HK-01. \*Values from colonies with high akinete content. \*\*Protein protective activity tested by LDH aggregation after heating (50°C).

	Chemical formula	Molecular weight	Amount / 10 <sup>8</sup> cells*	Accumulation in akinetes specifically	Protein protect activity to heat**	Structure
Glucosyl-glycerol	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	254.23	30 ng	+	-	
Betaine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117.15	18 ng	+	+	
Glycine	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75.07	18 μg	+	+	
Sucrose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.30	17 μg	+	+	
Trehalose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.30	30 ng	-	+	

## 総合考察

## 総合考察

熱は生体内のタンパク質、DNA および脂質膜を損傷させるため、多くの生物は高温環境で生存できない (Table 0-1)。一方で、湿熱耐性を備える生物のグループとして超好熱菌 (Hyperthermophile) や好熱性藍藻 (Thermophilic cyanobacteria) が、乾熱耐性を備える生物として古草菌 (*Bacillus subtilis*)、クマムシ (*Tardigrades*)、ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) およびイシクラゲ、ハッサイと呼ばれる陸棲藍藻 (*Nostoc*) が知られている。これら生物の熱耐性のしくみは一部解明されているが、陸棲藍藻の乾熱耐性の具体的なしくみは未だ明らかにされていない (Table 0-2)。陸棲藍藻の乾熱耐性は、陸棲藍藻が過酷な陸上で生存するために必要不可欠な要素である。本論文は、陸棲藍藻の乾熱耐性を解明するため、極めて高い環境耐性が報告されている *Nostoc* sp. HK-01 に注目し、乾熱耐性のしくみに関わる可能性のある候補として、まず細胞形態による耐性の違いを、次に細胞外多糖類の熱耐性への貢献を、そして細胞内に蓄積される適合溶質について検証した。

第1章は、*Nostoc* sp. HK-01 の分化する細胞形態によって耐性が異なる可能性があることから、詳細が明らかにされていない *Nostoc* sp. HK-01 の生活環を検証した後、乾燥藻体への乾熱曝露後に細胞形態ごとの生存率を算出した。*Nostoc* sp. HK-01 の、休眠細胞 (akinete) から発芽・伸長して栄養細胞 (vegetative cell) に分化し、さらに連鎖体 (hormogonia)、異型細胞 (heterocyst) および休眠細胞に分化する生活環を明らかにした (Fig. 1-4 and 1-16)。乾燥と乾熱後に、休眠細胞



以外の細胞形態は死滅したが休眠細胞は生存していた結果から、休眠細胞のみが乾燥と乾熱に耐性を備える細胞形態であることを明らかにした (Fig. 1-7, 1-8 and 1-9)。休眠細胞への分化は、陸棲藍藻が日照りに曝される陸地環境で生存するための極めて重要な機能であることをはじめて明らかにした。休眠細胞に分化しない陸棲藍藻は、休眠細胞への分化とは異なる乾熱耐性のしくみを備えている可能性が合わせて示された。湿熱曝露後に細胞形態ごとの生存率を算出することおよび、乾燥過程に細胞形態が変化するかどうか検証することで、熱に耐える準備が熱耐性の高い細胞形態への分化時に行われているのか乾燥時に行われているのか検証した。乾燥過程における休眠細胞への分化促進が見出されなかった結果および (Fig. 1-10 and 1-11)、湿潤藻体においても、休眠細胞は栄養細胞と比べて優れた熱耐性 (50°C) を備えていた結果から (Fig. 1-12 and 1-13)、栄養細胞から休眠細胞への分化の過程で、熱耐性に関与する機能分子が休眠細胞に蓄積されていると考えられた。*Nostoc* sp. HK-01 の分泌する細胞外多糖 (extracellular polysaccharides; EPS) が乾熱耐性に関与している可能性に注目し、EPS 除去方法を検討した後、EPS 除去後の乾熱耐性の変化を検証した。Fig. 1-3 に示す EPS 除去処理により *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体から EPS を除去できることをアストラブルー染色により確認した (Fig. 1-14)。EPS 除去前後の乾熱耐性を比較すると、EPS の有無による熱耐性の著しい変化は認められず、UV 耐性や塩耐性と異なり、EPS の乾熱耐性への貢献は低いことが示された (Fig. 1-14, Fig. 1-15)。乾熱後の生存細胞は全て休眠細胞であることを確認し (data not shown)、熱耐性に関わる機能分子は休眠細胞の細胞内に蓄積されていることを

明らかにした。EPS は急速な乾燥などの環境変化を防ぐことで、休眠細胞への分化等、乾熱耐性に必要な代謝を行う時間を確保する役割を果たし、間接的に乾熱耐性に貢献している可能性が考えられた。五十嵐 (2013) は、100°C、10 時間の乾熱が *Nostoc* sp. HK-01 の生存限界であると報告している。しかし本研究で 100°C、12 時間の乾熱後に生存が認められた結果は (Fig. 1-15)、*Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性に対する生存限界は再検証の余地があることおよび、スクリーニングによりさらに高乾熱耐性を備えた株を単離できる可能性を示した。

第 2 章は、*Nostoc* sp. HK-01 の細胞内低分子化合物の分析を行い、休眠細胞に蓄積されている低分子化合物を探索し、HPLC および LC-ESI/MS を用いて単離・同定後、定量した。*Nostoc* sp. HK-01 は休眠細胞のみの藻体 (細胞群) の作出は困難な種であることから、全細胞中の休眠細胞の存在の割合が異なる藻体を作成した後、休眠細胞にのみ蓄積される耐性物質を、休眠細胞の割合の差を元に探索した。各藻体から得られた抽出物 (水溶性) を HPLC および LC-ESI/MS を用いて分離・分析した。休眠細胞に蓄積する成分は、LC-ESI/MS 分析により、各抽出物成分量が著しく異なる分子量を詳細に解析することで得た。Sucrose、glycine、betaine、glucosylglycerol および trehalose の 5 種を HPLC および LC-ESI/MS レベルで同定した (Fig. 2-2~2-9)。Trehalose を除く 4 種が休眠細胞に特異に蓄積していることをはじめて見出した (Fig. 2-10~2-14)。藍藻の休眠細胞は他の細胞形態と比べて厚い細胞壁を備え、glycogen および cyanophycin の顆粒を蓄積することが知られているが (Adams and Duggan, 1999; Garcia-Pichel, 2010; Kaplan-Levy *et al.*, 2010)、適合溶質として機能し、生体分子を保護する物質の休眠細胞への蓄

積は明らかにされていなかった。休眠細胞に分化する条件や単離の方法はまだ確立されていないが、本研究は休眠細胞含有率の異なる藻体を材料に用いて細胞内物質の定量を行うことで、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞に蓄積されている化合物をはじめで見出した。

第3章は、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞で同定された sucrose、glycine、betaine、glucosylglycerol および trehalose を材料に用い、タンパク質の凝集量および酵素活性を指標に、生体分子の保護活性を検証した。タンパク質は、適合溶質の活性測定モデル酵素として用いられている乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase; LDH) を用いた (Borges *et al.*, 2002)。Glucosylglycerol を除く4種は、タンパク質保護機能を備えることを実験的に示した (Fig. 3-2 ~ 3-7)。低分子化合物によるタンパク質保護活性の一部が明らかにされていたが (第三章序論)、sucrose、glycine、1 M 未満の betaine、0.5 M 未満の glucosylglycerol および 0.5 M 未満の trehalose の熱耐性への関与は示されていなかった。LDH を 50°C で加熱し、凝集量を測定した結果、betaine および trehalose を 100 mM 以上で、sucrose および glycine を 50 mM 以上添加した際に、熱凝集を抑制する活性を示すことを見出した (Fig. 3-3 ~ 3-6)。休眠細胞含有率の高い藻体の  $1.0 \times 10^8$  cells あたりの sucrose および glycine の蓄積量はそれぞれ 17  $\mu\text{g}$  および 18  $\mu\text{g}$  で、glucosylglycerol、betaine および trehalose と比較して約 1000 倍多く認められた (Fig. 2-10 ~ 2-14 and Table. 3-7)。これらの結果から、sucrose と glycine が、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の乾熱耐性に関わる主な機能物質である可能性を示した。

陸棲藍藻の乾熱耐性のしくみはこれまで明らかにされていなかったが、本研

究により、休眠細胞への分化時に特に sucrose および glycine を蓄積することが、陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性に重要であることをはじめて示した (Fig. 4-1 and Table 4-1; Kimura *et al.*, 2015a, 2017ab)。本研究における陸棲藍藻の乾熱耐性機能に関する結果は、微生物や植物のみならず、全生物の細胞や組織の熱に対する耐性機能の付与や保護に、大きく貢献できると考えられる (Fig. 4-2)。

水棲藍藻において、寒期に休眠細胞に分化し、暖期に発芽して栄養細胞となる生活環が報告されている一方、陸棲藍藻において、生活環における休眠細胞分化の意義は示されていなかった ()。本研究結果から、陸棲藍藻は、生息する陸上環境において、雨、川および田畑の水分を用いて代謝を行い、栄養細胞、連鎖体および異型細胞からなる糸状体 (trichome) に分化して増殖し、生育に不適切な環境を感知すると、EPS が急激な環境変化を防ぐ機能を果たしている間に適合溶質である sucrose および glycine を蓄積して休眠細胞に分化し、日照りによる乾熱に備える、一連の生存戦略が推測された。しかし、湿潤状態の藻体において増殖を続ける糸状体と多くの休眠細胞が混在して認められたこと (Fig. 1-3 and 1-4A)、休眠細胞の一部は再び発芽する様子も確認されたこと (Fig. 1-3)、乾燥により容易に死滅する糸状体が多数確認されたこと (Fig. 1-4B and 1-5)、および乾燥による休眠細胞への分化の促進が見出されなかったことから (Fig. 1-10 and 1-11)、陸棲藍藻の藻体中の細胞は、乾燥をはじめとした環境変化を感知して一斉に休眠細胞への分化を開始しているとは考えにくい。詳細は明らかにされていないが、藍藻の *Cylindrospermum licheniforme* の休眠細胞を形成した培養の濾液から休眠細胞の分化誘導活性が報告されていることから (Fisher and Wolk,

1976; Hirose and Wolk, 1979ab)、濃度依存的に他細胞の休眠細胞への分化および適合溶質の蓄積を誘導し、湿潤状態においても藻体中に常に一定割合の休眠細胞を保つなど、藻体内の細胞の死滅を避ける何らかの複雑な戦略を陸棲藍藻が備えている可能性が考えられる。陸棲藍藻が乾熱に曝される陸上で生存する戦略の解明には、休眠細胞の分化機構および、適合溶質蓄積機構の解明が重要である。

細菌の耐熱性細胞として知られる芽胞を形成する細菌は、枯草菌 *Bacillus subtilis* (蜂須賀, 1980; Gerhardt and Marquis, 1989; Setlow, 2006)、ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* (瀬尾, 1973)、アンフィバチルス属細菌 *Amphibacillus xylanus* (Niimura *et al.*, 1990)、スポロサルシナ属細菌 *Sporosarcina* 等 (Magill *et al.*, 1990)、グラム陽性細菌に属している。芽胞は酵母、サルモネラのような無芽胞性の食中毒細菌やグラム陰性細菌に比べて極めて高い耐熱性を示す (渡部, 2001)。西田 (1976) は spore および spore-like organelle を形成する菌種のすべてはグラム陽性の側にあり、陰性側に無いと述べている。例外的に、グラム陽性細菌門であるファーミキューテス門 (firmicutes) の中の 10 種がグラム陰性を示すことが報告されており、そのうち 3 種、*Acetonema longum*、*Pelosinus fermentans* および *Sporomusa ovata* が spore を形成することが知られているが (Möller *et al.*, 1984; Poehlein *et al.*, 2013; Yutin and Galperin 2013)、以上のように基本的に胞子を形成する細菌はグラム陽性に属している。グラム陰性細菌に属する藍藻が (Hoiczkyk and Hansel, 2000)、休眠細胞を形成し、かつ優れた乾熱耐性を示すことは特殊な現象であり、そのしくみの解明は新規性が高いと考えられる。

陸棲藍藻が備える乾熱耐性の解明は、新たな応用利用の可能性も秘めている。好熱性真正細菌 *Thermus aquaticus* YT1 から単離された耐熱性 DNA ポリメラーゼは、DNA 変性のための 90°C 以上の熱環境で失活しないため、試験管内で DNA 鎖を合成する PCR (polymerase chain reaction) 法に応用され、世界中で用いられている (Saiki *et al.*, 1988; 石野, 2012)。湿熱環境において好熱性藍藻の光合成機能を保護していると考えられている熱ショックタンパク質 (heat shock protein; HSP) は (Tanaka and Nakamoto, 1999; 仲本, 2002; 佐々木ら, 2004)、ヒトにおいて血管新生促進作用、抗動脈硬化作用、心血管病からの保護作用、抗炎症、抗アポトーシスおよび抗酸化作用を示すことから、慢性心不全患者の心機能と血管機能を改善する和温治療に応用されている (宮内ら, 2012)。HSP は癌治療においても重要である。正常組織は、毛細血管が発達しているため、温熱により血管拡張し、組織温度が上がらない一方、癌組織は、急速に新生したため温熱順応性に乏しく、熱感受性が高いことを利用して、42°C 程度で温熱することで、癌組織の細胞のみ死滅させる温熱療法の研究が進められている。しかし、癌細胞は、正常細胞と同様に HSP を合成して熱耐性を獲得するため、癌細胞に熱耐性を獲得させないために、HSP の挙動や加温のタイミングの研究が行われている (秦・上原, 1993; 大西, 2007; 伊藤, 2014; 日本ハイパーサーミア学会 HP)。このように、これまで解明されてきた生物の熱耐性機構の一部は、人類に大きな利益をもたらしている。本研究は、休眠細胞内に蓄積される適合溶質が陸棲藍藻の乾熱耐性に重要であることを示した。Crowe らのグループは人間の血小板および赤血球の常温乾燥保存に成功している (Wolkers *et al.*, 2002; 奥田 2006)。Livine らの

グループは人間の培養細胞の 3 日間乾燥保存に成功している (Guo *et al.*, 2000; 奥田 2006)。Seki らの研究グループはラットの心臓を trehalose で灌流することで、10 日間乾燥保存後に心臓を鼓動させることに成功している (Seki, 2002; ワートン, 2004)。適合溶質の研究がもたらす、生体物質の保存方法の開発は、医学、産業、環境保護の分野での応用が可能になると期待されている (ワートン, 2004)。乾燥保存後に乾燥状態で熱に曝されても蘇生に必要な機能を保ち、再加水により蘇生する陸棲藍藻の休眠細胞の乾熱耐性のメカニズムの解明は、光合成機能をはじめとした植物細胞機能の保護など、新たな細胞保護の応用が期待される (Fig. 4-2)。

休眠細胞の分化誘導や適合溶質蓄積能の高い株のスクリーニングが達成されれば、より耐性の高い藍藻藻体の作出が可能であると考えられる。高耐性藻体の作出は、過酷な環境における生存が求められる荒廃土壌修復や砂漠化抑制への陸棲藍藻の応用において利用価値が高いと考えられる (大森・犬伏, 2004; Obana *et al.*, 2007)。さらに、将来の有人火星活動においても利用価値が高い。日本を含む世界各国は、2030 年以降の有人火星探査を目指している (グローバル探査戦略, 2007; 首相官邸, 2008; Badescu, 2009; Casaregola *et al.*, 2009; 国際宇宙探査協働グループ, 2011, 2013; International Space Exploration Coordination Group, 2011, 2013; 2018; Ehrenfreund *et al.*, 2012; Salotti and Heidmann, 2014; 宇宙開発戦略本部, 2015; 桜井・木部, 2015; 内閣府 HP; ISECG HP; JAXA 宇宙情報センターa)。有人火星探査は 900 日を超える長期ミッションとなり、物資の補給も困難であることから、水、酸素、食料および固形廃棄物等を再生し、持続的な食料生産をすること

が求められる（西村, 1985; 大西, 2006, 2015; 桜井・木部, 2015; 宮嶋, 2015; 山下, 2015; JAXA 宇宙情報センターb）。火星で食料生産を行うには、その初期段階において火星の無機環境を農業用に整備する必要がある（石川, 1997; 山下ら, 2005, 2007; Yamashita *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009; 和田, 2007; Kanazawa *et al.*, 2008; 山下, 2015）。太古の地球において光合成と窒素固定により多量の有機物を陸上にもたらし、陸の表面を岩石から土壌へと変化させ、植物が生育可能な環境を整えたと考えられている陸棲藍藻は、火星における農業の初期段階において、大気の酸化、火星レゴリスの土壌化および食資源としての利用を目指して火星に導入する生物候補として有用であると考えられている（大森, 2006; Obana *et al.*, 2007; Arai *et al.*, 2008; Oarga, 2009; Katoh *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2015b; 富田-横谷, 2015; 木村・富田, 2016; 木村ら, 2016; Verseux *et al.*, 2016）。火星農業に陸棲藍藻を導入することを想定すると、火星までの運搬過程には真空、宇宙線、低温および高温など過酷な宇宙環境に曝される可能性がある（高橋・菅, 1987; 五家, 2006; Baglioni *et al.*, 2007; 山岸ら, 2010; Horneck *et al.*, 2010; Kawaguchi *et al.*, 2013）。宇宙空間の温度は、低地球周回軌道（low earth orbit; LEO）で約  $1,360 \text{ W m}^{-2}$  の太陽光が照射されることおよび大気の対流が無いことにより、極めて高温になり得る（Nicholson *et al.*, 2000; Baglioni *et al.*, 2007; Horneck *et al.*, 2010）。国際宇宙ステーション（ISS）の耐熱温度は  $120^{\circ}\text{C}$  に設定されている（Nicholson *et al.*, 2000; Baglioni *et al.*, 2007; Horneck *et al.*, 2010）。過去に、スペースシャトルの荷台部の温度で  $100^{\circ}\text{C}$  が観測されている（Halstead and Dutcher, 1984; 高橋, 1987）。金星周回軌道に投入された日本の金星探査機「あかつき」は、メインエンジンの



トラブルにより太陽に近いコースを飛行した結果、想定されていた最高温度 100°Cを上回る 140 度の熱に曝されたと報じられている (NHK 科学文化部, 2015; JAXA/ISAS HP)。ホーマン軌道を用いた運搬 (西村, 1985; 宮嶋, 2015; JAXA 宇宙情報センターb) やスイングバイ、あるいは不慮のトラブルを考えると、地球から火星までの運搬過程で想定される宇宙環境は、太陽光の直射により 100°Cを超える高温に至る可能性がある。陸棲藍藻の乾熱耐性を解明し、高耐性の藻体が作出できれば、将来の有人火星活動においても利用価値が高いと考えられる (Fig. 4-2)。

本研究は、*Nostoc* sp. HK-01 の詳細な生活環を明らかにした後、乾燥藻体の乾熱耐性に関わる機能分子が休眠細胞の細胞内に存在すること、休眠細胞への分化過程に蓄積されていることおよび、sucrose と glycine が機能分子の候補であることをはじめて明らかにした (Fig. 4-1 and Table 4-1)。陸棲藍藻の一連の生存戦略の推測から、休眠細胞の分化機構および、適合溶質蓄積機構の解明が、陸地における生存戦略の解明に重要であることを示した。休眠細胞の調製、細胞内水分量の測定および、水画分以外からの適合溶質の探索を行うことで、熱耐性に関わる機能分子のより包括的な理解に繋がることを示した。耐性機能に優れた藍藻藻体が作出されれば、地球における荒廃土壌修復や砂漠化抑制に加え、将来の有人火星活動においても陸棲藍藻の利用価値が高いことを示した。本研究成果は、他藍藻の各種環境耐性に関わる機能分子解明へ波及することにより、藍藻の新たな応用利用をもたらす可能性が期待できる (Fig. 4-2)。本研究は、藍藻の陸地における生存のしくみの解明に極めて重要であるだけでなく、さらに幅広い応

用利用の可能性を秘めている陸棲藍藻の乾燥藻体の熱耐性の、その全容解明のための重要な基礎情報を得ることを達成した。

## 陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体の乾熱耐性

### 序章

**背景：** 陸棲藍藻の乾熱耐性のしくみは未解明  
乾熱耐性は陸棲藍藻の生存に必須

**目的：** 乾熱耐性機能の全容解明のための  
重要な基礎情報の取得

### 材料：

高い環境耐性を備えた  
陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01

### 第1章：細胞形態と細胞外多糖

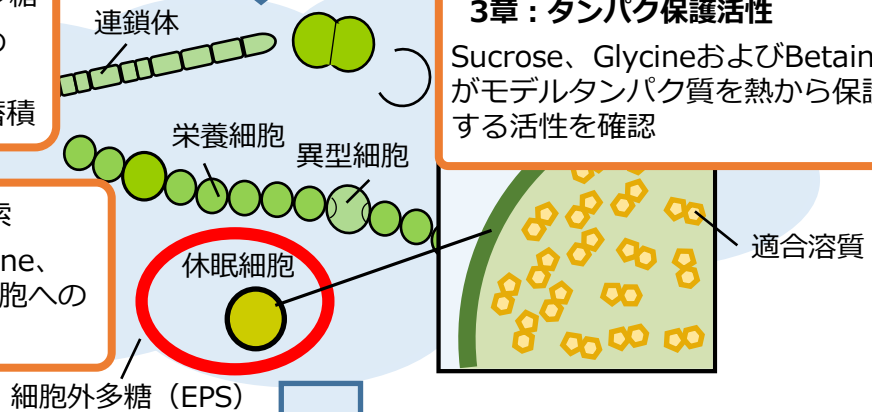
機能性分子は休眠細胞の  
内側に存在  
休眠細胞への分化時に蓄積

### 第2章：低分子化合物の探索

Sucrose、Glycine、Betaine、  
Glucosylglycerolの休眠細胞への  
特異な蓄積を確認

### 3章：タンパク保護活性

Sucrose、GlycineおよびBetaine  
がモデルタンパク質を熱から保護  
する活性を確認



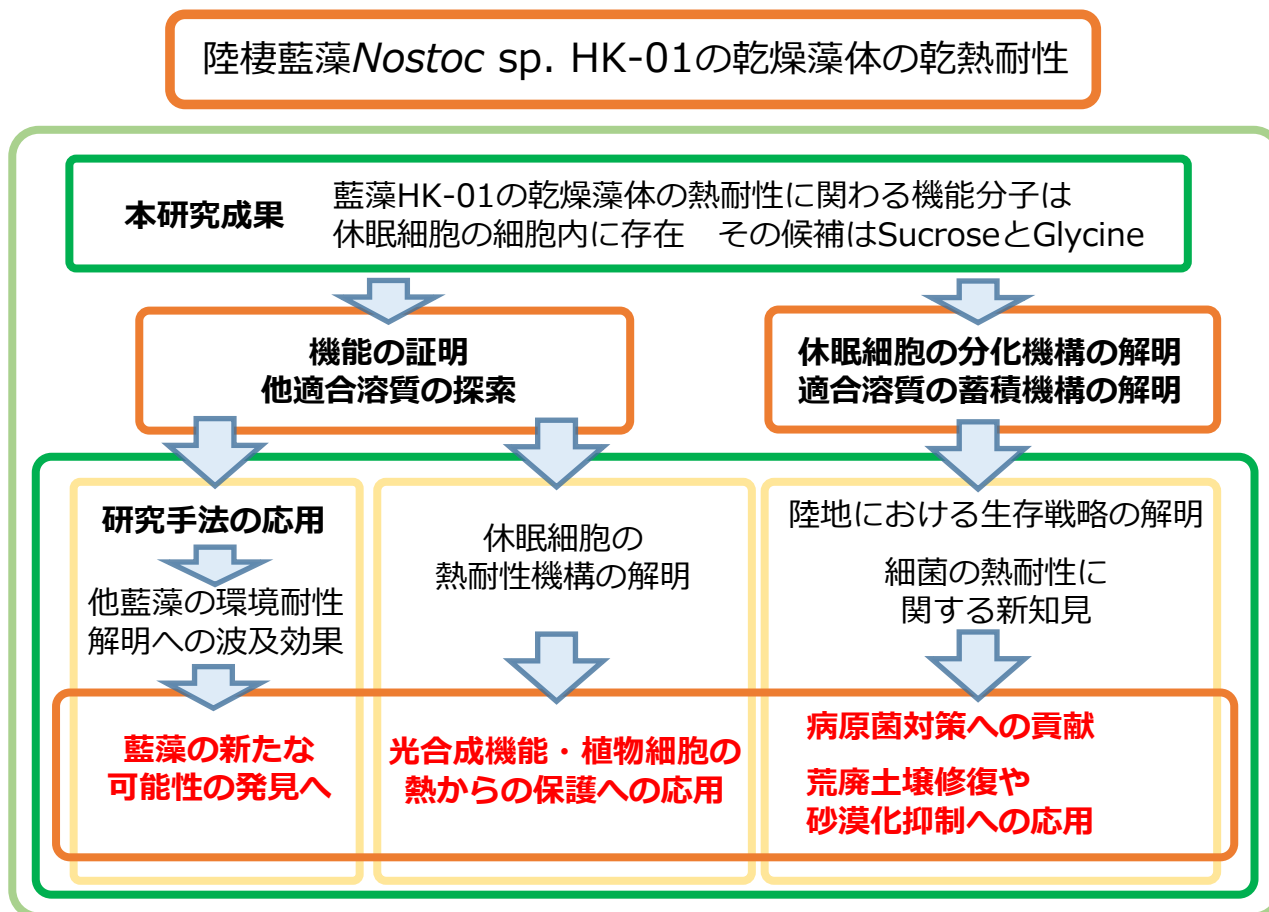
### 総合考察

陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 は休眠細胞への分化時に  
Sucrose と Glycine を蓄積することで乾熱に耐えている可能性を示した  
低分子化合物の低濃度におけるタンパク質の熱保護の活性を示した  
乾熱耐性機能の全容解明のための重要な基礎情報を得た

Fig. 4-1. Results of this study (in Japanese).

**Table. 4-1.** Species which have heat tolerance and contribution of this study. The sentence with red letters indicates contributions of this study.

	Species	Tolerant temperature	Reported mechanism	References
Wet heat tolerance	Hyperthermophile	80~122°C	Thermally-stable protein, Reverse gyrase, Low-fluidity lipid membrane and protection of Metabolic intermediate.	Atomi <i>et al.</i> , 2004; Takai <i>et al.</i> , 2008; Matsuno <i>et al.</i> , 2009; Boyd <i>et al.</i> , 2011; Sato and Atomi, 2015 (In Japanese).
	Thermophilic cyanobacteria	51~74°C	Thermally-stable protein, Heat shock protein	Tanaka and Nakamoto, 1999; Jordan <i>et al.</i> , 2001; Zouni <i>et al.</i> , 2001; Nakamura <i>et al.</i> , 2002; Ward <i>et al.</i> , 2012
Dry heat tolerance	<i>Bacillus subtilis</i>	90~120°C	Dehydrated Spore. Accumulation of dipicolinic acid (DPA), small acid-soluble spore proteins (SASP)	Hachisuka, 1980 (In Japanese); Setlow, 2006
	<i>Tardigrades</i>	60~110°C	Cryptobiosis (Tun formation). Accumulation of trehalose as compatible solute, active dehydration	Hengherr <i>et al.</i> , 1993; Okuda, 2006 (In Japanese); Horikawa and Arakawa, 2015
	<i>Polypedilium vanderplanki</i>	70~90°C	Cryptobiosis. Accumulation of Trehalose and glycerol as compatible solute.	Okuda, 2006 (In Japanese); Sakurai <i>et al.</i> , 2009
	<i>Nostoc</i>	60~over 100°C	Differentiation to akinetes which accumulate sucrose and glycine.	Mei and Cheng, 1990; Gao, 1998; Tamaru <i>et al.</i> , 2005; Igarashi, 2013(In Japanese); Kimura <i>et al.</i> , 2015, 2017ab



**Fig. 4-2.** Useful application of this study (in Japanese).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、筑波大学 生命環境系 市川創作 教授より始終適切な御指導を頂きました。本稿をまとめるにあたり、筑波大学 生命環境系 橋本義輝 准教授、並びに筑波大学 生命環境系 吉田滋樹 准教授に貴重な御助言を頂きました。本研究の遂行及び本稿をまとめるにあたり、筑波大学 生命環境系 富田-横谷香織 講師に終始適切な御指導と御鞭撻を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

藍藻株の提供および多くの貴重なご助言を賜りました、東京大学 大森正之名誉教授、並びに三重大学 加藤浩 助教に心より感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり貴重なご助言を賜りました、筑波大学 佐藤誠吾 名誉教授、独立行政法人宇宙航空開発機構 山下雅道 名誉教授、早稲田大学 園池公毅 教授、十文字女子大学 木村靖子 教授、香川大学 鈴木利貞 准教授、京都大学 馬場啓一 助教、東京電機大学 安部智子 助教、日本科学未来館 新井真由美 博士、筑波大学 五十嵐裕一 氏、筑波大学 オン碧 氏並びに東京薬科大学 山岸明彦 教授に心より感謝申し上げます。本研究の遂行および本稿をまとめるにあたり、筑波大学 生命環境科学研究科 富田-横谷研究室の味岡令子 氏、千田ゆかり 氏、藤代華歌 氏、横島美香 氏、新津史恵 氏、井上琴美 氏、阿部友亮 氏、加藤木ひとみ 氏、猪坂純平 氏、大山真來 氏、小林弘人 氏、並びに高原萌 氏には、多大なご協力を頂きました。ここに心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、独立行政法人 日本学生支援機構、一般財団法人 中西奨学会、公益財団法人 日本証券奨学財団、並びに独立行政法人 日本学術振興会からご支援頂き、活動費を賄いました。ここに心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- 赤沼哲史・山岸明彦（2009）好熱菌のタンパク質はなぜ熱に強いのか. *生化学*, **81**, 1064-1071.
- 味噌令子（2014）ガンマ線（5 kGy）曝露が陸棲ラン藻 *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥藻体に与える影響. 筑波大学大学院生命環境科学研究科生物資源科学専攻修士（農学）学位論文.
- 新井真由美（2009）火星を想定した宇宙農業におけるラン藻の活用. 筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻博士（学術）学位論文.
- 五十嵐裕一（2013）陸棲ラン藻 *Nostoc* sp. HK-01 の高温耐性. 筑波大学大学院生命環境科学研究科生物資源科学専攻修士（学術）学位論文.
- 池内昌彦（2007）地球と生命の歴史を作った光合成. 東京大学光合成教育研究会編, 光合成の科学. 19-21. 東京, 東京大学出版会.
- 石川洋二（1997）火星の生命 PART2 火星の環境と生命. *Biological Sciences in Space*, **11**, 3-12.
- 石野良純（2012）耐熱性 DNA ポリメラーゼ:PCR への利用から現在まで. *生物工学会誌*, **90**, 649-653.
- 伊藤政博, 道久則之, 鳴海一成, 東端啓貴, 為我井秀行, 國枝武和, 伊藤隆, 佐藤孝子, 中村聡（2014）極限環境生命: 生命の起源を考え, その多様性に学ぶ, 東京, コロナ社, pp. 232.
- 伊藤要子（2014）ヒートショックプロテイン（HSP70）の魅力. *日温気物医誌*, **77**, 222-226.
- 井上勲（2007）藍藻 30 億年の自然史 第二版 藍藻からみる生物進化・地球・環境. 東京, 東海大学出版会, pp. 643.
- 上田成子（1997）好熱菌. *日本食品科学工学会誌*, **44**, 77-77.
- 宇宙開発戦略本部（2015）宇宙基本計画工程表法（平成 27 年度改訂）.  
[http://www8.cao.go.jp/space/plan/plan2/kaitei\\_fy27/kaitei\\_fy27.pdf](http://www8.cao.go.jp/space/plan/plan2/kaitei_fy27/kaitei_fy27.pdf)

- 梅田真郷・榎本和生 (1999) 膜融合におけるリン脂質ダイナミクスと細胞骨格制御. *生物物理*, **39**, 18-23.
- 大塚徳勝 (1999) 熱はどのようにして伝わるのだろうか. そこが知りたい物理学. Chapter 29, 134-137, 東京, 共立出版株式会社.
- 大西武雄 (2007) 注目されるハイパーサーミアがん治療: そのしくみを科学する. *日本補完代替医療学会誌*, **4**, 1-7.
- 大西充 (2006) 有人宇宙活動に向けた生命維持システムの研究開発. 平成 18 年度宇宙環境利用の展望, 第 2 章, 一般財団法人宇宙システム開発利用推進機構.
- 大西充 (2015) 生命維持システムの現状: 国際宇宙ステーションを中心として. 閉鎖生態系・生態工学ハンドブック (大政謙次, 竹内俊郎, 木部勢至朗, 北宅善昭, 船田良監修, 生態工学会出版企画委員会編). 1章, 24-37. 東京, アドスリー.
- 大森正之・犬伏和之 (2004) 土壌圏の創生とラン藻. *化学と生物*, **42**, 192-197.
- 大森正之, 吉村英尚, 肥後明佳 (2006) 特集シアノバクテリアがひらく新しい世界: 陸に棲むシアノバクテリア. *生物の科学 遺伝*, **60**, 52-57.
- 大森正之 (2009) 藍藻の出現. 光合成と呼吸30講. 第8講, 31-34. 東京, 朝倉書店.
- 奥田隆 (2006) ネムリユスリカの極限的な乾燥耐性とトレハロース. *熱測定*, **33**, 20-26.
- 小野信一・古賀汎 (1984) 水田土壌表層における窒素の自然集積とラン藻による窒素固定: 水田土壌の窒素集積に関する研究 (第 1 報). *日本土壌肥料学雑誌*, **55**, 465-470.
- 尾花望 (2012) 休眠からの目覚め: 細菌胞子の発芽. *生物工学会誌*, **90**, 512.
- オン碧, 木村駿太, 加藤浩, 富田-横谷香織 (2017) 陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の細胞形態、重量及び細胞数. 2017 生態工学会年次大会, P05.



黄川田隆洋 (2009) ネムリユスリカの乾燥耐性: アンヒドロビオシスの分子機構. *比較内分泌学*, **35**, 98-106.

木村駿太, 富田-横谷香織 (2016) 陸棲藍藻が有人宇宙活動導入生物として活躍する可能性. *生物工学会誌*, **94**, 205.

木村初男 (1990) 生体膜の相転移-最近の進歩. *生物物理*, **30**, 45-49.

木村靖子, 木村駿太, 佐藤誠吾, 富田-横谷香織 (2016) 陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の食品としての機能と宇宙食素材としての利用の可能性. *Eco-Engineering*, **28**, 43-51.

グローバル探査戦略 (2007) 国際協働のための共通の認識.

[http://www.jaxa.jp/press/2007/05/20070531\\_ges\\_j.pdf](http://www.jaxa.jp/press/2007/05/20070531_ges_j.pdf)

國枝博信 (2002) 界面活性剤自己組織体溶液の相挙動, 構造, 機能に関する研究. *オレオサイエンス*, **2**, 739-744.

小池裕幸 (2014) “ヘン” な藻類イシクラゲ. 教育×ChuoOnline, 読売新聞.

<http://www.yomiuri.co.jp/adv/chuo/research/20140605.html>

五家建夫 (2006) 宇宙環境リスク事典. 一章, 東京, 丸善株式会社出版サービスセンター. pp. 194.

国際宇宙探査協働グループ (2011) 国際宇宙探査ロードマップ.

[http://www.jspec.jaxa.jp/enterprise/data/roadmap\\_j.pdf](http://www.jspec.jaxa.jp/enterprise/data/roadmap_j.pdf)

国際宇宙探査協働グループ (2013) 国際宇宙探査ロードマップ.

[http://www.jspec.jaxa.jp/enterprise/data/GER\\_V2-J.pdf](http://www.jspec.jaxa.jp/enterprise/data/GER_V2-J.pdf)

佐伯政男・豊田剛己 (2003) 除草剤ベンスルフロンメチルのモデル水田土壌における窒素固定能に及ぼす影響. *日本土壌肥料学雑誌*, **74**, 809-811.

桜井誠人・木部勢至朗 (2015) 有人宇宙活動の将来展望. 閉鎖生態系・生態工学ハンドブック (大政謙次, 竹内俊郎, 木部勢至朗, 北宅善昭, 船田良監修, 生態工学会出版企画委員会編). 1章, 17-23. 東京, アドスリー.

櫻井実 (2001) トレハロースによる生体材料の凍結・凍結乾燥保存のメカニズム.

低温生物工学会誌, **47**, 19-25.

佐々木茂乃, 小林敏明, 熊谷重則, 檜山哲夫 (2004) 熱ショックを与えた藍藻抽出物の線維芽細胞増殖作用およびその他の有用性. *日本化粧品技術者会誌*, **38**, 34-38.

佐藤喬章・跡見晴幸 (2015) 特集 環境ストレスに対する微生物応答と適応機構: 超好熱菌の高温適応戦略. *生物工学会誌*, **93**, 458-472.

澤井淳, 五十嵐英夫, 清水賢 (1995) 加熱による細菌の損傷. *日本食品微生物学会雑誌*, **12**, 79-85.

首相官邸 (2008) 宇宙基本法 (平成二十年法律第四十三号)  
<http://www.kantei.go.jp/jp/singi/utyuu/kihon.pdf>

白木賢太郎 (2004) タンパク質の失活や凝集を抑制する小分子添加剤. *生物物理*, **44**, 87-90.

園池公毅 (2012) トコトンやさしい光合成の本. 東京, 日刊工業新聞社. pp. 160.

瀬尾永樹 (1973) ウエルシュ菌の耐熱性と孢子形成. *金沢大学十全医学会雑誌*, **82**, 78-87.

高橋秀幸・菅洋 (1987) 宇宙船の植物学. 東京, 学会出版センター. pp. 142.

田中文昭 (2010) 分子ロボティクス研究のはじめ方. *日本ロボット学会誌*, **28**, 1151-1154.

たんぽぽ計画 HP. <http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~lcb-7/tanpopo/>

富田-横谷香織 (2015) 生物間相互作用. 閉鎖生態系・生態工学ハンドブック (大政謙次, 竹内俊郎, 木部勢至朗, 北宅善昭, 船田良監修, 生態工学会出版企画委員会編), 4章, 227-232. 東京, アドスリー.

豊田剛己・Kyaw, K. M. (2011) 農薬による土壌微生物の活動制御. *Journal of pesticide science*, **36**, 119-123.

内閣府 HP, 宇宙政策

<http://www8.cao.go.jp/space/index.html>

永田和宏・平芳一法 (1987) 熱ショック蛋白質の発現と機能. *日本ハイパーサーミア学会誌*, **3**, 135-154.

仲本準 (2002) シアノバクテリアの熱ショック応答. *CACS FORUM*, **22**, 20-26.

西田尚紀 (1976) 孢子形成菌のエコロジー. *食品衛生学雑誌*, **17**, 1-11.

西村敏充 (1985) 宇宙飛しょう体の誘導制御問題. *計測と制御*, **24**, 397-402.

日本ハイパーサーミア学会 HP, 温熱療法 (ハイパーサーミア) はなぜ“がん”に効くのでしょうか

[http://www.jsho.jp/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=25&Itemid=24](http://www.jsho.jp/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=25&Itemid=24)

萩三二・村上俊太郎 (1975) 概論. 熱伝達の基礎と演習. 一章, 1-9. 東京, 東海大学出版.

蜂須賀養悦 (1980) 芽胞 (細菌孢子) の耐熱性の機構. *化学と生物*, **18**, 731-739.

秦一雄・上原智 (1993) 放射線治療と温熱療法の進歩. *日本ハイパーサーミア学会誌*, **9**, 73-79.

藤代華歌 (2012) ラン藻の宇宙環境耐性実験のための実験系の検討. 筑波大学生命環境学群・第二学群生物資源学類卒業研究要旨集, 86.

藤原伸介 (2011) どうして核酸は変性するの?. *生物工学会誌*, **89**, 200-203.

平野篤・白木賢太郎 (2011) 姿をかえるタンパク質. *生物工学会誌*, **89**, 404-407.

平野篤 (2015) アルギニンを利用した化合物の可溶化と分散. *生物工学会誌*, **93**, 268-272.

古木隆生, 奥田隆, 黄川田隆洋, 櫻井実 (2009) トレハロースが鍵を握る昆虫の極限乾燥耐性. *生物物理*, **49**, 130-131.

細沼佑介, 後藤義也, 安田政実 (2009) 病理: アストラブルー染色. *検査と技術*,

37, 666-670.

松本信二・鏡石嘉子 (1970) 放射線感受性大腸菌及び酵母菌の致死率の温度依存性. *遺伝学雑誌*, **45**, 153-160.

松木均・金品昌志 (2006) リン脂質二分子膜相転移の熱力学. *熱測定*, **33**, 74-82.

松口龍彦 (1976) タイ国水田の遊離窒素固定微生物フロラと窒素固定能. *土と微生物*, **18**, 7-19.

宮内孝浩, 池田義之, 宮田昌明, 鄭忠和 (2012) Heat shock protein を介した和温療法の不全心筋及び下肢虚血に対する効果. *日温気物医誌*, **75**, 238-247.

宮下英明 (2006) 特集シアノバクテリアがひらく新しい世界: シアノバクテリアに見られるクロロフィルの多様性. *生物の科学 遺伝*, **60**, 33-39.

宮嶋宏行 (2015) 生命維持システムの現状: 国際宇宙ステーションを中心として. 閉鎖生態系・生態工学ハンドブック (大政謙次, 竹内俊郎, 木部勢至朗, 北宅善昭, 船田良監修, 生態工学会出版企画委員会編), 1 章, 24-37. 東京, アドスリー.

山岸明彦, 矢野創, 奥平恭子, 小林憲正, 横堀伸一, 田端誠, 河合秀幸 (2007) TANPOPO: 有機物と微生物の宇宙空間曝露と微隕石及び微生物の捕集実験 *Biological Sciences in Space*, **21**, 67-75.

山岸明彦, 馬場昭次, 山下雅道 (2010) 宇宙環境生物学. 極限環境生物学 (浅島誠, 黒岩常祥, 小原雄治編), 5章, 179-220. 東京, 岩波書店.

山下雅道, 新井真由美, 石井忠司, 石川洋二, 泉龍太郎, 大島泰郎, 大島博, 大森克徳, 片山直美, 片山新太, 金澤晋二郎, 刈屋達也, 河崎行繁, 北宅善昭, 後藤英司, 齋藤高弘, 清水強, 白石篤志, 高沖宗夫, 高橋秀幸, 谷晃, 都木恭一郎, 富田-横谷香織, 中島厚, 長友信人, 新田慶治, 橋本博文, 平藤雅之, 藤井義晴, 水谷広, 三原恵二郎, 宮川照男, 向井千秋, 森滋夫, 矢野幸子, 山崎直子, 横田博樹 (2005) 宇宙農業構想. *Space Utilization Research*, **21**, 323-326.

山下雅道, 秋山豊寛, 新井真由美, 石井忠司, 石川洋二, 稲富裕光, 大島泰郎, 大西充, 大森克徳, 大森正之, 鏡味裕, 片山直美, 金澤晋二郎, 刈屋達也, 河崎行繁, 木口憲爾, 岸本直子, 北宅善昭, 後藤英司, 齋藤高弘, 嶋宮民安, 清水

強, 白石篤志, 高沖宗夫, 高橋秀幸, 竹内俊郎, 武田弘, 田中茂雄, 谷晃, 田村憲司, 都木恭一郎, 富田 (横谷) 香織, 中島厚, 長友信人, 中野完, 中村輝子, 中村祐二, 中山伸, 新田慶治, 能登谷正浩, 橋本博文, 馬場啓一, 平藤雅之, 広崎朋史, 藤井義晴, 藤田修, 水谷広, 三橋淳, 三原恵二郎, 宮川照男, 向井千秋, 森滋夫, 矢沢勇樹, 山崎直子, 横田博樹, 渡邊博之, 和田秀徳, そのほか宇宙農業サロン(2007)宇宙農業構想の展開. *Space Utilization Research*, **23**, 396-399.

山下雅道 (2015) 宇宙での食料生産. 閉鎖生態系・生態工学ハンドブック (大政謙次, 竹内俊郎, 木部勢至朗, 北宅善昭, 船田良監修, 生態工学会出版企画委員会編), 1章, 74-79. 東京, アドスリー.

横谷明徳 (2010) DNA 変性を利用した分子切断損傷を検出するための新しい方法の開発. *基礎科学ノート*, **17**, 6-9.

吉澤俊祐・白木賢太郎 (2015) タンパク質の凝集剤としての塩・有機溶媒・高分子. *生物工学*, **93**, 260-263.

渡辺巖 (1992) ラン藻とアゾラの共生: 共生的窒素固定の機構とその利用. *化学と生物*, **30**, 820-829.

渡部一仁 (2001) 細菌芽胞 (孢子): その特徴と調整法, 抵抗性試験法, 第14改正日本薬局方での関連記載項目および芽胞形成菌管理の意義. 日本 PDA 学術誌 *GMP とバリデーション*, **3**, 67-73.

和田秀徳 (2007) 地球の農業と火星の農業. *Biological Sciences in Space*, **21**, 135-141.

ワートン, D. A. (著), 掘越弘毅 (訳), 浜本哲郎 (訳) (2004) 極限環境の生命: 生物のすみかのひろがり, 東京, シュプリンガー・フェアラーク東京. pp. 367.

Adams, G. D. and Duggan, S. P. (1999) Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *The New Phytologist*, **144**, 3-33.

Akanuma, S., Yamagishi, A., Oshima, T. and Tanaka, N. (1998) Serial increase in the thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* by experimental evolution. *Protein science*, **7**, 698-705.

- Aono, R., Sato, T., Imanaka, T. and Atomi, H. (2015) A pentose bisphosphate pathway for nucleoside degradation in Archaea. *Nature chemical biology*, **11**, 355-360.
- Arai, M., Tomita-Yokotani, K., Sato, S., Hashimoto, H., Ohmori, M. and Yamashita, M. (2008) Growth of terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp., on martian regolith simulant and its vacuum tolerance. *Biological Sciences in Space*, **22**, 8-17.
- Arai, M. (2009) Cyanobacteria for Space Agriculture on Mars. *Biological Sciences in Space*, **23**, 203-210.
- Atomi, H., Matsumi, R. and Imanaka, T. (2004) Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life. *Journal of bacteriology*, **186**, 4829-4833.
- Badescu, V. (2009) Mars: prospective energy and material resources. Berlin, Heidelberg, Springer. pp. 718.
- Baglioni, P., Sabbatini, M. and Horneck, G. (2007) Astrobiology experiments in low earth orbit: facilities, instrumentation and results. In Complete Course in Astrobiology (eds. Horneck, J. and Rettberg, P.), Chapter 11, 273-319. Weinheim, Wiley.
- Bertocchi, C., Navarini, N., Cesaro, A. and Anastasio, M. (1990) Polysaccharides from Cyanobacteria. *Carbohydrate Polymers*, **12**, 127-153.
- Blomberg, A. (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS microbiology letters*, **182**, 1-8.
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. and Stetter, K. O. (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles*, **1**, 14-21.
- Bock, P. E. and Frieden, C. (1974) pH-induced cold lability of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase. *Biochemistry*, **13**, 4191-4196.
- Borges, N., Ramos, A., Raven, N. D., Sharp, R. J. and Santos, H. (2002) Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles*, **6**, 209-216.

- Boyd, E. S., Pearson, A., Pi, Y., Li, W. J., Zhang, Y. G., He, L., Zhang, C. L. and Geesey, G. G. (2011) Temperature and pH controls on glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipid composition in the hyperthermophilic crenarchaeon *Acidilobus sulfurireducens*. *Extremophiles*, **15**, 59-65.
- Böhm, G. A., Pfleiderer, W., Böger, P. and Scherer, S. (1995) Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 8536-8539.
- Braune, W. and Sanke, H. (1979) Interferometric studies of the dynamics of hydration and dry matter content during light-dependent germination of the *Anabaena variabilis* Kützing akinetes (In German with English summary). *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, **19**, 535-546.
- Bridges, B. A., Ashwood-Smith, M. J. and Munson, R. J. (1969) Susceptibility of mild thermal and of ionizing radiation damage to the same recovery mechanisms in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, **35**, 193-196.
- Cameron, R. E. (1962) Species of *Nostoc vaucher* occurring in the sonoran desert in Arizona. *Transactions of the American Microscopical Society*, **81**, 379-384.
- Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. (1988) The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, **25**, 244-255.
- Carpenter, J. F., Hand, S. C., Crowe, L. M., and Crowe, J. H. (1986) Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Archives of biochemistry and biophysics*, **250**, 505-512.
- Casaregola, C., Cesaretti, G. and Andrenucci, M. (2009) HiPER: A roadmap for future space exploration with innovative electric propulsion technologies. Proceedings of 31st International Electric Propulsion Conference, IEPC-2009-066. Michigan.
- Chakravarty, S. and Varadarajan, R. (2000) Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Letters*, **470**, 65-69.

- Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W. and Carpenter, J. F. (2003) Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical research*, **20**, 1325-1336.
- Cossins, A. R., and Bowler, K. (1987) *Temperature Biology of Animals*. New York, Chapman and Hall. pp. 339.
- Cottin, H., Kotler, J. M., Billi, D., Cockell, C., Demets, R., Ehrenfreund, P., Elsaesser, A., d'Hendecourt, L., Van Loon, J. J., Onofri, S., Quinn, R. C., Martins, Z., Rabbow, E., Rettberg, P., Ricco, A. J., Slenzka, K., de la Torre, R., de Vera, J. P., Westall, F., Carrasco, N., Fresneau, A., Kawaguchi, Y., Kebukawa, Y., Nguyen, D., Poch, O., Saiagh, K., Stalport, F., Yamagishi, A., Yano, H., Klamm, B. A. (2017) Space as a tool for astrobiology: review and recommendations for experimentations in Earth orbit and beyond. *Space Science Reviews*, **209**, 83-181.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F. and Crowe, L. M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, **60**, 73-103.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **57**, 779-795.
- De, P. K. (1939) The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice-fields. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **127**, 121-139.
- De Kruijff, B., Cullis, P. R. and Verkleij, A. J. (1980) Non-bilayer lipid structures in model and biological membranes. *Trends in Biochemical Sciences*, **5**, 79-81.
- De Philippis, R. and Vincenzini, M. (1998) Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**, 151-175.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D. and Goloubinoff, P. (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 39586-39591.
- Diamant, S., Azem, A., Weiss, C. and Goloubinoff, P. (1995) Increased efficiency of



- GroE-assisted protein folding by manganese ions. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 28387-28391.
- Dong, H., Mukaiyama, A., Tadokoro, T., Koga, Y., Takano, K. and Kanaya, S. (2008) Hydrophobic effect on the stability and folding of a hyperthermophilic protein. *Journal of molecular biology*, **378**, 264-272.
- Dworkin, M. (2006) Prokaryotic life cycles. In *The Prokaryotes*. Chapter 1.6, 140-166. New York, Springer.
- Ehling-Schulz, M., Bilger, W. and Scherer, S. (1997) UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology*, **179**, 1940-1945.
- Ehrenfreund, P., McKay, C., Rummel, J. D., Foing, B. H., Neal, C. R., Masson-Zwaan, T., Ansdell, M., Peter, N., Zarnecki, J., Mackwell, S., Perino, M. A., Billings, L., Mankins, J. and Race, M. (2012) Toward a global space exploration program: A stepping stone approach. *Advances in Space Research*, **49**, 2-48.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. and Carroll, D. (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, **13**, 17-27.
- Fiala, G. and Stetter, K. O. (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archives of Microbiology*, **145**, 56-61.
- Fisher, R. W. and Wolk, C. P. (1976) Substance stimulating the differentiation of spores of the blue-green alga *Cylindrospermum licheniforme*. *Nature*, **259**, 394-395.
- Forterre, P. (2002) A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends in Genetics*, **18**, 236-237.
- Fox, K. and Eder, B. D. (1969) Comparison of survivor curves of *Bacillus subtilis* spores subjected to wet and dry heat. *Journal of Food Science*, **34**, 518-521.
- Gao, K. (1998) Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *Journal of Applied Phycology*, **10**, 37-49.

- Garcia-Pichel, F. (2010) Cyanobacteria. In *The desk of encyclopedia of microbiology*, second edition (ed. Schaechter, M.), 327-345. Oxford, Elsevier.
- Gerhardt, P. and Marquis, R. E. (1989) Spore thermoresistance mechanisms. In *Regulation of procaryotic development* (eds. Slepecky, R. A., and Setlow, P.), Chapter 2, 43-63. Washington, D. C., American Society for Microbiology.
- Göller, K. and Galinski, E. A. (1999) Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **7**, 37-45.
- Granhall, U. (1981) Biological nitrogen fixation in relation to environmental factors and functioning of natural ecosystems. In *Terrestrial nitrogen cycles* (eds. Clark, F. E. and Rosswall, T.) *Ecological Bulletins*, 33. 131-144. Stockholm, Swedish Natural Science Research Council.
- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D. R., Mansbridge, J. and Levine, F. (2000) Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature biotechnology*, **18**, 168-171.
- Halstead, T. W. and Dutcher, F. R. (1984) Status and prospects. *Annals of Botany*, **54**, Supplement 3, 3-18.
- Hengherr, S., Heyer, A. G., Köhler, H. R. and Schill, R. O. (2008) Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades—evidence for divergence in responses to dehydration. *FEBS Journal*, **275**, 281-288.
- Hengherr, S., Worland, M. R., Reuner, A., Brümmer, F. and Schill, R. O. (2009) High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiological and Biochemical Zoology*, **82**, 749-755.
- Hershkovitz, N., Oren, A. and Cohen, Y. (1991) Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matric water stress. *Applied and environmental microbiology*, **57**, 645-648.
- Higashibata, H., Fujiwara, S., Ezaki, S., Takagi, M., Fukui, K. and Imanaka, T. (2000) Effect of polyamines on histone-induced DNA compaction of hyperthermophilic archaea. *Journal of bioscience and bioengineering*, **89**, 103-106.

- Higo, A., Katoh, H., Ohmori, K., Ikeuchi, M. and Ohmori, M. (2006) The role of a gene cluster for trehalose metabolism in dehydration tolerance of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology*, **152**, 979-987.
- Hill, D. R., Peat, A. and Potts, M. (1994) Biochemistry and structure of the glycan secreted by desiccation-tolerant *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *Protoplasma*, **182**, 126-148.
- Hill, D. R., Keenan, T. W., Helm, R. F., Potts, M., Crowe, L. M. and Crowe, J. H. (1997). Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *Journal of Applied Phycology*, **9**, 237-248.
- Hincha, D. K. and Hagemann, M. (2004) Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochemical Journal*, **383**, 277-283.
- Hirosawa, T. and Wolk, C. P. (1979a) Factors Controlling the Formation of Akinetes Adjacent to Heterocysts in the Cyanobacterium *Cylindrospermum licheniforme* Kütz. *Journal of General Microbiology*, **114**, 423-432.
- Hirosawa, T. and Wolk, C. P. (1979b) Isolation and Characterization of a Substance which Stimulates the Formation of Akinetes in the Cyanobacterium *Cylindrospermum licheniforme* Kütz. *Journal of General Microbiology*, **114**, 433-441.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. and Buitink, J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, **6**, 431-438.
- Hoiczuk, E. and Hansel, A. (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of bacteriology*, **182**, 1191-1199.
- Holman, J. P. (2009) Introduction. Heat Transfer. Chapter 1, 1-25. New York, McGraw Hill Higher Education.
- Hori, K., Okamoto, J., Tanji, Y. and Unno, H. (2003) Formation, sedimentation and germination properties of *Anabaena* akinetes. *Biochemical Engineering Journal*, **14**, 67-73.

Horikawa D. D. and Arakawa K. (2015) Tardigrades: Ultimate animals surviving extreme environments (Abstract in English). *SFC Journal*, **15**, 246-260.

Horneck, G., Klaus, D. M. and Mancinelli, R. L. (2010) Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**, 121-156.

Hu, C., Gao, K. and Whitton, B. A. (2012) Semi-arid regions and deserts. In *Ecology of Cyanobacteria II* (ed. Whitton, B. A.), 345-369. Dordrecht, Heidelberg, New York, London, Springer.

Ingersoll, L. R., Zobel, O. J. and Ingersoll, A. C. (1954) Introduction. Heat conduction: With engineering geological and other applications. Chapter 1, 1-10. Calcutta, Bombay, New Delhi, Oxford and Ibh Publishing Co.

International Space Exploration Coordination Group (2011) The Global Explorational Roadmap.

[http://www.nasa.gov/pdf/591067main\\_GER\\_2011\\_small\\_single.pdf](http://www.nasa.gov/pdf/591067main_GER_2011_small_single.pdf)

International Space Exploration Coordination Group (2013) The Global Explorational Roadmap.

[http://www.nasa.gov/sites/default/files/files/GER-2013\\_Small.pdf](http://www.nasa.gov/sites/default/files/files/GER-2013_Small.pdf)

International Space Exploration Coordination Group (2018) The Global Explorational Roadmap.

[https://www.globalspaceexploration.org/wordpress/wp-content/isecg/GER\\_2018\\_small\\_mobile.pdf](https://www.globalspaceexploration.org/wordpress/wp-content/isecg/GER_2018_small_mobile.pdf)

ISECG HP, About ISECG

<https://www.globalspaceexploration.org/about-isecg>

JAXA 宇宙情報センターa, 世界の宇宙開発機関.

[http://spaceinfo.jaxa.jp/ja/world\\_space\\_agencies.html](http://spaceinfo.jaxa.jp/ja/world_space_agencies.html)

JAXA 宇宙情報センターb, ホーマン軌道.

[http://spaceinfo.jaxa.jp/ja/hohmann\\_orbit.html](http://spaceinfo.jaxa.jp/ja/hohmann_orbit.html)

JAXA/ISAS HP, 金星探査機「あかつき」特設ページ.

<http://www.isas.jaxa.jp/j/enterp/missions/akatsuki/compile/index.shtml>

- Jones, K. H. and Senft, J. A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **33**, 77-79.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauß, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411**, 909-917.
- Jönsson, K. I. and Persson, O. (2010) Trehalose in three species of desiccation tolerant tardigrades. *Open Zoology Journal*, **3**, 1-5.
- Kajiyama, S. and Kobayashi, A. (2003) Chemical and biochemical aspect of desiccation tolerant cyanobacterium *Nostoc commune* (In Japanese with English summary). *Cryobiology and Cryotechnology*, **49**, 37-42.
- Kanazawa, S., Ishikawa, Y., Tomita-Yokotani, K., Hashimoto, H., Kitaya, Y., Yamashita, M., Nagatomo, M., Oshima, T., Wada, H. and Space Agriculture Task Force (2008) Space agriculture for habitation on Mars with hyper-thermophilic aerobic composting bacteria. *Advances in Space Research*, **41**, 696-700.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA research*, **8**, 205-213, 227-253.
- Kaplan-Levy, R. N., Hadas, O., Summers, M. L., Rücker, J. and Sukenik, A. (2010) Akinetes: Dormant cells of cyanobacteria. In *Topic in Current Genetics 21; Dormancy and Resistance in Harsh Environments* (eds. Lubzens, E., Cerdá, J., and Clark, M.S.), Chapter 2, 5-27. Heidelberg, Dordrecht, London, New York, Springer.
- Katoh, H., Shiga, Y., Nakahira, Y. and Ohmori, M. (2003) Isolation and characterization of a drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01. *Microbes and environments*, **18**, 82-88.
- Katoh, H., Furukawa, J., Tomita-Yokotani, K. and Nishi, Y. (2012) Isolation and

purification of an axenic diazotrophic drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc commune*, from natural cyanobacterial crusts and its utilization for field research on soils polluted with radioisotopes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1817**, 1499-1505.

Kawaguchi, Y., Yang, Y., Kawashiri, N., Shiraishi, K., Takasu, M., Narumi, I., Satoh, K., Hashimoto, H., Nakagawa, K., Tanigawa, Y., Momoki, Y., Tanabe, M., Sugino, T., Takahashi, Y., Shimizu, Y., Yoshida, S., Kobayashi, K., Yokobori, S. and Yamagishi, A. (2013) The possible interplanetary transfer of microbes: Assessing the viability of *Deinococcus* spp. under the ISS environmental conditions for performing exposure experiments of microbes in the Tanpopo mission. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, **43**, 411-428.

Kawaguchi, Y., Yokobori, S. I., Hashimoto, H., Yano, H., Tabata, M., Kawai, H. and Yamagishi, A. (2016) Investigation of the Interplanetary Transfer of Microbes in the Tanpopo Mission at the Exposed Facility of the International Space Station. *Astrobiology*, **16**, 363-376.

Kikawada, T., Minakawa, N., Watanabe, M. and Okuda, T. (2005) Factors inducing successful anhydrobiosis in the African chironomid *Polypedilum vanderplanki*: significance of the larval tubular nest. *Integrative and Comparative Biology*, **45**, 710-714.

Kikuchi, A. and Asai, K. (1984) Reverse gyrase: a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature*, **309**, 677-681.

Kimura, S., Arai, M., Katoh, H., Ajioka, R., Baba, K., Sato, S. and Tomita-Yokotani, K. (2014) Utilization of a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01, under the space environment. *Proceedings of the 44th International Conference on Environmental Systems*, ICES-2014-127, 721-726.

Kimura, S., Tomita-Yokotani, K., Igarashi, Y., Sato, S., Katoh, H., Abe, T., Sonoike, K. and Ohmori, M. (2015a) The heat tolerance of dry colonies of a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01. *Biological Sciences in Space*, **29**, 12-18.

Kimura, Y., Kimura, S., Sato, S., Katoh, K., Abe, T., Arai, M., and Tomita-Yokotani, K. (2015b) Evaluation of a cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01, as food material for space agriculture on Mars. *Biological Sciences in Space*, **29**, 24-31.

- Kimura, S., Ong, M., Ichikawa, S. and Tomita-Yokotani, K. (2017a) Compatible solutes in the akinetes of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. HK-01 contribute to its heat tolerance. *American Journal of Plant Sciences*, **8**, 2695-2711.
- Kimura, S., Tomita-Yokotani, K., Katoh, H., Sato, S. and Ohmori, M. (2017b) Complete life cycle and heat tolerance of dry colonies of a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01., *Biological Sciences in Space*, **31**, 1-8.
- Knowles, E. L. and Castenholz, R. W. (2008) Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *FEMS microbiology ecology*, **66**, 261-270.
- Kosugi, M., Kashino, Y., Kudoh, S. and Imura, S. (2012) Establishment of an isolation method of *Nostoc commune* cells free from extracellular polysaccharides (EPS) using Percoll centrifugation (In Japanese with English summary). *Antarctic Record*, **56**, 285-293.
- Leprince, O., Buitink, J. and Hoekstra, F. A. (1999) Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 1515-1524.
- Liu, X. J. and Chen, F. (2003) Cell differentiation and colony alteration of an edible terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*, in liquid suspension cultures. *Folia microbiologica*, **48**, 619-626.
- Maeda, N., Kanai, T., Atomi, H. and Imanaka, T. (2002) The unique pentagonal structure of an archaeal Rubisco is essential for its high thermostability. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 31656-31662.
- Mager, D. M. and Thomas, A. D. (2011) Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: A review of their role in dryland soil process. *Journal of Arid Environments*, **75**, 91-97.
- Magill, N. G., Loshon, C. A. and Setlow, P. (1990) Small, acid-soluble, spore proteins and their genes from two species of *Sporosarcina*. *FEMS microbiology letters*, **72**, 293-297.

- Mateo, P., Perona, E., Berrendero, E., Leganés, F., Martín, M. and Golubić, S. (2011) Life cycle as a stable trait in the evaluation of diversity of *Nostoc* from biofilms in rivers. *FEMS Microbiology Ecology*, **76**, 185-198.
- Matsuno, Y., Sugai, A., Higashibata, H., Fukuda, W., Ueda, K., Uda, I., Sato, I., Itoh, T., Imanaka, T. and Fujiwara, S. (2009) Effect of growth temperature and growth phase on the lipid composition of the archaeal membrane from *Thermococcus kodakaraensis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **73**, 104-108.
- Matsuura, Y., Takehira, M., Joti, Y., Ogasahara, K., Tanaka, T., Ono, N., Kunishima, N. and Yutani, K. (2015) Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100°C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues. *Scientific reports*, **5**, 1-9.
- Mei, J. X. and Cheng, Z. J. (1990) Effects of temperature on physiological activities of *Nostoc flagelliforme* Born et Flah (In Chinese with English summary). *Journal of Northwest Normal University*. **1**, 75–85.
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., Van der Voort Maarschalk, K. and Hinrichs, W. L. J. (2017) How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **114**, 288-295.
- Mori, F., Erata, M. and Watanabe, M. M. (2002) Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-collection. *Microbiol Cult Coll*, **17**, 45-55.
- Möller, B., Oßmer, R., Howard, B. H., Gottschalk, G. and Hippe, H. (1984) *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Archives of microbiology*, **139**, 388-396.
- Nakamoto, H., Suzuki, N. and Roy, S. K. (2000) Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS letters*, **483**, 169-174.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi M., Kawashima, K., Kimura, T. Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Kishida, Y. (2002) Complete genome structure of the



thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA research*, **9**, 123-130.

NASA Astrobiology Institute. <https://astrobiology.nasa.gov/>

NHK 科学文化部 (2015) NHK 「かぶん」 ブログ: 2015 年 09 月 08 日 (火) 金星探査機「あかつき」 高温に耐え飛行続ける <http://www9.nhk.or.jp/kabun-blog/200/226957.html>

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. and Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 548-572.

Niimura, Y., Koh, E., Yanagida, F., Suzuki, K. I., Komagata, K. and Kozaki, M. (1990) *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **40**, 297-301.

Oarga, A. (2009) Life in extreme environments. *Revista de Biologia e ciencias da Terra*, **9**, 1-10.

Obana, S., Miyamoto, K., Morita, S., Ohmori, M. and Inubushi, K. (2007) Effect of *Nostoc* sp. on soil characteristics, plant growth and nutrient uptake. *Journal of applied phycology*, **19**, 641-646.

Perez, R., Forchhammer, K., Salerno, G. and Maldener, I. (2016) Clear differences in metabolic and morphological adaptations of akinetes of two *Nostocales* living in different habitats. *Microbiology*, **162**, 214-223.

Poehlein, A., Gottschalk, G. and Daniel, R. (2013) First insights into the genome of the Gram-negative, endospore-forming organism *Sporomusa ovata* strain H1 DSM 2662. *Genome announcements*, **1**, e00734-13.

Potts, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological reviews*, **58**, 755-805.

Potts, M. (1999) Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, **34**, 319-328.

- Potts, M. (2001) Desiccation tolerance: a simple process?. *Trends in microbiology*, **9**, 553-559.
- Potts, M. (2002). *Nostoc*. In The ecology of cyanobacteria. (eds. Whitton, B. A. and Potts, M.). Chapter 17, 465-504, Dordrecht, Kluwer academic publishers.
- Prasanna, R. and Nayak, S. (2007) Soil pH and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice field soils. *Applied Ecology and Environmental Research*, **5**, 103-113.
- Razvi, A. and Scholtz, J. M. (2006) Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Science*, **15**, 1569-1578.
- Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, **18**, 571-573.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, **111**, 1-61.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001) Life in extreme environments. *Nature*, **409**, 1092-1101.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K. I., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., Watanabe, M. and Okuda, T. (2008) Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 5093-5098.
- Salotti, J. M. and Heidmann, R. (2014) Roadmap to a human Mars mission. *Acta Astronautica*, **104**, 558-564.
- Sato, T., Atomi, H. and Imanaka, T. (2007) Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science*, **315**, 1003-1006.

- Sawangwan, T., Goedel, C. and Nidetzky, B. (2010) Glucosylglycerol and glucosylglycerate as enzyme stabilizers. *Biotechnology journal*, **5**, 187-191.
- Scherer, S., Chen, T. W. and Böger, P. (1988) A new UV-A/B protecting pigment in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Plant Physiology*, **88**, 1055-1057.
- Seki, K. (2002) Method for preserving mammalian organs. U.S. Patent No. 6,475,716. 2002-11-05.
- Setchell, W. A. (1895) Notes on some cyanophyceae of New England. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, **22**, 424-431.
- Setlow, P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*, **101**, 514-525.
- Setlow, B. and Setlow, P. (1995) Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2787-2790.
- Setlow, B. and Setlow, P. (1996) Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology*, **178**, 3486-3495.
- Shaw, E., Hill, D. R., Brittain, N., Wright, D. J., Täuber, U., Marand, H., Helm, R. F. and Potts, M. (2003) Unusual water flux in the extracellular polysaccharide of the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and environmental microbiology*, **69**, 5679-5684.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Shiraki, K., Kudou, M., Fujiwara, S., Imanaka, T. and Takagi, M. (2002) Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation. *The Journal of Biochemistry*, **132**, 591-595.
- Somero, G. N. (1997). Temperature relationships: from molecules to biogeography. In Handbook of physiology: Section 13: Comprehensive Physiology Two-Volume Set. Chapter 19, 1391-1443, Oxford, Oxford University Press.

- SpaceRef. (2015) NASA ISS On-Orbit Status 13 May 2015.  
<http://spaceref.com/international-space-station/nasa-iss-on-orbit-status-13-may-2015.html>
- Srinivasan, S. (1979) Blue-green algae (In Tamil). Department of Agriculture, Tamil Nadu, **74**.
- Stetter, K. O. (1982) Ultrathin mycelia-forming organisms from submarine volcanic areas having an optimum growth temperature of 105°C. *Nature*, **300**, 258.
- Sukenik, A., Kaplan-Levy, R. N., Viner-Mozzini, Y., Quesada, A. and Hadas, O. (2013) Potassium deficiency triggers the development of dormant cells (akinetes) in *Aphanizomenon ovalisporum* (Nostocales, Cyanoprokaryota). *Journal of phycology*, **49**, 580-587.
- Sukenik, A., Maldener, I., Delhaye, T., Viner-Mozzini, Y., Sela, D. and Bormans, M. (2015) Carbon assimilation and accumulation of cyanophycin during the development of dormant cells (akinetes) in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *Frontiers in microbiology*, **6**, 1067.
- Sutherland, J. M., Herdman, M. and Stewart, W. D. (1979) Akinetes of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524: macromolecular composition, structure and control of differentiation. *Journal of General Microbiology*, **115**, 273-287.
- Sykes, G. (1969) Methods and Equipment for Sterilization of Laboratory Apparatus and Media. In *Methods in microbiology* (eds. Norris, J. R. and Ribbons, D. W.), Chapter 3, 77-121. London, New York, Academic Press.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T. and Horikoshi, K. (2008) Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 10949-10954.
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T. and Sakamoto, T. (2005) Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**,

7327-7333.

- Tanaka, N. and Nakamoto, H. (1999) HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS letters*, **458**, 117-123.
- Taylor, T. J. and Vaisman, I. I. (2010) Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins. *BMC structural biology*, **10** (Suppl 1), S5.
- Thajuddin, N. and Subramanian, G. (2010) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, **89**, 47-57.
- Tomita-Yokotani, K., Kimura, S., Kimura, Y., Igarashi, Y., Ajioka, R., Sato, S., Katoh, H. and Baba, K. (2013) Dried colony in cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01: The several high environment tolerances for Tanpopo mission. *The International Astrobiology Workshop 2013*, poster session, 1033.
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S. and Arakawa, T. (2004) Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnology progress*, **20**, 1301-1308.
- Vaishampayan, A., Sinha, R. P., Hader, D. P., Dey, T., Gupta, A. K., Bhan, U. and Rao, A. L. (2001) Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review*, **67**, 453-516.
- Van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J. and Konings, W. N. (1998) The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles*, **2**, 163-170.
- Venkataraman, G. S. (1981) Algal nitrogen fixation in rice soils. In Blue-green algae for rice production. FAO Soils Bulletin, 46. Chapter 3, 9-12. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Verseux, C., Baqué, M., Lehto, K., de Vera, J. P. P., Rothschild, L. J. and Billi, D. (2016) Sustainable life support on Mars—the potential roles of cyanobacteria. *International Journal of Astrobiology*, **15**, 65-92.
- Ward, D. M., Castenholz, R. W. and Miller, S. R. (2012) Cyanobacteria in geothermal habitats. In Ecology of Cyanobacteria II (ed. Whitton, B. A.), 39-63. Dordrecht,

Springer Netherlands.

- Welnicz, W., Grohme, M. A., Kaczmarek, Ł., Schill, R. O. and Frohme, M. (2011) Anhydrobiosis in tardigrades: the last decade. *Journal of insect physiology*, **57**, 577-583.
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**, 4576-4579.
- Wolkers, W. F., Tablin, F. and Crowe, J. H. (2002) From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **131**, 535-543.
- Yamagishi, A., Yano, H., Okudaira, K., Kobayashi, K., Yokobori, S., Tabata, M., Kawai, H., Yamashita, M., Hashimoto, H., Naraoka, H. and Mita, H. (2008) TANPOPO: Astrobiology Exposure and Micrometeoroid Capture Experiments. *Preprints of 26th International Symposium on Space Technology and Science*, k-05.
- Yamamoto, Y. (1975) Effect of desiccation on the germination of akinetes of *Anabaena cylindrica*. *Plant & Cell Physiol.*, **16**, 749-752.
- Yamashita, M., Ishikawa, Y., Nagatomo, M., Oshima, T., Wada, H. and Space Agriculture Task Force. (2005) Space Agriculture for Manned Space Exploration on Mars. *The Journal of Space Technology and Science*, **21**, 1-10.
- Yamashita, M., Ishikawa, Y., Kitaya, Y., Goto, E., Arai, M., Hashimoto, H., Tomita-Yokotani, K., Hirafuji, M., Ohmori, K., Shiraishi, A., Tani, A., Toki, K., Yokota, H. and Fujita, O. (2006) An overview of challenges in modeling heat and mass transfer for living on Mars. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1077**, 232-243.
- Yamashita, M., Hashimoto, H., Tomita-Yokotani, K., Katayama, N., Yazawa, Y., Takeda, H., Mitsuhashi, J., Wada, H. and Space Agriculture Task Force. (2008) Development of Space Agriculture Concept, *Space Utilization Research*, **24**, 375-377.
- Yamashita, M., Hashimoto, H. and Wada, H. (2009) On-site resources availability for space agriculture on Mars. In Mars (ed. Badescu, V), Chapter 18, 517-542. Berlin, Heidelberg, Springer.

- Yokobori, S. I., Kawaguchi, Y., Yang, Y., Hashimoto, H., Nakagawa, K., Narumi, I., Yoshida, S., Kobayashi, K., Yamagishi, A. and Tanpopo WG. (2013) Space Exposure Experiments of Microbes at the International Space Station. ISTS Web Paper Archives, 2013-p-12p, 1-7.
- Yoshimura, H., Ikeuchi, M. and Ohmori, M. (2006) Up-regulated Gene Expression during Dehydration in a Terrestrial Cyanobacterium, *Nostoc* sp. Strain HK-01. *Microbes and environments*, **21**, 129-133.
- Yoshimura, H., Kotake, T., Aohara, T., Tsumuraya, Y., Ikeuchi, M. and Ohmori, M. (2012) The role of extracellular polysaccharides produced by the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HK-01 in NaCl tolerance. *Journal of applied phycology*, **24**, 237-243.
- Yutin, N. and Galperin, M. Y. (2013) A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental microbiology*, **15**, 2631-2641.
- Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, **409**, 739-743.