

陸棲ラン藻の環境適応機構

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/26900

氏名	吉田 尚之
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第1045号
学位授与の日付	平成20年3月31日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	陸棲ラン藻の環境適応機構
論文審査委員(主査)	坂本 敏夫(自然科学研究科・准教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝(自然科学研究科・教授), 東 浩(自然科学研究科・准教授), 山口 正晃(自然科学研究科・准教授), 金森 正明(自然科学研究科・講師)

Abstract

The cyanobacterium *Nostoc commune* is adapted to the terrestrial environment and highly tolerant to ultraviolet radiation (UV) and desiccation. It is shown that *N. commune* accumulates scytonemine and mycospoline-like amino acids (MAAs) that absorb UV-A and UV-B, respectively when *N. commune* is subjected to UV. In this study, localization of UV-absorbing pigments in *N. commune*, changes of trehalose content and levels of transcript of the genes for trehalose methabolizing enzymes responding to desiccation and biochemical properties of these enzymes were investigated. Scytonemine localized in the extracellular matrix and MAAs localized in cells and extracellular matrix. *N. commune* colonies contained scytonemine and its level was equivalent to chlorophyll content. In the EPS-depleted cells, MAA was accumulated and its level was equivalent to chloropyll content. These results suggest that accumulation of UV-absorbing pigments is necessary for adaptation to terrestrial environment. *N. commune* accumulated trehalose as a compatible solute. Photosynthetic activity of *N. commune* decreased when *N. commune* was desiccated. Levels of transcripts of genes of trehalose synthesis (*treY* and *treZ*) and trehalose hydrolysis (*treH*) in *N. punctiforme* IAM M-15 decreased simultaneously

after 6 h of dehydration. Trehalase activity decreased in the presence of 50 mM NaCl *in vitro*, and was strongly inhibited by Tris buffer. These results suggest that trehalose level is regulated mainly by change of trehalase activity.

要旨

陸棲ラン藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) は地球上の陸地に広く分布し、数珠状に連なった細胞が細胞外多糖類 (EPS) に包まれたコロニーを形成している。*N. commune* は陸上に生息しているため、紫外線に対する防御機構や強い乾燥耐性を持っている。*N. commune* は紫外線照射によって、紫外線吸収色素であるスキトネミンやマイコスポリン様アミノ酸 (MAAs) を蓄積することが知られている。本研究では、*N. commune* が陸上環境に適応した機構を解明するために、*N. commune* コロニー内での紫外線吸収色素の局在と乾燥ストレスに応答したトレハロースの蓄積の機構について調べた。

まず、*N. commune* コロニーに含まれる紫外線吸収色素の量とEPS 除去細胞に含まれる紫外線吸収色素の量を比較した。スキトネミンは EPS と細胞内に、MAAs は細胞内に局在していた (Table 1)。細胞内に含まれている MAAs はクロロフィルとほぼ同程度で、コロニーに含まれるスキトネミンの量はクロロフィルと同程度であった。光合成色素と同程度まで高濃度に含まれることから、紫外線吸収色素の蓄積が陸上への適応に必要であることが考えられる。

N. commune の乾燥と水和過程において、含水量に対する光合成活性とトレハロース含有量の変化を調べた。乾燥の過程では、コロニーに含まれている水が減少するにしたがって光合成活性が減少し、同時に、トレハロース含有量が増加した (Fig. 1)。水和の過程では、コロニーに含まれている水が増加するにつれて光合成活性が上昇しトレハロース含有量が減少した。

さらに、*N. commune* に近縁で実験室で培養可能な *N. punctiforme* IAM M-15 を用いて、乾燥過程でのトレハロース含有量の変化を調べた。乾燥により

トレハロース量が増加し、風乾した試料では $5\mu\text{mol/g}$ 乾重量以上のトレハロースが蓄積していた。トレハロース代謝系酵素の遺伝子はゲノム上に近接している。トレハロース合成酵素遺伝子(*treYZ*)、分解酵素遺伝子(*treH*) の転写産物量は乾燥処理 6~12 時間で減少した。*N. punctiforme* IAM M-15 粗抽出液中のトレハロース合成活性は 0.5 U/g protein 、分解活性は 50 U/g protein であった。トレハロース合成活性は 50 mM NaCl を加えても影響されなかったが、分解活性は約 20% まで活性が減少した (Fig. 2)。Tris (hydroxymethyl) aminomethane (略称: Tris) はトレハロース合成酵素の活性に影響を与えなかったが、分解活性を強く阻害した (Table 2)。大腸菌で大量発現したトレハロース分解酵素の活性は、 NaCl および Tris で阻害されることから、非ストレス条件下でトレハロース分解酵素の活性が高く保たれており、乾燥または塩ストレス条件下でトレハロース分解酵素の活性が阻害をうけることによって合成と分解のバランスが合成へと大きく傾くことにより、トレハロースの蓄積を行う機構があることが考えられる。今後は、トレハロース分解酵素の阻害剤についての研究を行っていく必要がある。

Table 1 陸棲ラン藻 *Nostoc commune* における色素およびウロン酸の含有量

	<i>N. commune</i> cells with EPS	<i>N. commune</i> cells without EPS
Chlorophyll (mg/g dry weight)	0.9±0.5	7.6±3.0
Carotenoids (mg/g dry weight)	0.6±0.2	2.6±0.8
MAAs (mg/g dry weight)	4.8±8.5	7.9±10
Scytonemine (mg/g dry weight)	1.0±1.2	1.0±0.7
Uronic acid (mg/g dry weight)	310±190	0.04±0.01

EPS はコロニーを機械的に破碎した後紙フィルターでろ過することにより除去した。クロロフィルとカロテノイドはメタノールで抽出し、分光学的に定量した。MAAs とスキトネミンはメタノール抽出物を HPLC を用いて定量した。硫酸加水分解物中に含まれるウロン酸をカルバゾール法により比色定量した。

Table 2 トレハロース代謝系酵素に対する緩衝液の影響

	Mts + Mth activity (mU/g protein)	Trehalase activity (U/g protein)	<i>Np</i> TreH activity ($\times 10^3$ U/g protein)
25mM HEPES-NaOH (pH 7.5)	29.6	24.9	477
25mM TES-NaOH (pH 7.5)	54.0	25.8	446
25mM Tris-HCl (pH 7.5)	8.8	0	0
25mM Tris-H ₂ SO ₄ (pH 7.5)	Not measured	0	Not measured
25mM HEPES-NaOH + 5mM Tris-HCl (pH 7.5)	Not measured	0	9

ラン藻 *N. punctiforme* IAM M-15 株の無細胞抽出液および大腸菌で大量発現し精製したトレハロース分解酵素 *Np*TreH を用いて酵素反応溶液に含まれている緩衝液の影響を調べた。デンプンを基質とし 2 段階の反応の結果生じたトレハロースを定量しトレハロース合成酵素 (Mts + Mth) の活性とした。また、トレハロースを基質とし加水分解により生じたグルコースを定量してトレハロース分解活性とした。

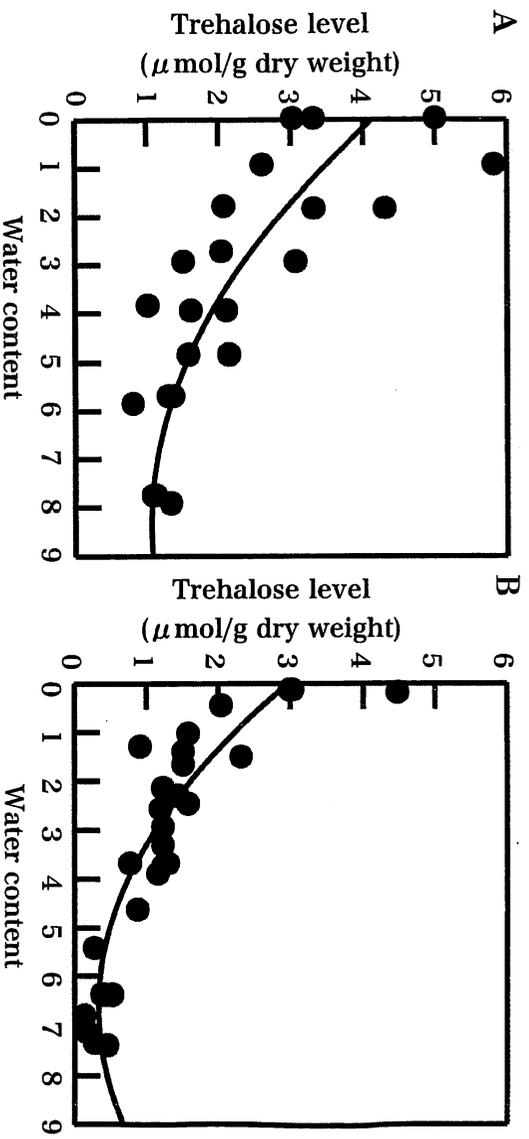


Fig. 1 *N. commune* の光合成活性とトレハロース含有量に対する含水量の影響

A, 制限された水を加えた時の *N. commune* のトレハロース含有量の変化。乾燥させたコロニーに対して乾重量あたり一定量の水を加えて水和した後の *N. commune* のトレハロース含有量をコロニーに含まれている水分量に対してプロットした。 $y=0.015029x^2-0.25104x+1.413$ 、 $r^2=0.608$ 、 $p<0.0001$ 。 B, 乾燥させた時の *N. commune* のトレハロース含有量の変化。完全に水和させた *N. commune* のコロニーをデジテーター内で乾燥させ、トレハロース含有量を測定し、コロニーに含まれている水分量に対してプロットした。 $y=0.020701x^2-0.27363x+1.0188$ 、 $r^2=0.767$ 、 $p<0.0001$ 。 C, 制限された水を加えた時の *N. commune* の光合成活性の変化。乾燥させたコロニーの乾重量に対して一定量の水を加えて水和した後、光合成活性を測定した。測定後、コロニーを完全に水和

させて得た光合成活性を100%とした。 $y=-0.18573x^2+10.644x+19.211$ 、 $r^2=0.599$ 、 $p<0.0001$ 。D, 乾燥させた時の *N. commune* の光合成活性の変化。完全に水和させたコロニーをデシケーター内で乾燥させて、光合成活性を測定した。測定後、コロニーを完全に水和させて得た光合成活性を100%とした。 $y=-0.4272x^2+10.73x+32.384$ 、 $r^2=0.613$ 、 $p<0.0001$ 。

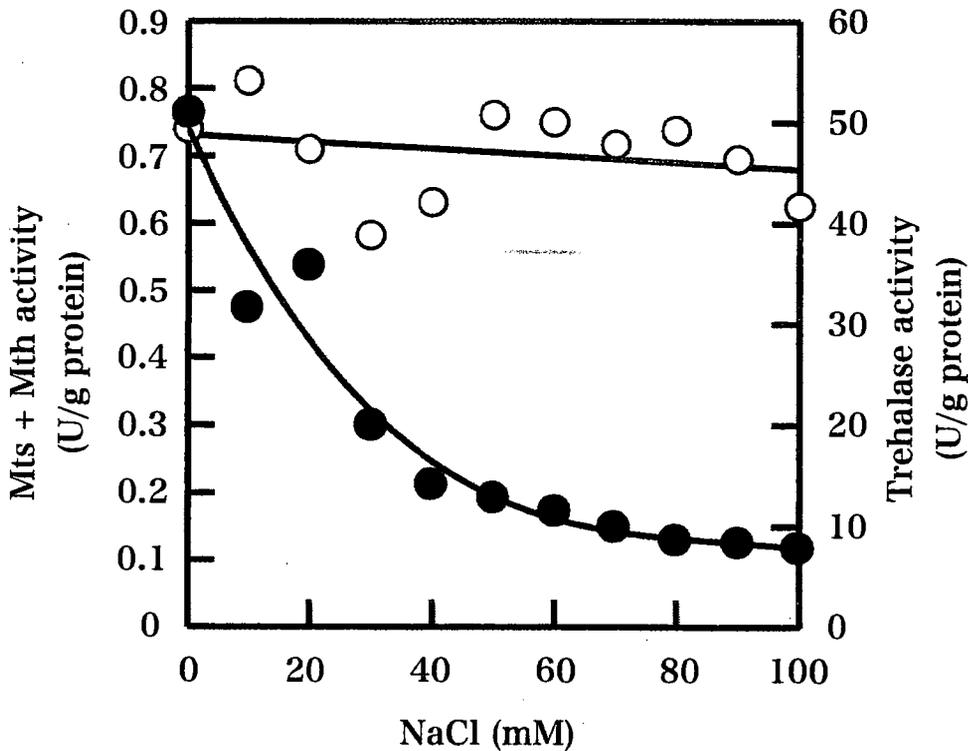


Fig. 2 トレハロース代謝系酵素の活性に対する NaCl の影響

Nostoc punctiforme M-15 株の無細胞抽出液を用いて、デンプンを基質として 2 段階の酵素反応によりトレハロースを生じる反応を指標としてトレハロース合成酵素活性 (Mts + Mth, ○) を測定した。また、トレハロースが加水分解されグルコースを生じる反応を指標にしてトレハロース分解酵素活性 (trehalase, ●) を測定した。酵素反応溶液中に NaCl を加えて活性を測定し、NaCl の影響を調べた。

学位論文審査結果の要旨

本論文は、陸棲ラン藻 *Nostoc commune* (イシクラゲ) が陸上環境に適応した機構を解明することを目的とし、ストレス防御物質として働くと考えられる紫外線吸収色素の局在と乾燥ストレスにตอบสนองして適合溶質であるトレハロースが蓄積する機構について、生理生化学的手法により解析した研究成果を記載している。

野外に生育する本生物のコロニーには光合成色素に匹敵する量の紫外線吸収色素が含まれており、高濃度の紫外線吸収色素を蓄積することが陸上への適応に必要であることが考察された。乾燥ストレス処理によって、コロニーに含まれている水が減少するに従って光合成活性が減少し、同時に、トレハロース含有量が増加した。この結果は、コロニーに含まれる水の量にตอบสนองして光合成活性とトレハロース含有量を変化させる適応現象であると考察された。トレハロース合成酵素活性は酵素反応液中に含まれている塩濃度に影響されないが、トレハロース分解酵素活性は反応液中に含まれている塩により強く阻害される現象が *in vitro* の実験により見いだされた。この結果は、非ストレス条件下ではトレハロース分解酵素の活性が高く保たれており、乾燥または塩ストレス条件下ではトレハロース分解酵素活性が阻害をうけることによって合成と分解のバランスが合成へと大きく傾き、その結果としてトレハロースを蓄積するという機構を強く示唆する。この発見は、本生物が示す極限的な乾燥耐性の分子機構についての重要な知見である。

以上の研究成果は当該学問分野における新知見を含むものであり、審査委員会として博士(理学)に値すると判断した。