

研究終了報告書

「多細胞性シアノバクテリアの細胞分化調節物質の探索」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：木村 駿太

1. 研究のねらい

シアノバクテリア(藍藻)は葉緑体の起源と考えられている生物で、世界中の水中、陸地に生息しており、生態系における重要な一次生産者である。シアノバクテリアは、原核生物でありながら多細胞が連なって役割分担をしており、真核生物とは別個の進化を遂げた多細胞生物といえる。一方で植物の葉緑体の起源生物であるシアノバクテリアには、植物の細胞間コミュニケーションの最も原始的な例が保存されている可能性があるといえる。その情報のやりとりは化学物質で行われているはずであり、提案者は本研究期間においてこの機能性物質を探索・解明したい。植物の起源生物としてのシアノバクテリア、独自の進化を遂げた多細胞生物としてのシアノバクテリア、この2つの側面に注目しつつ、細胞間のコミュニケーションを行う活性化化合物を単離・同定することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

シアノバクテリア(藍藻)は、原核生物でありながら多細胞が連なって役割分担をしており、真核生物とは別個の進化を遂げた多細胞生物といえる。一方で植物の葉緑体の起源生物であるシアノバクテリアには、植物の細胞間コミュニケーションの最も原始的な例が保存されている可能性が考えられる。本研究は、シアノバクテリアの細胞分化を調節する新規の活性化化合物の単離・同定を試みた。多細胞性シアノバクテリアは、明確な生活環と優れた環境耐性を備え、乾燥処理により生存細胞を休眠細胞(akinetes)のみにできることを申請者が見出した *Nostoc* sp. HK-01 を用いた。本研究期間内の成果として、シアノバクテリアの細胞分化を調節する新規の活性化化合物の単離・同定を試みた。培養後の培地の抽出液から、休眠細胞の発芽を抑制する活性を見出し、各種精製手法と、申請者が確立した生物検定法による活性試験により、その活性画分を特定した。単離のためには煩雑なステップを経ることが必要であったことから、活性画分の精製の効率化を図り、より簡便に活性画分を単離できるメソッドを確立した。効率化した精製フローを用いて単離した活性物質を質量分析などに供し、精密な分子量等の構造情報を得た。また、構造予測により、活性化化合物本体および開裂した部分構造と思われる組成式を得た。構造決定には至っていないものの、引き続き大量培養と分離・精製を繰り返し、各種分析に供することで、活性物質の構造決定が可能であると考えている。構造決定後は、市販品または合成品を用いた活性確認により、明らかにした化学構造が活性を示すことを確かめた後、公表論文として報告したいと考えている。シアノバクテリアの陸地における生存のために、細胞分化を伴う細胞の役割分担、特に休眠の制御は必須であるが、akinetes の休眠を制御する化合物はこれまで明らかにされていなかった。当該活性物質は乾燥に曝される陸地環境において、休眠と増殖のバランスをとる鍵として働いている可能性が

あり、本研究成果は陸棲のシアノバクテリアの生存戦略の解明に大きく貢献できると期待している。

(2) 詳細

研究テーマ1. 各種既知生長調節物質のシアノバクテリアへの影響の検証

研究提案者は、光合成・窒素固定により陸地生態系・作物収量に多大な影響を与えているシアノバクテリアの陸地における生存のために、細胞分化を伴う細胞の役割分担、特に休眠細胞への分化が必須であることを示してきた(図1)。休眠細胞への分化は生存に必須であるがゆえに厳密な制御機構が存在すると予想されるが、その分化・発芽に関する環境条件の報告において、栄養細胞の糸状体の全てではなく、その中のいくつかの細胞のみが休眠細胞に分化する。このため、環境要因以外にもトリガーがあると推測されるが、分化を直接制御する物質等は明らかにされていなかった(Sukenic et al. In *Cyanobacteria*, Academic Press, 2019)。高等植物においては、ジベレリンやアブシジン酸といった生長調節物質(植物ホルモン)類が休眠・発芽を調節していることが良く知られていた(Hilhorst and Karssen, *Plant Growth Regul.*, 1992.)。他方、シアノバクテリア類においてはいくつかの植物ホルモン生産の報告例があるが(Lu and Xu, *Trends Plant Sci.*, 2015)、その生理機能はほとんど解明されておらず、既知あるいは未知の物質がシアノバクテリアの休眠を制御している可能性が考えられた。既知の植物ホルモン類をシアノバクテリアに添加し、休眠からの発芽率を検証したところ、アブシジン酸、ジベレリンは活性を示さず、オーキシンは発芽をやや抑制する傾向、エチレンとサイトカイニン類は発芽をやや促進する傾向が認められた。特に、サイトカイニン類の発芽促進活性は植物と似た構造-活性相関を示したことから、植物とシアノバクテリアが、ある程度共通の情報物質と受容のメカニズムを利用している可能性が考えられる。

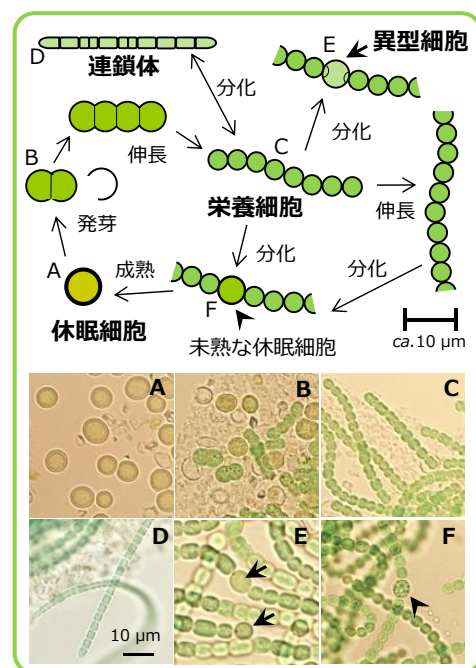


図1 NosHK の生活環と顕微鏡写真

研究テーマ2. シアノバクテリア *Nostoc* sp. HK-01 の生活環に關与する新規活性物質の探索

申請者は、シアノバクテリアの細胞および、シアノバクテリア培養後の培地の抽出物をカラムクロマトグラフィーで溶媒分画した特定の画分から、発芽促進活性と発芽抑制活性をそれぞれ予備的に見出していた。特に発芽抑制活性は既知の植物ホルモンで説明できなかったため、新規物質であることが期待された。

5段階のクロマトグラフィーによる精製と、申請者が確立した生物検定法による活性試験により、その活性画分を特定した。その活性画分は極めて微量で、かつ、単離のためには煩雑なステップを経ることが必要であり、構造決定に關わる各種分析の律速となっていた。活性画分の精製の効率化を図り、いくつかのステップを省略して、より効率的に活性画分を単離できるメソッドを確立した。効率化した精製フローを用いて単離した活性物質を質量分析などに供し、精密な分子量等の構造情報を得た。また、構造予測により、活性化化合物本体および開裂した部分構造と思われる組成式を得た。

3. 今後の展開

本研究は、多細胞性シアノバクテリア *Nostoc* sp. HK-01 の生活環のうち、特に生存に關わる機能である休眠からの発芽を調節していると考えられる化合物を、生物活性を指標に単離した。引き続き大量培養と分離・精製を繰り返す、各種分析に供することで、活性物質の構造決定が可能であると考えている。構造決定後は、市販品または合成品を用いた活性確認により、明らかにした化学構造が活性を示すことを確かめた後、公表論文として報告したいと考えている。また、今回見出した化合物について、今後、時間的・空間的な量変動の追跡、新規生長調節物質の代謝経路の推定、他階層の生物における存在と活性の検証といった項目を進めていくことで、細胞集団の生活環をどのように制御しているか、考察することが可能になると考えており、進めていきたいと計画している。

本研究は、休眠から蘇生(発芽)するフェーズを抑制する活性化化合物にフォーカスしたが、生活環の他のフェーズにおいても未知の生長調節物質が機能している可能性は大いに考えられる。こういった活性物質を探索していくことで、シアノバクテリアの生長生理学という学問分野が開拓できると考えている。活性化化合物の探索は、個人研究では一つの化合物に年単位の時間が必要となるが、より多くの研究者と協働し、10年ほどこの分野に取り組むことができれば、ある程度幅広い読者を想定した教科書に掲載できるような内容になるのではないかと考えている。

4. 自己評価

シアノバクテリアの休眠からの発芽を調節していると推定される新規の活性化化合物を単離し、構造決定まであと一歩というところまで迫れたことは、ある程度評価できている。現時点で構造決定が達成できておらず、また元々想定していた新規活性物質の機能解明まで至らなかった点は残念であるが、研究期間中の異動および実験室のセットアップのためかなりの労力を要したにも関わらず、一定の成果を出すところまでたどり着けたことはACT-X制度のサポートに拠るところも大きく、大変感謝している。社会実装という観点では、

植物の化学調節研究はシダやコケまでは行われているが、シアノバクテリアまで遡られてはいないことから、3項でも述べたように、本研究が発展した際には、幅広い読者を想定した教科書に掲載できるような内容になるのではないかと考えている。また、陸棲シアノバクテリアは、光合成・窒素固定により陸地生態系・作物収量に多くの影響を与えていることから、その陸地での生存に関わる調整機構が紐解かれることで、食糧生産においても重要な波及効果となる可能性も秘めていると期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

該当なし

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

木村駿太. 惑星保護方針を満たす宇宙農業を目指した陸棲シアノバクテリアの生活環の人為的な制御研究. 日本農芸化学会 2021 年度大会 2021 年度産学官学術交流フォーラム. 2021 年 3 月.

惑星保護と宇宙農業の両立を目指した陸棲シアノバクテリアの制御研究. 木村駿太. 2022 年日本農芸化学会大会 産学官学術交流フォーラム. 2022 年 3 月.