



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	窒素固定性シアノバクテリアNostoc sp. に対するホルモゴニア分化誘導因子の探索およびそれらの構造活性相関に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	西塚, 紘明
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13150号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70182
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroaki_Nishizuka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称：博士（農学）

氏名 西塚 紘明

学 位 論 文 題 名

窒素固定性シアノバクテリア *Nostoc* sp. に対するホルモゴニア分化誘導因子の
探索およびそれらの構造活性相関に関する研究

【背景】

窒素供給を介した植物 - 微生物共生系は、異種間情報伝達物質を介した相互情報伝達機構およびその応答機構によって維持されている。窒素固定能を持つ *Nostoc* 属シアノバクテリアは通常、栄養細胞と窒素固定細胞（ヘテロシスト）からなる自活連鎖体（糸状体, filamentous cells）を形成しており、共生系構築時に運動性を持つホルモゴニアへと分化する。共生系構築の初期段階では、*Nostoc* sp. は、宿主植物から放出されるホルモゴニア分化誘導因子 (hormogonium-inducing factor, HIF) によって運動性をもつホルモゴニアへ形態分化するが、その分子構造あるいは作用機序はほとんど明らかになっていない。特に HIF の化学構造に関する知見は、所属研究室でソテツ (*Cycas revoluta*) のサンゴ状根メタノール抽出物から単離同定された(S)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol など、中鎖飽和脂肪酸が 1 位にアシル基として結合したジアシルグリセロール(DAG) 以外にはほとんどないのが現状である。本研究では、HIF 様活性を有すると予想される DAG 構造類似化合物の HIF 活性を検定し、それらの構造活性相関を検討すると共に、HIF が含まれると予想される宿主植物から非 DAG 系 HIF の探索を行った。

1. 合成ジアシルグリセロール類およびプロテインキナーゼ C 賦活化剤関連化合物による HIF 様活性の検証

ソテツ・サンゴ状根から HIF の 1 つとして単離同定された(S)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol とそのエナンチオマー、さらにはそれらのラセミ体をそれぞれ合成し、合成品の HIF 様活性と不斉炭素の活性との関わりを検定した。また、アシル基のアルキル鎖長、異なる不飽和度、アシル基の位置異性に加え、ジアシルフォスファチジノイド類 や 1-モノアシルグリセロール(MAG) を加え、置換基構造や物理化学的性質の違いと HIF 様活性の強弱との間に認められる相関を検証した。さらには、DAG の生理活性の 1 つとして知られる PKC 賦活化と HIF 様活性との関連性を検証するため、DAG および天然物として知られる幾つかの PKC 賦活化剤について、それらの HIF 様活性の有無を検証した。その結果、1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol は天然型の S-体が R-体よりも低濃度（10 nmol/disc）で活性力価が高く、R-体は高濃度ではむしろ活性が低下することが分かった。またこれらの等量混合物（ラセミ体）は、安定した活性が 1~100 nmol/disc の範囲で維持された。1 位のアシル基が不飽和脂肪酸である(S/R)-1-linoleoyl-2-palmitoylglycerol では HIF 様活性はほとんど見られなかったが、

アシル基の組み合わせにより活性力価は異なるものの、1 位が C₁₄~C₁₈ の飽和脂肪酸によるアシル化を受けている DAG は、強い HIF 様活性を示した。また、ホルボールエステル類やウルシオールはいずれも HIF 様活性をほとんど、あるいは全く示さず、ホルモゴニア分化誘導には PKC 賦活化によるシグナル伝達経路とは別の作用機序が関わっていることが示唆された。一方、接触毒性化合物アナカルド酸類は、高濃度ではシアノバクテリアに対する致死毒性活性を示すが、1 nmol/disc で HIF 様活性を示すことが確認された。

2. アナカルド酸アルキルエステル誘導体の化学合成とそれらのホルモゴニア分化誘導活性

シアノバクテリアに対する致死毒性作用がある HIF の 1 つとしてイチョウ偽果からアナカルド酸類を単離同定した。この毒性にはアナカルド酸のカルボキシ基が寄与すると予想し、これをメチルエステルに変換し、毒性と活性がそれぞれ維持されるかどうかを検証した。一方、DAG とアナカルド酸類の化学構造が類似性に注目し、アナカルド酸類のカルボキシ基に中鎖アルキルアルコールをエステルとして導入することにより、化学構造がより DAG に類似するアナカルド酸誘導体群を調製し、それらの HIF 様活性に対する構造活性相関を調べた。その結果、エステル誘導体化により、シアノバクテリアに対する致死毒性は解消され、HIF 様活性が大きく上昇した。特に、C₈~C₁₀ 中鎖アルコールエステル誘導体により高い HIF 様活性が示された。これらの化合物は、ホルモゴニア分化研究の新規化学ツールとして期待される。

3. ソテツ由来の宿主特異的ホルモゴニア分化誘導因子の探索

Nostoc 属シアノバクテリアと共生関係を構築できるソテツのサンゴ状根から HIF として単離同定した(S)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol をはじめとする DAG 類は、多くの生物で細胞膜構成一次代謝産物として存在していることから、宿主植物を特異的に認識する化学シグナル因子とは考えにくく、共生系の構築機序に関わる宿主特異的シグナル因子が DAG とは別に存在することが示唆される。ソテツ落葉（リター）から溶脱・供給される宿主特異的 HIF が、土壌表面に棲息する単生シアノバクテリアのホルモゴニア分化誘導に関与すると予想し、ソテツ・リターのメタノール抽出物から HIF を探索した。各種クロマトグラフィーとバイオアッセイで活性本体を追跡した結果、裸子植物が特異的に産生するビフラボン類の幾つかを、強力な HIF として単離同定した。ビフラボン類を含め、フラボノイドは、ホルモゴニア分化誘導と連動する遺伝子である *hrm* 遺伝子の発現に関与していることから、ビフラボン類がシアノバクテリアとの共生構築シグナル因子として主に機能している可能性が示された。

【今後の展望】

本研究によって見出したこれら化学ツールは、ホルモゴニア分化誘導に関わる遺伝子検索や、次に続くシグナル物質の探索に役立てることができる。一連のシアノバクテリア共生系構築の分子機序解明により、高等植物への共生系附与技術の確立から農作物の収穫改善へ至る応用展開が期待される。