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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13150
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70911
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroaki_Nishizuka.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

北海道大学　大学院農学院

応用生物科学専攻　博士後期課程

西塚　紘明

謝辞

本研究は多くの方々のご協力により遂行することができました。本論文の主査をお引き受けくださった北海道大学農学研究院生態化学生物学研究室の橋床泰之教授には，研究の基礎から論文の執筆まで終始ご指導，ご鞭撻いただき大変お世話になりました。実験のミスが多く，思うように結果を残せない著者を指導教官として，学部 3 年生の研究室分属から現在までの 7 年間，最後までご指導してくださいました。言葉には尽くせませんが，ここに厚く御礼申し上げます。本論文の副査として適切なご助言，ご指導をいただきました同農学研究院生物有機化学研究室の松浦英幸教授，同農学研究院生態化学生物学研究室の橋本誠准教授，崎浜靖子講師に厚く御礼申し上げます。松浦英幸教授には日本農芸化学会，植物化学調節学会の大会参加にあたり大変お世話になりました。また，橋本誠准教授，崎浜靖子講師には研究に対するクリティカルなご助言や，日頃の研究生活や日常生活の姿勢に対する数々のご指導をいただきました。重ねて御礼申し上げます。

本研究で使用した植物試料の採取に当たり，様々な方のご助力をいただきました。屋久島のソテツ・サンゴ状根，葉裏面滲出物，枯死葉の採取にあたり屋久島ネイチャーセンターの市川聡様にご協力いただきました。スウェーデン Döttrenåive サイトでのフェザーモスの採取は，ウェールズ大学の Thomas H. DeLuca 教授のご厚意により行うことができました。また，スカンジナビア調査では，ウメオ大学の Reiner Giesler 教授，北海道大学農学研究科森林資源生物学研究室の宮本敏澄講師，北九州市立大学の原口昭教授に大変お世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

機器分析に際し，北海道大学大学院農学院 GC-MS・NMR 測定室の福士江里博士，高田祐輔氏にご協力いただきました。化合物の MS スペクトル測定からビフラボン類の化学構造の決定に至るまで，数々のご助言，ご協力いただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究は，北海道大学農学院生態化学生物学研究室において遂行されたものです。著者は同研究室に在籍した 7 年間，数多くの方々に支えられ，充実した研究室生活を送ることができました。事務官の安住真梨子さんには，事務手続きにおいて多くのご面倒を引き受けていただきました。また，同研究室の諸先輩や，同期，後輩の皆様には様々な面で助けていただきました。基本的な実験の手法から事務的な手続きの仕方まで，礒田玲華さんをはじめとする先輩方にはお世話になりました。学部生 3, 4 年生の研究室生活では，同期の島綾奈さん，

久野航さん，布施茜さんには支えられました。修士課程から博士後期課程に至る 5 年間は，たくさんの後輩に恵まれ，数えきれないほどの励ましをいただき，実りある研究生活を送ることができました。北海道大学農学院生物有機化学研究室の学生諸氏，北海道大学農学院木質生命化学研究室の学生諸氏とは，多くの交流する機会をいただき，単調になりがちな研究室生活を楽しく過ごすことができました。深く感謝いたします。

最後に，私の大学生活を含め，これまでの人生を精神的，経済的に支えてくださり，常に応援してくださった両親に深く感謝いたします。

平成 30 年 3 月　　西塚紘明

目次

第一章　緒論 1

1.1 *Nostoc* 属シアノバクテリアについて 1

1.2 *Nostoc* 属シアノバクテリアの生活環 2

1.3 *Nostoc* 属シアノバクテリアと植物との共生 3

1.3.1 グンネラとの共生 3

1.3.2 ソテツとの共生 4

1.3.3 アカウキクサとの共生 4

1.3.4 コケ植物との共生 5

1.4 *Nostoc* 属シアノバクテリアと宿主植物とのシグナル応答 6

1.4.1 ホルモゴニア分化誘導因子 (hormogonia-inducing factor, HIF) 7

1.4.2 走化性因子 (attractant) 7

1.4.3 ホルモゴニア分化抑制因子 (hormognia-repressing foctor, HRF) 8

1.5 プロテインキナーゼ C による細胞内シグナル伝達 9

1.6 *Nostoc* sp.のホルモゴニア分化誘導に関連する遺伝子 11

1.7 裸子植物とそれらの二次代謝産物・関連有機化合物について 12

1.8 本研究の目的 13

第二章　材料と方法 14

2.1 植物試料のサンプリング 14

2.1.1 イチョウ (*Ginkgo biloba*) 15

2.1.2 ソテツ (*Cycus revoluta*) 15

2.2 シアノバクテリアの培養法 17

2.2.1 培地 17

2.2.2 培養条件 18

2.3 シアノバクテリアの種同定 18

2.3.1 シアノバクテリアの分離 18

2.3.2 16SrRNA 遺伝子配列の相同性解析を用いた分離株の同定 18

2.3.2.1 シアノバクテリアの核酸抽出 18

2.3.2.2 分光光度計を用いた核酸の定量 19

2.3.2.3 PCR 20

2.3.2.4 電気泳動 20

2.3.2.5 切り出し精製法 21

2.3.2.6 シークエンシング 21

2.4 ホルモゴニア分化誘導試験 23

2.5 蛍光顕微鏡観察 24
2.6 クロロフィル定量 24
2.7 溶媒 24
2.8 薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC) 25
2.8.1 TLC プレート 25
2.8.2 検出方法 25
2.9 カラムクロマトグラフィー 26
2.9.1 順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー 26
2.9.2 硝酸銀コーティング順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー 26
2.9.3 逆相カラムクロマトグラフィー 26
2.9.4 DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィー 27
2.9.5 ゲル濾過クロマトグラフィー 27
2.10 機器分析 27

第三章 2 種類のゲル化剤を用いた固体培地上でのホルモゴニア分化誘導現象の比較検討 28
3.1 はじめに 28
3.2 方法 29
3.2.1 ホルモゴニア分化誘導試験に用いた固体培地の調製 29
3.2.2 ホルモゴニア分化誘導試験の活性力価の定量的評価 29
3.3 結果 30
3.4 考察 32
3.4.1 各ゲル上でのホルモゴニア分化誘導 32
3.4.2 菌体の生存性とホルモゴニアによるバンドル状の形成 32
3.4.3 ジェランガムゲルを用いたアッセイ法の利点 33
3.5 第三章のまとめ 34

第四章 不斉およびラセミ合成ジアシルグリセロール類による HIF 様活性の検証 34
4.1 はじめに 34
4.2 方法 34
4.2.1 化合物の設定 34
4.2.3 ホルモゴニア分化誘導試験 35
4.3 結果 36
4.3.1 合成ジアシルグリセロール類のホルモゴニア分化誘導活性 36
4.3.2 合成ジアシルグリセロール類のホルモゴニア分化誘導活性 36
4.4 考察 41

4.4.1 ジアシルグリセロール類の HIF 様活性の構造活性相関 41
4.4.2 光学異性体ジアシルグリセロール類の HIF 様活性の構造活性相関 41
4.4.3 HIF 様活性を示さないジアシルグリセロール類似化合物について 42
4.5 第四章のまとめ 43
4.6 Experimental 44

第五章 プロテインキナーゼ C 賦活化剤の HIF 様活性の検証とアナカルド酸アルキルエステル誘導体の HIF 様活性の構造活性相関 48
5.1 はじめに 48
5.2 PKC 賦活化剤関連化合物のホルモゴニア分化誘導活性の検証 49
5.2.1 anacardic acid C15:1-Δ^8 の調製 49
5.2.1.1 イチョウ偽果 MeOH 抽出物の液液分配 51
5.2.1.2 シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるアナカルド酸類の精製 51
5.2.1.3 アナカルド酸メチルエステル誘導体の化学合成 53
5.2.1.4 硝酸銀シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる不飽和アルキル基をもつアナカルド酸メチルエステル誘導体の分離 54
5.2.1.5 逆相 HPLC による各メチルエステル誘導体の精製 55
5.2.1.6 メチルエステル誘導体の加水分解処理 56
5.2.2 PKC 賦活化剤関連化合物のホルモゴニア分化誘導試験結果 57
5.3 アナカルド酸メチルエステル誘導体による細胞毒性の解消 61
5.4 アナカルド酸アルコールエステル誘導体の化学合成 62
5.5 アナカルド酸アルコールエステル誘導体の HIF 様活性検定結果 63
5.6 考察 67
5.6.1 PKC 賦活化との関連性 67
5.6.2 アナカルド酸類とジアシルグリセロール類の構造活性相関 67
5.6.3 アナカルド酸類のシアノバクテリアに対する致死毒性 68
5.6.4 アナカルド酸アルキルエステル誘導体の構造活性相関 69
5.6.5 アナカルド酸アルキルエステル誘導体の利便性 69
5.7 第五章のまとめ 70

第六章 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 71
6.1 はじめに 71
6.2 HIF 探索に利用した植物資材 72
6.3 ソテツ枯死葉抽出物及びソテツ葉裏滲出物を用いた予備試験 73
6.4 ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物からの HIF の単離精製 74
6.4.1 ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物の液液分配 75
6.4.2 カラムクロマトグラフィー1 75

6.4.3 カラムクロマトグラフィー2 76
6.4.4 カラムクロマトグラフィー3 77
6.4.5 逆相 HPLC による分画 78
6.4.6 活性本体の化学構造の推定 79
6.5 ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物からのビフラボン類の単離精製 80
6.5.1 ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物の液液分配 82
6.5.2 有機層の acetone 転溶 82
6.5.3 acetone 可溶画分の $CHCl_3$ 転溶 82
6.5.4 $CHCl_3$ 不溶沈殿のゲル濾過クロマトグラフィー 83
6.5.5 シリカゲルカラムクロマトグラフィー 84
6.5.6 逆相 HPLC による精製 85
6.5.7 活性本体の化学構造決定 87
6.5.7.1 Compound **1** の化学構造決定 88
6.5.7.2 Compound **2** の化学構造決定 90
6.5.7.3 Compound **3** の化学構造決定 91
6.6 各ビフラボン類のホルモゴニア分化誘導検定試験 101
6.7 考察 102
6.7.1 ソテツ枯死葉由来の新規 HIF の同定 102
6.7.2 ホルモゴニア分化誘導関連遺伝子との関係 102
6.7.3 フラボノイドの共生シグナル因子としての役割 103
6.8 第六章のまとめ 104

第七章 総合考察 105
7.1 はじめに 105
7.2 ホルモゴニア分化誘導と PKC 賦活化との関係性 105
7.3 アナカルド酸及びアナカルド酸アルコールエステル誘導体と DAG との構造活性相関 105
7.4 DAG とは異なる分子種である新規 HIF ビフラボン類の同定とそれらの環境中での役割 106
7.5 各化合物のホルモゴニア分化誘導の機序について 107
7.6 結論 109

参考文献 110

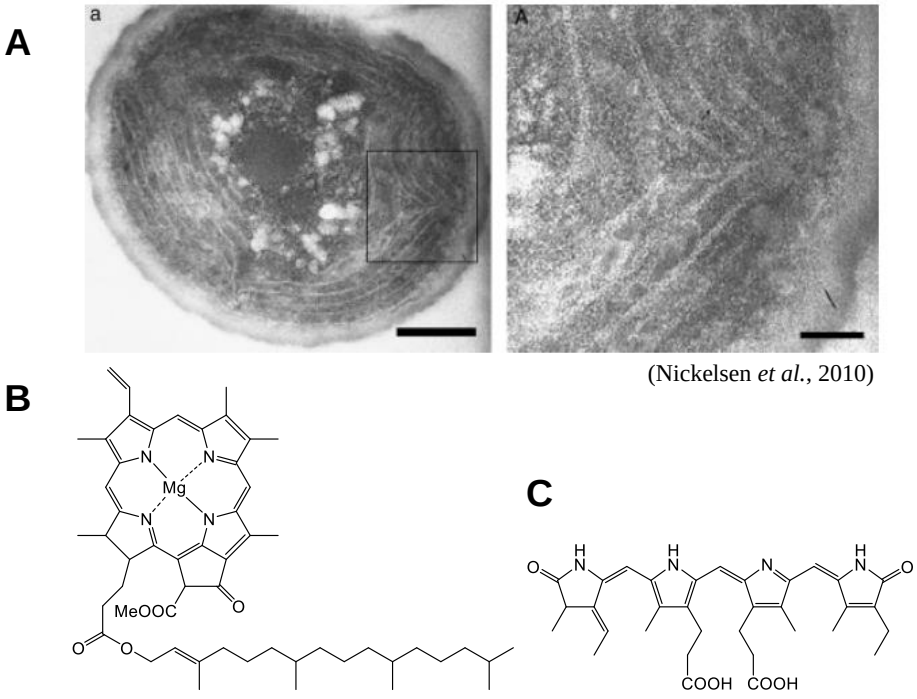
Appendix 119

第一章　緒論

1.1　*Nostoc* 属シアノバクテリアについて

シアノバクテリア (Cyanobacteria) はグラム陰性細菌に属する真正細菌の一種であり，シアノバクテリア門 (phylum : *Cyanobacteria*) に分類される微生物である。シアノバクテリアは光合成を行う独立栄養生物であり，光合成色素としてクロロフィル *a* やフィコシアニンをもつ。細胞の大きさは多様で，0.8 μm から 40 μm 程度のものまで知られており，Fig. 1.1 で示されるようにその内部には多層のチラコイド膜が存在する (Nickelsen *et al.*, 2010) 。シアノバクテリアは生育形態，細胞分裂様式，窒素固定能の有無などにより様々な目に分けられ，単細胞で生育するもの，糸状体と呼ばれる糸状の集合体を形成するもの，窒素固定を行うものなどが存在する (Rippka *et al*., 1979) 。それらの特徴から Table 1.1 で示されるような複数の目に分類されている。

Nostoc 属シアノバクテリアは，栄養増殖時においては細胞が糸状に連なった糸状体を形成するが，窒素飢餓環境下で窒素固定を行うヘテロシスト (異質細胞) と呼ばれる細胞に分化するという点で特徴的である。



(Nickelsen *et al.*, 2010)

Fig. 1.1 シアノバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC 6803) 光合成色素と菌体微細構造

A) シアノバクテリアの細胞内部には，プラスチドのチラコイド膜を連想させる多重膜構造が存在する。 (a, scale bar = 200 nm, A, scale bar = 100 nm)　**B)** Chlorophyll *a* の化学構造 **C)** phycocyanin の化学構造

Table 1.1　シアノバクテリアの分類

Unicellular （単細胞）	reproduction by binary fission （二分裂による増殖）		**Section I** Chroococcales（クロオコッカス目） Gloeobacterales（グロエオバクター目）
	reproduction by multiple fission giving rise to baeocytes （多分裂により内生胞子を生じる）		**Section II** Pleurocapsales（プレウロカプサ目）
Filamentous （糸状体を形成）	only vegetative cell （栄養細胞のみ）	division in only one plane （単平面で分裂）	**Section III** Oscillatoriales（ユレモ目）
	forming such as heterocysts, hormogonia, akinates （各種形態への分化能を持つ）		**Section IV** Nostocales（ネンジュモ目）
		division in more than one plane （多平面で分裂）	**Section V** Stigonematales（スティゴネマ目）

(Rippka *et al*., 1979, 一部改変)

本研究で用いた *Nostoc* 属シアノバクテリアは Section IVに属する。

1.2　*Nostoc* 属シアノバクテリアの生活環

本研究で用いた *Nostoc* 属シアノバクテリアは，細胞の分化の上で特徴的な生活環を持っている。生活環の大部分を占めるのは糸状体と呼ばれる形態で，光合成を行う栄養細胞が糸状に連なっている。また窒素飢餓環境下においては，糸状体の一部が窒素固定を行うヘテロシストに分化している。ヘテロシストでは窒素を還元するモリブデン，鉄，イオウ含有酵素であるニトロゲナーゼが産生され，この特殊な細胞において大気中の窒素が固定され，アンモニウムイオンが生成される。ニトロゲナーゼは酸素によって失活するため，ヘテロシストは厚い細胞壁に保護され，酸素供給源となるクロロフィルを持たないという特徴をもつ (Rai *et al*., 2000) 。

Nostoc 属シアノバクテリアは生活環のごく一部において，ホルモゴニウムと呼ばれる形態に分化することがある。ホルモゴニウムは繊毛による滑走運動を行う運動性を獲得しており、栄養細胞よりやや小さな細胞 (ホルモサイト) が糸状に数10個連なった形態をとる。この分化は，*Nostoc* 属シアノバクテリアが生育に不利な環境に置かれたときの環境ストレス応答によるものであると考えられており，分化を引き起こす要因としては新しい培地への継代 (Rippka *et al*., 1979) , 液体培地から固体培地への接種 (Hernández-Muñiz *et al*., 1987) , リン酸飢餓 (Hernández *et al*., 1993) あるいは鉄飢餓 (Douglas *et al.*, 1986) などが報告されている。ただ，ホルモゴニアにはヘテロシストが存在しないため窒素固定能はなく，栄養増殖も行わない。また，ホルモゴニアへ分化後，24 時間から 72 時間後に糸状体へと再分化する。

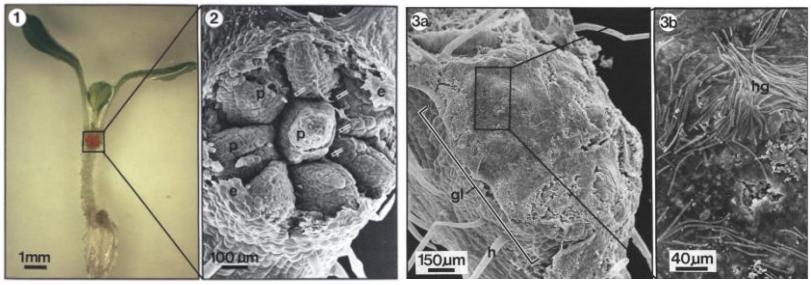
このほか，*Nostoc* 属シアノバクテリアは低温や乾燥にさらされた際，アキネート（休眠細胞）と呼ばれる低温耐性や乾燥耐性を獲得した休眠細胞へと分化し，その後生育に適した環境に戻るとそれを感知し，栄養細胞へと再分化できる (Adams *et al*., 1999) 。以上のように *Nostoc* 属シアノバクテリア栄養増殖菌体の各種細胞への形態及び機能分化は，周辺環境に対する応答の結果として起こるものであり，シアノバクテリアの生存ならびに生活環維持の上で重要である。

1.3 *Nostoc* 属シアノバクテリアと植物との共生

窒素固定能を持つ微生物は，複数の光合成植物と相利的な共生関係を構築することが知られている。すなわち，窒素固定微生物は宿主植物に大気中の窒素ガスから固定したアンモニア態窒素を宿主植物に供給し，一方，宿主植物は光合成産物や窒素固定微生物の生育場所を提供している。窒素固定性シアノバクテリアの宿主植物としては，被子植物であるグンネラ (*Gunnera*, グンネラ科) ，裸子植物であるソテツ (*Cycas revoluta*, ソテツ科) 及びザミア (*Zamia* sp., ザミア科) ，シダ植物であるアカウキクサ (*Azolla* sp., アカウキクサ科) ，コケ植物苔類であるウスバゼニゴケ (*Blasia pusilla*, ウスバゼニゴケ科) やツノゴケ類のツノゴケ (*Anthoceros punctatus*, ツノゴケ科) などが知られており，特定の門に限らず幅広い宿主域をもつという特徴がある (Bergersen *et al*., 1965; Peters and Meeks, 1989; Johansson *et al*., 1992; Chapman and Margulis, 1998; Adams and Duggan, 2008) 。

1.3.1 グンネラとの共生

グンネラは現在確認されている限り，シアノバクテリアと特異的共生関係を構築できる唯一の被子植物として知られている。この植物では stem gland と呼ばれる粘液を分泌する茎部の器官でシアノバクテリアが組織内生共生している (Chiu *et al*., 2005; Fig. 1.2) 。



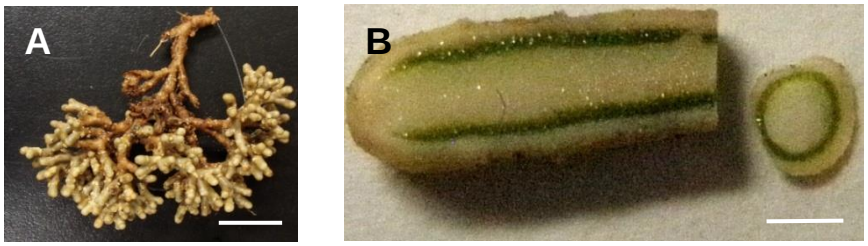
(Johansson *et al*., 1992)

Fig. 1.2 グンネラの stem gland に共生しているシアノバクテリア

1) グンネラ芽生えの子葉交差部分に粘液滲出部が存在する。**2)** stem gland の電子顕微鏡検鏡画像 **3a)** stem gland は *Nostoc* 属糸状シアノバクテリアに覆われており，その大部分は運動性ホルモゴニアの形態をとる。 **3b)** *Nostoc* で覆われている部分を拡大すると，ヘテロシストを持たないホルモゴニアが多数存在している様子が観察される。

1.3.2　ソテツとの共生

ソテツは，サンゴ状根 (coralloid root) と呼ばれる疑似根をシアノバクテリアとの共生器官として発達させている (Vessey *et al*., 2005) 。シアノバクテリアはサンゴ状根内部の維管束周辺の細胞間隙に，中心柱を円筒状に包み込むように組織内生共生している (Fig. 1.3) 。それらの細胞は糸状体や連鎖体のような連鎖状集合体ではなく，個々が球状の単細胞として細胞間隙に充填され，それぞれ高い窒素固定能を示す (Bergersen *et al*., 1965) 。



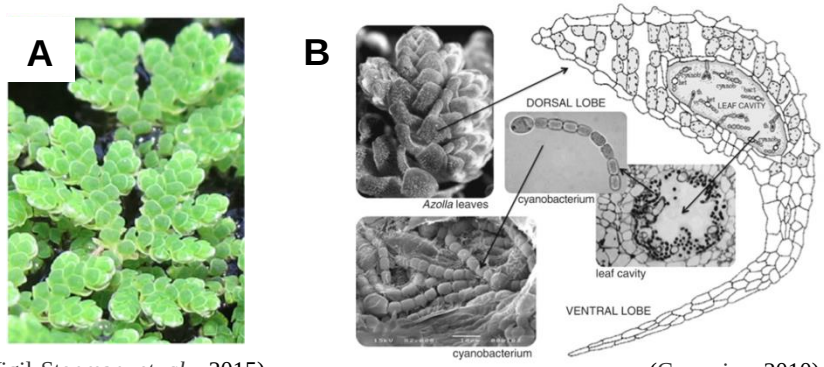
（田中，修士論文, 2012）

Fig. 1.3 ソテツ・サンゴ状根とそれに共生しているシアノバクテリア

A) シアノバクテリアが組織内に定着後，サンゴ状の塊を形成した根を発達させ，共生器官を形成する。scale bar = 2 cm　**B)** サンゴ状根先端部の横断面を撮影。維管束周辺の細胞間隙に *Nostoc* 属シアノバクテリアを共生させている。scale bar = 2 mm

1.3.3　アカウキクサとの共生

シダ植物であるアカウキクサ (*Azolla filiculoides*) と共生するシアノバクテリアは *Anabaena* 属である。*Anabaena* 属は *Nostoc* 属と同じ *Nostocaceae* (ネンジュモ科) に分類され，dorsal leaves に点在する小孔内 (leaf cavity) に細胞外共生している (Fig. 1.4) 。連鎖体はかろうじて保つが，個々の細胞は不規則にヘテロシスト化する (Peters and Meeks, 1989) 。



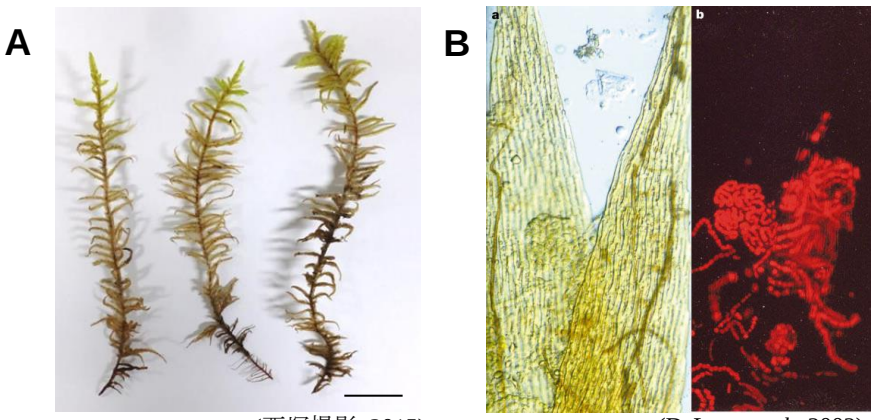
(Vigil-Stenman *et al*., 2015)　　(Carrapiço, 2010)

Fig. 1.4 アカウキクサ葉身と小孔内空洞に共生しているシアノバクテリア

A) アカウキクサ植物体 B) アカウキクサは茎に沿って鱗上に重なった厚みのある緑色または赤色の葉を発達させている。その内部には 0.15 × 0.30 mm 程度の楕円状の空洞が存在し，そこに *Anabaena* 属シアノバクテリアを共生させている。

1.3.4　コケ植物との共生

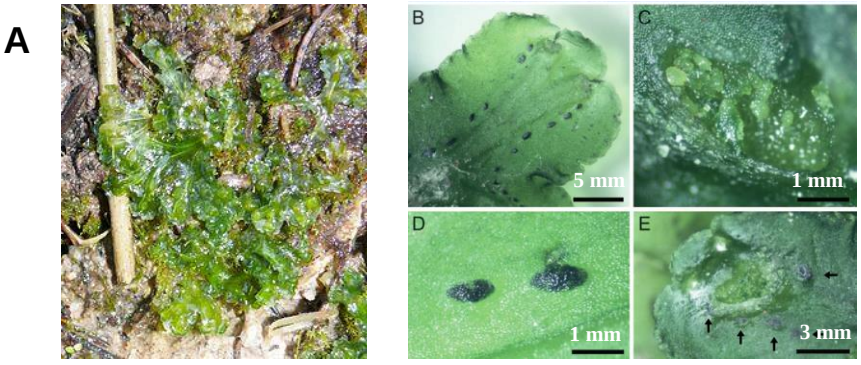
シアノバクテリアとコケ植物との共生の様式は多様である。蘚類との共生の多くは着生共生であり，フェザーモスの一種である *Pleurozium schreberi* では葉の表面に糸状体様の *Nostoc* 属シアノバクテリアを着生させている (Fig. 1.5) 。着生が認められた蘚類では，着生しているシアノバクテリアに菌体外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 様のゲル状構造物が発達しており，フェザーモスの葉片垂直断面からその様子が観察できる (Hill, 1997; Otero and Vincenzini, 2003; 西塚, 修士論文, 2015, Appendix 参照) 。一方，ツノゴケ類や苔類のように，シアノバクテリアを組織内に共生させているものも存在する (Fig. 1.6) 。



(西塚撮影, 2015)　　(DeLuca *et al*., 2002)

Fig. 1.5　フェザーモス *Pleurozium schreberi* と葉表面に着生しているシアノバクテリア

A) フェザーモス *Pleurozium schreberi* は窒素飢餓環境下において，葉の色は黄色を呈しており，その表面にしばしばシアノバクテリアを着生させている。scale bar, 1 cm　B) 蛍光顕微鏡下において，赤い自家蛍光を発するシアノバクテリアが着生している様子が観察できる。a : 明視野での検鏡像，b : 蛍光観察によるシアノバクテリアの自家蛍光の検鏡像



(Rikkinen and Virtanen, 2008)

Fig. 1.6 シャクシゴケ (*Cavicularia densa*)の組織内に共生しているシアノバクテリア

A) シャクシゴケ植物体 **B)** シャクシゴケに着生しているシアノバクテリアコロニー **C)** 葉状体から発芽したシャクシゴケ無性芽 **D)** 着生シアノバクテリアコロニーの拡大像 **E)** 老化シアノバクテリアコロニー（矢印）に囲まれた成熟花托

1.4 *Nostoc* 属シアノバクテリアと宿主植物とのシグナル応答

窒素固定微生物と宿主植物が相利的な共生関係を構築し，それを維持していくためには，化学物質を介したシグナル応答が必要不可欠である。たとえば両者の共生の代表例として，根粒菌とマメ科植物による相利共生がよく知られているが，感染誘導の段階ではマメ科植物の根からフラボノイドが分泌され，これを根粒菌が受け取ると Nod factor というリポキトオリゴ糖をシグナル物質として合成し，これを宿主植物へ放出する。これによりマメ科植物が根粒菌の存在を認識し，根粒形成のための各種遺伝子群が発現を開始する (Peters *et al.*, 1986; Long, 1996) 。*Nostoc* 属シアノバクテリアと宿主植物における共生関係の構築においても，これに類似した化学的シグナル応答が重要な役割を果たしていると予想されている (Fig.1.7) 。

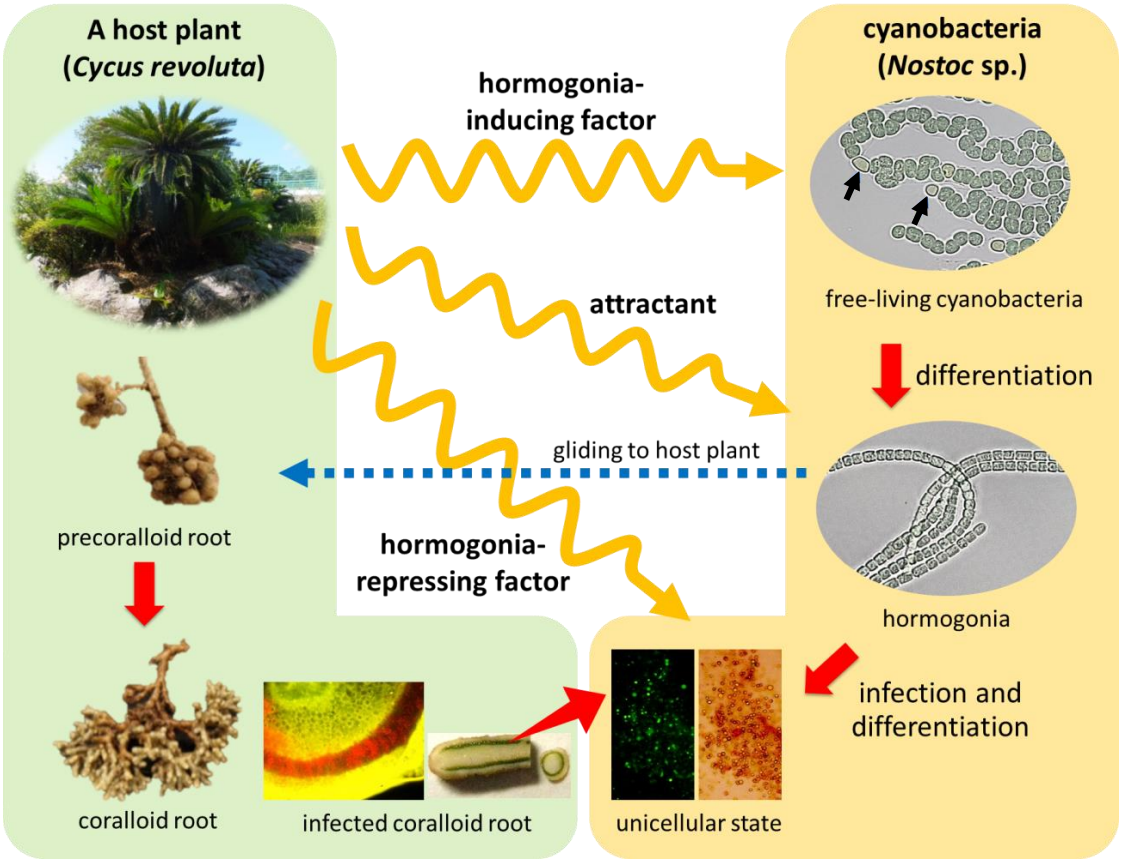


Fig. 1.7　ソテツ－シアノバクテリア共生系で予想されるシグナル応答

栄養細胞とヘテロシスト（黒矢印）からなる自活型の糸状シアノバクテリア（free-living cyanobacteria）は，ソテツから放出されるホルモゴニア分化誘導因子（hormogonia-inducing factor）によって，運動性をもつホルモゴニア（hormogonia）へと分化誘導される。ホルモゴニアは宿主植物からの誘引物質（attractant）に従って宿主植物へ遊走し，根内に着生する。着生後，ソテツはサンゴ状根（coralloid root）を発達させるが，*Nostoc* sp.を定着させるためにホルモゴニア分化抑制因子（hormogonia-repressing factor）を放出し，結果，*Nostoc* sp.はヘテロシスト型単細胞（unicellular state）を形成したままサンゴ状根内にとどまる。

1.4.1　ホルモゴニア分化誘導因子（hormogonia-inducing factor, HIF）

Nostoc 属シアノバクテリアが宿主植物との共生関係を構築するためには，土壌中の単生シアノバクテリアが宿主の存在を認識し，宿主の共生部位 (根端など) に到達することが必須である。この感染初期段階では，シアノバクテリアは運動性のない糸状体からホルモゴニアへ分化し，運動性を獲得する必要がある。したがってこの感染初期イベントで，宿主植物がホルモゴニア分化を促進するシグナル因子を分泌し，自身へのシアノバクテリア感染を促すことは，双方にとって有益である。このようなシグナル因子はホルモゴニア分化誘導因子 (hormogonia-inducing factor, HIF) と呼ばれ，ツノゴケ (Campbell *et al.*, 1989) ，ウスバゼニゴケ (Knight *et al.*, 1996) ，グンネラ (Rasmussen *et al.*, 1994) などの抽出物中にその存在が報告されている。HIF 活性を有する化合物は複数存在することが示唆されており，たとえば stem gland から分泌されホルモゴニア分化誘導活性を示すグンネラの粘液に含まれる HIF の化学的特性は，酸処理や熱処理でその活性が低下することから，タンパク質の一種ではないかと考えられている。また当研究室の田中により, ソテツ・サンゴ状根の MeOH 抽出物から(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol (Fig. 1.8) が HIF の一つとして単離同定されている (田中, 修士論文, 2012) 。このような化合物が宿主植物から環境中へ放出されることによって，共生関係構築が進行すると考えられることから，HIF の化学構造，活性，ならびに作用機序に関する知見を深めることは極めて重要であると考えられる。

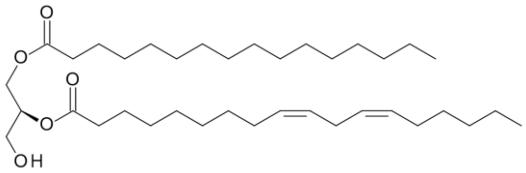


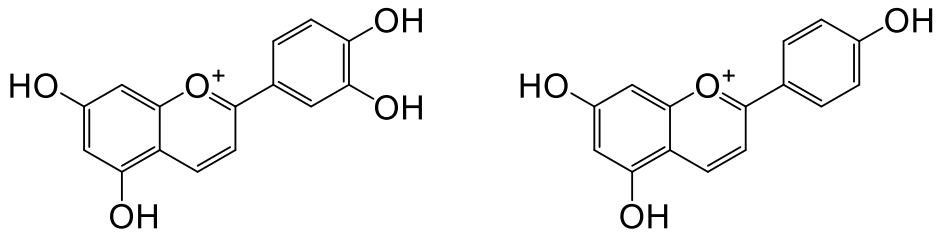
Fig. 1.8　ソテツ・サンゴ状根から単離同定された HIF 様活性化合物
(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol

1.4.2　走化性因子（attractant）

HIF によるホルモゴニア分化誘導を受けたシアノバクテリアは, 宿主の共生部位を認識してそこへ正確に到達しなければならないため，運動性を持ったホルモゴニアを誘引するシグナル因子が宿主植物から放出されていると予想される。*Nostoc* 属シアノバクテリアの走化性に関する報告は複数存在しており (Nilsson *et al.*, 2006) ，宿主植物であるウスバゼニゴケ抽出物中に誘引活性が報告されている (Knight *et al.*, 1996) ほか, 非宿主植物であるオオムギの根抽出物もホルモゴニア誘引活性を示すことが確認されている (Gantar *et al.*, 1991; 1995) 。このことから，ホルモゴニアに対する誘引因子は比較的普遍的な代謝産物である可能性が指摘されている。しかしながら，これら誘引活性本体の単離には至っておらず，ホルモゴニア誘引の作用機序には未知である部分が多い。

1.4.3　ホルモゴニア分化抑制因子（hormogonia-repressing factor, HRF）

さらに，ホルモゴニアが共生部位に到達した後，これを植物表面や部位内に留め維持するため，宿主植物からの第 3 のシグナル因子が産生され，機能していることが予想される。通常ホルモゴニア分化したシアノバクテリアは 72 時間後には糸状体に戻るが，周囲環境の貧栄養状態が続けば再度ホルモゴニアへ分化し，共生部位へとどまらない。これは宿主植物にとっては不利に働くことになるので，このホルモゴニアへの再分化を抑制するために宿主植物はホルモゴニア分化抑制因子 (hormogonia-repressing factor, HRF) を放出すると考えられている。これにより，共生シアノバクテリアは宿主植物内に定着し，共生関係を維持し続ける。この HRF の一つとして，アカウキクサ抽出物中からデオキシアントシアニン類 (Fig. 1.9) が単離同定されている。このアントシアニン誘導体が *Azolla* の末端につく gliding cell の活動を抑制すると報告されている (Cohen *et al*., 2002) 。また，本研究室では，独自にコケ植物 (フェザーモス, *Pleurozium schreberi*) の EtOAc 抽出物が HRF 様活性を示すことを確認している (園田，修士論文, 2011) 。



(a) : luteolinidin　　(b) : apigeninidin

Fig. 1.9　アカウキクサ由来の HRF であるデオキシアントシアニン類

以上のように，宿主植物－シアノバクテリア共生系成立においては，複数の化学シグナルが介在した両者の相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。この共生成立機序を解明してゆくにあたって，化学シグナル因子の構造と化学特性そのものに対する知見を深めてゆくことは極めて重要である。しかし，これらのシグナル因子を単離同定したという報告は極めて少なく，研究手法の開発も含め多くの実験的課題が山積している。したがって，これらのシグナル因子の精査は，宿主植物―シアノバクテリア共生系に関する研究の発展においては，極めて重要なステップであると言える。

1.5　プロテインキナーゼ C による細胞内シグナル応答

先述のとおり，HIF の一つとしてソテツ・サンゴ状根からジアシルグリセロール類である (*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol が単離同定されている (田中, 修士論文, 2012) 。この化合物は，生体内においてプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) を賦活化させる細胞内シグナル物質として機能していることが知られている (Nishizuka, 1992; Dong, 2012) 。ジアシルグリセロールは 3 位にリン酸あるいはホスファチジン酸などが結合したリン脂質を形成し，たとえばイノシトール-1,4,5-三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate, IP_3) と 3 位で結合したリン脂質 (Fig. 1.10) として細胞膜を構成している。活性化したホスホリパーゼ C (phospholipase C) によってリン脂質からイノシトール三リン酸が切り出されることによって，ジアシルグリセロールが遊離する。ジアシルグリセロールは生体膜上で PKC を賦活化させ，それ以降の細胞内シグナル伝達カスケードが活性化される起点となる (Fig. 1.11; Kishimoto *et al*., 1980) 。また PKC 賦活化剤には，ジアシルグリセロールのアゴニストとしてホルボールエステル類 (Fig. 1.12)　が存在することが知られており，C-3, C-4, C-20 の酸素原子と PKC とで水素結合を形成することで PKC 賦活化剤として機能する (Zhang *et al*., 1995; Fig. 1.13) 。ホルボールエステル類はトウダイグサ科の植物に多く含まれ，強い接触毒性を示すことでも有名な化合物である (Hecker, 1967) 。

PKC による細胞内シグナル伝達機構 (Fig. 1.11) には，細胞分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAP キナーゼ) のアップレギュレーションを受けるリン酸化カスケードが代表的なものとして知られている (Howe *et al.*, 1992) 。この反応では，活性化した PKC は低分子 GTP 結合タンパク質である Ras タンパク質をリン酸化し活性化させる。活性化した Ras は MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) である Raf を活性化させ，次いで Raf が Mek (MAP キナーゼキナーゼ, MAPKK) を，これがさらに Erk (MAP キナーゼ, MAPK) を活性化させる。この，活性化された Erk が MAP をリン酸化により活性化させることで，特異的遺伝子転写や細胞増殖，細胞の運動性獲得，がん化といった様々な細胞分化や細胞生理現象が引き起こされると考えられている (Oltmanns *et al*., 2003) 。このように PKC による細胞内シグナル伝達は，細胞の増殖や運動性獲得などと深くかかわっており，*Nostoc* 属シアノバクテリアに対するホルモゴニア分化誘導作用機序を解明する手がかりとなることが期待される。

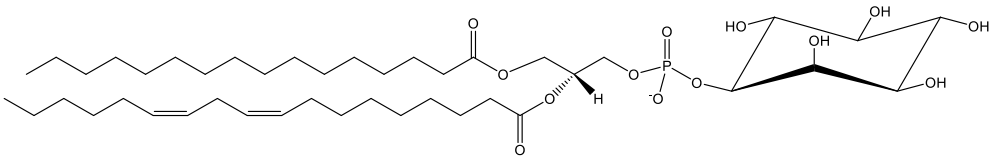


Fig. 1.10　1-palmitoyl-2-linoleoylphosphatidylinositol

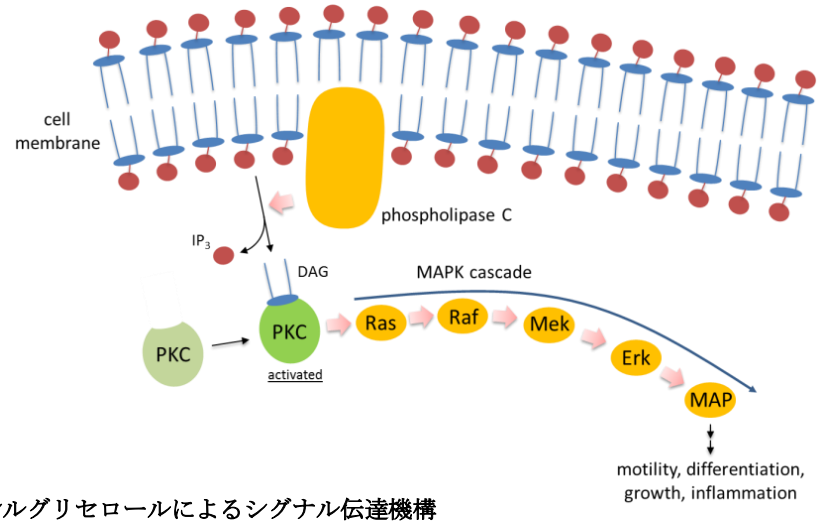


Fig. 1.11　ジアシルグリセロールによるシグナル伝達機構

細胞膜上のホスホリパーゼ C（phospholipase C）によって，リン脂質はジアシルグリセロール（DAG）とイノシトール三リン酸（IP_3）に分解される。分解により遊離した DAG は PKC と結合することで PKC を賦活化させ，次いで Ras, Raf, Mek, Erk, MAP のリン酸化を引き起こす MAP キナーゼカスケード（MAPK cascade）を進行させる。

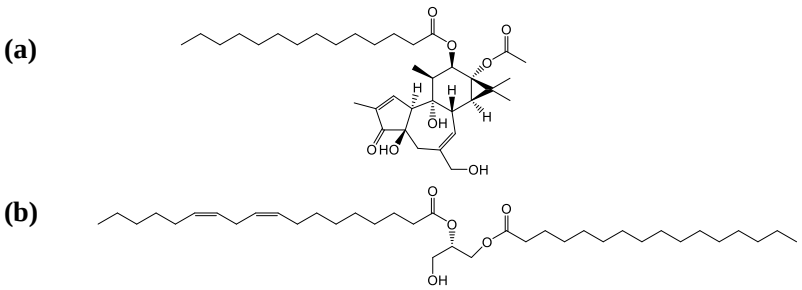
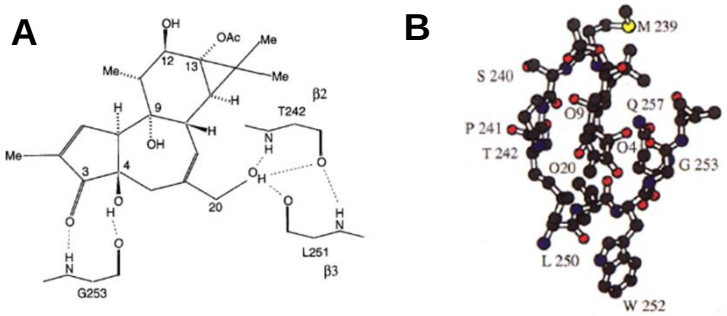


Fig. 1.12　プロテインキナーゼ C 賦活化剤の化学構造

(a) : 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate **(b) :** 1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol



(Zhang *et al.*, 1995)

Fig. 1.13　ホルボールエステル類の PKC Cys2 domain への結合

A) ホルボールエステル類の C-3, 4, 20 に対応する酸素原子は PKC Cys2 domain の L251, G253 と水素結合を形成する。B) PKC Cys2 domain の立体構造

1.6 *Nostoc* sp.のホルモゴニア分化誘導に関連する遺伝子

シアノバクテリアと宿主植物との共生の研究には，分子生物学的なアプローチもなされており，シアノバクテリアの分化に関与する遺伝子にはいくつか報告例がある。ホルモゴニア分化に関与する遺伝子としては *sigH* (Campbell *et al.*, 1998) や *hrm* (Cohen *et al.*, 1994) が報告されている。

SigH は σ70 family に属する σ 因子をコードする遺伝子であり，σ 因子は genome DNA 上で転写開始点を制御するタンパク質であり，プロモーター領域の特異的な配列を認識することで遺伝子の転写を制御する。σ70 family には group 1 から group 3 が存在する (Lonetto *et al.*, 1992) 。Group 1 は恒常的に発現する対数増殖期に必須の主要な σ 因子であり，平常時の遺伝子発現制御を担う。Group 2 は group 1 と相同性の高い塩基配列を持つが，対数増殖期において必須ではない。Group 3 の σ 因子は最も多様性に富み，熱刺激，運動，胞子形成といった独自の遺伝子のプロモーターによる転写開始に必要となる。シアノバクテリアが周辺環境の変化に対応する際には, group 2 及び group 3 の σ 因子の活性化による特異的な遺伝子発現が起こり，周辺環境への適応がなされる。

シアノバクテリアのホルモゴニア分化の機能として，運動性の獲得によって生存に適した環境への移動が挙げられるが, この環境変化への対応は group 2 に属する *sigH* によって制御されていると考えられている (Campbell *et al.*, 1998; Muro-Pastor *et al.*, 2001) 。また，*sigH* はツノゴケ培養液処理によって発現し，その他のホルモゴニア分化誘導処理では発現が確認されず，対数増殖期においても発現していなかったことから，ツノゴケ由来 HIF に特異的に応答して発現する遺伝子であると考えられる。したがって，ツノゴケは宿主特異的なシグナル因子でシアノバクテリアとの共生を成立させていると考えられる (Campbell *et al.*, 1998) 。

Hrm はツノゴケとの共生時に過剰にホルモゴニア分化が引き起こされる変異体 UCD 328 株から Cohen らによって特定された遺伝子群である。*HrmA* や *hrmU* の変異体で過剰のホルモゴニア形成が引き起こされたことから，ホルモゴニア分化抑制に関わるホルモゴニア調節遺伝子として機能していると考えられている (Cohen and Meeks, 1997) 。ホルモゴニアは栄養細胞と比べて細胞のサイズが小さくクロロフィル量も少ないため，長時間この形態を維持するとシアノバクテリア自身の生存性に関わる (Campbell and Meeks, 1989)。したがって, *hrm* は分化誘導されたホルモゴニアが速やかに栄養細胞の形態に戻ることができるための役割を果たしていると考えられている。また，sigH タンパク質は *hrmUA* 転写へ関与している可能性が低いという報告もあり (Campbell *et al.*, 1998) ，ホルモゴニア分化誘導と連動する遺伝子発現機構には複数の経路が存在することが示唆されている。

1.7　裸子植物とそれらの二次代謝産物・関連有機化合物について

裸子植物 (Gymnosperm) は胚珠がむき出しになっている種子植物の一種であり，ソテツ綱，イチョウ綱，マツ綱，グネツム綱がこのグループに属している。

Nostoc 属シアノバクテリアと共生関係を構築するソテツは植物体内に特徴的な有機化合物を含有していることで知られている。ソテツに特有な二次代謝産物の代表例として，アゾキシメタンを含む配糖体である cycasin や (Nishida *et al.*, 1956) ，フラボノイド二量体である amentoflavone などが挙げられる。Cycasin はソテツ実に多く含まれており, β-glucosidase によって加水分解を受けるとメチルアゾキシメタノールを生じ，この化合物およびその代謝産物が細胞毒性や神経毒性を引き起こす (Morgan and Hoffmann, 1983) 。また，このアグリコンには発がん性があるという報告もある (Laqueur *et al.*, 1962) 。Amentoflavone を代表とするフラボノイド二量体（ビフラボン類, biflavone）はソテツやメタセコイヤなどに代表される裸子植物の葉，樹皮などに含まれる有機化合物である。ビフラボン類の中には抗癌作用やオートファジー誘導作用を示すシグナル伝達に関与している報告が近年なされている (Sui *et al.*, 2016; 2017)。ジアシルグリセロール類のほかにソテツには細胞内シグナル伝達にかかわる，あるいは伝達を阻害する，未知化合物が含まれることが期待される。

ソテツと同じ裸子植物門に属するイチョウ (*Ginkgo biloba*) は，その葉や外種皮（偽果）にサリチル酸骨格をもつアナカルド酸類を含んでいる。Anacardic acids には抗癌作用，抗菌作用，殺虫作用，接触毒性，アレルギー作用などがあることが知られており，しばしば皮膚のかぶれの原因となる (Lepoittevin *et al.*, 1989) 。接触性皮膚炎はホスホリパーゼ C の活性化により引き起こされるという報告例もあることから (Hu *et al.*, 2010) ，接触性皮膚炎を引き起こす化合物は PKC 賦活化と密接に関わっている可能性も考えられる。イチョウではシアノバクテリアと共生関係を構築するという報告例はないが，ソテツ同様に「生きた化石」とされるイチョウにホルモゴニア分化に関わる化合物が含まれている可能性を検証する意味は小さくないと考えられる。裸子植物特異的二次代謝産物の例を Fig. 1.14 に示す。

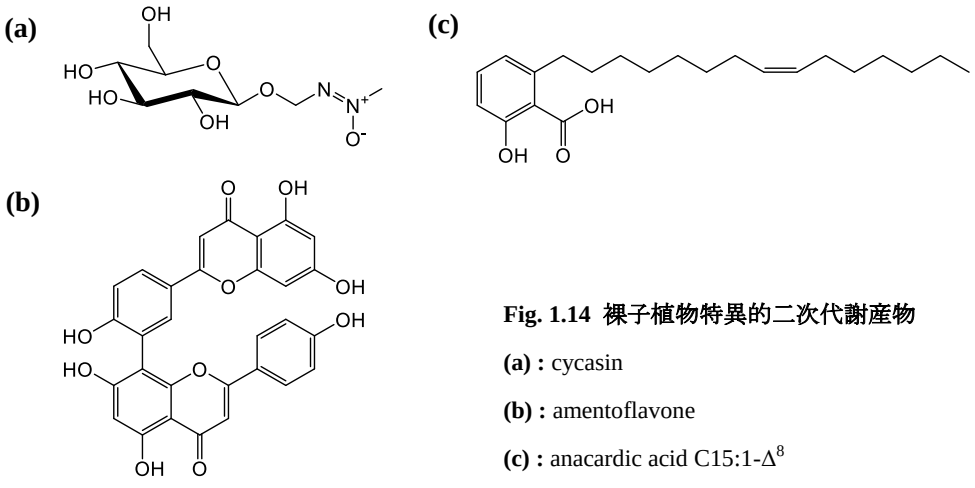


Fig. 1.14 裸子植物特異的二次代謝産物

(a) : cycasin

(b) : amentoflavone

(c) : anacardic acid C15:1-Δ^8

1.8　本研究の目的

本研究は，植物とシアノバクテリアの相利的共生関係の構築を化学シグナルによる相互応答という視点で解明することを目的とした。宿主植物－シアノバクテリア間の共生成立機序に関する知見を深めることができれば，農業を含め様々な分野への応用展開がはかられる。たとえば農業分野においては，イネなどの主要農作物へのシアノバクテリア共生による貧栄養土壌の生産性向上が期待できる。また，微生物の形態変化を伴う機能性制御技術を開発することで機能性微生物のデリバリー技術の確立も期待できる。

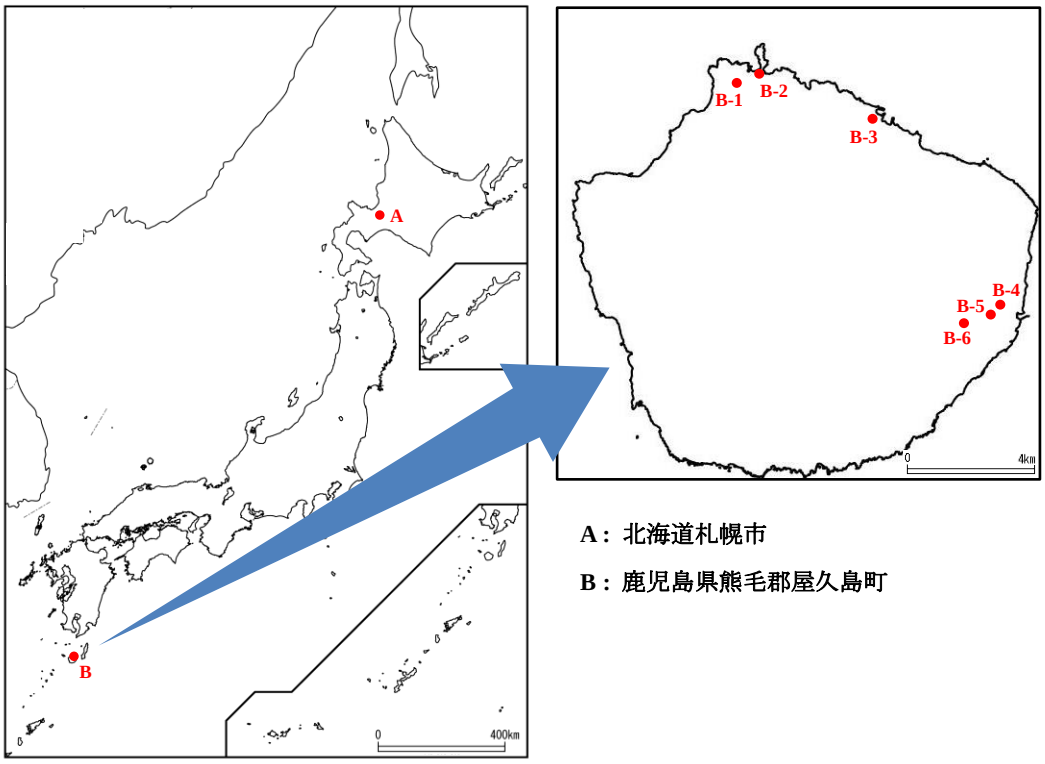
シアノバクテリアは複数の植物，しかも系統分類学的に関連の希薄な限られた植物と共生するという，マメ科植物のみに共生する根粒菌には見られない特徴を持っている。さらに，宿主植物の共生部位や化学シグナルは，宿主となる植物ごとに少しずつ異なっている。この事実は，各宿主植物における最適な共生成立機構がそれぞれ独自に確立されていることを意味すると考えることができ，作物を含む全ての植物がシアノバクテリアと共生関係を構築できる可能性を秘めていることを示唆していると考えた。したがって複数の植物におけるシアノバクテリア共生機構の知見を蓄積していくことは実学的応用展開実践するという視点からも必須であると考えられる。特に感染初期段階にあるホルモゴニア分化誘導は，共生関係構築において最も重要な初期段階のひとつであるので，複数存在しうる HIF に関する理解を深めていくことは大きな意味がある。

以上を踏まえ，本研究では多くの脂質類，植物由来の接触毒性化合物，さらには宿主，非宿主植物試料抽出物を含めてスクリーニングを行い，シアノバクテリアに対するホルモゴニア分化誘導活性化合物の探索を試みた。また，活性本体として特定した HIF の構造を基に調製した類似化合物を用い，構造活性相関を検討した。

第二章　材料と方法

2.1　植物試料のサンプリング

本研究で用いた植物試料は, 北海道札幌市 (2014 年 11 月, 地点 A), 鹿児島県屋久島 (2015 年 7 月, 地点 B) において採取した。いずれの試料も輸送中は可能な限り高温多湿を避け暗所に保ち, 輸送後は低温室 (4°C) で保存した。保存後の取り扱いについては各章で示す。植物試料およびそれらの採取地は Fig. 2.1 に示す。



地点	採取場所	緯度, 経度	採取植物
A	北海道大学構内イチョウ並木	N 43°04’31”, E 141°20’41”	イチョウ（ギンナン）
B-1	一湊中学校跡	N 30°26’56”, E 130°29’12”	ソテツ（枯死葉, 葉裏面滲出物）
B-2	一湊海水浴場	N 30°27’15”, E 130°29’49”	ソテツ（枯死葉, 葉裏面滲出物）
B-3	屋久島森林生態系保全センター	N 30°25’26”, E 130°34’13”	ソテツ（葉裏面滲出物）
B-4	安房小学校	N 30°19’10”, E 130°39’01”	ソテツ（枯死葉, 葉裏面滲出物）
B-5	上牧公園	N 30°18’47”, E 130°38’39”	ソテツ（枯死葉, 葉裏面滲出物）
B-6	今井氏邸敷地内畑	N 30°18’34”, E 130°38’11”	ソテツ（サンゴ状根, 新鮮葉）

Fig. 2.1　植物試料採取場所と採取部位

2.1.1　イチョウ（*Ginkgo biloba*）

本研究に用いた植物試料（イチョウ, *Ginkgo biloba*）は、北海道大学構内のイチョウ並木（Fig. 2.1）で 2014 年 11 月上旬に採取した（Fig. 2.2）。樹上から落下したまだ青みの残った偽果（ギンナン）を 2.4 kg（新鮮重）集めた。採取した偽果はアナカルド酸類の単離精製に用いるため，MeOH に浸漬した。



Fig. 2.2　北海道大学構内イチョウ並木で採取したギンナン

(scale bar : 2 cm)

2.1.2　ソテツ（*Cycas revoluta*）

本研究で用いた植物試料（ソテツ, *Cycas revoluta*）は，鹿児島県屋久島（熊毛郡屋久島町, Fig. 2.1 地点 B）で屋久島ネイチャーセンター，市川聡氏の協力によって 2015 年 7 月 14~16 日に採取したものである。特に，植物体周辺に堆積している枯死葉とソテツ葉裏面の滲出物（Fig. 2.3 (a) 白矢印）に注目し，Fig. 2.3 (c) に示すように 60% EtOH で湿らせた球状の脱脂綿で葉裏面を拭き取り，滲出物を可能な限り回収した。また，1 年以上を経た成熟新鮮葉と枯死した茶色の落葉もそれぞれ集めた。いずれの試料も地点 B-1 から B-6 で採取したものをそれぞれ 1 サンプルにまとめて，次に続く実験に供した。



Fig. 2.3　鹿児島県屋久島で採取したソテツ葉とその滲出物

A) ソテツ生葉の裏面には，葉身からの滲出物（白矢印）が観察されている。**B)** ソテツ枯死葉は採取地 B-1, 2, 4, 5 で採取し，第六章に示す MeOH 抽出物を得るのに使用したものである。**C)** ソテツ葉裏面滲出物は 60% EtOH で湿らせた脱脂綿で拭き取り, 回収した脱脂綿を 60% EtOH で浸し低温室で保存する。

2.2　シアノバクテリアの培養法

2.2.1　培地

シアノバクテリアの培養には BG-11_0（無窒素）培地（Rippka *et al.*, 1979）を用いた。Table 2.1 に培地組成を示す。

Table 2.1　BG-11_0 培地

BG-11_0 培地	
solution I	2 mL
solution II	50 mL
solution III	2 mL
solution VI	1 mL
trace metal mix A6	1 mL
1 M TES-KOH (pH 7.0-8.2)	20 mL
MilliQ water	up to 1 L

solution I	
Ferric ammonium citrate	0.3 g
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.05 g
MilliQ water	up to 0.1 L

solution II	
K_2HPO_4	0.78 g
$MgSO_4$（無水）	0.73 g
MilliQ water	up to 1 L

solution III	
$CaCl_2$（無水）	1.43 g
MilliQ water	up to 0.1 L

solution VI	
Na_2CO_3	2 g
MilliQ water	up to 0.1 L

trace metal mix A6	
H_3BO_4	2.86 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.08 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.021 g
濃硫酸	1 滴
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0494 mg
MilliQ water	up to 1 L

BG-11_0 培地を調製後，2 M NaOH 水溶液を用いて pH 7.2-7.4 に調整し，0.45 μm JH OMNIPORE^{TM} PTFE メンブレンフィルター (Merck Millipore, Billerica, MA, US) で濾過した後にオートクレーブ滅菌 (120°C, 15 min) して使用した。添加したゲル剤，炭素源などはその都度記載する。

2.2.2 培養条件

シアノバクテリアの培養は全て 25°C，LED 照射下 (明期 16 時間，暗期 8 時間) の人工気象室 (Nippon Medical & Chemical Instruments, Osaka, Japan) 内で行った。

2.3 シアノバクテリアの種同定

2.3.1 シアノバクテリアの分離

・バイオアッセイ用分離株

本研究で用いた *Nostoc* sp.分離株は，2005 年 4 月に鹿児島県屋久島で採集したソテツ・サンゴ状根から分離し，-80°C で凍結保存しておいたものである。2%次亜塩素酸で 30 sec 表面殺菌処理したソテツ・サンゴ状根の内部組織を約 2 mm 四方の大きさの切片に切り出し，1 mL の滅菌水中で白金耳を用いて破砕し，懸濁液を BG-11_0 無窒素寒天培地 (sucrose 0.2%, agar 1.5%) に画線接種後，プレートを 2 週間培養した。得られた単コロニーについて白金耳で画線培養を繰り返して純粋分離を行った。この分離株を BG-11_0 無窒素ジェランガム培地 (gellan gum 1.0%) で 1 か月以上静置培養して得た不定形菌体塊 (5 mm ~ 20 mm) を以降の実験に供した。

2.3.2 16S rRNA 遺伝子配列の相同性解析を用いた分離株の同定

2.3.2.1 シアノバクテリアの核酸抽出

・シアノバクテリアの DNA 抽出前処理

シアノバクテリアは厚い細胞壁をもつため，抽出の前処理として菌体を液体窒素で凍結し，滅菌処理した乳鉢と乳棒を用いて破砕した。得られた菌体破砕物を試料とし，後述する DNA 抽出に供した。

・ISOPLANT II (Nippon Gene, Toyama, Japan) による DNA 抽出

DNA 抽出は植物，酵母，細菌用 DNA 抽出キット ISOPLANT IIを用いた。抽出に用いた試薬を Table 2.2 に示す。DNA 抽出用試料を 300 μL の Solution I に懸濁し, 150 μL の Solution II を加え，10 秒間ボルテックスした。その後，50℃ に 10 分間保持し，ここへ 100 μL の Solution III-A と 120 μL の Solution III-B を加えて 5 秒間ボルテックスし，直ちに 10 分間氷冷した。氷冷後，この試料を 4℃，14,000 × *g* で 10 分間遠心し，得られた水層約 400 μL をマイクロピペットで注意深く回収し，その 2 倍量の EtOH と混和した。これを 6,000 × *g* 室温で 5 分間遠心し，上清を除去した後，得られた沈澱に対して 70% EtOH を 1 mL 加えて，6,000 × *g* 室温で 1 分間遠心した。最終的に得られた白色沈澱を真空遠心機で風乾した後，TE buffer 50 μL に溶解し， DNA 溶液とした。

Table 2.2　ISOPLANT IIの試薬と使用量

試薬名	使用量
Solution I	300 μL
Solution II	150 μL
Solution III-A	100 μL
Solution III-B	120 μL

2.3.2.2　分光光度計を用いた核酸の定量

分光光度計 (Beckman DU® 640 Spectrophotometer) を用いて, 核酸試料の DNA 定量を行った。核酸溶液は H_2O で順次希釈し，H_2O でキャリブレーションを行った後に，希釈試料の OD_{230}-OD_{320} のスキャンを行った。この測定結果から以下の式にしたがって核酸の濃度を算出した。

$$\text{DNA 濃度 [ng /μL]} = OD_{260} \times 50 \times \text{(希釈倍率)}$$

2.3.2.3 PCR

PCR には Ex Taq (TaKaRa Bio, Ohtsu, Japan) PCR キットを用いた。Table 2.3 に従って反応液を調製し，サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice TP600, TaKaRa Bio) にかけ，Table 2.4 に示す条件に従って反応を行った。

Table 2.3　PCR 反応液組成

10×buffer	5 μL
dNTP mix	4 μL
template	<1000 ng
forward primer (27F)	25 pmol
reverse primer (1525R)	25 pmol
Ex Taq	0.5 μL
MilliQ water	up to 50 μL

Table 2.4　PCR thermal cycler 運転条件

Initial activation	98°C	4	min	
Denaturation	98°C	10	sec	×25
Annealing	50°C	30	sec	
Extension	72°C	60	sec	
Storage	4°C	∞		

2.3.2.4 電気泳動

電気泳動には，以下のバッファーおよび試薬を使用した。

・TBE buffer (Table 2.5)

・Gene Ladder (0.1-2 kbp, Nippon Gene)

泳動ゲルは、agarose Medium electroendosmosis (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 0.225 g に TBE buffer 15 mL を加え，電子レンジを用いて加熱融解し，ゲル温度が 60°C 以下に下がってからゲルトレーへキャストしてこれを調製した。DNA 電気泳動はサブマリン式の Mupid mini (TaKaRa Bio) で 100V 電圧下約 30 分行い, 泳動後のゲルは ethidium bromide 溶液 (0.1 mg/mL) で 30 分間染色し, ゲル撮影装置で PCR 産物の増幅を確認した。また UV 照射下で PCR 産物のバンドを必要に応じて切り出した。

Table 2.5　10×TBE buffer の調製

Tris base (Wako Pure)	108.00 g
H_3BO_3 (Merck)	55.00 g
EDTA・2Na (Wako Pure)	7.43 g
MilliQ water (Merck Millipore)	up to 1,000 mL

2.3.2.5　切り出し精製法

電気泳動後のアガロースゲルから目的の DNA バンドを切り出し，MonoFas (GL science, Fukushima, Japan) を用い，以下の方法に従って DNA を精製した。電気泳動後に ethidium bromide 溶液によって染色したアガロースゲルから，UV 照射下でサイズマーカーを指標に目的のバンドをカミソリで切り出し, これに同体積の MonoFas solution A を加え, 5 分間 50°C でインキュベートした。この操作によって切り出したゲルが溶解した溶液は，付属のカラムに移し 14,000 rpm で 30 秒間遠心して DNA を担体に吸着させた。ここに洗浄液 solution B を 500 μL 加え，14,000 rpm で 30 秒間遠心して DNA が吸着した担体を洗浄した。その後，新たなチューブにカラムを移し，任意の量の溶出液 solution C を加えて 14,000 rpm で 60 秒間遠心し，溶出した DNA 溶液をそのまま以降の操作に供した。

2.3.2.6　シークエンシング

DNA の塩基配列は Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) を用いて解析した。Sequence PCR 反応液を Table 2.6 に従って調製し，Table 2.7 の条件で反応を進行させ，ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) によって配列を決定した。本分離株の 16S rRNA 遺伝子配列のシークエンス PCR に用いたプライマーを Table 2.8 に示す。決定した塩基配列 (1486 bp, accession no. LC318298) を Fig 2.4 に示す。本分離株を *Nostoc* sp. YI-1 株と命名した。

Table 2.6　Sequence PCR 反応液組成

5×sequencing buffer	3.8 μL
premix	2.0 μL
template	1.0 μL
primer[1μM]	3.2 μL
Sterilized distilled water	10 μL

Table 2.7　Sequence PCR 条件

Initial activation	96°C	5	min	
Denaturation	96°C	30	sec	×25
Annealing	50°C	15	sec	
Extention	60°C	4	min	
Storage	4°C	∞		

Table 2.8　本研究で使用したプライマー

primer	sequence (5' to 3')	Reference
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTTAG	Lane (1991)
327R	GTAGGAGTCTGGACCGTGT	Sakaguchi *et al*. (2000)
341F	CCTACGGGAGGCAGCA	Muyzer *et al*. (1993)
359FSQ	GGGGAATYTTCCGCAATGGG	Nübel *et al*. (1997)
518RSQ	GWATTACCGCGGCKGCTG	Sakaguchi *et al*. (2000)
926F	AAACTCAAAGGAATTGACGG	Sitepu *et al*. (2010)
1080F	ACGAGCTGACGACA	Sitepu *et al*. (2010)
1112FSQ	CCAGCAGCGGCGGTAATA	Sakaguchi *et al*. (2000)
1389R	ACGGGCGGTGTGTACAAG	Sakaguchi *et al*. (2000)
1525R	AAGGAGGTGWTCCARCC	Lane (1991)

>YI-1

5′-

TGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTTTCGGACACA

GTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTCTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGG

ATGTGCCCTTCGGGGTGAAAGGTTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGGAAGTGTTCAAGT

GGACTCCCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC

CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGG

CTCTTGGGTCGTAAACGCTCTTTTCTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCG

TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAAT

GTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAAAGCAGTGGAAACTACATAGCTAGAGTGCGTTCGGGGCA

GAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCG

TAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGA

TACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCCGGC

AACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAG

AACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCTTCTCGAAAGGGAAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTG

CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTAGTTGCCAGC

ATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCC

TTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTCCGGACAGAGGGCAGCAAGCATGCGAATGCAAGCAAATCCCGTA

AACCGGAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCAT

ACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCCGAAGTCATTA

CTCCAACTTTTCGGAGAGGAGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCG

GAAGGTGTGCTGGGGATCACTCA-3′

Fig. 2.4　*Nostoc* sp. YI-1 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列

2.4　ホルモゴニア分化誘導試験

ホルモゴニア分化誘導試験は Fig. 2.5 に示す手法に従って行った。窒素フリーのシアノバクテリア培養用 BG-11_0 平板培地 (gellan 1.5% or agar 1.5%, sucrose 0.2%) でソテツ・サンゴ状根由来 *Nostoc* sp. を 2 週間プレ培養し, 生育したコロニーを乾熱滅菌処理済みの金属製メッシュ (70 mesh/inch) で濾過し, 凝集体の径サイズを 0.2 mm 以下に整えた。10 ng chlorophyll / mL の濃度に調整した BG-11_0 懸濁液 50 µL を 12 穴プレート上で作成した BG-11_0 平板培地に広げ, 2 週間コロニー培養後, 検定試料を含むペーパーディスク (Ø 10 mm) を平板上に置き, ディスク周辺の凝集体の応答を蛍光顕微鏡下で経時観察した。この方法をサンドイッチアッセイ (sandwich assay) と名付けた。シアノバクテリアの自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を用いた。検定試料及び添加したゲル剤はその都度記載する。

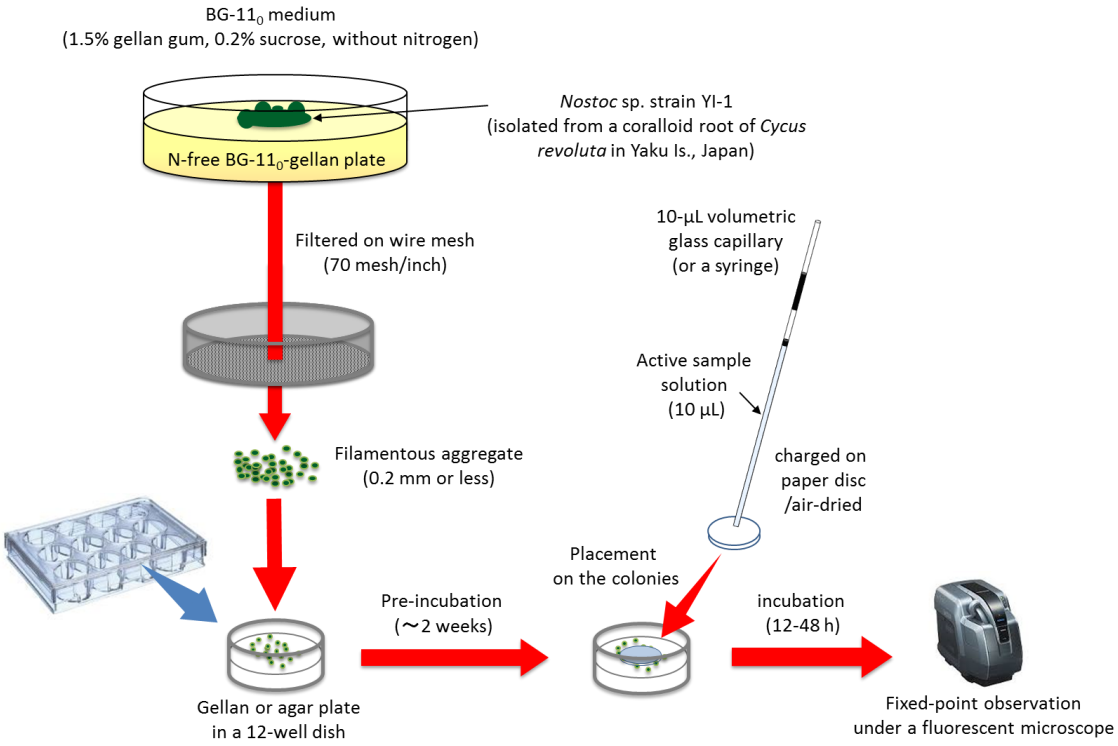


Fig. 2.5　ホルモゴニア分化誘導試験 (sandwich assay) の手順

2.5　蛍光顕微鏡観察

シアノバクテリアの観察には，以下に示す機材およびソフトウェアを用いた。

・HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan)

・BZ-II解析アプリケーション (Keyence)

観察倍率および使用した蛍光フィルターは，その都度別記する。

2.6　クロロフィル定量

プレート上に広げるシアノバクテリア量を調整する際に，クロロフィル量を指標にした。シアノバクテリアを含む BG-11_0 液体培地 1 mL に滅菌水 0.5 mL を加え，14,000 rpm、5 min で遠心して菌体を回収した。得られた上清を除去し，MeOH 1 mL を加え，遮光した氷上に 15 min 静置してクロロフィルを抽出した。これを再び 14,000 rpm，5 min で遠心して上清を回収し，吸光光度計 (Sunrise^{TM}, Tecan Japan, Kanagawa, Japan) を用いて 660 nm の吸光度を測定した。シアノバクテリアはクロロフィル *a* のみを持つため，得られた吸光度から以下の式を用いてクロロフィル量を算出した (Grimme *et al*., 1972)。

$$\text{クロロフィル量[ng]} = A_{660} \times \frac{\text{MeOH 量[mL]}}{\text{液体培地量[mL]}} \times 13.4$$

2.7　溶媒

TLC 用展開溶媒，各種カラムクロマトグラフィー，化学合成などで使用した溶媒を Table 2.9 に示す。化学合成の手法などは各章にて記載する。

Table 2.9　本研究で使用した溶媒及びメーカー

クロロホルム (Wako, 1st Grade)	: $CHCl_3$	エタノール (Wako, Special Grade)	: EtOH
ジクロロメタン (Wako, 1st Grade)	: CH_2Cl_2	メタノール (Wako, 1st Grade)	: MeOH
四塩化炭素 (Wako, Special Grade)	: CCl_4	MilliQ water (Merck Millipore)	: H_2O
n-ブタノール (Wako, 1st Grade)	: *n*-BuOH	酢酸 (Wako, Special Grade)	: AcOH
アセトニトリル (Wako, 1st Grade)	: CH_3CN	ギ酸 (Wako, Special Grade)	: HCOOH
酢酸エチル (Wako, 1st Grade)	: EtOAc	*n*-ヘキサン (Wako, 1st Grade)	: *n*-hexane
トルエン (Wako, 1st Grade)	: toluene	テトラヒドロフラン (Wako, Special Grade)	: THF
アセトン (Wako, 1st Grade)	: acetone	1,4-ジオキサン (Kanto Chemical, Special Grade)	: 1,4-dioxane

2.8　薄層クロマトグラフィー（thin layer chromatography, TLC）

2.8.1　TLC プレート

分析 TLC および分取 TLC には以下の既成品を用いた。各分析で用いた TLC 板，展開溶媒はその都度記載する。

・順相 TLC : TLC silica gel 60 F_{254} Glass plates (Merck, Darmstadt, Germany)

・逆相 TLC : TLC silica gel RP-18 F_{254} Glass plates (Merck)

・Diol TLC : HPTLC silica gel 60 DIOL F_{254} Glass Plates (Merck)

・硝酸銀コーティング TLC の調製

不飽和結合をもつ炭化水素（アルキン類，アルケン類）は銀イオンと π 錯体を形成することから，硝酸銀でコーティングしたシリカゲルによるクロマトグラフィーによって不飽和結合をもつ化合物を分離することができる (Dudley and Anderson, 1975) 。10% (w/v) の濃度で硝酸銀 (Wako, Special Grade) を溶解した CH_3CN に TLC プレートを 1 分間浸し，取り出した TLC プレートを 60°C に設定した恒温器中，暗所で 3 時間風乾することによって，硝酸銀コーティング TLC を調製した。

2.8.2　検出方法

・UV による検出

無機蛍光剤（酸化マンガン）入りの薄層板を分子内に共役二重結合を有する有機化合物の検出に汎用した。共役系が存在すると，254 nm の紫外線を照射した際に緑色蛍光をバックグラウンドとして，その蛍光をクエンチングする部分が化合物のスポットに対応して現れる。一方，365 nm の紫外線照射では，特定の化合物が発する自家蛍光が明瞭に観察され，これをマーカーとして使用できる。クエンチングは化合物量を反映するが，自家蛍光はほとんど量的な意味合いを持たないことを意識しながら, HIF 様活性を示す化合物を追跡した。

・Vanillin 硫酸試薬による検出

Vanillin 硫酸試薬 (vanillin : EtOH : 濃硫酸 = 0.5 g : 80 mL : 20 mL) はテルペノイド，糖類，高級アルコール，脂肪族化合物などの発色に適し，特に脂質やステロイドでそれぞれ特徴的な赤桃色と紫色を呈する。またテルペン類には多様な色彩を示し、たとえばテトラヒドロフラン環を部分構造に持つものでは鮮やかな黄色を呈する。展開後の TLC 板に vanillin 硫酸試薬を噴霧し，ドライヤーの熱風を用いて加熱し，スポットの呈色とその色調を記録した。呈色試薬の構造を Fig. 2.6 (a) に示す。

・Gibbs 試薬による検出

Gibbs 試薬 (2,6-dibromoquinone-4-chloroimide : EtOH = 0.2 g : 100 mL) はパラ無置換のフェノール性水酸基をもつ化合物の発色に適し，アンモニアが共存すると特徴的な青色を呈する。また，パラ置換体でもフェノール基を有していれば，茶色などの反応色を呈する。展開後の TLC 板に Gibbs 試薬を噴霧し，アンモニア蒸気に曝し，スポットの呈色とその色調を記録した。呈色試薬の構造を Fig. 2.6 (b) に示す。

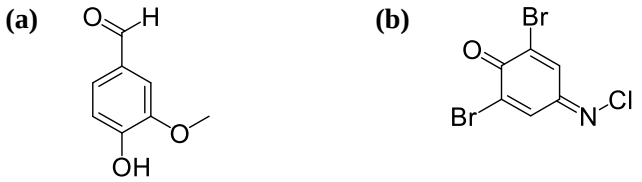


Fig. 2.6　呈色反応に用いた試薬の化学構造

(a) vanillin **(b)** 2,6-dibromoquinone-4-chloroimide

2.9　カラムクロマトグラフィー

2.9.1　順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー

充填剤としてシリカゲル 60 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) を用いた。各カラムクロマトグラフィーにおけるカラムベッド溶媒，ゲルベッドボリュームおよびゲル担体重量，使用したオープンカラムのサイズ（長さ，内径)，溶出溶媒およびそれらの容量，分離操作に供した試料量，ならびにその試料のカラムへのチャージ方法などは，その都度記載する。

2.9.2　硝酸銀コーティング順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲル 60 (50 g) を 10% (w/v) 硝酸銀 CH_3CN 溶液 (100 mL) 中に混合し，ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮して硝酸銀コーティングシリカゲルを作成し，不飽和結合をもつ化合物の分離に用いた。各カラムクロマトグラフィーにおけるカラムベッド溶媒，ゲルベッドボリュームおよびゲル担体重量，使用したオープンカラムのサイズ（長さ，内径)，溶出溶媒およびそれらの容量，分離操作に供した試料量，ならびにその試料のカラムへのチャージ方法などは，その都度記載する。

2.9.3　逆相カラムクロマトグラフィー

逆相カラム用充填剤として COSMOSIL 75C_{18}-OPN (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いた。各カラムクロマトグラフィーにおけるカラムベッド溶媒，コンディショニング方法，担体

重量，使用したオープンカラムのサイズ（長さ，内径）溶出溶媒およびそれらの容量，分離操作に供した試料量，ならびにその試料のカラムへのチャージ方法などは，その都度記載する。

2.9.4　DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィー

DIOL シリカゲルカラム用充填剤として LiChroprep® DIOL (Merck) を用いた。各カラムクロマトグラフィーにおけるカラムベッド溶媒，コンディショニング方法，担体重量，使用したオープンカラムのサイズ（長さ，内径）溶出溶媒およびそれらの容量，分離操作に供した試料量，ならびにその試料のカラムへのチャージ方法などはその都度記載する。

2.9.5　ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

ゲル濾過クロマトグラフィー用充填剤として Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いた。各カラムクロマトグラフィーにおけるカラムベッド溶媒，コンディショニング方法，担体重量，使用したオープンカラムのサイズ（長さ，内径）溶出溶媒およびそれらの容量，分離操作に供した試料量，ならびにその試料のカラムへのチャージ方法などは，その都度記載する。

2.10　機器分析

使用した機器を以下に示す

・核磁気共鳴スペクトル分析

JEOL JNM-EX 270 FT-NMR Spectrometer (270 MHz) (JEOL, Tokyo, Japan)

Bruker AMX500 (500 MHz) (Bruker, Billerica, MA, US)

・質量分析

JEOL JNX-SX-102A Mass Spectrometer (JEOL)

・旋光度計

P-2200 型旋光計 (JASCO, Tokyo, Japan)

第三章　2 種類のゲル化剤を用いた固体培地上でのホルモゴニア分化誘導現象の比較検討

3.1　はじめに

Nostoc sp.の滑走運動現象の多くは寒天ゲル上で 1 週間以上の経時変化を得たうえで評価されている。ホルモゴニア分化誘導に関連する初期の研究報告として，0.9%寒天培地上のシアノバクテリア凝集体に赤色光を照射後 36 時間後に糸状シアノバクテリアが発達するという報告がある (Lazaroff *et al*., 1966) 。また，近年のホルモゴニア分化誘導現象を評価する手法においても寒天培地を利用したアッセイ法が取り上げられている。しかし，これらの評価方法はいずれもホルモゴニア分化誘導処理後 1 週間以上の培養を必要としており (Khamar *et al*., 2010) ，0.8%-1.5%寒天培地を用いて 1 週間後に凝集体から菌体が拡散している様子をホルモゴニア分化誘導陽性として評価している (Hernández-Muñiz *et al*., 1987; Liaimer *et al*., 2011; Khayatan *et al*., 2015; Liaimer *et al*., 2015; Splitt *et al*., 2016) 。一方，真正細菌の一種である *Pseudomonas elodea* によって産生される水溶性菌体外多糖類として知られているジェランガムが近年，培地用ゲル化剤として注目されている (Shungu *et al*., 1983; 橋床, 2017) 。ジェランガムは透明度の高いゲルを形成するだけでなく，多くの難培養機能微生物の培養に有効であるという報告がある (Shungu *et al*., 1983; Harris, 1985; Jassen *et al*., 2002; Tamaki *et al*., 2005; Hara *et al*., 2010) 。しかしながら，ホルモゴニア分化誘導現象を評価する目的で，このゲル化剤を用いている報告はない。

ホルモゴニア分化誘導を短時間かつ簡便に評価する手法として，第二章に示すホルモゴニア分化誘導試験を構築した。さらにジェランガムゲル上で培養した *Nostoc* sp.を HIF に曝露させると，凝集体が緩やかにほどけ，ホルモゴニアがゲル平板表面に均一に拡散する現象を見出した。ジェランガムの透明度と滑走運動の均一性の高さから，ジェランガム平板はホルモゴニアの滑走運動現象の観測に優れていると予想された。本研究では，寒天とジェランガムをそれぞれ用いて，ゲル化剤の種類および濃度がホルモゴニアの滑走運動に及ぼす影響について検証した。

3.2　方法

3.2.1　ホルモゴニア分化誘導試験に用いた固体培地の調製

ホルモゴニア分化誘導試験は，第二章に記載した手法に基づいて行った。ゲル化剤の種類およびゲル化剤濃度に応じた固体培地上での *Nostoc* sp.の応答を比較するため，*Nostoc* sp. のプレ培養以降の平板培地は Table 3.1 に示す濃度になるように各ゲル化剤を添加して調製した。また，培地に添加する炭素源とその濃度は 0.2% sucrose に統一した。ホルモゴニア分化誘導剤には anacardic acid C 15:1-Δ^8 decyl ester (40 ng/disc，調製方法は第五章に記載) を用いた。

Table 3.1　培地作成に用いたゲル化剤

Gel matrix	Concentration of gel matrix [%]					
agar (PN : 010-15815, Wako, Osaka, Japan)	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
gellan gum (PN : 075-03075, Wako, Osaka, Japan)	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6

3.2.2　ホルモゴニア分化誘導試験の活性力価の定量的評価

ホルモゴニア分化誘導活性力価を定量的に評価するために，ペーパーディスク周辺のホルモゴニア数を評価の指標とした。1.0 mm 四方の正方形をペーパーディスク周辺に無作為に作成し，正方形内に存在するホルモゴニアの数 (numbers of hormogonia) を計測した (Fig. 3.1) 。単位面積当たりのホルモゴニア数の平均 (n = 3) をとり，100/mm^2 以上のものを (++) ，30/mm^2 以上のものを(+)，30/mm^2 未満ではあるがホルモゴニアの存在が認められるものを (±) と評価した。

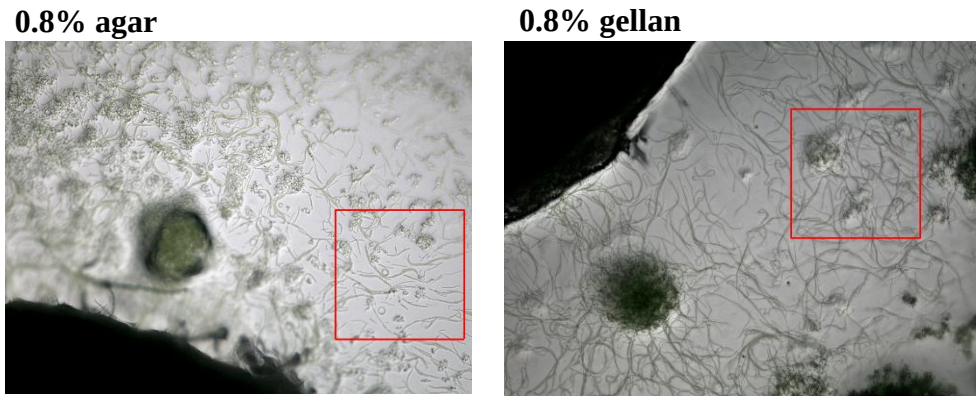


Fig. 3.1 ペーパーディスク周辺のホルモゴニアと単位面積 (1 mm^2) の作成

ペーパーディスクから 2.5 mm の範囲内に 1 mm 四方の正方形を 3 か所作成し，正方形内のホルモゴニアの数を計測している。計測に用いた各濃度での写真は Appendix 参照。

3.3　結果

anacardic acid C 15:1-Δ^8 decyl ester (100 nmol/disc) 曝露後，各ゲル上での菌体のペーパーディスク周辺での応答の検鏡画像を Fig. 3.2 及び Fig. 3.3 に示す（それぞれの control 区における結果は Appendix 参照）。また，3.2.2 の手法に従ってそれぞれの処理区を計測した結果を Fig. 3.4 に示す。菌体は自家蛍光及び運動性を示しながら 24 時間以内にペーパーディスク周辺へ拡散運動した。寒天ゲル平板上においては，0.6%ゲル濃度で最も高い拡散運動を示したが，寒天の濃度上昇に伴って周辺に拡散する菌体量は減少しており，1.4%以上の高濃度の寒天ゲル平板上では，ペーパーディスク周辺に拡散したホルモゴニアの数は 30　mm^{-2} 未満であった (Fig. 3.2) 。一方，ジェランガムゲル平板上においては，ホルモゴニアの周辺への拡散運動はより顕著に確認され，処理後 12 時間後から高い HIF 様活性が示された。ゲル濃度 0.6% ~ 1.0%においては，寒天ゲル以上の高い菌体の分散が示されていたが，高いゲル濃度 (1.2% ~ 1.6%) においては菌体の分散量が減少する傾向が見られた。

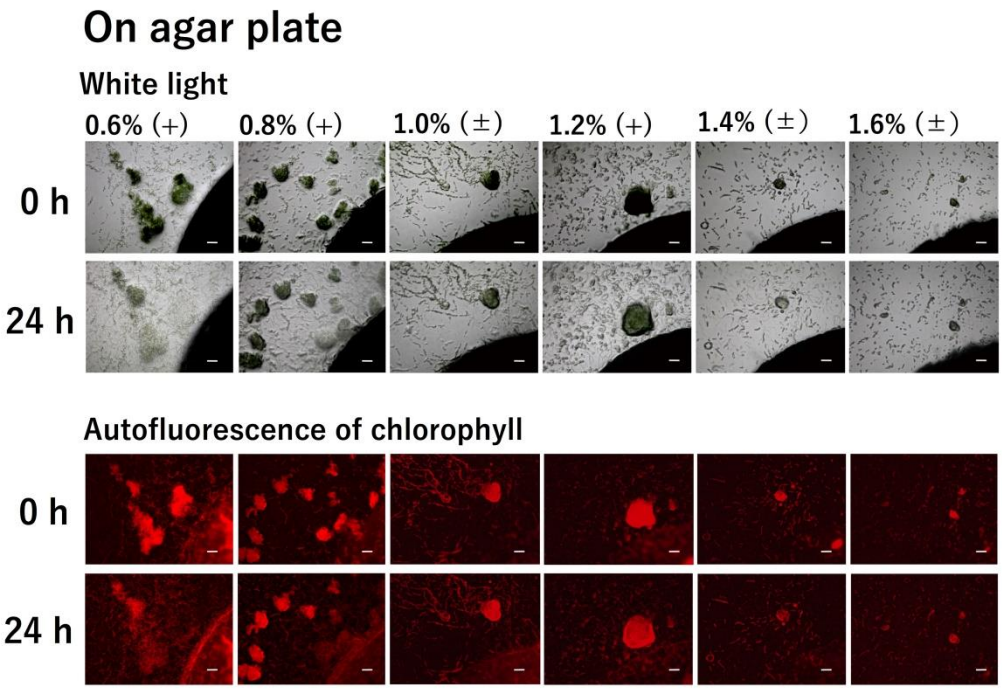


Fig. 3.2　寒天ゲル培地上の *Nostoc* sp.のホルモゴニア分化誘導処理に対する応答

anacardic acid C 15:1-Δ^8 decyl ester (100 nmol/disc) で処理後，24 時間以内の寒天ゲル平板での菌体の応答を定点観測している。菌体の自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を用いて観測している。scale bar, 300 µm

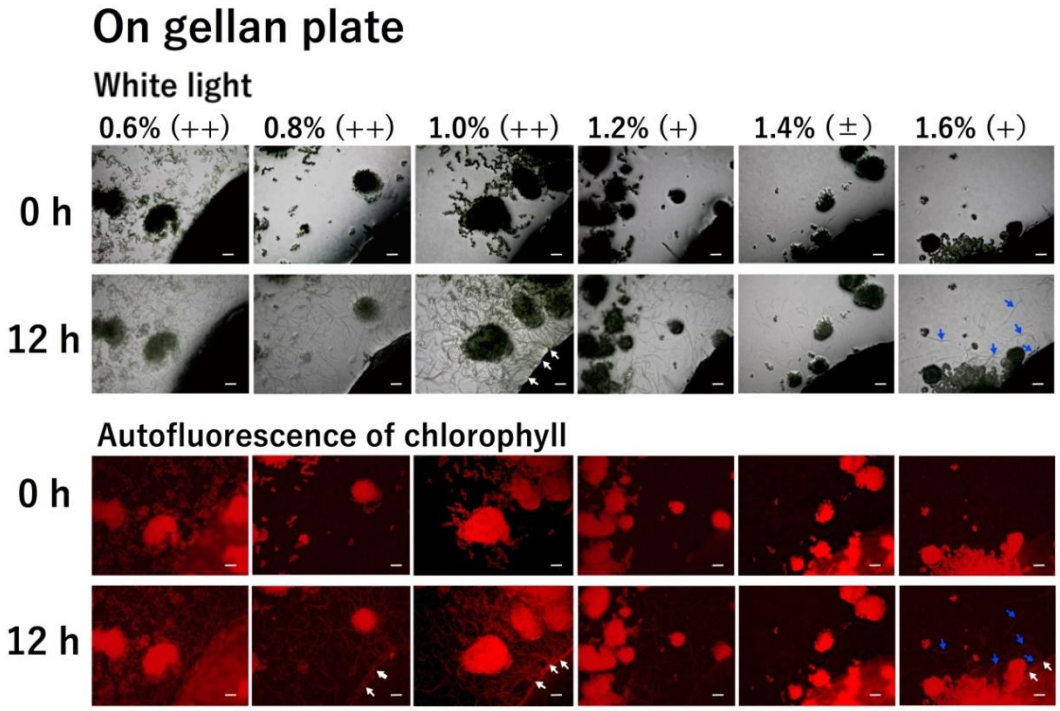


Fig. 3.3　ジェランガムゲル培地上の *Nostoc* sp.のホルモゴニア分化誘導処理に対する応答

anacardic acid C 15:1-Δ^8 decyl ester (100 nmol/disc) で処理後，12 時間以内のジェランガムゲル平板での菌体の応答を定点観測している。菌体の自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を用いて観測している。0.8~1.0%ジェランガム上では，ペーパーディスクに沿うようにバンドル状のホルモゴニアが観測され (白矢印)，1.6%ジェランガム上でもバンドル状のホルモゴニアが観測されている (青矢印)。24 時間後の検鏡画像は Appendix 参照。scale bar, 300 µm

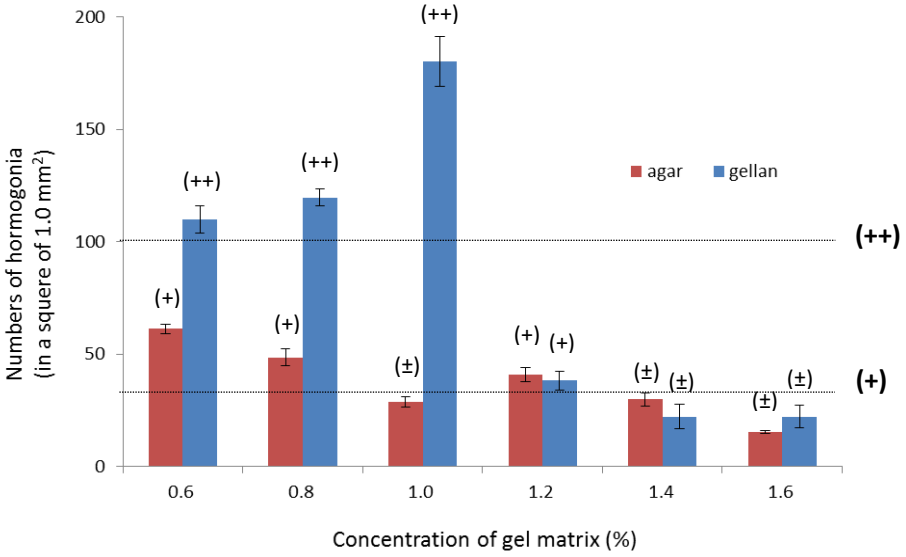


Fig. 3.4　各ゲル上における単位面積当たりのホルモゴニア数

分化誘導処理後 24 時間後のペーパーディスク周辺の単位面積当たりのホルモゴニア数が 100 以上のものを(++)，30 以上のものを(+)として評価している。n = 3

3.4 考察

3.4.1 各ゲル上でのホルモゴニア分化誘導

寒天はゲル化剤として広く用いられる中性多糖類であるが，3.3 で示したようにホルモゴニア分化誘導処理に対する凝集体の応答は，寒天平板上ではやや鈍いという結果が得られた。この傾向は寒天濃度の上昇に伴って強く表れており，高濃度の寒天平板上では少なくとも 24 時間以内のホルモゴニア分散はほぼ完全に妨げられた。

これに対し，ジェランガムゲル平板上ではより高頻度の菌体分散が確認されたことから，ホルモゴニア分化誘導因子の活性を評価するうえではジェランガムゲル平板の使用が有効であることが明らかとなった。ジェランガムは *Pseudomonas* 属細菌によって生合成される細菌由来の菌体外多糖類であり (Jansson *et al.*, 1983) ，微生物の遊走の潤滑剤として優れていることでも知られている。ジェランガムゲル上では一部の微生物の遊走運動が亢進されるという報告もあり (Hara *et al.*, 2009; 2012) ，これがホルモゴニアの運動性を高めている要因とも考えられている。以上の結果は，*Nostoc* 属シアノバクテリアのホルモゴニアによる滑走運動を評価するためには，ジェランガムゲルを含んだ基剤を用いることが有効であることを示している。

3.4.2 菌体の生存性とホルモゴニアによるバンドル状の形成

本研究で用いた手法で検定したシアノバクテリアは分化誘導前と分化誘導後ではいずれもクロロフィルの自家蛍光を維持しており，構築したアッセイ系では菌体の生存への影響はほとんどないということが示された (Krause and Weis, 1991) 。したがって，ジェランガムで調製した $BG\text{-}11_0$ ジェランガム平板は，検定した試料の効果のみを評価できるアッセイ系に利用することができると考えられる。

また，ジェランガムゲル平板上を拡散運動しているホルモゴニアは，1 菌体の個々それぞれが別個の運動をしているのではなく，複数の菌体が列をなしてやや太いバンドル状の形状をとりながら運動している様子が観察された (Fig. 3.3，青矢印) 。この現象は高密度のホルモゴニアの滑走運動を容易にしており，より多くの菌体が同一の目的地へ滑走運動することを助長していると考えられる。また，ジェランガムの表面よりもホルモゴニアの表面が構造的に滑走運動しやすいと想像されるため，その分子機序についても興味が持たれる。本研究で観察されたホルモゴニアでのバンドル形成はホルモゴニア分化誘導にとどまるだけではなく，次のステップである宿主植物への誘引運動との関係性も高いことが強く示唆される。

3.4.3　ジェランガムゲルを用いたアッセイ法の利点

これまでに報告された，ホルモゴニア分化誘導を評価するアッセイ法には，寒天を用いた手法が主に用いられており，さらには分化誘導による菌体の滑走運動を評価するためには 1 週間以上の時間を必要としていた。本研究で確立したジェランガムゲル平板 0.6 ~ 0.8% を用いた検定法では，従来の寒天を用いた手法と比べて，12 時間という迅速かつリアルタイムに菌体の挙動を追跡することができるという利点を持つ。また, control 区においては，凝集体はその形状を維持しており，与えた試料による要因以外をほぼ完全に排除することができる。アッセイの手法で 0.2%の sucrose を炭素源として添加しているが，sucrose には栄養状態のシアノバクテリアの自発的なホルモゴニアへの分化を抑制する作用があることが知られているため (Khamar *et al*. 2010) ，自発的な分化による要因を排除して，これを評価することができる。

3.4.2 でも述べたように，本研究で確立したアッセイ法はホルモゴニア分化誘導現象だけではなく，分化誘導後のバンドル形成，誘引物質による走化性運動へと，一連の共生系成立に必要かつ評価が難しいとされる現象をも観察することができる可能性を持つ。これは，宿主植物―シアノバクテリア間の多段階の応答による共生系構築機序を解明していくうえで極めて重要な意味を持つ。

3.5　第三章のまとめ

ホルモゴニア分化誘導現象を迅速かつ簡便に評価するため, 2 種類のゲル化剤を比較するホルモゴニア分化誘導検定試験を実施した。Anacardic acid C 15:1-Δ^8 decyl ester (100 nmol/disc) を HIF 剤として用い, ゲル濃度の異なるそれぞれのゲル平板上でペーパーディスク周辺の菌体の応答を経時的に定点観察した結果, 0.6%~1.0%のゲル濃度において活発なホルモゴニア分化誘導が示された。1.2%よりも高い濃度のゲル化剤を用いた平板では，ホルモゴニア分化と分散は強い抑制を受けていた。また，ゲルの種類同士を比較すると，ジェランガム平板ゲル上では 12 時間という極めて短時間で高密度のホルモゴニア滑走運動が確認され，バンドルを形成しながら運動している様子が確認された。これらの結果から，ジェランガムゲルはホルモゴニア分化誘導現象を評価するためのゲル化剤として有用であり, ホルモゴニア分化誘導から誘引運動へ至る，宿主植物との共生関係構築の初期段階を評価する資材として利用できると期待される。

第四章　不斉およびラセミ合成ジアシルグリセロール類による HIF 様活性の検証

4.1　はじめに

HIF の一つとして，ソテツ・サンゴ状根からジアシルグリセロール類の一種である (*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol を単離同定しているが (田中, 修士論文, 2012) ，この分子種にのみ HIF 様活性が示されるか，あるいはアシル基の異なるジアシルグリセロール全般に HIF 活性が認められるかについてはほとんど体系的検証がなされていない。また，ホルボールエステル類などの PKC 賦活剤についても HIF 様活性を有するかどうかも明らかにはなっておらず，ホルモゴニア分化誘導と PKC 賦活化との関連性については依然不明なままである。本章では，ジアシルグリセロール類の構造活性相関 HIF 様活性の有無を明らかにするために，1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol の *S*-体および *R*-体，ラセミ体ならびにアシル基の位置異性体（1-linoleoyl-2-palmitoylglycerol），炭素鎖や不飽和結合の数が異なるアシル基をもつ複数のジアシルグリセロール類，関連するモノアシルグリセロールやリン脂質をいくつか選んで，それらの HIF 様活性を同一条件下で比較し，構造と HIF 様活性との関連性について検証し，考察した。

4.2　方法

4.2.1　化合物の設定

ラセミ体として合成した合成ジアシルグリセロール類(*S/R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol および (*S/R*)-1-palmitoyl-2-oleoylglycerol, (*S/R*)-1-miristoyl-2-linoleoylglycerol, (*S/R*)-1-linoleoyl-2-palmitoylglycerol は，やや弱いながらも HIF 様活性を有することが確認されている (西塚, 修士論文，2015) 。これに加え，光学異性体による構造活性相関を検討するため，(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol および (*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol を化学合成し，それらの HIF 様活性を検討した。同時に，ジアシルグリセロールの化学合成中間体であるモノアシルグリセロール (*S/R*)-1-palmitoylglycerol についても, 同様に HIF 様活性の検証を試みた。

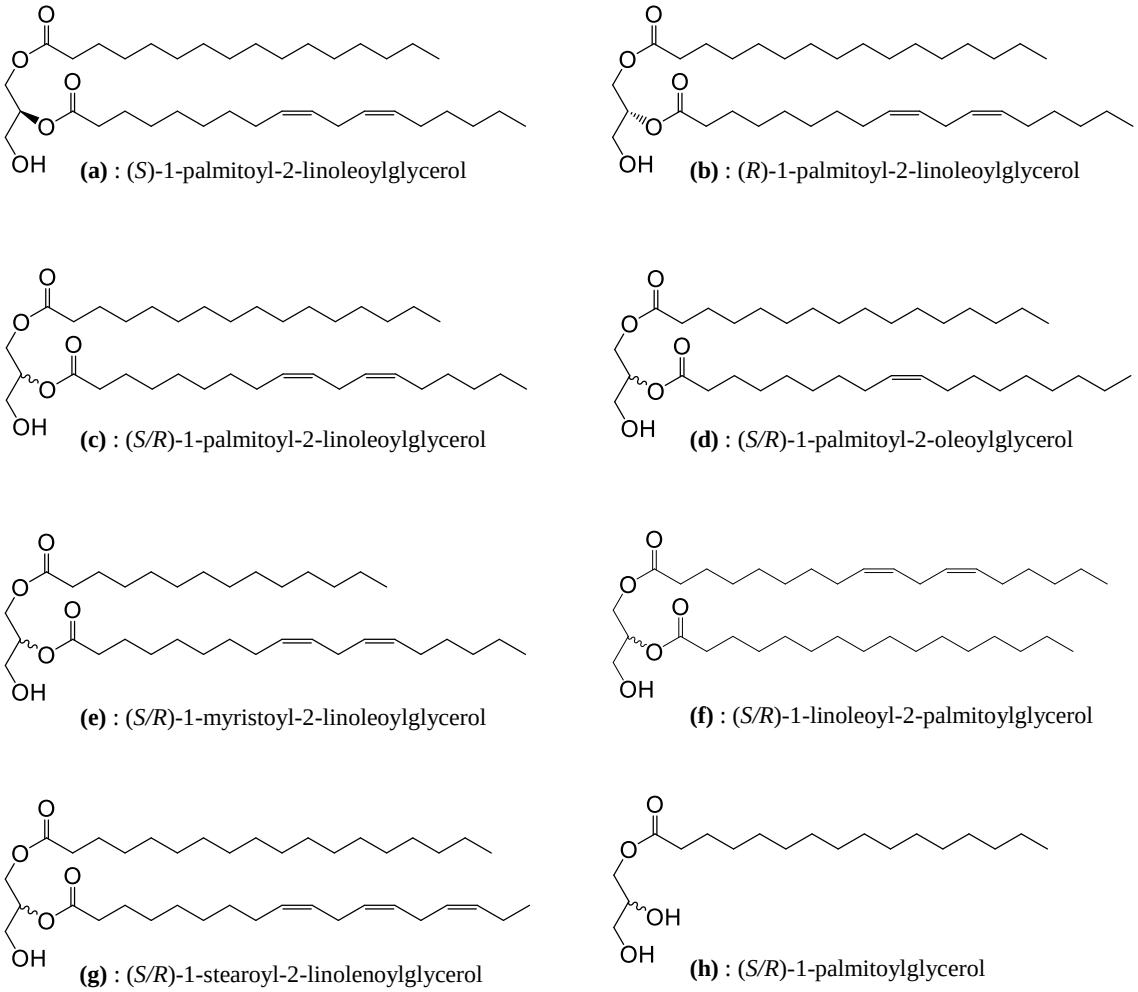


Fig. 4.1 本章で検定試験に供した化合物群

化合物 (a) - (h) は 4.6 Experimental に示す手法に従って化学合成し (Hui *et al*., 2003; Tallman *et al*., 2007; Mori, 2012) ，サンドイッチアッセイに供した。各化合物の ^{1}H-NMR スペクトルは Appendix 参照。

4.2.2 ホルモゴニア分化誘導試験

ホルモゴニア分化誘導試験は第二章に記載したサンドイッチアッセイに従って実施した。ゲル剤には 1.2%寒天ゲルを用い, 培地に添加する炭素源は 0.2% sucrose に統一した。Fig. 4.1 に示す検定試料を 10 mM の濃度になるように MeOH に溶解し，この溶液を基準として希釈溶液 (1, 0.1, 0.01, 0.001 mM) をそれぞれ作成した。作成した溶液 10 µL をペーパーディスクにチャージし (100, 10, 1, 0.1, 0.01 nmol/disc) 風乾後，検定に供した。

4.3 結果

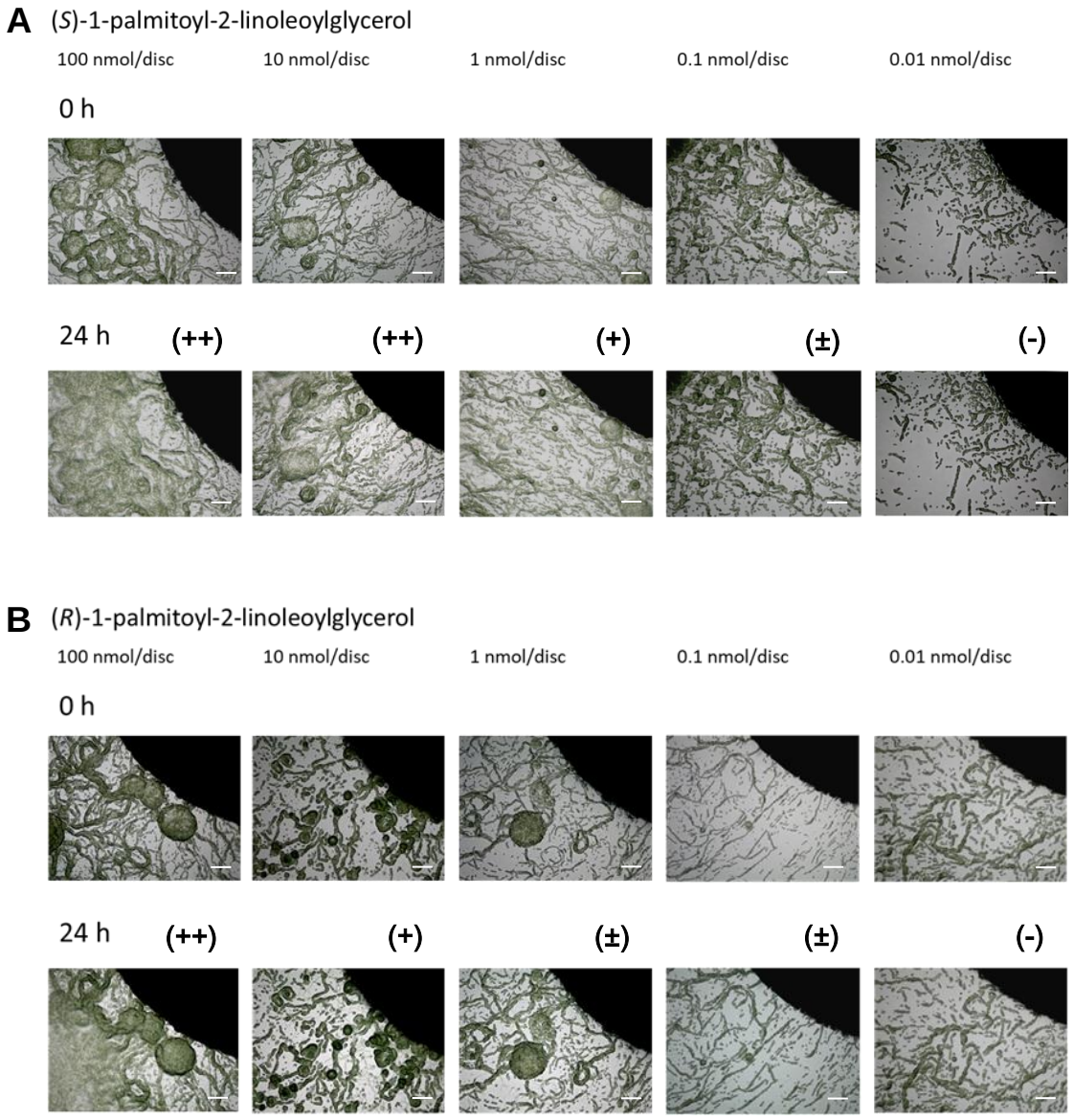
4.3.1 合成ジアシルグリセロール類のホルモゴニア分化誘導活性

各ジアシルグリセロール類を用いたホルモゴニア分化誘導試験で得た菌体応答の検鏡写真を Fig. 4.2 に示す。天然型の (*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol は 1~100 nmol/disc で最も明瞭な HIF 様活性を示した (Fig. 4.2 A) 。また，非天然型の *R*-体は，100 nmol/disc でペーパーディスク近傍のホルモゴニア誘導がほとんど認められないのに対して (Fig. 4.2 B)，*S*-体では活発なホルモゴニア分化が認められた。

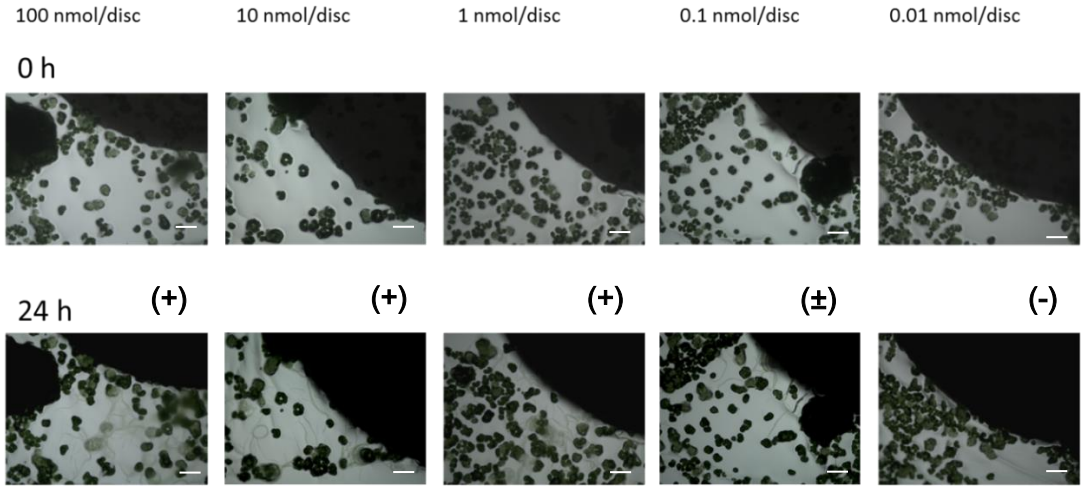
ラセミ体として調製したジアシルグリセロール類はいずれも 0.1-100 nmol/disc の範囲内でホルモゴニア分化誘導活性を示し，ペーパーディスク周辺へ拡散するホルモゴニアが観察された。しかし，ホルモゴニア分化誘導の強さはジアシルグリセロールを構成するアシル基の組み合わせによって異なっており，1 位にパルミトイル基を持ち，2 位に不飽和アシル基を持つ (*S/R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol および (*S/R*)-1-palmitoyl-2-oleoyl glycerol が特に高い活性を示した (Fig. 4.2 C-D) 。一方，1 位に不飽和アシル基，2 位に飽和アシル基をもつ (*S/R*)-1-linoleoyl-2-palmitoylglycerol では活性がほとんど消失することも確認された (Fig. 4.2 F) 。

4.3.2 合成モノアシルグリセロール類のホルモゴニア分化誘導活性

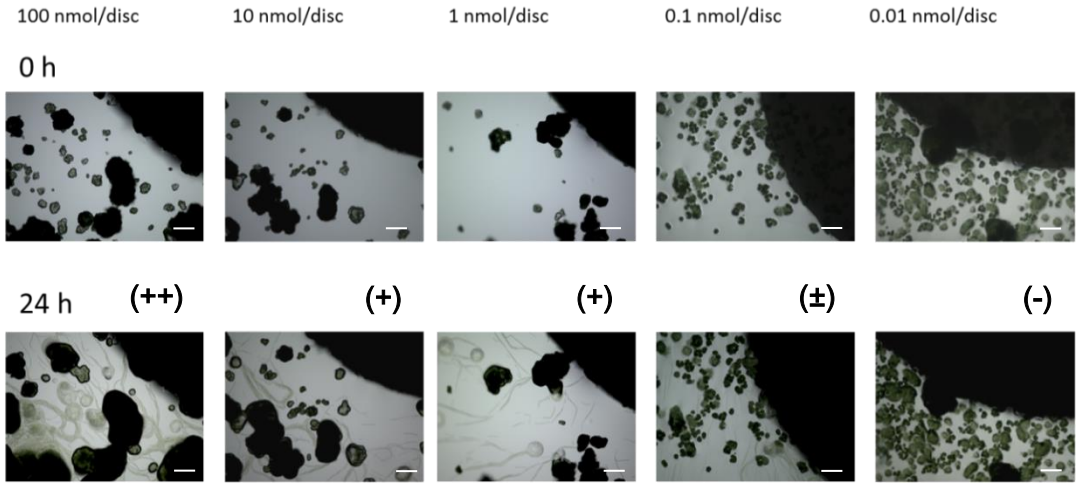
本章で検定に用いたジアシルグリセロール類 (**a~g**) は，活性の強度に違いはあるが，弱いながらもほぼすべてのアナログ体が HIF 様活性を示した。一方，モノアシルグリセロール類の一つである (*S/R*)-1-palmitoylglycerol (**h**) は，HIF 様活性を示さず，100 nmol/disc，48 時間でもペーパーディスク周辺の凝集塊の変動は観察されなかった (Fig. 4.2 H) 。


A
(S)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol
100 nmol/disc
10 nmol/disc
1 nmol/disc
0.1 nmol/disc
0.01 nmol/disc
0 h
24 h
(++)
(++)
(+)
(±)
(-)
B
(R)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol
100 nmol/disc
10 nmol/disc
1 nmol/disc
0.1 nmol/disc
0.01 nmol/disc
0 h
24 h
(++)
(+)
(±)
(±)
(-)

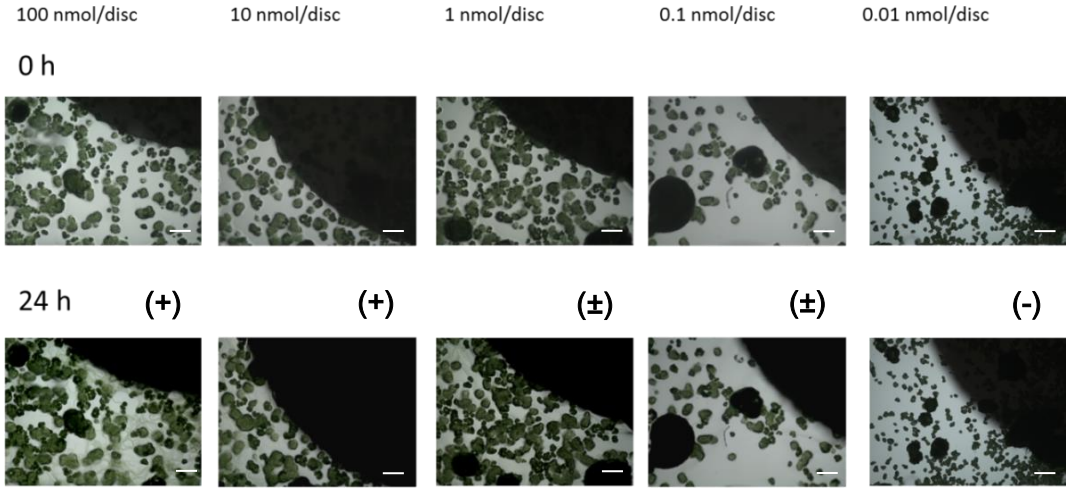
C (*S/R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol



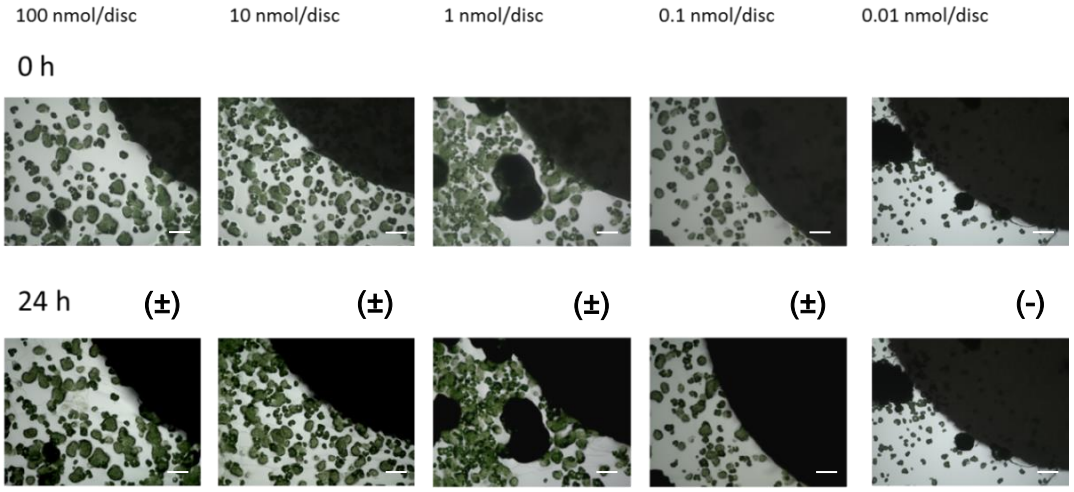
D (*S/R*)-1-palmitoyl-2-oleoylglycerol



E (*S/R*)-1-myristoyl-2-linoleoylglycerol



F (*S/R*)-1-linoleoyl-2-palmitoylglycerol



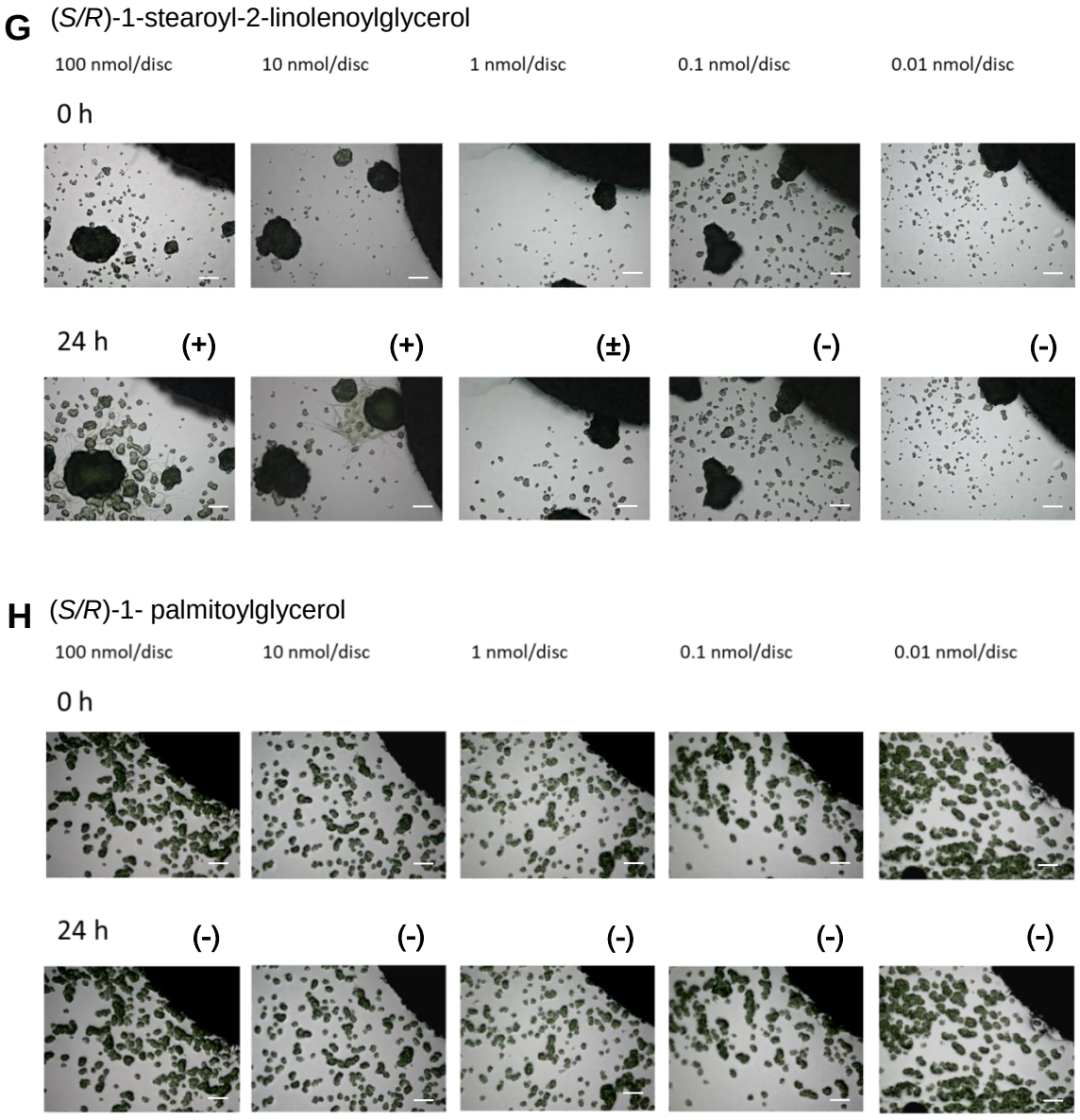


Fig. 4.2　ジアシルグリセロール類およびモノアシルグリセロール曝露に対する *Nostoc* sp.の分化応答

それぞれをバイオアッセイに使用し，24 時間以内の寒天ゲル平板 (1.2%) での菌体応答を定点観測している。**A)**：(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol, **B)**：(*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol, **C)**：(*S/R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol, **D)**：(*S/R*)-1-palmitoyl-2-oleoylglycerol, **E)**：(*S/R*)-1-myristoyl-2-linoleoylglycerol, **F)**：(*S/R*)-1-linoleoyl-2-palmitoylglycerol, **G)**：(*S/R*)-1-stearoyl-2-linolenoilglycerol H)：(*S/R*)-1-palmitoylglycerol, scale bar, 500 µm

4.4 考察

4.4.1 ジアシルグリセロール類の HIF 様活性の構造活性相関

合成した 4 種類のジアシルグリセロール類のラセミ体はいずれも HIF 様活性をもつことが確認された。また，各ジアシルグリセロール類の HIF 様活性を比較すると，その活性力価は各化合物ごとに差異が認められ，ジアシルグリセロール類によるホルモゴニア分化誘導現象は，ジアシルグリセロール類を構成するアシル基の組み合わせと相関性があるものと考えられる。1 位にパルミトイル基を持ち，2 位に不飽和アシル基をもつジアシルグリセロール類で特に強い HIF 様活性が示されたことから，1 位アシル基のアルキル鎖長および 2 位不飽和アシル基の存在が HIF 活性に大きく影響していると考えられる。植物の脂質を構成するジアシルグリセロール類は，ホスファチジン酸誘導体を経由して生成されるため，1 位に飽和脂肪酸，2 位に不飽和脂肪酸が結合した構造が天然物として普遍的であり，飽和脂肪酸には C_{16} のパルミチン酸，不飽和脂肪酸には C_{18} のオレイン酸やリノール酸，リノレン酸が入ることが多いことが知られている (Berg *et al.*, 2002) 。本研究で合成した (*S/R*)-1-myristoyl-2-linoleoylglycerol や(*S/R*)-1-linoleoyl-2-palmitoylglycerol，特に後者は天然にはほとんど存在しないため，ジアシルグリセロール類としての生理機能を発揮するにはやや不適な構造であることが考えられ，これも HIF のシグナル伝達機能との関連性に注目が集まる。

4.4.2 光学異性体ジアシルグリセロール類の HIF 様活性の構造活性相関

不斉合成品(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol，(*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol はいずれも HIF 様活性を示したが, 特に高濃度における活性に違いが見受けられた。100 nmol/disc では，(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol ではペーパーディスク付近から凝集体がほどけてホルモゴニアの拡散が観察されたが，(*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol ではペーパーディスクからやや離れた位置でのみホルモゴニアの拡散が確認された。ペーパーディスクから離れるにしたがって周辺に拡散するジアシルグリセロール類の濃度は低下していくため，(*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol は高濃度では HIF 様活性の閾値を超えて抑制されるという結果になったと考えられる。また，ジアシルグリセロール類の天然体として存在している化合物である(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol は，ホルモゴニア分化誘導活性としてより優れている可能性もある。光学異性体の間では, 100 nmol/disc において, 天然型 *S*-体に対し 非天然型 *R*-体は，ペーパーディスクからやや離れた距離でのホルモゴニア分化が強く誘導されており，近距離では抑制されているが，これは *S*-体が高濃度で存在すると推察される根表面での共生構築に関わっていると考えられる。

4.4.3　HIF 様活性を示さないジアシルグリセロール類類似化合物について

本章で合成したジアシルグリセロール類がいずれも HIF 様活性を示したのに対し，モノアシルグリセロールである(*S/R*)-1-palmitoylglycerol は HIF 様活性を全く示さなかった。ジアシルグリセロール類は 1 位および 2 位にアシル基を持つのに対し，モノアシルグリセロール類は 1 位にのみアシル基を持つことから，ジアシルグリセロール類によるホルモゴニア分化誘導活性には，2 つのアシル基の存在，特に 2 位のカルボニル結合あるいはアシル基の存在が必須であると考えられる (Fig. 4.3) 。また，ジアシルグリセロール類の 3 位にホスファチジルイノシトールが結合した 1-palmitoyl-2-linoleoylphosphatidylinositol も HIF 様活性を示さないことが確認されていることから (田中，修士論文，2012) ，3 位の遊離 OH 基の存在も必須であることが示唆される。

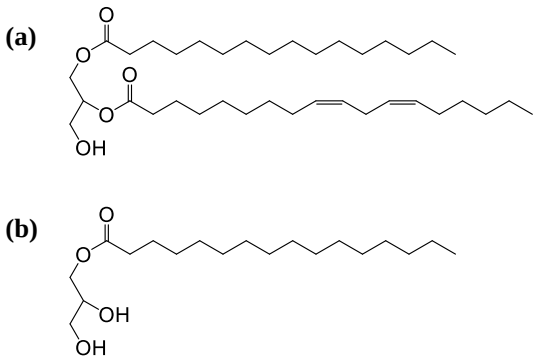


Fig. 4.3　(a) : 1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol と (b) : 1-palmitoylglycerol の化学構造

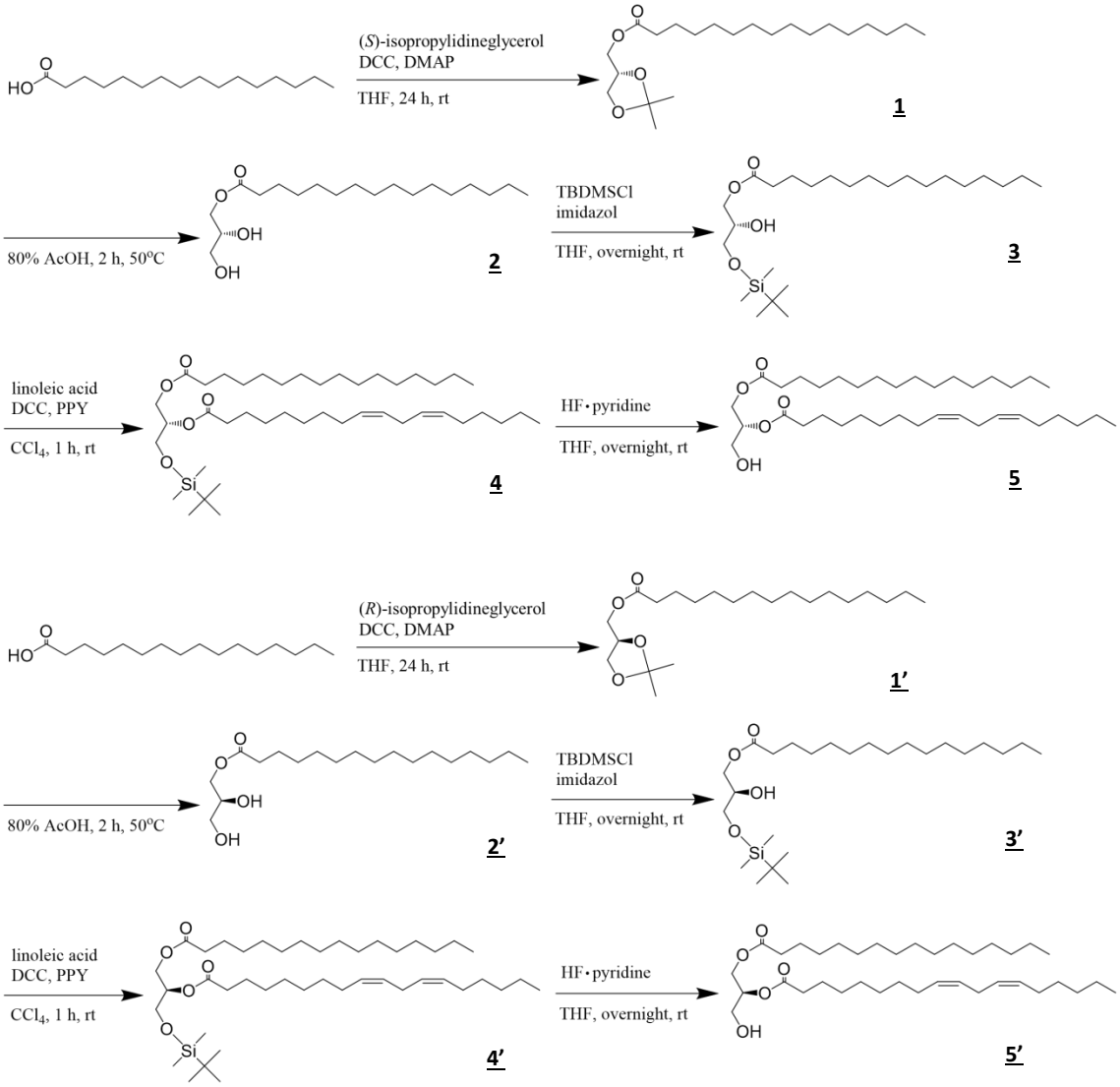
4.5 第四章のまとめ

ソテツ・サンゴ状根から HIF の 1 つとして単離同定した(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol の生理活性を検証し，アシル基の異なるジアシルグリセロール類を用いた構造活性相関をみるため, (*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol および(*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol の不斉合成，アシル基の異なるラセミ体ジアシルグリセロール類の化学合成を行い，それらの HIF 様活性の有無を調べた。不斉合成品である (*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol および(*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol はいずれも HIF 様活性を示したが，100 nmol/disc 曝露においては(*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol ではホルモゴニア分化誘導が妨げられる傾向が見られた。ラセミ体として合成したジアシルグリセロール類はアシル基の組み合わせにより活性力価は異なるものの，いずれも HIF 様活性を示した。一方，モノアシルグリセロール類である 1-palmitoylglycerol は HIF 様活性を示さなかった。 以上の結果から，ジアシルグリセロール類によるホルモゴニア分化誘導活性には，2 つのアシル基の存在，特に 2 位のカルボニル結合あるいはアシル基の存在が必須であると考えられる。

4.6 Experimental

4.6.1 1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol の不斉合成 (5 and 5')

(*R*)-1-palmotoyl-2-linoleoylglycerol (**5**) および(*S*)-1-palmotoyl-2-linoleoylglycerol (**5'**) の不斉合成は，Scheme 4.1 に示す方法に従って行った (Hui *et al*., 2003; Tallman *et al*., 2007; Mori, 2012) 。



Scheme 4.1 Synthesis of enantiomers of 1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol

*3-palmitoyl-(S)-isopropylidine glycerol (**1**)*: palmitic acid (0.68 g, 2.65 mmol) を超脱水 THF (20 mL) に溶解し，これに DCC (0.54 g, 2.65 mmol) ，DMAP (0.32 g, 2.65 mmol) および (*S*)-isopropylidineglycerol (0.42 g, 3.19 mmol) を加えた。これをマグネットスターラーで 24 時

間，室温条件で撹拌し，反応物を濾紙で濾過して減圧濃縮した。油状の濃縮物からシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane:EtOAc, 9:1) によって，無色の固体状の化合物 **1** を精製した (0.67 g, 収率 68%) 。

*(*R*)-1-Palmitoyglycerol (2)*: 化合物 **1** (0.55 g, 1.5 mmol) に 80%酢酸 (AcOH:H_2O, 80:20, 12 mL) を加えた混合物をマグネットスターラーで 2 時間，50°C の条件で撹拌した。TLC 上で化合物 **1** の消失を確認後，混合物を冷却して EtOAc (100 mL) に溶解した。これを H_2O，飽和 $NaHCO_3$ 水溶液，飽和 NaCl 水溶液で順次液液分配し，得られた有機層を無水 Na_2SO_4 で脱水後，減圧濃縮して無色の固体状の反応物を得た。これを EtOAc/hexane で再結晶し，結晶状の化合物 **2** を得た (0.39 g, 収率 80%) 。

*(*S*)-1-Palmitoyl-3-*tert*-butyldimethylsilylglycerol (3)*: 化合物 **2** (300 mg, 0.91 mmol) を超脱水 THF (20 mL) に溶解後，*Tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) (0.15 g, 1.0 mmol) と imidazole (93 mg, 1.4 mmol) を加えた。これをマグネットスターラーで overnight，室温条件で撹拌した。反応後，生成した白色沈殿を濾過して減圧濃縮をして得られた油状の濃縮物から，シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc, 6:1) によって，無色の油状の化合物 **3** を精製した (360 mg, 収率 89%) 。

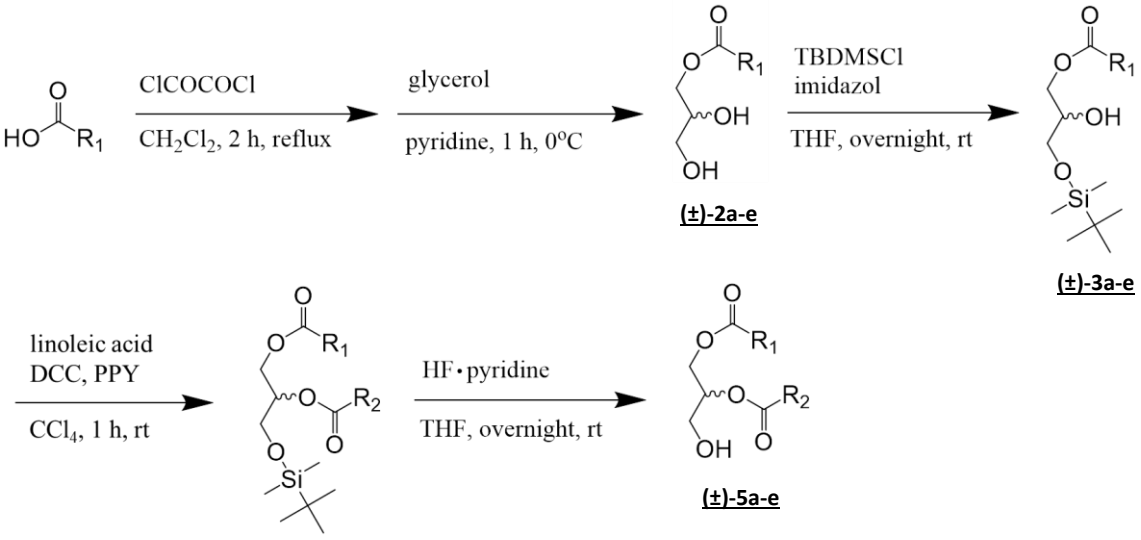
*(*S*)-1-Palmitoyl-2-linoleoyl-3-*tert*-butyldimethylsilylglycerol* (***4***): 化合物 **3** (140 mg, 0.31 mmol), linoleic acid (0.11 mL, 0.35 mmol), および 4-pyrrolidinopyridine (56 mg, 0.38 mmol) を CCl_4 (15 mL) に溶解し，これに DCC (78 mg, 0.38 mmol) を溶解した CCl_4 (15 mL) を滴下した。これをマグネットスターラーで 1 時間，室温条件で撹拌した。反応後，生成した白色沈殿を濾過して減圧濃縮をして得られた油状の濃縮物から，シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc, 30:1) によって, 無色の油状の化合物 **4** を精製した (200 mg, 収率 90%) 。

*(*R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol (5)*: 化合物 **4** (150 mg, 0.21 mmol) および pyridine (55 µL, 0.65 mmol) を超脱水 THF (10 mL) に溶解し，これにフッ化水素ピリジン (60 µL, 0.65 mmol) を加えた。これをマグネットスターラーで overnight，室温条件で撹拌した。撹拌後，反応物を *n*-hexane (50 mL) に溶解後，H_2O，飽和 $NaHCO_3$ 水溶液，飽和 NaCl 水溶液で順次液液分配し，得られた有機層を無水 Na_2SO_4 で脱水後，減圧濃縮して黄色の油状の化合物 **5** を得た (103 mg, 収率 82%) 。

(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol (**5'**) の不斉合成は，(*S*)-isopropylidineglycerol を (*R*)-isopropylidineglycerol に変更し，上記と同様の方法で化学合成した。まず，上記と同様の反応条件で化合物 **1'**を化学合成した (0.62 g, 収率 63%) 。次に，化合物 **1'** (500 mg, 1.35 mmol) から 80%酢酸と反応により，化合物 **2'**を得た (0.39 g, 収率 88%) 。このモノアシルグリセロール（300 mg, 0.91 mmol）の 3 位水酸基を TBDMSCl で保護して，化合物 **3'**を化学合成した。さらに，化合物 **3'** (300 mg, 0.67 mmol) の 2 位水酸基に linoleic acid を導入して，化合物 **4'**を得た (420 mg, 収率 88%) 。この化合物 **4'** (300 mg, 0.42 mmol) から *tert*-butyldimethylsilyl 基を脱保護し，化合物 **5'**を得た (230 mg, 収率 90%) 。

4.6.2 (*S/R*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol および各種ジアシルグリセロール類のラセミ合成

ジアシルグリセロール類のラセミ合成は，Scheme 4.2 に示す方法に従って行った (Hui *et al*., 2003; Tallman *et al*., 2007) 。



	R_1COOH	R_2COOH
a	palmitic acid	linoleic acid
b	palmitic acid	oleic acid
c	myristic acid	linoleic acid
d	linoleic acid	palmitic acid
e	stearic acid	linolenic acid

Scheme 4.2 Synthesis of racemic diacylglycerols

*(*S/R*)-1-Palmitoylglycerol* (**(±)-2a, b**), *(*S/R*)-1-Myristoylglycerol* (**(±)-2c**), *(*S/R*)-1-linoleoylglycerol* (**(±)-2d**), *(*S/R*)-1-Stearoylglycerol* (**(±)-2e**) : Palmitic acid (10 mmol) と塩化オキサリル (15 mmol) を CH_2Cl_2 (10 mL) に溶解し，2 時間，40°C の条件で reflux を行った。反応後，ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し，酸クロライド化合物を得た。これを CH_2Cl_2 (5 mL) に再溶解したものを，0°C，撹拌条件下で glycerol (50 mmol) を溶解した pyridine (20 mL) に滴下しながら加えて, 同条件下で 1 時間反応させた。反応液は 0°C の H_2O (50 mL) に混合することで反応を停止させた。これを $CHCl_3$ で 2 回液液分配し，得られた有機層は HCl (2M, 0°C) で洗浄し，残存 pyridine を取り除いた後，無水 Na_2SO_4 で脱水処理し

た。脱水処理後，減圧濃縮して得た濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$:MeOH, 19:1) で精製し，白色の固体として化合物 **(±)-2a** (= **(±)-2b**) を得た (2.1 g, 収率 63%) 。化合物**(±)-2c, 2d, 2e** の調製は出発物質を palmitic acid から myristic acid, linoleic acid, stearic acid にそれぞれ変更して同様の条件で行い，それぞれ 2.0 g (収率 67%)，2.1 g (収率 58%) ，2.2 g (収率 61%) を得た。

1-Palmitoyl-3-tert-*butyldimethylsilylglycerol* (**(±)-3a, 3b**), *1-Myristoyl-3*-tert-*butyldimethylsilyl-glycerol* (**(±)-3c**), *1-Linoleoyl-3*-tert-*butyldimethylsilylglycerol* (**(±)-3d**), *1-Stearoyl-3*-tert-*butyldimethylsilylglycerol* (**(±)-3e**) : 化合物**(±)-2a** (=**(±)2b**) (1.0 g, 3.0 mmol) を超脱水 THF (20 mL) に溶解後, *Tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) (0.54 g, 3.6 mmol) と imidazole (300 mg, 4.5 mmol) を加えた。これをマグネットスターラーで overnight，室温条件で撹拌した。反応後，生成した白色沈殿を濾過して減圧濃縮をして得られた油状の濃縮物から，シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc, 6:1) によって，無色の油状の化合物**(±)-3a** (=**(±)3b**)を精製した (1.2 g, 収率 88%) 。化合物**(±)-3c, 3d, 3e** の調製は同様の条件で行い，それぞれ 1.2 g (収率 90%)，0.87 g (収率 66%) ，1.2 g (収率 91%) を得た。

1-Palmitoyl-2-linoleoyl-3-tert-*butyldimethylsilylglycerol* (**(±)-4a**). *1-Palmitoyl-2-oleoyl-3*-tert-*butyldimethylsilylglycerol* (**(±)-4b**). *1-myristoyl-2-linoleoyl-3*-tert-*butyldimethylsilylglycerol* (**(±)-4c**). *1-Llinoleoyl-2-palmitoyl-3*-tert-*butyldimethylsilylglycerol* (**(±)-4d**) : 化合物**(±)-3a** (500 mg, 1.1 mmol), linoleic acid (0.38 mL, 1.2 mmol), および 4-pyrrolidinopyridine (180 mg, 1.2 mmol) を CCl_4 (15 mL) に溶解し，これに DCC (270 mg, 1.3 mmol) を溶解した CCl_4 (15 mL) を滴下した。これをマグネットスターラーで 1 時間，室温条件で撹拌した。反応後，生成した白色沈殿を濾過して減圧濃縮をして得られた油状の濃縮物から，シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc, 30:1) によって，無色の油状の化合物**(±)-4a** を精製した (699 mg, 収率 88%) 。化合物**(±)-4b, 4c, 4d, 4e** の調製は同様の条件で行い, それぞれ 530 mg (収率 67%), 640 mg (収率 78%) ，590 mg (収率 78%) ，620 mg (収率 80%) を得た。

*(*S/R*)-1-Palmitoyl-2-linoleoylglycerol* (**(±)-5a**), *(*S/R*)-1-Palmitoyl-2-oleoylglycerol* (**(±)-5b**), *(*S/R*)-1-Myristoyl-2-linoleoylglycerol* (**(±)-5c**), *(*S/R*)-1-Linoleoyl-2-palmitoylglycerol* (**(±)-5d**), *(*S/R*)-1-Stearoyl-2-linolenoylglycerol* (**(±)-5e**) : 化合物**(±)-4a** (500 mg, 0.7 mmol) および pyridine (170 µL, 2.1 mmol) を超脱水 THF (10 mL) に溶解し，これにフッ化水素ピリジン (200 µL) を加えた。これをマグネットスターラーで overnight，室温条件で撹拌した。撹拌後，反応物を *n*-hexane (50 mL) に溶解後，H_2O，飽和 $NaHCO_3$ 水溶液，飽和 NaCl 水溶液で順次液液分配し，得られた有機層を無水 Na_2SO_4 で脱水後，減圧濃縮して黄色の油状の化合物**(±)-5a** を得た (384 mg, 92%) 。化合物**(±)-5b, 5c, 5d, 5e** の調製は同様の条件で行い, それぞれ 376 mg (収率 90%)，373 mg (収率 90%) ，382 mg (収率 91%) ，380 mg (収率 90%) を得た。

第五章　プロテインキナーゼ C 賦活化剤の HIF 様活性の検証とアナカルド酸アルキルエステル誘導体の HIF 様活性の構造活性相関

5.1　はじめに

HIF 様活性を有するジアシルグリセロール類には，プロテインキナーゼ C を賦活化させる生理作用があることが知られているが，ホルボールエステル類やウルシオール類などの PKC 賦活剤にも DAG 同様，HIF 様活性が示されるかどうかは，その活性の分子機序を知るうえで重要な知見を与える。本章では，ホルモゴニア分化誘導と PKC 賦活化との関連性を明らかにすべく，PKC 賦活化剤として知られる天然物のいくつかを用い，それらの HIF 様活性を比較し，構造と HIF 様活性との関連性を検証した。

また，イチョウ偽果に含まれるアナカルド酸類は HIF 様活性を示すが（西塚，修士論文，2015），この分子種の化学構造はジアシルグリセロール類と少なからず類似している (Fig. 5.1)。アナカルド酸類には分子内にアルキル側鎖とサリチル酸タイプのカルボキシ基が存在しており，これらがホルモゴニア分化誘導に極めて重要な働きをもつ可能性が高い。しかし，高濃度 (10-100 nmol/disc) のアナカルド酸類には殺細菌性があることから，アナカルド酸類のシアノバクテリアに対する細胞毒性作用にはカルボキシ基が大きく関与していると推察された。この毒性を排除するとともに，より構造がジアシルグリセロール類に類似した HIF 様活性化合物をアナカルド酸メチルエステル誘導体あるいはアルコールエステル誘導体として得るため，それら誘導体のアルキル鎖長と不飽和度と HIF 様活性との構造活性相関を検討することにし，本章では，アナカルド酸類のカルボキシ基にアルコールをエステル結合させたアナカルド酸アルコールエステル誘導体を化学合成し，それらの HIF 様活性誘導体としての構造活性相関についても検討した。

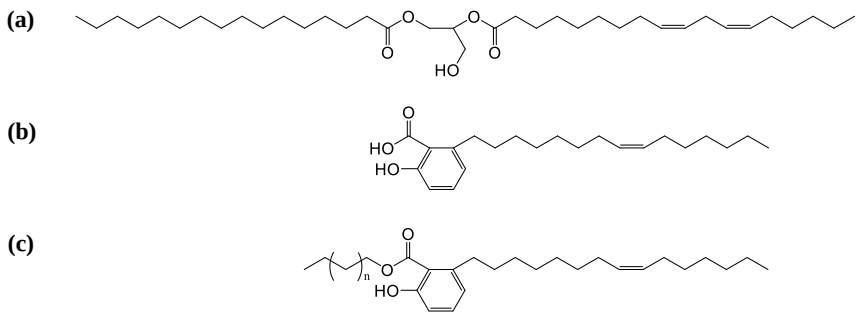
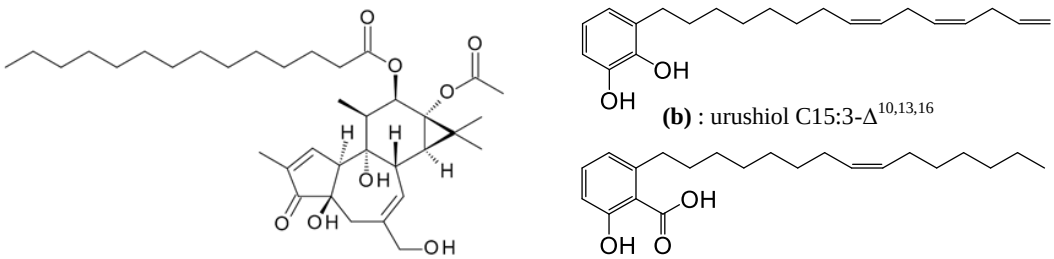


Fig. 5.1 (a) 1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol と (b) anacardic acid C15:1-Δ^{8} および (c) そのエステル誘導体の化学構造

5.2　PKC 賦活化剤関連化合物のホルモゴニア分化誘導活性の検証

PKC 賦活化剤として知られる天然化合物として，トウダイグサ科の植物由来である 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (Takai *et al*., 1979; Kishimoto *et al*., 1980) ，ウルシ科の植物由来の接触毒性化合物である urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$ (Weissmann *et al*., 1986) ，イチョウ偽果由来のアナカルド酸類の最大成分である anacardic acid C15:1-Δ^{8} (Begum *et al*., 2002) を選び，これらの化合物に曝露させたときの *Nostoc* sp.栄養増殖菌体塊の応答を比較検討した (Fig. 5.2) 。



(a) : 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

(b) : urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$

(c) : anacardic acid C15:1-Δ^{8}

Fig. 5.2 本章で検定試験に供した PKC 賦活化関連化合物

化合物 (a) および (b) は市販品 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) を用いている。化合物 (c) は 5.2.1 の手法に従ってイチョウ偽果 MeOH 抽出物から単離精製したものを用いている。

5.2.1　anacardic acid C15:1-Δ^{8} の調製

HIF の一つとしてイチョウ偽果に含まれるアナカルド酸類を同定している (西塚，修士論文，2015) 。HIF 様活性を有する接触毒性化合物であるアナカルド酸類のうち，イチョウ偽果に主成分として含まれるアナカルド酸類である anacardic acid C15:1-Δ^{8} を比較対象化合物とした。anacardic acid C15:1-Δ^{8} の単離精製は次の手順に従って行った (Fig. 5.3) 。

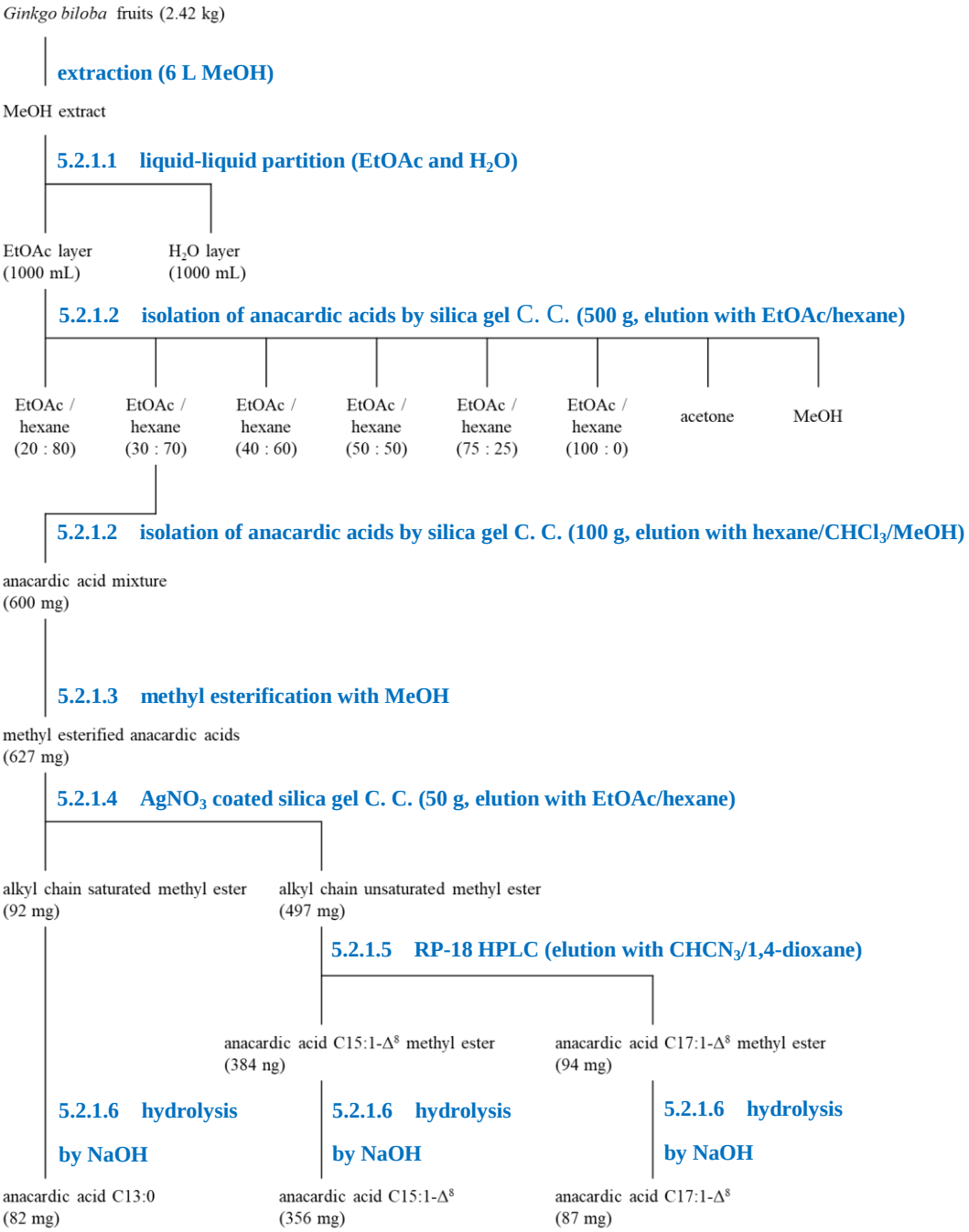


Fig. 5.3 anacardic acid C15:1-Δ^8 の単離精製過程

反応条件，精製条件の詳細は各節を参照のこと。

5.2.1.1　イチョウ偽果 MeOH 抽出物の液液分配

アナカルド酸類の単離精製には，第二章で述べた北海道大学構内で採取したイチョウ偽果をソースに用いた。青みの残るイチョウ偽果（銀杏）2.42 kg をそのまま MeOH 6 L に浸漬して 1 週間 4°C 下で抽出した。その後 MeOH 一回目抽出液を回収し，ロータリーエバポレーターで減圧濃縮して得たタール状のものを水 1000 mL に再懸濁し, 等量の EtOAc で液々分配抽出した。これを 2 回繰り返し，得られた有機層は混合後無水硫酸ナトリウムで脱水し，濃縮乾固した (10.26 g) 。これを MeOH に再溶解し，アナカルド酸類を含む EtOAc 可溶画分全量を次に続くシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し，アナカルド酸類の単離精製を行った。

5.2.1.2　シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるアナカルド酸類の精製

液液分配によって得た EtOAc 可溶画分を，2 段階にわたる順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーに従って分画した。1 回目の分画を *n*-hexane – EtOAc 溶媒系のステップワイズ法で行い，アナカルド酸類を多く含む EtOAc 30%溶出画分 6,810 mg のうち 1,000 mg を 2 回目の分画に供し，Fraction 2-3 からアナカルド酸混合物 625 mg を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィー条件を Table 5.1-2 に示す。

Table 5.1　カラムクロマトグラフィー 1 の条件

sample weight	Silica gel	bed solvent	bed volume	column internal diameter × height
10.26 g	500 g	*n*-hexane	880 mL	75 mm × 225 mm

Fraction	eluted solvent	elution volume	weight
1	*n*-hexane-EtOAc = 80 : 20	1000 mL	32 mg
2	*n*-hexane-EtOAc = 70 : 30	1000 mL	6810 mg
3	*n*-hexane-EtOAc = 60 : 40	1000 mL	2044 mg
4	*n*-hexane-EtOAc = 50 : 50	1000 mL	264 mg
5	*n*-hexane-EtOAc = 25 : 75	1000 mL	112 mg
6	*n*-hexane-EtOAc = 0 : 100	1000 mL	217 mg
7	acetone	2000 mL	207 mg
8	MeOH	2000 mL	372 mg

Table 5.2　カラムクロマトグラフィー２の条件

sample weight	Silica gel	bed solvent	bed volume	column internal diameter × height
1000 mg	100 g	*n*-hexane–$CHCl_3$–MeOH (15 : 15 : 1)	150 mL	40 mm × 120 mm

Fraction	eluted solvent (*n*-hexane–$CHCl_3$–MeOH)	elution volume	weight
2-1	15 : 15 : 1	165 mL	10 mg
2-2	15 : 15 : 1	165 mL	352 mg
2-3	15 : 15 : 1	625 mL	625 mg

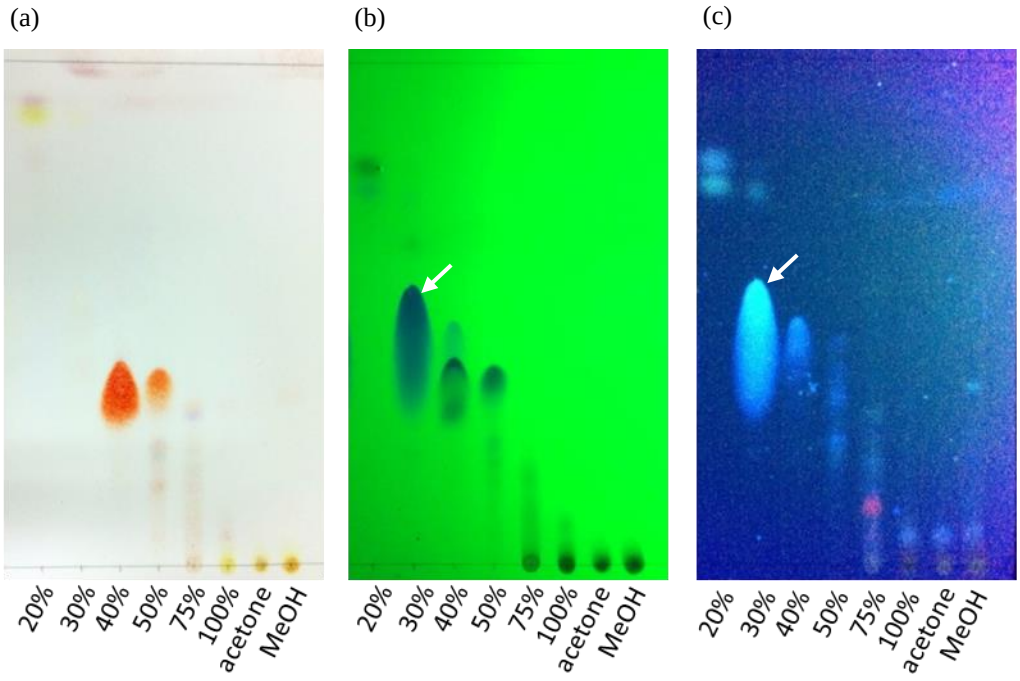


Fig. 5.4　イチョウ偽果 MeOH 抽出物 EtOAc 転溶部の順相 TLC パターン

n-Hexane–EtOAc (3 : 1) を展開溶媒としている。図の白矢印はアナカルド酸類のスポットを示す。アナカルド酸類は 30%EtOAc 画分に白青色自家蛍光を示すクエンチングスポットとして検出されている。(a) vanillin 硫酸試薬を噴霧後，熱風で加熱。(b) UV 254 nm 紫外線照射によるクエンチングスポットの検出。(c) UV 365 nm 紫外線照射による自家蛍光検出。

5.2.1.3　アナカルド酸メチルエステル誘導体の化学合成

5.2.1.2 で部分精製したアナカルド酸混合物を FD-MS スペクトル分析に供した結果 (Fig. 5.5)，3 種類のアナカルド酸類 anacardic acid C13:0, anacardic acid C15:1-Δ^8, anacardic acid C17:1-Δ^8 の混合物であることを確認したため, 各アナカルド酸類の分離を容易にすることを目的に，これら混合物のそれぞれのカルボキシ基をメチルエステル誘導体へと変換した (Fig. 5.6) 。反応は，600 mg のアナカルド酸混合物を濃硫酸を含む MeOH (MeOH : H_2SO_4 = 20 : 1) に溶解し，78°C の条件下で 2 時間 reflux 処理を行った。reflux 処理後，反応液は基質のカルボキシ基と MeOH との間の脱水縮合反応により生じた H_2O を除去する目的で適量の無水 Na_2SO_4 を加え, 綿濾過によって Na_2SO_4 を取り除いた MeOH-H_2SO_4 反応溶液を冷却後，過剰量 (500 mL) の H_2O で希釈し，これを直ちに EtOAc–H_2O の液液分配に供し，得られた有機層はさらに飽和 NaCl 水溶液で洗浄した。この有機層を無水 Na_2SO_4 で脱水処理後，減圧濃縮して得た生成物（油状，627 mg）を次に続く硝酸銀シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。この操作は Begum らの方法を改良したものである (Begum *et al.*, 2002)。

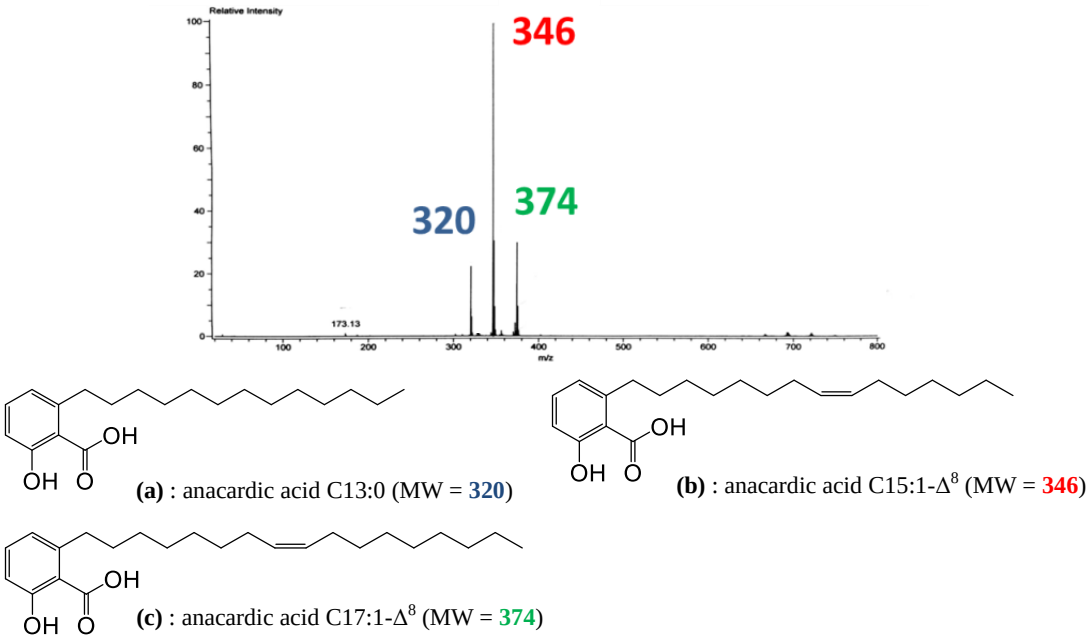


Fig. 5.5　Fr. 2-3 の FD-MS スペクトル

ペアレントイオン強度から，*m/z* 346 の化合物 (b) が主成分であることがわかる。

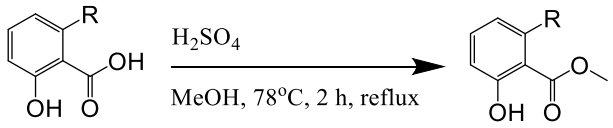


Fig. 5.6　アナカルド酸のメチルエステルへの誘導スキーム

5.2.1.4　硝酸銀シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる不飽和アルキル基をもつアナカルド酸メチルエステル誘導体の分離

5.2.1.3 によって得られたメチルエステル混合物から，飽和アルキル側鎖をもつアナカルド酸メチルエステル誘導体と不飽和アルキル側鎖をもつアナカルド酸メチルエステル誘導体を分離するために，硝酸銀コーティングシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。第二章に示した手法で調製した硝酸銀コーティングシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : EtOAc, 60 : 1) によって，飽和アナカルド酸メチルエステル誘導体および不飽和アナカルド酸メチルエステル誘導体をそれぞれ単離した。TLC の展開パターンを Fig. 5.7 に示す。混合物である不飽和アナカルド酸メチルエステル誘導体については，5.2.1.5 に示す ODS カラムを用いた逆相 HPLC に供した。

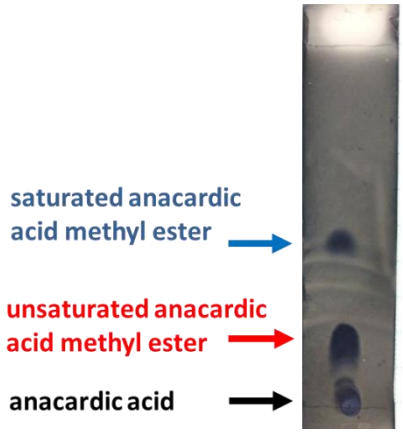


Fig. 5.7　アナカルド酸メチルエステル誘導体の TLC 展開パターン
硝酸銀コーティング TLC を用い，*n*-hexane–EtOAc (60 : 1) を展開溶媒として展開している。Gibbs 試薬噴霧後，アンモニア蒸気に曝し，呈色を確認している。原点スポットは未反応のアナカルド酸である。

5.2.1.5　逆相 HPLC による各メチルエステル誘導体の精製

5.2.1.4 によって精製した不飽和アルキル側鎖をもつアナカルド酸メチルエステル誘導体混合物 (497 mg) から anacardic acid C15:1-Δ^8 methyl ester, anacardic acid C17:1-Δ^8 methyl ester をそれぞれ単離するため，分取 HPLC に供した。分取 HPLC の条件を Fig. 5.8 に示す。

- Column : Wakosil ODS C_{18} column (7.5 mm diameter × 250 mm length) (Wako, Osaka, Japan)
- Eluent : CH_3CN - 1,4-dioxane = 1 : 1 (v/v), 1.0 mL/min, isocratic
- Detection : UV (260 nm)

Peak 1 (R_t = 12.9 min) : anacardic acid C15:1-Δ^8 methyl ester
Peak 2 (R_t = 14.7 min) : anacardic acid C17:1-Δ^8 methyl ester

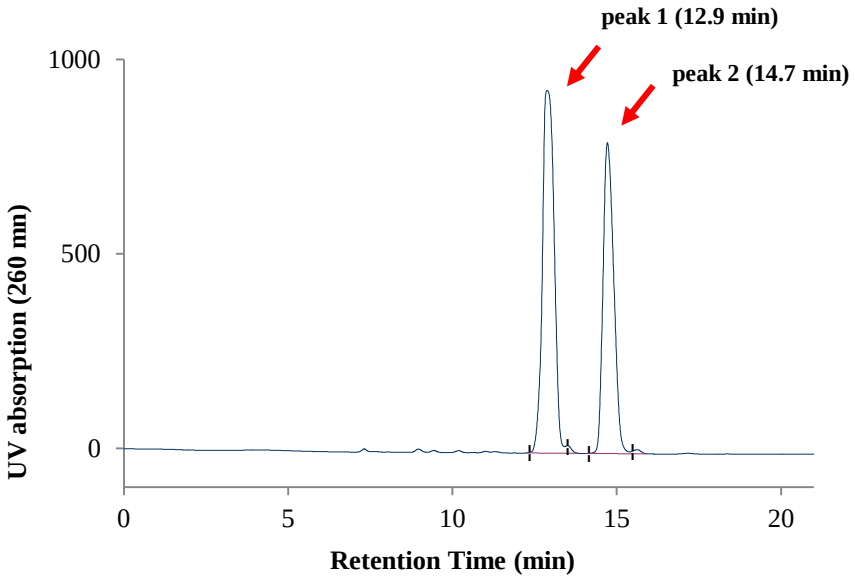


Fig. 5.8　不飽和アナカルド酸メチルエステル誘導体の分取 HPLC 条件

5.2.1.6　メチルエステル誘導体の加水分解処理

単離精製した anacardic acid C13:1 methyl ester (92 mg) , anacardic acid C15:1-Δ^8 methyl ester (384 mg) , anacardic acid C17:1-Δ^8 methyl ester (94 mg) をそれぞれアルカリ加水分解に供し，カルボキシ基遊離型のアナカルド酸を調製した。それぞれアナカルド酸メチルエステル誘導体を 10 mg/mL の濃度で MeOH に溶解し，1 : 1 (v/v) の割合になるように 2M NaOH を加え，60 °C，overnight の条件で撹拌反応し，十分に加水分解反応させた。反応後，pH 4.0 になるように 1 M HCl を加えて反応液を酸性にしたのち，500 mL の H_2O で希釈した。これと等量の EtOAc を加えて液液分配に供し，得られた有機層を無水 Na_2SO_4 で脱水し，濃縮乾固したものから，anacardic acid C13:0 (82 mg, yielded 93%) , anacardic acid C15:1-Δ^8 (356 mg, yielded 96%) , anacardic acid C17:1-Δ^8 (87 mg, yielded 96%) をそれぞれ回収した。anacardic acid C13:0, anacardic acid C15:1-Δ^8, anacardic acid C17:1-Δ^8 の FD-MS スペクトルを Fig. 5.9 に示す。

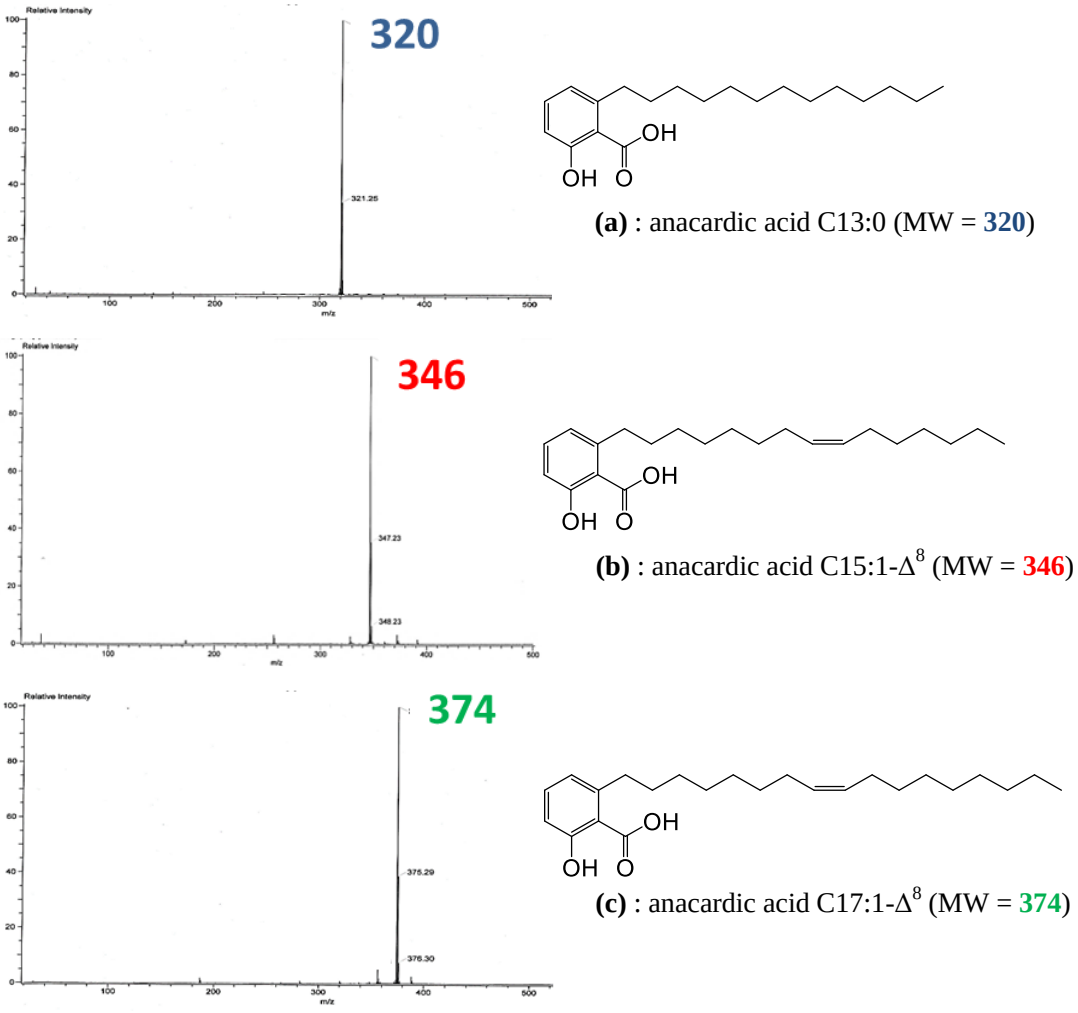


Fig. 5.9　加水分解処理して得られた 3 種のアナカルド酸の FD-MS スペクトル

5.2.2　PKC 賦活化関連化合物のホルモゴニア分化誘導試験

接触毒性化合物として知られる urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, anacardic acid C15:1-Δ^{8} をそれぞれホルモゴニア分化誘導活性検定試験に供したときの活性検定結果を Table 5.3 に，検鏡画像を Fig. 5.10 に示す。urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$，12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate はいずれも 0.01-100 nmol/disc においてペーパーディスク周辺では HIF 様活性を示さず，*Nostoc* sp.は凝集体のまま形態を維持していることが確認された。ただ，12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate は，100 nmol/disc ではペーパーディスク直下のみで，弱いホルモゴニア分化誘導効果らしき活性を示した。

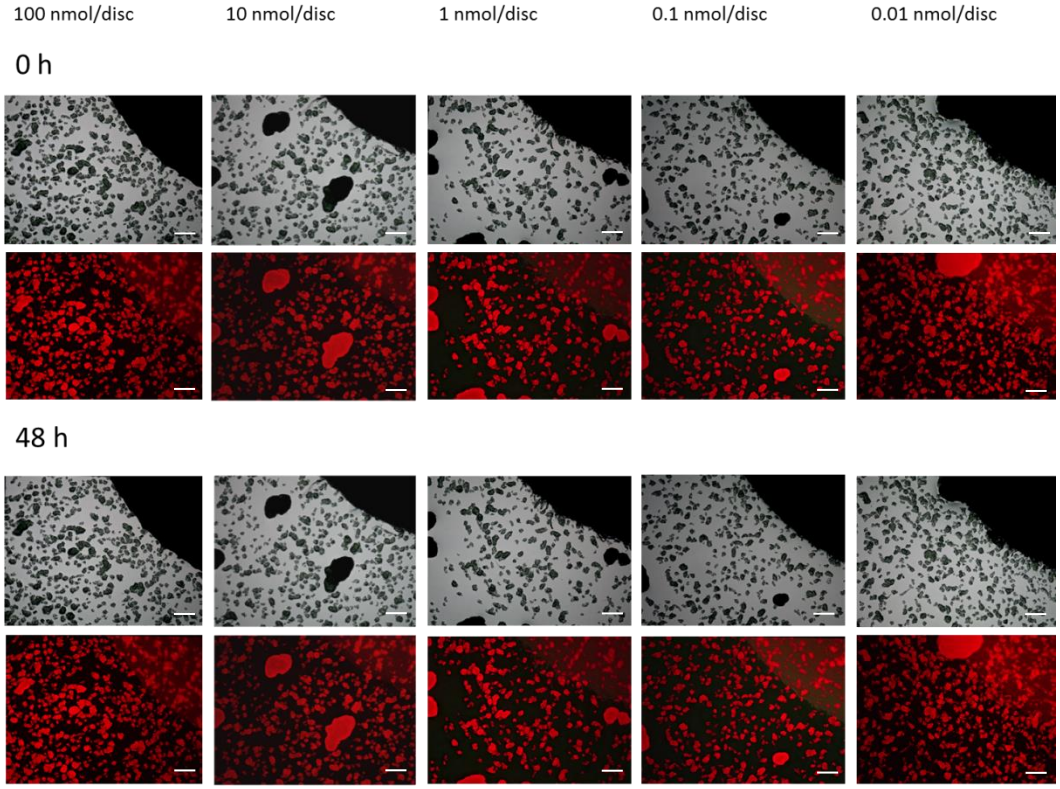
一方，anacardic acid C15:1-Δ^{8} は濃度依存的な応答を示した。0.1-1 nmol/disc においては 48 時間以内にペーパーディスク周辺にホルモゴニアが分散運動している様子が観察された。しかし，より高い濃度である 10-100 nmol/disc においてはペーパーディスク上の *Nostoc* sp. は自家蛍光を失い，アナカルド酸類はシアノバクテリアに対する致死性を示すことが示唆された。この致死活性と同様の現象は，urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$，12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate では観察されず, それぞれにおいて *Nostoc* sp.は自家蛍光を維持していた。

Table 5.3　接触毒性化合物のホルモゴニア分化誘導活性

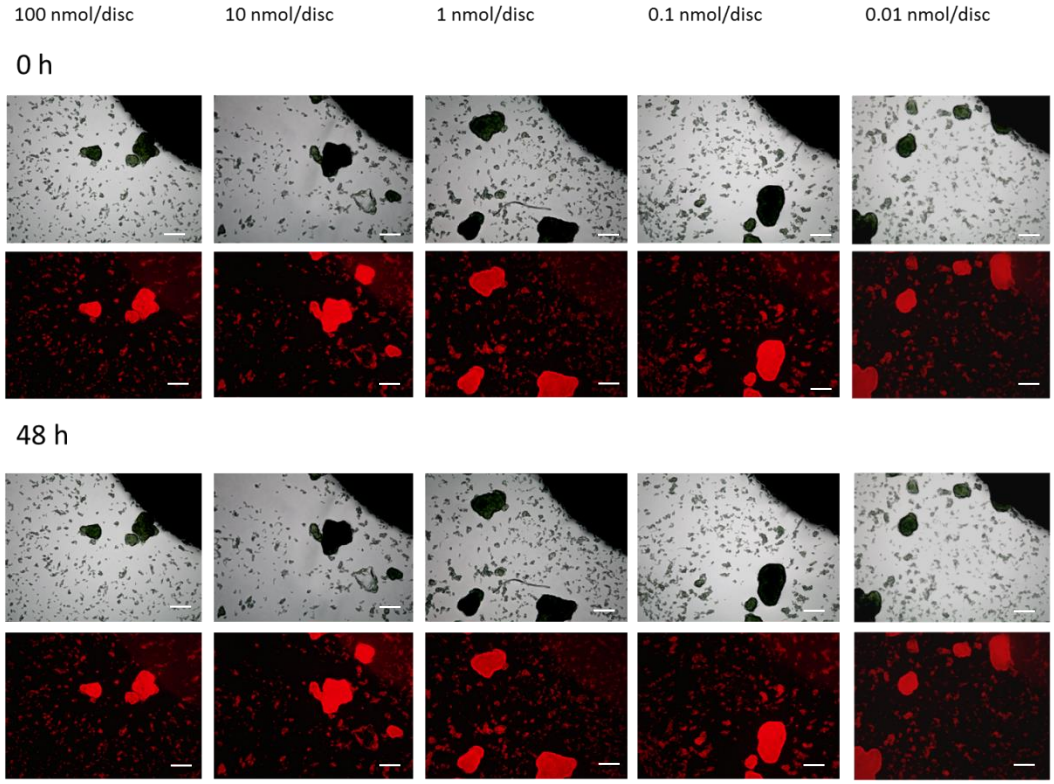
LT : lethally toxic, + : positive, - : negative

Compound (glyceride)	$1x10^{-7}$ (100 nmol)	$1x10^{-8}$ (10 nmol)	$1x10^{-9}$ (1 nmol)	$1x10^{-10}$ (100 pmol)	$1x10^{-11}$ (10 pmol)
(*S*)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol	++	+	+	−	−
12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate	±	−	−	−	−
urushiol C15:3-$\Delta^{7,10,13}$	−	−	−	−	−
anacardic acid C15:1-Δ^{8}	LT	LT	+	+	−

A urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$



B 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate



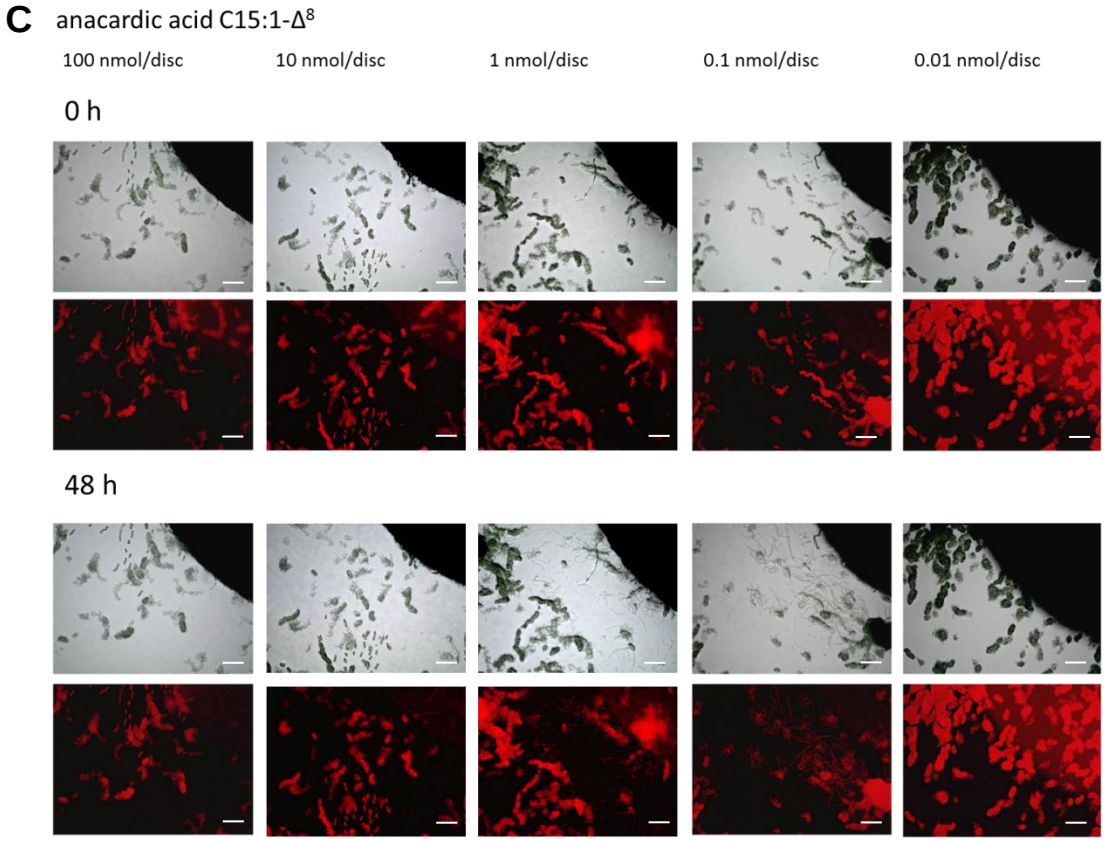


Fig. 5.10　接触毒性化合物添加に対する *Nostoc* sp.の応答の検鏡画像

それぞれをバイオアッセイ (sandwich assay) に使用し，48 時間後の 1.5%寒天培地上での菌体応答を定点観測している。菌体の自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を通して観測している。A) urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$, B) 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, C) anacardic acid C15:1-Δ^{8}, scale bar, 500 µm

5.3　アナカルド酸メチルエステル誘導体による細胞毒性の解消

アナカルド酸類のシアノバクテリアに対する細胞毒性作用に遊離カルボキシ基の存在が大きく関与しているかどうかを確認するため，化学合成したアナカルド酸メチルエステル誘導体を用いて，カルボキシ基遊離アナカルド酸類とのホルモゴニア分化誘導活性の比較検討を行った。ペーパーディスク周辺の菌体応答検鏡画像を Fig. 5.11 に示す。48 時間後には，アナカルド酸類を含むペーパーディスク直下付近での *Nostoc* sp.は自家蛍光を失っており，クロロフィル分解が進行している，つまり，*Nostoc* sp.に対する致死作用が示された。高濃度 (100 nmol/disc) のアナカルド酸では，ホルモゴニア分化誘導が阻害されているのみならず，殺細菌性が発揮されていることが判った。一方，メチルエステル誘導体を含ませたペーパーディスク周辺の菌体はクロロフィルの自家蛍光を維持しており，周辺ではホルモゴニア分化誘導が観察された。このことから，メチルエステル誘導体化により，*Nostoc* sp. に対する致死活性が解消され，HIF 様活性が観察できるようになった。

以上の結果から，アナカルド酸類のカルボキシ基にアルコールエステルを導入することで，シアノバクテリアに対する致死作用が解消できる一方，ホルモゴニア分化誘導作用は維持されると予想された。さらに，アルキル側鎖の鎖長をより長くすることでジアシルグリセロール類により近い構造（DAG アナログ）をとることから，アルキル側鎖の鎖長の変化に応じた構造活性相関をみられると期待できる。以上の予想に基づき，以降の実験を行った。

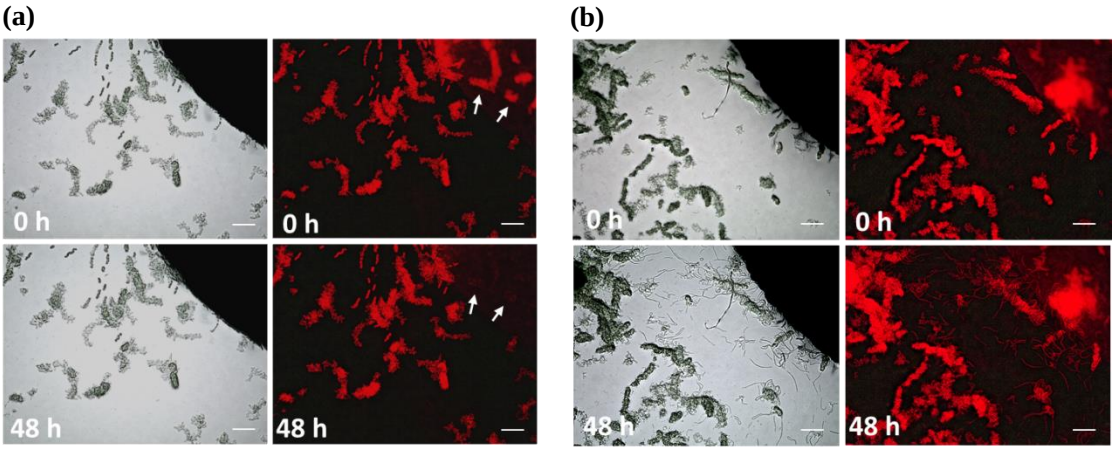
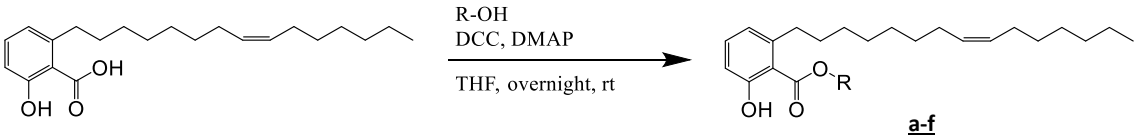


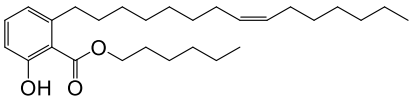
Fig. 5.11 アナカルド酸メチルエステル誘導体化によるシアノバクテリア致死活性の解消

(a) anacardic acid C15:1-Δ^8 および (b) anacardic acid C15:1-Δ^8 methyl ester それぞれ 100 nmol/disc を sandwich assay に使用し，48 時間以内の 1.2%寒天培地上に菌体の応答を定点観測している。菌体の自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を通して観測している。図中の白矢印はペーパーディスク直下のシアノバクテリアの自家蛍光が経時変化に伴って失われていることを示している。scale bar, 300 μm

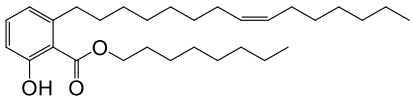
5.4　アナカルド酸アルキルエステル誘導体の化学合成

アナカルド酸アルキルエステルの HIF 様活性とアルキル側鎖の炭素鎖長や不飽和度との間における構造活性相関を検討するため，各種アナカルド酸アルキルエステル誘導体の化学合成を行った。第四章 4.2.2 の手法に従って調製した anacardic acid C15:1-Δ^8 を出発物質として，アルキル鎖長または不飽和度の異なる各種アルコールとそれぞれ DCC 縮合剤を用いたエステル化反応を進行させ，Fig. 5.2 に示す化合物 (a) – (f) を調製した。各化合物の FD-MS スペクトルは Appendix に記載する。

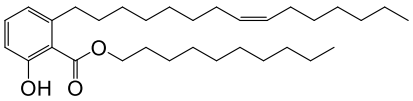




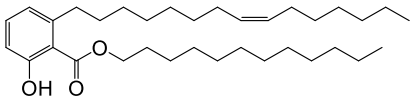
(a) : anacardic acid C15:1-Δ^8 hexyl ester



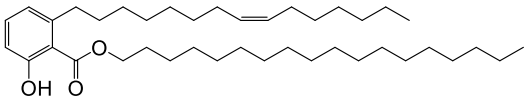
(b) : anacardic acid C15:1-Δ^8 octyl ester



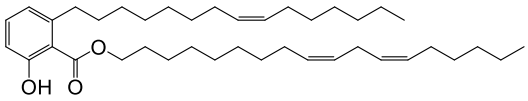
(c) : anacardic acid C15:1-Δ^8 decyl ester



(d) : anacardic acid C15:1-Δ^8 dodecyl ester



(e) : anacardic acid C15:1-Δ^8 stearyl ester



(f) : anacardic acid C15:1-Δ^8 linoleyl ester

- **a** R = 1-hexanol
- **b** R = 1-octanol
- **c** R = 1-decanol
- **d** R = 1-dodecanol
- **e** R = stearyl alcohol
- **f** R = linoleyl alcohol

Fig. 5.12 本章で検定試験に供したアナカルド酸アルコールエステル誘導体

5.5　アナカルド酸アルコールエステル誘導体の HIF 様活性検定結果

ホルモゴニア分化誘導処理後のペーパーディスク周辺で凝集菌体応答の HIF 様活性検定結果を Table 5.4 に，検鏡画像を Fig. 5.13 に示す。炭素鎖 6 から 12 の飽和中鎖アルコールを導入したアルキルエステル誘導体はいずれもホルモゴニア分化誘導活性を有しており，凝集体からほどけた糸状ホルモゴニアが順次拡散している様子が経時的に観察された。特に anacardic acid C15:1-Δ^8 octyl ester，anacardic acid C15:1-Δ^8 decyl ester では最も強い HIF 様活性が示され，48 時間後ではペーパーディスク周辺の凝集体が完全に崩壊している様子が観察された。一方，炭素数 18 の長鎖アルコールを導入したアルキルエステル誘導体では，導入したアルコールの不飽和度と HIF 様活性に正の相関が確認された。飽和 C_{18} アルキルアルコール (stearyl alcohol) を導入して調製した anacardic acid C15:1-Δ^8 stearyl ester 曝露区では，凝集体はわずかに膨らむものの，糸状ホルモゴニアが周辺へと拡散する様子は観察されなかった。これに対し，不飽和 C_{18} アルケニルアルコール (linoleyl alcohol) を導入して調製した anacardic acid C15:1-Δ^8 linoleyl ester 曝露区では，ホルモゴニアがペーパーディスク周辺に拡散する様子がはっきりと観察され，不飽和結合の分子内導入が分化誘導活性の改善に重要であることが示された。これは分子種側鎖の可動性が高まり，常温で固体よりも液体としてふるまうようになったことと関連していると推察している。

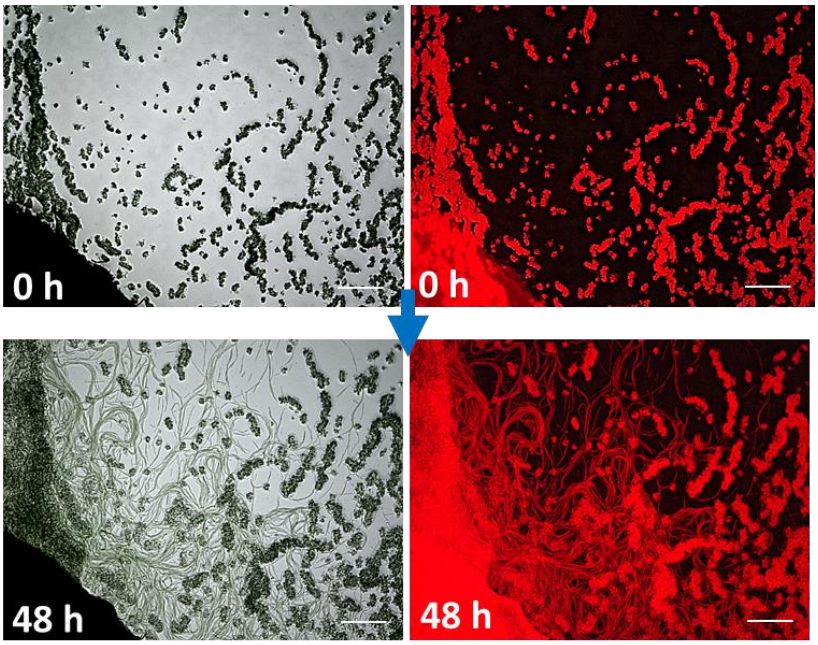
いずれの処理区においても，遊離アナカルド酸類がシアノバクテリアに対する致死作用を示す 10~100 nmol/disc では抗細菌性は示されず，シアノバクテリアによる自家蛍光はよく維持されている様子が確認された。

Table 5.4　アナカルド酸アルキルエステル誘導体のホルモゴニア分化誘導活性

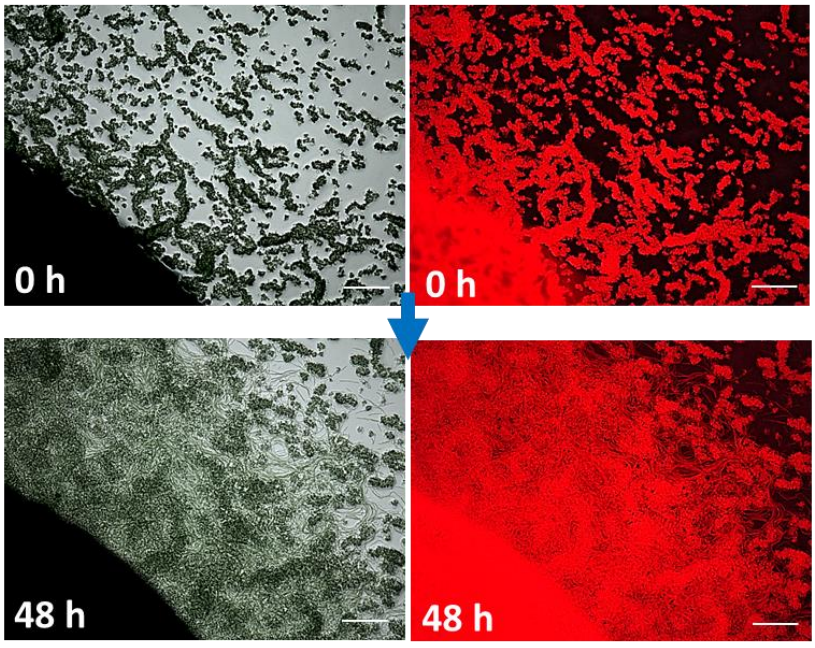
	Molar mass for HIF assay [mol/disc]				
	$1x10^{-7}$ (100 nmol)	$1x10^{-8}$	$1x10^{-9}$	$1x10^{-10}$	$1x10^{-11}$
Δ^8-anacardic acid C15:1 hexyl ester	+	++	+	-	-
Δ^8-anacardic acid C15:1 octyl ester	++	++	+	-	-
Δ^8-anacardic acid C15:1 decyl ester	++	++	+	-	-
Δ^8-anacardic acid C15:1 dodecyl ester	+	+	+	-	-
Δ^8-anacardic acid C15:1 stearyl ester	-	+	+	-	-
Δ^8-anacardic acid C15:1 linoreyl ester	+	+	+	-	-

＋: positive, －: negative, LD : lethal dose

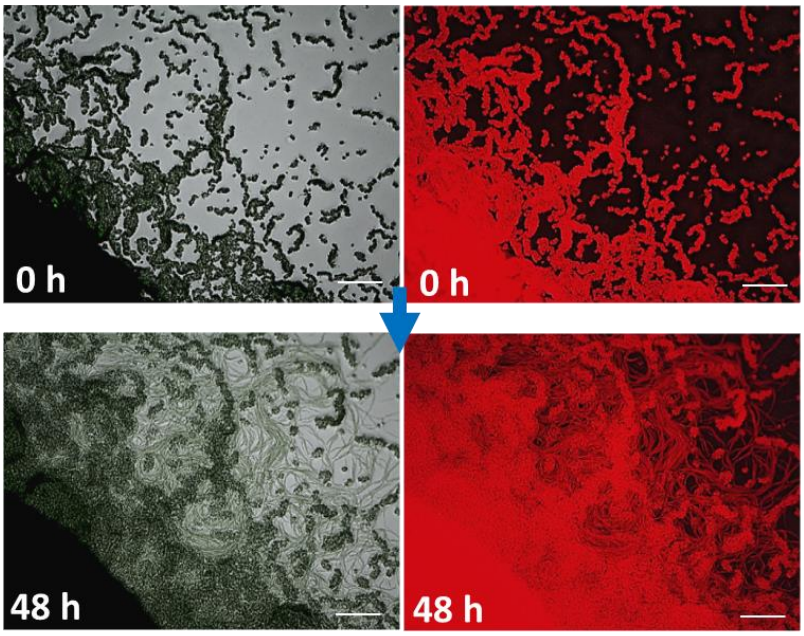
A **anacardic acid C15:1--Δ^8 hexyl ester (100 nmol/disc)**



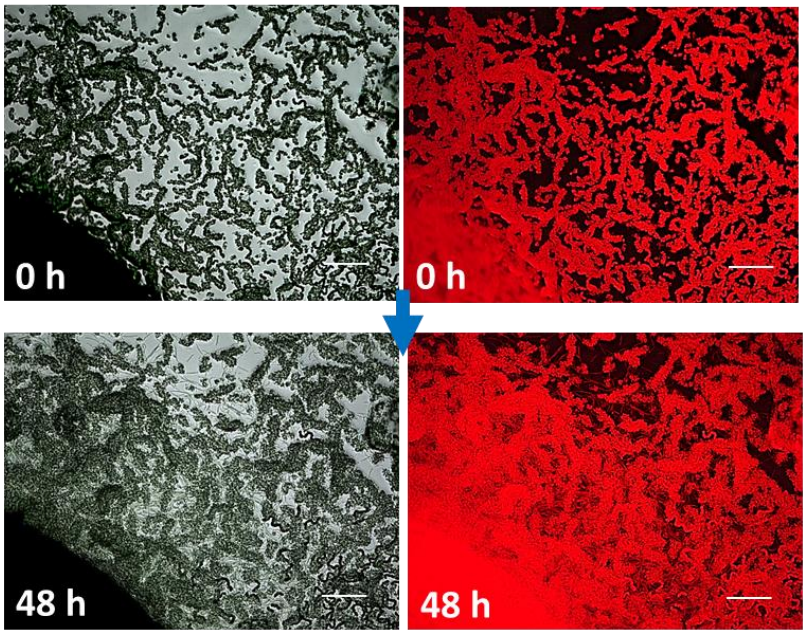
B **anacardic acid C15:1--Δ^8 octyl ester (100 nmol/disc)**



C anacardic acid C15:1--Δ^8 decyl ester (100 nmol/disc)



D anacardic acid C15:1--Δ^8 dodecyl ester (100 nmol/disc)



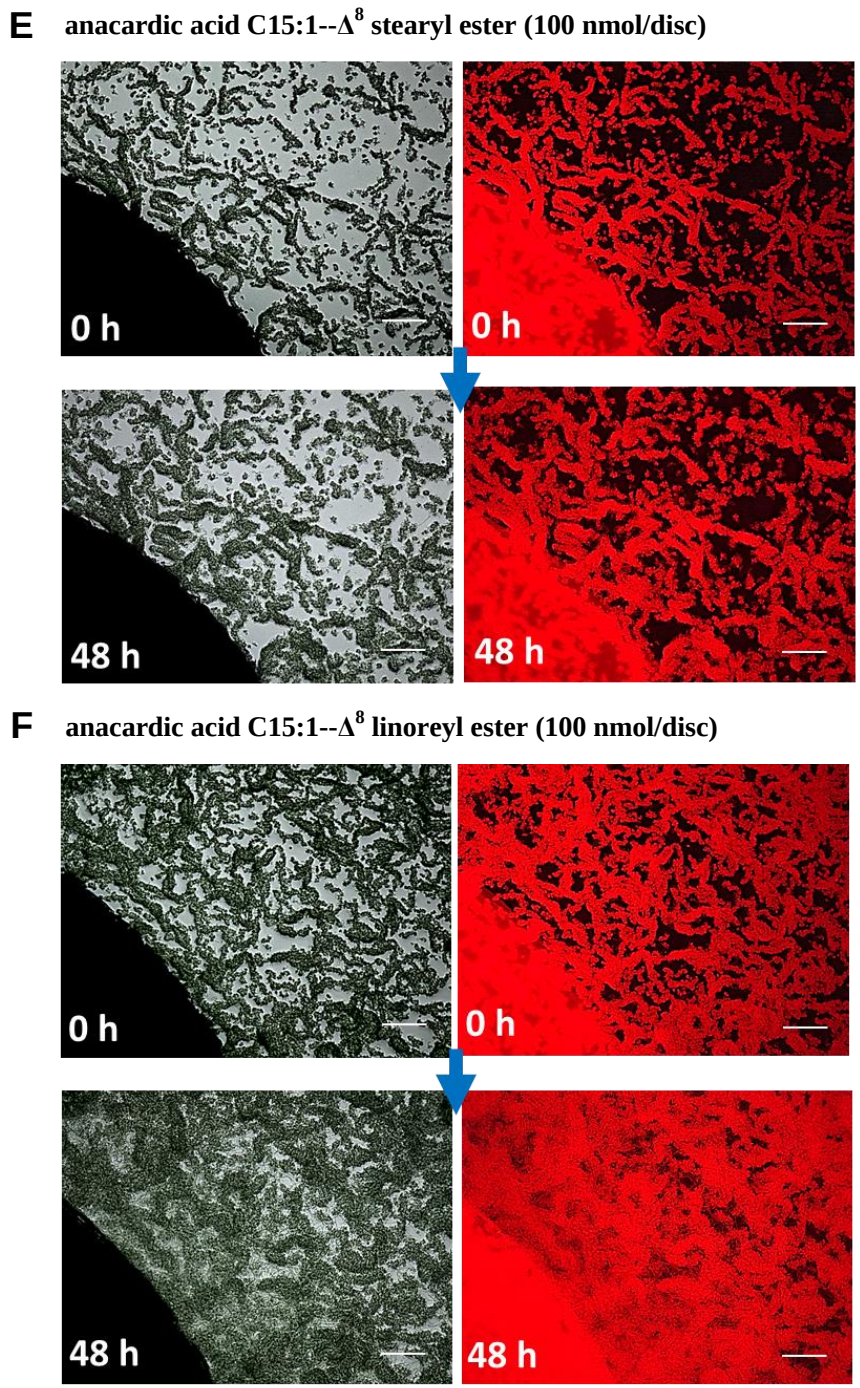


Fig. 5.13　アナカルド酸アルキルエステル誘導体添加に対する *Nostoc* sp.の応答の検鏡画像

それぞれをバイオアッセイ (sandwich assay) に使用し，48 時間後の 1.5%寒天培地上で菌体応答を定点観測している。菌体の自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を通して観測している。A) anacardic acid C15:1-Δ^8 hexyl ester, B) anacardic acid C15:1-Δ^8 octyl ester, C) anacardic acid C15:1-Δ^8 decyl ester, D) anacardic acid C15:1-Δ^8 dodecyl ester, E) anacardic acid C15:1-Δ^8 stearyl ester, F) anacardic acid C15:1-Δ^8 linoreyl ester, scale bar, 500 µm.

5.6 考察

5.6.1 PKC 賦活化との関連性

ジアシルグリセロール類はホスファチン酸などと結合したリン脂質として存在する生体膜構成成分として知られており, phospholipase C によりイノシトール三リン酸が切り出されることによって細胞内に遊離し，シグナル伝達因子として機能する。その代表的な生理活性機能が protein kinase C (PKC) の賦活化であり，それに連動したリン酸化カスケードシグナル伝達を通じて, 細胞増殖, 運動性獲得, 癌化などの生理活性機能を発現する (Takai *et al*., 1979; Kishimoto *et al*., 1980) 。

本研究で，PKC 賦活化剤として知られるホルボールエステル類である 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate や urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$ を用いて，PKC 賦活化物質が HIF 様活性示すかどうかを検証した。その結果，両化合物はいずれも HIF 様活性を示さず，PKC 賦活化に関わるシグナル伝達経路とホルモゴニア分化誘導との関連性は低いことが示唆された。このことから，ホルモゴニア分化誘導現象にはそれ特有の経路が存在し，DAG によって引き起こされることが示唆される。ホルモゴニア分化誘導現象に関連する発現遺伝子として *hrm A* (Cohen *et al*., 2002) や *sig H* (Campbell *et al*., 1998) が知られており, 本研究で明らかとなった HIF に曝露させてホルモゴニア分化を誘導したとき，これらの遺伝子発現変動を解析すること，さらにはこれらの遺伝子群の PKC 賦活化との関連性を再検証していく必要があるだろう。

5.6.2 アナカルド酸類とジアシルグリセロール類の構造活性相関

12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate や urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$ とは対照的に，接触毒性化合物であるアナカルド酸類は，高濃度では致死活性を示すものの，致死毒性の閾値を下回る低濃度においてはホルモゴニア分化誘導活性を示すことが明らかとなった。アナカルド酸類の HIF としての活性には，注目すべき点がある。その分子構造はジアシルグリセロール類と類似しており, HIF 様活性を示すためにはアルキル基の存在とフェノール性水酸基の重要性が示唆された (5.6.3 節参照) 。

しかしながら，モノアシルグリセロール類は HIF 様活性を全く示さないため，アナカルド酸自体が HIF 様活性を示す事実は，これらがアナログ化合物であることを否定しているようにも思える。そのため，アナカルド酸類とジアシルグリセロール類の各化合物処理によるホルモゴニアへ誘導された菌体で強く発現している遺伝子を比較してゆく必要があるであろう。また，ジアシルグリセロール類による PKC 賦活化に関わる活性部位はグリセロール骨格が関わっており，本研究で得られたアシル基に対する構造活性相関がみられたことから，むしろアシル基側が活性部位に関わっている可能性が高い。以上の事実は，ホル

モゴニア分化では PKC 賦活化とは別のシグナル伝達経路が働いている可能性を支持するものである。いずれにせよ，ホルモゴニア分化時に転写活性が上昇する遺伝子の特定は，ホルモゴニア分化機序を解明するために重要であると考えられる。

5.6.3　アナカルド酸類のシアノバクテリアに対する致死毒性

アナカルド酸類はホルモゴニア分化誘導活性を示す一方で 10 nmol/disc 以上の高濃度で処理すると，シアノバクテリアに対して致死毒性を示すことが明らかとなった。ウルシオールとの分子構造の比較から，アナカルド酸類のカルボキシ基が致死毒性に影響を与えている可能性が高いと予想し，これにアルキル基をエステルとして導入したアルキルエステル誘導体を用いて当該致死毒性に影響を与えるかどうか検証した。それぞれのアルキルエステル誘導体はいずれも毒性を失っており，アナカルド酸類のカルボキシ基がシアノバクテリアに対する致死性に強く影響を与えているという予想を支持する結果が得られた (Fig. 5.14) 。アナカルド酸類の HIF としての生理機能にはカルボキシ基の存在は重要であるが，同時に致死毒性を示すことから，イチョウが生育している土壌中に拡散しているアナカルド酸の濃度勾配に応じて，シアノバクテリアを含めた微生物群集に対するそれぞれ多様性に富んだ異なる生理活性を示すことを示唆している。

この現象が自然界においてどのように機能しているかは不明だが，これを説明する仮説を 1 つ提示する。地面に落下したイチョウ偽果がアナカルド酸を徐々に放出するに伴い，土壌中に拡散する低濃度のアナカルド酸類に単生窒素固定シアノバクテリアコロニーが反応し，これがホルモゴニアへ分化して土壌周辺に逃げるように拡散し，結果として周辺の土壌肥沃度を窒素供給，死菌としての有機物供給，金属元素保持などで改善し，イチョウ自身の生育環境を維持しているのかもしれない。これを検証するためには，イチョウ周辺の土壌に残留しているアナカルド酸量，シアノバクテリアの菌体量や土壌の有機物量などを測定していく必要がある。いずれにしても，アナカルド酸類に微生物の形態分化に関わる生理活性機能があるという新たな知見は，イチョウの生育戦略を理解するうえで極めて大きな意味を持つかもしれない。

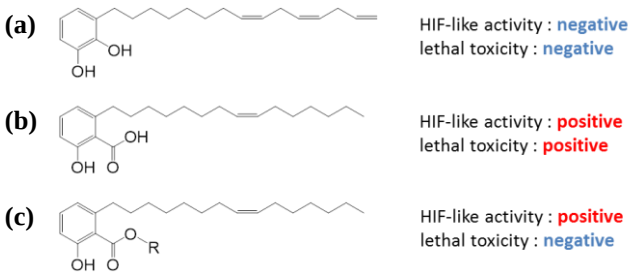


Fig. 5.14　ウルシオール，アナカルド酸，アナカルド酸アルコールエステルの化学構造の比較

(a) カテコール骨格を持つウルシオールは，シアノバクテリアの自家蛍光を消失させる致死毒性を持たないが，ホルモゴニア分化誘導活性を示さない。(b) サリチル酸骨格を持つアナカルド酸はホルモゴニア分化誘導活性を示す一方，高濃度では致死毒性を示す。(c) アナカルド酸アルコールエステル誘導体は，ホルモゴニア分化誘導活性を示しながらも，シアノバクテリアに対する致死毒性を示さない。

5.6.4　アナカルド酸類アルキルエステル誘導体の構造活性相関

アナカルド酸アルキルエステル誘導体はシアノバクテリアに対する HIF 様活性を示したが，導入したアルコールの鎖長および不飽和度に応じた構造活性相関を示した。C_6~C_{12} の飽和アルコールエステル誘導体をそれぞれ比較すると，C_8~C_{10} において最も高い HIF 様活性を示し，中鎖アルキルエステル誘導体で最も HIF として高い生理活性機能を発揮した。また，C_{18} 飽和アルコールを導入した anacardic acid C15:1-Δ^8 stearyl ester においてホルモゴニアの拡散能が著しく低下したことから，極度に伸長した長鎖アルキル側鎖を持つと，逆に HIF 様活性は大きく低下することが示唆された。

一方，C_{18} 不飽和アルコールエステル誘導体である anacardic acid C15:1-Δ^8 linoreyl ester は anacardic acid C15:1-Δ^8 linoreyl ester に比べて高いホルモゴニア分化誘導活性を示した。この結果は不飽和度の高い，つまり流動性の高いアルキル側鎖をもつアナカルド酸アルコールエステル誘導体の方がより高いホルモゴニア分化誘導活性を示すことを示唆している。不飽和アルコールは飽和アルコールと比べて融点が低く，生体膜との親和性も高いため，これが HIF としての生理機能の向上に寄与している一因であることが考えられる。これは，その初期作用点が生体膜上にあることを意味しているようにも思われることを指摘しておきたい。

5.6.5　アナカルド酸類アルキルエステル誘導体の利便性

本研究で化学合成したアナカルド酸アルキルエステル誘導体は，植物―シアノバクテリア間での共生系構築機序解明に関する研究推進のための新規化学ツールとして，以下の点

で期待される。

ジアシルグリセロール類はアシル基転移酵素やリパーゼ類により容易に加水分解され，化学構造自体を変化させるため，化学的に不安定であるという欠点を持つ。一方，アナカルド酸アルキルエステル誘導体はジアシルグリセロール類と比較してリパーゼ耐性が高く，より安定であるため，再現性良くホルモゴニア分化誘導を引き起こすことができる。したがって，必要時に化学的に誘導されたホルモゴニアを即座に供給することができ，分化誘導時における遺伝子発現の挙動を追跡することができる点で役立つ。しかし，ホルモゴニア分化誘導因子には複数の種類の異なる化合物が存在すると考えられており，本論文で述べてきたように，分化誘導に応じたシグナル伝達経路も 1 種類のみの経路ではない可能性が高い。これを明らかにするためにも，ジアシルグリセロール類とアナカルド酸アルキルエステル誘導体の分化誘導時の遺伝子発現の差異を検証していく必要があるだろう。

また，第三章でも述べたようにアナカルド酸アルキルエステル誘導体による分化誘導によって，ホルモゴニアはペーパーディスク周辺を拡散運動するだけではなく，ホルモゴニアのバンドルを形成しながら列をなした菌体が同一の方向へ運動する様子が観察されている。このため，アナカルド酸アルキルエステル誘導体には分化誘導だけではなく，走化性因子としての生理機能もある可能性がある。いくつかのジアシルグリセロール類には誘因性があると思われるが，アナカルド酸アルキルエステル類がジアシルグリセロール類のアナログ化合物である事実は，その意味で極めて重要な知見と考える。ホルモゴニア分化誘導後の現象を明らかにするためにも，本研究で得られた化学ツールを用いてホルモゴニア分化研究を行っていく意義は大きい。

5.7 第五章のまとめ

ジアシルグリセロール類の生理作用の 1 つである PKC 賦活化とホルモゴニア分化誘導との関連性を検討するため，PKC 賦活化剤として知られる天然物を選び，それらの HIF 様活性を検討した。12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate や urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$ はいずれも HIF 様活性を示さず，PKC 賦活化による細胞内シグナル伝達経路とは別の経路がホルモゴニア分化誘導に関与していることが示唆された。一方，アナカルド酸類は高濃度では致死活性を示すが，低濃度では HIF 様活性を示すことが確認された。このアナカルド酸類とジアシルグリセロール類との構造類似性から，アナカルド酸類のカルボキシ基にアルキルエステルを導入することによる HIF 様活性の向上が予想されたため，各種アナカルド酸アルキルエステルを化学合成し，それらの HIF 様活性との構造活性相関を検討した。その結果，アルキル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性は解消され HIF 様活性は残存もしくは亢進され，C_8~C_{10} 中鎖アルキルエステル誘導体で特に高い 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。

第六章　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

6.1　はじめに

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共生器官であるサンゴ状根 MeOH 抽出物から HIF の一つとして 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycerol を単離同定している。この化合物を含んだジアシルグリセロール類 (diacylglycerols, DAG) は多くの生物の細胞膜を構成する一次代謝産物であり，細胞内シグナル伝達経路においてプロテインキナーゼ C を賦活化する生理作用があることが知られている。しかし，DAG はほぼすべての生物に存在していることから，宿主植物の存在を認識する化学シグナル因子とは考えにくく，共生系を構築するための宿主特異的化学シグナル因子として関与しているものではないことが示唆される。ソテツ―シアノバクテリア共生系において，DAG によるホルモゴニア分化誘導作用は汎用性の高い生理活性であり，サンゴ状根近傍で運動を停止した *Nostoc* sp.を再度ホルモゴニアへ分化誘導させるという二次的なものであることが予想される。土壌中に広範囲に単生しているシアノバクテリアに対しては，宿主に特異的なホルモゴニア分化誘導因子が存在し，ソテツへの誘導を含め，主要な賦活化剤としてシアノバクテリアに作用するのではないかと考えられる (Fig. 6.1) 。

本研究において，ソテツ葉に宿主特異的な HIF の存在を予想した。葉は植物の同化組織の大半を占め，また，大量の二次代謝産物を産生する場でもあるため，化学シグナル因子の探索に外せない資材である。特に，枯死葉はクロロフィルなどの色素を失っていることから，種特異的二次代謝化合物群の探索が容易であるという点，周辺土壌に堆積し，その腐植への分解途上で放出され，表土に近い土壌中の単生シアノバクテリアに直接影響を与えることができうる点に注目した。以上の予想に基づき，本章ではホルモゴニア分化誘導因子の探索に取り組んだ。

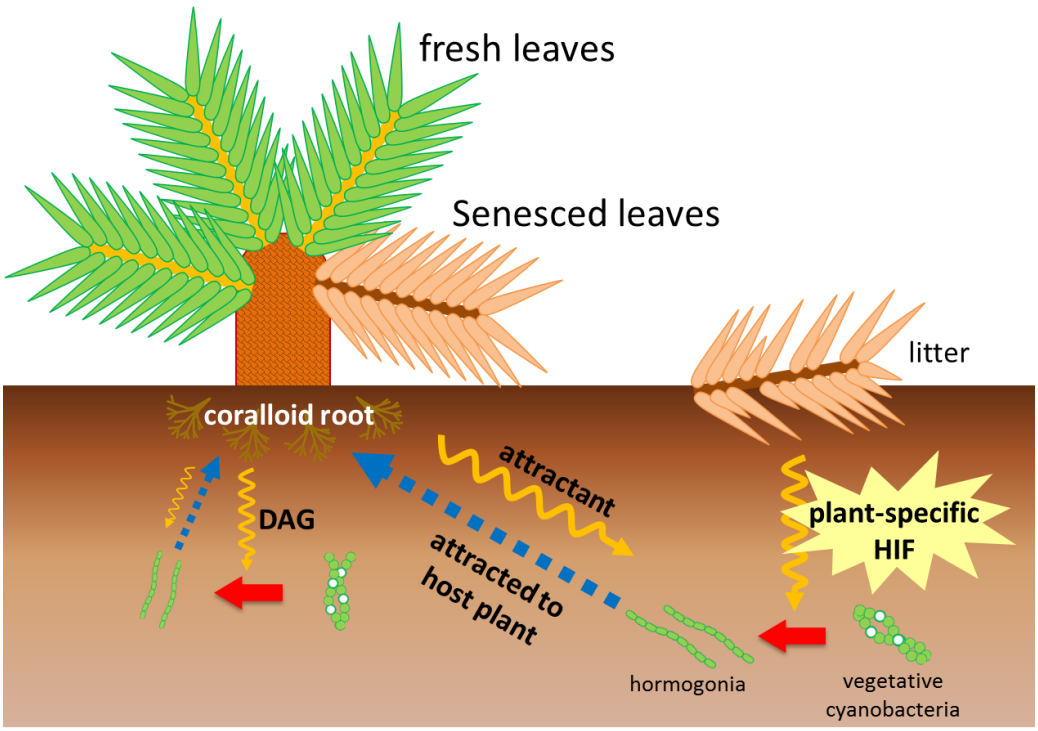


Fig. 6.1 ソテツ－シアノバクテリア共生系で予想される土壌中での化学シグナル因子の動態

葉に残留している HIF が表土に拡散し，広範囲の単生シアノバクテリアをホルモゴニアへと誘導する。ソテツ・サンゴ状根近傍で運動性を失い，再度糸状体として土壌中にとどまったシアノバクテリアは，根近傍であれば根から放出される DAG によって再度ホルモゴニアに分化誘導され，その放出源に誘引されるであろう。

6.2　HIF 探索に利用した植物資材

本研究で使用した植物資材は第二章で記載したソテツの枯死葉および葉裏滲出物である。予備試験として，ソテツ枯死葉 34.1 g（乾燥重量）を 1 L の MeOH に浸漬して 2 週間 4°C 下で抽出した。その後 MeOH 一回目抽出物を回収し，ロータリーエバポレーターで減圧濃縮して得られた濃縮物 1059 mg を MeOH に再溶解した。一方，概算でおよそ 150 枚の緑色成熟葉 (第二章 Fig. 2.3 参照) をぬぐい集めたソテツ葉裏滲出物を含んだ脱脂綿 (1 L のメジューム瓶 2 本分のコットンボール) を 1 L の EtOH に浸漬して回収した EtOH 溶液を濾過したろ液を，ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し，濃縮物 16 mg を得た。

6.3　ソテツ枯死葉抽出物およびソテツ葉裏面滲出物を用いた予備試験

ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物およびソテツ葉裏面滲出物をホルモゴニア分化誘導試験に供し, HIF 様活性の有無を検証した。ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物は 0.01 g 相当量 (0.31 mg) を, ソテツ葉裏面滲出物は 20 µg を sandwich assay での検定に供した。ペーパーディスク周辺での糸状体の菌体応答の検鏡画像を Fig. 6.2 に示す。いずれの処理区においてもホルモゴニアが周辺に拡散している様子が観察され，HIF の存在が示唆された。また，TLC での挙動も類似しており，同一の化合物が関与している可能性が高いと予想された。これらの試料から HIF の単離精製を試みようとしたが，葉裏滲出物の回収量は少なく，単離精製は困難であったため，以降はソテツ枯死葉に含まれる HIF の探索に取組み，以降の実験を行った。

A

sample	weight [mg]	test amount [µg/disc]	HIF-like activity
cycad litter MeOH extract	1059	310	++
cycad leaf exudate	16	20	+

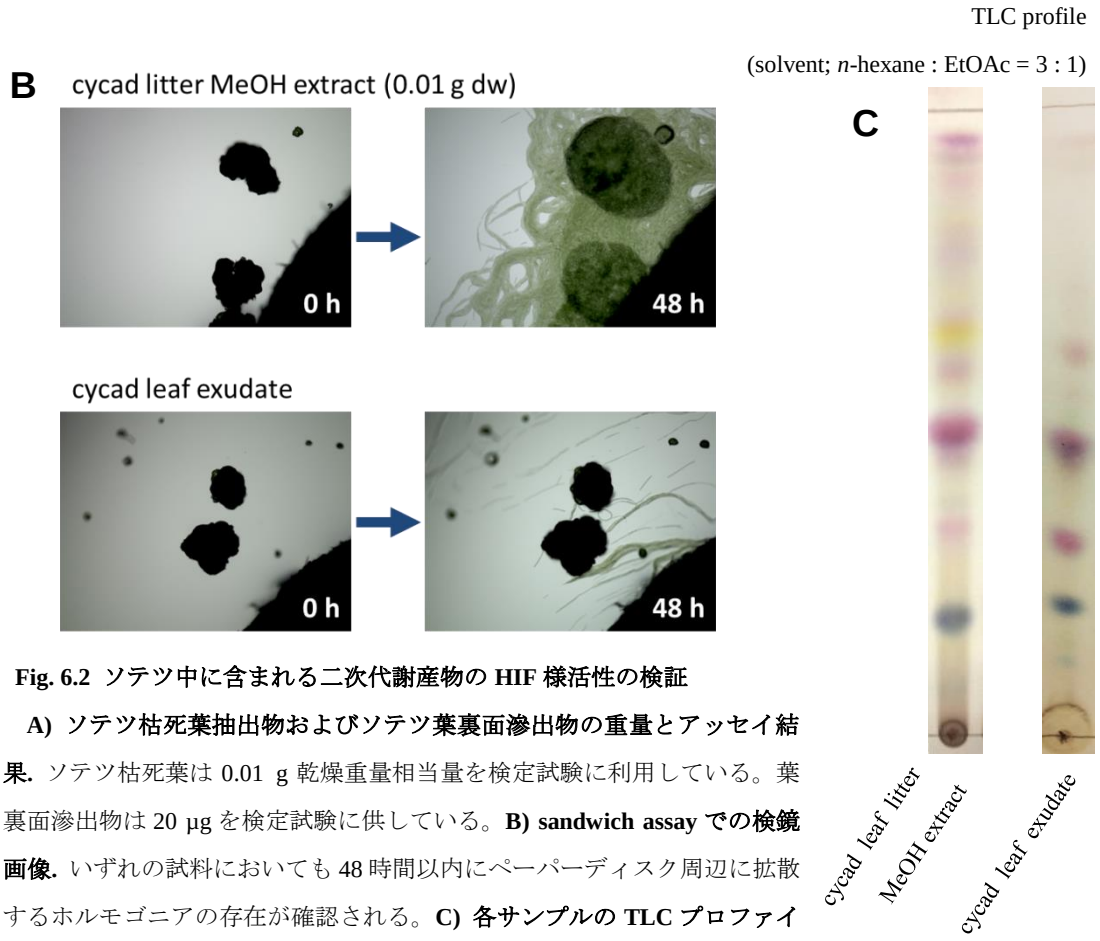


Fig. 6.2 ソテツ中に含まれる二次代謝産物の HIF 様活性の検証

A) ソテツ枯死葉抽出物およびソテツ葉裏面滲出物の重量とアッセイ結果. ソテツ枯死葉は 0.01 g 乾燥重量相当量を検定試験に利用している。葉裏面滲出物は 20 µg を検定試験に供している。**B) sandwich assay での検鏡画像.** いずれの試料においても 48 時間以内にペーパーディスク周辺に拡散するホルモゴニアの存在が確認される。**C) 各サンプルの TLC プロファイル.** *n*-hexane–EtOAc (3:1) を展開溶媒とした TLC に硫酸バニリンを噴霧。

6.4　ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物からの HIF の単離精製

予備試験により HIF の存在が示唆されたソテツ枯死葉から HIF 本体を単離精製するために，ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物中の活性本体を追跡した。ソテツ枯死葉 178 g（乾燥重量）を 6 L の MeOH に浸漬して 2 週間 4°C 下で抽出した。その後 MeOH 一回目抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮して得られた濃縮物 17 g を Fig. 6.2 に示す精製過程に従って分画，活性検定を行い，HIF 活性本体を追跡した。

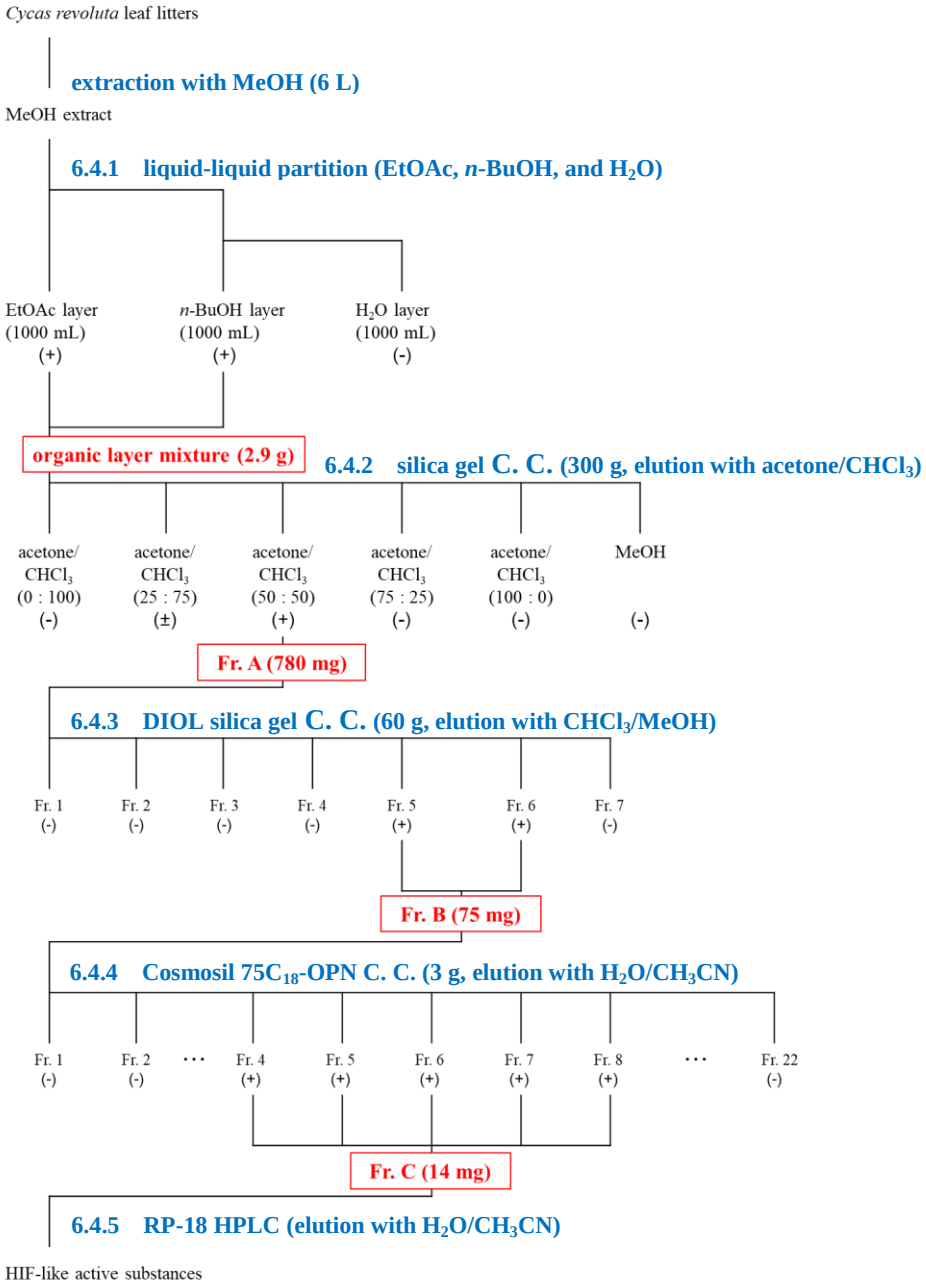


Fig. 6.3　ソテツ枯死葉由来 HIF の単離精製過程

各過程での HIF 様活性検定には gellan 1.2%ゲル化剤を使用。精製条件の詳細は各節を参照。

6.4.1　ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物の液液分配

ソテツ枯死葉 178 g（乾燥重量）を MeOH 6 L に浸漬して 2 週間 4°C 下で抽出した。その後 MeOH 一回目抽出液を回収し，ロータリーエバポレーターで減圧濃縮して得たタール状物質を水 1000 mL に再懸濁し，等量の EtOAc で 2 回液々分配により抽出した。有機層は無水硫酸ナトリウムで脱水後，濃縮乾固し，MeOH に再溶解した。残存した水層は等量の *n*-BuOH に転溶し，有機層のみを減圧濃縮して MeOH 溶液として回収した。各層をホルモゴニア分化誘導試験に供したところ，EtOAc 層および *n*-BuOH 層に HIF 様活性が示されたため，これらを 6.4.2 に示すシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。

6.4.2　カラムクロマトグラフィー１

6.4.1 で得られた有機層転溶物 (EtOAc 可溶部および *n*-BuOH 可溶部の混合物, 2.9 g) をセライトに吸着させ，溶媒を減圧下で除去後，これを順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画した。カラム条件を Table 6.1 に示す。各フラクションをホルモゴニア分化誘導試験 (sandwich assay) に供した結果，acetone 50%溶出画分に最も強い HIF 様活性が示されたため (Table 6.1，枠内の赤字部分)，これを Fr. A として次のカラム分画に供した。

Table 6.1　カラムクロマトグラフィー１の条件

sample weight	Silica gel	bed solvent	bed volume	column internal diameter × height
2900 mg	300 g	$CHCl_3$	675 mL	50 mm × 340 mm

Fraction		eluted solvent	elution volume	weight	HIF-like activity
1		$CHCl_3$-acetone = 100 : 0	700 mL	154 mg	-
2		$CHCl_3$-acetone = 75 : 25	700 mL	632 mg	±
3	**(Fr. A)**	**$CHCl_3$-acetone = 50 : 50**	**700 mL**	**780 mg**	**+**
4		$CHCl_3$-acetone = 25 : 75	700 mL	423 mg	-
5		$CHCl_3$-acetone = 0 : 100	700 mL	212 mg	-
6		MeOH	1500 mL	692 mg	-

6.4.3　カラムクロマトグラフィー２

6.4.2 で得られた acetone 50%溶出画分 (=Fr.A) 780 mg を DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画した。カラム条件を Table 6.2 に示す。各フラクションをホルモゴニア分化誘導試験 (sandwich assay) に供した結果, Table 6.2 に示す Fr. 5 (42 mg) および Fr. 6 (33 mg) に HIF 様活性が示されたため (Table 6.2，枠内の赤字部分)，これらを 1 つに混合したものを Fr.B として再分画に供した。

Table 6.2　カラムクロマトグラフィー２の条件

sample weight	DIOL Si.	bed solvent	bed volume	column internal diameter × height
780 mg	60 g	$CHCl_3$	135 mL	30 mm × 190 mm

Fraction		eluted solvent	elution volume	weight	HIF-like activity
A-1		$CHCl_3$–MeOH = 20 : 1	100 mL	14 mg	-
A-2		$CHCl_3$–MeOH = 20 : 1	20 mL	107 mg	-
A-3		$CHCl_3$–MeOH = 20 : 1	40 mL	140 mg	-
A-4		$CHCl_3$–MeOH = 20 : 1	100 mL	121 mg	-
A-5	**(Fr. B)**	**$CHCl_3$–MeOH = 20 : 1**	**100 mL**	**42 mg**	**+**
A-6		**$CHCl_3$–MeOH = 20 : 1**	**100 mL**	**33 mg**	**+**
A-7		MeOH	200 mL	314 mg	±

6.4.4　カラムクロマトグラフィー３

6.4.3 で得られた Fr.B (75 mg) を逆相カラムクロマトグラフィーによって再分画した。カラム条件を Table 6.3 に示す。各フラクションをホルモゴニア分化誘導試験 (sandwich assay) に供した結果，Table 6.3 に示す Fr. 4~Fr. 8 に HIF 様活性が現れたため (Table 6.3，枠内赤字部分)，これらを 1 つに混合したものを Fr.C (14 mg) として，活性本体の HPLC による最終精製に供した。

Table 6.3　カラムクロマトグラフィー３の条件

sample weight	Cosmosil	bed solvent	bed volume	column internal diameter × height
75 mg	3	H_2O	7 mL	15 mm × 40 mm

Fraction		eluted solvent (H_2O-CH_3CN)	elution volume	weight	HIF-like activity
B-1		2 : 1	10 mL	3 mg	-
B-2		2 : 1	10 mL	10 mg	-
B-3		2 : 1	10 mL	9 mg	-
B-4		**2 : 1**	**2 mL**	**2 mg**	**+**
B-5		**2 : 1**	**2 mL**	**2 mg**	**+**
B-6	**(Fr. C)**	**2 : 1**	**2 mL**	**3 mg**	**+**
B-7		**2 : 1**	**2 mL**	**3 mg**	**+**
B-8		**2 : 1**	**2 mL**	**4 mg**	**+**
B-9		2 : 1	2 mL	3 mg	-
B-10		2 : 1	2 mL	4 mg	-
B-11		2 : 1	2 mL	4 mg	-
B-12		2 : 1	2 mL	5 mg	-
B-13		2 : 1	2 mL	4 mg	-
B-14		2 : 1	2 mL	3 mg	-
B-15		2 : 1	2 mL	3 mg	-
B-16		2 : 1	2 mL	3 mg	-
B-17		2 : 1	2 mL	2 mg	-
B-18		2 : 1	2 mL	2 mg	-
B-19		2 : 1	2 mL	1 mg	-
B-20		2 : 1	2 mL	1 mg	-
B-21		2 : 1	2 mL	0 mg	-
B-22		2 : 1	10 mL	2 mg	-

6.4.5　逆相 HPLC による分画

6.3.4 で得られた分画物中に含まれる活性本体を特定するために，Fr. C 全量を逆相 HPLC に供して精製し，各主要ピークをホルモゴニア分化誘導試験 (sandwich assay) に供した。HPLC 条件を Fig. 6.4 に示す。検出は $UV_{220\,mm}$ の末端吸収帯によった。各ピークおよび主要ピーク間の溶出フラクションをそれぞれホルモゴニア分化誘導試験に供した結果，Fr.C-2，Fr. C-4 ならびに Fr. C-5 に HIF 様活性が示された。HIF 様活性が示された Fr. C-2 と Fr. C-4 をそれぞれ分取し，両化合物の化学構造の推定を試みた。

- Column : Wakosil ODS C_{18} column (7.5 mm diameter × 250 mm length) (Wako, Osaka, Japan)
- Eluent : H_2O–CH_3CN = 1:1 (v/v), 1.5 mL/min, isocratic
- Detection : UV (220 nm)

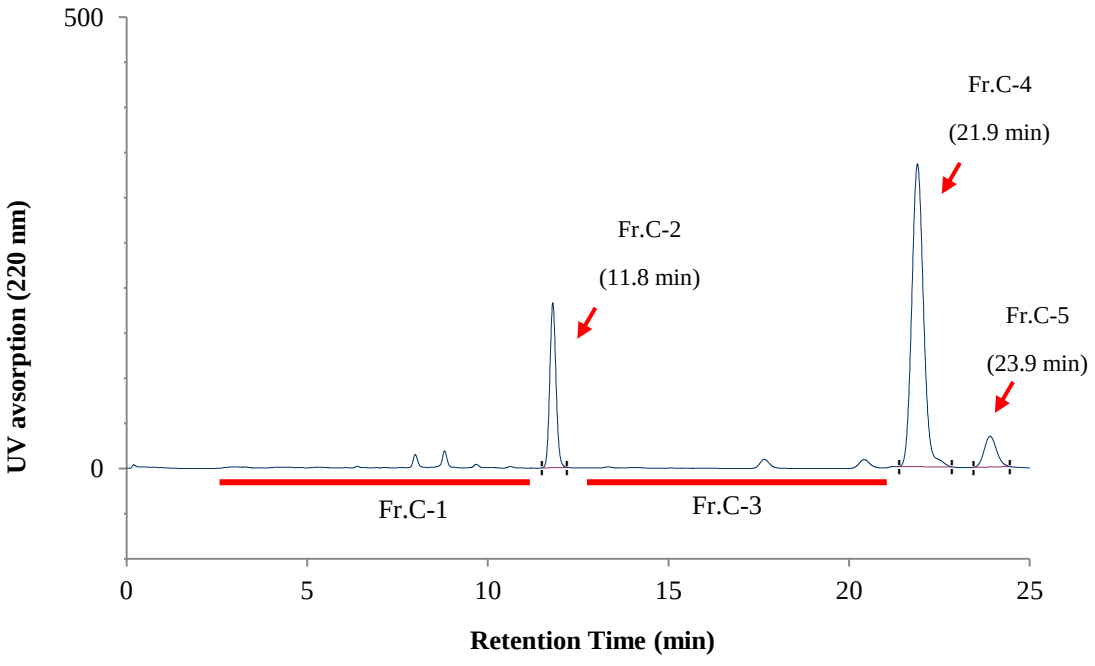
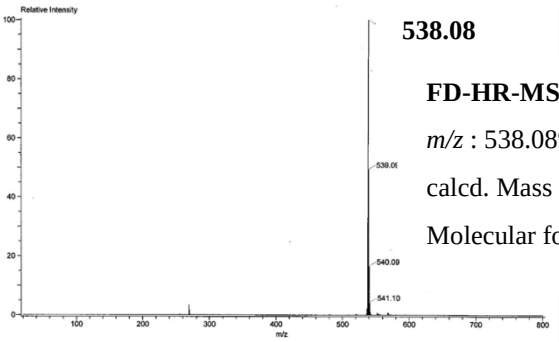


Fig. 6.4　Fr.C の HPLC 条件

6.4.6　活性本体の化学構造の推定

6.4.5 で分取した化合物の化学構造を推定するため，それぞれを FD-MS および FD-HR-MS スペクトル分析に供した。それぞれの FD-MS スペクトルを Fig. 6.5 に示す。いずれの化合物も炭素数 30 酸素数 10 の化合物であることが明らかとなった。また，これらの化合物を methanol-d_4 中で ^{1}H-NMR スペクトル分析に供した結果，多数のアロマティックプロトンシグナルが観測され，これらがともにポリフェノールであることが推測された。実際，両化合物とも TLC 上，Gibbs 試薬に対し，陽性（青色を呈する）を示した。^{1}H-NMR で測定される低磁場域のシグナルは，フラボノイドの A 環，B 環ならびに C 環に特徴的なものであることが強く示唆された (Fig.6.5) 。以上の結果から，活性本体はソテツに比較的大量に含まれるフラボノイド二量体（ビフラボン類，biflavones）であると推定された。この化合物の完全構造決定を試みるべく，二次元 NMR スペクトル分析を行おうとしたが，各精製過程およびバイオアッセイなどによる活性本体のロスのため，化合物を充分量調製することができなかった。また，測定溶媒には methanol-d_4 を用いていたが，フラボノイド A 環 5 位の水酸基と C 環上の 4 位カルボニル酸素原子の間に生じる分子内水素結合の存在が予測され，フラボノイド炭素の帰属に使えるため， acetone-d_6 に測定溶媒を変更し，活性本体の平面構造を決定する方針を立てた。以上の戦略に基づいて，このビフラボン類を大量に調製すべく，精製方法を改良して再度単離精製を試みた。

Fr.C-2



538.08

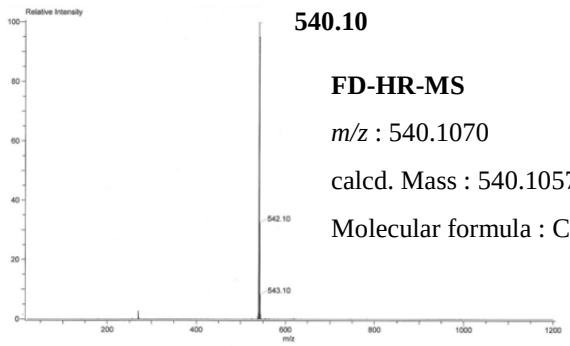
FD-HR-MS

m/z : 538.0892

calcd. Mass : 538.0900

Molecular formula : $C_{30}H_{18}O_{10}$

Fr.C-4



540.10

FD-HR-MS

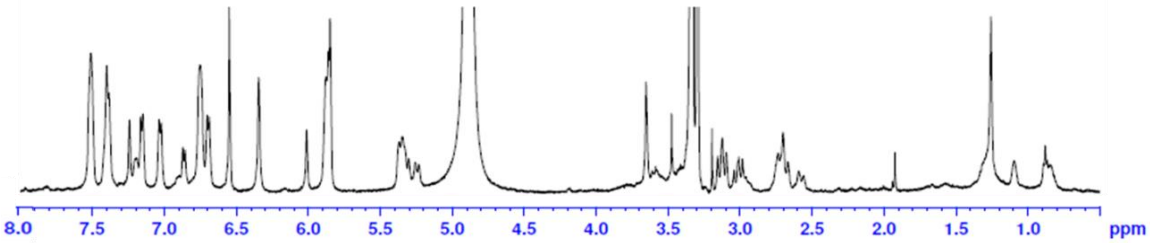
m/z : 540.1070

calcd. Mass : 540.1057

Molecular formula : $C_{30}H_{20}O_{10}$

Fig. 6.5 Fr.C-2, 4 の FD-MS スペクトル

Fr.C-2 (Formula : $C_{30}H_{18}O_{10}$)



Fr.C-4 (Formula : $C_{30}H_{20}O_{10}$)

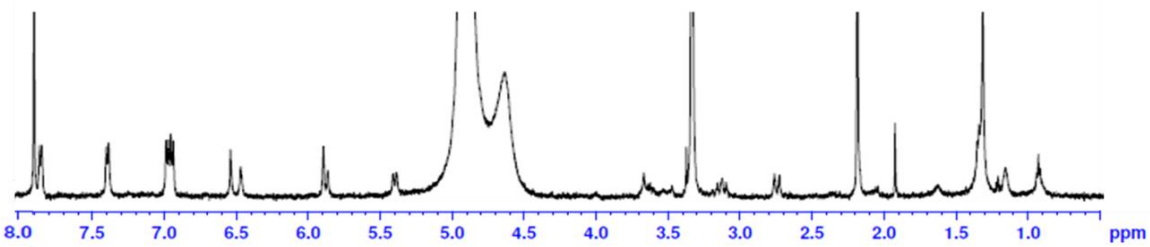


Fig. 6.6　Fr.C-2 および Fr. C-4 の ^{1}H-NMR スペクトル

Bruker AMX500 (500 MHz, methanol-d_4) で測定

6.5　ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物からのビフラボン類の単離精製

ソテツ枯死葉由来 HIF であるビフラボン類を高収率で回収するために，単離精製過程の改良を行った。ソテツ枯死葉 1.34 kg（乾燥重量）を 15 L の MeOH に浸漬して 2 週間 4°C 下で抽出した。その後 MeOH 一回目抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮して得られた濃縮物 32 g を Fig. 6.7 に示す精製過程に従って分画，活性検定を行い，HIF 活性本体を追跡した。

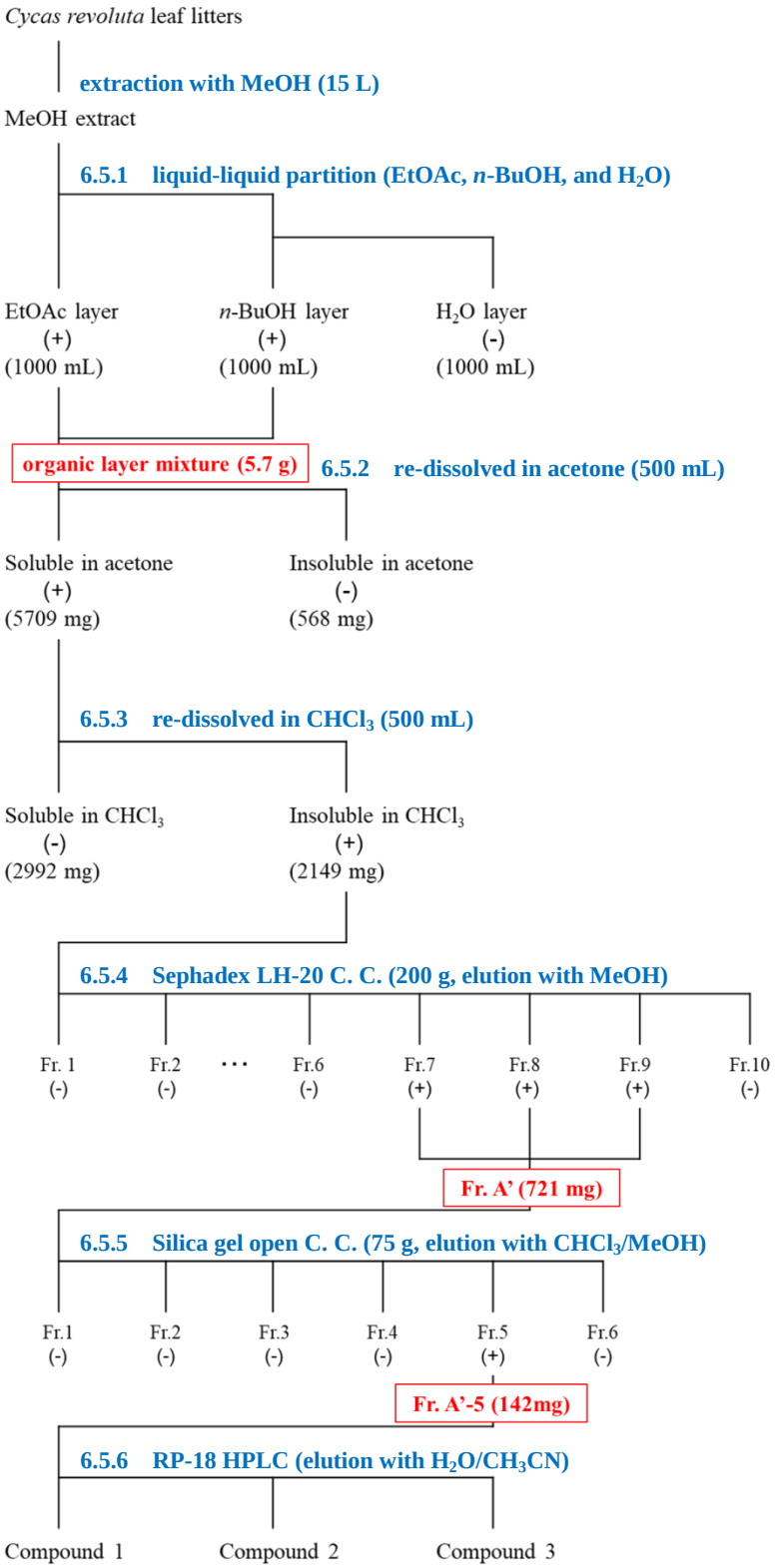


Fig. 6.7　ビフラボン類に着目したソテツ枯死葉由来 HIF の単離精製過程

精製条件の詳細は各節を参照。

6.5.1　ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物の液液分配

ソテツ枯死葉 1.34 kg（乾燥重量）を MeOH 15 L に浸漬して 2 週間 4°C 下で抽出した。その後 MeOH 一回目抽出液を回収し，ロータリーエバポレーターで減圧濃縮したタール状物質を水 1000 mL に再懸濁し，等量の EtOAc で 2 回液々分配した。有機層は，無水硫酸ナトリウムで脱水後，濃縮乾固し，MeOH に再溶解した。水層は等量の *n*-BuOH で抽出し，有機層を減圧濃縮物として回収した。

6.5.2　有機層の acetone 転溶

ビフラボン類は acetone への溶解性が比較的高い性質を利用して，タンニンや糖類などの水溶性化合物と大まかに分離することができる。この acetone 転溶によって以降のフラボン類の分画，精製はスムーズに運ぶことが多いとされる。そこで，6.5.1 で MeOH 抽出によって得られた有機層 (5.7 g) について acetone 転溶を試みた。減圧濃縮した MeOH 可溶タール状混合物を 500 mL の acetone に再懸濁し，マグネットスターラーを用いて 1 晩撹拌した。撹拌終了後，ろ紙を用いた濾過で得られた上清 5141 mg と acetone 不溶物 568 mg をそれぞれ 50 mL の MeOH に再溶解して回収した。それぞれ枯死葉 0.01 g 相当量をホルモゴニア分化誘導試験 (sandwich assay) に供した結果，ビフラボン類を含む acetone 可溶部に HIF 様活性が示されることを確認し，これを次に続く精製操作に供した。

6.5.3　acetone 可溶画分の $CHCl_3$ 転溶

ビフラボン類は $CHCl_3$ には不溶である性質を利用して, 6.5.2 で得られた acetone 転溶画分濃縮物の $CHCl_3$ 転溶を試みた。$CHCl_3$ 可溶物を含む acetone 可溶物全量を減圧濃縮し，得られた混合物 5.1 g を 500 mL の $CHCl_3$ に再懸濁し，マグネットスターラーを用いて 1 晩撹拌した。撹拌終了後，ろ紙を用いた濾過で得られた上清中の $CHCl_3$ 可溶物 2992 mg と不溶物 2149 mg をそれぞれ 50 mL の MeOH に再溶解して回収した。それぞれをホルモゴニア分化誘導試験 (sandwich assay) に供した結果，ビフラボン類を含む $CHCl_3$ 不溶物にのみ HIF 様活性が示されることを確認したため，これを次に続く精製操作に供した。

6.5.4　$CHCl_3$ 不溶沈殿のゲル濾過クロマトグラフィー

6.5.3 で得られた $CHCl_3$ 不溶物 (2149 mg) を Sephadex LH-20 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供し，ビフラボン類の分画精製を試みた。カラムクロマトグラフィーの条件を Table 6.4 に示す。各フラクションを回収し，ホルモゴニア分化誘導試験に供した結果，Fr. 7～Fr. 9 に HIF 様活性が示されたことを確認し (Table 6.4，枠内赤字部分)，これらフラクションの混合物 721 mg を Fr. A'として次のシリカゲルカラム分画に供した。

Table 6.4　ゲル濾過クロマトグラフィーの条件

sample weight	Sephadex LH-20	bed solvent	bed volume	column internal diameter × height
2149 mg	200 g	MeOH	300 mL	40 mm × 240 mm

Fraction	eluted solvent	elution volume	weight	HIF-like activity
1	MeOH	300 mL	97 mg	-
2	MeOH	300 mL	147 mg	-
3	MeOH	300 mL	315 mg	-
4	MeOH	300 mL	332 mg	-
5	MeOH	300 mL	215 mg	-
6	MeOH	300 mL	196 mg	-
7	**MeOH**	**300 mL**	**287 mg**	**+**
8 (Fr. A')	**MeOH**	**300 mL**	**221 mg**	**+**
9	**MeOH**	**300 mL**	**213 mg**	**+**
10	MeOH	300 mL	124 mg	-

6.5.5　シリカゲルカラムクロマトグラフィー

6.5.4 で得られた分画物 721 mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して，活性本体の分画を試みた。実施したカラムクロマトグラフィー条件を Table 6.5 に示す。各フラクションを回収し，ホルモゴニア分化誘導試験に供した結果，Fr. 5 (142 mg) に HIF 様活性が示されたことを確認し (Table 6.5，枠内赤字部分)，これを単離精製すべく，逆相 HPLC に供した。

Table 6.5　シリカゲルカラムクロマトグラフィーの条件

sample weight	Silica gel	bed solvent	bed volume	column internal diameter × height
721 mg	75 g	$CHCl_3$	150 mL	20 mm × 150 mm

Fraction	eluted solvent ($CHCl_3$-MeOH)	elution volume	weight	HIF-like activity
A'-1	8 : 1	150 mL	162 mg	-
A'-2	8 : 1	150 mL	213 mg	-
A'-3	8 : 1	150 mL	107 mg	-
A'-4	8 : 1	150 mL	46 mg	-
A'-5 (Fr. A'-5)	**8 : 1**	**150 mL**	**142 mg**	**+**
A'-6	8 : 1	300 mL	51 mg	-

6.5.6　逆相 HPLC による精製

6.5.5 で得られた分画物 (Fr. A'-5) 142 mg のうち 0.1 mg をセミ分取 HPLC に供した結果, 3 種類のビフラボン類を示すピークが観測された。HPLC の条件を Fig. 6.8 に示す。Fig. 6.4 で示した HPLC パターンとの違いには，抽出および分画方法の違いが反映されていると思われた。各主要ピークのフラクションを回収し，ホルモゴニア分化誘導試験 (sandwich assay) に供した結果，全ての主要ピークに HIF 様活性が示されたことを確認し，それぞれのピークをセミ分取 HPLC で単離精製した。単離精製後の各化合物の HPLC プロファイルを Fig. 6.9 に示す。

- Column : Wakosil ODS C_{18} column (7.5 mm diameter × 250 mm length) (Wako, Osaka, Japan)
- Eluent : CH_3CN–H_2O = 1:1 (v/v), 1.5 mL/min, isocratic
- Detection : UV (220 nm)

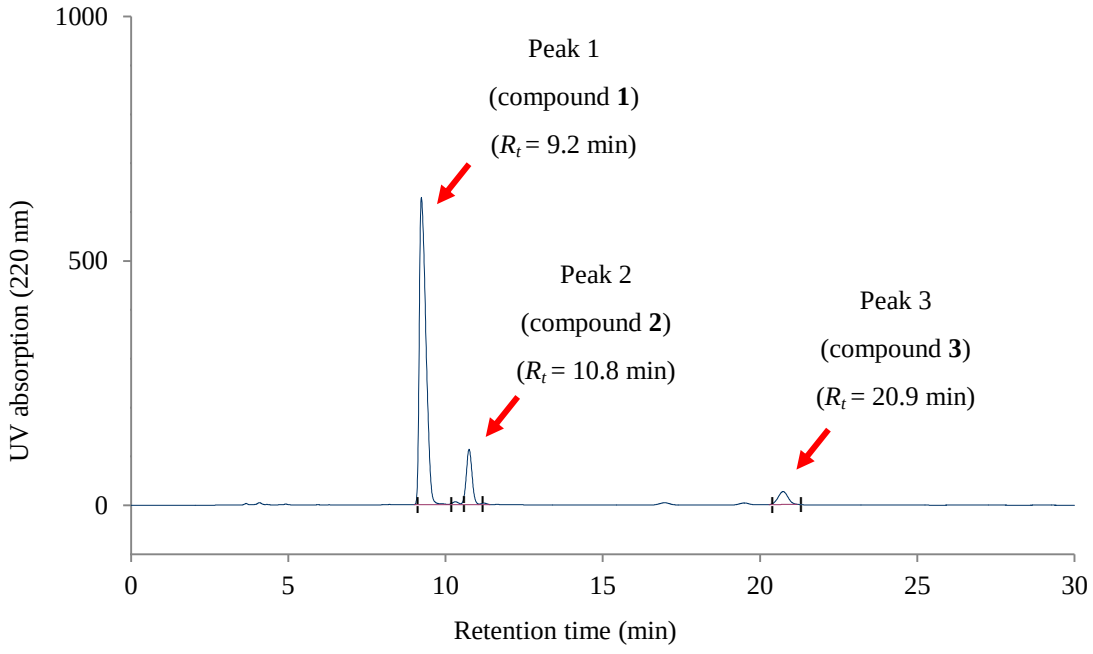


Fig. 6.8　ソテツ枯死葉から単離精製したビフラボン類の HPLC プロファイル

- Column : Wakosil ODS C_{18} column (7.5 mm diameter × 250 mm length) (Wako, Osaka, Japan)
- Eluent : CH_3CN–H_2O = 1:1 (v/v), 1.0 mL/min, isocratic
- Detection : UV (220 nm)

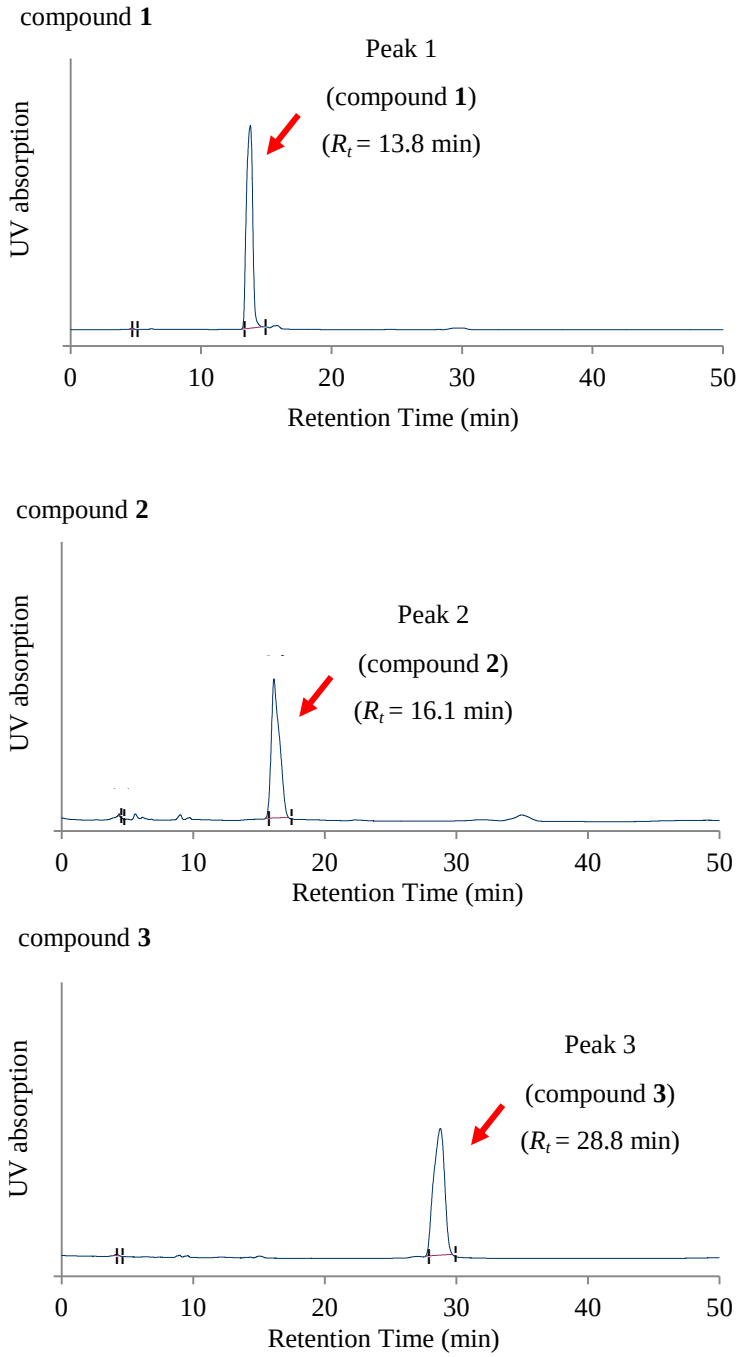
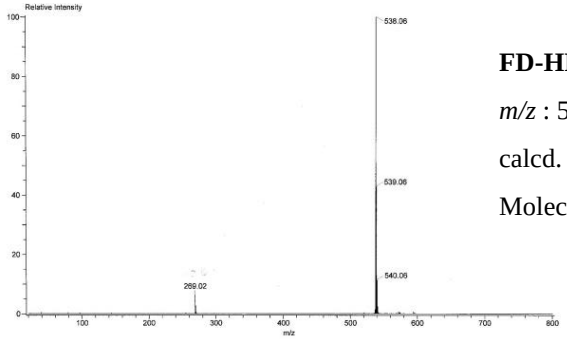


Fig. 6.9　単離精製後の各ビフラボン類の HPLC プロファイル

6.5.7　活性本体の化学構造決定

6.5.6 で分取した各化合物の化学構造を推定するため，それぞれの化合物を FD-MS スペクトル分析に供した。それぞれの FD-MS スペクトルを Fig. 6.10 に示す。FD-HR-MS スペクトルではそれぞれ *m/z* 538.0645, *m/z* 540.0943, ならびに *m/z* 540.1263 が得られ，各組成式 $C_{30}H_{18}O_{10}$，$C_{30}H_{20}O_{10}$，$C_{30}H_{20}O_{10}$ を与えた。これらは全て炭素数 30 の化合物であり，相互に類似した骨格をもち，不飽和度はそれぞれ 22, 21, 21 である。この高度な共鳴系と，分子内に存在する酸素原子の数，さらには Gibbs 試薬に対する呈色から，これら 3 化合物は全てビフラボノイドではないかと推測した。

compound **1** (*m/z* 538.06)



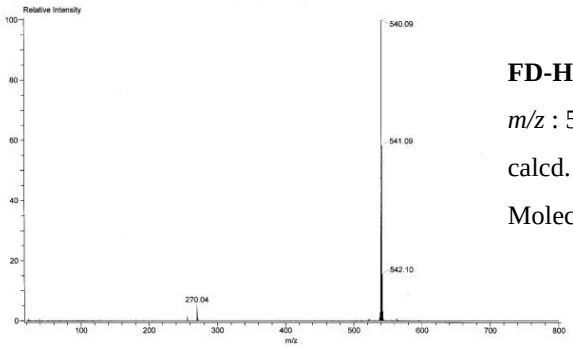
FD-HR-MS

m/z : 538.0645

calcd. Mass : 538.0900

Molecular formula : $C_{30}H_{18}O_{10}$

compound **2** (*m/z* 540.09)



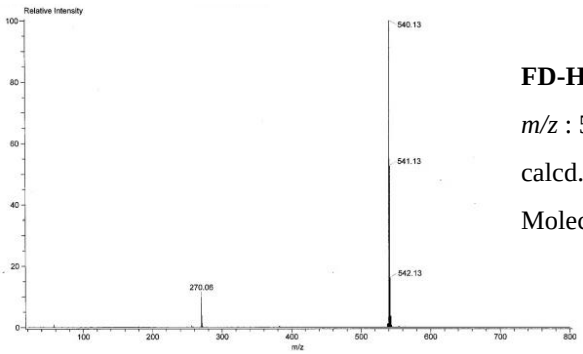
FD-HR-MS

m/z : 540.0943

calcd. Mass : 540.1057

Molecular formula : $C_{30}H_{20}O_{10}$

compound **3** (*m/z* 540.13)



FD-HR-MS

m/z : 540.1263

calcd. Mass : 540.1057

Molecular formula : $C_{30}H_{20}O_{10}$

Fig. 6.10　各ビフラボン類の FD-MS スペクトル

6.5.7.1 Compound 1 の化学構造決定

二次元 NMR 測定を含め, compound **1** の ^{1}H-NMR スペクトルおよび ^{13}C-NMR スペクトル, ならびに同定した compound **1** の化学構造を Fig. 6.11 に, 二次元 NMR スペクトルを Fig. 6.12 に示す。測定溶媒に acetone-d_6 を用いることによって，A 環 5 位のフェノール性水酸基と C 環 4 位のカルボニル基を構成する酸素原子間で形成される 2 個分の分子内水素結合性プロトンシグナル（δ_H 13.09 (1H, s)と δ_H 12.93 (1H, s)）を観測した。これらのシグナルの検出と，他の低磁場域のみに観測されたアロマティックプロトンシグナルのパターンから，フラボノイド構造が含まれると容易に推測できた。そこで，上記の分子内水素結合性プロトン，それぞれのシグナルから HMBC 相関によってフラボノイド骨格を前提とした C-6 位と C-10 位の骨格位置に帰属できる炭素シグナルの帰属を試みた。その結果，両分子内水素結合性プロトンシグナルからスリーボンド（H-C-C-C）で相関を示す安定同位体炭素 ^{13}C シグナル（以下，単に炭素シグナルと呼ぶ）を，δ_H 13.09 では δ_C 99.80 (6-CH) と 105.39 (10-C) に，δ_H 12.93 では δ_C 99.73 (6-CH) と 105.25 (10-C) に，それぞれ見出すことができた。特に δ_C 105 ppm 付近の炭素シグナルは，典型的なフラボン骨格 (5,7,4’-trihydroxyflavone や 5,7,4’-trihydroxyflavanone 骨格) の 10 位炭素に特徴的なケミカルシフト値に合致することから，compound **1** はフラボン 2 量体であることが強く支持された。

フラボンに特徴的な C-3 位オレフィニックプロトンシグナルは，通常，α 位の 4 位カルボニル基によって高磁場シフトし，2 位炭素への B-環置換効果によって低磁場シフトする。その結果，フラボン骨格の 3 位オレフィニックプロトンシグナルは，δ_H 6.5 よりもやや低磁場側に，カップリングを持たないシングレットシグナルとして観測される。実際, compound **1** の ^{1}H-NMR スペクトルでは，δ_H 6.60 と 6.67 にシングレットシグナルとして観測される。HMQC 相関により，これらのプロトン（δ_H 6.60 と 6.67）はそれぞれ δ_C103.66 と 104.19 の CH 炭素シグナルとの相関を示し，これらのプロトンと直に結合している C-3 位の CH 炭素のものと帰属された。

また，仮に compound **1** がフラボン 2 量体骨格を有していれば，上述したシングレットのオレフィンプロトンシグナル（δ_H 6.60 と 6.67）から HMBC ツーボンド相関により，それぞれ 4 位のカルボニル炭素の帰属が可能になる。その相関シグナルから，δ_C 183.41 と 183.03 ppm の炭素シグナルが, それぞれ δ_C 103.66 と 104.19 の CH オレフィン炭素の α-位（C-4 位）に位置するカルボニル炭素に帰属されることが分かった。さらには，HMBC スリーボンド相関により，δ_H 6.60 と 6.67 はそれぞれ δ_C 105.39, 105.25 に出現する C-10 水素無置換炭素シグナルとの相関を示した。これらの相関シグナルの検出によって，二つのフラボンユニットについて C-5-OH から C-3-H までの部分構造で炭素-水素が帰属できた（Table 6.6 参照）。

一方，HH-COSY 相関シグナルから，B 環プロトンを示す 5 つのシグナル (δ_H 8.07 (1H, s), 7.97 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.59 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.19 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.77 (2H, d, J = 8.3 Hz)) は, 2 つの等価のプロトンが 2 対, 非等価のプロトンが 3 つ存在することが示された。HMBC

解析によって，C-3 位のプロトンシグナルから C-2 位炭素および B 環 C -1 位の炭素シグナルが帰属され（δ_H 6.60 と 6.67 に対し，それぞれ δ_C 123.16, 123.23），δ_H 13.09 側の C-5-OH から相関をとる炭素のシグナル δ_C 123.16 が C-1’炭素に帰属された。この 1’-位炭素シグナルと HMBC 相関を示し，それぞれの対で磁気的等価性，つまり B 環 1,4-二置換体に特徴的なオルト・メタダブルダブレット様シグナルの形状を示す δ_H 7.59 (2H, d, *J* = 8.4 Hz) (C-2’位と 6’位), δ_H 6.77 (2H, d, *J* = 8.3 Hz) (C-3’位と 5’位) の各プロトンシグナルに HMBC 相関をもつ炭素シグナル δ_C 161.83 が B 環 4’-位の炭素に帰属された。フラットな構造をとるとされるフラボン誘導体では，C-2’位と 6’位のプロトンシグナルは C 環の 2 位と 3 位の共役二重結合のデシールディング領域にあるため, C-3’位と 5’位のプロトンシグナルに比べ大きく低磁場シフトすることから，この帰属は 4’-位のフェノール性水酸基が遊離 OH であることを強く示唆する結果となった。また，C 環を形成する 2-位，3-位，4-位の炭素シグナルは，10-位の炭素シグナルを含めて, 単量体基本骨格である apigenin のケミカルシフトとほとんど差異がなく，従って，もう一つのフラボンユニットは，A 環から直接，あるいは酸素を介して結合していると考えられた。

A 環の C-6 プロトンシグナルは，HMQC 相関により直ちに δ_H 6.41 (1H, br s, H-6’’)であることが確認できた。このプロトンシグナルからの HMBC 相関によって 8-位炭素のシグナルは δ_C 104.49 に認められ，このケミカルシフト値は，apigenin などに見られる通常の 8 位炭素シグナルのケミカルシフト値よりも低磁場側にあり，この周辺にもう一方のユニットとの結合部位が存在すると考えられた。もう一方のフラボンユニットでは B 環のプロトンシグナルは 1,2,4-置換ベンゼンに特徴的な, オルトカップリングしたプロトンシグナル δ_H 8.07 (1H, s, H-2’’’), オルト-メタカップリングしたプロトンシグナル 7.97 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6’’’), ならびにメタカップリンしたプロトンシグナル 7.19 (1H, d, *J* = 8.5 Hz , H-5’) のセットが観測され，δ_H 8.07 のオルトカップリングシグナルと 7.97 のオルト-メタカップリングシグナルが大きく低磁場シフトしていることから，これらを 2’’’-位および 6’’’-位のプロトンシグナルと帰属した。従って，3’’’-位炭素に置換基が結合することになり，この 3’’’-位炭素のシグナルは HMBC 相関から δ_C 120.95 と帰属した。

HMBC および HMQC で帰属できない唯一の炭素シグナル δ_C 162.80 を C-9 位に無理なく帰属させると, 残った唯一の炭素シグナル δ_C 104.5 は酸素とは結合しない C-8 位炭素に帰属させることになる。その結果，二つのフラボンユニットは，一方のフラボン A 環 8-位炭素ともう一方の B 環 3’’’-位の間の炭素炭素間共有結合によって二量体を形成していると結論づけた。この化合物はソテツ葉から単離された報告がある既知化合物，amentoflavone であった。炭素シグナルのケミカルシフト値は amentoflavone の文献値とほぼ一致した (Kenneth *et al*., 1987) 。Table 6.6 に amentoflavone 文献値，その帰属，HIF として得た compound **1** の実測データ，ならびに比較のための apigenin (5,7,4’-trihydroxyflavone) と narigenin (5,7,4’-truhydroxyflavanone) の ^{13}C-NMR データを Table 6.6 に示す。

6.5.7.2　Compound 2 の化学構造決定

二次元 NMR 測定を含め, compound **2** の ^{1}H-NMR スペクトルおよび ^{13}C-NMR スペクトル, ならびに同定した compound **2** の化学構造を Fig. 6.13 に, 二次元 NMR スペクトルを Fig. 6.14 に示す。測定溶媒に acetone-d_6 を用いることによって，A 環 5 位のフェノール性水酸基と C 環 4 位のカルボニル基を構成する酸素原子間で形成される 2 個分の分子内水素結合性プロトンシグナル（δ_H 13.14 (1H, s)と δ_H 12.16 (1H, s)）を観測した。これらのシグナルの検出と，他の低磁場域のみに観測されたアロマティックプロトンシグナルのパターンから，compound **1** 同様，フラボノイド構造の存在が容易に推測できた。そこで，compound **1** での HMBC 相関をなぞり，上記の分子内水素結合性プロトン，それぞれのシグナルから HMBC 相関によってフラボノイド骨格を前提とした C-6 位と C-10 位の骨格位置に帰属できる炭素シグナルの帰属を試みた。注目すべきは，一方の分子内水素結合性プロトンシグナルが compound **1** よりも 1 ppm 近く，高磁場側にシフトしている点であった。これは C-5-OH の水素結合性プロトンが受けるデシールディング効果がフラボンに比べて低下するフラバノン（フラボン骨格の 2, 3-位の二重結合部分が水素添加によって炭素-炭素単結合になっているため，カルボニル基の平面構造が崩れ，デシールディング効果がやや弱くなる）と考えた。

その結果，両分子内水素結合性プロトンシグナルからスリーボンドで相関を示す炭素シグナルを，δ_H 13.14 では δ_C 100.22 (6-CH) と 105.00 (10-C) に，δ_H 12.15 では δ_C 96.87 (6''-CH) と 102.98 (10''-C) に，それぞれ見出すことができた。特に δ_C 105 ppm 付近の炭素シグナルは，化合物 **1** との比較から，典型的なフラボン骨格 (5,7,4'-trihydroxyflavone) の 10-位炭素に，103 ppm 付近のシグナルは 5,7,4'-trihydroxyflavanone 骨格の 10-位炭素に特徴として現れる，フラボン骨格よりも 2 ppm ほど高磁場側の水素無置換炭素シグナルに合致することから，compound **2** はフラボンーフラバノン 2 量体であることが強く推測された。

Compound **2** では，compound **1** 同様，δ_H 13.14 のプロトンシグナルを基点にした HMBC 相関で 8 位水素が置換された apigenin 骨格の存在が明らかになった。一方，フラバノン C 環に特徴的なメチンの H-2''シグナル δ_H 5.51 (1H, dd, J = 2.4 Hz) およびジェミナルカップリング（J= 13.0 Hz）した一対のメチレンプロトンシグナル，δ_H 3.26 (1H, overwrapped with $CD_2\underline{H}OD$, H_a-3'') と 2.75 (2H, dd, J = 3.0, 18.4 Hz, H_b-3'') が確認されるが，このうち δ_H 2.75 のシグナルは HMBC 解析で 4 位カルボニル炭素 δ_H 197.16 ppm と相関が認められた。また，HSQC 相関により δ_C 80.13 と 43.71 ppm に観測される炭素シグナルがフラバノン骨格 C 環の 2 位および 3 位にそれぞれ帰属された。さらにこのフラバノン骨格では，H-2''メチンプロトンシグナル δ_H 5.51 からの HMBC 相関により B 環炭素を全て帰属することができた。これらの解析の結果，compound **2** は compound **1** と同じ B 環の 3 置換様式（3 位炭素-炭素結合および 4 位フェノール性 OH 基置換）を持つことが明らかになった（Table 6.6）。従って，compound **2** は apigenin の A 環 8 位に narigenin ユニットが 3'位で炭素-炭素共有結合したフ

ラボン-フラバノン 2 量体と同定した。その炭素シグナルの帰属は，フラバノン骨格の C 環を除いて，compound **1** と良く一致した（Table 6.6）。この化合物はソテツ葉から単離された報告がある既知化合物，2,3-dihydroamentoflavone であった。炭素シグナルのケミカルシフト値は 2,3-dihydroamentoflavone の文献値とほぼ一致した (Kenneth *et al.*, 1987) 。2,3-dihydroamentoflavone 文献値，その帰属，HIF として得た compound **1** の実測データ，ならびに比較のための apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavone) と narigenin (5,7,4'-truhydroxy-flavanone) の ^{13}C-NMR データを Table 6.6 に示す。

6.5.7.2 Compound 3 の化学構造決定

二次元 NMR 測定を含め, compound **3** の ^{1}H-NMR スペクトルおよび ^{13}C-NMR スペクトル，ならびに同定した compound **3** の化学構造を Fig. 6.15 に, 二次元 NMR スペクトルを Fig. 6.16 に示す。測定溶媒に acetone-d_6 を用いることによって，A 環 5 位のフェノール性水酸基と C 環 4 位のカルボニル基を構成する酸素原子間で形成される 2 個分の分子内水素結合性プロトンシグナル（δ_H 13.24 (1H, s)と δ_H 12.15 (1H, s)）を観測した。これらのシグナルの検出と，他の低磁場域のみに観測されたアロマティックプロトンシグナルのパターンから，compound **1**, **2** 同様，フラボノイド構造の存在が容易に推測できた。そこで，compound **1**, **2** での HMBC 相関をなぞり，上記の分子内水素結合性プロトン，それぞれのシグナルから HMBC 相関によってフラボノイド骨格を前提とした C-6 位と C-10 位の骨格位置に帰属できる炭素シグナルの帰属を試みた。一方の分子内水素結合性プロトンシグナルは compound **2** 同様，1 ppm 近く，高磁場側にシフトしており，これは C-5-OH の水素結合性プロトンが受けるデシールディング効果がフラボンに比べて低下するフラバノンと考えた。その結果，両分子内水素結合性プロトンシグナルからスリーボンドで相関を示す炭素シグナルを，δ_H 13.24 では δ_C 126.38 (6-CH) と 105.74 (10-C) に，δ_H 12.15 では δ_C 96.86 (6''-CH) と 103.17 (10''-C) に, それぞれ見出すことができた。特に δ_C 105 ppm 付近の炭素シグナルは, compound **1**, **2** との比較から, 典型的なフラボン骨格 (5,7,4'-trihydroxyflavone) の 10-位炭素に, 103 ppm 付近のシグナルは 5,7,4'-trihydroxyflavanone 骨格の 10-位炭素に特徴として現れる, フラボン骨格よりも 2 ppm ほど高磁場側の水素無置換炭素シグナルに合致することから, compound **3** はフラボンーフラバノン 2 量体であることが強く推測された。また，6 位炭素のケミカルシフト値 (δ_C 126.38) は，apigenin などに見られる通常の 6 位炭素シグナルのケミカルシフト値よりも低磁場側にあり，この周辺にもう一方のユニットとの結合部位が存在すると考えられた。

Compound **3** では，C-5'-OH (δ_H 13.24) のプロトンシグナルを基点にした HMBC 相関で 6 位水素が置換された apigenin 骨格の存在が明らかになった。もう一方のフラバノン骨格では, C-5'''-OH (δ_H 12.15) および H-2'' メチンプロトンシグナル δ_H 5.51 (dd, J = 2.6 Hz, 12.7 Hz) からの HMBC 相関によりフラバノンユニットの炭素を全て帰属することができ，naringenin

骨格の存在が明らかになった。Compound **3** の B 環のプロトンシグナル H-2’’’(δ_H 7.48), 3’’’ (δ_H 6.98), 5’’’ (δ_H 6.98), 6’’’ (δ_H 7.48) を naringenin の B 環プロトンシグナルの文献値と比較すると (Fig. 6.17) ， compound **3** のフラバノン B 環のプロトンシグナルは低磁場側にシフトしていることから，フラバノン C-4’’’の酸素を介したフラボン C-6 へのエーテル結合によって，二量体を形成していると結論付けた。従って，compound **3** は apigenin の A 環 6 位に narigenin ユニットが 4’’’位で炭素-酸素-炭素エーテル結合したフラボン-フラバノン 2 量体と同定した。この化合物はソテツ葉から単離された報告がある既知化合物，2,3-dihydrohinokiflavone であった。炭素シグナルのケミカルシフト値は 2,3-dihydrohinokiflavone の文献値とほぼ一致した (Kenneth *et al*., 1987) 。Table 6.6 に 2,3-dihydroihinokiflavone 文献値，その帰属，HIF として得た compound **1** の実測データ，ならびに比較のための apigenin (5,7,4’-trihydroxyflavone) と narigenin (5,7,4’-truhydroxyflavanone) の ^{13}C-NMR データを並べている

以上の構造解析結果から， compounds **1** (分子量 538) , **2** (分子量 540), **3** (分子量 540) はそれぞれ，フラボン-フラボン骨格をもつフラボノイド二量体 8-(3’’’-apigenyl)apigenin (= amentoflavone) ，amentoflavone と同じ炭素骨格と置換様式を有するフラボン-フラバノン骨格を有する 8-(3’’’-naringenyl)apigenin (= 2,3-dihydroamentoflavone), ならびにエーテル結合を介して 2 量体を形成している 4’’’-*O*-(6-apigenyl)naringenin (= 2,3-dihydrohinokiflavone) と同定した。これらのフラボノイド二量体は全て既知化合物であったが，HIF としての活性をソテツに特有なビフラボン類に見出したことは重要な意味を持つ。

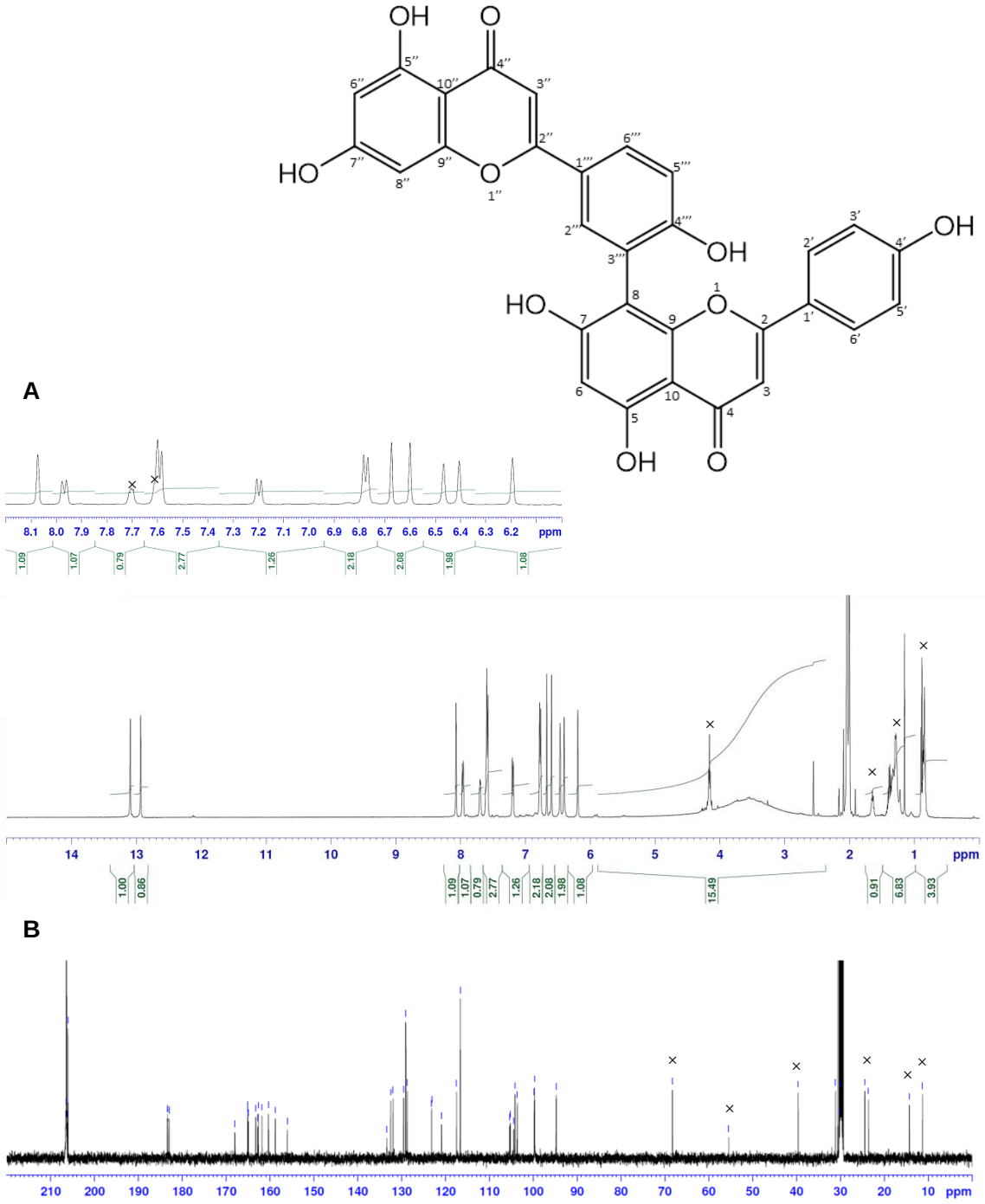


Fig. 6.11　compound 1 の ^{1}H および ^{13}C-NMR スペクトル

A) ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz, acetone-d_6), δ_H 13.09 (1H, s, C-5-OH), 12.93 (1H, s, C-5''-OH), 8.07 (1H, s, H-2'''), 7.97 (1H, d, *J* = 8.5 Hz , H-6'''), 7.59 (2H, d, *J* = 8.4 Hz , H-2', 6'), 7.19 (1H, d, *J* = 8.5 Hz , H-5'''), 6.77 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3', 5'), 6.67 (1H, s, H-3''), 6.60 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, br s, H-6''), 6.41 (1H, br s, H-6), 6.19 (1H, br s, H-8''); B) ^{13}C-NMR spectrum (125 MHz, acetone-d_6), δ_c 183.41, 183.03, 165.09, 165.06, 164.95, 163.26, 162.80, 162.68, 161.83, 160.36, 158.79, 156.07, 132.55, 129.08, 128.73, 123.20, 123.16, 120.95, 117.49, 116.68, 105.39, 105.25, 104.49, 104.19, 103.66, 99.80, 99.73, 94.78

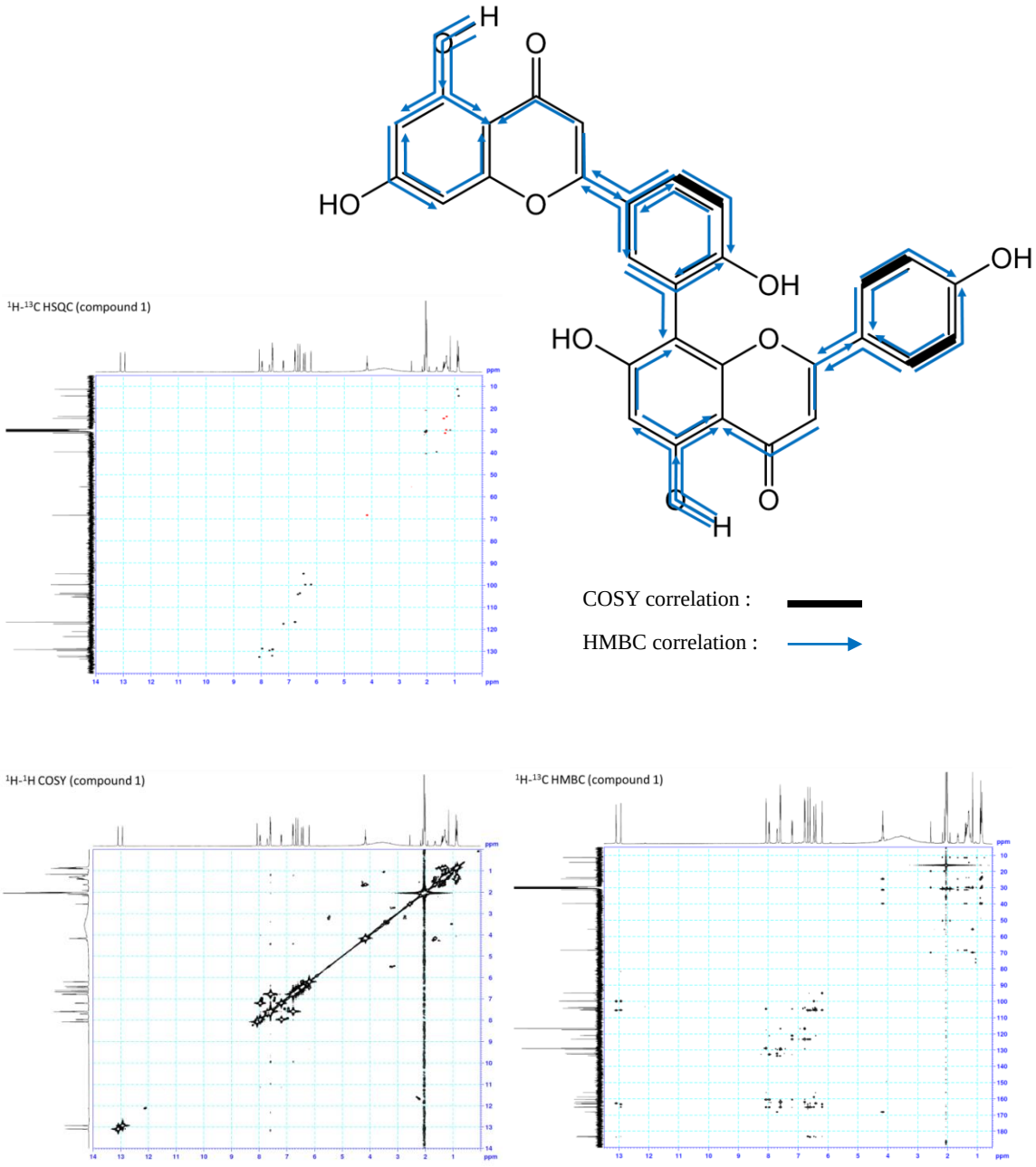


Fig. 6.12　compound 1 の二次元 NMR スペクトルおよび ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HMBC 相関

各二次元 NMR スペクトルの拡大部分は Appendix 参照

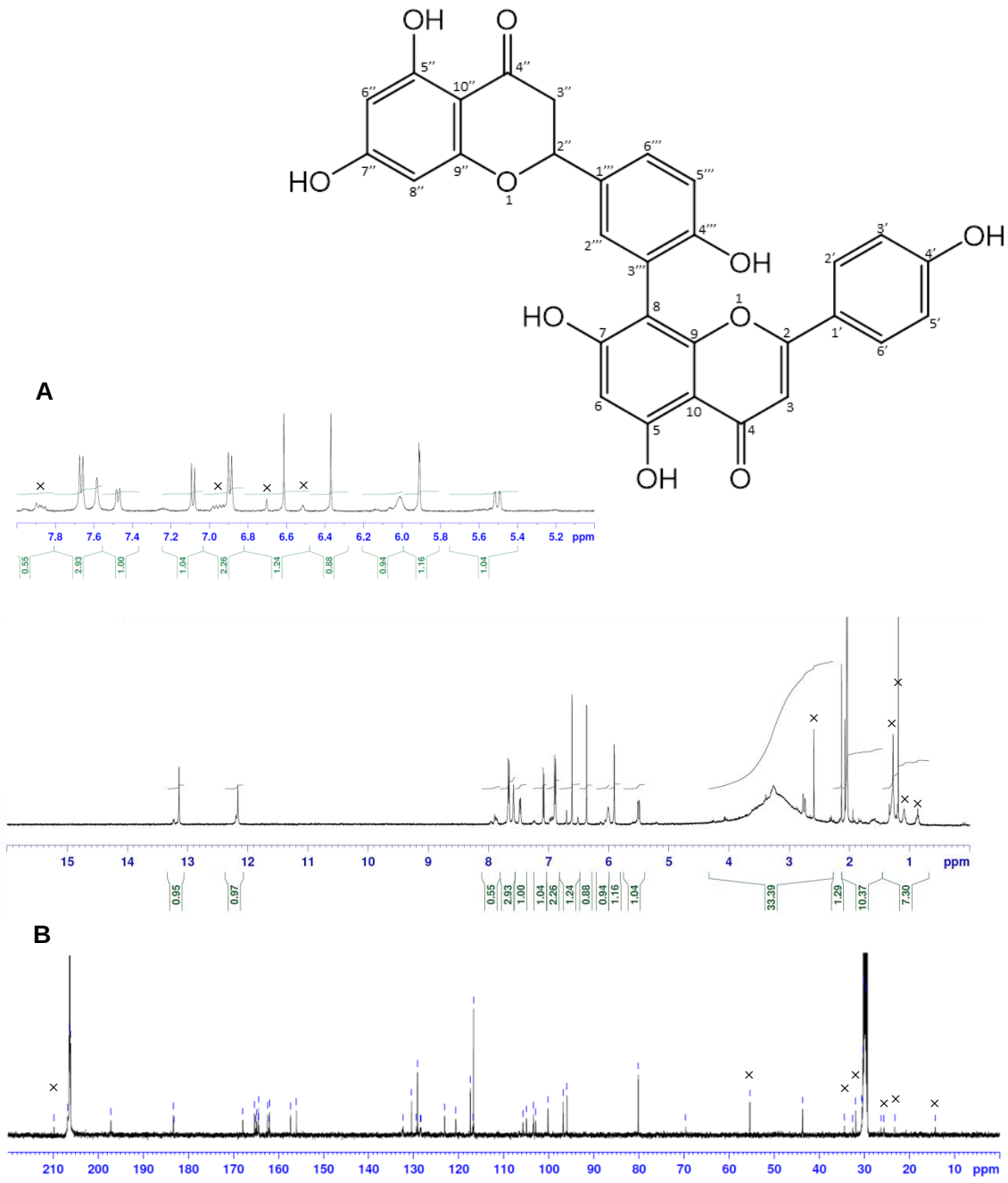


Fig. 6.13　compound 2 の ^{1}H および ^{13}C-NMR スペクトル

A) ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz, acetone-d_6), δ_H 13.14 (1H, s, C-OH-5), 12.16 (1H, s, C-OH-5''), 7.67 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-2', 6'), 7.58 (1H, s, H-2'''), 7.48 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'''), 7.09 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-5'''), 6.89 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.61 (1H, s, H-3), 6.37 (1H, s, H-6), 6.01 (1H, br s, H-8''), 5.91 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6''), 5.51 (1H, dd, J = 2.4 13.0 Hz, H-2''), 3.26 (1H, overwrapped, H_a-3''), 2.75 (2H, dd, J = 3.0 18.4 Hz, H_b-3''); B) ^{13}C-NMR spectrum (125 MHz, acetone-d_6), δ_c 197.15, 183.33,, 167.89, 165.27, 164.81, 164.45, 162.41, 162.10, 161.95, 157.36, 156.01, 132.39, 130.47, 129.16, 128.55, 123.15, 120.66, 117.43, 116.73, 105.79, 105.00, 103.41, 102.98, 100.22, 96.86, 96.01, 80.18, 43.71

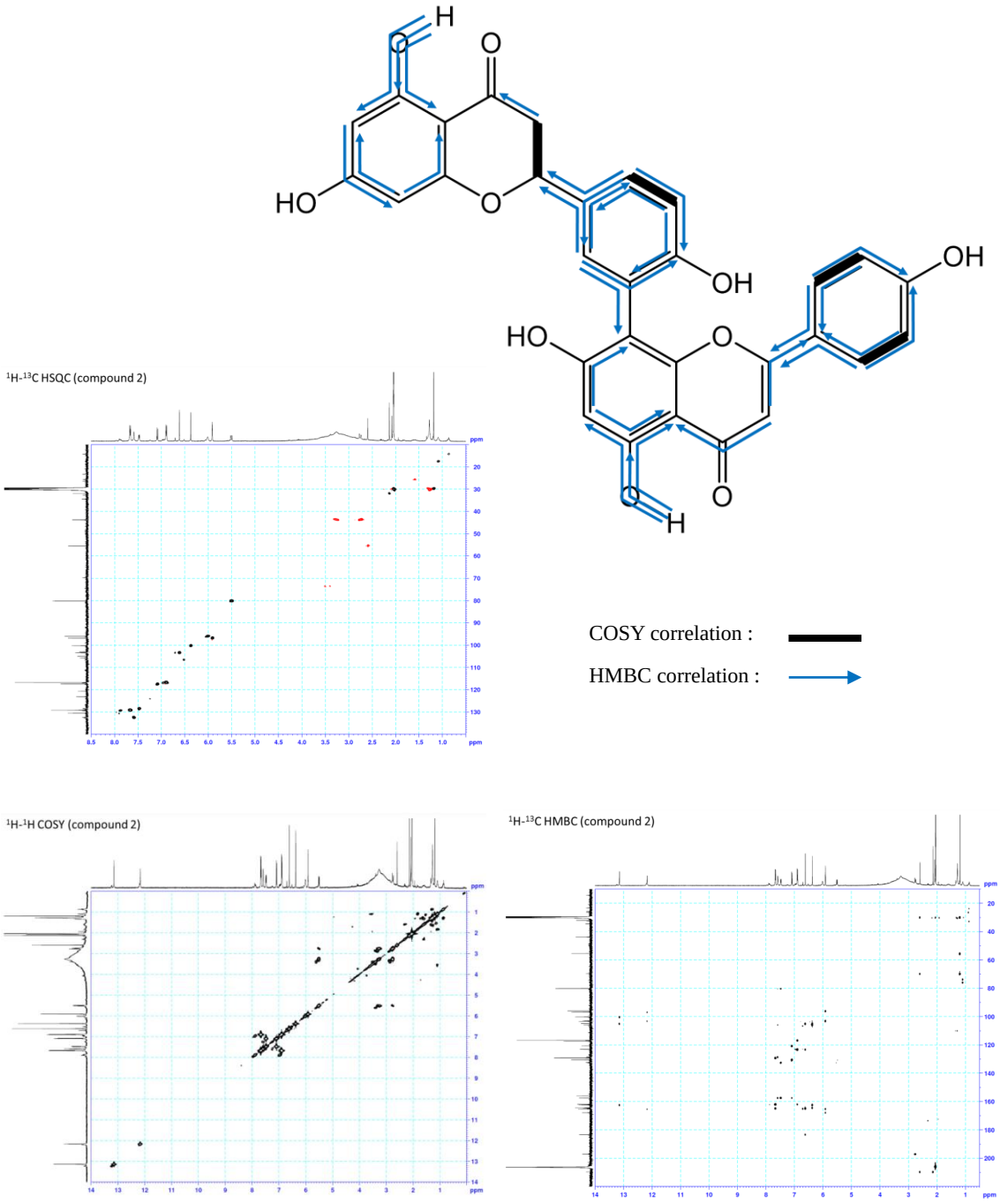


Fig. 6.14　compound 2 の二次元 NMR スペクトルおよび ^{1}H-^{1}H COCY, ^{1}H-^{13}C HMBC 相関

各二次元 NMR スペクトルの拡大部分は Appendix 参照

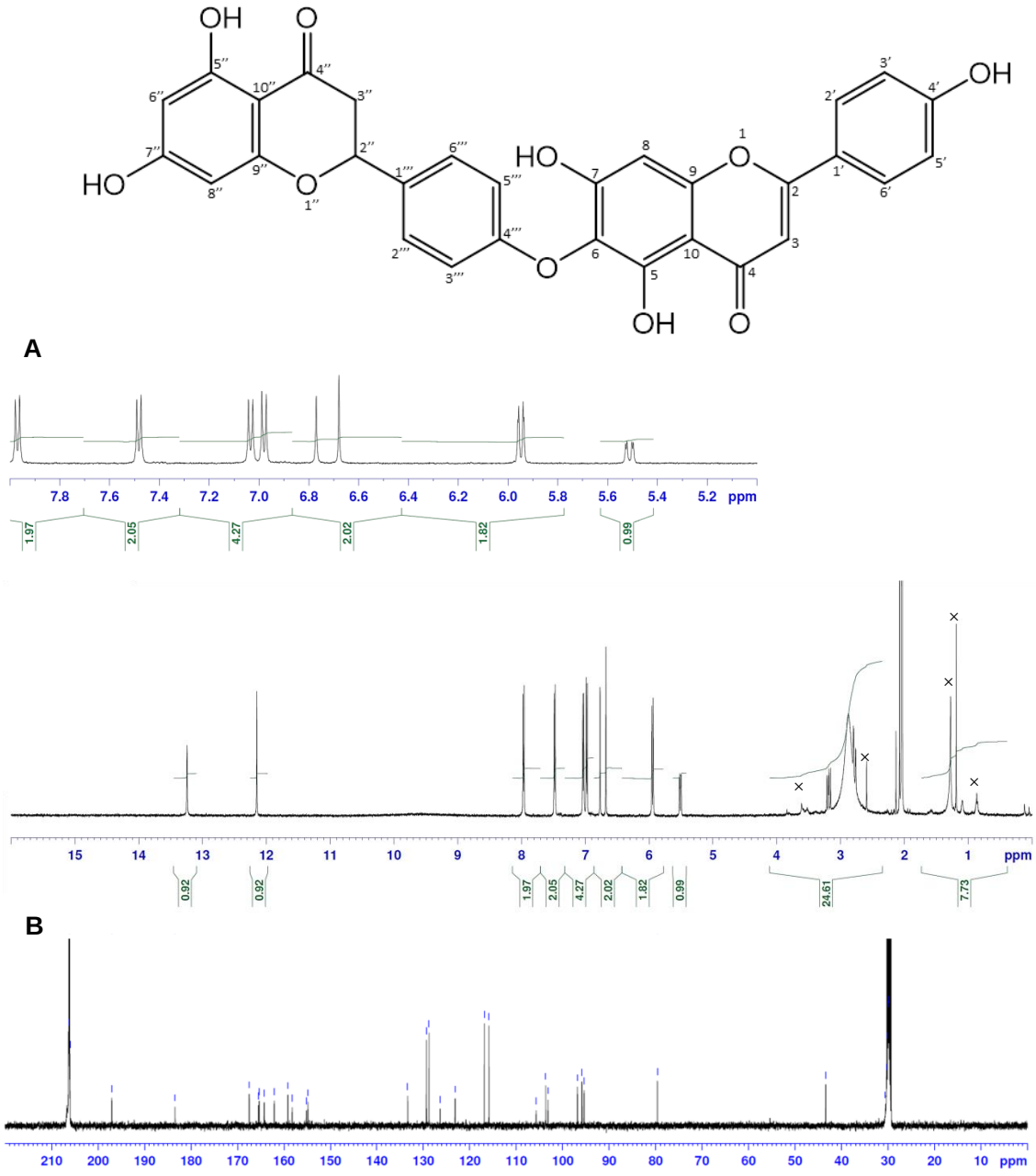
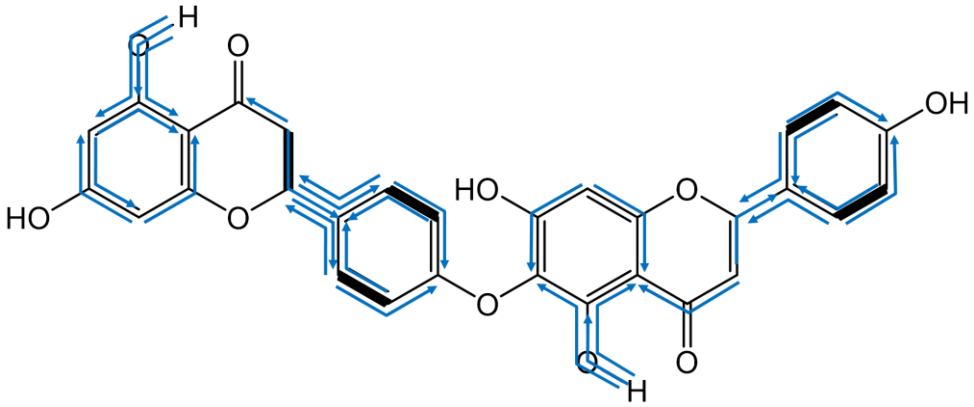
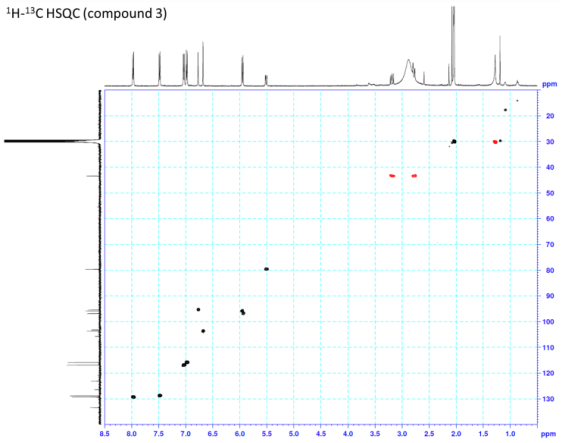


Fig. 6.15　compound 3 の ^{1}H および ^{13}C-NMR スペクトル

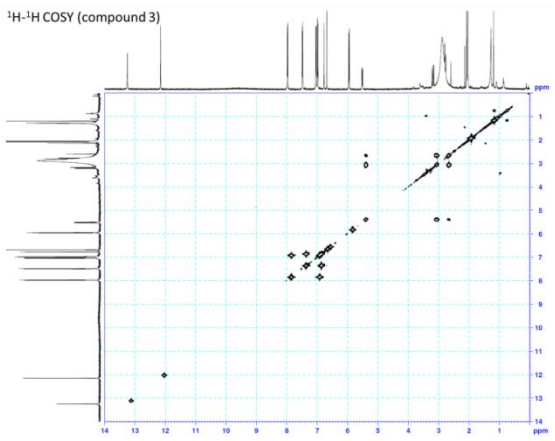
A) ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz, acetone-d_6), δ_H 13.24 (1H, s, C-5-OH), 12.15 (1H, s, C-5'-OH), 7.97 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 7.48 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2''', 6'''), 7.03 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.98 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3''', 5'''), 6.77 (1H, s, H-8), 6.68 (1H, s, H-3), 5.96 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-8''), 5.94 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6''), 5.51 (1H, dd, *J* = 2.6 Hz, 12.7 Hz, H-2''), 3.19 (1H, dd, *J* = 12.8, 17.1 Hz, H_a -3''), 2.78 (1H, dd, *J* = 3.0 Hz, 17.2 Hz, H_b -3'') ; B) ^{13}C-NMR spectrum (125 MHz, acetone-d_6), δ_c 197.02, 183.43, 167.42, 165.46, 165.27, 164.20, 162.04, 159.11, 158.19, 155.13, 154.80, 133.38, 129.34, 128.78, 126.38, 123.18, 116.89, 115.87, 105.73, 103.69, 103.17, 96.85, 95.87, 95.42, 79.64, 43.40





COSY correlation :

HMBC correlation :



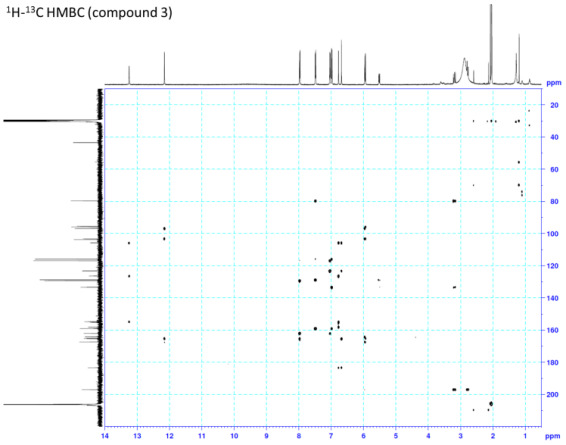


Fig. 6.16　compound 3 の二次元 NMR スペクトルおよび ^{1}H-^{1}H COCY, ^{1}H-^{13}C HMBC 相関

各二次元 NMR スペクトルの拡大部分は Appendix 参照

Table 6.6　各化合物の ^{13}C-NMR スペクトルのシグナルの帰属

position	compound 1	amentoflavone	compound 2	2,3-dihydro-amentoflavone	compound 3	2,3-dihydro-hinokiflavone	apigenin	naringenin
1	-	-	-	-	-	-	-	
2	165.06	164.3	164.81	163.7	165.46	164.1	164.1	
3	103.66	102.8	103.41	102.6	103.69	102.6	102.8	
4	183.41	182.2	183.33	182.2	183.43	182.0	181.8	
5	162.68	160.8	162.41	160.4	154.80	153.2	161.5	
6	99.80	99.1	100.22	98.8	126.38	125.1	98.8	
7	156.07	161.9	164.45	162.2	158.19	157.4	163.7	
8	104.49	104.1	105.79	104.9	95.43	94.5	94.0	
9	162.80	154.7	156.01	154.5	155.13	153.6	157.3	
10	105.39	104.0	105.00	103.7	105.74	104.1	103.7	
1’	123.16	121.4	123.15	121.5	123.18	121.1	121.3	
2’	129.08	128.3	129.16	128.4	129.34	128.5	128.4	
3’	116.68	116.0	116.73	115.9	116.89	116.0	116.0	
4’	161.83	161.1	161.95	161.2	162.04	161.2	161.1	
5’	116.68	116.0	116.73	115.9	116.89	116.0	116.0	
6’	129.08	128.3	129.16	128.4	129.34	128.5	128.4	
1’’	-	-	-	-	-	-		-
2’’	165.09	164.1	80.18	78.8	79.64	78.1		78.4
3’’	104.19	103.2	43.71	42.5	43.40	42.0		42.0
4’’	183.03	181.9	197.16	196.5	197.02	196.0		196.6
5’’	163.26	161.6	165.26	163.6	165.27	163.4		163.6
6’’	99.73	98.8	96.87	96.0	96.86	95.9		95.9
7’’	164.95	163.9	167.89	166.8	167.42	166.6		166.7
8’’	94.78	94.2	96.01	95.2	95.87	95.0		95.0
9’’	158.79	157.6	162.10	163.2	164.21	162.8		162.9
10’’	105.25	104.0	102.98	101.9	103.17	101.7		101.8
1’’’	123.20	120.3	130.48	128.7	133.38	131.9		128.9
2’’’	132.55	127.9	132.39	127.8	128.78	128.2		128.2
3’’’	120.95	121.7	120.66	119.2	115.88	114.6		115.2
4’’’	160.36	159.6	157.36	156.2	159.11	157.9		157.8
5’’’	117.49	116.4	117.44	115.9	115.88	114.6		115.2
6’’’	128.73	131.6	128.55	131.6	128.78	128.2		128.2

position	compound **3**	naringenin
1	-	-
2	5.51 (dd, *J* = 12.7, 2.6 Hz)	5.40 (dd, *J* = 13.1, 3.0 Hz)
3	2.78 (dd, *J* = 3.0, 17.2 Hz) 3.19 (dd, *J* = 12.8, 17.2 Hz)	2.70 (dd, *J* = 3.0, 17.2 Hz) 3.15 (dd, *J* = 13.1, 17.2 Hz)
4	-	-
5	12.15 (s, 5-OH)	12.15 (s, 5-OH)
6	5.94 (d, *J* = 2.0 Hz)	5.95 (d, *J* = 2.0 Hz)
7	-	-
8	5.96 (d, *J* = 1.9 Hz)	5.94 (d, *J* = 2.0 Hz)
9	-	-
10	-	-
1’	-	-
2’	7.48 (d, *J* = 8.7 Hz)	7.37 (d, *J* = 8.7 Hz)
3’	6.98 (d, *J* = 8.7 Hz)	6.87 (d, *J* = 8.7 Hz)
4’	-	-
5’	6.98 (d, *J* = 8.7 Hz)	6.87 (d, *J* = 8.7 Hz)
6’	7.48 (d, *J* = 8.7 Hz)	7.37 (d, *J* = 8.7 Hz)

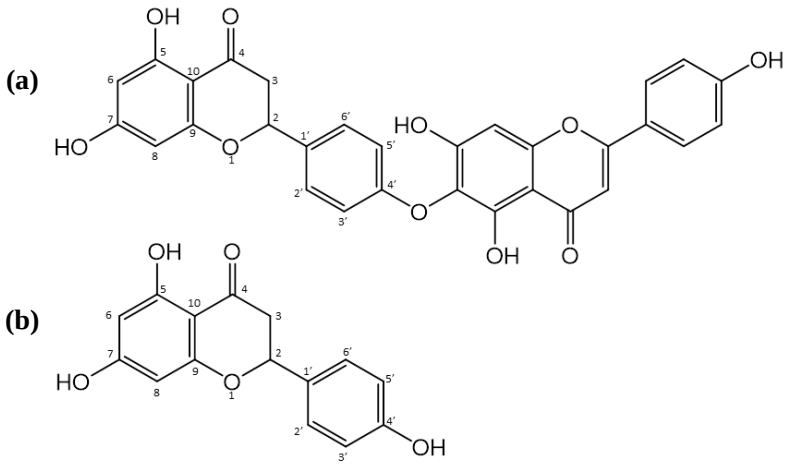


Fig. 6.17　(a) compound 3 と(b) naringenin の化学構造および ^{1}H-NMR 化学シフトの比較

Compound **3** のフラバノン骨格の ^{1}H-NMR 化学シフトを naringenin の文献値と比較すると(Álvarez-Álvarez *et al*., 2015)，B 環 4’位に遊離水酸基をもつ naringenin に対し，compound **3** の B 環シグナルは低磁場側にシフトしており，compound **3** のフラバノン B 環 4’”位の酸素原子からフラボン骨格 A 環 6 位へとエーテル結合をしている。

6.6　各ビフラボン類のホルモゴニア分化誘導検定試験

compound **1**(amentoflavone)，compound **2** (2,3-dihydroamentoflavone)，compound **3** の HIF 様活性を検証するため，それぞれを 100 nmol/disc ホルモゴニア分化誘導検定試験 (sandwich assay) に供した。各化合物を検定に供した際の 24 時間後のペーパーディスク周辺の菌体検鏡画像を Fig. 6.17 に示す。いずれの化合物もペーパーディスク周辺に拡散運動するホルモゴニアの様子が観察されたことから，これら主要なビフラボン誘導体はソテツ特有の HIF であることが示唆された。このアッセイ系で見る限り，ホルモゴニアは方向性を有していないことが明らかとなった。

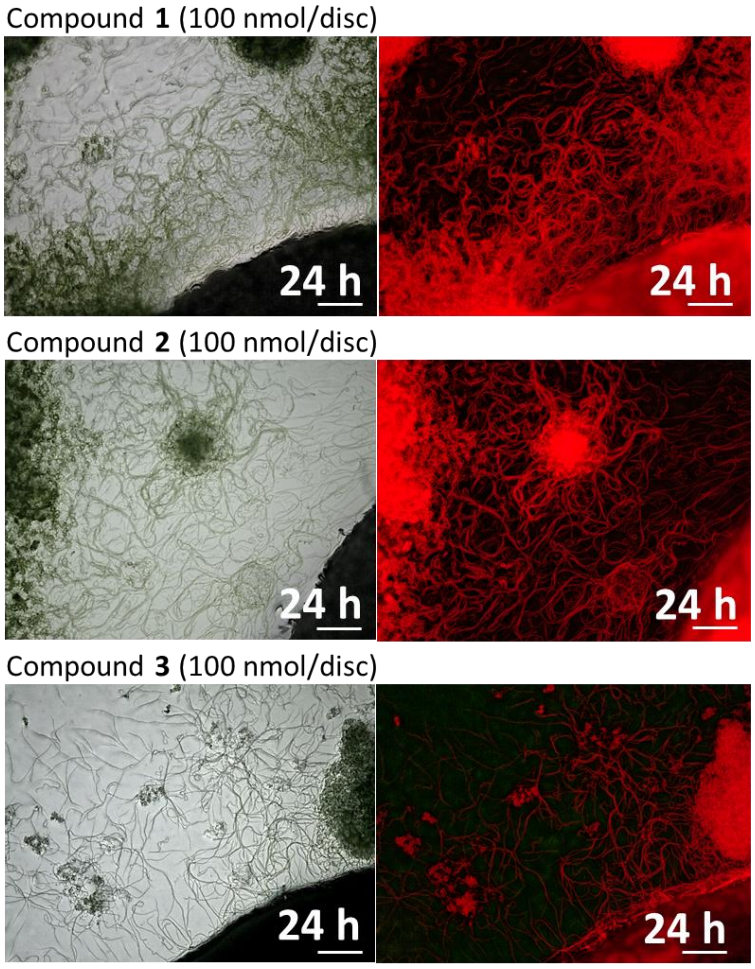


Fig. 6.17　ビフラボン類に対する *Nostoc* sp.の応答の検鏡画像

それぞれをバイオアッセイに使用し，ジェランガムゲル培地 (1.2%) 上糸状体菌体塊の応答を定点観測している。菌体の自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を使用し，クロロフィル *a* の自家蛍光を検出している。 scale bar, 300 µm

6.7 考察

6.7.1 ソテツ枯死葉由来の新規 HIF の同定

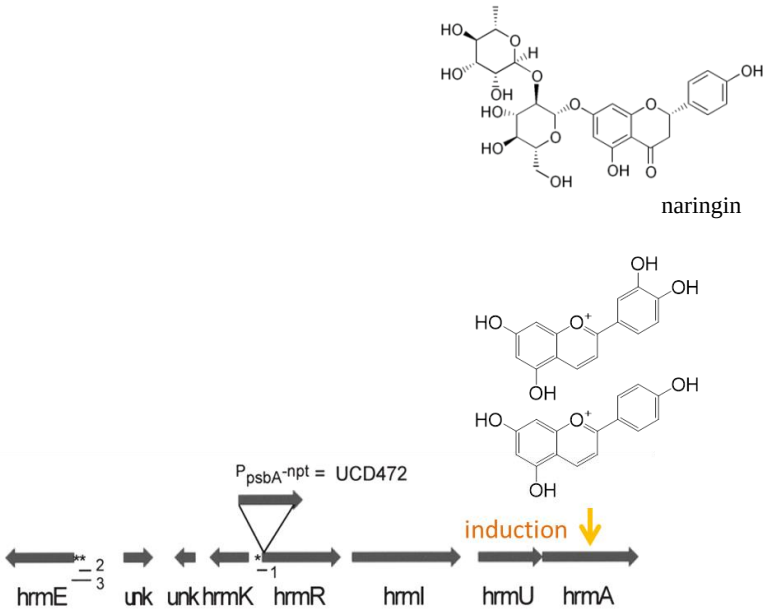
ソテツ・サンゴ状根はシアノバクテリアが宿主に到達した後に発達してできる共生器官であり，サンゴ状根 MeOH 抽出物から HIF の一つとして単離同定された 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycerol を含んだジアシルグリセロール類は，共生器官へのシアノバクテリアの誘導を補助するための役割を果たしていると考えられ，むしろ周辺の土壌中に単生するシアノバクテリアに運動性を持たせ，根に到達させることが共生系構築の初期の応答として重要である。また，ホルモゴニア分化誘導後，生きた宿主根の方へ誘引する必要があることから，宿主に特異的な化学シグナルと生きた根への強い誘引は，新陳代謝の盛んな新しい根端への誘導とは別のものと考えるのは妥当であろう。以上を踏まえ，本研究では，ソテツ葉に宿主特異的な新規 HIF が存在することを予想し，特に土壌に堆積する枯死葉に着目して HIF の探索を試みた。ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物に HIF 様活性が認められたため，その活性本体を追跡した結果，複数のビフラボン類を HIF として単離同定した。ビフラボン類はソテツやイチョウ，メタセコイヤなどの裸子植物に特異的な二次代謝産物として知られていることから (Dossaji *et al*., 1975) ，ソテツに由来する宿主特異的 HIF であると推定された。この宿主特異的 HIF がソテツ－単生シアノバクテリアの共生系成立において初期 HIF として機能していると予想される。

6.7.2 ホルモゴニア分化誘導関連遺伝子との関係

ソテツ枯死葉由来 HIF としてビフラボン類が同定されたが，フラボノイドには *Nostoc* sp. の形態分化に関与する遺伝子発現について興味深い報告が知られている。*Nostoc* sp.のホルモゴニア分化誘導に関与する遺伝子として, *hrm* や *sigH* が報告されているが, このうち *hrmA* の発現には，luteolinidin や apigeninidin といったアントシアニンの他 (Cohen *et al*., 2002) ，フラボノイド配糖体である naringin (Fig. 6.18) が関与しているという報告もある (Cohen and Yamasaki, 2000) 。ホルモゴニアは運動性に優れているが，一細胞当たりの DNA 量，クロロフィル量などの観点から生存性については極めて不安定な形態であるため (Campbell and Meeks, 1989) ，*hrmA* を含む *hrm* 遺伝子群は，ホルモゴニア分化の継続を抑制する機能があると考えられている。また，*hrm* 遺伝子群はラクトースオペロンに類似しているという報告もあり，化合物によるフィードバック調節を受けていると示唆されている (Fig.6.18) 。

以上の点を考慮すると，以下の機序が *Nostoc* sp.の細胞内で機能している可能性がある。土壌土面近くで単生生活を行っている *Nostoc* sp.は，外部から供給されるビフラボン類の刺激を受けてホルモゴニアへと分化する。分化誘導を促進したビフラボン類は菌体内にとどまるが，仮想的な脱重合などにより単量体フラボノイドへ分解されると考えられる。分解

されたフラボノイドが蓄積するとホルモゴニア分化誘導が逆に抑制され，元の栄養細胞へと戻る。この仮説を検証するためには，ビフラボン類で処理した際の菌体遺伝子発現の変動，特に *hrm* の発現を追跡する必要があるだろう。より重要なアプローチとして，これらビフラボン類から単量体フラボノイドが生成するか否か，またそれらが *hrm* 発現を上昇させるかを検証する必要があるだろう。いずれにしても，本研究で得られた知見と *hrm* との関連性は，ホルモゴニア分化誘導の分子機序を明らかにするうえで重要な位置に存在すると考えてよい。



(Campbell *et al.*, 2003，一部改変)

Fig. 6.18　*Nostoc punctiforme* の *hrm* 遺伝子のオープンリーディングフレーム

HrmA はこれまで同定されたどのタンパク質とも相同性がないもので，シアノバクテリアの形態分化に関わる特異的なものであると考えられている。HrmR はラクトースオペロンのリプレッサーと相同性のあるタンパク質で，フィードバック調節機構が存在することが示唆されている。

6.7.3　フラボノイドの共生シグナル因子としての役割

フラボノイドは植物から共生微生物へ放出される宿主特異的シグナル因子としての役割を果たしていることが知られている。根粒菌 (Rhizobia) を共生微生物とするマメ科植物は，共生系構築の初期段階としてダイゼイン (daizein) などのフラボノイド類を土壌中に放出する (Zuanazzi *et al.*, 1998) 。フラボノイド類は根粒菌の *nod* の発現を誘導し，根粒菌はマメ科植物の根粒形成を誘導するシグナル因子である Nod 因子を産生する (Gage, 2004) 。このように，植物が放出するフラボノイド類は共生微生物とのシグナル伝達因子の役割を担

っており，マメ科植物が産生するイソフラボンは，マメ科植物に特異的な化合物であることは特に注目すべき点である (Graham, 1991) 。本研究で明らかとなった HIF は，ソテツに特異的な化合物であるビフラボン類であり，植物が自身に適した共生微生物を誘引するために共生シグナル因子としてフラボノイドを利用していることを示唆するものである。フラボノイド類は，植物が栄養飢餓環境下で生存するための戦略として，フェニルアラニンからフェニルアラニンアンモニアリアーゼを介して，それらの前駆体が産生されるが，低栄養ストレス下で共生微生物を誘引する化学シグナル因子として永い年月の間保存されつづけているのかもしれない。

6.8 第六章のまとめ

本研究では，*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共生器官であるサンゴ状根に由来する HIF の一つとして 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycerol を単離同定しているが，この化合物を含んだジアシルグリセロール類 (diacylglycerols, DAG) は多くの生物の細胞膜を構成する一次代謝産物であり，ほぼすべての生物に存在している。この事実から，DAG が宿主植物の存在を認識させる初期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有の化学シグナル因子が存在することが示唆された。本研究において，広範囲の土壌単生シアノバクテリアの分化に関与するシグナル因子を探索し，特にソテツ枯死葉からの溶脱によってはじめて機能する HIF に注目した。ソテツ枯死葉 MeOH 抽出物およびソテツ葉裏面滲出物の HIF 様活性を検定した結果，両者に共通する新規 HIF の存在が確認されたため，ソテツ枯死葉の重量をスケールアップしてこの活性本体の単離精製に取り組んだ。各種クロマトグラフィーとバイオアッセイに従って活性本体を追跡した結果，3 種類フラボノイド二量体を HIF として単離同定した。ビフラボン類は DAG とは全く異なる分子種であり，裸子植物で特異的に産生される化合物群である。また，ビフラボン類を含んだフラボノイドは，ホルモゴニア分化誘導と連動する遺伝子である *hrm* の発現に関与している。以上の知見から，ビフラボン類はシアノバクテリアとの初期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高いと推察される。この HIF によって宿主根端に近づけたシアノバクテリアは，根端から放出される DAG によって強力に誘引され，共生器官に侵入すると考えている。

第七章　総合考察

7.1　はじめに

本研究は，植物とシアノバクテリアの共生系構築機序の解明を目的とし，その初期イベントである宿主によるシアノバクテリアのホルモゴニア分化誘導にスポットを当てて，活性本体であるホルモゴニア分化誘導因子 (hormogonia-inducing factor, HIF) を様々な角度から探索し，同定したものである。本章では，これまでに得られた知見を総合的に考察する。

7.2　ホルモゴニア分化誘導と PKC 賦活化との関係性

ソテツの共生器官であるサンゴ状根から HIF の 1 つとしてジアシルグリセロール類である 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycerol が単離同定されたことから (田中, 修士論文, 2012) ，ジアシルグリセロール類の細胞内シグナル伝達における主要な生理作用であることが知られているプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) の賦活化に着目した。PKC 賦活化剤としてのジアシルグリセロール類の作用点はグリセロール骨格部分の 3-位の水酸基にあると考えられ，実際この部分がリガンドとして認識されて PKC に結合し，このキナーゼを賦活化する (Baba *et al*., 2004) 。天然物として PKC 賦活化作用を有する接触毒性化合物，あるいは類似の活性化合物を幾つか選び，これらの HIF としての生理作用を調査した。実際，これら接触毒性化合物（12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$, anacardic acid C15:1-Δ^{8}）は，構造的にジアシルグリセロール類のアナログ化合物であるとの指摘がある。しかしながら，予想に反し 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate および urushiol C15:3-$\Delta^{10,13,16}$ はいずれも，100 nmol/disc でも明瞭な HIF 様活性を示さなかったため (5.2.2 節) ，PKC 賦活化と HIF 様活性との関連は低いことが示唆された。また，ジアシルグリセロール類では，アシル基の組み合わせでそれらのホルモゴニア分化誘導活性力価が大きく異なることから (4.3.1 節) ，HIF としての生理作用にはアシル基側鎖の位置，長さ，飽和度が重要であると考えられた。これらの結果から，PKC 賦活化とは別の分子標的がホルモゴニア分化誘導には関与していることが強く支持される。

7.3　アナカルド酸及びアナカルド酸アルコールエステル誘導体と DAG との構造活性相関

上述した接触毒性化合物とは異なり，イチョウ偽果由来のアナカルド酸類は 0.1-1 nmol/disc の低濃度では HIF 様活性を示すことが確認されたが，高濃度（10-100 nmol/disc）

ではシアノバクテリアに対する致死毒性を示した (5.2.2 節) 。この殺細菌毒性の原因はアナカルド酸類の遊離カルボキシ基であるという予測を立て，メチルエステル誘導体を調製し，それらの HIF 様活性を検証した結果，殺細菌毒性は消失し，HIF 様活性が相対的に上昇する結果が得られた (5.3 節) 。このアナカルド酸メチルエステルとジアシルグリセロールの構造を比較し，これらが部分的に類似した構造を持つことに注目した。そこでアナカルド酸類のカルボキシ基に長鎖アルコールをエステル結合させた中鎖アルキルエステル誘導体により強力な HIF 様活性を期待し，調製した幾つかの誘導体について生理活性を検証した結果，中鎖アルコールのアルキル鎖長や不飽和度に HIF 様活性が大きく影響されることを明らかにした。加えて，アルキル鎖が 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycerol や 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol などソテツ・サンゴ状根から同定された活性本体により近いアナログ分子ほど強い HIF 様活性を示すことを見出した。これは，HIF 様活性とジアシルグリセロールとの構造類似性の高いアナログ誘導体との間にはっきりとした構造活性相関の存在を示しており，また，分解しやすいジアシルグリセロールよりも化学的安定性が高く，HIF 様活性が強い化合物の合成に成功したことになる (5.5 節) 。以上の結果は，ジアシルグリセロール類のホルモゴニア分化誘導活性には二つのアシル基の化学構造が基本的な割を果たしていることを再確認させるものであった。

ジアシルグリセロール類はリパーゼにより生体内で容易に分解されるため，その代謝回転が比較的早い，不安定な分子種であるが，アナカルド酸エステルはジアシルグリセロール類に比べてリパーゼに対する耐性が高いと思われ，極めて安定な化合物としての特性を示す。そのため，*Nostoc* 属シアノバクテリア Yaku-1 株の糸状体の菌体塊から極めて再現性良くホルモゴニアを誘導・調製することができる。この化学ツールを用いて，ホルモゴニア分化誘導に連動して発現する遺伝子のオミックス解析を行い，シアノバクテリア分化誘導と機能性を制御する遺伝子群を同定することができれば，将来的には，この窒素固定細菌をバイオ農薬・バイオ肥料として非宿主である多様な作物との半共生系成立誘導剤にも応用できると期待される。

7.4 DAG とは異なる分子種である新規 HIF ビフラボン類の同定とそれらの環境中での役割

ジアシルグリセロール類は，既に共生系が成立しているソテツ・サンゴ状根から単離同定したものであるが，ジアシルグリセロール自体の生物界での広範な分布から，宿主植物とシアノバクテリアとの特異的な共生系構築，特に宿主認識に関わっているとは考えにくく，共生系が構築される前段階で強く作用するシグナル物質であるとするには疑問が残る。ジアシルグリセロール類は多くの生物の細胞膜の重要な構成成分のひとつであることから，寄主側が宿主の存在を認識する宿主認識化学シグナルとしては不適であり，宿主には特異的な HIF が存在するのではないかという仮説に行き着いた。ソテツ葉から滲み出るリター

分泌物に含まれる化学シグナル因子が土壌表面近くで単生生活を送っているシアノバクテリアに運動性を付与し，ソテツ根プレサンゴ状根根端に運動性を獲得したホルモゴニアを誘導するかもしれないと考え，アルコールを含ませた脱脂綿で生きたソテツ葉裏面のリター分泌物をぬぐいとり，これを回収して宿主特異的かつ新規なHIFの探索を試みた (6.1節) 。この微量のソテツ葉分泌物に極めて強い HIF 様活性を示す，クエンチングと自家蛍光を示す化合物を見出したが，ごく微量のため構造決定に至らなかった。しかしながら，完全に薄茶色に枯れたソテツ・落葉落枝に同一あるいは類似化合物を探索したところ，これを含め幾つかの類似活性物質が含まれていることを見出し，このリター由来の HIF を比較的多量に結晶状粉末として得ることに成功した。二次元 NMR を駆使した構造解析によって，これらがビフラボン類骨格を有する，裸子植物に特有な二次代謝産物であることが分かった (6.5 節)。これらのビフラボン類はソテツを含む裸子植物（マツなどの針葉樹）に特異的な化合物群であることから，ビフラボン類はシアノバクテリアが宿主を認識するための重要なシグナル物質であり，ソテツ特有の HIF であるとの結論が得られた。

ソテツには少なくとも，分子種が全く異なる 2 種類の HIF が存在することが明らかとなったが，環境中でのシアノバクテリアに対する分化誘導は以下のプロセスが考えられる。ソテツ葉に蓄積しているビフラボン類は枯死した葉にも残留し，落葉に伴って土壌に堆積したリターに保持されている。リターは徐々に分解し，腐植が形成される過程でビフラボン類が溶脱し，雨水によって土壌表面へ拡散する。表土に棲息している単生シアノバクテリアがこれを認識し，ホルモゴニアへと分化し，運動能を獲得して移動を開始する。ソテツ根の周辺に行き着いたシアノバクテリアは，ソテツ根細胞が生体膜を構成するリン脂質からリン酸とコリン有機態窒素が回収した残りものであるジアシルグリセロールを二次 HIF として認識し，共生器官である根へ誘引されるのではないかと推測している。しかし，ホルモゴニアの形態には時間的制約があり，根内に到達することができない菌体も出現するであろう。このような菌体に対してはリターから放出されるビフラボン類によって再度分化誘導され，ジアシルグリセロールを認識できる根近傍への到達を誘い，共生器官へ到達する効率を上昇させる。以上のプロセスの存在を仮説として提唱したい。

7.5 各化合物のホルモゴニア分化誘導の機序について

本論文では，HIF として 3 種類の化合物群の存在を明らかにしてきた。1 つ目はソテツ・サンゴ状根由来のジアシルグリセロール類 (第四章) ，2 つ目はイチョウ偽果由来のアナカルド酸および殺細菌性を大幅に低減させ HIF 様活性を強化したアナカルド酸アルコールエステル誘導体 (第五章) ，3 つ目はソテツ・リター由来のビフラボン類である (第六章) 。これら HIF 様活性物質が示すホルモゴニア分化誘導機序について考察していく。

ホルモゴニア分化誘導の分子機序を考えていくうえで重要なのが分化誘導と連動して発

現が変化する遺伝子群であり，ホルモゴニア分化に関与する遺伝子としては *sigH* 遺伝子 (Campbell *et al.*, 1998) や *hrm* 遺伝子 (Cohen *et al.*, 1994) が報告されている。前者は真正細菌の DNA 上での転写開始点を決定するシグマ因子をコードする遺伝子であり，多くの原核生物や真核生物が保有している遺伝子である。一方，後者はこれまでに相同性を持つタンパク質が同定されていないため，*Nostoc punctiforme* に特異的な遺伝子であると考えられている。また，sigH タンパク質は *hrm* 遺伝子の発現に影響を与えていないとの報告もある (Campbell *et al.*, 1998) 。

先にも述べたようにジアシルグリセロール類はほぼすべての生物に存在している分子種であり，*sigH* の発現に関与している可能性が高い。アナカルド酸類はイチョウやフウロソウに特徴的な二次代謝産物であるが，これらの高等植物とシアノバクテリアとの共生の報告例はなく，アナカルド酸中鎖アルキルエステル誘導体とジアシルグリセロール類との化学構造類似性から，この化合物群はむしろジアシルグリセロール類のアナログ化合物であり，ジアシルグリセロールアゴニストとしてジアシルグリセロールと同様，*sigH* の発現に関与しているのではないかと推測している。一方，ビフラボン類は宿主に特異的な化合物であり，フラボノイドに関連した化合物が *hrmA* の遺伝子発現を誘導する報告があることから (Cohen and Yamasaki, 2000; Cohen *et al.*, 2002) ，ビフラボン類によるホルモゴニア分化誘導は, *hrm* 遺伝子の発現に連動するシグナル伝達機構により引き起こされていると推定する。これらの仮説を検証するためにも，本研究で得られた各種 HIF がどの遺伝子発現に影響を与えているのかを網羅的に解析してゆく必要があるだろう。これらを明らかにすることで，ホルモゴニア分化誘導の機序からその先に続く宿主への誘引及び共生器官への定着といった共生系構築イベントの全体像が明らかとなることが期待される。

本研究では，屋久島で採取したソテツ・サンゴ状根から分離した *Nostoc* sp. Yaku-1 株を用いている。この分離株はソテツと共生することができる株であるため，ビフラボン類に HIF 活性を見出すことができたと考えられるが, ツノゴケやグンネラなどの他の植物に共生している *Nostoc* sp.に対しても同様に HIF としての生理活性を発揮することができるかどうかは，興味深い疑問である。今後，多くの *Nostoc* sp.で保存されている宿主植物への共生能力の存在について明らかにすることができれば，農作物などへのシアノバクテリア共生系付与技術の確立が現実のものとなり，貧栄養環境下での農作物収量の劇的な改善が期待されるだろう。

7.6 結論

本論文では，窒素固定能を持つ *Nostoc* 属シアノバクテリアの宿主植物との共生系構築機序の解明を目指し，その初期イベントであるホルモゴニア分化誘導に関する化学シグナル物質について着目し，宿主植物から放出されるホルモゴニア分化誘導因子の探索を様々な方向から行ったことを報告した。

この化学シグナルの探索において簡便かつ安定にホルモゴニア分化誘導が検討できるアッセイ法を開発し，この手法に従って HIF のスクリーニングを行った。その結果，第一に，ソテツ・サンゴ状根から単離同定された天然体ジアシルグリセロール類および合成ジアシルグリセロール類，第二にイチョウ偽果由来のアナカルド酸およびアナカルド酸アルコールエステル誘導体，さらには第三にソテツ・リター由来のビフラボン類を宿主特異的 HIF として同定した。これらの知見は，ほとんどの生物に存在するジアシルグリセロール類に HIF としての生理作用がある一方で, ビフラボン類のように宿主特異的 HIF が存在することを示しており，ホルモゴニア分化誘導現象には複数の異なるシグナル伝達経路が関与している可能性を否定できない。また, PKC 賦活化剤が HIF 様活性を有するか否かの検討から，ホルモゴニア分化誘導は PKC 賦活化と関係性が低いことを明らかにした。一方，構造活性相関研究の過程で，より安定にホルモゴニア分化誘導を引き起こすことができるアナカルド酸中鎖アルキルエステル誘導体を見出した。

各ホルモゴニア分化誘導因子によって発現する遺伝子と情報伝達系カスケードが HIF 分子種ごとに異なる可能性が高く，今後これらを解析していく必要がある。一連の応答に対する分子機序が解明されれば，ホルモゴニア分化誘導に続く共生系構築機構の解明研究に繋がる展開が期待される。

参考文献

Adams DG, Duggan PS. **Cyanobacteria–bryophyte symbioses.** *Journal of Experimental Botany.* 2008;59(5):1047–1058.

Adams DG, Duggan PS. **Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria.** *New Phytologist.* 1999;144(1):3–33.

Álvarez-Álvarez R, Botas A, Albillos SM, Rumbero A, Martín JF, Liras P. **Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*.** *Microbial cell factories*. 2015;14(1):178.

Baba Y, Ogosi Y, Hirai G, Yanagisawa T, Nagamatsu K, Mayumi S, Hashimoto Y, Sodeoka M. **Design, synthesis, and structure–activity relationship of new isobenzofuranone ligands of protein kinase C**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004;14(11):2963–2967.

Begum P, Hashidoko Y, Islam MT, Ogawa Y, Tahara S. **Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*.** *Zeitschrift für Naturforschung, Biochemistry.* 2002;57(9–10):874–882.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. **The citric acid cycle is a source of biosynthetic precursors.** *In Biochemistry, 5th Edition, W. H. Freeman and Company, New York.* 2002;ISBN-10:0-7167-3051-0.

Bergersen FJ, Kennedy GS, Wittmann W. **Nitrogen fixation in the coralloid roots of *Macrozamia communis* L. Johnson.** *Australian Journal of Biological Sciences*. 1965;18(6):1135–1142.

Carrapiço F. ***Azolla* as a superorganism. Its implication in symbiotic studies.** *Symbioses and Stress.* 2010;17:225–241.

Campbell EL, Brahamsha B, Meeks JC. **Mutation of an alternative sigma factor in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* results in increased infection of its symbiotic plant partner, *Anthoceros punctatus*.** *Journal of Bacteriology*. 1998;180(18):4938–4941.

Campbell EL, Meeks JC. **Characteristics of hormogonia formation by symbiotic *Nostoc* spp. in response to the presence of *Anthoceros punctatus* or its extracellular products.** *Applied and Environmental Microbiology.* 1989;55(1):125–131.

Chapman MJ, Margulis L. **Morphogenesis by symbiogenesis.** *International Microbiology*. 1998;1(4):319–326.

Chiu W-L, Peters GA, Levieille G, Still PC, Cousins S, Osborne B, Elhai J. **Nitrogen deprivation stimulates symbiotic gland development in *Gunnera manicata*.** *Plant Physiology.* 2005;139(1):224–230.

Cohen MF, Meeks JC. **A hormogonium regulating locus, *hrmUA*, of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its response to an extract of a symbiotic plant partner *Anthoceros punctatus*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1997;10(2):280–289.

Cohen MF, Sakihama Y, Takagi YC, Ichiba T, Yamasaki H. **Synergistic effect of deoxyanthocyanins from symbiotic fern *Azolla* spp. on *hrmA* gene induction in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 2002;15(9):875–882.

Cohen MF, Wallis JG, Campbell EL, Meeks JC. **Transposon mutagenesis of *Nostoc* sp. strain ATCC 29133, a filamentous cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives.** *Microbiology*. 1994;140(12):3233–3240.

DeLuca TH, Zackrisson O, Nilsson MC, Sellstedt A. **Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests.** *Nature.* 2002;419(6910):917–920.

Dong W, Lv H, Xia G, Wang M. **Does diacylglycerol serve as a signaling molecule in plants?** *Plant Signaling and Behavior.* 2012;7(4): 472−475.

Dossaji SF, Mabry TJ, Bell EA. **Biflavanoids of the Cycadales.** *Biochemical Systematics and Ecology*. 1975;2(3–4):171–175.

Douglas D, Peat A, Whitton BA, Wood P. **Influence of iron status on structure of the cyanobacterium (blue-green alga) *Calothrix parietina*.** *Cytobios.* 1986;47(190–191):155–165.

Dudley PA, Anderson RE. **Separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin layer chromatography.** *Lipids*. 1975;10(2):113–115.

Gage DJ. **Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004;68(2):280–300.

Gantar M, Kerby NW, Rowell P. **Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N_2–fixing cyanobacteria: II. An ultrastructural study.** *New Phytologist.* 1991;118(3):485–492.

Gantar M, Rowell P, Kerby NW, Sutherland IW. **Role of extracellular polysaccharide in the colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) roots by N_2-fixing cyanobacteria.** *Biology and Fertility of Soils*. 1995;19(1):41–48.

Graham TL. **Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates.** *Plant Physiology.* 1991;95(2):594–603.

Grimme LH, Boardman NK. **Photochemical activities of a particle fraction P 1 obtained from the green alga *Chlorella fusca*.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1972;49(6):1617–1623.

Hara S, Desyatkin RV, Morishita T, Hatano R, Hashidoko Y. **Clear increase of acetylene reduction in soil bacteria of East Siberian Taiga forest bed under appropriate conditions mimicking the natural soil environments.** *Soil Science and Plant Nutrition.* 2010;56(4):716–724.

Hara S, Hashidoko Y, Desyatkin RV, Hatano R, Tahara S. **High rate of N_2 fixation by East Siberian cryophilic soil bacteria as determined by measuring acetylene reduction in nitrogen-poor medium solidified with gellan gum.** *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(9):2811–2819.

Hara S, Isoda R, Tahvanainen T, Hashidoko Y. **Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine quality of solid plates for bacterial culture.** *PLoS ONE.* 2012;7:e41142.

Harris JH. **Gelrite as an agar substitute for the cultivation of mesophilic *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter* species.** *Applied and Environmental Microbiology.* 1985;50(4):1107–1109.

Hecker E. **Phorbol esters from croton oil chemical nature and biological activities.** *Naturwissenschaften.* 1967;54(11):282–284.

Hernández I, Fernández JA, Niell FX. **Influence of phosphorus status on the seasonal variation of alkaline phosphatase activity in *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützing.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 1993;173(2):181–196.

Hernández-Muñiz W, Stevens SE. **Characterization of the motile hormogonia of *Mastigocladus laminosus*.** *Journal of Bacteriology.* 1987;169(1):218–223.

Hill DR, Keenan TW, Helm RF, Potts M, Crowe LM, Crowe JH. **Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation.** *Journal of Applied Phycology.* 1997;9(3):237–248.

Howe LR, Leevers SJ, Gómez N, Nakielny S, Cohen P, Marshall CJ. **Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf.** *Cell.* 1992;71(2):335–342.

Hu L, Edamatsu H, Takenaka N, Ikuta S, Kataoka T. **Crucial role of phospholipase Cε in induction of local skin inflammatory reactions in the elicitation stage of allergic contact hypersensitivity.** *Journal of Immunology.* 2010;184(2):993–1002.

Hui SP, Murai T, Yoshimura T, Chiba H, Kurosawa T. **Simple chemical syntheses of TAG monohydroperoxides.** *Lipids.* 2003;38(12):1287–1292.

Jansson PE, Lindberg B, Sandford PA. **Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*.** *Carbohydrate Research.* 1983;124(1):135–139.

Jassen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM, Sait M. **Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia.** *Applied and Environmental Microbiology.* 2002;68(5):2391–2396.

Johansson C, Bergman B. **Early events during the establishment of the *Gunnera/Nostoc* symbiosis.** *Planta* 1992;188(3):403–413.

Khamar HJ, Breathwaite EK, Prasse CE, Fraley ER, Secor CR, Chibane FL, Elhai J, Chiu W-L. **Multiple roles of soluble sugars in the establishment of *Gunnera-Nostoc* endosymbiosis.** *Plant Physiology.* 2010;154(3):1381–1389.

Khayatan B, Meeks JC, Risser DD. **Evidence that a modified type IV pilus-like system powers gliding motility and polysaccharide secretion in filamentous cyanobacteria.** *Molecular Microbiology.* 2015;98(6):1021–1036.

Kishimoto A, Takai Y, Mori T, Kikkawa U, Nishizuka Y. **Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover.** *Journal of Biological Chemistry.* 1980;255(6):2273–2276.

Knight CD, Adams DG. **A method for studying chemotaxis in nitrogen fixing cyanobacterium-plant symbioses.** *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 1996;49(2):73–77.

Krause GH, Weis E. **Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics.** *Annual Review of Plant Biology.* 1991;42(1):313–349.

Lane DJ. **16S/23S rRNA sequencing.** Stackebrandt E, Goodfellow M. (Ed.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* 1991; pp.115–175. Wiley. London.

Laqueur GL, Mickelsen O, Whiting MG, Kurland LT. **Carcinogenic properties of nuts from *Cycas circinalis* L. indigenous to Guam.** *Journal of National Cancer Institute.* 1963;31(4):919–951.

Lazaroff N. **Photoinduction and photoreversal of the nostocacean developmental cycle.** *Journal of Phycology.* 1966;2(1):7–17.

Lepoittevin JP, Benezra C, Asakawa Y. **Allergic contact dermatitis to *Ginkgo biloba* L.: relationship with urushiol.** *Archives of Dermatological Research.* 1989;281(4):227–230.

Liaimer A, Helfrich EJ, Hinrichs K, Guljamow A, Ishida K, Hertweck C, Dittmann E. **Nostopeptolide plays a governing role during cellular differentiation of the symbiotic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*.** *Proceedings of National Academy of Science, USA.* 2015;112(6):1862–1867.

Liaimer A, Jenke-Kodama H, Ishida K, Hinrichs K, Stangeland J, Hertweck C, Dittmann E. **A polyketide interferes with cellular differentiation in the symbiotic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*.** *Environmental Microbiology Reports.* 2011;3:550–558.

Lonetto M, Gribskov M, Gross CA. **The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships.** *Journal of Bacteriology.* 1992;174(12):3843–3849.

Long SR. ***Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective.** *Plant Cell.* 1996;8(10):1885–1898.

Markham KR, Sheppard C, Geiger H. **^{13}C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids.** *Phytochemistry*. 1987;26(12): 3335–3337.

Morgan RW, Hoffmann GR. **Cycasin and its mutagenic metabolites.** *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.* 1983;114(1):19–58.

Mori K. **Pheromone synthesis. Part 253: Synthesis of the racemates and enantiomers of triglycerides of male *Drosophila* fruit flies with special emphasis on the preparation of enantiomerically pure 1-monoglycerides.** *Tetrahedron*. 2012;*68*(40):8441–8449.

Muro-Pastor AM, Herrero A, Flores E. **Nitrogen-regulated group 2 sigma factor from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 involved in survival under nitrogen stress.** *Journal of Bacteriology*. 2001;183(3):1090–1095.

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. **Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.** *Applied and Environmental Microbiology.* 1993;59(3):695–700.

Nickelsen J, Rengstl B, Stengel A, Schottkowski M, Soll J, Ankele E. **Biogenesis of the cyanobacterial thylakoid membrane system–an update.** *FEMS Microbiology Letters.* 2011;315(1):1–5.

Nilsson M, Rasmussen U, Bergman B. **Cyanobacterial chemotaxis to extracts of host and nonhost plants.** *FEMS Microbiology Ecology.* 2006;55(3):382−390.

Nishida K, Kobayashi A, Nagahama T. **Studies on cycasin, a new toxic glycoside, of *Cycas revoluta* thunb: Part 1. Isolation and the structure of cycasin.** *Bulletin of Agricultural Chemical Society of Japan*. 1955;19(1):77–84.

Nishizuka H, Hashidoko Y. **Comparison of nostocean hormogonium induction and its motility on solid plates made of two gelling materials, agar and gellan gum, at alternative concentrations.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* (2018) on line published.

Nishizuka Y. **Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.** *Science.* 1992;258(5082):607–614.

Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. **PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria.** *Applied and Environmental Microbiology.* 1997;63(8):3327–3332.

Oltmanns U, Issa R, Sukkar MB, John M, Chung KF. **Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells.** *British Journal of Pharmacology.* 2003;139(6):1228–1234.

Otero A, Vincenzini M. **Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity.** *Journal of Biotechnology.* 2003;102(2):143–152.

Peters GA, Meeks JC. **The *Azolla-Anabaena* symbiosis: basic biology.** *Annual Review of Plant Biology*. 1989;*40*(1): 193–210.

Peters NK, Frost JW, Long SR. **A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes.** *Science.* 1986;233(4767):977–980.

Rai AN, Soderback E, Bergman B. **Cyanobacterium-plant symbioses.** *New Phytologist.* 2000;147(3):449–480.

Rasmussen U, Johansson C, Bergman B. **Early communication in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis: plant-induced cell differentiation and protein synthesis in the cyanobacterium.** *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 1994;7(6):696–702.

Rikkinen J, Virtanen V. **Genetic diversity in cyanobacterial symbionts of thalloid bryophytes.** *Journal of Experimental Botany.* 2008, 59(5), 1013–1021.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. **Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria.** *Journal of General Microbiology.* 1979;111(1):1–61.

Sakaguchi K, Okino N, Sueyoshi N, Izu H, Ito M. **Cloning and expression of gene encoding a novel endoglycoceramidase of *Rhodococcus* sp. strain C9.** *Journal of Biochemistry.* 2000;128(1):145–152.

Shungu D, Valiant M, Tutlane V, Weinberg E, Weissberger B, Koupal L, Gadebusch H, Stapley E. **GELRITE as an agar substitute in bacteriological media.** *Applied and Environmental Microbiology.* 1983;46(4):840–845.

Sitepu IR, Aryanto, Hashidoko Y, Turjaman M. **Application of phytohormone-producing rhizobacteria to improve the growth of *Aquilaria* sp. seedlings in the nursery.** *Proceeding of Gaharu Workshop, Development of Gaharu Production Technology, A Forest Community Based Environment*. 2010;7(2):67–77.

Shungu D, Valiant M, Tutlane V, Weinberg E, Weissberger B, Koupal L, Gadebusch H, Stapley E. **GELRITE as an agar substitute in bacteriological media.** *Applied and Environmental Microbiology.* 1983;46(4):840–845.

Splitt SD, Risser DD. **The non-metabolizable sucrose analog sucralose is a potent inhibitor of hormogonium differentiation in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*.** *Archives of Microbiology.* 2016;198(2):137–147.

Sui Y, Li S, Shi P, Wu Y, Li Y, Chen W, Huang L, Yao H, Lin X. **Ethyl acetate extract from *Selaginella doederleinii* Hieron inhibits the growth of human lung cancer cells A549 via caspase-dependent apoptosis pathway.** *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;190:261–271.

Sui Y, Yao H, Li S, Jin L, Shi P, Li Z, Wang G, Lin S, Wu Y, Huang L, Liu Q, Lin X. **Delicaflavone induces autophagic cell death in lung cancer via Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway.** *Journal of Molecular Medicine*. 2017;95(3):311–322.

Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y. **Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1979;91(4):1218–1224.

Tallman KA, Kim HYH, Ji JX, Szapacs ME, Yin H, McIntosh TJ, Porter NA. **Phospholipid-protein adducts of lipid peroxidation: synthesis and study of new biotinylated phosphatidylcholines.** *Chemical Research in Toxicology* 2007;20(2): 227–234.

Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, Kamagata Y. **Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques.** *Applied and Environmental Microbiology.* 2005:71(4):2162–2169.

Vessey JK, Pawlowski K, Bergman B. **Root-based N_2-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. In Root Physiology.** *Plant and Soil.* 2005;274(1–2):51–78.

Vida TA, Emr SD. **A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast.** *Journal of Cell Biology.* 1995;128(5):779–792.

Vigil-Stenman T, Larsson J, Nylander JA, Bergman B. **Local hopping mobile DNA implicated in pseudogene formation and reductive evolution in an obligate cyanobacteria-plant symbiosis.** *BMC Genomics*. 2015;*16*(1):193.

Weissmann G, Azaroff L, Davidson S, Dunham P. **Synergy between phorbol esters, 1-oleyl-2-acetylglycerol, urushiol, and calcium ionophore in eliciting aggregation of marine sponge cells.** *Proceeding of the National Academy Science.* 1986;83(9):2914–1918.

Zhang G, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hurley JH. **Crystal structure of the Cys2 activator-binding domain of protein kinase Cδ in complex with phorbol ester.** *Cell.* 1995;81(6):917–924.

Zuanazzi JAS, Clergeot PH, Quirion J, Husson H, Kondorosi A, Ratet P. **Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots.** *Molecular Plant–Microbe Interactions.* 1998;11(8):784–794.

園田純寛 ：**「スカンジナビア北方林におけるコケ植物–シアノバクテリア間相互作用に関する研究」**北海道大学大学院農学院　応用生物科学専攻　生態化学研究室，修士論文 (2011 年 3 月).

田中慎人 ：**「ソテツサンゴ状根に含まれるシアノバクテリア分化誘導因子の探索」**北海道大学大学院農学院　応用生物科学専攻　生態化学生物学研究室，修士論文 (2012 年 3 月).

橋床泰之 ：**「ジェランガムと *Sphingomonas* 属細菌の機能性」**温古知新 (2017);54:77–84.

Appendix

目次

Fig. S1.1	*Pleurozium schreberi* 葉片共生シアノバクテリアの蛍光顕微鏡検鏡画像	i
Fig. S1.2	寒天包埋法による *Pleurozium schreberi* 垂直断面切片の作成	ii
Fig. S3.1	2 種類のゲル剤の各濃度におけるホルモゴニア数計測に用いた検鏡画像	iii
Fig. S3.2	2 種類のゲル培地上の *Nostoc* sp.のコントロール区の検鏡画像	ix
Fig. S3.3	ジェランガムゲル培地上の *Nostoc* sp.のホルモゴニア分化誘導処理 24 時間後の検鏡画像	x
Fig. S4.1	1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル	xi
Fig. S4.2	1-palmitoyl-2-oleoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル	xi
Fig. S4.3	1-myristoyl-2-linoleoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル	xii
Fig. S4.4	1-linoleoyl-2-palmitoyl glycerol の ^{1}H-NMR スペクトル	xii
Fig. S4.5	1-stearoyl-2-linolenoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル	xiii
Fig. S5.1	アナカルド酸アルコールエステル誘導体の FD-MS スペクトル	xiv
Fig. S6.1	compound 1 の二次元 NMR スペクトル	xv
Fig. S6.2	compound 2 の二次元 NMR スペクトル	xx
Fig. S6.3	compound 3 の二次元 NMR スペクトル	xxiv

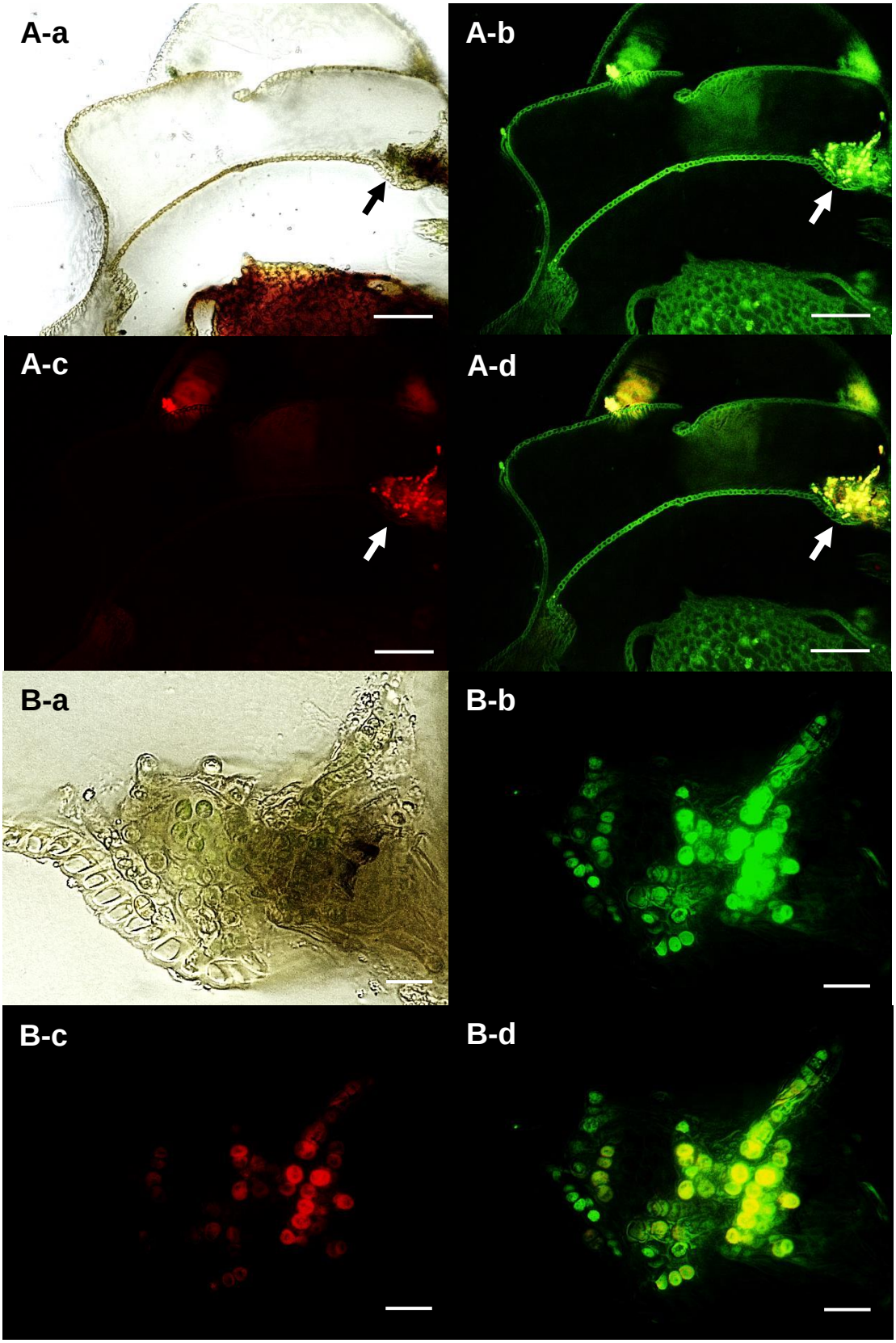

A-a
A-b
A-c
A-d
B-a
B-b
B-c
B-d

Fig. S1.1　*Pleurozium schreberi* 葉片共生シアノバクテリアの蛍光顕微鏡検鏡画像

Fig. S1.2 に記載した手法に従って，寒天包埋処理した葉片から葉の垂直断面の切片を作成し，検鏡したものである。脂質二重膜蛍光染色試薬にはスチリル色素 FM4-64 (Life Technologies, Carlsbad, US) を用いている (Vida *et al*., 1995) 。この蛍光試薬により染色した試料は，TRITC 蛍光フィルター (*Ex.* 525-545 nm, *Em.* 605-670 nm) を用いて検鏡し，緑色に疑似染色している。A) 葉片垂直断面全体を×20 の対物レンズを用いて検鏡している。a) 明視野，b) 脂質二重膜染色試薬 FM4-64 による染色 (TRITC) ，c) シアノバクテリアの自家蛍光 (Cy5) ，d) b, c のマージ画像，bar size : 100 µm　B) A の葉片垂直断面のうち，共生シアノバクテリアの着生が観察された部分 (A，矢印) を高倍率 (×100) で検鏡している。a) 明視野，b) 脂質二重膜染色試薬 FM4-64 による染色 (TRITC) ，c) シアノバクテリアの自家蛍光 (Cy5) ，d) b, c のマージ画像，bar size : 20 µm

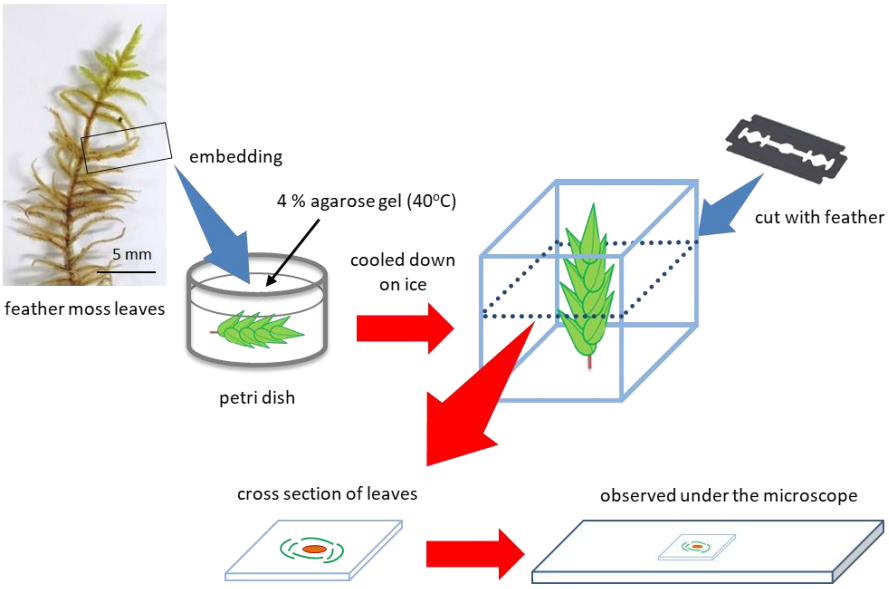


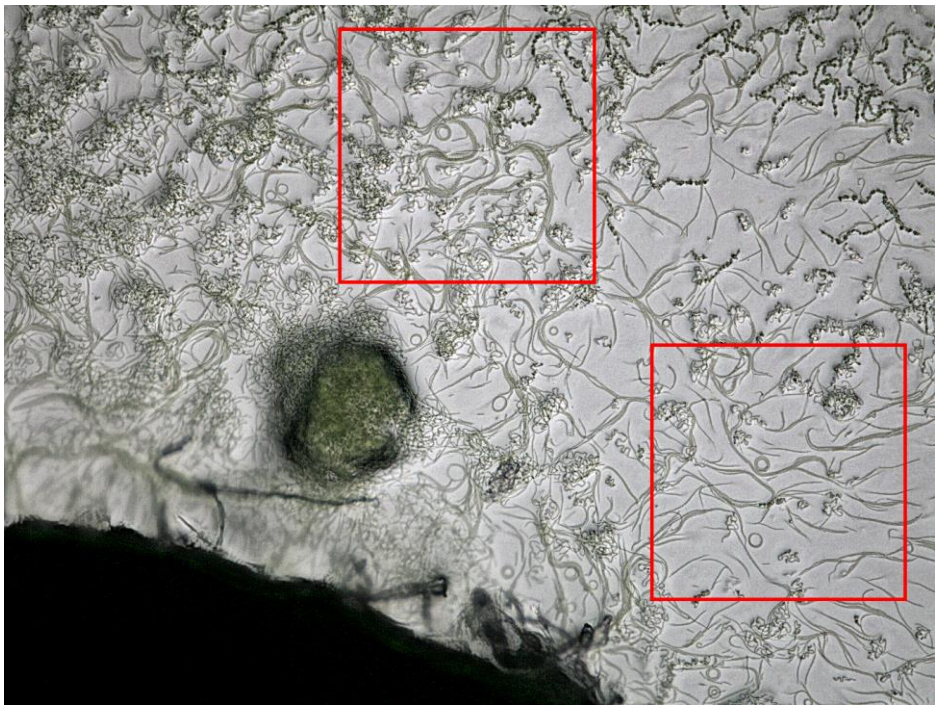
Fig. S1.2　寒天包埋法による *Pleurozium schreberi* 垂直断面切片の作成

4 %アガロースゲルを電子レンジで 1 分間加熱し，融解したゲル液を petri dish に流し込む。これを室温で 35-40°C まで冷却した後，気泡が入らないよう注意しながら，ピンセットでゲル内にフェザーモス葉片を挿入，包埋する。その後プレートを氷上で冷やし、完全に固まった後にカミソリを用いて厚さ約 0.5 mm の切片を作成し，蛍光顕微鏡下での観察に供する。

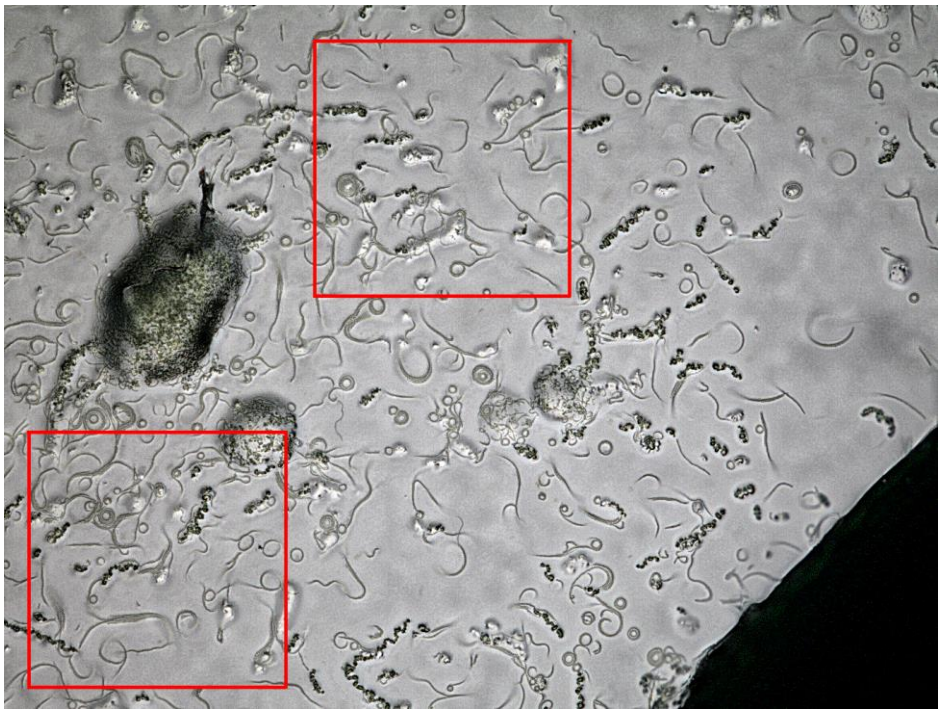
agar 0.6%



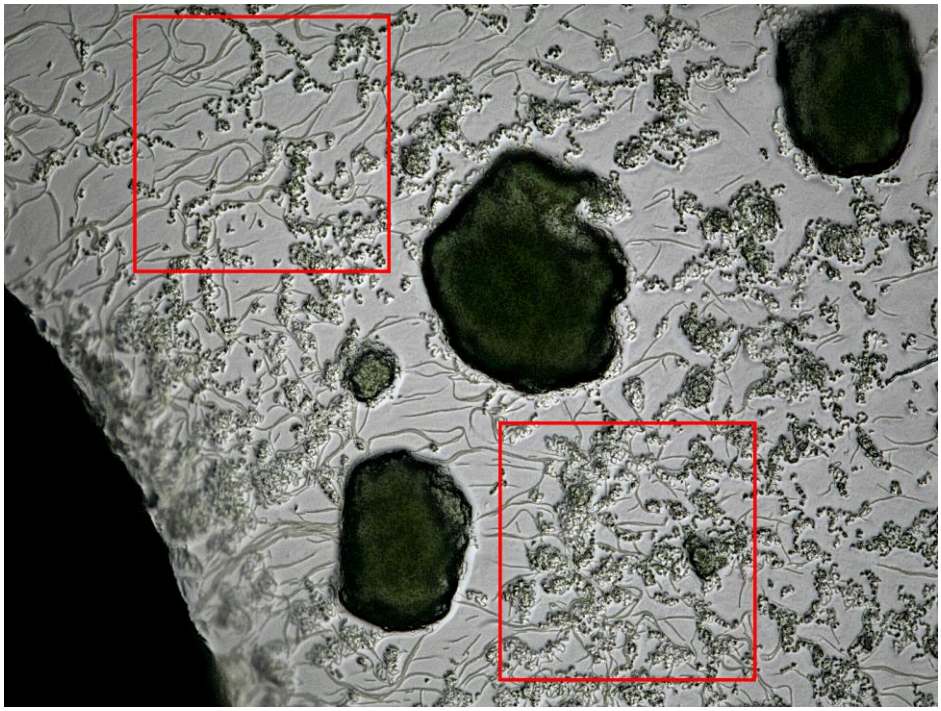
agar0.8%



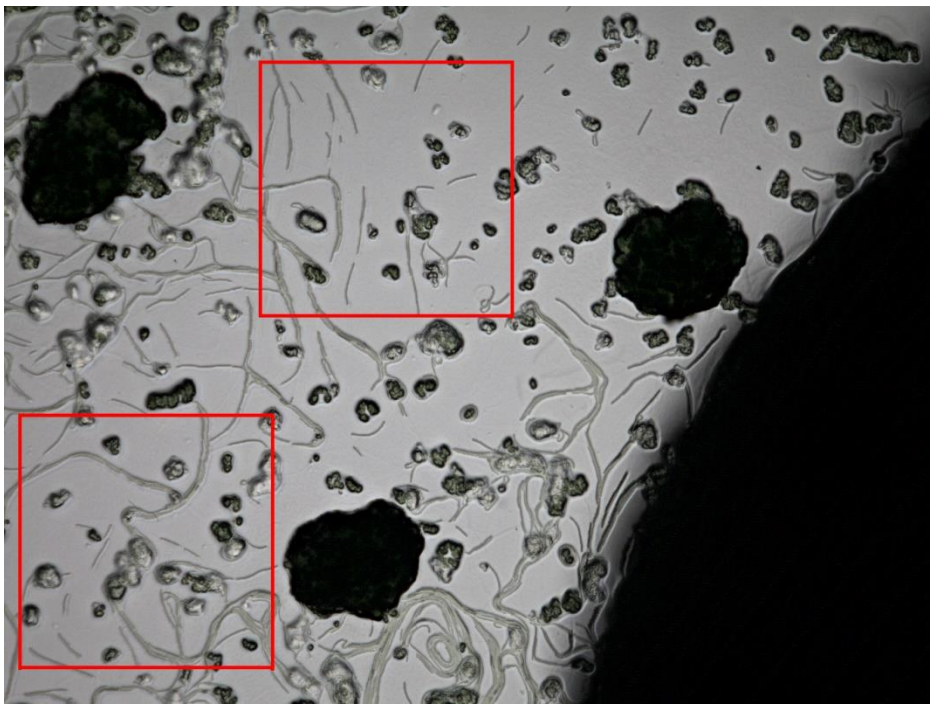
agar1.0%



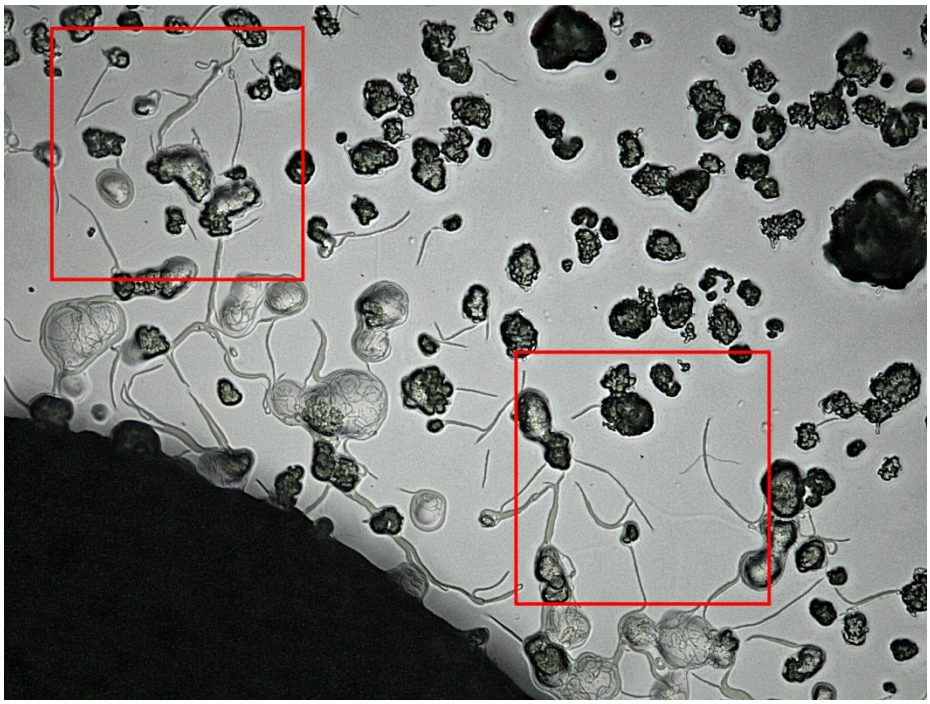
agar1.2%



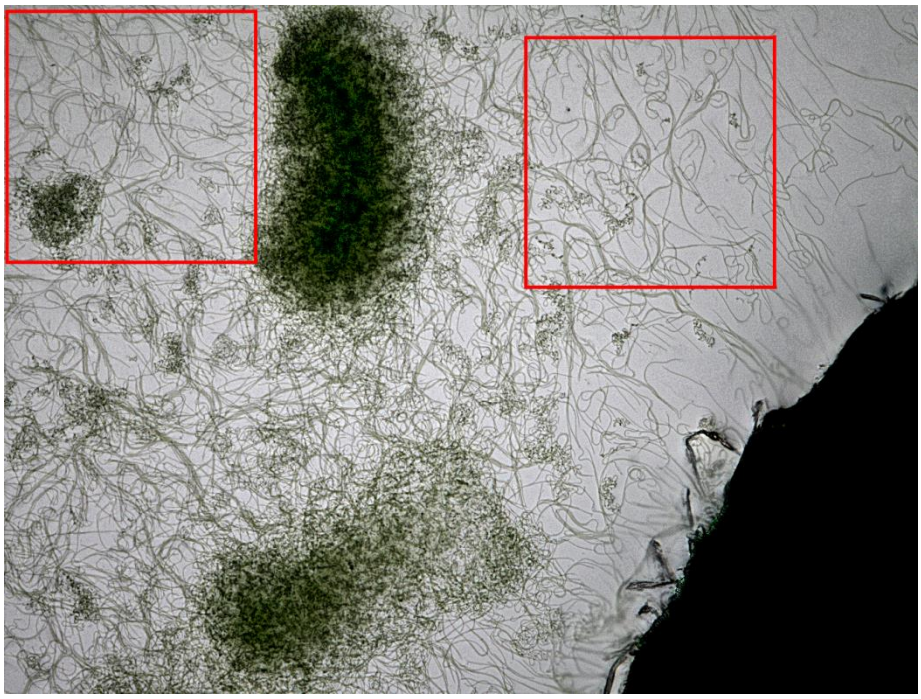
agar1.4%



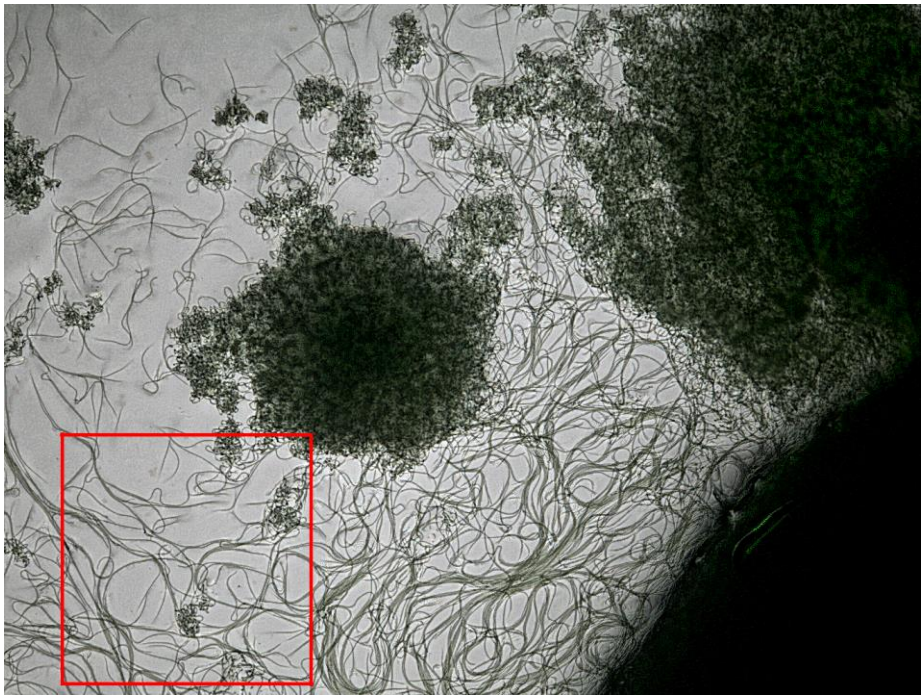
agar1.6%



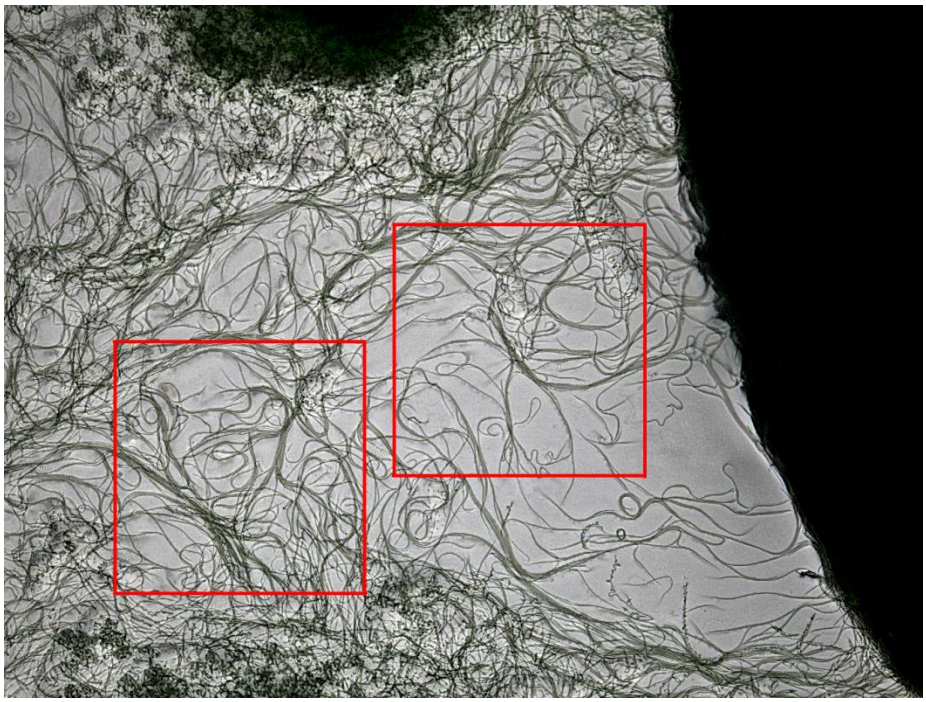
gellan0.6%



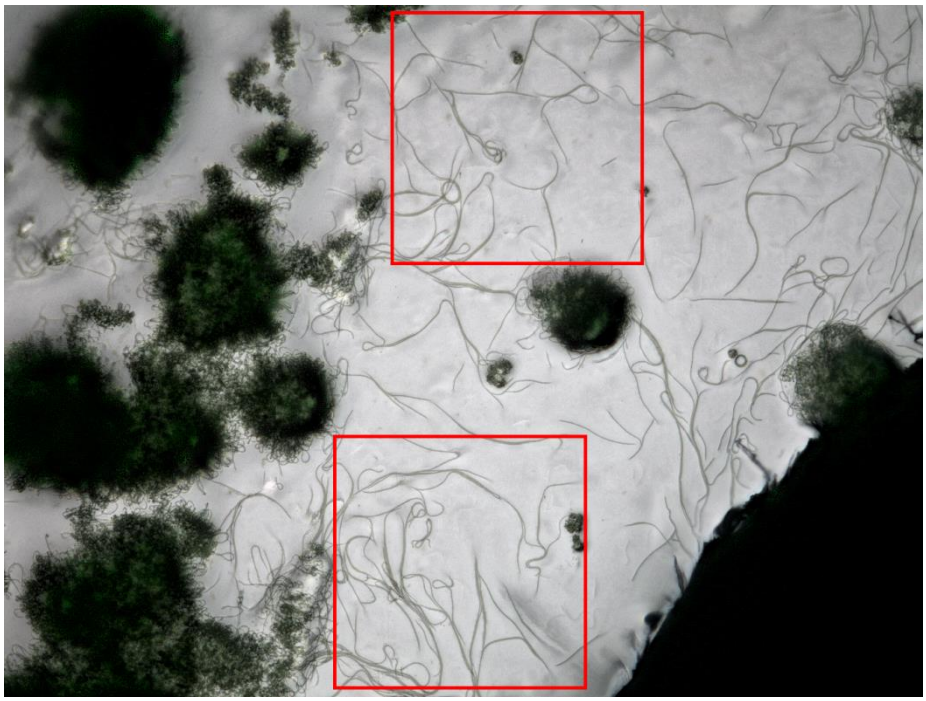
gellan0.8%



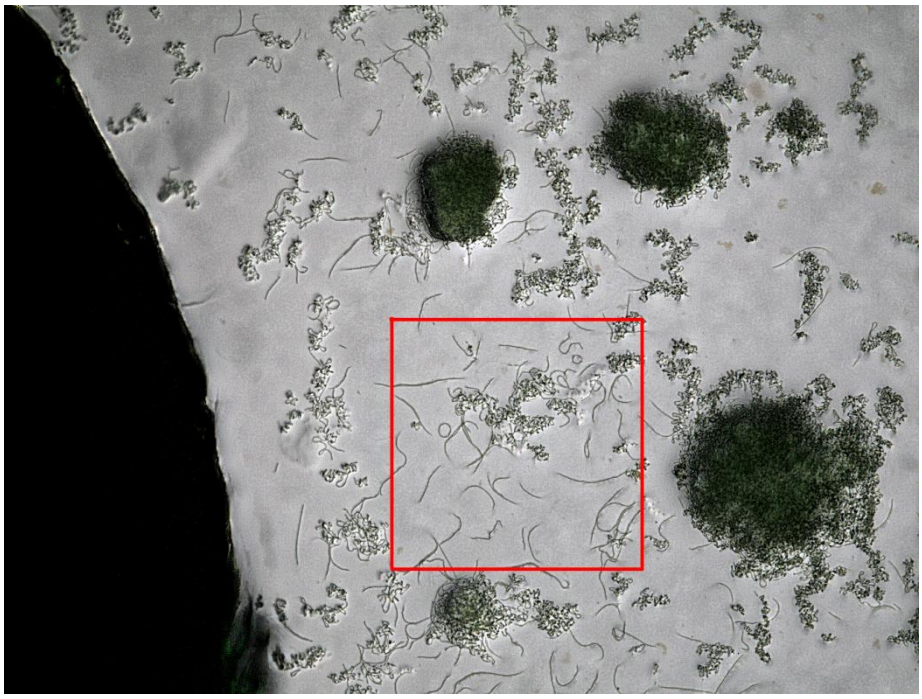
gellan1.0%



gellan 1.2%



gellan 1.4%



gellan 1.6%

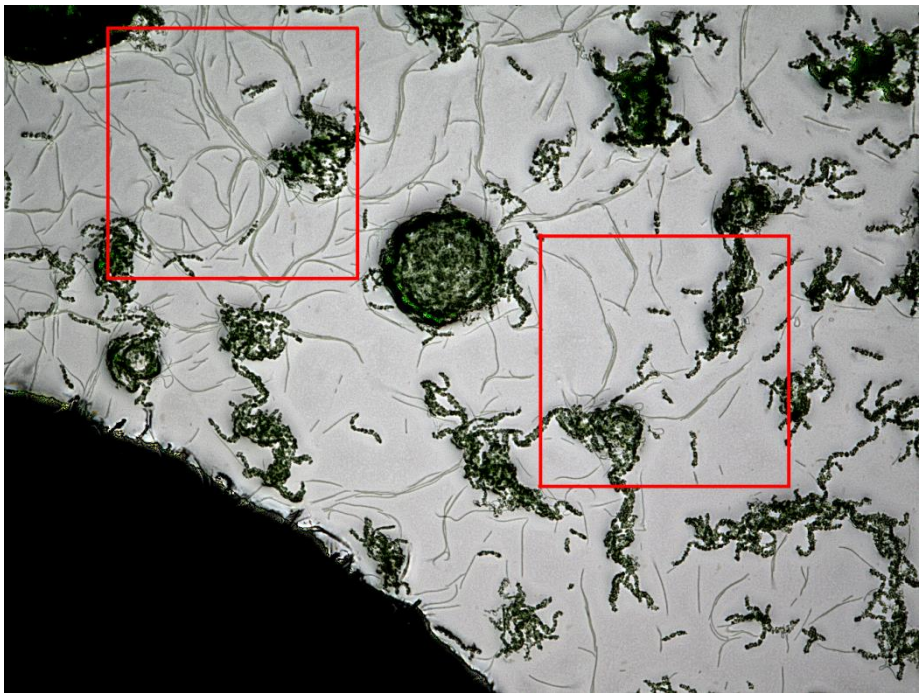


Fig. S3.1　2 種類のゲル剤の各濃度におけるホルモゴニア数計測に用いた検鏡画像

ホルモゴニア分化誘導処理後 24 時間経過時の検鏡画像を計測に用いている。1 mm^2 の正方形を無作為に作成し，正方形内のホルモゴニア数を計測し活性力価の指標としている。

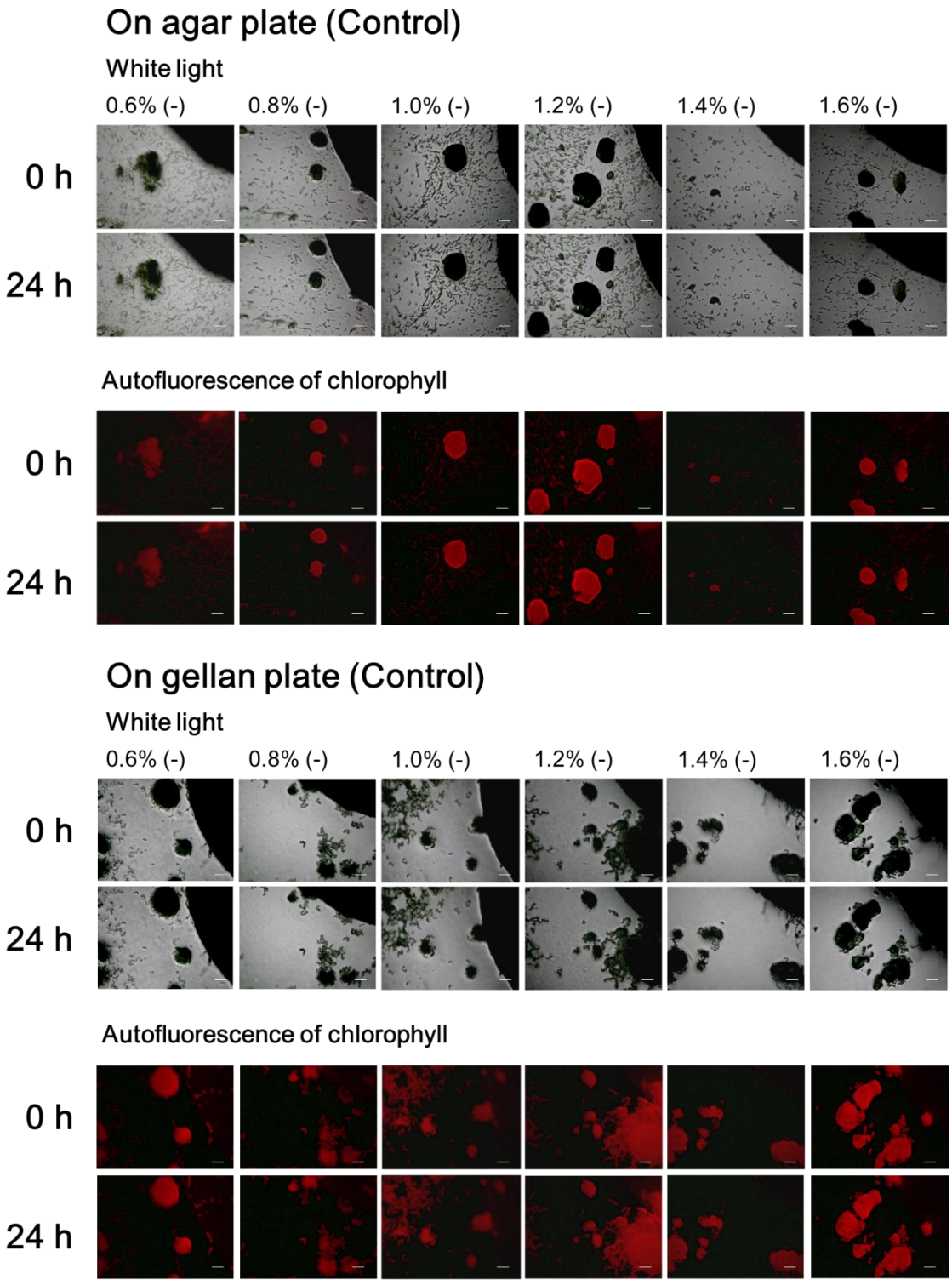


Fig. S3.2　2 種類のゲル培地上の *Nostoc* sp.のコントロール区の検鏡画像

control 区における 24 時間以内の寒天およびジェランガムゲル平板でのペーパーディスク周辺の菌体の挙動を定点観測した。菌体の自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を用いて観測した。scale bar, 300 μm

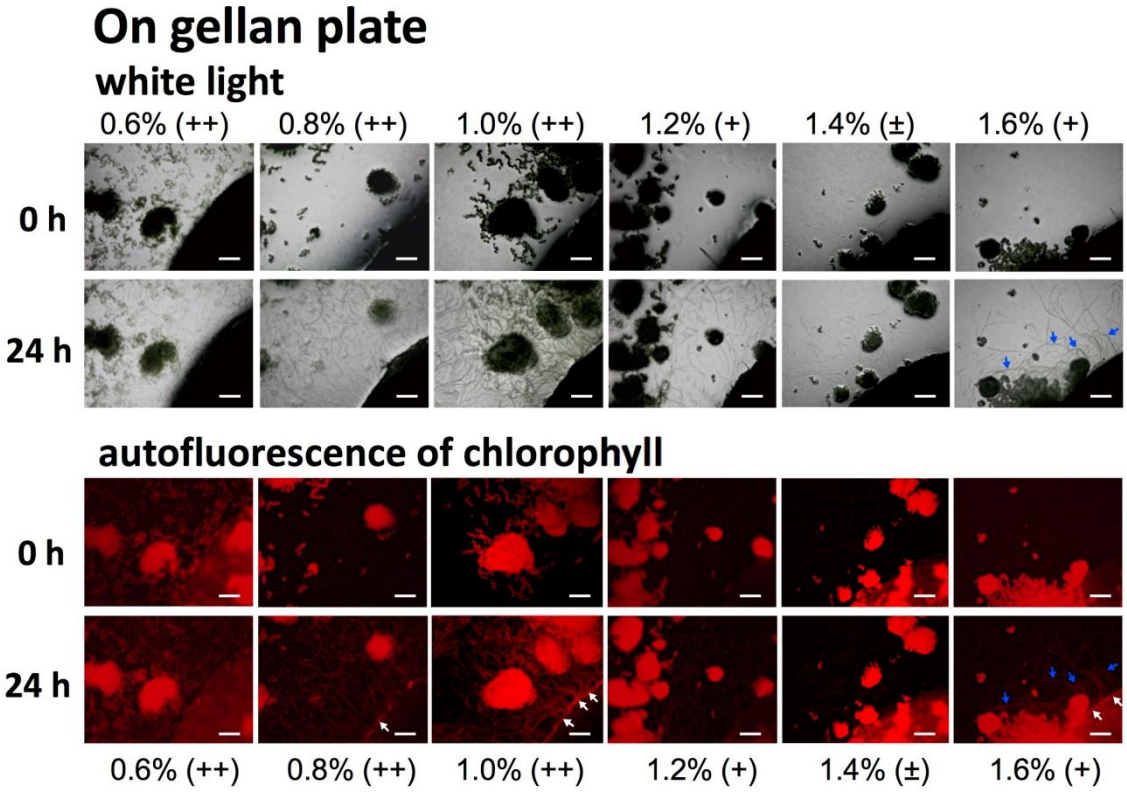


Fig. S3.3　ジェランガムゲル培地上の *Nostoc* sp.のホルモゴニア分化誘導処理 24 時間後の検鏡画像

anacardic acid C 15:1-Δ^8 decyl ester (100 nmol/disc) で処理後，24 時間後のジェランガムゲル平板での菌体の応答を定点観測している。菌体の自家蛍光は Cy5 蛍光フィルター (*Ex.* 620-660 nm, *Em.* 700-775 nm) を用いて観測している。0.8~1.0%ジェランガム上では，ペーパーディスクに沿うようにバンドル状のホルモゴニアが観測され (白矢印)，1.6%ジェランガム上でもバンドル状のホルモゴニアが観測されている (青矢印)。scale bar, 300 µm

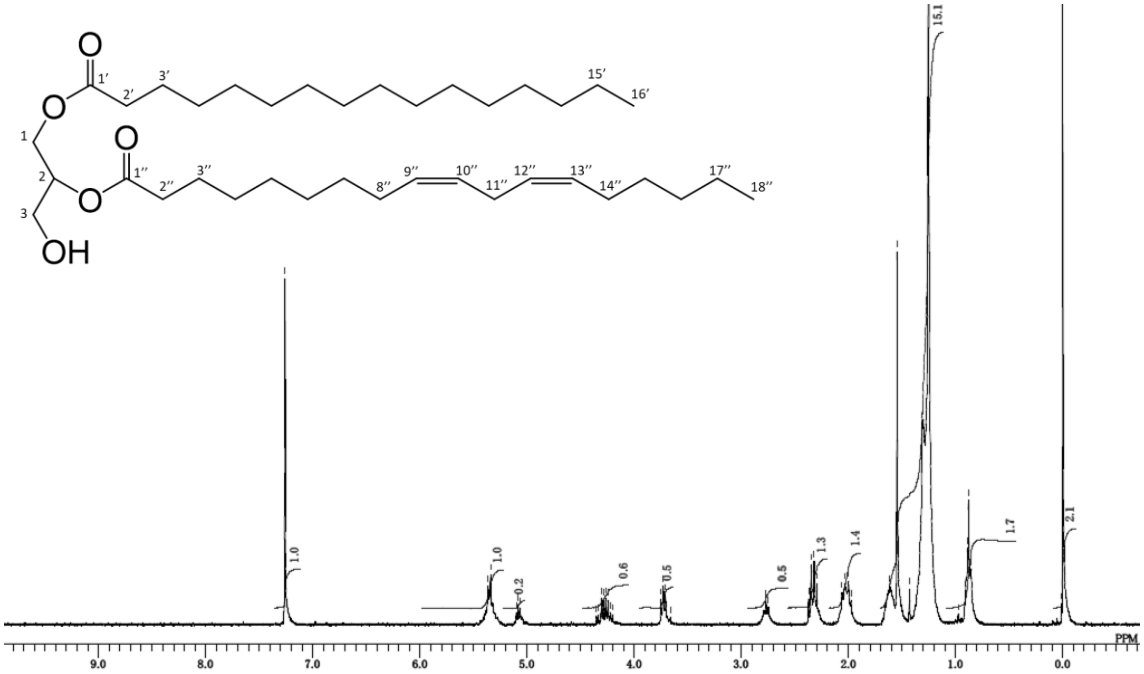


Fig. S4.1　1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル

^{1}H-NMR spectrum (270 MHz,$CDCl_3$), δ_H 5.35 (4H,br. m, H-9'', 10'', 12'', 13''), 5.08 (1H, ddd, *J* = 5.6, 5.4, 4.6 Hz, H-2), 4.29 (2H, dd, *J* = 11.9, 5.4 Hz, H-1), 3.73 (2H, d, *J* = 5.1 Hz, H-3), 2.73 (2H, m, *J* = 5.7 Hz, H-11''), 2.35 (4H, m, H-2', 2''), 2.03 (4H, q, *J* = 7.3 Hz, H-8'', 14''), 1.61 (4H, m, H-3', 3''), 1.31 (12H, m, H-4', 14', 15', 4'', 16'', 17''), 1.25 (26H, m, H-5'-13', 5''-7'', 14''), 0.88 (6H, m, H-16'', 18'')

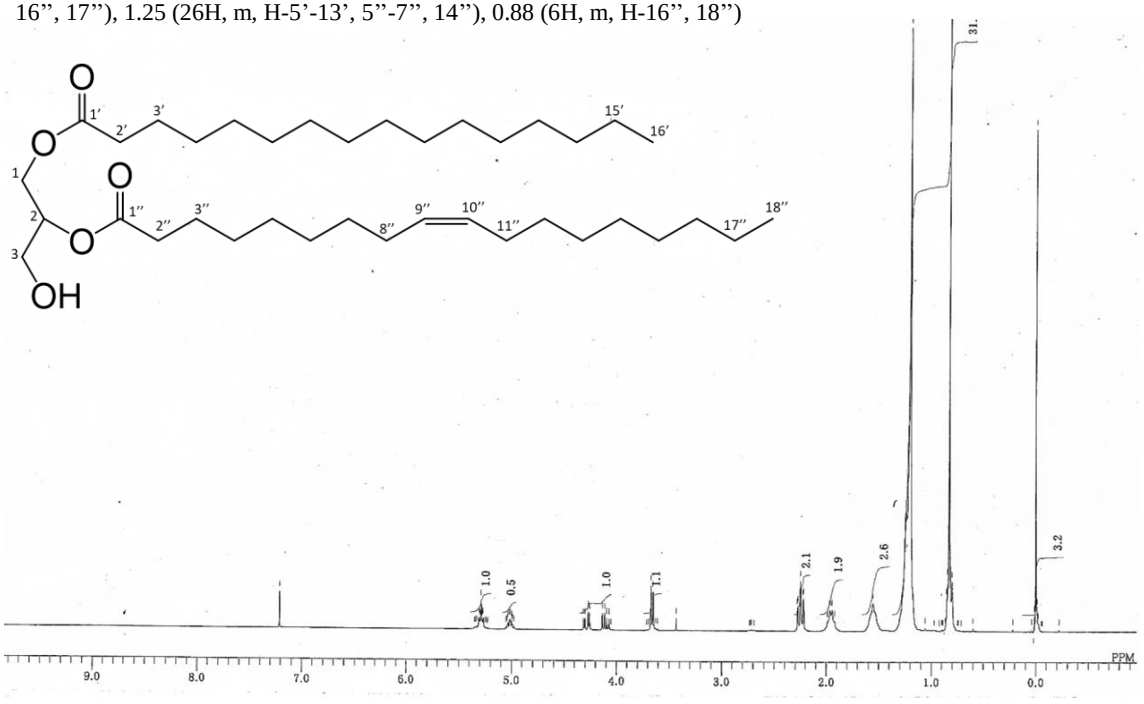


Fig. S4.2　1-palmitoyl-2-oleoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル

^{1}H-NMR spectrum (270 MHz,$CDCl_3$), δ_H 5.30 (2H, m, H-9'', 10''), 5.03 (1H, m, H-2), 4.19 (2H, ddd, *J* = 2.7, 17.6 Hz, H-1), 3.66 (2H, d, *J* = 5.4 Hz, H-3), 2.25 (4H, m, H-2', 2''), 1.96 (4H, m, H-8'', 11''), 1.55 (4H, m, H-3', 3''), 1.20 (44H, m, H-4'-17', 4''-7'', 12''-17''), 0.82 (6H, m, H-16'', 18'')

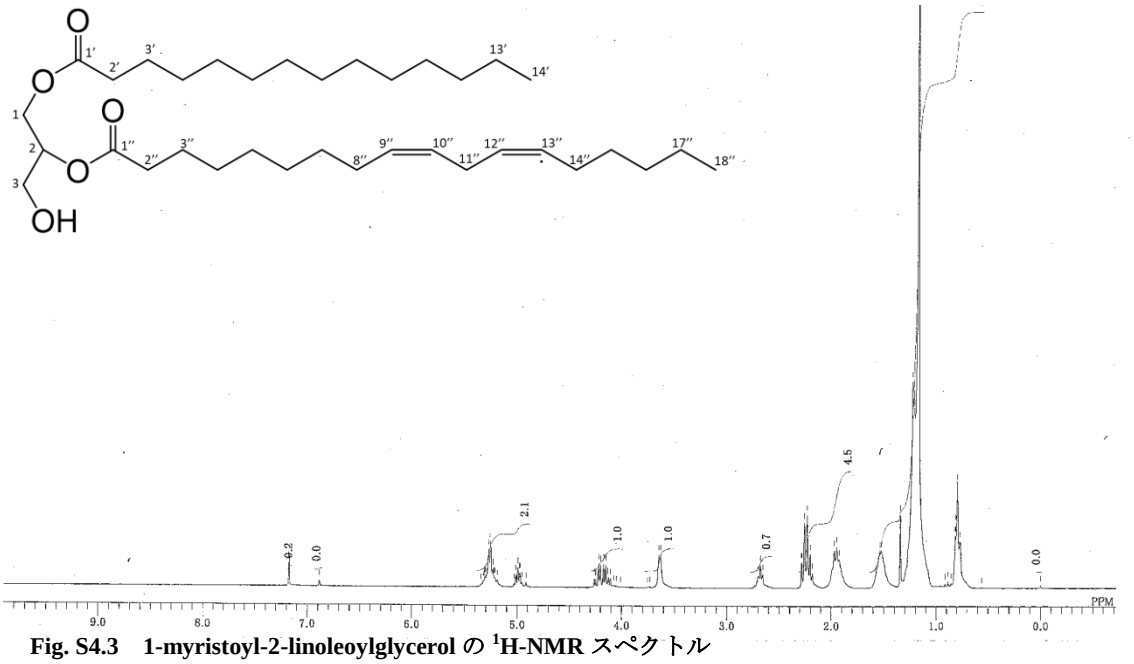


Fig. S4.3　1-myristoyl-2-linoleoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル

^{1}H-NMR spectrum (270 MHz,$CDCl_3$), δ_H 5.26 (4H, m, H-9’’, 10’’, 12’’, 13’’), 4.98 (1H, m, H-2), 4.15 (2H, ddd, *J* = 5.4, 6.8 Hz, H-1), 3.74 (2H, d, *J* = 2.7 Hz, H-3), 2.68 (2H, m, H-11’’), 2.23 (4H, m, H-2’, 2’’), 1.95 (4H, m, H-8’’, 14’’), 1.53 (4H, m, H-3’, 3’’), 1.34 (12H, m, H-4’, 12’, 13’, 4’’, 16’’, 17’’), 1.17 (22H, m, H-5’-11’, 5’’-7’’, 14’’), 0.81 (6H, m, H-14’’, 18’’)

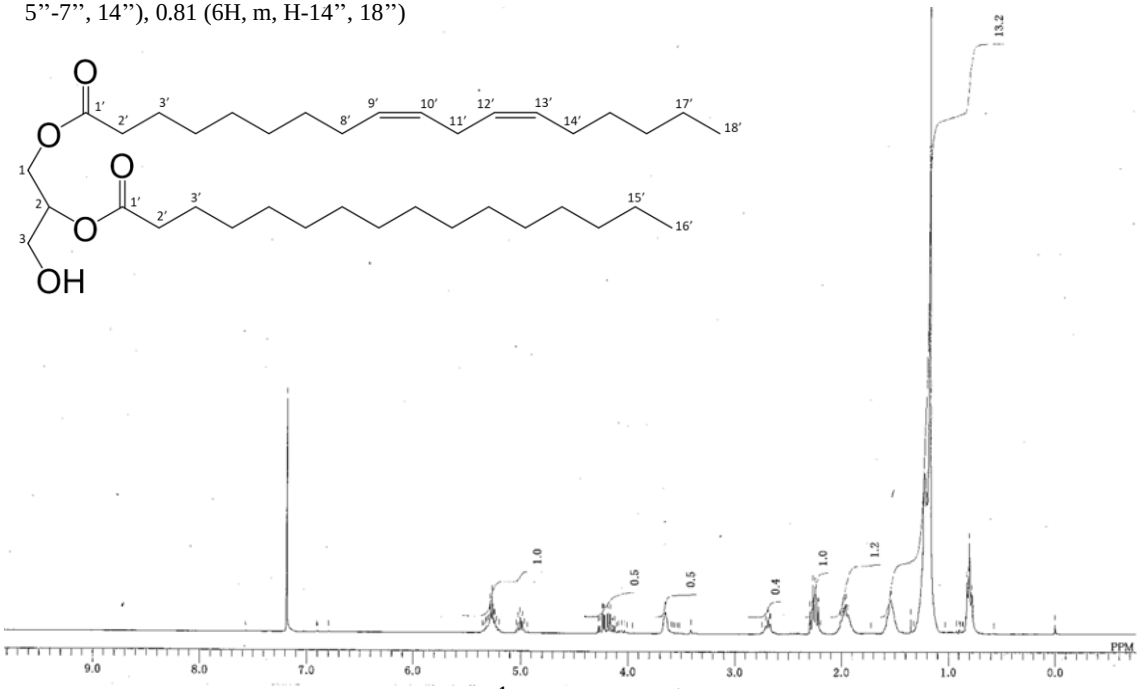


Fig. S4.4　1-linoleoyl-2-palmitoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル

^{1}H-NMR spectrum (270 MHz,$CDCl_3$), δ_H 5.28 (4H, m, H-9’, 10’, 12’, 13’), 5.03 (1H, m, H-2), 4.21 (2H, ddd, *J* = 8.1, 13.5 Hz, H-1), 3.65 (2H, m, H-3), 2.70 (2H, m, H-11’), 2.25 (4H, m, H-2’, 2’’), 1.97 (4H, m, H-8’, 14’), 1.54 (4H, m, H-3’, 3’’), 1.34 (12H, m, H-4’, 16’, 17’, 4’’, 14’’, 15’’), 1.23 (26H, m, H-5’-13’, 5’’-7’’, 14’’), 0.84 (6H, m, H-16’’, 18’’)

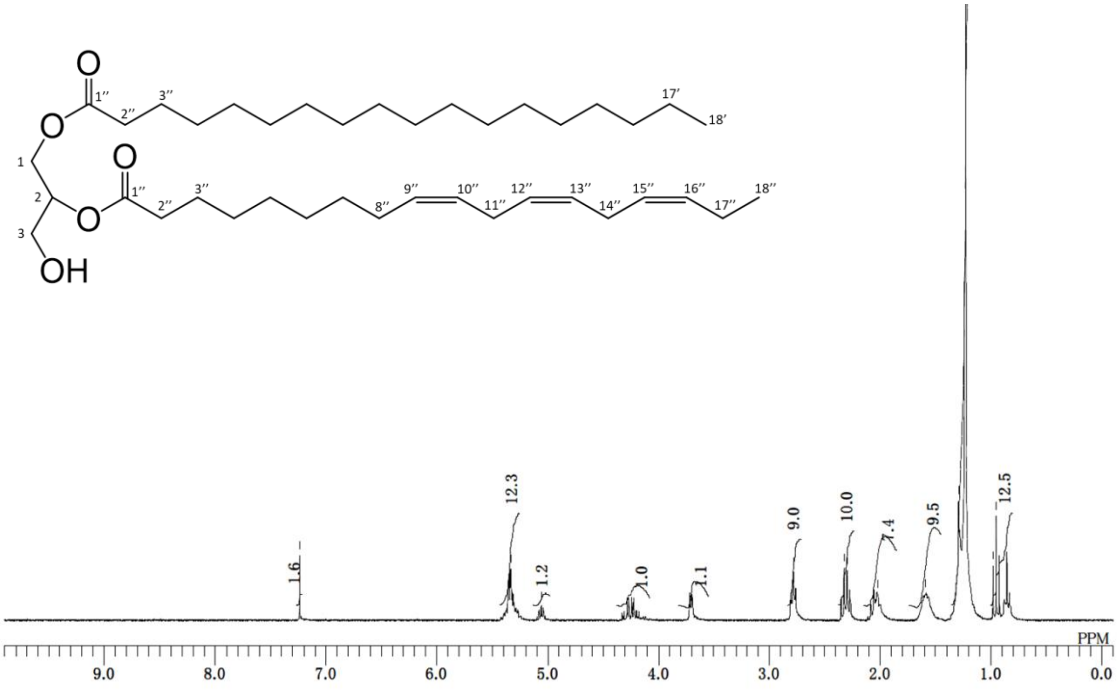
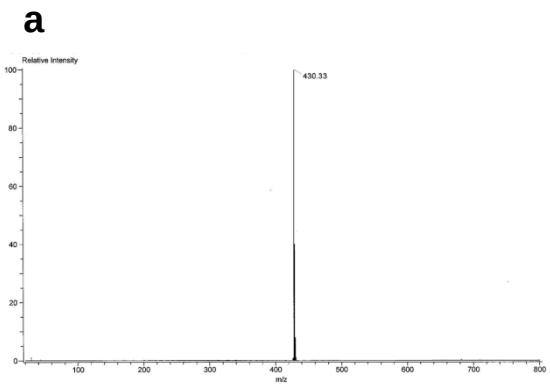
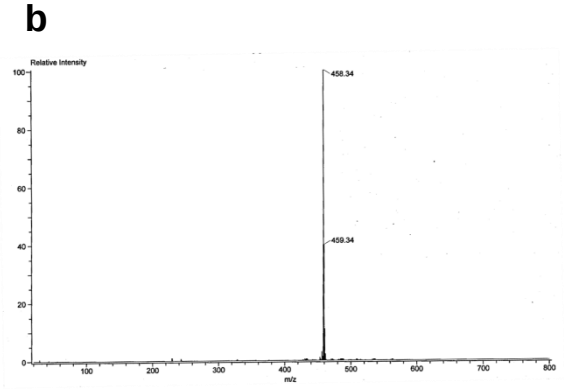


Fig. S4.5　1-stearoyl-2-linolenoylglycerol の ^{1}H-NMR スペクトル

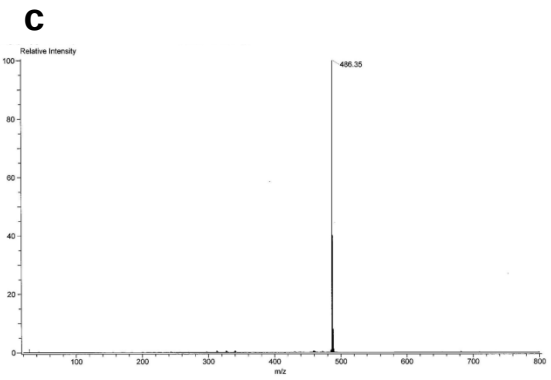
^{1}H-NMR spectrum (270 MHz,$CDCl_3$), δ_H 5.33 (6H, m, H-9’’, 10’’, 12’’, 13’’, 15’’, 16’’), 5.06 (1H, m, H-2), 4.23 (2H, m, H-1), 3.71 (2H, d, *J* = 5.4 Hz, H-3), 2.78 (4H, m, H-11’’, 14’’), 2.31 (4H, m, H-2’, 2’’), 2.02 (4H, m, H-8’’, 17’’), 1.59 (4H, m, H-3’, 3’’), 1.29 (8H, m, H-4’, 16’, 17’, 4’’), 1.23 (28H, m, H-5’-15’, 5’’-7’’), 0.95 (3H, t, *J* = 7.6 Hz, H-18’’), 0.86 (3H, m, H-18’)



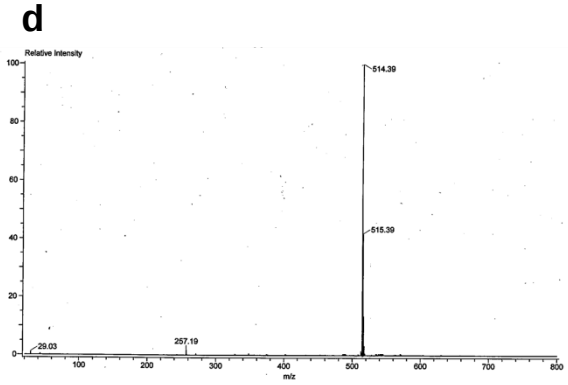
a : Δ^8-anacardic acid C15:1 hexyl ester



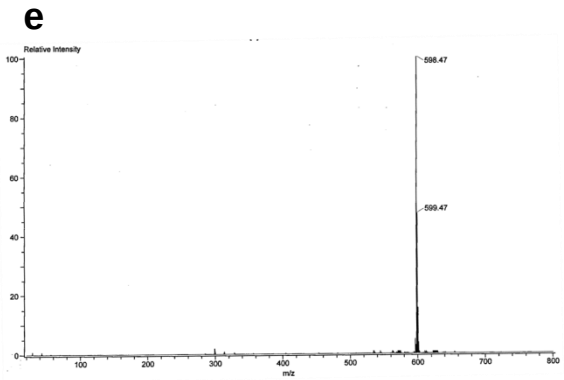
b : Δ^8-anacardic acid C15:1 octyl ester



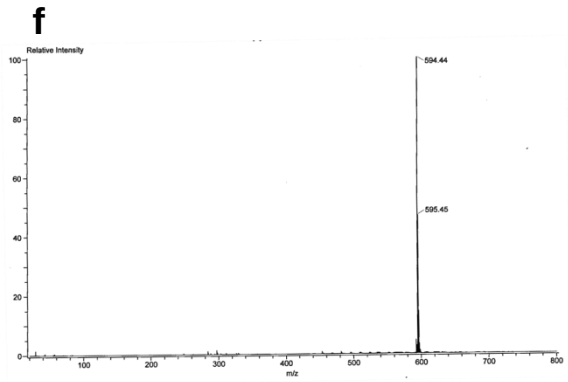
c : Δ^8-anacardic acid C15:1 decyl ester



d : Δ^8-anacardic acid C15:1 dodecyl ester



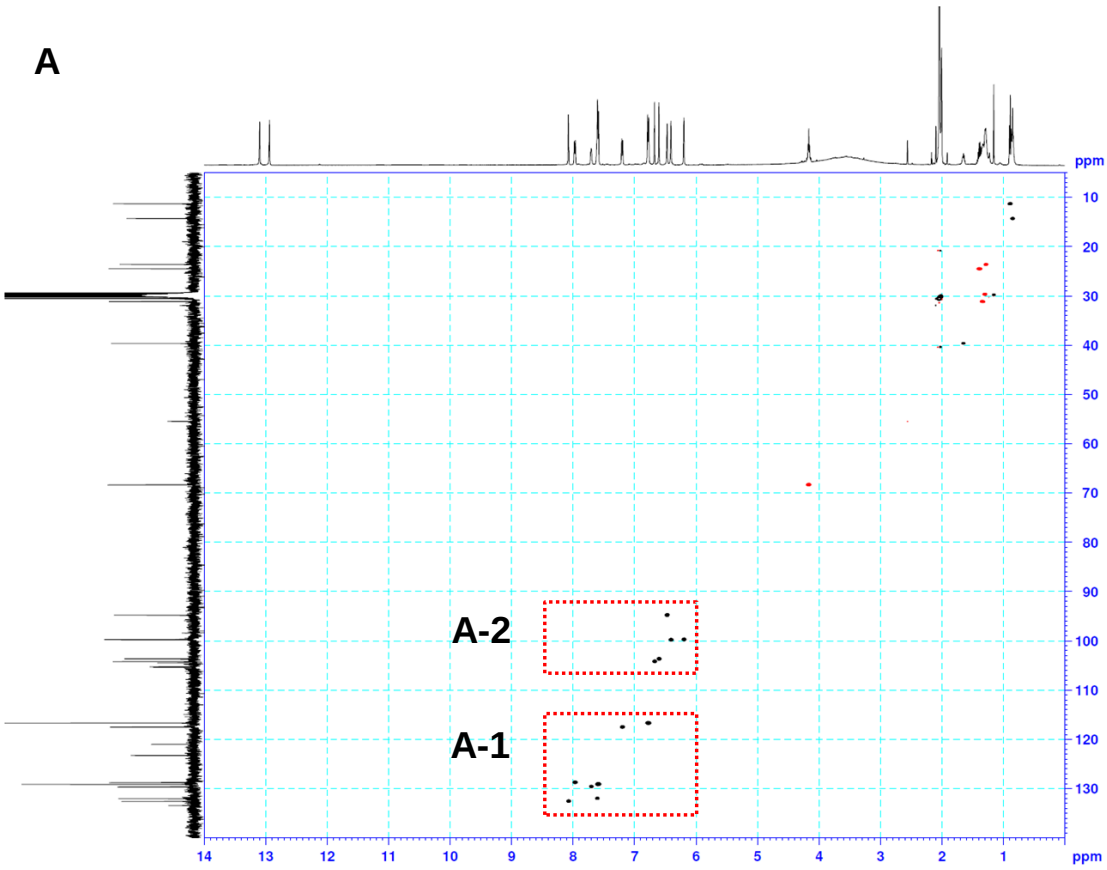
e : Δ^8-anacardic acid C15:1 stearyl ester



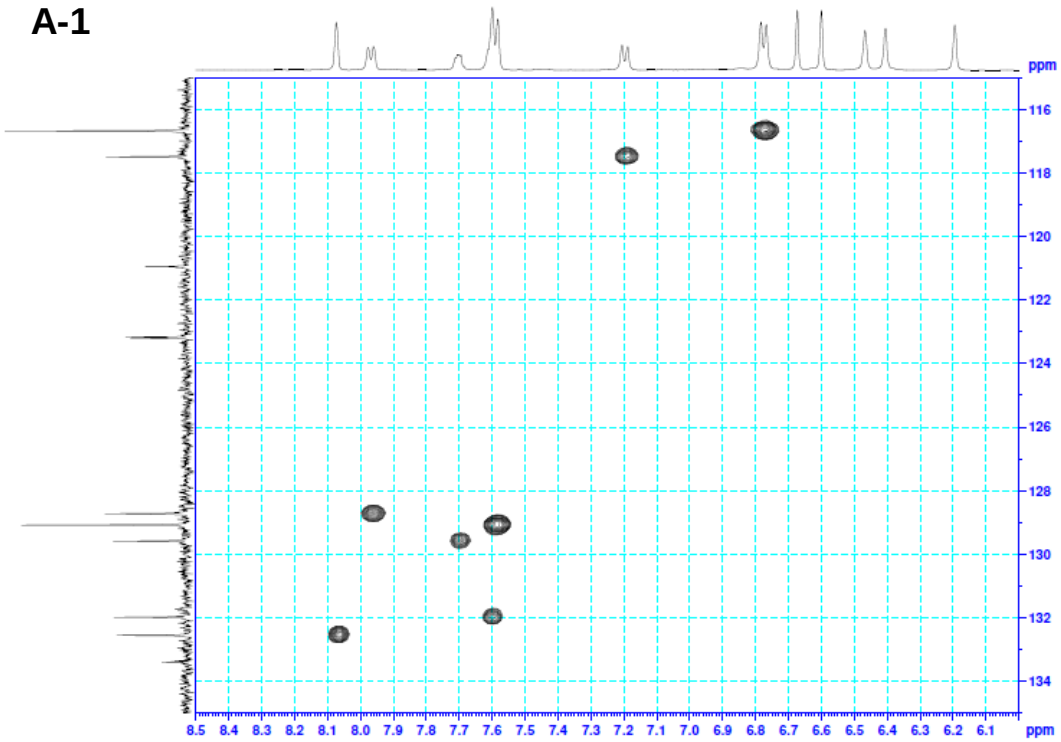
f : Δ^8-anacardic acid C15:1 linoleyl ester

Fig. S5.1　アナカルド酸アルコールエステル誘導体の FD-MS スペクトル

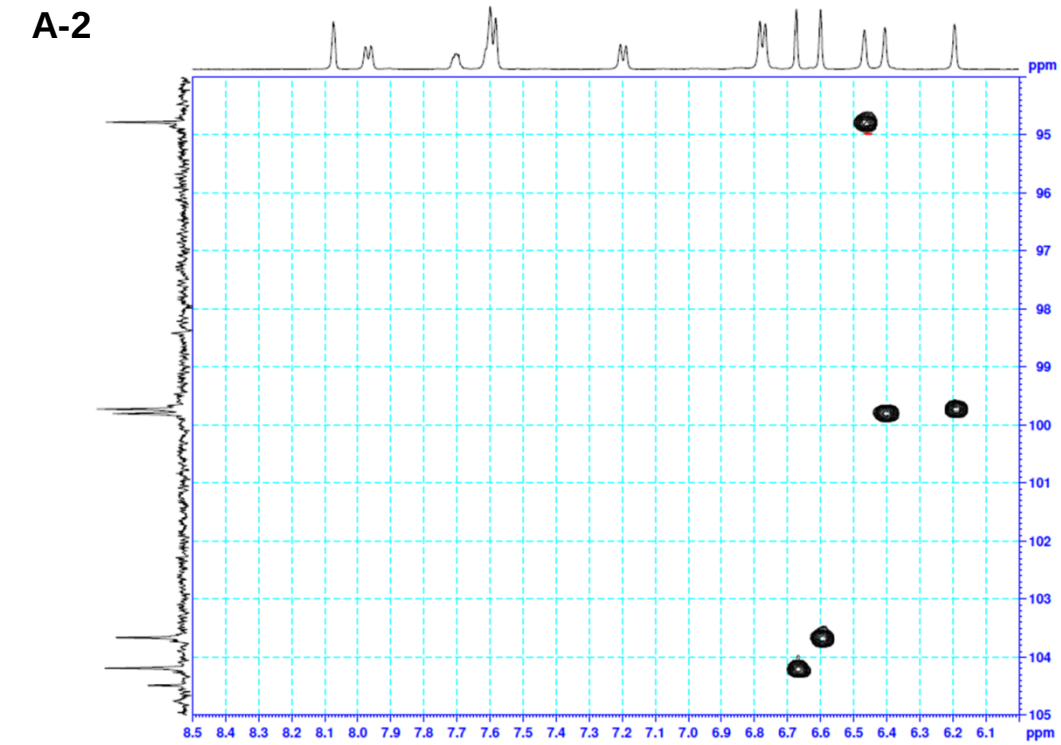
^{1}H-^{13}C HSQC (compound 1)



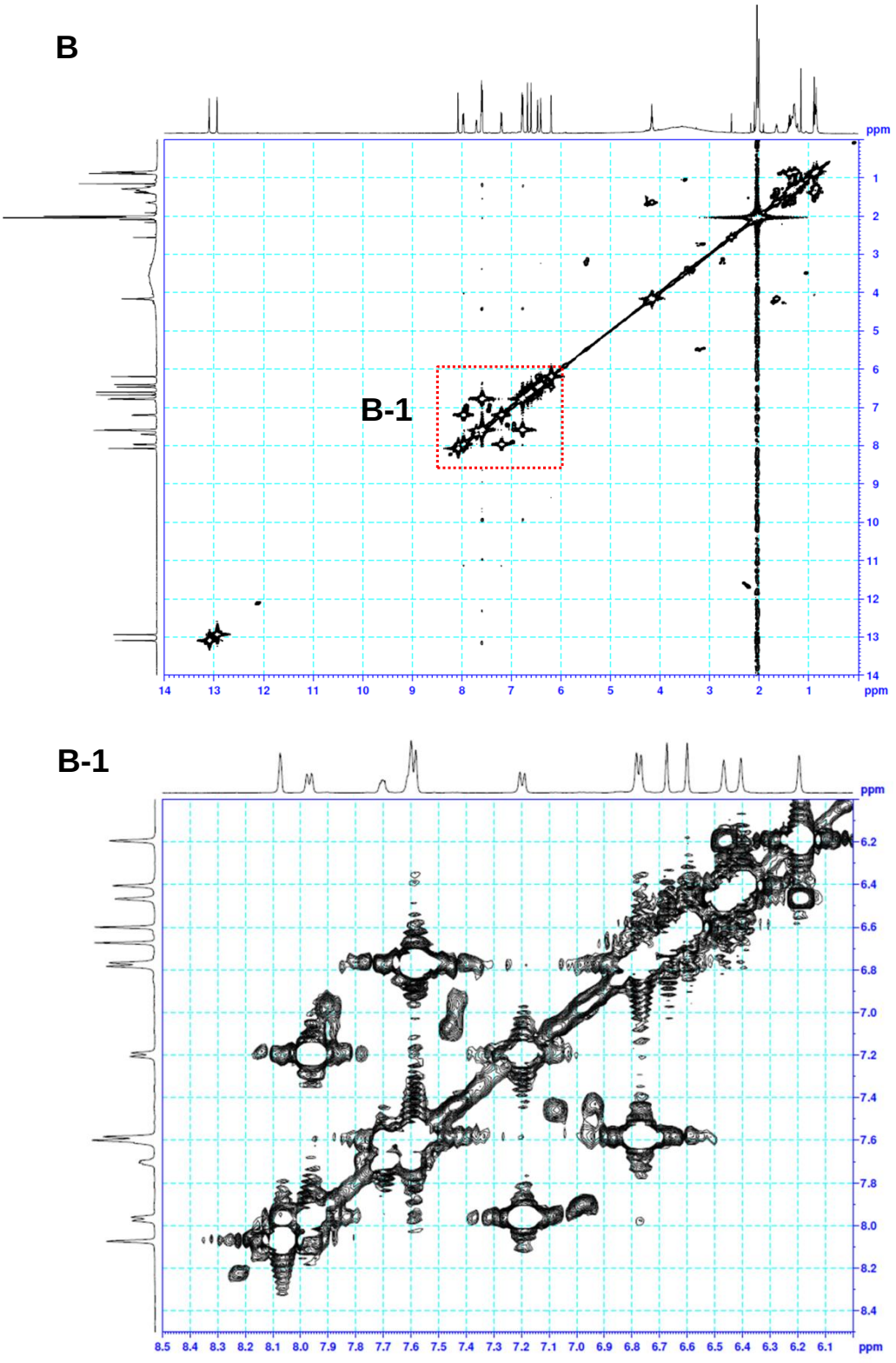
A-1


ppm
116
118
120
122
124
126
128
130
132
134
8.5 8.4 8.3 8.2 8.1 8.0 7.9 7.8 7.7 7.6 7.5 7.4 7.3 7.2 7.1 7.0 6.9 6.8 6.7 6.6 6.5 6.4 6.3 6.2 6.1
ppm

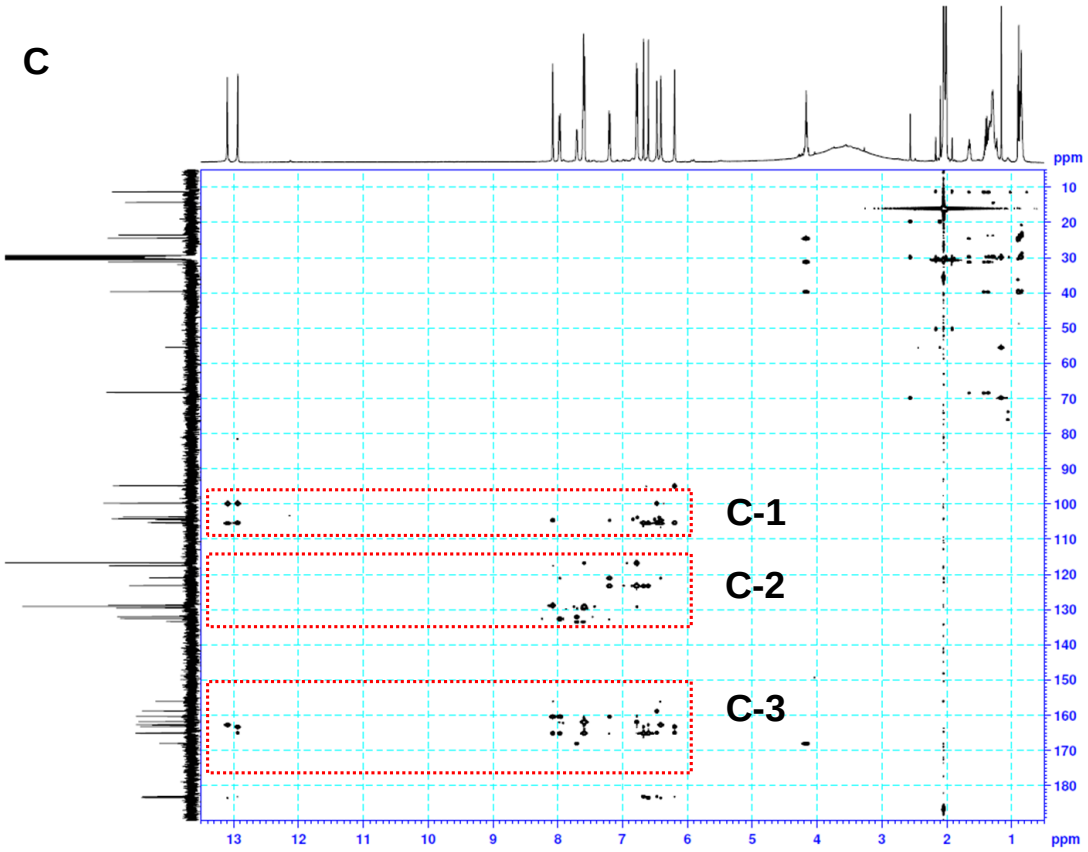
A-2

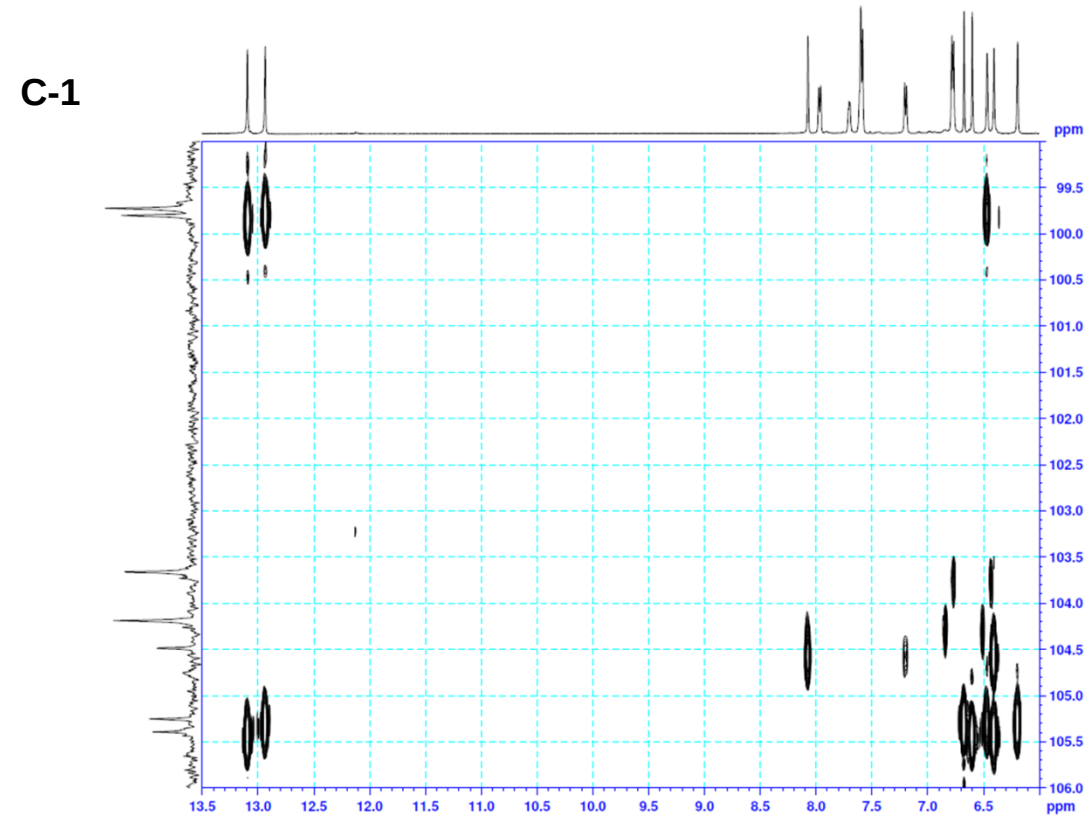

ppm
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
8.5 8.4 8.3 8.2 8.1 8.0 7.9 7.8 7.7 7.6 7.5 7.4 7.3 7.2 7.1 7.0 6.9 6.8 6.7 6.6 6.5 6.4 6.3 6.2 6.1
ppm

^{1}H-^{1}H COSY (compound 1)



^{1}H-^{13}C HMBC (compound 1)





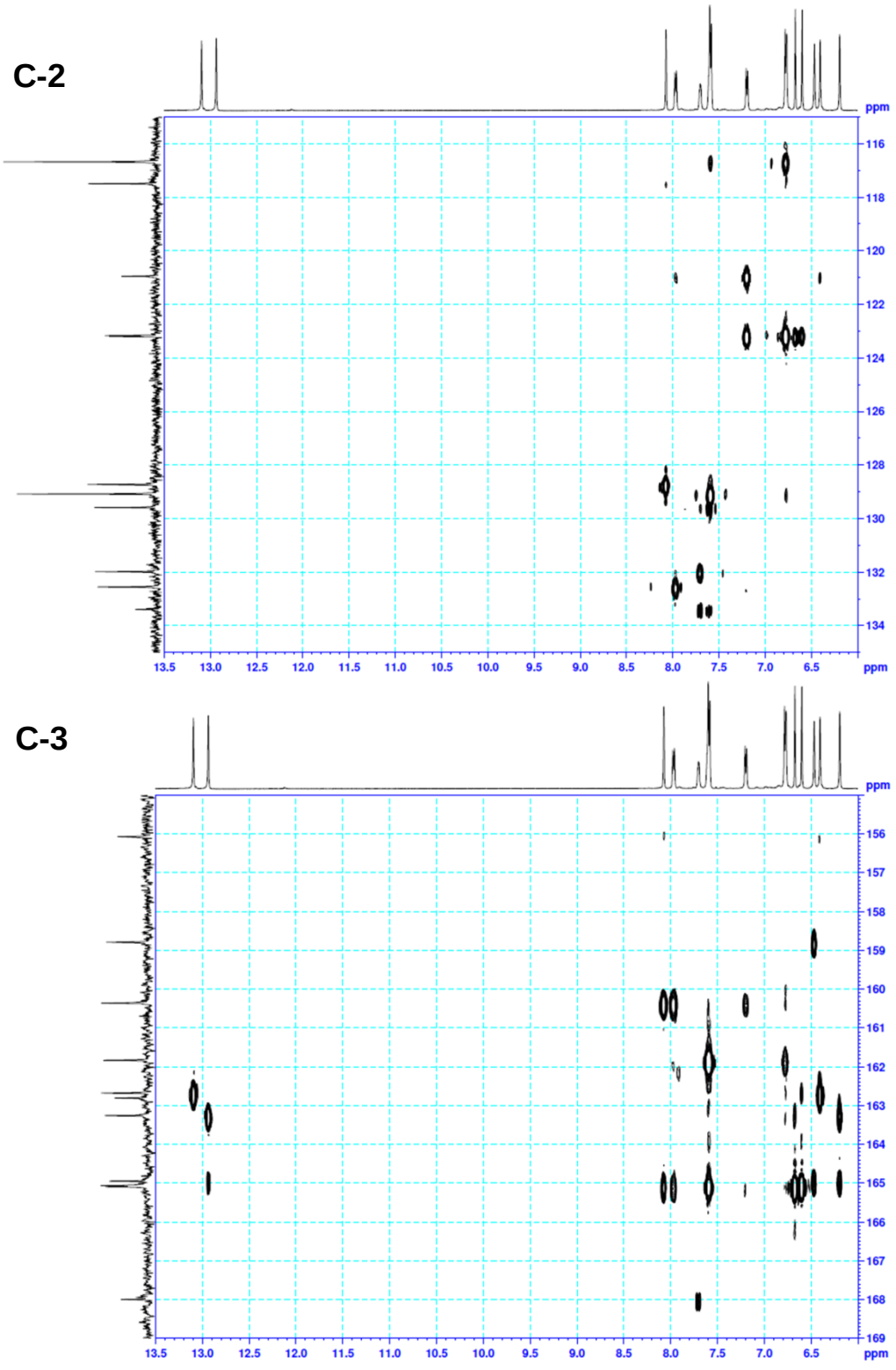
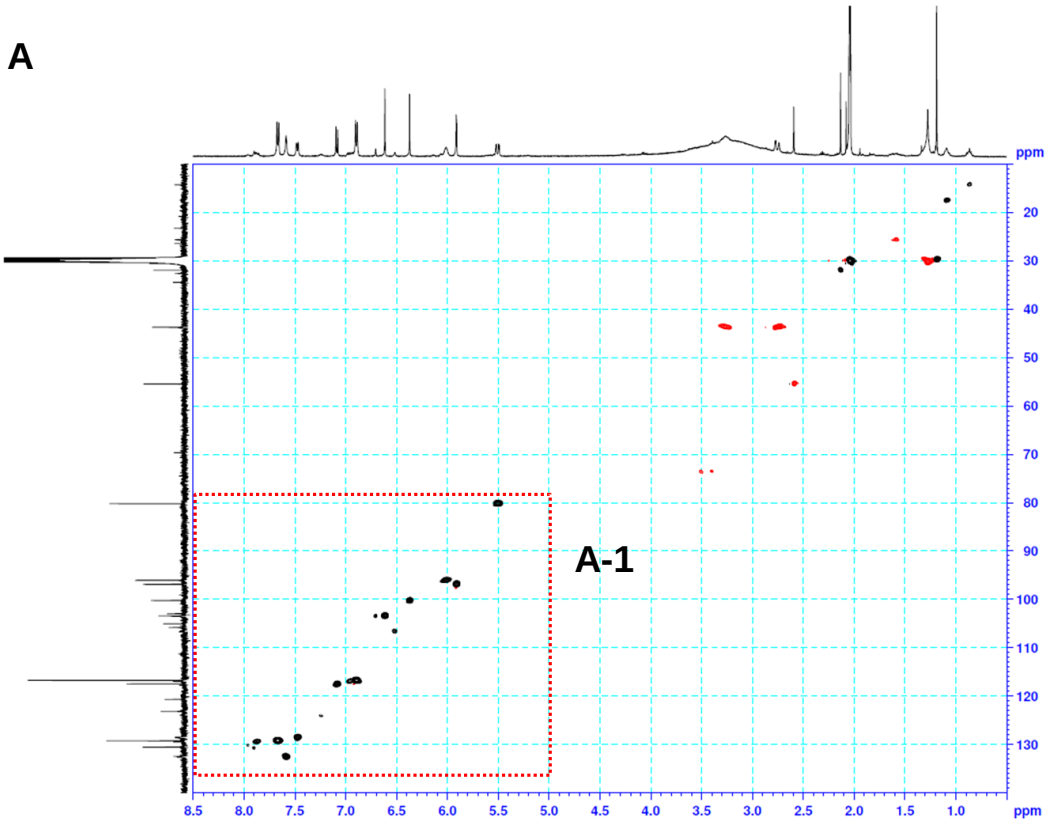
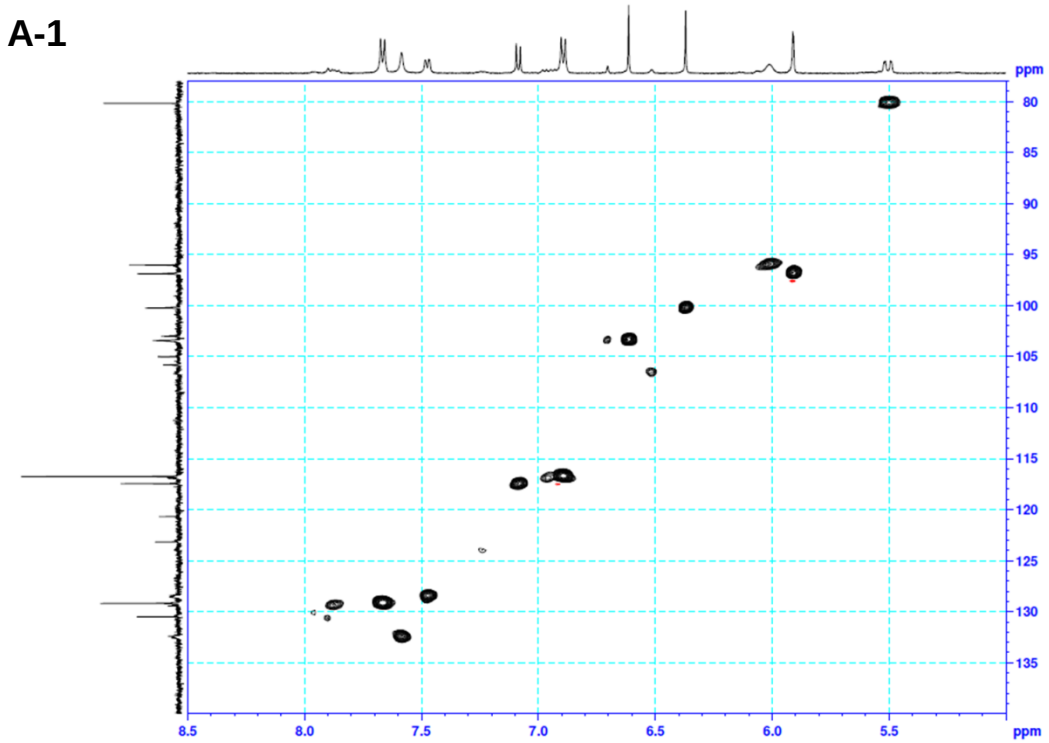


Fig. S6.1　compound 1 の二次元 NMR スペクトル

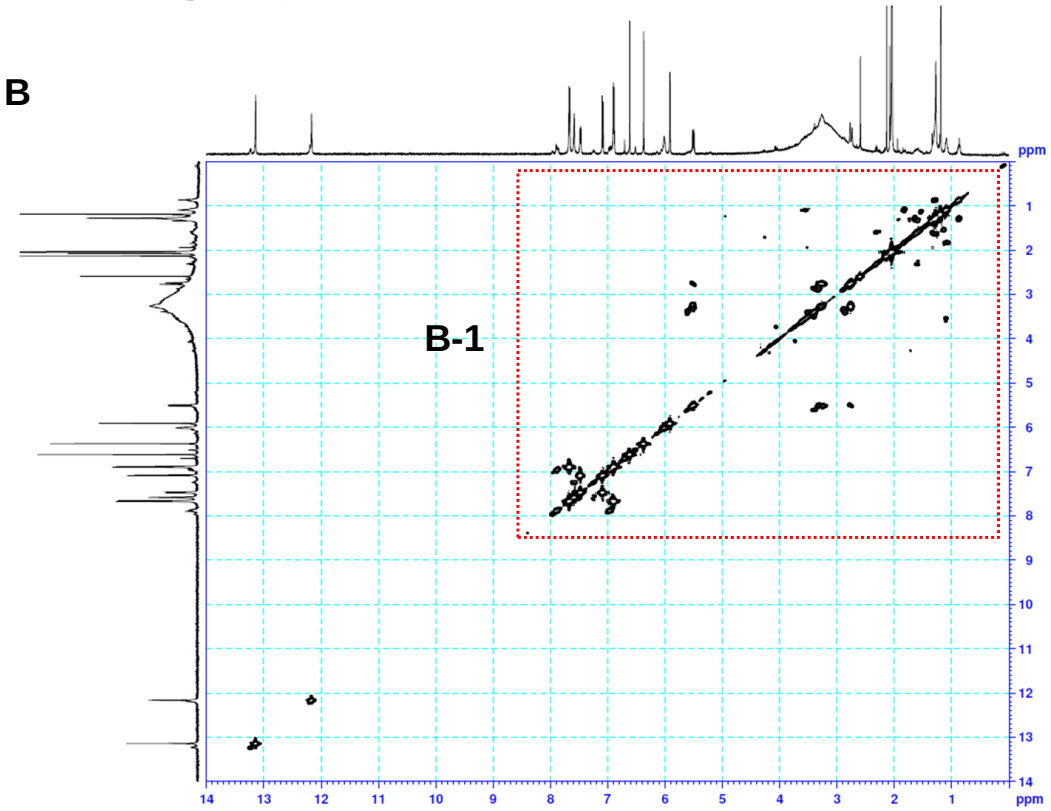
A) ^{1}H-^{13}C HSQC とその拡大画像 (A-1, 2)　B) ^{1}H-^{1}H COSY とその拡大画像 (B-1)　C) ^{1}H-^{13}C HMBC とその拡大画像 (C-1, 2, 3)

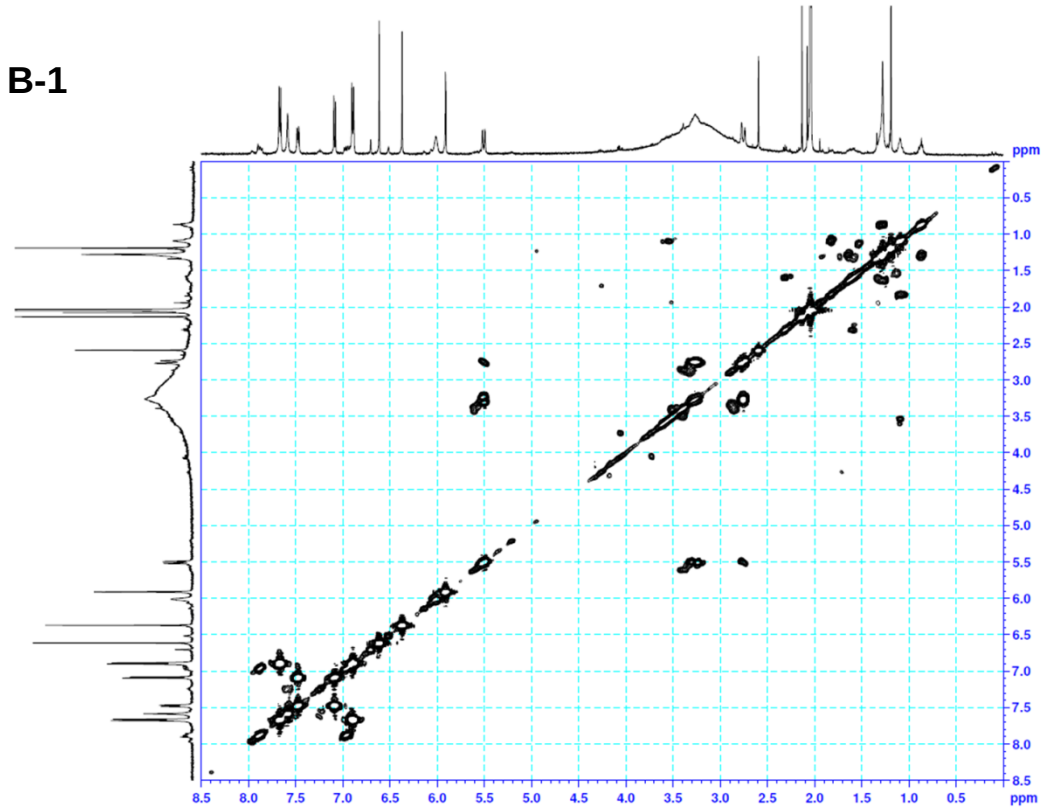
^{1}H-^{13}C HSQC (compound 2)





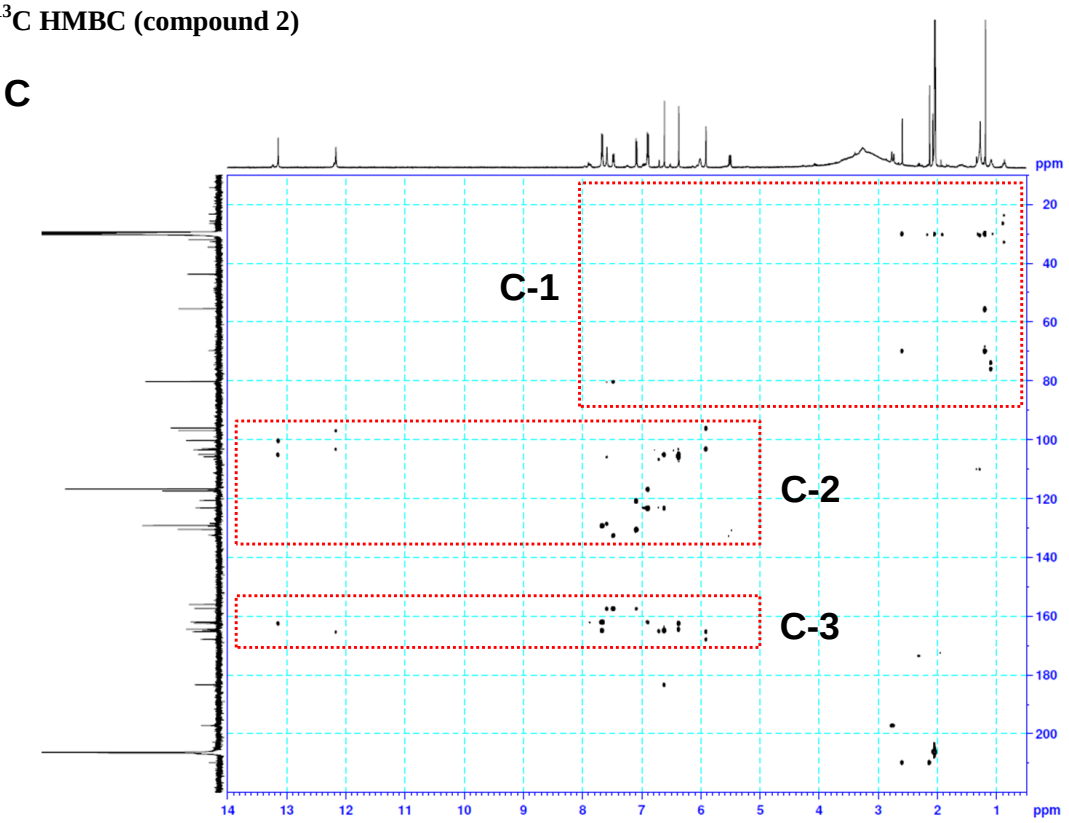
^{1}H-^{1}H COSY (compound 2)



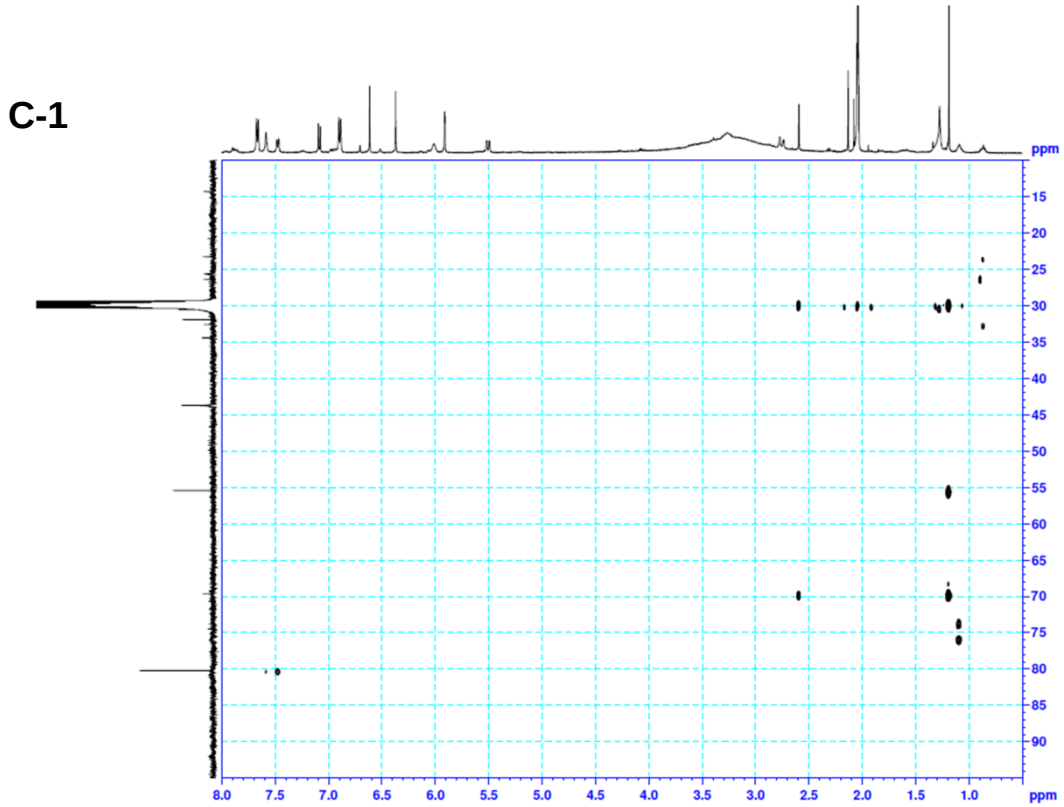


^{1}H-^{13}C HMBC (compound 2)

C



C-1



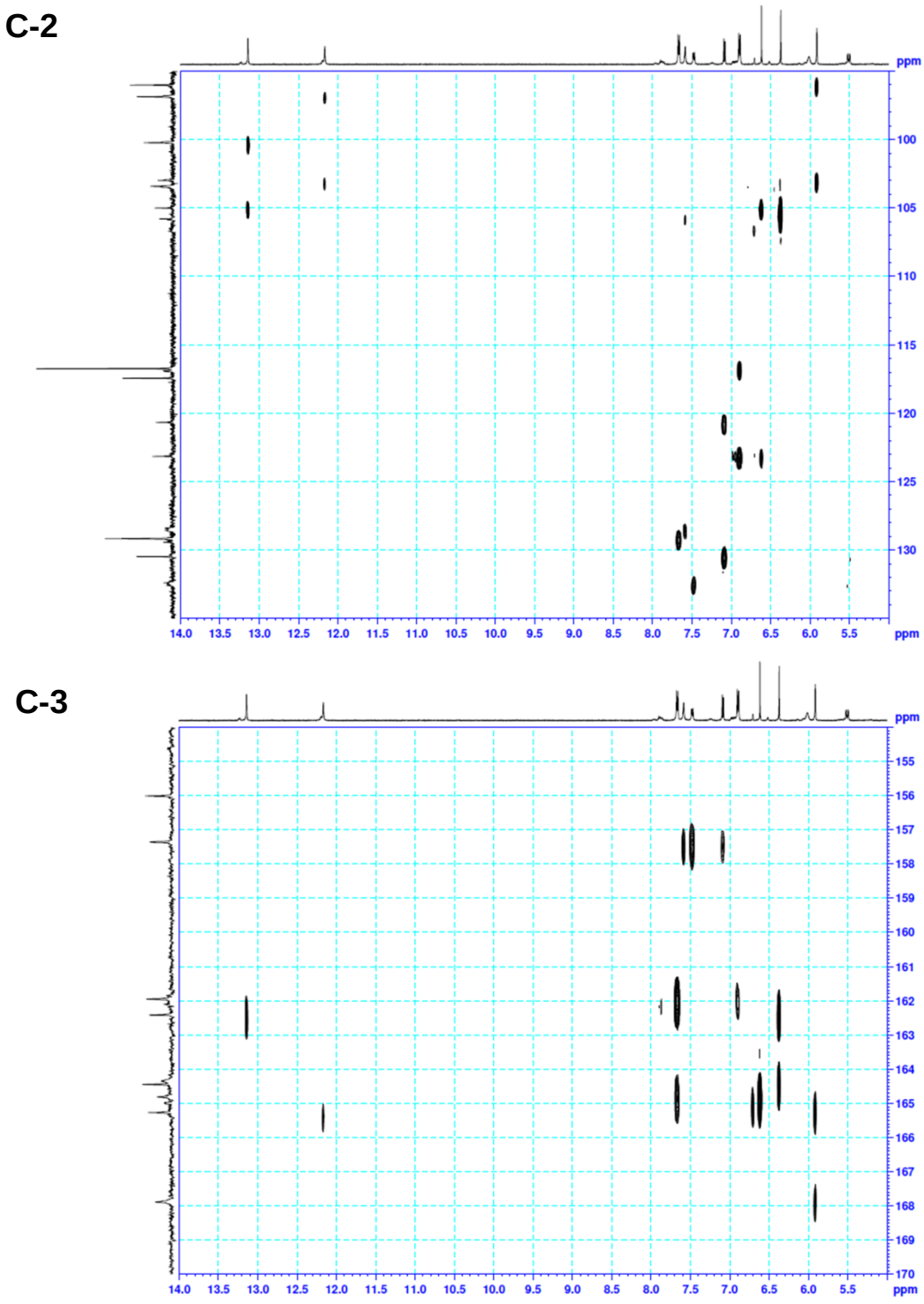
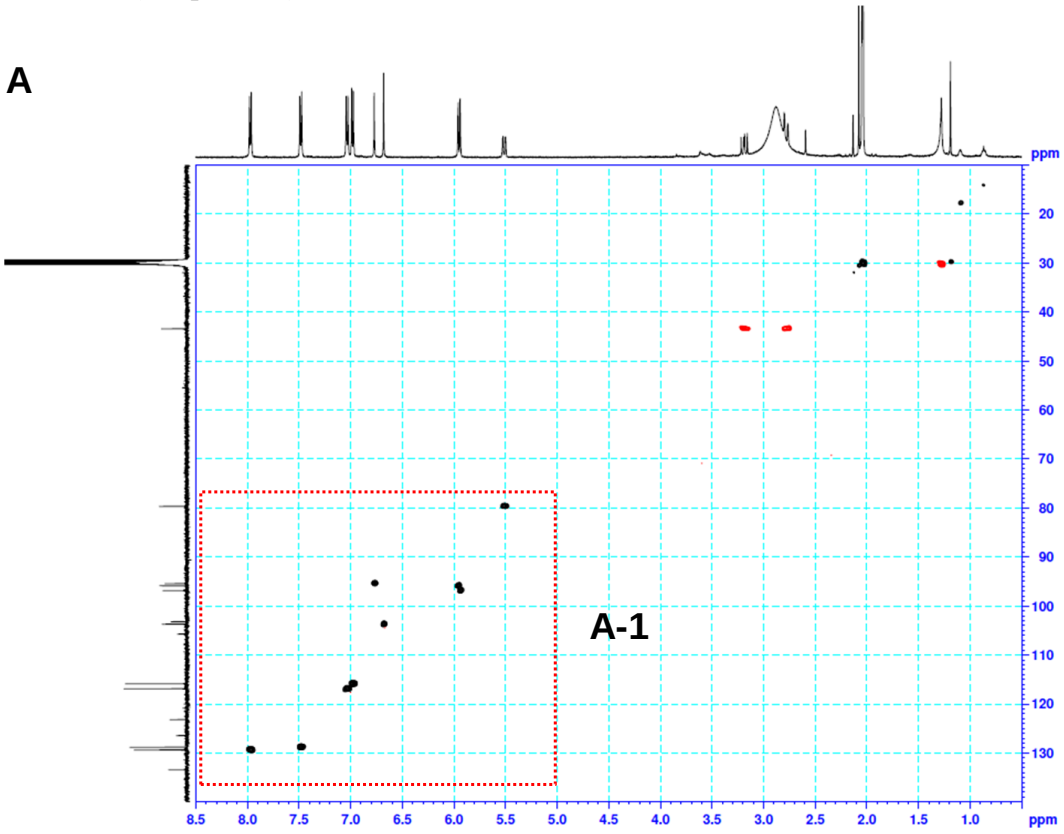
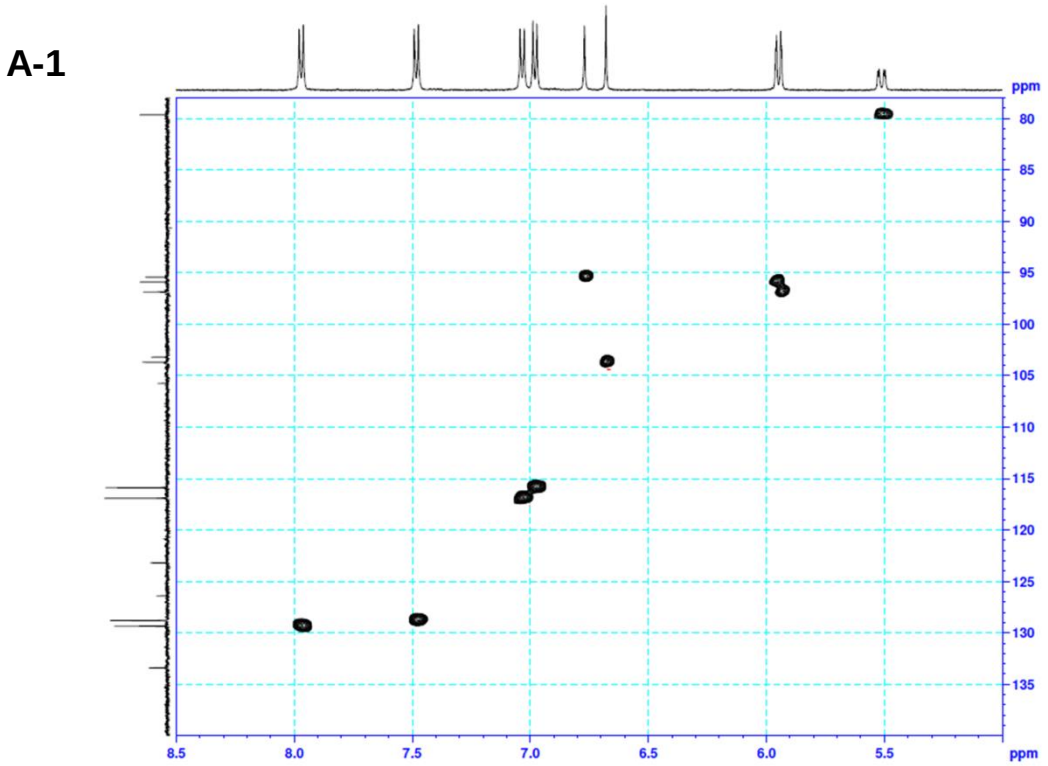


Fig. S6.2　compound 2 の二次元 NMR スペクトル

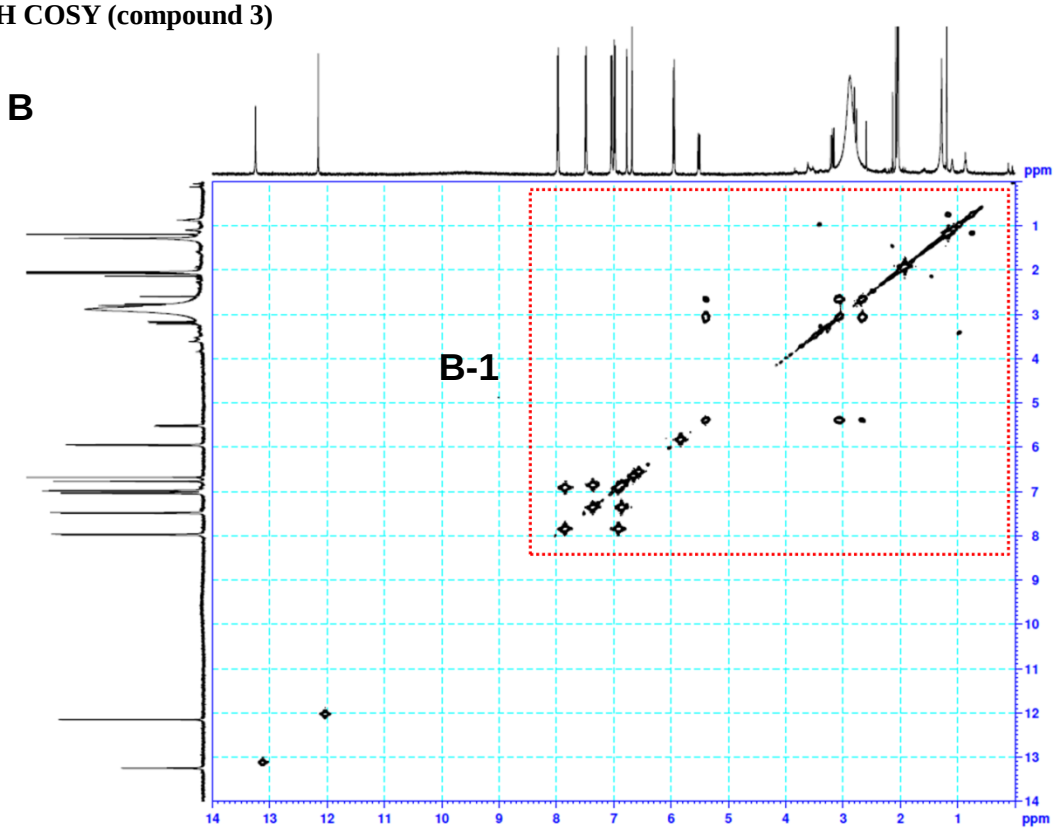
A) ^{1}H-^{13}C HSQC とその拡大画像 (A-1)　B) ^{1}H-^{1}H COSY とその拡大画像 (B-1)　C) ^{1}H-^{13}C HMBC とその拡大画像 (C-1, 2, 3)

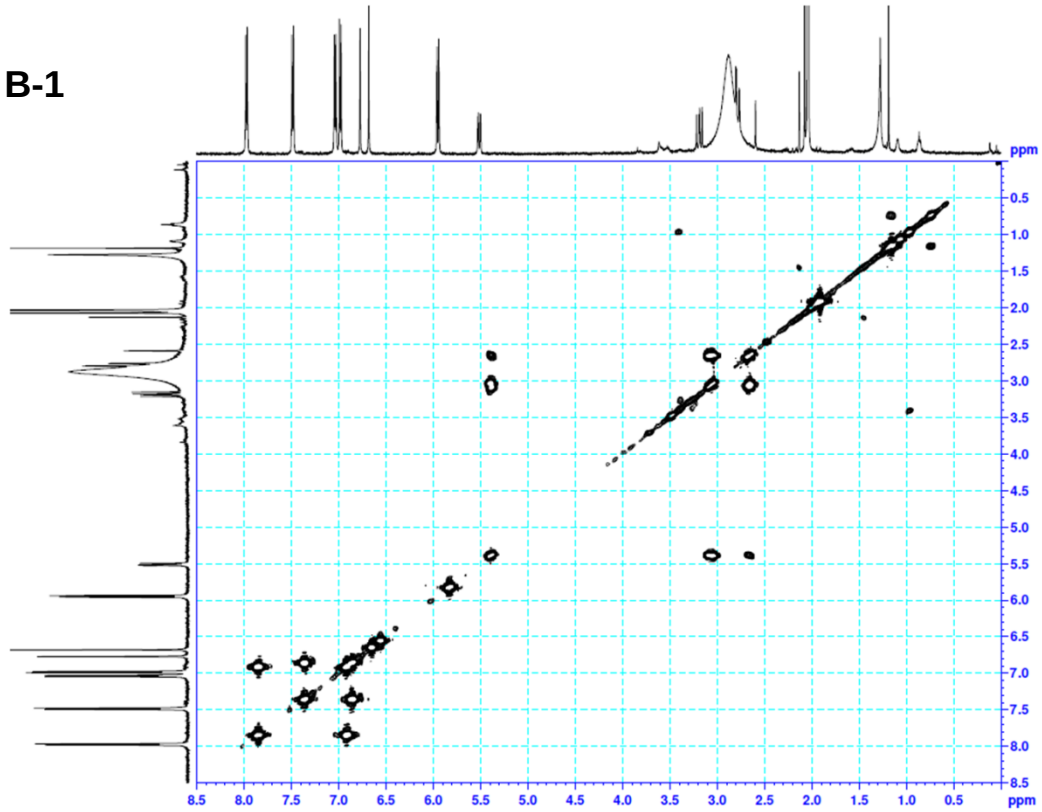
^{1}H-^{13}C HSQC (compound 3)



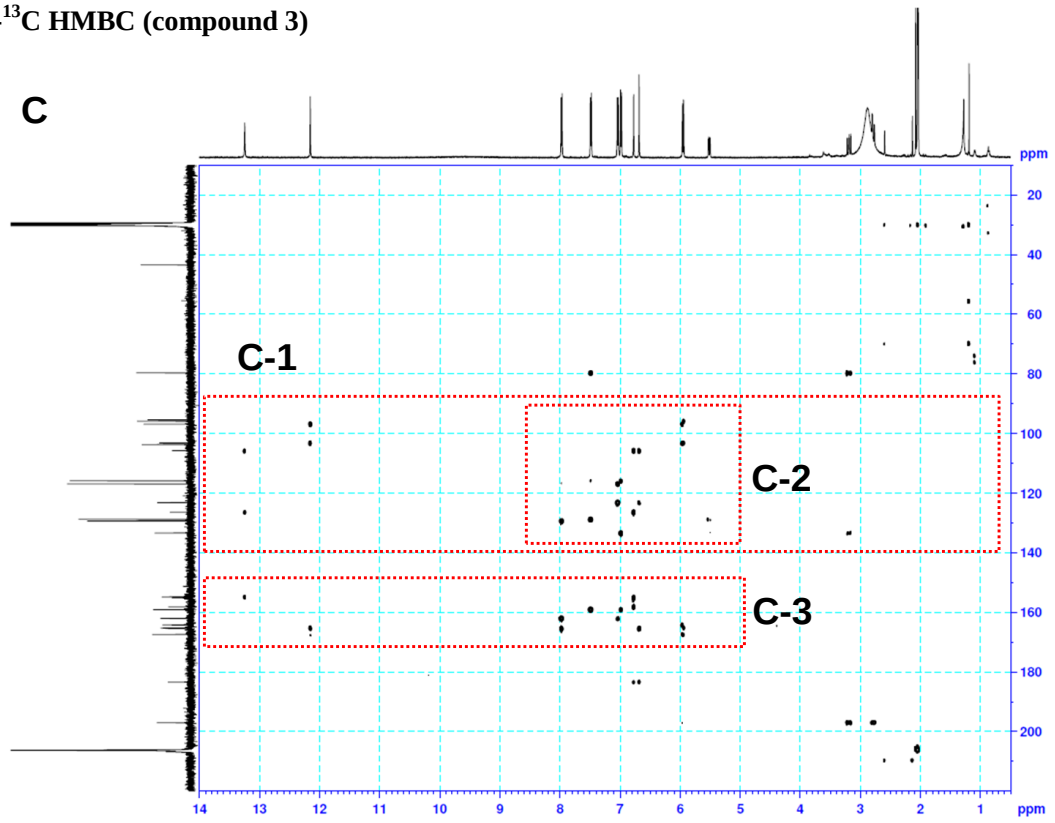


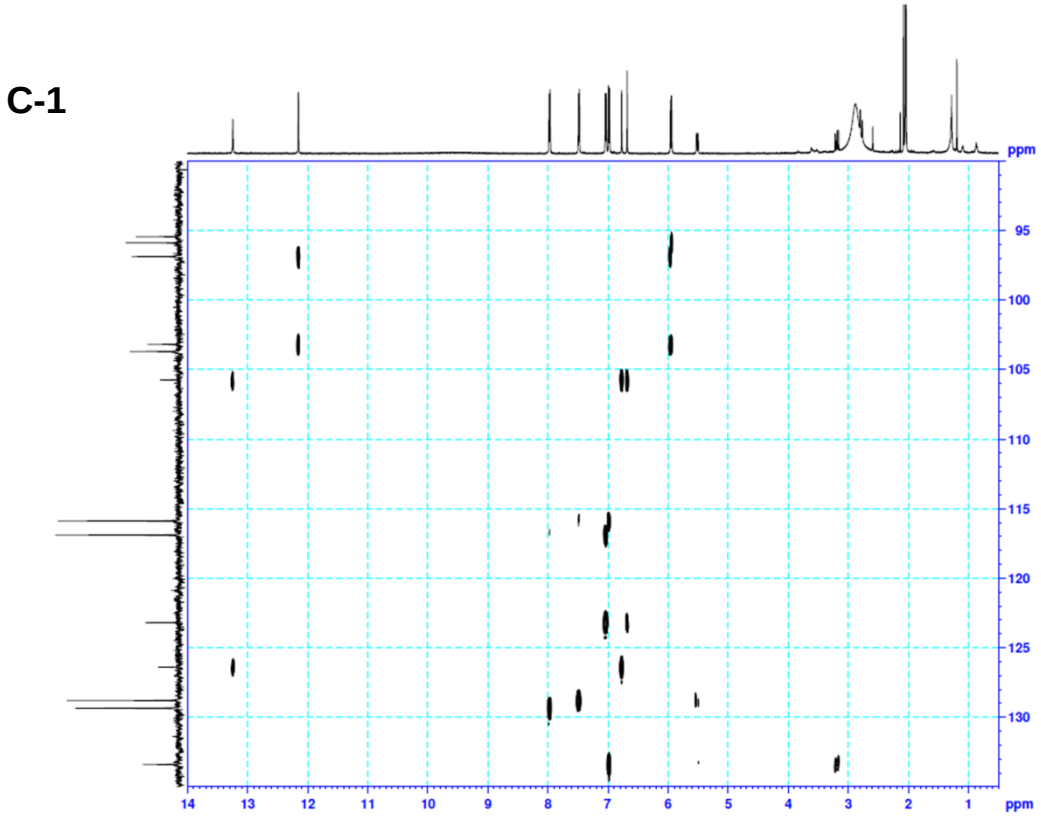
^{1}H-^{1}H COSY (compound 3)





^{1}H-^{13}C HMBC (compound 3)





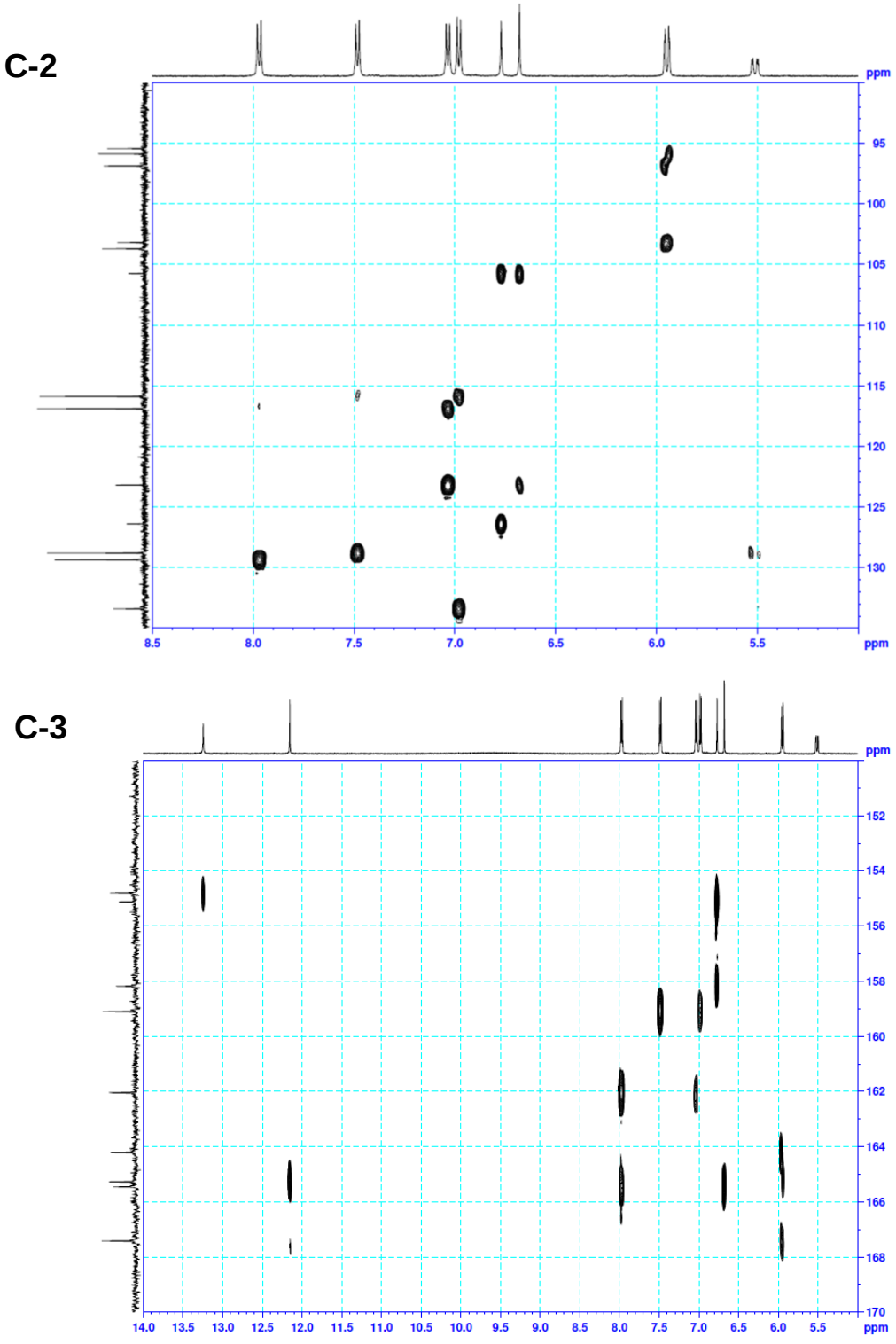


Fig. S6.3　compound 3 の二次元 NMR スペクトル

A) ^{1}H-^{13}C HSQC とその拡大画像 (A-1)　B) ^{1}H-^{1}H COSY とその拡大画像 (B-1)　C) ^{1}H-^{13}C HMBC とその拡大画像 (C-1, 2, 3)