

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻
平成 12 年度博士課程 進学
氏 名 伊藤裕才
指導教官名 村上昌弘

論文題目 Studies on cyanobacterial siderophores
(藍藻由来のシデロフォアに関する研究)

鉄は全ての生物において必須な金属原子であるが、近年、水中の鉄濃度が微細藻類の消長に強く関わっているとして微細藻類の鉄獲得機構が注目されている。鉄欠乏下において細菌やカビ類はシデロフォアと呼ばれる強力な低分子キレーターを放出し、その鉄錯体を特異的レセプターから細胞内に取り込む機構を備えている。原核生物である藍藻類は、酸素発生型の光合成以外に鉄酵素 nitrogenase を用いて窒素固定も行うため、過剰の鉄が必要とされる。藍藻類もシデロフォアによる鉄獲得機構を備えるとの報告が過去に数例あり、湖沼での藍藻ブルーム形成の一因は、シデロフォアによる鉄の独占によるとの推測もなされている。しかしながら、単離・構造決定された藍藻シデロフォアは僅か一例のみであり、藍藻種間のシデロフォア産生能に関しても統一的な報告はない。またシデロフォア自身は金属過剰症への対症薬剤として使用されており、薬理学の面からも新規シデロフォアの知見は重要である。これらの観点から藍藻類のシデロフォア産生能の評価およびその化学的性状に関する研究を行った。

1. 藍藻類のシデロフォア産生能のスクリーニング

ブルームに関わる淡水産藍藻種を中心に 41 株の藍藻類を鉄欠乏下で培養し、それらのシ

デロフォア産生能を CAS 法による鉄キレート活性によって評価した。その結果、ブルーム形成の代表種である *Microcystis aeruginosa*、*Oscillatoria agardhii* は予想に反して産生活性を全く示さなかった。また単細胞性の *Synechocystis* sp.、*Synechococcus leopoliensis* も同様に活性を示さなかった。一方、*Anabaena cylindrica*、*A. variabilis*、*Nostoc* sp.、*Scytonema hofmanni*、*Fischerella ambigua*、*Calothrix brevissima* 等の窒素固定能力をもつヘテロシスト形成糸状性藍藻は強力なシデロフォア産生活性を示した。また嫌氣的条件下のみで窒素固定を行うとされる *Plectonema boryanum* 等のヘテロシスト不形成糸状性藍藻の一部も活性を示した。これはシデロフォア産生能力がブルーム形成と関係がないことを示すと同時に、窒素固定能力との強い相関を示唆するものであった。

2. *Anabaena cylindrica* NIES-19 の産するシデロフォア anachelin 類の構造および化学性状

窒素固定種の代表種である *A. cylindrica* NIES-19 の産するシデロフォアの構造を明らかにするために、本株を鉄欠乏合成培地中で大量培養し、培地上清より ODS カラムおよび逆相 HPLC を用いて 2 つのシデロフォア anachelin-2 (1) および anachelin (2) を単離した。両物質の平面構造は 1 次元および各種 2 次元 NMR 解析、MS 分析、アミノ酸分析を用いて決定された (Figure 1)。すなわち、両物質は中心部に Thr-Ser(1)-Ser(2) という連続する 3 つの親水性アミノ酸群を含み、その N 末に 6-amino-3,5,7-trihydroxyheptanoic acid (Atha) が結合し、C 末には植物由来のアルカロイドとして報告のある *N,N*-dimethyl-3-amino-1,2,3,4-tetrahydro-7,8-dihydroxyquinolin (Dmaq) が結合していることが判明した。さらに 1 は Atha の 6-NH₂ と 5-OH 間で、また 2 は 6-NH₂ と 7-OH 間で salicylic acid (Sal) と共に 2-hydroxyphenyl-oxazoline を形成しており、両物質は構造異性体であることが判明した。

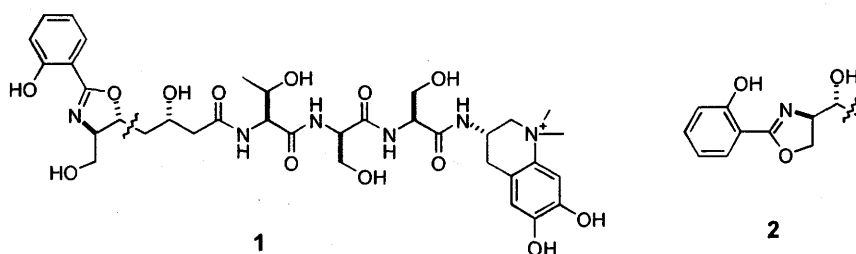


Figure 1. Structures of anachelin-2 (1) and anachelin (2).

Thr の立体化学は Marfey 法により L 体と決定した。Ser は D、L 体が 1:1 で存在したため、部分加水分解により得た Ser(1)-Ser(2)-Dmaq の N 末をダンシル化し、その加水分解物をキラル GC 分析に付し L-Ser のみが検出されたことから、Ser (1) が D 体、Ser(2) が L 体であると決定した。Dmaq の絶対立体化学は、1,2 をメチル化後に加水分解することで得られた MeDmaq のアミノ基に Boc-phenylglycine 法を用いることで 3*S*-Dmaq であると決定した。Atha の相対立体は、acetonide 化した 2 の NMR 解析から 3,5 位が *syn* であるとし、1 の ¹H NMR において 7 位を選択的に照射することで得られた 5,6 位間の *J* 値から、その相対配座を *syn* と

決定した。絶対立体は部分加水分解より得た Sal-Atha をメチルエステル化後、3位の水酸基に Mosher 法を適用することで 3*S*, 5*R*, 6*R*-Atha と決定した。

1 および 2 の鉄錯体の MS 分析から、両物質は鉄分子と 1:1 で結合することが判明した。配位子は Dmaq のカテコール性水酸基および 2-hydroxyphenyl-oxazoline のフェノール性水酸基と窒素原子であると推定される。両物質はこれまでに他の微生物から報告されているものとは全く異なる構造をもつ新規シデロフォアであり、藍藻類が独自の構造のシデロフォアを持つことを強く示した初めての例である。

3. *Anabaena variabilis* M-204 および NIES-23 の産するシデロフォア schizokinen の構造および化学性状

A. variabilis は嫌気下においては栄養細胞内に nitrogenase を発現させる特異なヘテロシスト形成種であり、窒素固定の研究に頻繁に用いられている。そこで *A. variabilis* の産するシデロフォアの単離・構造決定を行った結果、*A. variabilis* M-204 およびヘテロシスト不形成変異株である NIES-23 の両株のシデロフォアは、クエン酸を中心に左右対称な構造を持つヒドロキサム酸系の既知シデロフォア schizokinen (3) であることが判明した (Figure 2)。Schizokinen (3) は *Bacillus megaterium* より最初に発見され、また *Anabaena* sp. PCC7120 よりも唯一の藍藻シデロフォアとして報告されている。

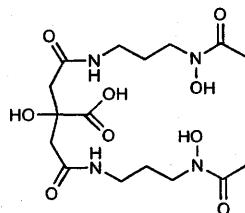


Figure 2. Structure of schizokinen (3)

4. *Oscillatoria tenuis* UTEX1566 の産するシデロフォア oscillabactin の構造および化学性状

O. tenuis UTEX1566 はヘテロシスト不形成糸状性藍藻の 1 種である。本株を鉄欠乏培地中で通気培養を行い、濃縮したろ液を ODS カラムに付し、含水メタノールで溶出させた。CAS 活性を示した 50%メタノール画分を逆相 HPLC に供することで oscillabactin A (4) を得た。MS および各種 NMR スペクトル解析により、Sal および 2 つの β -Ala が容易に確認された。さらに oxazole を含む特異なカルボン酸 3-[2'-(2"-amino-1"-hydroxybutane-4"-yl)oxazole-4'-yl]-2,3-dihydroxypropionic acid (Ahoda) の構造が決定された。また未同定の窒素原子および水酸基を考慮し、環状ヒドロキサム酸 1,2-dihydro-1,3-dihydroxy-2-oxopyridine (Ddop) を構築した。各ユニットは HMBC 相関によって結合され (Figure 3)、全ての窒素原子の存在は ^1H - ^{15}N HMBC 相関で確認された。

しかし、4 の Sal-Ahoda のアミド結合は、この部位が oxazoline 環の加水分解物であることを強く示唆していた。そこで CAS 活性を示す 100%MeOH 画分を精査したところ、4 よりも

分子量が 18 小さい oscillabactin (5) の単離に成功した。NMR 解析により 5 の oxazoline 環の存在が証明され、さらに 5 は DMSO 溶媒中で容易に 4 の前駆体であるエステル体 6 へと開環した。これにより本株の真のシデロフォアは 5 であり、4 は培養中もしくは精製過程で生じた加水分解物と判明した。

Oscillabactin A (4) の鉄錯体の ESI-MS スペクトルは 4 が鉄と 1:1 結合することが示し、これは 5 も同様であることを強く示唆した。Oscillabactin (5) の配位子は 2-hydroxyphenyl-oxazoline のフェノール性水酸基と窒素原子、Ahoda の oxazole 窒素原子および 3 位の水酸基、そして Ddop のヒドロキサム酸構造であると推定される。Ddop のような hydroxypyridinone 構造は生体からのプラトニウム除去剤になりうるとして近年精力的な研究がなされているが、本構造がシデロフォア内の配位子の 1 つとして含まれていたのは 5 が初めての例である。

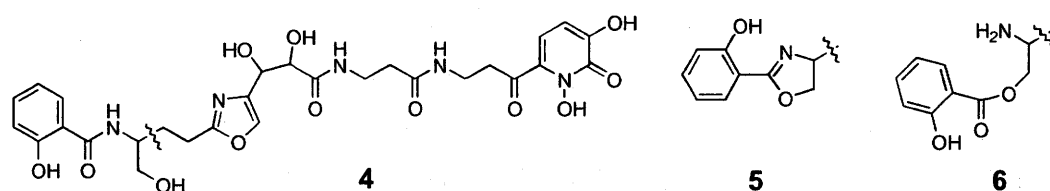


Figure 3. Structures of oscillabactin A (4), oscillabactin (5) and ester intermediate to 4 (6)

以上、本研究において、藍藻種間におけるシデロフォア産生能の有無が藍藻種の窒素固定能と強く相関することが示された。またほとんど未開拓であった藍藻シデロフォアの構造解析の結果、1,2 や 5 のように極めて新規かつ複雑な構造を有していることが明らかにされた。これらは生態・進化の観点からみても非常に興味深い結果である。今後はこれら藍藻シデロフォアが、環境中の鉄循環や他の微生物群に対してどのような影響を及ぼしているのかということの解明していく必要があると思われる。