

称号及び氏名	博士(応用生命科学)	谷岡	由梨
学位授与の日付	平成21年3月31日		
論文名	ラン藻におけるコリノイド化合物とその生理機能に関する研究		
論文審査委員	主査	乾	博
	副査	宮武	和孝
	副査	笠井	尚哉

## 論文要旨

### 第1章 緒論

コリノイドは、テトラピロール環の一種であるコリン環にコバルトが配位した化合物の総称であり、その代表はビタミン $B_{12}$ （以下、 $B_{12}$ ；コバラミン）である。コバルトにはコリン環以外に上方配位子、下方配位子と呼ばれる2つのグループが配位している。 $B_{12}$ では、上方配位子としてメチル基、アデノシル基、ヒドロキソ基、シアノ基などを有するものが知られており、そのうちメチル $B_{12}$ とアデノシル $B_{12}$ は高等動物ではそれぞれメチオニンシンターゼ（MS）とメチルマロニル-CoAムターゼ（MCM）の補酵素として機能している。一方、 $B_{12}$ の下方配位子は5,6-ジメチルベンズイミダゾール基である。自然界には $B_{12}$ 以外に下方配位子の異なる様々なコリノイド化合物が存在し、その代表的なものとしてアデニンを下方配位子とするシュード $B_{12}$ が知られている。しかし、このような $B_{12}$ アナログは栄養学的に価値がない（すなわちビタミンとして機能しない）ため、ほとんど研究が行われてこなかった。

B<sub>12</sub>は、微生物が合成したものを高等動物が利用している。一方、高等植物はB<sub>12</sub>を合成も利用もしない。したがって、B<sub>12</sub>の良い供給源は動物性食品であり、一般に植物性食品には含まれていないとされている。ところが、植物性食品に分類されるノリなどの海藻類にB<sub>12</sub>が豊富に含まれているとされている。しかし、食品中のB<sub>12</sub>の定量はB<sub>12</sub>要求性乳酸菌を用いたバイオアッセイで測定されており、B<sub>12</sub>とシュードB<sub>12</sub>などのアナログの区別がつかない。そのため、藻類のB<sub>12</sub>については否定的な報告が多数なされていた。近年、主要な食用藻類のコリノイド化合物が検討され、スジアオノリやクロレラなどの真核藻類には真のB<sub>12</sub>が含まれていることが見出された。さらに、一般的に、高等植物は、B<sub>12</sub>非依存性MS（植物型MS）を有していることが知られているが、真核藻類は、微生物が合成するB<sub>12</sub>を積極的に取り込み、B<sub>12</sub>依存型（動物型）MSを発現していることが報告された。一方、原核藻類（ラン藻）では、スピルリナでシュードB<sub>12</sub>が主要なコリノイド化合物であることが報告されているだけで、詳細は不明であった。

本論文では、コリノイド化合物を簡便に分別定量できる方法を確立し、ラン藻には一般にシュードB<sub>12</sub>が主要なコリノイドとして含まれることを見いだした。さらに、シュードB<sub>12</sub>は動物型MSの補酵素として機能していることも明らかにした。

## 第2章 食用ラン藻におけるコリノイド化合物について

コリノイド化合物の中には、生体に対しアンタゴニストとして作用するものも報告されており、食品中のB<sub>12</sub>とB<sub>12</sub>アナログを知ることは重要である。そこで、食品中のB<sub>12</sub>とB<sub>12</sub>アナログを簡便に分別定量することを目的とし、シリカゲル 60 を用いたTLCによりコリノイド化合物を分離し、B<sub>12</sub>依存性大腸菌によるバイオオートグラフィーにより検出した。その結果、B<sub>12</sub>とシュードB<sub>12</sub>を分離同定できるとともに、B<sub>12</sub>が 20~100 pgの範囲で定量性が見られ、簡便なB<sub>12</sub>とB<sub>12</sub>アナログの分別定量法が確立できた。次に、スピルリナの他に流通しているラン藻食品であるスイゼンジノリ、イシクラゲ、ハッサイについて総コリノイド化合物量をバイオアッセイで測定した。その結果、乾燥藻体 100 gあたりスイゼンジノリでは約 140 µg、イシクラゲでは約 100 µg、またハッサイでは約 110

μgであり、これらの値はすでに報告されているスピルリナと同等であった。さらに、確立した分別定量法を用いて分析した結果、スイゼンジノリでは大半のコリノイド化合物がシュードB<sub>12</sub>であった。イシクラゲでもB<sub>12</sub>は10%程度であり、残りはシュードB<sub>12</sub>だった。一方、ハッサイには、シュードB<sub>12</sub>が55%でB<sub>12</sub>は45%であった。したがって、原核藻類のラン藻では、一般に主要なコリノイド化合物は栄養学的に価値のないシュードB<sub>12</sub>であり、B<sub>12</sub>が豊富に含まれる真核藻類（緑藻類など）とは異なり、B<sub>12</sub>の良質な供給源にはならないと考えられる。

### 第3章 ラン藻におけるシュードB<sub>12</sub>の生理機能について

ラン藻におけるシュードB<sub>12</sub>の生理機能について、ゲノム全塩基配列が公開されている *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて検討した。最初に本生物にコリノイド化合物が著量（40 ng/g wet weight）含まれ、シュードB<sub>12</sub>であることを同定した。本生物をコバルト欠乏培地に植え継ぎコバルト制限下で培養すると、増殖に影響は見られなかったが、シュードB<sub>12</sub>含有量は30%程度にまで低下した。さらに、コバルト制限細胞を再度コバルト欠乏培地に植え継ぎコバルト欠乏状態にすると、細胞増殖が著しく抑制された。したがって、本生物はコバルトを原料にシュードB<sub>12</sub>を生合成しており、コバルトが欠乏すると生育できなくなることが明らかになった。本生物のゲノム配列上にはB<sub>12</sub>依存型（動物型）MS遺伝子のホモログが存在する（植物型MS遺伝子はない）。そこで、本生物のMS活性を測定したところ、反応系に補酵素（メチルB<sub>12</sub>）を添加しなくても強い活性が見られ、その値は動物細胞と同等もしくはそれ以上であった。さらに、コバルト欠乏細胞ではMS活性は10%程度にまで低下した。したがって、本生物ではシュードB<sub>12</sub>を補酵素として動物型MSが機能していることが示される。なお、MSと同様に高等動物のB<sub>12</sub>依存性酵素であるMCMについて調べたが、本生物のゲノム配列上にMCM遺伝子ホモログは見当たらず、また酵素活性も検出できなかった。

次に *Synechocystis* と同様にシュードB<sub>12</sub>を生合成することが知られている *Spirulina platensis* のMSについて検討した。本生物から動物型MS遺伝子をクローニングし、大腸

菌で発現させた。 *Spirulina*のMSは、大腸菌内で分子質量約 140 kDaのアポタンパク質として発現しており、酵素反応系に補酵素としてメチルB<sub>12</sub>を添加することで活性が出現した。 さらに、メチルB<sub>12</sub>のかわりにメチルシュードB<sub>12</sub>を添加したところ、メチルB<sub>12</sub>と同等の活性が見られた。

以上の結果から、*Synechocystis*や*Spirulina*などのラン藻は、シュードB<sub>12</sub>を生合成し、動物型MSの補酵素として利用していることが証明された。

## 審査結果の要旨

コリノイドは、テトラピロール環の一種であるコリン環にコバルトが配位した化合物の総称であり、その代表はビタミン B12（以下、B12；コバラミン）である。コバルト原子にはコリン環以外に上方配位子、下方配位子と呼ばれる2つのグループが配位している。上方配位子は、B12ではメチル基、アデノシル基、ヒドロキシ基、シアノ基などが知られており、そのうちメチル-B12とアデノシル-B12は高等動物ではそれぞれメチオニンシンターゼとメチルマロニル-CoA ムターゼの補酵素として機能している。下方配位子は、B12では5,6-ジメチルベンズイミダゾール基であるが、自然界にはB12以外に下方配位子の異なる様々なコリノイド化合物が存在する。その代表的なものとして、アデニンや2-メチルアデニンを下方配位子とするシュードB12やファクターAが知られている。しかし、このようなコリノイド化合物の多くはヒトでビタミンとしての活性を示さないため、栄養学的に価値がないものとされ、ほとんど研究が行われてこなかった。

B12のよい供給源は動物性食品であり、一般に植物性食品には含まれていないとされている。ところが、通常植物性食品に分類される海苔などの海藻類にはB12が豊富に含まれているとされていた。しかし、その詳細については不明であった。近年になって、藻類のコリノイドについて研究が行われるようになり、アオノリ (*Enteromorpha prolifera*) やクロレラ (*Chlorella* sp.) などの真核藻類には実際にB12が著量含まれていることが確認されている。一方、原核生物であるラン藻については、スピルリナ (*Spirulina platensis*) ではB12ではなくシュードB12が著量含まれていると報告されているが、他のラン藻における知見はない。本研究では、原核生物であるラン藻には

一般にシュード B12 が存在すると考え、食用として市販されている 3 種のラン藻、スイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*)、イシクラゲ (*Nostoc commune*)、ハッサイ (*Nostoc flagelliforme*) について、コリノイドの同定・定量を行なっている。その結果、予想通り、いずれのラン藻においても、スピルリナと同様に、シュード B12 が主要なコリノイドとして著量含まれていることを明らかにしている。このことから、スイゼンジノリなどのラン藻食品は、アオノリなどの食用真核藻類とは異なり、B12 のよい供給源にはならないことが明確になった。

ラン藻内に著量含まれるシュード B12 は補酵素などの生理機能を有する可能性が考えられる。このような観点から、本研究では、ゲノム全塩基配列が公開されているシネコシスティス (*Synechocystis* sp. PCC 6803) をもちいてシュード B12 の生理機能に関する検討を行なっている。最初にシネコシスティスのコリノイドを同定・定量を行ない、スピルリナの場合と同様に、培地中の  $\text{Co}^{2+}$  を取り込み、唯一のコリノイドとしてシュード B12 を生合成していることを明らかにしている。次にシネコシスティスのゲノム配列について検索し、植物型 (B12 非依存性) ではなく動物型 (B12 依存性) メチオニンシンターゼ遺伝子ホモログが存在することを見いだしている。さらに実際にメチオニンシンターゼ活性を測定し、本生物ではシュード B12 を補酵素として動物型メチオニンシンターゼが機能している可能性を示している。一方、本生物にはメチルマロニル-CoA ムターゼは存在しないことも明らかにしている。スピルリナにも動物型メチオニンシンターゼ遺伝子が存在することを示すとともに、本遺伝子産物を大腸菌で発現させ、メチルシュード B12 を補酵素として実際にメチオニンシンターゼとして機能することを明らかにしている。さらに、本酵素はメチル-B12 に比べてメチルシュード B12 にきわめて高い親和性を示すことを見いだしている。したがって、ラン藻のメチオニンシンターゼは、B12 ではなくシュード B12 を真の補酵素とする、言い換えるならば、シュード B12 依存性酵素と呼ぶべき、きわめてユニークな酵素であると考えられる。

以上、本研究は、ラン藻には真の B12 ではなく栄養学的に価値の低いシュード B12 が含まれていることを示した。一方、ラン藻は自ら合成したシュード B12 をメチオニンシンターゼの補酵素として利用していることを明らかにした。これらの成果は、栄養学、食品学さらに生化学や分子生物学の発展に寄与するものであり、最終試験の結果と併せて博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。