

氏名	木村 駿太		
学位の種類	博 士 ( 農 学 )		
学位記番号	博 甲 第 8 6 1 0 号		
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 3 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	陸棲藍藻 <i>Nostoc</i> sp. HK-01 の乾燥藻体の乾熱耐性		
主査	筑波大学教授	博士 ( 工学 )	市川創作
副査	筑波大学准教授	博士 ( 工学 )	橋本義輝
副査	筑波大学准教授	博士 ( 農学 )	吉田滋樹
副査	筑波大学講師	博士 ( 学術 )	横谷 ( 富田 ) 香織

## 論 文 の 要 旨

本論文は、乾燥状態で100℃、10時間暴露された際の耐性は報告されているが、その生活環と乾熱耐性の関係や、乾熱耐性に関わる具体的な機能分子が未解明の光合成微生物である陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 を研究対象としている。審査対象論文で著者は、*Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性機能の全容解明を目的に、*Nostoc* sp. HK-01 の乾熱耐性を備えた細胞形態の特定と耐性に関与する機能分子の同定、および同定された各成分の熱に対する生体分子保護活性を調べた。乾燥状態で熱に曝されても蘇生に必要な機能を保ち、再加水により蘇生する耐性機能の解明は、生物の過酷環境における利用や、光合成をはじめとした植物細胞機能の高熱からの保護に関する研究に大きく貢献すると期待できる。

藍藻の生活環は種により異なるが、著者は顕微鏡観察により *Nostoc* sp. HK-01 の詳細な生活環を調べ、休眠細胞 (akinetete) から発芽して栄養細胞 (vegetative cell) に分化した後、連鎖体 (hormogonia) 、異型細胞 (heterocyst) および休眠細胞に分化する一連の *Nostoc* sp. HK-01 の生活環を、本研究ではじめて明らかにした。また、各細胞形態と乾熱耐性の関係を、生存細胞を指標に染色法で検証した結果、100℃の乾熱曝露後に蘇生する細胞は休眠細胞のみであることを明らかにした。栄養細胞の殆どが、乾燥過程で死滅することも合わせて報告している。

本藍藻の生活環における熱耐性の獲得時期に関して、著者は、乾燥過程で休眠細胞への分化促進が認められない結果と、湿潤藻体においても休眠細胞は栄養細胞と比べて優れた熱耐性 (50℃) を具備したことを示す結果から、栄養細胞から休眠細胞への分化の過程で、熱耐性に関与する機能分子が休眠細胞に蓄積されている可能性を導いている。本藍藻の乾熱耐性に関与する機能分子の藻体中の分布は、陸棲藍藻の紫外線、塩や自然乾燥に対する耐性に関与が知られている細胞外多糖 (extracellular polysaccharides; EPS) を藻体から除去した前後で乾熱後の生存率に著しい差異が認められない結果から、休眠細胞の内部に存在すると導いている。

機能性分子の本体について、*Nostoc* sp. HK-01 は休眠細胞のみの藻体 (細胞群) の作出が困難

であることから、著者は、全細胞中の休眠細胞の存在の割合が異なる藻体を作成することで、休眠細胞にのみ蓄積される耐性物質を、休眠細胞の割合を元に探索することを試みた。各藻体から得られた抽出物（水溶性）をHPLC（high-performance liquid chromatography）およびLC-ESI/MS（liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry）を用いて分離・分析し、LC-ESI/MS分析により各抽出物成分量が著しく異なる分子量の詳細な解析から、休眠細胞に蓄積する物質として、sucrose、glycine、betaine、glucosylglycerolおよびtrehaloseの5種をLC-ESI/MSレベルで同定した。特に、trehaloseを除く4種が、休眠細胞に特異に蓄積していることを、本論文ではじめて明らかにした。更に、これらの低分子化合物について、熱曝露後の*Nostoc* sp. HK-01の休眠細胞の蘇生に必要な高分子保護活性を有しているか、モデル酵素の乳酸デヒドロゲナーゼを用いて熱（50℃）曝露後に調べた。その結果、sucroseおよびglycineを50 mM以上、betaineを100 mM以上添加した条件下で、タンパク質の熱凝集を抑制することを、はじめて実験的に示した。休眠細胞中にsucroseおよびglycineが、glucosylglycerolおよびbetaineと比較して約1000倍高い濃度で蓄積されることを算出した結果から、sucroseおよびglycineが、*Nostoc* sp. HK-01の休眠細胞における主な適合溶質である可能性を示した。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、これまでに乾燥状態で、乾燥や真空、放射線および温度に対して優れた耐性を具備することが明らかにされている陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01の、100℃の乾熱耐性機能について、熱曝露後の細胞形態に注目した生存率、優れた熱耐性の具備が明示された休眠細胞の細胞外多糖の有無による乾熱耐性能の変化、休眠細胞に特異に蓄積されている低分子化合物の探索、および同定された各低分子化合物のタンパク質熱凝集抑制活性について丁寧に検証している。

陸棲藍藻は、古来より地球上の陸地に幅広く生息する生物であるが、乾熱耐性機能について、これまで具体的な検証は行われておらず、全く明らかにされていなかった。本論文において、熱耐性に優れた細胞形態を特定したこと、耐性に関わる機能分子は休眠細胞の細胞内に存在し、休眠細胞への分化時に蓄積されることを明らかにしたこと、熱耐性に優れた細胞形態の細胞中のみ蓄積する低分子化合物が適合溶質としてタンパク質の熱凝集を抑制すること、またその活性濃度に関する情報が具体的かつ明確に示されたことは、光合成生物の藍藻の乾熱耐性機能の全容解明のための極めて貴重な情報を示した成果として高く評価できる。本論文で示された、陸棲藍藻の乾熱耐性機能に関する結果は、微生物や植物のみならず、全生物の細胞や組織の熱に対する耐性機能の付与や保護機構の解明に、大きく発展・貢献できる内容であると評価できる。

平成30年 1月 12日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。