

〈一般研究課題〉 スイゼンジノリにおける新奇機能性物質の
生合成経路解明
助成研究者 名城大学 景山 伯春



スイゼンジノリにおける新奇機能性物質の 生合成経路解明

景山 伯春
(名城大学)

Elucidation of biosynthetic pathway for novel functional compounds in *Aphanothece sacrum*

Hakuto Kageyama
(Meijo University)

Abstract :

Saclipins, novel UV-absorbing compounds isolated from an edible cyanobacterium *Aphanothece sacrum* endemic to Japan, are natural compounds that are promising as a cosmetic ingredient. It has been known that the accumulation of saclipins in *A. sacrum* was induced by drought stress, but its biosynthetic pathway was completely unknown. In this research project, we focused on lipoxygenases as the responsible enzymes involved in the biosynthesis of saclipins and analyzed their functions. As a result, it was suggested that AsLOX2, one of two lipoxygenases present in the genome of *A. sacrum*, is involved in the biosynthesis of saclipins.

1. はじめに

日本固有の淡水性シアノバクテリア株 *Aphanothece sacrum* は、スイゼンジノリと呼ばれ古くから食用利用されてきた歴史がある。*A. sacrum* の生息域はもともと九州の一部地域に限られていたが[1]、環境変化などの要因によって現在では福岡県朝倉市の黄金川のみで自生が確認されている希少種である。環境省によって絶滅危惧 I 類に指定されている[1]。

我々は *A. sacrum* の抽出液中に紫外線領域に大きな吸収を示す 2 つの物質が存在することを見出し、これらの物質の化学構造を決定した[2]。これらの物質は脂肪酸を前駆体とするオキシリピン類の化合物であり、saclipin A および saclipin B と名付けて報告した(図 1)。Saclipin A および

saclipin B の吸収極大は共に 320 nm 付近でモル吸光係数も $30,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 程度と大きく、UV-A および UV-B 領域の波長を効率よく吸収した。また、saclipin A および saclipin B が抗酸化作用と抗糖化作用を有することも明らかにした[2]。また最近になって、saclipins がエラスター阻害活性、チロシナーゼ阻害活性、メラニン生成抑制作用、コラーゲン産生促進活性、ヒアルロン酸生産促進活性を示すことを報告した[3]。さらに、saclipins が熱や光照射に対して化学的に安定であることを実証した[3]。これらの知見は、saclipins がスキンケア関連の化粧品への配合用途に有望な化合物であることを示している。

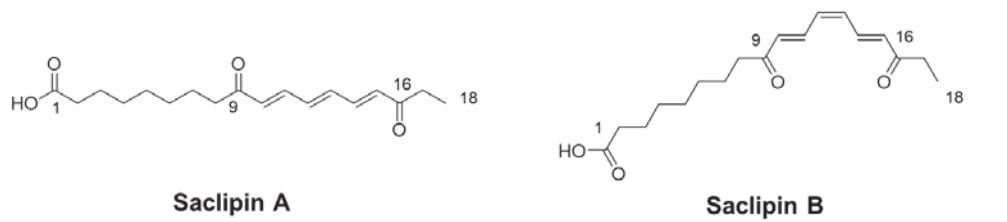


図1. Saclipin A および saclipin B の化学構造

シアノバクテリアが生合成する紫外線吸収物質としては、これまでにマイコスボリン様アミノ酸とシトネミンが報告されていたが、saclipins はこれらの化合物とは構造が全く異なるものであり、注目に値する天然化合物である[4]。

これまでに、*A. sacrum* において saclipins が乾燥ストレスによって誘導されることが分かっているが、生合成経路については明らかになっていない。我々は、 α -リノレン酸が saclipins の前駆体物質であると推定しており、saclipins の化学構造をつくりだすことが可能な酵素としてリポキシゲナーゼ、ペルオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソメラーゼが関与していると考えている(図2)。本研究課題では、リポキシゲナーゼ(LOX)に焦点をあてて解析を進めた。

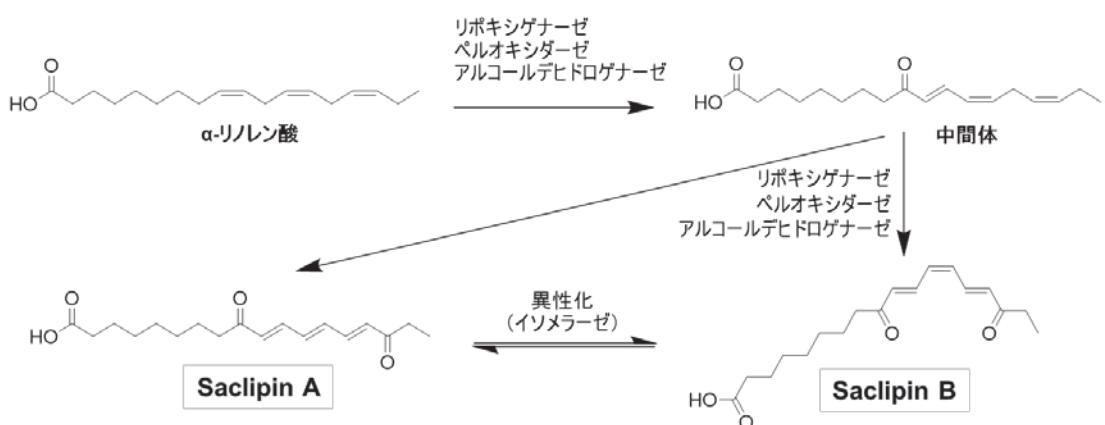


図2. Saclipins の推定生合成経路。 α -リノレン酸を前駆体とする多段階の酵素反応によって saclipin A および saclipin B が生合成されると推定している。

2. 試料および実験方法

A. sacrum は福井県立大学名誉教授の大城香博士よりご提供いただいたクローン株である *A. sacrum* FPU1 株を用いた[5]。National Center for Biotechnology Information のデータベース上に

公開されている *A. sacrum* FPU1 株のゲノム情報から得られた *LOX* 遺伝子と推定される 2 遺伝子 (*AsLOX1*, *AsLOX2*) の塩基配列を基に PCR 用プライマーを設計した。本プライマーを用いて *A. sacrum* FPU1 株のゲノムを鋳型として PCR をを行い、*AsLOX1* および *AsLOX2* 遺伝子をクローニングした。増幅した DNA 断片を大腸菌用発現ベクターに導入した後に、塩基配列を確認した。これらの発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌細胞を用いて *AsLOX1* および *AsLOX2* の組換え蛋白質を発現させ、アフィニティーコロマトグラフィー法によって粗精製した(図3)。これらの組換え蛋白質の LOX 活性の測定には Cayman Chemical 社の Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit を用いた。基質と *AsLOX1* または *AsLOX2* 蛋白質を反応させ、LOX 活性によって生じるヒドロペルオキシドを 490 nm で比色定量することで LOX 活性を測定した。

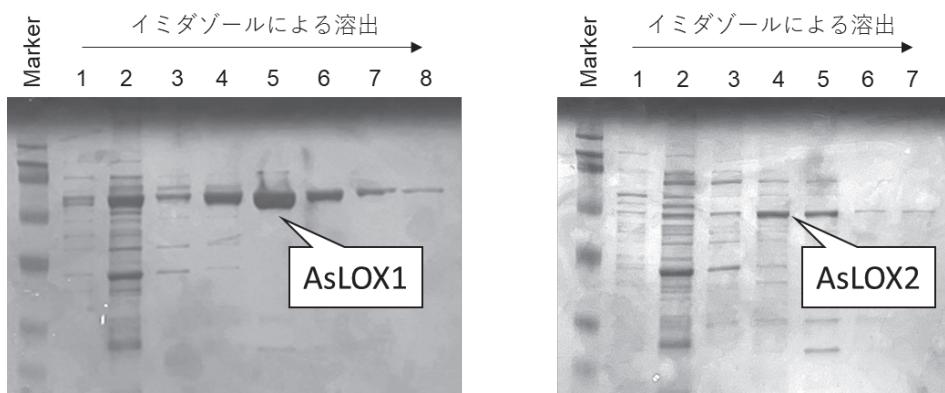


図3. *AsLOX1* および *AsLOX2* の粗精製。HisTrap HP カラムに吸着させた後に、イミダゾール濃度を上昇させて溶出させた。

3. 実験結果と考察

大腸菌発現系において、蛋白質発現誘導条件として温度、IPTG 濃度、誘導時間を検討した結果、*AsLOX1* および *AsLOX2* 蛋白質は共に可溶性画分として発現した。精製した両蛋白質を用いて、 α -リノレン酸、リノール酸およびアラキドン酸を基質として LOX 活性を簡易的に測定したところ、*AsLOX2* はすべての基質に対して LOX 活性が確認されたが、*AsLOX1* の活性は検出されなかった(図4)。*AsLOX2* は 3 つの基質のうち α -リノレン酸に対する活性が最も高かった(図4)。これらの結果から、*A. sacrum* において *AsLOX2* が saclipins の生合成に関与している可能性が示唆された。また、共役ジエン法によって *AsLOX2* の α -リノレン酸に対する LOX 活性の pH 依存性を調査したところ、塩基性 pH において最大活性を示すことが分かった。これらの結果は国内学会にて発表した[6]。 α -リノレン酸を前駆体とする saclipins の推定生合成経路においては、図2に示したように α -リノレン酸の 9 位と 16 位の炭素が LOX によって過酸化される必要がある。今後、*AsLOX2* の LOX 活性について過酸化部位の特定を含めてさらに詳細に調べる必要がある。

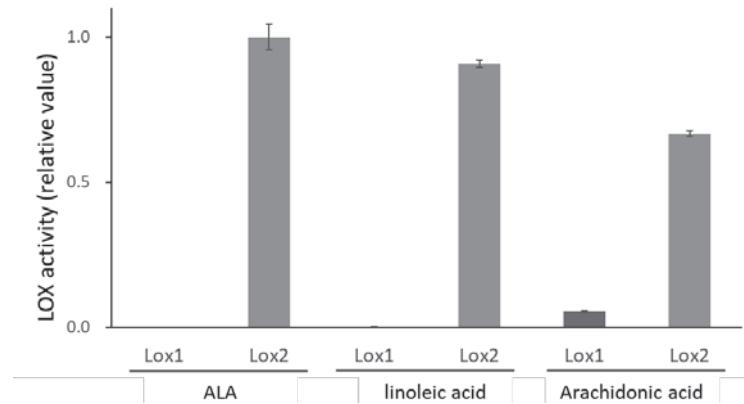


図4. AsLOX1 および AsLOX2 のLOX活性。 α -リノレン酸(ALA)に対するAsLOX2 蛋白質のLOX活性を1.0とした相対値を示した。

3. 参考文献

- [1] Oku N, Matsumoto M, Yonejima K, et al. (2014) Sacrolide A, a new antimicrobial and cytotoxic oxylipin macrolide from the edible cyanobacterium *Aphanthece sacrum*. Beilstein Journal of Organic Chemistry 10: 1808-1816.
- [2] Uchida Y, Maoka T, Palaga T, et al. (2023) Identification of desiccation stress-inducible antioxidative and antiglycative ultraviolet-absorbing oxylipins, saclipin A and saclipin B, in an edible cyanobacterium *Aphanthece sacrum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 71: 16137-16147.
- [3] Uchida Y, Honda M, Waditee-Sirisattha R, et al. (2024) Photo- and thermo-chemical properties and biological activities of saclipins, UV-absorbing compounds derived from the cyanobacterium *Aphanthece sacrum*. ACS Agricultural Science & Technology 4: 1260-1270.
- [4] Kageyama H and Waditee-Sirisattha R. (2025) Bioactive ultraviolet-absorbing compounds derived from cyanobacteria and microalgae. AIMS Molecular Science 12: 26-31.
- [5] Ohki K, Kanesaki Y, Suzuki N, et al. (2019) Physiological properties and genetic analysis related to exopolysaccharide (EPS) production in the fresh-water unicellular cyanobacterium *Aphanthece sacrum* (Suizenji Nori). The Journal of General and Applied Microbiology 65: 39-46.
- [6] 内田美重、景山伯春 (2025) Functional analysis of lipoxygenase involved in the biosynthesis of a novel UV-absorbing substance, saclipins, in *Aphanthece sacrum*. 第66回日本植物生理学会年会