The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Characterization of Bioactive Extracellular Pink Pigments Produced by Tropical Freshwater Cyanobacteria
Author(s)	Karseno
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/49650
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【21】

氏　　名	Karseno（カルセノ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学 位 記 番 号	第　２２８９０　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	Characterization of Bioactive Extracellular Pink Pigments Produced by Tropical Freshwater Cyanobacteria **（熱帯に生息する淡水性シアノバクテリアが細胞外に産出する桃色色素の解析）**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　平田　收正 （副査） 教　授　那須　正夫　　教　授　高木　達也　　教　授　八木　清仁

論 文 内 容 の 要 旨

シアノバクテリアが生合成する代謝産物は非常に多様な化学構造，生理活性を有し，従来から農業，食品，医薬など人類の生活の様々な場面で用いられてきた．熱帯地域に生息するシアノバクテリアは特に生物的多様性に富み，そのほとんどが未だ単離，同定がなされておらず，それらが生産する代謝物質は有用な医薬品，化学薬品のシーズとして今も尚，期待されている．シアノバクテリアが生合成する生理活性物質の多くは生合成した細胞内に蓄積されるが，細胞外に積極的に放出される物質も中には存在する．申請者はインドネシアで単離された淡水性シアノバクテリア*Oscillatoria* sp. BTCC/A0004，およびタイで単離された淡水性シアノバクテリア*Scytonema* sp. TISTR 8208が桃色色素を培地中に放出することを見出した．このように緑藻から細胞外に「色素」が放出されるという現象は珍しく，その生理的意義には興味が持たれる．また，当該色素が非常に有用な物質であった場合，細胞外に放出されるという性質は，培養工学的プロセスによる物質生産において，抽出，精製段階の削減あるいは簡略化などというメリットに繋がる．本研究は当該色素の医薬，化学薬品への応用展開の可能性を探るべく，当該新規桃色色素の物理化学的特性，生理活性，生合成促進因子の解析を目的とした．

藍藻の培養に汎用される改変C培地において両シアノバクテリアを回分培養したところ，培地中の桃色色素量は対数増殖期に急増することが明らかになった．さらに対数増殖期の細胞抽出液と培地濃縮液をSDS-PAGEに供したところ，両者でバンドのパターンが大きく異なっていることも明らかになった．これらの結果から桃色色素は単に死滅細胞から漏れ出るのではなく，活発に増殖

している細胞から能動輸送により細胞外に放出されることが示唆された．続いて塩析，ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した*Oscillatoria*由来桃色色素をOsPPと名付け，Native-PAGE，SDS-PAGEに供したところ，当該色素は分子量18, 20 kDaのサブユニットを有し，これらが会合した250 kDaのオリゴマータンパク質であることが明らかになった．OsPPの紫外・可視光吸収スペクトルを取得したところ，560, 620 nmに吸収極大を有し，また，498 nmの可視光により励起され，580 nmが極大となる蛍光を発生することも明らかになった．*Scytonema*由来桃色色素も同様の特性を示した．これらの物理化学的特性はシアノバクテリアの光受容タンパク質として知られるフィコエリスリンに非常に類似している．

光合成に必要な光エネルギーを受容し，光反応中心複合体にエネルギーを移動させるとされる色素がなぜ細胞外に放出されるのか，細胞生理学的に非常に興味深い現象である．また，既知のフィコエリスリンは色素添加物や光線力学治療への応用が検討されており，当該色素が既存フィコエリスリンに比べ有用な特性を有していれば，新規フィコエリスリンとしてこれらの分野への応用が期待される．そこで，OsPPの*Oscillatoria*における生理的意義の解明，および食品，医療分野への応用展開の可能性を探索することを志向して，OsPPの生理活性について詳細に解析を行った．緑藻である*Chlorella fusca*，*Chlamydomonas reinhardtii*の培養液にOsPPを添加すると濃度依存的に増殖阻害が観測された．*C. fusca*, *C. reinhardtii* における50%増殖阻害濃度は各々 0.5，6.0 mg ml^{-1}であった．一方，シアノバクテリアも含めたバクテリアにおいて生育阻害は観測されなかった．緑藻に対するOsPPの増殖阻害はOsPPを光照射することにより高まった．光照射したOsPP溶液の電子スピン共鳴(ESR)スペクトルを測定したところ，典型的なヒドロキシルラジカルのシグナルが検出された．活性酸素種のスカベンジャーであるカタラーゼやジエチレントリアミン六酢酸存在下で同様の測定を行うとシグナルが検出されなくなることから，OsPPは光照射により活性酸素種であるヒドロキシルラジカルを発生させる光増感作用を有することが示された．さらにヒト肺癌細胞A549に光照射したOsPPを処理したところ，細胞増殖が抑制された．以上の結果からOsPPが光線力学治療における新規光増感剤の有用な候補化合物となる可能性が示唆された．

最後に，新規桃色色素の培養工学的生産プロセスを志向し，OsPP生合成を活性化する環境因子の探索を行った．様々な環境因子を探索した結果，培地中の窒素濃度および照射する光の種類がOsPP生合成に影響を及ぼし，高濃度の窒素および色素と同じ色である桃色光がOsPP合成を促進することが明らかになった．培地のpH，光強度，温度，他の微生物の存在等の環境因子はOsPP合成に影響を及ぼさなかった．

以上の研究成果は新規桃色色素が光増感作用を介して緑藻やヒト細胞において細胞増殖阻害活性を有することを示し，新規殺菌剤や光線力学療法薬剤の開発促進に貢献する有用な情報を提供し得るものと考える．今後，当該色素の安定性，細胞毒性等をより詳細に解析することにより，これらの分野への展開が期待される．

論文審査の結果の要旨

博士論文「Characterization of Bioactive Pink Pigments Produced by Tropical Freshwater Cyanobacteria」では、有用な生物活性物質の探索資源であるラン藻から、新規物質として細胞外色素を単離し、その機能解析を行なった。

まず、タイおよびインドネシアで分離されたラン藻株において見出したタンパク性の細胞外色素について、その生産に対する環境条件の影響を調べ、高い生産性を示す条件を特定した。また本色素は、その物理化学的特性の解析から、フィコエリスリンに類似した構造および機能を有することが示された。次に、本色素を精製して生物活性を調べ、同じ淡水性の微細藻類である緑藻２株において特異的な増殖抑制作用を持つことを明らかにした。さらに、この作用は光照射下で強くなることも見出した。そこで、本色素の増殖抑制作用は光増刊作用によるものと推測して光照射による活性酸素の発生を観察し、特定種の発生を確認することにより、これを検証した。

これらの研究成果は、学術的にも高いレベルにあり、さらに癌等の新規治療薬開発への応用・貢献が期待できる有用な知見と言える。

以上、論文審査により、本論文は学術的な観点および今後広範な応用が期待できる実用的な応用研究という観点から、非常に優れた研究であることを確認し、大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程の博士論文に値するものと判断するに至った。