

Title	紫外線耐性菌の生存メカニズム解析
Sub Title	Survival Mechanism Analysis of Ultra Violet Resistive Bacteria
Author	鶴岡, 茉佑子(Tsuruoka, Mayuko)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2014
Jtitle	生命と情報 No.21 (2014.) ,p.32- 41
JaLC DOI	
Abstract	<p>生体への過度の紫外線(Ultraviolet ; UV)照射は、DNAをはじめとする様々な生体中の分子構造を変異させ、発がん作用など生命機能に悪影響を与える。そのためヒトを含む多くの生物は体内で色素を合成する事で、UVによる生体へのダメージを軽減する機能を保持している。特に一部の微生物は独自の色素合成経路に基づく高レベルのUV耐性を持ち、多量のUV照射を受けても生命を維持できる事が発見されつつある。一方で、これらのUV耐性菌が有する独自の耐性獲得メカニズムについては、いまだ未解明な部分が多い。近年、本研究の共同研究者であるアメリカ航空宇宙局エイムズ研究所Lima研究員によって、アリゾナ州ソノラ砂漠の土壌から特異的に高いUV耐性を持つ細菌が新たに単離培養された。この細菌は16S rRNAシーケンシングによる系統解析から、Geodermatophilus obscurusと特定されている。G. obscurusは、生育初期は薄赤色の細胞であるものの、定常期後半から濃い緑色～黒色の色素を合成・放出するようになり、生育初期には持たなかった高いUV耐性を獲得する。同じ土壌から単離されたGeodermatophilus属近縁種は黒～緑色の色素を合成せず、またUV耐性も持たない事から、G. obscurusに固有の色素が高いUV耐性の要因となっていると考えられる。本研究では、この特徴的な色素の特定を主軸とし、G. obscurusが有する生体防御メカニズムの解明を目的とした解析を行った。その結果、クロリン環を持つポルフィリン様代謝物が色素分子の有力候補として得られた。またG. obscurusでは多糖の合成・細胞外放出が亢進している事、その多糖から成る細胞外構造体に色素を顆粒として放出している事、エネルギー代謝関連物質と一部の補酵素の細胞内濃度が顕著に高い事が明らかになった。これらの結果から、G. obscurusは色素による細胞内外のUV吸収・高い代謝レベルによる細胞内の恒常性維持と、複数の働きによってUVダメージに対する抵抗性を強めている事が示唆された。高いUV耐性を実現するメカニズムの解明は、多量のUV-Cに晒される宇宙環境での宇宙船外活動から皮膚がん等の疾病予防まで、幅広い分野への活用と貢献が期待できる。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2014年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000021-0032

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

紫外線耐性菌の生存メカニズム解析

Survival Mechanism Analysis of Ultra Violet Resistant Bacteria

鶴岡茉佑子

要旨

生体への過度の紫外線（Ultraviolet; UV）照射は、DNAをはじめとする様々な生体中の分子構造を変異させ、発がん作用など生命機能に悪影響を与える。そのためヒトを含む多くの生物は体内で色素を合成する事で、UVによる生体へのダメージを軽減する機能を保持している。特に一部の微生物は独自の色素合成経路に基づく高レベルのUV耐性を持ち、多量のUV照射を受けても生命を維持できる事が発見されつつある。一方で、これらのUV耐性菌が有する独自の耐性獲得メカニズムについては、いまだ未解明な部分が多い。近年、本研究の共同研究者であるアメリカ航空宇宙局エイムズ研究所Lima研究員によって、アリゾナ州ソラ砂漠の土壌から特異的に高いUV耐性を持つ細菌が新たに単離培養された。この細菌は16S rRNAシーケンシングによる系統解析から、*Geodermatophilus obscurus*と特定されている。*G. obscurus*は、生育初期は薄赤色の細胞であるものの、定常期後半から濃い緑色～黒色の色素を合成・放出するようになり、生育初期には持たなかった高いUV耐性を獲得する。同じ土壌から単離された*Geodermatophilus*属近縁種は黒～緑色の色素を合成せず、またUV耐性も持たない事から、*G. obscurus*に固有の色素が高いUV耐性の要因となっていると考えられる。本研究では、この特徴的な色素の特定を主軸とし、*G. obscurus*が有する生体防御メカニズムの解明を目的とした解析を行った。その結果、クロリン環を持つポルフィリン様代謝物が色素分子の有力候補として得られた。また*G. obscurus*では多糖の合成・細胞外放出が亢進している事、その多糖から成る細胞外構造体に色素を顆粒として放出している事、エネルギー代謝関連物質と一部の補酵素の細胞内濃度が顕著に高い事が明らかになった。これらの結果から、*G. obscurus*は色素による細胞内外のUV吸収・高い代謝レベルによる細胞内の恒常性維持と、複数の働きによってUVダメージに対する抵抗性を強めている事が示唆された。高いUV耐性を実現するメカニズムの解明は、多量のUV-Cに晒される宇宙環境での宇宙船外活動から皮膚がん等の疾病予防まで、幅広い分野への活用と貢献が期待できる。

キーワード

Geodermatophilus obscurus ; 紫外線 ; 色素 ; メタボローム解析.

1. 序論

近年、本研究の共同研究者であるIvan PG Lima研究員（アメリカ航空宇宙エムズ研究所 [National Aeronautics and Space Administration; NASA]，米）によって、南米ソノラ砂漠の土壌から黒～緑色の細菌が単離・培養された。培養時の通し番号からIsolate 22と呼ばれるこの細菌は、培養初期には薄赤色のコロニーを形成するものの、培養時間が長くなるにつれて黒～緑色の物質を培地中に放出するようになる。種々の実験から、Isolate 22は色素の増加に応じて強い紫外線 (Ultra Violet; UV) 耐性を獲得する事が明らかになった (Figure 1A)。更に、Isolate 22が獲得するUV耐性は他の細菌種と比較しても著しく高く、放射線を含む様々な外部刺激に強い耐性を持つ事で知られる*Deinococcus radiodurans*を凌ぐ事が分かった (Figure 1B)。

Isolate 22に加え、同じ土壌サンプルからIsolate 32と呼ばれる薄赤色の細菌も単離されている。Isolate 22とIsolate 32は、16S rRNAシーケンシングの結果から、それぞれアクチノマイセス科に属する*Geodermatophilus obscurus*と、その近縁種*Geodermatophilus* sp. である事が判明した。Isolate 32は生育上の特徴においてIsolate 22と似た生態を示すが、生育後期になっても黒い色素を合成せず、またIsolate 22の持つ高いUV耐性能力を獲得しない。この事から、Isolate 22の有するUV耐性は、特徴的な黒緑色の色素によるものと考えられる。

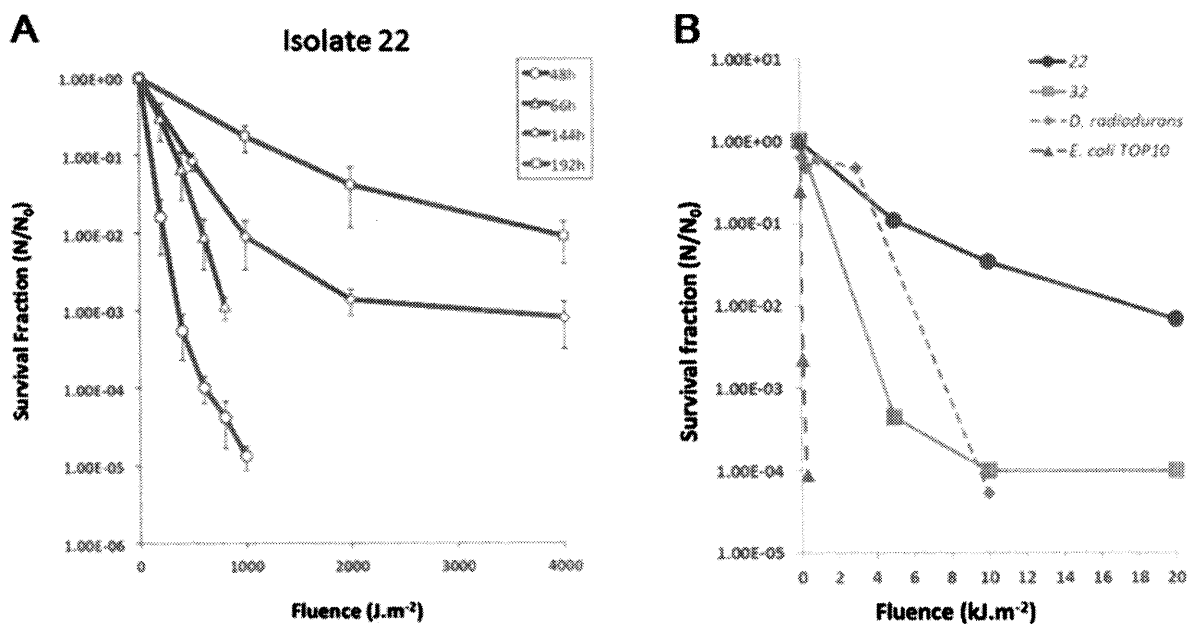


Figure 1. *Geodermatophilus obscurus*に対するUV照射実験の結果。(A) 培養時間ごとにUV耐性を測った実験の結果（共同研究者提供, unpublished）。横軸は照射したUVの量, 縦軸は照射量0とした時の生存率。培養時間が長いもの程UV耐性が強い事が分かる。(B) 細菌種間でUV耐性を比較した実験の結果（共同研究者提供, unpublished）。22: Isolate 22, 32: Isolate 32, *D. radiodurans*: *Deinococcus radiodurans*, *E. coli* TOP10: *Escherichia coli* TOP10株をそれぞれ表す。

Isolate 22こと*G. obscurus*の特徴的な生態は、1968年にはLuedemannらによって報告されている[1]。またIsolate 22が採取されたソノラ砂漠以外でも、イスラエルのネゲヴ砂漠[2]、アメリカ合衆国のウィップル山脈[3]、ネパールのエベレスト山脈[4]など、世界各地の極地で発見報告があるほか、2010年には全ゲノムが解読されている[5]。一方で*G. obscurus*の特徴である色素やUV耐性に関する研究は未だ例がなく、耐性獲得のメカニズムは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、色素の構造特定、ひいては*G. obscurus*が有するUV耐性メカニズムの解明を目指している。高いUV耐性を実現するメカニズムの解明は、多量のUV-Cに晒される宇宙環境での宇宙船外活動から皮膚がん等の疾病予防まで、幅広い分野への活用と貢献が期待できる。

色素を合成する細菌は分類上の区別をまたいで様々な種が確認されており、工業的な活用を目標として構造の分析を行った研究も数多く報告されている[6][7][8][9]。このような研究は基本的に抽出・単離を行った後に化学的な特徴を得て、最終的に色素分子の構造を決定するという流れに乗っている事がほとんどである。抽出段階では、多くの色素は脂溶性で1kDa以下の低分子化合物である事から、菌体をホモジナイズした溶液から液液分配によって色素層を段階的に抽出するのがセオリーとなっている。また構造解析の段階では、培養液が色に応じて特徴的な吸光度を示す事から、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) によって抽出液をカラム中で分け、事前に測定した培養液の吸光度と一致する層を質量分析計や、十分に純度が高ければ直接核磁気共鳴分光法 (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR) で解析しているケースが多い。しかし本研究で対象としている色素は菌体から放出されて培養液中に溶けている事から、サンプル中の色素は水溶性である事が分かっており、通常の液液分配法のみでは目的分子を単離できない。また培養初期では薄赤色である事から、サンプル中には複数の色素が混合しており、単純に吸光度だけでは分離できない事が予想される。そこで本研究では、色素の抽出・特定を目的とした一般的な分析アプローチに加えて、サンプル中成分の網羅的な分析を行った。後者のノンターゲットな分析は色素分子そのものを特定できない反面、生物学的な代謝動態の情報が得られるため、抽出法の検討だけでなくUV耐性メカニズムそのものについても有用であると考えられる。具体的な手法としては、色素分子のスクリーニングには液体クロマトグラフ - 飛行時間型質量分析計 (Liquid Chromatogram - Quadrupole Mass Spectrometer; LC-Q-TOFMS) による分析を行った。今回用いたLC-Q-TOFMSはタンデム型の質量分析計で、MS情報に加えてMS/MS情報を同時に取得できるため、未知分子の探索と構造推定に長けている。またノンターゲットな分析にはキャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析計 (Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometer; CE-TOFMS) を主に用いた。CE-TOFMSは中心代謝経路や、そこから派生する二次代謝産物を広く定量できるため、生物の代謝プロファイルを俯瞰するのに適している。本稿では、これらのメタボローム解析手法を用いたIsolate 22とIsolate 32の比較解析から、現時点までに明らかになった分析結果を報告する。

2. CE-TOFMSによる代謝プロファイル分析

2.1. 対象と手法

2.1.1. サンプル準備

Geodermatophilus obscurus (Isolate22) 及び *Geodermatophilus* sp. (Isolate32) は、いずれも NASA Ames Research Center (CA, USA) で48hまたは144h培養された。40hの時点ではIsolate 22・Isolate 32ともに菌体の色は薄赤色を示すが、144hの時点ではIsolate 22のみが黒緑色を示すため、この2ポイントを色素合成の前・後としてサンプリングを行った。各サンプルについては、以下Table 1に則って表記する。培養後の培養液は遠心 (20°C, 8000rpm, 5min) によって菌体ペレットと培養液上清に分けられ、培養液上清は各1mL (n=5) がサンプルとして分取された。菌体は0.9% NaCl水溶液に再展開・分取 (n=5) され、血球計算盤を用いて細胞数を算出した後、NaCl水溶液を除去されペレット状にされた。その後菌体・上清はそれぞれ1mLのMeOHを添加され、-80°C冷凍状態で慶應義塾大学先端生命科学研究所 (山形・日本) へ郵送された。

Table 1. サンプル情報

種名	培養時間 (h)	
	40	144
Isolate 22 (<i>Geodermatophilus obscurus</i>)	22-40	22-144
Isolate 32 (<i>Geodermatophilus</i> sp.)	32-40	32-144

全サンプルから菌体、培養液が採取された。各n=5。

2.1.2. 前処理

慶應義塾大学先端生命科学研究所に到着したサンプルは-80°Cで保管後、代謝物の抽出及び解析に用いた。まず菌体サンプルについては、全サンプル中の細胞濃度が等しく 6.65×10^7 (cells/L) になるようMeOHで希釈し、計500 μ Lの溶液とした。細胞膜を壊して代謝物を抽出するため、この溶液にCHCl₃ 500 μ L及びMilli-Q水200 μ Lを加えてボルテックスで攪拌した。遠心 (2300g, 4°C, 5min) の後、水溶性代謝物の含まれる水層400 μ Lを5kDaの限外ろ過チューブに通して高分子を除き、乾固させた後、Milli-Q水25 μ Lに再溶解して測定に供した。培養上清サンプルについては、Milli-Q水150 μ L, MeOH 500 μ L, CHCl₃ 500 μ Lにサンプル50 μ Lを加えてボルテックスで攪拌した。その後は菌体と同様、400 μ Lを5kDaの限外ろ過チューブに通し、乾固させ、Milli-Q水25 μ Lに再溶解して測定に供した。なおメタボローム測定にはAgilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies, CA, USA) を用いた。

2.1.3. データ処理

CE-TOFMSで検出されたスペクトルから、自動積分ソフトウェアMasterHands ver2.13.0.8 (慶應義塾大学先端生命科学研究所, 山形, 日本) によりシグナル/バックグラウンドノイズ比 > 3 のピークのみを解析対象として抽出し、質量電荷比 (m/z), ピーク面積値, 泳動時間 (Migration Time; MT) の値を取得した。その後m/z, MTの値を元にサンプル間でピークのアライメント処理を行ったのち、標品測定結果との比較から、各ピークについて物質名のアノテーションを行った。また機器中に注入されたサンプル量や検出器感度による影響を除くため、全ピーク面積は内部標準物質のピークを用いて正規化し、相対ピーク面積 (Relative Area; RelArea) に換算した。更に同位体・アダクト・フラグメント・ノイズ由来のピークを解析対象から除外し、最終的に得られたRelAreaを各代謝物の定量値とした。

2.2. 結果と考察

CE-TOFMSによるメタボローム解析によって、細胞で197種、培養上清で228種の代謝物が検出された。これらの定量値の比較から、細胞では中心代謝経路上の多くの物質が広範囲にわたって22-144で高い値を示しており、*G. obscurus* の細胞では死滅期に差し掛かる144時間の時点でも、近縁種に比べてエネルギー代謝が亢進されている事が示唆された。各菌体でリン酸結合エネルギーがチャージされている割合を示し、代謝活動の指標となるエネルギー・チャージ $\{[ATP]+0.5[ADP]/([AMP]+[ADP]+[ATP])\}$ の値も、概ね22-144 > 22-40 > 32-40 = 32-144であり、22-144でエネルギー代謝が亢進されている事を裏付ける結果となっていた (Figure 2A)。更に22-144は、これらのアデニンヌクレオチドATP・ADP・AMPの総和でも最も高い値を示していたほか、ATP産生の途上で用いられる補酵素 NAD⁺/NADH 及び NADP⁺/NADPH のうち酸化型 (NAD⁺・NADP⁺) が突出して多かった (Figure 2B)。ATPに加えてリン酸結合エネルギーの貯蓄に用いられる他のヌクレオシド-3リン酸の値も、同様に22-144で高い検出値を示していた (Figure 2C)。これらの結果から、22-144は通常よりも亢進されたエネルギー産生経路を持ち、リン酸結合エネルギーを多く蓄積していること、またこれは40h時点でも同族多種より高いエネルギー代謝活性が144h時点で更に亢進されている状態であることが示された。更に、NADP⁺の増加は細胞内の酸化ストレスの増強を示しており、これは主なATP産生反応である電子伝達系の亢進によって生じた活性酸素種によるものと考えられる。

一般的に細菌は培地中において生存に十分な代謝物が確保できなくなると死滅期に入り、細胞数が減少を始める。そのため今回Isolate 22に見られたエネルギー代謝経路の亢進は、Isolate 22において死滅期への移行・細胞数の減少を遅らせ、生存時間を延ばすことに繋がっていると予想できる。実際に細菌の細胞壁構成成分であり欠乏によって増殖が妨げられるdiaminopimelic acid [10]は、先述の中心代謝経路物質と同様 Isolate 22

で有意に高い値で検出されており，22-144の細胞が増殖に十分な代謝物を蓄えていることを示唆している (Figure 3D)．しかし今回用いたサンプルにおいて，Isolate 22とIsolate 32の間で増殖効率に明らかな差は見られなかった．このことから，Isolate 22において多量に合成されたATPをはじめとする各種代謝物は，主に増殖ではなくバイオフィルムの原料となる多糖類や細胞内の恒常性維持に用いられていると考えられる．

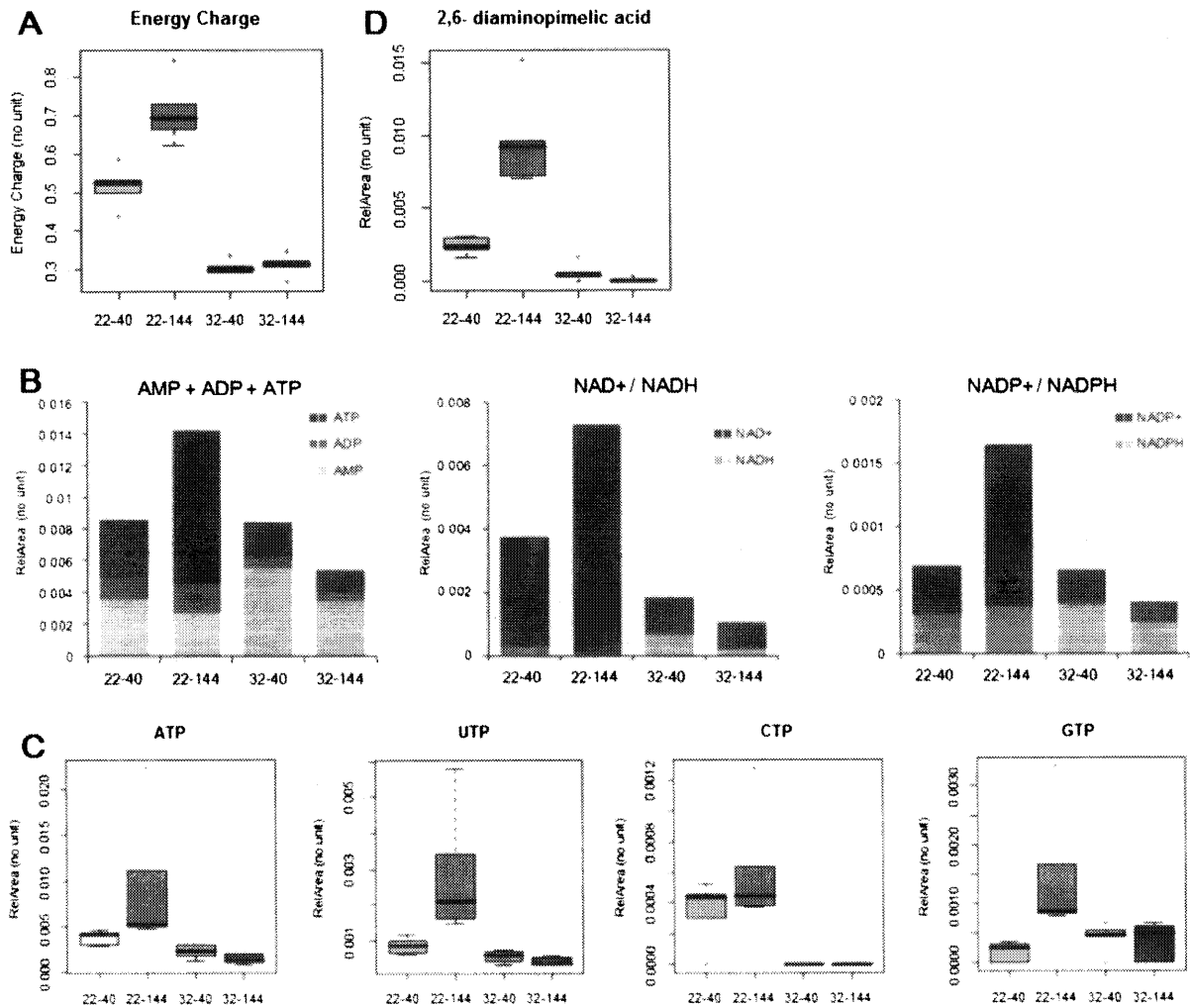


Figure 2. *G. obscurus*はエネルギー代謝経路が充進している。(A) 定量値を基に算出されたエネルギー・チャージの値，値が1に近い程，リン酸化エネルギーが豊富に貯蓄されている事を示す。(B) 定量値の総和と酸化型/還元型の割合。(C) ヌクレオチド-3-リン酸の定量値，UTP・CTP・GTPについて，リン酸化数の少ないものは定量できなかった。

3. LC-Q-TOFMSによる色素探索

3.1. 対象と手法

3.1.1. サンプル準備

CE-TOFMSによる水溶性代謝物の定量時と同様、NASAで培養されている Isolate 22・Isolate 32 それぞれを40時間・144時間培養した後の培養液4種を実験材料として用いた。採取された培養液は1mLのサンプルに対し1mLのMeOHを加えて-80°Cで冷凍された後、IABへ郵送された。

3.1.2. エタノール沈殿による色素抽出

菌体培養後の培養液には様々な高分子が夾雑している事が予想されるため、LC-MS測定の前処理として、エタノール沈殿による色素層の抽出の除去を行った。郵送された培養液を氷上で解凍後、濃縮遠心機 (20°C, 5h) でMeOHと水分を完全に蒸発させた後、MeOH添加前の状態に戻すため 500uL のMilli-Qに再溶解した。その後培養液サンプル300uLを1.5mLのEtOHに滴下してエタノール沈殿を行い、水層約60uLずつを回収した。回収した水層は再度濃縮遠心 (20°C, 1h) でペレット状にし、60uLのMilli-Qで再溶解してEtOHを除去した後、66uLのAcetonitrileとMeOH (移動相に含まれる有機溶媒) を加えて沈殿が生じない事を確認した。この抽出液のうち、50uLをサンプルとしてLC-MS測定に供した。

3.1.3. エタノール沈殿と加水分解による色素抽出

各種定性分析により*G. obscurus*が合成する色素は顆粒の状態では培養液中に存在する事、培養後の液中には多量の多糖類が含まれている事が明らかになった (3.2.1. で後述) ため、エタノール沈殿のみによる抽出法に加え、顆粒・多糖などの高次構造を分解する加水分解による抽出を行った。培養液の濃縮遠心と再溶解、エタノール沈殿による高分子の除去までは 3.1.2. と同様の手法で行い、100uLの水層を回収した。更に100uLの3M HClを加えて3時間静置した後、同量100uLの3M NaOHを加えて中和した。得られた溶液について遠心分離 (12,000rpm, 10min) を行い、上層を回収、ペレットを100uLのCHCl₃で溶解した。これらの抽出液のうち、上層・ペレットのそれぞれ50uLをサンプルとしてLC-MS測定に供した。

3.1.4. LC-Q-TOFMSによる脂溶性代謝物の定量

脂溶性代謝物の定量には、LC-Q-TOFMS (LC: Agilent Technologies, CA, USA; Q-TOFMS: AB Sciex, MA, USA) を用いた。移動相には溶媒A (Acetonitrile : MeOH : Milli-Q [= 20 : 20 : 60] + 5mM Ammonium Formate) と溶媒B (Isopropanol + 5mM Ammonium Formate) のグラジエントを用い、MS/MS測定を行った。今回用いたタンデム型質量分析計によるMS/MS解析は、通常のMS解析で得られる質量数の情報に加えて、各代謝物から生じるフラグメントの質量数の情報を得られるため、未知物質の探索や構造式の推定に適している。なお詳細な測定条件は先行研究に準拠する[12]。得られたピークの解析には Analyst TF 1.6 及び PeakView ver1.2 (AB Sciex, MA, USA) を用いた。

3.2. 結果と考察

3.2.1. エタノール沈殿抽出液ではオリゴ糖が*G. obscurus*特異的に検出された

エタノール沈殿によって得た色素抽出液について、いずれかのサンプルに特異的なクロマトグラムは見られなかった。そこでクロマトグラムでは見られない小スケールの差を検証するため、22-144で検出されたピークのうち、22-144と比べて Fold > 2.0 かつ 個々のピーク強度が5000以上 (または32-144のみ0) の条件にあて

はまるピークを探索したところ、1つのピークが該当した。このピークはm/zとフラグメントピークの分布から、分子式C₂₆H₅₇N₇O₂Sの物質由来であると推測された (Figure 4)。しかしこの分子式に一致する化合物は化学データベースPubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)・ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>)のどちらにも存在せず報告が無いため、これ以上の情報は得られていない。

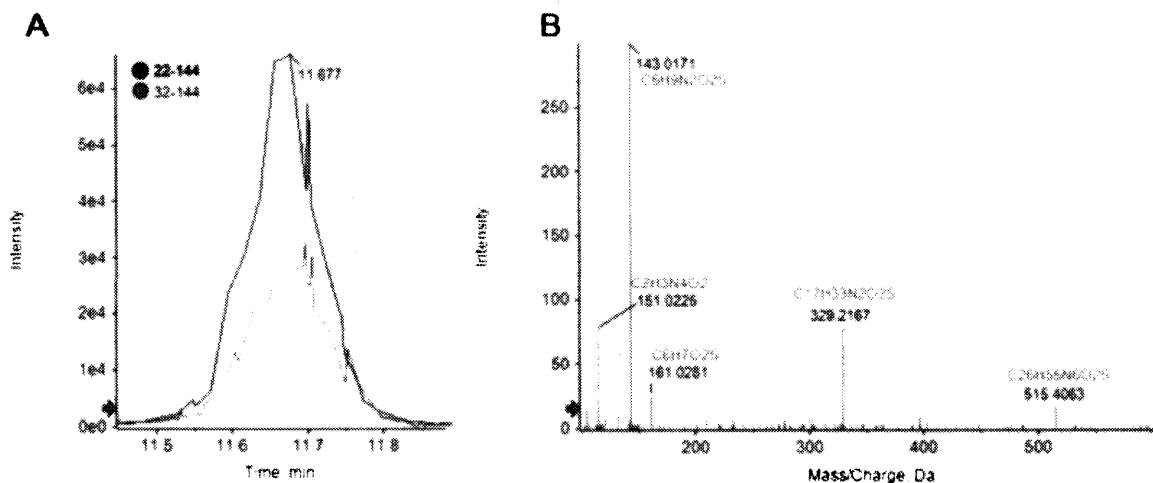


Figure 4. C₂₆H₅₇N₇O₂Sについて (A) 各サンプルでのピーク強度 (B) 得られたMS/MSスペクトルを表す。推測された各フラグメントの分子式を赤字で示した。

上記の物質以外に22-144で増加が見られたピークのうち、2ピークが代謝物データベースMETLIN (<http://metlin.scripps.edu/>)とのMS/MSスペクトルの一致から、オリゴ糖と予想された (Figure 5)。これは*G. obscurus*における多糖の合成と放出を示唆する結果である。このようなヘテロ多糖は細菌の形成するバイオフィーム中に広く見られるものであり、*G. obscurus*が色素と多糖から成るバイオフィームによって、UV照射を含む外部刺激から細胞を保護している事が予想される。

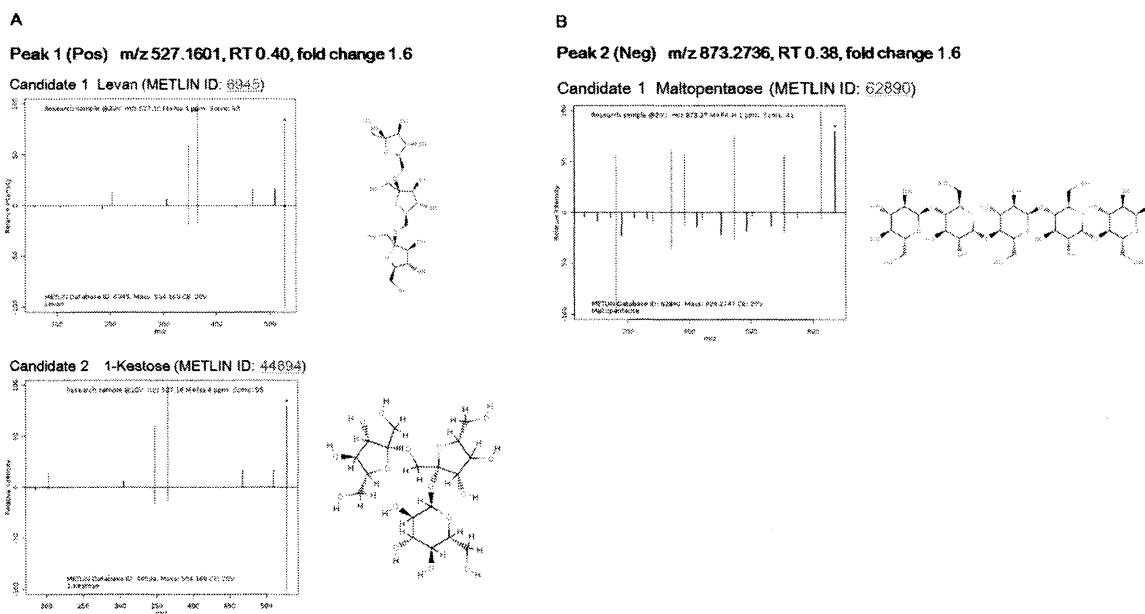


Figure 5. 検出されたMS/MSスペクトルと、一致したデータベース上の物質。上半分が検出されたスペクトル，下半分がデータベース上に登録されているスペクトルを表す。

3.2.2. エタノール沈殿+加水分解抽出液で検出された*G. obscurus*特異的なピークはクロリン骨格物質の可能性はある

エタノール沈殿と加水分解を併用して抽出した溶液は、遠心後の上清溶液ではクロマトグラムに差はなかったものの、ペレット溶解液は22-144においてRT = 14 (min) 付近に特異的なピークが検出された。それぞれのピーク群について、MS/MSスペクトルの一致するデータベース上の代謝物は見つからなかったため、MS・MS/MSで検出されたm/zを基に構造式の推定を行った。その結果m/z = 537.3961のピークについて、候補となる構造式が得られた (Figure 6)。m/z = 537.3961の候補として、クロリン骨格を持つ物質が得られた。クロリン環はポルフィン環のC=C二重結合の一つが単結合に置き換わった構造で、化学的性質はポルフィン環と大きな差異はない。これらの分子はヘム (ポルフィリン - Fe²⁺錯体) やクロロフィルa (クロリン - Mg²⁺錯体) に代表される通り、金属原子と錯体を形成し様々な生理活性を持つ事が知られている。また環状の共役構造を持つ事から、非常に安定な分子であるとともに、UVを含む特定の波長の光に吸光を持ち、錯体中心となる金属原子に応じて発色を示す。これらの性質から今回検出されたm/z = 537.3961の物質は、*G. obscurus*の特徴的な色素、ひいてはUV耐性に関わっている可能性がある。

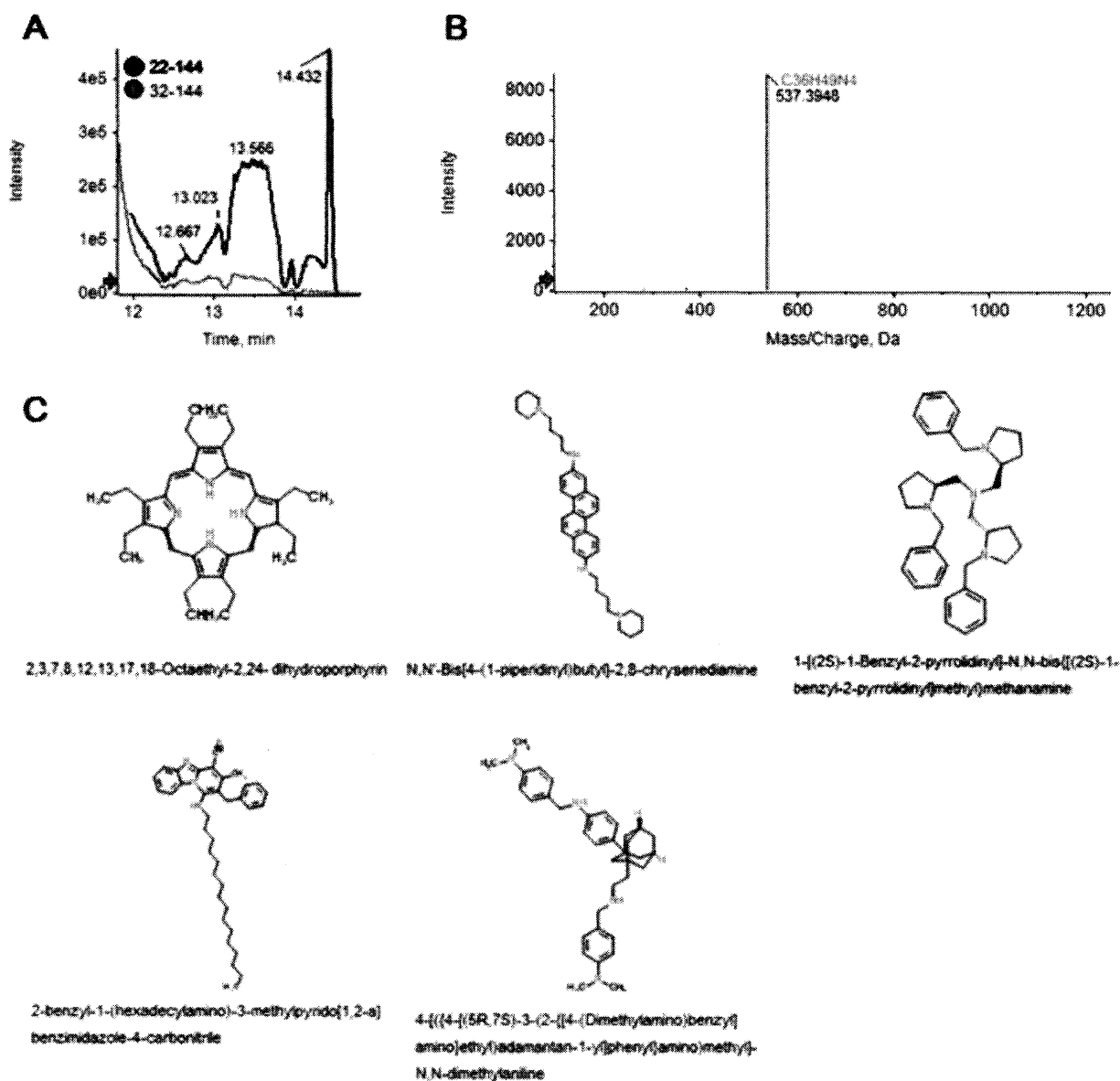


Figure 6. $m/z = 537.3961$ の詳細. (A) $m/z = 537.40 \pm 0.05\text{Da}$ の XIC (Extracted Ion Chromatogram), 12.6min以降, 22-144のみに大きなピークが複数回見られる. (B) MS/MSスペクトル. フラグメントピークが無いのは安定な構造であることを示唆している. (C) 推測された構造式. 構造・光学異性体は省いた. 画像はChemSpiderより転載.

4. 結論

LC-Q-TOFMSによる解析から、色素合成時の*G. obscurus*サンプルに特異的な物質として、 $m/z = 537.3961$ の物質が得られた。これはクロリン骨格構造を持つ物質である可能性があり、金属原子の錯体を形成する事で、*G. obscurus*の特徴的な色素としてはたらいっている可能性がある。またCE-TOFMSによる解析から、*G. obscurus*はエネルギー代謝が増加している事が示唆された。*G. obscurus*は細胞内外の色素によってUVダメージをブロックするだけでなく、多量のATPによって受けたダメージを修復しており、これら複数の経路を併用して高いUV耐性を実現していると考えられる。

謝辞

修士在学中の研究について辛抱強いご指導を頂いたアドバイザーの池田和貴氏、サンプル採取から手法の改善まで度々アドバイスを頂いた共同研究者の藤島皓介氏、Ivan Lima氏、Lynn Rothschild氏、そしてこのようなチャレンジングな研究に携わる機会とご支援を下さった富田勝氏に篤く感謝致します。

参考文献

- [1] G. M. Luedemann, "Geodermatophilus, a new genus of the Dermatophilaceae (Actinomycetales).," *J. Bacteriol.*, vol. 96, no. 5, pp. 1848–58, Nov. 1968.
- [2] O. Salazar, A. Valverde, and O. Genilloud, "Real-time PCR for the detection and quantification of geodermatophilaceae from stone samples and identification of new members of the genus blastococcus.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 346–52, Jan. 2006.
- [3] K. R. Kuhlman, L. B. Allenbach, C. L. Ball, W. G. Fusco, M. T. La Duc, G. M. Kuhlman, R. C. Anderson, T. Stuecker, I. K. Erickson, J. Benardini, and R. L. Crawford, "Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California," *Icarus*, vol. 174, no. 2, pp. 585–595, Apr. 2005.
- [4] E. E. Ishiguro and R. S. Wolfe, "Control of morphogenesis in Geodermatophilus: ultrastructural studies.," *J. Bacteriol.*, vol. 104, no. 1, pp. 566–80, Oct. 1970.
- [5] N. Ivanova, J. Sikorski, M. Jando, C. Munk, A. Lapidus, T. Glavina Del Rio, A. Copeland, H. Tice, J.-F. Cheng, S. Lucas, F. Chen, M. Nolan, D. Bruce, L. Goodwin, S. Pitluck, K. Mavromatis, N. Mikhailova, A. Pati, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y.-J. Chang, C. D. Jeffries, L. Meincke, T. Brettin, J. C. Detter, M. Rohde, M. Göker, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N. C. Kyrpides, and H.-P. Klenk, "Complete genome sequence of Geodermatophilus obscurus type strain (G-20).," *Stand. Genomic Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 158–67, Jan. 2010.
- [6] L. Lemee, E. Peuchant, M. Clerc, M. Brunner, and H. Pfander, "Deinoxanthin: A new carotenoid isolated from Deinococcus radiodurans," *Tetrahedron*, vol. 53, no. 3, pp. 919–926, Jan. 1997.
- [7] A. Franks, P. Haywood, C. Holmström, S. Egan, S. Kjelleberg, and N. Kumar, "Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium Pseudoalteromonas tunicata.," *Molecules*, vol. 10, no. 10, pp. 1286–91, Jan. 2005.
- [8] Y. Lu, L. Wang, Y. Xue, C. Zhang, X.-H. Xing, K. Lou, Z. Zhang, Y. Li, G. Zhang, J. Bi, and Z. Su, "Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China," *Biochem. Eng. J.*, vol. 43, no. 2, pp. 135–141, Feb. 2009.
- [9] I. Arulselvi, S. P. R. R. K. C., and R. S. Gurumayum, "Isolation and characterization of yellow pigment producing Exiguobacterium sps.," *Journal of Biochemical Technology*, vol. 4, no. 4, pp. 632–635.
- [10] R. J. Cox, A. Sutherland, and J. C. Vederas, "Bacterial diamino-pimelate metabolism as a target for antibiotic design.," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 8, no. 5, pp. 843–71, May 2000.
- [11] D. Kulms, E. Zeise, B. Pöppelmann, and T. Schwarz, "DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way.," *Oncogene*, vol. 21, no. 38, pp. 5844–51, Aug. 2002.
- [12] K. Ikeda, Y. Oike, T. Shimizu, and R. Taguchi, "Global analysis of triacylglycerols including oxidized molecular species by reverse-phase high resolution LC/ESI-QTOF MS/MS.," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 25, pp. 2639–47, Sep. 2009.