

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K06868

研究課題名（和文）カロテノイド生産工場の設計：高度好塩性古細菌を用いた多様なカロテノイドの大量合成

研究課題名（英文）Design of carotenoid production plant: Large scale synthesis of various carotenoids by extremely halophilic archaea

研究代表者

八波 利恵 (Yatsunami, Rie)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：90334531

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高度好塩性古細菌*Haloarcula japonica*を用いて、高い抗酸化活性を持つ新規カロテノイドを大量合成することを目的とした。

より抗酸化活性を持つカロテノイドを合成するために、共役二重結合数が15のテトラデヒドロリコペンを合成することを目指した。その合成にはカロテノイド不飽和化酵素（CrtD）に進化分工学的手法により変異を導入して用いた。変異を導入したCrtD遺伝子ライブラリーを解析したところ、リコペン合成に重要なアミノ酸残基を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は高度好塩性古細菌を用いて、新規カロテノイドを大量に合成することを目的とした。本研究では、当該微生物による新規カロテノイド合成に重要な酵素のアミノ酸残基を明らかにすることができた。今後はそのアミノ酸残基あるいは、その周辺に置換を導入することで、新規カロテノイドの大量合成へと繋がると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to synthesize a large amount of a novel carotenoid with high antioxidant activity by extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. In order to synthesize carotenoids with more antioxidant activity, we aimed to synthesize tetrahydrolycopene with 15 conjugated double bonds. For its synthesis, carotenoid desaturase (CrtD) was mutated by the directed evolution. Analysis of the mutated CrtD gene library revealed amino acid residues important for lycopene synthesis.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：新規カロテノイド合成

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1 . 研究開始当初の背景

申請者は、一貫して高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* に関する研究を行っており、2015 年に世界で初めて本菌の生産するカロテノイドであるバクテリオルベリン (BR, 図 1) の生合成経路を明らかにした。

カロテノイドは、イソプレン (炭素数 5 個: C_5 , 図 1 の点線で囲んだ部分) 単位が 8 個結合した C_{40} の基本骨格をもつ色素であり、 β -カロテン (C_{40})・アスタキサンチン (C_{40} -Asx) などがサプリメントとして販売されている。カロテノイドは、以前から食品の着色料、養殖魚の退色改善などの用途に用いられてきた。

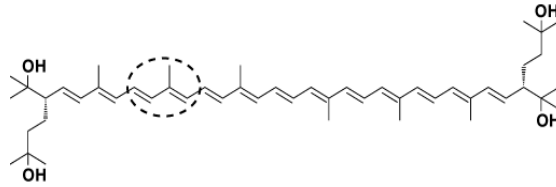


図 1 *Ha. japonica* が生産するバクテリオルベリン (BR) 点線で囲んだ部分はイソプレンを表す。

一方近年、カロテノイドは抗酸化作用・免疫賦活作用および抗腫瘍作用など、優れた生理活性を示すことが明らかとなってきた。そのため、機能性物質として医薬品・食品・化粧品などの分野で研究が盛んに行われている。しかしながら、天然物である植物等からのカロテノイド抽出には限界があり、効率的な製造法は見つかっていなかった。一方、微生物発酵および藻類から抽出される方法もあるが、他の生物混入によるコンタミネーション (微生物汚染)、カロテノイド抽出の煩雑さ、新規カロテノイドの大量生産系の欠如など多くの問題点を抱えていた。

2 . 研究の目的

本研究では、上記の問題を解決する、全く新しいカロテノイド生産系を確立することを目的とした。申請者が明らかにしたカロテノイド生産系を有する *Ha. japonica* をカロテノイド生産菌とし、これを用いたカロテノイド大量生産系を確立することとした。

本菌を用いることで問題を解決できると考えた理由は以下のとおりであった。

1. 他の生物混入によるコンタミネーションがなくなる。

なぜなら、申請者が研究してきた *Ha. japonica* は、生育に 20% の NaCl を必要とする。そのため、他の微生物の混入がほとんどおこらない。

2. カロテノイド抽出が容易である。

なぜなら、申請者が研究してきた *Ha. japonica* は、菌体内に高濃度の KCl を有する。そのため、水に懸濁するだけで、浸透圧により本菌は破裂され、酵素処理、超音波破壊および超臨界二酸化炭素抽出も行うことなく、カロテノイドを容易に抽出できる。

3. カロテノイドを大量に生産できる。

Ha. japonica は BR を菌体 1 g あたり数 10 mg 生産できる。そのため、大腸菌と異なり、カロテノイド生産の原料となるイソプレンなども大量に有していることからカロテノイドを大量に合成できる。

4. 多様な新規カロテノイドを大量に生産できる。

申請者は *Ha. japonica* の形質転換系を世界で初めて確立した。そのため、藻類とは異なり安定な組換え体取得が可能である。また、申請者は本菌のカロテノイド生合成経路を解明している。そのため、本菌のカロテノイド合成酵素の改変や生合成経路に非好塩性微生物由来の遺伝子を新たに導入したりすることで多様なカロテノイドを大量に合成することができる。さらに、申請者は、酵素の分子表面に酸性アミノ酸を配置することで耐塩化できることを見出した。そこで、この耐塩化法を使って非好塩性微生物由来のカロテノイド合成酵素を耐塩化することで、様々な酵素を好塩菌内で機能させることができると考えた。

3. 研究の方法

本研究は、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* を用いて新規カロテノイド大量合成系を構築することを目的とした。新規カロテノイドとは、BR (C₅₀) を基本骨格とした共役二重結合数が 17 の新規カロテノイドである。カロテノイドの特徴である抗酸化活性は、共役二重結合数が多いほど高い。BR の共役二重結合数は 13 であり、高い抗酸化活性を有する天然型 C₄₀-アスタキサンチンと同じである。そこで、より高い抗酸化活性を持つカロテノイドを合成するために、共役二重結合数が 17 の新規カロテノイドを合成することとした。このカロテノイドは、BR の前駆体である BABR (C₅₀) をさらに不飽和化して取得することとした。不飽和化には、申請者が見出した新規カロテノイド不飽和化酵素 (CrtD) に進化分子工学的手法によりランダム変異を導入して用いた。

まず、*crtD* 遺伝子にランダム変異を導入し、*Ha. japonica* に形質転換した。宿主は、申請者が保有する BABR (赤色) のみを生産する *Ha. japonica* 変異株とした。変異株は新規カロテノイドを合成するため、BABR とは異なった色を呈すると思われ、この色の違いにより変異型 CrtD を有する変異株が取得できると考えた。変異株が生産するカロテノイドを抽出し、液体クロマトグラフィーにより分離・解析した後、MS を用いて構造解析を行った。さらに変異型 *crtD* 遺伝子の塩基配列決定および変異型 CrtD の性質を調べて構造機能関連の解明も行った。なお、進化分子的手法による変異導入法は、申請者が既に確立した方法を *crtD* 遺伝子に応用した。

4. 研究成果

既に構築したランダム変異導入法を用い、変異を導入した *crtD* 遺伝子ライブラリーを取得した。なお、研究開始当初は、*Ha. japonica* を宿主とした形質転換効率が極めて低かったため、形質転換法の改良も行った。その結果、多様性を有するライブラリー取得に成功した。さらにライブラリーを解析したところ、リコペン合成の途中で生合成が滞っているクローンを見出した。クローンが生産するカロテノイド分析およびクローンが生産する変異型 CrtD の解析を行った。その解析より、CrtD に複数のアミノ酸置換が導入されていることがわかった。そこで、複数のアミノ酸置換箇所を一箇所ずつにわけた変異型 CrtD を作製し、不飽和化反応における関与を調べた結果、リコペンからの不飽和化反応に重要なアミノ酸残基を複数見出すことができた。このアミノ酸箇所を他の微生物由来 CrtD のものと比較したところ、微生物種に関わらず、共通の重要なアミノ酸残基を見出すことができた。一方で、*Ha. japonica* CrtD にのみ有する重要なアミノ酸残基があることが明らかとなった。すなわち、*Ha. japonica* CrtD と他の微生物 CrtD の触媒反応は、一部異なっている可能性が考えられた。さらに、*Ha. japonica* CrtD 立体構造モデルを構築し、本研究で見出した活性に重要なアミノ酸残基と基質との相互作用を解析した。その結果、当該箇所のアミノ酸残基の変異と活性の間に明らかな相関が見られることがわかった。

今後は、*Ha. japonica* CrtD に見られたアミノ酸置換箇所に対し、様々なアミノ酸を導入し、どのアミノ酸が不飽和化に最適かを検索する。さらに、CrtD 立体構造モデルにおいて見出した基質との相互作用部分にアミノ酸置換を施し、BABR (C₅₀) をさらに不飽和化することを行う。これらを組み合わせることで、効率よく、大量に新規カロテノイドを合成すること可能と期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 K. Nakatani, Y. Katano, K. Kojima, T. Takita, R. Yatsunami, S. Nakamura, K. Yasukawa.	4. 巻 82
2. 論文標題 Increase in the thermostability of <i>Bacillus</i> sp. strain TAR-1 xylanase using a site saturation mutagenesis library	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1495550.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 K. Toyama, D. Misu, Rei Kajitani, K. Endo, T. Fukazawa, R. Yatsunami, T. Ito, T. Fukui, and S. Nakamura	4. 巻 16
2. 論文標題 Characterization of a novel multi-domain chitinase from alkaliphilic <i>Nocardioopsis</i> sp. strain F96	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Jpn. Soc. Extremophiles	6. 最初と最後の頁 37-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小島和士, 佐野直也, 安藤 藍, 楊 影, 三横伸弘, 高市真一, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 新規カロテノイド創製に向けた <i>Haloarcula japonica</i> カロテノイド生合成系の改変
3. 学会等名 酵素工学研究会第80回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東紀碩, 相良龍太, 萩原佑介, 村瀬彩華, 坂上耕一, 三原康博, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 <i>Paenibacillus</i> sp. H2C 株由来アラビノフラノシダーゼ Abf43A および Abf51Aの大腸菌における発現と組換え酵素の性質検討
3. 学会等名 酵素工学研究会第80回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桶田智博, 萩原佑介, 伊東紀碩, 坂上耕一, 三原康博, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 Paenibacillus sp. H2C 株由来 GH5 キシラナーゼ Xyn5Aの大腸菌における発現と組換え酵素の性質検討
3. 学会等名 酵素工学研究会第80回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥田敬子, Bat-Erdene Undramaa, 萩原佑介, 坂上耕一, 三原康博, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 Paenibacillus sp. H2C 株由来各種 GH10キシラナーゼの切断特異性比較
3. 学会等名 酵素工学研究会第80回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川雄太郎, 朝日達哉, 清原三絵, 吉田健人, 鈴木龍一郎, 鈴木英治, 福居俊昭, 八波利恵, 中村 聡
2. 発表標題 高度好塩性古細菌 Haloarcula japonica 由来菌体内グルコアミラーゼのドメイン解析およびグリコーゲン様多糖生成への寄与
3. 学会等名 第17回微生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大越智之, 相良龍太, 萩原佑介, 坂上耕一, 三原康博, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 Bacillus および Paenibacillus 属細菌由来各種 GH30 キシラナーゼの性質比較および耐熱化検討
3. 学会等名 第17回微生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安部航司, 塩梅昇太, 伊藤栄紘, 池田郁也, 八波利恵, 蒲池利章, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 高度好塩性古細菌 <i>Haloarcula japonica</i> 由来エステラーゼの酵素学的性質およびカチオン性コポリマーへの固定化
3. 学会等名 第17回微生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木理紗, 八波利恵, 高橋季之, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 高度好塩性古細菌 <i>Haloarcula japonica</i> の代謝改変によるスクアレン生産の向上
3. 学会等名 第20回生体触媒化学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長岡真太郎, 杉山典子, 中川真理, 鈴木 薫, 八波利恵, 福居俊昭, 竹中章郎, 関口武司, 中村 聡
2. 発表標題 <i>Haloarcula japonica</i> 由来3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼLeuBの性質検討とleuB遺伝子の栄養要求性マーカーへの応用
3. 学会等名 極限環境生物学会2018年度 (第19回) 年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸松彩理, 遠山絹華, 八波利恵, 福居俊昭, 中村聡
2. 発表標題 好アルカリ性細菌 <i>Bacillus</i> sp. J813株由来GH18キチナーゼに存在する挿入ドメインの機能解析
3. 学会等名 第31回日本キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塩梅昇太、安部航司、吉田健人、八波利恵、福居俊昭、 中村 聡
2. 発表標題 高度好塩性古細菌Haloarcula japonica の内在性プラスミド上にコードされる新規耐塩性エステラーゼの親株における発現と性質検討
3. 学会等名 酵素工学研究会 第78回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末田凜, 吉田健人, 小野寺雅彦, 八波利恵, 福居俊昭, 中村聡
2. 発表標題 Haloarcula japonicaの多分岐グルカン生合成系を構成するヌクレオチジルトランスフェラーゼの親株における発現と組換え酵素の性質検討
3. 学会等名 極限環境生物学会2017年度(第18回)年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末田凜, 吉田健人, 小野寺雅彦, 八波利恵, 福居俊昭, 中村聡
2. 発表標題 Haloarcula japonicaの多分岐グルカン生合成系の解析:ヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子ホモログの転写解析と組換え酵素の性質検討
3. 学会等名 第16回微生物研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐野直也, 安藤藍, 三横伸弘, 高市真一, 八波利恵, 福居俊昭, 中村聡
2. 発表標題 高度好塩性古細菌Haloarcula japonica 由来フィットエンデサチラーゼ/3,4-デサチラーゼの進化分子工学的検討
3. 学会等名 第16回微生物研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤元紘, 館岡侑輝, 福居俊昭, 八波利恵, 中村聡
2. 発表標題 好アルカリ性 <i>Bacillus</i> sp. 41M-1 株由来 GH 11 キシラーゼの進化分子工学検討: アルカリ性での比活性が向上した変異型酵素の取得
3. 学会等名 第17回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 遠山絹華, 三須大樹, 梶谷 嶺, 遠藤さみ子, 深沢徹也, 康 斐, 八波利恵, 伊藤武彦, 福居俊明, 中村 聡
2. 発表標題 好アルカリ性放線菌 <i>Nocardiopsis</i> sp. F96 株由来 GH ファミリー 18 キチナーゼの性質検討および各ドメインの機能解明
3. 学会等名 第17回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 塩梅昇太, 吉田健人, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 高度好塩性古細菌 <i>Haloarcula japonica</i> 由来新規耐塩性エステラーゼの親株における発現と性質検討
3. 学会等名 第17回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 吉田健人, 小野寺雅彦, 清原三絵, 朝日達哉, 八波利恵, 福居俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 高度好塩性古細菌 <i>Haloarcula japonica</i> 由来多分岐グルカン生合成系遺伝子群の転写解析と 4- β -グルカノトランスフェラーゼの性質検討
3. 学会等名 第17回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kinuka Toyama, Daiki Misu, Rei Kajitani, Kimiko Endo, Tetsuya Fukazawa, Rie Yatsunami, Takehiko Ito, Toshiaki Fukui and Satoshi Nakamura
2. 発表標題 Characterization of GH Family 18 Chitinases from Alkaliphilic Actinomycete Nocardiosis sp. Strain F96
3. 学会等名 11th International Congress on Extremophiles (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 遠山 絹華, 三須 大樹, 梶谷 嶺, 遠藤 きみ子, 深沢 徹也, 八波 利恵, 伊藤 武彦, 福居 俊昭, 中村 聡
2. 発表標題 好アルカリ性放線菌 Nocardiosis sp. F96 由来 GH ファミリー 18 キチナーゼ ChiF1 および ChiF3 の性質検討
3. 学会等名 第30回 日本キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----