

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K23670

研究課題名（和文）カロテノイド酸化開裂酵素の進化分子工学によるアポカロテノイド多様性の創出

研究課題名（英文）Creation of Apocarotenoid Diversity through Evolutionary Molecular Engineering of Carotenoid Oxidative Cleavage Enzymes

研究代表者

古林 真衣子（Furubayashi, Maiko）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：90849895

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：アポカロテノイドとは、カロテノイドの酸化開裂産物の総称であり、植物ホルモンや香り分子をはじめとする様々な生物機能が知られている。本研究では、多様な生物由来のカロテノイド開裂酵素（CCO）を用いて、さまざまなカロテノイドを生産する組換え大腸菌で発現させることにより、新規アポカロテノイドを実験室内で作り出すことを目指した。微生物や植物由来の多様なCCO遺伝子を、カロテノイド生産大腸菌の中で発現させたところ、元の基質ではないカロテノイドの切断、つまり新規アポカロテノイドの生産に成功した。さらに、CCO酵素へのアミノ酸変異導入により、新たなアポカロテノイドの効率生産ができることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、自然界に存在するカロテノイド開裂酵素（CCO）遺伝子をカロテノイド生産大腸菌に導入して調べることにより、その基質選択性を詳細に調べた。その結果、本来の基質以外のカロテノイドを切断することができることを見出した。この成果は、自然界のアポカロテノイド経路の進化のさらなる理解につながるだろう。また、アポカロテノイドは多様な生理活性や健康・美容効果が知られているが、本研究で生み出されたアポカロテノイド、およびこの方法を用いて生み出しうる新たなアポカロテノイド化合物の生物活性や物性を調べることで、より機能性が高く価値のある化合物の発見に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Apocarotenoids are the general term for the oxidative cleavage products of carotenoids, and are known for various biological functions, including plant hormones and fragrance molecules. In this study, we aimed to create novel apocarotenoids in the laboratory by expressing a variety of carotenoid cleavage enzymes (CCOs) from diverse biological origins in recombinant *E. coli* that produce various carotenoids. By expressing a variety of CCO genes from microorganisms and plants in carotenoid-producing *E. coli*, we succeeded in the cleavage of carotenoids that are not the original substrates, in other words, the production of novel apocarotenoids. Furthermore, by introducing amino acid mutations into the CCO enzyme, we discovered the possibility of efficient production of new apocarotenoids.

研究分野：生合成工学

キーワード：アポカロテノイド カロテノイド 生合成 レチノイド 生合成工学 合成生物学

## 1. 研究開始当初の背景

カロテノイドは赤から黄色の彩りを与える、自然界に多く存在する天然色素の一群である。カロテノイドが開裂された産物「アポカロテノイド」も極めて豊かな多様性を誇る：バラの香りやトマトの匂い等の香料分子や植物のストレスホルモン、さらにはビタミン A としてなど、多彩な生物機能を示し、近年その同定や解析研究が大きな注目を浴びている。アポカロテノイドは、「カロテノイド酸化開裂酵素 CCO」によって、カロテノイド“切断”されることにより生合成される。植物や動物、藻類等の様々な生物源から単離されている CCO は、さまざまなカロテノイドに作用し、多種多様なアポカロテノイドを創り出す (図 1a)。

カロテノイドは長い鎖長をもつ疎水性分子であり、色素・抗酸化作用・光合成集光分子として重要である。その一方、アポカロテノイドはより短く親水的で、揮発性分子も多く、ホルモンやシグナル分子等の多様な生物機能を示す。自然界での働きが重要であるだけでなく、新たな創薬・ホルモン分子としてなども可能性を秘めている分子である。しかし、これまでアポカロテノイドの探索は、自然界から新たな分子・生合成経路を発見してくるものが主であった。

ここで、既に千種類を超える天然カロテノイド構造や、実験室で生み出されてきた人工非天然カロテノイド構造は、全て CCO の基質となりうると考えられ、その組み合わせ次第では膨大な量の未発見アポカロテノイドを作り出せる可能性を秘めている (図 1b)。特に、CCO は基質特異性が広いもの (異なるカロテノイド基質を認識・または複数箇所で開催) も発見されており、微生物内でも活性が見られることから、可塑性が高く工学し易い酵素だと考えられる。CCO の特異性を理解してカロテノイド経路と掛け合わせることで、多種多様なアポカロテノイドを実験室内で創出できるだろうと考えた。

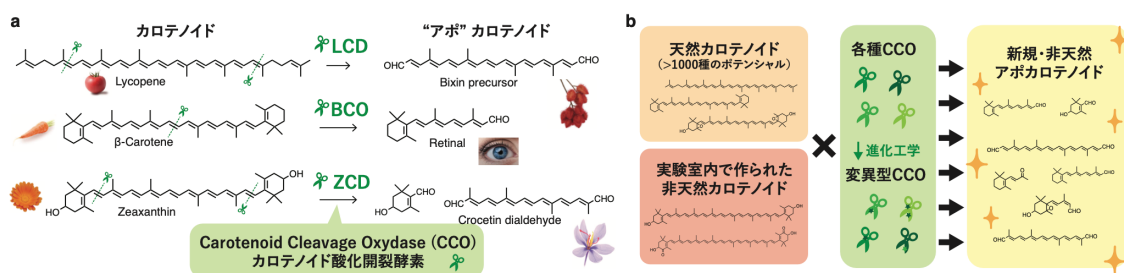


図 1. アポカロテノイドの生合成工学

## 2. 研究の目的

本研究では、大腸菌内でのアポカロテノイド生合成工学・スクリーニング系を構築し、カロテノイド酸化開裂酵素 CCO の大腸菌内機能発現・酵素工学を行うことにより、天然・非天然アポカロテノイドの多様性を実験室内で創り出すことを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種カロテノイドを生産する大腸菌株および CCO 発現コンストラクトの作製

カロテノイドを生産する細菌 (*Pantoea ananatis*, *Brevundimonas* sp. SD212, *Brevibacterium linens*, *Myxococcus xanthus*) および植物 (*Arabidopsis thaliana*, *Lactuca sativa*) のカロテノイド生合成酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌用ベクター (p15A) を用いて、各種カロテノイドを生産させるためのプラスミドコンストラクトを作製した。具体的には lycopene,  $\beta$ -carotene, zeaxanthin, canthaxanthin, astaxanthin,  $\gamma$ -carotene,  $\epsilon$ -carotene,  $\delta$ -carotene, isorenieratene 用のコンストラクトを作製した。

CCO 酵素遺伝子を発現させるため、pMB1 由来のベクターに lac promoter を配置したベクター (pUClac) を作製した。ここに、多様な生物由来の CCO をクローニングした。ここで、CCO は大腸菌での発現に最適化させるため、コドン最適化およびリボソーム結合部位の最適化を行なった。

## (2)組換え大腸菌の培養と生産物の抽出・分析

大腸菌 K-12 株 (DH5  $\alpha$ , NEB Turbo または XL1-Blue) に、カロテノイド合成プラスミドおよび CCO 発現プラスミドを導入し、コロニーを形成させた。コロニーをつついて LB で一晩培養し、これを 10 mL TB 培地に植え継いだ。ここで、TB 培地にドデカンを上層させた。24 時間から 48 時間、30°C・200 rpm で振盪培養後した。培養液層を回収し、色素をアセトン抽出し、吸光および LCMS 分析を行い、生産されるカロテノイドを分析した。また、ドデカン層を LCMS で分析し、含まれるアポカロテノイドを分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

#### ① 大腸菌を用いた CCO 機能評価系の構築

CCO 機能 (カロテノイド基質特異性および酵素活性) を大腸菌内で簡便に評価できる系を作製するため、まず、各種カロテノイドを選択的に生産させる大腸菌株を作製した。具体的には、p15A 由来のベクターに、各種カロテノイドを生産させるためのオペロンコンストラクトをデザインした。ここで、強度の異なるプロモータ (J23119 シリーズ) を各オペロンの前に配置した。これらのコンストラクトを大腸菌に導入してカロテノイドを分析したところ、目的カロテノイドのみを選択的に生産し、かつ、異なる量のカロテノイドを生産した (図 2)。このように基礎的なカロテノイドをさまざまな量で生産させる大腸菌ラインナップを揃えることができた。

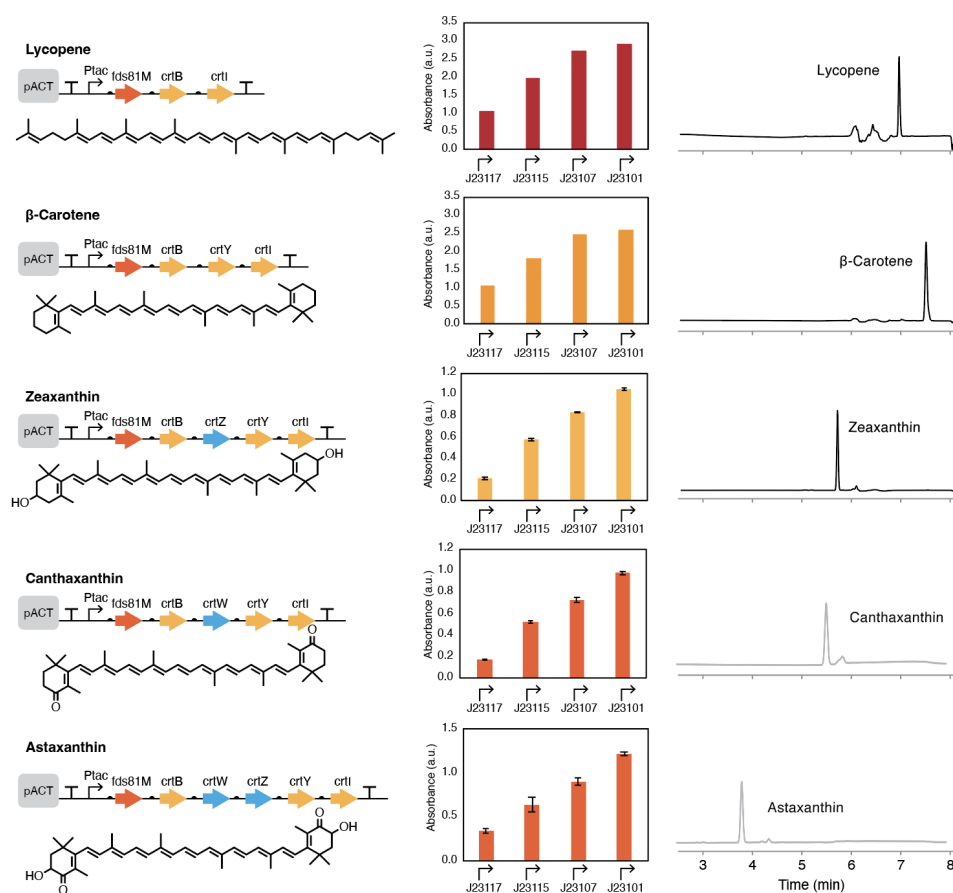


図 2. カロテノイドオペロンの作製

#### ② カロテノイド経路×CCO の掛け合わせによる多様なアポカロテノイド生産

構築した複数種のカロテノイド経路 (図 2) と、CCO 遺伝子とをコンビナトリアルに組み合わせで発現し、各種カロテノイドの切断により、アポカロテノイドを生産することができるかを調査した。

使用した CCO は、*Crocus sativus* CsCCD2, *Bixa orellana* BoCCD1, BoCCD4, uncultured marine bacterium 66A03 由来 Blh, *Phycomyces blakesleeanus* CarS, *Fusarium fujikuroi* CarX である。これらのうち、*B. orellana* 以外の CCO のカロテノイド開裂活性を大腸菌内で確認することができた。

次に、様々なカロテノイド生産大腸菌に、各種 CCO を発現させ、カロテノイドを開裂させることができるかを調べた。このうち、一種の CCO が特に強いカロテノイド開裂活性をもつことを見出した。この CCO を、本来の基質ではないカロテノイドである Astaxanthin を生産させる大腸菌に導入したところ、Astaxanthin に加え、中間体である Canthaxanthin や Zeaxanthin の切断産物 (アポカロテノイド/レチノイド) を見出すことができた (図 3)。

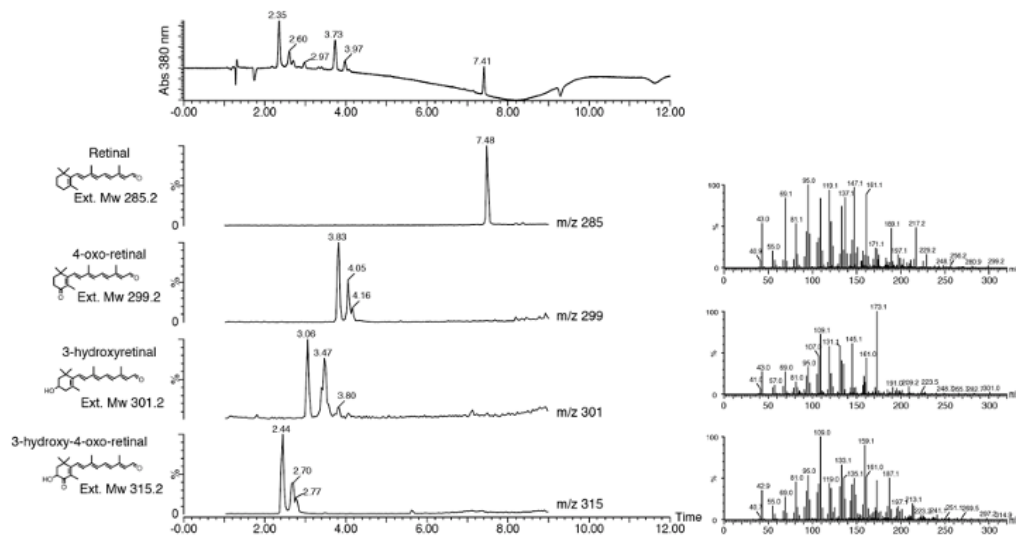


図 3. Astaxanthin 生産大腸菌に CCO を共発現させてできた新規アポカロテノイド

### ③ CCO の基質選択性改変の工学

上記項目②で見出した CCO の酵素活性・特異性の改変を試みるため、アミノ酸変異導入を行なった。CCO の結晶構造を Alphafold2 で予測し、基質が結合するキャビティ部分を同定した。このキャビティの天井部分を形成するアミノ酸 9 カ所を、体積の小さいアミノ酸であるアラニンに置換した変異体をそれぞれ作製した。それぞれの CCO 変異体遺伝子を Astaxanthin 生産大腸菌に導入し、その切断効率を調べた。その結果、変異体番号 2 の遺伝子を用いた場合に、Astaxanthin の切断産物を効率的に生産した (図 4)。この変異体を用いた場合、他のカロテノイド (Zeaxanthin) も効率的に切断できることがわかった。このように、カロテノイド生産大腸菌と CCO の変異体を組み合わせる結果、新たなアポカロテノイド化合物を生産することに成功した。

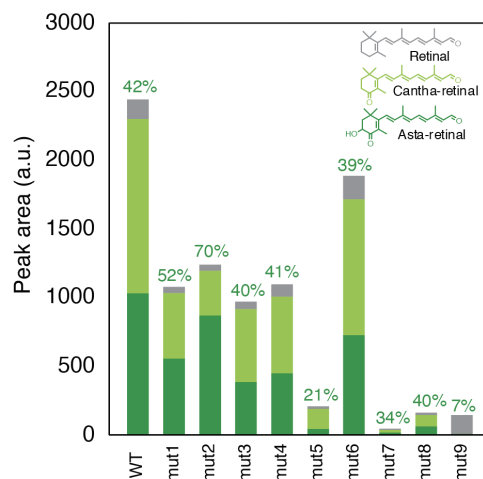


図 4. キャビティへの変異導入をした CCO 変異体による Astaxanthin 切断活性

## (2) 今後の展望

本研究では、様々なカロテノイドと様々な CCO、およびその変異体を組み合わせることにより、これまで切断できることの知られていなかったカロテノイドを切断し、新たなアポカロテノイド構造を作り出すことができることを示した。本研究で使用した以外にも、まだ多くのカロテノイドや CCO の組み合わせを試すことができ、今後ラインナップを広げていくことにより、さらなる化合物を生み出すことができると考えられる。また、進化学などのハイスループットな酵素工学の手法を CCO に適用させることで、その工学を加速させることができるだろう。

また、本研究で生み出されたアポカロテノイド、およびこの方法を用いて生み出する新たなアポカロテノイド化合物の生物活性や物性を調べることにより、より機能性が高く価値のある化合物を見出すことができるかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 1件）

1. 著者名 Furubayashi Maiko, Maoka Takashi, Mitani Yasuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Promiscuous activity of carotene hydroxylase CrtZ on epoxy-carotenoids leads to the formation of rare carotenoids with 6-hydroxy-3-keto ends	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furubayashi Maiko, Kubo Akiko, Takemura Miho, Otani Yuko, Maoka Takashi, Terada Yoshinobu, Yaoi Katsuro, Ohdan Kohji, Misawa Norihiko, Mitani Yasuo	4. 巻 69
2. 論文標題 Capsanthin Production in Escherichia coli by Overexpression of Capsanthin/Capsorubin Synthase from Capsicum annuum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 5076 ~ 5085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.1c00083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furubayashi Maiko, Umeno Daisuke	4. 巻 671
2. 論文標題 Use of directed enzyme evolution to create novel biosynthetic pathways for production of rare or non-natural carotenoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in enzymology	6. 最初と最後の頁 351 ~ 382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2022.03.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 古林 真衣子	4. 巻 100
2. 論文標題 彩りと香りをもたらすアポカロテノイドの魅力	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 382 ~ 382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.100.7_382	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古林真衣子
2. 発表標題 カロテノイド生合成経路の構築方法
3. 学会等名 第33回カロテノイド若手の会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古林真衣子
2. 発表標題 カロテノイド生合成工学と磁性細菌の合成生物学
3. 学会等名 第13回ゲノム微生物学会若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maiko Furubayashi
2. 発表標題 Engineering Natural and Non-natural Carotenoid/Apocarotenoid Pathways in Escherichia coli
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Biology and Applications of Carotenoids, Retinoids and Other Apocarotenoids（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------