

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658155

研究課題名（和文） 化学合成細菌の光刺激によるカロテノイド生合成系の活性化と制御

研究課題名（英文） Regulation of carotenoid biosynthesis in non-photosynthetic bacteria by light irradiation

研究代表者

細川 雅史（HOSOKAWA MASASHI）

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：10241374

研究成果の概要（和文）：

本研究では、海藻から分離した 11ShimoA1 (A1) 株が新規カロテノイドである 2'-isopentenyl saporxanthin を合成し、その生合成系が青色光（470nm）の刺激によって活性化することを見出した。A1 株は、カロテノイド合成に関わる *crtB*、*crtI*、*crtY*、*crtZ* 遺伝子を有し、それらがクラスターを形成していることを明らかにした。更に、A1 株に特徴的な prenyltransferase および phytoene desaturase の存在を見出すとともに、これらの遺伝子が青色光刺激によって発現増加することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

11ShimoA1, which was isolated from a marine alga, synthesized a novel carotenoid, 2'-isopentenyl saporxanthin (2'-isopentenyl Spx). Blue LED irradiation increased 2'-isopentenyl Spx content in the culture medium of strain A1. Furthermore, blue LED also enhanced mRNA expression level of carotenoid synthetic genes such as *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ*. In addition, strain A1 has unique genes coded prenyltransferase and phytoene desaturase, which are suggested to play an important role for 2'-isopentenyl Spx synthesis in strain A1. Both genes also tended to be up-regulated by blue LED. These results show that strain A1 is a unique bacteria with carotenoid synthetic pathways regulated by blue light.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：微生物・光刺激

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドは、黄-赤色を呈する脂溶性の色素化合物であり、代表的なものとして、プロビタミン A 活性を有する β -カロテンや、抗癌作用をもつアスタキサンチン、加齢黄斑変性に対する予防効果を示すルテインやゼアキサンチンなどが広く知られている。このようなカロテノイドは、動物では生合成されず、植物や藻類、光合成細菌において生合成され

る。また、例外的に光合成能を持たないある種の化学合成細菌によっても生合成されることが知られており、申請者も黄橙色を呈する非光合成の海洋細菌を複数分離してきた。細菌は他の生物に比べ増殖が早いことから、天然物中に微量しか存在しない有用カロテノイドを効率的に生産する上での応用が期待される。更に、培養条件を検討することで合成反応の効率化を容易に検討できるとともに、合

成反応に関わる遺伝子を取得して他の細菌や生物中での生産法の開発に役立てられることから、将来に向けた研究基盤を創成する上で有用な生物資源といえる。

細菌によるカロテノイド合成に関わる研究については、国内外で多くの研究報告が見られるが、異なる波長や照度などの様々な光刺激によるカロテノイド合成系への影響について詳細に検討した報告は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、これまで報告されているカロテノイド合成細菌株や新たに探索する海洋細菌に対して光刺激を行い、カロテノイド合成系への影響を詳細に検討する。その際、光刺激による影響をカロテノイドの合成量や組成を定量分析することで評価するとともに、応答するカロテノイド合成遺伝子の発現量を測定し、その活性化条件を見出す。更に、光によるカロテノイド合成能の活性化制御因子の探索を行う。

本研究は、化学合成細菌におけるカロテノイド合成系の制御因子として、光に着目した独創的な研究である。これらは、光合成能を持たない細菌においても、光エネルギーが有用物質の合成に重要な役割を果たすことを明らかにする革新的な内容であり、生物変換反応を利用した多様なカロテノイド合成法に新たな道を拓くものである。

3. 研究の方法

(1) カロテノイド合成細菌の分離と光応答性の評価

海水や海藻および海底堆積物を浸漬した海水を Marine Agar プレートに塗布し、一定時間培養後にコロニーの色調を観察することにより、カロテノイド合成細菌をスクリーニングした。

更に、本研究のスクリーニングによって新たに分離した海洋細菌に加え、申請者がこれまでに分離しているカロテノイド合成細菌、カロテノイド合成が既に報告されている *Flavobacterium* 属や *Polaribacter* 属の菌株を入手して光刺激による影響を調べた。具体的には、光を照射しながらカロテノイド合成細菌を Marine Agar プレートにて培養し色調の変化を観察することで、光応答性を定性的に評価した。光刺激としては、通常の白色蛍光灯に加え、LED 光源を用いて赤色光 (670 nm) および青色光 (470 nm) を照射した。

(2) 11Shimo A1 株のカロテノイド合成に及ぼす青色光の影響

(1) で定性的に光刺激によりカロテノイド合成に変化のみられた細菌を選択し、Marine Broth を用いて光照射を行いながら一定時間培養を行った。その後、菌体を回収し脂質成

分を抽出した後、HPLC にてカロテノイド組成や合成量を定量分析した。特に、合成されるカロテノイドの利用や合成系の制御を検討するうえで有用な細菌として、ゼアキサントンおよびアスタキサントン、更には新規カロテノイドを合成する細菌に着目して検討した。また、種々の光刺激による細菌の増殖速度を併せて調べることで、光刺激によるカロテノイド合成系の活性化と細菌増殖との関連について調べた。

(3) 11Shimo A1 株がもつカロテノイド合成遺伝子の解析

光応答性を示した 11Shimo A1 株のゲノム情報が不明であったため、最初にゲノム DNA の分離、精製を行った後、全塩基配列の解析を行った。得られたゲノムドラフトを用いて、アノテーションを行い、カロテノイド合成に関わる遺伝子の探索と推定を行った。

(4) 11Shimo A1 株のカロテノイド合成遺伝子の mRNA 発現に及ぼす青色光の影響

ゼアキサントンやアスタキサントンの合成は、骨格であるフィトエンの合成や不飽和化に関わる *crtB*, *crtI*, 環状構造の形成に関わる *crtY*, ヒドロキシル基およびケト基を導入する *crtZ*, *crtW* (図 1) の遺伝子発現によって制御を受けていることが知られている。そこで、光刺激によるカロテノイド合成遺伝子群の発現量への影響を定量 PCR 法により調べることで、転写レベルでの光応答性を検討した。

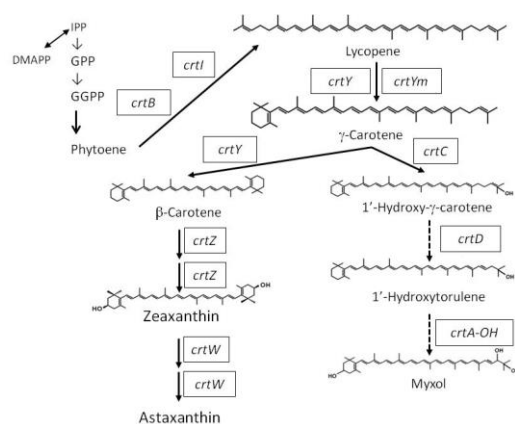


図1 細菌で見出されているカロテノイド合成系と関連遺伝子

4. 研究成果

(1) カロテノイド合成細菌の分離と光応答性の評価

海水や海藻、海底堆積物などから黄色—赤色のコロニーを形成する細菌をスクリーニングした結果、67 株を分離した。これらのうち黄色の呈色が強かった SS8 株と黄橙色を呈し

た 11ShimoA1 株 (以下 A1 株と表記) を選択し、16S rRNA 系統解析を行った結果、両細菌とも *Flavobacteriaceae* に属する *Algibacter lectus* と *Jejua pallidilutea* と同定された。更に、合成されるカロテノイドの分析を行った結果、SS8 株は 95% 以上の組成でゼアキササンチンを合成し、A1 株ではゼアキササンチンに加え、新規カロテノイドの 2'-isopentenyl saporxanthin (2'-isopentenyl Spx, (3R)-2'-(3-methylbut-2-enyl)-3',4'-dihydro-1',2'-dihydro- β - Ψ -carotene-3,1'-diol) (図 2) を合成することが明らかとなった (平成 23 年度の報告書では 2'-isopentenyl-mtxol と表記したが、2'-isopentenyl Spx に修正した)。

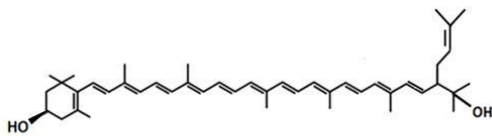


図2 新規カロテノイド2'-isopentenyl Spxの構造

ゼアキササンチンは、加齢黄斑変性に対する予防効果を示すなど、その機能性が注目されている。また、2'-isopentenyl Spx と類縁構造を有する myxol には優れた抗酸化作用が報告されており、2'-isopentenyl Spx にも同等の効果が予想される。更に本研究において、新規カロテノイドである 2'-isopentenyl Spx が、ヒト白血病細胞に対してその増殖を抑制することを見出した (図 3)。このように、ゼアキササンチンに加え、モノサイクリック型の新規カロテノイドである 2'-isopentenyl Spx にも優れた機能性が期待されることから、これらの有効利用をはかる上で、その生合成量を増加させる培養法の検討は重要な課題といえる。

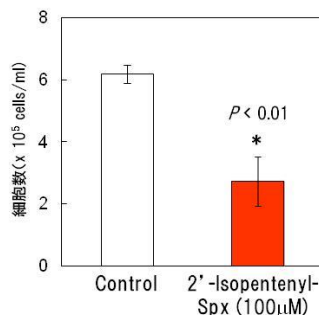


図3 ヒト白血病HL-60細胞に対する2'-isopentenyl Spxの増殖抑制効果

そこで本研究では、特に光刺激によるカロテノイド生合成系への影響を検討した。先ず、SS8 株や A1 株など本研究によって分離した細菌に加えて、カロテノイド合成が報告されて

いる *Paracoccus* sp. や *Polaribacter* sp. を各種照射下で培養し、カロテノイド合成量を HPLC で測定した。その結果、SS8 株への影響はみられなかったが、A1 株を含む 3 株でカロテノイド組成や増殖に影響が認められた。特に、A1 株では、青色光によってコロニーの色調が黄橙色から赤橙色に変化し、光応答性を持つことが示唆された。

(2) 11Shimo A1 株のカロテノイド合成に及ぼす青色光の影響

A1 株のカロテノイド合成と増殖に及ぼす光刺激の影響について検討した。図 4 に示すように赤色光下での培養では、カロテノイド合成量や増殖菌数に影響はみられなかった。一方、青色光の照射では 48 時間の培養後におけるゼアキササンチン合成量がやや低下傾向にあったのに対し、2'-isopentenyl Spx の合成量は培養液当たりで光刺激しない場合と比較して 1.5-2 倍程度増加することが分かった。青色光により A1 株の増殖が大きく変化しなかったことから、2'-isopentenyl Spx の合成量の増加は、培養液中の菌数の増加によるものではなく、生合成系の促進によるものと推察した。更に、このような青色光によるカロテノイド合成量の変化は、標準株である *Jejua pallidilutea* KCTC22298 株でも同様に認められた。よって、*Jejua pallidilutea* に分類される A1 株並びに KCTC22298 株は、青色光に応答するカロテノイド生合成系を持つユニークな非光合成細菌であることが明らかとなった。

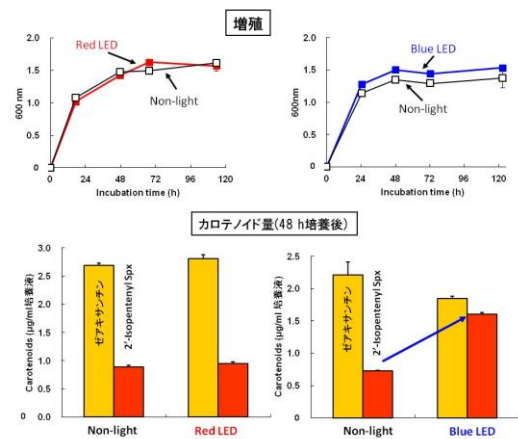


図3 A1株のカロテノイド合成に及ぼす光刺激の影響

(3) 11Shimo A1 株がもつカロテノイド生合成遺伝子の解析

A1 株に加え KCTC22298 株のいずれにおいてもゲノム DNA に関する情報が全くなかったことから、カロテノイド生合成系遺伝子を解析するにあたり、まず最初にゲノム DNA の全塩基配列の解析を行った。得られたゲノムドラフトを用いて、 γ -カロテンの生合成に関わる

crtB, *crtI*, *crtY*およびゼアキサントンの合成において重要な *crtZ* の遺伝子を調べた。その結果、これら 4 つの遺伝子がクラスターを形成して存在することが分かった。また、それぞれの塩基配列からプライマーを設計し定量 PCR を行った結果、4 つの遺伝子が mRNA レベルで発現することを確認した。

新規カロテノイドである 2'-isopentenyl Spx の生合成は、その構造から γ -カロテンを経由して合成されることが推定される。類縁構造を有する *myxol* ではその生合成遺伝子として *crtC* や *crtD*, *crtA-OH* が報告されている (図 1)。そこで、これらと相同性が高い遺伝子をゲノム DNA 中に検索したが、存在は認められず、2'-isopentenyl Spx の合成系は *myxol* とは異なることが推察された。一方、2'-isopentenyl Spx の生合成において重要であるペンテニル基の導入と 3' と 4' 間の不飽和化反応に関わる可能性がある酵素として prenyltransferase 並びに *crtI* とは異なる phytoene desaturase の遺伝子の存在を見出した。これら二つの遺伝子は連結して存在し、*Gillisia limnaea* を除きゲノム検索された他の *Flavobacteriaceae* の細菌には見られない特徴的な遺伝子であることが分かった。Prenyltransferase と phytoene desaturase の mRNA 発現量についても、定量 PCR 法により測定が可能であったとともに、標準株である KCTC22298 株でも同様に発現が見られたことから、2'-isopentenyl Spx の生合成において重要な役割を担っている可能性が考えられる。

(4) 11Shimo A1 株のカロテノイド生合成遺伝子の mRNA 発現に及ぼす青色光の影響

A1 株では青色光刺激によって 2'-isopentenyl Spx の合成量が増加したことから、カロテノイド遺伝子の mRNA 発現に及ぼす影響を定量 PCR 法で調べた。

生合成系の間産物として推定される γ -カロテンやゼアキサントンの生合成に関わる *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* の mRNA 発現量は、青色光での刺激 8.6 h 後において光刺激なしの場合と比較して 1.5-2 倍程度上昇した (図 4)。2'-Isopentenyl Spx はゼアキサントンの同様の部分構造を有することから、それらの生合成系遺伝子の発現増加は 2'-isopentenyl Spx の合成促進にも関連するものと考えられる。また、A1 株に特徴的な prenyltransferase (*ptf*) と phytoene desaturase (*pds*) の mRNA 発現量も青色光刺激により増加する傾向が見られた。更に、カロテノイドの生合成系の初期段階に関わるイソペンテニルピロリン酸イソメラーゼの遺伝子 (*idi*) 発現の増加が見出された。イソペンテニルピロリン酸イソメラーゼはイソペンテニルピロリン酸 (IPP) からジメチルアルピロリン酸 (DMAPP) への変換をつかさどる酵素

である (図 1)。通常、生成する DMAPP はカロテノイドのイソプレン主鎖の合成に関わるが、2'-isopentenyl Spx の生合成系では、prenyltransferase の基質となってペンテニル側鎖の導入にも関わる可能性が考えられる。このように、A1 株では青色光の刺激によってその生合成系の複数の反応が制御を受けていることが予想される。

以上、本研究では海藻から分離した A1 株において、青色光の刺激が新規カロテノイドである 2'-isopentenyl Spx の合成量を増加させるとともに、その生合成に関わるものと推定される遺伝子の発現量も増加することを見出した。これらの遺伝子は、ゲノム DNA 上の異なる位置に保存されていることから、複数の因子によって転写が制御されていると考えられる。制御因子の特定に関しては、現在検討を進めおり、今後の研究展開が期待される。

(5) その他

本研究において、光刺激によるカロテノイド合成への影響をスクリーニングした細菌の中で、*Bacillus megaterium* ALA2 はそれ自体にカロテノイド合成能は認められないものの、褐藻由来のフコキサントンを、より高い抗癌作用や脂肪細胞の分化抑制能を有するフコキサントノールへの変換することを見出した。このような生物変換反応は、カロテノイド生合成のみならず、構造改変によるカロテノイドの高機能化をはかる上で興味深い知見である。

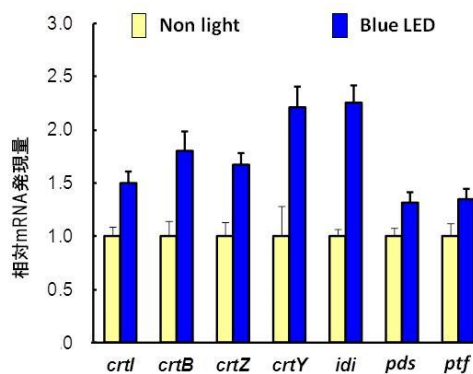


図4 A1株のカロテノイド生合成遺伝子の発現に及ぼす青色光の影響

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ① Production and conversion of functional carotenoids by bacteria (招待講演), M. Hosokawa, K. Nishida, T. Sawabe, K. Miyashita, Ching T. Hou, 103rd AOCS annual meeting & Expo, Long Beach Convention Center (Long Beach, CA, USA), 2012/04/30
- ② *Jejuia pallidilutea* (11ShimoA1 株) 合成

カロテノイドの同定と培養条件の検討, 細川雅史・西田健太郎・澤辺智雄・宮下和夫・眞岡孝至, 平成 24 年度 日本水産学会春期大会 東京海洋大学 (東京) 2012/3/29.

③ *Bacillus megaterium* ALA2 による fucoxanthin から fucoxanthinol への変換反応, 西田健太郎・Ching T. Hou・澤辺智雄・宮下和夫・細川雅史, 平成 23 年度 日本水産学会秋期大会 長崎大学(長崎) 2011/9/29.

④ Bioconversion of marine carotenoids and their Health functions (招待講演), M. HOSOKAWA, Y.J. Yim, K. Miyashita, CT. Hou, 102nd AOCs Annual Meeting & Expo, Duke Energy Center (Cincinnati, Ohio, USA) 2011/5/1.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 雅史 (HOSOKAWA MASASHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：10241374