

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05577

研究課題名(和文) 光合成細菌がもつ高い抗酸化力を示す直鎖状ケト化カロテノイドの疾病予防効果の評価

研究課題名(英文) Evaluation study of antioxidative abilities of the keto-carotenoid species found in photosynthetic bacteria

研究代表者

原田 二郎 (Harada, Jiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10373094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスを原因とする肥満から発展するメタボリックシンドロームは、脳梗塞や心筋梗塞のリスクファクターとなることから、予防法の開発が急務である。本研究では未だ動物実験では使われていない光合成細菌がもつケト型カロテノイドを調べることで、メタボリックシンドロームの予防効果について検討する。具体的には、糸状性酸素非発酵型光合成細菌 *Chloroflexus aurantiacus* がもつ、ケト型カロテノイドに着目し、カロテノイド分子種の同定と機能を調べた。ケト型カロテノイドの疾病に対する優れた予防剤としての開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome developed from the oxidative stress-induced adiposity is the risk factors for myocardial and cerebral infarctions, and it is imperative that its prophylaxis is exploited. In this study, it is evaluated that photosynthetic bacterial carotenoids known as antioxidants, are effective for prevention of metabolic syndrome.

研究分野：生体機能関連

キーワード：応用微生物 生体分子 生体機能利用 薬理学 メタボリックシンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に備わっている抗酸化システムだけでは補足しきれないほど過剰に生産される活性酸素種は、メタボリックシンドロームを代表とする生活習慣病、老化、癌など多くの疾患を引き起こす原因となっている。よって、活性酸素の有効な除去法の確立は、疾病予防を指向する現代医学において、解決すべき重要な課題の1つである。我々が食事で摂取するものの中には、活性酸素を消去する抗酸化物質が含まれており、代表としてはカロテノイドという脂溶性色素が挙げられる。一般的にはニンジンに含まれる  $\beta$ -carotene やトマトの lycopene などが知られており、抗酸化物質として従来から注目されてきた。このようなカロテノイドは、植物や微生物では合成されるが、我々ヒトを含めた動物では生産されないため、食物によって体内に取り込んでいる。体内に取り込んだカロテノイドは上記のように強力な抗酸化剤として働き、特に一重項酸素の消去能力は  $\alpha$ -tocopherol (ビタミンE) よりも高いことが分かっている[1]。近年では lycopene や astaxanthine 等を積極的に摂取することで、癌および肥満を基盤としたメタボリックシンドロームの予防効果が認められている [2, 3]。それ以外にも、カロテノイドには眼疾患の予防と改善、抗疲労作用、抗炎症作用、美容効果などが確認されているため、疾患予防剤やサプリメントとしての開発を目的とした、優れた効果を持つカロテノイドの探索が盛んに行われている。

## 2. 研究の目的

カロテノイドは、光合成細菌にも多様に見られる色素であり、光合成反応の光エネルギー捕集や光酸化障害の防止を行っている。研究代表者はこれまでに、光合成細菌のカロテノイドに関する研究を行ってきた。紅色光合成細菌 *Rubribivax (R.) gelatinosus* は、多種類のカロテノイドを生体内で合成することが知られていたが、代表者が研究を行うまで、それらの生合成経路は未解明であった。そのため、まずはこの細菌のカロテノイド合成経路を決定し、また、それら分子種の生体内での局在についても明らかとした [4, 5]。さらに、*R. gelatinosus* を用いて代謝工学的に遺伝子を改変し、共役二重結合の数が異なる 7 種類のカロテノイドをそれぞれ蓄積する変異株を作製している。これらの蓄積変異株を用いて、カロテノイド分子種の違いによる抗酸化作用の評価を細菌の細胞内で行った。人工的に発生させた一重項酸素による細胞生存率を測定したところ、ケト基を含む共役二重結合を持つ diketo-spirilloxanthin および spheroidenone 蓄積株は高い生存率を示し、反対にそれら以外のリコペン蓄積株を含めた全ての株においては、著しい生存率の低下が見られた。この結果は、spheroidenone と lycopene の様に共役二重結合の数が同じであっても、ケト基が共役系に関与するケト化カロテノイドには、さらに高い

抗酸化能力があることを示した。この様なことから、ケト化カロテノイドには、酸化ストレスが関与する疾病などにも優れた予防効果を持つことが期待された。

光合成細菌である繊維状非酸素発生型光合成細菌および緑色硫黄細菌のグループは、クロロソームと呼ばれる特徴的なアンテナ系を持つ。このクロロソームは高濃度のクロロフィル分子(約 2 M)を含んでいるため、最も効率的な光捕集系であることが分かっているが、一方でその効率の良さから酸素存在強光照射下において光酸化障害を起こしやすい。これに対し緑色硫黄細菌では、酸化条件下においてクロロソームが吸収した光エネルギーをキノン等が消光させることが分かっている。しかし、繊維状酸素発生型光合成細菌にはそのような現象はみられず、カロテノイドによる防御機構が高いことが予想された。繊維状酸素発生型光合成細菌 *Chloroflexus (C.) aurantiacus* は光合成培養時には  $\beta$ -carotene と  $\gamma$ -carotene を合成し、条件によってはケト型カロテノイドも検出される。しかし詳しいカロテノイド組成や、その合成経路は明らかとなっていない。本研究では *C. aurantiacus* のカロテノイドに関する基礎的な知見を得ることで、疾病などにも優れた予防効果あるかを検討する。

## 3. 研究の方法

*C. aurantiacus* のカロテノイド組成を HPLC によって調べた。一方で、この菌のカロテノイド合成経路を調べるために、ゲノム上に存在するカロテノイド合成酵素遺伝子と相同性の高い遺伝子を大腸菌(*E. coli*)に導入し、合成される色素の分析を行った。その結果明らかとなった *C. aurantiacus* のカロテノイド合成遺伝子の生体内での転写量を調べ、培養条件によって比較を行った。

## 4. 研究成果

最初に *C. aurantiacus* のカロテノイド組成を正確に調べるために、この菌を嫌気光照射下および好気暗所下で培養し、その色素分析を HPLC によって行った。その結果、嫌気条件下では、 $\beta$ -carotene と  $\gamma$ -carotene を主成分として合成していた。また、 $\gamma$ -carotene から派生した HO- $\gamma$ -carotene、HO- $\gamma$ -carotene glucoside、HO- $\gamma$ -carotene glucoside ester を合成していた。一方で好気培養条件下では、それらのカロテノイドにケト基が付いたケト化カロテノイドに変化しており、カンタキサンチンが主成分であった。この様に、*C. aurantiacus* は培養条件でカロテノイド組成が変化していることが明らかとなった。

次に *C. aurantiacus* のカロテノイド合成経路を調べるために、この菌のゲノム情報に対し、既知のカロテノイド合成酵素遺伝子の配列を用いて相同性検索を行った。合成経路初期過程においては、*crtE* および *crtB* が保存されていた。phytone の不飽和化においては、

緑色硫黄細菌では *crtP* と *crtQ* が関与して lycopene を合成する。しかし、*C. aurantiacus* にはこれらの相同性遺伝子はゲノム上に存在しなかった。一方で別の phytoene 不飽和化酵素遺伝子 *crtI* について調べると、3 つの相同性遺伝子が存在していた(*crtI1*、2 および 3 と名付けた)。そこで、これらの遺伝子について *E. coli* 内での機能解析を行った。*C. aurantiacus* の *crtE*、*B* を導入した *E. coli* にそれぞれの *crtI* を発現させたところ、紅色細菌の *crtI* と最も相同性が高かった *crtI1* を導入した *E. coli* のみに lycopene の合成が確認された。よって、*C. aurantiacus* のカロテノイド合成の初期過程は、*crtE*、*crtB*、*crtI1* が関与することが分かった。現在の所、*crtI2* と *crtI3* の機能は不明である。

次に lycopene から  $\gamma$ -carotene と  $\beta$ -carotene を合成する lycopene cyclase に関して調べた。他の光合成生物では *crtY*、*crtL*、*cruA* および *cruB* といった異なる酵素遺伝子がこの過程に関与することが分かっており、どれを持つかは生物種によって異なる。緑色硫黄細菌は *cruA* と *cruB* の存在が明らかとなっているが、*C. aurantiacus* のゲノム上にはこの 2 つの遺伝子は存在せず、*crtY* の相同性遺伝子が 1 つ見出された。そこで *crtE*、*crtB*、*crtI1* を持つ *E. coli* に、その *crtY* 遺伝子を導入したところ、 $\gamma$ -carotene と  $\beta$ -carotene の合成が確認された。よって、*C. aurantiacus* の lycopene cyclase は *crtY* が関与することが明らかとなった。

さらには、*crtE*、*crtB*、*crtI1*、*crtY* を発現させた *E. coli* を用いて、他の合成酵素遺伝子についても調べた。その結果、HO- $\gamma$ -carotene の合成には *cruF* 遺伝子が、HO- $\gamma$ -carotene glucoside の合成には *cruC* 遺伝子の関与が予想される結果が得られている。一方でケト型カロテノイドの合成には、*crtO* が関わっていることが明らかとなった。HO- $\gamma$ -carotene glucoside ester の合成に関与すると考えられた *cruD* については、今回その機能を調べることができなかった。*E. coli* 内で機能しないのか、それともこの遺伝子酵素自体に反応能力が無いのかについては不明である。ここまでの結果より、*C. aurantiacus* のカロテノイド合成経路を提唱した(図 1)。

*C. aurantiacus* のカロテノイド合成酵素遺

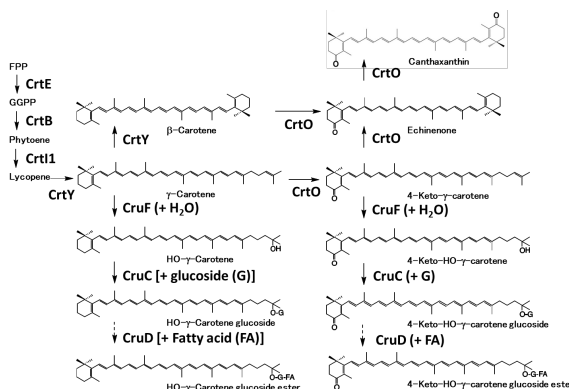


図1. *Cfx. aurantiacus* の予想されるカロテノイド合成経路  
※実線矢印は本研究により確認された経路を示す。

伝子が明らかとなったので、それらの転写量を嫌気培養と好気培養とで調べて比較を行った。その結果、*crtO* のみ好気培養において転写量の増加がみられた。好気条件でこの遺伝子は転写レベルで調節を受け、ケト型カロテノイドを合成していると考えられる。先の研究から、ケト型カロテノイドは抗酸化能力に優れているので、*C. aurantiacus* においても酸素存在下において合成されると考えられる。よって合成されるケト型カロテノイドも、活性酸素を原因とする疾病に対して、予防効果あることが期待された。

#### <参考文献>

- [1] W. Miaki, "Biological functions and activities of animal carotenoids.", *Pure Appl. Chem.*, **63**: 141-146 (1991).
- [2] Y. Yasui *et al.*, "Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines.", *Chemico Biol. Interact.*, **193**: 79-87 (2011).
- [3] H. Yoshida *et al.*, "Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia.", *atherosclerosis*, **209**: 520-523 (2010).
- [4] J. Harada *et al.*, "Phytoene desaturase, CrtI, of the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, produces both neurosporene and lycopene.", *Plant Cell Physiol.*, **42**: 1112-1118 (2001).
- [5] Y. Kakitani *et al.*, "Selective binding of carotenoids with a shorter conjugated chain to the LH2 antenna complex and those with a longer conjugated chain to the reaction center from *Rubrivivax gelatinosus*.", *Biochemistry*, **46**: 7302-7313 (2007).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件) 全て査読有

- [1] J. Harada, (他5名, 4番目-溝口, 5番目-山本), "In vivo excited energy transfer of bacteriochlorophyll *c*, *d*, *e*, or *f* to bacteriochlorophyll *a* in the wild-type and mutant cells of the green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum*.", *ChemPhotoChem*, **2**: 190-195 (2018).
- [2] C. Iwaya, (他6名, 3番目-山本), "DNA methylation of the K1f14 gene region in whole blood cells provides prediction for the chronic inflammation in the adipose tissue.", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **497**: 190-195 (2018).
- [3] M. Teramura, (他2名, 2番目-原田), "In vitro enzymatic assays of photosynthetic bacterial 3-vinyl hydratases for bacteriochlorophyll biosynthesis.", *Photosynth. Res.*,

- 135: 319-328 (2018).
- [4] T. Mizoguchi, (他 4 名, 3 番目-原田), "Light-dependent accumulation of new bacteriochlorophyll-*e* bearing a vinyl group at the 8-position in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum*.", *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **358**: 356-361 (2017).
- [5] T. Mizoguchi, (他 5 名, 3 番目-原田), "Molecular structures and functions of chlorophylls-*a* esterified with geranylgeranyl, dihydrogeranylgeranyl and tetrahydrogeranylgeranyl groups at the 17-propionate residue in a diatom, *Chaetoceros calcitrans*.", *Biochem.*, **56**: 3682-3688 (2017).
- [6] T. Mizoguchi, (他 3 名, 3 番目-原田), "Supramolecular organogelation of bacteriochlorophyll-*c* possessing an isobutyl substituent at the 8-position in carbon tetrachloride.", *ChemPlusChem*, **82**: 595-597 (2017).
- [7] I. Taniguchi, (他 4 名, 5 番目-山本), "Genome-wide DNA methylation analysis reveals hypomethylation in the low-CpG promoter regions in lymphoblastoid cell lines.", *Human Genomics*, **11**: 8 (2017).
- [8] H. Takao, (他 14 名, 7 番目-原田, 12 番目-山本), "A substrate-bound structure of cyanobacterial biliverdin reductase identifies stacked substrates as critical for activity.", *Nature Comm.*, **8**: 14397 (2017).
- [9] Y. Hagicawara, (他 7 名, 4 番目-佐藤, 6 番目-山本), "Atomic-resolution structure of the phycocyanobilin: ferredoxin oxidoreductase I86D mutant in complex with fully protonated biliverdin.", *FEBS Lett.*, **590**: 3425-3434 (2016).
- [10] M. Teramura, (他 2 名, 2 番目-原田), "*In vitro* stereospecific hydration activities of the 3-vinyl group of chlorophyll derivatives by BchF and BchV enzymes involved in bacteriochlorophyll *c* biosynthesis of green sulfur bacteria.", *Photosynth. Res.*, **130**: 33-45 (2016).
- [11] M. Teramura, (他 4 名, 2 番目-原田, 3 番目-溝口, 4 番目-山本), "*In vitro* assays of BciC showing C13<sup>2</sup>-demethoxycarbonylase activity requisite for biosynthesis of chlorosomal chlorophyll pigments.", *Plant Cell Physiol.*, **57**: 1048-1057 (2016).
- [12] J. Harada, (他 5 名, 3 番目-溝口, 5 番目-山本), "Stereochemical conversion of C3-vinyl group to 1-hydroxyethyl group in bacteriochlorophyll *c* by the hydratases BchF and BchV: adaptation of green sulfur bacteria to limited-light environments.", *Mol. Microbiol.*, **98**: 1184-1198 (2015).
- [13] T. Mizoguchi, (他 3 名, 2 番目-原田, 3 番目-山本), "Inactivation of *bciD* and *bchU* genes in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum* and alteration of photosynthetic pigments in the resultant mutants.", *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **313**: 52-59 (2015).
- [14] Y. Saga, (他 4 名, 4 番目-原田), "Modification of the esterifying farnesyl chain in light-harvesting bacteriochlorophylls in green sulfur photosynthetic bacteria by supplementation of 9-decyn-1-ol, 9-decen-1-ol, and decan-1-ol.", *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **313**: 44-51 (2015).
- [15] Y. Tsukatani, (他 6 名, 3 番目-原田), "Complete genome sequence of the bacteriochlorophyll *b*-producing photosynthetic bacterium *Blastochloris viridis*.", *Genome Announce.*, **3**: eD1006-15 (2015).
- [学会発表](計 20 件)
- [1] 原田二朗, "バクテリオクロロフィル *e* を合成する緑色硫黄細菌で見られる赤色光に対する応答.", 第 59 回日本植物生理学会年会 (2018 年).
- [2] 原田二朗, "繊維性非酸素発生型光合成細菌 *Chloroflexus aurantiacus* の培養条件で変化するカロテノイド合成系.", 第 59 回日本植物生理学会年会 (2018 年).
- [3] 原田二朗, "緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum limnaeum* を用いたバクテリオクロロフィル *c*, *d*, *e* および *f* の生体内でのエネルギー移動効率の比較.", 日本化学学会年会 第 98 春季年会 (2018 年).
- [4] 原田二朗, "繊維状非酸素発生型光合成細菌 *Chloroflexus aurantiacus* のカロテノイド合成経路: ゲノムに見られる 3 つの CrtI ホモログと CrtY の大腸菌内での機能解析.", 第 31 回カロテノイド研究談話会 (2017 年).
- [5] 原田二朗, "天然クロロフィルのゲル化の検討.", 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (2017 年).
- [6] 原田二朗, "光合成細菌のアンテナクロロフィル色素の代謝系.", 第 25 回「光合成セミナー2017: 反応中心と色素系の多様性」(神戸, 2017 年 7 月).
- [7] 原田二朗, "緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum limnaeum* が赤色光照射下において合成する C8 位ビニルバクテリオクロロフィル *e* の役割について.", 第 8 回光合成学会年会およびシンポジウム (2017 年).
- [8] 原田二朗, "バクテリオクロロフィル *e* を合成する緑色硫黄細菌の赤色光照射下において蓄積する C8 位ビニル色素の役割についての考察.", 第 58 回日本植物生理学会年会 (2017 年).
- [9] J. Harada, "The photosynthetic competences of chlorosomes containing bacteriochlorophyll *c*, *d*, *e*, or *f* in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum* mutants cells.", 2017 International Conference on

- Artificial Photosynthesis (2017 年).
- [10] 原田二朗, “緑色イオウ光合成細菌の光捕集アンテナ色素合成系に必須な C3 位ビニルヒドラターゼおよび C13<sup>2</sup> 位デメトキシカルボニラーゼの生体内での役割”, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム (2016 年).
- [11] J. Harada, “Chlorophyllide *a* oxidoreductase identified as the third divinyl reductase, specifically works in bacteriochlorophyll *a* biosynthesis.”, The 17th International Congress on Photosynthesis Research (2016 年).
- [12] J. Harada, “Adaptation of green sulfur bacteria to limited-light conditions by transcriptional regulation of two C3-vinyl hydratase genes, *bchF* and *bchV*.”, Light Harvesting Satellite Meeting of the 17th International Congress on Photosynthesis Research (2016 年).
- [13] 原田二朗, “緑色硫黄光合成細菌内でのクロロソーム色素合成経路への分岐に関わる C13<sup>2</sup> 位デメトキシカルボニル化酵素 BciC の解析”, 第 24 回「光合成セミナー2016: 反応中心と色素系の多様性」(2016 年).
- [14] 原田二朗, “バクテリオクロロフィルの生合成から見た光合成の進化”, 第 7 回日本光合成学会年会およびシンポジウム, (2016 年).
- [15] 原田二朗, “緑色イオウ光合成細菌の自己会合体色素に必要な C3<sup>1</sup> 位ビニル基の水和反応および C13<sup>2</sup> 位メトキシカルボニル基の脱落に関わる酵素の解析”, 日本化学会第 96 春季年会 (2016 年).
- [16] J. Harada, “Functional analysis of chlorophyllide *a* demethoxycarbonylase, BciC, working in chlorosomal pigment biosynthetic pathways of green sulfur bacteria.”, 第 57 回日本植物生理学会年会 (2016 年).
- [17] J. Harada, “Constructions and characterizations of mutants containing bacteriochlorophyll *c*, *d*, *e*, or *f* of the green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum*.”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015) (2015 年).
- [18] 原田二朗, “緑色硫黄光合成細菌の巨大アンテナ系内におけるクロロフィル超分子構造の形成を光強度に応じてコントロールする 2 つの水和化酵素の機能解析”, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム (2015 年).
- [19] 原田二朗, “光強度に応じて巨大アンテナ系内のクロロフィル色素の超分子構造をコントロールする 2 つの水和化酵素 BchF と BchV の機能解析”, 第 23 回「光合成セミナー2015: 反応中心と色素系の多様性」(2015 年).
- [20] 原田二朗, “緑色硫黄細菌のアンテナ色素の異性体組成変化に関わる 2 つの水和

化酵素の役割”, 第 6 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム (2015 年).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

・ Google Scholar

<https://goo.gl/zPyt2G>

・ 久留米大学研究者紹介

<https://goo.gl/kBe5KB>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 二朗 (Jiro Harada)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 10373094

### (2) 研究分担者

山本 健 (Ken Yamamoto)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 60274528

溝口 正 (Tadashi Mizoguchi)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号: 90343665

佐藤 秀明 (Hideaki Sato)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 60271996