

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450092

研究課題名(和文)油糧微生物ラビリンチュラの飢餓応答における分子機構の解明と有用脂質生産への応用

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms on the stress response in oleaginous microorganism thraustochytrid and its application to value-added lipid production

研究代表者

秋 庸裕 (Aki, Tsunehiro)

広島大学・先端物質科学研究科・教授

研究者番号：80284165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性真核微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属において、アスタキサンチンなどの抗酸化性カロテノイドの生産特性とトランスクリプトーム解析の結果から推察されたストレス応答性に関する分子機構の解明を目的とした。カロテノイドの生成量を決定づける β -カロテン合成酵素CrtI BYの機能ドメイン破壊株を解析したところ、ドメイン間での協同作用は見いだされなかった。同酵素の遺伝子発現調節機構を詳細に調べるため、ルシフェラーゼレポーターシステムを構築して解析したところ、培養後期に亢進する発現様式が再現できた。

研究成果の概要(英文)：This research aims to elucidate the molecular mechanisms underlying the stress response nature of carotenoid production which has been suggested in transcriptome of marine thraustochytrid, *Aurantiochytrium*. Analysis on the functional domain disruptants of β -carotene synthase CrtI BY did not suggest any cooperative action between three domains. A luciferase reporter system was constructed to investigate the regulation mechanisms of gene expression of CrtI BY. This system reproduced the expression pattern of CrtI BY gene, being enhanced at the stationary and starvation phases of cultivation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：脂質生合成 ラビリンチュラ オーランチオキトリウム カロテノイド 遺伝子発現調節 酵素機能

1. 研究開始当初の背景

海洋性真核微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属は、高度不飽和脂肪酸やキサントフィル、炭化水素などの機能性脂質を顕著量生産することから産業微生物としての利用拡大が期待されている。なかでも、高付加価値を有するアスタキサンチンなどの抗酸化性カロテノイドは、食品や化粧品分野で需要が急増しており、新規かつ安定的な供給源として同微生物が注目されている。しかし、オーランチオキトリウム属におけるカロテノイド生合成の分子機構は不明な点が多く、生産性向上のための代謝工学的戦略はまだ確立されていない。

本研究代表者らはこれまでに、オーランチオキトリウム属の自然界からの単離、脂肪酸組成と分子系統解析による分類再編、高度不飽和脂肪酸生合成機構の解析、カロテノイド生成の発見、スクワレン生産の最適化、形質転換系の開発、バイオマスを利用した持続的油脂生産システムの構築など、同微生物を用いた油脂バイオテクノロジーの基礎から応用まで、幅広い研究を展開してきた。これらの知見を結集して、新たなカロテノイド供給源の確立をめざすこととした。

2. 研究の目的

オーランチオキトリウム属のカロテノイド生合成系についてゲノム及びトランスクリプトーム解析から推察したところ、栄養飢餓や酸化などのストレスに応答して活性化する機構の存在が示唆された。そこで、細胞内カロテノイド生成を支配する β -カロテン合成酵素 CrtIBY に特に注目して、その構造と機能ならびに遺伝子発現調節の分子機構を明らかにし、得られた知見をカロテノイドの高生産化に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

β -カロテン合成酵素 CrtIBY を各種微生物において同種あるいは異種宿主発現し、細胞内カロテノイドを TLC や HPLC、LC-MS で解析した。同酵素の機能ドメインを欠損あるいは点変異導入によって不活化した変異株を酵母で発現させ、生成した中間体を解析した。ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に CrtIBY の発現制御領域を配置したレポーターシステムをオーランチオキトリウム属細胞内に構築し、CrtIBY の発現パターンを解析した。

4. 研究成果

(1) CrtIBY 発現解析系の確立

β -カロテン合成酵素 CrtIBY の全長遺伝子を各種宿主で発現させて、カロテノイド組成を調べた。N あるいは C 末端に His または FLAG タグを付加するように発現ベクターを設計し、カロテノイド低生産性のオーランチオキトリウム属細胞内で発現させたところ、 β -カロテンの顕著な蓄積が認められた。

さらに、カンタキサンチンやアスタキサンチンなどの代謝生成物も検出可能なレベルに達したことから、CrtIBY の発現調節がカロテノイド生成に重要であることが再認識された。しかし、タグ検出のためのウェスタン解析では、糖鎖修飾のためか、ブロードなバンドが検出された。

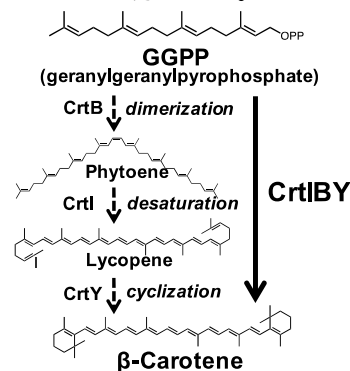
次に、糖鎖修飾の可能性が低い大腸菌で同様にして CrtIBY を発現させたところ、タグで検出される予想分子量に一致するバンドが見られた。しかし、大腸菌野生株は CrtIBY の基質であるゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を生成しないため、 β -カロテンは蓄積しなかった。そこで、GGPP を生成するように遺伝子操作した株を構築して、再び CrtIBY を発現させたが、依然として β -カロテンの生成は見られなかった。

一方、GGPP を生成するがカロテノイド合成系を持たない出芽酵母で同様に発現させたところ、 β -カロテンが新たに生成し、細胞破砕液を濃縮すると His タグも検出できた。そこで、以降の実験は酵母発現系を用いた。

(2) CrtIBY のドメイン機能解析

CrtIBY は 3 つの機能ドメインを持ち、GGPP を重合してフィトエンを生成する CrtB、フィトエンに二重結合を導入してリコペン生成する CrtI、および、リコペンの両端を環化して β -カロテンを生成する CrtY とそれぞれ高いアミノ酸配列の相同性を示すドメインが N 末端側から I、B、Y の順に並んでいる。これらのドメインが互いに直接あるいは間接的に相互作用して協同的に機能しているかどうかを調べるため、機能欠損体を作成して酵母内発現系で解析した。

CrtI の N 末端側の FAD 結合モチーフを含む 75 アミノ酸を欠損させて酵母内発現したところ、フィトエンが蓄積したが、リコペンは検出できなかった。一方、CrtY の環化モチーフの 1 つに点変異を導入して同様に発現解析したところ、リコペンは蓄積したが、フィトエンは検出できなかった。以上の結果から、各ドメインは独立して機能している可能性が高く、基質・生成物の受け渡しはすばやく行われることが分かった。



(3) CrtIBY プロモーターのレポーター解析

CrtIBY 遺伝子は飢餓条件となる培養後期

に発現誘導されることがトランスクリプトーム解析で見いだされていたが、定量的PCRにおいても同様の結果が得られた。そこで、このような応答における遺伝子発現調節の機構をより詳細に調べるため、当該遺伝子の発現制御領域を精査するレポーターシステムを構築して、ストレス応答エレメントの同定を試みることにした。

まず、オーランチオキトリウム属株にルシフェラーゼ遺伝子を導入して構成的に発現させ、細胞溶解液を発光測定に供したところ、低バックグラウンドでの顕著な活性が観察された。そこで、本系に用いた構成発現プロモーターを、CrtIBY 遺伝子のプロモーターおよび発現調節領域で置き換えたプラスミドを構築して、カロテノイド高生産性のオーランチオキトリウム属株へ導入し、同様に解析したところ、培養後期におけるルシフェラーゼ活性の亢進が認められた。これは、同遺伝子の制御機構がレポーターシステムにおいて再現されたことを示している。引き続き、ストレス応答に関わる領域を絞り込んでいくところである。

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 21 件)

K. Watanabe, M. Ohno, M. Taguchi, S. Kawamoto, K. Ono, T. Aki (2016) Identification of amino acid residues that determine the substrate specificity of mammalian membrane-bound front-end fatty acid desaturases. *J. Lipid Res.*, **57**, 89-99. DOI: 10.1194/jlr.M064121 査読有

K. Watanabe, M. Ohno, T. Aki (2016) Detection of acyl-CoA derivatized with butylamide for *in vitro* fatty acid desaturase assay. *J. Oleo Sci.*, **65**, 161-167. DOI: 10.5650/jos.ess15257 査読有

Arafiles K.H.V., Iwasaka H., Eramoto Y., Okamura Y., Tajima T., Matsumura Y., Nakashimada Y., Aki T. (2014) Value-added lipid production from brown seaweed biomass by two-stage fermentation using acetic acid bacterium and thraustochytrid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 9207-9216. DOI: 10.1007/s00253-014-5980-4 査読有

他 18 件

[学会発表](計 19 件(招待講演))

T. Aki, K.H.V. Arafiles, K. Watanabe, Y. Okamura, T. Tajima, Y. Nakashimada, Y.

Matsumura: Production of biomethane and functional lipids from marine macroalgae. 107th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo (Salt Lake City, UT, USA, May 4, 2016)

K.H.V. Arafiles, R. Sato, A. Nagano, Y. Eramoto, A. Oda, R. Higashi, H. Iwasaka, K. Watanabe, Y. Okamura, T. Aki: Bioconversion of marine biomass for production of valuable lipids. 11th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (Banff, Canada, Sep 14, 2015)

Arafiles K., Eramoto Y., Iwasaka H., Okamura Y., Matsumura Y., Nakashimada Y., Aki T.: Utilization of seaweed biomass for functional lipid production. 105th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo (San Antonio, TX, USA, May 6, 2014)

他、海外 6 件、国内 10 件

[図書](計 3 件)

冷牟田修一、秋 庸裕 (2016) バイオマスエネルギーの技術と市場、pp. 22-32 (分担執筆)、藻類の分子育種とその応用、シーエムシー出版

秋 庸裕 (2016) 海藻バイオマスの利用とラビリンチュラによる油脂生産。海洋と生物 **38**: 36-40

秋 庸裕、細川雅史 (2016) 海藻カロテノイドと不飽和脂肪酸代謝。化学と生物 **54**: 308-309

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称: カロテノイド合成酵素およびその利用
発明者: 秋 庸裕、岩坂宏明、佐藤矩行、小柳 亮

権利者: 国立大学法人広島大学、学校法人沖縄科学技術大学院大学学園

種類: 特許

番号: 特願 2014-133368

出願年月日: 平成 26 年 6 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: カロテノイド組成物、カロテノイド組成物の製造方法、カロテノイド組成物を生産する微生物

発明者: 秋 庸裕、渡邊研志、東 莉沙、上原 莉世、松山恵介

権利者: 長瀬産業株式会社、国立大学法人広

島大学
種類：特許
番号：特願 2017-010607
出願年月日：平成 29 年 1 月 24 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/aki/>

6．研究組織

(1)研究代表者

秋 庸裕 (AKI, Tsunehiro)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授
研究者番号：80281465