

カロテノイドの生合成遺伝子の同定とその合成生物学研究 (Identification of biosynthesis genes of carotenoids and their synthetic biology research)

三沢 典彦

石川県立大学・生物資源工学研究所

背景

カロテノイドは、通常炭素数 40 の基本骨格を持つイソプレノイド色素であり、自然界から 750 種以上が単離されている。カロテノイドは、すべての光合成生物、及び一部の細菌、アーキア、真菌により生合成される。光合成生物では本色素は、光合成に必須な集光の機能を担うほか、過剰な光による光酸化から生体を守っている。また、高等植物では Neoxanthin 及び β -Carotene はそれぞれ、植物ホルモンのアブシジン酸及びストリゴラクトンの前駆体であり、ヒトでは β -Carotene や β -Cryptoxanthin は、ビタミン A の前駆体である (カロテノイドの具体名は英語で記載)。また、高等植物起源のカロテノイドである Lutein、Zeaxanthin、 β -Cryptoxanthin、Lycopene、Capsanthin、及び緑藻 *Haematococcus pluvialis* や *Paracoccus* 属細菌等により生産される Astaxanthin は、がん、生活習慣病や加齢性疾患の予防効果があることが解明されつつあり、栄養補助食品として市販されている。今日では、カロテノイドの生合成経路は、高等植物やカロテノイド産生細菌において遺伝子のレベルで十分に解明されている (図 1)。さらに、上記の有用カロテノイドを、大腸菌や酵母、高等植物といった異種宿主で効率生産しようとするパスウェイエンジニアリング (代謝工学) 研究は、1990 年代以降盛んに実施され、合成生物学の先駆的研究の一つとなっている。しかしながら、筆者がカロテノイドの研究を始めた 1988 年当時、カロテノイドの生合成を担う酵素や遺伝子は一つとして同定されていなかった。この理由は、カロテノイド生合成酵素は高等植物をはじめとする生物資源から抽出すると容易に失活するので、酵素の精製、及び精製タンパク質の情報に基づく遺伝子のクローニングが困難であったためである。

カロテノイド生合成遺伝子の同定

筆者は、そのようなカロテノイド生合成遺伝子を解析するには、できるだけ単純な材料を用いた方が良く考え、植物ではなく細菌に注目した。具体的に説明すると、1986 年に Perry らは、黄色細菌 *Erwinia herbicola* から黄色色素 (化学構造は不明) の生合成遺伝子群 (12.4 kb) を大腸菌にクローニングすることができ、その結果、大腸菌が黄色くなったと報告したが、遺伝子群の構造や機能解析の報告は無かった¹⁾。筆者は、この黄色色素が Zeaxanthin diglucoside であることを見出し^{2,3)}、*Erwinia* 属細菌のカロテノイド生合成遺伝子群が大腸菌で機能発現できることに着目した。そして、*Erwinia uredovora* (後に *Pantoea ananatis* と再分類) からカロテノイド生合成遺伝子群 (6.9 kb) を単離し、塩基配列を決定して 6 個の ORF を割り出し、これら ORF の種々の組合せを大腸菌に導入して機能発現させた。そして、これら組換え大腸菌が生産す

る色素を構造決定することにより、各 ORF (*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ*, *crtX* 遺伝子と命名) がコードするタンパク質の触媒機能を解明した²⁾。その結果、1992 年までに、Phytoene、Lycopene、 β -Carotene、Zeaxanthin、 β -Cryptoxanthin といった植物と共通のカロテノイドを、ファルネシルニリン酸 (FPP) から作るのに必要な生合成酵素遺伝子を世界で初めて同定することができた (図 1)^{2,4)}。さらに、筆者らが開発した、基質としての各種カロテノイドまたはゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) を合成する組換え大腸菌は、機能が未知のカロテノイド生合成候補遺伝子の機能解析の強力なツールとなった。たとえば、GGPP を合成する大腸菌は Phytoene synthase 候補遺伝子の機能解析に利用できる⁵⁻⁷⁾。本手法の開発が、1990 年代以降のカロテノイド生合成研究の急速な進展の主たる要因であり、筆者らも、高等植物、ゼニゴケ、緑藻、シアノバクテリア、その他の細菌等由来の種々のカロテノイド生合成遺伝子の同定を行った⁵⁻¹⁸⁾。この中には、Astaxanthin の生合成の鍵となる Carotenoid 4,4'-ketolase (oxygenase) 遺伝子 (*Paracoccus* 属細菌など細菌由来: *crtW* と命名; 及び *H. pluvialis* が持つオルソログ: *BKT* と命名) の同定が含まれている (図 1)^{7,10,11)}。

カロテノイドの合成生物学研究

有用カロテノイド生産のための高等植物の合成生物学研究では、筆者らは 1994 年までに、Rubisco 小サブユニットのトランジットペプチド配列と結合させた *P. ananatis* の Phytoene desaturase (*crtI*) 遺伝子をタバコ (*Nicotiana tabacum*) 染色体に導入し、機能発現させることにより、ブリーチング除草剤耐性能をタバコに与えるとともに、葉のカロテノイド組成を改変した^{19,20)}。本研究は、植物における外来遺伝子を利用した色素の代謝工学の最初の報告となった。なお、本遺伝子カセットは、 β -Carotene 強化米 (Golden Rice) の作出には必須である。我々はその後、Astaxanthin 合成の鍵となる 7 個の外来遺伝子 (*crtW* と *crtZ* を含む) をナタネ (キャノーラ; *Brassica napus*) の染色体に導入することにより、野生株の 30 倍のカロテノイド (α -Carotene、Astaxanthin 等) を種子に蓄積させた²¹⁾。我々はさらに、レタス²²⁾、アマ²³⁾、トマト²⁴⁻²⁶⁾、バレイショ^{27,28)}といった農作物、及び花卉植物²⁹⁾を宿主とするカロテノイドの合成生物学研究を実施した。特にレタス (*Lactuca sativa*) では、葉緑体に直接 *crtW* と *crtZ* 遺伝子を導入することにより、高含量 (180 $\mu\text{g/g}$ FW) の Astaxanthin を生産させることができた²²⁾。この葉緑体形質転換レタスでは、全カロテノイドの 77%が Astaxanthin に、95%がケトカロテノイド (野生株が持たないカロテノイド) に変換されていたにもかかわらず、非形質転換体と同等の生育速度を示し、強光に耐性を示した³⁰⁾。

カロテノイドの微生物における生産研究では、筆者らは、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) やトルラ酵母 (*Candida utilis*) に、Lycopene や β -Carotene (後者ではさらに Astaxanthin) を初めて生産させたという先駆的研究の実施のみでなく³¹⁻³³⁾、大腸菌の合成生物学では、植物成分 Lutein や Violaxanthin の効率生産に成功している^{34,35)}。

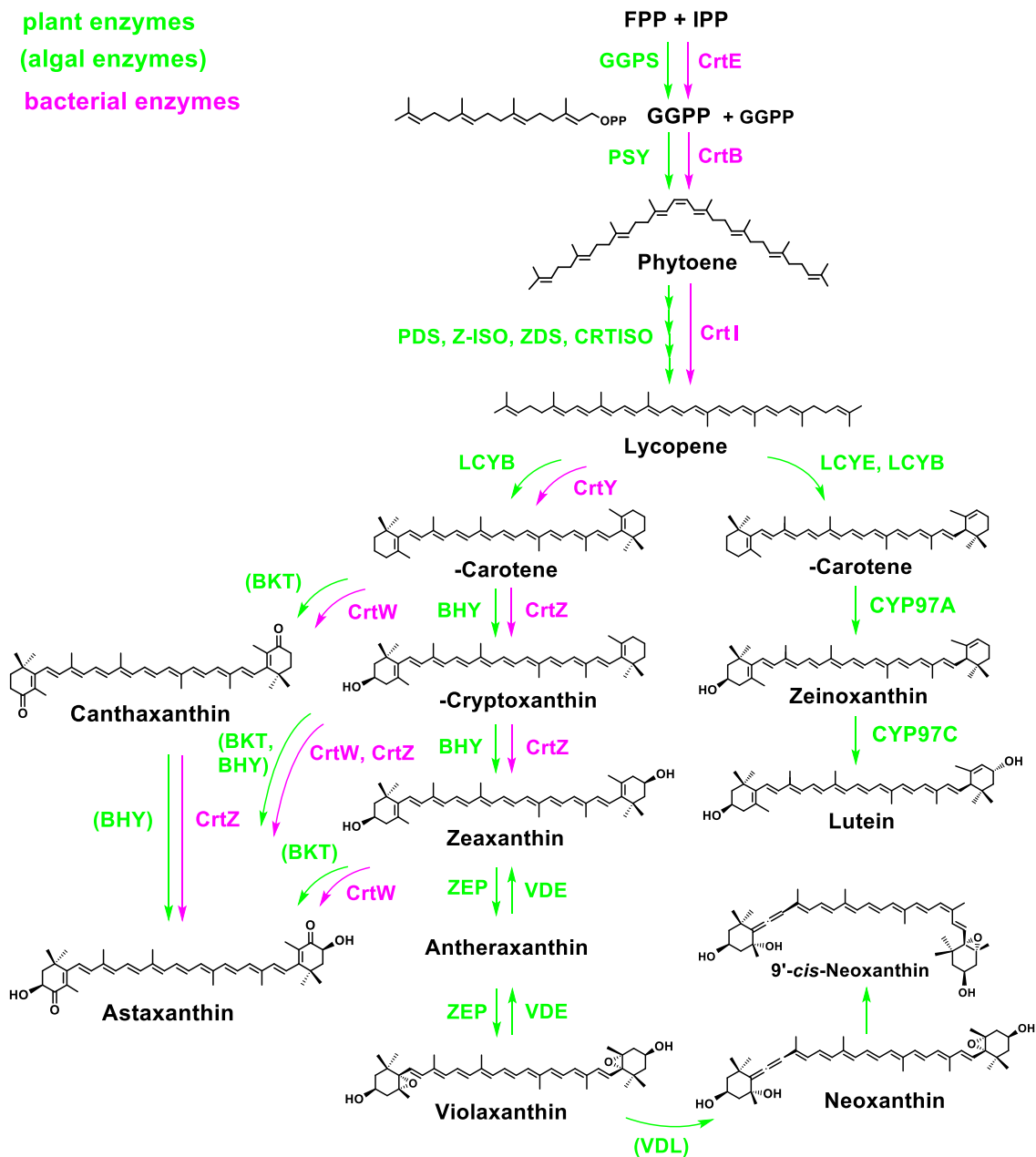


図 1. 遺伝子レベルで解明されたカロテノイドの生合成経路

謝辞

本受賞にあたり、まず、私の恩師である故 大山莞爾 先生、駒野 徹 先生（京都大学名誉教授）に感謝します。本研究は、麒麟麦酒(株)（及びキリンホールディングス(株)）・基盤技術研究所、Konstanz 大学・Prof. Peter Böger 研究室、(株)海洋バイオテクノロジー研究所・分子設計領域、及び、石川県立大学・生物資源工学研究所にて実施されたものであり、これらの研究機関及び関係者に感謝します。また、国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）には、植物バイオプロジェクト（Pj）及びスマートセル Pj を通してお世話になり、これら NEDO Pj 関係者に感謝します。

参考文献

1. Perry KL et al, *J Bacteriol* **168**: 607-612, 1986.
2. Misawa N et al, *J Bacteriol* **172**: 6704-6712, 1990.
3. Nakagawa M, Misawa N, *Agric Biol Chem* **55**: 2147-2148, 1991.
4. Sandmann G, Misawa N, *FEMS Microbiol Lett* **90**: 253-258, 1992.
5. Chamovitz D et al, *FEBS Lett* **296**: 305-310, 1992.
6. Misawa N et al, *J Biochem* **116**: 980-985, 1994.
7. Misawa N et al, *J Bacteriol* **177**: 6575-6584, 1995.
8. Cunningham FX et al, *FEBS Lett* **328**: 130-138, 1993.
9. Linden H et al, *Plant Mol Biol* **24**: 369-379, 1994.
10. Misawa N et al, *Biochem Biophys Res Com* **209**: 867-876, 1995.
11. Kajiwara S et al, *Plant Mol Biol* **29**: 343-352, 1995.
12. Masamoto K et al, *Plant Cell Physiol* **39**: 560-564, 1998.
13. Verdoes JC et al, *Biotechnol Bioeng* **63**: 750-755, 1999.
14. Teramoto M et al, *FEBS Lett* **545**: 120-126, 2003.
15. Tsuchiya T et al, *FEBS Lett* **579**: 2125-2129, 2005.
16. Nishida Y et al, *Appl Environ Microbiol* **71**: 4286-4296, 2005.
17. Makino T et al, *Plant Cell Physiol* **49**: 1867-1878, 2008.
18. Takemura M et al, *Plant Cell Physiol* **55**: 194-200, 2014.
19. Misawa N et al, *Plant J* **4**: 833-840, 1993.
20. Misawa N et al, *Plant J* **6**: 481-489, 1994.
21. Fujisawa M et al, *J Exp Bot* **60**: 1319-1332, 2009.
22. Harada H et al, *Transgenic Res* **23**: 303-315, 2014.
23. Fujisawa M et al, *J Biosci Bioeng* **105**: 636-641, 2008.
24. Römer S et al, *Nature Biotechnol* **18**: 666-669, 2000.
25. Fraser PD et al, *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 1092-1097, 2002.
26. Enfissi EMA et al, *Plant Biotechnol J* **17**: 1501-1513, 2019.
27. Campbell R et al, *Plant Sci* **234**: 27-37, 2015.
28. Mortimer CL et al, *Plant Biotechnol J* **14**: 140-152, 2016.
29. Otani M et al, *Plant Biotechnol* **38**: 219-226, 2021.
30. Fujii R et al, *Plant Cell Physiol* **57**: 1518-1529, 2016.
31. Yamano S et al, *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 1112-1114, 1994.
32. Miura Y et al, *Appl Environ Microbiol* **64**: 1226-1229, 1998.
33. Shimada H et al, *Appl Environ Microbiol* **64**: 2676-2680, 1998.
34. Takemura M et al, *Appl Microbiol Biotechnol* **103**: 9393-9399, 2019.
35. Takemura M et al, *Synthetic Biol* **6**: ysab012, 2021.