

論文内容の要旨

氏名	にし た やす ひろ 西 田 康 宏			
学位の種類	博 士 (農学)			
学位記番号	農 第 110 号			
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 22 日			
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当			
学位論文題目	遺伝子工学手法を用いた稀有物質の創生			
論文審査委員 (主査)	教授	米	虫	節 夫
(副主査)	教授	内	海	龍 太 郎
(副主査)	教授	藤	田	藤 樹 夫

本研究では、最近活性酸素などの消去作用で注目されているカロテノイドであるアスタキサンチンの効率的な増産と、種々のカロテノイドのうち、*,-ionone ring*の改変を目的として、*,-ionone ring*のC1位に隣接するC16,17位のジメチル基の影響により、立体障害や低反応性で、有機合成的なアプローチが非常に困難であるC2位に水酸基を付加させることを目的とした。そのため、これらC2位に水酸基を有するカロテノイド、2-hydroxyastaxanthinを生産する、*,-proteobacteria*である*Brevundimonas* sp. SD212、*Erythrobacter* sp.PC6に着目している。

本研究は4章から構成され、第1章では、序論として、今何故カロテノイドの研究が大事であるかをすぐに来るであろう高齢化社会と加齢による生活習慣病や加齢性疾患との関連で検討している。第2章では、カロテノイドおよびその生成に関する過去の知見を整理している。さらに第3章においてカロテノイドの生体への寄与を述べ、行った研究の意義を明確にしている。これらの検討の上に立ち、第4章において新規カロテノイド水酸化酵素のクローニングに関する実験結果を示し、アスタキサンチンの効果的な増産とアスタキサンチンよりもSOD様活性の高いC2水酸化カロテノイドの酸性について論じている。

実験的には、次のようなことをおこなっている。

細菌のゲノムライブラリ (コスミドライブラリ)を前駆体となる種々のカロテノイド生合成遺伝子を有する大腸菌にて作成し、スクリーニングを行ったが、これらのクローンによる変換は認められず、C2-水酸化酵素遺伝子の単離は不可能であった。このため、カロテノイド生合成酵素のうちphytoene desaturase (CrtI)は、生物間においてアミノ酸レベルで非常に高い相同性を示していることから、保存領域のアミノ酸配列から degenerated primerを設計し*crtI*の増幅を試みた。二つの、*,-proteobacteria*のうち、*Brevundimonas* sp.SD212株の*crtI*の増幅に成功し、配列決定後、それをプローブとし、SD212株のゲノムライブラリよりコロニーハイブリダイゼーションを行うことによってスクリーニングを行った。続いてこれらスクリーニングによって得られたクローンから得られたコスミドを制限酵素で消化後、サザンハイブリダイゼーションを行い、陽性フラグメントのサブクローニングを行った。そのうち12kbの*EcoRI*断片の塩基配列の決定を行ったところ、GC含量が69%と高く、この断片の中に12個のORFが存在することが明らかとなった。そのうちの7個は、既知のカロテノイド生合成遺伝子、*crtW*、*crtY*、*crtI*、*crtB*、*crtE*、*idi*、*crtZ*と相同性を示した。これらORFのうち*crtY*、*crtI*、*crtB* (それぞれ lycopene cyclase遺伝子、phytoene desaturase遺伝子、phytoene syntase遺伝子)は、現在までに報告されている環状のカロテノイドを生産する細菌と同じ向き・順序で保存されていた。それ以外は現在までに報告されているastaxanthinおよびその前駆体を生産する細菌のカロテノイド生合成遺伝子クラスターと大きく異なり、SD212株はコンパクトなクラスターながら4つ以上の転写単位に分かれていることが類推された。

また、それぞれのアミノ酸レベルでの相同性は31-72%であった。分類的に離れている γ -proteobacteriaとSD212株のCrtタンパク質群との間で、相同性が認められたことは、これらの遺伝子は、分類的に関連性のない種間における遺伝子伝達(横の遺伝子伝達: lateral gene transfer)によりもたらされている可能性があるということを示唆している。

これら、既知のORF以外の5つのORFに関して、astaxanthin生合成能を有する大腸菌に導入したところ、そのうちの一つORF11において、水酸基付加によると思われるastaxanthinより高極性な色素ピーク(化合物1)がHPLC/PDAにより確認された。化合物1をカラムクロマトグラフィーにより分離・精製後、HPLC/PDA/APCI-MSによりUV/VISスペクトル、分子量を測定したところastaxanthinより更に一つ多い水酸基が存在することが示唆され、 $^1\text{H-NMR}$ により、C2位に水酸基が存在することが明らかとなった。この結果により、化合物1は、2-hydroxyastaxanthinと決定され、ORF11は、新規酵素であるC2-hydroxylaseであり、その遺伝子をcrtGと命名した。また、SOSUIにより膜貫通領域が示唆されたので、おそらくCrtGはほかの多くのカロテノイド生合成酵素と同様に膜酵素であることが考察される。また、Blastにより、他のタンパク質とのアミノ酸相同性を検索したところ、興味深いことに哺乳動物のcholesterol代謝に関連するsterol-C5-desaturases (Δ^7 -sterol 5-desaturase)と部分的に高い相同性を示すことが明らかとなった。これらの結果と機能との間に関連性は認められないが、イソプレノイドの酸化に関与する反応としてこれらの保存領域は重要なかもしれない。

次に、Combinatorial Biosynthesisにより種々の難合成カロテノイドの生合成を行うこととCrtGの基質特異性を評価するために、zeaxanthin、canthaxanthin、 β -caroteneにおける変換能を調べた。zeaxanthin生産性大腸菌にcrtG遺伝子を導入したところ新たに二つの色素(化合物4,5)がHPLC/PDAにより確認され、これらをカラムクロマトグラフィーで単離後、HPLC/PDA/APCI-MSによりUV/VISスペクトル、分子量を測定し、 $^1\text{H-NMR}$ データより、これらはC2位(4はC2'位も含む)に水酸基が存在することが示された。これにより化合物4,5は、それぞれ自然界に極僅かしか存在しない稀有な、(2R, 2'R)-dihydroxyzeaxanthin(nostoxanthin)、2R, 2'-hydroxyzeaxanthin(caloxanthin)であることが明らかとなった。

次にcanthaxanthin生産性大腸菌にcrtG遺伝子を導入したところ新たに二つの色素(化合物7,8)がHPLC/PDAにより確認され、これらをカラムクロマトグラフィーで単離した。これらのUV/VISスペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ データより化合物7は、分子構造が対称形であることが示され、化合物8は非対称であった。また、その二次元NMRの結果によりC2位(7はC2'位も含む)に水酸基が存在することが示され、HRFABMSとHPLC/PDA/APCI-MSにより分子量が決定され化合物7は、新規カロテノイドである2,2'-dihydroxycanthaxanthin(2,2'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione)であることが示された。同様に化合物8は、化合物7と同様の2-hydroxy-4-keto- β -ringと

canthaxanthinと同様な4-keto- β -ringを示す $^1\text{H-NMR}$ データであることから、これは、オオミジンコ(*Daphnia magna*)から単離が報告されたことがある2R-hydroxycanthaxanthin(2R-hydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione)であることが示された。また、この2種をラット脳ホモジネートを用いた抗過酸化脂質試験を行ったところastaxanthinと同様に優れた活性を示した。

これらの事実により、CrtGを用いることによって従来、有機合成が非常に困難であったC2(2')-水酸化カロテノイド類の生合成が組替え大腸菌によって可能になった。

論文審査結果の要旨

本研究では、最近活性酸素などの消去作用で注目されているカロテノイドであるアスタキサンチンの効率的な増産と、種々のカロテノイドのうち、 β -ionone ringの改変を目的として、 β -ionone ringのC1位に隣接するC16,17位のジメチル基の影響により、立体障害や低反応性で、有機合成的なアプローチが非常に困難であるC2位に水酸基を付加させることを目的とした。そのため、これらC2位に水酸基を有するカロテノイド、2-hydroxyastaxanthinを生産する、 α -proteobacteriaである*Brevundimonas* sp. SD212、*Erythrobacter* sp. PC6に着目している。

本研究は4章から構成され、第1章では、序論として、今何故カロテノイドの研究が大事であるかをすぐに来るであろう高齢化社会と加齢による生活習慣病や加齢性疾患との関連で検討している。第2章では、カロテノイドおよびその生成に関する過去の知見を整理している。さらに第3章においてカロテノイドの生体への寄与を述べ、行った研究の意義を明確にしている。これらの検討の上に立ち、第4章において新規カロテノイド水酸化酵素のクローニングに関する実験結果を示し、アスタキサンチンの効果的な増産とアスタキサンチンよりもSOD様活性の高いC2水酸化カロテノイドの酸性について論じている。

Brevundimonas sp. SD212株の*crtI*の増幅に成功し、配列決定後、それをプローブとし、SD212株のゲノムライブラリよりコロニーハイブリダイゼーションを行うことによってスクリーニングを行った。続いてこれらスクリーニングによって得られたクローンから得られたコスミドを制限酵素で消化後、サザンハイブリダイゼーションを行い、陽性フラグメントのサブクローニングを行った。そのうち12kbの*EcoRI*断片の塩基配列の決定を行ったところ、GC含量が69%と高く、この断片の中に12個のORFが存在することが明らかとなった。そのうちの7個は、既知のカロテノイド生成遺伝子、*crtW*、*crtY*、*crtI*、*crtB*、*crtE*、*idi*、*crtZ*と相同性を示した。これらORFのうち*crtY*、*crtI*、*crtB*（それぞれlycopene cyclase 遺伝子、phytoene desaturase 遺伝子、phytoene syntase 遺伝子）は、現在までに報告されている環状のカロテノイドを生産する細菌と同じ向き・順序で保存されていた。それ以外は現在までに報告されているastaxanthinおよびその前駆体を生産する細菌のカロテノイド生成遺伝子クラスターと大きく異なっており、SD212株はコンパクトなクラスターながら4つ以上の転写単位に分かれていることが類推された。

これら、既知のORF以外の5つのORFに関して、astaxanthin生成能を有する大腸菌に導入したところ、そのうちの1つORF11において、水酸基付加によると思われるastaxanthinより高極性な色素ピーク(化合物1)がHPLC/PDAにより確認された。化合物1をカラムクロマトグラフィーにより分離・精製後、HPLC/PDA/APCI-MSによりUV/VISスペクトル、分子量を測定したところastaxanthinより更に一つ多い水酸基が存在することが示唆され、¹H-NMRIにより、C2位に水酸基が存在することが明らかとなった。この結果により、化合物1は、2-hydroxyastaxanthinと決定され、ORF11は、新規

酵素であるC2-hydroxylaseであり、その遺伝子を*crtG*と命名した。また、SOSUIにより膜貫通領域が示唆されたので、おそらく*CrtG*はほかの多くのカロテノイド生成酵素と同様に膜酵素であることが考察される。また、Blastにより、他のタンパク質とのアミノ酸相同性を検索したところ、興味深いことに哺乳動物のcholesterol代謝に関連するsterol-C5-desaturases (Δ^7 -sterol 5-desaturase)と部分的に高い相同性を示すことが明らかとなった。これらの結果と機能との間に関連性は認められないが、イソプレノイドの酸化に関与する反応としてこれらの保存領域は重要なものかもしれない。

次に、Combinatorial Biosynthesisにより種々の難合成カロテノイドの生合成を行うことと*CrtG*の基質特異性を評価するために、zeaxanthin、canthaxanthin、 β -caroteneにおける変換能を調べた。zeaxanthin生産性大腸菌に*crtG*遺伝子を導入したところ新たに二つの色素(化合物4,5)がHPLC/PDAにより確認され、これらをカラムクロマトグラフィーで単離後、HPLC/PDA/APCI-MSによりUV/VISスペクトル、分子量を測定し、¹H-NMRデータより、これらはC2位(4はC2'位も含む)に水酸基が存在することが示された。これにより化合物4,5は、それぞれ自然界に極僅かしか存在しない稀有な、(2*R*, 2'*R*)-dihydroxyzeaxanthin(nostoxanthin)、2*R*,*H*-hydroxyzeaxanthin(caloxanthin)であることが明らかとなった。

また、本研究は、2005年7月に行われた第7回マリンバイオテクノロジー学会大会ポスター発表において、その内容が高く評価され、最優秀賞を受賞している。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、審査に当たっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成19年2月9日、農学研究科委員会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。