

シアノバクテリアにおけるカロテノイド合成とその改変

島田 尚弥, 前田 海成, 池内 昌彦
東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻
〒153-8902 東京都目黒区駒場

Naoya Shimada, Kaisei Maeda, Masahiko Ikeuchi

Biosynthesis and engineering of carotenoids in cyanobacteria

Keywords: carotenoids, mutants,

Department of Life Sciences (Biology), Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo
Komaba, Meguro, Tokyo, 153-8902, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9b7.00139

カロテノイドは炭素 5 (C5) を単位とするイソプレンの重合体であるイソプレノイドのうちおもに炭素 40 (C40) の一群の化合物であり、共役二重結合によって色素などとしてののはたらきをもち、植物やシアノバクテリア、光合成細菌だけでなく、光合成機能をもたない動物、菌類、微生物にも広く分布する。その主な役割は、光合成のアンテナもしくは過剰な光エネルギーのクエンチ、活性酸素種ストレスの防御などが知られている。なかでも、シアノバクテリアは遺伝子改変が容易で、光合成生物のモデルとしてよく利用されている。そのためカロテノイドの機能や合成経路、その調節について解析するのに最適である。本稿では、モデル生物 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の遺伝子を合成経路に示し、その調節や改変について概説する。

1. シアノバクテリアのカロテノイド種

多くのシアノバクテリアにおいて、 β -カロテン、ゼアキサントフィル、ミクソキサントフィル、エキネノンなどの炭素 40 (C40) のカロテノイドが広く分布している。また紅色光合成細菌に特徴的な非環状のカロテノイドはシアノバクテリアにはほとんど含まれない。代わりに、 β イオノン環を1つもつミクソールと2つもつ β -カロテンおよびそれらの誘導体が普通である。また、藻類に多いエポキシドをもつものもあまり知られていない。図1に示すように、シアノバクテリアは植物の葉緑体と同じく MEP (メチルエリスリトール-4-リン酸) 経路で C5 単位を合成し、これを順次重合して C20 をつくり、さらに C20 同士を重合し C40 のカロテノイド前駆体であるフィトエンをつくる。このようなカロテノイド合成系のほとんどはすでに同定されており、さまざまな改変も試みられている。また、多様なカロテノイドの役割として、デオキシ糖を付加したミクソキサントフィルの存在、シアノバクテリア特有の光合成のクエンチに関わるオレンジカロテノイドタンパク質 (OCP)、光合成の光化学系 I 反応中心の多様なカロテノイドの結合などもシアノバクテリアの特徴である。

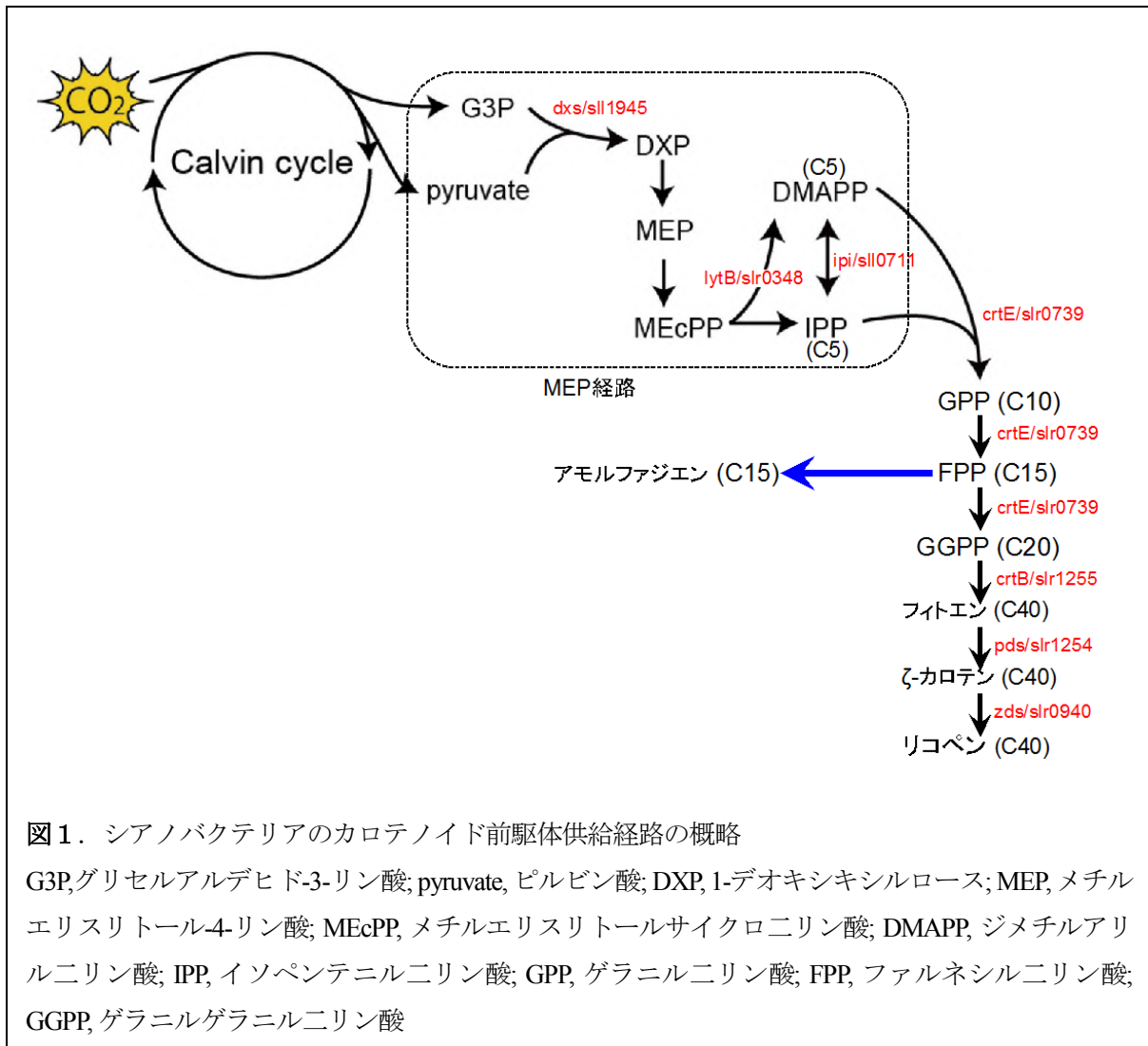


図1. シアノバクテリアのカロテノイド前駆体供給経路の概略

G3P,グリセルアルデヒド-3-リン酸; pyruvate, ピルビン酸; DXP, 1-デオキシキシシルロース; MEP, メチルエリスリトール-4-リン酸; MEcPP, メチルエリスリトールサイクロニリン酸; DMAPP, ジメチルアリルニリン酸; IPP, イソペンテニルニリン酸; GPP, ゲラニルニリン酸; FPP, ファルネシルニリン酸; GGPP, ゲラニルゲラニルニリン酸

2. MEP 経路とリコペン合成

真核生物や古細菌はメバロン酸経路でイソプレノイドの前駆体 (C5) を合成するが、葉緑体やシアノバクテリアを含む多くの細菌は MEP 経路で合成する。この MEP 経路ではメバロン酸を中間体として経路しないため、非メバロン酸経路ともいわれる。その概略は図1に示す通りで、グリセルアルデヒド-3-リン酸 (G3P) とピルビン酸を前駆体として MEP などを経由する。この経路に参与する酵素とその遺伝子はほぼ同定されているが、その調節系は明らかではない。我々は、*Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて、MEP 経路の律速段階を推定した。まず、植物のリモネン (C10) 合成酵素を導入した株を作出し、大腸菌で MEP 経路の強化に有効な酵素遺伝子の発現強化によって、リモネン生産の大きな促進を確認した (Kiyota et al. 2014)。しかし、このとき内在のイソプレノイド合成の数%程度のリモネン生産であったため、内在のカロテノイド蓄積にはほとんど影響がなかった。次に、別の植物のアモルファジエン (C15) 合成酵素の導入株を作出した。この株ではリモネンの約 30 倍にあたるアモルファジエン生産となり、内在のイソプレノイド合成の炭素フローの 90% を越える値であった。このような高生産株は酵素自身の高発現とともにその基質を供給するファルネシルニリン酸 (FPP) 合成酵素の発現強化によって実現できた。このとき、内在

N. Shimada-2

のカロテノイド蓄積は大きく減少し、光合成による増殖速度も低下した (清田ら 2016)。これはアモルファジエン合成酵素による FPP を消費が、内在のカロテノイド合成と競合したためと考えられる。なお、リモネンはレモンの香成分、アモルファジエンは抗マラリア薬アルテミシニンの合成前駆体として知られている。このようなカロテノイド生産の抑制の解消を手がかりとして、MEP 経路の強化も試みた。シアノバクテリアでは MEP 経路の酵素として推定されている 7 種の酵素遺伝子の発現強化株を作出したところ、*dxs* (1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸シンターゼ) と *ipi* (イソペンテニル・ジメチルアリルピロリン酸イソメラーゼ), *lytB* (4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルピロリン酸レダクターゼ) の発現が蓄積減少を回復させた。以上のことは律速段階の存在を示唆している (池内ら 2016)。これらの結果は大腸菌での報告とも似ており、律速段階が生物間で似ていることを示唆している。なお、C5 単位から C20 の GGPP (ゲラニルゲラニルニリン酸) を合成する GGPP 合成酵素 (*crtE*) は、経路途中の FPP の蓄積にも貢献するようである。

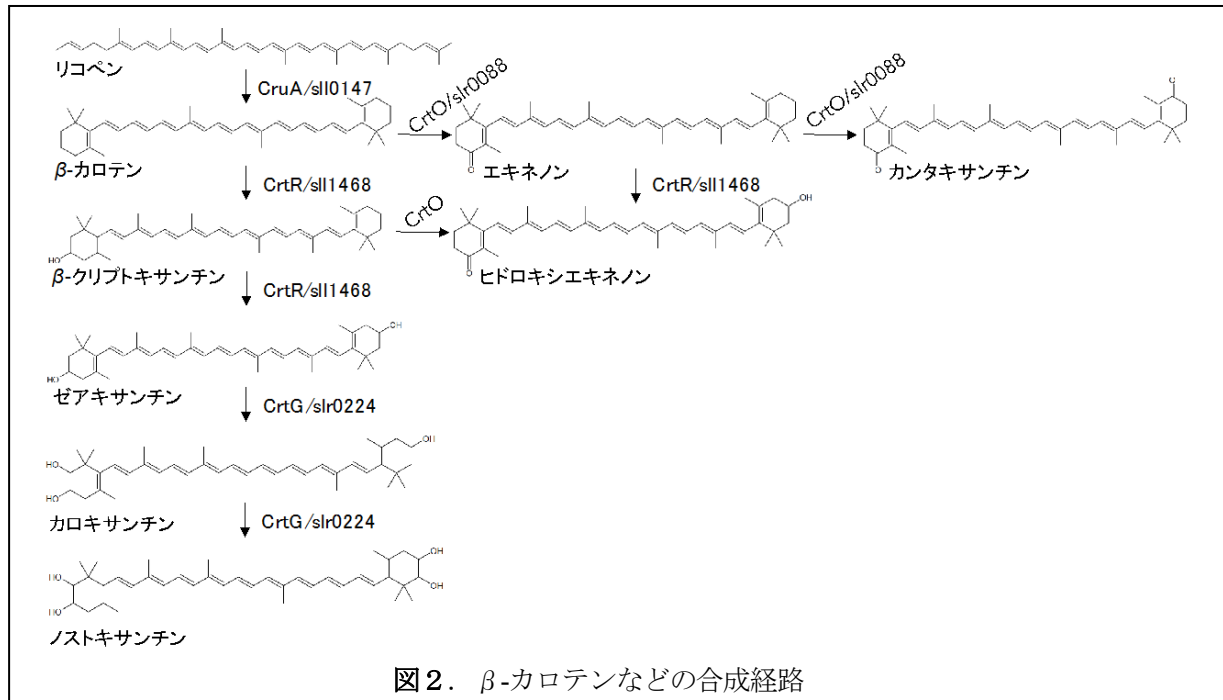
GGPP 以降は、C20 の GGPP を重合して C40 のフィトエンを合成し、これを段階的に脱水素してリコペンまで合成する。これらの反応にかかわるフィトエン合成酵素 (*crtB*) とフィトエン不飽和化酵素 (*pds*), ζ -カロテン不飽和化酵素 (*zds*) は順次共役二重結合を導入してリコペンとする。これらの酵素を光合成細菌の酵素に置換すると、 β -カロテンを合成することができなくなり、光化学系のアセンブリに影響が出る。また、これらを破壊すると、カロテノイド蓄積がなくなり、光合成能も消失する (Bautista et al. 2005)。一方、これらの遺伝子の強制発現株は安定に維持できないので、毒性があるかもしれない。また、強光で *crtB* や *pds* が誘導を受けるといわれ、カロテノイド蓄積の引き金になっている可能性が高い (Fernandez-Gonzalez et al. 1998)。一方、*crtB*, *pds* だけでなく *zds*, *crtR* が誘導されるという報告もある (Schäfer et al. 2006)。このようにシアノバクテリアでは光合成機能が必須であるため、カロテノイド合成のドラスティックな改変はこれまで成功していない。

3. β -カロテンとその関連カロテノイドの合成

シアノバクテリアの β -カロテンおよびその誘導体であるキサントフィル類は、チラコイド膜の主要なカロテノイドである。 β -カロテンは植物でもシアノバクテリアでも光化学系 I, 系 II の反応中心に結合し、反応中心のアセンブリや安定化に必要と考えられている。しかし、最近の *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系 I 三量体の結晶構造では、 β -カロテンだけでなく、少量のエキネノン、ゼアキササンチン、カンタキササンチン、ヒドロキシエキネノンが特定の部位に含まれている。これらの β -カロテン系列のカロテノイド種の役割について、再注目されている (Malavath et al. 2018)。一方、大部分のキサントフィルは脂質とともにチラコイド膜に存在する。一方、植物では、キサントフィルの多くは集光性アンテナ複合体に結合しており、集光性アンテナ複合体が一般的ではないシアノバクテリアとは異なっている。つまり、多くのシアノバクテリアの主要なキサントフィルであるゼアキササンチンやその関連カロテノイドは膜内にあって、光傷害ストレスの回避などの役割を果たしている。多くのシアノバクテリアに存在する OCP は 3'-ヒドロキシエキネノンと結合し、フィコビリソームが吸収した光エネルギーの非光化学消光に重要な役割を果たしている。この OCP に含まれる 3'-ヒドロキシエキネノンは青紫色光を吸収して長波長シフト

した活性型となり、暗所で元の不活性型に戻る。このようなカロテノイド分子の構造変化が非光化学消光の活性を調節している。

β -カロテンは両端がリコペンシクラーゼ (*cruA*) によって環化された β イオン環をもつ (β , β -カロテン) (図2)。一方、植物には *cruA* とは別のシクラーゼによって、一端が ϵ イオン環となった α -カロテン (β, ϵ -カロテン) が合成され、これを經由してルテインがつくられる。また、光合成細菌には β -カロテンやその誘導体はなく、光化学系反応中心にも非環状のカロテノイドが結合しており、シクラーゼもない。多くのシアノバクテリアにみられるゼアキササンチンはヒドロキシラーゼ (*crtR*) によって両端の 3,3'位が OH 化されたもので、ミクソキサントフィルとともにストレスによって蓄積が亢進することが多く、強光ストレスで *crtR* の発現が誘導されることによるらしい。しかし、光化学系に必須の β -カロテンを消費し尽くすことはないの、何らかの調節があるらしい。また、*crtR* 破壊株では、ゼアキササンチンの消失とともに β -カロテンが代償的に増加する (Zhu et al. 2010)。一方、ケトラーゼ (*crtO*) は β 環の 4 位にケト基を導入し、エキネノン、カンタキササンチンを合成する。また、*crtR* と *crtO* のはたらきで少量の 3'-ヒドロキシエキネノンを合成し、OCP に取りこまれる。この OCP も光ストレスの軽減に重要な役割をもっている。なお、OCP のバリエーションにはカンタキササンチンが結合し、一重項酸素の解消などの光保護の役割をもつものや未知の役割をもつものがあり、それらもシアノバクテリアに広く分布している (Lopez-Igual et al. 2016)。なお、強光ストレスでゼアキササンチン蓄積が亢進しても、 β -カロテンが消失することも、後述のアスタキササンチンが合成されることもないのは、光合成に必要な一定量の β -カロテン蓄積を担保するしくみがあるためと考えられる。

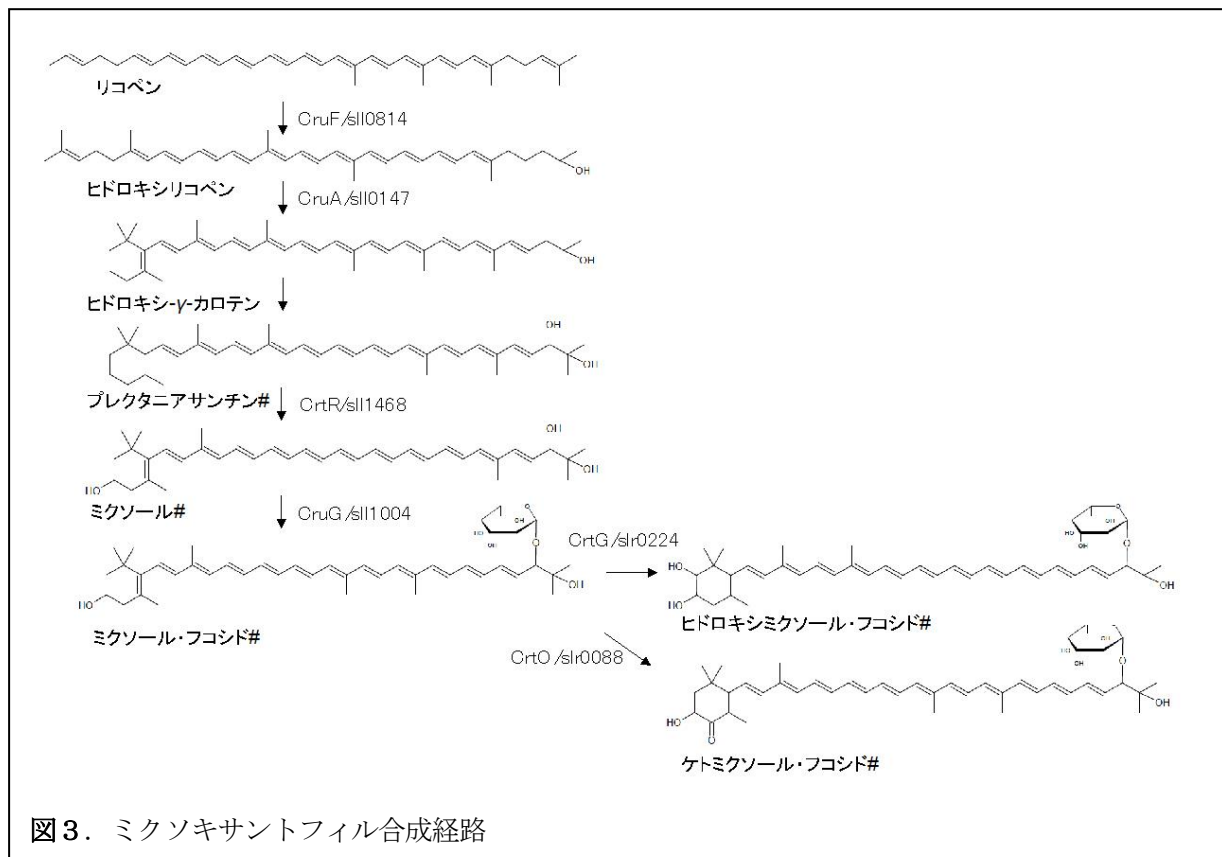


4. ミクソキサントフィルの合成 (糖付加)

ミクソキサントフィルは一端が β 環となったミクソールの他端にデオキシ糖が付加したもので、シアノバクテリアにおける主要なカロテノイドのひとつであり、ストレスで蓄積が亢進することが多い。

N. Shimada-4

その多くは、フコースやラムノースなどのデオキシ糖が C-2'位の OH に付加されている点で、当初はシアノバクテリア固有とされていた。なお、*Synechocystis* ではジメチルフコースが付加している。これらはシアノバクテリアの細胞外膜にとくに多い。ミクソキサントフィルの合成にかかわるいくつかの酵素遺伝子は同定されている（図 3, Graham and Bryant 2009）。その破壊株ではミクソキサントフィルが合成されなくなることで、光ストレスへの感受性が増加することが知られている。しかし、ストレスでどのように合成が誘導されるかはわかっていない。また、ミクソールの合成において β 環の形成と他端の OH 化のどちらが先に進行するかが、 β -カロテン系列とミクソキサントフィル系列の蓄積量比に影響を及ぼすはずであるが、わかっていない。また、ミクソキサントフィルへの糖付加は細胞外膜への局在に重要な役割を持つと考えられているが、その機構についてもほとんど知見がない。

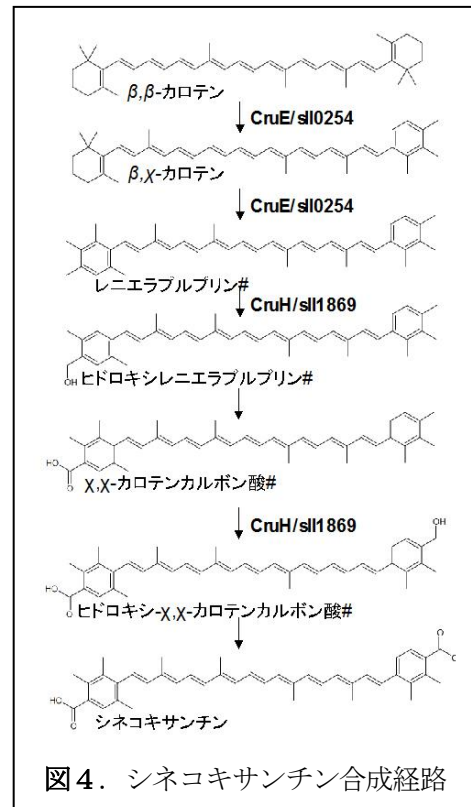


5. シネコキサントフィルの合成

シネコキサントフィルは最近 Bryant らによって発見された芳香族環にカルボン酸をもつカロテノイドで、水溶性が高く細胞外へ放出される特徴がある。また、通常の増殖期には生産されないが、定常期に高生産され、活性酸素ストレスへの防御の役割をもつので、なんらかの合成の誘導のしくみと細胞外への排出のしくみがあると考えられる (Graham and Bryant 2008)。その合成経路の全貌はまだ不明だが、重要な酵素遺伝子 β -カロテンデサチュラーゼ/メチルトランスフェラーゼ (CruE) と C18 ヒドロキシラーゼ (CruH) が同定されている (図 4)。カロテノイドの細胞外への排出は、合成調節機構の理解や応用としての大量生産において重要なポイントのひとつであるが、その詳細はわかっていない。

6. アスタキサンチンの合成

アスタキサンチンは両方のβ環の3位にOH, 4位にケト基をもつもので、抗酸化活性が高いこととともに、いくつかの動物においてディスプレイ、保護色、警告色などのための色素として役割を果たしている。その合成はある種の海洋細菌、藻類や一部の植物に限られ、シアノバクテリアでは知られていない。原理的には上述の crtR による OH 付加と crtO によるケト化の作用で合成されるはずであるが、現実には合成されない。これは、これらの酵素の基質特異性が高いことによるらしい。一方、海洋性細菌から単離された同様の活性をもつ crtZ (ヒドロキシラーゼ) と crtW (ケトラーゼ) をシアノバクテリアで発現すると、大量にアスタキサンチンが合成される。このとき、β-カロテンやゼアキサンチンが消失するので、これらの酵素は光化学系に結合したカロテノイドにも作用するのかもしれない (池内, 未発表)。



7. 展望

シアノバクテリアは遺伝子改変や導入による代謝経路や光合成活性のエンジニアリングに適した生物であり、これまでにさまざまな物質生産にも応用されている。一方、シアノバクテリアでは光合成による独立栄養が主要な増殖手段であるため、これまでさまざまな制約があった。とくに、カロテノイドは光合成の補助色素として重要であるため、その役割の解析は不十分であった。昨今、多様なゲノム情報の蓄積、遺伝子改変や代謝エンジニアリング、さらにこれに適した株の開発などが急速に進歩している。近い将来、シアノバクテリアを用いてさらなるカロテノイド合成経路の改変によって、多種多様なカロテノイドを生産することが可能になり、各種カロテノイドの役割の解明、生産への応用などに展開していくことが期待される。

謝辞

カロテノイド合成にかかわる複数の酵素遺伝子の提供を梅野太輔先生 (千葉大学) から受けました。また、カロテノイド組成の分析は、高市真一先生 (東京農業大学) によります。ここに感謝いたします。

引用文献

- Bautista JA, Rappaport F, Guergova-Kuras M, Cohen RO, Golbeck JH, Wang JY, Beal D, & Diner BA 2005. Biochemical and biophysical characterization of photosystem I from phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase deletion mutants of *Synechocystis* Sp. PCC 6803: evidence for PsaA- and PsaB-side electron transport in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 280: 20030-20041.
- Fernandez-Gonzalez B, Martinez-Ferez IM, & Vioque A 1998. Characterization of two carotenoid gene promoters in the *N. Shimada-6*

- cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1443: 343-351.
- Graham JE & Bryant DA 2008. The Biosynthetic pathway for synechoxanthin, an aromatic carotenoid synthesized by the euryhaline, unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* 190: 7966-7974.
- Graham JE & Bryant DA 2009. The biosynthetic pathway for myxol-2' fucoside (myxoxanthophyll) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* 191: 3292-3300.
- 池内昌彦, 清田浩史, 松村雅子, 奥田裕紀子, 高市真一, 2016. 日本植物学会年会
- 清田浩史, 奥田裕紀子, 梅野太輔, 平井優美, 池内昌彦. 2016. 日本植物生理学会年会
- Kiyota H, Okuda Y, Ito M, Hirai MY, & Ikeuchi M 2014. Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO₂. *J. Biotechnol.* 185: 1-7.
- Lopez-Igual R, Wilson A, Leverenz RL, Melnicki MR, Bourcier de Carbon C, Sutter M, Turmo A, Perreau F, Kerfeld CA, & Kirilovsky D 2016. Different functions of the paralogs to the N-terminal domain of the orange carotenoid protein in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Physiol.* 171: 1852-1866.
- Malavath T, Caspy I, Netzer-El SY, Klaiman D, & Nelson N 2018. Structure and function of wild-type and subunit-depleted photosystem I in *Synechocystis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1859: 645-654.
- Schäfer L, Sandmann M, Woitsch S, & Sandmann G 2006. Coordinate up-regulation of carotenoid biosynthesis as a response to light stress in *Synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Environ.* 29: 1349-1356.
- Zhu Y, Graham JE, Ludwig M, Xiong W, Alvey RM, Shen G, & Bryant DA 2010. Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Arch. Biochem. Biophys.* 504: 86-99.