

古細菌のカロテノイド生合成経路

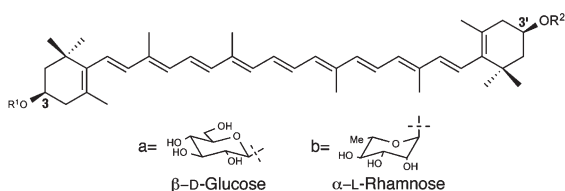
八波 利恵

はじめに

古細菌という概念は、WoeseとFoxがリボソーム小サブユニットのRNA（原核生物では16S rRNA，原核生物では18S rRNA）の解析により提唱したものである¹⁾。主な構成グループは、メタン生成古細菌，好熱性古細菌および高度好塩性古細菌である。本稿のタイトルは「古細菌のカロテノイド生合成経路」であるが，実は古細菌が生産するカロテノイドの報告は，高度好塩性古細菌を除くとあまり多くない。メタン生成古細菌は，現在のところカロテノイドを生産しないといわれている²⁾。好熱性古細菌については，*Sulfolobus shibatae*がゼアキサニングルコシド（図1，化合物1-7）を生産することが報告されている³⁾。そして，類縁の*S. solfataricus*について，その生合成の一部に関与するリコペンβ-シクラーゼ（CrtY）の報告がなされた⁴⁾ものの，生合成系を構成する全遺伝子の同定には至っていない。一方，ある種の高度好塩性古細菌は，β-カロテンや炭素数50（C₅₀）のバクテリオルベリン（BR）（図2）といったカロテノイドを生産することが知られており，これまでにその生合成に関与するいくつかの遺伝子が同定されている。さらについで最近，筆者らは高度好塩性古細菌*Haloarcula japonica*のBR生合成に関与する複数の遺伝子を同定することに成功した⁵⁾。そこで，本稿では*Ha. japonica* BRの生合成経路を中心に紹介し，カロテノイドの生理的役割についても述べる。

高度好塩性古細菌のカロテノイド生合成経路

米国ユタ州北部にある塩湖 Grate Salt Lake をご存知だ



- 1 (all-E, 3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin-di-β-D-glucopyranoside (R¹=a, R²=a)
- 2 (all-E, 3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin-di-α-L-rhamnopyranoside (R¹=b, R²=b)
- 3 (9*Z*, 3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin-di-α-L-rhamnopyranoside (R¹=b, R²=b)
- 4 (all-E, 3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin-α-L-rhamnopyranoside (R¹=b, R²=H)
- 5 (9*Z*, 3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin-α-L-rhamnopyranoside (R¹=b, R²=H)
- 6 (13*Z*, 3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin-α-L-rhamnopyranoside (R¹=b, R²=H)
- 7 (15*Z*, 3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin-α-L-rhamnopyranoside (R¹=b, R²=H)

図1. *S. shibatae*の生産するカロテノイド

ろうか。湖水の色としては食塩の「白」をイメージされるだろうが，実際は一部赤く染まった部分が存在する（カラー写真で紹介できないのが残念である）。これは，この塩湖に生育する好塩性の緑藻 *Dunaliella salina* および高度好塩性古細菌が赤色のカロテノイドを生産しているからである。高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* は，光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシンを有し⁶⁾，その発色団であるレチナールはリコペン，β-カロテンを経て合成される。一方で，リコペンは，C₅₀カロテノイドの前駆体であり，最終的にはBRに変換される（図2）。β-カロテンおよびレチナールの生合成に関与するCrtYおよびBrp/Blpは，すでに*Hb. salinarum*より同定されている^{7,8)}。また，同じく*Hb. salinarum*よりリコペンへのC₅付加に関与するリコペンエロンガーゼ（Lye）も見つかっていた⁹⁾ものの，BRに至る生合成経路の全貌は不明であった。

*Ha. japonica*におけるカロテノイド生合成に関わる酵素群の特定

***Ha. japonica*の生産するカロテノイドの同定** *Ha. japonica*は，石川県塩田土壌より分離された高度好塩性古細菌であり，三角形平板状という特徴的な形態を有している¹⁰⁾。また，2011年に全ゲノム配列解析も終了している¹¹⁾。そこで，*Ha. japonica*におけるカロテノイド生合成に関わる酵素群の特定を目的として，まず本菌の生産するカロテノイドを同定することとした。その結果，*Ha. japonica*は類縁菌*Hb. salinarum*と同様，フィトエン，リコペン，イソペンテニルデヒドロロドピン，ビスアンヒドロバクテリオルベリン，モノアンヒドロバクテリオルベリンおよびBRを生産していることがわかった（図2）¹²⁾。

フィトエンからリコペンへの生合成に関与する酵素の解析 ある種の細菌のカロテノイド生合成経路において，フィトエンからリコペンに至る反応ではフィトエンデサチユラーゼ（CrtI）の関与が知られている。そこで本菌ゲノム上より *crtI* ホモログの有無を調べた結果，4つの遺伝子が見いだされた。このうち，既知の *crtI* と相同性のより高い2つの遺伝子ホモログ (*c0507* および *d1086*) の機能を明らかにするため，これらの遺伝子の単独破壊株および二重破壊株の構築し，生産するカロテノイド種の解析を行った。その結果，*Ha. japonica*のフィトエンからリコペンに至る反応においては，*c0507* および *d1086* にコードされる2つの *crtI* が関与する生合成経

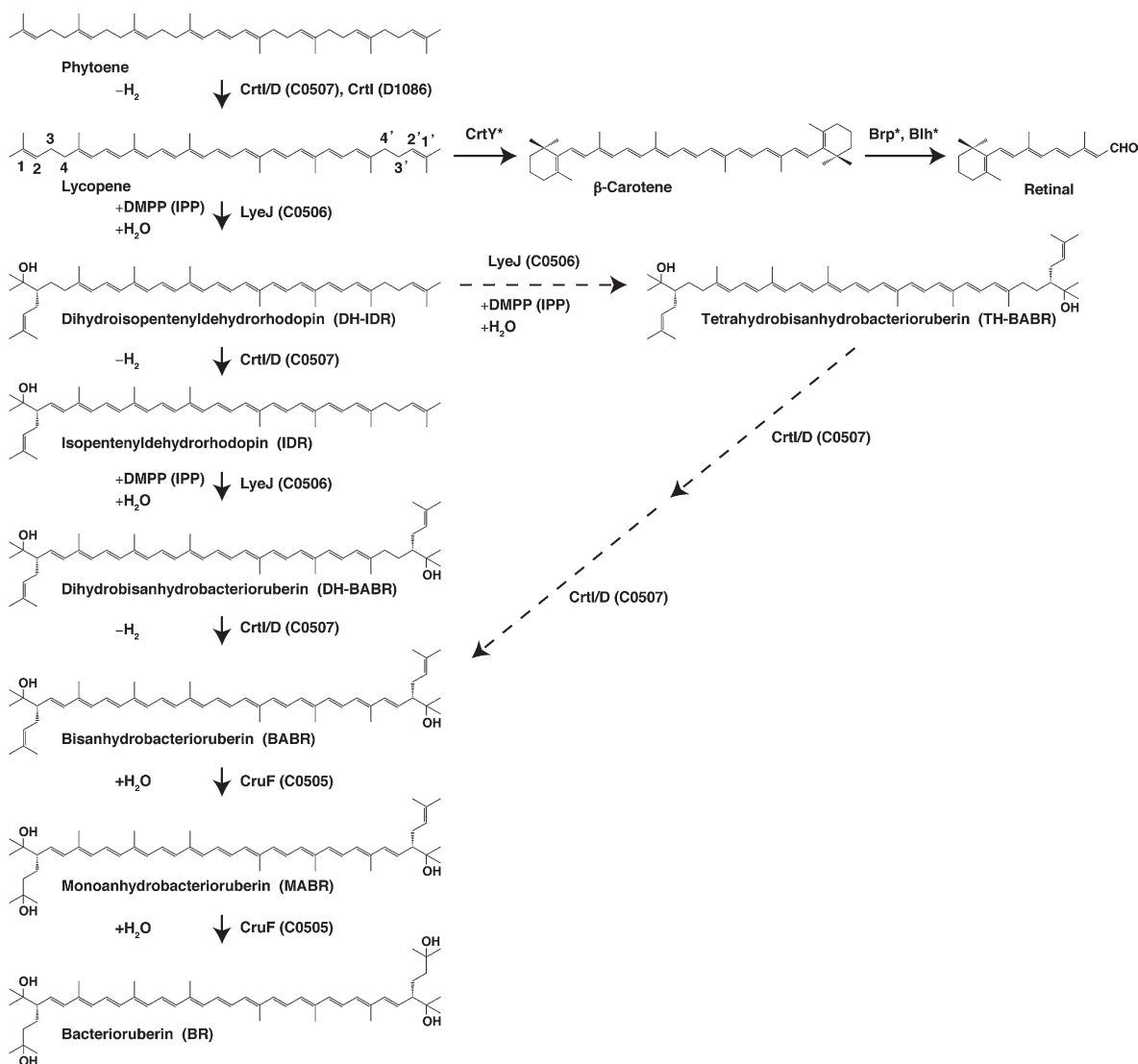


図2. *Ha. japonica*におけるカロテノイド生合成経路. 点線はマイナーと考えられる経路を示す. また, *Hb. salinarum* で同定されているCrtYおよびBrp/Blpにはアスタリスクを付けた.

路が存在することが示唆された.

リコペンからBRへの生合成に関与する酵素の解析

*c0507*近傍のゲノム配列を詳細に解析したところ, *c0507*のすぐ下流に存在する*c0506*および*c0505*が, それぞれリコペンエロンガーゼおよびヒドラターゼの遺伝子ホモログであることがわかった. これら3つの遺伝子はクラスターを形成し, 共転写されていたことから, 本菌のカロテノイドの生合成に密接に関与していると予想された. そこで, *c0507/c0506/c0505*クラスターを構成するそれぞれの遺伝子の単独破壊株を構築し, それらの生産するカロテノイド種の分析を行った. その結果, C0506はイソプレンおよび水酸基を付加する二機能酵素 (リコペンエロンガーゼおよび1,2-ヒドラターゼの両方の活性を持つ酵素), C0507は, リコペンからBRの生合成においては, 3,4-デサチュラーゼ (CrtD), そ

してC0505はヒドラターゼ (CruF) として機能することがわかった. C0506は, すでに*Hb. salinarum*より同定されているLyeと60%程度の相同性を有することから, LyeJと名付けた. これより, *c0507/c0506/c0505*遺伝子クラスターにコードされる3つの酵素がリコペンからBRの生合成系に関与することが明らかとなった. C0507は先にも述べたとおり, フィトエンデサチュラーゼ活性も有することからCrtI/Dとよべる. また, 本研究におけるCrtI, CrtDおよびCruFの同定は, 古細菌において初めてののものであった.

カロテノイドの生理的役割

高度好塩性古細菌が生産するBRは, この生物のみが生産するカロテノイドではない. 高度放射線耐性細菌*Rubrobactor radiotolerans*もBRを生産する. そのため,

*Hb. salinarum*においてBRは、種々の環境ストレスに対し防御的な役割を果たすと予想された。そこで、*Hb. salinarum*をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン処理して作製したBR欠損株を用い、酸化ストレスや他のストレスに対する感受性が検討された¹³⁾。すなわち、対数増殖期の野生株およびBR欠損株に対し、過酸化水素処理、⁶⁰Co γ -線照射および紫外線照射を行った。その後、菌体をプレートに塗布し、37°Cでインキュベート後、コロニー数を計測した。その結果、過酸化水素および γ -線のいずれに対してもBR欠損株は野生株に対し、高い感受性を示した。 γ -線の生物作用は、主に細胞内に含まれる水の放射線分解により発生する種々の活性酸素種（ヒドロキシラジカルおよび過酸化水素など）に由来することが知られている¹⁴⁾。そのため、BRが活性酸素種に対し防御的に働き、膜成分などの酸化的障害を抑制していることが示唆された。また、BR欠損株は紫外線に対しても高い感受性を示した。これより、塩田や塩湖など強い紫外線環境下で生育する高度好塩性古細菌がBRを生産することで、紫外線防御を行っていると考えられた。

また、カロテノイドの高度好塩性古細菌における生理的役割として、細胞膜内でリベット構造をとることで膜の力学的強度を上げ、高塩環境適応に寄与しているとも考えられている。そこで筆者らは、*Ha. japonica*野生株およびフィトエンのみを生産する変異株（上述、*c0507/dl086*遺伝子二重破壊株）を種々の塩濃度下で培養し、その生育を調べた。その結果、本菌の生育至適NaCl濃度である20%（w/v）より高い23%（w/v）の条件にお

いては、どちらの株も至適濃度下とほぼ同様な増殖を示した（図3）。一方で、至適濃度より低い15%（w/v）の条件において、野生型では培養初期の増殖抑制が見られたものの、定常期での到達ODは至適濃度下とほぼ同じであった。しかしながら、変異株では増殖速度の顕著な低下が観察された。これより、BRは高塩濃度下での増殖に必須のものでなく、低塩濃度下での増殖に重要な役割を果たすことが示唆された。すなわち、低塩濃度下ではBRが膜構造を安定化することで、増殖可能となったことが推測された。

冒頭で述べた*Sulfolobus*属におけるカロテノイドの役割は未だ明らかになっていないが、膜強化を担っていると推察されている³⁾。一方で、全ゲノム配列が明らかになっている類縁の*S. tokodaii*がカロテノイド合成遺伝子をもたないことから、カロテノイドは*Sulfolobus*属にとって必須のものではなく、ラジカルスカベンジャーとして機能していると推測する説⁴⁾もある。今後の研究成果が待たれるところである。

おわりに

古細菌の生息地域は、たとえば好熱性古細菌をあけても、温泉・石油鉱床・浅海あるいは深海の熱水域など、特殊環境が多く、分離・培養が困難である。しかしながら、新しい培養方法および新たな生息地へのアプローチ法の開発とともに、現在も続々と新種の古細菌が発見されている。それに伴い、今後新規カロテノイド・カロテノイド生合成酵素・生合成経路が発見されることを期待したい。

文 献

- 1) Woese, C. R. and Fox, G. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576 (1977).
- 2) Ogawa, T. et al.: *FEBS J.*, **281**, 3165 (2014).
- 3) Kull, D. R. and Pfander, H.: *J. Nat. Prod.*, **60**, 371 (1997).
- 4) Hemmi, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 586 (2003).
- 5) Yang, Y. et al.: *J. Bacteriol.*, **197**, 1614 (2015).
- 6) Lanyi, J. K. and Luecke, H.: *Curr. Opin. Struct. Bio.*, **11**, 415 (2001).
- 7) Peck, R. F. et al.: *J. Bacteriol.*, **184**, 2889 (2002).
- 8) Peck, R. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 5739 (2001).
- 9) Dummer, A. M. et al.: *J. Bacteriol.*, **193**, 5658 (2011).
- 10) Nishiyama, Y. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **99**, 43 (1992).
- 11) Nakamura, S. et al.: *Extremophiles Handbook*, vol. 2, Springer, Heidelberg (2011).
- 12) Yatsunami, Y. et al.: *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2014.00100.
- 13) Shahmohammadi, H. R. et al.: *J. Radiat. Res.*, **39**, 251 (1998).
- 14) Sonntag, C. von: *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, New York (1987).

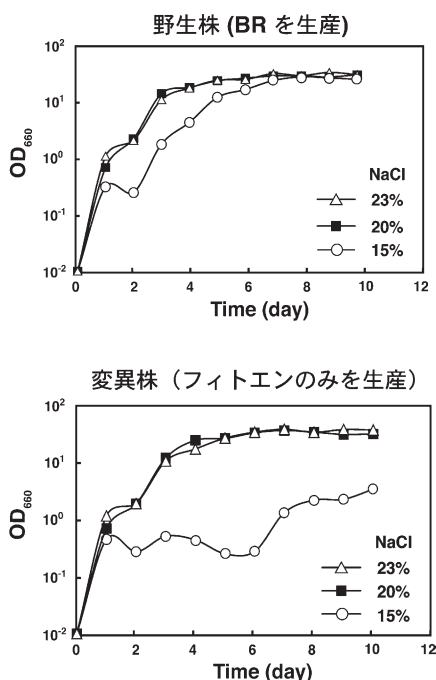


図3. *Ha. japonica*野生株および破壊株の増殖曲線