論文内容の要旨

申請者氏名 浮辺 健

赤色カロテノイドの一種アスタキサンチン (AX; 3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) は高い抗酸化能を有し、細胞保護、免疫賦活、抗癌作用などの生理機能が注目されており、健康食品や機能性食品、化粧品などへの応用に伴い、生物由来の AX に対する需要が増している。担子菌 *Xanthophyllomyces dendrorhous* は AX を細胞内に蓄積する酵母であるが、AX を産生する他の生物に比べて蓄積量が少ない。しかしながら、培養時間が短く、日照や照光も不要であるため、低コストで AX を生産できる可能性があり、培養条件の検討や突然変異による高生産株の作出が行なわれてきた。

申請者はまず、AX 高生産変異株の効率的選抜を目的にフローサイトメトリー (FCM) を用いる方法を検討した。AX の蛍光スペクトルにおける極大値は 570 nm 付近にあった。一方、AX 合成阻害剤を添加した野生株あるいは種々の変異株を培養し、AX 生成量を変化させた細胞を FCM で分析すると、蛍光強度との相関は 570 nm 付近よりも 675 nm 付近で高く、それぞれ $R^2 = 0.92$ 、 0.97 であった。実際のスクリーニングを想定し、野生株に薬剤処理により突然変異を導入後、675 nm 付近で強く蛍光を発する細胞を FCM により回収し、平板培地に塗布した。7 日間培養後、強い赤色を示すコロニーを分離すると、野生株の 1.5 倍以上の AX を生産する変異株が 0.33% の効率で取得でき、FCM で濃縮しなかった場合 (0.06%) に比べて約 5 倍の効率で高生産株が得られた。

次に、変異株の AX 高生産メカニズムを検討した。*X. dendrorhous* では、メバロン酸経路で合成されるイソペンテニルピロリン酸が各酵素 (Idi, CrtE, CrtYB) により重合し、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を経てフィトエンに変換後、CrtI 酵素により不飽和化されリコペンになる。リコペンは CrtYB 酵素の環化反応により β -カロテンに、CrtS 酵素により最終的に AX に変換される (ヒドロキシ化、ケト化)。各酵素の遺伝子配列は野生株と高生産株で完全に一致していたが、リアルタイム PCR を用いた解析から、*crtS* の転写量が培養後期の野生株では減少し、高生産株では維持されていたため、転写制御機構の存在が示唆された。これまでに one-hybrid 法により転写因子の候補として 2 種類の open reading frame を得ており、詳細な解析を行なう予定である。

さらに、GGPP を合成する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主として、AX 高生産株の分子育種を試みた。まず、*X. dendrorhous* 由来 CrtI, CrtYB, CrtS の各 cDNA 発現プラスミドを作製し、*S. cerevisiae* に導入すると中間体 β -カロテンを蓄積した。しかしながら、シトクロム P450 酵素と予想される CrtS が機能していない可能性が考えられたため、*X. dendrorhous* 由来 P450 還元酵素 CrtR の cDNA を *S. cerevisiae* に導入したところ、CrtS を異種生物で機能させた初めての例として、微量ながら AX が検出された。また、P450 とは異なる経路である細菌由来の β -カロテンケトラーゼ遺伝子 (*crtW*) とヒドロキシラーゼ遺伝子 (*crtZ*) を導入すると、中間体 (カンタキサンチン、ゼアキサンチンなど) と共に AX が蓄積され、野生株に比べて H_2O_2 に対する耐性の向上も確認できた。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 浮辺 健

アスタキサンチン (AX) は主に養殖魚の体色改良剤として使用されてきたが、近年高い抗酸化能が注目され、健康食品や機能性食品、化粧品などへの応用が進んできた。現在、AX は主に化学合成品が市販されているが、新たな用途向けに生物由来品の需要が増している。生物由来の供給源である単細胞緑藻は、AX 蓄積量が多いものの光源が必要であり生産コストが高い。一方、担子菌酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* は AX 蓄積量が少なく、産業利用はほとんど進んでいないが、培養時間が短く、既存設備で培養できるため、生産条件の検討や高蓄積変異株の分離などの研究が行われてきた。

申請者は AX 高生産菌の育種を目的に、まず *X. dendrorhous* から変異株を効率的に選抜する方法の開発に取り組んだ。フローサイトメトリー (FCM) による単細胞解析を試みたところ、AX に特異的な自家蛍光を指標とする測定が不調であったため、測定に影響を及ぼす因子を詳細に解析した。その結果、FCM の高感度性に注目し、夾雑する他のカロテノイドとの差が現われる蛍光波長 (675 nm) において AX の微弱なシグナルを測定し、両者を区別することに成功した。また、実際のスクリーニングを想定した実験により、変異処理後の細胞から高効率で高生産株を分離できた。現在の生産菌は変異処理の繰り返しにより親株の 10 倍程度の AX を蓄積しているが、本法では一度の変異処理で親株の約 4 倍もの AX を蓄積する変異株が得られ、有効性が実証できた。

次に、取得した *X. dendrorhous* 変異株を用いて AX 高生産メカニズムの解明を試み、生合成の最終酵素遺伝子 *crtS* が転写制御を受けている可能性を見出した。また、分子生物学知見が蓄積され、遺伝子操作技術も確立されている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、AX の生合成機構の解析と生産株の分子育種を試みた。生合成系の上流を強化した *S. cerevisiae* に *X. dendrorhous* 由来遺伝子を導入すると、 β -カロテンを著量生産したが、*crtS* を導入しても AX は検出されなかった。*CrtS* はシトクロム P450 酵素であるため、P450 還元酵素の共発現が必要であると考え、*X. dendrorhous* 由来の同酵素遺伝子 *crtR* を導入したところ、AX の蓄積が認められ、*CrtS* の異種生物での機能化および *S. cerevisiae* での AX 生産の両方に世界に先駆けて成功した。また、P450 とは異なる経路の細菌由来の酵素遺伝子の導入によっても、代謝中間体や AX を蓄積し、酸化ストレス耐性の向上が認められ、AX 高生産株の分子育種の第一歩を踏み出すに至った。

以上のように、本論文は FCM を利用して AX 高生産株を効率的に選抜する新しい手法を確立し、FCM においては特異蛍光以外にも重要なパラメーターの存在を示した。また、分子生物学的手法により *S. cerevisiae* 細胞内で *X. dendrorhous* や細菌由来の酵素を機能させ、AX の蓄積に初めて成功し、酸化ストレス耐性の向上にも繋がる知見を得たものであり、学術上、応用上、貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。