

赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* における
アスタキサンチン高生産変異株の効率的スクリーニング法の開発と
高生産機構の解析

浮辺 健

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞機能学講座
(高木 博史 教授)

平成 21 年 1 月 26 日提出

目次

序論	3
第1章 フローサイトメーターを用いた <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> アスタキサンチン高生産株の効率的スクリーニング法の開発	
1-1. 緒言	11
1-2. 材料と方法	12
1-3. 結果	15
1-4. 考察	17
第2章 <i>X. dendrorhous</i> アスタキサンチン高生産変異株における 高生産機構の解明と <i>S. cerevisiae</i> への アスタキサンチン生合成遺伝子の導入	
2-1. 緒言	36
2-2. 材料と方法	38
2-3. 結果	45
2-4. 考察	51
総括	84
謝辞	85
参考文献	86
報文目録	95

序論

炭素数 40 の炭化水素を基本骨格とするカロテノイド類は、細菌、植物、動物を問わず様々な生物に広く分布している。カロテノイド類の特徴の一つはその色であり、花や果実、鳥類の羽、昆虫や爬虫類の体色など、様々なものに鮮やかな色を与え、視覚的に対象を惹きつける、あるいは遠ざける役割を果たしている。例えば、その皮膚にテトロドトキシンを持つことで知られるアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の腹側の赤色は警告色と言われ、自身が危険な存在であることを周囲に示し、捕食の危険度を下げる為のものであると言われていたが、その色はβ-カロテン、カンタキサンチン (Fig. 1) など 6 種類のカロテノイドの蓄積によるものであることが知られている (Matui *et al.*, 2002)。また、キンカチョウ (*Taeniopygia guttata*) のオスにルテインとゼアキサンチンを与えると、嘴の色が赤みを帯び、メスにより好まれるようになったとの報告がある (Blount *et al.*, 2003)。また、カロテノイド類は色素として働くだけでなく、植物、藻類、一部の細菌などの光合成を行う生物においては、タンパク質と複合体を形成することで、光エネルギーを吸収し、クロロフィルに励起エネルギーを渡す光捕集色素として働いたり、過剰な光によって引き起こされる障害を防ぐ光障害防御剤として機能していることが知られており、カロテノイドを欠く光合成細菌や植物の変異体は弱い光条件でのみ生育が可能であるとの報告もある (Niyogi *et al.*, 1997)。カロテノイドによる生体防御機構は光合成や呼吸などの反応によって生じる活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) の除去によると考えられており、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、ヒドロキシルラジカル (OH^\bullet)、ペルオキシラジカル (ROO^\bullet) を消去することが知られている (Kobayashi & Sakamoto., 1999; Kobayashi, 2000)。またラジカルと不飽和脂肪酸の反応によって生じる過酸化脂質の生成も顕著に抑制する。その抗酸化機構については、一重項酸素の消去では、カロテノイドが一重項酸素からエネルギーを受けとり三重項励起状態となり、振動緩和 (熱失活)によりそのエネルギーを消費すると考えられている。また分子中央に存在する共役二重結合鎖が長いほど一重項酸素消去能が高いことが報告されている (Miki, 1991)。ペルオキシラジカルなどとの反応では、電子授与 ($\text{CAR} + \text{ROO}^\bullet \rightarrow \text{CAR}^{\bullet+} + \text{ROO}^-$)、水素原子授与 ($\text{CAR} + \text{ROO}^\bullet \rightarrow \text{CAR}^\bullet + \text{ROOH}$)、ラジカルとカロテノイドの結合 ($\text{CAR} + \text{ROO}^\bullet \rightarrow \text{ROOCAR}^\bullet$) の3つの反応が想定されているが、どの反応を行うかはそのカロテノイドの構造、反応を行う場の極性、ラジカルの反応性などにより異なると考えられている (El-Agamey *et al.*, 2004)。一方、動物はフィトエン合成酵素を持たないためにカロテノイドを合成することはできないが、植物などから摂取したカロテノイド

を代謝し、蓄積することが知られている。フラミンゴの羽、サケ、甲殻類の体色などは食物から吸収したカロテノイドを変換、蓄積したものであり、これらの生物をその体色を保って飼育、養殖する為にはその餌としてカロテノイドを与えることが重要となる。また、 β -カロテンは動物体内で β -カロテンジオキシゲナーゼにより開裂を受けてレチナールとなり、さらにレチノール (ビタミン A) へと還元される。このビタミン A の欠乏症として、夜盲症、皮膚の角化、粘膜異常、睾丸萎縮、子宮粘膜角化などが知られており、動物の成長や繁殖に必要な要素であることがわかる。さらに、動物体内においてもカロテノイドは ROS の除去に働いている。ROS はタンパク質、糖、脂質、核酸と反応して生体膜や血管壁などへ損傷を与え、これらのことが老化、動脈硬化、癌などの疾病の大きな要因になると考えられており、これらの疾病への予防効果を計る目的として、疫学的解析や投与実験が行われ、一定の効果が得られている (高市ら、2006; Semba *et al.*, 2007)。

これらの理由から、カロテノイド類は家畜飼料、養殖魚の色揚げ剤、健康食品などに幅広く利用されており、様々な産業において有用な物質となっている。

アスタキサンチン (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) は赤色のカロテノイドの一種で、主としてサケやマス、マダイなどを養殖する際の色揚げ剤 (体色改良剤) として用いられており、年間 1 億 US ドルを超える非常に大きな市場を形成しているが、近年、魚食の世界規模での広まりに伴い、その需要はさらに増大している (Johnson, 2003; Fujii *et al.*, 2006)。一方で、アスタキサンチンは β -カロテンや α -トコフェロールなどのカロテノイド類の中でも特に優れた抗酸化作用を持つことでも注目されており (Palozza & Krinsky, 1992; Kobayashi & Sakamoto, 1999)、免疫賦活化作用、抗癌作用などの生理機能を持つとの報告もされている (Miki, 1991; Hussein *et al.*, 2006)。 β -カロテンやリコペンはその疎水度が高いため、リン脂質膜内でのみ働くと考えられているが、アスタキサンチンやゼアキサンチンなどのキサントフィルはその末端のヒドロキシル基のために末端が膜表面に存在する形で膜内に存在し、膜表面で発生する ROS の除去にも働き、またヒドロキシル基からの水素原子授与が行えるためラジカル消去能が高いと考えられている (Naguib, 2000; Goto *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2001)。これらのことから、現在、アスタキサンチンはサプリメントなどの健康食品や機能性食品、化粧品などへの応用も進められており、さらにその市場を拡大しつつある。

現在、市場に流通しているアスタキサンチンのほとんどが化学合成品であるが、その価格は 1 kg あたり 2,500 US ドル以上と非常に高価である (Fujii *et al.*, 2006)。海洋性細菌、単細胞緑藻、赤色酵母などから得られた生物由来のアスタ

キササンチンも、健康食品や化粧品などを中心として使用されてきており (Higuera-ciapara *et al.*, 2006; Bjerkeneg *et al.*, 2007)、特に人が摂取するものについて需要が高いが、化学合成品と比較してさらに高価な為、利用範囲が広がっていない。これらのことから生物由来アスタキササンチンの大量生産、そしてコストダウンが期待されている。

赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* (旧名、*Phaffia rhodozyma* : 完全世代が判明したことによる改名、Golubev, 1995) は 1960 年代に Phaff らによって日本やアラスカの高山地帯の木の樹液から単離された担子菌酵母で (Johnson, 2003)、アスタキササンチンを蓄積する唯一の酵母として知られているが、その蓄積量は他のアスタキササンチン生産生物と比較して少なく、このことが商業的応用の妨げになっている。しかし、現時点で生物由来アスタキササンチンの主な供給源となっている単細胞緑藻などと比較して、培養にかかる時間が短く、様々な炭素源を利用でき、また、日射や照明の光源などの特別な設備も必要としないため、高密度培養に適し、低コストで培養できるという大きな利点を有している。そのため、*X. dendrorhous* のアスタキササンチン蓄積量を増やすことを目的として、培養条件の検討、突然変異による高蓄積株の分離など、様々な研究が行なわれてきた (An *et al.*, 1991; Chumpolkulwong *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2004)。本論文の第 1 章では、食品、化粧品業界での応用を視野に入れ、遺伝子組換えなど分子生物学的手法を用いずに、*X. dendrorhous* のアスタキササンチン高生産株を高効率で取得する方法として開発した、フローサイトメーターを利用したスクリーニング法について述べる。

一方、近年になり *X. dendrorhous* のアスタキササンチン生合成経路に関わる酵素の遺伝子がクローニングされ、経路の全体像も明らかになりつつある (Fig. 2)。*X. dendrorhous* のアスタキササンチン生合成経路では、アセチル CoA を出発物質として、メバロン酸経路を通して生成したイソペンテニルピロリン酸 (IPP) から Idi (IPP イソメラーゼ) の作用により、その異性体であるジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) が生成する。DMAPP に IPP が重合していくことにより、ゲラニルピロリン酸 (GPP)、ファルネシルピロリン酸 (FPP) となり、CrtE の作用によりさらに IPP が加わってゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) が合成される。GGPP は CrtYB のフィトエン合成活性によりその 2 分子が重合してフィトエンに変換され (Verdoes *et al.*, 1999a)、フィトエンは不飽和化反応を触媒する CrtI により 4 つの二重結合を挿入されリコペンへと変換される (Verdoes *et al.*, 1999b)。リコペンは CrtYB が触媒するもう一つの反応である環化反応により両末端が環化されて β -カロテンになり、最終的にヒドロキシル化/ケト化酵素である CrtS により、 β -カロテンの両末端の環構造にヒドロキシル基とケト基が導入

され、アスタキサンチンが生合成される (Ojima *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2006)。また、生合成経路の中でフィトエンからリコペンに変換される際の、共役二重結合の増加により、カロテノイドの吸収波長は徐々に長波長側へシフトし、450–490 nm 付近に吸光をもつようになる (Akimoto *et al.*, 2000)。このことによりカロテノイドはその特有の色を呈するようになるのである。

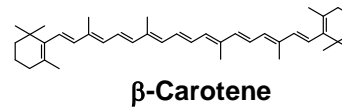
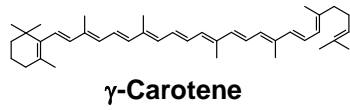
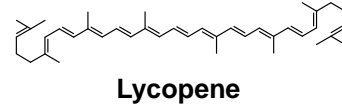
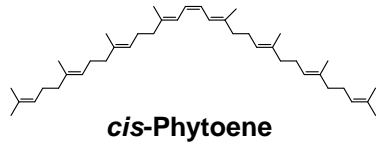
アスタキサンチン生産細菌 *Paracoccus* sp. N81106 (旧名、*Agrobacterium aurantiacum*) の生合成経路と比較すると (Fig. 3) (Misawa *et al.*, 1995)、細菌が GGPP 以降アスタキサンチンまでの反応に 5 つの遺伝子 (*crtI*, *crtY*, *crtB*, *crtW*, *crtZ*) を必要とするのに対して、*X. dendrorhous* のアスタキサンチン生合成経路では 3 つの遺伝子 (*crtI*, *crtYB*, *crtS*) しか必要としない。また、それぞれの反応を触媒する酵素の一次構造における相同性が低いことから、*X. dendrorhous* と細菌のアスタキサンチン生合成経路は別起源から進化したのではないかと考えられる。細菌の生合成経路では β -カロテンからアスタキサンチンへの変換は CrtZ、CrtW の 2 つの酵素によって触媒され、経路上には多くの代謝中間体が確認されるが、*X. dendrorhous* の生合成経路ではこの反応は 1 つの酵素 CrtS によって触媒され、これらの代謝中間体をほとんど蓄積しない。蓄積された代謝中間体や精製酵素を用いた実験から細菌の CrtZ、CrtW は基質特異性の低い酵素であり、これらほぼすべての中間体を基質とできることが分かっているが (Fraser *et al.*, 1998)、*X. dendrorhous* の CrtS に関しては欠失させるとアスタキサンチンを合成できなくなることは確認されているものの、異種生物での発現によるアスタキサンチンの生産や酵素の精製に成功していないため、どのような代謝中間を通してアスタキサンチンを合成するのかは分かっておらず、従って、上記二つの反応を触媒する確証はない (Papp *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2008)。

このような、アスタキサンチン生産生物を改良することで高生産を目指す研究の一方で、これらカロテノイド生合成遺伝子を大腸菌などの異種の生物に導入し、カロテノイドの大量生産を目指す (Misawa & Shimada, 1998)、または β -カロテンを蓄積するゴールドンライスのように、その生物自体の付加価値を高めるとい研究も行われている (Ye *et al.*, 2000)。さらに、カロテノイドを蓄積させた結果、その生物の酸化ストレス耐性が向上したという報告があることから、ストレス耐性生物の育種法としても利用できると考えられている (Tatsuzawa *et al.*, 2000; Jayaraj & Punja, 2008b)。

本論文の第 2 章においては、これまでに突然変異処理により得られている *X. dendrorhous* アスタキサンチン高生産株を分子生物学的に解析し、高生産変異株が獲得した高生産機構の解明を目指した。また、ゲノム情報や遺伝学的、分子生物学的知見が蓄積され、遺伝子操作技術も確立されている、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に *X. dendrorhous*、もしくは細菌のアスタキサンチン生

合成遺伝子を導入することにより、アスタキサンチン生産株の分子育種、合成反応の解析を試み、得られた形質転換体のカロテノイド生産性及びストレス耐性を評価した。

Carotenoids



Xanthophylls

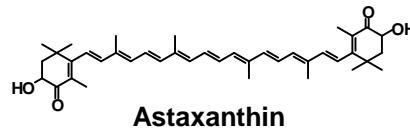
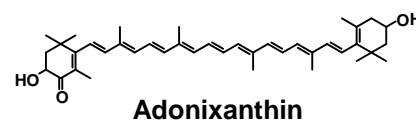
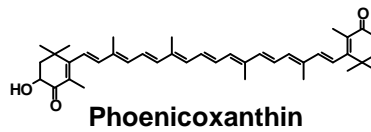
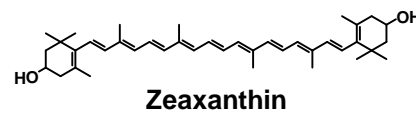
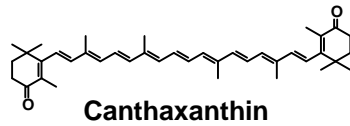
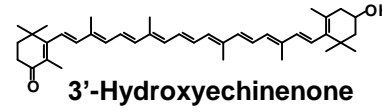
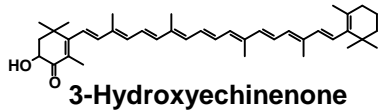
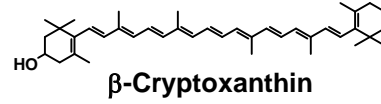
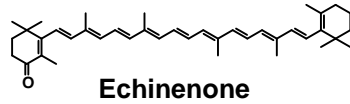


Fig. 1. Structure of carotenoids mentioned in this thesis.

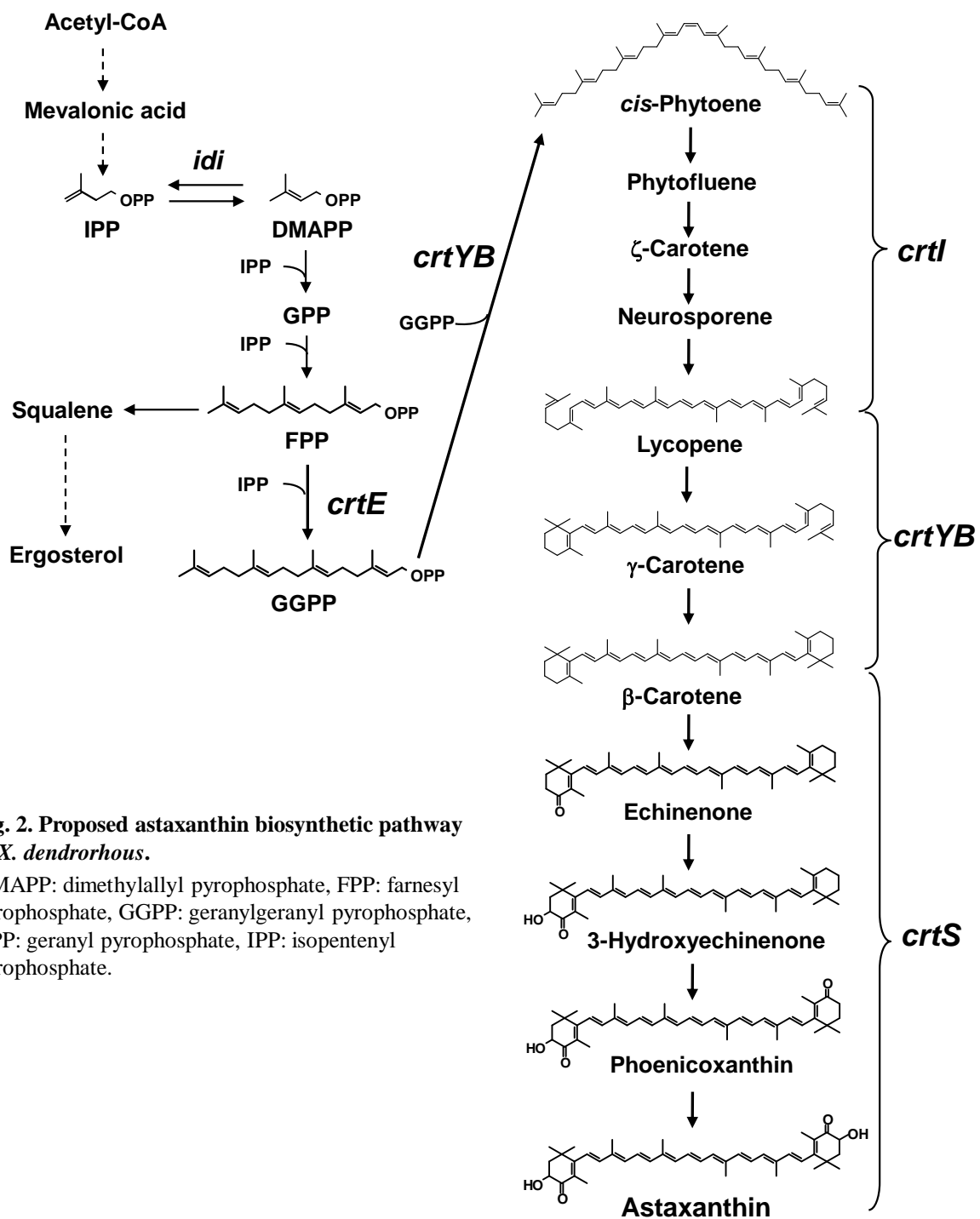


Fig. 2. Proposed astaxanthin biosynthetic pathway in *X. dendrorhous*.

DMAPP: dimethylallyl pyrophosphate, FPP: farnesyl pyrophosphate, GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate, GPP: geranyl pyrophosphate, IPP: isopentenyl pyrophosphate.

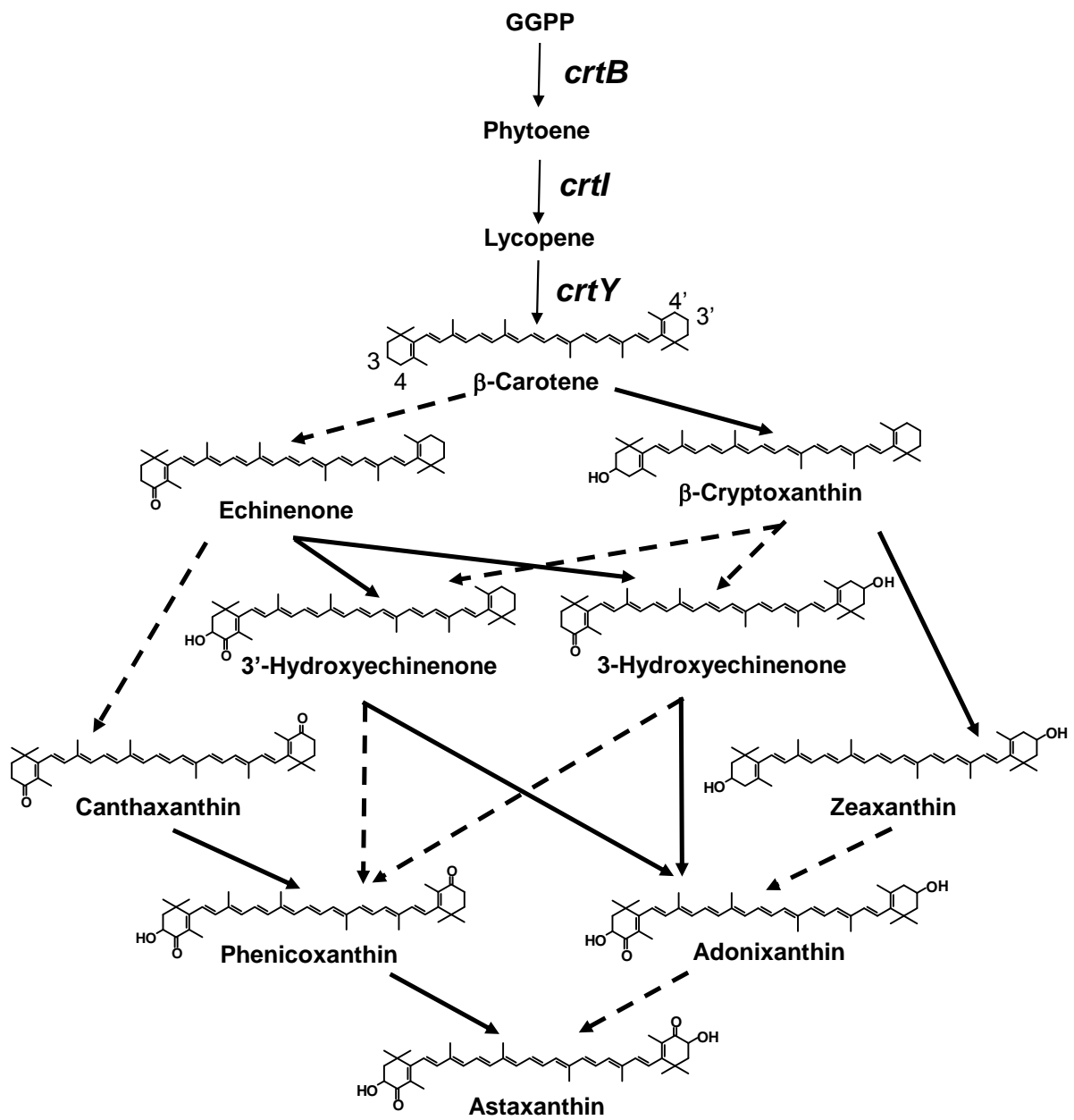


Fig. 3. Astaxanthin biosynthetic pathway in *Paracoccus* sp.

—> ; the reaction catalyzed by translated product of *crtZ*,

- -> ; the reaction catalyzed by translated product of *crtW*.

第 1 章

フローサイトメーターを用いた *Xanthophyllomyces dendrorhous* アスタキサンチン高生産株の効率的スクリーニング法の開発

1-1. 緒言

序論でも述べたとおり、*X. dendrorhous* の最大の欠点はアスタキサンチン蓄積量が少ないことである。そのため、現在までに *X. dendrorhous* のアスタキサンチン蓄積量を向上させることを目的として、培養条件の検討に加え、ニトロソグアニジン、UV、ガンマ線などの変異原を用いた高生産株の取得が、多くの研究者により試みられてきた。しかし、従来用いられてきたアスタキサンチン高生産株のスクリーニング法では、コロニーの色の目視による確認と手動での移植が主な選別手段であり、 β -ヨノンやジフェニルアミンなどのカロテノイド合成阻害剤を用いて高生産株を見分けやすくするなどの工夫も行われたが (Lewis *et al.*, 1990; Chumpolkulwong *et al.*, 1997)、未だに非常に多くの時間と手間を必要としていた。このような従来からの方法に代わる、より高効率な分離法として、フローサイトメーターを用いるスクリーニング法が検討された (An *et al.*, 1991)。しかし、この論文では目的物質はアスタキサンチンではなく、総カロテノイドであり、アスタキサンチンの量など、個々のカロテノイドについての解析はなされていなかった。また、一応は高生産株を取得できたものの、その総カロテノイド蓄積量は最大でも親株の 1.2 倍程度と少量であった。

フローサイトメーターは細胞の特性を散乱光と蛍光のパラメーターを用いて 1 細胞単位で迅速かつ正確に分析できる装置であり、1 秒間に数千から数万の細胞を分析でき、さらにその分析とほぼ同時に任意の細胞集団を分取することも可能な優れた装置である (分取機構を持つフローサイトメーターを特にセルソーターと呼ぶ)。細胞を懸濁したサンプル液は共に流れるシース液の中を次々に石英製のフローセルへ通され、そこで励起光となるレーザーを照射される。このとき発生した散乱光と蛍光を検出器で捉え、コンピューターによってヒストグラムやサイトグラムを作製する (Fig. 4a)。分取を行う際にはフローセルから噴出するサンプルを含むシース流が途中から液滴になるように、振動子を用いてフローセルを上下に振動させる。レーザー光照射部で検出された細胞について、分取条件に基づいて、「分取する細胞かどうか」が瞬時に判別される。そしてその細胞を含むシース液が液滴になる直前に、シース流全体を正または負に荷電し、その時に液滴になった液滴はシース流から離れても電荷を持ち続ける。その後、液滴は ± 6000 V の 2 枚の偏向板の間を落下し、正に荷電した液滴は陰極

側に、負に荷電した液滴は陽極側に引かれ、左右の試験管内へ飛んで補集される。荷電していない液滴は、垂直に落下し、廃棄される (Fig. 4b)。フローサイトメーターは主として医療分野における細胞の診断などに使われてきたが、細胞周期、細胞内カルシウム濃度の解析、アポトーシス、生死の判定などを目的として基礎生物学分野への応用も進んでいる (Riseberg *et al.*, 2001; Ibrahim & van den Engh, 2007)。

実際のフローサイトメーターを利用したスクリーニングの例としては、酵母細胞の出芽痕に存在するキチンに、蛍光ラベルした小麦胚芽アグルチニンを結合させることで、多数回出芽した高齢の細胞を選抜するなど、細胞表面をラベルしたものや (Chen & Contreras, 2007)、蛍光ラベルされたリガンドを用いて、そのレセプターを発現している細胞をライブラリーの中から分取するなどがあり (Chen *et al.*, 2001)、分子生物学的解析にも利用されるようになっている。しかし、生分解性プラスチックの素材として研究されているポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) の例を除き (Srienc *et al.*, 1984; Kacmar *et al.*, 2005)、今回目的としているアスタキサンチンのような二次代謝産物の高生産株をスクリーニングした報告はない。

フローサイトメーターで分析できるのは主に散乱光と蛍光である。そのためスクリーニングの指標としてそのどちらか、または両方を使わなければならないことになる。前述の PHB 高生産株の分離では、PHB を脂質を染める蛍光試薬 Nile red、Nile blue、BODIPY 493/503 などでも染色し、その蛍光を指標としていた。しかし、*X. dendrorhous* 内のアスタキサンチンは脂質に溶解しているわけではなく、蛍光試薬による直接ラベル、あるいは交代の利用は困難である。このような状況から蛍光試薬などと比較し非常に微弱なシグナルではあるが、アスタキサンチンの自家蛍光を指標とし、スクリーニングを行うことにした。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 菌株と培養方法

Xanthophyllomyces dendrorhous Y989、Y2238、Y2238-10IL、Y2342 株は味の素 (株) から譲り受けた。*X. dendrorhous* ATCC24202、66272 株は American Type Culture Collection (Rockville, MD) から購入した。黄色変異株の Y9Y 株、白色変異株の Y9W 株は Y989 株を 0.004% のニトロソグアニジン (東京化学工業社) で処理することにより得た (データ示さず)。

すべての *X. dendrorhous* 株の培養には YMG 培地 (0.3% 酵母エキス、0.3% 麦芽エキス、0.5% ペプトン (Bacto; 日本ベクトン・ディッキンソン社)、2% グル

コース、pH 6.0 に調整) を用いた。以降、特別に記述のない限り 100 ml の三角フラスコに YMG 培地 20 ml を入れ、18°C、150 rpm で振とう培養を行った。固体培養を行う際には YMG 培地に 2% の寒天を加えて使用した。菌の増殖は濁度 (OD₆₆₀) と、トーマ氏血球計算盤を用いた直接計測法により観測した。乾燥菌体重量は凍結乾燥させた菌培養液 2 ml の重量を計測することにより決定し、この重量と直接計測法により得られた菌体数から 1 菌体あたりの重量を計算した。

1-2-2. フローサイトメトリー

X. dendrorhous のサイトメトリー分析と分取には Coulter flow cytometer (Epics Elite ESP; ベックマンコールター社) を用い、励起用レーザーとして 488 nm アルゴンイオンレーザーを、フローセルは内径 60 µm のものを用いた。分析の前には菌体を 10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) で 2 回洗浄し、40-µm ナイロンメッシュを通して夾雑物、凝集塊を取り除いた。前方散乱光 (FS)、側方散乱光 (SS)、そして 4 チャンネルの蛍光強度 (FL525; 490–550 nm、FL575; 570–580 nm、FL610; 600–620 nm、FL675; 665–685 nm) はすべて同時に測定した。光電子増倍管にかける電圧とゲインは分析の都度、最適化した。光軸、感度の調整には蛍光ビーズ (Epics DNA-Check, ベックマンコールター社) を利用した。得られたデータの解析には Expo-32 (ベックマンコールター社) と WinMDI (<http://facs.scripps.edu/software.html>) を用いた。

菌体の分取はフローサイトメーターのマニュアルに従って行い、“ディレイ” (分取を行う際にデータ取得後何ミリ秒後に電荷をかけるかという値) は分取を行う際、その都度蛍光ビーズを用いて計算した。選り分けられた菌体は滅菌済みの YMG 培地が入ったガラス試験管に回収した。

1-2-3. カロテノイドの分析

X. dendrorhous 培養液を遠心分離 (800 × g、2 分間) にかけて、回収された菌体を脱イオン水で 2 回洗浄し、Lymph-Lock12 Vacuum Freeze Drier (ラブコンコ社, Kansas, MO) を用いて凍結乾燥した。乾燥菌体の一定量を 2-ml プラスチックチューブ (安井器械社) にとり、0.75-ml 容の 2 mm ガラスビーズ、約 1.5 ml の 90% アセトンを加え、冷却機付きガラスビーズミル (マルチビーズショッカー; 安井器械社) を用いて菌体を破砕した (2,700 rpm、ON/OFF = 40/20 秒、30 サイクル)。目の細かいざるに通しガラスビーズを取り除いた懸濁液を 15 ml のプラスチックチューブに回収し、4 ml の 90% アセトンを加え、激しく攪拌した後、4°C で 1 時間静置した。懸濁液を遠心分離 (2,000 × g、10 分間) し、菌体残渣を沈殿させ、上清をカロテノイド抽出液として回収した。この後さらに菌体残

渣に 4 ml の 90% アセトンを加え、もう 1 度抽出操作を繰り返した。抽出液を合わせ、90% アセトンを用いて 10 ml にメスアップし、その内の 4 ml をガラス試験管に移し、遠心エバポレーター (CVE-100D; 東京理化工機社) を用いてアセトンを蒸発させた後、1 ml の 90% アセトンを加え、暗所に 12 時間静置した。このようにして得た抽出液を 0.20- μm Millex-LG Microfilter (日本ミリポア社) に通し、その内の 30 μl を HPLC 分析に用いた。

HPLC システムとして D-7000 HPLC システム (日立ハイテクノロジーズ社) を用い、固定相としては SP-120-5-ODS-AP (ダイソー社) を用いた。分離条件は Yokoyama & Miki (1995) の方法を改変して用いた。すなわち、流速を 1 ml/min とし、[1] 0–17 分：溶離液 A (H_2O /メタノール、容積比 5 : 95) 100% から溶離液 B (テトラヒドロフラン/アセトニトリル、容積比 3 : 7) 100% へのリニアグラジエント、[2] 17–22 分：溶離液 B 100%、[3] 22~30 分：溶離液 A 100% という分離条件である。カロテノイドの検出は PD-90 Photodiode-Array Detector (昭和電工社) を用い 200–750 nm の波長で行った。ピークの同定、定量はアスタキサンチン標品 (シグマアルドリッチジャパン社)、 β -カロテン標品 (関東化学社) との比較により行った。

1-2-4. 突然変異処理

2 日間培養した Y989 株 ($\text{OD}_{660} = 20\text{--}25$) 4 ml を遠心分離 (800 \times g、2 分間) により回収し、4 ml の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄した。菌体を 3% メタンスルホン酸エチル (シグマアルドリッチ社)、2% グルコースを含むリン酸カリウム緩衝液 4 ml に懸濁し、18°C で 2 時間緩やかに攪拌した。その後、4 ml のろ過滅菌した 10% チオ硫酸ナトリウム溶液を加えメタンスルホン酸エチルを中和した。遠心分離により菌体を回収し、10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) で洗浄した後、4 ml の同緩衝生理食塩水に懸濁した。

1-2-5. アスタキサンチン高生産変異株の選抜

従来からのスクリーニング法では変異処理した菌体を YMG プレート培地に植菌し、7 日間培養後、コロニーの数と色を目視で観察した。野生株と異なる色を持つコロニーを選抜し、YMG 液体培地に植菌し、5 日間培養後に回収して、HPLC を用いてカロテノイドの分析を行った。

本研究で開発したスクリーニング法では変異処理した菌体を YMG 液体培地に植菌し、2 日間培養 (細胞のアスタキサンチン含量を検出可能な量まで増やすために必要) した後に回収してフローサイトメーターで分析した。675 nm 付近の蛍光を強く放つ菌体をアスタキサンチン高生産株の候補として選抜し (一次スクリーニング)、YMG プレート培地に植菌した。以降は従来法と同様に、

7 日間培養後、野生株と異なる色を持つコロニーを選抜し 二次スクリーニング)、HPLC による分析を行った。

1-3. 結果

1-3-1. アスタキサンチンの蛍光特性の分析

アスタキサンチンの自家蛍光をスクリーニングの指標とするため、アスタキサンチン標品を 90% アセトンに溶解し、分光蛍光光度計 (F-7000; 日立ハイテクノロジーズ社) を用いて 3 次元分析を行った。その結果、アスタキサンチン標品の最適励起波長と蛍光波長はそれぞれ 350 nm と 570 nm であった (Fig. 5a, b)。また、フローサイトメーターに標準的に装備されているアルゴンイオンレーザーの発振波長である 488 nm で励起した際にも 570 nm 付近に蛍光が観察された (Fig. 5c)。

1-3-2. 細胞内のアスタキサンチン量と蛍光強度の関係

細胞内アスタキサンチン量と細胞から発せられる蛍光の間の相関を調べるために、アスタキサンチン合成阻害剤であるジフェニルアミンを用いて、段階的にアスタキサンチン含量の異なる菌体を作製し、それらをフローサイトメーターで分析することにした。ジフェニルアミンはフィトエンから β -カロテンへの変換を阻害する物質で、結果として β -カロテンから作られるアスタキサンチンの量を減少させる (Chumpolkulwong *et al.*, 1997)。

X. dendrorhous Y2342 株を 0–50 μ M のジフェニルアミンを含む YMG 培地で 3 日間培養し、カロテノイド含量と蛍光強度をそれぞれ HPLC とフローサイトメーターで分析した。その結果、細胞あたりのアスタキサンチン含量と菌体の赤色の強さはジフェニルアミンの添加量に依存して減少した (Fig. 6)。これらの細胞をフローサイトメーターを用いて分析すると、アスタキサンチンの最適励起波長に近いと思われる 325 nm のレーザーを用いて分析した際には、どの波長の蛍光強度もアスタキサンチン含量との相関を示さなかったが (データ示さず)、488 nm のレーザーで励起した際には FL675 の強度がアスタキサンチン含量の減少に伴って減少していた (Fig. 7)。また、この範囲のジフェニルアミン量では生育 (OD_{660}) や FS (細胞の大きさを表す指標) に変化は見られなかった。分析した細胞 3 万個から各波長の蛍光強度の平均値を算出し、グラフを作成し分析したところ、各波長域の蛍光強度はジフェニルアミンの濃度依存的に減少し、アスタキサンチン含量と同様の変化を示していたが、FL525、FL575 の強度はジフェニルアミンを 20–30 μ M 加えた際に上昇しており、この変化は

β -カロテン含量の変化と同調しているように思われた (Fig. 8)。アスタキサンチン含量と各波長の蛍光強度との相関係数 R^2 を計算したところ、それぞれ 0.70 (FL525)、0.84 (FL575)、0.89 (FL610)、0.92 (FL675) となり、675 nm 付近の蛍光強度 (FL675) とアスタキサンチン含量の間で最も良い相関が見られた (Fig. 9)。

次に、より実際のスクリーニングに近い状況を模すため、突然変異処理などにより得られた、アスタキサンチン含量の異なる 8 株の *X. dendrorhous* 株を用いて、これらの株の間でも 675 nm 付近 (FL675) の蛍光強度とアスタキサンチン含量の間に良い相関が見られるかを検証した。*X. dendrorhous* Y9W、Y9Y、Y989、Y2238、Y2238-10IL、Y2342 株、そして ATCC24202、ATCC66272 株の 8 株を YMG 培地で 4 日間培養し、カロテノイド量と各波長の蛍光強度を測定した。これら 8 株の間ではアスタキサンチン含量以外にも増殖速度、細胞の大きさ、蓄積するカロテノイドの種類など様々な違いが観察された (Table 1、Fig. 10)。Y9W 株は色のあるカロテノイドを生産できず、Y9Y 株は主に β -カロテンを蓄積し、アスタキサンチンを蓄積しなかった。これらの変異株をフローサイトメーターで分析し、各波長の蛍光強度とアスタキサンチン含量の相関係数を計算すると FL610、FL675 の強度とアスタキサンチン含量の間でそれぞれ $R^2 = 0.972$ 、 0.973 の良い相関が見られた (Fig. 11)。また、Y9Y 株は β -カロテン (24.7 fg/cell) しか蓄積しないにも関わらず、525 nm 付近の波長 (FL525) において、21.2 fg/cell のアスタキサンチンを蓄積する Y2238 株よりも強い蛍光を発していた (Table 1)。しかしそれ以外の波長域 (FL575–FL675) では Y2238 株の方が強い蛍光を発していた。

1-3-3. フローサイトメーターを用いたアスタキサンチン高生産株の濃縮

実際に高生産株のスクリーニングを行う際に、サイトグラムの中のどの位置から分取を行えば効率的に高生産株を得られるかを検討するために、既知の野生株と高生産株の混合液をサンプルとし、その中から高生産株を濃縮する実験を行った。

4 日間培養した Y989 株 (野生株) と Y2342 株 (アスタキサンチン高生産株) をフローサイトメーターで分析し、サイトグラム上に、A: 野生株が最も多く存在する位置、B: 高生産株が最も多く存在する位置、C: 野生株がほとんど存在しない位置 (0.1%)、D: 野生株が存在しない位置、の 4 つのウィンドウを設定した (Fig. 12)。野生株と高生産株の 100:1 (細胞数比) の混合液をサンプルとし、これら A、B、C、D のウィンドウを用いて分取を行い、寒天培地上に現れたコロニーの数を計測したところ、C のウィンドウを用いた際にアスタキサンチン高生産株を約 9 倍まで濃縮できた一方、ウィンドウ D を用いた際には高生

産株を 1 細胞も得られなかった (Table 2)。

1-3-4. 従来のスクリーニング方法とフローサイトメーターを用いる方法の比較

上述した方法で Y989 株 (野生株) に変異処理を施し、2 日間培養後、従来法では 1.5×10^4 個の細胞をそのまま寒天培地上に撒いた。一方、フローサイトメーターを用いる方法では、まず変異処理を施していない Y989 株を分析し、この細胞を 0.1% 含むようにウィンドウ A を、対照用として最も細胞密度の高い所にウィンドウ B を作成した (Fig. 13)。次に変異処理を施した約 2×10^6 個の細胞を分析し、ウィンドウ A、B それぞれから 1.5×10^4 、 5.0×10^3 個の細胞を分取し、寒天培地上に撒いた。その結果、寒天培地上で親株よりも強い赤色を示したコロニーの数は、フローサイトメーター法 (ウィンドウ A)、(ウィンドウ B)、従来法でそれぞれ、59、10、18 個となった。これらの株をすべて HPLC で分析したところ、親株より 1.5 倍以上多くのアスタキサンチンを蓄積した株はそれぞれ 39、0、7 株であり、その寒天培地上に現れたコロニーの数に対する割合はそれぞれ 0.33、0、0.06% となり、フローサイトメーターを用いる方法では従来法と比較して約 5 倍の高い効率で高生産株が得られた (Table 3, Fig. 14a, b)。また、得られた高生産株の中では親株の約 1.5 から 2 倍量のアスタキサンチンを蓄積するものが最も多く、最も多くのアスタキサンチンを蓄積した株は、乾燥菌体重量 1 g 当たり、0.50 mg のアスタキサンチンを蓄積し、その量は親株 (0.13 mg/g 乾燥菌体重量) の約 3.8 倍であった。

1-4. 考察

1-4-1. 細胞内アスタキサンチン量と蛍光強度

分光蛍光光度計で測定したアスタキサンチンの最適励起波長は 360 nm であったにもかかわらず (Fig. 5a, b)、325 nm のレーザーを用いた時には蛍光強度と細胞内のアスタキサンチン量は相関を示さなかった。これは細胞内に存在する他の自家蛍光物質の影響と考えられた。細胞内には様々な自家蛍光物質が存在することが知られており、蛍光顕微鏡観察などを行う時には大きな障害となることがある。その中でも代表的なものは NADH とフラビントタンパク質であり、前者は 365 nm で励起され 450 nm の蛍光を、後者の構成成分であるフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) は 360 と 450 nm の 2 波長で励起され、520 nm の蛍光を発することが知られている (Andersson *et al.*, 1998)。

本研究ではアスタキサンチンの蛍光ピークは 570 nm 付近に観察された (Fig. 5a, b)。この結果は他の文献のデータとも矛盾しない (An *et al.*, 1991; Jørgensen

et al., 1992)。しかしながら、フローサイトメーターで細胞の蛍光を測定した際には 575 nm 付近の蛍光強度よりも 675 nm 付近の蛍光強度の方が細胞内アスタキサンチン量と良い相関を示した。この理由として考えられるのは、まず、細胞内のアスタキサンチンの状態による蛍光波長の変化である。一般的に物質の蛍光はその物質が溶解している溶媒によって変化することが知られており (Lakowicz, 2006)、今回の分光蛍光光度計を用いた実験ではアスタキサンチン標品の溶媒としてアセトンを使用していたが、*X. dendrorhous* 細胞内でアスタキサンチンがどのような状態で存在しているのかは分かっておらず、その違いにより蛍光ピークが長波長側にシフトした可能性も考えられる。また別の予想として、細胞内のアスタキサンチン量の増減と連動して変化する他の物質が発している蛍光を捉えたという可能性もある。しかし、私が最も可能性が高いと考えているのは、細胞内に存在するβ-カロテンが発する蛍光により 525、575 nm の蛍光強度とアスタキサンチン量との相関が下がり、結果として 675 nm 付近の蛍光強度が良い相関を示した、というものである。カロテノイド合成阻害剤を用いた実験の際にも FL525、575 の値はβ-カロテンの蓄積量に同調して上昇しており (Fig. 8)、またβ-カロテンのみを蓄積する Y9Y 株の FL525 の値は、ほぼ等量のアスタキサンチンを蓄積する Y2238 株よりも高かった (Table 1)。このことは分光蛍光光度計を用いてアスタキサンチンとβ-カロテン標品を分析した結果にも合致しており、β-カロテンは 525 nm 付近に蛍光ピークを持ち、その蛍光強度はアスタキサンチンよりもはるかに高いことがわかった。そして、600 nm 付近を境として、短波長側ではβ-カロテンの蛍光が、長波長側ではアスタキサンチンの蛍光が優位となっていた (Fig. 15)。これらのことから本来のアスタキサンチンの蛍光ピークである 570 nm 付近の蛍光強度を測定した際には、細胞内に存在するβ-カロテンが発する蛍光によりアスタキサンチン由来の蛍光が覆い隠されてしまい正確な量を測定できず、一方 675 nm 付近の蛍光強度を測定した際には、アスタキサンチンの蛍光ピークからは離れているものの、フローサイトメーターの蛍光検出感度が高いことと相まって、β-カロテンの影響を受けることなくサンプル間の相対量を測定できたと考えられる。私は以前フローサイトメーターを利用し単細胞緑藻 *Haematococcus pluvialis* のアスタキサンチン高生産株のスクリーニングを試みていた (浮辺、修士論文、奈良先端大、2003)。その際も 675 nm 付近の蛍光強度が細胞内のアスタキサンチン量と相関するということが示唆されていたが、緑藻の持つクロロフィルが 670 nm 付近に非常に強い蛍光を放つため、675 nm 付近の蛍光強度を指標にしてスクリーニングを行っても、高生産株の分離には成功しなかった。

本来フローサイトメーターを用いてスクリーニングを行う際には、目的物質を何らかの方法で蛍光染色することが通常であり、それは細胞から発せられる

自家蛍光の影響を覆い隠すためにも重要である。フローサイトメーターは光電子増倍管により非常に微弱な蛍光も検出することができるため、今回のようにそれを染める手段がない場合にはその物質の自家蛍光に頼るのも一つの考えであるが、その際には目的物質からの蛍光のみをとらえるための工夫が必要になるであろう。

1-4-1. 結果の比較とフローサイトメーターを用いたスクリーニング法の展望

本研究ではフローサイトメーターを利用することで、従来法の約 5 倍の効率でアスタキサンチン高生産株を分離することができ、さらに親株の約 3.8 倍のアスタキサンチンを蓄積する株を得られた。An らは 1991 年の論文で、実際に計測した数は示されていないが、ニトロソグアニジン処理により得られたカロテノイド高生産株は全体の 0.006% であり、一方、フローサイトメーターで 530 nm 付近の蛍光を強く発する細胞を分取したところ、分取した細胞の 56% が高生産株であり、結果として効率は 1 万倍高かったとしている。また得られた高生産株の中で最も多くカロテノイドを蓄積したものは親株 (1.5 mg/g) よりも 15% 多くのカロテノイド (1.76 mg/g) を蓄積したとしている。これを見ると、今回の方法と比較して非常に高い効率で高生産株を得られているように見えるが、これは何をもって高生産株と定義するかによって異なり、彼らの論文にはその基準は記されていない。しかし、最も良い高生産株が親株の 1.2 倍程度の量しかカロテノイドを蓄積していないところから、かなり少量の上昇でも高生産株としているようである。今回の実験では高生産株は親株よりも 1.5 倍以上多くのアスタキサンチンを蓄積する株と定義し、その上で従来法よりも 5 倍高い効率を得られた。このことから、今回の方法は、得られた高生産株の親株に対する蓄積量は言うまでもなく、変異処理自体の効率、そしてそのスクリーニング効率においても彼らの方法を超えられたと考えられる。

また、今回のスクリーニングにより得られた変異株のアスタキサンチン生産量の分布を見てみると、親株の 2 倍程度のアスタキサンチンを蓄積するものと 3 倍を超えるものとの間には変異株が存在しなかったことから (Fig. 14b)、これら 2 種類の変異株群に起きた変異は異なるメカニズムによるものである可能性も示唆され、*X. dendrorhous* のアスタキサンチン高生産機構を探る上で有用な素材となると考えられる。

しかし、今回の実験手法にはまだ改良の余地がある。まず、効率をさらに上げる手法の一つとしてソーティングに用いるウィンドウの最適化があげられる。今回の実験では 2 時間で 2×10^6 個の細胞の中から 1.5×10^4 個の細胞を分取したが、さらにウィンドウを最適化し、より狭いウィンドウでソーティングを行えば、高生産株の純度を上げられ、無駄に分取する細胞の数を減らし、次の段階

での手間を大きく減らすことができる。また、まず高速、低純度でのソーティングを行い高生産株をある程度濃縮し（一般的にサンプルの流速と、ソーティングの正確性は反比例する）、続いて濃縮されたサンプルをもう一度ソーティングすることにし、この時には低速で高純度のモードで操作すれば得られる高生産株の純度を上げられると予想されるが、これには一度レーザーによる励起を受けた細胞が次回も細胞内アスタキサンチン量に比例した量の蛍光を発するかという問題があり、検討が必要である。そして、さらなる高生産株を得るためには、得られた高生産株を親株として、これにさらに変異を導入し、同様のスクリーニングを行うことで次々に蓄積量が増大した株を得ることができると考えられる。

フローサイトメーターには、機器そのものが非常に高価であること、レーザーを使用するため装置自体が巨大であること、そのフロー系の複雑さから安定して使用するためには熟練したオペレーターが必要なことなどの欠点があり、一般的な装置とはなり得ていないが、近年になりその価格も比較的下がり、ダイオードレーザーを利用することによる小型化、さらにメンテナンスフリーのものも登場するなど、その汎用性が増している。その上でその測定感度、分析、分取の速度、正確性は向上しており、一度に5種類の細胞の分取が行えるもの、1細胞ずつ寒天培地や96穴プレートに分取できるものなども登場し、これらの装置を用いれば、プレートに塗布する手間も省け、さらに短時間で効率よくスクリーニングが行えるようになり、これからも動物、微生物細胞のスクリーニングに広く利用されていくと考えられる。

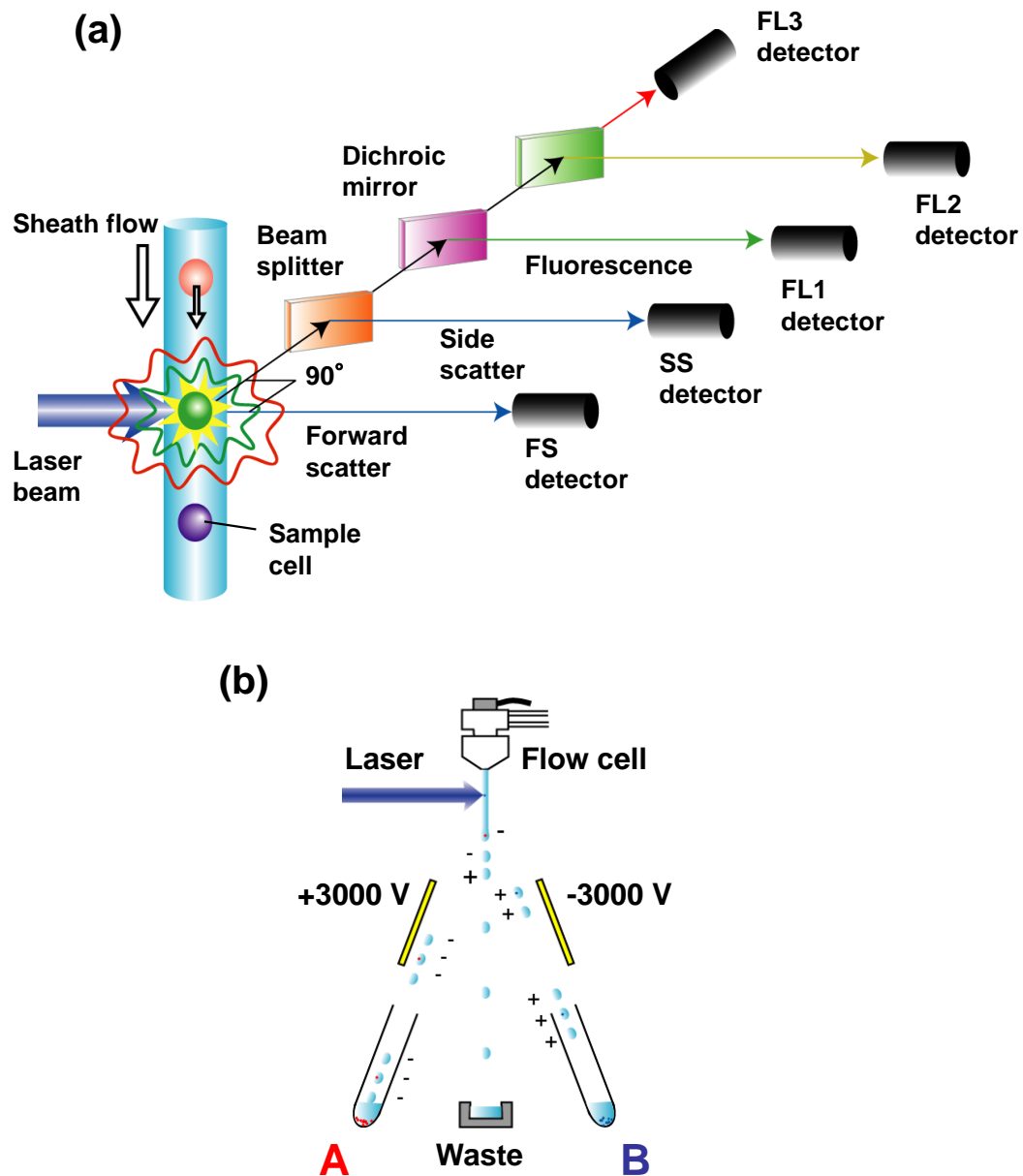


Fig. 4. Diagram of a flow cytometer.

(a) The cells are forced hydrodynamically to flow in the middle of the sheath stream, remaining there even after effluxion from the nozzle. When the cells illuminated with a laser, some of the light is scattered forward at a small angle out of the laser beam by each passing cell, and smaller amounts are scattered to the side, where fluorescent light detectors also are provided. Sets of signals are stored in a computer and the results are generally displayed on two-parameter cytograms. (b) The nozzle is vibrated axially to cause the stream to form tiny droplets. The cell concentration in the fluid must be adjusted so that almost all droplets contain either no cells or only one cell. The time between detection of a cell and its incorporation into a droplet is known in advance, and during the actual run, the computer causes such droplets to be charged electrostatically after their detection. The charge causes the droplet to be deflected through an electrostatic field established between two charged plates (some 3000 V across) so that it enters the appropriate collection tube.

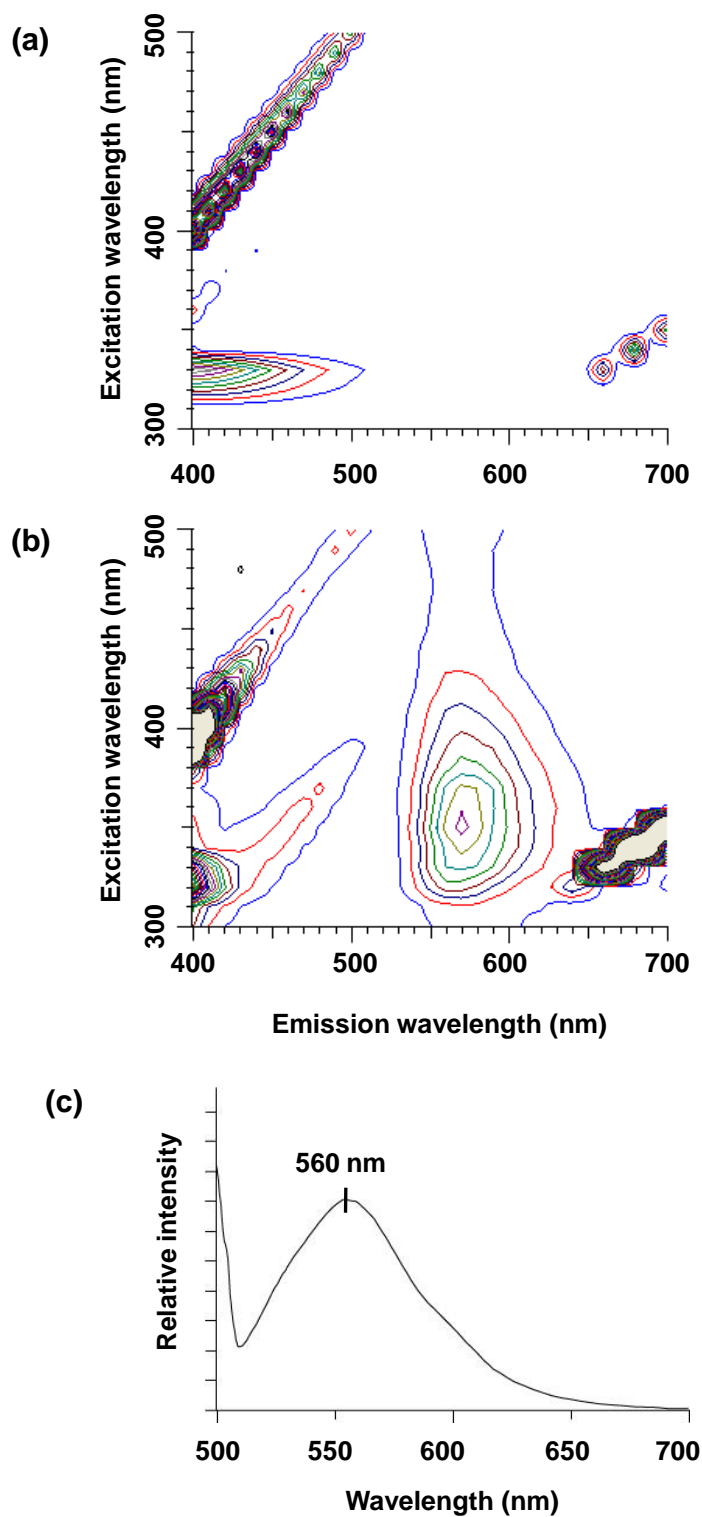


Fig. 5. Fluorescence property of astaxanthin.

3D fluorescence spectra of acetone (a) and astaxanthin (b) dissolved in acetone, and emission spectrum of astaxanthin (c) dissolved in acetone (excitation wavelength was 488 nm are shown).

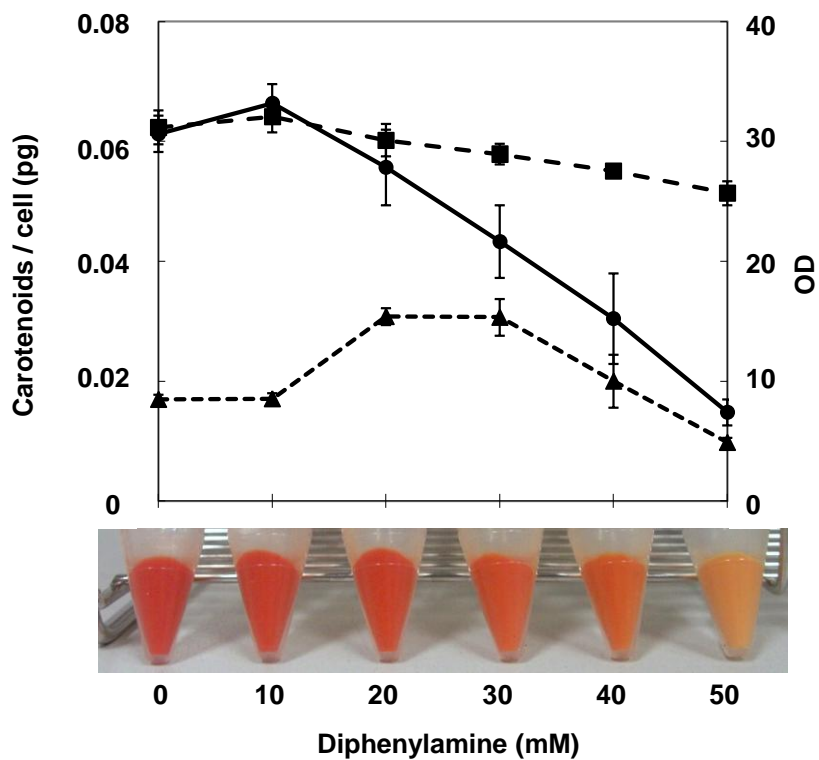


Fig. 6. Effect of diphenylamine on the growth and carotenoid synthesis of *X. dendrorhous*. Carotenoid contents in 3-day culture containing various concentrations of diphenylamine were determined by HPLC from three independent cultures. Vertical bar represents mean \pm standard deviation for growth and contents of carotenoids: ■, growth (OD₆₆₀); ●, astaxanthin; ▲, β-carotene. The photograph represents color of the cells after centrifugation.

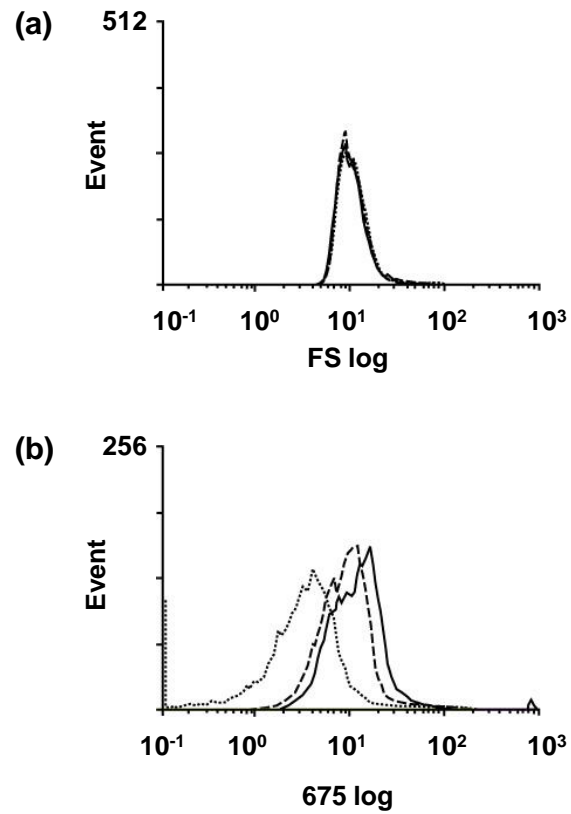


Fig. 7. Effect of diphenylamine on intensities of forward scatter and fluorescence from *X. dendrorhous* cells.

The results of flow cytometrical analyses are shown for intensity of forward scatter (a) and fluorescence intensity at around 675 nm (FL675) (b). Solid line, broken line, and dotted line represent the values for the cells incubated with 0, 30, and 50 μ M diphenylamine, respectively.

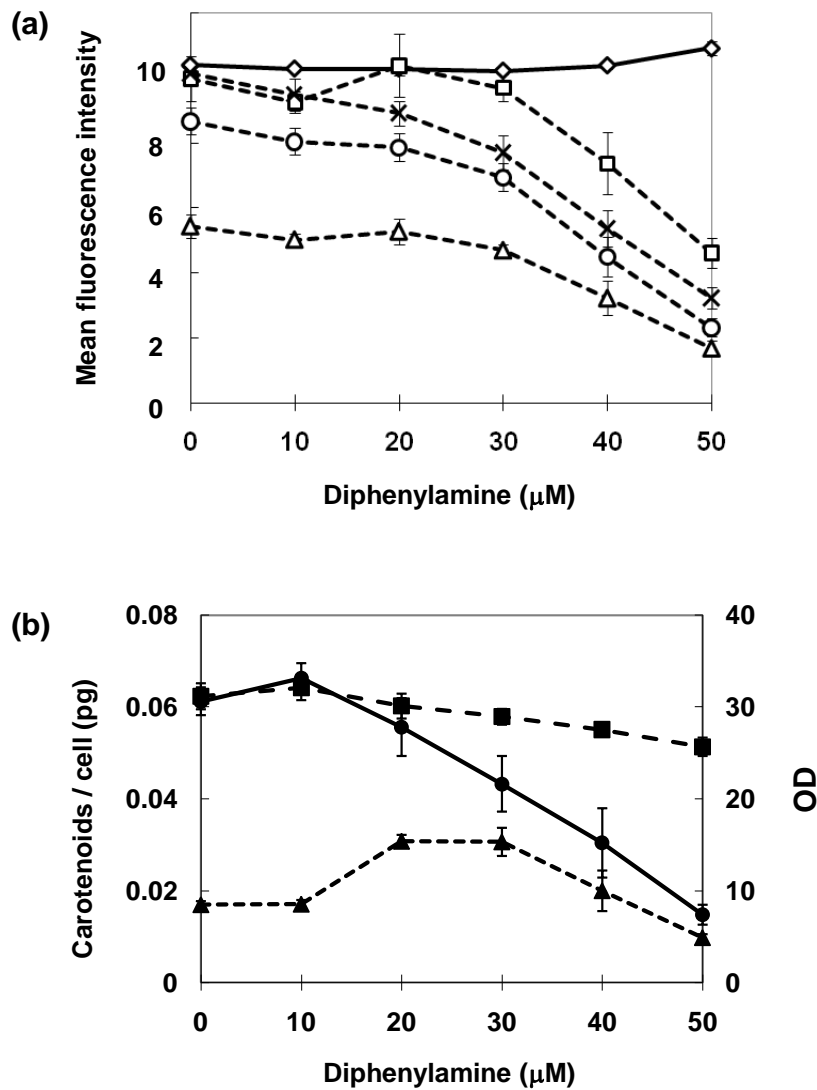


Fig. 8. Effect of diphenylamine on the mean intensities of fluorescence at various wavelength from *X. dendrorhous* cells.

(a) The mean fluorescence intensities for 3-day cultures containing various concentrations of diphenylamine were calculated from three independent cultures. Vertical bar represents mean \pm standard deviation for FL. Symbols: \diamond , forward scatter; \square , mean fluorescence intensity at around 525 nm (FL525); \circ , at around 575 nm (FL575); \triangle , at around 610 nm (FL610); \times , at around 675 nm (FL675). (b) The same graph as that in Fig. 6 are shown as a reference.

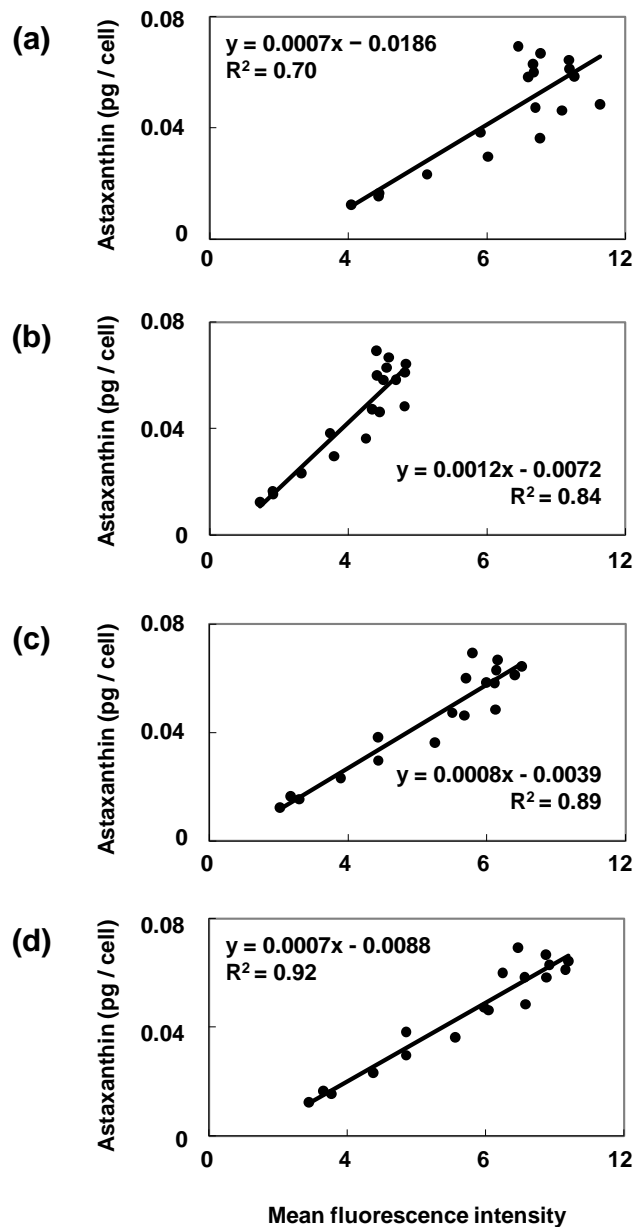


Fig. 9. Correlation between astaxanthin contents and relative fluorescence intensities in *X. dendrorhous* cell cultivated with various concentration of DPA.

Correlation between astaxanthin contents and mean fluorescence intensity at around 525 nm (a), around 575 nm (b), around 610 nm (c), and around 675 nm (d) were shown. Every symbol represents the fluorescence intensity and astaxanthin contents from a single culture. The approximate formula and the correlation coefficient (R^2) are shown in each figure.

Table 1 FCM analysis of carotenoid contents in cultures of different *X. dendrorhous* strains.

Each strain, in duplicate, was cultured for 4 days and analyzed for the fluorescence behavior by FCM and for the carotenoid contents by HPLC.

Strain	Growth of cells		FCM analysis of cells				Carotenoid content		
	Number ($\times 10^6$ ml ⁻¹)	Dry weight of cells (mg ml ⁻¹)	Mean forward scatter	Mean relative fluorescence intensity at around :				Astaxanthin content (fg cell ⁻¹)	β -Carotene content (fg cell ⁻¹)
				525 nm (FL1)	575 nm (FL2)	610 nm (FL3)	675 nm (FL4)		
Y9W	158	7.0	7.4	1.8	2.3	2.7	2.3	— ^a	—
Y9Y	134	8.1	8.3	6.4	4.6	4.3	2.3	—	24.7
Y989	174	8.6	8.1	3.7	3.3	3.7	2.2	4.9	5.3
Y2238	188	6.5	7.9	5.0	5.5	6.9	4.8	21.2	2.1
Y2238-10IL	59	7.6	9.4	10.5	12.1	14.4	9.4	76.7	8.1
Y2342	58	7.7	9.4	10.9	12.6	14.7	9.7	82.4	9.2
ATCC24202	92	8.3	7.7	3.4	2.9	3.3	2.0	9.8	8.2
ATCC66272	60	6.8	10.3	7.5	9.0	11.1	7.4	59.8	2.5

^a not detected.

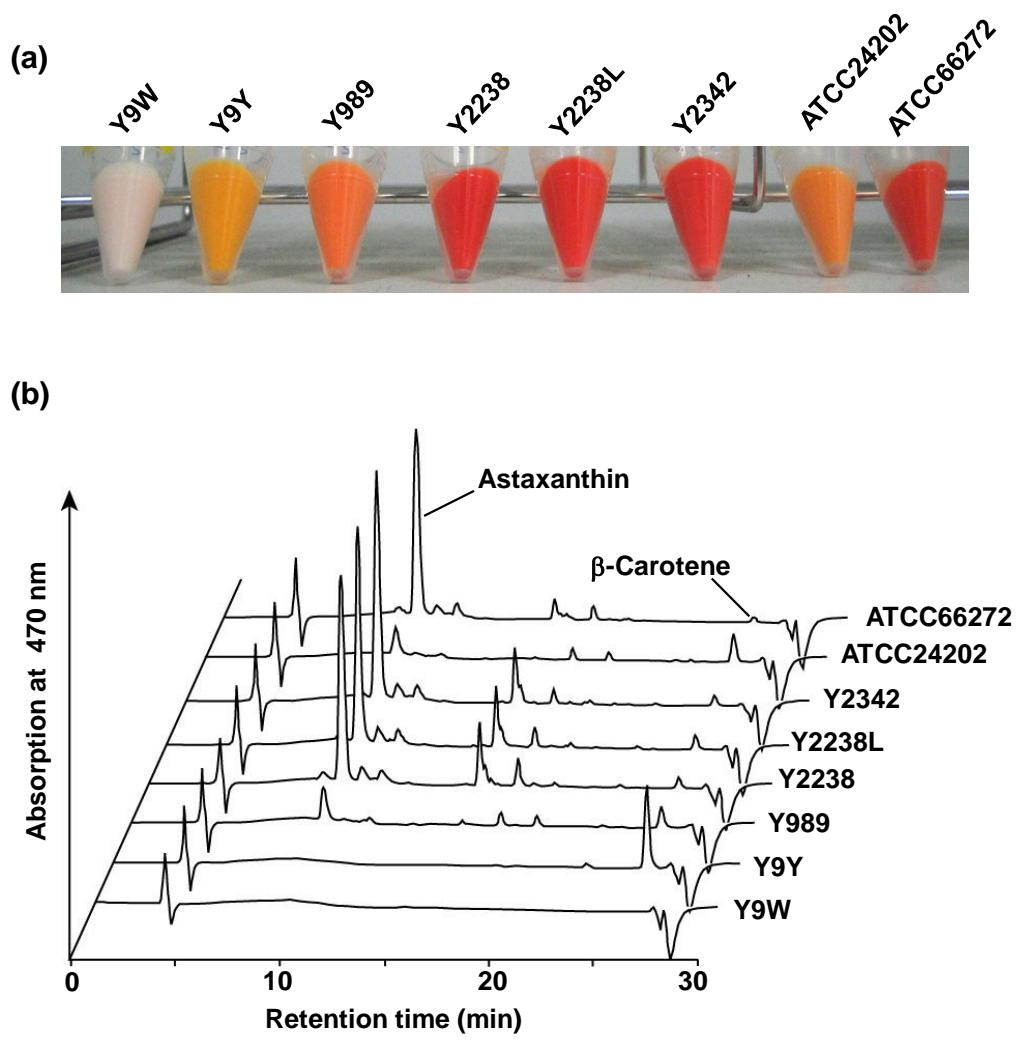


Fig. 10. Carotenoid production of various *X. dendrorhous* strains.
 The cells cultivated for 3 days (a) were subjected to HPLC analysis for carotenoids (b).

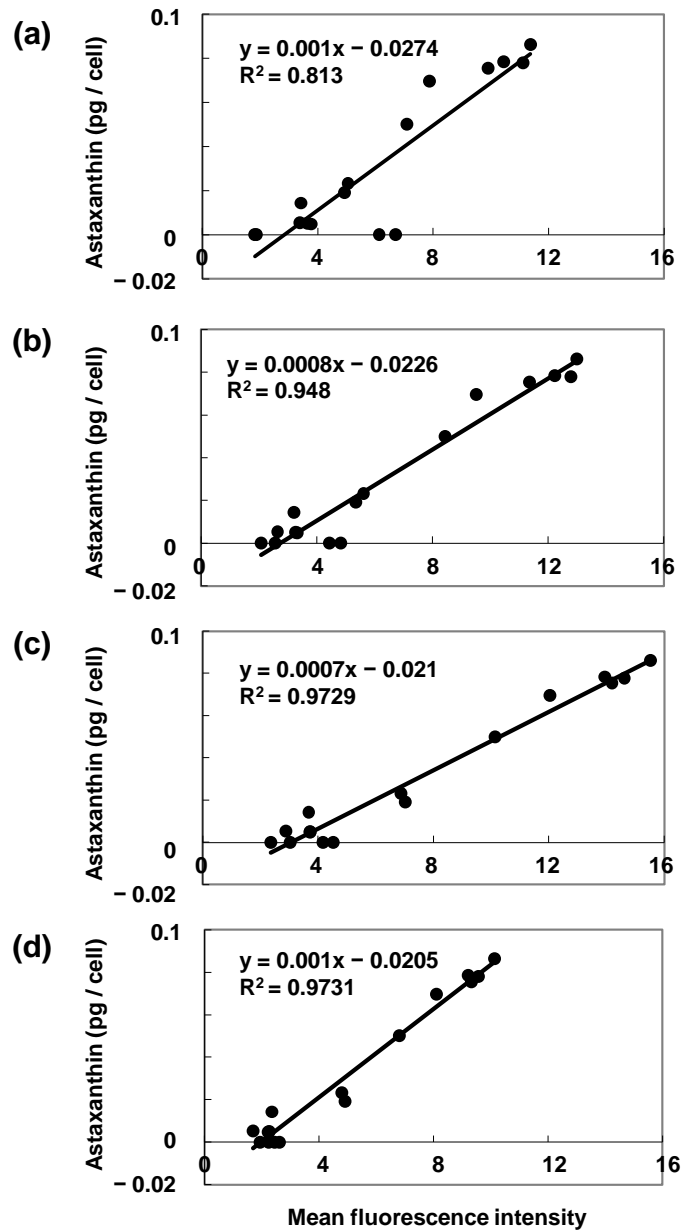


Fig. 11. Correlation between astaxanthin contents and relative fluorescence intensities in the various *X. dendrorhous* mutant cells.

Correlation between astaxanthin contents and mean fluorescence intensity at around 525 nm (a), around 575 nm (b), around 610 nm (c), and around 675 nm (d) were shown. Every symbol represents the fluorescence intensity and astaxanthin contents from a single culture. The approximate formula and correlation coefficient (R^2) are shown in each figure.

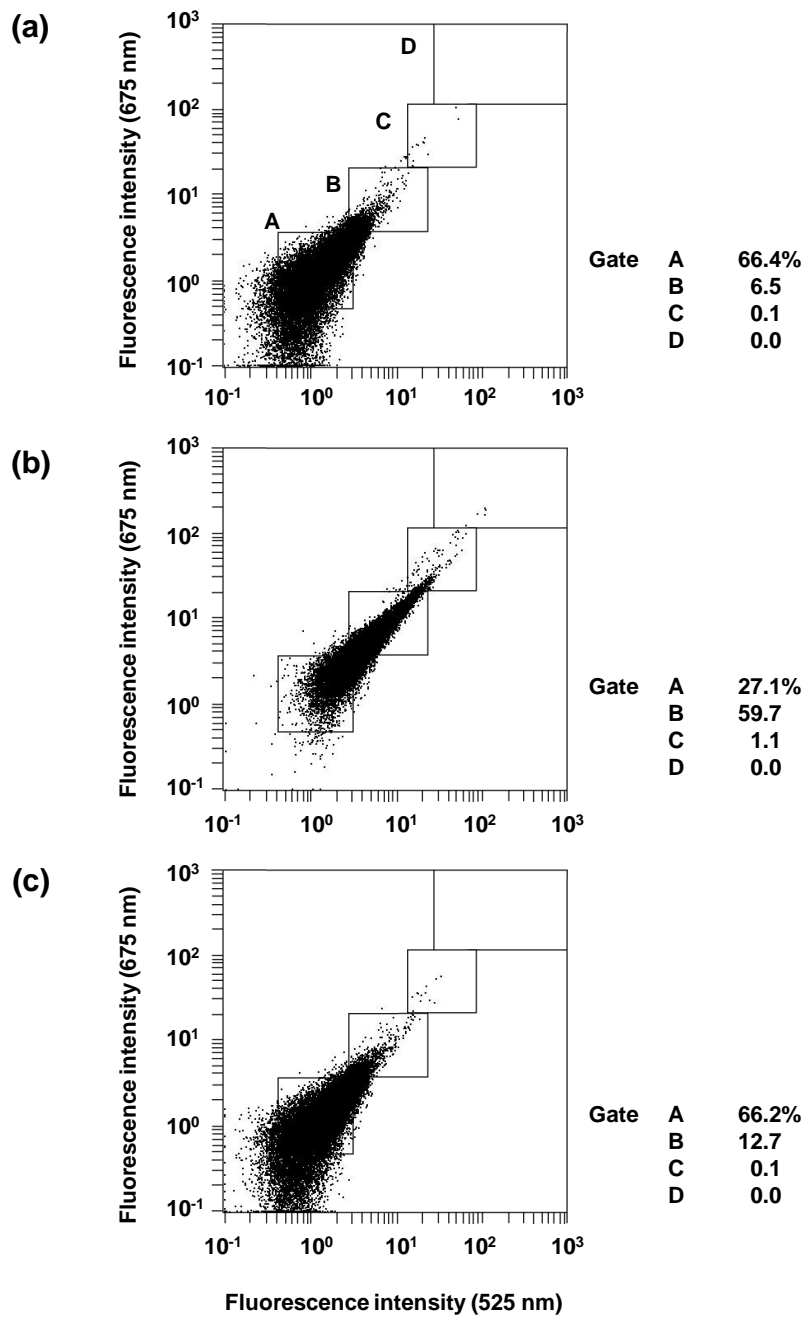


Fig. 12. FCM sorting of different *X. dendrorhous* cells.

Strains Y989 (a) and Y2342 (b) were separately cultured for 3 days and analyzed by FCM for FL1 (525 nm) vs. FL4 (675 nm). The two cultures were mixed at the ratio of 100 to 1 (c) and the mixture was analyzed by the same method. For clarity, only the first 20,000 events are plotted in the three cytograms. Four same windows were set in each cytogram. Numbers of the cells falling in the windows are shown as the percentage at the right side of each figures.

Table 2 Separation of strains Y989 and Y2342 cells by FCM sorting.

The mixture of the cultures of strains Y989 and Y2342 (100:1) were sorted as described in Fig. 12. Several-thousand cells were sorted to give the fractions in window A and B. In the following run, half a million cells were sorted to give fraction C and D.

Window	Sorting count	Number of colonies formed ^b		Survival rate (%)	Y2342 (% the total number of colonies)
		Y989	Y2342		
A	500 ^a	384	0	77	0
B	500 ^a	468	11	96	2.3
C	203	127	13	69	9.3
D	2	3	0	150	0

^a As many as 500 cells were collected.

^b The cells from the sorting windows were cultured on agar plates and visually inspected by the color of the colonies formed.

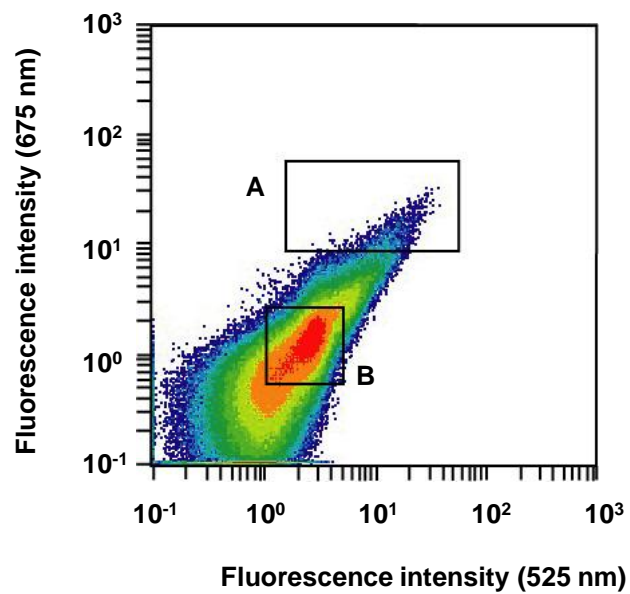


Fig. 13. Cytogram by density plot of mutagenized Y989 cells.

In the cytogram, the red color represents the highest density of cells, followed by the orange and then light green, green, and sky blue, and the cells occurring at the lowest frequency are navy blue in color. 0.6 million cells are shown in this cytogram. Before analysis of mutagenized cells, non-mutagenized cells were analyzed and the window A was set up on the cytogram to include the top 0.1% of non-mutagenized cells, and window B was set up on the densest area of the non-mutagenized cells.

Table 3 Comparison of FCM and conventional techniques in screening work for astaxanthin production.

		Number of cells screened	Number of cells tested on plates	Number of colonies formed	Number of colonies from visual selection	Number of colonies (% the number of colonies formed)			Sum
						Astaxanthin formed :			
					1.5–1.9-times ^b	2.0–2.9-times ^b	≥ 3.0-times ^b		
FCM	Window A	2 x 10 ⁶	15,000 ^a	11,800	59	20 (0.17)	15 (0.13)	4 (0.03)	39 (0.33)
	Window B	8000	5,000	3,900	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Conventional		15,000	15,000	11,200	18	3 (0.03)	3 (0.03)	1 (0.01)	7 (0.06)

^a Number of cells from FCM selection.

^b As compared with the amount by the parental strain Y989.

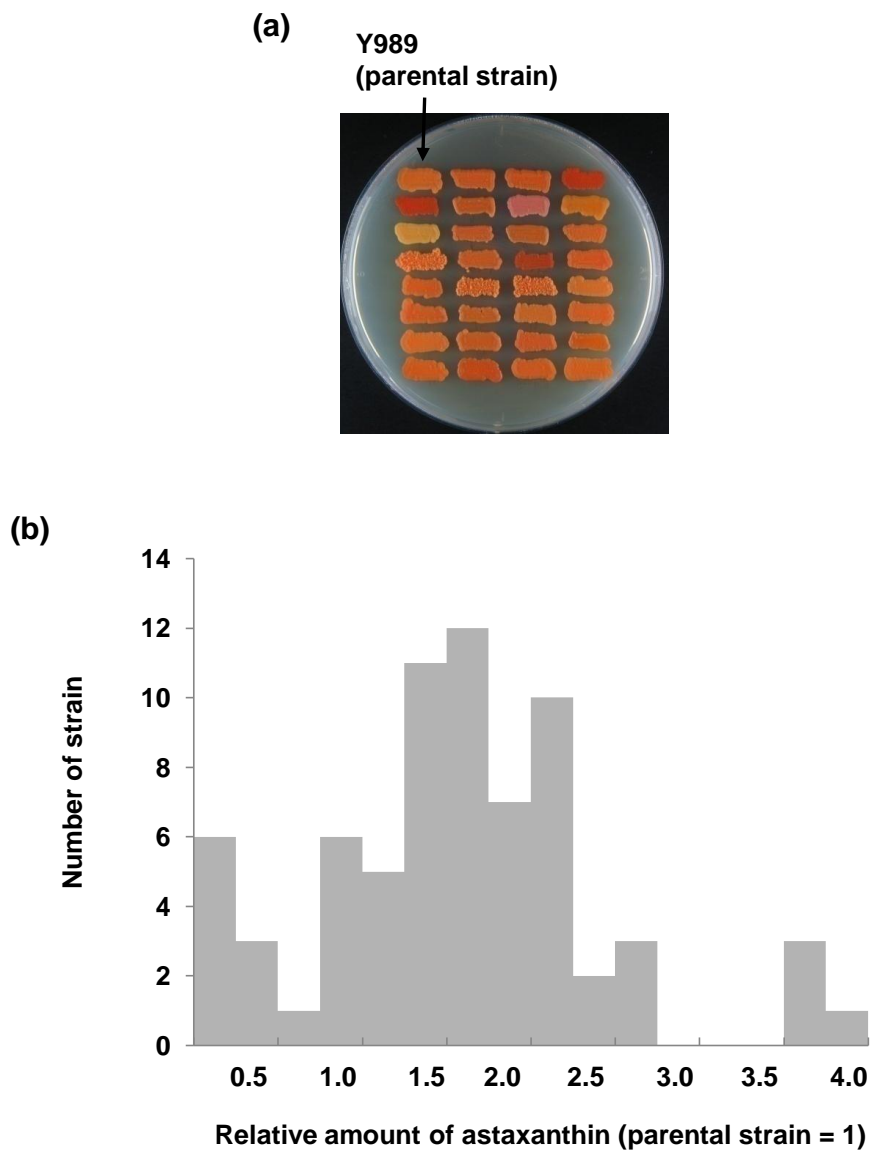


Fig. 14. Property of mutant strains acquired by flow cytometry from window A in Fig. 13.
 (a) A photograph of mutants selected from visual selection. (b) Histogram of relative amount of astaxanthin.

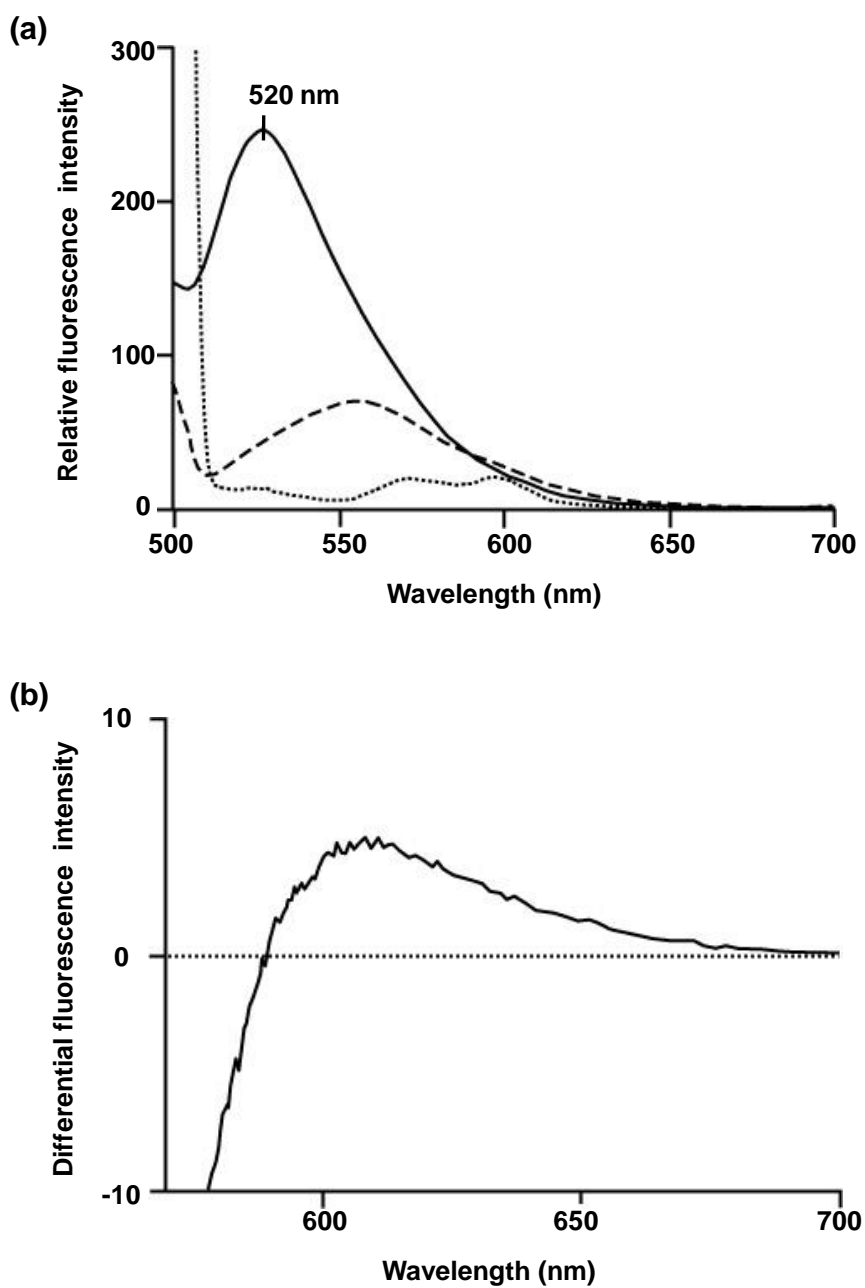


Fig. 15. Fluorescence characteristics of astaxanthin and β -carotene.

(a) The fluorescence spectrums of β -carotene standard (solid line), astaxanthin standard (broken line) and acetone (dotted line) were measured spectrophotometrically (excitation was at 488 nm). The same amount (1 mg/50 ml) of the β -carotene and astaxanthin were dissolved in acetone. (b) A subtracted spectrum of β -carotene by astaxanthin.

第 2 章

X. dendrorhous アスタキサンチン高生産変異株における 高生産機構の解明と *S. cerevisiae* へのアスタキサンチン生合成遺伝子の導入

2-1. 緒言

これまでに多くのカロテノイド生合成生物において、その生合成経路、それに関わる遺伝子とその転写制御が研究されてきた。そのなかで、炭素源、窒素減などの栄養源の量、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素、過酸化水素などの ROS、あるいは光による刺激がカロテノイド蓄積量を増大させることが報告されている (Ma & Chen, 2001; Steinbrenner & Linder, 2001; Iigusa *et al.*, 2005)。微生物におけるカロテノイド生合成の誘導については β -カロテン生合成糸状菌 *Neurospora crassa*、*Phycomyces blakesleeanus*、*Mucor circinelloides* の 3 種で最も研究が進んでいる。これら 3 種の糸状菌では、光刺激を受けた際に各種カロテノイド生合成系遺伝子群の転写が強く誘導され、その結果カロテノイドが蓄積するとされており、この光刺激による応答を制御している因子として、子囊菌 *N. crassa* では WC-1、WC-2 という転写活性化因子が (Talora *et al.*, 1999)、子囊菌 *P. blakesleeanus* では転写抑制因子である *carS*、*carD*、*carF* が、そして接合菌のでも転写抑制因子である *crgA* が見つかっている。これらの知見を応用した例として *M. circinelloides* では、突然変異処理によりリコペンを生産するようになった株において *crgA* を欠損させることでリコペンを高生産させることに成功している (Almeida & Cerdá-Olmedo, 2008; Nicolás-Molina *et al.*, 2008)。 *X. dendrorhous* においては、光刺激によるアスタキサンチン生合成の誘導は確かめられていないが、一重項酸素、過酸化水素によってアスタキサンチン蓄積量が増加することが知られている (Schroeder & Johnson, 1995; Liu & Wu, 2006)。これらの現象から *X. dendrorhous* においては、アスタキサンチン生合成系遺伝子群は酸化ストレスに応答する因子により制御されていることが想像できるが、その因子についての知見は今のところ無い。

第 1 章の実験でも *X. dendrorhous* を突然変異処理することにより多くのアスタキサンチン高生産株が得られたように、現在までに、多くの高生産株が突然変異処理により得られている。これらの高生産株はそのアスタキサンチン生合成遺伝子、あるいはその制御因子に変異が起こったためアスタキサンチンを高生産するようになったと考えられるが、そのような解析は為されていない。そこで本章では、これらの高生産株とその親株のアスタキサンチン生合成制御機構

について、分子生物学的手法を用いて比較し、その知見を利用することでさらなるアスタキサンチン高生産株を育種することを目的とした。

また、これまでに紹介してきたような、もともとアスタキサンチンを生産する生物を改良することで高生産を目指す試みが行われる一方で、大腸菌、酵母植物などにアスタキサンチン生合成系遺伝子を導入し、高生産させる試みも行われており、このような試みには海洋性細菌 *Paracoccus* sp.、あるいは植物性付着菌 *Pantoea ananatis* (旧名、*Erwinia uredovora*) のアスタキサンチン生合成系遺伝子などが幅広く利用されている。大腸菌をこれらの遺伝子で形質転換した結果、フィトエン、リコペン、 β -カロテン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、そしてアスタキサンチンを蓄積する形質転換体を得られており、他の生物のカロテノイド生合成系遺伝子を研究する際の宿主としても利用されている (Table 4) (Misawa & Shimada, 1998)。また、高等植物には β -カロテンのヒドロキシル化反応を行う酵素が幅広く存在するため、ゼアキサンチンなどのカロテノイドを蓄積するが、ケト化反応を行う酵素が存在しないためにアスタキサンチンを蓄積する植物はほとんどない。そこで、他生物由来の β -カロテンケト化酵素を導入することで、バレイショ (*Solanum phureja*) (Morris *et al.*, 2006)、ニンジン (*Daucus carota* L.) (Jarayaj *et al.*, 2008a; Jarayaj & Punja, 2008b)、トウモロコシ (*Zea mays* L.) (Zhu *et al.*, 2008) などにおけるアスタキサンチン生合成に成功している。さらに、タバコの色素体で海洋性細菌 *Brevundimonas* sp.由来の β -カロテンヒドロキシル化酵素、ケト化酵素を発現させたところ、タバコが持つ総カロテノイドの 70% にも上るアスタキサンチンを蓄積させることに成功したとの報告がある (Hasunuma *et al.*, 2008)。また、酵母 *Candida utilis* においても、細菌のカロテノイド合成遺伝子を導入することでリコペン、 β -カロテン、アスタキサンチンを蓄積させることができたという報告がある (Miura *et al.*, 1998)。このような研究によりカロテノイドの大量生産が試みられる一方で、大腸菌やニンジンにおいては、アスタキサンチンなどのカロテノイドを蓄積させた結果、UV、過酸化水素などのストレスに耐性を持つようになったとの報告があり (Tatsuzawa *et al.*, 2000; Jayaraj & Punja, 2008b)、宿主のストレス耐性を向上させるという目的でもカロテノイド生合成系遺伝子群の研究が進められている。

これらのことを踏まえ、ゲノム情報や遺伝学的、分子生物学的知見が蓄積され、遺伝子操作技術も確立されている、酵母 *S. cerevisiae* に *X. dendrorhous* 由来、あるいは細菌由来のアスタキサンチン合成遺伝子を導入することにより、[1] 未知の部分が多い *X. dendrorhous* のアスタキサンチン生合成酵素の導入による *S. cerevisiae* でのアスタキサンチン生産とその反応機構の解析、[2]すでに多くの知見がある細菌由来の遺伝子を利用し、*S. cerevisiae* にアスタキサンチンを蓄積さ

せることによる高生産株の分子育種、[3] アスタキサンチンなどのカロテノイドを蓄積させることによる、*S. cerevisiae* へのストレス耐性の付与、の3つの目的を達成するための実験を行った。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 菌株と培養方法

X. dendrorhous

X. dendrorhous の使用菌株と培養方法に関しては、第1章の「1-2-1. 菌株と培養方法」を参照。

S. cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae Y187 株 (*MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *met*, *URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-LacZ MEL1*)、及び INVSc1 株 (*MAT α* , *ura3*, *leu2*, *trp1*, *his3*) の培養には、YPDA 培地 (2% ペプトン、1% 酵母エキス、2% グルコース、0.003% アデニン硫酸塩)、及び SC 培地 (0.67% Yeast Nitrogen Base W/O Amino Acids (Bacto; 日本ベクトン・ディッキンソン社)、2% グルコース、0.2% ドロップアウトミックス*、pH 5.8)を用い、30°C、300 rpm で振とう培養した。細胞の増殖は濁度 (OD₆₀₀) と、トーマ氏血球計算盤を用いた直接計測法により観測した。

*ドロップアウトミックスは、培養する株が示す栄養要求性に応じ、以下の物質から特定の物質を取り除き、残りをよく混合して調整した。

アデニン 0.5 g、L-アラニン 2.0 g、L-アルギニン 2.0 g、L-アスパラギン 2.0 g、L-アスパラギン酸 2.0 g、L-システイン-HCl 2.0 g、L-グルタミン 2.0 g、L-グルタミン酸 2.0 g、グリシン 2.0 g、L-ヒスチジン 2.0 g、イノシトール 2.0 g、L-イソロイシン 2.0 g、L-ロイシン 10.0 g、L-リジン 2.0 g、L-メチオニン 2.0 g、*p*-アミノ安息香酸 2.0 g、L-フェニルアラニン 2.0 g、L-プロリン 2.0 g、L-セリン 2.0 g、L-スレオニン 2.0 g、L-トリプトファン 2.0 g、L-チロシン 2.0 g、ウラシル 2.0 g、L-バリン 2.0 g

E. coli

大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α (*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*(rk⁻,mk⁺), *phoA*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, F⁻, λ) の培養は、LB 培地 (0.5% 酵母エキス、1% トリプトン、1% 塩化ナトリウム、pH 7) を用い、37°C、250 rpm で振とう培養した。必要に応じ、アンピシリン (50 μ g/ml)、カナマイシン (20 μ g/ml) を添加した。

Paracoccus sp.

Paracoccus sp. (NBRC101723) は独立行政法人製品評価技術基盤機構 (千葉) より購入した。培養には LB 培地を用い、25°C で行った。

2-2-2. ゲノム DNA の抽出

X. dendrorhous からの抽出

YMG 培地で 2 日間培養した菌液 1.5 ml を回収し、遠心分離により菌体を得た。1 度 Milli-Q 水で菌体を洗浄した後、Solution A (150 mM 塩化ナトリウム、10mM トリス-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、0.1% SDS) 200 μ l を加えてボルテックスし、菌体を完全に分散させた。そこにフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) 溶液 (PCI 溶液) 200 μ l、0.5 mm のガラスビーズ 500 mg を加えた。1 分間ボルテックスし、その後 1 分間氷上で冷却するというサイクルを 3 回繰り返して菌体を破碎した。破碎液に TE バッファー (10 mM トリス-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) 200 μ l を加えて遠心分離し、上層の水層を新しい 1.5-ml 容チューブに回収した。回収した水層に等量の PCI 溶液を加えボルテックスにより混和した後、遠心分離し、先ほどと同様に水層を新しい 1.5-ml 容チューブに移した。移した水層に等量のジエチルエーテルを加えて軽く攪拌後、遠心分離し、アスピレーターを使ってジエチルエーテル層を除去した。残った水層に 1/10 容の 3 M 酢酸ナトリウム、2.5 倍容の 100% エタノールを加えて攪拌した後、5 分間室温で放置し、遠心分離して上清を捨てた。そこに 1 ml の 70% エタノールを加えて軽く攪拌した後、遠心分離し、上清を捨て、アスピレーターを用いて沈殿を乾燥させた。乾燥した沈殿物に TE バッファー 400 μ l を加えて溶かし、ゲノム DNA 溶液を得た。次にゲノム溶液に含まれる RNA を除去するために、3 μ l の Ribonuclease (DNase free) Solution (10 mg/ml) (ニッポンジーン社) を加えて混ぜ、37°C で 30 分間放置した。その後、上記と同様の PCI 処理を 1 回、ジエチルエーテル処理を 1 回行い、エタノール沈澱後、最終的に 50 μ l の TE バッファーに溶解させた。

S. cerevisiae INVSc1 からの抽出

S. cerevisiae INVSc1 株を YPDA 培地で培養し、培養液 5 ml から遠心分離 (5,800 \times g、4°C、1 分間) によって菌体を回収しゲノム抽出用のサンプルとした。抽出には Gen とるくん (酵母用) (タカラバイオ社) を用い、製品の取り扱い説明書に従って行った。

Paracoccus sp. からの抽出

LB 培地で 2 日間培養した菌体を用い、抽出には ISOPLANT (ニッポンジーン社) を用いて、製品の取扱説明書に従って行った。

2-2-3. *X. dendrorhous* からの全 RNA 抽出

全 RNA の抽出には RNeasy Mini Kit (キアゲン社) を用い、製品の取り扱い説明書に従って抽出を行った。全 RNA の抽出に用いた菌体は、YMG 培地で培養した培養液 1.5 ml から遠心分離 (5,800 × g、4°C、2 分間) によって回収した。細胞の破碎には、0.5 mm のガラスビーズと冷却機付きガラスビーズミキサー (マルチビーズショッカー、安井器機社) を用いた (2,500 rpm、ON/OFF = 60/60 秒、5 サイクル)。キットに含まれる RNase-Free DNase Set を用いて、抽出と同時に DNase 処理も行った。抽出した全 RNA は、バッファーとして MESA (20 mM 4-モルフォリンプロパンスルホン酸 (MOPS)、5 mM 酢酸、1 mM EDTA) を用い、1.2% アガロースゲルを使って、100 V の定電圧で 30 分間、電気泳動し、SYBR Gold 溶液 (インビトロジェン社) を用いて染色することで確認した。

全 RNA からの mRNA の精製は、*Oligotex-dT30 <Super>* mRNA Purification Kit (From Total RNA) (タカラバイオ社) を用い、製品の取り扱い説明書に従って行った。

2-2-4. リアルタイム PCR

RNA から cDNA への逆転写は High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (アプライドバイオシステムズジャパン社) を用い、取り扱い説明書に従って行った。リアルタイム PCR は、SYBR Green PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン社) を用いて行った。反応組成は 25 μ l (最終容量) の使用時の濃度の Master Mix 液 ($\times 1$ 濃度液) に、最終で 100 nM の濃度になるように正方向と逆方向のプライマーと、20 ng の cDNA を加えた。それぞれの遺伝子に対するプライマーのセットは Table 5 に示した。反応条件は、(50°C で 2 分間)、(95°C で 10 分間)、(95°C で 15 秒間と 60°C で 1 分間 $\times 40$) とした。内在性コントロールとしてはアクチン遺伝子を用い、 $\Delta\Delta$ cT 法による計算を行った。

2-2-5. *crtS* に結合する転写因子の探索

転写因子の探索には Matchmaker One-Hybrid Library Construction & Screening Kit (タカラバイオ社) を用い、製品の取扱説明書に従って操作を行った。操作に用いたプライマーは Table 5 に示す。

Y989 株のゲノム DNA をテンプレートとして KOD-plus- (TOYOBO 社) を用いて PCR を行い、両端に *EcoR* I と *Mlu* I の認識配列をもつ 3 つの断片 (*crtS* の上流配列 -1280 から -696、-948 から -299、-435 から +21 の配列をもつ) を得た。それぞれを *EcoR* I と *Mlu* I で処理し、同制限酵素で処理した pHIS2 レポーター

ーベクターの最小プロモーターの上流に組み込み、pHIS2-crtS-up1、2、3 を作製した (Fig. 19a)。Y989、Y2238-10IL 株から oligo-dT プライマー (CDS III Primer) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、pGADT7-Rec2 発現ベクター、pHIS2-crtS-up と同時に *S. cerevisiae* Y187 株に導入した (Fig. 19b, c)。得られた形質転換体を 60 mM の 3-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール (3-AT) を含む SC/-His/-Leu/-Trp 寒天培地上に撒き、3 日間の内に生育してきたコロニーを新しい同様の寒天培地に植菌した (Fig. 19d, e)。この培地上でポジティブコントロールと同様の生育を示す株を選抜し、1 次候補とした。

1 次候補の株からプラスミドを抽出し、*E. coli* DH5 α 株に導入後、アンピシリンを含む培地上に撒いた。現れたコロニーからプラスミドを抽出し、再度 pHIS2-crtS-up1 ベクターと共に *S. cerevisiae* Y187 株に導入した。形質転換体を SC/-Leu/-Trp 寒天培地上に撒き、現れたコロニーの中から無作為に 10 個を選抜し、新しい 70 mM 3-AT を含む SC/-His/-Leu/-Trp 寒天培地上に植菌した。この培地上に植菌したコロニーの内、ネガティブコントロールよりも生育が良好なものが 5 コロニー以上あったものを最終候補とした。

2-2-6. プラスミド抽出

E. coli

E. coli からのプラスミド抽出には QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社) を使用し、製品の取扱説明書に従って操作を行った。

S. cerevisiae

S. cerevisiae からのプラスミド抽出には PrepEase Yeast Plasmid Isolation Kit (usb 社、Cleveland, OH) を使用し、製品の取扱説明書に記載してある量の半量を用いて操作を行った。

2-2-7. RT-PCR によるアスタキサンチン生合成系酵素遺伝子 (*crtI*、*crtYB*、*crtS*、*crtR*) の増幅

crtI、*crtYB*、*crtS* の増幅については、*X. dendrorhous* ATCC24202 株から抽出した mRNA をテンプレートとし、PrimeScript High Fidelity RT-PCR Kit (タカラバイオ社) を用いて製品の取り扱い説明書に従って行った。*crtR* の増幅については *X. dendrorhous* Y989 株から抽出した全 RNA をテンプレートとして PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ社) と KOD-plus- (TOYOBO 社) を用い、製品の取り扱い説明書に従って行った。それぞれの遺伝子の増幅に用いたプライマーを Table 5 に示す。

2-2-8. *BTS1*、*NCPI*、*crtZ*、*crtO*、*crtW* の増幅

BTS1、*NCP1* の増幅は、*S. cerevisiae* INVSc1 株のゲノム DNA をテンプレートとして、KOD-plus- (TOYOBO 社) を用いて行った。

crtZ (*Pantoea ananatis*)、*crtO* (*Synechocystis* sp.) の増幅は University of Minnesota (USA) の Dr. Claudia Schmidt-Dannert の研究室に留学した際に、それぞれの遺伝子を持つプラスミド pUCmod-*crtZ*、pUCmod-*crtO* をテンプレートとして *Pfu* DNA Polymerase (プロメガ社) を用いて行った。

crtW の増幅は *Paracoccus* sp. のゲノム DNA をテンプレートとして KOD-plus- (TOYOBO 社) を用いて行った。

すべての PCR 反応ではアニーリング温度を 60°C とし、30 サイクルの反応で増幅を行った。その他の条件は製品の取扱説明書に従った。遺伝子の増幅に用いたプライマーを Table 5 に示す。

2-2-9. *S. cerevisiae* 用発現プラスミドの構築

crtI、*crtYB* の PCR 産物は *Sal* I / *Sma* I で処理し、同制限酵素で処理した pAD4 ベクターに組込んだ。組込んだ遺伝子の塩基配列を DNA シークエンシングにより確認し、それぞれ pAD-*crtI*、pAD-*crtYB* とした。次に、pAD-*crtI*、pAD-*crtYB* をそれぞれ *Bam* H I で処理し、*ADH1* プロモーターと *ADH1* ターミネーターを含む遺伝子断片 (P_{ADH1} -*crtI*- T_{ADH1} 、 P_{ADH1} -*crtYB*- T_{ADH1}) を切り出した。これらの断片 P_{ADH1} -*crtI*- T_{ADH1} は pTV3、 P_{ADH1} -*crtYB*- T_{ADH1} を pUV2 に組み込み、それぞれ pTV-*crtI*、pUV-*crtYB* と名付けた (Fig. 16a)。

crtS、*BTS1*、*NCP1* の PCR 産物は *Pst* I / *Sma* I で処理し、同制限酵素で処理した pAD4 ベクターに組み込み、それぞれ pAD-*crtS*、pAD-*BTS1*、pAD-*NCP1* とした。その後、pAD-*crtS* を *Bam* H I で処理し、*ADH1* プロモーターと *ADH1* ターミネーターを含む遺伝子断片 (P_{ADH1} -*crtS*- T_{ADH1}) を切り出した。この断片を pHV3 に組み込み、pHV-*crtS* と名付けた。

crtZ、*crtO*、*crtW* の PCR 産物は *Pst* I / *Sac* I で処理し、同制限酵素で処理した pAD4 ベクターに組み込み、それぞれ pAD-*crtZ*、pAD-*crtO*、pAD-*crtW* と名付けた。その後、それぞれのプラスミドを *Bam* H I で処理し、*ADH1* プロモーターと *ADH1* ターミネーターを含む遺伝子断片を切り出した。これらの断片を pHV3 に組み込み、それぞれ pHV-*crtZ*、pHV-*crtO*、pHV-*crtW* と名付けた。

crtR の PCR 産物は *Hind* III / *Sma* I で処理し、同制限酵素で処理した pAD4 ベクターに組み込み pAD-*crtR* と名付けた。

タンデムベクター

pAD-*crtS*、pAD-*BTS1* を *Bam* H I で処理し、*ADH1* プロモーターと *ADH1* ターミネーターを含む遺伝子断片 (P_{ADH1} -*crtS*- T_{ADH1} 、 P_{ADH1} -*BTS1*- T_{ADH1}) を切り出した。これらの断片 2 つと *Bam* H I で処理した pHV3 との 3 者ライゲーションを

行い、pHV-crtS-BTS1 を構築した (Fig. 16b)。同様にして、pHV-crtZ-crtO、pHV-crtZ-crtW も構築した。

2-2-10. 導入遺伝子発現確認プラスミドの構築

pEGFP-N1 から増幅した EGFP の PCR 産物を *Sma* I / *Sac* I で処理し、同制限酵素で処理した pAD4 ベクターに組み込み pAD-EGFP とした (Fig. 16c)。

終止コドンを持たない導入遺伝子 (*crtI*、*crtYB*、*crtS*、*BTS1*、*NCP1*、*crtZ*、*crtO*、*crtW*) は、それぞれの導入遺伝子を pAD4 に組み込んだベクターを鋳型とし、各導入遺伝子の終止コドンを除いたプライマーを用いて KOD-plus- (TOYOBO 社) により増幅した。遺伝子の増幅に用いたプライマーを Table 5 に示す。

増幅した *crtI*、*crtYB* の PCR 産物を *Sal* I / *Sma* I で処理し、同制限酵素で処理した pAD-EGFP ベクターに組み込み、pAD-crtI-GFP、pAD-crtYB-GFP と名付けた (Fig. 16c)。

crtS、*BTS1*、*NCP1*、*crtZ*、*crtO*、*crtW* の PCR 産物を *Pst* I / *Sma* I で処理し、同制限酵素で処理した pAD-EGFP ベクターに組み込み、pAD-crtS-GFP、pAD-BTS1-GFP、pAD-NCP1-GFP、pAD-crtZ-GFP、pAD-crtO-GFP、pAD-crtW-GFP と名付けた。

2-2-11. *S. cerevisiae* 形質転換体の作製

S. cerevisiae INVSc1 株の形質転換は、酢酸リチウム法により行った。

2-2-12. カロテノイド分析

S. cerevisiae 形質転換体からのカロテノイド抽出、及び HPLC による解析は第 1 章「1-2-3. カロテノイド分析」に記述した方法に準じた。

2-2-13. ウェスタン解析

形質転換体からのタンパク質の抽出は以下に示す方法で行った。SC 培地 5 ml、20°C で二日培養した培養液から遠心分離 (5,800 × g、4°C、2 分間) によって菌体を回収した。この菌体を 10% トリクロロ酢酸 (TCA) で一度処理し、200 μl の 10% TCA、500 μl のガラスビーズ (平均径 0.5 mm) を加え、冷却機付きガラスビーズミキサー (マルチビーズショッカー、安井器械社) で破碎した (2,500 rpm、ON/OFF = 30/30 秒、8 サイクル)。破碎後の菌体にさらに 200 μl の 10% TCA を加え、チューブの底に穴をあけて遠心分離することによりビーズを除去し、菌体を回収した。回収した菌体を 200 μl のサンプルバッファー (50 mM トリス-HCl (pH 6.8)、2% SDS、4.5% グリセロール、0.01% ブロムフェノールブルー、0.7 M 2-メルカプトエタノールに 0.5 M トリス-HCl (pH8.0) を添加)

に懸濁し、65°C で 15 分間処理した。遠心分離 (17,800 × g、25°C、10 分間) 後、上清を回収し、Bio-Rad Protein Assay (バイオラッド社) を用いてタンパク質量を測定した。

各形質転換体から得られたタンパク質抽出液を 10.5% SDS ポリアクリルアミドゲル (90 × 70 × 1 mm) にそれぞれ 100 μg ずつアプライし、120 V の定電圧で電気泳動を行った (Laemmli, 1970)。

電気泳動後のゲルをニトロセルロースメンブレン (Hybond-C、GE ヘルスケア社) と重ね、ブロッキングバッファー (48 mM トリス、385 mM グリシン、0.1% SDS、20% メタノール) 中で、タンパク質をメンブレンへ転写した (115 V、400 mA、60 分間)。ブロッキング終了後、メンブレンをブロッキングバッファー (3 % スキムミルク入り TBS-T バッファー (25 mM トリス、137 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム、0.3% トウイーン 20、(pH 8.0)) に浸し、1 時間ブロッキングした。続いて、Anti-GFP (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を一次抗体、Horseradish peroxidase (HRP) 融合抗マウス IgG 抗体 (Amersham ECL Plus Western Blotting Reagent Pack : GE ヘルスケア社) を二次抗体とし、それぞれをブロッキングバッファーで 1,000 倍、25,000 倍に希釈して使用した。抗体反応はそれぞれ 1 時間ずつ行った。シグナルの検出は検出試薬 (ECL Plus Western Blotting Detection System : GE ヘルスケア社) を用い、製品の取り扱い説明書に従って行った。

2-2-14. 導入遺伝子発現産物の局在性の確認

GFP タグ付きの各遺伝子を導入した形質転換体を、SC/-Leu 培地 5 ml に植菌し、20°C で 2 日培養した。培養液から遠心分離 (5,800 × g、24°C、2 分間) によって菌体を回収し、リン酸バッファー (10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.5) に再懸濁して蛍光顕微鏡 (Axiovert 200M、カールツァイスマイクロイメージング社) で観察した。小胞体の染色は、ER-Tracker Blue-White DPX (インビトロジェン社) を用い、製品の取扱説明書に従って行った。

2-2-15. 電子顕微鏡による観察

形質転換体の細胞を 2% 四酸化オスミウムにより固定し、急速凍結置換法により樹脂へ包埋した。超薄切片の作製、および電子顕微鏡での観察は、岩野 恵博士 (細胞間情報学講座 助教) に行っていた。

2-2-16. ストレス感受性テスト

各形質転換体を SC-His/-Leu/-Trp/-Ura 培地に植菌し、20°C で 48 時間培養した。菌数を計測した後、 10^5 - 10^0 個の範囲で、SC-His/-Leu/-Trp/-Ura 寒天培地、

0.85、1.7 mM の過酸化水素を含む SC-His/-Leu/-Trp/-Ura 寒天培地、5、10% のエタノールを含む SC-His/-Leu/-Trp/-Ura 寒天培地上にスポットし、UV 試験区では UV を 1 分間照射した後、20°C で 3 日培養して生育を観察した。

2-3. 結果

2-3-1. 野生株と高生産株のアスタキサンチン合成系酵素遺伝子の配列比較

X. dendrorhous Y989 株と Y2238-10IL 株、ATCC24202 株と ATCC66272 株はそれぞれ親株 (野生株) とそれから得られた変異株 (アスタキサンチン高生産株) という関係にある。これら 2 つの系統の野生株と高生産株の間でアスタキサンチン合成系酵素遺伝子 *idi*、*crtE*、*crtI*、*crtYB*、*crtS* の塩基配列を比較した。その結果、Y989 系統と ATCC24202 系統で若干の配列の差異はあったが、親株と変異株の間では、上記 5 種の遺伝子の配列は完全に一致した (データ示さず)。このことから変異株におけるアスタキサンチン高生産の原因はアスタキサンチン合成系の各酵素遺伝子自身の変異によるものではないことが明らかとなった。

2-3-2. アスタキサンチン合成系酵素遺伝子の転写量の比較

親株と高生産株の間で、アスタキサンチン合成系酵素遺伝子 *idi*、*crtE*、*crtYB*、*crtI*、*crtS* の塩基配列は全く同一であったが、野生株と高生産株とではそのアスタキサンチン生産量に約 10 倍近くもの差があることから (Fig. 17)、次にそれぞれの遺伝子の転写量をリアルタイム PCR を用いて測定した。

Fig. 18 の (a) (b) は野生株と高生産株それぞれの対数増殖期 (24 時間) の転写量を 1 とし、それぞれの定常期 (72 時間) の転写量を相対的に表したものであり、(c) (d) は野生株の対数増殖期と定常期のそれぞれの転写量を 1 とし、高生産株の対数増殖期と定常期の転写量を表したグラフである。この結果から、すべての遺伝子の転写量は対数増殖期においても定常期においても、ばらつきはあるものの、高生産変異株の方が野生株よりも若干多かったが (Fig. 18c, d)、ATCC24202 株 (野生株) は対数増殖期から定常期にかけて *crtE* の転写量が約 6 倍上昇することや (Fig. 18b)、Y2238-10IL (高生産株) の *crtI* の転写量が定常期において野生株の約 14 倍になることなど (Fig. 18c)、2 つの異なる系統間での転写様式には差が見られた。これらの違いから、元々の野生株でもそれぞれの系統では異なる転写調節をしていることが考えられ、またその高生産変異株においても異なる変異が起きていると考えられた。しかし、これらの高生産株がアスタキサンチンを高生産するという共通の表現型を示す以上、共通に起きて

いる変異も有るはずであり、この2つの系統に共通にみられる変化を探したところ、定常期において高生産株の *crtS* の転写量が野生株よりも多くなるという共通点がみられた (Fig. 18c, d)。この野生株と高生産株の間の *crtS* の転写量の差は、野生株の *crtS* の転写量が対数増殖期から定常期にかけて減少するのに対して、高生産株では増加あるいはその量を維持することで生じていた (Fig. 18a, b)。

2-3-4. アスタキサンチン合成系に関わる転写因子の探索

リアルタイム PCR の結果から、高生産株では定常期においても *crtS* の転写量が維持されることがアスタキサンチンの高生産に繋がっており、高生産株では *crtS* の転写制御に変化が起きているのではないかと考えられた。しかしながら、現在までに *crtS* の転写制御およびその因子に関しては全く知見がないことから、One-hybrid 法による *crtS* の転写因子の探索を試みた。

レポーターベクターとして pHIS2-*crtS*-*up1* を用いたスクリーニングにより (Fig. 19)、60 mM 3-AT を含む SC/-His/-Leu/-Trp 培地上で、ポジティブコントロールと同程度の生育を示す 78 個のコロニーを得た (Fig. 20a)。得られたコロニーの 3-AT 耐性がプラスミド由来であることを確認するために、まず得られたコロニーからプラスミドを抽出し、*E. coli* DH5 α に導入し、アンピシリンを含む LB 培地上で生育させることにより、pGADT7-Rec2 ベクターをもつ *E. coli* を選別した。現れたコロニーからプラスミドを抽出し、再度 pHIS2-*crtS*-*up1* ベクターと共に *S. cerevisiae* に導入した。その結果、78 株の形質転換体のなかから 8 株の 3-AT 耐性株を選抜した (Fig. 20b)。これら 8 株のもつ pGADT7-Rec2 ベクターに挿入された配列を解析したところ、*GAL4* アクチベータードメインとの融合タンパク質として発現しているアミノ酸の推定配列は Table 6 に記してある通りであった。このうち最も大きなアミノ酸として発現していた Y9-R7 から得られた配列は BLAST 検索をかけたところ赤色担子菌系酵母である *Cryptococcus neoformans* の Rds1 というタンパク質と相同性が高いことが分かった (Fig. 21) (Identity = 287/385 74%)。また、Y9-R15 はドメイン検索プログラム SMART による解析の結果、ジンクフィンガードメインに近い配列をもっていることがわかった。しかし、Y9-R7 の ORF と現在までに得られている Y9-R15 の配列は今回用いた野生株と高生産株のゲノム上で完全に同一であった。

2-3-5. 酵母 *S. cerevisiae* へのアスタキサンチン合成系酵素遺伝子 (*crtI*, *crtYB*, *crtS*) の導入

X. dendrorhous 野生株 (ATCC 24202) よりクローニングしたアスタキサンチ

ン生合成系酵素遺伝子(*crtI*、*crtYB*、*crtS*)を持つプラスミド pTV-*crtI*、pUV-*crtYB*、pHV-*crtS* を *S. cerevisiae* INVSc1 株に導入し、形質転換体を作製したが、形質転換体はカロテノイドの生産を示すようなコロニーの色を呈さなかった (Fig. 22a)。しかしながら、HPLC 解析の結果、*crtI* と *crtYB* を同時に導入した菌株 (I/YB、I/YB/S) で非常に微量ではあるが特有のピークが検出され、そのピークは標品との比較によりβ-カロテンであることが示された (Fig. 22c)。また、アスタキサンチンの生産に必要と思われるすべての生合成系酵素遺伝子 *crtI*、*crtYB*、*crtS* を導入した形質転換体 (I/YB/S) においても、β-カロテンのピークしか検出できず、アスタキサンチンのピーク (保持時間 8.6 分) は確認できなかった。

2-3-6. *BTS1* (GGPP 合成酵素遺伝子) の導入によるカロテノイド合成系の強化

確認されたβ-カロテンのピークの量から考察すると、アスタキサンチンの量が微量であり、HPLC の検出限界以下であったという可能性が考えられた。そこで、カロテノイド合成系の出発物質である GGPP の量を増加させ、生産されるカロテノイドの総量を増やすことを目的に、*S. cerevisiae* 由来の GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1* (Jiang *et al.*, 1995) を *ADH1* プロモーターの制御下で構成的に発現させた。その結果、*crtI*、*crtYB*、*BTS1* を同時に導入した形質転換体 (I/YB/*BTS1*) は、コロニーの色が明らかな黄色を示した (Fig. 23a)。この形質転換体の HPLC 解析の結果を *crtI* と *crtYB* のみを発現させた形質転換体 (I/YB) と比較すると、ピーク面積や検出されるピーク数が増加しており、*BTS1* を構成的に発現させることでβ-カロテン量を約 22 倍にまで増加させることができた (4.5 → 100 μg/g 乾燥菌体重) (Fig. 23c)。また、β-カロテンを示すピークの他にもピークが検出され、その 1 つは標品との比較によりリコペンであることが示された。しかしながら、*crtI*、*crtYB*、*crtS*、*BTS1* を導入した形質転換体 (I/YB/S/*BTS1*) においても、アスタキサンチンの生産を示すピークは見られなかった。

2-3-7. 導入遺伝子の発現解析

これまでの結果から、β-カロテンからアスタキサンチンへの変換が行われていないことが明らかとなり、この反応を触媒する *crtS* 遺伝子が発現していない、またはその翻訳産物が機能していないという可能性が考えられた。

そこで、導入遺伝子 *crtI*、*crtYB*、*crtS*、*BTS1* の *S. cerevisiae* 内での発現を確認するため、導入遺伝子と EGFP の融合タンパク質を発現させるプラスミドを構築し、抗 GFP 抗体による導入遺伝子の発現解析を行った。その結果、4 つの遺伝子を導入した株すべてで予想された分子量と一致するバンドが確認され

た (Fig. 24)。

2-3-8. *NCPI* の構成的発現による *CrtS* の機能化

すべての導入遺伝子 *crtI*、*crtYB*、*crtS*、*BTS1* が形質転換体内で発現していることが確認されたことから、形質転換体においてアスタキサンチンが生産されない原因は、発現した *CrtS* が酵素として機能していないことであると考えられた。

*CrtS*はその推定一次構造に、ヘム結合サイトや酸素結合ポケットなどのよく保存された領域を持つことからシトクロームP450 3A サブファミリーに属すると考えられている (Ojima *et al.*, 2006)。シトクローム P450酵素は、一般的に自身を還元するシトクロームP450還元酵素と共役して働くことが知られており (van den Brink *et al.*, 1998) (Fig. 25)、そのため、*CrtS*を機能発現させるためにはP450還元酵素の共発現が必要であると推測されるが、*S. cerevisiae*はP450還元酵素Ncp1を持つことが知られている (Yabusaki *et al.*, 1988)。それにもかかわらず、*CrtS*が*S. cerevisiae*の細胞内において機能できない理由として、[1] Ncp1の細胞内の存在量が少ないために内在性のシトクロームP450酵素に独占され、*CrtS* がうまく機能できていない、[2] Ncp1と*CrtS*が細胞内で共役できない位置に存在している、[3]基質となる β -カロテンと*CrtS*が反応できる位置にない、[4]酵母のNcp1では*CrtS*を活性化できない、という4つの可能性が考えられた。

そこでまず、*S. cerevisiae*の*NCPI*を形質転換体 (I/YB/S/BTS1) に新たに導入し、*ADHI* プロモーターの制御下で構成的に発現させた。導入した*NCPI*の発現は、EGFP タグを用いたウェスタン解析により確認した (Fig. 24)。作製した形質転換体 (I/YB/S/BTS1/NCPI) をHPLCにより解析した結果、そのクロマトグラムは*NCPI*を導入していない形質転換体のものと同様で、 β -カロテン、リコペンの生産を示すピークは検出できたが、アスタキサンチンの生産を示すピークを検出することはできなかった (Fig. 26b)。

2-3-9. 導入遺伝子産物の局在性の解析

Ncp1の存在量は*CrtS*が酵母内で機能できない原因ではないことが分かったので、次に、Ncp1と*CrtS*が細胞内で共役できない位置に存在している可能性を調べた。Ncp1は小胞体に局在することが知られ、また、*S. cerevisiae*細胞内でNcp1と共役して働くとされている内在性のシトクローム P450 Erg11 (Ott *et al.*, 2005) も小胞体に局在することが知られていることから、*CrtS*においても小胞体に局在することが機能化に必要であると考え、*S. cerevisiae*細胞内での*CrtS*とNcp1の局在性を、EGFPとそれぞれの遺伝子の融合タンパク質を発現する形質転換体を用いて、蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、Ncp1-EGFP は細い円形の線状の蛍光パターンを示し、小胞体膜の選択的染色試薬である ER Tracker と類似した蛍光パターンを示したことから、Ncp1 は小胞体に局在していることが確認された (Fig. 27)。一方、CrtS-EGFP は Ncp1 と類似した蛍光パターンを示す細胞 (Fig. 27、CrtS-GFP(1)) と、細胞質の中で数箇所に塊っているような蛍光パターンを示す細胞 (CrtS-GFP(2)) の 2 種類が確認でき、Ncp1 ほど明確ではないものの、少なくとも CrtS の一部は小胞体に存在し、Ncp1 と共役できる位置にあると考えられた。

また、その他の導入遺伝子産物についても同様に解析をした結果、CrtI-GFP は、細胞内での詳細な局在場所はわからないが、細胞質の中で数箇所に塊って点在していた。CrtYB-GFP は細いライン状で円形の蛍光パターンを示し、ER Tracker と類似した蛍光パターンを示したことから CrtYB は小胞体に局在していると考えられた。Bts1-GFP は細胞質全体が光っていることから、細胞質全体に存在していると思われた。しかし、細胞質の中でも特に濃く光っている所があり、局所的な凝集も考えられた。

2-3-10. 電子顕微鏡による形質転換体の観察

次に、*S. cerevisiae* 細胞内において合成された β -カロテンがどこに蓄積され、そしてそれが CrtS と反応できる場所なのかを確認するため、コントロールベクターのみを導入した株と *crtI*、*crtYB*、*crtS*、*BTS1* を導入した β -カロテンを蓄積する形質転換体 (I/YB/S/BTS1)、さらに *X. dendrorhous* Y989 株 (野生株) と Y2238-10IL 株 (アスタキサンチン高生産株) の細胞を電子顕微鏡により観察し、比較した。

その結果、 β -カロテン生産株 (I/YB/S/BTS1) において、カロテノイド非生産株には見られない、電子密度の高い特徴的な粒子状の塊が細胞質全体に確認できた (Fig. 28b)。サンプルはオスミウムにより染色されているため、電子密度の高い部分 (色の濃い部分) ほど疎水性が高い部分ということになる。サンプルに用いた菌株の違いは、カロテノイド生産の有無のみであると考えられ、またカロテノイドは炭素数 40 からなる疎水性の高い物質であることから、黒い粒状の物質は生産されたカロテノイドと予想された。また、*X. dendrorhous* の野生株と高生産株の比較においてもやはり高生産株の方に黒い塊が多く観察された (Fig. 28c, d)。この粒状の物質がカロテノイドであるとすると、生産されたカロテノイドは、細胞内で特別な組織に蓄積するのではなく、細胞質内で小さな固まりとなって存在しているのではないかと考えられた。また、カロテノイド生産株の方が細胞膜の電子密度が高いことから、生産されたカロテノイドは細胞膜にも存在すると考えられた。

2-3-11. *X. dendrorhous* 由来 P450 還元酵素 *crtR* の導入

電子顕微鏡観察の結果から、カロテノイドは細胞質全体に存在する予想されたが、*CrtS* と同様に小胞体に局在していた β -カロテン合成を触媒する *CrtYB* が、その反応を行えていることから、この基質の局在性も *CrtS* が機能しないことの理由ではないと考えた。

これまでの結果から、前述の *CrtS* が機能しない 4 つの可能性、[1]、[2]、[3] の可能性は低いということが分かったので、[4]の酵母の *Ncp1* では *CrtS* を活性化できないという可能性を確かめるために、*X. dendrorhous* 自身の P450 還元酵素をスクリーニングしようかと考えていたところ、昨年 10 月に *X. dendrorhous* の P450 還元酵素が発見されたという報告があった (Alcaíno *et al.*, 2008)。そこで、この論文で見いだされた *X. dendrorhous* 由来の P450 還元酵素をコードする *crtR* を Y989 株からクローニングし、*crtI*、*crtYB*、*BTS1*、*crtS* を持つ β -カロテン蓄積株 (*I/YB/S/BTS1*) に導入した。同時に発現確認用プラスミドも作製し、ウェスタン解析の結果、その発現が確認され、また蛍光顕微鏡観察の結果から、発現した *CrtR* は小胞体に局在していると考えられた (Fig. 29a, b)。得られた形質転換体の色は β -カロテン蓄積株 (*I/YB/BTS1*) と変わらないように見えたが (Fig. 30a)、HPLC 分析の結果、微量ではあるが、 β -カロテン蓄積株 (*I/YB/S/BTS1*) とは明らかに異なるピークがいくつかクロマトグラム上に観察され、その中の保持時間 8.6 分付近に観察されたピークはアスタキサンチンのものと思われた (Fig. 30c)。

2-3-12. 細菌由来カロテノイド生合成遺伝子 *crtZ*、*crtO*、*crtW* の導入

X. dendrorhou 由来のアスタキサンチン合成酵素 *CrtS* の機能化を目指す一方で、すでに異種生物でも機能化の報告が多数ある *Pantoea ananatis* 由来の β -カロテンヒドロキシル化酵素をコードする *crtZ*、*Synechocystis* sp.由来の β -カロテンケト化酵素をコードする *crtO*、および *Paracoccus* sp.由来の β -カロテンケト化酵素をコードする *crtW* を用いたアスタキサンチンの生産も試みた。

crtI、*crtYB*、*BTS1* を導入した β -カロテン蓄積株 (*I/YB/BTS1*)に pHV-*crtZ*、pHV-*crtO*、pHV-*crtW*、そしてヒドロキシル化酵素とケト化酵素を組み合わせ発現させるためのタンデムベクターpHV-*crtZ-crtO*、pHV-*crtZ-crtW* をそれぞれ導入した結果、それぞれの形質転換体は β -カロテン蓄積株とは異なる色を示し、その色は 30°C で培養した時よりも、20°C で培養した時の方が濃かった (Fig. 31)。また発現確認用プラスミドを作製し、蛍光顕微鏡観察を行った結果、*CrtZ*、*CrtW* は小胞体に局在していると考えられ、*CrtO* は細胞質内に塊となって存在していると考えられた (Fig. 32)。HPLC 分析の結果、*crtZ* を導入した株 (*I/YB/BTS1/Z*) においては新しいピークが観察され、その主要ピークは標品と

の比較の結果、 β -カロテンに2つのヒドロキシル基が付加された構造のゼアキササンチンのピークと考えられた (Fig. 33)。しかし、*crtO* を導入した株 (I/YB/BTS1/O) では新しいピークは観察されなかった。一方で *crtW* を導入した株 (I/YB/BTS1/W) では新しいピークが検出され、標品との比較の結果、その主要な2つのピークは、 β -カロテンにそれぞれケト基が一つと二つ付加された構造の、エキネノンとカンタキササンチンであると考えられた。また、*crtZ*、*crtO* を導入した株 (I/YB/BTS1/Z/O) では、*crtZ* のみを導入した株 (I/YB/BTS1/Z) と同様のピークしか観察されなかったが (Fig. 34)、*crtZ*、*crtW* を導入した株 (I/YB/BTS1/Z/W) では (I/YB/BTS1/Z) や (I/YB/BTS1/W) で見られたピークに加え、目的としていたアスタキササンチンのピークを検出することができた。

2-3-13. カロテノイド生産株のストレス感受性テスト

本研究で作製した、アスタキササンチンのみならず、種々のカロテノイドを蓄積する酵母形質転換体を用いて、その蓄積されたカロテノイドが宿主酵母にストレス耐性を付与するかどうかを検討した。

その結果、UV 照射、エタノール添加による影響は各形質転換体間であまり見られなかったが、過酸化水素添加培地では形質転換体ごとに生育に差が見られ、カロテノイドを蓄積しないコントロール株と比較して、主としてゼアキササンチンを蓄積する株 (I/YB/BTS1/Z)、エキネノンとカンタキササンチンを蓄積する株 (I/YB/BTS1/W)、それらに加えてアスタキササンチンを蓄積する株 (I/YB/BTS1/Z/W) は 1.7 mM の過酸化水素に耐性を示した (Fig. 35)。このことから酵母においても細胞内に蓄積されたカロテノイドは宿主に酸化ストレス耐性を付与することが明らかとなった。一方で主として β -カロテンを蓄積した株 (I/YB/BTS1) は、コントロールよりも過酸化水素に感受性となっていた。

2-4. 考察

2-4-1. *X. dendrorhous* 野生株と高生産株の比較

本論文第1章で用いたアスタキササンチン非生産性変異株、Y9W 株、Y9Y 株はそれぞれ、*crtYB*、*crtS* 上の1塩基置換に基づくアミノ酸置換を起こしていることが確かめられており、アスタキササンチンの合成不能はこれらがコードする合成各酵素の機能不全あるいは欠失によるものであると考えられた。このように、当初アスタキササンチン高生産変異株の変異点もアスタキササンチン合成系酵素遺伝子上にあると予想していたが、実際には高生産株のそれらの配列は親株のものと完全に一致しており、変異は他の個所に起きたものであることが明ら

かとなった。また、今回のアスタキサンチン合成遺伝子の配列比較の結果から、異なる系統の株ではその機能に影響は無いと思われるものの、各酵素のアミノ酸配列に多少の差異があることがわかった。このことから、より多くの系統の配列を解析すれば、他生物の酵素との比較とは別の視線で、各酵素の機能ドメイン、触媒活性部位などに関する知見が得られると考えられる。

アスタキサンチン生合成系酵素遺伝子群の転写解析の結果、用いた2つの系統の株に共通して、野生株では定常期において *crtS* の転写量が減少する一方、高生産変異株ではその転写量が維持されていることが明らかとなり (Fig. 18)、このことが、高生産株が定常期においてもアスタキサンチンを蓄積し続ける一方、野生株では蓄積量が伸びず、培養後期になるほど野生株と高生産株とのアスタキサンチン蓄積量の差が広がる原因であると考えられた (Fig. 17)。 *X. dendrorhous* のアスタキサンチン生合成系酵素遺伝子の転写制御に関する論文は少ないが、2007年に発表された論文の中で高生産株では野生株と比較して培養後期でも *crtS* の転写量が維持されるという今回の実験結果を支持する結果が報告された (Lodato *et al.*, 2007)。その一方で、実験に用いた系統の一方では定常期において野生株の *crtE* の転写量が増大したり、また他方では定常期において高生産株の *crtI* の転写量が増大したりと、同種の、同様の表現型を示す株においてもその遺伝子の転写制御は異なっている可能性も示唆された。

2-4-2. アスタキサンチン合成酵素遺伝子 *crtS* の転写因子の探索

今回実験に用いた野生株と高生産株では *crtS* の上流 1,200 bp、下流 300 bp までは、完全に同一であることが確かめられており、アスタキサンチン生合成の亢進が *CrtS* 自身の変異、あるいは上流配列の変異による転写因子結合能の変化などによるものではないと考えられる。このことから変異は *crtS* の転写を制御する転写因子に起きたものであると予想し、*crtS* の上流配列に結合するタンパク質の候補として今回 Y9-R7 という ORF をクローニングした。この Y9-R7 の ORF は *Cryptococcus neoformans* の Rds1 と非常に高い相同性を持っていた (Fig. 21)。Rds1 は *Schizosaccharomyces pombe* において、アデニンの欠乏、栄養飢餓、高温、高炭酸ガス環境などによりその転写量が増大するということが知られているが、実際の機能などについてはいまだに解明されていない (Ludin *et al.*, 1995)。しかし、そのような環境の変化に対して転写が亢進されることから、何かしらのストレス応答に関わっていることが予想される。緒言でも述べた通り、種々のカロテノイド生合成生物において、ストレスに応答してカロテノイド蓄積量が上昇することが知られており、また *X. dendrorhous* においても酸化ストレスに応答してアスタキサンチン蓄積量が上昇することから、Y9-R7 ORF の翻訳産物と *crtS* の転写制御との関係は非常に興味深い。また同様に候補とし

て選抜された Y9-R15 はその配列内にジンクフィンガーに近い配列が観察され、DNA 結合能をもつタンパク質として期待される。ただし、Y9-R7 の ORF と、現時点までに明らかとなっている Y9-R15 の部分配列は、今回用いた野生株と高生産株のゲノム上で完全に同一であり、これらが *crtS* の転写因子であったとしても、高生産株に見られるアスタキサンチンの高生産性はこれらの高機能化によるものではない。これ以降、Y9-R15 の全長解析、ゲルシフトアッセイによる両タンパク質の *crtS* 上流配列への結合能の確認、またβ-ガラクトシダーゼ活性を指標としたレポーターアッセイによる転写活性化能の確認などを行い、アスタキサンチン高生産性との関わりを調べていく予定である。

2-4-3. *X. dendrorhous* 由来アスタキサンチン生合成酵素を用いた *S. cerevisiae* でのアスタキサンチン生産とその反応機構の解析

crtI、*crtYB* の導入により形質転換体はβ-カロテンを蓄積したが、その量は微量であった (Fig. 22)。そこで当研究室で過去に行われた *S. cerevisiae* のマイクロアレイの結果を調べてみると、GGPP 合成酵素遺伝子 *BTS1* の転写量はその前段階の反応を触媒する FPP 合成酵素遺伝子 *ERG20* よりも 7 倍程度低く、また、*BTS1* が触媒する反応と競合する、FPP からスクアレンへの変換を触媒するスクアレン合成酵素遺伝子 *ERG9* よりも 5 倍程度低いことが分かった。このことから *BTS1* の転写量が低いことがβ-カロテンの蓄積量が少ないことの原因だと判断し、*BTS1* を構成的に発現させた結果、その蓄積量は約 22 倍も増加した (Fig. 23)。しかし、残念なことに、この実験を行っている最中の 2007 年に本論文と同様の手法で *S. cerevisiae* でのβ-カロテン高生産に成功したという報告があり、そのβ-カロテン蓄積量は本論文の結果よりも多いものであった (Verwaal *et al.*, 2007)。しかし、このβ-カロテンの量を 22 倍に増加させることができ他という結果は、今までに蓄積された *S. cerevisiae* のデータが実際の分子育種に生かされた結果であり、これ以降もこのようなデータをもとにボトルネックを解消していくことで、さらなる高生産株の分子育種が可能であると考えられる。

今回使用した *X. dendrorhous* のアスタキサンチン生合成酵素遺伝子のうち、*crtI* と *crtYB* については、すでに大腸菌での発現と機能確認が行われていた。一方、ほぼ同時に 2 つのグループによってβ-カロテンからアスタキサンチンへの変換を行う酵素として発見された *crtS* については、そのどちらのグループも *X. dendrorhous* のβ-カロテン蓄積変異株に *CrtS* を発現させることでその表現型を回復させることには成功していたものの、異種生物での発現には成功しておらず、その機能には疑問符が付いたままであった (Ojima *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2006)。今回の実験でもこの *CrtS* の機能化は困難を極めた。

ウェスタン解析により、すべての導入遺伝子の発現が確認され (Fig. 24)、さらに形質転換体が β -カロテンを蓄積していたことから (Fig. 23)、形質転換体がアスタキサンチンを生合成できない原因は、 β -カロテンからアスタキサンチンへの変換を行う CrtS の機能不全であることが強く示唆されていた。CrtS が機能しない理由として、*S. cerevisiae* 細胞内で CrtS が特異な部位に発現し、*S. cerevisiae* の内在性 P450 還元酵素 Ncp1 と共役できない、Ncp1 の発現量が少なく、内在性 P450 酵素との競合により CrtS と共役できない、発現部位の問題で基質である β -カロテンと接触できない、などの様々な理由が考えられ、それを確かめるために1つ1つ実験を行った。最終的にこれらの想定された原因はすべて排除され、*X. dendrorhous* の内在性 P450 還元酵素遺伝子である *crtR* の導入によって、*S. cerevisiae* 内において CrtS が機能化され、微量ではあるがアスタキサンチンが合成された (Fig. 30)。この結果は、*X. dendrorhou* 由来のアスタキサンチン生合成遺伝子を用いて異種生物でのアスタキサンチン合成に成功した初めての例であり、この結果をもって CrtS が β -カロテンのヒドロキシル化とケト化の両方の触媒活性をもっていることが初めて証明された。

しかし、まだ疑問は残る。*S. cerevisiae* の P450 還元酵素 Ncp1 は哺乳類のほぼすべての P450 酵素と共役できることが知られており (van den Brink *et al.*, 1998)、その特異性は非常に低いといえる。また *crtS* を発見したグループの一方は、 β -カロテンを生産する大腸菌に *crtS* を導入し、さらに *NCP1* を導入すると、 β -カロテンに2つのケト基が付加されたカンタキサンチンを生産したと報告していることから (Ojima *et al.*, 2006)、ここではなぜアスタキサンチンではなくカンタキサンチンなのかという疑問は残るが、CrtS は Ncp1 と共同で、完全ではないにしろ機能できると考えられる。しかし、今回の実験ではたとえ Ncp1 の発現量を増加させてもアスタキサンチンは当然のこととしてカンタキサンチンも蓄積されなかった (Fig. 26)。これは、蛍光顕微鏡観察の結果からは、一部の CrtS が小胞体に局在しているように観察されたが (Fig. 27)、やはりそれはアスタキサンチンを合成するには少なすぎ、そのほとんどが機能できない場所に発現していたからではないかと考えられる。またウェスタン解析の結果から CrtS の存在量自体が他の導入酵素に比べて少ないことも読み取れ (Fig. 23)、これにより小胞体に移行できなかった CrtS が細胞内で分解されている可能性も考えられた。 β -カロテン蓄積株 (I/YB/BTS1/S) に *crtR* を導入した際に蓄積されたアスタキサンチンの量が少量であったことも (Fig. 29)、CrtS の存在量が少なく、その中でも機能化できた CrtS がさらに微量であったことが原因であると思われる。この問題を解決するためには *S. cerevisiae* ですでに明らかになっている小胞体移行シグナルを CrtS に付加するなどの局在性を変える試みが必要であると考えられる。また上述の大腸菌での実験でカンタキサンチン

が蓄積されたことから、やはり Ncp1 では CrtS の機能を完全に引き出せないことも予想される。CrtS は β -カロテンのヒドロキシル化とケト化を行うが、その活性中心と思われる場所は配列情報から推測すると一つしかないことから、その反応機構は一酸素原子付加であると考えられる。Ojima らの考察によると、この一酸素原子付加反応を3回繰り返すことで片方の末端にケト基とヒドロキシル基を付加できると考えられている (Fig. 36)。*X. dendrorhous* の P450 還元酵素 CrtR と *S. cerevisiae* の P450 還元酵素 Ncp1 の相同性は 38% (identity = 273/706, BLASTP score = 459) と比較的低い、その機能ドメインは高度に保存されている。これらのことから、Ncp1 では機能ドメイン以外の配列の差により CrtS との相互作用に問題が生じ、その結果 Ncp1 から CrtS への電子伝達に支障をきたし、その反応が途中までしか進まなかったとも考えられる。しかし *crtS* を発見したグループの他方は、 β -カロテン生産菌である糸状菌 *Mucor circinelloides* に *crtS* を導入するとアスタキサンチンではなく β -カロテンに2つのヒドロキシル基が付加されたゼアキサンチンを蓄積したと報告している (Álvarez *et al.*, 2006)。*M. circinelloides* 内ではその内在性 P450 還元酵素が CrtS と共役したと考えられるが、これらのことから CrtS による反応でケト基とヒドロキシル基のどちらが付加されるかはその還元酵素に由来する、という仮説も立てられるが、情報不足であり、今後の研究を待たなければならない。

今回の実験により CrtS を発現する *S. cerevisiae* という非常に優秀なツールを手に入れることができた。これ以降この CrtS の触媒活性部位などに変異を導入することにより、カンタキサンチン、あるいはゼアキサンチンなどの代謝中間体しか合成できない変異体を得ることができれば、この酵素による反応機構の解析に非常に有用であると考えられる。

2-4-4. 細菌のカロテノイド生合成遺伝子の導入によるカロテノイド生産

β -カロテンを蓄積する形質転換体 (I/YB/BTS1) に最近由来の β -カロテンヒドロキシル化酵素 CrtZ とケト化酵素 CrtW を発現させることによっても、アスタキサンチンを蓄積させることができた (Fig. 33, 34)。現在までに細菌の遺伝子を用いても *S. cerevisiae* でアスタキサンチンを蓄積させた例は無く、これも初めての報告となる。

本来の *S. cerevisiae* の至適培養温度は 30°C であるが、カロテノイドを蓄積する形質転換体を 20°C と 30°C で培養した時のコロニーの色を比べると、明らかに 20°C で培養した時の方が色が濃かった (Fig. 30)。すべての導入遺伝子は *ADHI* プロモーターの制御下にあり、このプロモーターの活性が温度によって変わるとい報告は無いことから、これは発現した酵素の安定性が 30°C では悪くなるためと考えられる。実際、各遺伝子のホストである *X. dendrorhous* と、

Paracoccus sp.の至適培養温度はそれぞれ 18°C、25°C であり、このような、酵素のドナー生物と同様の温度で培養することがカロテノイドの生産には効果的であると考えられた。

これらの形質転換体は、HPLC で検出されたピークの面積から考えると、総カロテノイドの量ではすでに *X. dendrorhous* の野生株よりも多い量を蓄積していると考えられ、アスタキサンチンの高生産宿主として非常に優秀であると言える。しかし、まだ中間代謝産物であるβ-カロテンが多く蓄積されていること、培養途中で色が抜けてしまうコロニーがあることから、高発現プロモーターの使用や、各遺伝子の酵母ゲノムへの組込みによる安定性向上などを通して、更なる変換効率の向上を目指す必要がある。また、蓄積されるエキネノン、カンタキサンチンの量に比べて、ゼアキサンチンの量が少ないことから、*CrtW* と比較して *CrtZ* の活性が低いことも読み取れる。このことから今回非常に強い活性を示している *CrtW* のドナーである *Paracoccus* sp.由来の *CrtZ* に切り替えるなどの方法も有効であると考えられる。さらに、すでに高発現させることでカロテノイド合成の向上に効果があると報告されている、IPP イソメラーゼ (Misawa & Shimada., 1998) や、メバロン酸経路内の HMG-CoA 還元酵素 (Wang & Keasling *et al.*, 2002) の高発現に取り組み、アスタキサンチンの高生産を目指す予定である。すでに、前述の *S. cerevisiae* のマイクロアレイのデータから、*S. cerevisiae* の HMG-CoA 還元酵素遺伝子 *HMG1* もその転写量が低いことが分かっている。また、酵母においては IPP の合成はメバロン酸経路で行われていることが知られているが、大腸菌ではメリルエリスリトールリン酸 (MEP) を中間代謝産物とする MEP 経路で合成されている。この違いを利用し、大腸菌にメバロン酸経路のすべての遺伝子を導入し、メバロン酸経路を移植した結果、リコペンを生産する大腸菌形質転換体において、リコペン生産量を 11.8 倍に増やしたという報告があることから (Harada *et al.*, 2009)、この方法の逆を行い酵母に MEP 経路を移植するということがアスタキサンチンの高生産につながると考えられる。

また、*crtZ* 導入株ではゼアキサンチンの蓄積により、β-カロテンのピークが減少しているが、*crtW* 導入株ではカンタキサンチンやエキネノンのピークが上昇してもβ-カロテンのピークは減少しなかった (Fig. 33, 34)。これはゼアキサンチンの蓄積によりβ-カロテンよりも上流の酵素がフィードバック阻害を受けた可能性を示している。またカンタキサンチンやエキネノンにはそのような効果が無いことも示唆される。今回用いた HPLC の検出波長は 470 nm であり、ゼアキサンチン蓄積形質転換体のクロマトグラムではゼアキサンチンとβ-カロテン以外に目立ったピークは現れていないことから、フィードバック阻害によって蓄積している物質は 470 nm の吸収を持たない物質、つまり、共役二重

結合の少ない、リコペンよりも上流の物質であると予想される (Fig. 2, 序論参照)。現段階ではフィードバック阻害を受けるのが、導入した CrtI、CrtYB なのか、あるいはさらに上流の *S. cerevisiae* 内在性の酵素なのかは分からないが、もし *X. dendrorhous* 由来の CrtI、CrtYB であれば *X. dendrorhous* 内での β -カロテンからアスタキサンチンへの変換経路ではゼアキサンチンを通らない、つまり、先にケト化が起こるという予想を立てることができ、またもし *S. cerevisiae* 内在性の酵素であったとすれば *S. cerevisiae* の中にゼアキサンチンという本来在り得ない物質に対する応答機構があるということで非常に興味深い。この点を明らかにするためにはリコペンよりも上流の中間代謝産物の解析が必要である。

2-4-5. 各種カロテノイド蓄積による酸化ストレス耐性の向上

今回の実験で得られた、カロテノイドを蓄積する形質転換体のストレス耐性をスポット試験により確認した結果、これまで報告されていた大腸菌やニンジンなどでの報告 (Tatsuzawa *et al.*, 2000; Jayaraj & Punja, 2008b) と同様に、酵母 *S. cerevisiae* においても蓄積されたカロテノイドは宿主に過酸化水素耐性を付与した (Fig. 35)。しかし、 β -カロテンを蓄積させた形質転換体 (I/YB/BTS1) は耐性を示さず、さらに、カロテノイドを蓄積しないコントロール株と比較して過酸化水素に感受性になっていた。このような、 β -カロテン蓄積株とその他のカロテノイド蓄積株との違いは蓄積したカロテノイドの抗酸化力の差によるものだと考えられた。これまでの報告から *in vitro* では β -カロテンよりも末端にヒドロキシル基やケト基が付加されたカロテノイドの方が抗酸化力が高いことが示されており、*in vivo* においてもその効果が示された結果であると考えられる。また β -カロテン蓄積株がコントロール株よりも感受性になった点については、GGPP合成酵素Bts1の構成的発現により、FPPからGGPPへの変換が亢進され、その結果エルゴステロールやキノンの原料となるFPPが不足し (Fig. 2)、細胞膜などの構成に支障をきたし、このことにより細胞外のストレスに弱くなったのではないかと推測される。元々 *S. cerevisiae* ではBTS1の転写量は低く抑えられていたので、その影響も大きかったと考えられる。その他のカロテノイド蓄積株は、細胞内に蓄積したカロテノイドによる細胞保護効果が上述のような障害を打ち消したのだと考えられ、この効果はさらに多くのカロテノイドを蓄積させることで強化されると考えられる。

今回カロテノイドを蓄積させることで酵母に酸化ストレス耐性を付与することができた。この知見は様々な発酵産業で利用されるストレス耐性酵母の育種に大きく貢献するであろう。

Table 4 Carotenoid production in wild, mutant, and transgenic organisms

Organism	Genes or conditions	Product	Amount (mg/g DW)	Reference
Yeasts				
<i>X. dendrorhous</i> ATCC24202	wild	astaxanthin	0.384	Moriel <i>et al.</i> , 2005
<i>P. rhodozyma</i> NTG-3-7	mutant	astaxanthin	0.73	Lewis <i>et al.</i> , 1990
<i>X. dendrorhous</i> JH1	mutant	astaxanthin	5.07	Kim <i>et al.</i> , 2005
<i>P. rhodozyma</i> UBV-AX	mutant	astaxanthin	7.2	US Patent 6015684
<i>C. utilis</i> IFO 0988	<i>Pn-crtE, B, I, Y, Ps-crtZ, W</i>	astaxanthin	0.4	Miura <i>et al.</i> , 1998
Algae				
<i>H. pluvialis</i> Flotow NIES-144	AcNa, Fe ²⁺ , high light (72 h)	astaxanthin	13.5	Steinbrenner & Linden, 2001
<i>H. pluvialis</i> SAG-19a	NaCl, AcNa, high light (216 h)	astaxanthin	24.5	Vidhyavathi <i>et al.</i> , 2008
<i>H. pluvialis</i> EU3	mutant (144 h)	astaxanthin	25	Chen <i>et al.</i> , 2003
Bacteria				
<i>E. coli</i> JM101	<i>Pn-crtE, I, B</i>	lycopene	0.228	Kajiwara <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> JM101	<i>Pn-crtE, B, I, Hp-ipi</i>	lycopene	1.029	Kajiwara <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> JM101	<i>Pn-crtE, B, I, Y, Hp-ipi</i>	β-carotene	1.310	Kajiwara <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> YBS125	<i>Eh-crtE, B, I, MVP, ΔackA-pta, Δnuo</i>	lycopene	4.28	Vadari <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> VJS676	<i>Ps-crtB, I, Y, Z, W, gps, idi</i>	astaxanthin	1.4	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> JM109	<i>Pn-crtE, B, I, Y, Z, Bv-crtW, MVP, Sc-idi, Rn-Aacl</i>	astaxanthin	1.47	Harada <i>et al.</i> , 2009
Higher plants				
Corn (<i>Zea mays</i> L.)	<i>Zm-psy1, Pn-crtl, Gl-lycb, Ps-crtW</i>	astaxanthin (endosperm)	4.46 ug/g DW	Zhu <i>et al.</i> , 2008
Potato (<i>Solanum phureja</i>)	<i>Hp-BKT</i>	astaxanthin (tuber)	13.9 ug/g DW	Morris <i>et al.</i> , 2006
Cattot (<i>Daucus carote</i> L.)	<i>Hp-BKT</i>	astaxanthin (leaf)	34.7 ug/g FW	Jayaraj & Punja., 2008b
Cattot (<i>Daucus carote</i> L.)	<i>Hp-BKT, At-chyB</i>	astaxanthin (loot)	91.6 ug/g FW	Jayaraj <i>et al.</i> , 2008a
Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Pn-crtY</i>	β-carotene (fluit)	286 ug/g DW	Wurbs <i>et al.</i> , 2007
Tobacco (<i>N. tabacum</i>) (Xanthi)	<i>Bv-crtW, Z</i>	astaxanthin (leaf)	5440 ug/g FW	Hasunuma <i>et al.</i> , 2008

The alphabets prefixed to each gene name represent the origin as follows: *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Bv*, *Brevundimonas* sp.; *Gl*, *Gentiana lutea*; *Hp*, *Haematococcus pluvialis*; *Pn*, *Pantoea ananatis*; *Pg*, *Pantoea agglomerans*; *Ps*, *Paracoccus* sp.; *Rn*, *Rattus norvegicus*; *Zm*, *Zea mays*.

The names of the gene products are as follows: *idi* and *ipi*, isopentenyl diphosphate isomerase; *crtE* and *Gps*, GGPP synthase; *crtl*, lycopene synthase; *crtB* and *psy1*, phytoene synthase; *crtY* and *lycb*, lycopene cyclase; *crtZ* and *chyB*, β-carotene hydroxylase; *crtW* and *BKT*, β-carotene ketolase; *MVP*, 6 genes encoding mevalonate pathway; *Aacl*, acetoacetate-CoA ligase; *ackA-pta* and *nuo*, the genes encode the enzymes involved in acetate production.

FW: flesh weight.

DW: dry weight.

Table 5 Primers used in this thesis.

Primer	Sequence (5'-3')	Reference (accession No.)
For real-time PCR		
actin F	tggccggtcgagacttga	X89898
actin R	agggatcctcgtccatca	
idi F	gcatcaaggcgagggtaaa	Y15811
idi R	ggacgcagctcgtcgaa	
crtE F	accgatacccatgctgtatt	A63889
crtE R	gcagaggagacggatgattga	
crtYB F	tggcccccctaca	AY177204
crtYB R	ggaagtaaaggcgaagaaggat	
crtI F	tggtatccgagaggagctt	AY177424
crtI R	tgttgcgttgacgatctg	
crtS F	ccgtatgtaaccgtgaatgc	AX034665
crtS R	tgaggctcggcaagtg	
For one-hybrid screening		
asy_up_F1_EcoRI	<u>gGA ATT C</u> ctgaatccgctgtgcat	
asy_up_R1_MluI	agcg <u>ACGCGT</u> acctgcgaataatgtcgtc	
asy_up_F2_EcoRI	<u>gGAATTC</u> ttcatcgacaactacggct	
asy_up_R2_MluI	agcg <u>ACGCGT</u> tccgtagtatcatcaagcc	
asy_up_F3_EcoRI	<u>gGAATT C</u> gggtggacagaatcagtagtg	
asy_up_R3_MluI	agcg <u>ACGCGT</u> gagcaagaccaagatgaaca	
pHIS2_MCS_UP	gctgcaagcggattaagtt	
pHIS2_MCS_LOW	catctttgccttcgtttatct	
pG7R2_cDNA_ampli_F	ctattcgatgatgaagataccc	
pG7R2_cDNA_ampli_R	aaattgagatggtgcacga	
pG7R2_cDNA_seq_F	taatacgactcactatagggcg	
pG7R2_cDNA_seq_R	agttgaagtgaaactgicgg	
For cloning of the genes for astaxanthin biocynthesis in <i>X. dendrorhous</i>		
crtI upper (RT-PCR)	acgc <u>GTCGAC</u> atgggaaaagaacaagatcagg	
crtI lower (RT-PCR)	aata <u>CCCGGG</u> tcagaaagcaagaacaccaac	
crtI lower (exp)*	aata <u>CCCGGG</u> gaaagcaagaacaccaacg	
crtYB upper (RT-PCR)	acgc <u>GTCGAC</u> atgacggctctcgcata	
crtYB lower2 (RT-PCR)	aata <u>CCCGGG</u> ttactgccctcccattcc	
crtYB lower (exp)*	aata <u>CCCGGG</u> ctgccctcccattccg	
ast upper2 (RT-PCR)	gaa <u>CTGCAG</u> atgttcattcttggcttgcctc	
ast lower (RT-PCR)	aata <u>CCCGGG</u> tcattcgcacggcttg	
ast lower (exp)*	aata <u>CCCGGG</u> ttcgaccggcttgacct	
crtR_start_F_HindIII	ccc <u>AAGCTT</u> atggccacctctccgat	EU884134
crtR_stop_R_SmaI	tcc <u>CCCGGG</u> ctaccgaccagactccatc	
crtR_nonstop_SmaI*	tcc <u>CCCGGG</u> cgaccagactccatca	
For cloning of genes derived from <i>S. cerevisiae</i>		
BTS1 up (PstI)	gaa <u>CTGCAG</u> atggaggccaagatagatg	AY692852
BTS1 low (SmaI)	aata <u>CCCGGG</u> tcacaattcgataaagtggt	
BTS1 low (exp)*	aata <u>CCCGGG</u> caattcggataaagtggtcta	
NCP1up (PstI)	gaa <u>CTGCAG</u> atgccgtttggaatagaca	AY693091
NCP1up (SmaI)	aata <u>CCCGGG</u> atgccgtttggaatagaca	
NCP1low (SmaI)	aata <u>CCCGGG</u> ttaccagacatcttcttggtatcta	
NCP1low (XhoI)	ccc <u>CTCGAG</u> ttaccagacatcttcttggtatcta	
NCP1 low (exp)*	aata <u>CCCGGG</u> ccagacatcttcttggtatcta	
For cloning of the genes for astaxanthin bioynthesis in bacteria		
crtZ_ure_F_PstI	aaaa <u>CTGCAG</u> atggttggtgattggaatg	D90087
crtZ_ure_R_SacI	aatt <u>GAGCTC</u> tcacttcccggatgog	
crtZ_ure_R_nonstop_SmaI*	tcc <u>CCCGGG</u> cttcccggatgogggct	
crtO_syne_F_PstI	aaaa <u>CTGCAG</u> atgatcaccaccgatgttg	BA000022
crtO_syne_R_SacI	aatt <u>GAGCTC</u> ttaccaaaaacgacgtgtgtgt	
crtO_syne_R_nonstop_SmaI*	tcc <u>CCCGGG</u> ccaaaaacgacgtgtgtgt	
crtW_para_F_PstI	aaaa <u>CTGCAG</u> atgagcgcacatgacct	AB206672
crtW_para_R_SacI	aatt <u>GAGCTC</u> tcatgcggtgtccccctt	
crtW_para_R_nonstop_SmaI*	tcc <u>CCCGGG</u> tgicgg	

The underlined sequences indicate the restriction site.

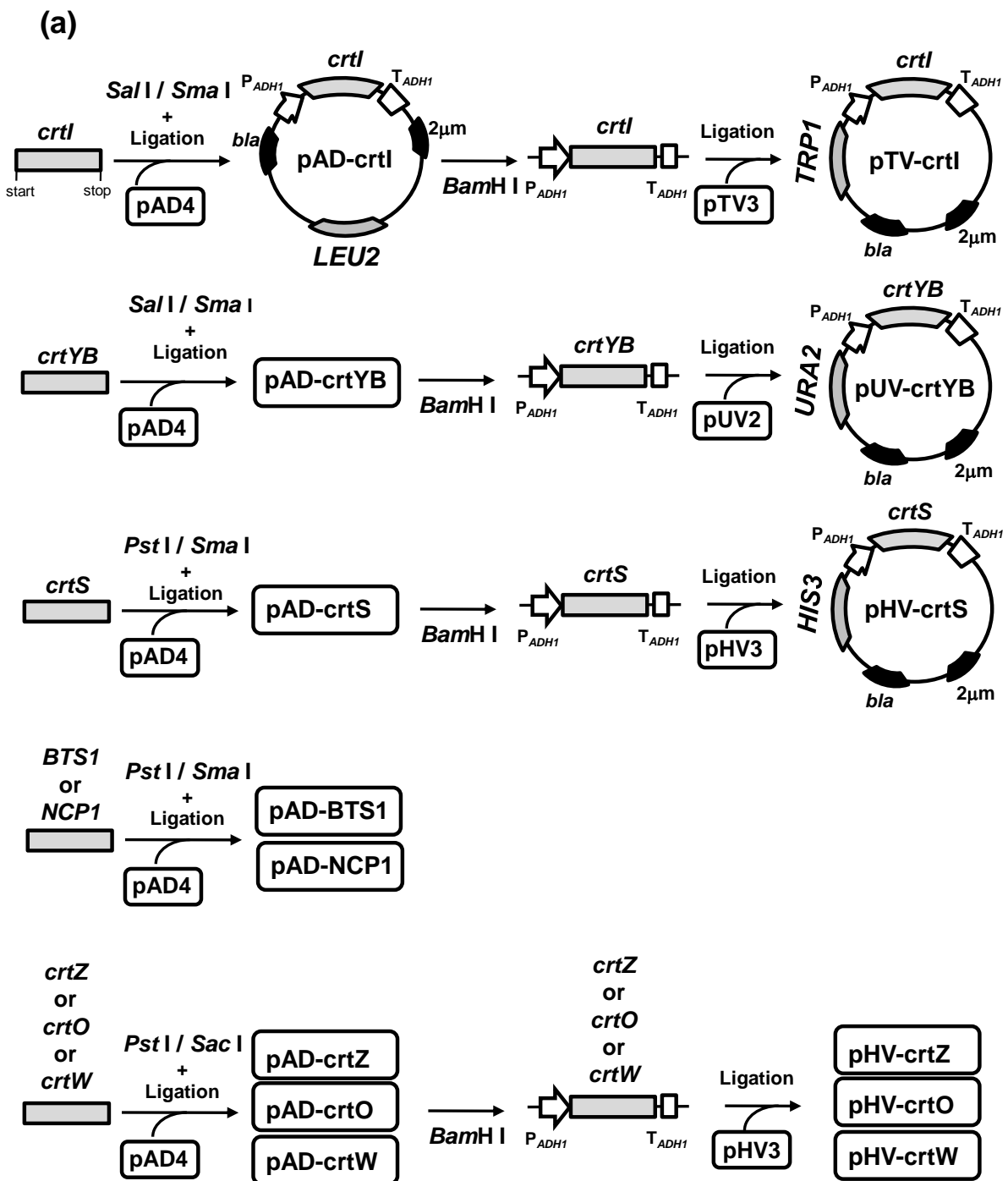


Fig. 16. Construction of yeast-expression vectors for the astaxanthin-synthetic genes.
 (a) Each of the astaxanthin-synthetic genes was introduced under *ADH1* promoter in a yeast-expression vector, pAD4.

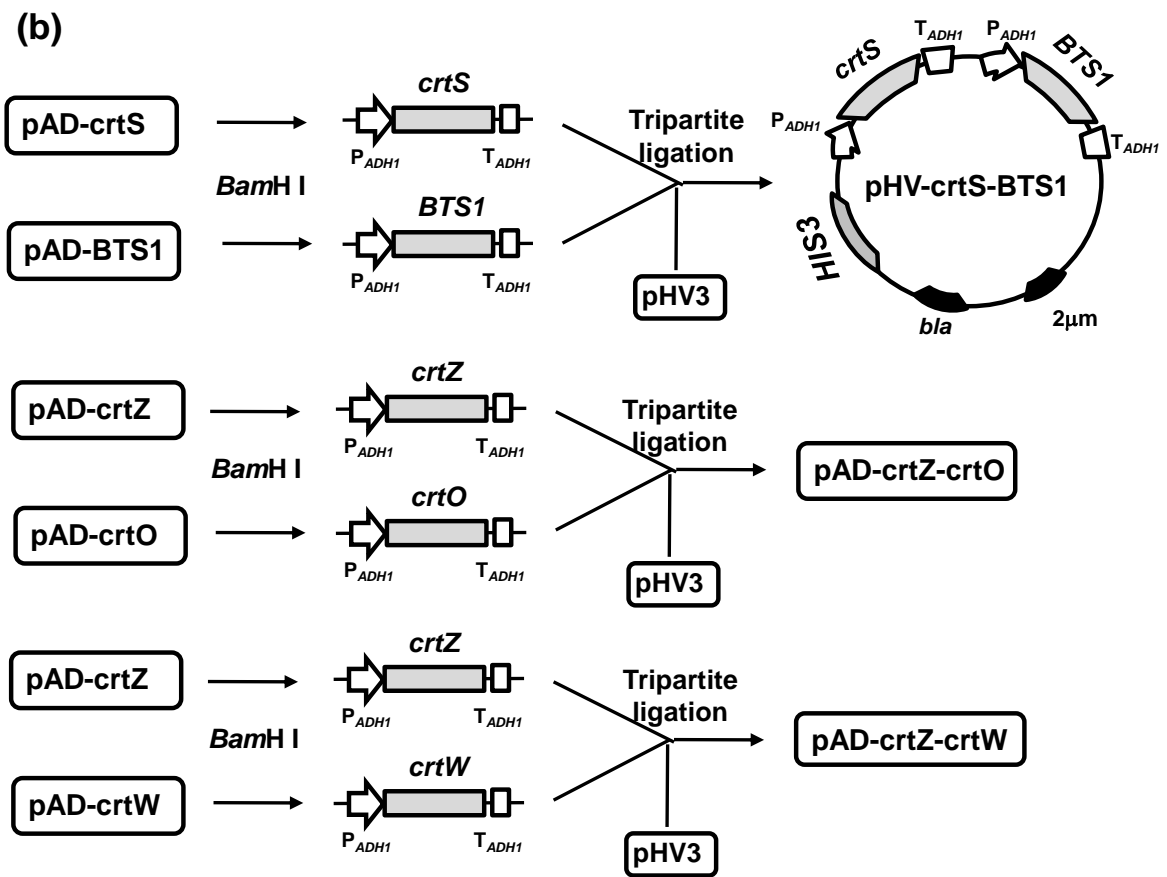


Fig. 16. Construction of yeast-expression vectors for the astaxanthin-synthetic genes (continued).

(b) Two of the astaxanthin-synthetic genes were introduced tandem to a yeast-expression vector, pHV3. Each of them were under *ADH1* promoter.

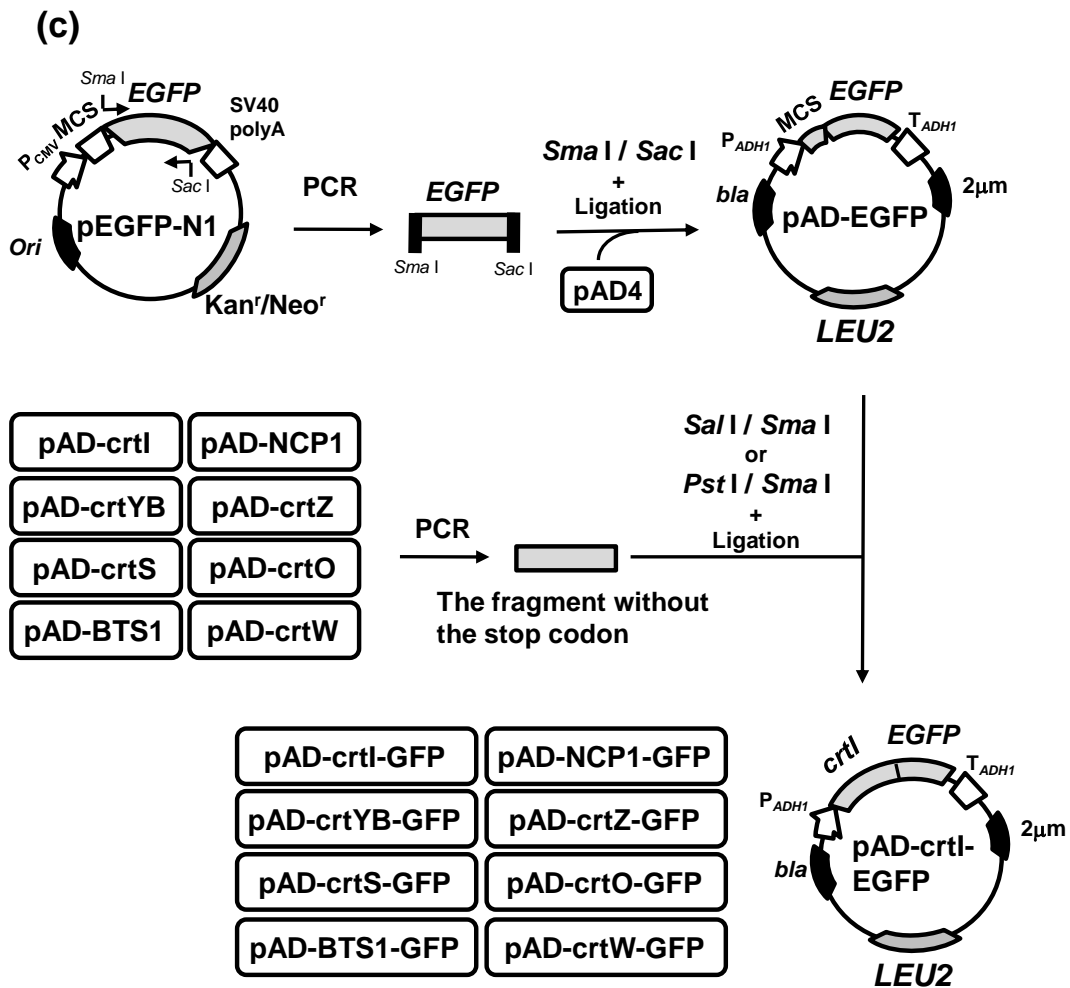


Fig. 16. Construction of yeast-expression vectors for the astaxanthin-synthetic genes (continued).

(c) Each of the astaxanthin-synthetic genes of which the stop codons were eliminated was connected to *EGFP* genes to construct the confirming vectors for their expression in *S. cerevisiae*.

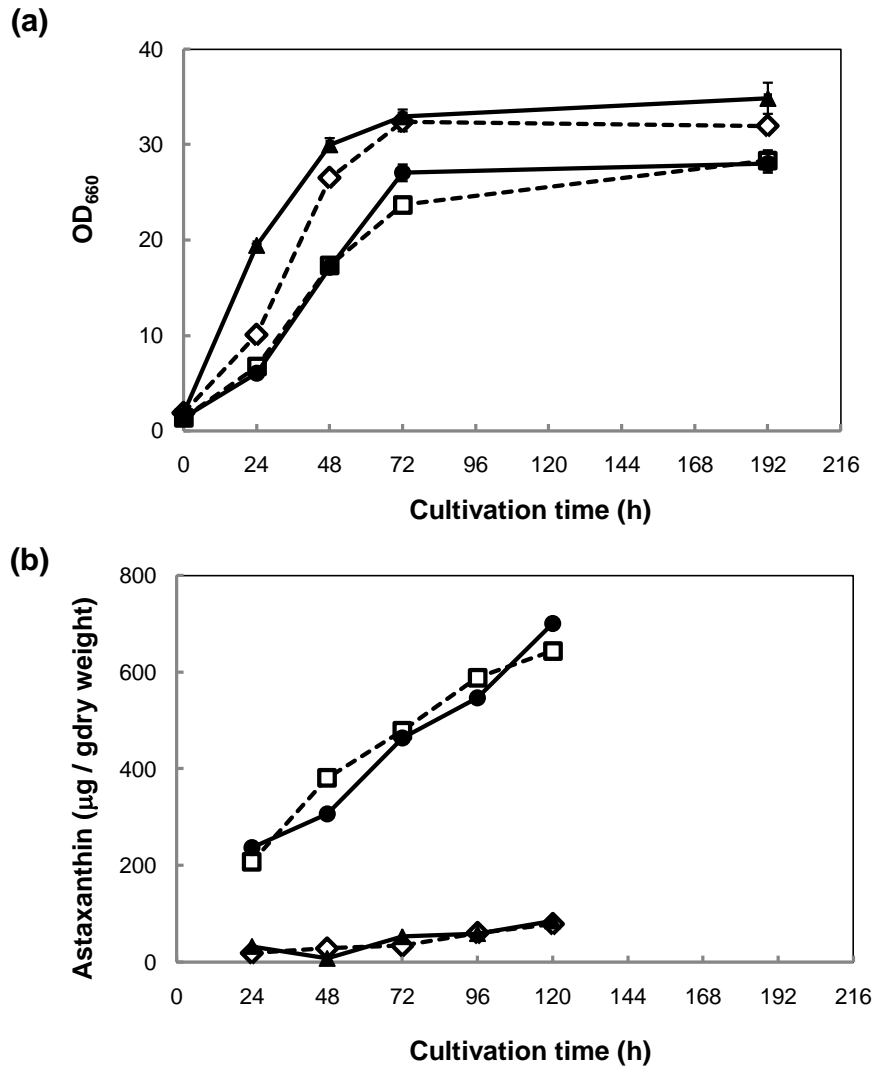


Fig. 17. Growth (a) and astaxanthin contents (b) of wild type strains (Y989, ATCC24202) and astaxanthin over-producing mutants (Y2238-10IL, ATCC66272).

20 ml of YMG medium was inoculated with 1 ml of 4-day preculture. For each strain, six set of the culture were prepared and one of them was used for analysis of growth and astaxanthin contents every 24 h. Symbols : ▲, Y989; ●, Y2238-10IL; ◇, ATCC24202; □, ATCC66272.

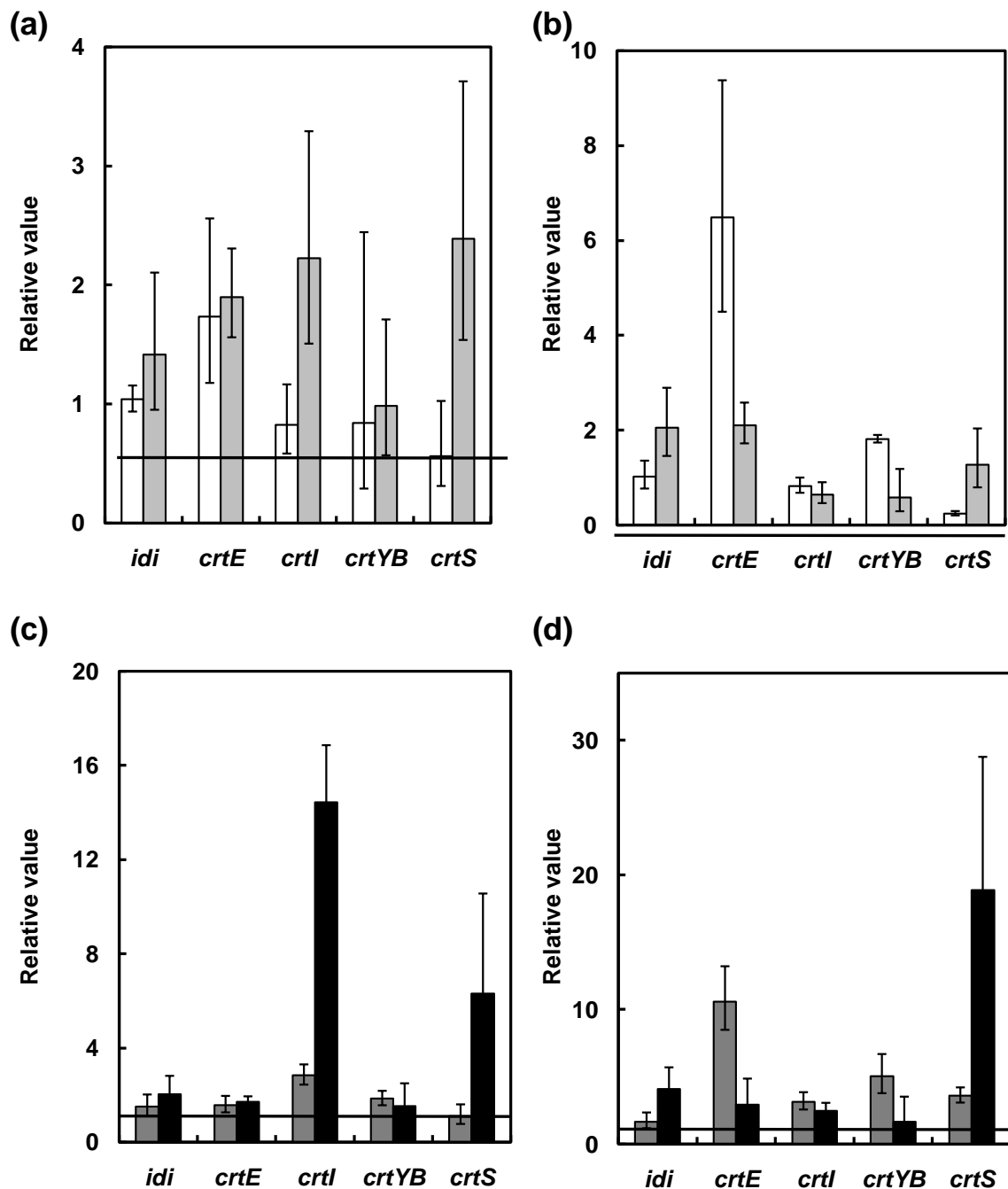


Fig. 18. Relative transcriptional levels of the genes involved in astaxanthin synthetic pathway.

Total RNA was prepared from the cells after cultivation at 20°C for 24 h and 72 h in YMG medium. (a) Relative transcriptional levels of Y989 (wild type, white bar) and Y2238-10IL (over-producing mutant, gray bar) at stationary phase compared to their transcriptional levels at log phase (= 1). (b) Relative transcriptional levels of ATCC24202 (wild type, white) and ATCC66272 (over-producing mutant, gray) at stationary phase compared to their transcriptional levels at log phase (= 1). (c) Relative transcriptional levels of Y2238-10IL at log (gray) and stationary phase (black) compared to transcriptional levels of Y989 at respective phase (=1). (d) Relative transcriptional levels of ATCC66272 at log (gray) and stationary phase (black) compared to transcriptional levels of ATCC24202 at respective phase (=1). The horizontal black bar indicate relative transcriptional levels is 1. The values were represent as the means and the error bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

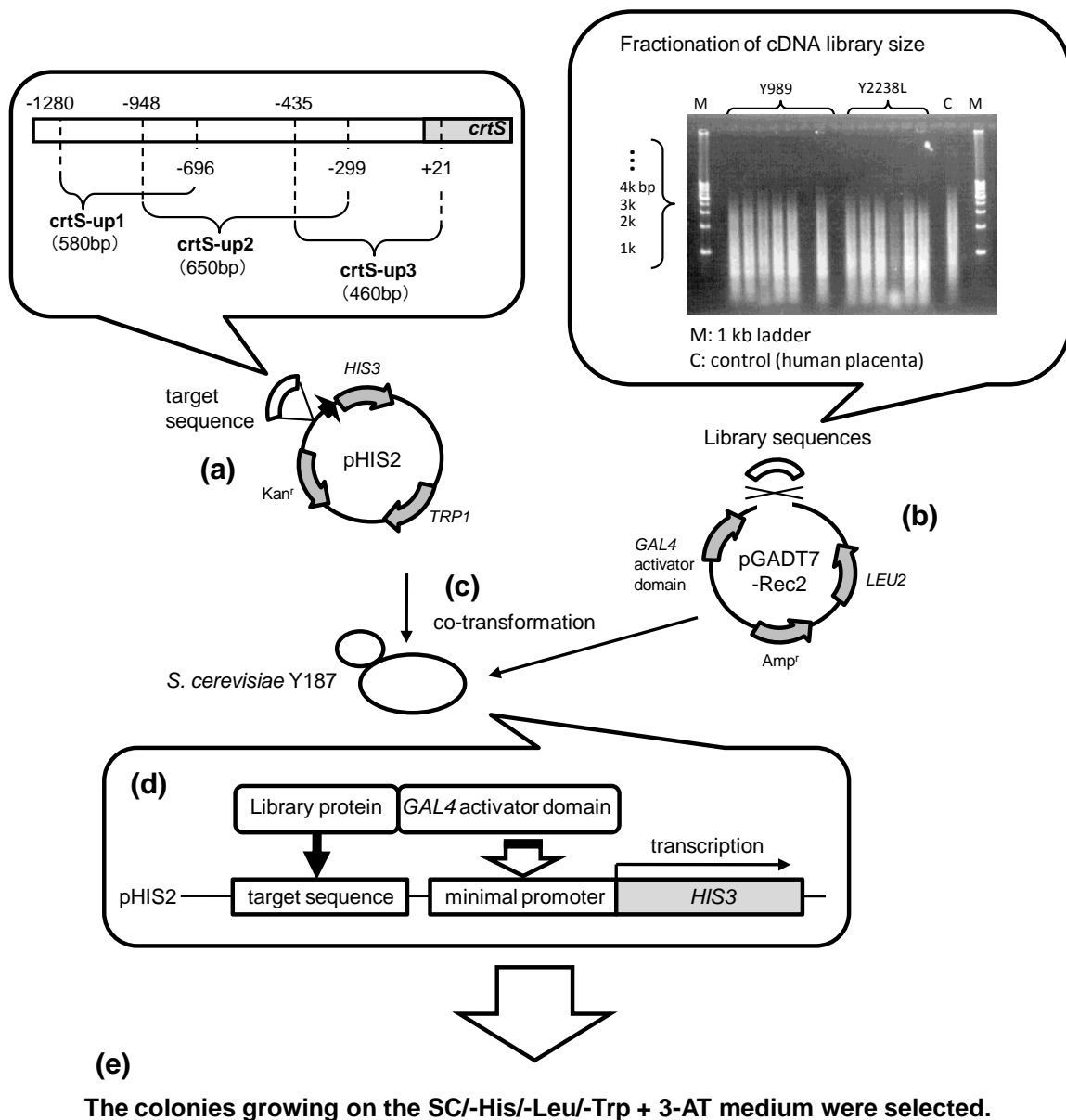


Fig. 19. Strategy of one-hybrid screening in this study.

(a) The 5'-noncoding regions of *crtS* (*crtS-up1*, *crtS-up2*, and *crtS-up3*) were cloned into the *pHIS2* vector. (b) cDNA libraries of Y989 and Y2238-10IL were constructed. (c) The reporter and the expression vectors and the library were co-introduced to *S. cerevisiae* Y187 cell. (d) If a library protein can attach to the target sequence inserted in *pHIS2*, *GAL4* activator domain fused to the library protein can enhance the transcription of *HIS3*. (e) The positive colonies were selected as those which could grow on SC medium without His, Leu and Trp, containing 3-AT by their *HIS3* expression.

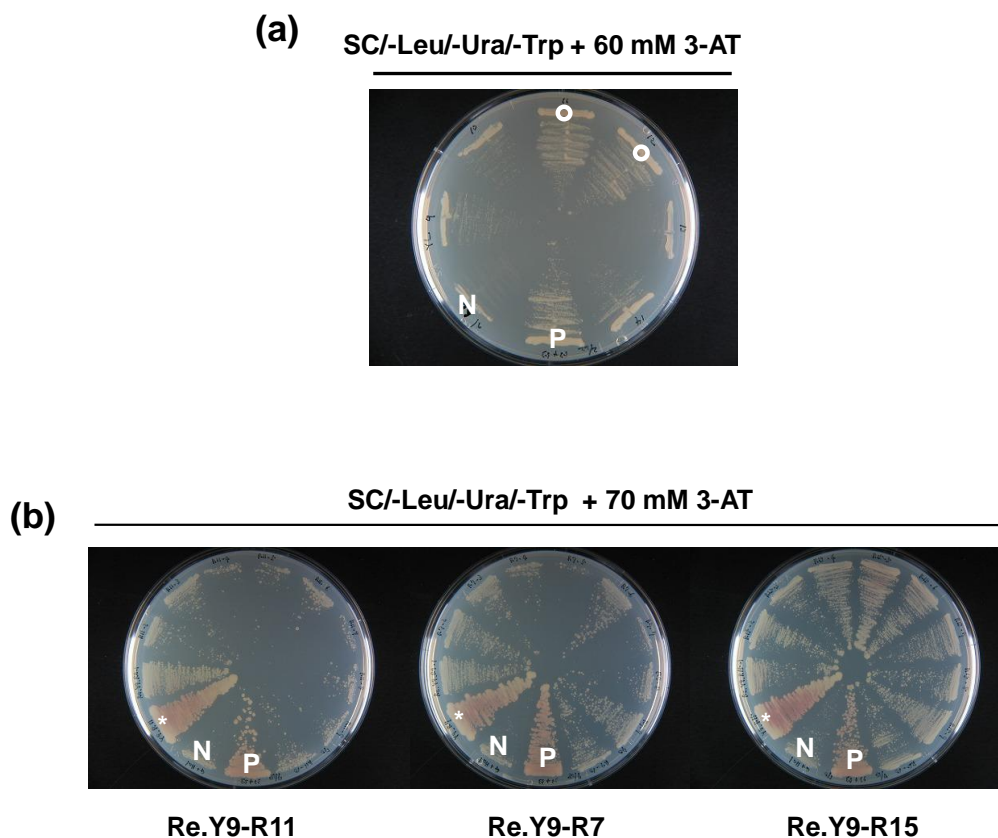


Fig. 20. *S. cerevisiae* transformant candidates in the one-hybrid screening.

(a) The photograph shows the result of the practical 1st screening. The transformants designated as "○" were picked up as candidates. P, positive control; N, negative control. (b) Validation of the candidates from the 1st screening. pGADT7-Rec2 vectors containing the library sequences extracted from the candidates were introduced to *S. cerevisiae* Y187 cells with pHIS-crtS-up1 again. A SC/-Leu/-Ura/-Trp plate was inoculated with 10 colonies of the transformants. The asterisk shows the original candidate for each transformant. In this experiment, Re. Y9_R11 was not selected as a final candidate. P, positive control; N, negative control.

Table 6 Deduced amino acid sequences of the candidates obtained by the one-hybrid screening.

Name	Length (a.a.)	Sequence^a
Y9-3	18	PGIVEVATLF ¹⁰ LC ²⁰ SLRW ³⁰ SL* ⁴⁰ ⁵⁰
Y9-R2	8	PGGDLSPS*
Y9-R7	129	PGQRSLIQFM ANQEVGHATL ISNIVGGYPG GAPKQCTYKY NFTTVPEFVD FCQRLTRWGE SGVYGFPLPHL DSRPAAQLL QSISTEARQQ MIFRQLSGLF PMPVYFEAGY TSSILVSSSP HPSSI ^{AKNS*}
Y9-R8	47	PGTHTSSISS SLPLSLIAAL SL ^{SLSLSHTQ} PKAPPKECHP CRPT ^{PMR*}
Y9-R15	72	RGGGGKEPTK DHLLASSHT YKHKHKHTRI PTHNVQTYQG TQHPCPICRV RSTD ^{LVLINP} TCQRRNSARK RP*
Y9-R19	27	PGTRHTRLFE TWKEPLVVRA TRFIGMG*
Y9-R21	41	PGIHR ^{TTKQQ} SWAT ^{LLLLIT} QTHPLWILPP MGQTSSGRYA H*
YL-3	9	PGKKLPGDL*
YL-8	44	PGDLPPAFSF APFVDSFFN FPF ^{LFLSPSF} FPSLNHFSHS HLTD*

^aEach nucleotide sequence obtained from the one-hybrid screening was translated to produce a fusion protein with *GAL4* activator domain.

* stop codon.

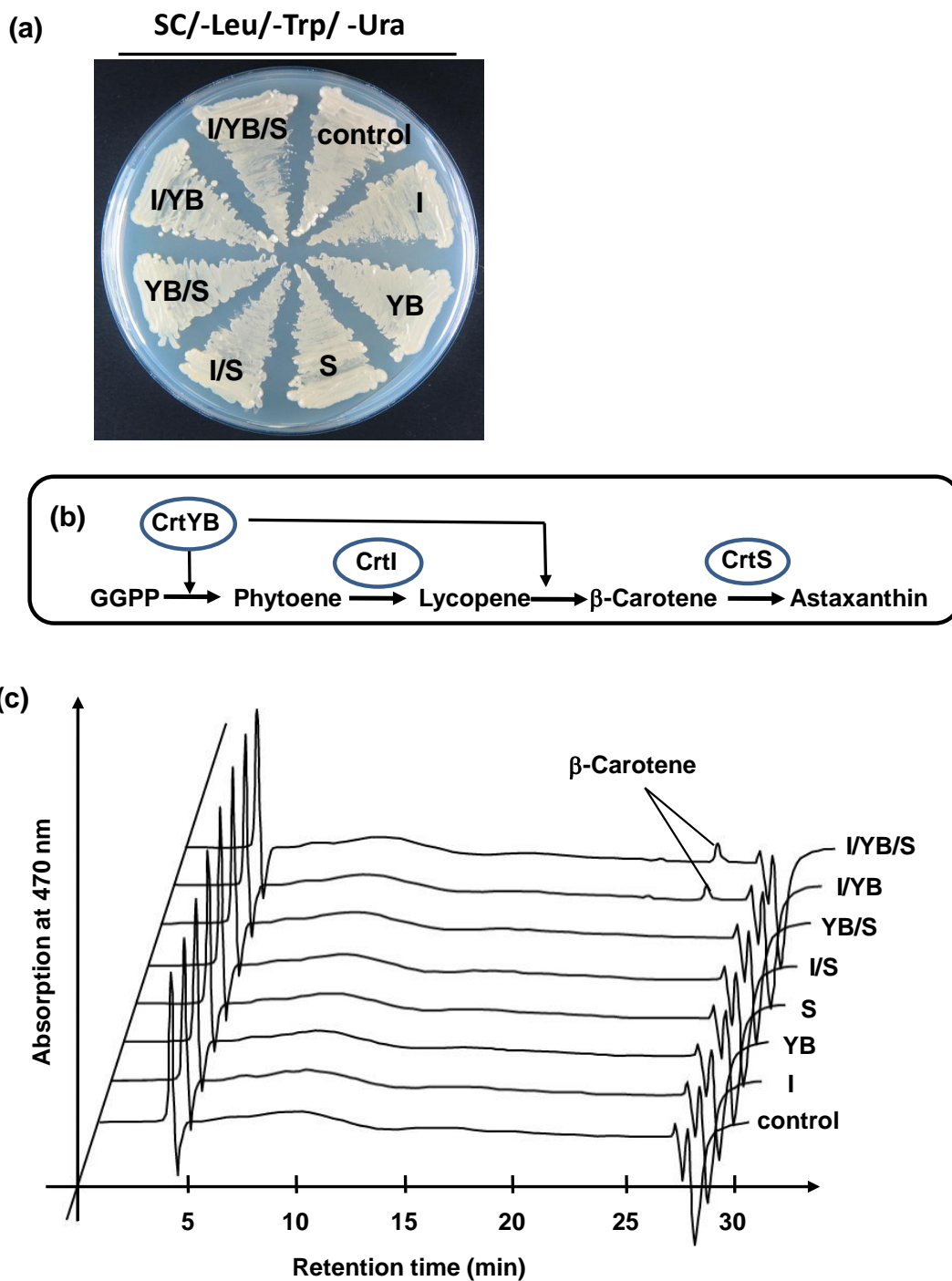


Fig. 22. Colony colors (a) and HPLC chromatograms (b) of transformants having *crtI*, *crtYB*, and/or *crtS* genes.

(a) The transformants possessing the astaxanthin-synthetic gene(s) were grown on SC/-Leu/-Trp/-Ura medium. These also possessed appropriate control plasmids (pTV3, pUV2, and/or pAD4) required for growth on the SC/-Leu/-Trp/-Ura medium. (b) Prospective astaxanthin synthesis pathway in the transformants constructed. (c) Intracellular carotenoids of the transformants in the above photograph were extracted with acetone and subjected to HPLC analysis. Peaks were identified by comparison with that of the authentic carotenoid as the standard and quantified by the integrated peak area. The control transformant had the only 3 control plasmids.

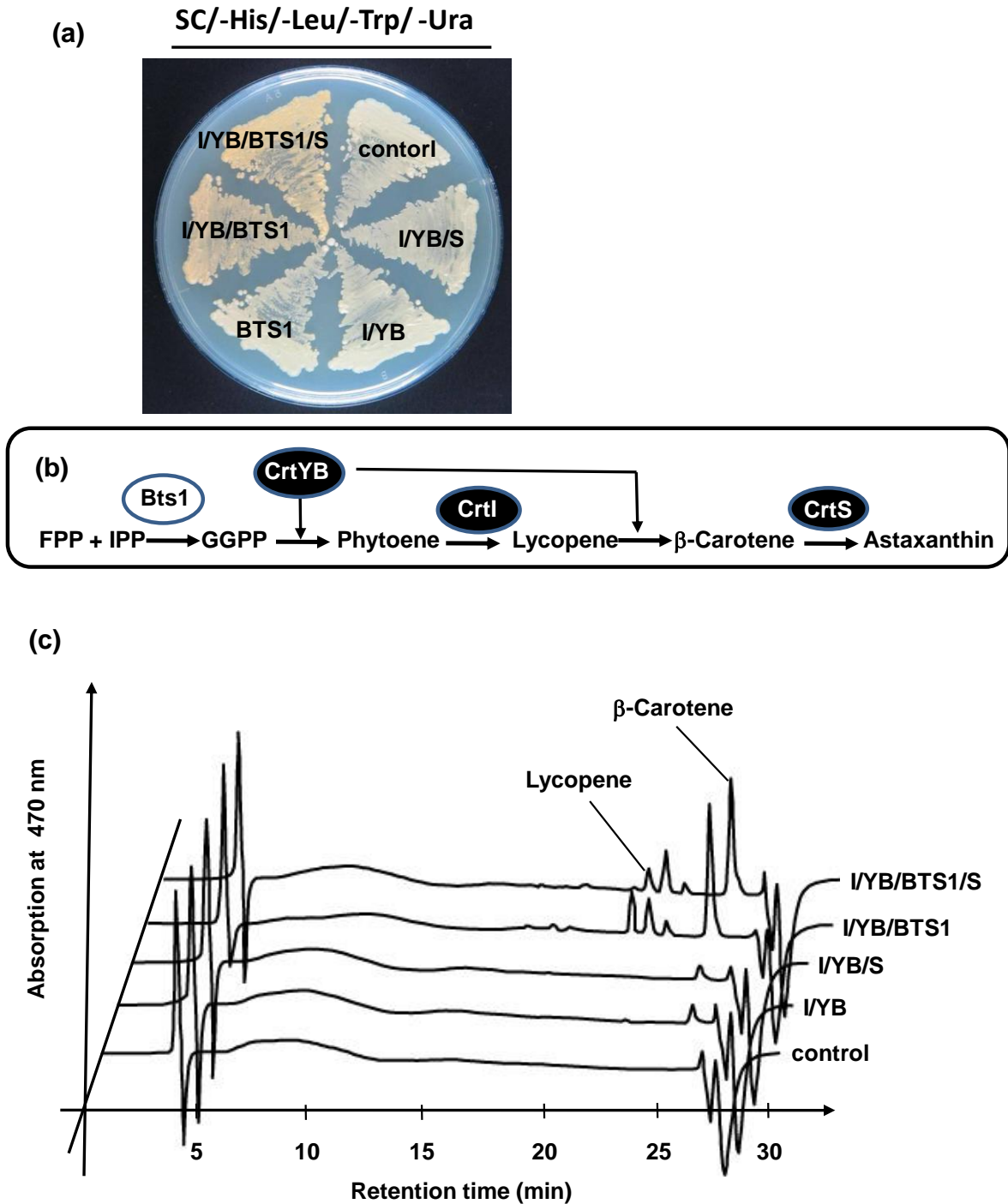


Fig. 23. Colony colors (a) and HPLC chromatograms (b) of transformants having *crtI*, *crtYB*, *crtS*, and/or *BTS1* genes.

(a) The transformants possessing the astaxanthin-synthetic gene(s) were grown on SC/-His/-Leu/-Trp/-Ura medium. These also possessed appropriate control plasmids (pHV3, pAD4, pTV3, and/or pUV2) required for growth on the SC/-His/-Leu/-Trp/-Ura medium. (b) Prospective astaxanthin synthesis pathway in the transformants constructed. (c) Intracellular carotenoids of the transformants were extracted with acetone and subjected to HPLC analysis. Peaks were identified by comparison with those of the authentic carotenoids as the standards and quantified by the integrated peak areas. The control transformant had the only 4 control plasmids.

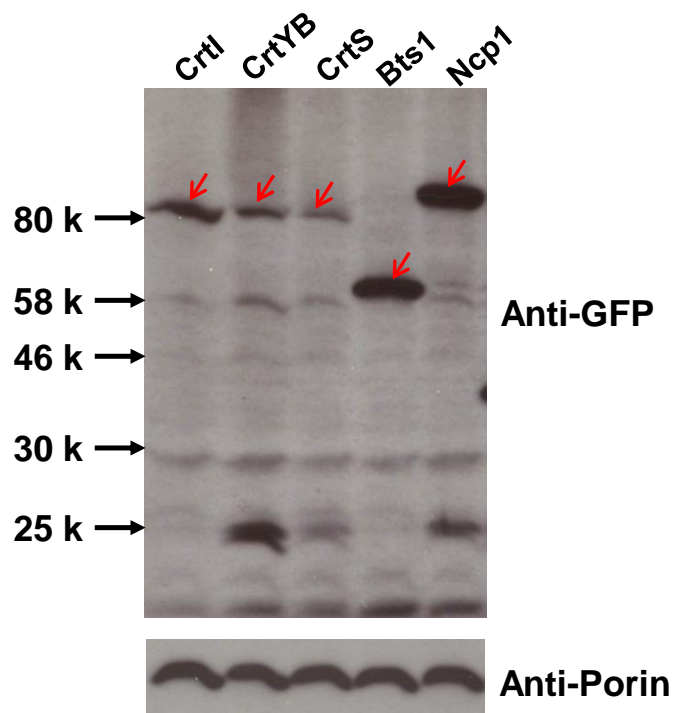


Fig. 24. Immunoblot analysis of cell extracts of the transformants retaining the *EGFP*-fused astaxanthin synthetic genes.

Protein was extracted from each transformant and subjected to SDS-PAGE, followed by Western blot analysis using anti-GFP and anti-Porin (internal standard) antibody. The amount of the loading protein of each lane was 100 μ g. Deduced molecular masses of the EGFP-fused proteins are follows: CrtI, 92 k; CrtYB, 102 k; CrtS, 90 k; Bts1, 66 k; Ncp1, 104 k; intact EGFP, 27 k.

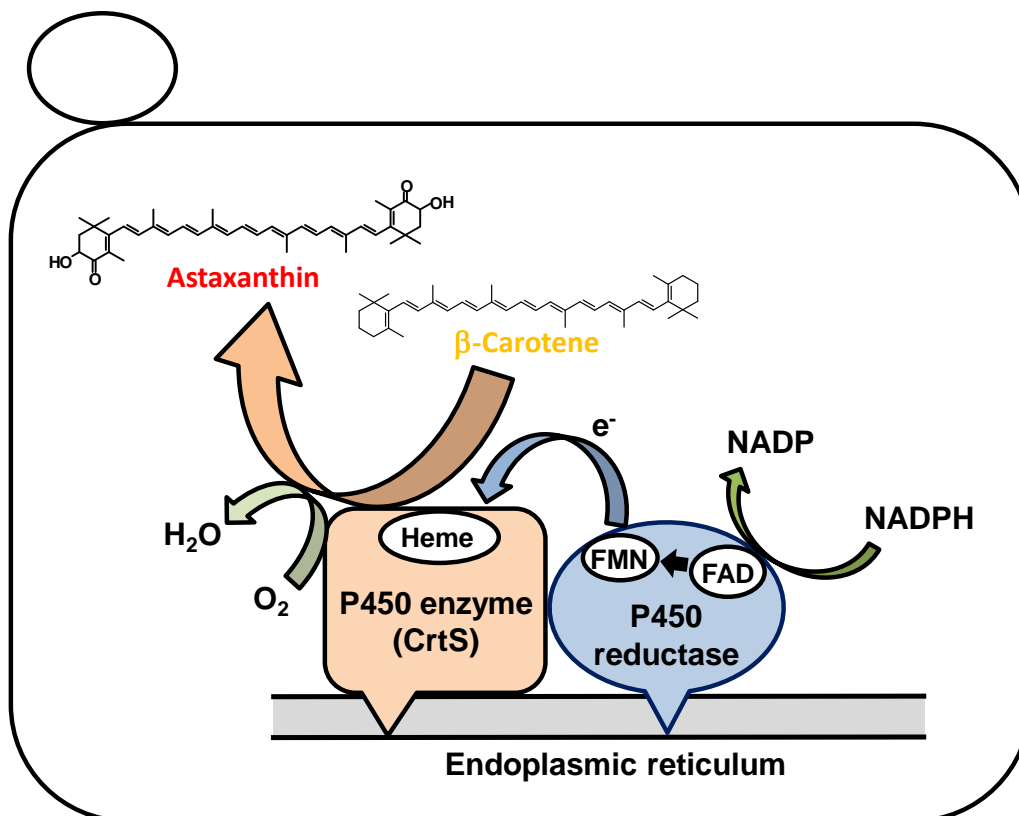


Fig. 25. Deduced astaxanthin synthetic reaction by CrtS (cytochrome P450) and NADPH-cytochrome P450 reductase.

In general, fungal P450 monooxygenase system is composed of two proteins bound to the endoplasmic reticulum. The general reaction for catalyzed the P450 system is summarized as $RH + NADPH + H + O_2 \rightarrow ROH + NADP + H_2O$ (van den Brink *et al.*, 1998). The FAD and FMN in the reductase transfer electron from NADPH to heme domain in the P450 enzyme, which catalyzes monooxygenase reaction. The yeast *S. cerevisiae* has NADPH-P450 reductase (Ncp1) and is capable of electron donation to various mammalian P450 enzymes.

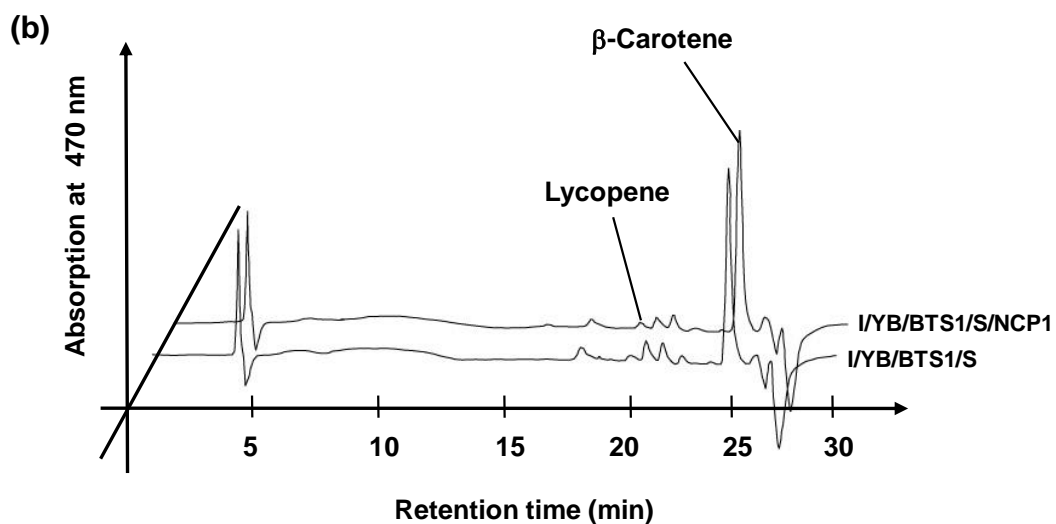
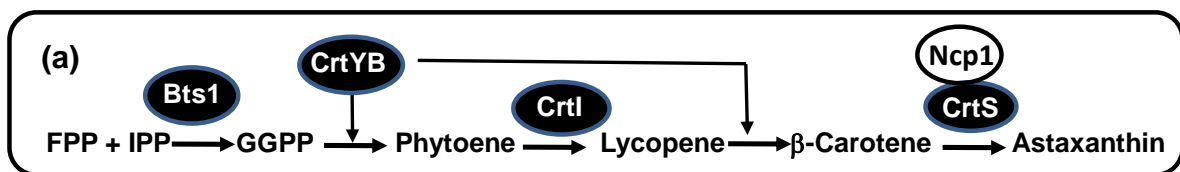


Fig. 26. HPLC chromatograms of transformant having *crtI*, *crtYB*, *crtS*, *BTS1*, and/or *NCP1* genes. (a) Prospective pathway for astaxanthin biosynthesis in the transformants constructed. (b) Intracellular carotenoids of the transformants were extracted with acetone and subjected to HPLC analysis. Peaks were identified by comparison with those of the authentic carotenoids as the standards and quantified by the integrated peak areas. The control transformant had the only 4 control plasmids.

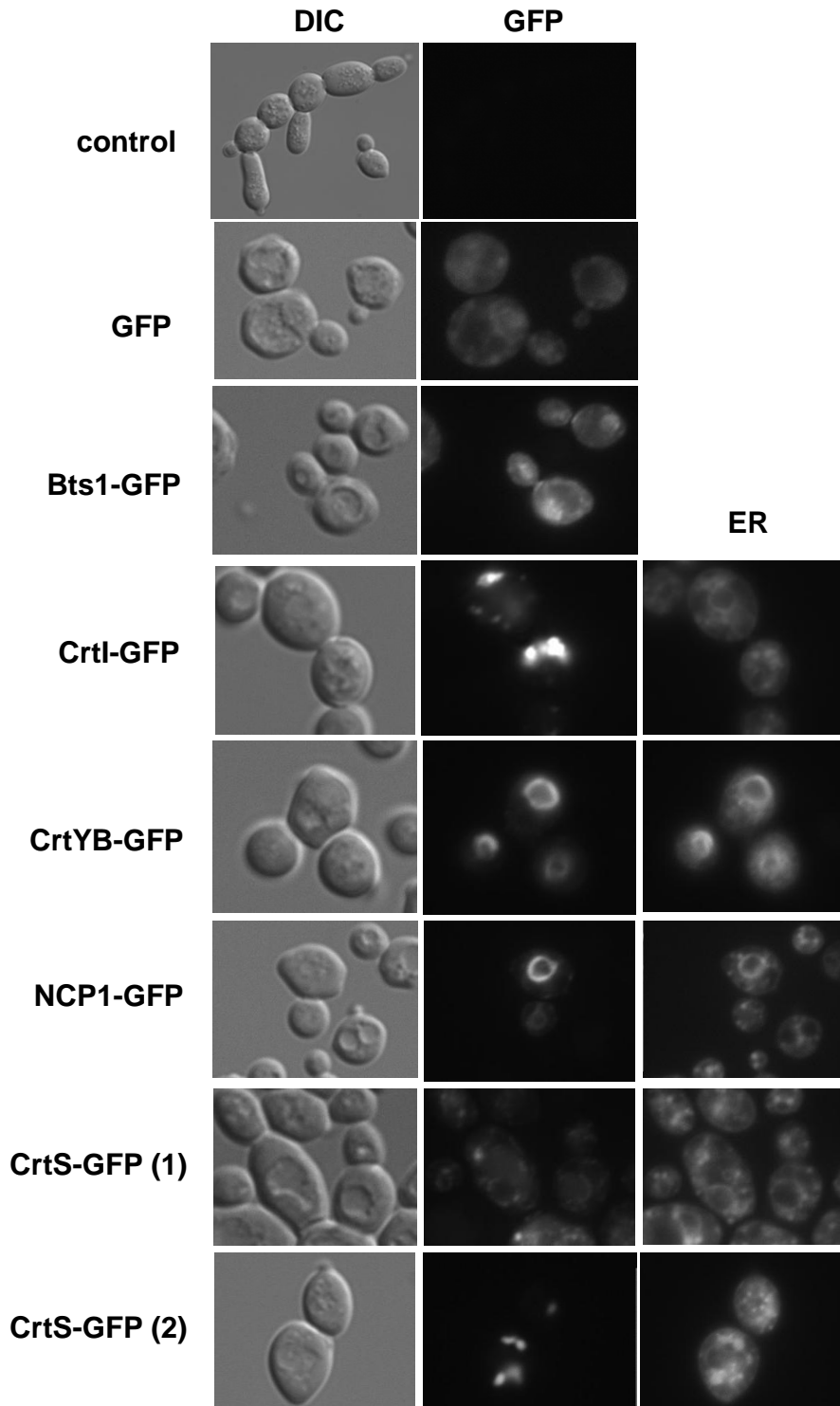


Fig. 27. Localization of GFP-fused proteins involved in astaxanthin biosynthesis.

The *S. cerevisiae* transformant possessing each of the GFP-fusion protein expression vector (pAD-GFP, pAD-BTS1-GFP, pAD-crtI-GFP, pAD-crtYB-GFP, pAD-NCP1-GFP, pAD-crtS-GFP) was observed by fluorescent microscopy. For observation of endoplasmic reticulum, the cells stained by ER-Tracker Blue-White DPX. DIC, differential interference contrast image.

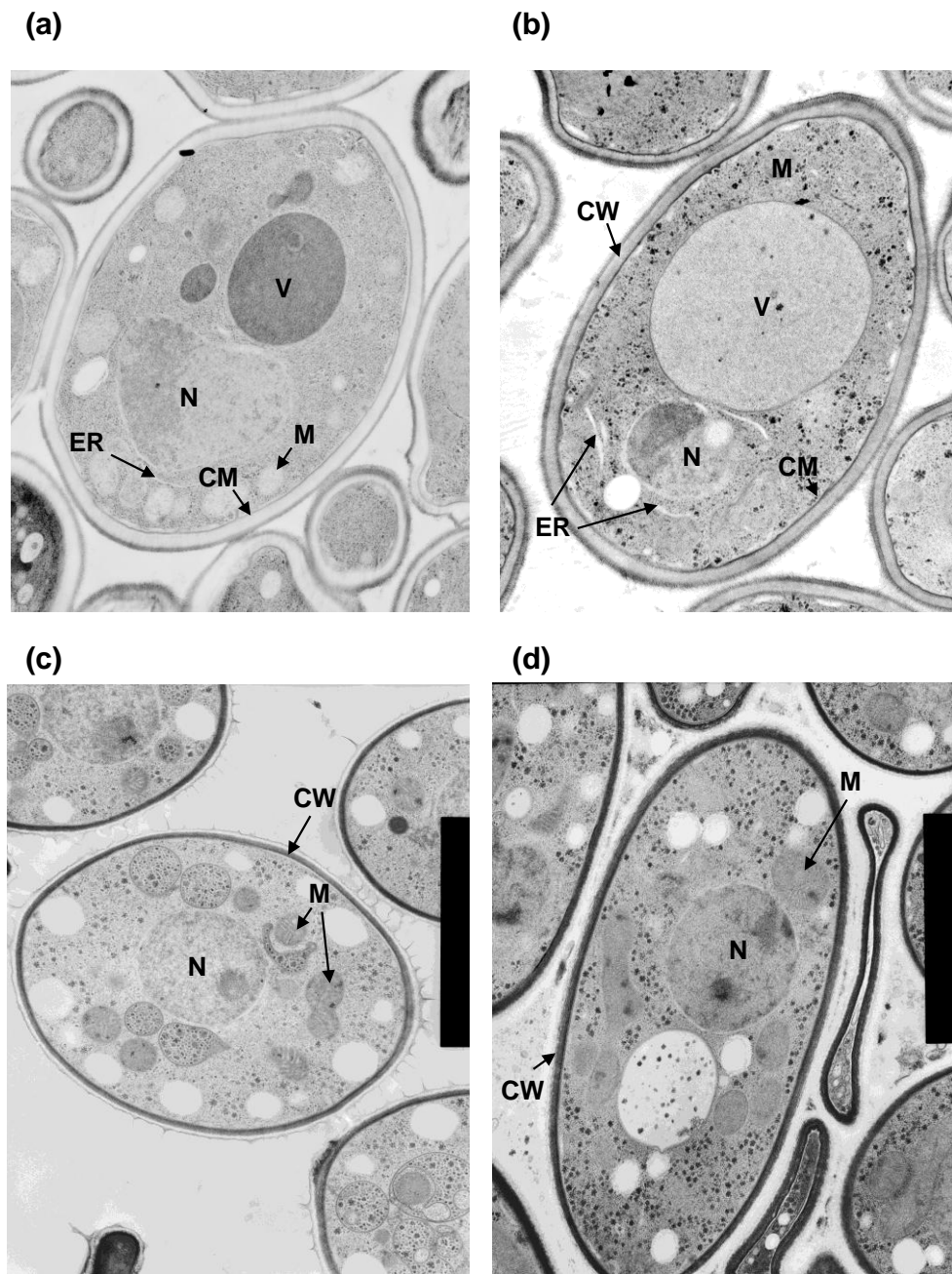


Fig. 28. Electron micrographs of *S. cerevisiae* transformants and *X. dendrorhous* cells. (a) *S. cerevisiae* control transformant cells having pTV3, pUV2, pAD4, and pHV3, (b) *S. cerevisiae* transformant having *crtI*, *crtYB*, *crtS*, and *BTS1* accumulating β -carotene, (c) *X. dendrorhous* strain Y989 (wild-type), (d) *X. dendrorhous* strain Y2238-10IL (astaxanthin over-producing mutant). N, nuclear; ER, endoplasmic reticulum, V, vacuole; M, mitochondrion; CM, cell membrane; CW, cell wall.

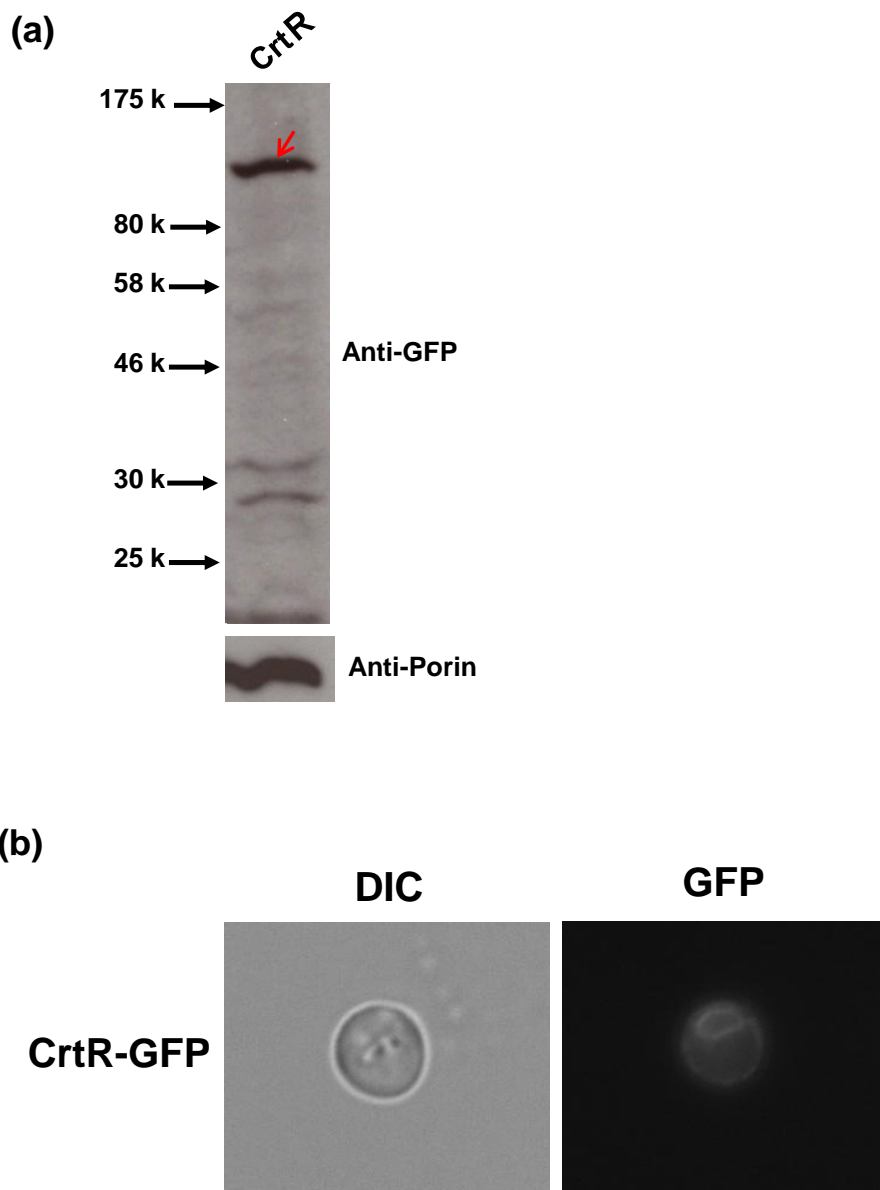


Fig. 29. Western blotting (a) and fluorescent microscopy (b) of GFP-fused CrtR.
 (a) Protein was extracted from each transformant and subjected to SDS-PAGE, followed by Western blot analysis using anti-GFP and anti-Porin (internal standard) antibody. The amount of the loading protein was 100 μ g. Deduced molecular masses of the EGFP-fused CrtR is 109 k. (b) The *S. cerevisiae* transformant possessing GFP-CrtR expression vector, pAD-crtR-GFP, was observed by fluorescent microscopy. DIC, differential interference contrast image.

(a) SC/-His/-Leu/-Trp/ -Ura

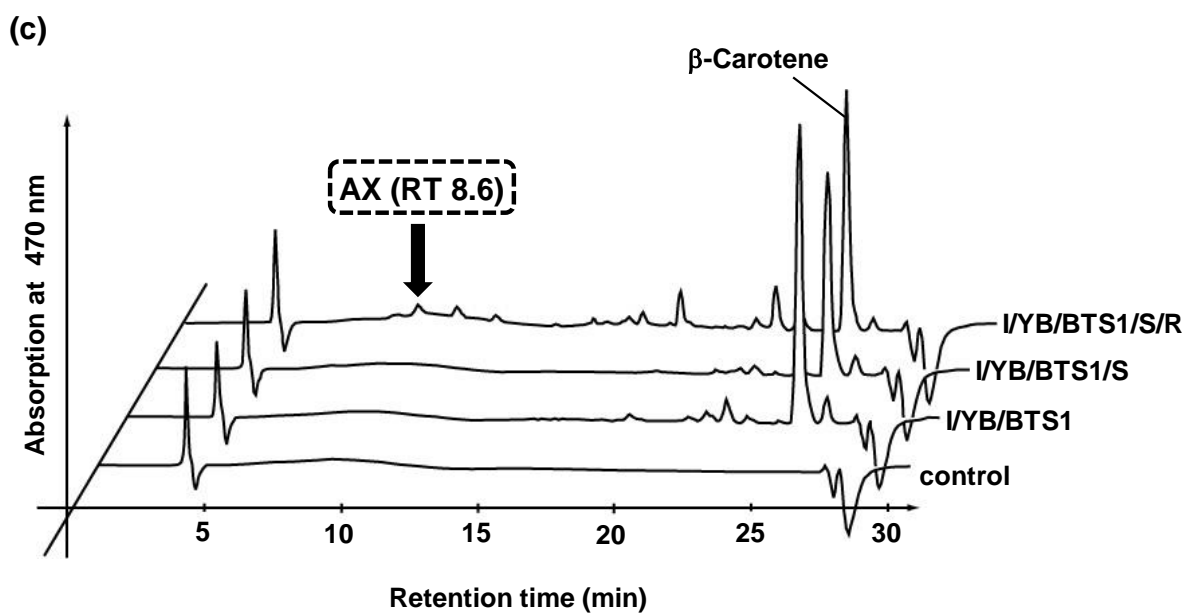
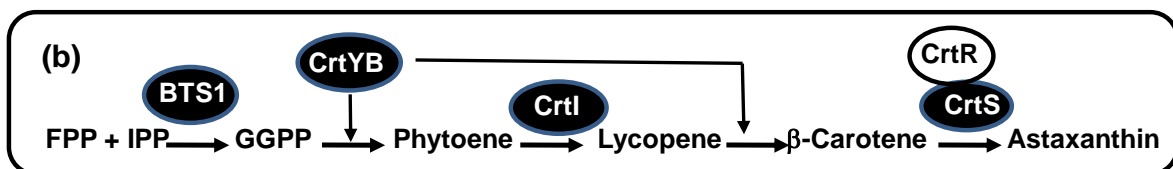
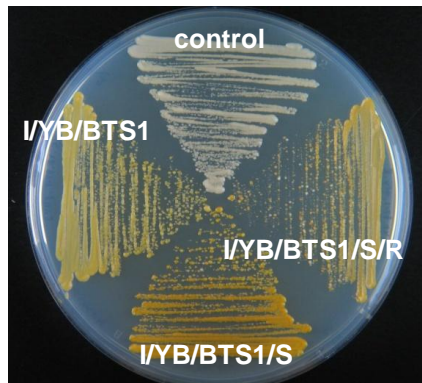


Fig. 30. HPLC chromatograms of transformant having *crtI*, *crtYB*, *crtS*, *BTS1*, and/or *crtR* genes.

(a) Prospective pathway for astaxanthin biosynthesis in the transformants constructed. (b) Intracellular carotenoids of the transformants were extracted with acetone and subjected to HPLC analysis. Peaks were identified by comparison with those of the authentic carotenoids as the standards and quantified by the integrated peak areas. The control transformant had the only 4 control plasmids.

SC/-His/-Leu/-Trp/-Ura

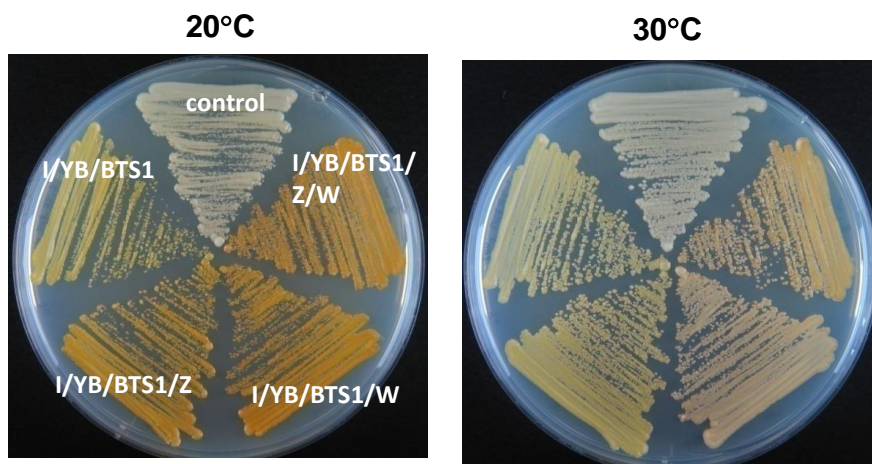


Fig. 31. Colony colors of the transformants having *crtI*, *crtYB*, *BTS1*, *crtZ*, *crtO*, and/or *crtW* genes.

The *S. cerevisiae* transformants were streaked on a SC/-His/-Leu/-Trp/-Ura medium and incubated for 3 days.

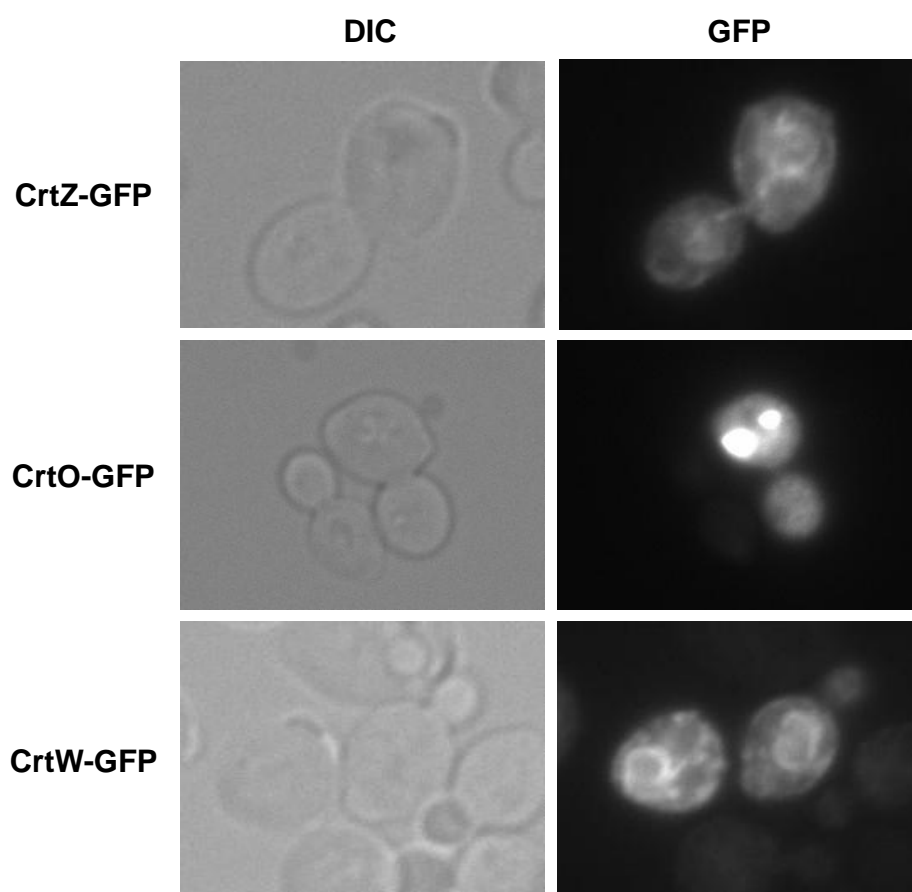


Fig. 32. Localization of GFP-fused CrtZ, CrtO, and CrtW protein.

The *S. cerevisiae* transformants possessing GFP-fusion protein expression vector, pAD-crtZ-GFP, pAD-crtO-GFP, pAD-crtW-GFP were observed by fluorescent microscopy. DIC, differential interference contrast image.

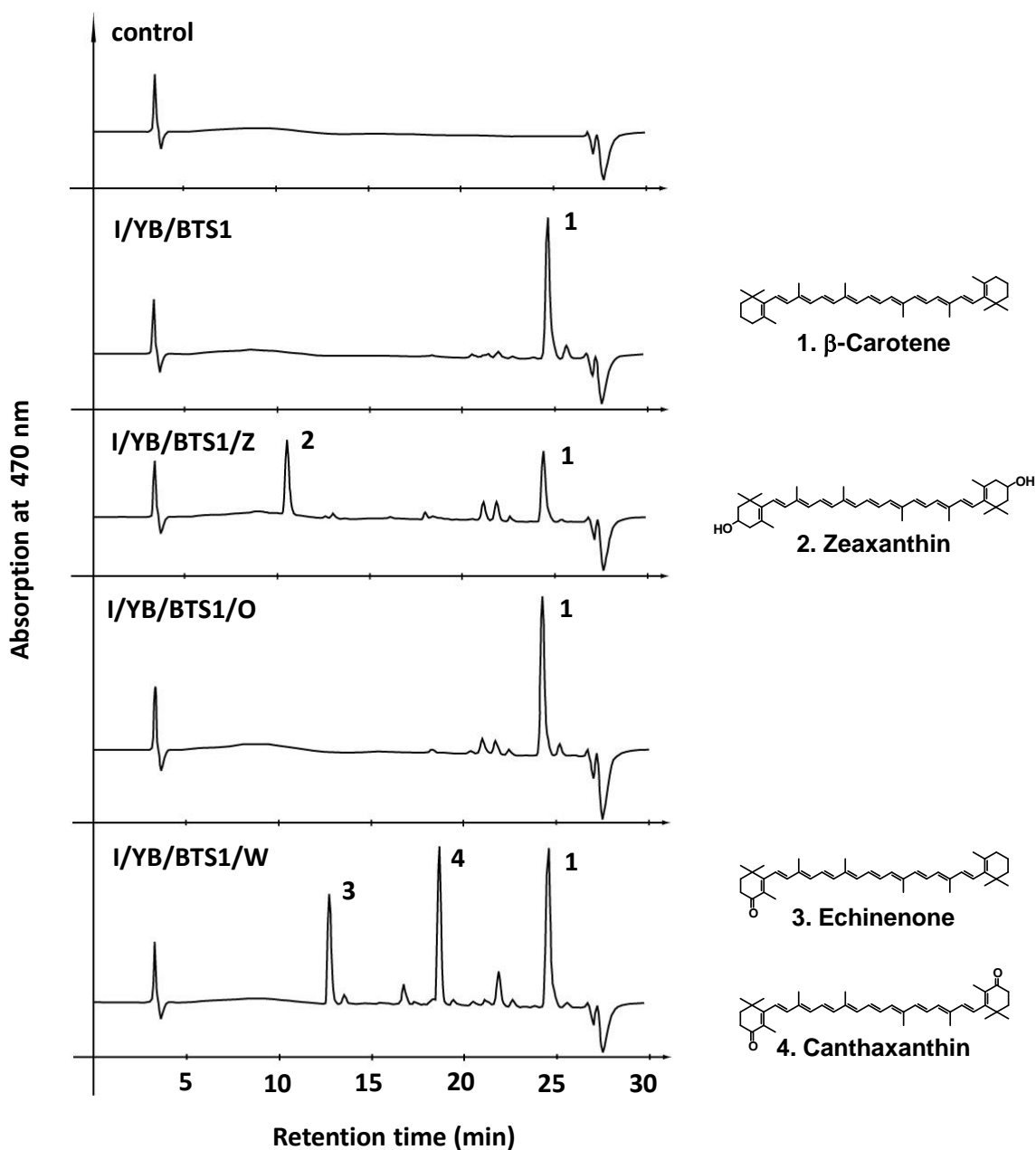


Fig. 33. HPLC chromatograms of transformants having *crtI*, *crtYB*, *BTS1*, *crtZ*, *crtO*, and/or *crtW* genes.

4-day culture of each transformant was used to the extraction of carotenoids. Peaks were identified by comparison with those of the authentic carotenoids as the standards and quantified by the integrated peak areas. 1, β -carotene; 2, zeaxanthin; 3, echinenone; 4, canthaxanthin.

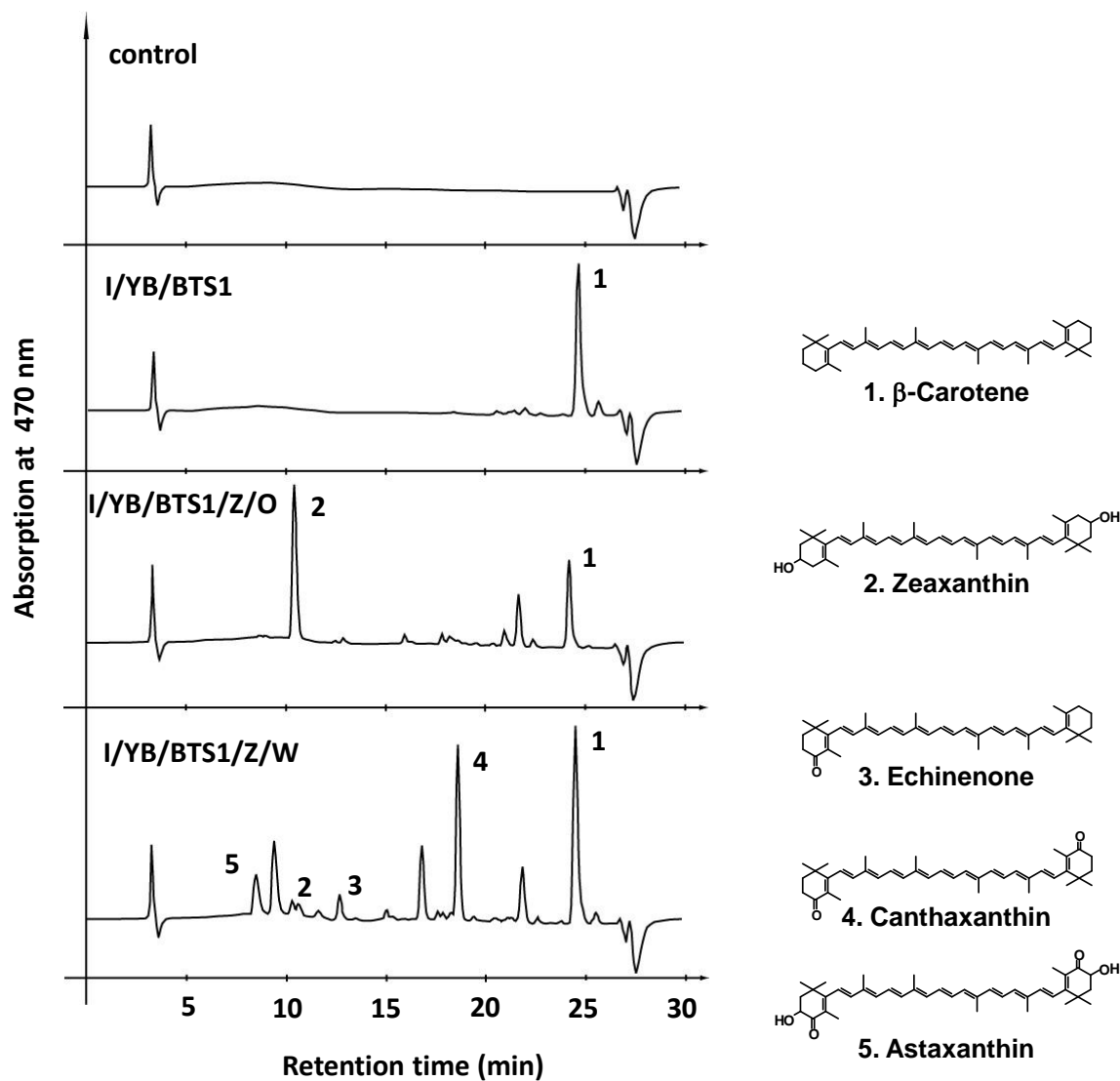


Fig. 34. HPLC chromatograms of transformants having *crtI*, *crtYB*, *BTS1*, *crtZ-crtO*, and/or *crtZ-crtW* genes.

4-day culture of each transformant was used to the extraction of carotenoids. Peaks were identified by comparison with those of the authentic carotenoids as the standards and quantified by the integrated peak areas. 1, β -carotene; 2, zeaxanthin; 3, echinenone; 4, canthaxanthin; 5, astaxanthin.

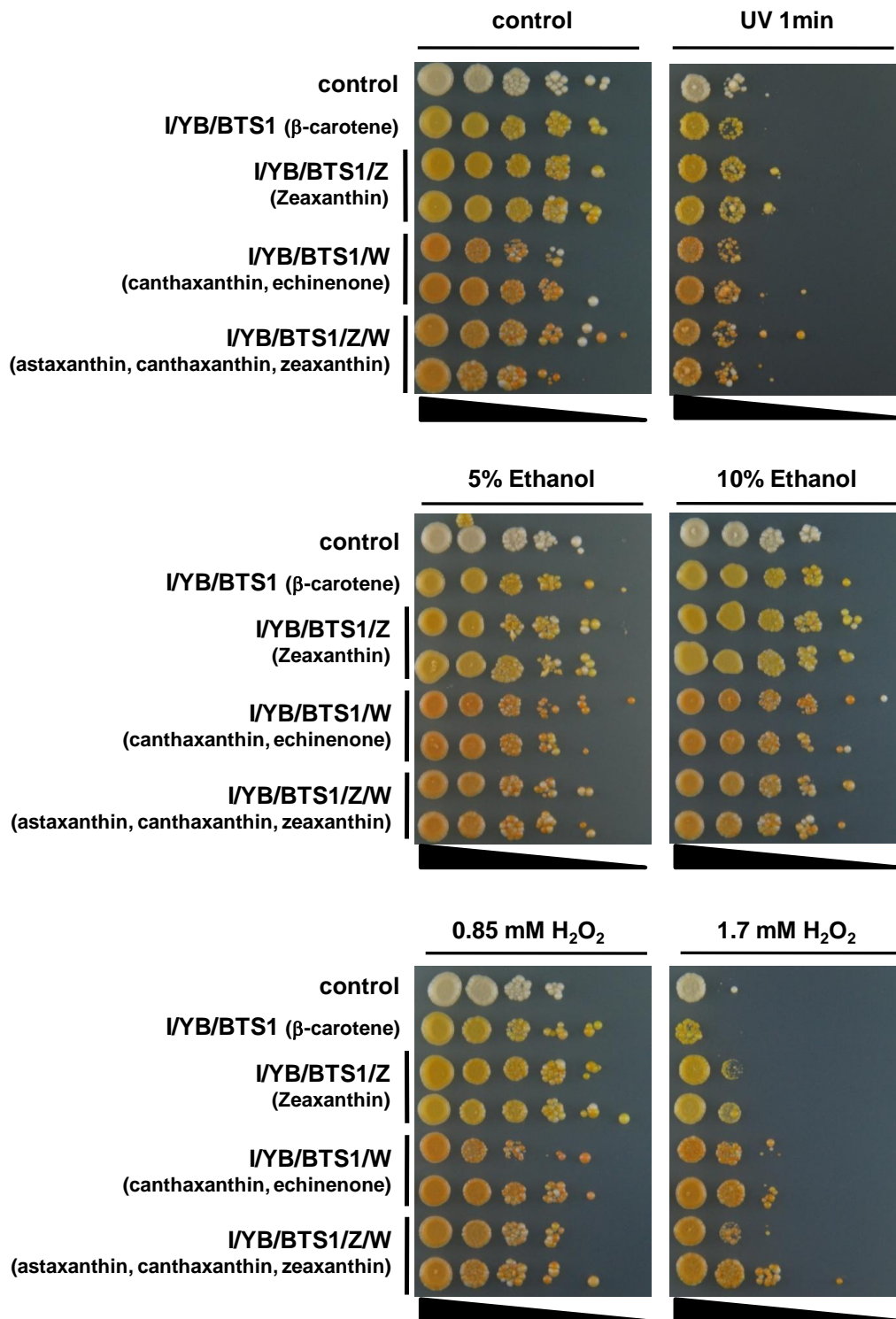


Fig. 35. Tolerance of the carotenoid-producing transformants under various stress condition. Approximately 10^5 cells of each transformant and serial dilutions of 10^{-1} to 10^{-5} (from left to right) were spotted and incubated onto SC/-His/-Leu/-Trp/-Ura plates, containing ethanol (5%, 10%), or H_2O_2 (0.85 mM, 1.7 mM) at $20^\circ C$ for 3 days. To examine UV tolerance, transformants spotted onto a SC/-His/-Leu/-Trp/-Ura plate and irradiated by UV for 1 min, then incubated as described above.

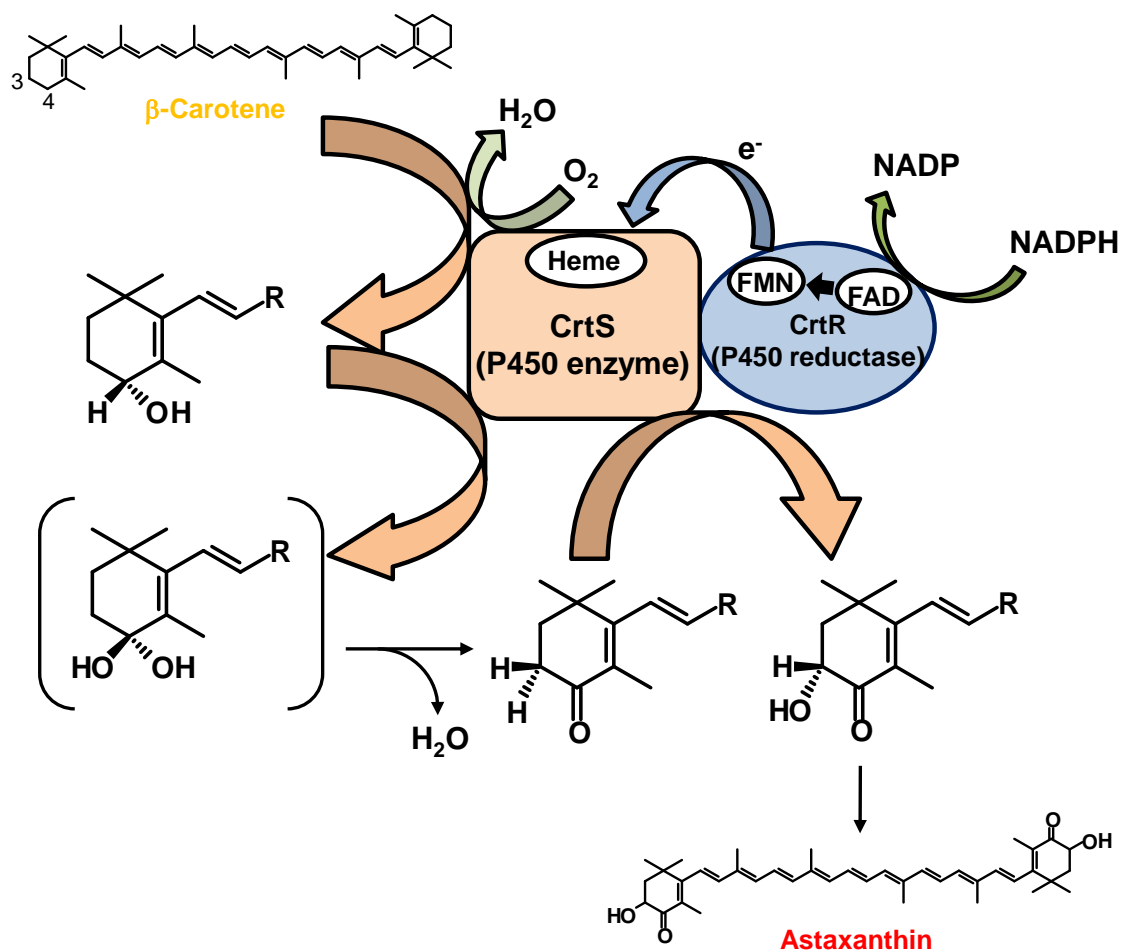


Fig. 36. Proposed β-carotene oxidation mechanism by CrtS and CrtR.

CrtS (cytochrome P450 enzyme) accepts two electron from CrtR (cytochrome P450 reductase) to oxygenate β-carotene. The reactions involve a series of hydroxylations of allylic carbons starting at C4. A putative enzyme recognition site for the first step could be the C5, 6 double bond. C4 could be hydroxylated twice followed by spontaneous elimination of water forming a keto group. Next in the reaction sequence catalyzed by CrtS, carbon 3 in the 4-keto intermediate which becomes allylic by the keto group is recognized by the enzyme as the subsequent partner for hydroxylation (Ojima *et al.*, 2006).

総括

アスタキサンチンは養殖、健康食品、化粧品業界などでこれからさらに重要な位置を占めていく物質である。実験動物に留まらず、ヒトへの投与実験も多数行われ、その効果を示す論文も次々に発表されている。アメリカなどの一部の国では家畜などの飼料としてであっても化学合成アスタキサンチンの使用を禁止しており、また世界的に化学合成品よりも生物由来品の方が好まれる傾向があることから、生物由来アスタキサンチンがそのシェアを拡大していくのは確実である。また現在は遺伝子組換え食品など分子生物学的手法を用いて作られたものに対する理解は薄いですが、世界人口は減少する兆しが見えず、耕地面積がこれ以上広がらない以上、食糧危機は必ず訪れ、そしてその時には、遺伝子組換え食品のリスクよりも価値の方が高いと全世界の人が考えるはずである。

本論文では現在の需要、そして将来の需要も考え、遺伝子組換えなどの分子生物学的手法を用いない方法、用いる方法の双方でアスタキサンチン高生産生物の育種を目指した。

分子生物学的手法を用いない方法としては従来からの突然変異処理と、フローサイトメーターを組み合わせることで従来よりも高い効率でアスタキサンチン高生産変異株を得られる方法を開発した。現在知られている高生産株は何度も変異処理を繰り返して親株の10倍程の量を蓄積するようになったが、この方法では一回のスクリーニングで親株の約3.8倍ものアスタキサンチンを蓄積する変異株が得られており、この株を親株として変異処理とスクリーニングを繰り返すことによってさらなる高生産株が取得できるであろう。さらに遺伝子組換え手法を用いていないため、この方法で得られた高生産生物は現在でも市場に受け入れられやすいと考えている。

分子生物学的手法を用いる方法としては、まず、現在得られ得ている高生産株を調べることによって、アスタキサンチンの高生産機構を知ろうと試みた。この試みはまだ志半ばだが、興味深いORFも発見され、これからの研究が楽しみなテーマでもある。次に、分子生物学的知見の多い*S. cerevisiae*にアスタキサンチンを合成させ、高生産株の分子育種、カロテノイド合成酵素の反応機構の解析を試み、その結果、*S. cerevisiae*内にアスタキサンチンや他のカロテノイドを蓄積させることに成功し、酵素の反応機構についても反応経路やフィードバック阻害の可能性など多くの知見が得られた。またカロテノイドを蓄積した*S. cerevisiae*が酸化ストレスに耐性を示したことから、ストレス耐性生物を作製するための新たな手法としても期待される。

謝辞

本研究の遂行ならびに博士論文の作製にあたり、終始熱心にご指導いただいた奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 細胞機能学講座の高木博史教授に、厚く御礼申し上げます。また、2005年に本学を退職なさった谷吉樹教授（現・京都学園大）にも退職までの間、厚いご指導をいただきましたことに心から御礼申し上げます。研究テーマについて直接のご指導をくださった桂樹徹准教授に深く感謝申し上げます。吉田信行助教においては直接の指導教員でないにもかかわらず、公私ともに大変お世話になりました。この場で心からの感謝を申し上げます。大津巖生助教、小野寺慶子助教、平石博之博士、戒能智宏博士、小谷哲也博士、笹野祐博士には本研究遂行に当たり多くの有益な提案を賜り、ここに重ねて深く感謝致します。同グループとして、共に研究し、多くの自分の至らぬ点に気づかせてくれた、竹原明子さん、橋田慶介君には本当に心から感謝致します。電子顕微鏡による観察実験遂行にあたり、サンプルの準備から解析まで、丁寧に指導いただいた岩野恵博士に深く感謝申し上げます。ミネソタ大学留学の際に快く私を受け入れてくれ、さらにバクテリアの遺伝子のクローニングを許可してくださった **Dr. Claudia Schmidt-Dannert** とその研究室の皆さんに心から感謝致します。

最後に、研究、私生活共にお世話になりました皆様方に深く感謝致します。

参考文献

- 高市 真一, 三室 守, 富田 純史 (2006) カロテノイド —その多様性と生理活性— 高市 真一 編. (裳華房、東京).
- Akimoto S, Yamazaki I, Sakawa T & Mimuro M (2000) Excitation relaxation dynamics of linear carotenoids. *J Lumines* **87–89**: 797–799.
- Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, Niklitschek M, Sepúlveda D, Baeza M & Cifuentes V (2008) Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol* **8**: 169.
- Almeida ERA & Cerda-Olmedo E (2008) Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr Genet* **53**: 129–137.
- Álvarez V, Rodríguez-Saiz M, de la Fuente JL, Gudiña EJ, Godio RP, Martín JF & Barredo JL (2006) The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of β -carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet Biol* **43**: 261–271.
- Andersson H, Baechi T, Hoechl M & Richter (1998) Autofluorescence of living cells. *J Microsc* **191**: 1–7.
- An GH, Bielich J, Auerbach R & Johnson EA (1991) Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Bio/Technology* **9**: 70–73.
- Barros MP, Pinto E, Colepicolo P & Pedersén M (2001) Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe^{2+} -loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochem Biophys Res Commun* **288**: 225–232.

- Bjerkeng B, Peisker M, von Schwartzberg K, Ytrestøyl T & Åsgård T (2007) Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. *Aquaculture* **269**: 476–489.
- Blount JD, Metcalfe NB, Birkhead TR & Surai PF (2003) Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* **300**: 125–127.
- Chen C & Contreras R (2007) Identifying genes that extend life span using a high-throughput screening system. *Methods Mol Biol* **371**: 237–248.
- Chen G, Hayhurst A, Thomas JG, Harvey BR, Iverson BL & Georgiou G (2001) Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS). *Nat Biotechnol* **19**: 537–542.
- Chen Y, Li D, Lu W, Xing J, Hui B & Han Y (2003) Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Lett* **25**: 527–529.
- Chumpolkulwong N, Kakizono T, Nagai S & Nishio N (1997) Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. *J Ferment Bioeng* **83**: 429–434.
- El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG & Young AJ (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* **430**: 37–48.
- Fraser PD, Shimada H & Misawa N (1998) Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate *in vitro* assay. *Eur J Biochem* **252**: 229–236.
- Fujii K, Imazato E, Nakashima H, Ooi O & Saeki A (2006) Isolation of the

- non-fastidious microalga with astaxanthin-accumulating property and its potential for application to aquaculture. *Aquaculture* **261**: 285–293.
- Golubev WI (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* **11**: 101–110.
- Goodwin TW (1986) Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annu Rev Nutr* **6**: 276–297.
- Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E & Terada H (2001) Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta* **1512**: 251–258.
- Harada H, Yu F, Okamoto S, Kuzuyama T, Usumi R & Misawa N (2009) Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 915–925.
- Hasunuma T, Miyazawa S, Yoshimura S, Shinzaki Y, Tomizawa K, Shindo K, Choi SK, Misawa N & Miyake C (2008) Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J* **55**: 857–868.
- Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L & Goycoolea FM (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* **46**: 185–196.
- Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K & Watanabe H (2006) Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod* **69**: 443–449.
- Ibrahim SF & van den Engh G (2007) Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **106**: 19–39.
- Iigusa H, Yoshida Y & Hasunuma K (2005) Oxygen and hydrogen peroxide light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett* **579**:

4012–4016.

Jayaraj J, Devlin R & Punja Z (2008a) Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Res* **17**: 489–501.

Jayaraj J & Punja ZK (2008b) Transgenic carrot plants accumulating ketocarotenoids show tolerance to UV and oxidative stresses. *Plant Physiol Biochem* **46**: 875–883.

Jiang Y, Proteau P, Poulter D & Ferro-Novick S (1995) BTS1 encodes a geranylgeranyl diphosphate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**: 21793–21799.

Johnson EA (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol* **6**: 169–174.

Jørgensen K, Stapelfeldt H & Skibsted LH (1992) Fluorescence of carotenoids. Effect of oxygenation and cis/trans isomerization. *Chem Phys Lett* **190**: 514–519.

Kacmar J, Carlson R, Balogh SJ & Srienc F (2005) Staining and quantification of poly-3-hydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae* and *Cupriavidus necator* cell populations using automated flow cytometry. *Cytometry A* **69**: 27–35.

Kajiwara S, Fraser PD, Kondo K & Misawa N (1997) Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J* **324**: 421–426.

Kim JH, Kang SW, Kim SW & Chang HI (2005) High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1 using statistical experimental designs. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 1743–1748.

Kobayashi M & Sakamoto Y (1999) Singlet oxygen quenching of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Lett* **21**: 265–269.

Kobayashi M (2000) *In vivo* antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 550–555.

- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed, Springer-Verlag, Berlin.
- Lewis MJ, Ragot N, Berlant MC & Miranda M (1990) Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2944–2945.
- Liu YS & Wu JY (2006) Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 663–668.
- Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, Niklitschek M, Carmona M, Wozniak A, Baeza M, Jiménez A & Cifuentes V (2007) Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* **40**: 73–84.
- Ludin KM, Hilti N & Schweingruber MF (1995) *Schizosaccharomyces pombe rds1*, an adenine-repressible gene regulated by glucose, ammonium, phosphate, carbon dioxide and temperature. *Mol Gen Genet* **248**: 439–45.
- Ma RYN & Chen F (2001) Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnol Lett* **23**: 519–523.
- Martín JF, Gudiña E & Barredo J (2008) Conversion of β -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microb Cell Fact* **7**: 3.
- Matsui K, Marunouchi J & Nakamura M (2002) An ultrastructural and carotenoid analysis of the red ventrum of the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Pigment Cell Res* **15**: 265–272.

- Miki W (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem* **63**: 141–146.
- Misawa N, Satomi Y, Kondo K, Yokoyama A, Kajiwara S, Saito T, Ohtani T & Miki W (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol* **177**: 6575–6584.
- Misawa N & Shimada H (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotechnol* **59**: 169–181.
- Miura Y, Kondo K, Saito T, Shimada H, Fraser PD & Misawa N (1998) Production of the carotenoids lycopene, β -carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl Environ Microbiol* **64**:1226–1229.
- Moriel DG, Chociai MB, Machado IMP, Fontana JD & Bonfim TMB (2005) Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. *Braz arch boil techno* **48**: 397–401.
- Morris WL, Ducreux LJM, Fraser PD, Millam S & Taylor MA (2006) Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. *Metab Eng* **8**: 253–263.
- Naguib YMA (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem* **48**: 1150–1154.
- Nicolás-Molina FE, Navarro E & Ruiz-Vázquez RM (2008) Lycopene over-accumulation by disruption of the negative regulator gene *crgA* in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**: 131–137.
- Niyogi KK, Björkman O & Grossman AR (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14162–14167.
- Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, Hoshino T, van den Berg J &

- Sandmann G (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol Gen Genomics* **275**: 148–158.
- Ott RG, Athenstaedt K, Hrastnik C, Leitner E, Bergler H & Daum G (2005) Flux of sterol intermediates in a yeast strain deleted of the lanosterol C-14 demethylase Erg11p. *Biochim Biophys Acta* **1735**: 111–118.
- Papp T, Velayos A, Bartók T, Eslava AP, Vágvölgyi C & Iturriaga EA (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**: 526–531.
- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF & Scheper T (2001) Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 350–360.
- Schroeder WA & Johnson EA (1995) Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J Biol Chem* **270**: 18374–18379.
- Semba RD, Lauretani F & Ferrucci L (2007) Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults. *Arch Biochem Biophys* **458**: 141–145.
- Srienc F, Arnold B & Bailey JE (1984) Characterization of intracellular accumulation of poly-hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol Bioeng* **26**: 982–987.
- Steinbrenner J & Linden H (2001) Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol* **125**: 810–817.
- Sun N, Lee S & Song KB (2004) Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. *Int J Food Microbiol* **94**:

263–267.

- Talora C, Franchi L, Linden H, Ballario P & Macino G (1999) Role of white collar-1–white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J* **18**: 4961–4968.
- Tatsuzawa H, Maruyama T, Misawa N, Fujimori K & Nakano M (2000) Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in *Escherichia coli* — attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids. *FEBS Lett* **484**: 280–284.
- Vadali RV, Fu Y, Bennett GN & San KY (2005) Enhanced lycopene productivity by manipulation of carbon flow to isopentenyl diphosphate in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **21**: 1558–1561.
- van den Brink HM, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ & Punt PJ (1998) Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol* **23**: 1–17.
- Verdoes JC, Krubasik P, Sandmann G & van Ooyen AJJ (1999a) Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* **262**: 453–461.
- Verdoes JC, Misawa N & van Ooyen AJJ (1999b) Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng* **63**: 750–755.
- Verwaal R, Wang J, Meijnen JP, Visser H, Sandmann G, van den Berg JA & van Ooyen AJJ (2007) High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4342–4350.
- Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R & Ravishankar AR (2008) Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green

- alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *J Exp Bot* **59**: 1409–1418.
- Wang CW, Oh MK & Liao JC (1999) Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **62**: 235–241.
- Wang GY & Keasling JD (2002) Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*. *Metab Eng* **4**: 193–201.
- Wurbs D, Ruf S & Bock R (2007) Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J* **49**: 276–288.
- Yabusaki Y, Murakami H & Ohkawa H (1988) Primary structure of *Saccharomyces cerevisiae* NADPH-cytochrome P450 reductase deduced from nucleotide sequence of its cloned gene. *J Biochem* **103**: 1004–1010.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P & Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**: 303–305.
- Zhu C, Naqvi S, Breitenbach J, Sandmann G, Christou P & Capell T (2008) Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18232–18237.

報文目録

Ken Ukibe, Tohoru Katsuragi, Yoshiki Tani & Hiroshi Takagi (2008) Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS Microbiol Lett* **286**: 241–248.