



Title	紅藻スサビノリPyropia yezoensisのカロテノイド生合成経路に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	小泉, 次郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第14150号
Issue Date	2020-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78947
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jiro_Koizumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：小 泉 次 郎

学 位 論 文 題 目

紅藻スサビノリ *Pyropia yezoensis* のカロテノイド生合成経路に関する研究

カロテノイドは植物や藻類、微生物によって生合成される脂溶性色素成分であり、特に光合成生物では光合成アンテナとして機能し、クロロフィルに光エネルギーを渡す役割を果たしている。また、カロテノイドは過剰な光エネルギーからの細胞保護機能を持つことも知られている。一方、食品中に含まれるカロテノイドは、栄養学的に様々な健康機能が知られており、機能性食品などの素材として広く利用されている。

Pyropia yezoensis (スサビノリ) はウシケノリ目ウシケノリ科アマノリ属の海藻で、日本食の食材であるノリの主要な原料である。現在、日本を始め東アジアで大規模に養殖生産されており、重要な水産物といえる。また、*P. yezoensis* は産業的に重要な生物であるだけでなく、実験培養可能な点や部分的にゲノム情報が解析されている点など、他の紅藻と比較して研究対象としての優位性が高く、紅藻のモデルとしての活用がなされている有用な生物である。特に、*P. yezoensis* においてカロテノイドは、上述したような光制御因子であるばかりでなく、食品として利用する際の栄養価や、ノリの主要な香り成分であるイオノンの前駆体であり、さらにはノリの等級は色艶によって決められるため、品質にも関わる重要な成分である。よって、*P. yezoensis* におけるカロテノイド生合成経路を理解することは、その養殖や食品利用につながる基礎的な知見として重要であると考えた。

カロテノイドの生合成経路については、陸上植物において変換酵素も含めて多くの報告が見られる。一方、海藻におけるカロテノイド生合成経路は十分な検討が進んでいない。特に紅藻のカロテノイド生合成経路は、同じ藻類である褐藻や緑藻とも異なっており、その解明は紅藻のみならず二次共生光合成生物の系統学的分類や光合成生物の進化の解明にも貢献しうる有益な知見となると考えられる。そこで、本研究では紅藻 *P. yezoensis* のカロテノイド合成経路について検討を行った。

第一章では *P. yezoensis* 糸状体の培養を行い、得られた藻体から総脂質を抽出し、HPLC により主要なカロテノイドの分析を行った。その後、総脂質を分取 TLC により分画し、低極性画分を回収した。さらに、分取 HPLC により各成分を分離し、LC/MS、¹H-NMR 分析による構造決定を行った。総脂質画分の分析により主要なカロテノイドとして、既報通り α -/ β -carotene、zeaxanthin、lutein の 4 つのカロテノイドが検出された。次いで、分離した低極性画分から、これまで *P. yezoensis* で報告がなかった β -cryptoxanthin と、Bangiales での報告がなかった α -cryptoxanthin、さらには紅藻から見出されていなかった zeinoxanthin の 3 つのカロテノイドを同定した。このことから *P. yezoensis* の lutein 合成経路は、 α -carotene の ϵ 環にヒドロキシル基が導入される α -cryptoxanthin を介する経路と β 環にヒドロキシル基が導入される zeinoxanthin を介する 2 経路が存在することが中間代謝物の同定から初めて明らかにすることができた。

次に、より微量の高極性中間代謝物を解析するため、多量に入手可能な海面養殖された *P. yezoensis* 葉状体から総脂質を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより lutein/zeaxanthin よりも高極性の画分を回収した。分取 HPLC で各成分を分離後、LC/MS、¹H-NMR 分析を用いて微量のカロテノイドの同定を行った。その結果、これまで *P. yezoensis* で見出されていない antheraxanthin と Bangiales で報告がない lutein-5,6-epoxide を初めて同定した。これらのカロテノイドの同定は、これまで *P. yezoensis* では見出されていなかった epoxycarotenoid の合成経路が存在することを示すものであり、カロテノイド生合成系の解明に加え、それらから変換される植物ホルモンの生合成経路を考えるうえで極めて興味深い結果といえる。

第二章では、第一章で明らかにした *P. yezoensis* のカロテノイド生合成経路において重要な役割をもつカロテノイド変換酵素について、ゲノム情報から遺伝子の探索を行い、大腸菌を用いた酵素機能解析を行った。

まず、*P. yezoensis* のゲノム情報に対し、植物のカロテノイド合成酵素の遺伝子配列を用いて、BLAST 検索によりカロテノイド合成酵素の探索を行った。その結果、phytoene synthase (PSY)、phytoene desaturase (PDS)、carotenoid isomerase (CRTISO)、lycopene cyclase (LCY1, LCY2)、CYP97B、zeaxanthin epoxidase (ZEP) の遺伝子が見つかった。一方、陸上植物において機能解析が進められているカロテノイド生合成酵素である CYP97A、CYP97C、BHY の遺伝子と相同性がある遺伝子を見出すことはできなかった。

次に、これらの酵素のうち、陸上植物では機能が未解明であり、海藻においても詳細な検討が行われていない carotene hydroxylase (*P. yezoensis* CYP97B (PyCYP97B)) について、大腸菌を用いた酵素遺伝子の発現系によるカロテノイド変換活性の解析を行った。その結果、zeinoxanthin を合成する大腸菌に PyCYP97B を形質導入したところ、新たに lutein 合成が確認され、PyCYP97B の ϵ -ring carotene hydroxylase 活性が明らかになった。これまでに紅藻の ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を明らかにした報告はなく、新規のカロテノイド合成酵素活性の発見といえる。

一方、同じ Bangiales の *Porphyra umbilicalis* の CYP97B (PuCHY1) では β -ring carotene hydroxylase 活性が認められているが、本研究では確認できなかった。その原因として、PyCYP97B 遺伝子の GC 含量の高さと葉緑体移行シグナルの存在による影響を考え、コドンの最適化および葉緑体移行シグナル除去を行い carotene hydroxylase 活性について検討を行った。その結果、コドン最適化により PyCYP97B で変換された lutein 組成が増加し、 ϵ -ring carotene hydroxylase 活性が向上したことが示唆された。さらに、葉緑体移行シグナルを除去した配列では、わずかではあるが zeaxanthin の蓄積が確認された。このことから、PyCYP97B は ϵ -ring carotene hydroxylase 活性と β -ring carotene hydroxylase 活性の両方を併せ持つことが示唆された。

第三章では、第二章で見出したカロテノイド変換酵素遺伝子を用いて、ノリ養殖業で長年問題となっている色落ちとカロテノイド生合成との関係を検証した。色落ちの原因は海水中の栄養塩の減少であると考えられており、本研究では培地中の栄養成分 (ESS₂) を除いて *P. yezoensis* 糸状体の培養を行うことで色落ちを誘導した。結果として、栄養成分除去培地で培養した *P. yezoensis* は培養 3 週目で顕著な退色を示した。その後、栄養成分添加培地で培養を行ったところ、色調の回復が認められた。このことから、栄養成分の除去により *P. yezoensis* では色落ちが誘導されることが明らかとなった。さらに、色落ち現象中の藻体内カロテノイド量を測定したところ、栄養塩除去後 2 週目でコントロールの藻体と比較して、 α -/ β -carotene、zeaxanthin、lutein の有意な増加が認められた。さらに、カロテノイド生合成遺伝子の mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法で評価したところ、カロテノイド量と同様に色落ちに伴い有意に mRNA 発現量が増加していることが分かった。これらの結果

から、*P. yezoensis* 中で、色落ち現象中にカロテノイド合成が促進されることが推察された。

以上のように、本研究では精密な機器分析により *P. yezoensis* におけるカロテノイド合成経路中の中間代謝物を同定し、これまで明らかになっていなかった lutein 合成経路や epoxycarotenoid の存在を初めて明らかにした。さらに、大腸菌を用いた酵素機能解析により、紅藻で見出されていなかった ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を PyCYP97B が担っていることを明らかにし、陸上植物とは異なるカロテノイド生合成系の一端を示した。これらの知見は、紅藻のカロテノイド合成経路の解明に寄与することが期待される。