



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	紅藻スサビノリ <i>Pyropia yezoensis</i> のカロテノイド生合成経路に関する研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14150
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96732
Type	doctoral thesis
File Information	Jiro_Koizumi.pdf



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
(Studies on the carotenoid biosynthetic pathway
in a red seaweed, *Pyropia yezoensis*)

北海道大学大学院水産科学院
海洋応用生命科学専攻
Graduate School of Fisheries Sciences
Division of Marine Life Science

小泉 次郎
Jiro Koizumi

2020 年

目次

緒言	・・・1
第一章 <i>Pyropia yezoensis</i> に含まれるカロテノイドの同定	
序論	・・・13
第一節 <i>P. yezoensis</i> 糸状体のカロテノイドの抽出・精製および同定	・・・15
第二節 <i>P. yezoensis</i> 葉状体のカロテノイドの抽出・精製および同定	・・・33
第二章 <i>P. yezoensis</i> カロテノイド合成遺伝子の探索と CYP97B の酵素機能解析	
序論	・・・47
第一節 <i>P. yezoensis</i> カロテノイド合成遺伝子の探索	・・・50
第二節 大腸菌を用いた <i>P. yezoensis</i> CYP97B の酵素機能解析	・・・66
第三節 大腸菌を用いた PyCYP97B の酵素機能解析におけるコドン最適化と 葉緑体移行シグナル除去の検討	・・・77
第三章 <i>P. yezoensis</i> における栄養ストレスに対するカロテノイド量とカロテノイド 合成遺伝子発現量の変化	
序論	・・・88
第一節 栄養ストレス環境下における <i>P. yezoensis</i> のカロテノイド合成	・・・90

総合考察	・・・101
参考文献	・・・108
謝辞	・・・119

緒言

カロテノイドは主に植物、海藻などの光合成生物や菌類、酵母などの微生物が産生する赤色から黄色の脂溶性色素であり、クロロフィル、フラボノイドとともに植物の多様な色調を構成する主要成分である。一方で、動物においては水平伝播で獲得した少数の昆虫の例外を除き[1]、カロテノイド合成は認められないが、サケ類や甲殻類などは餌由来のカロテノイドを蓄積し、赤色の体色を示す種が多い。

カロテノイドは光合成生物中で主に光合成アンテナとして機能し、光合成複合体で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と考えられている。一方、カロテノイドはクロロフィル a の一重項励起状態の消去能や活性酸素除去能といった過剰な光エネルギーからの細胞保護機能も持つ[2-6]。これらの生物機能はカロテノイドの分子構造に依存するところが大きく、構造中に共役二重結合鎖が長いほどクロロフィル a の一重項励起状態の消去機能が強い。多くの光合成生物はこのようなカロテノイドの構造的特徴を利用し、可逆的にカロテノイドを変換することでキサントフィルサイクルと呼ばれる光制御機構を有している。代表的な例として、陸上植物では zeaxanthin $\rightleftharpoons$ antheraxanthin $\rightleftharpoons$ violaxanthin のサイクルを持ち、暗所下では zeaxanthin epoxidase により、zeaxanthin を violaxanthin に変換することで光補修を亢進し、逆に強光下では、violaxanthin deepoxidase により光防御能の高い zeaxanthin の含有量を増加させる(Fig. 1)。また、近年他のカロテノイドによる新たなキサントフィルサイクルが報告されており、lutein と lutein-5,6-epoxide[7,8]、珪藻や褐藻の diadinoxanthin と diatoxanthin のサイクルなどが報告されている[9]。

カロテノイドはこのような光制御能に加えて、植物ホルモンの一種である

strigolactone や abscisic acid の前駆体として知られており、光合成生物の成長に重要な成分である[10]。

また、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、 β -carotene や α -carotene、 β -cryptoxanthin の provitamin A 活性や lutein、zeaxanthin の加齢黄斑変性に対する改善効果が知られている[11-13]。近年、様々なカロテノイドの新たな健康機能が報告されており[14]、健康食品や化粧品の素材として広く利用されている。

このようなカロテノイドの分子構造は、8 個のイソプレノイドが直鎖状に結合した C40 構造をしており、メバロン酸回路、あるいは非メバロン酸回路で生産される isopentenyl diphosphate (IPP) から生合成される。IPP は head to tail 型縮合することで炭素数が増加し、C20 である geranylgeranyl diphosphate (GGPS) を経て、もっとも単純なカロテノイドである C40 の phytoene が合成される。Phytoene は共役二重結合が少ないため無色をしているが、不飽和化を受け phytofluene、 ζ -carotene、neurosporene を経て lycopene になると黄色の色調を呈するようになる[15]。その後、lycopene は両端に環状構造を形成することで carotene が合成されるが、環は二重結合の位置により β 環、 ϵ 環の二種類があり、両端が β 環の構造 (β, β -carotene (β -carotene)) または、 β 環と ϵ 環を両端にそれぞれ持つ構造 (β, ϵ -carotene (α -carotene)) に変換し、レタスなどの例外を除いて両端が ϵ 環の ϵ, ϵ -carotene は合成しない[16]。

さらに下流に進むと α -/ β -carotene の両端の環はヒドロキシル基、エポキシ基、ケト基などの修飾を受けキサントフィルが生合成される。一部のカロテノイドではイソプレノイド骨格がアレン構造、アセチレン構造などに変換されることで、生物種特有のカロテノイドを生合成する経路もある。このように多くの官能基や分子構造がカロテノイド構造の多様性に寄与しており、現在までに天然

から 750 種類を超えるカロテノイドが同定されている[17]。

多数のカロテノイドが発見されている中、多彩な構造は主に藻類やカビ、細菌などによって合成されるものが多く、陸上植物は比較的共通したカロテノイド組成を持つものが多い。多くの陸上植物のカロテノイド組成は β -carotene およびその誘導体である violaxanthin、neoxanthin と α -carotene 誘導体である lutein が主成分である。一方で、海藻のカロテノイド組成は緑藻、紅藻、褐藻でそれぞれ異なる特徴を持つ。まず、緑藻は陸上植物に含まれるカロテノイドに加えて siphonaxanthin や astaxanthin などのケトカロテノイドを合成する種が多く存在する[18,19]。また、褐藻は α -carotene 誘導体を持たず β -carotene 誘導体のみ合成し、アレン構造を持つ fucoxanthin を顕著に合成する特徴がある[18,19] (Fig. 2)。さらに、紅藻については β -carotene 誘導体のみを産生するタイプ (β -carotene タイプ)と α - β -carotene 誘導体の両方を産生するタイプ (α - β -carotene タイプ)の両方が存在する[18,19]。 β -carotene タイプの紅藻は主に、 β -carotene と zeaxanthin を蓄積し、 α - β -carotene タイプの紅藻は β -carotene と zeaxanthin に加えて α -carotene、lutein が主要な成分で、種によっては antheraxanthin を豊富に蓄積する[20]。しかしながら、紅藻からは緑藻で検出される neoxanthin 以降の誘導体は見つかっていない。

これらの海藻は海中に生息する共通点はあるが、陸上植物のように共通祖先をもつ単系統の生物群ではないため、上記のようなカロテノイド組成の違いが生じたと考えられる。最近の分類によると[21,22]、一次共生由来の葉緑体を持つ生物群を Archaeplastida とし、Glaucophyta (灰色植物)、Chloroplastida (緑色植物)、Rhodophyta (紅色植物)の 3 群に分類されている。緑藻および陸上植物は Chloroplastida に含まれ、紅藻は一般に Rhodophyta と同義で扱われるが、褐藻は紅藻由来の二次共生の葉緑体を持つと考えられているため、

Archaeplastida ではなく Sar の Stramenopiles に分類されている。このように、系統学的に近縁の陸上植物と緑藻はカロテノイド組成が類似しており、二次共生由来の葉緑体を持つ褐藻は独自の性質を獲得したと考えられる。

紅藻は上述した通り 2 種類のカロテノイド組成のタイプ (β -carotene、 α - β -carotene タイプ) が存在するため、さらに詳細な分類をすると、従来、原始紅藻と真正紅藻に分けられていた分類が、現在は分子系統学的手法により *Cyanidioschyzon merolae* を含む Cyanidiophytina (イデユコゴメ亜門) を独立の分類群とし、残りを Eurhodophytina (真正紅藻亜門) と Proteorhodophytina (原始紅藻亜門) に分けることが提唱されている (Fig. 3)[22-24]。カロテノイド組成は、現在提唱されている分類に良く一致し、Cyanidiophytina と Proteorhodophytina は β -carotene タイプのカロテノイド組成を持ち、Eurhodophytina は多くが α - β -carotene タイプのカロテノイド組成を持つ[19]。

このように、海藻のカロテノイド組成は陸上植物と異なり多様性に富むため、合成経路についての詳細な検討が進んでいない。特に、陸上植物と共通点が多い緑藻と異なり、紅藻と褐藻については未解明な点が多く存在する。褐藻は紅藻由来の二次共生の葉緑体をもつと考えられているため、紅藻のカロテノイド合成経路の解明は、紅藻のみならず褐藻を含む二次共生光合成生物の系統学的分類に貢献し、光合成生物進化の解明に寄与する有益な知見となる。

P. 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り、日本を始め東アジアで大規模に養殖されている。国内で食用とされるノリは 28 種類存在するが[25]養殖される品種は *P. tenera* (アサクサノリ) や *P. yezoensis* など数種類しか存在しない。かつては *P. tenera* が養殖の代表的品種であったが、近年では多収性、成長の良さ、色艶の良さなどから *P. yezoensis* がノリ養殖全体の 99% 以上を占めている。

P. yezoensis は、配偶体である葉状体と孢子体である糸状体とが交互に世代交代を繰り返す生活史を持ち、ノリとして食用とされる葉状体は数～数十 cm の大きさになる一方、糸状体は顕微鏡的な大きさで、太さ 5 μm 程度の枝分かれする構造である。葉状体は冬から春にかけて潮間帯から漸深帯の岩や構造物、他の海藻などに着生するのに対して、糸状体は夏に貝殻などの石灰質の物に穿孔して生育している。我が国のノリの養殖は約 300 年前から行われていたが、食用とされる冬から春の形状と夏の形状が大きく異なるため、長らく夏期のノリの存在場所は不明であった。ノリが生活史が明らかになったのは、1949 年にイギリスの Drew によって糸状体が発見されたことによる功績が大きい。Drew は *Porphyra kurogii* (チシマクロノリ) の雌から放出された孢子を貝殻に付着させたところ長年 *Conchocelis rosea* と呼ばれていた藻類と同様の菌糸状になることを Nature 誌に報告[26]し、ノリが糸状体期 (conchocelis-phase) を持つことを明らかにした。これにより、ノリの夏期の存在形態が明らかになり、現在の貝殻に糸状体を付着させる養殖技術が開発され、ノリ養殖が大きく発展した。現在では、養殖ノリは国内だけでも年約 30 万トン(湿重量)生産されており[27]、日本で最も重要な養殖水産物の一つである。

大量養殖が可能となった一方で、近年ノリ養殖で問題となっているのが色落ちである。色落ちとは、窒素塩などの栄養成分が不足することによりノリの色素が減少することで本来濃紫色の藻体が薄緑色に変化する現象であり、色落ちしたノリは商品価値が損なわれるため養殖生産地域で大きな問題となっている。

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、最近、植物ホルモン前駆体の可能性が報告され注目される。また、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物質であり[28]、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。

また、*P. yezoensis* は産業的に重要な生物であるだけでなく、研究室レベルで培養可能な点や、ゲノム情報が解析されている点[29]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学術的に有用な生物である[30]。以上から、本研究では *P. yezoensis* を用いて、紅藻のカロテノイド合成経路に関する研究を試みた。

カロテノイド合成経路を明らかにするためには、中間代謝物の同定と変換酵素の探索が必要である。そのような中間代謝物に関して、陸上植物ではおおむね共通した経路が明らかにされており、Fig. 4 に示す通り β -carotene 代謝物は単一の経路で、 α -carotene は 2 経路で lutein を合成することが明らかになっている。一方で、*P. yezoensis* を含む紅藻においては、上述した主要なカロテノイド以外のカロテノイドについて、含有量が極めて微量であることや、異性体の構造が酷似していることから分離が困難であるために十分な解明が進んでいない。また、近年 *P. yezoensis* からカロテノイド代謝物である植物ホルモン abscisic acid が検出された[31]。陸上植物において abscisic acid は、 β -carotene 誘導体である zeaxanthin を経て、antheraxanthin から violaxanthin、neoxanthin へと代謝される経路の中で、violaxanthin または neoxanthin から生合成されることが明らかになっている。このことから、*P. yezoensis* 中にも abscisic acid 前駆体である antheraxanthin 以降の代謝物の存在が予想されるが、これまでにこれらのカロテノイドが *P. yezoensis* から検出された報告はない。

また、同じカロテノイド合成経路においても、異なる生物間ではカロテノイド合成酵素は必ずしも同一ではないことが分かっている。たとえば、phytoene から lycopene までの合成酵素は、多くの原核生物では単一の酵素(CrtI)で行われるが、シアノバクテリア、緑色硫黄細菌と葉緑体では 3 または 4 種の酵素に

分けられている[32]。また、lycopene cyclase についても葉緑体のもつ CrtL 以外に、主に原核生物では CrtY、CruA/CruP、ヘテロ二量体型(グラム陽性菌の CrtYc+CrtYd など)の 3 種類の酵素が知られている[33]。続く carotene hydroxylase については、葉緑体生物間においても多様性が認められる。まず、酵素の種類として、非ヘム型二鉄水酸化酵素である BHY とシトクローム P450 型酵素である CYP97 の二種類が存在する。BHY は陸上植物、緑藻で見つかっており、これまでに β -ring carotene hydroxylase 活性のみが認められ、主に β -carotene 誘導体のヒドロキシル化に寄与すると考えられている。一方、CYP97 を含むシトクローム P450 タイプの酵素は 40%の類似性で共通のファミリー、55%の類似性で共通のサブファミリーで分類される酵素群で[34]、これまでに CYP97 で見つかっている主要なサブファミリーは CYP97A、CYP97B、CYP97C である。陸上植物の CYP97A は BHY 同様 β -ring carotene hydroxylase 活性をもつが、特に α -carotene 誘導体に関与していると考えられている[35]。また、CYP97C は ϵ -ring carotene hydroxylase 活性をもち[36]、これらの酵素により α -carotene の両環がヒドロキシル化され、lutein が合成される。陸上植物は CYP97B も持つが、その酵素機能はよくわかっておらず、CYP97A と CYP97C で酵素機能の解析報告がある一方で、陸上植物と緑藻の CYP97B の酵素活性が認められた報告はない[37]。

さらに、陸上植物と緑藻以外の光合成生物の carotene hydroxylase についてはほとんど明らかになっていない。特に緑藻以外の藻類からは CYP97B 以外の carotene hydroxylase のホモログが見つかっておらず[38]、解析が進んでいない状況にある。

これまでに CYP97B の活性が明らかになった報告は 2 報しかなく、1 報目が *Po. umbilicalis* の CYP97B(PuCHY1)に関する報告で、 β -carotene を合成する

大腸菌に *PuCHY1* 遺伝子を形質導入し、PuCHY1 が β -carotene を zeaxanthin に変換する β -ring carotene hydroxylase 活性を持つことが示されている[39]。さらに、 ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を有することも示唆されたが、大腸菌中で活性は認められなかった。2 報目は珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の CYP97B に関する報告で、2 個の CYP97B(Ptrcyp97b1、Ptrcyp97b2)が見つかったうち、Ptrcyp97b2 のみに β -ring carotene hydroxylase 活性が認められたものであった[40]。しかしながら、これら 2 報以外の報告はなく、特に lutein 合成に必要な紅藻の ϵ -ring carotene hydroxylase は未解明である。そこで、本研究では紅藻 *P. yezoensis* を用いて、第一章で紅藻のカロテノイド組成について詳細な検討を行い、カロテノイド中間代謝物や、誘導体を LC/MS や $^1\text{H-NMR}$ で同定することで、*P. yezoensis* におけるカロテノイド合成経路を明らかにした。

続いて、第二章では *P. yezoensis* ゲノム情報からカロテノイド合成酵素の遺伝子情報を入手し、得られた塩基配列を用いてほかの生物のカロテノイド合成酵素とアライメント比較を行い、その活性を推定した。さらに、得られた carotene hydroxylase 配列を *P. yezoensis* から単離し、carotene 合成大腸菌に形質導入することでその解析を行った。

第三章では、ノリ養殖の現場で近年問題となっている *P. yezoensis* の色落ちとカロテノイドの関係を評価するため、得られたカロテノイド合成遺伝子配列を用いてリアルタイム PCR で色落ち現象中のカロテノイド合成遺伝子発現量を評価した。さらに、遺伝子発現量と藻体中のカロテノイド含有量と比較し、色落ちに対する *P. yezoensis* のカロテノイド制御機能を評価した。

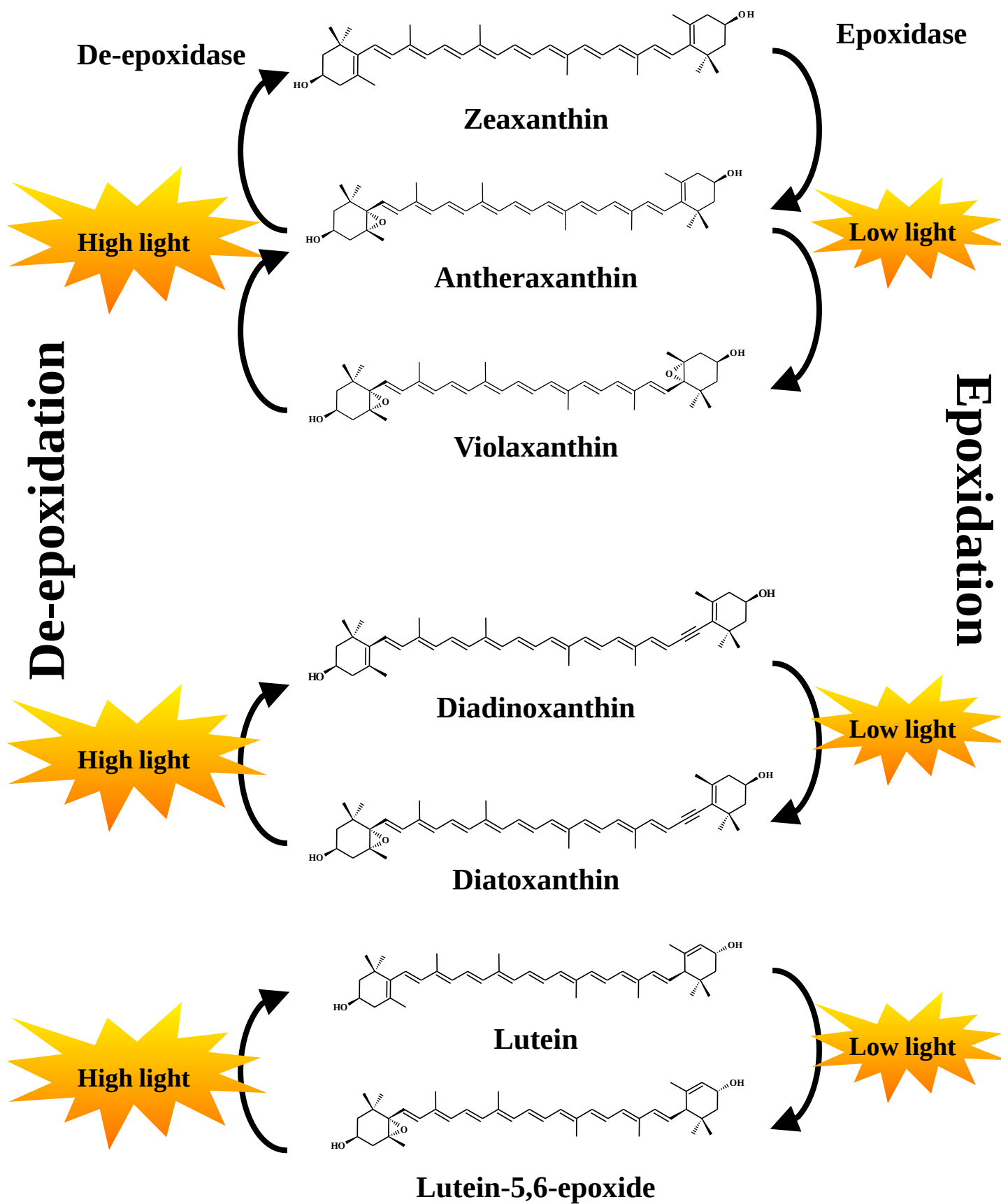


Fig. 1 Xanthophyll cycles.

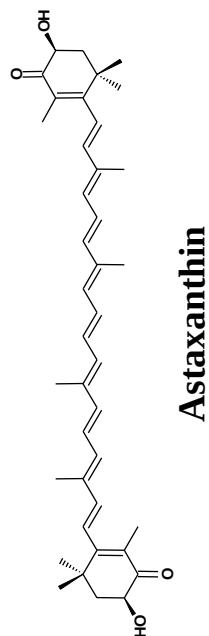
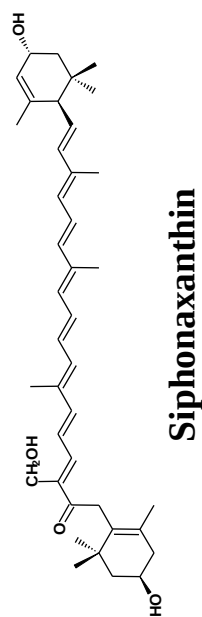
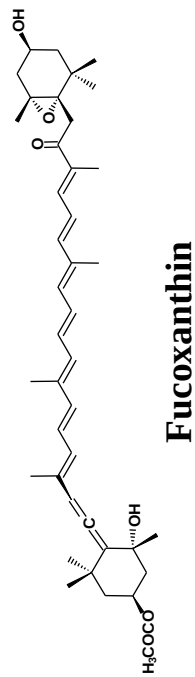
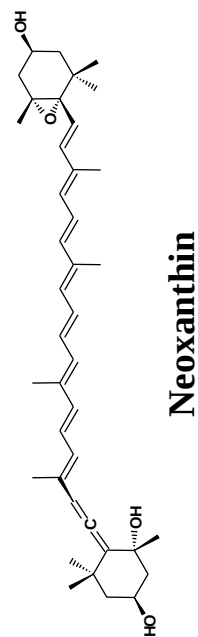
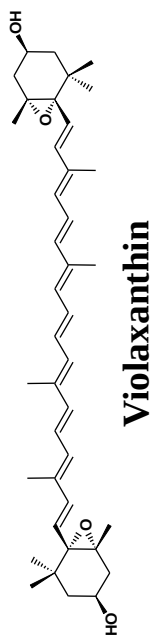
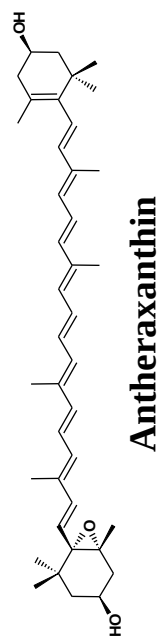
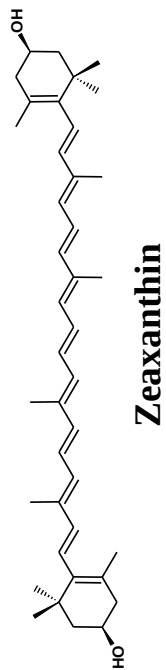
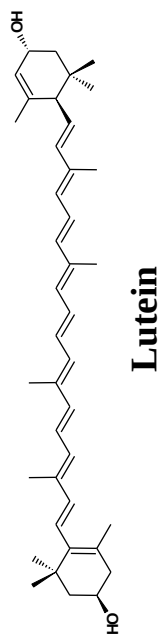
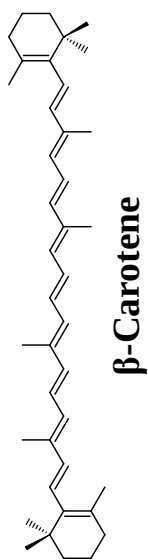
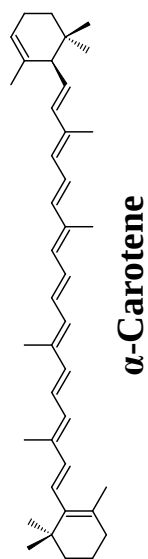


Fig. 2 Carotenoids structure

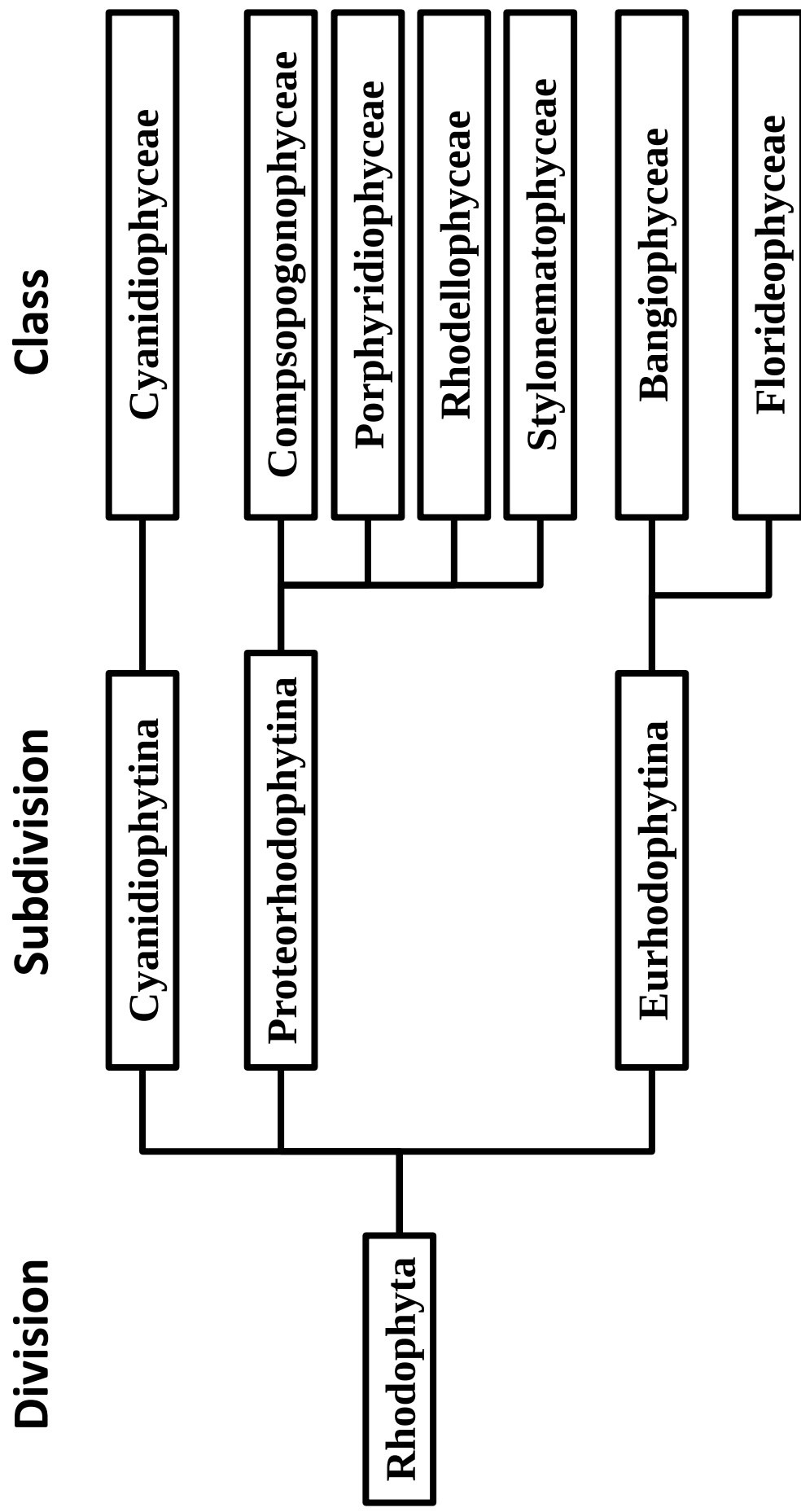


Fig. 3 Classification of red algae

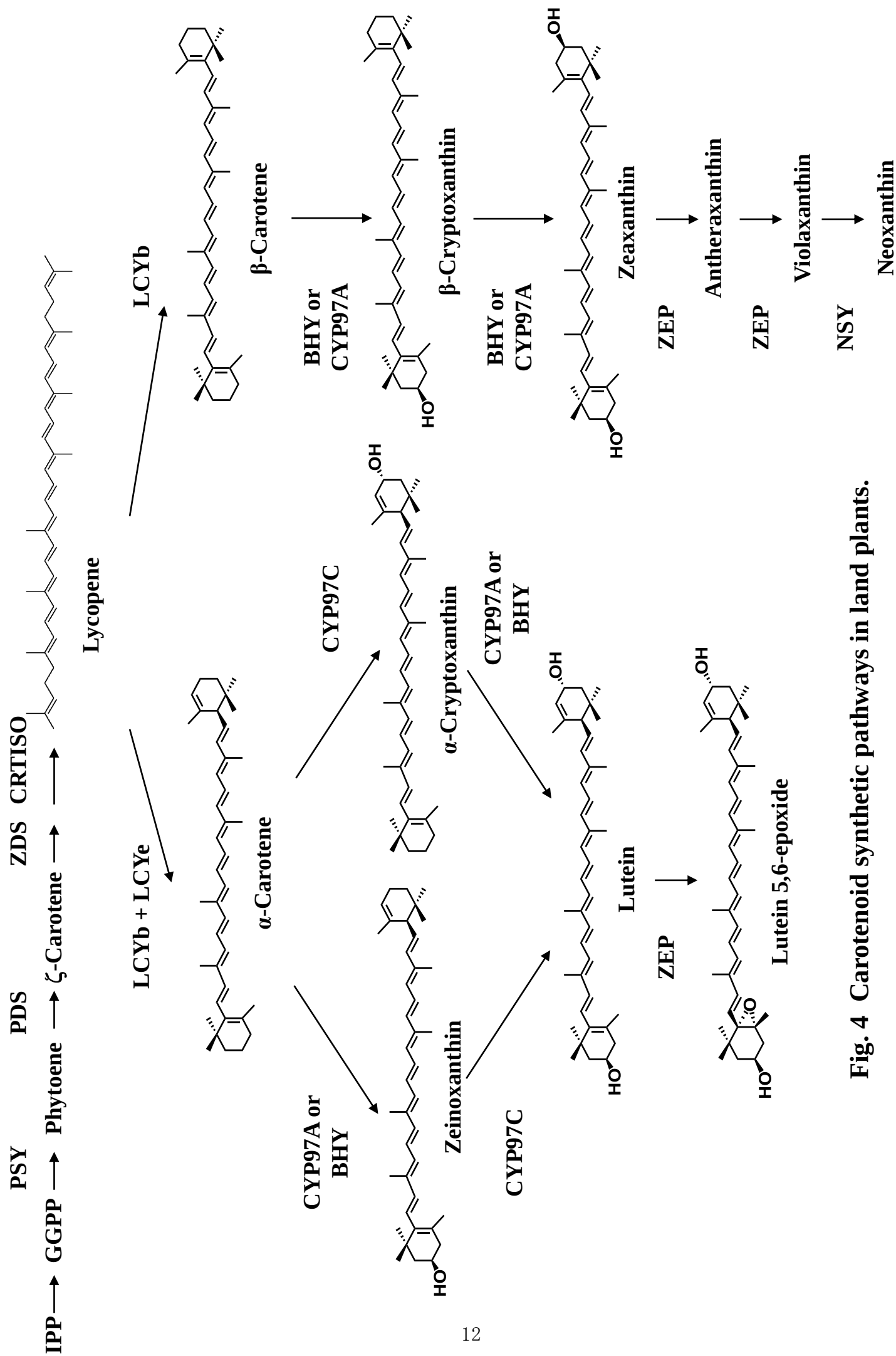


Fig. 4 Carotenoid synthetic pathways in land plants.

第一章

Pyropia yezoensis に含まれるカロテノイドの同定

序論

Pyropia yezoensis は、糸状体と葉状体を交互に繰り返す生活環を持つ。糸状体は *P. yezoensis* の夏の形態で、顕微鏡で見ることのできる小さなサイズであり、自然界では貝殻などに穿孔するため採取は困難である。一方、実験室レベルでは培養容器中に浮遊させながら培養することが可能であるため、年間を通じて適宜サンプリングが可能である。しかし、増殖速度は遅く、培養に時間を要するため、大量に藻体を入手することは容易ではない。

葉状体は我々が食用のノリとして普段目にする形態であり、海面養殖されているため大量に入手可能である。一方で、採取可能な季節は冬から春に限られているため採取時期が限られる。また、海上養殖された藻体には大量の微細藻類が付着しており、成分分析のためにはその除去が必要となる。

カロテノイド合成経路を探索するために経路中の中間代謝物や代謝物の探索が必要である。これまでに *P. yezoensis* に含まれるカロテノイドとして、含有量の多い α -/ β -carotene、zeaxanthin、lutein の報告があるが[20]、微量なカロテノイドについてはNMRやLC/MSによる精密な構造解析がなされておらず未説明といえる。特に、 α -/ β -carotene から lutein や zeaxanthin への変換における中間代謝物には3種類の monohydroxy carotene が存在する可能性があり、生合成酵素も異なることが予想される。また、*P. yezoensis* から abscisic acid が同定されていることから、その前駆体となる epoxycarotenoid の存在が予測されるが、これまでに報告はない。その大きな要因として、上記の中間代謝物

が微量であることが想定される。そこで、効率よくカロテノイドを探索するため、大量に入手可能な葉状体の *P. yezoensis* と、付着微生物のコンタミネーションの恐れがない糸状体の両形態で合成経路の検討を行った。

まず *P. yezoensis* から総脂質を抽出した後、そこから微量に含まれるカロテノイドを分画し、機器分析に供することで微量中間代謝物の同定を試みた。同定に際し、第一節では純粋培養した糸状体を用いて、微量成分の中でも比較的含有量が多い monohydroxy carotenoid について、LC/MS、¹H-NMR を用いて構造決定を行った。

さらに第二節では第一節の糸状体では正しい同定が困難であった微量カロテノイドに関して、海面養殖された葉状体入手し、そこから抽出した総脂質から分画・精製をおこない、*P. yezoensis* 中のカロテノイド合成経路の全容の把握を試みた。

第一節

P. yezoensis 糸状体のカロテノイドの抽出・精製および同定

実験方法

1.1.1 試料および試薬

本節では愛知県水産試験場漁業生産研究所より分与された *P. yezoensis* U-51 株の糸状体を用いた。

培養には、日本海水（株）より購入した人工海水（SEA LIFE）に栄養源を含んだ ESS₂（Enriched Seawater of Saga-2）原液を 10 ml/l 添加した ESL（Enriched Sea Life）培地を用いた（Table. 1-1-1）。

ESS₂ の調製に用いた HEPES、inositol は Sigma-Aldrich から購入した。NaNO₃、disodium glycerophosphate 5.5 hydrate、KI、FeCl₃・6H₂O、H₃BO₃、MnCl₂・4H₂O、CoCl₂・6H₂O、cyanocobalamin（Vitamin B₁₂）、biotin、thiamine-HCl、Ca-pantothenate、*p*-aminobenzoic acid は和光純薬工業（株）より購入した。Fe-EDTA・3H₂O、2NA（EDTA・2Na）は同仁化学研究所（株）から購入した。ZnCl₂、nicotinic acid、thymine は、東京化成工業（株）から購入した。一級 chloroform、特級 acetone、特級 ethyl acetate、特級 n-hexane、特級 methanol、特級 petroleum ether、HPLC 用 dichloromethane、HPLC 用 acetonitrile、HPLC 用 methanol、LC/MS 用 methanol は、和光純薬工業（株）より購入した。薄層クロマトグラフィー（TLC）で用いた厚さ 0.5 mm および 0.25 mm シリカゲル TLC プレートは Merck より購入した。カロテノイドの標品である α -carotene、 β -carotene、 β -cryptoxanthin、lutein、zeaxanthin は Carote

Nature 社より購入した。Zeinoxanthin は、標品が市販されていないため神戸薬科大学から提供された合成 zeinoxanthin[41]を標品として用いた。

1.1.2 *P. yezoensis* の培養

簡易式培養容器であるポリエチレン製の培養バッグ（共和コンクリート株式会社 海藻技術研究所アルガテック Kyowa）に滅菌した ESL 培地 1.5 l を入れ、光量 $40 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、温度 15°C 、長日条件（明期 14 時間・暗期 10 時間）の下で、孔径 $0.22 \mu\text{m}$ の滅菌フィルター（Merck Millipore）を介して通気培養を行った。また、培地は 7 日毎に交換した。

1.1.3 *P. yezoensis* 総脂質の抽出

培養した *P. yezoensis* をろ過して重量を秤り、20 倍量の methanol (v/w) に、室温、暗所下で 24 時間浸漬した。得られた抽出液をロータリーエバポレーターで溶媒を留去し、さらに Folch 法 (chloroform : methanol : water (10 : 5 : 3, v/v/v)) による溶媒分画を行った。海藻残渣は再度 20 倍量の methanol (v/w) に浸漬し 2 回抽出を行った。下層の chloroform 層を回収後、溶媒を留去し *P. yezoensis* 総脂質を得た。

1.1.4 *P. yezoensis* 総脂質の HPLC 分析

1.1.3 で得た *P. yezoensis* 総脂質について、以下の条件で HPLC を用いて含まれているカロテノイドの分析を行った。カロテノイドの同定は、Carote Nature 社より購入した、 α -carotene（合成）、 β -carotene（合成）、lutein（抽出）、zeaxanthin（合成）標品とのリテンションタイムと吸収スペクトルを比較することで行った。

HPLC 条件

ポンプ：	HITACHI PUMP L-2130（日立製作所（株））
検出器：	HITACHI Diode Array Detector L-2455（日立製作所（株））
オートサンプラー：	HITACHI Autosampler L-2200（日立製作所（株））
カラムオーブン：	HITACHI Column Oven L-2350（日立製作所（株））
システム：	EZChrom Elite
カラム：	Develosil C30-UG-5(4.6×250 mm)（野村化学（株））
検出波長：	250-700 nm
移動相：	A：Methanol(MeOH) B：Dichloromethane
カラム温度：	25°C
流速：	1.0 ml/min

Table.1-1-2 HPLC solvent gradient pattern for carotenoid analysis

Time [min]	MeOH(A) [%]	Dichloromethane(B) [%]	Flow [ml/min]
0	100	0	1.0
20	100	0	1.0
40	50	50	1.0
60	50	50	1.0

1.1.5 Thin layer chromatography（TLC）を用いたカロテノイドの分画

P. yezoensis 総脂質を 0.5 mm 調製用シリカゲル TLC プレートに負荷し、petroleum ether : acetone (7:3, v/v) で展開した。展開後のプレートから、lutein

の黄色のバンドを基準とし、高極性の画分と、可視下で黄色を呈した低極性の画分を掻き取った (Fig. 1-1-1(a))。後者の画分を acetone によりシリカゲルから溶出し、溶媒をロータリーエバポレーターで留去した後、ethyl acetate : n-hexane (6:4, v/v) の溶媒で再度展開した (Fig. 1-1-2(b))。黄色を呈したバンドをクロロフィルから分離し、掻き取ったシリカゲルから、acetone で色素成分を溶出した。

1.1.6 HPLC を用いたカロテノイドの分取

1.1.5 で得られた lutein より低極性の黄色を呈した画分を、以下の条件のもと HPLC により分離精製を行った。

HPLC 条件

ポンプ：	HITACHI PUMP L-2130 (日立製作所 (株))
検出器：	HITACHI Detector L-2400 (日立製作所 (株))
カラム：	Develosil ODS-5(20×250 mm) (野村化学 (株))
検出波長：	450 nm
移動相：	Methanol : Acetone (6 : 4, v/v)
カラム温度：	室温
流速：	8.0 ml/min

精製後の画分を再び HPLC に供し、更なる分取と精製を行った。その際の HPLC 条件を以下に示す。

HPLC 条件

ポンプ： HITACHI PUMP L-2130（日立製作所（株））
検出器： HITACHI Detector L-2400（日立製作所（株））
カラム： Mightysil Si60(4.6×250 mm)（関東化学（株））
検出波長： 450 nm
移動相： n-Hexane : Acetone（9 : 1, v/v）
カラム温度： 室温
流速： 1.0 ml/min

1.1.7 カロテノイドの構造解析

CDCl₃ に溶解したカロテノイドの ¹H-NMR スペクトル解析は、UNITY INOVA-500 NMR system（Varian）を用いて、周波数 500 MHz にて行った。ポジティブイオンモードの ESI-MS（Electro-Spray Ionization Mass Spectrometry）スペクトルは、Aquity LC Xevo G2-S Q time-of-flight MS spectrometer（Waters）および LCMS8040(Shimadzu)を用いて測定した。

LC/MS 分析条件

ポンプ： SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH LC-20AD
（島津製作所（株））
検出器： SHIMADZU UV/VIS DETECTOR SPD-20A
（島津製作所（株））
オートサンプラー： SHIMADZU AUTO SAMPLER SIL-20AC HT
（島津製作所（株））
カラムオーブン： SHIMADZU COLUMN OVEN CTO-20AC
（島津製作所（株））

質量分析計： SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH MASS
SPECTROMETER（島津製作所（株））

システム： LabSolutions

カラム： Develosil HB ODS-UG-3(2.0×100 mm)（野村化学（株））

検出波長： 445 nm

移動相： Methanol

カラム温度： 25°C

流速： 0.1 ml/min

イオン化： ESI（ポジティブイオンモード）

結果と考察

P. yezoensis 主要なカロテノイドは、 α - β -carotene、lutein、zeaxanthin であることが分かっているが[20]これらの中間代謝物については報告されていない。

本章ではまず、*P. yezoensis* 糸状体から methanol で総脂質を抽出し、HPLC で主要なカロテノイドの存在を確認した。その結果、既報[20]通り α - β -carotene、lutein、zeaxanthin が検出された(Fig. 1-1-2)。次いで、これらの中間代謝物の同定のため TLC で総脂質を展開したところ、クロロフィルの緑色のバンドのほかに、3つの黄色のバンドが確認された(Fig. 1-1-1(a))。

最も低極性側(上部)のバンドは α - β -carotene であり、最も高極性側のバンドは lutein、zeaxanthin であったため、それらの中間のバンド(Fraction A)を回収した。Fraction A について精製を行った後、HPLC で分析したところ3つのピークが検出された(Fig. 1-1-1(c))。そこで、それらのピークについてそれぞれ HPLC で分取を行い、LC/MS による詳細な分析を行った。

まず、比較的含有量が多かった Peak 3(10.92 min)について LC/MS 分析を行ったところ、さらに Peak 3-1 と Peak 3-2 に分かれた(Fig. 1-1-3(a))。それらのリテンションタイムをカロテノイド標品と比較したところ、それぞれ Peak 3-1 が zeinoxanthin、Peak 3-2 が β -cryptoxanthin と一致した(Fig. 1-1-3(b,c))。さらに、マスキロマトグラムを比較したところ、 m/z 552.40[M]⁺のピークは Peak 3-1 と Peak 3-2 のいずれでも検出された。一方で、 m/z 535.40[MH-H₂O]⁺のピークはいずれも検出されなかった(Fig. 1-1-3(d,e,f))。ε環の第3位にアリルアルコールを持つカロテノイドの特徴として、イオン化の際に、ヒドロキシル基が水(-H₂O)として脱離しやすいことが知られており、水が脱離した[MH-H₂O]⁺の

ピークが検出されなかったことから、Peak 3-1 と 3-2 は同分子量の構造異性体である α -cryptoxanthin でないことが支持された。

次に、Peak 1 について LC/MS 分析を行った結果、 m/z 552.4337[M]⁺のピークよりも m/z 535.4299[MH-H₂O]⁺のピークが強い強度で検出された(Fig. 1-1-4)。このことは、上述したとおりヒドロキシル基が水として脱離したことを示しており、構造中に第 3 位にヒドロキシル基が結合した ϵ 環を持つことが示唆された。さらに、¹H-NMR で分析した結果、Peak 1 は α -cryptoxanthin であることが構造決定された(Fig. 1-1-5、Table 1-1-3)。なお、Peak 2 については、同定を試みたが微量であったため同定には至らなかったが、同定した monohydroxy carotene のいずれかの *cis* 体の可能性が考えられる。

Lutein、zeaxanthin はそれぞれ α -carotene、 β -carotene の両端の環構造にヒドロキシル基が結合した構造を有している。Zeaxanthin は両端が β 環を持つ対称構造のためモノヒドロキシル化した β -cryptoxanthin が唯一の中間代謝物であるが、lutein は β 環と ϵ 環を持つため、モノヒドロキシル化の部位で zeinoxanthin(β 環)と α -cryptoxanthin(ϵ 環)の 2 種類の間カロテノイドの存在が考えられる(Fig. 4)。本結果により、*P. yezoensis* の lutein 合成経路は α -cryptoxanthin を介する経路と zeinoxanthin を介する 2 つの経路が存在することが明らかとなった(Fig. 1-1-6)。紅藻類において、 α -cryptoxanthin はこれまでに *Antithamnion plumula*(Ceramiales)[42] と *Jania rubens* (Corallinales)[43]で報告があったが、Bangiales では本研究が初めての発見となった。さらに、zeinoxanthin についてはこれまでに紅藻で発見された報告はなく、本研究により初めて同定された。

Lutein 合成経路について、高等植物は α -carotene から α -cryptoxanthin と zeinoxanthin の 2 経路があることが知られており、*P. yezoensis* も同様の合成

経路を持つことが明らかとなった。一方、原始的な陸上植物であるゼニゴケでは zeinoxanthin を介する経路のみ報告されており[44]、このようなカロテノイド合成経路の違いは、それぞれの生物が持つカロテノイド変換酵素の違いによるものである可能性がある。

本節では lutein、zeaxanthin より高極性のカロテノイドについて、サンプル量が微量で検証を行うことができなかった。そこで、第二節では海面養殖されている豊富な葉状体からカロテノイドを抽出することで高極性成分の同定を試みた。

Table. 1-1-1 Composition of ESS₂ stock solution in ESL* medium.

ESS ₂ stock solution(pH 8.0)	
Distilled water	1000 ml
HEPES	10 g
NaNO ₃	5 g
Disodium Glycerophosphate 5,5 Hydrate	1.16 g
Fe-EDTA · 3H ₂ O	300 mg
KI	2 mg
EDTA · 2Na	400 mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	19.4 mg
H ₃ BO ₃	456 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.6 mg
ZnCl ₂	4.2 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.6 mg
Vitamin mix ESS**	10 ml

*For ESL medium, add 10 ml ESS₂ stock solution and 35 g SEALIFE power to 1000 ml distilled water.

**Vitamin mix ESS(1 ml) contains VitaminB₁₂ 10 µg, biotin 10 µg, thiamine-HCl 1 mg, nicotinic acid 1 mg, Ca-pantothenate 1 mg, *p*-aminobenzoic acid 100 µg, inositol 10 mg and thymine 1 mg.

Total lipid from *Pyropia yezoensis*

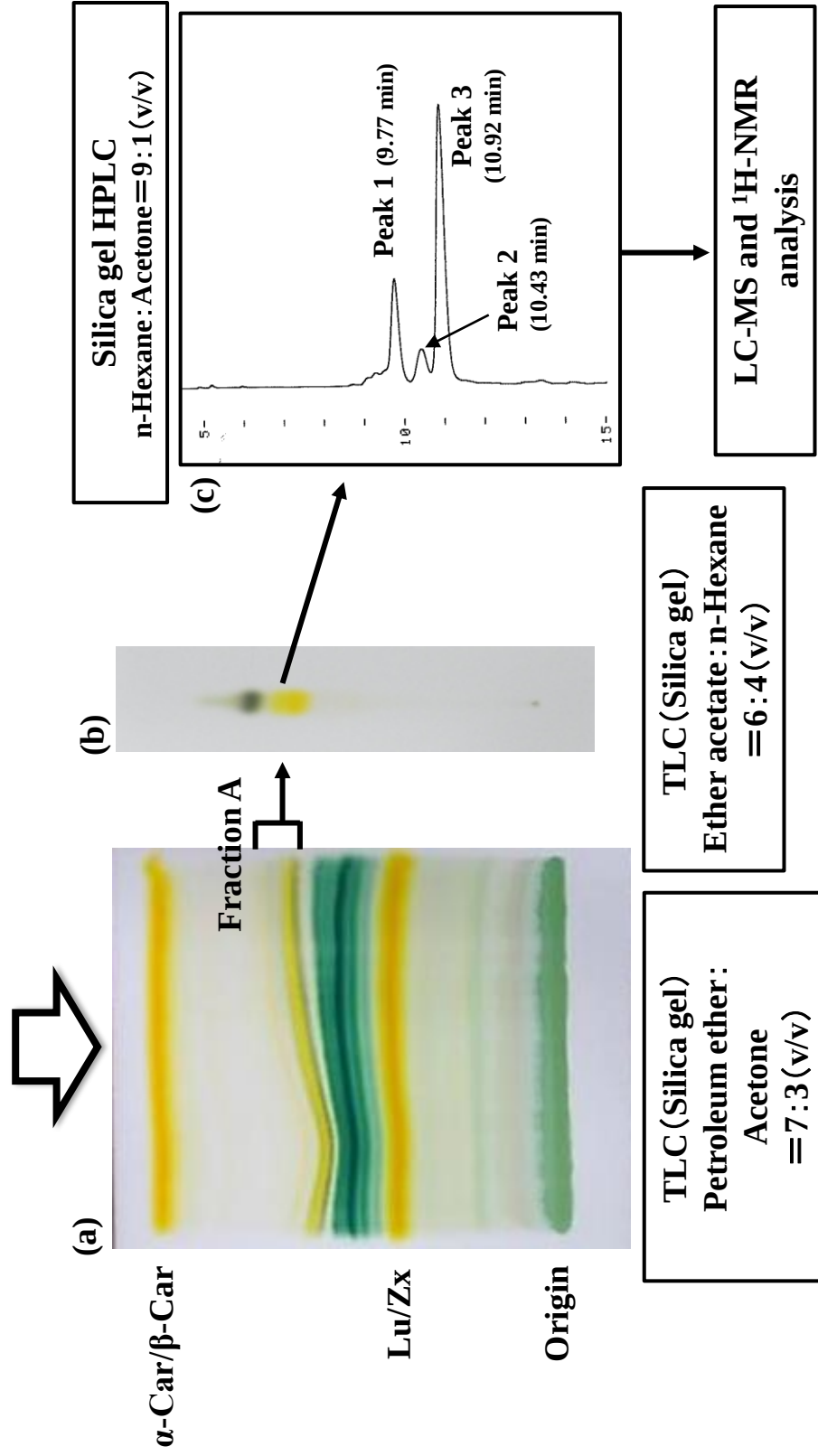


Fig. 1-1-1 Scheme for separation of monohydroxyl carotenoids in total lipid extracted from conchocells of *P. yezoensis*.

(a): Silica gel TLC of total lipid extracted from conchocells of *P. yezoensis*; (b): Silica gel TLC of Fraction A to remove chlorophyll fraction; (c): Fractionation of peak 1, peak 2 and peak 3 in Fraction A by HPLC system equipped with Mightysil silica gel column (250 x 4.6 mm), flow rate: 1.0 ml/min with n-hexane:acetone (9:1, v/v), detection at 450 nm.

α -Car/ β -Car: α -carotene and β -carotene; Lu/Zx: lutein and zeaxanthin

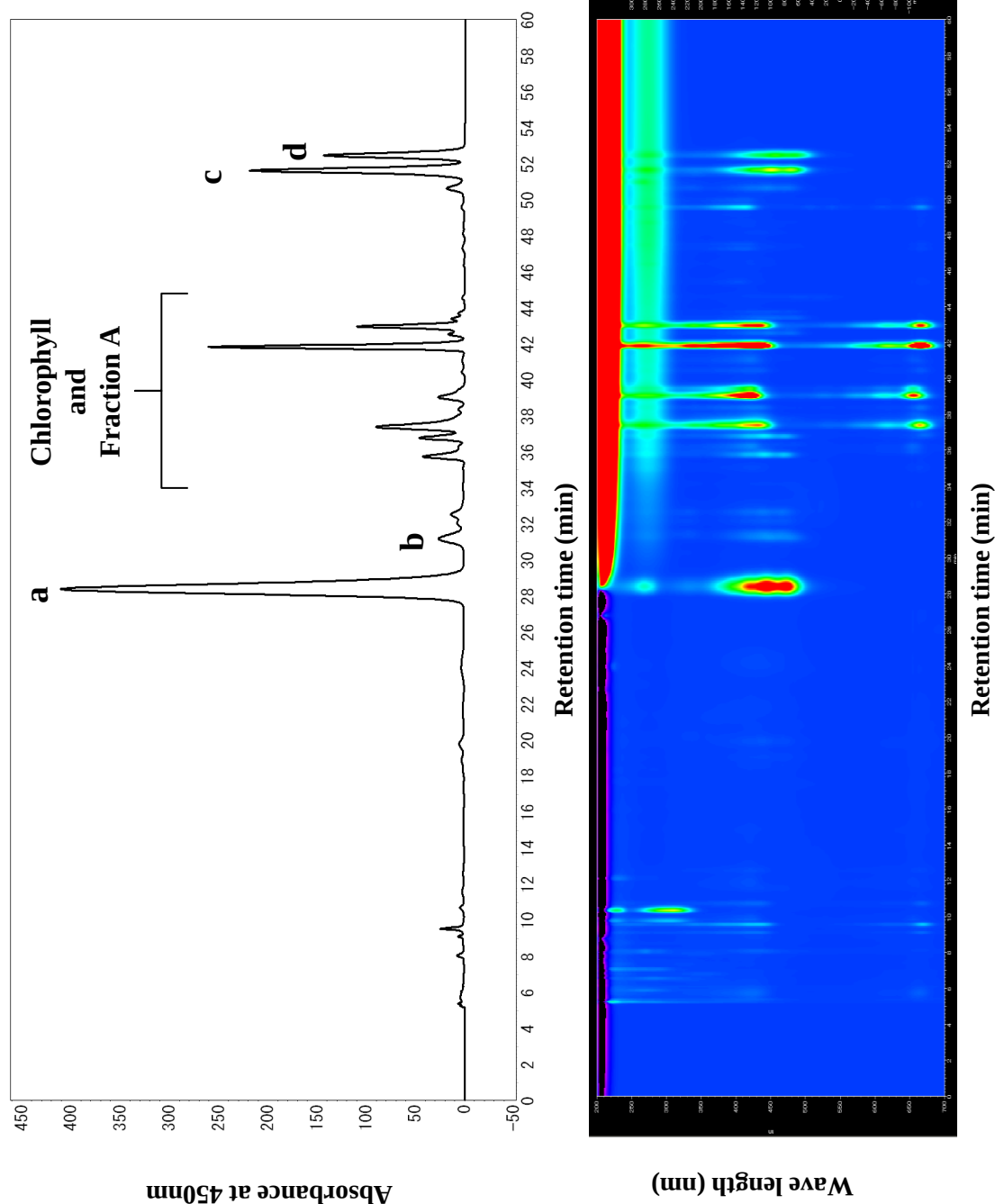


Fig. 1-1-2 HPLC chromatogram and contour map of total lipid extracted from conchocelis of *P. yezoensis*, strain U-15. Carotenoids were measured by HPLC system equipped with a photo diode array detector at 450 nm. Two Developed C30-UG-5 columns were connected for analysis. Mobile phase was methanol until 20 min and thereafter increased linearly dichloromethane from 0 to 50% in 20 min, then hold methanol:dichloromethane (1:1, v/v) for additional 20 min. The flow rate was 1.0 ml/min, and sample injection volume was 50 μ l. a, lutein; b, zeaxanthin; c, α -carotene; d, β -carotene

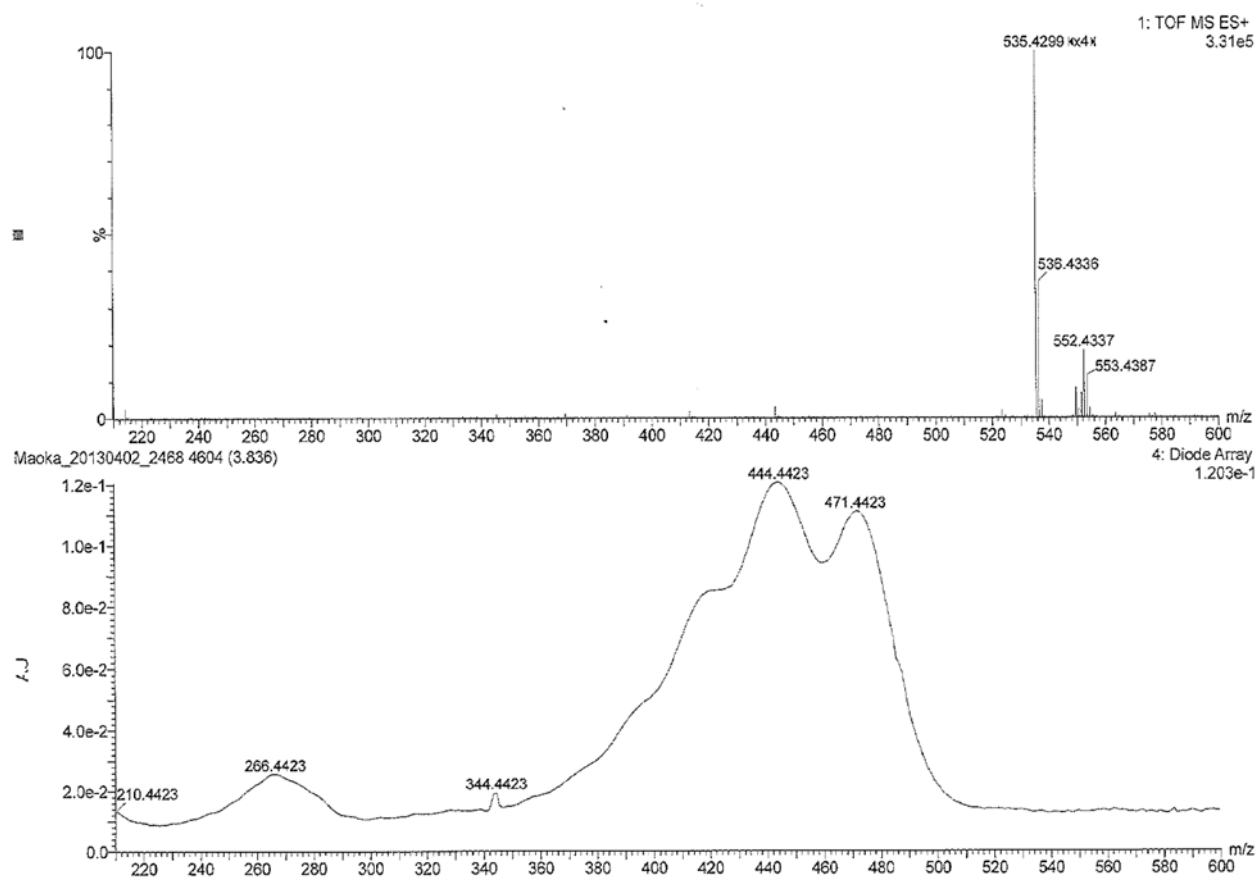


Fig.1-1-4 TOF-ES-MS spectrum and absorption spectrum of Peak 1 isolated from *P. yezoensis*.

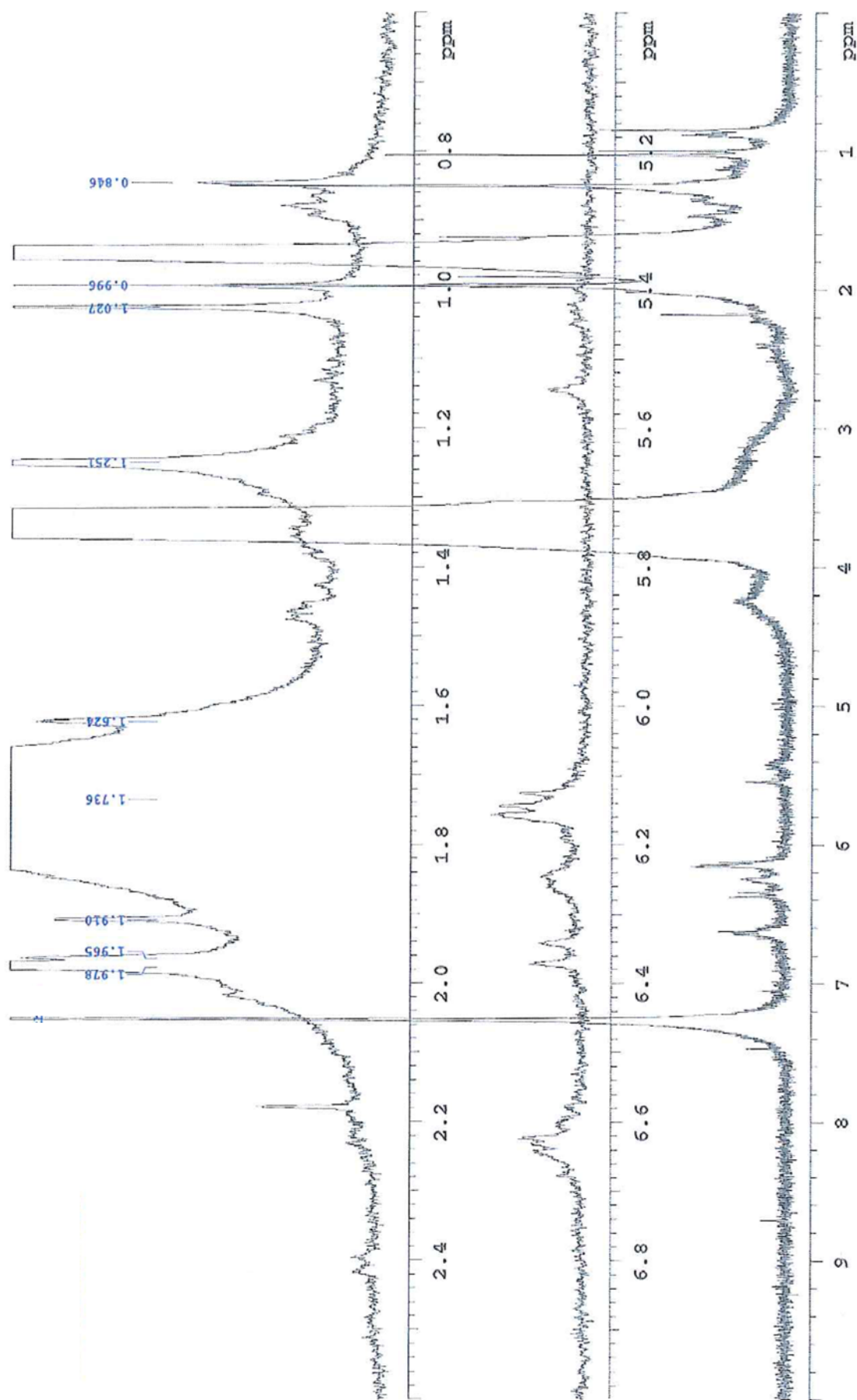


Fig. 1-1-5 ^1H -NMR spectrum of Peak 1 isolated from conchocelis of *P. yezoensis*.

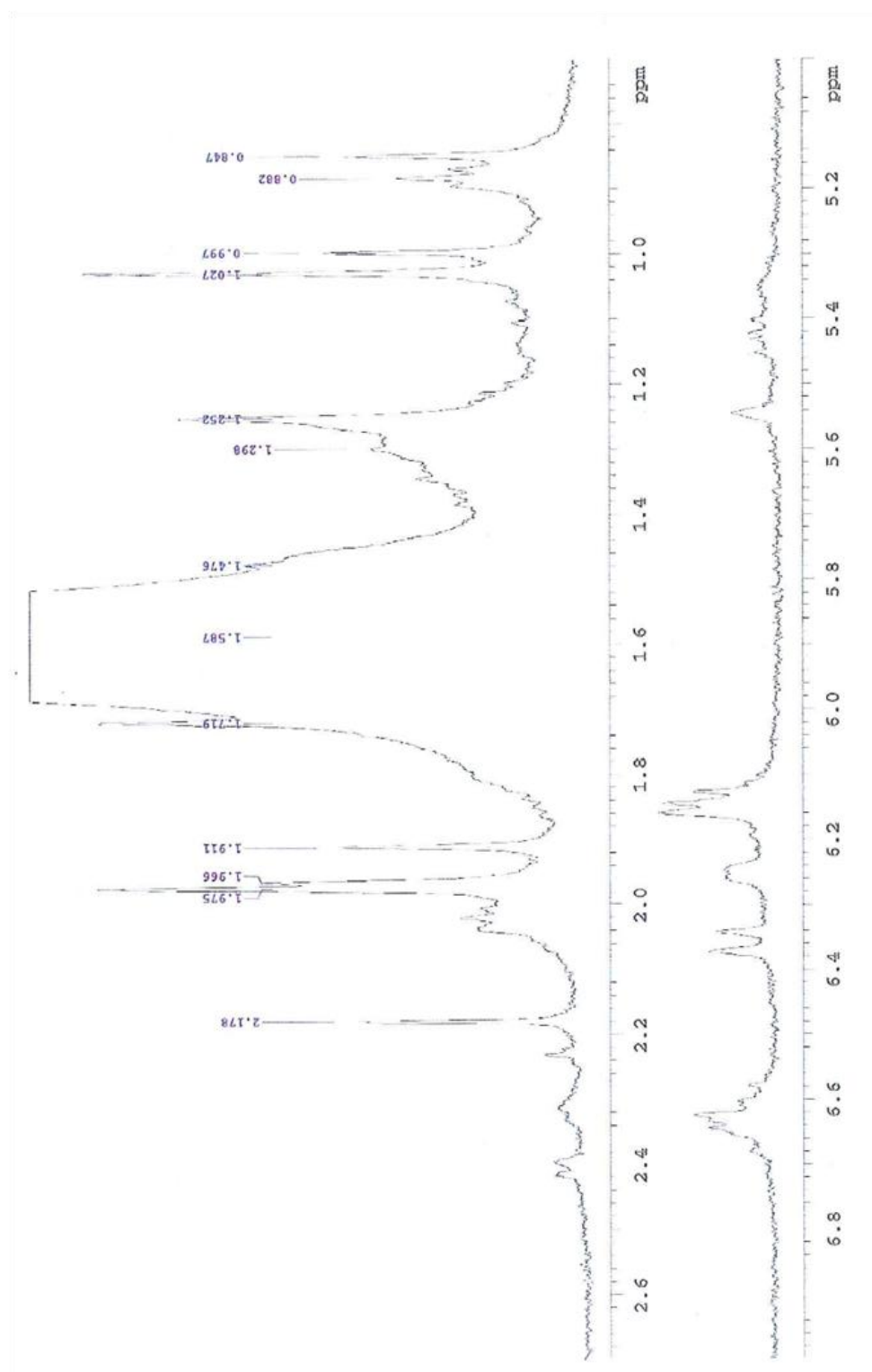
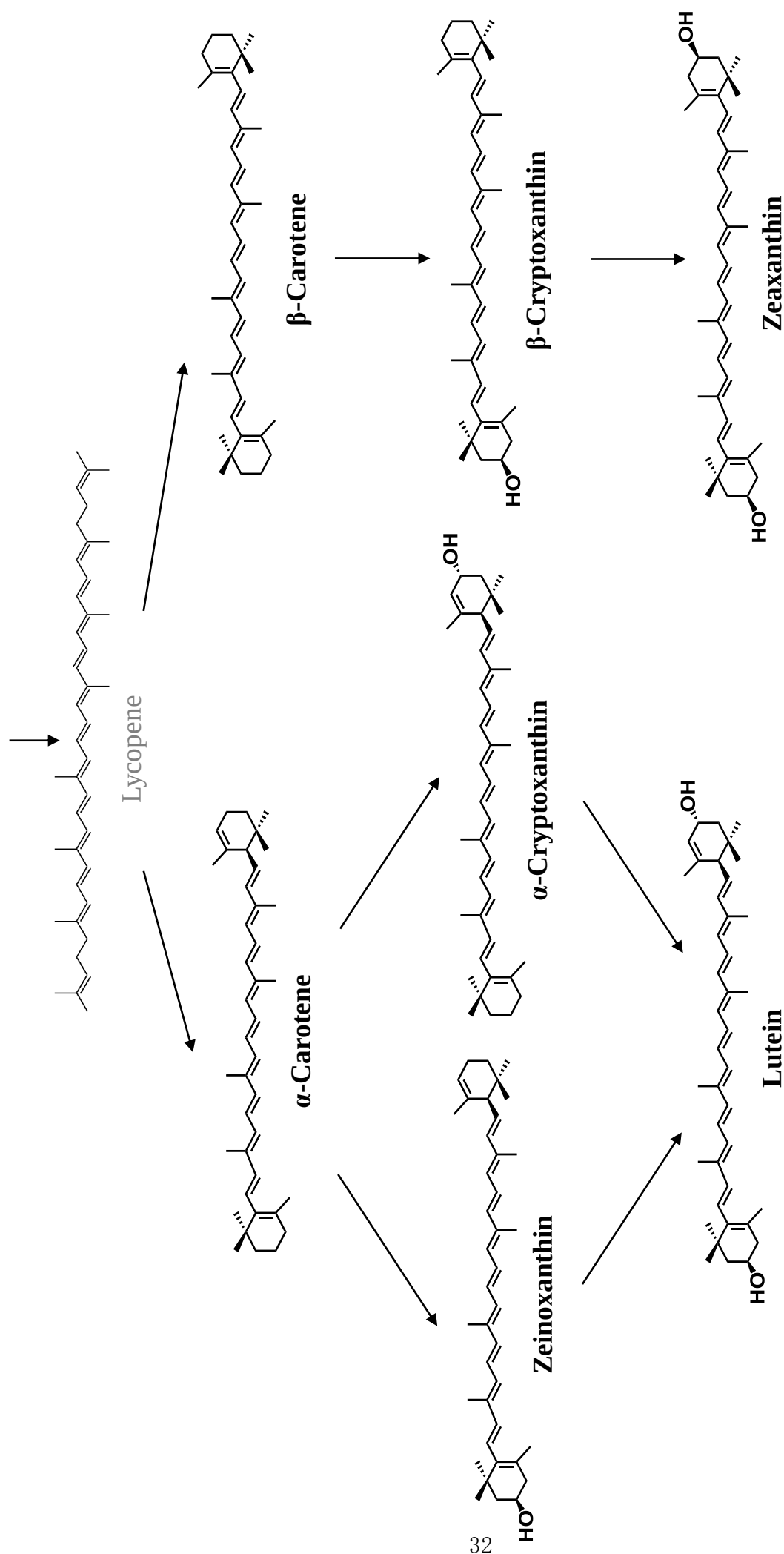


Fig. 1-1-5 ^1H -NMR spectrum of Peak 1 isolated from conchocelis of *P. yezoensis*(cont.).



**Fig. 1-1-6 Proposed carotenoid biosynthetic pathway in *P. yezoensis*.
The name of carotenoids identified in *P. yezoensis* are shown in bold.**

第二節

P. yezoensis 葉状体のカロテノイドの抽出・精製および同定

実験方法

1.2.1 試料および試薬

P. yezoensis 葉状体は宮城県七ヶ浜町で養殖されたものを入手した。藻体は分析まで-20℃で保存した。

カロテノイド標品として antheraxanthin、lutein-5,6-epoxide は Carote Nature 社より購入した。その他の分析に用いた試薬は 1.1.1 と同様のものを用いた。

1.2.2 *P. yezoensis* 葉状体総脂質の抽出

塩や微細藻類等の共雑物を除くため、*P. yezoensis* 葉状体を蒸留水で 10 回程度洗浄を行った。その後、ろ過して水分を十分に除いた後重量を秤り、1.1.2 と同様に、総脂質を抽出した。

1.2.3 *P. yezoensis* 葉状体総脂質の HPLC 分析

1.2.2 で得た *P. yezoensis* 葉状体総脂質を用い、1.1.3 と同様の条件で HPLC を用いて含まれているカロテノイドを分析した。

さらに、藻体中のカロテノイド量について、標品を用いて作成した検量線により定量を行い、1.1.4 で分析した糸状体中のカロテノイド量と比較を行った。

1.2.4 シリカゲルカラムを用いたカロテノイドの分画

P. yezoensis 葉状体総脂質をシリカゲルカラムに供し、n-hexane:acetone (7:3, v/v) で展開し、溶出順に、濃黄色画分(α -/ β -carotene 画分)、濃緑色画分(クロロフィル画分)、濃オレンジ色画分(lutein、zeaxanthin 画分)、淡黄色画分の4層を得た。その後、極性の最も高かった淡黄色画分について、溶媒をロータリーエバポレーターで除去し高極性画分を得た。

1.2.5 HPLC を用いたカロテノイドの分取

1.2.4 で得られた高極性画分を、以下の条件のもと HPLC により精製を行った。

HPLC 条件

ポンプ：	HITACHI PUMP L-2130 (日立製作所 (株))
検出器：	HITACHI Detector L-2400 (日立製作所 (株))
カラム：	Develosil C30-UG-5(4.6×250 mm) (野村化学 (株))
検出波長：	450 nm
移動相：	Methanol
カラム温度：	室温
流速：	1.0 ml/min

1.2.6 カロテノイドの構造解析

LC/MS、 ^1H -NMR によるカロテノイドの構造解析は 1.1.7 と同様に行った。

1.2.7 統計計算の方法

得られた数値は、その平均値および標準誤差を算出した。統計的検定は、

Student の t 検定を用いて行った。その際、有意水準は $P<0.05$ とした。

結果と考察

第一節では *P. yezoensis* 糸状体を用いて低極性のカロテノイドの同定を行ったが、高極性カロテノイドについてはその含有量が極めて微量なため、同定に至らなかった。そこで、大量に入手可能な葉状体の養殖ノリを用いて、高極性カロテノイドの同定を試みた。

まず、糸状体と同様に脂質を抽出後、葉状体総脂質について HPLC 分析を行った結果、糸状体と同様に 4 種の主要なカロテノイド(α -/ β -carotene、lutein、zeaxanthin)が同定された。さらに、乾燥重量当たりのカロテノイド含有量を糸状体と比較したところ、糸状体の方が優位に高い含有量を示した(Fig. 1-2-1)。

次に、カラムクロマトグラフィーで高極性画分を分離後、HPLC 分析を行った結果、zeaxanthin、lutein より極性の高いピークが 3 つ検出された(Fig. 1-2-2)。Peak 4(19.80 min)と Peak 5(22.18 min)を既知のカロテノイド標品と比較したところ、それぞれ、lutein-5,6-epoxide と antheraxanthin の標品と同じリテンションタイムと吸収スペクトルを示した(Fig. 1-2-3, 1-2-4)。続いて LC/MS 分析を行った結果、Peak 4 は lutein-5,6-epoxide の標品と同様に m/z 585.40 [MH]⁺ と 567.40 [MH-18]⁺ が検出されたことから(Fig. 1-2-3)、構造中に第 3 位にヒドロキシル基が結合した ϵ 環を持つことが予想された。さらに ¹H-NMR 分析から、Peak 4 の構造が lutein-5,6-epoxide であることが明らかとなった(Fig. 1-2-5、Table. 1-2-1)。

Peak 5 は antheraxanthin 標品と同様に m/z 585.35 [MH]⁺ が検出された一方で、[MH-18]⁺ は検出されなかった(Fig. 1-2-4)。また、¹H-NMR 分析の結果から、Peak 5 の構造が antheraxanthin であることが明らかになった(Fig. 1-2-6、Table. 1-2-1)。Antheraxanthin はこれまで Florideophyceae の Corallinales,

Ceramiales, と Gracilariales で蓄積が報告されていたが[20]Eurhodophytina の Bangiales ではこれまでに報告がなく本研究が初めての同定となった。さらに、lutein-5,6-epoxide についても Bangiales ではこれまで報告がなく、新規の同定となった。

これまでに、熱帯に生息する木本植物(woody plant)では、植物で一般的に見られる zeaxanthin $\rightleftharpoons$ antheraxanthin $\rightleftharpoons$ violaxanthin(VAZ サイクル)の機構に加えて lutein $\rightleftharpoons$ lutein-5,6-epoxide(LxL サイクル)によるキサントフィルサイクルが存在することが報告されている[7,8]。さらに、lutein-5,6-epoxide の蓄積は光捕集効率を上げることや熱帯植物の陰葉(shade leaves)に多く含まれることが知られている[7,8]ことから、紅藻は光捕集能向上のために lutein-5,6-epoxide を蓄積している可能性がある。

また、*P. yezoensis* からは植物ホルモンの一種である abscisic acid が検出されており[31]、abscisic acid は violaxanthin または neoxanthin から合成される (Fig. 1-2-7)ため *P. yezoensis* 中に zeaxanthin 以降の代謝物の存在が予想されていたが、極めて微量であったためこれまで検出されていなかった。今回 violaxanthin は検出されなかったものの、antheraxanthin が同定されたことで、*P. yezoensis* 中に zeaxanthin epoxidase 活性を持つ酵素が存在することが明らかになった。そこで次章では、*P. yezoensis* のゲノム情報からカロテノイド合成にかかわる遺伝子の探索および酵素機能の解析を試みた。

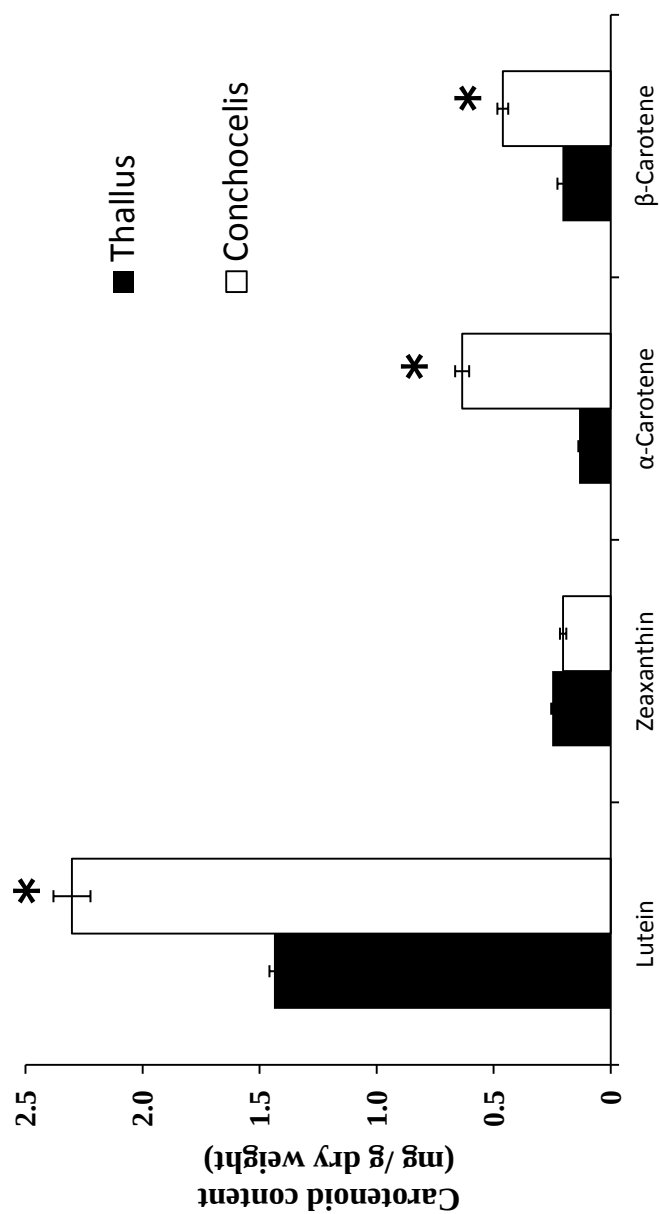


Fig. 1-2-1 Carotenoid contents in thallus and conchocelis of *P. yezoensis*. Values are the means $\pm$ SE (n=3). Asterisks show significance by the Student's t-test (* $P < 0.05$)

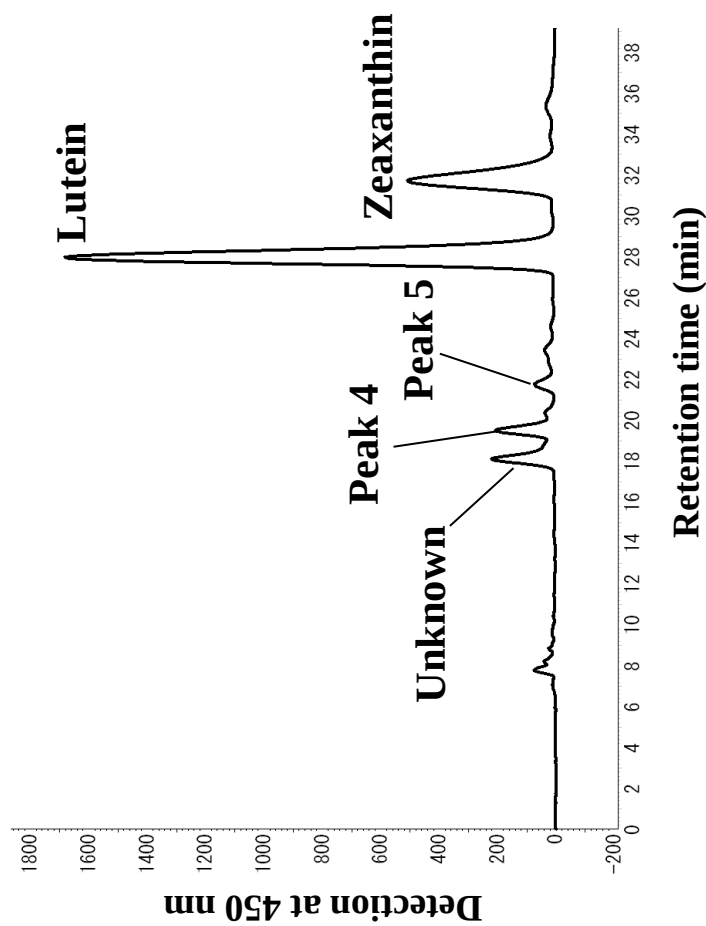


Fig. 1-2-2 Purification of Peak 4 and Peak 5 in Fraction B separated from thallus of *P. yezoensis* by HPLC system.
Peak 4 and Peak 5 were isolated by HPLC system equipped with a diode array detector at 450 nm. Two Develosil C30-UG-5 columns were connected and used for carotenoid isolation. Mobile phase was methanol. The flow rate was 1.0 ml/min.

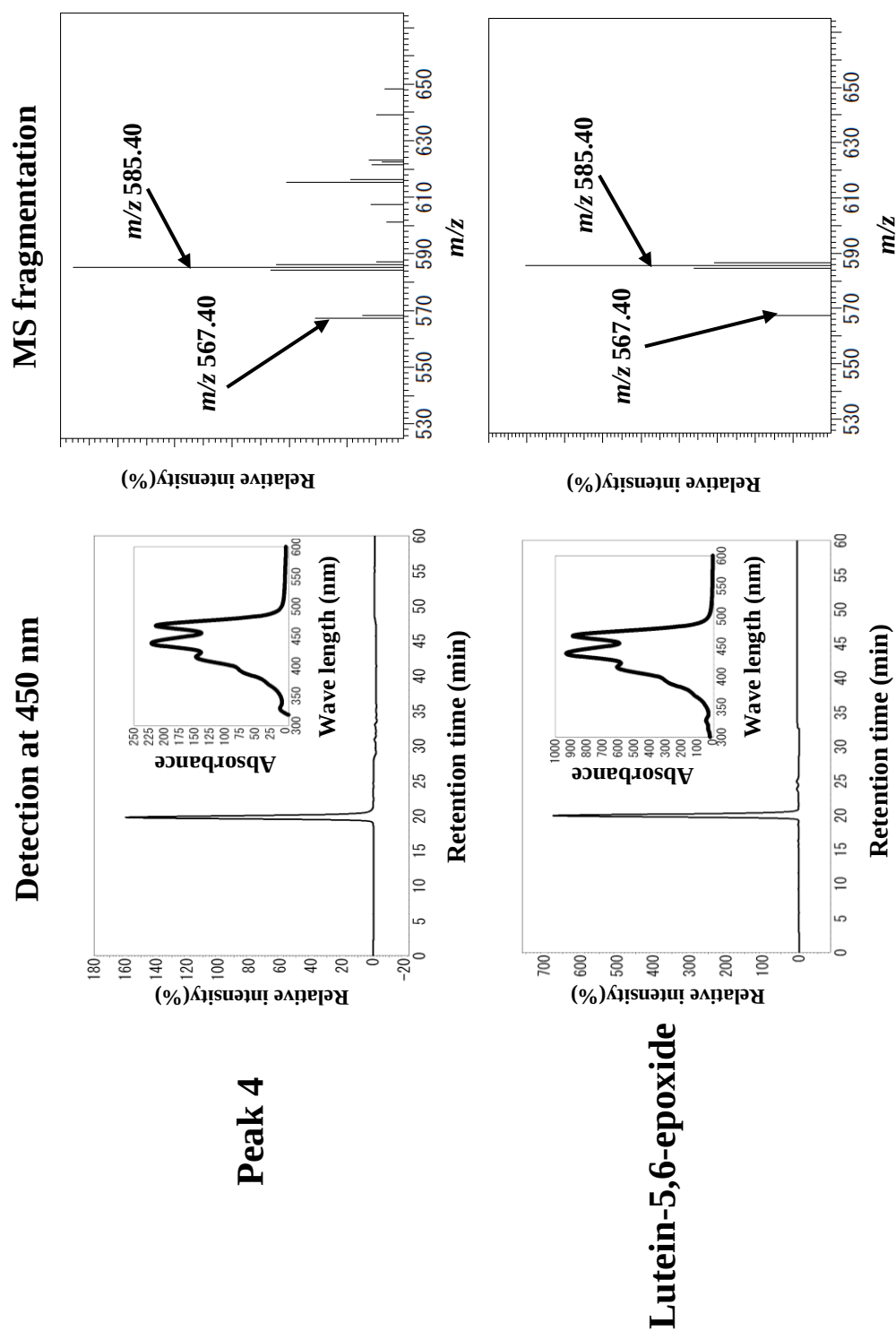


Fig. 1-2-3 HPLC and LC-MS analyses of Peak 4 and lutein-5,6-epoxide

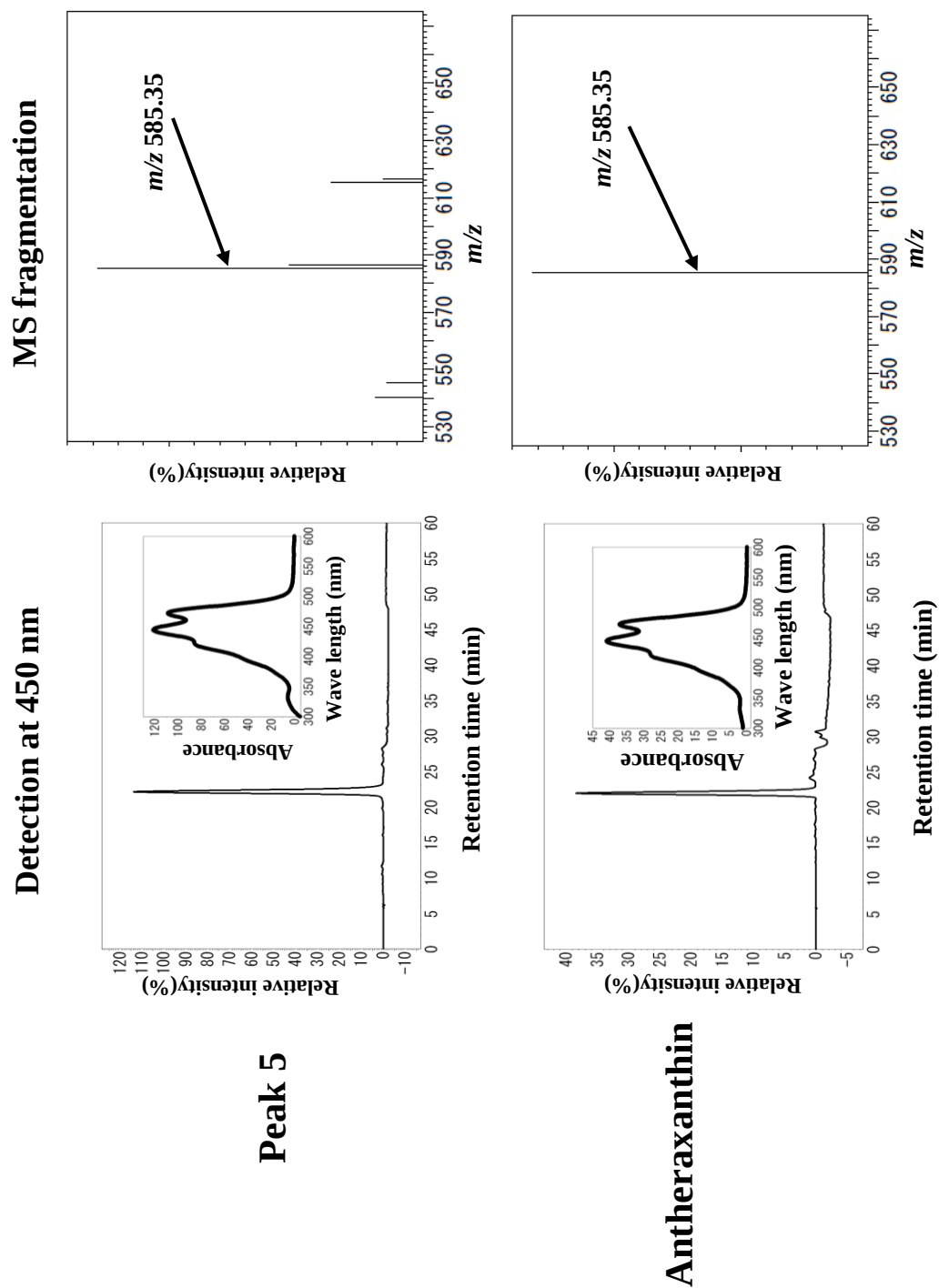


Fig. 1-2-4 HPLC and LC-MS analyses of Peak 5 and anthraxanthin

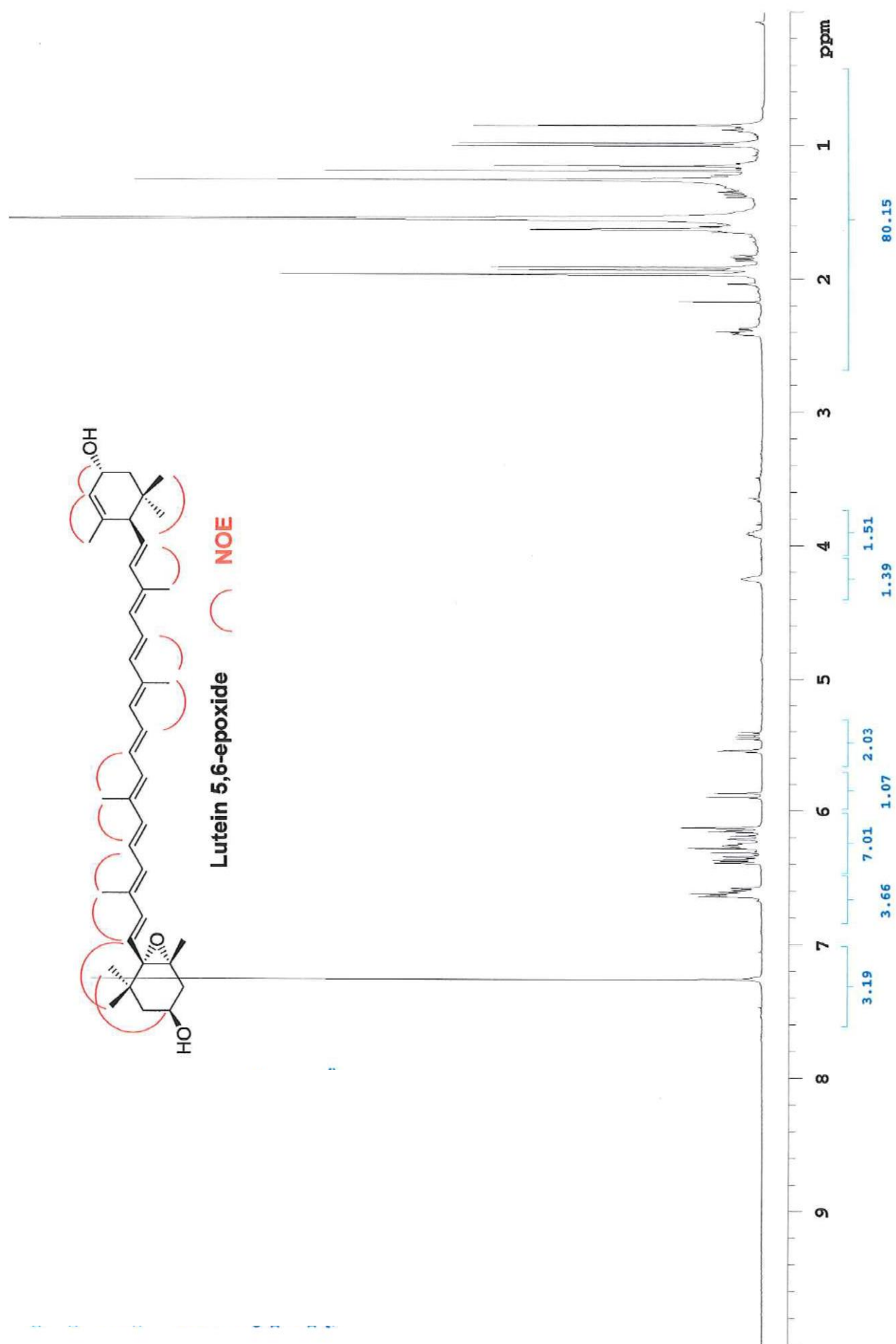


Fig. 1-2-5 ¹H-NMR spectrum of Peak 4.

**Table. 1-2-1 ¹H-NMR spectral data of Peak 4 and Peak 5
isolated from thallus of *P. yezoensis***

Position	Peak 4		Peak 5	
	δ	mult. J (Hz)	δ	mult. J (Hz)
2	1.25	dd (12, 7)	1.25	dd (12, 7)
2	1.63	ddd (12, 3, 1.5)	1.63	ddd (12, 3, 1.5)
3	3.91	m	3.91	m
4	1.63	dd (14, 9)	1.63	dd (14, 9)
4	2.39	ddd (14, 5, 1.5)	2.39	ddd (14, 5, 1.5)
7	5.88	d (16)	5.88	d (16)
8	6.29	d (16)	6.29	d (16)
10	6.20	d (11)	6.20	d (11)
11	6.61	dd (15, 11)	6.61	dd (15, 11)
12	6.38	d (15)	6.38	d (15)
14	6.25	m	6.25	m
15	6.63	m	6.63	m
16	0.98	s	0.98	s
17	1.15	s	1.15	s
18	1.19	s	1.19	s
19	1.93	s	1.93	s
20	1.97	s	1.97	s
2'	1.37	dd (13, 7)	1.48	
2'	1.85	dd (13, 6)	1.77	
3'	4.25	m	4.00	m
4'	5.55	br. S	2.05	dd (14, 9)
4'			2.39	ddd (14, 5.5, 1.5)
6'	2.40	d (9)		
7'	5.43	dd (15.5, 9)	6.10	d (16)
8'	6.14	d (16)	6.16	d (16)
10'	6.14	d (10)	6.16	d (11)
11'	6.62	dd (15, 11)	6.60	dd (15, 11)
12'	6.36	d (15)	6.35	d (15)
14'	6.26	m	6.25	d (11)
15'	6.63	m	6.63	m
16'	1.00	s	1.08	s
17'	0.85	s	1.08	s
18'	1.63	s	1.74	s
19'	1.91	s	1.93	s
20'	1.97	s	1.97	s

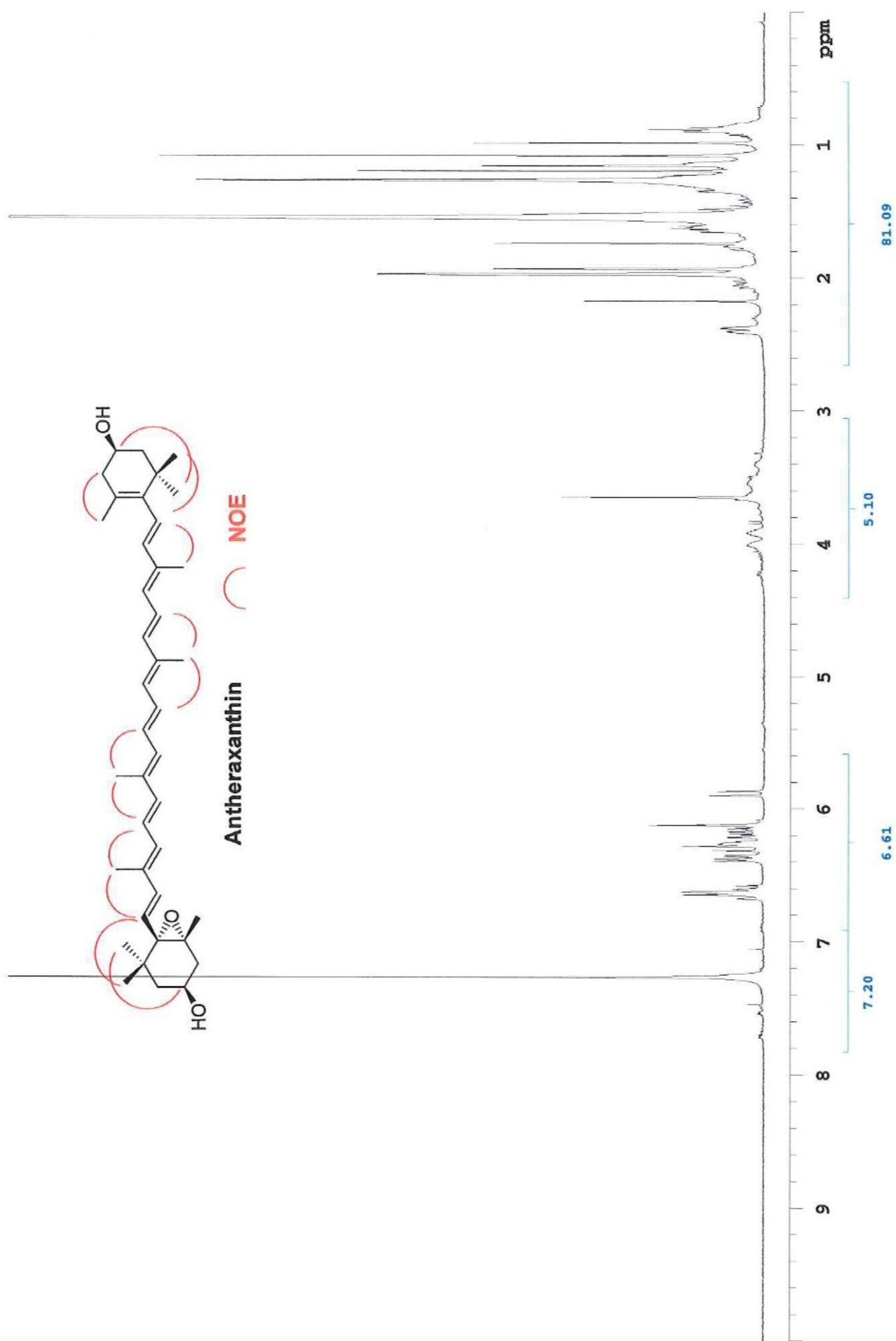


Fig. 1-2-6 ^1H -NMR spectrum of Peak 5.

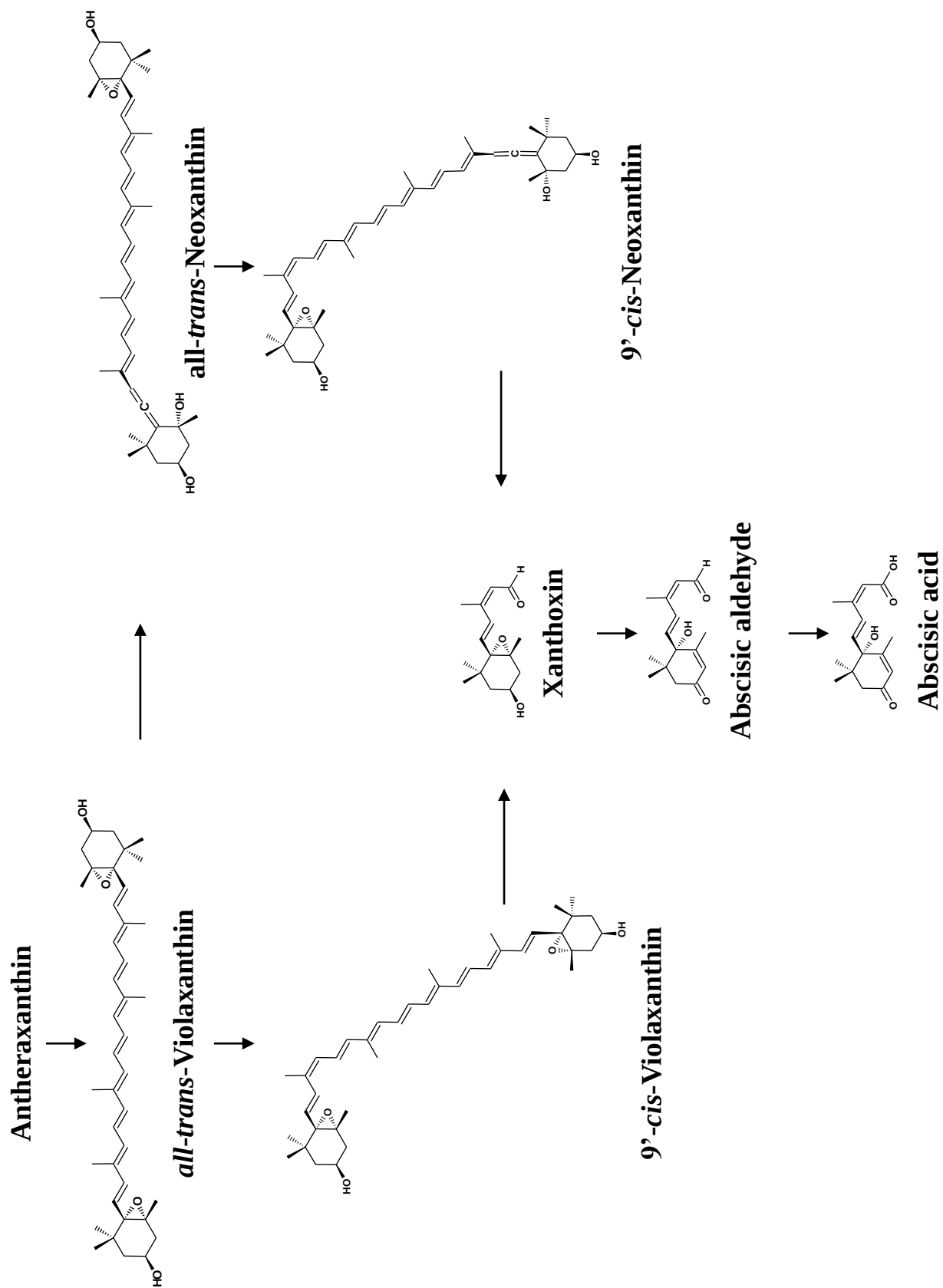


Fig. 1-2-7 Predicted abscisic acid biosynthetic pathways.

第二章

P. yezoensis カロテノイド合成遺伝子の探索と

CYP97B の酵素機能解析

序論

近年、次世代シーケンサーの普及により様々な生物のゲノム情報の解析が急速に進み、*P. yezoensis* ゲノムについても 2013 年に国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所により部分的であるが解析が行われ、その情報が公開されている[29]。*P. yezoensis* のカロテノイド変換酵素については一部報告されているものもあるが[45]、包括的な検証は行われていない。さらに、*P. yezoensis* 以外の一部紅藻においてもゲノム情報が公開されており[46-48]、紅藻間での遺伝子情報の比較が可能になってきた。そこで、本章では *P. yezoensis* ゲノム情報からカロテノイド合成酵素の探索を行い、さらにその酵素について他の紅藻とアライメント比較を行うことで、紅藻間のカロテノイド合成酵素の系統学的な比較を行い、その酵素機能を推測した。

第一章では *P. yezoensis* の lutein 合成経路として、zeinoxanthin と α -cryptoxanthin を介する経路の二種類が存在することを明らかにした。zeinoxanthin、 α -cryptoxanthin は α -carotene のそれぞれ β 環と ϵ 環にヒドロキシル基が結合した構造をしている。そのため lutein 合成には β -ring carotene hydroxylase と ϵ -ring carotene hydroxylase の両方が必要である。Carotene hydroxylase は陸上植物では β -ring carotene hydroxylase を BHY と CYP97A が担い、 ϵ -ring carotene hydroxylase を CYP97C が担うことが大腸菌を用いた評価系等で明らかにされている[49-51]。しかしながら、これまでに紅藻の遺伝

情報からは BHY、CYP97A、CYP97C いずれのホモログも発見されていない。代わりに紅藻からは CYP97B のみが報告されている[39]。陸上植物においても CYP97B は見つかったが、その遺伝子産物の活性を明らかにした報告はない[44,51]。

一方、近年 *Po. umbilicalis* で見つかった CYP97B(PuCHY1)の酵素機能解析の結果、PuCHY1 は β -ring carotene hydroxylase 活性を持つことが明らかにされている[39]。さらに、2019 年に珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* CYP97B の β -ring carotene hydroxylase 活性が報告された[40]ことから、CYP97B が、陸上植物を除く様々な光合成生物で主要な carotene hydroxylase として機能している可能性が推察される。

特に、珪藻や褐藻の二次共生型葉緑体は紅藻由来であると考えられているため、紅藻 CYP97B の酵素活性を明らかにすることは紅藻のみならず二次共生型光合成生物のカロテノイド合成経路の解明につながる知見となり得る。

これまでにカロテノイド変換酵素の活性を評価する手法として、大腸菌の形質導入が広く行われている。本来大腸菌はカロテノイドを合成しないが、1990 年に Misawa らは *Erwinia uredovora* からカロテノイド合成酵素を単離し、大腸菌に形質導入を行うことでカロテノイドを合成させることに成功した[52]。その後、様々な生物種のカロテノイド変換酵素が大腸菌を用いて評価され、カロテノイド合成経路の解明に大きく貢献した[37,39,44,53,54]。

本章では、第一節で *P. yezoensis* ゲノム情報に対して他の生物で報告されているカロテノイド変換酵素の配列情報と相同性解析を行うことで *P. yezoensis* のカロテノイド合成酵素の探索を行った。第二節では、第一節で見つかったカロテノイド合成酵素のうち、carotene hydroxylase に着目し、その酵素機能について大腸菌の形質導入による評価系で検討を行った。さらに第三節では、第

二節の結果を踏まえ、大腸菌に形質導入するインサートの配列を最適化し、*P. yezoensis* の carotene hydroxylase 活性を明らかにすることを試みた。

第一節

P. yezoensis ゲノム中のカロテノイド合成遺伝子の探索

実験方法

2.1.1 *P. yezoensis* ゲノム情報によるカロテノイド変換酵素の探索

まず、既知の紅藻カロテノイド変換酵素の塩基配列情報を KEGG(<https://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>)の Carotenoid biosynthesis(map 00906)あるいは NCBI データベース(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で検索を行い、塩基配列情報を入手した。

紅藻で未報告の酵素については、*Arabidopsis thaliana* の配列情報を NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)で BLAST を行い、紅藻のカロテノイド変換酵素を探索した。次に、*P. yezoensis* ゲノム情報(http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/5_AG/genomes/nori/)[29]に対して スタンドアローン型 BLAST を行い、相同性のある配列を探索した。さらに配列から Open Reading Frame(ORF)で探索し、遺伝子の全長配列を得た。

スタンドアローン型 BLAST 検索には BioEdit[55]を用い、ORF の探索は ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)を用いた。

2.1.2 カロテノイド変換酵素の系統解析

2.1.1 で検出した *P. yezoensis* カロテノイド変換酵素について、酵素活性の検証のため NCBI のウェブサイト (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で BLAST 検索を行い他生物の配列と相同性を比較した。

次に、*P. yezoensis* の carotene hydroxylase について、他の生物の carotene hydroxylase と ClustalW でアライメント検索を行った。比較に用いた配列は NCBI のウェブサイトよりダウンロードし、ClustalW は BioEdit[55]で行った。さらに、これまでに報告されている保存領域(conserved reagon)として鉄結合ドメインと酸素結合ドメインの配列比較を行った。また、紅藻の carotene hydroxylase について BioEdit[55]で類似性(identity)を比較し、酵素機能の推定を行った。

結果と考察

カロテノイドの合成はメバロン酸回路または非メバロン酸回路で作られた isopentenyl diphosphate(IPP)から geranylgeranyl diphosphate(GGPP)を合成されることから始まる[15]。GGPP は phytoene synthase(PSY)によって phytoene に変換され、phytoene desaturase(PDS)、 ζ -carotene desaturase(ZDS)によって二重結合が付与され ζ -carotene、neurosporene に変換される。さらに CRTISO により *cis* 二重結合が *trans* に異性化されることで all-*trans* 体の lycopene が合成される[15]。

Lycopene 以降の変換は両端を環化する反応であるが、環構造の違いにより α -carotene(ϵ , β -carotene)と β -carotene(β , β -carotene)の二種類のカロテノイドに分岐する。 β -Carotene はその分子構造上、対称性を持つので、lycopene から一つの変換酵素(lycopene β -cyclase(LCYb))で両端の環化が可能であり、その後の zeaxanthin 合成にはヒドロキシル化も一つの酵素 (β -ring carotene hydroxylase)で修飾できる。一方で、 α -carotene は両端の構造が異なるため LCYb および lycopene ϵ -cyclase(LCYe)の二種類の変換酵素が必要と考えられる。さらに lutein 合成には β -ring carotene hydroxylase および ϵ -ring carotene hydroxylase の両方が必要と考えられる。

本節では carotene を合成する PSY から lycopene cyclase(LCY)の各酵素に加えて、官能基の付加に寄与する carotene hydroxylase および zeaxanthin epoxidase(ZEP)、violaxanthin de-epoxydase(VDE)の探索を行った。

P. yezoensis のゲノム情報と *Arabidopsis thaliana* のカロテノイド変換酵素と相同性を持つ遺伝子を BLAST で探索した結果、carotene 合成までの遺伝子については ZDS 以外のカロテノイド変換酵素のホモログが検出された(Table.

2-1-1)。すなわち、PSY、PDS、CRTISO ならびに二個の LCY が発見された。ZDS については、他の紅藻(*Gracilariopsis chorda*(GenBank: PXF43369.1)、*Chondrus crispus*(NCBI Reference Sequence: XP_005712997.1))の塩基配列で再度探索を試みたが ZDS は見出されなかった。

また、ZEP についても相同性のある遺伝子が見つかった(Table. 2-1-1)。このことは、第一章でエポキシ基を持つカロテノイドである lutein-5,6-epoxide、antheraxanthin が同定されたことと合致する。一方で、多くの陸上植物に存在する VDE は検出されなかった。これまでに紅藻からは VDE が発見された報告はないことから、陸上植物と異なり紅藻はキサントフィルサイクルを持たないことが示唆される。実際に、複数の紅藻において光刺激に対しキサントフィルサイクルによるカロテノイド変換が起こらないことが報告されている[56,57]。

次に、carotene hydroxylase についても検索したが BHY のホモログは見つからず、CYP97 のホモログが 1 コピーのみ見つかった。この配列と他生物の CYP97 配列と比較を行ったところ、CYP97A と CYP97C より CYP97B との類似性が高かった。

そこで、既知の CYP97B サブファミリーに特徴的なドメインについて探索を行ったところ、CYP97B にのみ存在すると報告されている LRFLVDXR、LYPXE[54]の配列がいずれも保存されていた。さらに鉄結合ドメインと酸素結合ドメインは CYP97A、CYP97B、CYP97C でアミノ酸配列が異なることが報告されていることから[35]、各ドメイン配列を確認したところ、CYP97B の配列と共通していた(Fig. 2-1-2)ことから CYP97B サブファミリーに分類し PyCYP97B と名付けた。

今回の *P. yezoensis* のように、紅藻において carotene hydroxylase のホモログとして CYP97B のみが見つかる特徴は、過去の *Po. umbilicalis* でも同様の結

果が報告されており [39]、他の複数の紅藻 (*Po. purpurea*, *Gracilariopsis chorda*, *Chondrus crispus*, *Porphyridium purpureum*) においても同様であることを本研究でも確認した。上述した通り、lutein 合成には β - ϵ -ring carotene hydroxylase の両方が必要である。しかしながら、紅藻からは CYP97B のみが存在したことから、lutein を合成する紅藻の CYP97B は β - ϵ -ring carotene hydroxylase 活性の両方を持つ可能性が示唆された。

近年分子系統学的な手法により、Eurhodophytina(真正紅藻亜門) と Proteorhodophytina(原始紅藻亜門)の両方から分けられた Cyanidiophytina の一種である *Cyanidioschyzon merolae* では CYP97 の遺伝子が存在せず、シアノバクテリアに存在する CrtR のみ存在することが分かっている [38]。このことは Cyanidiophytina が carotene ヒドロキシル基導入酵素として他の紅藻と異なる合成酵素を持つことを示している。

さらに、多くの Eurhodophytina の紅藻が α -carotene とそれに続く lutein(α - β -carotene タイプ)を合成するのに対し、Proteorhodophytina の紅藻では β -carotene タイプのカロテノイドのみ生合成することから、Eurhodophytina の紅藻は β - ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を併せ持ち、Proteorhodophytina の紅藻は β -ring carotene hydroxylase 活性のみを持つ可能性が考えられる。

そこで CYP97B のアライメント及び類似性比較を行ったところ (Table. 2-1-3)、 β -carotene タイプの紅藻 (*Por. purpureum*) の CYP97B は、*P. yezoensis* 含めた α - β -carotene タイプの紅藻と 41-44% の類似性を示し、これは他の光合成生物 (陸上植物、緑藻、褐藻、珪藻) と同程度であった。

一方で、 α - β -carotene タイプの紅藻間では 49% 以上の高い類似性を示した。このことは、紅藻の進化の過程において、 β -carotene タイプ紅藻の CYP97B は

β -ring carotene hydroxylase 活性のみを持ち、 α -/ β -carotene タイプ紅藻の CYP97B は lutein を合成するために β -/ ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を併せ持つように変化した可能性がある。実際に、各配列を用いて系統樹解析を行った結果(Fig. 2-1-1)、*Por. purpureum* は他の紅藻より先に分岐していることから、CYP97B が β -ring carotene hydroxylase 活性を取得したのちに β -/ ϵ -ring carotene hydroxylase 活性をもった可能性がある。

続いて、本節の結果に基づくカロテノイド合成酵素の活性について、実際に確認する必要がある。PuCHY1 の研究で Yang ら[39]は、大腸菌の形質導入を用いて PuCHY1 が β -ring carotene hydroxylase 活性をもつことを示し、さらに *A. thaliana* を用いた実験で ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を持つことを示唆している。PuCHY1 と *P. yezoensis* CYP97B は極めて高い類似性(82%)を示したことから、PuCHY1 で予想されているように *P. yezoensis* CYP97B も β -/ ϵ -ring hydroxylase 活性の両方を併せもつことが示唆されるが、これまでに紅藻のみならず他生物においても、CYP97B の ϵ -ring carotene hydroxylase 活性が認められた報告はない。

そこで、第二節では得られた *P. yezoensis* CYP97B を単離し、カロテノイド合成大腸菌に対して形質導入することで、カロテノイド合成機能の評価を行った。

Table. 2-1-1 Sequence of predicted *P. yezeensis* carotenoid converting enzyme genes

1. Phytoene synthase (PSY)

```

ATGAGCCTCA ATCCGCCGCC AATGGATGCT GTTGTGGGGC CCTTGGCGTT TGCAGGTGCT CCTTTGCCAT CTTCTTCCCG CAGAACGGCC ACGTCAGCTT
CTGGTCGCTC CATTGTGCAG CGGGGACCCG GCGGAAACGA TGCACCTGCG AGTCGTCGGC GGTCTTGTGC GCGGGCCCGTG GTGGCACTGG CGCCAGCGAC
GGGCGACTCG AGCGGCGGGG TCGACACGTT TTATGACGCG GACCCGACGG TGCTGATGCC CGACCACCTG TTTGAAGAGG TGGCCCCCGG GGCTACTGAG
CCGGCTCGTG GGGACGGGCG CTCGCGGGGG TGTTTGGAGT CTGCCACAGC CACCTACACT CTGCCGTGCG AGGCGGCCGG TTTGTCAATC AAGCAACCAT
TGCCGGGCGTC TGACACGGGC CGGTCGAGCG CAACCCCGCG TGCGGACGCG GCGCTGCCGC GTCCACGCCG GAGCTGGACG CGCTGGACTT
GGAAACAGCTC CCTGTGTGG GCTCGCCAC GAGCGTGTCC CCCCAGGCTC CGTGGGACAC GACGACCAGC GCTCACGGAC TGTCGTTTTT GGCCCCGGCGA
CTAGACTTCG TCGGCCGCCG CCGTGCAATC GTGGCCAAAG GTACGAGGA GTGCGAGCGG ATTACTGCGC TGTAACGCCAA GACATTTTAT CTGGGCACCA
GCTTCCTGGA CCGGGCCAAAG CGCAAGGCTG TCTGGGCCGT GTACACCTGG TGCCGCCGCA CGGACGACCT TGTGATGG CCGCGGGTGG TACAACGGAG
CGGATCCCTT CGTGATGTTT TGGCTGGGTG GCGCACCCCGA CTGGACGCAA TTTTTCGGC CGGCCGGGGG TCGCGGGAAG GAGAGGAGGT ATCTCCGCCG
CGGGACGCGC TGGACCTGGC ACTGGTCGAC GTGATTGTGC GGTACCCAGA CATGGACGTC ACGCCTTTCG CCGACATGAT TGACGGGCATG ATCATGGATG
TGGAGATGGA CCGGTTTGCA ACGTGGGACG AGCTGCACCT CTA CTGCTAC CGGGTGGCGG GCACGGTGGG ACTGATGACG CTGCCCTATTA TGGGGTCCGT
GGACGGCACC CGAGCGGGCC TCGGTGCCGC CGCAGAGCCG GCACTGGCGC TAGGGGTTGC CCTCCAGCTG ACCAACATT CCGGGGACGT TGGTGAGGAT
CGCCTCCGTG GCGGCATCTA CCTGCCATTG GAGGACCTGG AGCGCTTTGG CTATTCTGAG GCGGACCTTC TGGCGGGCGT TCTTGACGAC CGCTACCGGG
CACTGATGAA GTTTCAGATT GCCCGGGCGC GGGCGTACTT TGCCAAAGGC GAGTCTGGCA TTGAGCTGCT GAGCGAAGAC GCGCGGCTGC CTGTGCGCGC
AAGCCTGGAC ATGTACGCCG GCATCCTCGA GGTCCCTCGA CTC AACCGCT ACGACAAATT CAAGAGACGT GCCTTCGTTA GCAAGTGGG CAAAGCTCGCC
ACCTGCCTG GCTCGTGGC GCGTATCCAA CCAGCCGATT CGCTCGCGC GCGCACGTTT GAGGCGTACC AGGCGTTTGT GTCGTTTGGT TCTGGGTAG

```

Table. 2-1-1 Sequence of predicted *P. yezoensis* carotenoid converting enzyme genes(cont.)

2. Phytoene desaturase (PDS)

```

ATGGGTTCCC TACGGGCCTT TACGGCGCGG CTAAGTGTCC CGCTTGCTGC CTCCCGCGCC TCCTCCTTTG TGGGCCGCCA CGCGGACGCC GCTGTCGGCG
GCCGGGCGCT CCCCTCCCGC AGTGTCGGG TGCACCCGAC CGCCCCCGCG GCGCGGATGG TAGTTGCTCC CGCCGCGCGG CCCGCTCCC TCACCGGCCT
CCCGCCACCG ACCAAGAAGC GGGGGGCTGT CATTGGGGCA GGCTTGCGAG GACTTTTCGT GCGAAAGTAC CTGGTGGACG CGGGCTACGA GCCGGTTGTC
CTCGAGTCGC GGGA TGCTCT GGGCGGCAAG GTCGACGCGT GGAAGGACGA GGACGGGGAC TGGTACGAGA CGGGCCTGCA CATTTTTC GGTGCTTACC
CCAAACATGCT GCAGCTGTTT AAGGAGCTGG ACA TTGAGGA CGCCTGCAG TGAAGTCCC ATTCGATGGT GTTAAACATG AAGACGGACG CGACGCCCGA
TGCGGACGGC CTCA TC CGG CCGAGCCGCA GTACAGCCGC TTGACTTTC CCGCTGGCT GCGGGCGCCC CTC AACGGCA TTGTTGCCAT CCTCCGCAAC
ACGGACATGC TGACGTGGAA CGAGAAAGATT CGGTTTGCGA TTGGCCTCCT GCGCGCTATC ATCCGTGGAC AGCGGTACGT GGAGGAGTGC GATGAGCTGT
CCTGGTCCGA GTGGGTGCGC AAGCACAACA TCCCGGACCG GGTTAATGAC GAGGTCTTTA TCGCCATGTC CAAGGCGCTC AACTTTATCA ACCCCGACGA
GATATCGGCC AGCGTCATCC TCGTCGCCCT CAACCGGTTT CTCCAGGAGA AGGAGGGCTC CAAGATGGCG TTCTCGACG GTGCCCCACC CGAGCGGTTG
TGCGGGCCTC TGGCGGAGCA CATTACCGCG AATACCGTG AACGCTGAC AGTCCCTGAC CAGCAAACCG CTCGCAAGT TTGAGCTGGC CGCTGATGGC AGCGTCTCTG
CGCTCCTGTT GGCCGGTGGT GAGCGGGTGG AGGCAGATGC CTACGTGTCT GCCATGCCCG TGGATATTGT CAAGAAAGTTG CTGCCGTCTG AGTGGGCGGG
TCTGCCCTTC TTCTCGGGCC TTAATAACCT GGTTGGCGTG CCGTCATCA ACGTGCACCT GTGGTTTGAC AAGAAAGCTCA CTGACGTGGA CCACCTCCTA
TTTTTCGCGT CGCCGCTGCT GTCAGTTTAC GCGGACATGT CTATCACGTG CAAAGAGTAT GAGGACCCCTG ACCGGAGCAT GCTGGAACATG GTGCTGGCAC
CGGCCGCTGA TTACATTGGC AAGAGCGACG AGGCGATTGT GGCA GCAACG ATGGACGAGC TGGAGCGCT CTTTCCCCAG CACATTGGCC CCAAGGCGGC
AGACCCGGCT TCTGTGCGCA AGTTCCACGT TGTTCCAGAC CCGCGGTCAG TTTACAAGAC GACCAAGGGC CTCCAGCCAA GCCGGCCGAC GCAGTCAACT
CCCATTCCEA ACTTTTCT CGCTGGTGAC TACACCTGCT AGATGTACCT TGCCAGCATG GAAGGGGCGG TGTGAGCGG TAAGATGGCC GCCGGTGAGG
TGGTCAAGGC TGGTGTGCT GGAGGGGCGG CCGCTTCAC GCGCGCATC GACAAGTCGT TCACCAAGCA GCGGCAATG TAG

```

Table. 2-1-1 Sequence of predicted *P. yezoensis* carotenoid converting enzyme genes(cont.)

3. Carotenoid isomerase (CRTISO) (partial)

```

CCATTCTGTG GGC GG GGGGGG GTGGTGGCTC CCGGGGCACC AGTGGCGGCC ATCACCATTG ACCCAACCAG CGGCGCCGCG ACTGGCGTCG AGTTGGCCCGA
CGGCACTCGC ATCGCCGCTC GACGGGCAGT TGTCTCCAAC GCTACCTCCT GGGACACTGC GCGGCTGCTC CCGCCGGCTG CTCGGGAGGC GAGCCGGGCT
GCGGCCGCTG CAGCTGGGGC GCTTGATGGG GTGGCAGGCC GACTGCGGCC CACCCCGAGC TTTGTGCACT TGCAC TTGGG CGTCGACTGT CAGGGTATGG
ACCCGGCGAC CCTGGACGCC CTTCCCTCA ACGCTACTAC TATCCGATCG TGGGAGCTGC CCACGACCGG GGAGCAGAAC GCGGCAGCCT TGTCTTTGC
CACCGTCGCT GACCC TTCCA TGGCGCCGCC CGGCCACCAC GTTGTTTCATG CCTACGCTCC TGCCACC GAA CCGTACAGCC TCTACGAAGG CATGGACCGG
CGTTCCCTG AGTACAAAGC CCTCAAAGCG GCCCGCGTCG AGTACTTGTA TGAGGCGGTG GAGCGGTTCC TGCCCGGCAT CCGCGCTGAA GGGCGCATCC
GGGTAGCTTT GGAGGGCTCC CCGCTGACGC ATGAGCGCTA CCTGCGGCGC CACCGCGGCA CGTACGGGCC TGAGGTTCATG GCTGGCACAG GTGACGCGTT
CACAGGCGGG TCTACGGGCG TGGCGGGCCT GTGGGCGGTT GCGCACAGCT GCTTTCCGGG CATTGGCGTA CCGGCAGTAG CTGCCAGTGC TCTGCTGACG
GTTGGCGGGG TGGTCGGCCG CAAAGGCGTA CAGCGGATGC TGCAAGATTT GAACTTTGA

```

Table. 2-1-1 Sequence of predicted *P. yezoensis* carotenoid converting enzyme genes(cont.)

4. Lycopene cyclase1 (LCY1)

```

ATGGCGGCGT TTGTACGGC GGC GCCGCGG GCG AC GGCTGGCC CGCGCCGCGT CGGGCGGTCTG TGGGGTCTGC GCCGCGGTT TGGCCGCTGT
CTACCAGACT CCGCGGTCTG AGTGGGCGG TCGCGGCGCA GCGGCTGGG CAGCGGCGCG CGCGCGACG GCCGCGTGA CGACGCCCGC
AGCGGCCGG TCGACTGCC CGGCGGCAGC GTCGTCGTCG CCGCGCGCTT CTTCCTCCGC CCCTTCGATG GCCTCTGTG CGGCCGCTGC GACGGCGACG
TCGCCCATCC CCCCACCTGC CGATGACGAC ACCCGCCTCT ACGACGTGGT GGTAAATGGC GCGGGCCCCG CGGGCCTGTC CCTGTCTGCG GGCCTTGGCG
AGCGCGCCCT CCGGACGCTG GTGCTGGACG CCGCGCTTGA TCAGCCGTGG CCAACAATT ACGGGGTGTG GTTGACGAG CTGGAGGCGC TCGGCCCTGG
CGACTGCACC AGCGCCGTTT GGCCCGACGC GGTGGCGTAC GTGCGCGCCG ACGGGGCTCC GTCGGCATT AACCGGTTGT ACGTGCCTGT GGACCGGCAC
GCGCTCAAGC GCGGCTGCT TGCTCGCTGC CCGCGCTGCG GGGCGGTGAC GGTCCGACAC GCGCGGCGG CGGACGTGA CGTGACGCC GCTGCCCAT
CGGTGGTGAG CTACCAGGAC GTGGTACCG GTGCTGCGTGG GCGCGGTGAC GACGCGACG GGGCGGGGG TGGCGGCCCG TCTCGGCCCG GGTGGTCTGG
GCCCCCTTGG TCTGCCCCGT GGGCGGTGCT CCGCGGACGCC ACTGGGACG CACTTCGGT TGTGAGATG GAGGGCGCCG CTGCCGACG GGACGGGCGG
TCCTCTTTGG ACCAGCGGG CTTCCAGGCC GCCTATGGCA TTGAGGCTGA GTAGAGTCC CACCCCTACG CGCCTGGTCG AATGGTCTC ATGGACTACC
GGGATGACCA CATGCAGGG AGCGCAGCCG AGCGCACCGA GTCCACCGCC GTCCCGACCT TCCTGTATGC CATGCCACG GCTCCCAACC GCGTTTCTT
TGAGGAGACC TCCCTCATCG CCTCCCCCG GGTGCCATT GACGACCTAA AGCGCCGCC CTACGCGCGC CTGGCACACG ACGGCAATCAC CGTCACGCGG
GTGCTCGAC AGGAATACTG TCTCATCCCT ATGGCGGGC CACTGCGGC CCGGGGCGAG CCGGTGTG CGTTGGCGG CGTGCCCGC CTCGTCCACC
CCCGACGGG CTACATGGT GCCCGCGCG TCGAGTTGG TCGAGTTGG CACGAGGCC GCGGGGCTGA TTGCGGGGCA GCTGGCGGG GCAAAGGCCA CCGCTGTAGA
GGCGGCCCG GCCGCCGGT GTGCAGTGAG TGGCCCTGCA TCCACGCCGA CGCCTTGTG AGGCCAGCAG GGTGCCCGCG GTGCCCGCG AGATGCGGAC
GCGGTAGCG CGGGCGTGT GGTGCGCTG TGAGCATTG GCCGGCGCG ACAGCGTGAC TTTTCACT TTGGCGGCGA GTACCTGGG GTACCTGGACC
TGCTCACGCT CCGCGATTC TTCTCCGGT TTTTCCGCT GCCCGGCCG CAGTGGGCG AGTTCCTCTC TTTCCGTCTG CTGCGGCCGG GTAGCGCCT
GGCGTTTGG TTGGCGTCT TTTTCCGGAC GAGCAACCG GTGCGGGCGA CGATCACACC ATTTGGGGCG TTTACGGGG GGGGCAAGCT GCTAATGAGC
CTGTTGCCG TGTACCCGGT GGAGGTGCCA CACCGGTCA AACTGCCACC GCTGCCGGC GAGACGGAGT GA

```

Table. 2-1-1 Sequence of predicted *P. yezoensis* carotenoid converting enzyme genes(cont.)

5. Lycopene cyclase2 (LCY2) (partial)

```

GGGGGGGCCC GCGCGCGGGG GGGGGGGGGG AGGNGGGGGG GGGGGCGGGG TTGTGCTCGA CCGCCCCCTAC CTGCGGGGTGG ACCGGGTGAA
GCTCAAGGCG CGGCTGCTGG AGCGGTGCGC AGCGGGAGGG GTGGTCATTG AACGGGCAAA CGTGACCGCG GTGGATCACA GTAGCGATAC TCACTCGACG
GTGACATTTG TGGAGGGTCA CCGCGGCCCA TCCACATCGA GGGGGGACGG CGCGGGCTCA CCACCAACCC CACCGTCGGC GCCTGCACCA CGACAGCTGC
GGACGCGGCT GGTGTGGAC GCCACTGGTC ACGCGCTGCG ATTTGTACAG ACCGCCCCCAG GCTACAGCCC CGGCTTCCAG GCCGCTTATG GCATTGAGGC
GGTTGTTGAG GGCCACCCCT TTCTCTCTGA CGAGATGCTG CTGATGGACT TTCGGGACGA CCACATGCAG GGGGATGCGG CCGATGTGGC TGCCCTCGTCG
GCGGCGCCCA CCTTCCTCTA CGTCTTTCCC ACAGATAGCA ACCGGGTCTT TCTGGAGGAA ACGTCGATCA TTTTGCCCGA AGCCATGCCA TTTGAAAACAC
TGCGGGAGCG GCTGAACAAG CGGCTTGCCC ACCTGGGCGT CACCGTCAAG TCGGTGGTCG AGGAGGAGTA CTCGCTGATC CCCCTGGGCG GGTGCGGTGCC
GCTGCTCGGC CAGCGGGTTG TTGATTGCG GGGGTCTGCC TGCCTCGTCC ACCCGGCCAC GGGCTACATG GTTGCCCGCA CGCTGTCACT CGCCGAGTCG
CTCGCGGGGG AGATTGCCAC TGCCTTGCGG ACTCCCGCTG CAGGGACGTC TCGTCGGGGA TGGGGGGCGA ATGCCGCCGC CGCCGCCGAC GCACCCGCCAC
CGCCCCTGGC GCGCGCGGAC ACGGTGGCGG CCGCCGCATG GCGGCACCTG TGGTCTGAAT CCCGAATCCG CGAGCGGGAC TTTCTCCTCT TTGGCGCCCGA
CCTCTTGGCG GGCCTGGACC TGGGGGCGAT GAAGGAGTTC TTCGCCGCCT TTTTCCGCCT GCCCAACCA CTGTGGGCGG GCTTCCCTAG CTTTCGGCTG
GAGCGGCCGA GCGAGCGGGC GACGTTTGGC TTTGTCTTTT TCCTCCAGGC CTCTAACCGC ATCCGGGGGG GGTGCTGCG GGGGATTGTG ACGACGGGGC
GGTGAAACT GATCCGCTCG GTGCTGCCCC TGTGGCTGGC ACGGCTGGGC GACTCTTCTC GCGAACAGCG GGGGAGAAC CAGCAGTAG

```

Table. 2-1-1 Sequence of predicted *P. yezeensis* carotenoid converting enzyme genes(cont.)

6. CYP97B

ATGGCCCCCTC CCGCGTTTGT CCCTGGGGGCC CACCCGCTGT CGGTTGCGG CTCTCTTCGC GGCTGTCTTT CGCCGGTCTG ATCGTCGCGG TCCCGCTCCT
CTACTTTTCT AGGAGCGACC GTGGCGGCAG GCGACCATGC GCCTTCCCGA GCAGCCTTTC GGATGGTTGC GCCCCCCCA CCACGGCGGC GGGATTGAA
CCCTCAGGAT AAGCGGCAG CAGATGGTGG GCGCGTAGGC GAGCGGGAGC GGCTTGAGGC TACTCTGAAA GTTGACGTTG TGCCCGGCGG GGA CTGCGCCG
CCACCAGAAG AGGAGATGTC CGAGTACGAC CCGCGCCGCT TCAATGACGC CAACCCGCGG CCACCCCTGT CCATGAAAGA CGCGATGGAC TTGTGGATTG
AGAACATTCT GTTCTGTAC GGCACAAAA AGCCGCGCGA CACGGTGCCG GTGGCGGAGG GGGAGGTGTC GGATCTGGTC GCGGTCTCTT TCTTTCTCGC
CCTGCACCGG TGCTTTAAGG AGTATGGGCC CATCTACAAG TTGGCCCTTG GCGCGAAGGT GTTCATTGTC GTGAACGACC CAGTGGTGTG CCGTCACATC
CTCCGTGAGC GCTCAATCCT GTATGACAA GCGGTGCTGT CTGAGATCCT CGAGCCAATT ATGGCAAGG GCCTCATCCC TCGGACTAT GAGACATGGA
AGACCAGGCG CCGGGCCATC GTGCCCCGCT TCCACTCGGC ATGGCTTGA TTCA TGACCG GCATGTTTG C TACTGCACT GCCGGCCTGG CCGATAAGCT
CGACGCACTC ATTGATGCAA GCGACGCCGA CGCTCCTGTC GTGGAGATGG AGACAGAGTA CAGTTCGCTG GCTTTGGATA TCATTGGCAA GGCCATCTTC
AATTATGACT TCAAGAGCAC ACAGACCGAG TCCCCCGTCA TCAAGGCCGT CTACCGGACG CTGCGGGAGG CTGAGTATCG GTCGACTTTT CTTCTCCCT
ACTGGAAGTT TGAGCCCCCTC AACTGGATTG TGCCCCCGCA GCGTCAGTTT CGACGTGACA TGAAGCTCAT CAACGACACC TTGCGCAAGC TCATCAACGA
GGCCAGCAC GGCAAGCAGT CAACGGAGCT GAACGACCTT AGCGGGCGG ACTATGAAA CGTGTCGGAC CCGTCCATGC TCGCTTCTT TGTGACCTG
CGCGGTGAGA GCACAAACCA CAAGCAGCTG CCGGACGATT TGATGACAA T GCTCATCGCT GGCCACGAAA CAACGGCTGC AGTGTGACG TGGGCCACAT
ACGAGCTCGT CCAGCAGCCG GACCTCTACG CACGAGTCCG GGCCGAGGTG GACGCGGTCA TGGGTGACCG GCAACGCCC CCCACCTTG ACGACGTCAA
AGCGCTGGAC CTTACCCGCC GAGTACTGGC GGAGGCCCTG CGCTTGTAAC CCGAGCCGCC ATTGCTCAT CGTAGATTGC TGCCGACGA CACTCTGCCT
GGCGGGGAGA TTGGCAAGCC GACCAGCCTC AAGCGCGCA CTGATGTCTT CATCTGCTT TATTCGCTG ACCGGTCACC CTCTCTGTG GAGGAGCCCC
ACAGGTTTGA CCCCAGCCG TGCTCAAGC CCACTCCAA TGGCGGTGTG GAAGGTTGG CTGGATAC GCGCCATCC AAGGCAAG GTGCGGGCT
CTACCCCAAC GAGGTCAACG CGGACTTTGC GTTCATGCCC GTTCATGCCC TTTGCGGGG GCTCCCGCAA ATGCGTCGG GACCAATTG CCATGCTGA AAGCACCGTC
GCGTTTGC GA GCTTTATGCG TCGGTTTGAC TTCTCGCTGG CTGCGCAC CCGAGGCGGT GGGATTGACA CCGGCGCGAC GATCCACACC AAGGTTGGTA
TGCCCATCCA GGTGAGGAAG CGCGGCGACA GGGCCGACTT GTCGGATGCT TCGGCCAAGC TTTCCAAGTA G

Table. 2-1-1 Sequence of predicted *P. yezoensis* carotenoid converting enzyme genes(cont.)

7. Zeaxanthin epoxidase (ZEP)

```

ATGGCAGCTG AGCAAGCGTC CGTCGCCCCCG GACGCTCCTG TGTCGCGGAC TGTGCTCATT GCCGGTTGTG GTATTGTTGG TTTGTGACC GCCATCGCGC
TGCGGGCGCT GCCGTCCCC CCCACGATCA TCATCCATGA ACGTCGGTGC AAGGAGGAGG CAATGTCTGG CCCTGGTGA ATCATGATTC AGCCCAATGG
CCTTGCCGCC CTCTCTGCC TGGCCGACGG CAGCGGCGAC ACGGTCGTTG CCGCCATCAG CGCCGCTGCC CGCCCGCTGG GCAGCGGTGG CTTCCAGTCC
GCGACCGGG AGGACCTCTA TATTGCAGAG CCGGCACGCG TGACATTGCG TGACCGGACT TCCGACCTGG GCGTGTCCTG GTCACGGACA GCCTTGATGG
GCGCCCTATC TACAGCAGCT GGGGTGGTG CGCCGGGCGG GTTGAGGTG GTTTGGCAGT CGGCCGTGCG GCACTTTGAA GTGTTACAGG GGGAAAGAGG
CGTGCTCAAG GTGGACGTGC AGCTCGAGAC GCGGGGGGTG ACGCAAATGG TGCGGGGGGT GGACGTGCTG GTCGGCGCAG ACGGCCCTCTG GTCTGGCGTC
CGGTCGGCGG TTGACGAGGT GACGGGCCGG GTGCCACACC CCCGCCACGTA CCGAGGCCCTC ATGTGGTGGC GTGGCTCGGT CAGCTACTCG GCCGTTGAGG
CGCGGTGCGC CGACATTGGG CGCTTGTCCT GGGCCCAAGC GTGGCTTCCG CGGGGCGCGT CGTTGGGCTA TATCCGCCCTG GCGGCGGACG ACCTGGCGTG
GTTGCGGTGC GCGCCACGGC CCGCCGACGC ACCCGTCGAG GGGGGCTCCC CGCTGGCGGA GTTCCCTGCC GAGTTGGCC CTGACCGCGG CACCACCCCC
CCCGTCTACG CGGCGGTAGT GCGGGAGCTG GCGTCCCCTG GCGAGGCGGC TGACTGCATT TATCGCGGGC CCACTACTC GCGGGGTGTC CCGTCAGGGC
CTGGCTGGGG CGTGGGCCCC GTCACCCCTG TGGGCGACGC CGCCCATGCC ATCTTTCCGA GCATGGGACA AGGCGCTGC GTGGGCA TTG AGGACGCAGT
GGAGCTCGCC GCGTGCCTG CCGCTGCTTG GCGCTCGCAG CCGCTGGTGG GTGCGGCTGC GCGCGCAAGC CGTGGCACCG TGCCCCCGCG GTTGC CGCGG
TTTGAAGCCG CCGCGCCCC GCGGGTGACG CGGATGGCG TGGAAGAGCG GCGGGGTGTAC CACTTGTCGG CCTGACAGC GCGCGCGGGG ATTTGGCTGC
GGGACACGGC CTACTCGATG CTGCCACAGT GGGTGGTGGA CCGCCAGTTT TCTTGGCTCT TCTCGTACAA GCGACGGTG GTTGCA TAA

```

Table. 2-1-2 Amino acid sequence alignment of the *P. yeoensis* CYP97B and other organism CYP97B⁹⁰

<i>Pyropia yeoensis</i>	STQTESPV	IKAVYRTL	REAYRSTF	LLPYWKFE	EPNLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Porphyra umbilicalis</i>	STQTESPV	IKAVYRTL	REAYRSTF	LLPYWKFE	EPNLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Porphyra purpurea</i>	STKTESPV	IKAVYRTL	REAYRSTL	LLPYWKFE	EPNLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Gracilariopsis chorda</i>	SVTESP	IKAVYRTL	KEITHRSM	MLLPYWK	EPNLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Chondrus crispus</i>	SVTESP	IKAVYRCL	KEITHRSM	MLLPYWK	EPNLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Porphyridium purpureum 1</i>	SVTNESPI	IKAVYRCL	REAEHRS	TFLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Porphyridium purpureum 2</i>	SVTNESPI	IKAVYRCL	REAEHRS	TFLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Haematococcus lacustris</i>	SVTESP	IKSVYGL	KEAEHRS	TFLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Marchantia polymorpha</i>	SVTESP	IKAVYGL	KEAEHRS	TFLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Physcomitrella patens</i>	SVTESP	IKAVYGL	KEAEHRS	TFLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Selaginella moellendorffii 1</i>	SVTKESPI	IKAVYGL	FEAEHRS	TFVLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Selaginella moellendorffii 2</i>	SVTKESPI	IKAVYGL	FEAEHRS	TFVLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Pisum sativum</i>	SVTKESPI	IKAVYGL	FEAEHRS	TFVLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SVTDSP	IKAVYGL	FEAEHRS	TFVLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Phaeodactylum tricornutum 1</i>	SVTQESPI	IKAVYAL	FEAEHRS	TFVLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Phaeodactylum tricornutum 2</i>	SVTKESPI	IKAVYAL	FEAEHRS	TFVLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Ectocarpus siliculosus 1</i>	SVTKESPI	IKAVYAL	FEAEHRS	TFVLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Ectocarpus siliculosus 2</i>	SVTKESPI	IKAVYAL	FEAEHRS	TFVLLPYWK	IEFLNW	VPRQQR	FRRDKL	INDTIR	KRLINE	AQHGGK	STELDD	LKR	RDYEN	SDPSML	RFLVD	LRGES
<i>Pyropia yeoensis</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Porphyra umbilicalis</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Porphyra purpurea</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Gracilariopsis chorda</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Chondrus crispus</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Porphyridium purpureum 1</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Porphyridium purpureum 2</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Haematococcus lacustris</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Marchantia polymorpha</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Physcomitrella patens</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Selaginella moellendorffii 1</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Selaginella moellendorffii 2</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Pisum sativum</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Phaeodactylum tricornutum 1</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Phaeodactylum tricornutum 2</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Ectocarpus siliculosus 1</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Ectocarpus siliculosus 2</i>	TNNQ	QRDD	LMTML	AGHET	LAAL	TWATYEL	Q	PD	LYAR	VR	AE	VD	AM	GD	RQ	T
<i>Pyropia yeoensis</i>	G	--	EIGK	PTS	LKRG	TD	FT	GV	SHRS	PS	LWE	EP	DR	DP	DR	WL
<i>Porphyra umbilicalis</i>	G	--	EIGK	PTS	LKRG	TD	FT	GV	SHRS	PS	LWE	EP	DR	DP	DR	WL
<i>Porphyra purpurea</i>	G	--	ESGK	PTN	LKRG	TD	FT	GV	SHRS	PS	LWE	EP	DR	DP	DR	WL
<i>Gracilariopsis chorda</i>	G	--	AAAD	VT	PLRG	TD	FT	GV	SHRS	PS	LWE	EP	DR	DP	DR	WL
<i>Chondrus crispus</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Porphyridium purpureum 1</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Porphyridium purpureum 2</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Haematococcus lacustris</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Marchantia polymorpha</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Physcomitrella patens</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Selaginella moellendorffii 1</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Selaginella moellendorffii 2</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Pisum sativum</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Arabidopsis thaliana</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Phaeodactylum tricornutum 1</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Phaeodactylum tricornutum 2</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Ectocarpus siliculosus 1</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF
<i>Ectocarpus siliculosus 2</i>	G	--	TSKMD	LKLL	RGN	DF	IS	TV	TLHR	PD	LWEN	PR	DP	DR	WT	REF

Identical amino acids are shaded

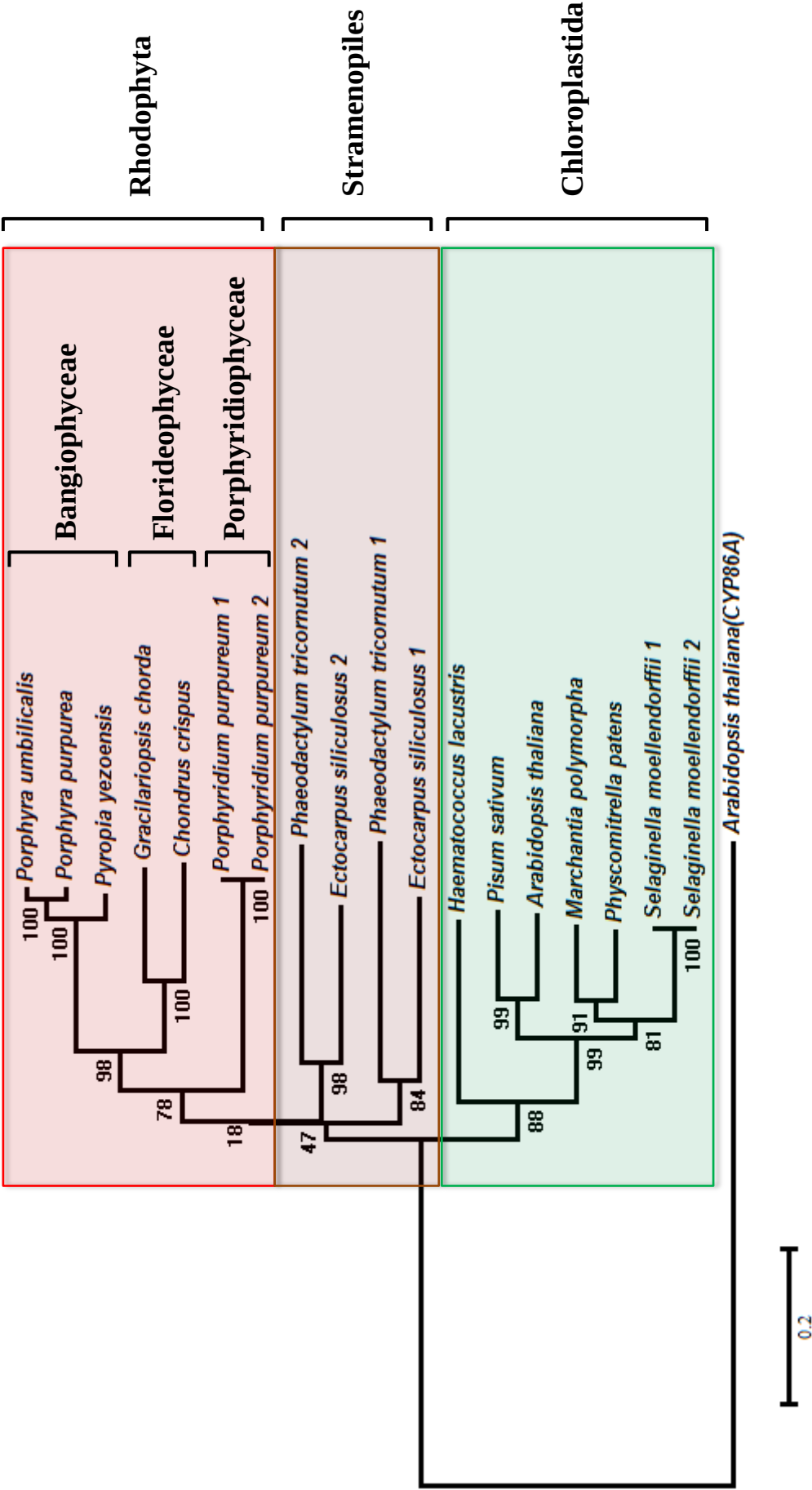
GenBank accession numbers are as follows: *Porphyra umbilicalis*, AHA51695.1; *Porphyra purpurea*, (unpublished data); *Gracilariopsis chorda*, PXF41140.1; *Porphyridium purpureum 1*, KAA8490514.1; *Porphyridium purpureum 2*, KAA8492888.1 *Chondrus crispus*, CDF35397.1; *Haematococcus lacustris*, AFR36909.1; *Marchantia polymorpha* (liverwort), BAR43285.1; *Physcomitrella patens* (moss), PNR555963.1; *Selaginella moellendorffii* (non flowering vascular plant) 1, EFJ30493.1; *Selaginella moellendorffii 2*, EFJ23046.1; *Pisum sativum* (pea), Q43078.1; *Arabidopsis thaliana* (flowering plant), AEE83557.1; *Phaeodactylum tricornutum* (diatom) 1, QDL56927.1; *Phaeodactylum tricornutum 2*, QDL56928.1; *Ectocarpus siliculosus* (brown alga) 1, CBJ27248.1 ; *Ectocarpus siliculosus 2*, CBJ27249.1.

Table . 2-1-3 Identity matrix of *Pyropia yezoensis* and other eukaryotes CYP97 predicted amino acid sequences.

	<i>P. yezoensis</i>	<i>Po. umbilicalis</i>	<i>Po. purpurea</i>	<i>G. chorda</i>	<i>C. crispus</i>	<i>Por. eum 1</i>	<i>Por. eum 2</i>	<i>H. lacustris</i>	<i>M. rpha</i>	<i>Ph. patens</i>	<i>S. moellei</i>	<i>S. moellei</i>	<i>Pi. sativu</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Pha. tricornutum 1</i>	<i>Pha. tricornutum 2</i>	<i>E. siliculosus 1</i>	<i>E. siliculosus 2</i>
<i>P. yezoensis</i>	100	82	81	51	49	42	42	43	43	44	43	43	39	42	32	37	35	43
<i>Po. umbilicalis</i>		100	90	50	49	43	43	41	43	44	42	42	39	41	32	36	35	43
<i>Po. purpurea</i>			100	52	51	44	43	43	44	45	43	43	40	43	32	36	35	44
<i>G. chorda</i>				100	66	42	42	41	41	41	41	41	39	40	32	38	32	45
<i>C. crispus</i>					100	41	41	43	42	43	42	43	39	42	30	36	34	45
<i>Por. purpureum 1</i>						100	94	38	37	36	37	36	34	36	31	34	36	42
<i>Por. purpureum 2</i>							100	37	36	35	36	36	34	35	31	34	36	42
<i>H. lacustris</i>								100	54	53	54	55	50	50	33	37	36	47
<i>M. polymorpha</i>									100	73	68	66	63	65	29	37	35	46
<i>Ph. patens</i>										100	69	68	62	65	30	37	36	46
<i>S. moellendorffii 1</i>											100	94	60	63	31	38	35	46
<i>S. moellendorffii 2</i>												100	59	62	31	38	35	47
<i>Pi. sativum</i>													100	68	28	36	33	41
<i>A. thaliana</i>														100	30	37	35	45
<i>Pha. tricornutum 1</i>															100	30	43	34
<i>Pha. tricornutum 2</i>																100	30	47
<i>E. siliculosus 1</i>																	100	36
<i>E. siliculosus 2</i>																		100

Pairwise alignments were made using ClustalW, and percentage identities were determined using Bio Edit Software[51].

Fig. 2-1-1 Phylogenetic analysis of CYP97B (PyCYP97B) between photosynthetic organisms.



The sequences were aligned using ClustalX, and a phylogenetic tree was constructed by rooted neighbor-joining method.

第二節

大腸菌を用いた *P. yezoensis* CYP97B の酵素機能解析

実験方法

2.2.1 cDNA ライブラリーの作製

P. yezoensis total RNA の抽出は、RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いて添付の使用説明書の方法に従って抽出操作を行った。すなわち、*P. yezoensis* 藻体を培養バッグから回収後、キムタオルで水分を除去し約 0.1 g をエッペンチューブに回収し、液体窒素で急冷凍した。回収した藻体は、液体窒素中で冷却しながら乳鉢で摩砕し、2-mercaptoethanol 4.5 μ l を含む 450 μ l Buffer RLC に加え、撹拌した。その後、QIA shredder spin column に移して、15,000 rpm で 3 分間遠心分離した。Collection tube に分離された溶液をエッペンチューブに移し、200 μ l ethanol を加えてピペッティング後、RNeasy mini column に移し、12,000 rpm で 15 秒遠心分離した。下層を捨て、Buffer RW1 を 700 μ l 加えて、12,000 rpm で 15 秒、Buffer RPE を 500 μ l 加えて、12,000 rpm で 15 秒、再度 Buffer RPE を加えて 12,000 rpm で 2 分間遠心分離した。次に、collection tube を新しいものに替え、15,000 rpm で 1 分遠心分離した。再度、collection tube を新しいものに替え、RNase-free water を 40 μ l 加えて、10 分静置した。12,000 rpm で 1 分遠心分離し、total RNA を得た。

2.2.2 DNA 除去

得られた total RNA を TURBO DNA free-kit(Invitrogen)を用いて、使用説明

書の方法に従って DNA 除去を行った。すなわち、エッペンチューブに Table. 2-2-1 の組成の通り反応液を調製し、37°C のヒートブロックで 30 分インキュベート後、DNase Inactivatoin Reagent を 4 μ l 加えた。室温で 5 分間静置後、10,000 rpm で 2 分間遠心分離し、上清をエッペンチューブに移した。回収した RNA は、total RNA 1 μ l を RNase-free water で 10 倍に希釈し、波長 260 nm の吸光度を分光光度計で測定することで RNA 濃度を算出した。

2.2.3 逆転写反応

逆転写反応は Prime Script 1st STrand cDNA Synthesis Kit (Takara)を用いて、使用説明書通りに行った。すなわち、Table. 2-2-2 に示した混合液を調製後、逆転写効率向上のため Table. 2-2-3 の条件で加温・冷却をおこなった。その後、Table. 2-2-4 の反応液を調製し、Table. 2-2-5 の温度条件で逆転写反応を行い、cDNA ライブラリーを作製した。

2.2.4 PyCYP97B の単離

P. yezoensis CYP97B (PyCYP97B)の cDNA は Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs)を使用して RT-PCR 法で単離した。RT-PCR には フォワードプライマーとして、5'-ACATATGGCCCCTCCCGCGTTTG-3'、リバープライマーとして 5'-TGGTACCTACTTGGAAGCTTGGC-3'の配列を用いた。その後、電気泳動で PCR 産物である cDNA を精製し、QIAGEN II Gel Extraction Kit (QIAGEN)でゲルから cDNA を回収した。

2.2.5 PyCYP97B の形質導入

回収した PyCYP97B の cDNA を pCR Blunt II TOPO vector (invitrogen) に結合させ、コンピーテントセルに導入した。その後、カナマイシン含 LB 培地に播種し、10 個コロニーを平板培地に移し、37°C で一晩培養した。

増殖したコロニーをカナマイシン含 LB 培地に播種し、一晩 37°C、300 rpm で振とうしながら培養を行い、Zyppy Plasmid Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) でプラスミドを回収し、DNA シーケンサーで配列を確認した。

正しい配列のインサートが結合したプラスミドを制限酵素 *NdeI*, *KpnI* で切断後、CDF vector (Merck Millipore) とライゲーションした後、大腸菌 DH5 α に形質導入した。

平板培地に播種後、コロニーを数個選び、プラスミド DNA を回収した。回収したプラスミド DNA を *NdeI*, *KpnI* で切断し、電気泳動でインサートの挿入を確認した。その後、DNA シーケンサーで配列を確認した。

次に、CDF-PyCYP97B を 4 種類の大腸菌 (β -carotene 合成菌(M13[58])、 α -carotene 合成菌 (M5[58] + pETD-MpLCYb/Mp-LCYe[59])、 α -carotene 合成菌 + CYP97C (M5 + pETD-MpLCYb/MpLCYe + pRSF-MpCYP97C[44])、zeinoxanthin 合成菌 (M5 + pETD-MpLCYb/MpLCYe + pRSF-MpBHY[44])) に形質導入した。

2.2.6 大腸菌のカロテノイド合成分析

2.2.5 で形質導入した大腸菌を、21°C、200 rpm、 ± 0.05 mM IPTG で 2 日間培養し、8,000 rpm で 5 分間遠心分離し、STE buffer(10mM Tris(pH 7.5)、1 mM EDTA、150 mM NaCl) に溶解した。菌体に methanol 200 μ l を加え 2 分間撹拌した。その後、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を 50 μ l、1M NaCl を 150 μ l、chloroform

を 200 μ l 加えて攪拌した。8,000 rpm で 5 分間遠心分離し、下層を回収し、遠心エバポレーターで乾固した。Ethyl acetate で溶解し、下記の条件で HPLC に供した。

HPLC-PDA : Waters Alliance 2695-2996 system

カラム : TSKgel ODS-80Ts(4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m,Tosoh, Japan)

カラム温度 : 25°C

流速 : 1.0 ml/min

溶媒 : (Solvent A)methanol : H₂O (95 : 5, v/v)
(Solvent B)methanol : THF (70 : 30, v/v)

注入量 : 10-100 μ l

測定波長 : 280-550 nm

Table.2-2-6 HPLC solvent gradient pattern for carotenoid analysis				
Time	Solvent A	Solvent B	Flow	
[min]	[%]	[%]	[ml/min]	
0	100	0	1.0	
5	100	0	1.0	
10	0	100	1.0	
18	0	100	1.0	

なお、回収したカロテノイドは、既知のリテンションタイムおよび吸収スペクトルと比較することで同定した[44,59,60]。

結果と考察

カロテノイド遺伝子の酵素機能解析については Misawa ら[52]がカロテノイド合成遺伝子を *Erwinia uredovora* (後に *Pantoea ananatis* に再分類)から単離し、大腸菌を用いて機能解析したことから始まる。これにより Misawa ら[52]は lycopene、 β -carotene、zeaxanthin などのカロテノイド合成経路の変換酵素をはじめて特定し、合成経路を明らかにした。その後、様々な生物からカロテノイド合成酵素が単離され、大腸菌の形質導入により、多数のカロテノイド合成酵素の活性が明らかになっており、現在でも主要な解析手法となっている[39,44,46,53,54]。

本研究で用いた M5 プラスミドは *P. ananatis* の *crtE*、*crtB*、*crtI* 遺伝子を導入して lycopene を生産するように設計されたプラスミド(pACCRT-EIB)であり、M13はさらに *crtY* 遺伝子を導入し β -carotene を合成するように設計されたプラスミドである(pACCAR16 Δ crtX)[58]。また、同時に導入した *LCY*、*BHY* および *CYP97* 遺伝子は Takemura ら[44,59]により *Marchantia polymorpha*(ゼニゴケ)より単離し酵素機能解析されたプラスミドを使用した。

PyCYP97B をインサートとして作製したプラスミド(CDF-PyCYP97B)を β -carotene 合成菌(M13)、 α -carotene 合成菌(M5 + pETD-MpLCYb/MpLCYe)、 α -carotene 合成菌 + CYP97C(ϵ -ring carotene hydroxylase)(M5 + pETD-MpLCYb/MpLCYe + pRSF-MpCYP97C)に導入した菌では、いずれの菌においてもカロテノイドの新たな変換は認められなかった(Fig. 2-2-1,2-2-2A)。

一方、PyCYP97B を zeinoxanthin 合成菌(M5 + pETD-MpLCYb/MpLCYe + pRSF-MpBHY)に導入した菌では、新たに lutein が合成された(Fig. 2-2-2B)。このことから、PyCYP97B が ϵ -ring carotene hydroxylase 活性をもつことが明

らかとなった。これまでに紅藻の CYP97B が ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を有することが示唆されてはいたが[39]、大腸菌発現系を用いて明確に酵素機能を明らかにした例はなく、本研究により初めて証明された。

しかしながら、本評価系では β -ring carotene hydroxylase 活性は認められなかった。緒言で述べたとおり、紅藻 *Po.umbilicalis* と珪藻の CYP97B で β -ring carotene hydroxylase 活性が明らかになっている[39,40]。このことから、本来 PyCYP97B が持つ β -ring carotene hydroxylase 活性が大腸菌による評価系の影響により、カロテノイド変換が発現していないことが推察される。その要因として、*P. yezoensis* は GC 含量が高い生物であり(PyCYP97B:GC 含量(61.5%))、大腸菌は低 GC 含量生物であることから(約 50%[61])、GC 含量の大きな差が遺伝子発現に影響している可能性が考えられた。

さらに、他生物の CYP97 には N 末端に葉緑体移行シグナルが存在することが報告されており[44]、シグナルペプチドが切断されないために酵素活性が制限されている可能性も考えられる。そのため、次節では PyCYP97B 遺伝子配列のコドンで大腸菌に最適化した配列と葉緑体移行シグナルを除去した配列の PyCYP97B を合成し、カロテノイド変換機能をさらに検証した。

Table. 2-2-1 Composition of DNA removal reaction mixture

Reagent	Volume(μ l)
10 $\times$ TURBO DNase Buffer	4
TURBO DNase	1
Total RNA	35
Total	40

Table. 2-2-2 Composition of reverse transcription(RT) reaction of master mix (denaturing)

Reagent	Volume(μl)
Total RNA	4
RNase free DW	2
Oligo dT primer	1
dNTP mixture	1
Random 6 mers	2
Total	10

Table. 2-2-3 Reaction condition of RT(denaturing)

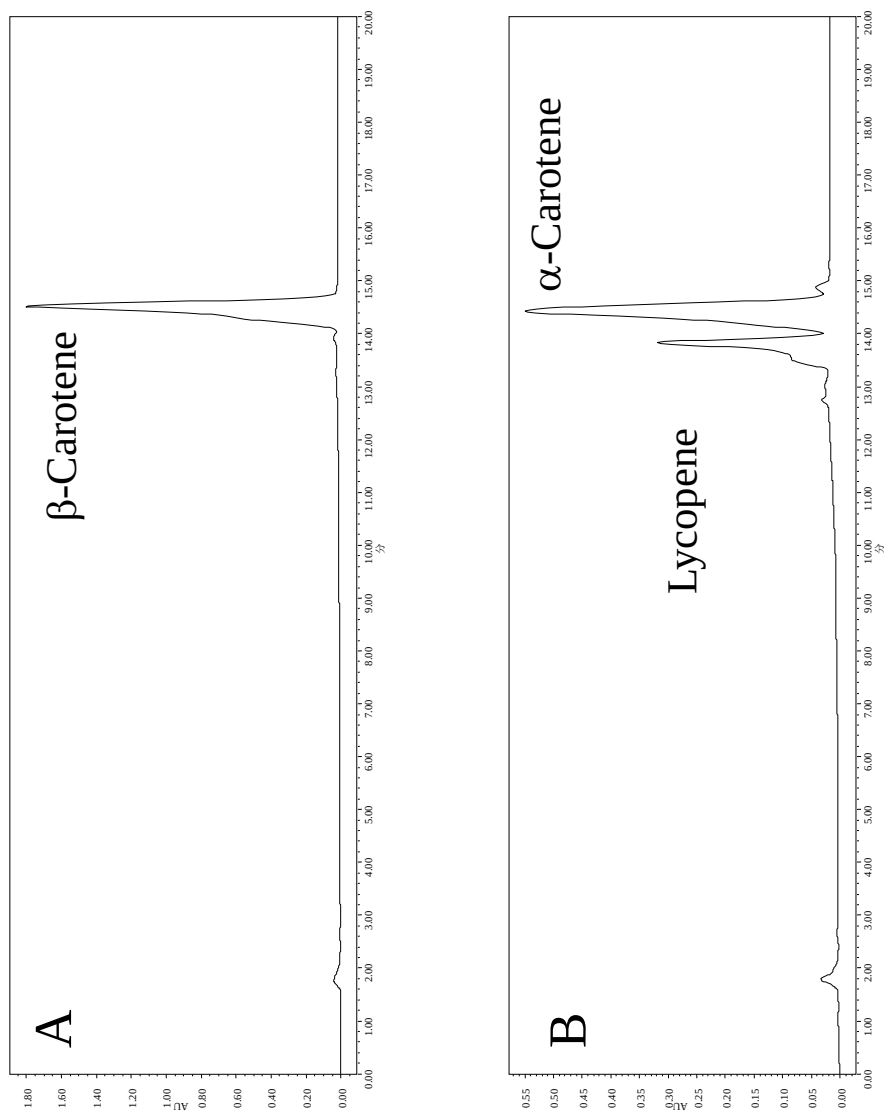
	Step 1	Step 2
Temperature	65° C	On ice
Time	5 min	2 min

Table. 2-2-4 Composition of RT reaction of master mix

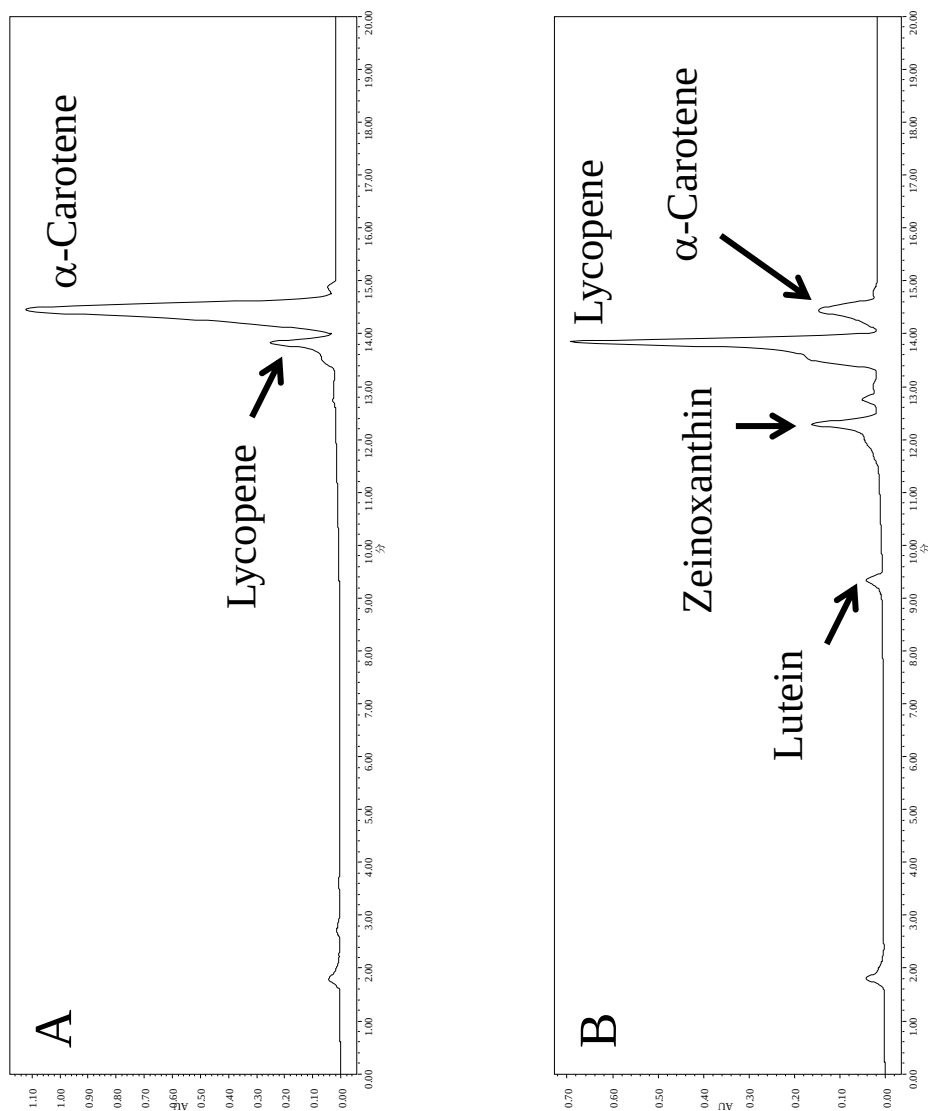
Reagent	Volume(μl)
Reaction mixture	10
5×Prime script buffer	4
RNase inhibitor	0.5
Primer script RTase	1
RNase free DW	4.5
Total	10

Table. 2-2-5 Reaction condition of RT

	Step 1	Step 2	Step 3
Temperature	30° C	42° C	75° C
Time	10 min	60 min	15 min



**Fig. 2-2-1 HPLC chromatograms of products extracted from transformed *E. coli*.
A M13 plus CDF-PyCYP97B vector; B M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus CDF-PyCYP97B vector**



**Fig. 2-2-2 HPLC chromatograms of products extracted from transformed *E. coli*.
A M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus pRSF-MpCYP97C plus CDF-PyCYP97B vector;
B M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus pRSF-MpBHY plus CDF-PyCYP97B vector.**

第三節

大腸菌を用いた PyCYP97B の酵素機能解析における コドン最適化と葉緑体移行シグナル除去の検討

実験方法

2.3.1 PyCYP97B コドンの最適化

PyCYP97B の塩基配列に関して、大腸菌のコドン偏位(codon bias)に最適化させるため、大腸菌のコドン使用率[62]を参考にコドンを選択し、大腸菌 GC 含量に最適化した配列を作成した (Table. 2-3-1)。

さらに、葉緑体移行シグナルを ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)で検索し、コドン最適化に加えて葉緑体移行シグナルを除いた配列を作成した。

作成した配列は GENEWIZ 社に委託し DNA 合成を行った。

2.3.2 コドン最適化 PyCYP97B の形質導入

2.3.1 で作製した 2 種類の PyCYP97B 配列を 2.2.5 と同様に大腸菌に導入した。

2.3.3 大腸菌のカロテノイド合成分析

2.2.6 と同様に大腸菌のカロテノイド合成を評価した。

結果と考察

P. yezoensis は GC 含量が高い生物であることが報告されており [29]、GC 含量の低い大腸菌とはコドン偏位(codon bias)が大きく異なる。コドン偏位が大きく異なる塩基配列で形質導入を行うと、使用頻度の低い tRNA を用いる影響により、翻訳量の低下、アミノ酸の置換などの翻訳エラーが増加することが知られている [63,64]。さらに、RNA の減衰も早くなることが明らかになっていることから [65]、コドン選択は異種タンパク質発現における重要なファクターである。

そこで、本研究では PyCYP97B の酵素活性を明らかにするため、大腸菌のコドンに最適化したインサート(PyCYP97B-opt)を作製し、Wild Type(WT)の配列(PyCYP97B-WT)と同様に検討を行った。

さらに、PyCYP97B 配列の葉緑体移行シグナルを検索したところ、N 末端の 13 アミノ酸が葉緑体移行ペプチドであることが予測された(Table. 2-3-2)。*P. yezoensis* の細胞内と異なり、大腸菌内では葉緑体移行シグナルの切断が遅く、酵素機能に悪影響を与えた可能性を考え、移行ペプチドを除いた mature protein 配列(PyCYP97B-opt-mat)についても酵素機能の解析を行った。

コドン最適化の結果、PyCYP97B-WT と比べ、PyCYP97B-opt では GC 含量は 61.54%から 52.56%に減少し、大腸菌のゲノム GC 含量(約 50% [61])に近づいた。

続いて、PyCYP97B-opt のカロテノイド変換活性を評価したところ、いずれの条件においても合成されたカロテノイドの種類は WT と変化はなかった(Fig. 2-2-1,-2, 2-3-1,-2,-3,-4)。しかしながら、それぞれのピーク面積を比較すると、lutein などの変換後カロテノイドの比率が、WT より PyCYP97B-opt で増加したことから、コドンの最適化によりカロテノイド変換効率が向上したことが明

らかとなった。

さらに、葉緑体移行ペプチドを除いた PyCYP97B-opt-mat では、 β -carotene 合成菌に導入することで、非常に微量ではあるが zeaxanthin が検出され、極大吸収波長によっても確認された(Fig. 2-3-1,2-3-5)。これらのことから PyCYP97B が β -ring carotene hydroxylase 活性をもつことが示唆された。

また、 α -carotene 合成菌についても PyCYP97B-opt-mat 導入により zeaxanthin 合成が確認された(Fig. 2-3-2)。 α -Carotene 合成菌は lycopene β -cyclase を持つため、すべての lycopene が α -carotene に変換されず一部 β -carotene が合成される。よって、 β -carotene から zeaxanthin が合成されたと考えられる。

紅藻のカロテノイド合成酵素に関する知見は少なく、これまでに *C. merolae* の LCY の lycopene- β -cyclase 活性を示した報告[66]や、*Po. umbilicalis* の CYP97B (PuCHY1)について報告がある[39]。PuCHY1 の報告の中で Yang らは、PuCHY1 の β -ring carotene hydroxylase 活性について明らかにするとともに、さらに ϵ -ring carotene hydroxylase 活性についても示唆している。さらに 2020 年に、*P. yezoensis* と *Po. umbilicalis* の lycopene cyclase(LCY)について、大腸菌を用いた解析が行われた[67]。そのなかで、本研究では部分配列にとどまっていた *P. yezoensis* の LCY2 配列について、RACE 法で全長配列を明らかにし、*Po. umbilicalis* LCY と併せて *P. yezoensis* LCY(本研究における LCY1、LCY2) の lycopene β -cyclase、lycopene ϵ -cyclase の活性をそれぞれ明らかにした。

第一節で述べた通り、これまでに *P. yezoensis* を含む複数の紅藻は *Po.umbilicalis* と同様に、植物で主要な carotene hydroxylase である BHY、CYP97A、CYP97C を持たず、CYP97B のみ見つかっている。このことから、PuCHY1 と同様に PyCYP97B もまた β -ring carotene hydroxylase 活性、さら

には ϵ -ring carotene hydroxylase 活性も持つと予想し、大腸菌を用いて酵素機能の解析を行った。

結果として、PyCYP97B は明確な ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を示した。

このことは、これまで紅藻で明らかになっていなかった lutein 合成経路の変換酵素が発見されたことを示している。一方で β -ring carotene hydroxylase 活性は PyCYP97B-WT では活性を示さなかったが、PyCYP97B-opt-mat でわずかなではあるが活性が認められた。このことは、PyCYP97B が弱いながらも β -ring carotene hydroxylase 活性をもつことを示している。PyCYP97B の β -ring carotene hydroxylase 活性が弱かった原因は、その酵素活性が弱い可能性のほかに、大腸菌内で転写やタンパク質のフォールディングがうまく機能しない可能性や、補酵素などの共存物質がないために活性が弱いことなどが考えられる。実際に、GC 含量を下げるようにコドン最適化を行った結果 lutein 合成量が増加したことから、大腸菌内では本来の PyCYP97B 活性より弱い活性しか発現しないことが示唆される。そのため、本研究で発見に至らなかった lutein 合成における α -carotene から zeinoxanthin への変換は、PyCYP97B の基質特異性が高いために、その経路の β -ring carotene hydroxylase 活性をもたない可能性と、大腸菌評価系の影響で活性が認められなかった可能性が推察される。今後、他のモデル生物(酵母、コケ、陸上植物)への遺伝子導入や、PyCYP97B のノックダウンによる解明が必要であり、今後の研究が期待される。

Table. 2-3-1 Codon usage for codon optimization of PyCYP97B

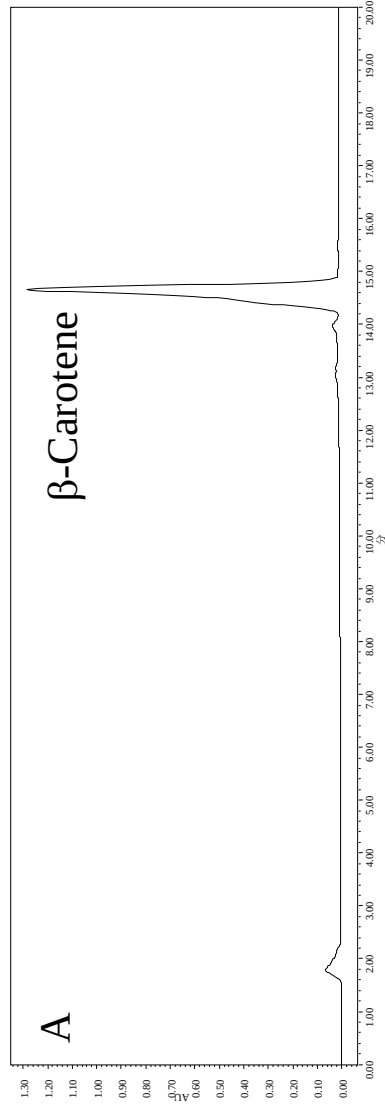
Amino acid	Codon	Amino acid	Codon
Phe(F)	TTT	Asn(N)	AAC
Leu(L)	CTG	Lys(K)	AAA
Ile(I)	ATT	Asp(D)	GAT
Met(M)	ATG	Glu(E)	GAA
Val(V)	GTT	Cys(C)	TGT
Pro(P)	CCG	Trp(W)	TGG
Thr(T)	ACC	Ser(S)	AGC
Ala(A)	GCG	Arg(R)	CGT
His(H)	CAT	Gly(G)	GGT
Gln(Q)	CAG	STOP	TAG

Table. 2-3-2 Sequence of codon optimal *P. yezeensis* CYP97B

Transit signal peptide

1	ATGGCCCTCCCGCGTTTGTCCTGGGGCCACCCGGTGTGGTTCGGGGCTCTCTTCGGGGCTGTCTTTTCGGCCGGTCTGTA	90	TCGTCGCGG
	<u>MA</u> PPAFVVPGLSVAAGSLRGCLSPVVS		R
91	TCCCGCTCCTCTACTTTTCTAGGAGCGACCGTGGCGGACGACCAATGCGCTTCCGAGCAGCCCTTTCGGATGGTTGCGCC	180	CCCCCA
	SRSTFLGATVAAGDAHAPSRAPFRMAPPP		P
181	CCACGGCGCGGGATTTCGAACCCCTCAGGATAAGCGGCGCAGATGGTGGCGCGTAGCGGAGCGGGCTTGAGGCTACTCTG	270	GAATL
	PRRDSDSNPQDKAAADGGGRVGERELATGACGCCAACCCGCGG		G
271	GTTGACGTTGTGCCCCGGGACTCGCCGCCACAGAGGAGATGTCCGAGTACGACCCGCGCGCTTCAATGACGCCAACCCGCGG	360	CCG
	VDPVPGGDSPPPEEMSEYDPRRFNDANPP		P
361	CCACCCCTGTCCATGAAGACGCGATGGACTTGTGGATTGAGAACATTCCTTGTTCGCGGCAACAAAGCCGCGCAGCGGTGCCG	450	CG
	PLSMKDAAMDLVGLWILENILLVLYGDKPKPTVP		P
451	GTGGCGGAGGGGAGGTGTGGATCTGGTTCGGCGGTCCTTTCTTCTCGCCCTGCACCGGTGCTTTAAGGAGTATGGGCCCATCTACA	540	AG
	VAGEVSDLVGGGPFFLALHLHRCFKEYGP		K
541	TTGGCCTTTGGGCCGAAGGTGTTCAITTCGTGGAACGACCCAGTGGTGTGCGGTACACATCCTCCGTGAGCGCTCAATCCTGTATGACA	630	AG
	LAFGPVKVFIFVVDPNDPVVCRLHLREISILYDK		K
631	GGCGTGTCTGAGATCCTCGAGCCAAATATGGGCAAGGCGCTCATCCCTGCGGACTATGAGACATGGAAGACGCGCGCGCCATC	720	ATC
	GVLSLEILPEPMGLIPADYE		I
721	GTGCCCGGCTTCCACTCGGCATGGCTTGAATTCATGACCGGCATGTTTGGCTACTGCACCTGCGGCGCTGGCGGATAAGCTCGACGCACTC	810	TC
	VPGFHSALWLEFM		L
811	ATTGATGCAAGCGACCGCTCCTGTCGTGGAGATGGAGACAGATACAGTTCGCTGGCTTTGGATATCATTTGGCAAGGCCATCTTC	900	TC
	IDASDAADAPVVEME		F
901	AATTATGACTTCAAGAGACACAGACCGAGTCCCGCTCATCAAGGCCGTCTACCGACGCTGCGGAGGCTGAGTATCGGTTCGACTTT	990	TT
	NYDFFKSTQTESPPVIAKAVYRTLR		T
991	CTTCTCCCTACTGGAAGTTTGAGCCCTCAACTGGATTGTGCCCGGCGAGCTCAGTTTCGACGTGACATGAAGCTCATCAACGACAC	1080	CC
	LPYWKFEPLNWI		T
1081	TTGCGCAAGCTCATCAACGAGGCGCCAGCACGGCAAGCAGTCAACGGAGCTGGACGACCTTAAGCGGGGACTATGAAAACGTGTCGGAC	1170	AC
	LRLILINEAQHGLQS		D
1171	CGTCCATGCTGCGCTTCCCTTGTGACCTGCGCGGTGAGAGCACAAACCAAGCAGCTGCGGAGCGATTGATGACAAATGCTCATCGCT	1260	CT
	PSMLRFLLVDLRGES		A
1261	GGCCACGAAACAAACGGCTGACGTGACGTGGGCCACATACGAGCTCGTCCAGCAGCGGACCTCTACGACGAGTCCGGGCGGAGGTG	1350	GT
	GHE		V
1351	GACGCGGTTCATGGGTGACCGGCAACGCCCGCCACCTTTGACGACGTCAAAAGCGCTGGACCTTACCCGCGGAGTACTGGCGGAGGCTTG	1440	TTG
	D		L
1441	CGCTTGTAACCCGAGCGCCATTGCTCATTCGTAGATTGCTGGCCGACGACACTCTGCTGCGGGGAGATTGGCAAGCCGACCGCCTC	1530	CTC
	RLYPPEP		L
1531	AAGCGGCGATGATGCTTCTGCTTATTCGCTGCAACCGGTACCCCTCTCTGTGGGAGGAGCCCGACGAGTTTGACCCCGACCGG	1620	GG
	KRG		R
1621	TGGCTCAAGCCCACTCCAATGCGGTGTGGAAGGTGGCTGGATACACGCCGCCATCCAAGGCGCAAGGTGCGGCGCTCTACCCCAAC	1710	AC
	WLKPH		N
1711	GAGGTCAACGCGGACTTTGCGTTTCATGCCCTTTGGCGGGGGCTCCCGCAATGCGTCGGCGACCCAGTTTCGCCATGCTGGAAGCACC	1800	CGTC
	EVNAD		V
1801	GCCTTTGCGACGCTTATGCGTCGGTTTGAATCTCTGCTGCGGTGCGCACCGGAGGCGGTTGGGATTGACACGGGCGCGACGATCCACAC	1890	ACC
	AFATLMRRFD		T
1891	AAGGTTGGTATGCCCATCCAGGTGAGGAAGCGCGCGGCGACAGGGCGGACTTGTGGATGCTTCGGCCCAAGCTTTCCAAAGTAG	1971	AG
	KGMPIQVVRKRGRADLS		K

Optimized



Optimized + Mature
(without signal peptide)

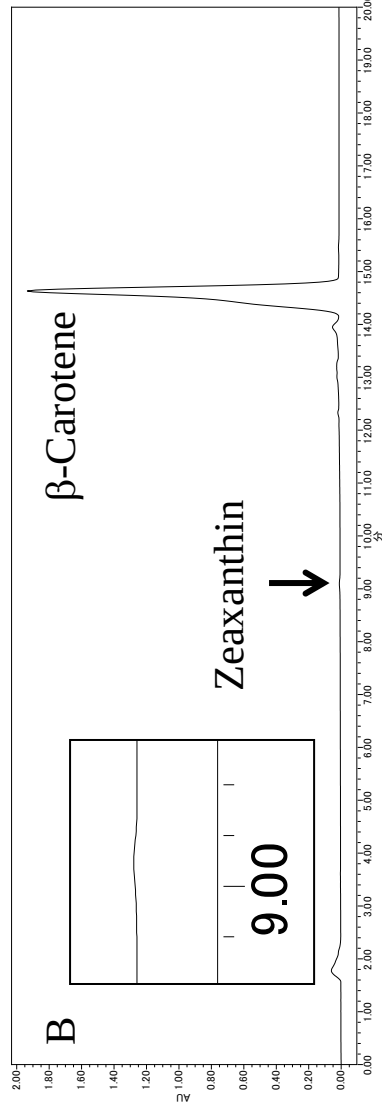


Fig. 2-3-1 HPLC chromatograms of products extracted from *E. coli* transformed with M13 plus CDF-PyCYP97B.
A: M13 plus CDF-PyCYP97B(codon optimized sequence) vector
B: M13 plus CDF-PyCYP97B(codon optimized and mature sequence) vector.

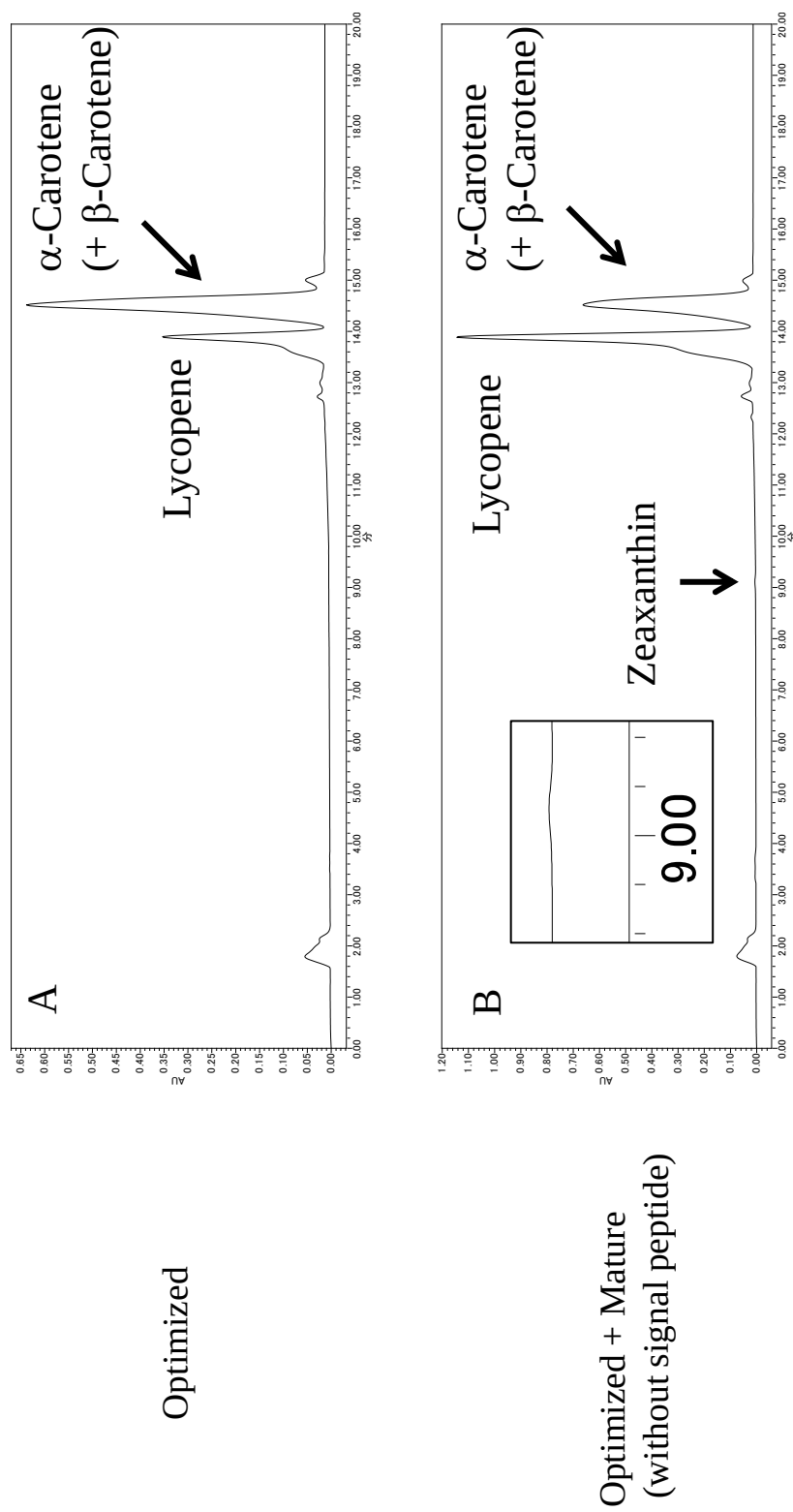


Fig. 2-3-2 HPLC chromatograms of products extracted from *E. coli* transformed with M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus CDF-PyCYP97B.
A: M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe CDF-PyCYP97B(codon optimized sequence) vector
B: M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe CDF-PyCYP97B(codon optimized and mature sequence) vector.

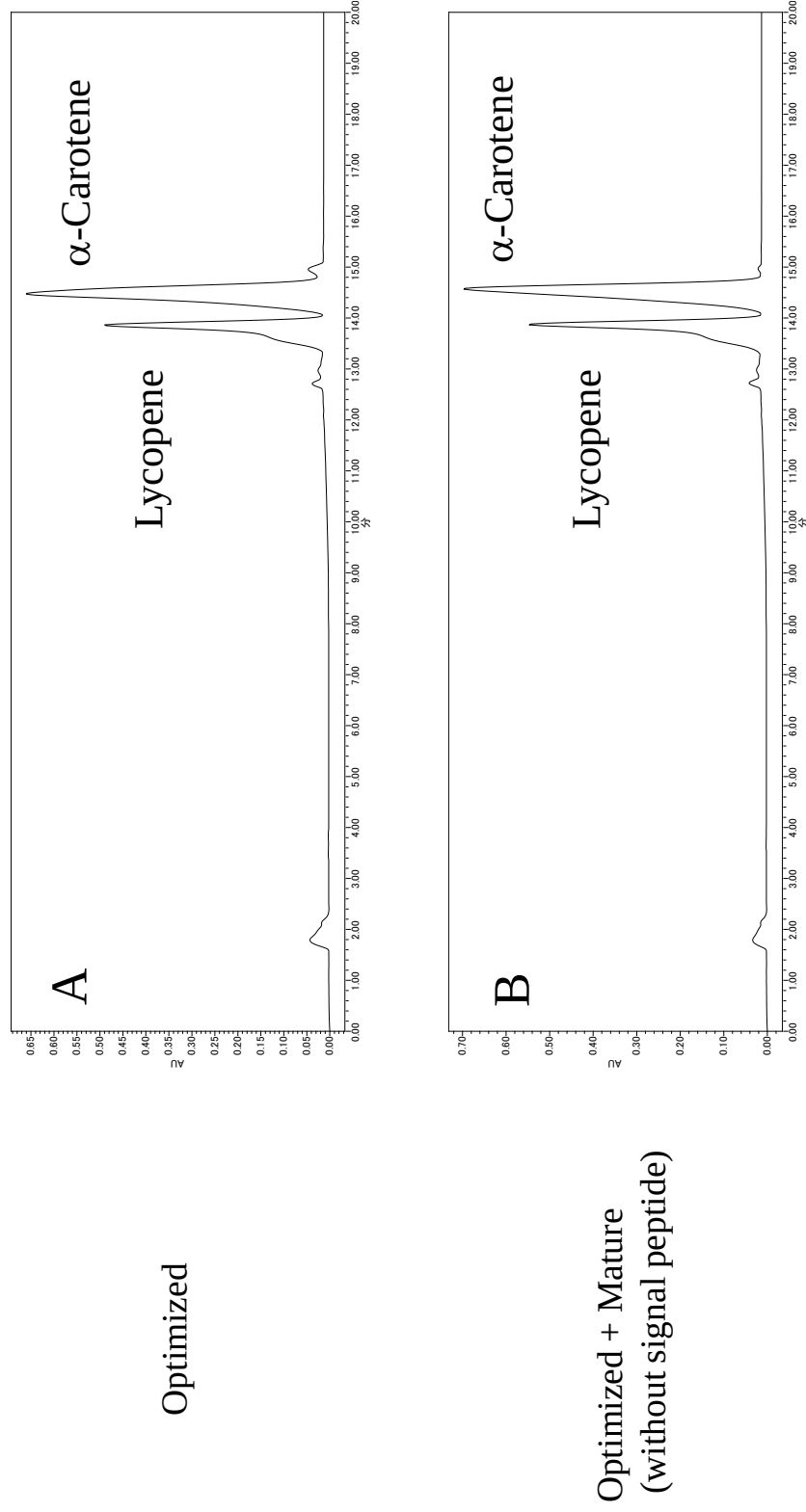


Fig. 2-3-3 HPLC chromatograms of products extracted from *E. coli* transformed with M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus pRSF-MpCYP97C plus CDF-PyCYP97B.
A: M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus pRSF-MpCYP97C plus CDF-PyCYP97B(codon optimized sequence) vector
B: M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus pRSF-MpCYP97C plus CDF-PyCYP97B(codon optimized and mature sequence) vector.

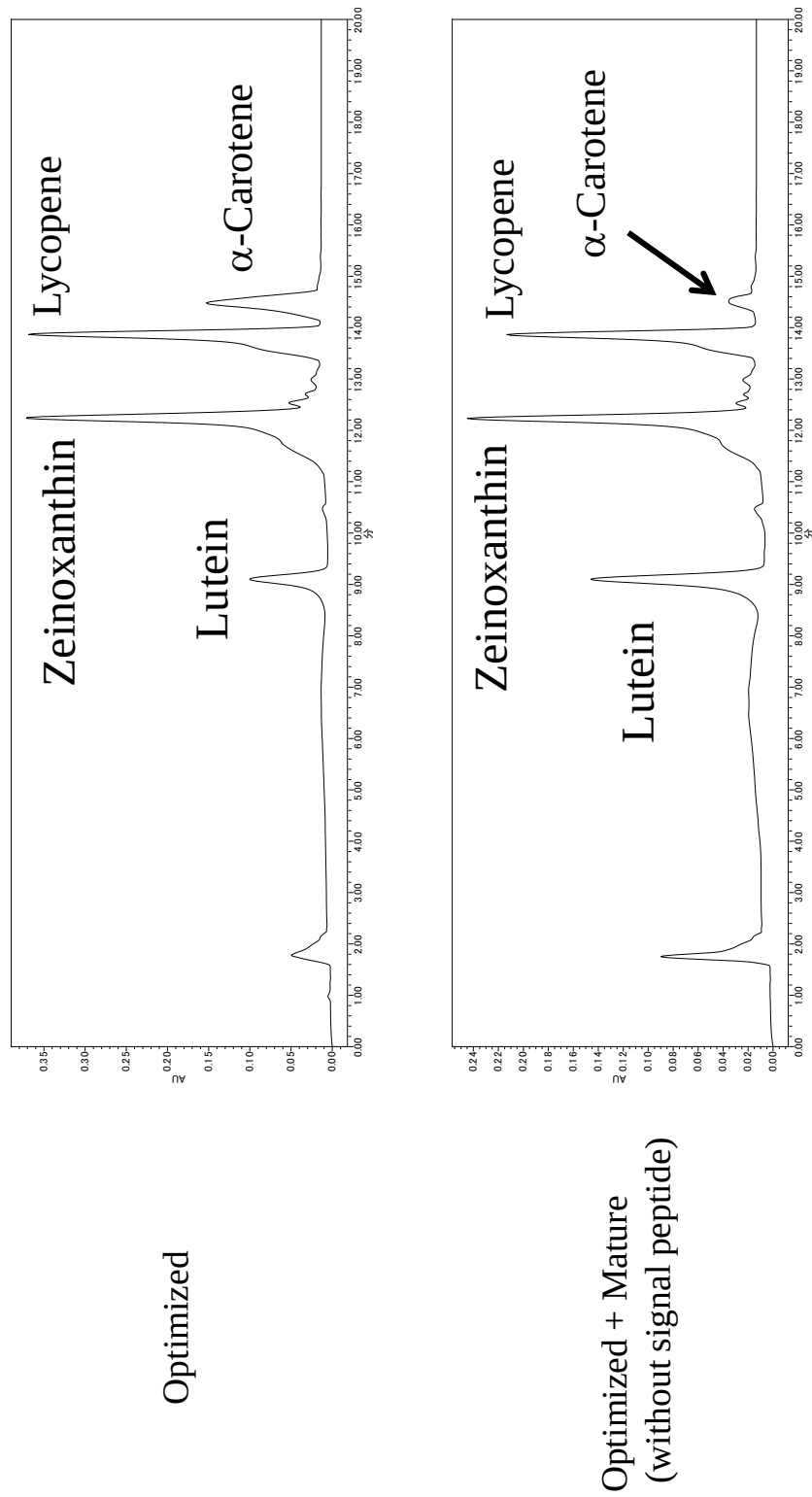


Fig. 2-3-4 HPLC chromatograms of products extracted from *E. coli* transformed with M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus pRSF-MpBHY plus CDF-PyCYP97B.

A: M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus pRSF-MpBHY plus CDF-PyCYP97B(codon optimized sequence) vector

B: M5 plus pET-MpLCYb/MpLCYe plus pRSF-MpBHY 7C plus CDF-PyCYP97B(codon optimized and mature sequence) vector.

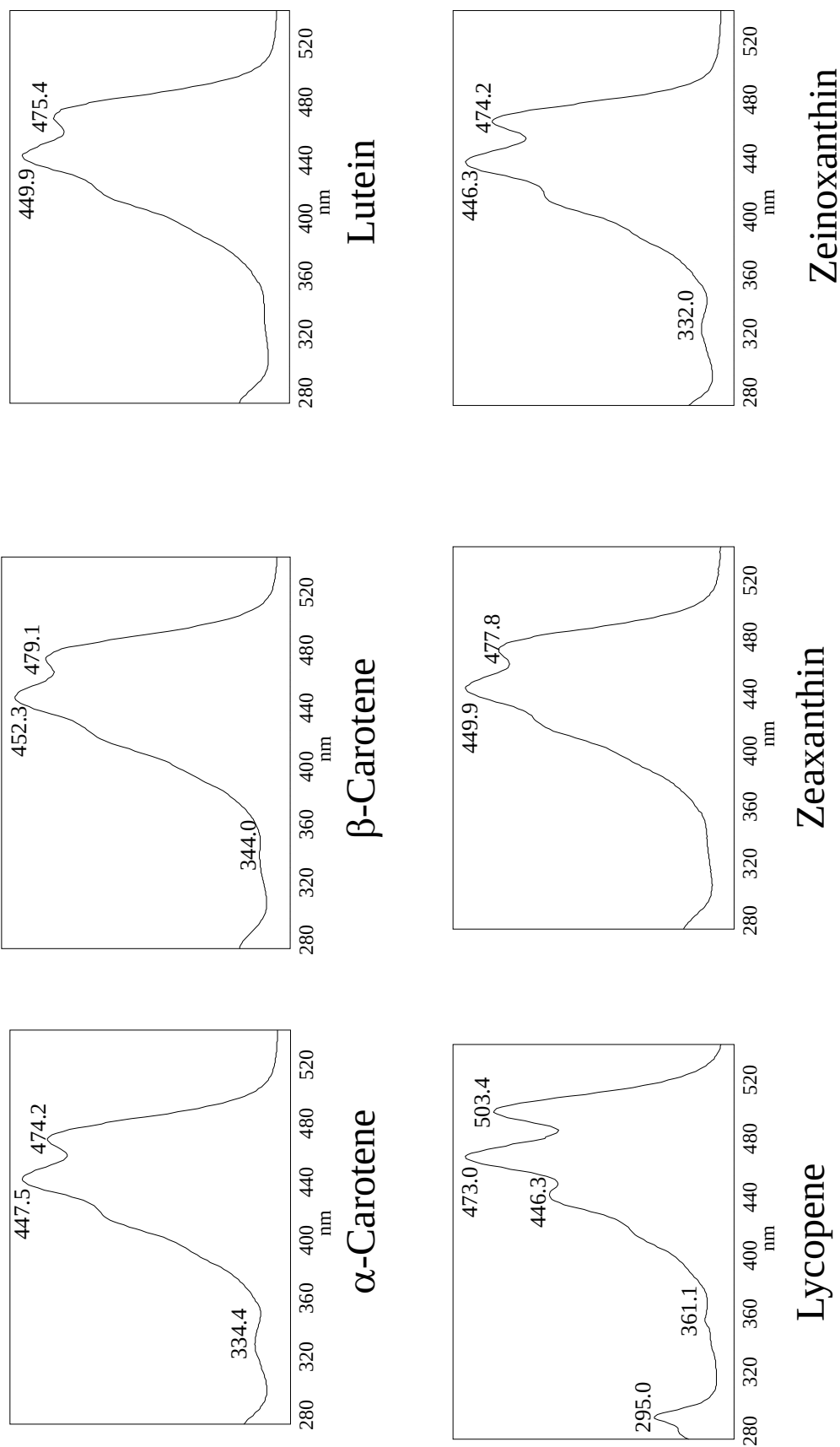


Fig. 2-3-5 Absorption spectrum of carotenoids detected in extracts from transformed *E. coli*.

第三章

P. yezoensis における栄養ストレスに対する

カロテノイド量とカロテノイド合成遺伝子発現量の変化

序論

P. yezoensis はノリの主要な養殖品種として、日本で最も養殖されている水産生物である。ノリは産業的に重要な食品であるが、ノリの養殖地域では藻体の色が薄くなり商品価値が著しく損なわれる現象、いわゆる「色落ち」が問題となっている。

例えば、有明海では 2000 年にノリ養殖が大不作となり、その原因として考えられているのが赤潮による色落ちである。赤潮は栄養塩吸収量の多い *Eucampia zodiacus* や *Coscinodiscus wailesii*、*Rhizosolenia imbricata* などの珪藻が大量発生することにより、ノリの生育に必要な栄養塩が減少することで色落ちを引き起こしたと考えられている[68]。しかしながら、近年は珪藻 *Asteroplanus karianus* による被害が発生するなど[68]、発生原因は完全には解明されていない。

さらに、瀬戸内海では、高度経済成長期に海水が富栄養化したことで赤潮が頻繁に発生したことから、1973 年に瀬戸内海環境保全臨時措置法を制定し、環境改善に努めた。その結果、水質は大きく改善したものの、栄養塩が不足することになり 1990 年代からはノリの色落ちが発生し始めた。そこで近年いわゆる「きれいな海」から「豊かな海」に方針転換がなされ、兵庫県では窒素濃度の下限値をもうけることが検討されるなど[69]、ノリ養殖を含めた水産業に対する対策が進められている。

また、東京湾では窒素塩濃度が比較的高水準であるにもかかわらず色落ちが発生し、リン酸塩濃度が重要であることが示唆されている[70]。

このように色落ちの現状や要因に地域差はあるものの、*P. yezoensis* 退色の生物学的原因は窒素塩などの栄養塩が不足することによるものであると考えられている[68]。*P. yezoensis* の主な色素成分は、クロロフィル a、フィコビリル(フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン)、カロテノイドでありこれら成分の減少が退色を引き起こす。これまでに、栄養塩の不足がクロロフィル a やフィコビリルを減少させることは報告されてきたが[68,71]、カロテノイドに関する報告はほとんどない。カロテノイドは光ストレス防御や光受容体としての役割を持つ光合成生物の生育に重要な成分であるため、光合成色素としてのクロロフィルやフィコビリルの減少とカロテノイドの関係を明らかにすることは、色落ち現象中の生体反応を明らかにするための重要な知見となる。

そこで、第三章では *P. yezoensis* の色落ちとカロテノイド合成の関係を評価するために、栄養欠乏条件下で培養した *P. yezoensis* 中のカロテノイド量の経時変化を測定することで、色落ち現象中におけるカロテノイド量の変化を評価した。さらに、カロテノイド生合成に対する影響を、第二章で発見したカロテノイド合成遺伝子を指標として定量 RT-PCR 法で遺伝子発現量を測定することで、検証した。

第一節

栄養ストレス環境下における *P. yezoensis* のカロテノイド合成

実験方法

3.1.1 試料および試薬

P. yezoensis 糸状体は 1.1.1 と同様に愛知県水産試験場漁業生産研究所より分与された *P. yezoensis* U-51 株の糸状体を用いた。培養には、1.1.1 と同様の試薬を用いた。

3.1.2 *P. yezoensis* の培養

藻体約 5 g を 250 ml フィルターユニット付試薬ビン（柴田科学）に移し、ESL 培地 200 ml を加えた。インキュベータ内で、光量 $40 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、温度 15°C 、長日条件（明期 14 時間・暗期 10 時間）下で、孔径 $0.22 \mu\text{m}$ の滅菌フィルター（Merck Millipore）を介して通気を行った。

ESL 培地で前培養を 1 週間行ったのち、栄養欠損群は初めの 2 週間は ESL 培地中の ESS_2 を添加せずに培養を行い、その後 ESS_2 を加えた通常の培地に戻し 5 週間培養を行った。培地交換はコントロール群、栄養欠損群いずれも 7 日おきに行った。

3.1.3 *P. yezoensis* のサンプリング

コントロール群および栄養欠損群の藻体約 0.3 g を一週間おきに同時刻に回収し、回収した藻体からただちにキムワイプで余分な培地をふき取り 1.5 ml チューブに回収後、液体窒素で急速凍結した。

3.1.4 カロテノイド量の分析

凍結保存した藻体約 0.1 g を試験管に秤量し、約 20 倍量の methanol に一晚浸漬し、methanol 抽出物を回収した。藻体残渣を再度 methanol に浸漬し、2 回抽出を行った。得られた methanol 抽出物を窒素で留去し、chloroform : methanol = 2:1(v/v)を 7.5 ml 加え、攪拌し抽出物を再度溶解させた。その後、蒸留水 1.5 ml を加え攪拌した後、10,000 rpm、10 min で遠心分離し、二層に分け、下層の chloroform 層を別の試験管に回収した。回収した chloroform 層は窒素で溶媒を留去し、総脂質を得た。その後、methanol で再溶解後、1 ml メスフラスコでメスアップし HPLC 分析に供した。

3.1.5 総脂質の HPLC 分析

HPLC 条件および定量は、1-1-4 と同様の方法で行った。

3.1.6 RNA 抽出および cDNA の調製

RNA の抽出は、RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いて 2.2.1 と同様の方法で行った。

3.1.7 DNA の除去

DNA 除去は TURBO DNA-free Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて 2.2.2 と同様の方法で行った。

3.1.8 逆転写反応

逆転写反応は Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)を用いて 2.2.3 と同様の方法で行った。

3.1.9 カロテノイド変換酵素のプライマー設計

カロテノイド変換酵素のプライマーはプライマー設計ソフト Prime3[72]を用いて作成した。

RT-PCR に使用した配列を以下に示した。

Py18S-F	5'-CGACCGTTTACTGTGAAG-3'
Py18S-R	5'-GACAATGAAATACGAATGCC-3'
PyPSY-F	5'-CTTGGCGTTTGCAGGTG-3'
PyPSY-R	5'-AAGACCGCCGACGACTC-3'
PyPDS-F	5'-CGCAACACGGACATGCT-3'
PyPDS-R	5'-ACCCACTCGGACCAGGA-3'
PyCRTISO-F	5'-ACCGTCGCTGACCCTTC-3'
PyCRTISO-R	5'-CGCCTTGAGGGCTTTGT-3'
PyLCY1-F	5'-TAGATGCGGACGCGGTA-3'
PyLCY1-R	5'-GAGCGTGAGCAGGTCCA-3'
PyLCY2-F	5'-TCTTCGCCGCCTTTTTC-3'
PyLCY2-R	5'-CCCGGATGCGGTTAGAG-3'
PyZEP-F	5'-AGCGGTGGCTTCCAGTC-3'
PyZEP-R	5'-GCCCATCAAGGCTGTCC-3'
PyCYP97B-F	5'-GTGTCGGACCCGTCCAT-3'
PyCYP97B-R	5'-TGCAGCCGTTGTTTCGT-3'

プライマーは、RNase free water にて 10 μ M に調製し、使用まで-40°C で冷凍保管した。

3.1.10 RT-PCR

PCR は、ABI PRISM® 7500 を用いて real time RT-PCR 法にて行った。3.1.8

に従い調製した cDNA をそれぞれ RNase free water にて適当な濃度に希釈した。反応試薬として SYBR Premix Ex Tag GC(Perfect Real time) (TaKaRa)を用い、添付の説明書に従い操作した。すなわち Table. 3-1-1 の組成となるように調製した反応液を 96-well Optical Reaction Plate に移し、ABI PRISM® 7500 にて PCR 反応を行った。なお、反応条件は Table. 3-1-2 に示した。反応後 ABI PRISM®7500 添付の使用説明書に従い mRNA の発現量の定量を行った。

3.1.11 統計計算の方法

得られた数値は、その平均値および標準誤差を算出した。統計的検定は、Student の t 検定を用いて行った。その際、有意水準は $P<0.05$ 、 $P<0.01$ とした。

結果と考察

本章では、簡易的な色落ちモデルとして、人工海水中に添加する栄養塩を総合的に欠如させることで *P. yezoensis* の色落ちを誘導した。

実験に先立ち、色落ちの培養条件を検討したところ、遮光あるいは弱光条件下では本研究と同様に栄養を欠如させているにもかかわらず、ほとんど色落ちが発生しなかった(データ未掲載)。このことから、色落ちの発生には栄養塩の欠如に加え光ストレスが重要な要因であると考え、光防御能をもつカロテノイドと色落ちの関係を評価した。

結果として、栄養塩欠如培地で培養を行った *P. yezoensis* は光照射 $40 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ での培養 2 週目にはコントロールの藻体と比較し、明確な退色を示した(Fig. 3-1-1)。さらに、3 週目から栄養塩を添加して培養したところ、5 週目には色調が概ね回復した。このことから、*P. yezoensis* は光量 $40 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下の栄養塩欠如により色落ちと同様の色調変化を示すことが明らかになった。また、その色調変化は不可逆的な藻体の死滅ではなく、可逆的な状態変化であることが確認された。

培養期間中のカロテノイド含有量を評価したところ、培養期間中にコントロール群のカロテノイド量が減少した(Fig. 3-1-2)。その原因として、培養バッグから試薬ビンに培養条件を変更したことによる藻体密度の変化や、光量の変化が考えられる。このような環境要因の影響を排除するため前培養を 1 週間行ったが不十分であった可能性がある。

しかしながら栄養塩欠乏で培養中(Starved)、2 週目で栄養塩欠乏群のカロテノイド量は α -carotene と zeaxanthin で増加し、lutein と β -carotene においても

コントロール群と比較して相対的に増加した(Fig. 3-1-2)。さらに回復期(Recovery)ではいずれのカロテノイドもコントロール群と同程度まで減少した。

このことは、色落ちの進行に対して、コントロール群と比較してカロテノイド量が増加したことを示しており、さらに、色落ちの回復とともにカロテノイド量がコントロール群と同程度まで低下したことを示している。

このような色落ちによるカロテノイド量増加の詳細なメカニズムを検証するため、カロテノイド合成酵素の遺伝子発現量を測定したところ、カロテノイド量と同様に、色落ちによるカロテノイド合成酵素の遺伝子発現量の増加と、回復期の低下が認められた(Fig. 3-1-3)。

以上の結果から、栄養塩の欠如は、*P. yezoensis* のカロテノイド合成を促進することが明らかになった。

栄養塩欠如による色調変化の研究はシアノバクテリアで古くからおこなわれている[73,74]。シアノバクテリアは体内のタンパク質の約 40%が色素タンパク質であるフィコビリタンパク質であり、栄養塩欠乏時に分解することで、不足した栄養素を補うことが示唆されている[73,74]。紅藻もシアノバクテリアと同様にフィコビリタンパク質を蓄積しているため、紅藻においても同様に栄養を補填する目的でフィコビリタンパク質を分解するために、色落ちが発生することが示唆されている[74,75]。

一方で、フィコビリタンパク質はチラコイド膜上でフィコビリソームと呼ばれる構造体を形成し、光合成においてクロロフィルに光エネルギーを受け渡す光捕集機能を持つと考えられている。紅藻は海藻では最も深くまで生息できる海藻であるが、それは名前の通り赤色の光捕集色素(フィコビリタンパク質の一種であるフィコエリスリン)を有することで、深海まで減衰しづらい青色や緑色の光エネルギーを吸収できるためであると考えられている。このように優れた

光補修能を持つ一方で、光防御能は他の光合成生物と比べて脆弱である。すなわち、緑色植物のようにキサントフィルサイクルを持たず、シアノバクテリアのように過剰な光ストレスから防御する orange carotenoid protein(OCP)をもたない[76]。これまでに中温域の紅藻では、フィコビリソームの構造を変化(mobility)させることで光合成制御を行うことが示唆されているが[77]、紅藻における過剰な光ストレスに対する防御機構の詳細は明らかになっていない。

本研究で、色落ちに伴いカロテノイドが増加したメカニズムとして、カロテノイドによる光ストレス防御機構である可能性が考えられる。実際に、緑藻である *Dunaliella salina* では窒素を欠乏させることでカロテノイド量の増加とカロテノイド合成遺伝子の発現量上昇や[78,79]、酸化ストレスに対するカロテノイドの防御能が報告されている[80]。これらのことから紅藻においても窒素減少に伴うカロテノイド増加について、同様のメカニズムを持つ可能性が考えられる。

Table. 3-1-1 Composition of real time PCR reaction mixture

Reagent	Volume(μl)
TB Green premix Ex Taq GC(2 ×)	10
PCR forward primer(10 mM)	0.4
PCR reverse primer(10 mM)	0.4
ROX reference dye II(50 ×)	2
cDNA template	2
Water	6.8
Total	20

Table. 3-1-2 Reactive condition for PCR

Step	Holding stage	Cycling stage			Melt curve stage		
Temperature	95° C	95° C	60° C	95° C	80° C	95° C	
Time	30 sec	5 sec	34 sec	15 sec	60 sec	15 sec	

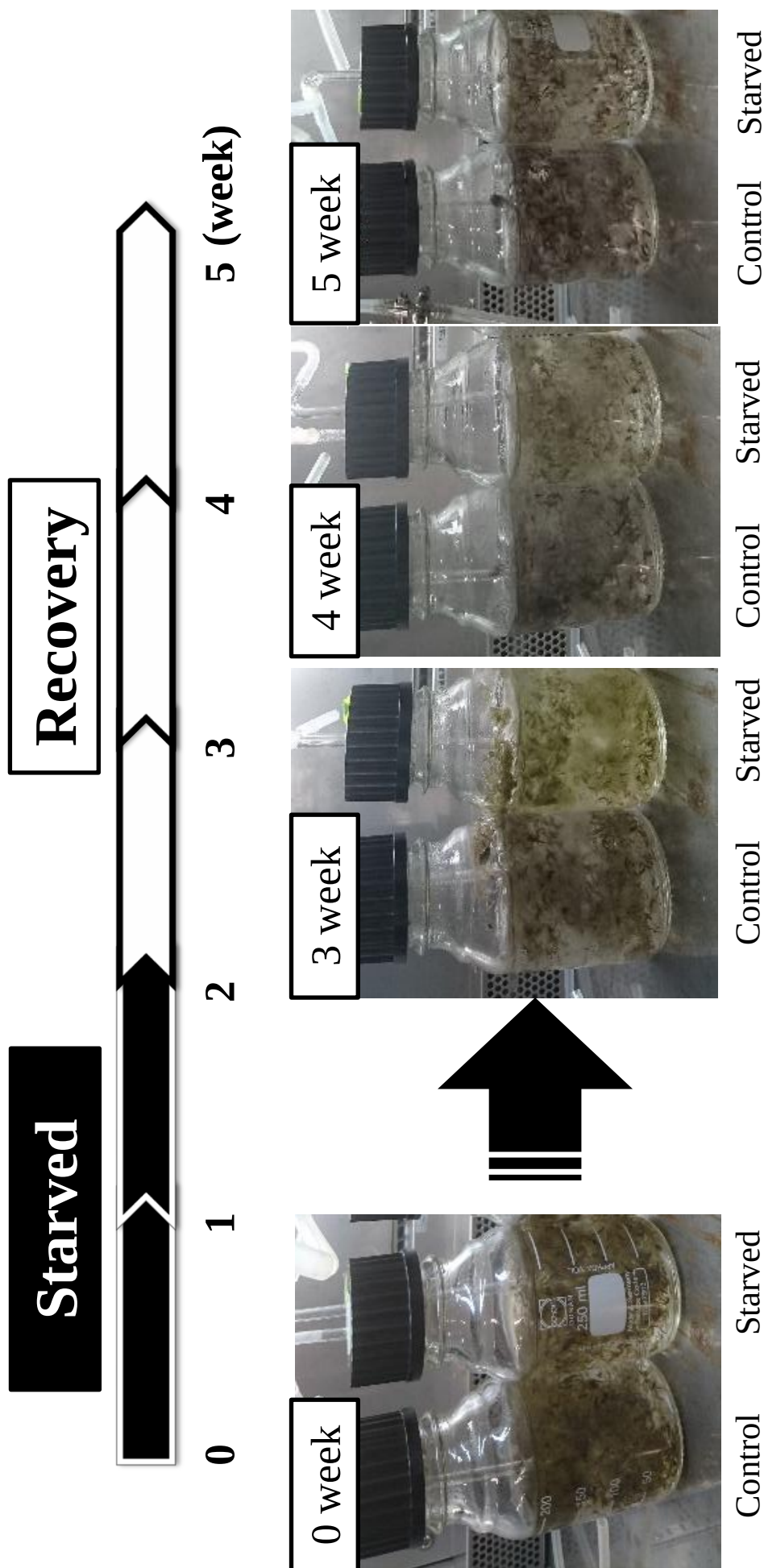


Fig. 3-1-1 Effect of medium nutrition on color fading of conchocelis of *Pyropia yezoensis*. Starved group algae was treated with nutrition starved(without ESS₂) medium for 2 weeks and recovered with control medium for 3 weeks.

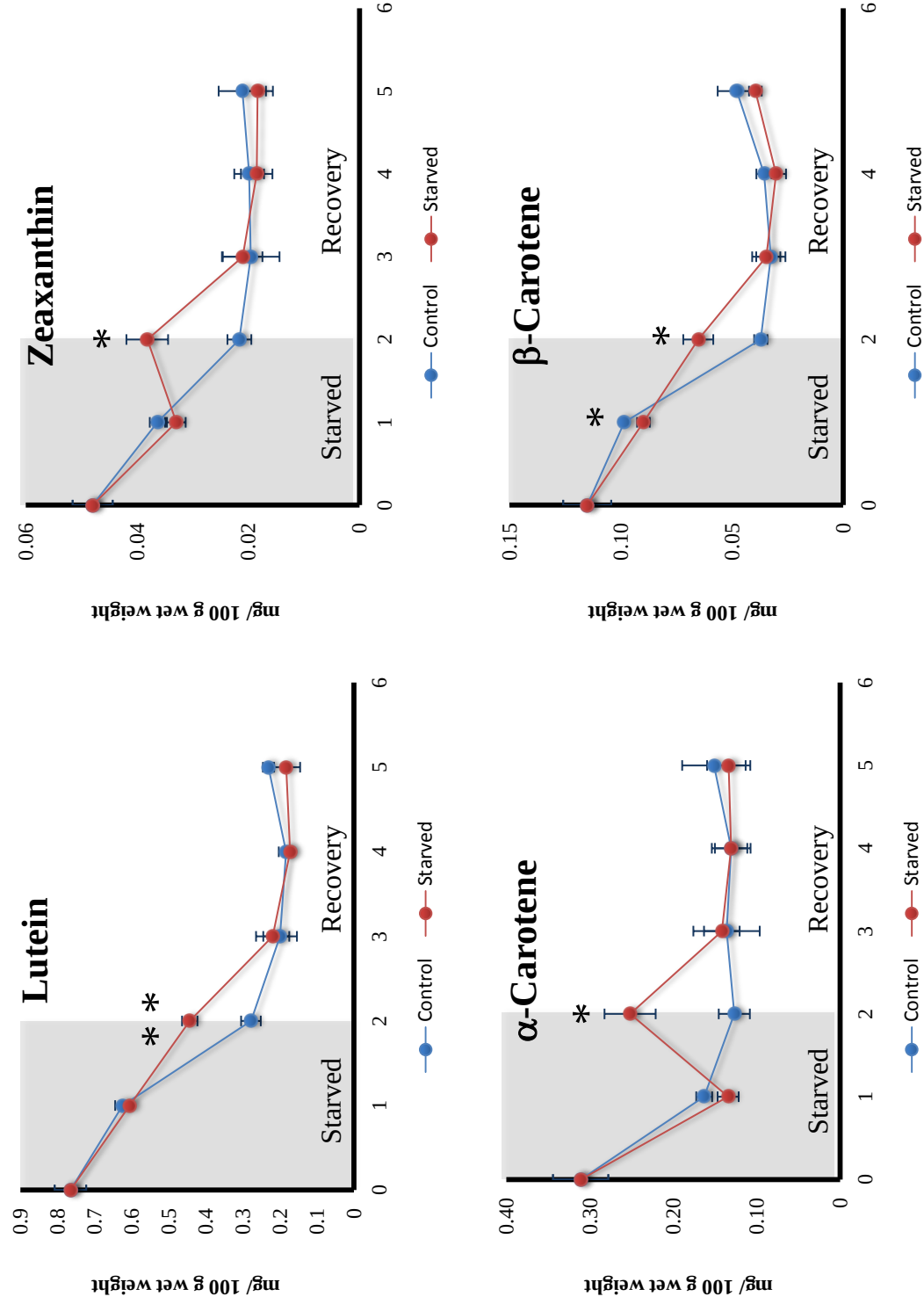


Fig. 3-1-2 Effect of medium nutrition on carotenoid biosynthetic enzyme gene expression in *Pyropia yezoensis*. N- group was treated with nutrition starved(without ESS₂) medium for 2 weeks and recovered with control medium for 3 weeks. The gene expressions were measured by RT-PCR. Values are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=3), * : P<0.01 vs Control, ** : P<0.05 vs Control

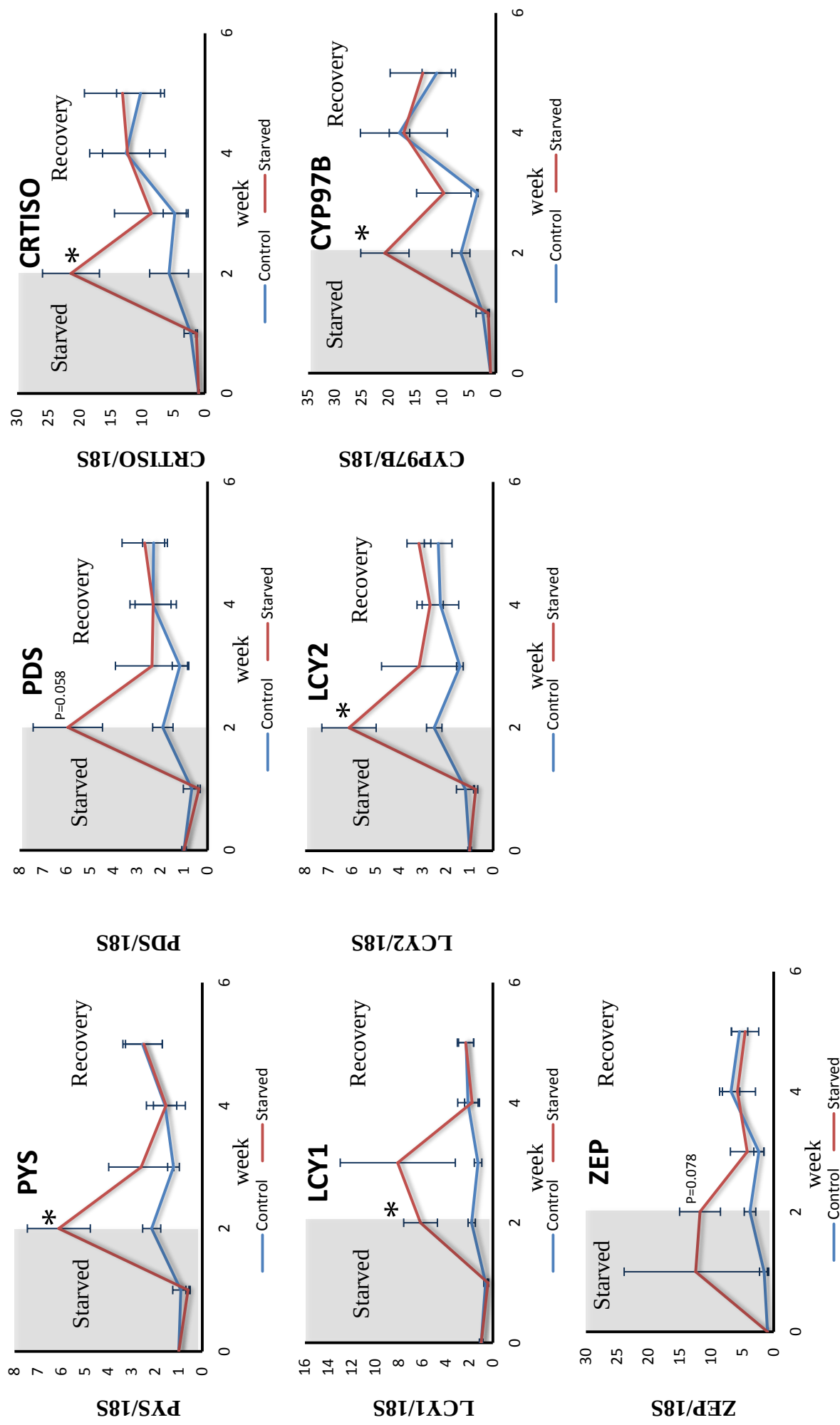


Fig. 3-1-3 Effect of medium nutrition on carotenoid biosynthetic enzyme gene expression in *Pyropia yezoensis*. N- group was treated with nutrition starved(without ESS₂) medium for 2 weeks and recovered with control medium for 3 weeks. The gene expressions were measured by RT-PCR. Values are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=3), *: P<0.05 vs Control

総合考察

P. yezoensis は、日本で最も養殖されている水産物であると同時に、実験室レベルで培養可能であり、ゲノム情報が整備されている点から近年紅藻のモデルとしても注目されている。本研究では、紅藻 *P. yezoensis* のカロテノイド合成経路について、中間代謝物の同定および変換酵素の探索、酵素機能解析の両視点から検討を行い、これまで部分的にしか明らかにされていない紅藻のカロテノイド合成経路の解明をはかるものである。

カロテノイド合成経路の特徴として lycopene からの環化において、 β 、 ϵ 環が形成されることやヒドロキシル基がどのような構造に特異的に導入されるかなどを考察する必要がある、その解明には中間代謝物の同定が不可欠である。*P. yezoensis* のカロテノイドについては、これまでに含有量の多い α -/ β -carotene、lutein、zeaxanthin のみが報告されていた[20]。第一章では、*P. yezoensis* のカロテノイド組成について詳細な分析を行い、*P. yezoensis* の lutein 合成経路は zeinoxanthin を介する経路と α -cryptoxanthin を介する2つの経路があることを明らかにした。さらに、高極性画分のカロテノイドを詳細に検証した結果、従来 lutein、zeaxanthin までしか見つかっていなかった *P. yezoensis* カロテノイド合成経路において、新たな代謝物としてエポキシ基を持つ lutein-5,6-epoxide と antheraxanthin を同定した。

第二章では、カロテノイド生合成経路の変換酵素の探索を行った。まず、*P. yezoensis* についてこれまでに明らかになっている他生物の遺伝情報から、複数の変換酵素の遺伝子の探索を行った。その結果、生物間で比較的酵素が共通している lycopene までの合成酵素と LCY、carotene hydroxylase、ZEP の遺伝子が見つかった。一方で、 ζ -carotene desaturase の遺伝子が発見できず、CRTISO

と LCY2 の遺伝子に関しては部分配列しか見つからなかった。*P. yezoensis* は GC 含量が高く全配列を解読することは困難であるため、中央水産研究所の報告でも全ゲノムの解読はできていない[29]。ζ-Carotene desaturase 遺伝子については他の紅藻では見つかっている (*Gracilariopsis chorda* (GenBank: PXF43369.1) 、 *Chondrus crispus* (NCBI Reference Sequence: XP_005712997.1))ことから、未解読部分に存在することが考えられる。

また、Dautermann and Lohr[81]は、紅藻の一種である *Madagascaria erythrocladioides* の ZEP 遺伝子について、ZEP 欠損タバコに導入した結果、antheraxanthin の蓄積を確認した。その報告のなかで、*P. yezoensis* ZEP は *M. erythrocladioides* ZEP と配列が大きく異なり、さらには *P. yezoensis* がエポキシ基を持つカロテノイドを蓄積しないこと、葉緑体移行ペプチドを欠損していることから *P. yezoensis* ZEP は酵素活性を持たないことを示唆している。しかしながら、これまでの研究において violaxanthin 代謝物である abscisic acid が *P. yezoensis* から見つかっていること[31]に加え、本研究において *P. yezoensis* から antheraxanthin、lutein-5,6-epoxide が同定されたことは、*P. yezoensis* の ZEP が epoxydase 活性を持つことを支持する結果となった。このような違いの要因として、分析手法の違いによる影響が考えられる。前者は主に HPLC の 447 nm による検出がなされていた[82]。一方、本研究では LC/MS を用いた高感度精密分析を行った。実際本研究においても、総脂質による分析では十分な検出が困難であったのに対し、高極性画分を分画、濃縮して分析することで同定に至った。

次に、検討した CYP97 はシトクローム P450 タイプの酵素で、ヘム鉄を含有する carotene hydroxylase である。陸上植物と緑藻は CYP97A、CYP97B、CYP97C に加えて BHY を持ち、生合成経路における各酵素が明らかになって

いる。一方で紅藻はこれまでに数種のゲノム情報が明らかになっているが、CrtR を持つ *Cyanidioschyzon merolae* と *Galdieria sulphuraria* (NCBI Reference Sequence: YP_009051169.1)を除けば *P. yezoensis* を含めたすべての紅藻で CYP97B のみが見つかっている。第一章で明らかになった通り、*P. yezoensis* の lutein の合成経路は2経路あり、 β -ring carotene hydroxylase と ϵ -ring carotene hydroxylase の両方の活性が必要であるにもかかわらず、単一の CYP97B しか見つかっていない。よって、CYP97B は β -/ ϵ -ring carotene hydroxylase の両方の活性を持つ可能性が示唆された。

本研究では、大腸菌を用いて PyCYP97B の酵素機能解析を行った結果、 ϵ -ring carotene hydroxylase 活性が明らかになった。これまでに、CYP97B は様々な植物からホモログが報告されているが、植物では β -ring carotene hydroxylase 活性を含めて、これまでに CYP97B の酵素活性が明らかになった例はない[44]。一方で、近年になって、藻類では *Po. umbilicalis* と珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* で CYP97B の β -ring carotene hydroxylase 活性が明らかになっている[39,40]。しかしながら、CYP97B の ϵ -ring carotene hydroxylase 活性が機能解析された報告はなく、本研究で初めて CYP97B の ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を見出した。さらに、詳細な検討を行うためにコドンの最適化および葉緑体移行シグナル除去を行ったインサートで大腸菌に形質導入し、活性評価を行ったところ、わずかではあるが zeaxanthin が検出された。このことは CYP97B が β -ring carotene hydroxylase 活性を併せ持つことを示している。*Po. umbilicalis* の報告では大腸菌による活性評価で、 β -ring carotene hydroxylase 活性が認められた一方で、 ϵ -ring carotene hydroxylase 活性は認められなかった。この *P. yezoensis* と *Po. umbilicalis* の違いは、藻体内に蓄積するカロテノイド組成に関連するものかもしれない。すなわち、*P. yezoensis* は、

α -carotene タイプのカロテノイド (lutein、 α -carotene)が全カロテノイドの約 80%を占める[19]。その一方で、*Po. umbilicalis* では約 45%であり、 β -carotene タイプのカロテノイド (β -carotene、zeaxanthin)を約 55%蓄積する[39]。以上のことから、*P. yezoensis* は比較的多く蓄積している lutein を合成するために ϵ -ring carotene hydroxylase 活性が高く、*Po. umbilicalis* は β -carotene タイプのカロテノイドを効率よく変換するため β -ring carotene hydroxylase 活性が強い可能性が考えられる。

また、本研究では *Marchantia polymorpha* の CYP97C[44]と同様に、 α -carotene から α -cryptoxanthin、zeinoxanthin に変換する反応は認められなかった。その要因として、大腸菌による評価の実験系による可能性と未発見の酵素が存在する可能性がある。評価系については本研究でコドンを最適化することで活性が強くなったことや葉緑体移行シグナルを除去することで新たな活性が認められたことから、藻体内では大腸菌の評価系では認められない活性が存在することが考えられる。一方、未発見の酵素については、上記の相同性解析で示した通り *P. yezoensis* のゲノムは完全に解読されていないことから、相同性解析で検出されなかった可能性と、原核生物では異なる β -ring carotene hydroxylase が見つかっていることから[83]、植物の β -ring carotene hydroxylase と異なるタイプの遺伝子が存在する可能性がある。

紅藻の分類は近年の分子系統学的分類により、Cyanidiophytina (イデユコゴメ亜門)をはじめに分岐した別の亜門とし、残りを Eurhodophytina (真正紅藻亜門)と Proteorhodophytina (原始紅藻亜門)に分けることが提唱されている[22-24]。その際に、Eurhodophytina に近縁である Bangiophyceae (ウシケノリ綱)は従来の原始紅藻(亜)綱から Eurhodophytina に移された。このような分子系統学的分類に則り、紅藻のカロテノイド組成を比較すると、まず、

Cyanidiophytina および Proteorhodophytina は β -carotene タイプであり、Eurhodophytina は多くが α - β -carotene タイプである[20]。さらにカロテノイド合成酵素に着目すると Cyanidiophytina の紅藻はシアノバクテリアの持つ carotene hydroxylase(CrtR)を持つが、Proteorhodophytina と Eurhodophytina の紅藻は CYP97B を持つ点で共通している。

紅藻の Cyanidiophytina が BHY の由来と考えられる CrtR を持つことは興味深い。Cyanidiophytina を除く紅藻と緑色植物が CYP97B を持ち、緑色植物が BHY を持つことから、緑色植物と紅藻の共通祖先は CYP97B と CrtR(BHY)の両方を持つことが推測される。緑色植物が CrtR(BHY)と CYP97B の両方を保存し、Cyanidiophytina が CrtR を選択し、その他紅藻が CYP97B を選択した理由は不明であるが、Cyanidiophytina は温泉藻と呼ばれ高温酸性に生息すること、その他紅藻は深海まで生息できる種も多いことから光強度や温度により保存する遺伝子を選択した可能性が考えられる。紅藻の進化の過程と陸上植物や緑藻では CYP97B の酵素機能が認められていないことから考えられる仮説として、初期の CYP97B は酵素機能を持たず陸上植物と緑藻に保存され、次に Proteorhodophytina で β -ring carotene hydroxylase 活性を獲得し、次に Eurhodophytina で ϵ -ring carotene hydroxylase 活性を併せ持ったのかもしれない。今後、紅藻のゲノム情報の解明が進み、未検討の CYP97B の機能解析が進むことで紅藻の carotene hydroxylase の進化が明らかになることが期待される。

第三章では、ノリ養殖で長年問題となっている色落ちとカロテノイドの関連性について検証を行った。色落ちは、窒素やリンなどの栄養塩が不足することにより発生すると考えられている。色落ち発生のメカニズムは、従来は富栄養化により発生した赤潮が海水栄養を大量に消費することにより引き起こされて

いたが[64]、近年は水質改善による貧栄養化が原因の色落ちが増えてきている。そのため、これまでに栄養塩供給による色落ちの改善研究などが行われており[84]、実際に下水処理水の窒素濃度を高める運転を試行したり[85]、下限を設定することが検討されている[69]。

本研究では *P. yezoensis* を培養し、栄養塩ストレスを与えることで、近年問題となっている *P. yezoensis* の色落ちを再現し、実際に色調の減衰を確認した。色落ちした *P. yezoensis* 藻体中のカロテノイド量とカロテノイド合成遺伝子発現量を測定した結果、カロテノイドの増加と遺伝子発現量の増加が明らかになった。窒素欠乏によるカロテノイド量の増加は緑藻でも報告されており[78,79]、光ストレスに対する防御機構であることが示唆されていることから、紅藻においても光ストレスに対する防御機構として機能している可能性がある。

カロテノイドの研究は、1831 年ドイツの Wackenroder がニンジン果汁に対してエーテル抽出を行い、赤い結晶を得たことに端を発する。Wackenroder[86]はこの赤い結晶をニンジン (carrot) にちなみカロテン (carotin) と名付けた。その後、1837 年に紅葉から抽出された黄色成分が発見され、キサントフィル (xantho:黄色+phyll:葉)と名称がつけられると、1911 年からはカロテンとキサントフィルを合わせてカロテノイド (carotene -oid) と呼ばれるようになった。現在では、カロテンは炭素と水素のみで構成されたカロテノイドを示し、酸素が結合したカロテノイドをキサントフィルと呼び区別している。

生物にとってカロテノイドは、単に色調を与えるだけでなく光合成における光捕集、光防御機能といった成長に重要な成分であることはすでに述べた。また、近年カロテノイドの多様な生理機能が報告されており、lutein、zeaxanthin の加齢黄斑変性に対する改善機能[87]、astaxanthin、lycopene の抗酸化作用

[88,89]、fucoxanthin の抗肥満作用[18]などが報告されており、機能性食品や化粧品としての利用が拡大している。さらに、カロテノイドは一次産業でも魚養殖や養鶏卵の色上げ剤として使われており、食品産業においては、 β -carotene、アナトー色素 (bixin)、マリーゴールド色素 (lutein)、パプリカ色素 (capsanthin、capsorubin) など着色料として多用されている。

このような産業における高い需要に対して、カロテノイドは β -carotene、canthaxanthin、astaxanthin などの主に動物飼料向けの需要の高い種類は化学合成で生産される。一方、それ以外のカロテノイドは天然物から抽出されるため、品種、生育条件による含有量の増加などの研究がおこなわれている。このような、カロテノイド生産にむけた研究において合成経路の探索は重要な役割を果たす。すなわち、合成経路における中間代謝物の含有量や合成遺伝子の発現量を把握することは、原料生物の合成経路の活性化の有用な指標となる。さらに近年、希少なカロテノイドあるいは新規のカロテノイドを遺伝子工学的手法で生産する手法が注目を集めている。本研究で得られた *P. yezoensis* カロテノイド合成経路に関する中間代謝物および遺伝子情報は、紅藻を含めた光合成生物の進化におけるカロテノイド合成経路の進化の解明に寄与するとともに、カロテノイド合成産業に有益な情報となることを期待する。

参考文献

1. VALMALETTE, Jean Christophe, et al. Light-induced electron transfer and ATP synthesis in a carotene synthesizing insect. *Scientific Reports*, 2012, 2: 579.
2. MIMURO, M.; KATOH, T. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. *Pure and Applied Chemistry*, 1991, 63.1: 123-130.
3. BALTSCHUN, Dietmar, et al. Singlet oxygen quenching abilities of carotenoids. *Liebigs Annalen*, 1997, 1997.9: 1887-1893.
4. CONN, Pauline F.; SCHALCH, Wolfgang; TRUSCOTT, T. George. The singlet oxygen and carotenoid interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1991, 11.1: 41-47.
5. DI MASCIIO, Paolo; KAISER, Stephan; SIES, Helmut. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 274.2: 532-538.
6. SCIMIDT, R. Deactivation of singlet oxygen by carotenoids: internal conversion of excited encounter complexes, *Journal of Physics Chemistry*, 2004, 108: 5509-5513.
7. LEONELLI, Lauriebeth; BROOKS, Matthew D.; NIYOGI, Krishna K. Engineering the lutein epoxide cycle into *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114.33: E7002-E7008.
8. JIA, Husen, et al. Decreased photochemical efficiency of photosystem II

- following sunlight exposure of shade-grown leaves of avocado: because of, or in spite of, two kinetically distinct xanthophyll cycles?. *Plant Physiology*, 2013, 161.2: 836-852.
9. LATOWSKI, Dariusz; KUCZYŃSKA, Paulina; STRZAŁKA, Kazimierz. Xanthophyll cycle—a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report*, 2011, 16.2: 78-90.
 10. CAZZONELLI, Christopher I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 2011, 38.11: 833-847.
 11. CASTENMILLER, Jacqueline JM; WEST, Clive E. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 1998, 18.1: 19-38.
 12. JOHNSON, Elizabeth J. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care*, 2002, 5.2: 56-65.
 13. FERNÁNDEZ-SEVILLA, José M.; FERNÁNDEZ, FG Acien; GRIMA, E. Molina. Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86.1: 27-40.
 14. EGGERSDORFER, Manfred; WYSS, Adrian. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 652: 18-26.
 15. HIRSCHBERG, Joseph. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4.3: 210-218.
 16. CUNNINGHAM, Francis X.; GANTT, Elisabeth. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ϵ -cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98.5: 2905-2910.

17. OHMIYA, Akemi, et al. Molecular basis of carotenoid accumulation in horticultural crops. *The Horticulture Journal*, 2019, UTD-R003.
18. MIKAMI, Koji; HOSOKAWA, Masashi. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14.7: 13763-13781.
19. TAKAICHI, Shinichi. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 2011, 9.6: 1101-1118.
20. TAKAICHI, Shinichi, et al. Carotenogenesis diversification in phylogenetic lineages of Rhodophyta. *Journal of Phycology*, 2016, 52.3: 329-338.
21. BURKI, Fabien, et al. The new tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 2019.
22. ADL, Sina M., et al. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2019, 66.1: 4-119.
23. QIU, Huan; YOON, Hwan Su; BHATTACHARYA, Debashish. Red algal phylogenomics provides a robust framework for inferring evolution of key metabolic pathways. *PLoS Currents*, 2016, 8.
24. MUÑOZ-GÓMEZ, Sergio A., et al. The new red algal subphylum Proteorhodophytina comprises the largest and most divergent plastid genomes known. *Current Biology*, 2017, 27.11: 1677-1684. e4.
25. 日本水産資源保護協会(鬼頭鈞 監修) のり(海苔) : わが国の水産業 2004 (<http://www.fish-jfrca.jp/02/book.html>)
26. DREW, Kathleen M. Conchocelis-phase in the life-history of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. *Nature*, 1949, 164.4174: 748-749.

27. E-Stat, Portal Site of Official Statistics of Japan. Available online: <https://www.e-stat.go.jp/> (accessed on 2 February 2020).
28. 梶原忠彦 海藻香気成分. 堀輝三・大野正夫・堀口健雄編「21 世紀初頭の藻学の現況」, 日本藻類学会, 山形, 2002. p. 132-135.
29. NAKAMURA, Yoji, et al. The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, Susabi-nori (*Pyropia yezoensis*). *PloS One*, 2013, 8.3: e57122.
30. SUN, Peipei, et al. Comparative transcriptome profiling of *Pyropia yezoensis* (Ueda) MS Hwang & HG Choi in response to temperature stresses. *BMC Genomics*, 2015, 16.1: 463.
31. MIKAMI, Koji, et al. Comprehensive quantification and genome survey reveal the presence of novel phytohormone action modes in red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28.4: 2539-2548.
32. 高市真一 「光合成細菌、シアノバクテリア、藻類、植物における多様なカロテノイド分子種と生合成経路の分布」, 植物科学最前線, 2018. p. 63-71 (<http://bsj.or.jp/jpn/general/bsj-review/archive.php>)
33. MARESCA, Julia A., et al. Identification of a fourth family of lycopene cyclases in photosynthetic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104.28: 11784-11789.
34. BAK, Søren, et al. Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 2011, 9.
35. KIM, Joonyul; DELLAPENNA, Dean. Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid β -ring hydroxylase CYP97A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103.9:

- 3474-3479.
36. TIAN, Li, et al. The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid ϵ -ring hydroxylation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101.1: 402-407.
 37. QUINLAN, Rena F.; JARADAT, Tahhan T.; WURTZEL, Eleanore T. *Escherichia coli* as a platform for functional expression of plant P450 carotene hydroxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 458.2: 146-157.
 38. CUI, Hongli, et al. Evolutionary origins, molecular cloning and expression of carotenoid hydroxylases in eukaryotic photosynthetic algae. *BMC Genomics*, 2013, 14.1: 457.
 39. YANG, Li - En, et al. The P450 - type carotene hydroxylase PuCHY1 from *Porphyra* suggests the evolution of carotenoid metabolism in red algae. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56.9: 902-915.
 40. CUI, Hongli, et al. Cloning, identification and functional characterization of two cytochrome P450 carotenoids hydroxylases from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128.6: 755-765.
 41. YAMANO, Yumiko; ITO, Masayoshi. Total synthesis of capsanthin and capsorubin using Lewis acid-promoted regio-and stereoselective rearrangement of tetrasubstituted epoxides. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007, 5.19: 3207-3212.
 42. BJØRNLAND, Terje; BORCH, Gunner; LIAAEN-JENSEN, Synnøve.

- Configurational studies on red algae carotenoids. *Phytochemistry*, 1984, 23.8: 1711-1715.
43. HEGAZI, Muhammad M., et al. Separation and identification of chlorophylls and carotenoids from *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* and *Padina pavonica* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, 829.1-2: 153-159.
 44. TAKEMURA, Miho; MAOKA, Takashi; MISAWA, Norihiko. Biosynthetic routes of hydroxylated carotenoids (xanthophylls) in *Marchantia polymorpha*, and production of novel and rare xanthophylls through pathway engineering in *Escherichia coli*. *Planta*, 2015, 241.3: 699-710.
 45. FROMMOLT, Ruth, et al. Ancient recruitment by chromists of green algal genes encoding enzymes for carotenoid biosynthesis. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25.12: 2653-2667.
 46. BRAWLEY, Susan H., et al. Insights into the red algae and eukaryotic evolution from the genome of *Porphyra umbilicalis* (Bangiophyceae, Rhodophyta). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114.31: E6361-E6370.
 47. BHATTACHARYA, Debashish, et al. Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nature Communications*, 2013, 4: 1941.
 48. SCHÖNKNECHT, Gerald, et al. Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science*, 2013, 339.6124: 1207-1210.
 49. QUINLAN, Rena F.; JARADAT, Tahhan T.; WURTZEL, Eleanore T. *Escherichia coli* as a platform for functional expression of plant P450 carotene

- hydroxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 458.2: 146-157.
50. LI, Qunrui, et al. Cloning and functional characterization of the maize carotenoid isomerase and β -carotene hydroxylase genes and their regulation during endosperm maturation. *Transgenic Research*, 2010, 19.6: 1053-1068.
 51. TIAN, Li, et al. The *Arabidopsis* LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid ϵ -ring hydroxylation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101.1: 402-407.
 52. MISAWA, Norihiko, et al. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172.12: 6704-6712.
 53. KAJIWARA, Susumu, et al. Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli*. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29.2: 343-352.
 54. CUNNINGHAM, Francis X., et al. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of β - carotene. *FEBS Letters*, 1993, 328.1-2: 130-138.
 55. HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999: 41: 95-98. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596-1599.
 56. ANDERSSON, Markus, et al. Different patterns of carotenoid composition

- and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Marine Biology*, 2006, 149.3: 653-665.
57. MARQUARDT, Jürgen; HANELT, Dieter. Carotenoid composition of *Delesseria lancifolia* and other marine red algae from polar and temperate habitats. *European Journal of Phycology*, 2004, 39.3: 285-292.
58. MISAWA, Norihiko, et al. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177.22: 6575-6584.
59. TAKEMURA, Miho; MAOKA, Takashi; MISAWA, Norihiko. Carotenoid analysis of a liverwort *Marchantia polymorpha* and functional identification of its lycopene β - and ϵ -cyclase genes. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 55.1: 194-200.
60. BRITTON, George; LIAAEN-JENSEN, Synnove; PFANDER, Hanspeter (ed.). *Carotenoids: Handbook*. Birkhäuser, 2012.
61. *Escherichia coli* genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/167>)
62. MALOY, Stanley R., et al. Genetic analysis of pathogenic bacteria: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*, 1996.
63. BURGESS-BROWN, Nicola A., et al. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expression and Purification*, 2008, 59.1: 94-102
64. KANE, James F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6.5: 494-500.

65. PRESNYAK, Vladimir, et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, 2015, 160.6: 1111-1124.
66. CUNNINGHAM, Francis X.; LEE, Hansel; GANTT, Elisabeth. Carotenoid biosynthesis in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6.3: 533-545.
67. DENG, Yin-Yin, et al. Functional Characterization of Lycopene Cyclases Illustrates the Metabolic Pathway towards Lutein in Red Algal Seaweeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68.5. 1354-1363.
68. 環境省：有明海全体に係る問題点と原因・要因の考察 (<https://www.env.go.jp/council/20ari-yatsu/y202-12b/03-8.pdf>)
69. 兵庫県(ひょうごの環境):豊かで美しい瀬戸内海の再生のための兵庫県水質目標値(下限値)の設定(案) (<https://www.kankyo.pref.hyogo.lg.jp/files/3915/6464/3329/190806.pdf>)
70. 植木知佳 紅藻スサビノリの光合成色素と葉緑体微細構造における栄養欠乏応答. 日本水産学会誌, 2010, 76.3: 375-382.
71. ISHII, M.; HASEGAWA, K.; MATSUYAMA, Y. Environmental factors influencing *Porphyra* (Nori) farming in Tokyo Bay [Japan]: Long-term changes in inorganic nutrients and recent proliferation of diatoms. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography (Japan)*, 2008.
72. UNTERGRASSER, A., et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (15): e115.
73. KUMAR SAHA, Sushanta; UMA, Lakshmanan; SUBRAMANIAN, Gopalakrishnan. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. *FEMS Microbiology Ecology*,

- 2003, 45.3: 263-272.
74. ALLEN, Mary Mennes; SMITH, Arnold J. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archiv für Mikrobiologie*, 1969, 69.2: 114-120.
 75. LEVY, I.; GANTT, E. Development of photosynthetic activity in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) following nitrogen starvation. *Journal of Phycology*; (USA), 1990, 26.1.
 76. GREEN, Beverley R. What Happened to the Phycobilisome?. *Biomolecules*, 2019, 9.11: 748.
 77. KAŇA, Radek, et al. Phycobilisome mobility and its role in the regulation of light harvesting in red algae. *Plant Physiology*, 2014, 165.4: 1618-1631.
 78. COESEL, Sacha Nicole, et al. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for *Psy* and *Pds* steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Marine Biotechnology*, 2008, 10.5: 602.
 79. SÁNCHEZ-ESTUDILLO, Leticia, et al. Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters*, 2006, 28.11: 787-791.
 80. SALGUERO, Alonso, et al. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering*, 2003, 20.4-6: 249-253.
 81. DAUTERMANN, Oliver; LOHR, Martin. A functional zeaxanthin epoxidase from red algae shedding light on the evolution of light - harvesting carotenoids and the xanthophyll cycle in photosynthetic eukaryotes. *The Plant Journal*, 2017, 92.5: 879-891.

82. SCHUBERT, Nadine; GARCÍA - MENDOZA, Ernesto; PACHECO - RUIZ, Isai. Carotenoid composition of marine red algae 1. *Journal of Phycology*, 2006, 42.6: 1208-1216.
83. MISAWA, Norihiko, et al. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177.22: 6575-6584.
84. ノリ、ワカメ養殖場における栄養塩供給技術実証試験事例集 (<https://www.jfa.maff.go.jp/j/koho/pr/pamph/attach/pdf/index-6.pdf>)
85. きれいで豊かな海の確保に向けた下水道の取組について (<https://www.env.go.jp/press/y0915-10/mat08.pdf>)
86. SOURKES, Theodore L. The discovery and early history of carotene. *Bulletin for the History of Chemistry*, 2009, 34.2: 32.
87. JOHNSON, Elizabeth J. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care*, 2002, 5.2: 56-65.
88. HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46.2: 185-196.
89. RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutrition Research*, 1999, 19.2: 305-323.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの皆様のご協力なしにはこの論文は完成しませんでした。ここに心より感謝いたします。

北海道大学大学院 水産科学研究院 細川 雅史 教授には研究生活全般において多大なるご指導とご鞭撻を賜り心より感謝いたします。

また、北海道大学大学院 水産科学研究院 三上 浩司 准教授には終始ご懇切なるご助言を賜りました。ここに感謝いたします。さらに、本研究をまとめるにあたりご校閲、貴重なご助言を賜りました北海道大学大学院 水産科学研究院 酒井 隆一 教授、別府 史章 准教授に深謝いたします。重ねて本研究の遂行にあたりご助言、ご指導を賜りました北海道大学大学院 水産科学研究院 宮下 和夫 教授(現 帯広畜産大学)に心より感謝いたします。

また、研究を進めるにあたり石川県立大学 生物資源工学研究所 三沢 典彦 教授、竹村 美保 准教授、一般財団法人 生産開発科学研究所 眞岡 孝至様、神戸薬科大学 山野 由美子 准教授に多大なるご協力を賜りました。厚くお礼申し上げます。

そして北海道大学大学院 水産科学院 機能性物質化学研究室のみなさまに深くお礼申し上げます。本研究が完遂できたのは後輩のみなさまのご協力のおかげです。

また、学位取得にご理解とご協力をいただきました地方独立行政法人 北海道立総合研究機構 食品加工研究センターのみなさまに感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、多くのご迷惑とご心配をおかけしながらも、私を信じ応援いただいた家族に心より感謝致します。