

# 赤ピーマンのカロテノイド及びその新規誘導体の大腸菌での効率生産系の構築

三沢 典彦

(石川県立大学 生物資源工学研究所)

## 研究の目的

カロテノイド色素のカプサンチンやカプソルビンは強力な一重項酸素消去能を有する有用機能性素材であるが、赤ピーマンやユリの花粉にしか含まれないため、多量調製が難しい。また、カプサンチンの誘導体である 4-ケトカプサンチンは新規物質であるが、カプサンチンと、すでに抗酸化性機能性食品として実用化されているアスタキサンチンの化学構造を合わせ持つため「スーパー抗酸化剤」となる可能性が高いと思われる。一方、我々は大腸菌で、カロテノイドの前駆体であるファルネシル二リン酸(FPP)を効率生産する系を既に構築した(特許取得済み:第 5405030 号)。本研究ではこの系を利用し、さらに、カプサンチン、カプソルビン、4-ケトカプサンチンそれぞれの合成に必要な遺伝子群を大腸菌に導入して機能発現させることにより、これらのカロテノイドの大腸菌での効率生産系の構築を行う。本研究により、これらのカロテノイドの包括的な機能性試験を実施することが可能になる。

## 研究方法

### 1. ゼアキサンチンの効率生産

目的とする 3 種のカロテノイドの共通の前駆体であるゼアキサンチン(Zeaxanthin)を大腸菌で効率生産(10 mg/g 乾重量以上)させる。具体的方法として、FPP を効率生産する組換え大腸菌(後述の文献 1 など)に、 $\gamma$ -Proteobacteria 綱に属する土壌細菌 *Pantoea ananatis* 由来の *crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY*、*crtZ* 遺伝子を導入して高発現させる。

### 2. アンテラキサンチン、ビオラキサンチンの効率生産

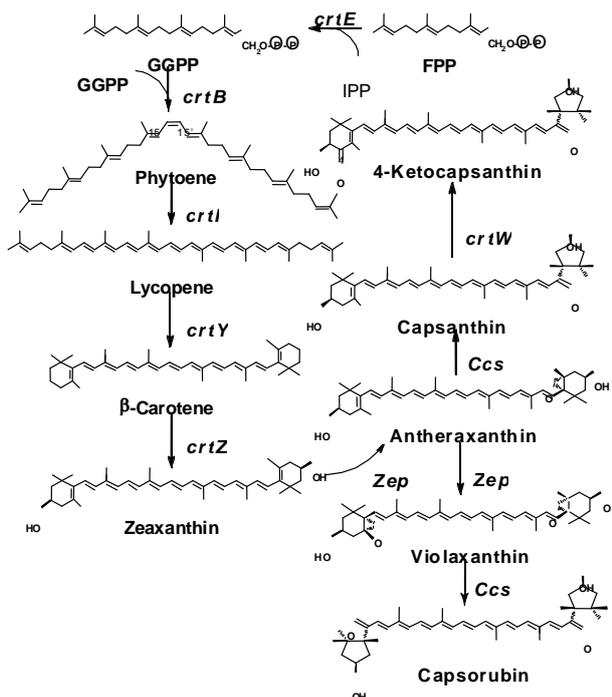
1 で作製した組換え大腸菌に植物由来の zeaxanthin epoxidase (*Zep*) 遺伝子を導入して機能発現させることにより、アンテラキサンチン(Antheraxanthin)またはビオラキサンチン(Violaxanthin)を効率生産させる。

### 3. カプサンチン、カプソルビンの効率生産

2 で作製した組換え大腸菌に、赤ピーマン (*Capsicum annuum*) 由来の capsanthin-capsorubin synthase (*Ccs*) 遺伝子を導入して機能発現させることにより、カプサンチン(Capsanthin)またはカプソルビン(Capsorubin)を効率生産させる。

### 4. 4-ケトカプサンチンの効率生産

3 で作製したカプサンチンを効率生産する組換え大腸菌に、海洋細菌 *Brevundimonas*



属SD212株由来のcarotenoid 4,4'-ketolase(*crtW*)遺伝子を導入して高発現させることにより、4-ケトカプサンチン(4-Ketocapsanthin)を効率生産させる。

## 結果

### 1. ゼアキサンチンの効率生産

*Pantoea ananatis* 由来の *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* 遺伝子を導入したプラスミド pACCAR25  $\Delta$  *crtX* に、FPP を効率生産するための遺伝子としてアスタキサンチン高産生緑藻である *Haematococcus pluvialis* 由来の *idi* (IPP isomerase) 遺伝子(文献 2)を挿入したプラスミド pAHP-Zea を作製し、大腸菌 BL21 (DE3)株に導入した。得られた組換え大腸菌(M12 と命名)を HPLC 分析した結果、これまで用いていた pACCAR25  $\Delta$  *crtX*(文献 3)を導入した大腸菌と比較して、2~3 倍のゼアキサンチンを生産することができた。

### 2. アンテラキサンチン、ビオラキサンチンの効率生産

ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* から zeaxanthin epoxidase (*MpZEP*) 遺伝子を単離した。本遺伝子を上記で作製した組換え大腸菌 M12 に導入し、大腸菌 M12(pET-MpZEP)を作製した。しかし、本組換え大腸菌は目的のアンテラキサンチンまたはビオラキサンチンを生産しなかった。これまでの報告から、zeaxanthin epoxidase が機能するためには、酸素、NADPH、FAD、ferredoxin、ferredoxin reductase (FNR)が必要であることがわかっている。これらの因子のうち、酸素以外の因子が、大腸菌では不足している可能性が考えられたので、ゼニゴケ等の植物または細菌由来のレドックスパートナー(ferredoxin-FNR)、及び細菌由来の NADPH 再生系 (glucose dehydrogenase; GDH) の遺伝子を単離し、これらを *MpZEP* 導入大腸菌 M12(pET-MpZEP)にさらに導入した。得られた組換え大腸菌 M12

( pET-MpZEP/GDH + pRSF-ferredoxin/FNR) を HPLC 分析した結果、目的とするアンテラキサンチンあるいはビオラキサンチンのピークは検出できなかったが、新たなピークが検出された(図1)。その物質は UV-visible 及び HRMS 解析の結果、新規物質の可能性が高く、さらにNMR解析が必要なことがわかった。そのため現在、大量培養して、サンプルを調製中であり、精製でき次第、解析を行う。

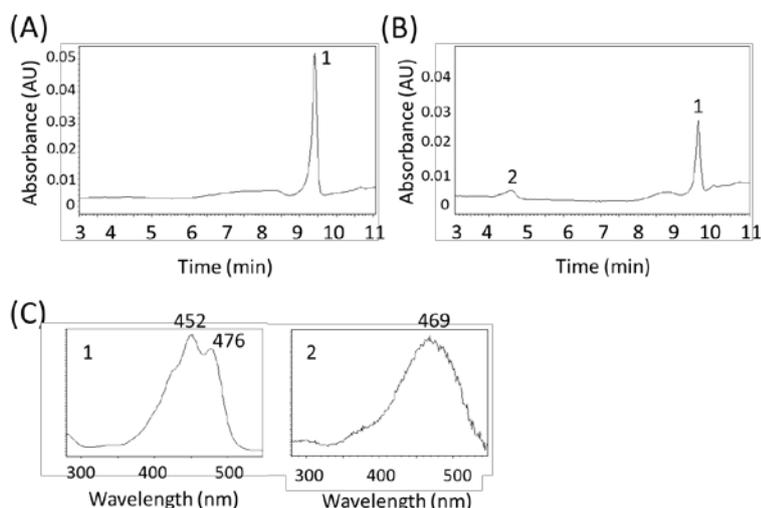


図1 組換え大腸菌 M12 (pET-MpZEP/GDH + pRSF-ferredoxin/FNR) のカロテノイド分析 (A) 組換え大腸菌 M12 (pET-MpZEP) のHPLCクロマトグラム、(B) 組換え大腸菌 M12 (pET-MpZEP/GDH + pRSF-ferredoxin/FNR)のHPLCクロマトグラム、(C) それぞれのピークの吸収曲線。1, zeaxanthin; 2, novel carotenoid.

### 3. カプサンチン、カプソルビンの効率生産

まず、赤ピーマン(*Capsicum annuum*) より、capsanthin-capsorubin synthase (*Ccs*) 遺伝子をクローニングし、上記の組換え大腸菌に導入するためのベクターを構築した。今後、アンテラキサンチン

やビオラキサンチンを生産する大腸菌ができた後、*Ccs* 遺伝子を導入する。

#### 4. 4-ケトカプサンチンの効率生産

*crtW* 遺伝子を上記3の大腸菌に導入するために、クローニングを行った。今後、*Ccs* 遺伝子とともに *crtW* 遺伝子を導入する予定である。

#### 結論

本研究により、ゼアキサンチンを効率生産する大腸菌を作製することができた。さらに、種々のレドックスパートナー (*ferredoxin/FNR*) 遺伝子や、*NADPH* 再生系遺伝子の品揃えを行うことができた。これらの遺伝子を組み合わせてゼアキサンチン高生産大腸菌に導入することにより、目的のアンテラキサンチンやビオラキサンチンではなかったが、新たな化合物が生産されることがわかった。この化合物は新規カロテノイドの可能性が高く、現在、構造解析中である。今後、このカロテノイドが何かわかれば、その反応機構が明らかとなり、アンテラキサンチンやビオラキサンチンの生産につながる知見が得られると考えている。また、この化合物自体が非常に興味深いものであるため、今後の研究が広がる可能性がある。また、*Ccs*、*crtW* 遺伝子についても発現用プラスミドが完成しているので、*Zep* 遺伝子を機能発現する方法が確立できれば、速やかに4-ケトカプサンチンを生産することが可能であると考えられる。

#### 文献

- 1) Harada, H., Yu, F., Okamoto, S., Kuzuyama, T., Utsumi, R., and Misawa, N., Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**: 915-925, 2009.
- 2) Kajiwara, S., Fraser, P. D., Kondo, K., and Misawa, N., Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **324**: 421-426, 1997.
- 3) Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W., Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.*, **177**: 6575-6584, 1995.