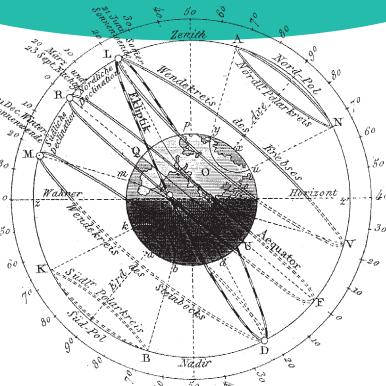


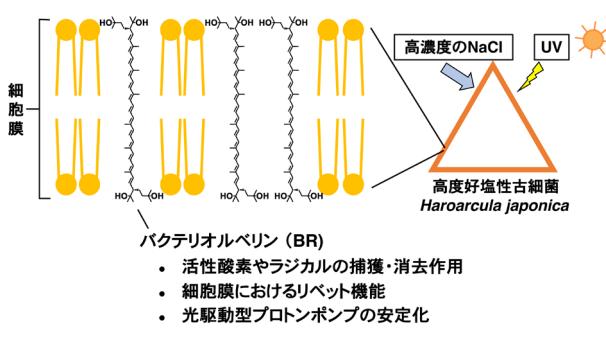
## [解説]



[2023年農芸化学女性研究者賞]

# 高度好塩性古細菌が生産するカロテノイド その生合成経路と役割

八波利恵



キーワード：好塩性細菌、高度好塩性古細菌、カロテノイド、バクテリオルベリン、カロテノイド生合成経路

死ぬまでに行きたい絶景スポット、本稿を読んでいる読者のうち、実際に訪れたことがある方はどれぐらいいるのだろうか。かくいう筆者も、写真や映像の中で楽しむことしかできていない。このうち、ボリビアにある「ウユニ塩湖」は多くの方が一度は見聞きしたことがあるのではないだろうか。見渡す限りの広大な白銀の塩原。塩湖全体の高低差がわずか

Carotenoids Produced by Extremely Halophilic Archaea: Biosynthetic Pathways and Roles  
Rie YATSUNAMI, 東京工業大学生命理工学院生命理工学系

50 cm以内という「世界で最も平らな場所」であるウユニ塩湖では、降った水が外部に流れることなく大地に薄く膜を張るため、空を湖面に映し出す「天空の鏡」と呼ばれる神秘的な絶景が現れる。ここに生息する生き物はフラミンゴが有名であるが、この他、塩を好む微生物「好塩菌」も生育している。本稿では、好塩菌のうち特に筆者が研究対象とする高度好塩性古細菌について、その生育環境および生産するカロテノイドを中心に解説する。

### 高度好塩性古細菌の生育環境

微生物は、増殖に適したNaCl濃度に応じて、大きく非好塩性微生物と好塩性微生物(halophile)に分類される(表1)<sup>(1)</sup>。非好塩性微生物はNaCl濃度0.2M以下で増殖するものを指し、大腸菌や大部分の土壤微生物が含まれる。一方、0.2M以上でよく増殖するものを好塩性微生物といい、高塩濃度を好んで生育するという点で、極限環境微生物の一種である。好塩性微生物は、NaCl要求性に応じてさらに細分化される。0.2~0.5Mの条件下では低度好塩性微生物が、0.5~2.5Mの条件下では中度好塩性微生物が、2.5~5.0Mの条件下では高度好塩性微生物がそれぞれよく増殖するとされている。低度好塩性微生物および中度

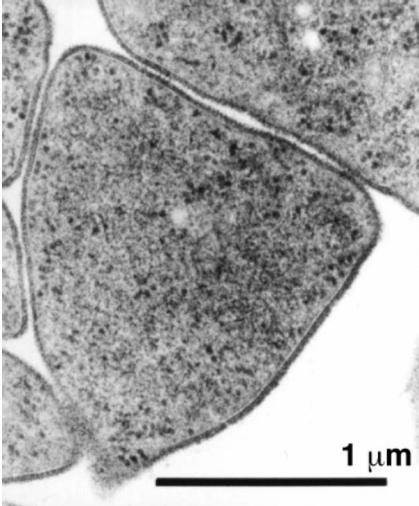


図1 ■ 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* の電子顕微鏡写真

好塩性微生物が基本的に細菌に属するのに対し、高度好塩性微生物の大半は古細菌である。高度好塩性古細菌は主に、塩湖、塩田および天日塩などから分離されている。つまり冒頭で紹介したウユニ塩湖に生育する好塩菌のほとんどは、高度好塩性古細菌なのである。最も研究が進んでいる高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum*<sup>②</sup> および *Haloferax volcanii*<sup>③</sup> は、いずれもイスラエルの塩湖である死海から分離されている。なお、日本に塩湖はないが、筆者が研究対象とする高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* は、石川県能登半島の塩田土壤より分離された<sup>④</sup>。その形状は、三角形平板状という特徴的な形態を有している（図1）<sup>⑤</sup>。本稿とは少し話がずれるが、上述した *Hbt. salinarum* は桿菌であり、*Hfx. volcanii* は増殖につれて桿菌からディスク状へと形を変える多型性の菌である。さらに、四角形の形状をもつ *Haloquadratum walsbyi*<sup>⑥</sup> も見つかっている。これらの形態維持機構にも非常に興味がもたれるところである。

### 高度好塩性古細菌が生産するカロテノイド

カロテノイド（Carotenoid）は、微生物、植物および動物に広く分布する赤、橙、黄色を呈する脂溶性の天然

表1 ■ 最適増殖塩（NaCl）濃度による微生物の分類

分類	最適増殖 NaCl濃度	微生物の例
非好塩性微生物	0~0.2 M	大腸菌、大部分の土壤細菌
好塩性微生物		
低度好塩性微生物	0.2~0.5 M	大部分の海洋性細菌
中度好塩性微生物	0.5~2.5 M	含塩試料由来の細菌
高度好塩性微生物	2.5~5.2 M	大半が古細菌

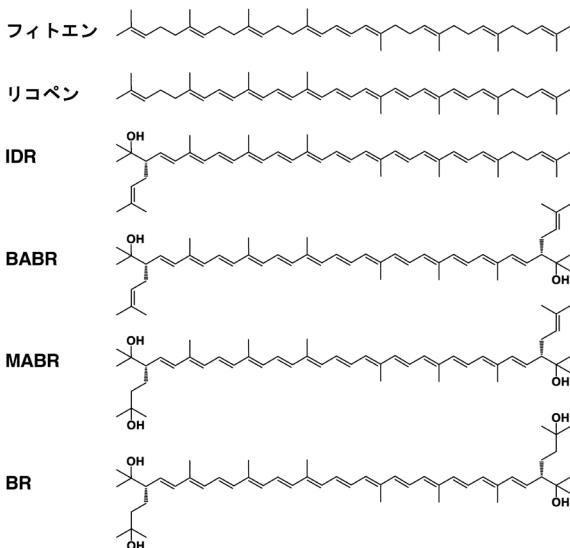


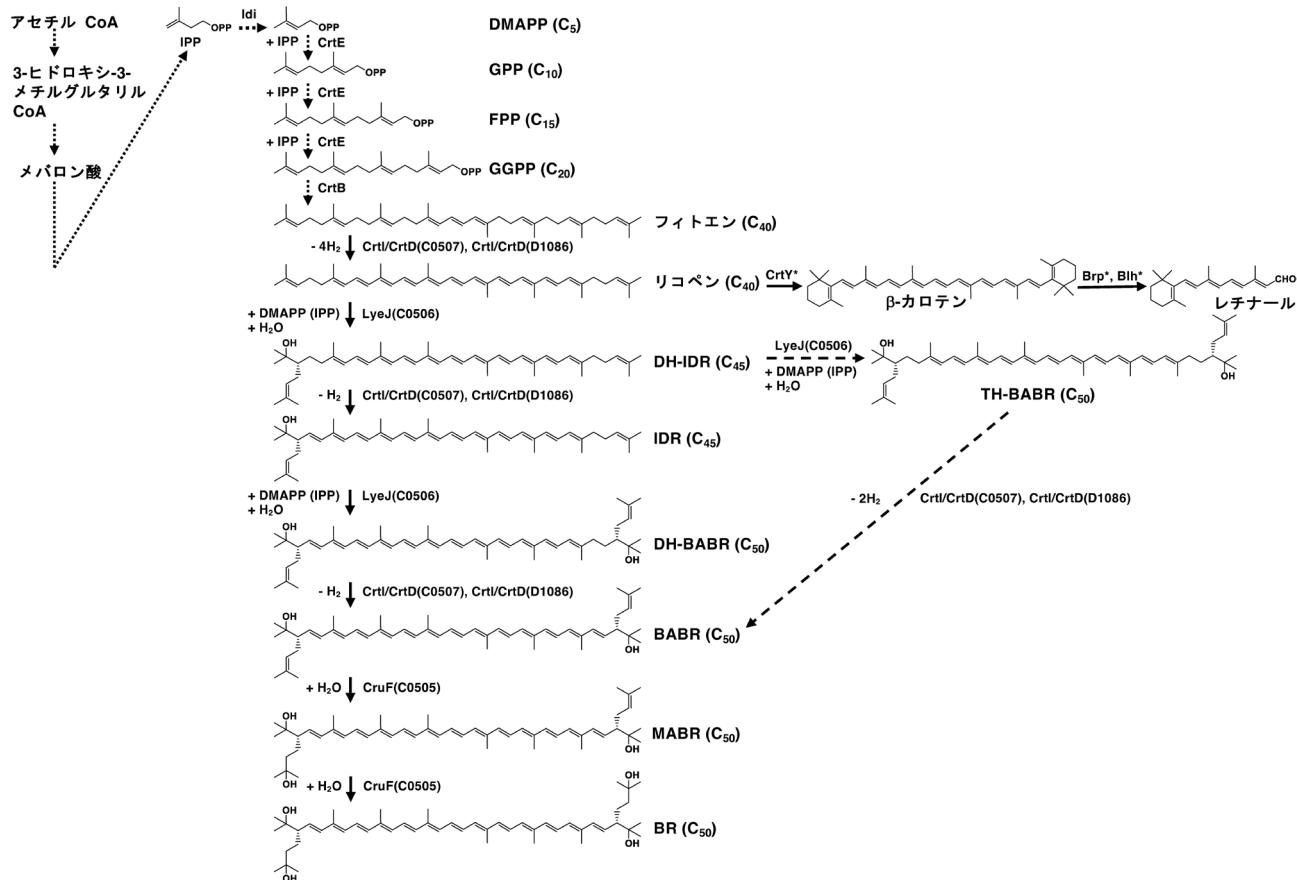
図2 ■ 高度好塩性古細菌が生産するカロテノイド

色素である。炭素と水素分子のみで構成されるカロテン類と分子内に水酸基やカルボニル基などの酸素を含む官能基が付いたキサントフィル類に分類される<sup>⑦, ⑧</sup>。その基本骨格は、8個のイソプレン（isoprane, C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>）単位が結合して構成された炭素数40(C<sub>40</sub>)の化合物である。一方、高度好塩性古細菌の多くは炭素数50(C<sub>50</sub>)のカロテノイドを生産することが知られている。

高度好塩性古細菌が生産するカロテノイドは、主に *Hbt. salinarum*, *Hfx. volcanii* および *Har. japonica* などで研究が行われてきた<sup>⑨, ⑩</sup>。これらは、C<sub>40</sub>カロテノイドのフィトエン（Phytoene）、リコ펜（Lycopene）に加え、C<sub>50</sub>カロテノイドのイソペンテニルデヒドロロドピン（IDR）、ビスアンヒドロバクテリオルベリン（BABR）、モノアンヒドロバクテリオルベリン（MABA）およびバクテリオルベリン（BR）（図2）を生産する。また、*Har. japonica*においてBRは、全カロテノイドのうち約70%を占めることが明らかとなっており、BRがカロテノイド生合成経路の最終産物と考えられている。

### カロテノイド生合成経路

細菌におけるカロテノイド生合成の初期段階はイソプレンの合成である。単位構造であるイソペンテニルピロリン酸（IPP）の生合成は、メバロン酸経路または非メバロン酸経路のどちらかをとる。高度好塩性古細菌は、非メバロン酸経路をもたず、メバロン酸経路でIPPを合成することが知られている。この合成経路の出発物質はアセチルCoAであり、細菌と同様に以下の経路を経ると考えられている。すなわち、アセチルCoAから3-ヒ

図3 ■ *Har. japonica*におけるカロテノイド生合成経路

点線は推定経路を、破線はマイナー経路を示す。また、*Hbt. salinarum*で同定されているCrtYおよびBrp, Blhにはアスタリスクをつけた。

ドロキシ-3-メチルグルタルCoA (HMG-CoA), メバロン酸を経由して, C<sub>5</sub>のIPPが合成される。合成されたIPPは、異性化酵素 (Idi) により、ジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) に異性化される。さらに、ゲラニルゲラニルピロリン酸合成酵素 (CrtE) により、順次IPPと縮合していくことにより、C<sub>10</sub>のゲラニルピロリン酸 (GPP), C<sub>15</sub>のファルネシルピロリン酸 (FPP), C<sub>20</sub>のゲラニルピロリン酸 (GGPP) が合成されていく。さらに、フィトエンシンターゼ (CrtB) により、アデノシン三リボン酸 (ATP) を用いて2分子のGGPPが結合することで、イソプレン8分子からなる最初のC<sub>40</sub>カロテノイドである15-シスフィトエンが合成されるものと推定されている（図3）<sup>(11)</sup>。

つい最近になって筆者らの研究により、*Har. japonica*においてフィトエンからリコ펜を経由してBRに至る生合成経路に関与するすべての遺伝子が同定され、その全貌が明らかにされた（図3）<sup>(12, 13)</sup>。その生合成経路を、1. フィトエンからリコペン, 2. リコペンからBRの生合成経路、にわけて解説する。

## I. フィトエンからリコペンの生合成経路

フィトエンからリコペンに至る反応では、ある種の細菌のカロテノイド生合成経路においてフィトエンデサチュラーゼ (CrtI) の関与が知られている。そこで *Har. japonica*ゲノム上より *crtI*遺伝子ホモログの有無を調べたところ、機能が詳細に調べられている *Pantoea ananatis* *crtI*遺伝子と相同性を示す2つの遺伝子ホモログ (*c0507*および*d1086*) が見出された。そこで、これらの遺伝子の単独破壊株 ( $\Delta c0507$ および $\Delta d1086$ ) および二重破壊株 ( $\Delta c0507\Delta d1086$ ) を構築し、生産するカロテノイド種の解析を行った。その結果、*Har. japonica*のフィトエンからリコペン至る反応においては、*c0507*および*d1086*遺伝子にコードされる2つの*crtI*遺伝子が関与することが明らかとなった。すなわち、この合成経路では、フィトエンにC0507およびD1086が共にフィトエンデサチュラーゼとして機能することで不飽和下が進行して、リコペンが合成されることがわかった。

## 2. リコペンからBRの生合成経路

上述したc0507遺伝子近傍のゲノム配列を詳細に解析したところ、c0507遺伝子のすぐ下流に存在するc0506およびc0505遺伝子は、それぞれリコペンエロンガーゼおよびヒドラターゼの遺伝子ホモログであることがわかった。さらに、これら3つの遺伝子は1つのmRNAとして共転写していることが明らかとなった。これより、c0507/c0506/c0505遺伝子クラスターが本菌のカロテノイドの生合成に密接に関与していると予想された。そこで、c0507/c0506/c0505遺伝子クラスターを構成するそれぞれの遺伝子の単独破壊株を構築し、それらの生産するカロテノイド種の分析を行った。その結果、C0507、C0506およびC0505はそれぞれ、3,4-デサチュラーゼ(CrtD)、リコペンエロンガーゼと1,2-ヒドラターゼの両方の活性をもつ二機能酵素LyeJ(既に*Hbt. salinarum*より同定されているLyeと60%程度の相同性を有することから、LyeJと命名された)、およびヒドラターゼ(CruF)であることがわかった。すなわち、リコペンからBRに至る反応では、リコペンにまずLyeJが作用し、リコペンの片側末端にIPPおよび水分子が付加して、ジヒドロ(DH)-IDRが合成される。次いで、3,4-デサチュラーゼ(CrtD)によって不飽和化されることでIDRが合成される。同様の反応が反対側の末端にも生じ、DH-BABRを経由してBABRが合成される。さらに、付加したIPP部分にヒドラターゼ(CrtF)が作用して水分子が付加し、MABRが合成される。同様の反応が反対側の末端にも生じることで最終産物であるBRが合成される。なお、破壊株の詳細な解析により、DH-IDRからのマイナー経路も存在することがわかっている。この経路では、DH-IDRにLyeJが作用し、テトラヒドロ(TH)-BABRが合成されたのち、CrtDによる不飽和化が進行してBABRが合成されるといった経路である。

C0507は、前述したようにフィトエンからリコペンに至る経路ではCrtIとして機能し、リコペンからBRに至る経路では、CrtDとして機能するため、二機能酵素[CrtI/CrtD(C0507)と命名]といえる。さらにその後の解析により、フィトエンからリコペンに至る経路において、C0507と共にフィトエンの不飽和化反応を担うD1086もC0507と同様に、リコペンからBRに至る経路においてCrtDとして機能することが明らかとなり、CrtI/CrtD(D1086)と命名された。すなわち、CrtI/CrtD(C0507)とCrtI/CrtD(D1086)はBR合成においてお互いに相補しているのである。これまでに、CrtI活性とCrtD活性を有する二機能酵素CrtI/CrtDは見つかっておらず、*Har. japonica*のCrtI/CrtD(C0507)お

よびCrtI/CrtD(D1086)が初めての例であった。

## レチナール生合成経路

*Hbt. salinarum*は、光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシンを有し<sup>(14)</sup>、その発色団はレチナールである。レチナールの生合成経路は*Hbt. salinarum*において明らかとなっており、BRの前駆体であるリコペンから合成されるため、ここで紹介しておく。この経路では、まずリコペンにリコペンβ-シクラーゼ(CrtY)が作用し、リコペンのψ末端基が環化されてβ末端基となってβ-カロテンが合成される(図3)<sup>(15)</sup>。次いで、β-カロテン-15,15'-ジオキシゲナーゼ(Brp, Blp)によって、β-カロテンが中央で開裂してレチナールが合成される<sup>(16)</sup>。このレチナールがアポタンパク質であるバクテリオオプシンと結合し、バクテリオロドプシンとなるのである。

## 高度好塩性古細菌におけるBRの役割

高度好塩性古細菌におけるBRの役割については、いくつか報告がある。1つ目は、一般的にカロテノイドが担うとされている活性酸素やラジカルの捕獲・消去作用をBRが担うというものである。すでに、BRの1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH)ラジカル消去能は調べられており<sup>(10)</sup>、BRはβ-カロテンに比べ高い活性を有していることが明らかとなっている(図4)。カロテノイドの抗酸化活性は、共役二重結合数が多いほど高いことが知られている<sup>(17, 18)</sup>。BRの共役二重結合数は13であり、β-カロテンの9よりも多い。このため、より高いラジカル消去能を示したと考えられる。

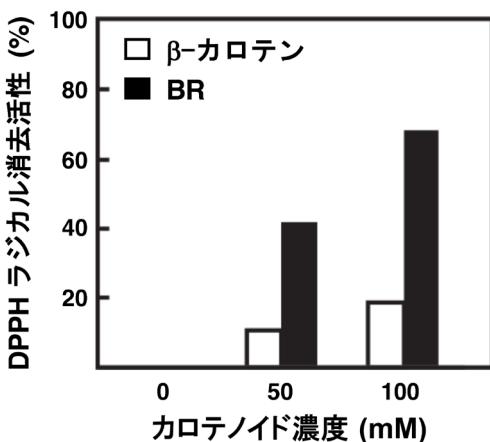


図4 ■ BRとβ-カロテンのDPPHラジカル消去活性

## ◆◆コラム◆◆

### 好塩菌、おそらく食べている？

高度好塩性古細菌の分離源は本稿に述べたように、主に塩湖、塩田および天日塩である。日本で初めて分離されたのは、*Har. japonica*であるが、その後、国内の天日塩・市販塩や輸入岩塩からも新種が見つかっている。例えば、沖縄県産の市販塩や天日塩などから新たな新種・新属が単離されている。この他、塩蔵食品からも数多くの高度好塩性古細菌がみつかっている。例えば、韓国の伝統的な発酵食品であるチヨッカル（日本食でいえば塩辛であろう）やタイの醤油といわれるナンプラーからも単離されている

のである。また、輸入岩塩も好塩菌の分離源である。小洒落たレストランに「お肉などにお好みでどうぞ」と添えられているものである。実際、筆者はポーランドから帰国した友人から、おみやげとしていただいた岩塩から高度好塩性古細菌のコロニーを分離した経験もある。これらを考えると、おそらく私たちは知らず知らずのうちに、好塩菌を食べているだろう（ただし、これまでに毒素産生能を有する高度好塩性古細菌は見つかっていないことをここに記述しておく）。このことは、私たちには身近にある岩塩、塩蔵食品やから新種・新属を分離するチャンスがあるということである。今後、読者から新たな好塩菌の発見者が現れることを期待している。

えられた。このような抗酸化能は、強い紫外線が照射される塩湖等で生育する高度好塩性古細菌に生じる様々な酸化ストレス耐性に寄与していると推定されている。*Hbt. salinarum*を用いた研究からは、BRが紫外線、X線、ガンマ線などの照射、過酸化水素暴露によって生じる酸化的DNA損傷に対する防御を担うことが示唆されている<sup>(19, 20)</sup>。

2つ目は、BRは末端に4つのヒドロキシル基をもつ極性カロテノイドであることから、細胞膜でリベットとして働くというものである<sup>(21)</sup>。*Hfx. mediterranei*においては低塩濃度下で培養した際に、BR生産量の顕著な増加が認められており、BRがリベットとして機能し、低塩濃度下における溶菌を防いでいると考えられている。

さらに、BRは上述したバクテリオロドプシンのような光駆動型プロトンポンプの安定化も担っているとも報告されている<sup>(22)</sup>。*Halorubrum* sp. aus-2は、プロトンポンプであるアーキロドプシン-2 (aR-2) を有している。aR-2の結晶構造解析の結果、BRは、3量体のaR-2のサブユニット間の隙間に結合していることが明らかとなった。これより、BRはaR-2の構造を支えていることが示唆された。以上、BRの役割は、現在わかっているだけでも多岐にわたる。BRは、高度好塩性古細菌のほとんどが生産している。一方で、バクテリオロドプシンのような光駆動型プロトンポンプに関しては、有しているものもあれば、もないものも見つかっている。そのことを考慮すると、高度好塩性古細菌は酸化ストレスに対する防御のため、および（もしくは）自然界で突如と起りえる塩濃度変化への適応のためにまずBR生合成経路を獲得したと考えられる。そして、後に取得した光駆動型プロトンポンプの機能をより強固にするために、すくにもち合わせていたBRを流用したように思える。

BRを合成する微生物には、高度好塩性古細菌の他に、放射線耐性細菌 *Rubrobacter radiotolerans* や、好冷性細菌 *Arthrobacter agilis* が報告されている。これらはいずれも高度好塩性古細菌と同様、極限環境微生物である。*R. radiotolerans*において、BRは細胞内で非常に効果的なヒドロキシルラジカルスカベンジャーとして働き、*R. radiotolerans*がもつ極めて高い放射線耐性の一端を担うと考えられている<sup>(23)</sup>。一方、*A. agilis*はBRとそのグリコシル化誘導体を合成し、それらが低温での膜流動性を改善し、細菌膜の凍結融解効果を低減する役割を担うことが明らかとなっている<sup>(24)</sup>。これより、BR（およびその誘導体）の機能は、高度好塩性古細菌を含む個々の極限環境微生物間で異なる。しかしながら、それぞれに必要な極限環境耐性を担っており、そのマルチな機能で大活躍しているのである。

### おわりに

上述したように、本稿で紹介した *Har. japonica*（当研究室では「三角菌」と呼んでいる）は、能登半島の塩田より分離された。つまり三角菌にとって、能登半島はふるさとである。その能登半島は2024年1月に発生した地震で大きな被害を受けたが、筆者が執筆している現在、復興に向けた様々な取り組みが始まったと聞いている。能登半島の1日も早い復興を願ってやまない。

### 文献

- D. J. Kushner. "Microbial life in extreme environments," Academic Press, 1978, p.317.
- M. T. Madigan & A. Orent: *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 265 (1999).
- M. Torreblanca, F. Rodriguez-Valera, G. Juez, A. Vento-

- sa, M. Kamekura & M. Kates: *Syst. Appl. Microbiol.*, **8**, 89 (1986).
- 4) K. Horikoshi, R. Aono & S. Nakamura: *Experientia*, **49**, 497 (1993).
  - 5) Y. Nishiyama, T. Takashina, W. D. Grant & K. Horikoshi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **99**, 43 (1992).
  - 6) D. G. Burns, P. H. Janssen, T. Itoh, M. Kamekura, Z. Li, G. Jensen, F. Rodríguez-Valera, H. Bolhuis & M. L. Dyall-Smith: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 387 (2007).
  - 7) G. Britton, S. Liaanes-Jensen & H. Pfander: Carotenoids. Handbook, Birkhäuser Verlag, Basel, 2004.
  - 8) 高市真一：カロテノイド—その多様性と生理活性—，裳華房，2006。
  - 9) M. Rodrigo-Baños, I. Garbayo, C. Vilchez, M. J. Bonete & R. M. Martínez-Espinosa: *Mar. Drugs*, **13**, 5508 (2015).
  - 10) R. Yatsunami, A. Ando, Y. Yang, S. Takaichi, M. Kohno, Y. Matsumura, H. Ikeda, T. Fukui, K. Nakasone, N. Fujita *et al.*: *Front. Microbiol.*, **5**, 100 (2014).
  - 11) J. Alcaino, I. Romero, M. Niklitschek, D. Sepúlveda, M. C. Rojas, M. Baeza & V. Cifuentes: *PLoS One*, **9**, e96626 (2014).
  - 12) R. Yatsunami, A. Ando, N. Miyoko, Y. Yang, S. Takaichi & S. Nakamura: *Microbes Environ.*, **39**, ME24004 (2024).
  - 13) Y. Yang, R. Yatsunami, A. Ando, N. Miyoko, T. Fukui, S. Takaichi & S. Nakamura: *J. Bacteriol.*, **197**, 1614 (2015).
  - 14) D. Oesterhelt & W. Stoeckenius: *Nat. New Biol.*, **233**, 149 (1971).
  - 15) R. F. Peck, E. A. Johnson & M. P. Krebs: *J. Bacteriol.*, **184**, 2889 (2002).
  - 16) R. F. Peck, C. Echavarri-Erasun, E. A. Johnson, W. V. Ng, S. P. Kennedy, L. Hood, S. DasSarma & M. P. Krebs: *J. Biol. Chem.*, **276**, 5739 (2001).
  - 17) M. Albrecht, S. Takaichi, S. Steiger, Z. Y. Wang & G. Sandmann: *Nat. Biotechnol.*, **18**, 843 (2000).
  - 18) B. Tian, Z. Xu, Z. Sun, J. Lin & Y. Hua: *Biochim. Bio-*
  - phys. Acta, Gen. Subj., **1770**, 902 (2007).
  - 19) H. R. Shahmohammadi, E. Asgarani, H. Terato, T. Saito, Y. Ohyama, K. Gekko, O. Yamamoto & H. Ide: *J. Radiat. Res.*, **39**, 251 (1998).
  - 20) M. Kottemann, A. Kish, C. Iloanusi, S. Bjork & J. DiRugiero: *Extremophiles*, **9**, 219 (2005).
  - 21) S. E. D' Souza, W. Altekar & S. F. D' Souza: *Arch. Microbiol.*, **168**, 68 (1997).
  - 22) K. Yoshimura & T. Kouyama: *J. Mol. Biol.*, **375**, 1267 (2008).
  - 23) T. Saito, Y. Miyabe, H. Ide & O. Yamamoto: *Radiat. Phys. Chem.*, **50**, 267 (1997).
  - 24) A. Flegler & A. Lipski: *Arch. Microbiol.*, **204**, 70 (2022).

## プロフィール



八波 利恵 (Rie YATSUNAMI)

<略歴>1995年長崎大学大学院工学研究科修士課程修了／1995～1996年艶金工業株式会社／1996年東京工業大学研究生／2000年同大学大学院生命理工学研究科博士課程修了／2000～2001年日本学術振興会特別研究員／2001年東京工業大学大学院生命理工学研究科助手／2007年同大学助教／2015年同大学准教授，現在に至る<研究テーマと抱負>極限環境微生物が生産する極限酵素の極限耐性機構の解明，極限環境微生物を用いた有用物質生産<趣味>テニス，バスケットボール観戦<所属研究室ホームページ><http://www.nakamura.bio.titech.ac.jp/>