

微細藻類を使ったアスタキサンチンの生産性向上  
Improvement of astaxanthin productivity by microalgae

井田 浩介  
Kosuke Ida

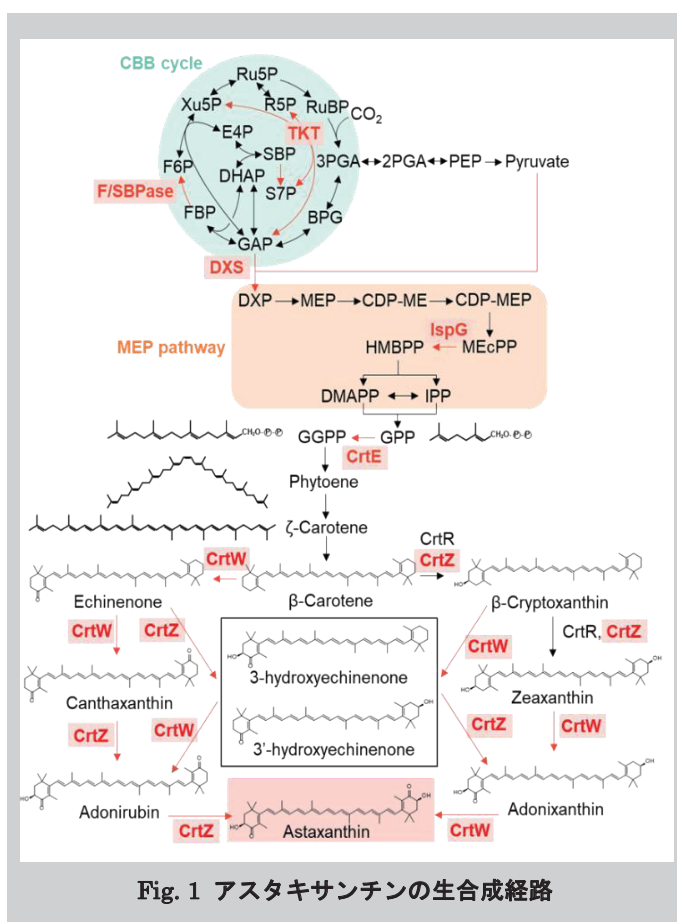
**Key Word :** Carotenoids, Cyanobacteria, Metabolic Engineering,

## 1 緒言

アスタキサンチンは、エビやカニなどの甲殻類に含まれる赤色の色素であり  $\beta$ -カロテンの約 40 倍の抗酸化活性を有する<sup>1)</sup>。また、抗腫瘍作用や皮膚老化防止などの生理活性を持つことから<sup>2)~4)</sup>、動物飼料だけでなく食品や化粧品産業でも利用が拡大している。様々な微生物による製造例があるが<sup>5)~7)</sup>、淡水性緑藻 *Haematococcus pluvialis* は高い生産性を持ち、CO<sub>2</sub> を炭素源とするため広く利用されている<sup>8)</sup>。この藻類は、細胞増殖工程の「green stage」とストレス条件下でアスタキサンチン生産を誘導する「red stage」の 2 段階によって乾燥細胞重量の約 4% までアスタキサンチンを蓄積する。しかし、現行プロセスは長期間の培養を必要とするほか、雑菌汚染のリスクが課題となっている。また、ストレスがアスタキサンチン生合成を誘導するメカニズムは完全には解明されていないため、生産条件の最適化が課題となっている<sup>9)</sup>。汚染リスクの低減に向けては、高塩分耐性を持つ株による生産が検討されてきた。好塩性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 による生産は、倍加時間が *H. pluvialis* より短く、高塩分条件下で成長可能なため、長期間の培養や培養中の汚染の問題を解消できることが期待される。先行研究では *Synechococcus* sp. PCC7002 に crtZ と crtW (Fig. 1) を発現させることで、3 mg/g-DCW および 3.35 mg/L/day のアスタキサンチン生産に成功した<sup>9)</sup>。しかし、アスタキサンチン生産性向上に向けた株の改良戦略が不明である点が、効率生産の障害となっている。

本研究では、アスタキサンチン生産能を付与した *Synechococcus* sp. PCC 7002 を対象としたメタボローム解析により、代謝のボトルネックの特定と、それを緩和するための体系的な株改良を行った。メタボローム解析に基づいて選択された遺伝子を導入することで、ボトルネックが緩和され、アスタキサンチン生産量が向上した。また、培養条件の最適化を進めることで、更なる生産性向上を達成することが

できた。本研究により、メタボロミクスの活用による株の改変がアスタキサンチン生産性向上に有効であることを示すことができた。



## 2 実験方法

### (1) 株の培養

*Synechococcus* sp. PCC 7002 はA2 培地(4.25 g/L, NaNO<sub>3</sub>, 50 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 18 g/L NaCl, 5 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.37 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.6 g/L KCl, 32 mg/L Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O,

東亜合成株式会社 川崎フロンティエンス R&D センター 次世代材料研究所  
NEXT GENERATION MATERIALS LABORATORY, KAWASAKI FRONTIENCE R&D CENTER, TOAGOSEI CO., LTD.

8 mg/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 34 mg/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 4.3 mg/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.32 mg/L  $\text{ZnCl}_2$ , 50  $\mu\text{g/L}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.0  $\mu\text{g/L}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 12  $\mu\text{g/L}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4.0  $\mu\text{g/L}$  cobalamin, and 8.3 mM tris(hydroxymethyl) aminomethane) 中で培養した<sup>10)</sup>。光源は最大波長 $\sim 545$  nm と $\sim 613$  nm の白色蛍光灯を使用した。株を 100  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 、30°C、3 日間前培養した。細胞は 2% (v/v)  $\text{CO}_2$ 、適切な抗生物質を追加した A2 培地 70 mL をフラスコに加え、100 rpm で攪拌しながら培養した<sup>11)</sup>。培養後の細胞を  $\text{OD}_{750}$  が 0.1 となるよう新しい A2 培地に添加し、2% (v/v)  $\text{CO}_2$ 、100  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  の白色蛍光下で 100 rpm、30°C で 7 日間培養した(条件 A)。また、細胞密度向上をねらい、MAD2 培地(16.3 g/L,  $\text{NaNO}_3$ , 0.28 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 18 g/L  $\text{NaCl}$ , 5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.37 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.6 g/L  $\text{KCl}$ , 32 mg/L  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.13 g/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2.86 mg/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.81 mg/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.22 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.26 mg/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.08 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 40.3  $\mu\text{g/L}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 12.2  $\mu\text{g/L}$  cobalamin, and 8.6 mM tris(hydroxymethyl) aminomethane) 中で培養した。光源は最大波長 $\sim 545$  nm と $\sim 613$  nm の白色蛍光灯を使用した。作製した株を 100  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 、30°C、3 日間前培養した。細胞は 2% (v/v)  $\text{CO}_2$ 、適切な抗生物質を追加した MAD2 培地 70 mL を二段式フラスコに加え、100 rpm で攪拌しながら培養した。前培養後の細胞を  $\text{OD}_{750}$  が 0.5 となるよう MAD2 培地に添加し 5% (v/v)  $\text{CO}_2$ 、150  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  の白色蛍光下で 150 rpm、38°C で 1 晩培養した。その後、光を 500  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  に変更し、6 日間培養した(条件 B)。培地中の細胞密度は乾燥菌体重量(DCW)に基づき決定した。

## (2) 組換え株の作製

*crtZ/crtW* またはプロモーターは先行研究のベクターより、各種相同組換え領域、内在性遺伝子は *Synechococcus* sp. PCC 7002 の染色体を鋳型として、KOD One PCR Master Mix/Blue(東洋紡)を使用し、基本的な PCR 条件で増幅した。各断片は In-Fusion® Snap Assembly Master Mix(タカラバイオ)を用いてベクターと結合した。

野生型 *Synechococcus* sp. PCC 7002 を  $\text{OD}_{750} = 1.0$  程度まで A2 培地で培養後、培養液 100  $\mu\text{L}$  に作製したプラスミド 1  $\mu\text{g}$  を加えた。遮光し、終夜攪拌後、A2 プレート培地の上に 0.45  $\mu\text{m}$  ニトロセルロースメンブレンフィルター(メルクミリポア)を置き、混合液 100  $\mu\text{L}$  を播種した。30°C、白色光下で 3 日間培養した後、抗生物質を含んだ A2 プレート培地へ移した。その後、*Synechococcus* sp. PCC 7002 への目的遺伝子の組換えが完了するまで、シングルコロニーの単離

を繰り返した。いずれの遺伝子もゲノム上の neutral site へ導入されたことを PCR で確認した。

## (3) メタボローム解析

5 mg DCW を含む培養液と-30°Cで予冷した 32.5% (v/v) メタノールを比率が 1:4 となるように添加した。8,000 $\times g$ 、-4°Cで3分間遠心分離した後に、上清を取り除いた。細胞を 20 mM 炭酸アンモニウム(pH 8.7)で洗浄した後に、8,000 $\times g$ 、-4°Cで3分間遠心した。洗浄液を除去後、MS 分析の内部標準として 37.5  $\mu\text{M}$  メチオニンスルホンと 37.5  $\mu\text{M}$  ペラジン-1,4 ビス-(2-エタンスルホン酸)を含むメタノール 1 mL を添加し懸濁した。0.5 mL の懸濁液を分取後、氷冷した 0.2 mL の水と 0.5 mL クロロホルムを加えた。30 秒攪拌した後に、14,000 $\times g$ 、4°Cで5分遠心分離した。上層 500  $\mu\text{L}$  を 3 kDa カットオフメンブレン(メルクミリポア)で濃縮した後に減圧乾燥した。乾燥後の抽出物を超純水に溶解させ、キャピラリー電気泳動・MS(CE-MS)システム(Agilent Technologies)にて既報に則り分析した<sup>11)</sup>。

## (4) 色素分析

色素の定量は、先行研究の手法を最適化して行った<sup>9)</sup>。DCW 5 mg 相当の培養液を 8,000 $\times g$ 、3 分、4°Cで遠心分離した後に、20 mM 炭酸アンモニウム(pH 8.7)で洗浄した。洗浄後の細胞に 0.5 mL メタノールを添加した後に、マルチビーズショッカー(安井器械、MB2000)を用い、2,700 rpm、4°Cで60 min 破碎した。破碎後、0.5 mL メタノール、0.3 mL クロロホルム、0.1 mL 超純水を添加して攪拌した。14,000 $\times g$ 、4°Cで5分間遠心分離した後に、上清 0.98 mL を回収した。上清に 0.44 mL の水を加え、攪拌した後に 14,000 $\times g$ 、4°Cで5分間遠心分離した。下層 50  $\mu\text{L}$  へ内部標準として 0.1 mM トランス- $\beta$ -アポ-8'-カロテナルを含んだ 8:2 (v/v) アセトニトリル:クロロホルム 450  $\mu\text{L}$  を添加し分析した。各成分は既報に則り、Acquity ultra performance Liquid chromatography (UPLC) システム(Waters Corporation) photodiode array (PDA) 検出器にて定量した<sup>12)</sup>。

## 3 結果

### (1) アスタキサンチン生産株の評価

*Synechococcus* sp. PCC 7002 は、 $\beta$ -カロテンやゼアキサンチン、3'-ヒドロキシエキネノンなどのさまざまなキサントフィルを生成するが、アスタキサンチンは生産しない<sup>13)</sup>。これは、ゼアキサンチンをアスタキサンチンに変換する際のケトラゼ活性が低いことが原因と推測されている<sup>14), 15)</sup>。先行研究では、*Brevundimonas* sp. SD212 由来の *crtZ* と *crtW*

を内因性プラスミドへ導入したところ、*Synechococcus* sp. PCC 7002 内で機能し、アスタキサンチン生産能を付与することに成功している<sup>9)</sup>。

本研究では、染色体からの発現へと変更した株を作製した。*Brevundimonas* sp. SD212 由来 *crtZ*, *crtW* をオペロンとし、*psbA2* プロモーター下で制御される発現系を構築し、ゲノム上の *glpK* site<sup>16)</sup> へ相同組換えにて挿入した株 Strain 1 を作製した (Fig. 2 (a))。ターゲット部位への遺伝子挿入はアガロースゲル電気泳動で確認した (Fig. 2 (b))。

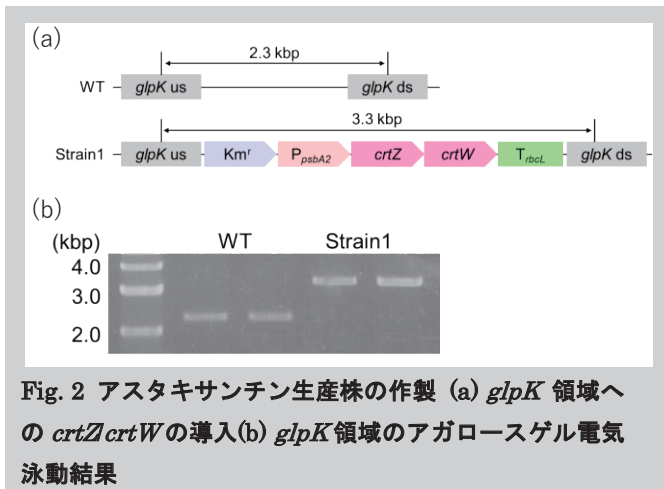


Fig. 2 アスタキサンチン生産株の作製 (a) *glpK* 領域への *crtZcrtW* の導入 (b) *glpK* 領域のアガロースゲル電気泳動結果

Fig. 3 (a) に培養中の両株の生育を示した。培養 7 日目に野生型 (以下 WT と表記) のバイオマス量は 3.9 g DCW/L に達した一方、Strain 1 は 2.1 g DCW/L であり、アスタキサンチン合成遺伝子の挿入が生育に負の影響を与えたと思われる。一方、Strain 1 の培養液は WT 株より濃い緑色を呈し、Strain 1 における色素生産が変化したことが示唆された。

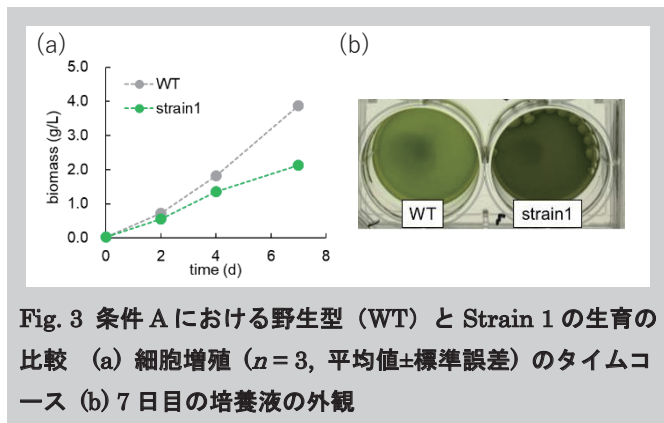


Fig. 3 条件 A における野生型 (WT) と Strain 1 の生育の比較 (a) 細胞増殖 ( $n=3$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差) のタイムコース (b) 7 日目の培養液の外観

続いて、WT 株および Strain 1 における  $\beta$ -カロテンおよびその誘導体を含む色素の生成を評価した。色素を UPLC-PDA によって定量化し、その結果を Fig. 4 に示した。WT では、ゼアキサンチンおよび  $\beta$ -カロテンが主要なカロテノイドとして細胞内に蓄積されていた。Strain 1 では WT における主要カロテノイドの蓄積量が減少し、アドニルビン、アドニキサンチンおよびアスタキサンチンが蓄積していた。特に、Strain

1 ではアスタキサンチンが主要な色素であり、蓄積量は 6.63 mg/g-DCW に達した。

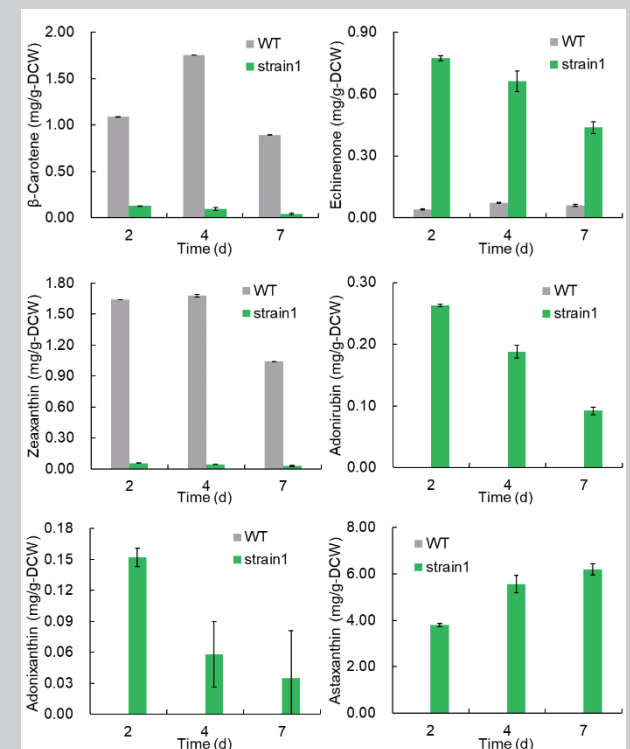


Fig. 4 色素生産量 ( $n=3$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差) の比較

## (2) *dxs*, *crtE*, *fbp/sbp* 過剰発現の効果検証

アスタキサンチン生産性をさらに向上させるため、イソプレノイドおよび/またはカロテノイド生産を促進することが報告されている *dxs*, *crtE*, *fbp/sbp* の 3 つの遺伝子を評価した。

先行研究では、*Deinococcus radiodurans* 由来の *dxs* を *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入することでイソプレノ生産性が向上することが示されている<sup>17)</sup>。本研究では、同様の効果が *Synechococcus* sp. PCC 7002 で観察されるかを検証するため、*D. radiodurans* 由来の *dxs* を発現する Strain 2 を構築・評価した。また、MEP 経路の重要な酵素であり、*Synechocystis* sp. PCC 6803 でリモネン生産性を向上させることが知られている<sup>18)</sup> ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素 (CrtE) を過剰発現する Strain 3 を構築した。さらに、シアノバクテリアの Calvin 回路における律速酵素と考えられ、改良により、光合成能力を向上させることが報告されている<sup>19)・21)</sup> FBP/SBPase を過剰発現する Strain 4 も同時に評価した。各遺伝子 (*dxs*, *crtE*, *fbp/sbp*) は、強力な内因性プロモーターである *psbA2* プロモーターまたは *rbcL* プロモーターの制御下で発現させた (Fig. 5 (a))。

Strain 2 および Strain 3 は、Strain 1 と類似した成長を示したが、Strain 4 において培養 4 日目以降に生育が向上

した (Fig. 5 (b)). 続いて、各株のアスタキサンチン含量を Fig. 5 (c) に示した。Strain 2 のアスタキサンチン含量は、Strain 1 と同等であった。Strain 3 では、培養 2 日目にアスタキサンチン含量が Strain 1 の約 1.6 倍に増加し、4.6 mg/g-DCW に達した一方、Strain 4 の培養 4 日目以降のアスタキサンチン含量は減少した。アスタキサンチン生産性は Strain 2 および Strain 3 の 2 株で増加し、Strain 3 では最大 2.5 mg/L/day に到達した (Fig. 5 (d)). 結果より、アスタキサンチン生産株 (Strain 1) における *dxs* または *crtE* の過剰発現が生産性向上に寄与することが示された。

しかし、*fbp/sbp* の過剰発現は *Synechocystis* sp. PCC 6803 においてアスタキサンチン生産性を向上させる効果があった一方で<sup>18)</sup>、*Synechococcus* sp. PCC 7002 由来の Strain 4 では逆の効果を示した。この結果より、*Synechococcus* sp. PCC 7002 におけるアスタキサンチン生産性を向上させるためには、株特異的な戦略が必要であることを示唆された。そのため、未知のボトルネック反応を明らかにし、新たな強化のターゲットとするために、メタボローム解析を実施した。

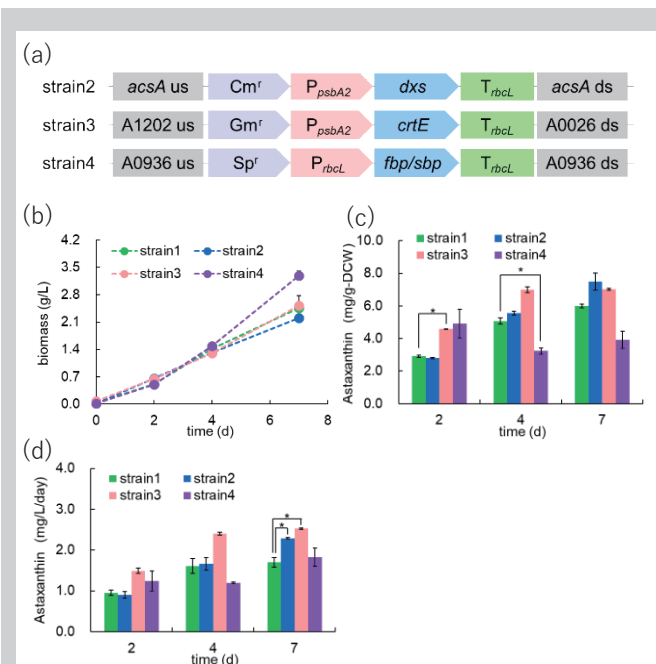


Fig. 5 Calvin 回路と MEP 経路中の遺伝子の過剰発現(a) ターゲット遺伝子の概要 (b) バイオマス量のタイムコース (c) アスタキサンチン含有量の比較 (d) アスタキサンチン生産性の評価 ( $n=3$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差,  $*p<0.05$ )

### (3) メタボローム解析による律速段階の特定

Fig. 4 より、*crtZ/crtW* の導入により、色素だけでなく、細胞内代謝にも変化が生じたと推測した。そこで、Strain 1

のアスタキサンチン生産におけるボトルネックを特定することを目的にメタボローム解析を行った。Strain 1 ではアスタキサンチンのほかに中間体の蓄積量が増加していたため、前駆体である  $\beta$  カロテンの供給量も増加していると考えた。そこで、 $\beta$  カロテンの供給に関与する Calvin 回路、解糖系、MEP 経路、の代謝物を対象とし、CE/MS による解析を行った。

メタボローム解析の結果を Fig. 6 に示した。解糖系では両株の中間体量に大きな差異は見られなかった。一方、Strain 1 では、培養 7 日目に Calvin 回路内のセドヘプツコース 7-リン酸 (S7P) の濃度が上昇していた。また両株とも、培養 2、4 日目において MEP 経路内の 2-*C*-メチル-D-エリトリトール 2,4 シクロピロリン酸 (MEcPP) が比較的高濃度で蓄積していることが確認された。

以上の結果より、S7P および MEcPP の変換がアスタキサンチン生産の律速段階となっていることが示唆された。より生産性の高い株を作製するために、上記 2 工程の変換を促進するよう Strain 1 の改変を実施した。

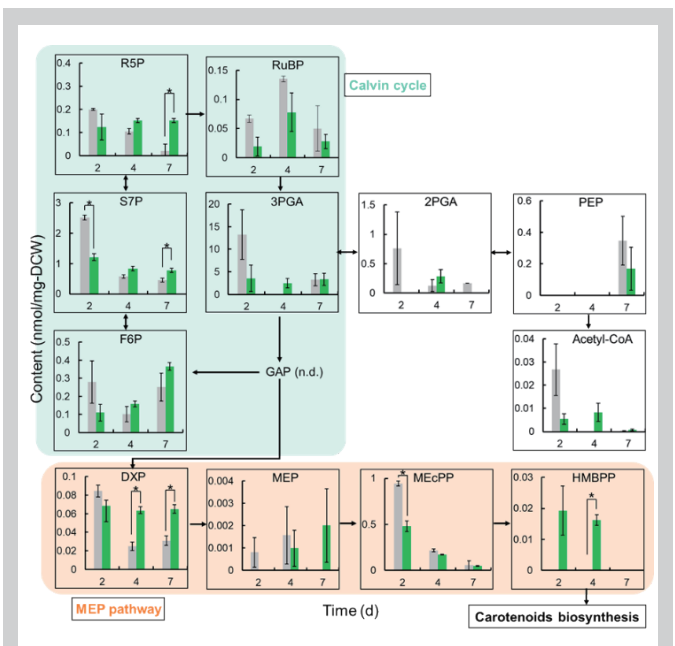


Fig. 6 WT (灰色) と Strain 1 (緑色) のメタボローム解析結果の比較 ( $n=3$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差,  $*p<0.05$ , n. d. = not detected)

### (4) 改良株の作製・評価

メタボローム解析に基づき、S7P からリボース 5-リン酸 (R5P) への変換および MEcPP から (*E*)-4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルピロリン酸 (HMBPP) への変換が、アスタキサンチン生産における代謝ボトルネックである可能性が示唆された。そのため Strain 1 を基として、推定ボトルネック反応の改善を指向した 2 つの新規株を構築した。具体



的には、内因性 *tkt* にコードされるトランスケトラーゼ (TKT) および内因性 *ispG* にコードされる HMBPP シンターゼ (IspG) をそれぞれ過剰発現する株 2 種を作製した (Fig. 7 (a)). *tkt* は *acsA*<sup>16)</sup> に導入され、TKT 過剰発現株である Strain 5 を得た。一方、*ispG* は、A0026<sup>22)</sup> に挿入し、IspG 過剰発現株である Strain 6 を構築した。

Strain 5 は Strain 1 と比較してバイオマスがわずかに減少したが、Strain 6 は Strain 1 と類似した成長を示した (Fig. 7 (b)). 培養 7 日目に、Strain 5 および Strain 6 のバイオマス量はそれぞれ 2.5 g DCW/L および 2.7 g DCW/L に到達した。Strain 5 ではアスタキサンチン含有量が 10.3 mg/g-DCW に増加した一方で、Strain 6 では Strain 1 と比較してアスタキサンチン含有量に顕著な変化は見られなかった (Fig. 7 (c)). また、アスタキサンチン含有量は増加したが、Strain 6 はバイオマスがやや低下したため、アスタキサンチン生産性については顕著な改善は見られなかった (Fig. 7 (d)).

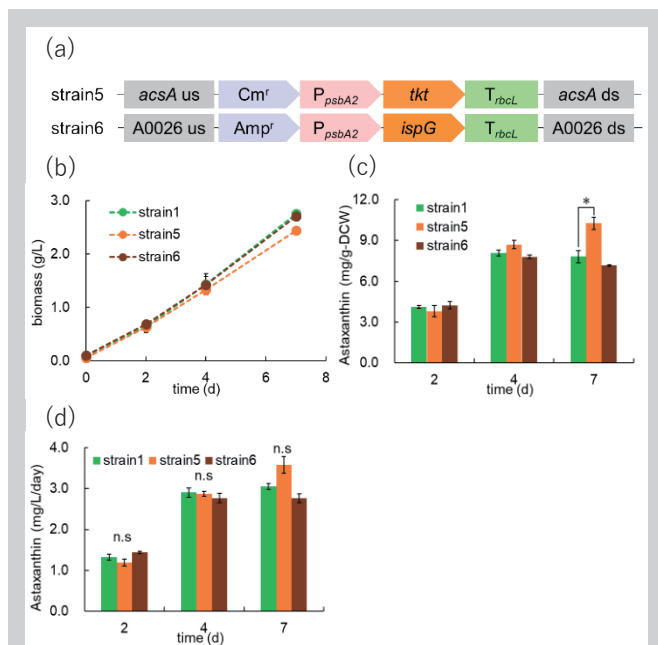


Fig. 7 ボトルネック解消後のアスタキサンチン生産評価 (a) *acsA* または A0026 領域へのボトルネック遺伝子の導入 (b) 細胞増殖のタイムコース (c) アスタキサンチン含有量 (d) 1 日あたりのアスタキサンチン生産性 ( $n=3$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差, \*  $p<0.05$ , n. s. = not significant)

続いて、Strain 5 および Strain 6 においてボトルネックが解消されているかを検証するため、再度メタボローム解析を実施した。TKT および IspG が触媒する酵素反応の基質および生成物の細胞内濃度を Fig. 8 に示した。Strain 5 では、TKT の基質である S7P の細胞内濃度が、培養 2 日目および 4 日目において Strain 1 と比較して減少していること

が確認された (Fig. 8 (a)). 同様に、Strain 6 では、IspG の基質である MEcPP の濃度が Strain 1 よりも低く、検出下限を下回った (Fig. 8 (b)). 以上の結果より、標的遺伝子の過剰発現が Strain 1 にて同定された代謝ボトルネックを緩和したことが示された。さらに、Strain 5 においてアスタキサンチン含量の増加を示したことより、*tkt* を標的とした遺伝子改変が、ねらい通り機能したことが明らかとなった。

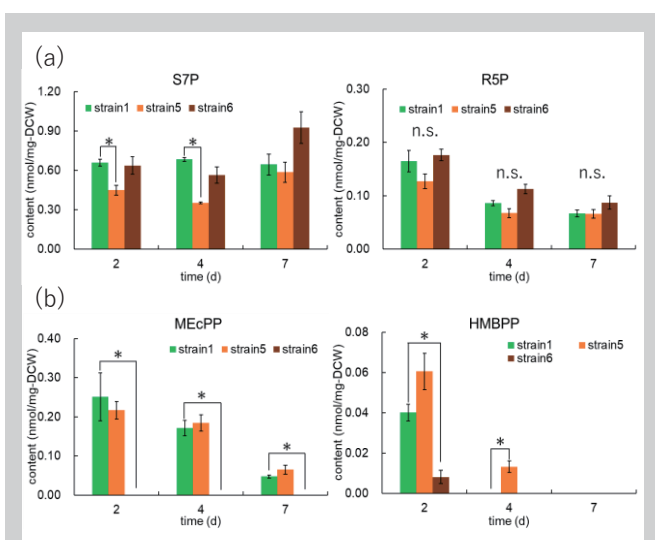


Fig. 8 ボトルネック解消後のメタボローム解析 (a) TKT 過剰発現によるプールサイズの変化 (b) IspG 過剰発現によるプールサイズの変化 ( $n=3$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差, \*  $p<0.05$ , n. s. = not significant)

Strain 6 において含有量が向上しなかった原因として、IspG より下流の工程において新たなボトルネックが生じてしまったと考えている。MEP 経路に含まれるジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) やイソペンテニルニリン酸 (IPP) の蓄積が MEP 経路を阻害するほか、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (IDI) の活性の低さが律速となることが報告されており、今後、これらの課題を解決することで、更なる生産性向上の達成が可能であると考えている。

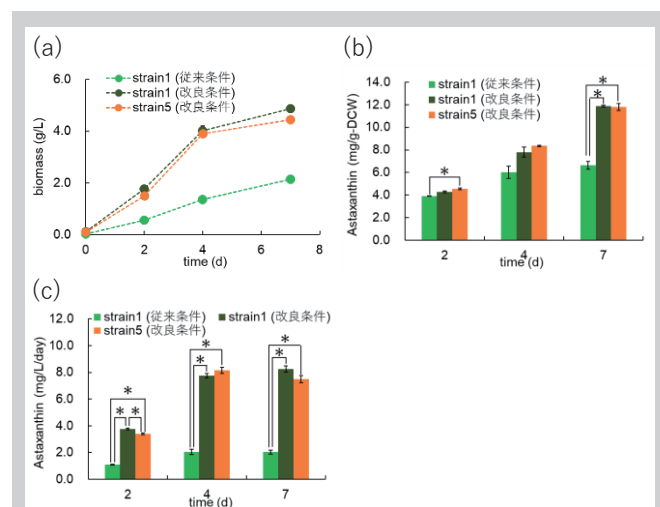
## (5) 培養条件改良によるバイオマス量の向上

先行研究にて、高光強度条件下で MAD2 培地を使用した場合に高いバイオマス収量を達成することが報告されている<sup>23), 24)</sup>。そのため、アスタキサンチン生産能を有する改変株 (Strain 1 および Strain 5) にて同様の効果を得ることができるか、2 種の培養条件 (条件 A および条件 B) の比較を行った。条件 A は標準的な培養条件である A2 培地、初期 OD<sub>750</sub> = 0.1 で培養を開始し、30 °C、2% (v/v) CO<sub>2</sub> 条件下で、100  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s の白色光を照射しながら 100 rpm で 7 日間振とう培養を行った。一方、条件 B は高密度培養条件として MAD2 培地、初期 OD<sub>750</sub> = 0.5 にて培養を開始し

た。38 °C、5% (v/v) CO<sub>2</sub> 条件下で 150 μmol/m<sup>2</sup>/s 白色光を照射しながら 150 rpm で一晚培養後、500 μmol/m<sup>2</sup>/s まです強度を増加し、さらに 6 日間培養を継続した。

条件 B にて、Strain 1 は顕著なバイオマス量増加を示し、最大乾燥細胞重量は 4.9 g DCW/L と、条件 A におけるバイオマス量の約 2 倍となった (Fig. 9 (a))。この結果は、培養条件の最適化がバイオマス量を大幅に向上させる可能性を示しており、アスタキサンチン生産性改善に寄与する可能性が示された。また条件 B、培養 7 日目において、Strain 1 のアスタキサンチン含量は有意に増加した (Fig. 9 (b))。

続いて、条件 A で最も高い生産性を示した Strain 5 を条件 B で評価した。条件 B、培養 7 日目の Strain 5 のバイオマスは Strain 1 よりやや低かったものの (Fig. 9 (a))、アスタキサンチン含量は 11.8 mg/g-DCW と、条件 A で観察された値より顕著に増加した。また、アスタキサンチン生産性は 7 日目に 7.5 mg/L/day に達したが、同一条件下で培養された Strain 1 の生産性との間に有意差は認められなかった (Fig. 9 (c))。この結果より、光飽和条件下における *tkt* の過剰発現が、成長の抑制や下流のボトルネックなど、他の生理的な制約によって制限される可能性が示唆された。



**Fig. 9 培養条件変更後のアスタキサンチン生産評価 (a) 細胞増殖のタイムコース (b) アスタキサンチン含有量 (c) 1 日当たりのアスタキサンチン生産性 ( $n = 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差, \*  $p < 0.05$ , n. s. = not significant)**

#### 4 考察

Strain 1 と WT の比較により、*crtZ* および *crtW* の導入によって  $\beta$ -カロテンおよびゼアキサンチンの蓄積量が減少した一方、エキネノンやアドニルビンなどのアスタキサンチン中間体の濃度が増加することが明らかとなった (Fig. 4 (e))。先行研究では、*crtZ* および *crtW* は pAQ プラスミドから発現していたが<sup>9)</sup>、本研究ではこれらの遺伝子を染色体へ導入し

た。一般に、プラスミドベースの発現はコピー数の増加と酵素発現量の向上をもたらす一方、ゲノムベースの発現は長期間の培養における遺伝的安定性を向上させる<sup>25)</sup>。実際に、*Synechococcus* sp. PCC 7002 において pAQ からのタンパク質発現がゲノム統合による発現よりも桁違いに高いことが報告されている<sup>26)</sup>。しかし、Strain 1 におけるアスタキサンチン蓄積量 (6.63 mg/g-DCW) は、先行研究<sup>9)</sup>の約 2 倍であった。今後、プラスミドコピー数、遺伝子発現量、およびタンパク質量の測定による原因究明が期待される。

また、*tkt* を過剰発現させた Strain 5 は、組換え株の中で最も高いアスタキサンチン含有量および生産性を達成し、それぞれ 10.3 mg/g-DCW および 3.5 mg/L/day に到達した (Fig. 7 (c), (d))。TKT はカルビン回路内の代謝工学ターゲットとして知られており、以前にはシアノバクテリアにおけるエタノール生産の向上に使用された<sup>27)</sup>。一方、カルビン回路内の他の酵素、例えば F/SBPase やリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) は、シアノバクテリアにおける炭素固定やバイオマス生産の向上を目的としてより頻繁にターゲットとされている<sup>20), 21)</sup>。しかし本研究では、F/SBPase の過剰発現によってアスタキサンチン生産は減少しており、どの酵素の過剰発現が産物収量を向上させるかを予測することは困難であり、メタボローム解析による有効なターゲットの特定が重要であることが示された。一方、MEcPP の蓄積が緩和され、IspG が触媒するステップが制限因子ではなくなったにもかかわらず、*ispG* の過剰発現はアスタキサンチン含有量の増加をもたらさなかった (Fig. 7, Fig. 8)。これは、新たな下流のボトルネックの出現や代謝フラックスのバランスによるものと推測している。同様の結果は *E. coli* でも報告されており、*ispG* の過剰発現が中間体 HMBPP の蓄積、細胞成長の減少、およびカロテノイド生産の低下を引き起こし、下流酵素 *ispH* を共発現させバランスを調整することで改善された<sup>28)</sup>。今後代謝解析を進め、ボトルネックの解明・改善を通して、さらなる生産性向上が期待される。

高細胞密度条件 (条件 B) で培養した場合、Strain 5 は標準条件 (条件 A) の時より生産性が向上したが、同じく条件 B にて培養した Strain 1 と同程度の生産性に留まった。この結果より、特に光飽和条件下で、RuBisCO 活性、ATP/NADPH 再生、または CO<sub>2</sub> 供給などの他の制限要因に代謝ボトルネックが移行する可能性が示唆された<sup>29)</sup>。このような条件下では、*tkt* の過剰発現によるカルビン回路フラックスのさらなる増加が全体的な炭素同化を向上させる可能性は低く、*Synechococcus* sp. PCC 7002 の株改良、および培養条件のさらなる最適化が求められる。

## 5 結論

本研究では代謝解析に基づいた合理的な遺伝子改変戦略により、アスタキサンチン生産に有用な株を開発した。

また、培養条件の改良がさらなる生産性向上につながる可能性を示すことができた。今後、代謝解析を駆使した株の改変および培養条件の最適化を進めることで、アスタキサンチンの大量生産法の確立が期待される。

## 6 謝辞

本研究は神戸大学蓮沼誠久教授、田中謙也准教授、富山県立大学加藤悠一講師との共同研究として実施した。研究にあたりご指導いただいた同教授、ならびに研究室の方々に感謝の意を表す。

本論文は米国化学会誌 (ACS Synthetic Biology) に掲載された”Astaxanthin Overproduction Enhanced by Metabolomics-Guided Rational Metabolic Engineering in *Synechococcus* sp. PCC 7002”

(<https://doi.org/10.1021/acssynbio.5c00490>) を CC BY 4.0 ライセンスの下で転載しています。

## 引用文献

- 1) N. Shimidzu, M. Goto, W. Miki, *Fish. Sci.*, **62**, 134-147 (1996).
- 2) H. Jyonouchi, S. Sun, K. Iijima, M. D. Gross, *Nutr. Cancer*, **36**, 59-65 (2009).
- 3) S.-Q. Sun, Y.-X. Zhao, S.-Y. Li, J.-W. Qiang, Y.-Z. Ji, *Mar. Drugs*, **18**, 415 (2020).
- 4) N. Ito, S. Seki, F. Ueda, *Nutrients*, **25**, 817 (2018).
- 5) C. Afalo, Y. Meshulam, A. Zarka, S. Boussiba, *Biotechnol. Bioeng.*, **98**, 300-305 (2007).
- 6) J. K. de la Fuente, M. Rodriguez-Sáiz, C. Schleissner, B. Díez, E. Peiro, J. L. Baredo, *J. Biotechnol.*, **148**, 144-146 (2010).
- 7) T. Ide, M. Hoya, T. Tanaka, S. Harayama, *Biochem. Eng. J.*, **65**, 37-43 (2012).
- 8) H. Cui, X. Zhu, X. Yu, S. Li, K. Wang, L. Wei, R. Li, S. Qin, *Biotechnol. Adv.*, **109**, 57 (2025).
- 9) T. Hasunuma, A. Takaki, M. Matsuda, Y. Kato, C. J. Vavricka, A. Kondo, *ACS Synth. Biol.*, **8**, 2701-2709 (2019).
- 10) M. Ludwig and D. A. Bryant, *Front. Microbiol.*, **2**, 41

(2011).

- 11) T. Hasunuma, M. Matsuda, Y. Senga, S. Aikawa, M. Toyoshima, G. Shimakawa, C. Miyake, A. Kondo, *Biotechnol. Biofuel.*, **7**, 293 (2014).
- 12) T. Hasunuma, S.-I. Miyazawa, S. Yoshimura, Y. Shinzai, K.-I. Tomizawa, K. Shindo, S.-K. Choi, N. Misawa, C. Miyake, *Plant J.*, **55**, 857-868 (2008).
- 13) Y. Zhu, J. E. Graham, M. Ludwig, W. Xiong, R. M. Alvey, G. Shen, D. Bryant, *Arch. Biochem. Biophys.*, **504**, 86-99 (2010).
- 14) S.-K. Choi, H. Harada, S. Matsuda, N. Misawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1335-1341 (2007).
- 15) T. Tsuchiya, S. Takaichi, N. Misawa, T. Maoka, H. Miyashita, M. Mimuro, *FEBS Lett.*, **579**, 2125-2129 (2005).
- 16) M. B. Begemann, E. K. Zess, E. M. Walters, E. F. Schmitt, A. L. Markley, B. F. Pfeleger, *PLoS ONE*, **8**, e76594 (2013).
- 17) E. Englund, K. Shabestary, E. P. Hudson, P. Lindberg, *Metab. Eng.*, **49**, 164-177 (2018).
- 18) H. Kiyota, Y. Okuda, M. Ito, M. Y. Hirai, M. Ikeuchi, *J. Biotechnol.*, **185**, 1-7 (2014).
- 19) J. Diao, X. Song, L. Zhang, J. Cui, L. Chen, W. Zhang, *Metab. Eng.*, **61**, 275-287 (2020).
- 20) F. Liang, E. Englund, P. Lindberg, P. Lindblad, *Metab. Eng.*, **46**, 51-59 (2018).
- 21) A. J. De Polcellinis, H. Nørgaard, L. M. F. Brey, S. M. Erstad, P. R. Jones, J. L. Heazlewood, Y. Sakuragi, *Metab. Eng.*, **47**, 170-183 (2018).
- 22) M. Wang, G. Luan, X. Lu, *J. Biotechnol.*, **195**, 37-40 (2019).
- 23) A. Włodarczyk, T. T. Selão, B. Norling, P. J. Nixon, *Commun. Biol.*, **3**, 215 (2020).
- 24) A. M. Ruffing, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2**, 17 (2014).
- 25) P. F. Xia, H. Ling, J. L. Hoo, M. W. Chang, *Biotechnol. J.*, **14**, e1800496 (2019).
- 26) N. E. Nozzi, A. E. Case, A. L. Carroll, S. Atsumi, *ACS Synth. Biol.*, **6**, 2136-2144 (2017).
- 27) T. Roussou, A. Albergati, F. Liang, P. Lindblad, *Metab. Eng. Commun.*, **12**, e00161 (2021).
- 28) S. Kajiwarra, P. D. Fraser, K. Kondo, N. Misawa, *Biochem. J.*, **324**, 421-426 (1997).
- 29) P. E. Jensen and D. Leister, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2**, 7 (2014).