

令和元年6月18日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18649

研究課題名(和文)カンキツ果実における植物ホルモンと二次代謝産物の代謝コミュニケーションの解明

研究課題名(英文) Elucidation of metabolic communication of plant hormones and secondary metabolites in citrus fruit

研究代表者

馬 剛 (Ma, Gang)

静岡大学・農学部・特任助教

研究者番号：20767412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：カロテノイド生合成経路の周辺には、植物ホルモンのアブシジン酸やジベレリン、色素成分のクロロフィルなど多くのカンキツ果実の品質に関わる物質の生合成経路が存在する。また、カンキツに多く蓄積するフラボノイドについても、生合成経路の周辺には、植物ホルモンのサリチル酸やジャスモン酸の生合成経路が存在する。本研究では、カンキツ培養砂じょうを用いて、植物ホルモンとカンキツ果実特有の二次代謝産物を中心とした代謝コミュニケーションを明らかにすることを目的とした。マイクロアレイ解析の結果、これらの物質間において代謝コミュニケーションを行い、様々な代謝に関わる酵素遺伝子の発現を調節していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、機能性成分である クリプトキサンチンに着目して研究を行った。 - クリプトキサンチンは、ビタミンA効力を有するほか、発ガン予防効果、骨代謝改善に関する研究が近年急速に進展し、ヒトへの効能が注目されているカロテノイドである。また、カンキツ果実には特有の二次代謝産物が多く含まれており、フラボノイドのヘスペリジンやノビレチンもその機能性が注目されている。本研究では、これらの機能性成分と植物ホルモンの関係性を明らかにする研究であり、カンキツ果実の高品質化に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Carotenoids and flavonoids are important bioactive compounds massively accumulated in citrus fruits. In plants, carotenoid shares a common biosynthetic pathway with chlorophyll, abscisic acid and gibberellins, while flavonoid metabolism is closely related to the biosynthesis of salicylic acid and jasmonic acid. In the present study, the relationship between the plant hormones biosynthesis and accumulation of carotenoid and flavonoid were investigated in citrus juice sacs in vitro. The microarray results showed that there was a communication in the biosyntheses of plant hormones, carotenoids and flavonoids, and the expression of genes related to carotenoid and flavonoid biosyntheses were regulated by the treatments of plant hormones.

研究分野：収穫後生理学

キーワード：カンキツ カロテノイド フラボノイド 植物ホルモン マイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドは、赤、黄、オレンジ色を示す 750 種以上にも及ぶ重要な植物色素の一群である。このカロテノイド生合成経路の周辺には、植物ホルモンのジベレリンおよびアブシジン酸の生合成が密接に関係している。ジベレリンは、カロテノイドの前駆物質であるゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) から生合成される。アブシジン酸は、カロテノイドの 9-cis-ピオラキサンチンまたは 9'-cis-ネオキサンチンから生合成される。最近では、分枝の抑制にはたらくストリゴラクトンが、 β -カロテンから生合成されることが明らかとなっている。また、 β -カロテンからは、キンモクセイの主要な芳香成分である β -イオンも生合成される。さらに、クロロフィルのフィトール側鎖は、GGPP から生合成される。このように、カロテノイドは、色素成分としてだけではなく、その生合成経路の周辺には植物ホルモン、芳香成分、クロロフィルの生合成経路があることから、カンキツ果実の成熟の調節や高品質化に重要であるとされている。

これまで研究代表者のグループは、カンキツ果実のカロテノイドである β -クリプトキサンチンの集積やその含量の調節に関する研究を行ってきた。 β -クリプトキサンチンは、ビタミン A として作用するほか、発ガン抑制作用、骨粗しょう症の予防など生活習慣病の予防に効果が期待される機能性成分である。 β -クリプトキサンチンの集積に関する研究では、 β -クリプトキサンチンを蓄積するウンシュウミカン、ピオラキサンチンを蓄積するバレンシアオレンジ、カロテノイド含量の少ないリスボンレモンのカロテノイド生合成・分解に関わる遺伝子の発現を調査することにより、 β -クリプトキサンチンの集積メカニズムを明らかにしてきた。また、 β -クリプトキサンチン含量の調節に関する研究では、カンキツ果実の砂じょうを培養し、LED による様々な波長 (色) の光照射、ジベレリンやアブシジン酸などの植物ホルモン、水分ストレスに関与する糖やマンニトールを培地に添加することが β -クリプトキサンチン含量の調節にどのような影響を与えるか、カロテノイド生合成・分解に関わる遺伝子の発現を調査することにより明らかにした。

2. 研究の目的

カロテノイド生合成経路の周辺には、植物ホルモンのアブシジン酸やジベレリン、色素成分のクロロフィル、芳香成分の β -イオンの生合成経路が存在する。また、カンキツに多く蓄積するフラボノイドについても、生合成経路の周辺には植物ホルモンのサリチル酸やジャスモン酸の生合成経路が存在する。これらのカロテノイドおよびフラボノイドは、色素成分としてのはたらくだけではなく、その生合成経路の周辺には植物ホルモン、芳香成分、クロロフィルの生合成経路があり、カンキツ果実の成熟の調節や高品質化に重要である。

本研究では、カンキツ培養砂じょうにおける植物ホルモンとカンキツ果実特有な二次代謝産物を中心とした代謝コミュニケーションを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

青色 LED および植物ホルモン処理により、植物ホルモン、二次代謝産物およびそれらに関連する遺伝子の発現を明らかにするため、カロテノイドおよびフラボノイドのウンシュウミカンの培養砂じょうを用いて次の実験を行った。

(1) ウンシュウミカンの砂じょうを用いた培養

ウンシュウミカンの砂じょうを、10%スクロースを加えた MS 培地に植え、20℃で培養した。実験 1 では光照射区として青色 LED 照射下で培養し、実験 2 および実験 3 では植物ホルモンを添加した培地で培養した。

(2) カロテノイドおよびフラボノイド含量・組成の調査

培養砂じょうにおけるカロテノイドおよびフラボノイドの含量および組成を HPLC により測定した。検出されたカロテノイドは、 β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、ルテイン、9-cis-ピオラキサンチンおよび All-trans-ピオラキサンチンであった。また、検出されたフラボノイドは、エリオシトリン、ナリルチン、ヘスペリジン、ポンシリンおよびロイフォルインであった。

(3) マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析

培養砂じょうから RNA を抽出し、農研機構果樹茶業研が設計した 8×60K カスタムマイクロアレイ (Agilent Technologie 社製) および Subio (Subio 社) を用いてマイクロアレイ解析を行った。このマイクロアレイには、クレメンティン (*Citrus clementina* hort. Ex Tanaka) の全ゲノム配列から予想された 33,929 個の遺伝子のうち、プローブ設計が可能な 30,826 個の遺伝子に由来するプローブが搭載されている。また、各生合成経路の代謝マップおよび関連する遺伝子の情報は KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) から得た。解析に用いた遺伝子名は、表 1 ~ 表 4 に示した。

4. 研究成果

(1) 培養砂じょうにおける青色光照射がカロテノイド代謝に及ぼす影響

青色光を照射した培養砂じょうにおけるカロテノイド含量および代謝関連遺伝子の発現量の

変動を調査した。青色 LED を用いた光照射区では、前駆物質から GGPP、および GGPP からカロテノイドの生合成経路の遺伝子発現が増大した（図 1）。これらの遺伝子発現の上昇は、培養砂じょうにおいてカロテノイド含量が増大する結果と良く一致していた。また、青色光照射区においてクロロフィルを生合成する 2 つの経路に関わる遺伝子の発現量がいずれも上昇したことから、青色光照射区で砂じょうが緑色を帯びるのはクロロフィルの増大によることが強く示唆された。

以上の結果から、青色光を照射することにより、カロテノイド生合成に関わる遺伝子の発現量が上昇するだけでなく、GGPP およびクロロフィルの生合成に関わる遺伝子の発現量が増大することから、カロテノイドおよびクロロフィルの代謝経路は、拮抗関係ではなく、どちらも含量の増大が促進されることが示唆された。

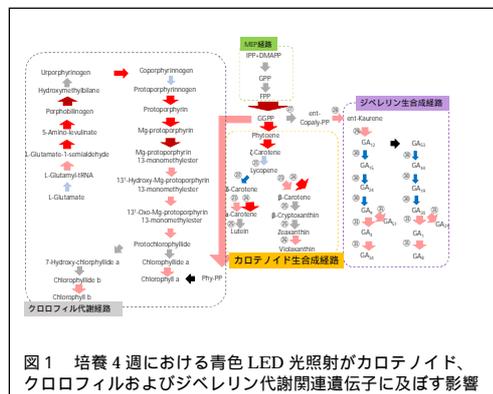


図 1 培養 4 週における青色 LED 光照射がカロテノイド、クロロフィルおよびジベレリン代謝関連遺伝子に及ぼす影響

(2) 培養砂じょうにおける植物ホルモンがカロテノイド代謝に及ぼす影響

植物ホルモンを処理した培養砂じょうにおけるカロテノイド含量および関連遺伝子の発現量の変動を調査した。

カロテノイド含量と代謝関連遺伝子の関係では、オーキシン処理ではリコペンから クリプトキサンチンまでの遺伝子の発現上昇に伴い、クリプトキサンチンが増大した。サリチル酸、サイトカイニン処理およびジャスモン酸処理では、GGPP からジベレリン生合成経路の遺伝子、リコペンから - カロテンへの遺伝子の発現上昇に伴い、ピオラキサンチンが減少した（図 2）。さらにジャスモン酸処理ではピオラキサンチンを分解する遺伝子発現が上昇したため、総カロテノイド含量の減少につながった（図 3）。

以上の結果から、カンキツ培養砂じょうでは、植物ホルモンを処理することにより、カロテノイド代謝に関わる遺伝子の発現が変動し、カロテノイド含量が調節されることが示唆された。

植物ホルモン生合成関連遺伝子の関係では、サリチル酸、ジャスモン酸およびサイトカイニン処理によりアブシジン酸の生合成関連遺伝子の発現が抑制された。ジャスモン酸処理により一部のサリチル酸生合成関連遺伝子の発現が抑制された。一方でサリチル酸処理により一部のジャスモン酸生合成に関わる遺伝子発現が抑制された。以上の結果から、カンキツ培養砂じょうでは、サイトカイニンとアブシジン酸は互いに拮抗作用があると考えられた。また、サリチル酸、ジャスモン酸およびアブシジン酸は相互に抑制的に制御していることが示唆された。

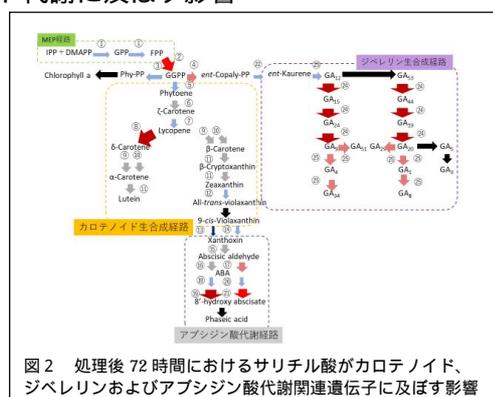


図 2 処理後 72 時間におけるサリチル酸がカロテノイド、ジベレリンおよびアブシジン酸代謝関連遺伝子に及ぼす影響

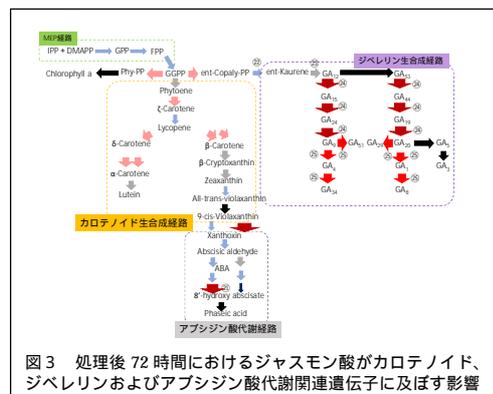


図 3 処理後 72 時間におけるジャスモン酸がカロテノイド、ジベレリンおよびアブシジン酸代謝関連遺伝子に及ぼす影響

(3) 培養砂じょうにおける植物ホルモンがフラボノイド代謝に及ぼす影響

植物ホルモンを処理した培養砂じょうにおけるフラボノイド含量および代謝関連遺伝子の発現量の変動を調査した。

フラボノイド含量と代謝遺伝子の関係では、オーキシン処理、サイトカイニン処理およびエチレン処理では *CitCHI* の発現減少に伴い総フラボノイド含量が減少した。ジャスモン酸処理では、p-クマロイル CoA から分岐する経路の遺伝子発現上昇により総フラボノイド含量が減少した（図 4）。一方、サリチル酸処理では *CitCHS2* の発現上昇に伴い総フラボノイド含量が増大した（図 5）。以上の結果から、カンキツ培養砂じょうでは、植物ホルモンを処理することにより、フラボノイド代謝に関わる遺伝子の発現が変動し、フラボノイド含量が調節されることが示唆された。

植物ホルモン生合成関連遺伝子の関係では、サリチル酸処理によりジャスモン酸生合成関連

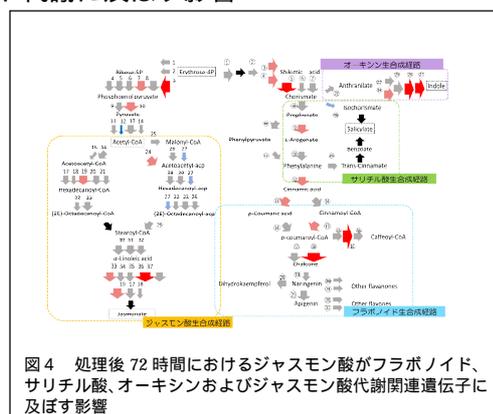


図 4 処理後 72 時間におけるジャスモン酸がフラボノイド、サリチル酸、オーキシンおよびジャスモン酸代謝関連遺伝子に及ぼす影響

遺伝子の発現が抑制された。一方でジャスモン酸処理によりサリチル酸合成関連遺伝子の発現が抑制された。以上の結果から、カンキツ培養砂じょうでは、サリチル酸およびジャスモン酸は相互に抑制的に制御していることが示唆された。

表1 マイクロアレイ解析に用いた代謝関連遺伝子(実験1)

No.	mRNA	Gene Name
	Ciclev10000427m	glutamylglutaminyl-tRNA synthetase, class 1c
	Ciclev10000765m	glutamyl-tRNA reductase family protein
	Ciclev10031685m	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2
	Ciclev10001240m	aldolase superfamily protein
	Ciclev10031858m	hydroxymethylbilane synthase
	Ciclev10001965m	uroporphyrinogen-III synthase family protein
	Ciclev10031799m	uroporphyrinogen decarboxylase
	Ciclev10011903m	coproporphyrinogen III oxidase
	Ciclev10019590m	flavin containing amine oxidoreductase family
	Ciclev10013671m	magnesium chelatase 12
	Ciclev10032125m	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase
	Ciclev10011842m	dicarboxylate diiron protein, putative (Crd1)
	Ciclev10000821m	phosphoribide a oxygenase family protein with Rieske [2Fe-2S] domain
	Ciclev10011985m	ubiA prenyltransferase family protein
	Ciclev10008529m	protoclorophyllide oxidoreductase A
	Ciclev10030419m	geranylgeranyl reductase
	Ciclev10008853m	farnesyl diphosphate synthase 2
	Ciclev10002201m	geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1
	Ciclev10011750m	phytoene synthase
	Ciclev10031587m	phytoene desaturation 1
	Ciclev10002967m	zeta-carotene desaturase
	Ciclev10008410m	lycopene beta/epsilon cyclase protein
	Ciclev10004730m	Lycopene beta-cyclase 1
	Ciclev10028245m	Lycopene beta-cyclase 2
	Ciclev10011312m	cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3
	Ciclev10025089m	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)
	Ciclev10014639m	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5
	Ciclev10019364m	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3
	Ciclev10012414m	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
	Ciclev10027685m	aldehyde oxidase 1
	Ciclev10027682m	abscisic aldehyde oxidase 3
	Ciclev10011655m	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1
	Ciclev10028346m	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 2
	Ciclev10028355m	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 4
	Ciclev10001043m	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 4
	Ciclev10006575m	Terpenoid cyclases/Rossmann-fold superfamily protein
	Ciclev10019986m	cytochrome P450, family 88, subfamily A, polypeptide 3
	Ciclev10005157m	gibberellin 20-oxidase
	Ciclev10005385m	gibberellin 2-oxidase 4

表2 マイクロアレイ解析に用いた代謝関連遺伝子(実験2)

No.	mRNA	JGI Name
	Ciclev10008853m	farnesyl diphosphate synthase 2
	Ciclev10002201m	geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1
	Ciclev10030419m	geranylgeranyl reductase
	Ciclev10018875m	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
	Ciclev10011750m	PHYTOENE SYNTHASE
	Ciclev10031587m	phytoene desaturation 1
	Ciclev10002967m	zeta-carotene desaturase
	Ciclev10008410m	Lycopene beta/epsilon cyclase protein
	Ciclev10004730m	Lycopene beta-cyclase 1
	Ciclev10028245m	Lycopene beta-cyclase 2
	Ciclev10011312m	cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3
	Ciclev10025089m	zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)
	Ciclev10014639m	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5
	Ciclev10019364m	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3
	Ciclev10012414m	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
	Ciclev10027685m	aldehyde oxidase 1
	Ciclev10027682m	abscisic aldehyde oxidase 3
	Ciclev10011655m	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1
	Ciclev10028346m	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 2
	Ciclev10028355m	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 4
	Ciclev10001043m	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 4
	Ciclev10006575m	Terpenoid cyclases/Rossmann-fold superfamily protein
	Ciclev10019986m	cytochrome P450, family 88, subfamily A, polypeptide 3
	Ciclev10005157m	gibberellin 20-oxidase
	Ciclev10005385m	gibberellin 2-oxidase 4

表3 マイクロアレイ解析に用いた代謝関連遺伝子(実験3)

No.	mRNA	JGI_NAME
	Ciclev10025342m	3-Deoxy-7-phosphoheptulonate synthase
	Ciclev10004711m	3-dehydroquinate dehydratase / shikimate dehydrogenase
	Ciclev10001137m	Shikimate dehydrogenase
	Ciclev10000903m	Shikimate dehydrogenase
	Ciclev10026155m	Shikimate kinase
	Ciclev10019734m	3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
	Ciclev10031547m	Chorismate synthase
	Ciclev10009151m	Chorismate mutase
	Ciclev10025283m	Glutamate/aspartate/prephenate aminotransferase
	Ciclev10028578m	Arogenate/prephenate dehydratase
	Ciclev10015303m	Tyrosine aminotransferase
	Ciclev10027913m	Phenylalanine ammonia-lyase
	Ciclev10000921m	trans-Clavamate 4-monoxygenase
	Ciclev10010822m	6-Coumarate-CoA ligase
	Ciclev10010839m	Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase
	Ciclev10011520m	Coumaroyl/quininate(coumaroylshikimate) 3'-monoxygenase
	Ciclev10005133m	Chalcone synthase 1
	Ciclev10015535m	Chalcone synthase 2
	Ciclev10032897m	Chalcone isomerase
	Ciclev10025931m	Naringenin 3-dioxygenase
	Ciclev10019637m	Flavonoid 3'-monoxygenase
	Ciclev10016176m	Anthranilate synthase component II
	Ciclev1002023m	Anthranilate phosphoribosyltransferase
	Ciclev1002023m	Anthranilate phosphoribosyltransferase
	Ciclev10032361m	Phosphoribosylanthranilate isomerase
	Ciclev10015498m	Indole-3-glycerol phosphate synthase
	Ciclev10002141m	Tryptophan synthase alpha chain
	Ciclev10030492m	Isochorismate synthase
	Ciclev10030821m	Phenylalanine ammonia-lyase
	Ciclev10028305m	Flavonoid 7-O-glucosyltransferase 1
	Ciclev10029184m	Flavonoid 7-O-glucosyltransferase 2

表4 マイクロアレイ解析に用いた代謝関連遺伝子(実験3)

No.	mRNA	JGI Name
	Ciclev10009360m	Fructose-bisphosphate aldolase, class II
	Ciclev10031765m	Sedoheptulose-bisphosphatase
	Ciclev10018991m	Transketolase
	Ciclev10016021m	Ribose 5-phosphate isomerase A
	Ciclev10001344m	Phosphoribulokinase
	Ciclev10009706m	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain
	Ciclev10001708m	2,3-Bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase
	Ciclev10028351m	Enolase
	Ciclev10019997m	Pyruvate kinase
	Ciclev10014977m	Pyruvate kinase
	Ciclev10031744m	Pyruvate dehydrogenase E2 component subunit alpha
	Ciclev10020254m	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha
	Ciclev10011317m	Pyruvate decarboxylase
	Ciclev10030940m	Pyruvate dehydrogenase E4 component
	Ciclev10015403m	Acetyl-CoA C-acetyltransferase
	Ciclev10015452m	Acetyl-CoA C-acetyltransferase
	Ciclev10004429m	Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
	Ciclev10004931m	Acetyl-CoA acyltransferase 1
	Ciclev10013617m	Acyl-CoA oxidase
	Ciclev10014502m	Acyl-CoA oxidase
	Ciclev10004342m	Acyl-CoA dehydrogenase
	Ciclev10021062m	Palmitoyl-protein thioesterase
	Ciclev10024514m	3-Oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase
	Ciclev10029246m	3-Hydroxy-acyl-CoA dehydratase
	Ciclev10020462m	3-Oxoacyl-acyl-carrier-protein synthase III
	Ciclev10000007m	Acetyl-CoA carboxylase / biotin carboxylase
	Ciclev10028836m	Acyl-carrier-protein/5-malonyltransferase
	Ciclev10007846m	3-Oxoacyl-acyl-carrier-protein synthase II
	Ciclev10029222m	3-Hydroxyacyl-acyl-carrier-protein dehydratase
	Ciclev10015082m	Enoyl-acyl-carrier-protein reductase I
	Ciclev10004460m	Long-chain acyl-CoA synthetase
	Ciclev10014159m	Acyl-acyl-carrier-protein desaturase
	Ciclev10028238m	Omega-6 fatty acid desaturase (delta-12 desaturase)
	Ciclev10020242m	Palmitoyl-CoA hydrolase
	Ciclev10014199m	Lipoxygenase
	Ciclev10000825m	Hydroperoxide dehydratase
	Ciclev10012532m	Allene oxide cyclase
	Ciclev10010078m	12-Oxophytadienoic acid reductase
	Ciclev10000764m	OPC-8.0 CoA ligase 1

5. 主な発表論文等

山本梨沙、二村実里、馬 剛、張 嵐翠、八幡昌紀、山脇和樹、島田武彦、藤井 浩、遠藤朋子、加藤雅也

植物ホルモンを処理したカンキツ培養砂じょうのマイクロアレイ解析

フラボノイド代謝周辺の変動についてー、園芸学会平成 31 年度春季大会、2019 年
二村実里、飯島菜摘、馬 剛、張 嵐翠、八幡昌紀、山脇和樹、島田武彦、藤井 浩、遠藤朋子、加藤雅也

青色 LED 光を照射したカンキツ培養砂じょうのマイクロアレイ解析

カロテノイド合成周辺代謝変動についてー、園芸学会平成 28 年度秋季大会、2016 年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：加藤 雅也

ローマ字氏名：KATO Masaya

研究協力者氏名：張 嵐翠

ローマ字氏名：ZHANG Lancui

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。