

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780020

研究課題名（和文）カンキツ果実におけるキサントフィル調節メカニズムの解明

研究課題名（英文）Studies on regulatory mechanism of xanthophyll accumulation in citrus fruit

研究代表者

加藤 雅也（Kato Masaya）

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：10432197

研究成果の概要（和文）：ウンシュウミカン、バレンシアオレンジ、リスボンレモンの砂じょうを培養し、キサントフィル含量・組成を調節する種々の要因について調査した。培養砂じょうに、植物ホルモン、水分ストレス、LEDを用いた光照射を処理することにより、キサントフィル生合成・分解に関わる遺伝子の発現が変動し、キサントフィル含量・組成が変動した。カンキツ果実におけるキサントフィルは、これらの要因により調節されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Juice sacs of Satsuma mandarin, Valencia orange, and Lisbon lemon were cultured *in vitro* to investigate the possible factors which regulated xanthophyll accumulation in citrus fruit. Xanthophyll accumulation and the expression of genes related to xanthophyll biosynthesis and catabolism were regulated by the treatments of phytohormones, water stress, and light irradiation with LED in the juice sacs. Thus, the results indicated that these factors are important to regulate xanthophyll accumulation in citrus fruit.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：園芸学・造園学

科研費の分科・細目：園芸利用

キーワード：カンキツ・カロテノイド・キサントフィル・遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドは、フィトエンから脱水素、環化、水酸基導入、エポキシ化を経て生合成され、700種以上にも及ぶ重要な植物色素の一群である。このカロテノイドは、フィトエンから β -カロテンまでの炭化水素のカロテンと、水酸基、エポキシ基などを有するキサントフィルに分けられる（図1）。カロテノイド生合成に関わる遺伝子の単離や発現調節に関する研究は、シロイヌナズナやトマト

のカロテノイド生合成変異体を用いて研究が行われてきており、 α -カロテンと β -カロテンまでのカロテンについては明快に説明がなされている（Bramley, 2002）。しかし、カロテンより下流のキサントフィルについてはシロイヌナズナやトマトでは多量に生成しないため、未解明であった。そこで、私達は、カンキツ属中の近縁種に、キサントフィル含量・組成が大きく異なる品種が多数存在することに着目し、これを研究材料とする

ことでキサントフィルの蓄積・調節メカニズムに関する研究が進展できると考え、現在まで研究を行ってきた。

これまでの研究では、カロテノイド含量・組成の異なるカンキツ3種（ウンシュウミカン、バレンシアオレンジ、リスボンレモン）の砂じょう（果肉部分）を用いて、カロテノイド合成・分解に関わる遺伝子の発現を比較することにより、カロテノイド蓄積メカニズムを明らかにした。これら3品種のカロテノイド含量・組成の違いは、特に、カロテノイド合成経路の上流のカロテン生成と下流のキサントフィル生成に関わる遺伝子の発現のバランスの違いによることを明らかにし、*Plant Physiology* 誌などに報告した（Kato et al., 2004, 2006）。このように、申請者はカンキツを研究材料とする利点を活かした研究に取り組み、キサントフィル合成・分解機構の解明に他に先駆けて成果をあげた（Kato et al., 2004, 2006）。

<引用文献>

・Bramley, *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 2107-886.

・Kato et al., *Plant Physiology*, 2004, 134: 824-837.

・Kato et al., *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 2153-2164.

2. 研究の目的

本研究では、培養した砂じょう（果肉部分）を用いて、キサントフィル合成・分解に関わる遺伝子発現の調節メカニズムの解明を目的とした。

カンキツにおけるカロテノイド合成経路を図1に示す。カロテノイド合成は、フィトエンシンターゼ (*CitPSY*) により2分子のゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) から無色のカロテノイドであるフィトエンが生成されるところから始まる。フィトエンはフィトエンデサチュラーゼ (*CitPDS*) により2重結合が2か所導入され、 ζ -カロテンに転換される。 ζ -カロテンは ζ -カロテンデサチュラーゼ (*CitZDS*) により、2重結合がさらに2か所導入され、リコペンに転換される。リコペンはリコペン β -シクラーゼ (*CitLCYb*) により γ -カロテンを経由して



図1 カンキツにおけるカロテノイド合成経路および関与する酵素

β -カロテンに転換される。 β -カロテンは、さらに β -リングヒドロキシラーゼ (*CitHYb*) により、水酸基が1つ導入され、 β -クリプトキサンチンに転換される。 β -クリプトキサンチンには、再度 *CitHYb* が作用することにより、2つ目の水酸基が導入され、ゼアキサンチンに転換される。その後、ゼアキサンチンは、ゼアキサンチンエポキシダーゼ (*CitZEP*) により、ビオラキサンチンに転換される。

カロテノイド合成経路の周辺には、果実の成長、成熟、老化に関わる重要な植物ホルモン（アブシジン酸、ジベレリン）や品質成分（クロロフィル、芳香成分の β -イオノン）が存在する。植物では、カロテノイド合成系を基幹として、種々の植物ホルモンや品質成分へと合成経路が繋がっている。

本研究では、培養砂じょう組織におけるカロテノイド合成や代謝分解に関わる遺伝子が、植物ホルモン（アブシジン酸およびジベレリンを培地に添加）、水分ストレス（スクロースおよびマンニトールを培地に添加）およびLEDを用いた光照射にどのように応答し、調節されているか解析した。

本研究の特色は、研究材料として培養した砂じょう組織を用いたことである。この砂じょう組織の培養系は、カロテノイド、糖、酸といった成分が樹上の果実と同様に蓄積する。培養砂じょう組織を用いることで、以下の点において樹上で成育した果実よりも有利に研究が進められる。

- ① 外的要因（環境、虫害、病害など）により果実の成育や品質が左右されない
- ② 砂じょう組織に直接植物ホルモンを処理

できる

③ 簡単に環境条件（温度、光条件など）を変えることができる

培養砂じょう組織は成育が均一であることから、遺伝子発現解析を行う際に、実験の精度が高くなり、新規の知見が得られる可能性が高い。

また、キサントフィル含量を調節する遺伝子の発現解析では、特に、機能性成分であるβ-クリプトキサンチンに着目して研究を行った。β-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。このβ-クリプトキサンチンを蓄積する果実は、ウンシュウミカンなど限られている。

以上のように、植物におけるキサントフィルを中心としたカロテノイドの調節メカニズムを解明する研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

ウンシュウミカン、バレンシアオレンジおよびリスボンレモンの培養砂じょう組織に植物ホルモン（アブシジン酸およびジベレリン）や水分ストレスとしてスクロースおよびマンニトールを、培地に添加し、カロテノイド合成・分解に関わる遺伝子の発現がどのように変動するか調査した。ウンシュウミカンとリスボンレモンは砂じょうにアブシジン酸を蓄積すること、一方、バレンシアオレンジはほとんど蓄積しないことから、アブシジン酸を培養砂じょうに処理し、アブシジン酸の果実成熟過程における生理的な役割を調査した。アブシジン酸と拮抗的な作用を示すジベレリンについても処理を行った。また、水分ストレスにより高糖度化したハウスミカンは、カロテノイド含量が高くなる傾向が認められることから、培地に水分ストレス（スクロースおよびマンニトール）を添加した。

また、上記培養砂じょうに、LEDを用いた光照射を行うことにより、カロテノイド含量・組成ならびにカロテノイド合成・分解に関わる遺伝子の発現がどのように変動するか調査した。光は、カロテノイドの蓄積に関わる重要なファクターであることから、光の波長（色）や強さがどのように関与するか調査し

た。LEDの光は、赤色、青色および赤+青色を用いた。

砂じょうの培養は、10%スクロースを含むMS培地に植えた。それぞれ処理を行い、1か月培養後、砂じょうをサンプリングした。サンプリングした培養砂じょうからカロテノイドを抽出し、HPLCによりカロテノイドの定量を行った。また、同じサンプルからRNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを合成後、遺伝子発現解析をTaqManプローブとプライマーを用いたリアルタイムPCRにより行った。

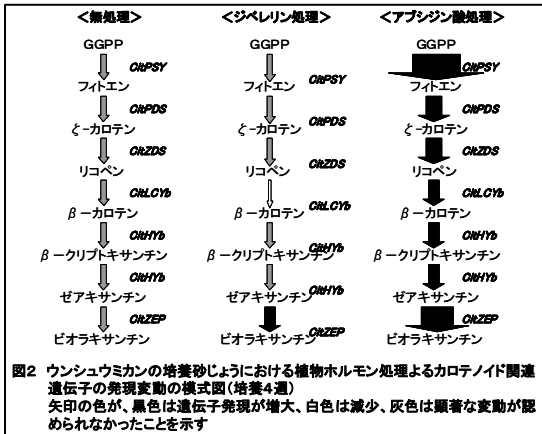
4. 研究成果

カンキツ果実は、カロテノイド含量・組成が多様である。ウンシュウミカンの砂じょうは、主にβ-クリプトキサンチンを蓄積する。バレンシアオレンジの砂じょうは、主にビオラキサンチンを蓄積する。リスボンレモンの砂じょうは、低レベルのカロテノイドが蓄積する。本研究では、カロテノイド含量・組成の異なる上記カンキツ3種の砂じょうを培養し、カロテノイド含量・組成ならびにカロテノイド関連遺伝子の発現に対する植物ホルモン（アブシジン酸、ジベレリン）、水分ストレス（スクロース、マンニトール）、LEDによる光照射処理の影響を調査した。

（1）カロテノイド含量・組成およびカロテノイド関連遺伝子の発現に及ぼす植物ホルモンの影響

カロテノイド含量・組成の異なるウンシュウミカン、バレンシアオレンジ、リスボンレモンの砂じょうを培養し、カロテノイド含量・組成ならびにカロテノイド関連遺伝子の発現に及ぼす植物ホルモンの影響を調査した。カンキツ培養砂じょうにアブシジン酸を処理することにより、3種いずれもカロテノイド関連遺伝子の発現は増大する傾向を示したが、カロテノイド含量に顕著な変動は認められなかった（図2）。これは、カロテノイド合成に関わる遺伝子の発現上昇と同時に、カロテノイドの分解に関わる遺伝子の発現が顕著に増大したためであると考えられた。ジベレリン処理により、3種いずれもカロテノイド関連遺伝子の発現は減少する傾向を示し、カロテノイド含量も減少した

(図2)。ウンシュウミカンの培養砂じょう

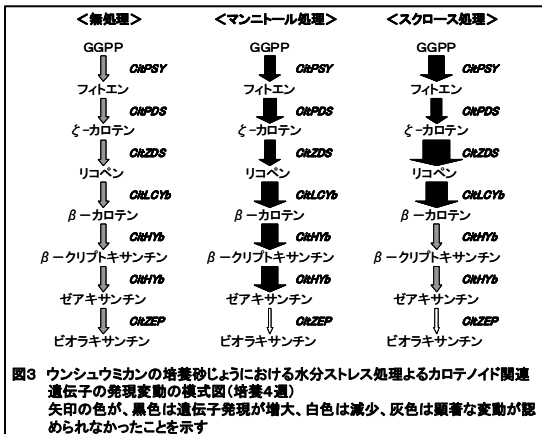


では、*CitLCYb*の遺伝子発現が減少した。

(2) カロテノイド含量・組成およびカロテノイド関連遺伝子の発現に及ぼす水分ストレスの影響

カロテノイド含量・組成の異なるウンシュウミカン、バレンシアオレンジ、リスボンレモンの砂じょうを培養し、カロテノイド含量・組成ならびにカロテノイド関連遺伝子の発現に及ぼす水分ストレスの影響を調査した。

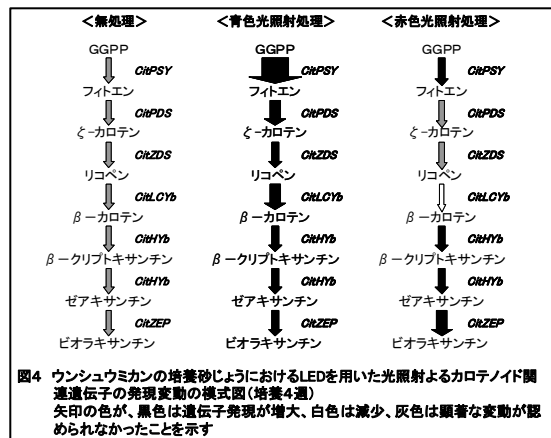
スクロースおよびマンニトール処理により、3種いずれもカロテノイド関連遺伝子の発現は顕著に増大する傾向を示し(図3)、



カロテノイド含量は急速に増大した。特に、マンニトールを6%処理した培養6週のウンシュウミカンの砂じょうでは、マンニトールを処理しないものと比較して、β-クリプトキサンチン含量が約7倍に増大した。

(3) カロテノイド含量・組成およびカロテノイド関連遺伝子の発現に及ぼすLEDを用いた光照射の影響

カロテノイド含量・組成の異なるウンシュウミカン、バレンシアオレンジ、リスボンレモンの砂じょうを培養し、カロテノイド含量・組成ならびにカロテノイド関連遺伝子の発現に及ぼすLEDを用いた光照射の影響を調査した。ウンシュウミカン、バレンシアオレンジ、リスボンレモン3種いずれも、青色光照射区で、Controlよりも総カロテノイド含量が増大した。また、上記3種いずれも、培養4週の青色光照射区で、Controlよりも*CitPSY*の遺伝子発現が増大した(図4)。ウ



ンシュウミカンでは、培養4週の青色および青+赤色の光照射区で、Controlよりも*CitHYb*の遺伝子発現が増大した。一方、培養2週の青色の光照射区で、Controlよりもカロテノイドの代謝分解に関わる*CitNCED2*および*CitNCED3*の遺伝子発現が減少した。また、培養4週の青色の光照射区で、*CitLCYb*の遺伝子発現が増大した。バレンシアオレンジでは、培養4週の青色の光照射区で、*CitPDS*、*CitZDS*および*CitHYb*の遺伝子発現が増大した。一方、培養2週の青色および青+赤色の光照射区で、Controlよりも*CitNCED2*および*CitNCED3*の遺伝子発現が減少した。また、培養4週の青色および青+赤色の光照射区で、*CitLCYb*の遺伝子発現が増大した。以上の結果から、カンキツ培養砂じょうに青色を含む光照射を行うことで、*CitPSY*、*CitNCED2*、*CitNCED3*および*CitLCYb*の遺伝子発現が変動し、カロテノイド含量が増大することが示唆された。

以上の結果から、アブシジン酸、ジベレリンなどの植物ホルモン、スクロースおよびマ

ンニートールによる水分ストレス、LED を用いた特定の波長の光照射は、カンキツ果実の成熟過程におけるカロテノイド、特に、キサントフィル含量・組成を調節する重要な要因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Lancui Zhang, Gang Ma, Masaya Kato, Kazuki Yamawaki, Toshihiko Takagi, Yoshikazu Kiriwa, Yoshinori Ikoma, Hikaru Matsumoto, Hirohisa Nesumi, and Terutaka Yoshioka. Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs *in vitro*. Journal of Experimental Botany, 2012, 63: 871-886.

② Gang Ma, Lancui Zhang, Masaya Kato, Kazuki Yamawaki, Yoshikazu Kiriwa, Yoshinori Ikoma, and Hikaru Matsumoto. Effect of blue and red LED light irradiation on β -cryptoxanthin accumulation in the flavedo of citrus fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 197-201.

③ 加藤 雅也、カンキツ果実におけるカロテノイド集積メカニズム、2011、49 巻、843-851.

[学会発表] (計5件)

① 張 嵐翠、白井由紀、馬 剛、松田あさみ、加藤雅也、山脇和樹、松本 光、生駒吉識、Functional analyses of two lycopene b-cyclase genes in citrus、園芸学会平成23年度秋季大会 平成23年9月25日 岡山大学 (岡山県).

② 菅 陽香、荻野智洋、松田あさみ、馬 剛、張 嵐翠、加藤雅也、山脇和樹、切岩祥和、高木敏彦、松本 光、生駒吉識、根角博久、吉岡照高 園芸学会平成23年度秋季大会平成23年9月25日 岡山大学 (岡山県).

③ 田中秀和、張 嵐翠、馬 剛、荻野智洋、

松田あさみ、木暮 瑛、高木秀明、加藤雅也、山脇和樹、切岩祥和、高木敏彦、松本 光、生駒吉識、園芸学会平成23年度秋季大会平成23年9月25日 岡山大学 (岡山県).

④ 荻野智洋、菅 陽香、馬 剛、張 嵐翠、加藤雅也、山脇和樹、切岩祥和、高木敏彦、松本 光、生駒吉識、根角博久、吉岡照高、カンキツ培養砂じょうにおけるアスコルビン酸およびカロテノイド関連遺伝子の発現に及ぼす光照射の影響、園芸学会平成23年度秋季大会 平成23年9月25日 岡山大学 (岡山県).

⑤ 張 嵐翠、馬 剛、荻野智洋、田中秀和、松田あさみ、加藤雅也、山脇和樹、切岩祥和、高木敏彦、松本 光、生駒吉識、根角博久、吉岡照高 カンキツ培養砂じょうにおけるカロテノイド関連遺伝子の発現に及ぼす LED による光照射ならびに植物ホルモンの影響 園芸学会平成22年度秋季大会 平成22年9月20日 大分大学 (大分県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 雅也 (KATO MASAYA)
静岡大学・農学部・准教授
研究者番号：10432197

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

