

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25410177

研究課題名(和文) 葉緑体ゲノム改変レタスによる希少カロテノイド生産システムの構築

研究課題名(英文) Development of the production system of functional carotenoids rare in nature using chloroplast-genome modified lettuce

研究代表者

三沢 典彦 (MISAWA, Norihiko)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：30393466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カロテノイドは代表的な天然色素群であり、種々の酸化ストレスから生体を守る機能を担っている。本研究では、その化学構造から機能性食品素材として期待されるが、自然界には希少にしか存在せず、かつ化学合成も困難であるカロテノイド色素として、4-ケトカプサンチンやノストキサンチン等に着眼し、これらの色素の葉緑体での生合成用プラスミドを作製し、葉緑体ゲノム改変(CGM)レタスの構築を行い、各々について色素分析等を実施した。なお、先行して作出していたアスタキサンチンやフリチエラキサンチン(希少カロテノイド)を産生するCGMレタスについても多量栽培し、植物生理学研究用、及び食品としての安全性試験用に提供した。

研究成果の概要(英文)：Carotenoids are one of the representative natural pigments, and prevent human body from oxidative stress. As promising functional carotenoids rare in nature, we noted 4-Ketocapsanthin, 2,2'-Dihydroxyastaxanthin, and Nostoxanthin. Plasmids for the biosynthesis of these pigments in the chloroplasts were constructed, and used to obtain respective chloroplast-genome modified (CGM) lettuce plants. Pigment analysis was carried out on these CGM lettuce plants. CGM lettuce that synthesized ketocarotenoids such as Astaxanthin and Fritschiellxanthin (4-Ketolutein; promising functional carotenoids rare in nature), which had already constructed in the beginning of the project, were cultivated with large scale, and supplied for experiments on plant physiology and confirmation study as food safety.

研究分野：合成生物学

 キーワード：カロテノイド レタス 葉緑体形質転換 カプサンチン アスタキサンチン フリチエラキサンチン
ノストキサンチン イドキサンチン

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドとフラボノイドは代表的な天然色素群であり、種々の酸化ストレスから生体を守る機能を担っている。現在までに750種以上のカロテノイドが自然界より単離・同定されており、幾つかのカロテノイドには、健康に有益な独自の機能性があることが明らかにされてきた。しかしながら、産業経済的になりつつある化学合成法、または、高含量植物(または緑藻)からの多量調製法が確立しているカロテノイドはごく僅かである。それらは、 β -Carotene、Lutein、Astaxanthin、Capsanthin、Canthaxanthin、Lycopodium、Zeaxanthin等である。これらのカロテノイド以外にも、健康に有益な独自の機能を持つものは少なからず存在すると思われるが、自然界に希少にしか存在せず、かつ化学合成が困難であるため、機能性試験の実施ができずに留まってきた。

2. 研究の目的

本研究では、その化学構造から機能性食品素材として期待されるが、自然界には希少にしか存在せず、かつ化学合成も困難であるカロテノイド色素(3種類)として、4-Ketocapsanthin(4-KCと省略)、2,2'-Dihydroxyastaxanthin(2,2'-DA)、及びNostoxanthin(Nosto)等に着目し、これらの葉緑体ゲノム改変(chloroplast-genome modified; CGM)レタスでの効率生産システムの構築を目的とする。なお、我々は、研究開始当初、CGMレタスの構築技術をすでに有しており、先行研究として、*crtZ*、*crtW*、*idi* 遺伝子(プラスミドpRL-crtZWidi)の導入により、AstaxanthinやFritschii xanthin(4-Ketolutein; 機能が期待できる希少カロテノイド)等のケトカロテノイドを産生するCGMレタスを作製中であったので、このCGMレタスについても生理特性を検討するとともに、機能性試験用に、有望な希少カロテノイドの精製を行う。

3. 研究の方法

(1) 3種類の希少カロテノイド産生用プラスミドの作製

3種類の希少カロテノイド(4-KC、2,2-DA、Nosto)をレタスで産生するために、それぞれの産生用プラスミドを作製した。そのため、まず、3種類の希少カロテノイドを生産するのに必要な遺伝子のクローニングを行った。CCSは、赤パブリカの実からRNAを抽出し、既知の配列情報からプライマーを設計し、RT-PCRを行うことにより、全長cDNAを獲得した。*crtG*は、既知の配列情報をもとに、レタス葉緑体のコドンに最適化した遺伝子を人工合成したものをを用いた。さらに、改良型プラスミドベクター-pLD7rrnPMCS Ascを構築し、これに、先に構築した外来遺伝子を導入した後、効率的なレタス葉緑体形質転換を可能にするように改良されたベクター

pRL200APに入れ換えることにより、最終的にpRL-idi-CCScrtZW、pRL-idi-crtGZW、及びpRL-idi-crtGZ(図1)を作製した。

(2) レタスへの遺伝子導入と形質転換レタスの取得

(1)で作製した3種類のプラスミドをそれぞれPmeIで切断したものをを用いて、パーティクルガン法により、レタス・パークレー(無菌的に栽培した*in vitro*植物)葉への打ち込み実験を行った。葉緑体ゲノムの相同組換え体を得る必要があるが、形質転換頻度が低いと予想されたので、打ち込み実験をそれぞれ数十回程度行った。

打ち込み後、spectinomycin耐性のカルスを選抜して培養し、不定芽形成を経て、幼植物体を得た。

(3) 葉緑体ゲノム改変(CGM)レタスの取得

(2)で取得した、spectinomycin耐性のレタス幼植物体について、目的の外来遺伝子がレタス葉緑体ゲノムの予想部位に導入されていることをゲノムPCRにより確認を行った。プライマーには、相同組み換え領域の配列および導入遺伝子の配列を用いた。その後、得られた幼植物体を再分化培地に置床して培養し、不定芽形成を経て、再び幼植物体を得た。この操作を最低3回繰り返し、ほとんどの葉緑体ゲノムが組み換えたいに置換された目的のCGMレタスを取得することを目指した。

(4) CGMレタス種子(T_1)の取得と栽培

(3)で選抜したCGMレタスの幼植物体を土壌に植え、組換え温室(特定網室)で栽培することにより、それぞれから十分量の T_1 種子を取得した。 T_1 種子を発芽させ、組換え温室で育てた[このCGMレタスをCGMレタス(T_1)と呼ぶ]

(5) 色素の分析

3種類の希少カロテノイド産生用プラスミドを導入したそれぞれのレタスについて、幼植物体または鉢植え植物体の段階で、葉のカロテノイド分析をHPLC-PDA(フォトダイオードアレイ付き高速液体クロマトグラフ)により実施し、カロテノイドの種類と生産レベルをモニターした。

(6) 色素の精製

CGMレタス(pRL-crtZWidi)葉[生(wet)重量1,500g前後]を凍結乾燥してミキサーで粉末とした後、 CH_2Cl_2 -MeOH(1:1)溶液1Lを加えて室温で30分間攪拌抽出を行い(抽出は2回実施)、葉中に蓄積された総カロテノイドを抽出した。溶媒を少量(50mL程度)まで濃縮後、抽出液をEtOAc/H₂O各1Lずつを用いて二層分配し、EtOAc層を回収した。EtOAc層を濃縮乾固後、hexane-EtOAc(1:1)

で作成したシリカゲル(silica gel 60)カラムクロマトグラフィー(30 mm x 200 mm)に EtOAc 層を供し、10 mL ずつ分画を行った。主たる赤色画分を集め濃縮乾固したところ、150 mg 程度であった。これを HPLC ODS カラム (Senshu Pak PEGASIL 20 mm x 250 mm) で CH₃CN-CH₂Cl₂ (8:2)で展開したところ、保持時間 11.0 min に Astaxanthin、12.1 min に Fritschiellaxanthin が溶出された。それぞれを分取して濃縮乾固したところ、Astaxanthin 30 mg 程度、Fritschiellaxanthin が 15 mg 程度得られた。

CGM レタス (pRL-idi-CCSrtZW) から希少カロテノイド (Iodoxanthin) の精製についても、上記に準じた方法で行った。

4. 研究成果

(1) 3 種類の希少カロテノイド産生用プラスミドの作製

3 種類の希少カロテノイド (4-KC, 2,2-DA, Nosto) をレタスで産生するためのプラスミド、pRL-idi-CCSrtZW、pRL-idi-crtGZW、pRL-idi-crtGZ を構築した (図 1)。

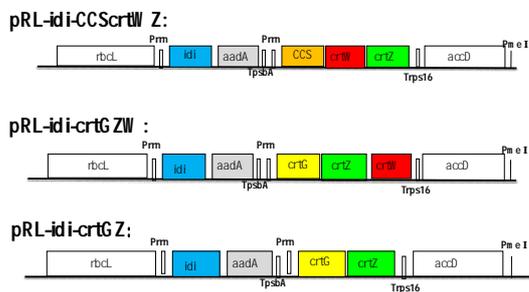


図 1. レタス葉緑体導入用プラスミドの構造

(2) レタスへの遺伝子導入と葉緑体形質転換レタスの取得

(1) で作製した 3 種類のプラスミドをそれぞれ PmeI で切断したものを用いて、パーティクルガン法により、レタス・パークレー (無菌的に栽培した *in vitro* 植物) 葉への打ち込み実験を行った。pRL-idi-CCSrtZW は 20 回、pRL-idi-crtGZW は 30 回、pRL-idi-crtGZ は 30 回、打ち込みを行った。その結果、pRL-idi-CCSrtZW は 1 株、pRL-idi-crtGZW は 3 株、pRL-idi-crtGZ は 1 株、spectinomycin 耐性カルスが得られた。それらのカルスを培養し、不定芽形成を行い、幼植物体を得た (図 2)。産生されるはずのカロテノイドの色から、pRL-idi-CCSrtZW 形質転換体は赤色、pRL-idi-crtGZW 形質転換体は赤色、pRL-idi-crtGZ 形質転換体は黄色になると予想されたが、pRL-idi-CCSrtZW 形質転換体のみ赤色を示し、その他は緑色のままであった。このことから、得られた形質転換体に遺伝子が導入されていない可能性も考えられた。そのため、(3) に示すように、まずゲノム PCR により、遺伝子が導入されて

いることを確かめた。

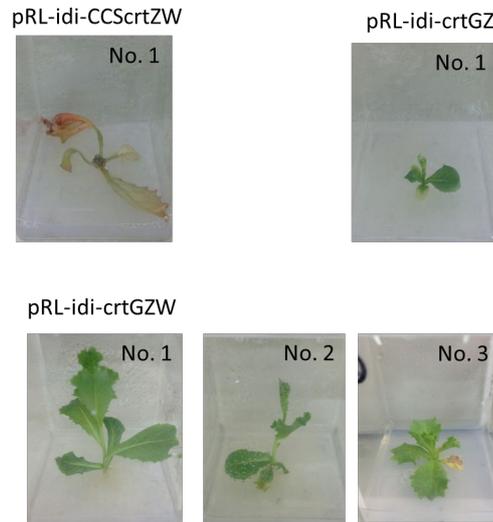
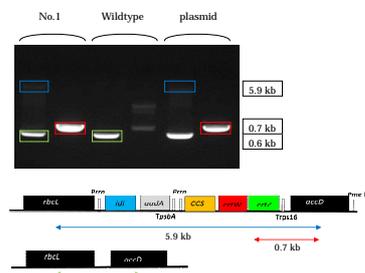
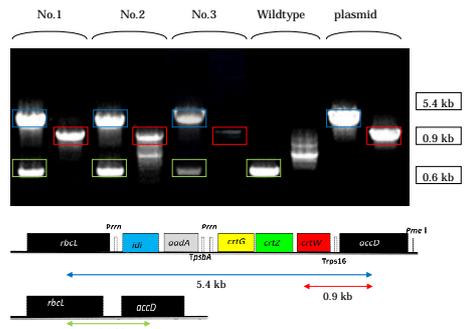


図 2 得られたレタス葉緑体の形質転換体

(A) pRL-idi-CCSrtZW



(B) pRL-idi-crtGZW



(C) pRL-idi-crtGZ

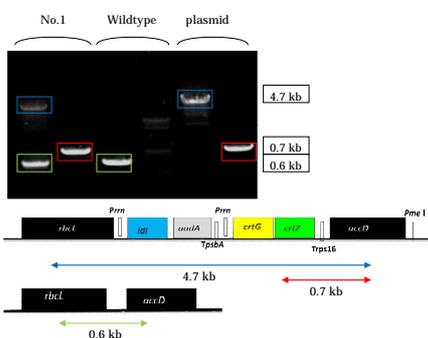


図 3 ゲノム PCR による遺伝子導入の確認

(3) 葉緑体ゲノム改変 (CGM) レタスの取得

(2) で取得した、spectinomycin 耐性のレタス幼植物体について、目的の外來遺伝子がレタス葉緑体ゲノムの予想部位に導入されていることをゲノム PCR により確認した。その結果、いずれの形質転換体においても、導入遺伝子由来のバンド (赤あるいは青枠で囲んだもの) が見られ、遺伝子導入が確認できた (図3)。しかしながら、野生型由来のバンド (緑枠) も見られ、葉緑体ゲノムの多くがまだ置換されていないことがわかった。

その後、再分化培地に置床して培養し、不定芽形成を経て、再び幼植物体を得た。この操作を最低3回繰り返し、再びゲノム PCR を行ったが、いずれも野生型の葉緑体ゲノムが存在しており、大部分の葉緑体ゲノムが組換え体に置換された目的のCGMレタスは得られなかった (data not shown)。そのため、同様の操作を何度か繰り返した結果、野生型のゲノムが減って行く傾向にあったが、pRL-crtZWidi 導入CGMレタスの場合とは違って、元のゲノムが外來ゲノムにほぼ全て、置き換わったものは得られなかった。その原因として、今回導入した遺伝子あるいはその産物が、レタスの葉緑体の機能や生育に悪い影響を与えるために、野生型を全て、組換えゲノムに置換することができない可能性も考えられた。また、以上の結果から、(2) で述べた形質転換体が緑色をしているのは、外來遺伝子が導入されていないためではないことがわかった。

(4) CGM レタス種子 (T_1) の取得と栽培

(3) で選抜したCGMレタスの幼植物体を土壌に植え、組換え温室 (特定網室) で栽培し、それぞれから十分量の T_1 種子を取得することができた。現在、 T_1 種子を発芽させ、組換え温室で育てている。このように、CGMレタス (T_1) を取得することができた。

(5) 色素の分析

3種類の希少カロテノイド産生用プラスミドを導入したそれぞれのレタスについて、幼植物体の段階で、葉のカロテノイド分析をHPLC-PDAにより実施した。その結果、pRL-idi-crtGZW 導入CGMレタスとpRL-idi-crtGZ 導入CGMレタスについては、明確な新規のピークは見られなかったため、それぞれ、微量の2,2-DA、Nostoが含まれている可能性が考えられた。一方、pRL-idi-CCSrtZW 導入CGMレタスでは、明確な新規のピークが見られたため、本ピークの色素を精製し、NMR、HRMS解析を実施したところ、Idoxanthinであることがわかった。

Idoxanthinは魚類のマスなどによく見られる希少カロテノイドで、その構造から、Astaxanthinが水酸化されたものでないかと考えられた (図4)。以前作製したpRL-idi-crtZW形質転換体では、Idoxanthin

は検出されていないため、CCS活性によってできた可能性が考えられた。この結果は非常に興味深く、今後さらに解析が必要である。

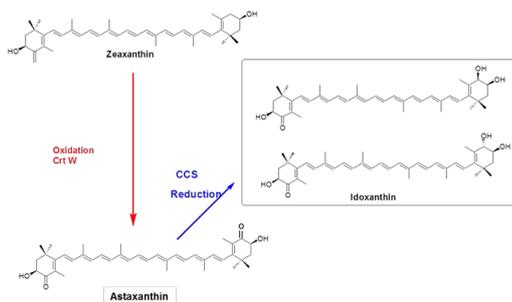


図4 予測される Idoxanthin の生合成経路

(6) 色素の精製

研究の方法(6)で記載した実験を計4回実施し、最終的に純粋な (^1H NMR解析で純度90%以上) Astaxanthin 250.5 mg、Fritschiellaxanthin (図5) 90.6 mgを、CGMレタス (pRL-crtZWidi) から調製することができた。後者の色素は貴重なサンプルであるので、然るべき機能性試験に用いたい。

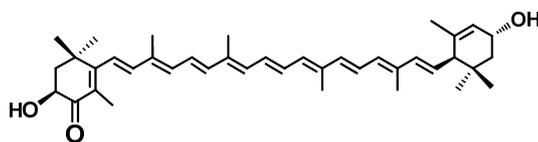


図5 Fritschiellaxanthin の構造

(7) その他の関連成果

先行して構築していたCGMレタス (pRL-crtZWidi) は多量栽培され、植物生理学研究用、食品としての安全性試験用に提供された。さらに比較のため、crtZ crtW idi 遺伝子の植物染色体への導入用プラスミド [プラスミド pUTR-crtZWidi (pZH2B or pZK3B)] を作製し、レタス以外の機能性カロテノイド産生農作物の作出にも貢献した。以上の成果等により、平成28年のGordon Research Conference on CarotenoidsにはDiscussion Leaderとして招待された。

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8件)

1. Harada, H., Maoka, T., Osawa, A., Hattan, J., Kanamoto, H., Shindo, K., Otomatsu, T., and Misawa, N. (2014) Construction of transplastomic lettuce (*Lactuca sativa*) dominantly producing astaxanthin fatty acid esters and detailed chemical analysis of generated carotenoids. *Transgenic Res.* 23: 303-315 (査読有り).

2. Campbell, R., Morris, W.L., Mortimer, C.L., Misawa, N., Ducreux, L.J.M., Morris, J.A., Hedley, P.E., Fraser, P.D., and Taylor M.A. (2015) Optimising ketocarotenoid production in potato tubers: effect of genetic background, transgene combinations and environment. *Plant Sci.*, 234: 27-37 (査読有り).
3. Takemura, M., Maoka, T., and Misawa, N. (2015) Evolution of carotenoid biosynthesis genes in land plants: from the viewpoint of liverwort. *Carotenoid Sci.*, 20 (Dec): 55-58 (査読有り).
4. Misawa, N. (2015) Our carotenoid biosynthesis research. *Carotenoid Sci.*, 20 (Dec): 30-34 (査読有り).
5. Mortimer, C.L., Misawa, N., Ducreux, L., Campbell, R., Taylor, M., Bramley, P.M., and Fraser, P.D. (2016) Product stability and sequestration mechanisms in *Solanum tuberosum* engineered to biosynthesise high value ketocarotenoids. *Plant Biotechnol. J.*, 14: 140-152 (査読有り).
6. Ogawa, T., Sasaki, T., Okazawa, A., Teshima, R., Misawa, N., and Ohta, D. (2016) Metabolite profiling and proteome analysis of genetically modified lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) that produce astaxanthin and its esterified derivatives. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety (日本食品化学学会誌)*, 23: 9-19 (査読有り).
7. Fujii, R., Yamano, N., Hashimoto, H., Misawa, N., and Ifuku, K. (2016) Photoprotection vs. photoinhibition of photosystem II in transplastomic lettuce (*Lactuca sativa*) dominantly accumulating astaxanthin. *Plant Cell. Physiol.*, 57: 1518-1529 (査読有り).
8. Maoka, T., Otani, M., Khan, M. Zubair, Takemura, M., Hattan, J., and Misawa, N. (2016) Novel carotenoids produced on the interaction of the foreign carotenoid ketolase CrtW and endogenous epoxy-carotenoids unique to sweetpotato tubers. *Tetrahedron Lett.*, 57: 4746-4748 (査読有り).

[学会発表](計 1件)

1. Misawa, N., Maoka, T., Hattan, J., Takemura, M., Choi, SK., Shindo, K., Otani, M. (2017) Pathway engineering of sweetpotato plants for biosynthesis of astaxanthin and large varieties of ketocarotenoids. The 18th International Symposium on Carotenoids. 2017年7月9~14日、Lucerne (スイス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三沢 典彦 (MISAWA, Norihiko)
石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：30393466

(2) 研究分担者

新藤 一敏 (SHINDO, Kazutoshi)
日本女子大学・家政学部・教授
研究者番号：80350180

(3) 連携研究者

眞岡 孝至 (MAOKA, Takashi)
一般財団法人生産開発科学研究所・食物機能研究室・室長
研究者番号：10157159

(4) 研究協力者

竹村 美保 (TAKEMURA, Miho)