

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450051

研究課題名(和文) 花弁に蓄積されるカロテノイドのエステル化の機構およびその役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of esterification of carotenoid accumulated in petals and its role

研究代表者

岸本 早苗 (Kishimoto, Sanae)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門 花き遺伝育種研究領域・上級研究員

研究者番号：70355717

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)：花弁のカロテノイドはキサントフィルと脂肪酸が結合したエステル体という形で存在していることが知られているが、エステル化を触媒する酵素については未知であった。そこで、トウガラシ果実から検出されたタンパク部分配列を基に様々な花き類の花弁から候補遺伝子を単離した。これらのうち、-クリプトキサンチンが主成分である黄花イボメア属植物花弁由来の遺伝子を導入した淡黄花ペチュニアの花弁のカロテノイド組成を分析したところ、ペチュニアにない -クリプトキサンチンが蓄積し、総蓄積量が上昇したことから、この遺伝子がエステル化の働きをもち、カロテノイド組成及び蓄積量の決定に重要な働きを持つことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It is known that carotenoids in petals are mainly esterified xanthophylls, but the enzyme that catalyze the reaction of xanthophyll to xanthophyll fatty acid ester had been unknown. We identified putative genes which encode the xanthophyll esterase from petals of several species containing characteristic xanthophylls using the partial protein sequence of putative esterase-lipase like enzyme isolated from proteome analysis of fruits of red pepper. Then we introduced the genes into pale yellow-flowered petunia. The transformants which contains the gene from Ipomoea sp. showed accumulation of esterified -cryptoxanthin and increase in the total amount of carotenoids. It was clarified that the putative genes encode xanthophyll esterase and that the gene play an important role in quality and quantity of carotenoid accumulation in petals.

研究分野：園芸農学

キーワード：カロテノイド エステル化 花色

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドは黄色から赤を示し、花卉において重要な働きをしている色素の一つである。

植物に蓄積するカロテノイドは組織や器官によってその組成が異なっていることが知られている。花卉においては -カロテンを主に蓄積するキンモクセイやリコペンを主に蓄積するキンセンカ橙花品種といったごく一部の例外を除き、ほとんどが水酸基を持つキサントフィル類を主に蓄積する (Kishimoto et al., 2005; Ohmiya, 2011)。これらキサントフィル類の大部分は水酸基の部分で脂肪酸と結合したエステル体として存在している (Maoka et al., 2011)。カロテノイドは有色体中の plastoglobule という小器官内部の脂質中に蓄積されることが明らかになっているが (Austin et al., 2006)、Zhong ら (2011) はアスタキサンチン生合成酵素遺伝子を導入したシロイヌナズナにおいて plastoglobule にアスタキサンチンを蓄積させるにはエステル体である必要があるという結果を示している。このことから、カロテノイドエステル化酵素は plastoglobule の脂質中に親水性が高く脂質溶解性の低いキサントフィルを蓄積させるための重要な鍵酵素であることが推測される。

しかしながら、研究開始当初はカロテノイドエステル化酵素に関しては植物だけでなく動物においても現在までほとんど報告がなく、唯一トウガラシのプロテオーム解析によって plastoglobule からエステラーゼ - リパーゼ様タンパクが検出されたとの報告があるのみであった (Ytterberg et al., 2006)。

2. 研究の目的

(1) 花卉におけるエステル化に関与する遺伝子の同定およびその酵素的特性の解析

カロテノイドエステル化酵素遺伝子であると予想されるトウガラシ由来リパーゼ - エステラーゼ様遺伝子配列を元に、様々な種の花弁からオルソログを単離する。また、単離したエステル化酵素をコードする候補遺伝子を大腸菌等に導入し、得られた組換えタンパク質の酵素活性を検証する。

(2) エステル化酵素遺伝子の導入による花卉中のカロテノイド蓄積量および組成への影響の解析

候補カロテノイドエステル化酵素遺伝子を花き類に遺伝子組換えし、花卉におけるカロテノイドの蓄積量、エステル化率、組成等に与える影響を調査し、カロテノイドのエステル化がカロテノイド蓄積に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 花き類の花弁に蓄積するカロテノイドエステル体の解析

材料として様々なキサントフィル類を蓄積する花き類を選び出し (例: ジニア: ゼア

キサランチン、マリーゴールド: ルテイン、キク: エポキシ化ルテイン) これらに含まれるキサントフィル類のエステル化の状態について HPLC で解析を行う。また、アルカリ加水分解処理 (ケン化) を行ってエステル体から脂肪酸を除去したサンプルを同時に解析することによって花弁内でエステル化されているキサントフィルとされていないものを明らかにし、それぞれの植物種におけるエステル化酵素の基質特異性の推測を行う。

(2) カロテノイドエステル化酵素遺伝子の単離

材料として上記のカロテノイドエステル体の解析を行った植物種を用いる。カロテノイドエステル化酵素はリパーゼと相同性のあるタンパクであることが推測される。プロテオーム解析においてパブリカ色素体中からエステラーゼ - リパーゼ様タンパクが検出されていることから (Ytterberg et al., 2006)、これらの情報を元に遺伝子を単離し、塩基配列および推定アミノ酸配列の解析を行う。いくつかのカロテノイドエステル体を蓄積する花きにおいて単離したオルソログの組織特異的発現様式を解析する。

(3) カロテノイドエステル化酵素の酵素活性の解析

様々な植物由来のカロテノイドエステル化酵素遺伝子を発現ベクターに組み込み、得られたタンパクのエステル化酵素としての機能を解析する。リパーゼを用いてキサントフィルの一種であるアスタキサンチンをエステル化する方法はすでに報告があるため (Nakao et al., 2008; 田中・日比野, 1999)、これらの知見を元にキサントフィル類と脂肪酸とのエステル結合実験を *in vitro* 中で行う。反応生成物は HPLC を用いてエステル化の有無について解析を行う。

(4) 植物へのカロテノイドエステル化酵素遺伝子の導入が花弁中のカロテノイド量および組成に及ぼす影響の解析

複数の種から単離したカロテノイドエステル化酵素遺伝子の過剰発現コンストラクトの構築を行う。これらをアグロバクテリウム法を用いてエステル化カロテノイドをごくわずかにしか蓄積しない淡黄花品種のペチュニア等への導入を試みる。得られた形質転換個体はカロテノイド量、カロテノイド成分およびエステル化の有無、導入遺伝子および既知のカロテノイド蓄積関連遺伝子の発現、の3点について調査を行う。

4. 研究成果

(1) 花き類の花弁に蓄積するカロテノイドエステル体の解析

黄花イボメア属の花弁に含まれるキサントフィル類のエステル化状態についてはすでに Yamamizo et al. (2009) が報告しており、

主成分が β -クリプトキサンチンであり、なおかつほとんど全てがエステル体であることが明らかになっている。本研究においては、さらに、ジニア、マリーゴールド、キク近縁野生種であるキクタニギク、ペチュニア、ペチュニア近縁の園芸植物であるカリブラコアのカロテノイドについてエステル化の割合を調査した。

ジニア(図1)、マリーゴールド、キクタニギク、カリブラコアについてはケン化サンプルにおいて検出されるフリー体のキサントフィルのピークが未ケン化のサンプルでは検出されず、代わりにリテンションタイムの大きな位置に同じスペクトルを持つエステル体のピークが検出されることが明らかになった。ジニア、マリーゴールド、キクタニギク、カリブラコアの主成分はそれぞれゼアキサンチン、ルテイン、エポキシ化ルテイン、ネオキサンチン・ピオラキサンチンであるが、非ケン化サンプルにおいてはこれらのフリー体はごくわずかにしか検出されなかったことから、これら各種の花弁において発現しているカロテノイドエステル化酵素は、少なくともそれぞれの主要キサントフィルをエステル化する能力があると推測された。

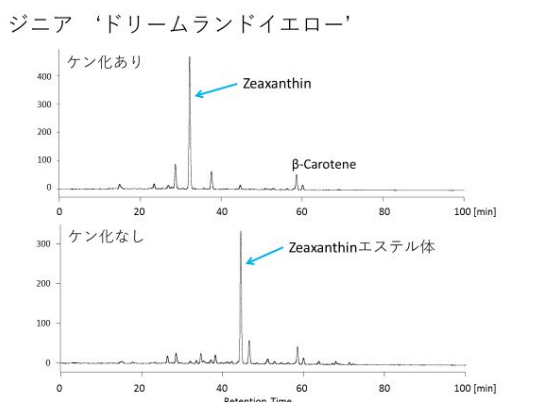


図1. ジニア花弁由来のケン化処理を行ったカロテノイド抽出物及びケン化処理を行っていないカロテノイド抽出物のHPLC解析

一方、ペチュニア花弁由来のカロテノイドについても、上記花き類の花弁同様に抽出を行い、ケン化したもの及びケン化を行わなかったサンプルのHPLC解析を行った(図2)。ペチュニアにおいては、ピオラキサンチン、ネオキサンチンはほぼエステル化されているものの、ゼアキサンチン、ルテインはほとんどピークに変化がなく、ペチュニア花弁に発現するカロテノイドエステル化酵素はゼアキサンチン・ルテインをエステル化する能力が低く、基質特異性を持つことが明らかになった。

(2) カロテノイドエステル化酵素遺伝子の単離

Zhong ら (2011) によってトウガラシ

plastoglobule から検出されたリパーゼ-エステラーゼ様タンパク質の配列と相同性の

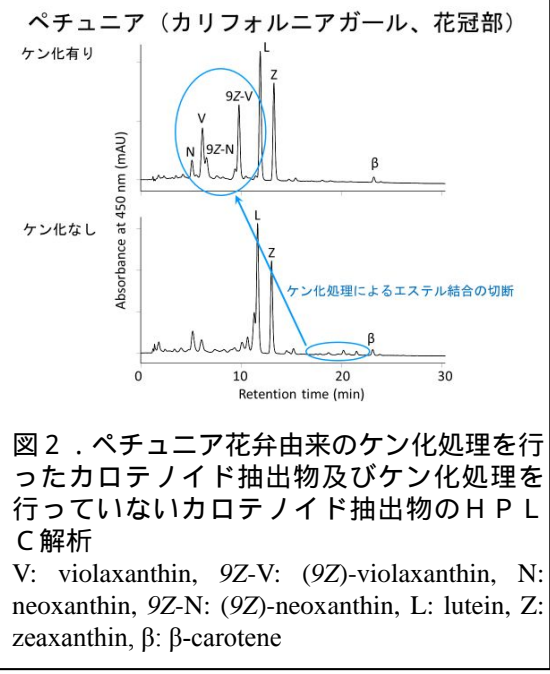


図2. ペチュニア花弁由来のケン化処理を行ったカロテノイド抽出物及びケン化処理を行っていないカロテノイド抽出物のHPLC解析

V: violaxanthin, 9Z-V: (9Z)-violaxanthin, N: neoxanthin, 9Z-N: (9Z)-neoxanthin, L: lutein, Z: zeaxanthin, β : β -carotene

高いアミノ酸配列をデータベース (NCBI) より検索した。そのうち、相同性の高い領域の配列を用いて縮合プライマーを作製し、ジニア、マリーゴールド、黄花イポメア属植物、ペチュニア、カリブラコア、トマト、キクタニギクからエステル化酵素遺伝子候補となる配列を単離した。うち、トマトから単離した配列は Ariizumi et al. (2014) が報告したカロテノイドのエステル化に関する遺伝子 PYP1 と同一であった。

これらをアミノ酸配列に翻訳した際の分子系統樹をデータベース上に存在したシロイヌナズナ、ブドウ、ポプラ、イネ、トウゴマのオルソログを加えて作成したところ、図3のとおり、花弁にカロテノイドを蓄積する植物とししない植物とは異なったクレードに分類されることが明らかになった。

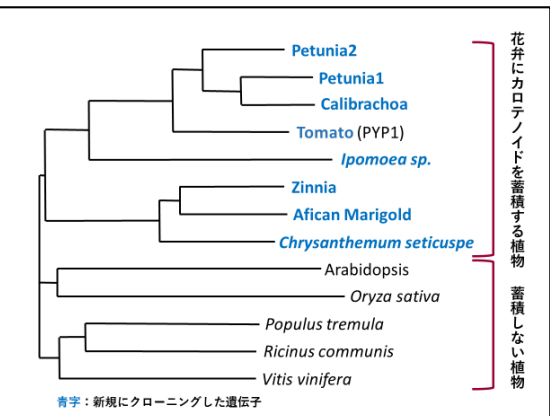


図3. 本研究において単離したカロテノイドエステル化酵素遺伝子がコードするアミノ酸配列の分子系統樹

(3) カロテノイドエステル化酵素の酵素活性の解析

前項において単離したカロテノイドエステル化酵素遺伝子の *in vitro* における活性を確認するため、大腸菌内での酵素タンパクの発現を試みた。大腸菌発現用ベクターとしては pMAL-c2x, pCOLD-TF の2種を用いた。また、ホストの大腸菌系統には BL21、Rosetta2、Rosetta-Gami2 を使い、導入タンパク質の発現に適した組み合わせを調査した。しかしながら、いずれの組み合わせにおいても目的の長さのタンパク質は得られず、大腸菌内においてはエステル化酵素タンパクは分解されているらしいことが明らかになった。そこで、大腸菌ではなく、カイコ培養細胞系(カイコ胚由来 BmN4 細胞)を宿主として、エステル化酵素遺伝子を導入したバキュロウイルスベクター(BmNPV) 3 系統を感染することによって組換え酵素タンパクを発現させることを試みた。その結果、N 末に昆虫細胞用分泌シグナルを追加したベクターにおいて、明瞭な単一バンドが確認されたことから、今後、カイコ生体等への感染を行えば一定量の精製タンパク質が得られる可能性が示された(図4)。

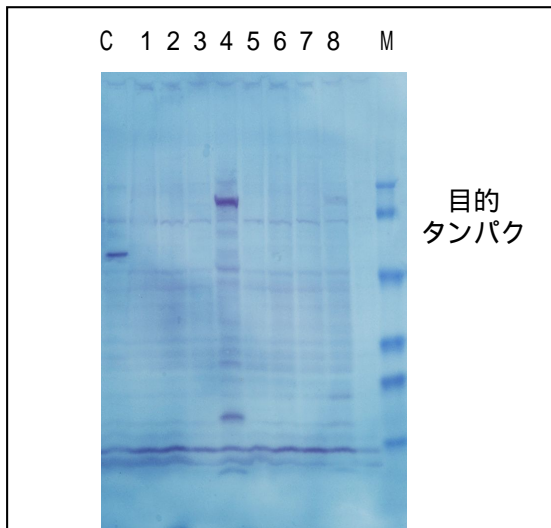


図4. カロテノイドエステル化酵素遺伝子を発現させたカイコ培養細胞抽出タンパク質のウエスタンブロット解析
 レーン1~4: ペチュニア由来遺伝子導入細胞系統
 5~8: 黄花イポメア由来遺伝子導入細胞系統

一方、カロテノイド産生大腸菌系統にエステル化酵素遺伝子を含むベクターを導入し、大腸菌内におけるエステル体の産生の有無について調査した。ゼアキサンチンを産生する pACCAR25 crtX 系統及びルテイン及びゼアキサンチンを産生する pACCRT-EIB 系統を宿主とし、それぞれエステル化酵素遺伝子の導入を行った。しかしながら、ゼアキサンチン及びルテインのエステル体は検出されなかった。

(4) 植物へのカロテノイドエステル化酵素遺伝子の導入が花弁中のカロテノイド量および組成に及ぼす影響の解析

ペチュニアの花弁にエステル体カロテノイドの割合が低いことは前述の通りである。これに黄花イポメア属植物、ジニア、カリブラコア由来のエステル化酵素遺伝子を導入し、その機能を分析することを試みた。導入コンストラクトはF3Hプロモーター(花弁特異的発現)及びNOSターミネーターを持つもの及び35Sプロモーター(全身発現)及びNOSターミネーターを持つものの2種類を用いた。ジニア、カリブラコア由来のエステル化酵素については導入を行ったものの組成及び蓄積量に変化はなかった。一方、黄花イポメア属植物由来のものを導入した個体の中から、通常ペチュニア花弁からは検出されないクリプトキサンチンを含む個体がF3Hプロモーターを用いた系統が5個体、35Sプロモーターを用いた系統が2個体得られた。これらにおいて導入した酵素遺伝子の発現の有無について調査を行ったが、いずれも発現が確認された(図5)。

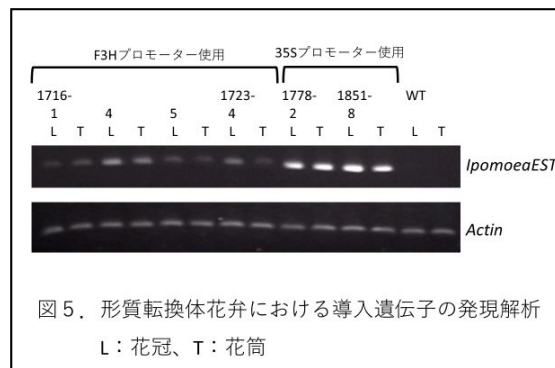


図5. 形質転換体花弁における導入遺伝子の発現解析
 L: 花冠、T: 花筒

これらの系統のカロテノイド量及びクリプトキサンチンとエステル化率との関係を見ると、いずれも正の相関が見られたことから、カロテノイドのエステル化はカロテノイド蓄積量の増加をもたらす、カロテノイドエステル化酵素には基質特異性があり、エステル化されることによって以降のカロテノイド生合成が進まなくなる、という2点の結論が得られた(図6)。

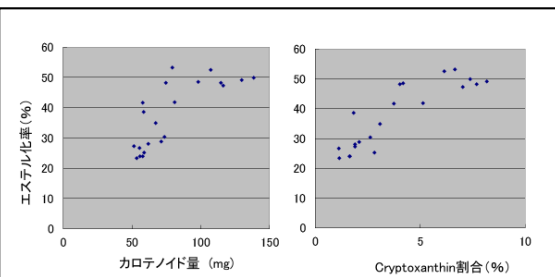


図6. 黄花イポメア由来エステル化酵素遺伝子の導入個体におけるカロテノイド量及びβ-クリプトキサンチンの割合とエステル化率との関係

また、開花から5日後の花弁を比較したところ、いずれの系統においても形質転換体のほうが色素の減少率が低いことから、カロテノイドのエステル化はカロテノイドの安定化に寄与していることが示された(図7)。

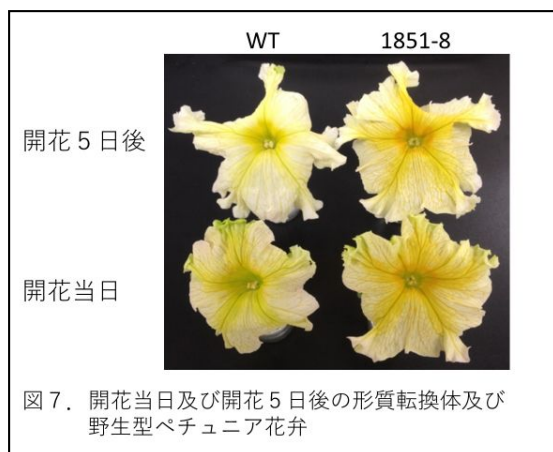


図7. 開花当日及び開花5日後の形質転換体及び野生型ペチュニア花弁

(5) まとめ

以上の結果より、本研究において単離した遺伝子はカロテノイドエステル化酵素遺伝子であり、花弁においてカロテノイド蓄積量及びその組成を制御する重要な鍵遺伝子であることが明らかになった。カロテノイドの生合成経路を操作し、組成や量を変えるためには非常に多くの生合成系酵素遺伝子が関わっていることから困難であったが、本研究により1遺伝子の操作によって改変できるようになる可能性があることを示すことができた。今後さらにペチュニア個体に導入する遺伝子種を追加し、データを蓄積した上で早急な論文化を予定している。

<引用文献>

Kishimoto S et al. (2005) Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69:2122-2128.

Ohmiya A (2011) Diversity of carotenoid composition in flower petals. *JARQ*, 45: 163-171.

Maoka T et al. (2011) Carotenoids and their fatty acid esters in the petals of *Adonis aestivalis*. *J. Oleo Sci.*, 60: 47-52.

Austin J R (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell*, 18: 1693-1703.

Zhong YJ et al. (2011) Functional characterization of various algal carotenoid ketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*. *J.*

Exp. Bot., 62: 3659-3669.

Ytterberg AJ et al. (2006) Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol.*, 140: 984-997.

Nakao, M. et al. (2008) Enzymatic synthesis of astaxanthin n-Octanoic acid esters. *J. Oleo Sci.*, 57:371-374.

田中・日比野 (1999) アスタキサンチン脂肪酸エステルの製造方法. 日本国特許, 特開平 11- 290094.

Yamamizo C et al. (2009) Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *J. Exp. Bot.* 61: 709-719.

Ariizumi T, Kishimoto S et al. (2014) Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant J.* 79:453-465.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 早苗 (KISHIMOTO, Sanae)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門 花き遺伝育種研究領域・上級研究員

研究者番号: 7 0 3 5 5 7 1 7

(2) 研究分担者

大宮 あけみ (OHMIYA, Akemi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門 花き遺伝育種研究領域・主席研究員

研究者番号: 5 0 3 5 5 7 1 5

(平成26年度より平成27年度まで研究分担者)