

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660023

研究課題名(和文)カンキツ果実の赤色色素， β -シトラウリンの生合成機構の解明研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of biosynthesis of red-pigment, β -citraurin, in citrus fruit

研究代表者

加藤 雅也 (Kato, Masaya)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10432197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： β -シトラウリンは、カンキツ果実に蓄積するC30の赤色のアポカロテノイド色素である。本研究では、ウンシュウミカンの β -シトラウリンを蓄積する‘山下紅早生’と蓄積しない‘宮川早生’を比較することにより、 β -シトラウリン生合成にCitCCD4が関わることを明らかにした。CitCCD4の遺伝子発現は、‘山下紅早生’のフラベドにおいて顕著に増大した。また、機能解析を行ったところ、CitCCD4は β -クリプトキサントチンまたはゼアキサンチンを基質とした場合、 β -シトラウリンを生成する反応を触媒した。以上の結果から、CitCCD4は β -シトラウリン生合成を調節する重要な酵素遺伝子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： β -Citraurin, a C30 apocarotenoid, is a color-imparting pigment responsible for the reddish color of citrus fruits. In the present study, we found that CitCCD4 was involved in the synthesis of β -citraurin, using two citrus varieties of Satsuma mandarin, ‘Yamashitabeni-wase’, which accumulates β -citraurin predominantly, and ‘Miyagawa-wase’, which does not accumulate β -citraurin. The expression of CitCCD4 increased significantly in the flavedo of ‘Yamashitabeni-wase’ during fruit maturation. In addition, function analysis showed that the cleavage of β -cryptoxanthin and zeaxanthin by CitCCD4 enzyme led to the formation of β -citraurin. The results suggested that CitCCD4 was a key gene regulating the biosynthesis of β -citraurin.

研究分野：収穫後生理学

キーワード： β -シトラウリン カロテノイド カンキツ CCD4

1. 研究開始当初の背景

これまでカロテノイド含量・組成が大きく異なるウンシュウミカン、パレンシアオレンジ、リスボンレモンを研究材料とすることで、 β -クリプトキサンチンの集積メカニズムおよび含量の調節に関する研究を行ってきた。また、カンキツの培養した砂じょう(果肉部分)や果実を用いて、LEDによる光照射、植物ホルモン、水分ストレス処理など種々の要因によるカロテノイド、特に β -クリプトキサンチン含量・組成の調節に関する研究を行った。カンキツ類は、カロテノイド組成の最も複雑な植物の一つであり、一部のものについて生合成機構は未解明である。「 β -シトラウリン」は未解明のカロテノイドの一つであり、 β -クリプトキサンチンのようなオレンジ色を呈さず、赤色である。この色素の集積により、ウンシュウミカンの「山下紅早生」や「セミノール」などでは、鮮やかな濃い紅色の果皮色となる。

2. 研究の目的

カンキツ果実は、 β -クリプトキサンチンなどカロテノイドを豊富に含有する。これまでウンシュウミカンの主要カロテノイドである β -クリプトキサンチンについて、果実での集積メカニズムを明らかにする研究を実施してきた。しかし、「山下紅早生」や「セミノール」など限られたカンキツ果実のフラベド(果皮部分)にだけに存在する赤色のアポカロテノイド「 β -シトラウリン」については、生合成経路やそれに関連する酵素遺伝子が未解明であった。本研究では、カロテノイド酸化開裂酵素(Carotenoid cleavage dioxygenase, CCD)のCCD4が β -シトラウリン生成に関与すると推定し、当該酵素の発見によってカンキツ果実における β -シトラウリンの生合成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) β -シトラウリンの高精度な抽出・定量方法を構築し、カンキツ類における含量の種および品種間差を調査した。抽出方法では、ケン化条件下での β -シトラウリンの化学構造変化を低減するために、抽出で用いるアセトンができる限り除去し、ケン化を行った。 β -シトラウリンの定量では、 β -シトラウリンを集積しない品種と β -シトラウリンを集積する品種について、 β -シトラウリンなどのカロテノイド含量・組成を、HPLCを用いて定量し、その成熟過程における季節変動を調査した。また、 β -シトラウリン生成に関与する候補の*CitCCD4*について遺伝子発現解析を行った。
(2) β -シトラウリン生成に関与するCCDを同定するために、*CitCCD4*の機能解析を行った。*CitCCD4*について β -シトラウリン生成能を大腸菌内(ゼアキサンチン生成組換え大腸菌)もしくは試験管内(大腸菌内で発現

させた*CitCCD4*を使用)で評価した。
(3) カンキツ果実での β -シトラウリン含量を増大させる要因(エチレン処理および赤色LEDによる光照射処理)を調査した。 β -シトラウリンを蓄積する「山下紅早生」を用いて、外生的なエチレン処理が、 β -シトラウリン含量に及ぼす影響を調査した。
(4) β -シトラウリン生成に関与するCCDについて、その局在性を明らかにするために、CCDをGFPとの融合タンパク質として植物細胞内で一過的に発現させ、共焦点顕微鏡を用いてCCDタンパク質の細胞内での局在を調査した。

4. 研究成果

(1) 果実のフラベド(果皮部分)に β -シトラウリンを蓄積する「山下紅早生」、「土橋紅温州」、「クレメンティン」、「朱見」の4品種と β -シトラウリンを蓄積しない「宮川早生」、「林温州」の2品種で、 β -シトラウリン含量および*CitCCD4*の遺伝子発現の季節変化を調査した。 β -シトラウリンを蓄積する5品種では、果実の成熟過程において β -シトラウリンが蓄積し、それに伴い*CitCCD4*遺伝子の発現上昇が認められた。一方、 β -シトラウリンを蓄積しない2品種では、*CitCCD4*遺伝子の発現上昇は認められなかった。特に、「山下紅早生」と「宮川早生」を比較すると β -シトラウリンおよび*CitCCD4*遺伝子の発現に顕著な品種間差が認められ、*CitCCD4*遺伝子の発現上昇が、 β -シトラウリン生成に関わっていることが示唆された。

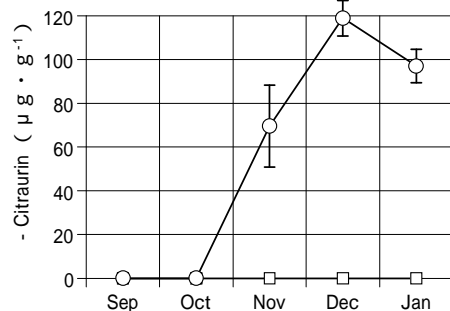


図1 「宮川早生」(○)と「山下紅早生」(□)のフラベドにおける β -シトラウリン含量の季節変化

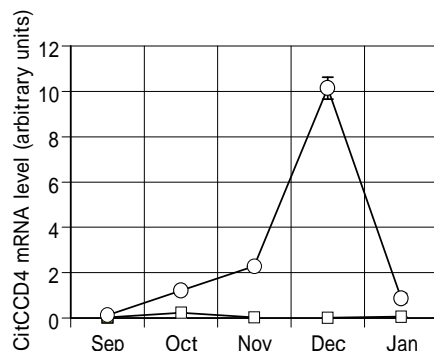


図2 「宮川早生」(○)と「山下紅早生」(□)のフラベドにおける*CitCCD4*の遺伝子発現の季節変化

(2) 遺伝子発現に差が認められた *CitCCD4* の機能解析を行った。カロテノイドを生成する大腸菌を用いて、*in vivo*において *CitCCD4* の機能解析を行った。ゼアキサンチンを蓄積する大腸菌に *CitCCD4* を導入したところ、
 - シトラウリンが新たな生成物として検出された。一方、*CitCCD4* を導入したリコペン、
 - カロテン、
 - カロテンを蓄積する大腸菌では、新たな生成物は認められなかった。
 また、*CitCCD4* のリコンビナントタンパク質を作製し、基質と考えられるカロテノイドと *in vitro*において反応させた。その結果、*CitCCD4* は、
 - クリプトキサンチンとゼアキサンチンを基質とした場合、
 - シトラウリンを生成した(図3)。一方、*all-trans-*

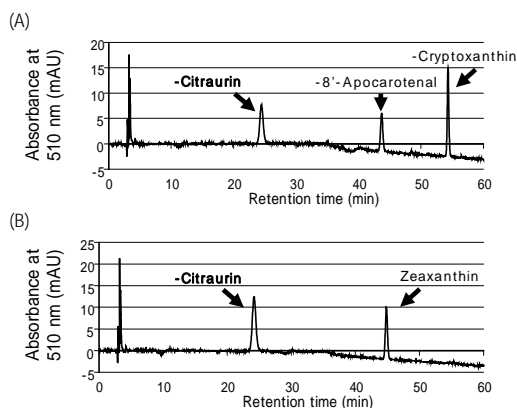


図3 *CitCCD4* の *in vitro*における機能解析
 (A) β -クリプトキサンチンを基質とした場合
 (B) ゼアキサンチンを基質とした場合

ピオラキサンチン、9-*cis*-ピオラキサンチンを基質とした場合、新たな生成物は認められなかった。

以上の結果から、*CitCCD4* は、カンキツ果実のフラベドにおいて、 β -クリプトキサンチンまたはゼアキサンチンから β -シトラウリンを生成する反応を触媒する重要な酵素遺伝子であることが明らかとなった(図4)。

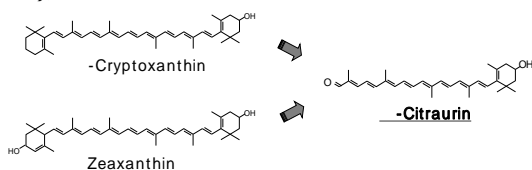


図4 β -シトラウリンの生合成経路

(3) カンキツ果実における β -シトラウリンの高含有化を追求する実験を行った。果実に β -シトラウリンを高含有化する処理条件として、エチレン処理および赤色LEDを用いた光照射処理を行った。*CitCCD4* の遺伝子発現および β -シトラウリン含量は、エチレン処理および赤色LEDによる光照射処理により増大した。特に、エチレン処理により、顕著に *CitCCD4* の遺伝子発現が誘導され、 β -シトラウリンが生成されることが明らかとなった。

(4) *CitCCD4* の細胞内における局在性を明

らかにした。*CitCCD4* を GFP との融合タンパク質として、タバコの葉に一過的に発現させ、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、*CitCCD4* は基質となる β -クリプトキサンチンやゼアキサンチンなどカロテノイドが含まれるクロロプラスト内に局在することが分かった。

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1件)

- ①馬 剛、張 嵐翠、松田 あさみ、松谷 一輝、山脇 和樹、八幡 昌紀、Anung Wahyudi、本橋 令子、加藤 雅也、Enzymatic formation of β -citraurin from β -cryptoxanthin and zeaxanthin by carotenoid cleavage dioxygenase4 in the flavedo of citrus fruits、Plant Physiology、査読有、163巻、2013、682-695 DOI:10.1104/pp.113.223297

〔学会発表〕(計4件)

- ①飯田 康平、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、 β -Citraurin 生成に関わる Carotenoid cleavage dioxygenase4 遺伝子の発現調節因子の探索、園芸学会平成 27 年度秋季大会、平成 27 年 9 月 27 日、徳島大学(徳島市)

馬 剛、張 嵐翠、加藤 雅也、Biosynthesis of β -citraurin in the flavedo of citrus fruits、The Third International Symposium on Citrus Biotechnology、平成 26 年 11 月 12 日、マリナート(静岡市)

飯田 康平、馬 剛、張 嵐翠、松谷 一輝、八幡昌紀、山脇 和樹、生駒 吉識、太田 智、加藤 雅也、カンキツ果実の成熟過程における β -Citraurin 集積および Carotenoid cleavage dioxygenase4 遺伝子の発現変動、園芸学会平成 26 年度秋季大会、平成 26 年 9 月 28 日、佐賀大学(佐賀市)

馬 剛、松谷 一輝、松田 あさみ、張 嵐翠、加藤 雅也、山脇 和樹、八幡 昌紀、カンキツ果実における *CitCCD4* の機能解析、園芸学会平成 25 年度秋季大会、平成 25 年 9 月 21 日、岩手大学(盛岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 雅也 (KATO, Masaya)
静岡大学・農学部・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：