

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25712004

研究課題名(和文) トマト花弁内におけるエステル化カロテノイド蓄積の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for esterified carotenoids in tomato petal

研究代表者

有泉 亨 (Ariizumi, Tohru)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：70575381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はエステル化カロテノイドの蓄積が低下して花弁の色が薄くなったトマト変異体 pale yellow petal-1 (pyp1)、pyp2 を利用して、エステル化カロテノイドの蓄積メカニズムを解明することを目的とした。まず、相補性検定により PYP1 および PYP2 遺伝子の同定に成功した。次に、PYP1 遺伝子はキサントフィルと炭素数14と16の飽和脂肪酸を基質としてエステル化カロテノイドを産生していることを明らかにした。また、プラスチド内に蓄積するプラストグロブリ形成はエステル化カロテノイドの蓄積量と強く関連すること、また、PYP1 タンパク質はプラストグロブリの周辺に局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to understand molecular mechanism for esterified carotenoid using tomato mutants named pale yellow petal 1 and pyp2 that produce petals with reduced pigmentation due to reduced accumulation of the esterified carotenoid. We identified candidate genes for pyp1 and pyp2 mutants and performed complementation experiments, demonstrating that both genes were the responsible. Biochemical analyses showed that PYP1 most likely catalyzes esterification of xanthophylls with mid-chain fatty acids such as C14:0 and C16:0 as substrate. Further, plastoglobule formation in plastid is highly associated with accumulation of esterified xanthophylls. Moreover, PYP1 is localized near the plastoglobule formation. These results indicated that esterified formation is essential for plastoglobule formation.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：トマト カロテノイド 変異体 脂肪酸 プラストグロブリ

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

1. 研究開始当初の背景

重要な園芸作物であるトマトは花卉や果実内にカロテノイド化合物を豊富に含む。カロテノイドは物質に色を与える色素であり、花や果実への着色、光合成系においては集光、光保護作用、さらには強い抗酸化・抗がん化作用を示すなど幅広い機能を示すことが知られる。しかし、この経路に関わるトマトの遺伝子は未だにほとんど単離されていない。

一方、研究代表者は、矮性トマト品種マイクロトムの突然変異体集団より、エステル化カロテノイドの蓄積に欠陥があり、花卉のクロモプラスト内の顆粒(プラストグロブリ)の形成が異常となり、薄い黄色の花弁色を示す2系統のトマト変異体 *pale yellow petal-1 (pyp1)* , および *pyp2* を単離していた。通常、構造に酸素原子を含むカロテノイドであるキサントフィル類は、生体内ではエステル化された状態で豊富に存在していることが知られている。しかし、*pyp1* 変異体の花卉ではそのエステル化キサントフィルがほぼ存在していなかった。一方、*pyp2* 変異体ではエステル化キサントフィルおよびフリー体のキサントフィルがともに減少していた。

そこで、DNA マーカーを利用したポジショナルクック法と、次世代シーケンサー(NGS)による全ゲノム解析により、両変異体の原因遺伝子同定を試みたところ、ともに1つの候補遺伝子を同定した。*PYP1* の候補遺伝子はカロテノイドのエステル化を触媒するエステラーゼ様タンパク質をコードしている一方、*PYP2* の候補遺伝子は、Tetratricopeptide repeat domain (TRP) を有するタンパク質をコードしていた。

以上のことから、*PYP1* 遺伝子はカロテノイドの1つであるネオキサントフィルに対して脂肪酸のエステル化を触媒する酵素を、*PYP2* 遺伝子はカロテノイドエステル化に関わる遺伝子を制御する因子をコードしていると推測した。また、また、エステル化カロテノイドはクロモプラスト内の顆粒形成に必要なと推測した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、トマト花卉内におけるエステル化カロテノイド蓄積の分子基盤を解明することを目的とし、上述の推測の実証する研究を行った。

3. 研究の方法

本研究ではトマト花卉内のエステル化カロテノイド蓄積の分子基盤を解明することを目的として次の5課題を実施した。

(1) 相補性検定

pyp1 および *pyp2* 変異体の原因遺伝子の候補において、相補性検定を行って表現型との関連を調査する。

(2) 過剰発現体の解析

PYP1 と *PYP2* をそれぞれトマト内で過剰発現させた時のエステル化カロテノイド組成・総含量の変化をHPLCで調査する。

(3) エステル化カロテノイドの基質探索
PYP1 によるエステル化反応の基質となる脂肪酸をガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)で調査する。

(4) *PYP1* の酵素実験系確立

PYP1 による脂肪酸エステル化カロテノイド生成能力を *in vitro* の系で調査する。

(5) プラストグロブリ形成とエステル化カロテノイドの関連性証明

透過型電子顕微鏡を用いて、クロモプラスト内のプラストグロブリ(顆粒)形成とエステル化カロテノイドの関係を証明する。

4. 研究成果

(1) 相補性検定

PYP1 の原因遺伝子候補として、脂肪酸の転移に関連するエステラーゼ様タンパク質をコードする遺伝子が同定されていた。そこで、この遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、トマト組織の全身で遺伝子発現を誘導する CaMV35S プロモーターに連結したコンストラクトを *pyp1* 変異体に導入した。その結果、得られた27系統の形質転換体内、20系統で花弁色の回復(薄い黄色から濃い黄色)が観察された。また、*pyp1* 変異体は葯の色も薄い黄色を示すが、この20系統の形質転換体では濃い黄色の葯を形成していた。

一方、*PYP2* の原因遺伝子候補として、タンパク質相互作用に重要な TPR ドメインを有するタンパク質をコードしていた。そこで、この遺伝子のうち、500bp 程度の cDNA を増幅し、アンチセンス方向で CaMV35S プロモーターの下流に連結したコンストラクトを作成し、トマト野生株へと遺伝子導入を行った。19系統の形質転換体を作出したところ、12系統で *pyp2* 変異体同様に薄い黄色を示す花卉と葯が形成された。また、3系統を選抜して定量的 RT-PCR (qRT-PCR) を行ったところ、形質転換体では候補遺伝子が40-70%程度、有意に発現低下していたことが分かった。

以上のことから、原因遺伝子の発現と表現型との関連が見られたため、候補遺伝子が原因遺伝子であると考えた。

(2) 過剰発現体の解析

(1) で作出した *PYP1* を過剰発現させた形質転換体のカロテノイド組成の調査を行った。野生株トマト、*pyp1* 変異体および、3系統の形質転換体の開花期の花弁をサンプリングし、花き研究所が保有する HPLC を利用して測定を行った。その結果、野生株トマトでは、花卉や葯にはエステル化されたキサントフィル類が豊富に含まれていたが、*pyp1* 変異体ではエステル化されたキサントフィルはほぼ存在していなかった。一

方、形質転換体ではいずれも野生株と同等量のカロテノイドが蓄積していた。また、トマトの花弁や葯に含まれるキサントフィルは、大部分がネオキササンチンとピオラキササンチンであるが、これらが存在する組成も野生株と同程度であった。以上、PYP1 遺伝子の過剰発現体において、野生株を上回るカロテノイド含量を示さず、かつ、組成も変化していなかったことから、野生株では、カロテノイド含量はほぼ閾値に達していると考えられた。

一方 PYP2 遺伝子の cDNA 全長は 5500bp ほどであり、エンタリーベクターへのクローニングは成功したが、destination vector へのクローニングが成功しなかった。コンストラクトが作れなかったため、PYP2 遺伝子の過剰発現体作出は行えなかった。

(3) エステル化カロテノイドの基質探索

(1) および (2) の実験により、pyp1 変異体ではエステル化カロテノイドがほぼ存在していなかったことから、PYP1 遺伝子はカロテノイドのエステル化を促進する遺伝子と予測される。(4)における酵素活性の実験系を立ち上げるため、PYP1 の基質の探索を試みた。通常、エステル化とはヒドロキシル基を含む化合物(ここではキサントフィル)とカフボキシル基を持つカルボン酸(ここでは脂肪酸)との縮合反応である。エステル化の対象はキサントフィルであるネオキササンチンとピオラキササンチンであるため、そのエステル化の対象となる脂肪酸の分子種の特定を試みた。

まず、野生株から 5g 程度の大量の花弁をサンプリングし、カロテノイドを抽出した後に HPLC を利用して、それぞれの出現ピーク毎にエステル化されたカロテノイドを分取した。合計 17 種類のエステル化カロテノイドを分取し、GC/MS による化合物の分子量の推定を行い、NMR で化学構造の推定を試みた。その結果、トマト花弁でエステル化されている可能物は、トランス型 (all-E) およびシス型 (9Z) のネオキササンチン、あるいはトランス型およびシス型のピオラキササンチンであること、また、炭素数 14 と 16 の飽和脂肪酸 (C14:0, C16:0) がこれらにエステル結合していることを明らかにした。また、1 つのカロテノイド分子に 2 つの脂肪酸がエステル結合した diester 型のエステル化ネオキササンチン、およびピオラキササンチンも存在することも分かった。

以上のことから、PYP1 はキサントフィル(ネオキササンチンおよびピオラキササンチン)と C14:0 あるいは C16:0 を基質してエステル結合を触媒する酵素であることが強く示唆された。

(4) PYP1 の酵素実験系確立

PYP1 によるエステル化反応を確認する実験系を立ち上げるため、ピオラキササンチンを産生を誘導するプラスミド pAC-VIOL と、PYP1 の全長を保有する大腸菌の作出を試みた。まず、PYP1 の全長 cDNA の C 末端側に His タグを連結したキメラ遺伝子を作成し、pGEM-T ベクターへのクローニングを試みた。酵素実験の反応系のネガティブコントロールとして、PYP1 遺伝子内にミスセンス変異が導入された pyp1-2 を利用した(この pyp1-2 は、pyp1 変異体の原因変異であり、おそらくは酵素活性が失活している)。pyp1-2 の cDNA 全長に His タグを連結したキメラ遺伝子を pZEM-T ベクターにクローニングすることができた。今後、野生株型である PYP1-His の pZEM-T へのクローニングを行い、両者のプラスミドをそれぞれ保有する大腸菌を培養後にカロテノイド組成を比較することで、PYP1 のエステル化酵素活性を実証できると期待される。

(5) プラストグロブリ形成とエステル化カロテノイドの関連性証明

カロテノイドはプラスチド(クロモプラスト)で合成されるため、透過型電子顕微鏡を用いて、花弁の異なる発達段階でプラスチドの形態を調査した。その結果、野生株ではカロテノイドの蓄積に伴い、顕著なプラストグロブリ形成が見られた一方、エステル化カロテノイドがほぼ存在しない pyp1 変異体ではプラストグロブリ形成がほとんど観察されなかった。また、pyp2 変異体ではプラスチドの構造が異常であった。さらに、免疫電子顕微鏡法により、PYP1 がプラスチド内に局在すること、特にプラストグロブリ周辺に局在することを明らかにした。以上のことから、プラストグロブリはおそらくエステル化カロテノイドが蓄積した形態であり、PYP1 はその周囲でエステル化カロテノイドを供給する役割があると推測された。

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1件)

(1) Ariizumi T, Kishimoto S, Kakami R, Maoka T, Hirakawa H, Suzuki Y, Ozeki Y, Shirasawa K, Bernillon S, Okabe Y, Moing A, Asamizu E, Rothan C, Ohmiya A and Ezura H (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*)."
The Plant Journal, 79:453-465, 2014, doi: 10.1111/tpj.12570

〔学会発表〕(計8件)

(1) 有泉亨, 星川健, 江面浩 (2017) 「マイクロトム変異体の活用によるトマト研究の革新」植物生理学会・DB講習会, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) 3月17日
(招待講演)

(2) Ariizumi T, Takezawa S, Kishimoto S, Hirakawa H, Shirasawa K, Ohmiya A, Bernillon S, Moing A, Rothan C, Okabe Y, Ezura H (2016) “*PYP2* mutation disturbs normal yellow pigmentation of flower in tomato (*Solanum lycopersicum*). ” Japan Solanaceae Symposium 2016 (JSOL2016), International Christian University, Mitaka, Tokyo, Japan 2016/11/25..

(3) Ariizumi T (2016) “Enhancement of tomato quality by the breeding techniques. ” Tsukuba-France Joint Conference, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan, Jan 22th.
(招待講演)

(4) 有泉亨(2016)「育種技術の力でトマトを高品質化する」理化学研究所(埼玉県・和光市)1月21日
(招待講演)

(5) 有泉亨(2015)「園芸作物トマトの遺伝資源創成と果実発達遺伝子群の同定」東京園芸懇話会, 筑波大学, 茨城県・つくば市, 12月8日
(招待講演)

(6) Ariizumi T, Shinozaki Y, Okabe Y, Hoshikawa K, Shikata M, Yano R, Hao S, Takahara M, Takei H, Benard C, Prodhomme D, Gibon Y, Kanayama Y, Kubo Y, Aoki K and Ezura H (2015) “Towards improved fruit set efficiency using tomato genetic resources. ” International Symposium on Solanaceae Conference 2015 (SOL2015), Bordeaux, France Oct 27th to 29th
(招待講演)

(7) 竹澤里実, 岸本早苗, 平川英樹, 白澤健太, 大宮あけみ, 江面浩, 有泉亨(2015) 「Biotechnological studies of the novel tomato mutant *pale yellow petal 2*. 」第33回日本植物細胞分子生物学会, 東京大学, 東京都・文京区, 2015年8月10日-12日

(8) Ariizumi T, Kishimoto S, Maoka T, Hirakawa H, Shirasawa K, Okabe Y, Takezawa S, Ohmiya A and Ezura H (2014) 「トマトの PALE YELLOW PETAL1 遺伝子はエステル化カロテノイドの蓄積と花卉黄色化に必須である。」第32回日本植物細胞分子生物学会, いわて県民情報交流センター(岩手県

盛岡市), 8月21日-22日

〔その他〕

ホームページ

<http://www.gene.tsukuba.ac.jp/Plant/MolecularBreeding/index.html>

<http://olericulture-tsukuba.org/manaer>

http://olericulture-tsukuba.org/ariizumi_lab/

6. 研究組織

(1)研究代表者

有泉 亨 (ARIIZUMI, TOHRU)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 70575381