

キク科植物の花弁におけるカロテノイドの解析に関する研究

岸本 早苗 (農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所)

sanae@affrc.go.jp

花色の形成には非常に多種の色素成分が関与していることが知られている。これらのうち、幅広い植物種に渡って重要な働きをしているのが赤色から青色を示すアントシアニンと黄色から赤色を示すカロテノイドである。近年、花き類のアントシアニンを含むフラボノイド類に関しては化学的、生理学的および遺伝学的なアプローチにより著しく研究が進展している。一方、カロテノイドに関する科学的知見は非常に不足している。本研究では世界的に重要な園芸植物の1つであるキク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) を含むキク科植物のカロテノイド構成を明らかにし、さらにカロテノイドによる花色発現を制御する遺伝的要因を明らかにすることを試みた。

はじめに

カロテノイドは炭素数 40 の基本骨格を持つイソプレノイド化合物であり、現在までに約 700 種以上が天然物として報告されている¹⁾。植物体内では光酸化から光合成器官を守るという重要な役割を担っており、生存に不可欠な成分の一つである。また、人間にとってはビタミンA 活性や抗酸化活性を持つ重要な栄養素である。その生合成は 2 分子のゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)が重合して無色の phytoene が生成するところからスタートする(図1)²⁾。Phytoene は不飽和化酵素、異性化酵素の触媒を経て、赤色の lycopene に至る。さらに環化酵素(LCYB: lycopene β -cyclase および LCYE: lycopene ϵ -cyclase)によって β 環・ ϵ 環というリング構造が炭素鎖の両端に付与され α -carotene (β 環と ϵ 環が一つずつ) および β -carotene (β 環が二つ) になり、カロテノイド生合成系はこれ以降二つに分岐する。これらがさらに水酸化、エポキシ化および異性化といったステップを経ることによって、様々な構造を持つカロテノイドに生合成される。水酸化、エポキシ化等によって酸素原子などの水素・炭素以外の原子種が付与されたカロテノイドを総称してキサントフィルと呼ぶ。

キク花弁中に存在する色素は主にカロテノイドとアントシアニンであり、この両成分の組み合わせによって白～黄色、橙色、桃～赤紫色などの幅広い花色が作り出されている³⁾。キクは仏事での需要が多く、切り花として出荷されるものの約 3/4 が仏花用の輪ギクであり、白色および黄色の花色のものでほとんどを占めている。ところが、一般的に黄色品種は白色品種よりも性質が劣る傾向があり、輪ギク全体の中の黄色品種のシェアは年々低下しつつある。黄色花色と白色花色を決定する要因を明らかにすれば、白色品種の性質を変えることなく花色のみを

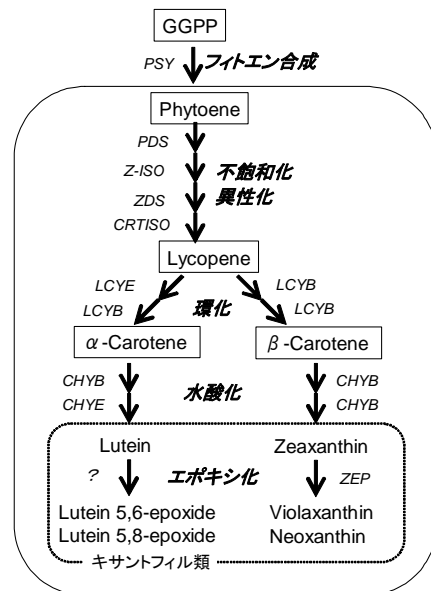


図1. 植物におけるカロテノイド生合成経路

制御する要因を明らかにすれば、白色品種の性質を変えることなく花色のみを

黄色にすることができる可能性がある。また、カロテノイドとアントシアニン両方を含む橙色品種はくすんだ色調であり、またアントシアニンの発現が環境条件、特に温度条件に影響を受けやすいため、色調を安定させることが難しい。これらの理由もあってか、橙色品種の流通量は非常に少ない。ところが、同じキク科の中には鮮やかな橙色を示す花き類が存在する。これらの鮮やかさの理由を明らかにすれば、キクだけでなく鮮やかな橙色を持たない様々な花き類の改良に有用な知見が得られると考え、解析に取り組んだ。

キク花卉に含まれるカロテノイド成分の分析

黄色～橙色花色を示すキク 16 品種から花卉に含まれるカロテノイド成分を抽出し、HPLC 分析を行ったところ、いずれの品種からも大きな 9 つのピークが得られ、どの品種もカロテノイドの構成成分は同じであることが明らかになった。そこで、これらの構造決定を行ったところ、キク花卉から 16 種のキサントフィル類が同定された(表 1) ⁴⁾。これらのうち、(3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*,6'*R*)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein はこれまでに天然物として報告のない新規カロテノイドであった。また、様々なシス構造を持つ化合物が検出され、大部分が炭素鎖の一カ所もしくは二カ所にシス構造を持っていた。二カ所にシス構造を持つカロテノイドは天然では非常にまれであり、他植物の花弁から数種が報告されているにすぎない。一つの材料からこのように複数種の二カ所にシス構造を持つカロテノイドが検出された例は今までにない。また、キク花卉から検出されたカロテノイドは 92%以上が α -carotene 誘導体であり、非常に特徴的な構成であることが明らかになった。

表 1. キク花卉から同定されたカロテノイド成分

ピーク番号	同定されたカロテノイド名
1	(3 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 3' <i>R</i> , 6' <i>R</i>)-5,6-dihydro-5,6-dihydroxylutein*
2	(9 <i>Z</i> ,13' <i>Z</i>)-lutein 5,6-epoxide*/ (13 <i>Z</i> ,9' <i>Z</i>)-lutein 5,6-epoxide*/ (9' <i>Z</i> ,13' <i>Z</i>)-lutein 5,6-epoxide*/ (9 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i>)-lutein 5,6-epoxide*
3	(all- <i>E</i>)-lutein 5,6-epoxide
4	(9 <i>Z</i> ,9' <i>Z</i>)-lutein 5,6-epoxide*/ (9 <i>Z</i>)-violaxanthin/ (8 <i>S</i>)-lutein 5,8-epoxide/ (8 <i>R</i>)-lutein 5,8-epoxide/ (9 <i>Z</i> -8' <i>R</i>)-luteoxanthin
5	(9' <i>Z</i>)-lutein 5,6-epoxide
6	(9 <i>Z</i>)-lutein 5,6-epoxide
7	(all- <i>E</i>)-lutein
8	(9 <i>Z</i>)-lutein
9	(9' <i>Z</i>)-lutein

* : 新規カロテノイド
太字: α -carotene 誘導体

キク花卉および葉におけるカロテノイド蓄積の調節機構の解明

先に述べたとおり花卉では全カロテノイドの 92%以上が α -carotene 誘導体であったが、一般的に多くの植物の葉では β -carotene 誘導体が主成分である ⁵⁾。キクの葉のカロテノイド分析を行ったところ、 α -carotene 誘導体が占める割合は 43%であり、 β -carotene 誘導体のほうが高い割合で含まれていた。そこで、この割合の差が生じる原因を調査するため、黄色品種の花弁と葉のカロテノイド生合成系酵素遺伝子 13 種の発現を調査し、比較した ⁶⁾。最も特徴的であったのが lycopene を環化する 2 種の酵素遺伝子、*LCYB* と *LCYE* の発現量の違いであった。花卉では発達段階に関わらず *LCYE* は *LCYB* に比べて常に高い発現を示す一方、葉では *LCYB* に比べ *LCYE* の発現は非常に低かった。従って、花卉と葉の α -carotene 誘導体と β -carotene 誘導体の蓄積割合の差はこれらの遺伝子の発現量の差が原因であることが明らかになった。

また、キク花卉の白色花色形質はカロテノイドによって着色される黄色花色形質に対して優性を示し、交配実験から一遺伝子によって支配されていると推定されていた ⁷⁾。しかしこの遺伝子は単離されておらず、キク花卉におけるカロテノイド蓄積の制御機構については不明であった。そこで、キクの黄色品種 3 品種と白色品種 3 品種の花弁におけるカロテノイド生合成系酵素遺伝子 13 種の発現について解析を行った ⁸⁾。その結果、いずれの生合成系酵素遺伝子も

黄色品種、白色品種共に発現しており、白色品種においてもカロテノイド生合成系が機能していることが推測された。したがって花卉におけるカロテノイド蓄積量の違いは生合成能の有無ではなくその他の要因の関与が示唆された。

では白色花卉を作り出す原因遺伝子は何なのか？これについては Ohmiya らが行った白色品種と黄色品種の花弁の遺伝子発現を比較し、白色花卉特異的に発現している遺伝子だけを単離する手法であるサブトラクション法を用いた解析によって明らかになった⁸⁾。白色品種特異的な発現を示す遺伝子として単離されたカロテノイド分解酵素遺伝子ホモログ(carotenoid cleavage dioxygenase 4a: *CmCCD4a*) がキクの花弁の白色形質の原因遺伝子であることが発現解析、遺伝子組換え実験によって明らかになった。キクの白色品種では、生合成されたカロテノイドが端から分解されることによって白い花卉を形成しているのである。

キク科植物の花弁における橙色および黄色の発現様式

なぜキクの橙色がくすんだ花色であるのか、また、なぜ他のキク科の花き類は非常に鮮やかな橙色を示すのかを明らかにするために、9種のキク科植物の橙色品種と黄色品種のアントシアニン量、カロテノイド量、及びカロテノイド成分について比較を行い、橙色の発現様式の解明を試みた⁹⁾。橙色品種と黄色品種はいずれも黄色のカロテノイドを含んでおり、橙色品種ではこれにさらに赤みを加えて橙色を作るために、①赤色のアントシアニンを蓄積する(キク、ジニア、ガーベラ)、②黄色のカロテノイドを大量に蓄積する(ヒマワリ、アフリカンマリーゴールド、フレンチマリーゴールド)、③赤色のカロテノイドを蓄積する(キンセンカ、ガザニア、オステオスペルマム)、という三つの方法のいずれかが採られていることが明らかになった。キクやジニアなどのようにアントシアニンとカロテノイドの重なりによって作り出される橙色は色調が暗い傾向を示した。いっぽう、マリーゴールドやキンセンカなどのようにカロテノイドのみで作られる橙色は非常に明るく鮮やかであり、今後橙色品種の育種を行う際に有用な知見となると考えられた。

キンセンカ花弁に含まれるカロテノイド成分の分析

前項の調査によってキンセンカの橙色品種には黄色品種にはない赤色のカロテノイド成分が多種含まれていることが明らかになったが、ほとんどが未知の成分であった。そこで、橙色品種および黄色品種に含まれるカロテノイド成分の構造を解析した¹⁰⁾。19種のカロテノイドを同定したが、これらのうち10種は橙色品種にのみ存在し、赤色を示す成分であった。このうち、6種類のカロテノイドが5位もしくは5'位にシス構造を持っていた

(5(5')-cis-カロテノイド)(図2)。5位にシス構造を持つカロテノイドは天然では非常にまれであり、ガザニア花弁やバラ果実といった限られた材料からしか検出されていない。キンセンカから同定された5(5')-cis-カロテノイドのうち3種は天然物として新規化合物であった。カロテノイドの環化は酵素の触媒によって行われ、トランス構造を持つ1~6位の炭素鎖の末端がβ環もしくはε環に変換される。ところが5位がシス構造のカロテノイドはその構造が障害となって環化の反応が起きず、生合成が進まなくなるために蓄積するのではないかと推測している。

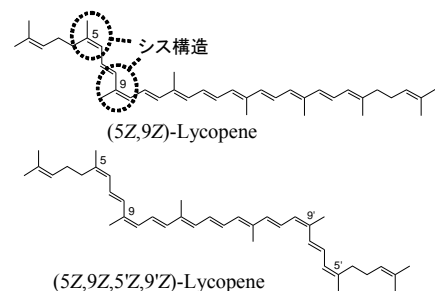


図2. キンセンカ橙色品種に特異的に含まれる5位もしくは5'位にシス構造を持つカロテノイド

おわりに

本研究では花卉におけるカロテノイド蓄積をコントロールすることによって多彩な花色を作り出すことが可能となることを示すことができた。植物のカロテノイド蓄積制御機構に関してはまだ解明されていない部分が多いが、今後の研究の進展によってこのメカニズムが明らかになれば花き類の改良だけでなく、多くの食用植物への応用も期待される。近い将来、自在に花色を改変できるようになることを目指して今後とも研究を推進していきたい。

謝辞

本研究を行うにあたっては、非常に多くの皆様にご協力・ご助言を頂きました。特に所属チーム長である花き研究所の大宮あけみ博士には本研究の計画・立案の段階から現在に至るまで終始ご指導・ご支援いただきました。心より厚くお礼申し上げます。また、カロテノイドの構造解析について全面的にご助力いただきました(財)生産開発科学研究所の眞岡孝至博士に心より感謝申し上げます。また、本研究にご助言・ご協力いただきました中山真義博士、住友克彦博士、八木雅史博士をはじめとした花き研究所の皆様にご心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Britton, G., S. Liaaen-Jensen and H. Pfander. 2004. Carotenoids Handbook. Birkhäuser, Basel.
- 2) Sandmann, G., S. Römer and P. D. Fraser. 2006. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab. Eng.* 8: 291-302.
- 3) Kawase, K. and Y. Tsukamoto. 1976. Studies on flower color in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. III. Quantitative effects of major pigments on flower color variation, and measurement of color qualities of petals with a color difference meter. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 45: 65-75.
- 4) Kishimoto, S., T. Maoka, M. Nakayama and A. Ohmiya. 2004. Carotenoid composition in petals of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Phytochemistry* 65: 2781-2787.
- 5) Goodwin, T. W. and G. Britton. 1988. Distribution and analysis of carotenoids. p. 62-132. In: T. W. Goodwin (ed.). *Plant Pigments*. Academic Press, London.
- 6) Kishimoto, S. and A. Ohmiya. 2006. Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Physiol. Plant.* 128: 436-447.
- 7) Hattori, K. 1991. Inheritance of carotenoid pigmentation in flower color of chrysanthemum. *Japan. J. Breed.* 41: 1-9.
- 8) Ohmiya, A., S. Kishimoto, R. Aida, S. Yoshioka and K. Sumitomo. 2006. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiol.* 142: 1193-1201.
- 9) Kishimoto, S., K. Sumitomo, M. Yagi, M. Nakayama and A. Ohmiya. 2007. Three routes to orange petal color via carotenoid components in 9 Compositae species. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 76: 250-257.
- 10) Kishimoto, S., T. Maoka, K. Sumitomo and A. Ohmiya. 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Biosci. Biotech. Biochem.* 69: 2122-2128.

Studies on Carotenoid in the Petals of Compositae Plants

Sanae Kishimoto (National Institute of Floricultural Science)

sanae@affrc.go.jp