

# 植物におけるカロテノイドの生合成とバイオテクノロジー

三沢 典彦

本稿では、光合成を行う真核生物、特に陸上植物におけるカロテノイドの生合成経路、および各種カロテノイド生合成遺伝子の機能を解説した。また、バイオテクノロジー生産に適した産業上有用なカロテノイドとしてアスタキサンチンがあげられるが、本色素を農作物に生産させるためのパスウェイエンジニアリング (pathway engineering) 研究について概説した。

## カロテノイドの生合成

### 植物における一般的なカロテノイド生合成経路

すべての光合成生物はカロテノイドを生合成 (*de novo* 合成) できる。光合成を行う真核生物ではカロテノイドはプラスチド (plastid; 葉緑体, 色素体) 内で生合成される。植物における一般的なカロテノイドの生合成経路、および各種カロテノイド生合成遺伝子がコードする酵素の機能を図1, 2に示した<sup>1-3)</sup>。図1はリコペン (lycopene; all-*trans*) までの生合成経路であり、光合成を行う真核生物に共通である。非メバロン酸経路 [MEP (methylerythritol 4-phosphate)] 経路により作られた IPP (isopentenyl diphosphate) と DMAPP (dimethylallyl diphosphate) は、IDI (IPP isomerase) により量比が調整され、DMAPP側に平衡が移動する。DMAPPはIPPと順次縮合することにより、GPP (geranyl diphosphate), FPP (farnesyl diphosphate), GGPP (geranylgeranyl diphosphate) に変換される (図1)。この反応はGGPS (GGPP synthase) により担われる<sup>1)</sup>。次に、PSY (phytoene synthase) により2分子のGGPPが縮合することにより、最初のカロテノイドである無色のフィトエン (phytoene; 15-*cis*) が合成される。フィトエンは2種類の脱水素酵素 (desaturase; 不飽和化酵素) と2種類の異性化酵素 (isomerase) によりリコペンに変換される<sup>2)</sup>。この反応の詳細は図1に示されているように、まず、PDS (phytoene desaturase) によりフィトエンから9,15,9'-*tri-cis*- $\zeta$ -caroteneが合成され、次に、Z-ISO ( $\zeta$ -carotene isomerase) により9,9'-*di-cis*- $\zeta$ -caroteneに変換される。この異性化反応は光でも進行する。次に、ZDS ( $\zeta$ -carotene desaturase) によりプロリコペン (prolycopene) が合成され、最後に、CRTISO (carotene isomerase) によりリ

コペンに変換される。図1, 図2ではまた、カロテノイド産生細菌 (Proteobacteria門) におけるカロテノイド生合成酵素の機能を括弧で示した。カロテノイド産生細菌におけるCrtB (phytoene synthase) は植物のPSYのオルソログであるのに対し、CrtI (phytoene desaturase) は植物のPDSとは違って、フィトエンからリコペンを1つの酵素で合成する (図1)<sup>4,5)</sup>。

図2は、植物 (陸上植物) の葉緑体におけるリコペン以降の生合成経路を示している<sup>3)</sup>。リコペンから2種類

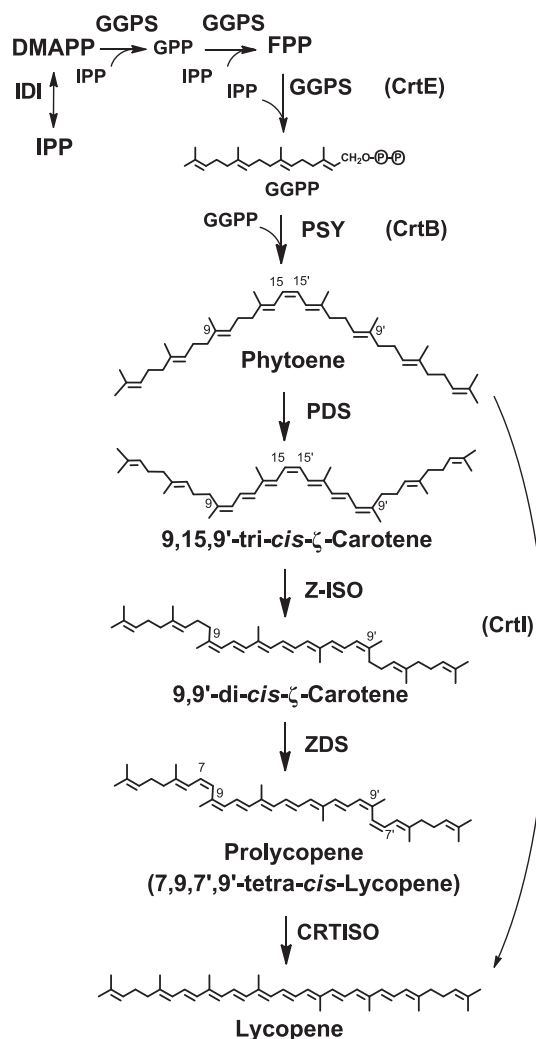


図1. 植物のプラスチドにおけるリコペンまでのカロテノイド生合成経路

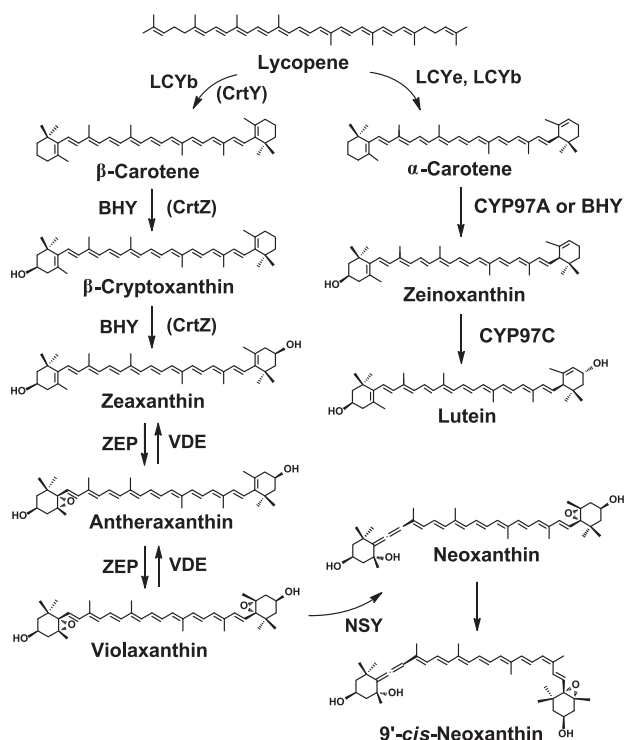


図2. 植物の葉緑体におけるリコペン以降のカロテノイド生合成経路

の環化カロテンが合成される。リコペンにLCYb (lycopene  $\beta$ -cyclase) のみが作用した場合、2つの $\beta$ 環を持つ $\beta$ -カロテン ( $\beta$ -carotene) が合成される。 $\beta$ -カロテンはBHY ( $\beta$ -carotene 3,3'-hydroxylase) により、 $\beta$ -クリプトキサニン ( $\beta$ -cryptoxanthin) を経てゼアキサニン (zeaxanthin) に変換される。なお、LCYbおよびBHYはそれぞれ、カロテノイド産生細菌におけるCrtYおよびCrtZのオルソログである<sup>4,5)</sup>。図2におけるゼアキサニン以降の経路は植物に固有の経路であり、細菌には存在しない<sup>5)</sup>。植物葉緑体では、ゼアキサニンはZEP (zeaxanthin epoxidase) によりアンテラキサニン (antheraxanthin) を経てビオラキサニン (violaxanthin) に変換され、さらに、NSY (neoxanthin synthase) によりネオキサニン (neoxanthin) に変換される。なお、ゼアキサニン-ビオラキサニン間にはキサントフィルサイクルを廻すため、VDE (violaxanthin de-epoxidase) による逆反応も存在する。また、ネオキサニンは最終的に、異性化酵素により9'-cis体に変換されると考えられている。リコペンにLCYe (lycopene  $\epsilon$ -cyclase) とLCYbが作用した場合は、 $\epsilon$ 環と $\beta$ 環を持つ $\alpha$ -カロテンが合成される(図2)<sup>6)</sup>。 $\alpha$ -カロテンはCYP97A( $\alpha$ -carotene 3-hydroxylase)またはBHY

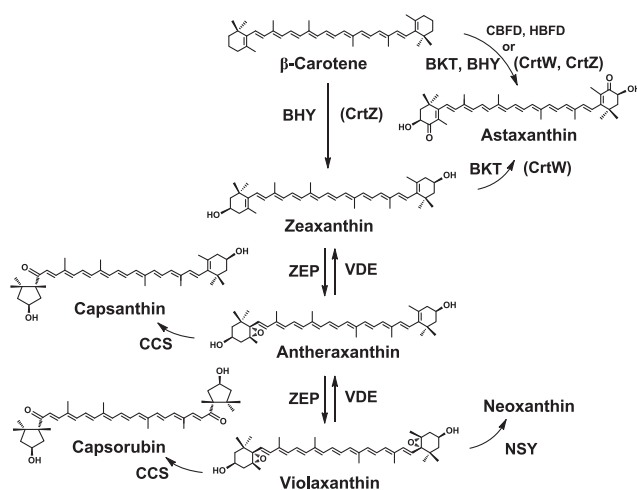


図3. 植物種に固有なカロテノイドの生合成経路

により、ゼイノキサニン (zeinoxanthin) に変換された後、CYP97C (zeinoxanthin 3'-hydroxylase) により、ルテイン (lutein) に変換される(図2)<sup>7)</sup>。なお、図2における $\alpha$ -カロテン以降の経路もまた、植物に固有の経路であり、細菌には存在しない。

#### 植物の特定器官におけるカロテノイド生合成経路

高等植物の葉においてもっとも多く存在するカロテノイドはルテインであり(全カロテノイドの45%程度)、次に多いカロテノイドは $\beta$ -カロテンである(25%程度)。これに、ビオラキサニンやネオキサニンが続く。一方、トマトやウンシュウ(温州)ミカンの実はそれぞれ、リコペンおよび $\beta$ -クリプトキサニンを主要カロテノイドとして蓄積し、ニンジンの主根やカボチャの実は、主要カロテノイドとして $\beta$ -カロテンを、 $\alpha$ -カロテン(10~20%程度)とともに蓄積している。これらの器官では、蓄積されるカロテノイド以降の代謝酵素遺伝子の発現レベルが相対的に低くなっており、結果的に、葉でのカロテノイド生合成中間体が蓄積すると考えられる。

一部の植物は新たな触媒機能を有する酵素遺伝子を獲得することによって、他の植物には見られない独自のカロテノイドを合成することができる。植物特定の器官における植物種に固有のカロテノイドの生合成経路、および各種カロテノイド生合成遺伝子がコードする酵素の機能を図3に示した<sup>5)</sup>。カプサンチン (capsanthin) やカプソルビン (capsorubin) は赤ピーマン (パプリカ; *Capsicum annuum*) の実やオニユリ (*Lilium lancifolium*) の花粉にのみ存在する珍しい構造を持つカロテノイドである<sup>8)</sup>。カプサンチンやカプソルビンはCCS (capsanthin-capsorubin synthase) の働きにより、それぞれ、アンテ

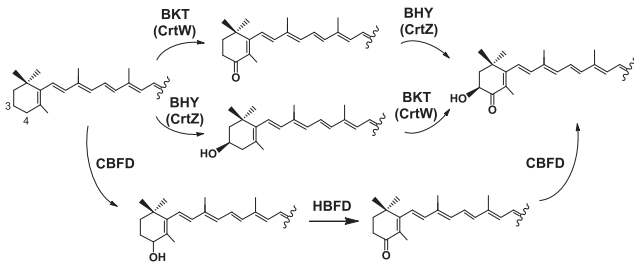


図4. β環から3-ヒドロキシ-4-ケト-β環への変換経路

ラキサンチンおよびビオラキサンチンから合成される(図3)<sup>9)</sup>。CCSはLCYbと相同性を有するため、CCS遺伝子はLCYb遺伝子から進化したと考えられる。他方、花卉にアスタキサンチン (astaxanthin) を蓄積できるアドニス (*Adonis aestivalis*; ナツザキフクジュソウ) がある。この植物では carotenoid β-ring 4-dehydrogenase (CBFD) と carotenoid 4-hydroxy-β-ring 4-dehydrogenase (HBFD) の働きによりβ-カロテンからアスタキサンチンが合成される(図3, 4)<sup>10)</sup>。β-カロテンにおけるβ環は、まずCBFDにより4-ヒドロキシ-β環になり、次いでHBFDにより4-ケト-β環になり、最後に再びCBFDにより3-ヒドロキシ-4-ケト-β環になると考えられている(図4)。CBFDはBHYと相同性を有するので、CBFD遺伝子はBHY遺伝子から進化したと考えることができる。一方、HBFDは植物や藻類で saccharopine dehydrogenase (SDH) と言われている遺伝子群と同じファミリーに属している。

現在、アスタキサンチンの商業生産に広く用いられている淡水性緑藻(微細藻)の *Haematococcus pluvialis* は、窒素飢餓などのストレス環境下に置かれると増殖を止め、それまで作っていた植物葉緑体型のカロテノイドからアスタキサンチン生産に切り替える。その際、BKT (carotenoid 4,4'-ketolase; carotenoid 4,4'-oxygenaseとも呼ばれる) およびBHY (carotenoid 3,3'-hydroxylase) の働きによりβ-カロテンからアスタキサンチンが合成される(図3, 4)。β-カロテンにおけるβ環は、最初にBKT, BHYどちらの作用も受けることができるが、最終的に3-ヒドロキシ-4-ケト-β環になる<sup>3,11)</sup>。なお、BKTは、アスタキサンチン産生細菌が持つCrtWのオルソログである。

#### アスタキサンチンを生産する遺伝子組換え植物の作出

植物は通常、β環の4,4'位にケト基を導入する酵素遺伝子を持たないので、アスタキサンチンなどのケトカロテノイドを合成できない。今日では、*crtW*または*BKT*

遺伝子を利用したパスウェイエンジニアリングにより、種々の高等植物にアスタキサンチン産生能を与えることができる<sup>3,12)</sup>。*crtW*または*BKT*は適当なプロモータとターミネータの制御下で、種々の高等植物の染色体DNA内に導入された<sup>12,13)</sup>。食用農作物では、ニンジン (*Daucus carota*) の主根<sup>14)</sup>、トウモロコシ (*Zea mays*) 胚乳<sup>15)</sup>、ナタネ (キャノラ; *Brassica napus*) 種<sup>16)</sup>、ジャガイモ (パレイショ; *Solanum phureja* 及び *Solanum tuberosum*) 塊茎<sup>17,18)</sup>、およびトマト (*Solanum lycopersicum*) 実<sup>19)</sup>でアスタキサンチンが合成された。このうち、報告されたアスタキサンチンの生産レベルはトマトがもっとも多く16.1 mg/g乾重量<sup>19)</sup>であり、次にニンジンで生産量は91.6 μg/g湿重量(含水率90%とすると916 μg/g乾重量)<sup>14)</sup>であった。一方、蓮沼らは、*Brevundimonas*属細菌SD212株の*crtZ*と*crtW*遺伝子(コドン使用は植物型に変えられている)を*rrn*プロモータの制御下で直接、タバコ (*Nicotiana tabacum*) 葉緑体のゲノムに導入し、葉緑体ゲノム改変(chloroplast genome-modified; CGMと記載)タバコを得た<sup>20)</sup>。CGMタバコ葉では99%のカロテノイドが、アスタキサンチン(全カロテノイドの74%)などのケトカロテノイドに変換されていたにもかかわらず、光合成を行い、正常に生育することができた。筆者らは最近、同じ*crtZ*と*crtW*遺伝子および*idi*遺伝子を利用した類似のプラスミドにより、レタス (*Lactuca sativa*; var. Berkeley) の葉緑体を形質転換することにより、CGMレタスを得ることができた<sup>21)</sup>。CGMレタスの葉におけるカロテノイド組成を調べたところ、アスタキサンチン [178 μg/g湿重量(フリー体換算; 含水率90%とすると1.78 mg/g乾重量); 全カロテノイドの77%]を筆頭に、全カロテノイドの95%(218 μg/g湿重量)がケトカロテノイドであった。今回作出したCGMレタスは組換え植物用植物工場で容易に増殖できるので、アスタキサンチンの安定的供給源として期待されるだけでなく、高等植物におけるカロテノイドの生理的役割や進化を探るためのモデル植物となるかもしれない。

#### おわりに

植物におけるカロテノイドの生合成について、最新の知見も加えながら解説した。今日では、高等植物における主要なカロテノイド生合成遺伝子は、ほぼすべて同定済みである。ただ、neoxanthin isomerase遺伝子については、まだ未解明である。一方、バイオテクノロジーによるカロテノイド生産研究は世界レベルで精力的に実施

されてきた。組換え農作物の実用化に関して、トウモロコシのPSY遺伝子とカロテノイド産生細菌の*crtI*遺伝子が導入されたβ-カロテン強化米 (*Oryza sativa*; Golden Rice)<sup>22)</sup>の商業栽培が近い将来、フィリピンで行われる予定である。この実用化を契機に、消費者の健康の維持・増進を目的とした組換え農作物が世界で認知される可能性がある。その際、次の実用化の対象として、アスタキサンチンを効率生産する組換え農作物が期待される。組換え農作物に限らず、パスウェイエンジニアリングにより開発された有用カロテノイドの効率生産技術が、商業生産に適応される日は近いかもしれない。

#### 文 献

- 1) Kuntz, M. *et al.*: *Plant J.*, **2**, 25 (1992).
- 2) Yu, Q. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **286**, 8666 (2011).
- 3) 三沢典彦, 竹村美保: バイオサイエンスとインダストリー, **73**, 110 (2015).
- 4) Misawa, N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **172**, 6704 (1990).
- 5) 竹村美保, 三沢典彦: FFIジャーナル, **220**, 110 (2015).
- 6) Takemura, M. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **55**, 194 (2014).
- 7) Takemura, M. *et al.*: *Planta*, **241**, 699 (2015).
- 8) Britton, G. *et al.* (eds.): *Carotenoids Handbook*, Birkhäuser Verlag, Basel (2004).
- 9) Jeknic, Z. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **53**, 1899 (2012).
- 10) Cunningham, Jr. F. X. and Gantt, E.: *Plant Cell*, **23**, 3055 (2011).
- 11) Fraser, P. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **272**, 6128 (1997).
- 12) Misawa, N.: *Curr. Opinion Biotechnol.*, **22**, 627 (2011).
- 13) Misawa, N.: *Plant Biotechnol.*, **26**, 93 (2009).
- 14) Jayaraj, J. *et al.*: *Transgenic Res.*, **17**, 489 (2008).
- 15) Zhu, C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18232 (2008).
- 16) Fujisawa, M. *et al.*: *J. Exp. Bot.*, **60**, 1319 (2009).
- 17) Campbell, R. *et al.*: *Plant Sci.*, **234**, 27 (2015).
- 18) Mortimer, C. L. *et al.*: *Plant Biotechnol. J.*, DOI: 10.1111/pbi.12365 (2015).
- 19) Huang, J. C. *et al.*: *Metab. Eng.*, **17**, 59 (2013).
- 20) Hasunuma, T. *et al.*: *Plant J.*, **55**, 857 (2008).
- 21) Harada, H. *et al.*: *Transgenic Res.*, **23**, 303 (2014).
- 22) Paine, J. C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **23**, 482 (2005).