

柑橘の機能性成分カロテノイドの代謝生理と制御

生駒 吉識

農研機構果樹研究所企画管理部業務推進室 室長

1. はじめに

カロテノイドは黄～赤色の色素成分として古くから知られており、例えば、トマト果実の赤色の色素はリコペンと呼ばれるカロテノイドの一種である。カンキツの果皮や果肉のオレンジ色もβ-クリプトキサンチン等のカロテノイドに由来する。また、一部のカロテノイドには、ビタミンAとしての効力を有するものがあり、栄養成分としても重要な成分の1つと位置づけられている。さらに、これらの機能のほかに、カロテノイドの生活習慣病予防効果等の機能性が注目されるようになってきた。

特に、平成27年4月1日には、食品表示法に基づく食品表示基準（平成27年内閣府令第10号）が施行され、事業者が安全性や機能性に関する科学的根拠を販売前に消費者庁に届け出ることによって、「機能性表示食品」として果実等の生鮮食品を含めた食品に機能性を表示できるようになったことから、カロテノイド等の機能性情報の表示に向けた検討が現在進んでいる。例えば、農研機構果樹研究所等によるグループが静岡県浜松市で実施した追跡調査（三ヶ日町研究）では、β-クリプトキサンチンの血中濃度が高い高齢女性は、低い人に比べて骨粗しょう症の発症率が有意に低く、他の食品に比べてβ-クリプトキサンチン含有量が高いウンシュウミカンの摂取が高齢女性の骨の維持・形成に有用であることが明らかにされ¹⁾、この研究結果等を根拠に、ウンシュウミカンやその加工品での機能性表示方法等が検討されている。

このような機能性表示に対応して、果実摂取による国民の健康維持・増進に貢献していくためには、β-クリプトキサンチン等のカロテノイドの果実中での集積メカニズムを解明し、さらにカロテノイド含有量が高い品種を開発することが、これまで以上に求められていると考えられる。ここでは、カンキツにおけるカロテノイド蓄積の多様性や、その多様性をもたらす生理学的メカニズムについて紹介したい。さらに、果肉におけるβ-クリプトキサンチンの高含有化に有効な遺伝的アプローチの現状を紹介したい。

2. カロテノイド生合成経路

カロテノイドは、8個のイソプレノイド単位からなるテトラテルペノイドが骨

格となり、その骨格中の 2 重結合の数、水酸基等の官能基の導入等の違いにより、多くの種類に分類される。

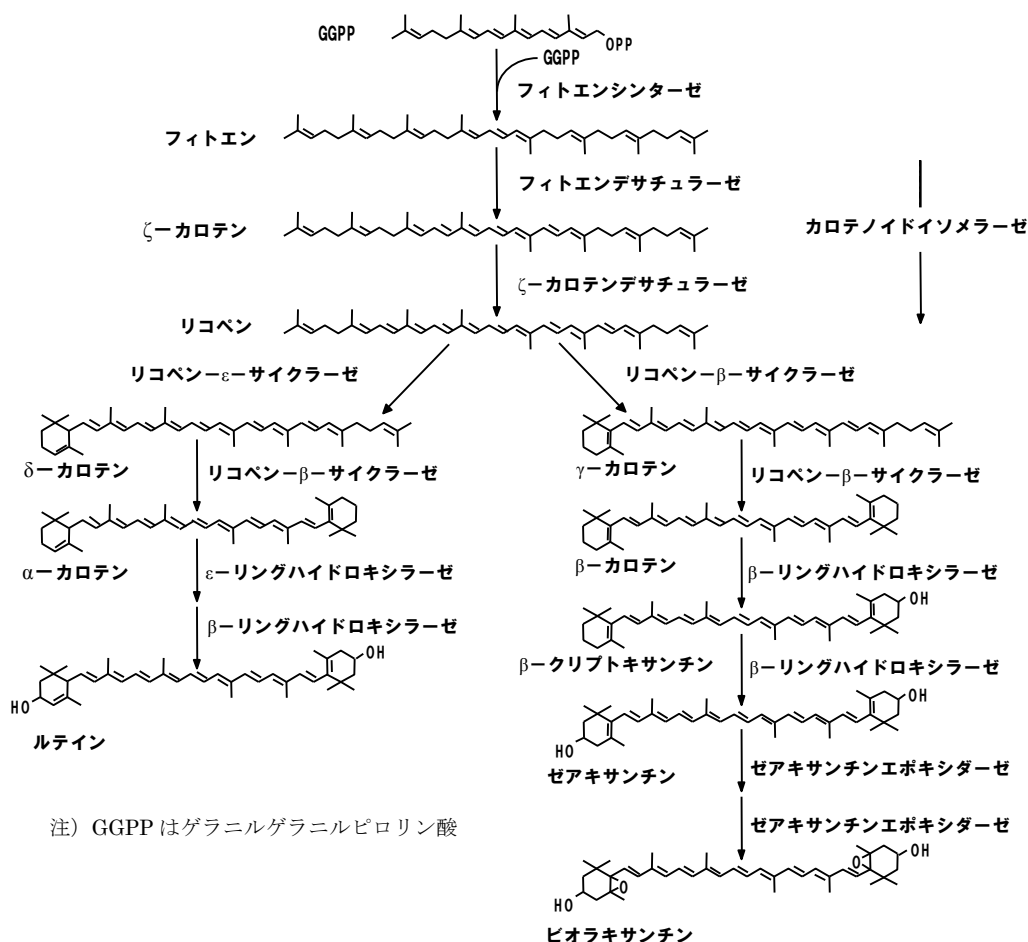


図1 カロテノイド生合成経路

植物体内では、β-クリプトキサンチン等のカロテノイドは、図1のように生合成される²⁾。その第1段階では、2分子のゲラニルゲラニルピロリン酸がフィトエンシンターゼにより縮合し、フィトエンが生成される。さらにフィトエンデサチュラーゼ及びζ-カロテンデサチュラーゼにより4個の二重結合がフィトエンに導入され、リコペンが生成される。リコペンの生成には、シス体をトランス体に変換する機能を有するカロテノイドイソメラーゼも関与する。リコペンまでは、直鎖状の構造を有するカロテノイドが生合成されるが、リコペン以降は、リコペン-ε-サイクラゼ及びリコペン-β-サイクラゼにより直鎖の末端が環化されたカロテノイドが生成される。すなわち、直鎖の片方の末端がリコペン-ε-サイクラゼにより環化されると、もう一方の末端はリコペン-β-サイクラゼにより環化されるため、ε環とβ環を有するα-カロテンが生成される。これに対して、直鎖の片方の末端がリコペン-β-サイクラゼにより環化されると、もう一方の末端もリコペン-β-サイクラゼで環化される

ため、両端にβ環を有するβ-カロテンが生成される。このように、リコペン以降のカロテノイド生合成系は、ε環とβ環を有するカロテノイド（ここではβ，ε-カロテノイドと称する）を生合成する経路と、β環を2個有するカロテノイド（β，β-カロテノイドと称する）を生合成する経路に分岐する。分岐後、水酸化酵素やエポキシ化酵素により水酸基やエポキシ基が導入され、β，ε-カロテノイド系列ではルテイン、β，β-カロテノイド系列ではβ-クリプトキサンチン、ゼアキササンチン、ビオラキササンチン等が生合成される。

3. カンキツにおけるカロテノイドの多様性

カンキツ類を代表する39品種を対象に果実に含まれるカロテノイドを成熟期に経時的に分析した³⁾。この39品種には、レモン、ライム、ブンタン、ユズ、ナツミカン、オレンジ、ウンシュウミカン等の種々タイプのカンキツ類が含まれる。果肉の分析結果では、4つのタイプに分類された(表1)。レモン、ライム、ブンタン、ユズ等は、カロテノイドが低いレベルで推移するタイプ(JS-I：低含有型)、ナツミカン等はビオラキササンチンが中程度のレベルで増大するタイプ(JS-II：VIO 中含有型)、オレンジ等はビオラキササンチンが高いレベルで増大するタイプ(JS-III：VIO 高含有型)、ウンシュウミカン等はビオラキササンチンが中程度のレベルで増大しフィトエンとβ-クリプトキサンチンも増大するタイプ(JS-IV：VIO 中含有、PHY、BCR 高含有型)であった。果皮についても、このようなカロテノイドの成熟期における経時的変化を観察したが、数種類の

表1 果肉と果皮の間のカロテノイド集積特性の関係

品種分類 (カロテノイド集積特性)	JS-I (低含有型)	JS-II (VIO中含有型)	JS-III (VIO高含有型)	JS-IV (VIO中含有、PHY、BCR高含有型)
FL-I (低含有型)	(A)タヒチライム (A)スイートレモン (B)ユーレカレモン (C)ヒラドブンタン (C)レッドブラッシュGF (C)マーシュGF (C)キヌカワ (D)ナルト (D)キクダイダイ (D)ヒュウガナツ (D)カワバタ (D)シュンコウカン (E)ヘンカミカン (F)カプチャー	(C)ヤマミカン (C)ハッサク (D)ナツダイダイ (D)アタニー (D)ロクガツミカン (D)ウジュキツ (F)ヤツシロ		
FL-II (PHY高含有型)	(E)ユズ			(C)テング
FL-III (VIO高含有型)		(D)イヨカン	(D)トロピタオレンジ (D)ワシントンネーブル (F)タチバナ (F)シークワシャー	
FL-IV (VIO、BCR高含有型)		(B)ラングプールライム	(D)タンカン	(B)リモニア (F)クネンボ (F)ボンカン (F)チチュウカイマンダリン (F)オオベニミカン (F)ダンシータンゲリン (F)クレオパトラ
FL-V (PHY、VIO、BCR高含有型)				(F)ウンシュウミカン (F)ヒラキシュウ

A:ライム区、B:シトロン区、C:ザボン区、D:ダイダイ区、E:ユズ区、F:ミカン区、GF:グレープフルーツ

品種を除き、果皮のカロテノイド集積の特徴 (FL-I ~ V) は、果肉におけるカロテノイドの集積の特徴と一致した。

以上のとおり、カロテノイド含有量が高いカンキツの成熟果実では、 β , β -カロテノイドの β -クリプトキサンチンやビオラキサンチンが高くなるが、どちらの含有量が高いかについては品種間差があり、ウンシュウミカン等では β -クリプトキサンチン含量が高く、オレンジ等ではそれより代謝が進んだビオラキサンチン含量が高い。

4. カロテノイド生合成遺伝子の発現とカロテノイド集積特性

カンキツの果皮や果肉では、成熟にともなって急激に β , β -カロテノイドの集積が認められるようになる^{4), 5)}。この時点の遺伝子発現を解析すると、図1に記載している生合成経路の分岐に関連するリコペン- β -サイクラゼのほか、それよりも上流に位置する酵素 (フィトエンシターゼ、フィトエンデサチュラーゼ、 ζ -カロテンデサチュラーゼ) やそれより下流に位置する酵素 (β -リングヒドロキシラーゼ、ゼアキサンチンエポキシダーゼ) の遺伝子群の発現が、全て一斉に高くなる現象が観察された⁵⁾。このような遺伝子発現の一斉上昇は、この時期に β , β -カロテノイドが急増するという、カロテノイド生合成の量的変化に直接的に関与する重要な生合成調節機構であると考えられる。

しかし、遺伝子発現の一斉上昇という調節機構は、着色期の急激な β , β -カロテノイドの集積に関する理由については説明できるが、ウンシュウミカン果肉で見られるような β -クリプトキサンチンが特異的に集積する現象については説明できない。 β -クリプトキサンチンが特異的に集積する機構には、 β -クリプトキサンチンを生成するキー酵素の β -リングヒドロキシラーゼが関連していると考えられる。

β -リングヒドロキシラーゼは、 β -カロテンを基質とし β -カロテンの片方の β 環に水酸基を1個付加して β -クリプトキサンチンを生成する反応 (第1段階目の反応) だけでなく、生成された β -クリプトキサンチンを基質としもう一方の β 環に2個目の水酸基を付加してゼアキサンチンを生成する反応 (第2段階目の反応) も進める (図1)。このように、 β -クリプトキサンチンは β -リングヒドロキシラーゼによる中間産物であり、ゼアキサンチンは最終産物である。実際に、試験管内や大腸菌内で、 β -カロテンを基質にして β -リングヒドロキシラーゼを作用させると、当該酵素反応の最終産物であるゼアキサンチンが主な産物として集積し、当該酵素反応の中間産物である β -クリプトキサンチンの集積は少ない^{6), 7), 8)}。一方、Liらは、トウモロコシ由来の β -リングヒドロキシラーゼを大腸菌に導入して、大腸菌内でカロテノイドを生成させたところ、酵素活性が高い β -リングヒドロキシラーゼを導入

した場合には、 β -リングヒドロキシラーゼの最終産物のゼアキササンチンを生成するが、酵素活性がこれより低い β -リングヒドロキシラーゼを導入した場合には、 β -クリプトキササンチンだけを蓄積することを観察し、酵素活性が不十分な条件下では中間産物の β -クリプトキササンチンが集積しやすいことを示した⁹⁾。したがって、 β -カロテンに対して β -リングヒドロキシラーゼが過少な場合には、 β -リングヒドロキシラーゼの中間産物である β -クリプトキササンチンが集積しやすいと推察される。

Katoらは、 β -クリプトキササンチンを急速に集積しているウンシュウミカン果肉と、ビオラキササンチンを急速に集積しているバレンシアオレンジ果肉を用いて、カロテノイド生合成系の遺伝子発現の品種間差を解析した⁵⁾。その結果、図2のとおり、ウンシュウミカン果肉では、バレンシアオレンジ果肉に比べて β -カロテンを生合成する遺伝子群の発現が高くなること、逆に、 β -リングヒドロキシラーゼ遺伝子の発現が低くなることが明らかとなった。すなわち、ウンシュウミカンでは、バレンシアオレンジに比べて、 β -カロテンの生成が多く、 β -リングヒドロキシラーゼの発現が低い条件下となること示唆した。このような条件になると、前述のとおり、 β -カロテンに対して β -リングヒドロキシラーゼが過少となって、 β -リングヒドロキシラーゼの中間産物である β -クリプトキササンチンが集積すると推察された。

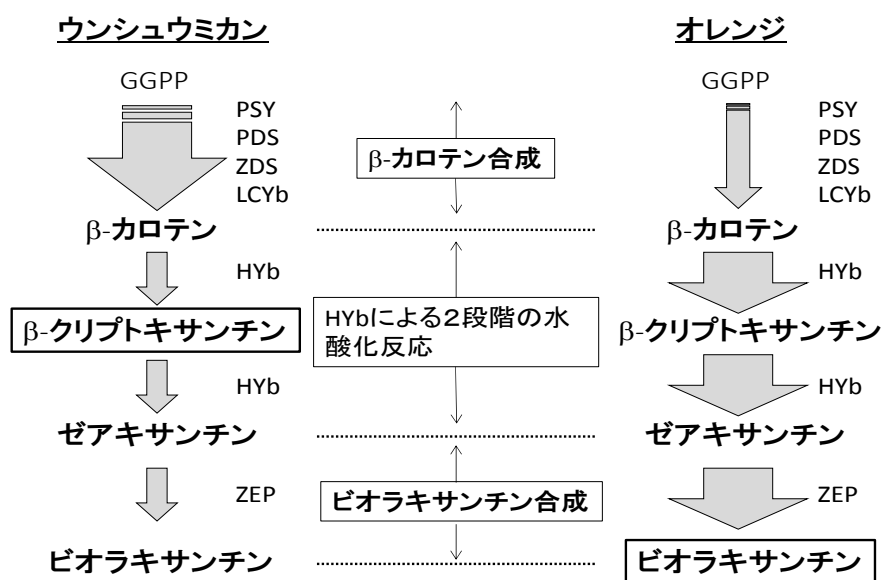


図2 ウンシュウミカンとオレンジ果実におけるカロテノイド生合成遺伝子の発現レベルの比較

注1) 太い矢印は、両品種間で比較した場合に発現レベルが高い。
 注2) PSYはフィトエンシターゼ、PDSはフィトエンデサチュラーゼ、ZDSは β -カロテンデサチュラーゼ、LCYbはリコペン β -サイクラーゼ、HYbは β -リングヒドロキシラーゼ、ZEPはゼアキササンチンエポキシダーゼを示す。
 注3) GGPPはゲラニルゲラニルピロリン酸を示す。

一方、バレンシアオレンジでは、ウンシュウミカンに比べて、 β -カロテンの生成に関わる遺伝子群の発現が低かったこと、 β -リングヒドロキシラーゼ遺伝子の発現が高かったことから、ウンシュウミカンよりも β -カロテンの生成が少なく、 β -リングヒドロキシラーゼの発現が高い条件下となった。このような条件になると、 β -カロテンに対して β -リングヒドロキシラーゼが十分となって、 β -リングヒドロキシラーゼの最終産物のゼアキサントキシンが生成されやすいと推察された。さらに、オレンジでは、ゼアキサントキシンエポキシダーゼ遺伝子の発現も高かったことから、生成されたゼアキサントキシンはビオラキサントキシンに代謝されると推察された。

このように、 β -クリプトキサントキシンが特異的に集積するのに重要な調節機構として、基質となる β -カロテンの生合成遺伝子群と β -リングヒドロキシラーゼ遺伝子の間の発現バランスが関与していると考えられる。

5. β -クリプトキサントキシンの特異的集積に関与するカロテノイド分解機構

上記のとおり、ウンシュウミカン果肉ではカロテノイド生成が β -クリプトキサントキシンを集積しやすい遺伝子発現バランスになっており、オレンジ果肉では β -クリプトキサントキシンを集積しにくく、さらに代謝が進んだビオラキサントキシンが集積しやすい遺伝子発現バランスになっている。しかし、カロテノイドの集積量は、生成されたカロテノイドの分解過程も明らかにしないと十分に説明できない。このため、図3のようにビオラキサントキシンを分解してアブシジン酸 (ABA) 生成を進める酵素である NCED (9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase) に着目し、カロテノイドの分解過程がカロテノイド集積量に及ぼす影響を解析した¹⁰⁾。

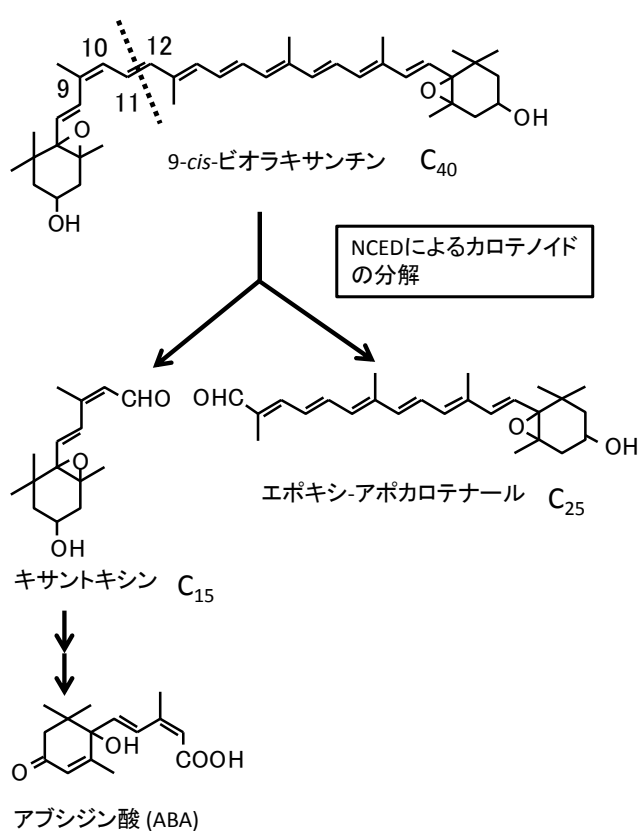


図3 NCEDによるカロテノイド分解とアブシジン酸の生成

その結果、カンキツから単離した NCED をコードする遺伝子の1種の

CitNCED2 の発現が、ウンシュウミカンでは成熟に伴って急増し、これにともなって果肉中の ABA 含量が増加することが明らかとなった。一方、オレンジでは成熟期間中に CitNCED2 の発現上昇は認められず、ABA 含量は低いレベルで推移することが明らかとなった。すなわち、オレンジでは CitNCED2 の発現が低いためビオラキサンチンの分解が進まず、ビオラキサンチンの集積量が増大し、逆に ABA 集積量が低く推移すると考えられた。一方、ウンシュウミカンでは成熟期に CitNCED2 の発現が高くなるためビオラキサンチンの分解が進み、ビオラキサンチンの集積量が低く推移し、逆に ABA 集積量が増大すると考えられた。このように、ウンシュウミカンにおける高い NCED の発現は、生成されたビオラキサンチンを急速に分解し、ウンシュウミカンにおける β -クリプトキサンチンの集積の特異性を一層明瞭にする一因となっている。

以上の結果は、「ウンシュウミカン果肉における特異的な β -クリプトキサンチンの集積には、カロテノイド生成が β -クリプトキサンチンで止まりやすいという機構だけでなく、ビオラキサンチンまで代謝が進んでも容易に ABA に分解されるという機構も関与する」という情報を提供するものであり、 β -クリプトキサンチンの高含有化やカロテノイド組成の改変のための今後の技術開発の参考になると期待できる。

6. β -クリプトキサンチン高含有化のための遺伝学的解析

Sugiyama らは、異なるカンキツ品種(興津 46 号×かんきつ中間母本農 5 号)を交配し、その雑種集団におけるカロテノイド含量と DNA 多型に基づき、QTL 解析によってカロテノイド含量に関する遺伝地図上の領域を解析した¹¹⁾。 β -クリプトキサンチン含量に関与する遺伝地図上の領域は、3 個の連鎖群上で検出されることを示した。さらに、最も強く検出された領域(第 6 連鎖群上の領域)にある DNA マーカーの Gn0005 の遺伝型(ホモ型もしくはヘテロ型)の違いで、遺伝型間の β -クリプトキサンチン含量の平均値が有意に異なることを明らかにした(ホモ型の個体群の平均値が、ヘテロ型よりも高くなった)。

また、Sugiyama らは、上記のカンキツの雑種集団を用いて、その雑種集団におけるカロテノイド生合成遺伝子の発現レベルと DNA 多型に基づき、発現 QTL (e-QTL) 解析によって、カロテノイド生合成遺伝子の発現を制御する領域を解析した¹²⁾。その結果、フィトエンシンターゼ、フィトエンデサチュラーゼ、 ζ -カロテンデサチュラーゼ、 β -リングヒドロキシラーゼ、ゼアキサンチンエポキシダーゼの遺伝子発現を制御する遺伝地図上の領域を検出した。さらに、 β -リングヒドロキシラーゼやゼアキサンチンエポキシダーゼの遺伝子発現レベルの違いはこれらの遺伝子近傍にあるシス因子の違いに起因すること、フィトエンデサチュラーゼや ζ -カロテンデサチュラーゼの遺伝子発現は同一のトランス因子の制御下にあること等を示唆した。

このように、カンキツにおいて、カロテノイド含量やカロテノイド合成遺伝子の発現レベルに關与する遺伝学的解析が進められているが、これらの結果から得た DNA マーカーを利用して、 β -クリプトキサンチン含量を高くする試みは、品種改良の現場において現時点では利用されていない。 β -クリプトキサンチンを特異的に高含有化する生理的メカニズムを考えると、 β -カロテンの生成に關与する遺伝子群の発現が高くなること、 β -リングヒドロキシラーゼ遺伝子の発現が高くなりすぎないこと等が重要となり、それらの制御に關わる複数の DNA マーカーを開発し、当該マーカーを組み合わせて利用する等の方法が、 β -クリプトキサンチンの高含有化のための品種育成に有効と考えている。



図4 西南のひかり
(農研機構果樹研究所、2007年育成)

7. おわりに

ウンシュウミカンの果肉には、1~1.5mg/100g程度の β -クリプトキサンチンが含有されている。DNA マーカー等を利用したわけではないが、普通の交雑育種法によって、ウンシュウミカンの2倍近い β -クリプトキサンチン(2mg/100g程度)を含有する「西南のひかり」が育成されるなど、これまでの品種育成でも、 β -クリプトキサンチン含量の高含有化は進められてきた。栽培性や果実形質等に問題があつて、結果的には品種にならなかった系統の中には、 β -クリプトキサンチン含有量が3mg/100g程度のものも見出されており、カンキツ類には、少なくともこの程度の含有量の果実を生産できるポテンシャルがあると推察される。今後は、DNA マーカー開発等を行つて、このようなポテンシャル持つ個体を、いかに効率的に見つけ出すかが重要と考える。

参考文献

- 1) Sugiura M. et al. (2012) PLOS ONE. 7(12): e52643
- 2) 矢野昌充ら (2005) 果樹研究所研究報告. 4:13-18
- 3) Matsumoto H. et al. (2007) J. Agric. Food Chem. 55 (6):2356-2368
- 4) Ikoma Y. et al. (2001) Physiol. Plant. 111:232-238
- 5) Kato M. et al. (2004) Plant Physiol. 134:824-837
- 6) Hundle B. et al. (1993) FEBS Lett. 315:329-334
- 7) Sun Z. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:24349-24352
- 8) Bouvier F. et al. (1998) Biochim. Biophys. Acta 1391:320-328

- 9) Li Q. et al. (2010) *Transgenic Res.* 19:1053-1068
- 10) Kato M. et al. (2006) *J. Experimental Botany* 57:2153-2164
- 11) Sugiyama A. et al. (2011) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80:136-144
- 12) Sugiyama A. et al. (2014) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 83:32-43