

カロテノイド生合成阻害物質のスクリーニング技術

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
果樹研究所カンキツ研究部

生駒吉識・加藤雅也・矢野昌充

1. はじめに

白化型除草剤は、光合成の補助色素として重要な役割を担っているカロテノイドの含量を低下させることで、光合成機能の低下や光酸化的障害を植物組織に引き起こし、植物を白化、枯死させる薬剤である。このように植物の生命活動に重要な役割を担うカロテノイドの生合成をターゲットにした除草剤には、カロテノイド生合成系酵素の活性を阻害するタイプ（直接的阻害タイプ）とプラストキノンの生合成を阻害することでカロテノイドを減少させるタイプ（間接的阻害タイプ）がある（関野，2003）。

直接的阻害タイプの活性を有する薬剤をスクリーニングするためには、カロテノイド生合成系酵素を植物から精製し、それに対して阻害活性の有無を調べる手法が用いられる。しかし、当該酵素の精製やその基質を調整する等の手間や技術を要し、簡易にスクリーニングを実施することは出来ない。迅速、簡便なカロテノイド生合成系酵素の活性阻害剤のスクリーニング技術を開発することができれば、直接的阻害タイプの薬剤開発の迅速化に寄与するものと考えられる。

そこで、筆者らは、簡易な直接阻害タイプの薬剤スクリーニング技術の開発のため、カロテノイド生合成遺伝子を導入した大腸菌に着目した。Misawaら（1990）は、カロテノイドを生成

する非光合成細菌の*Erwinia*から、カロテノイド生合成に関与する6個の遺伝子（*crtE*, *crtX*, *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtZ*）を単離し、これらが大腸菌に導入、発現させることで大腸菌内でカロテノイドを生合成できることを示した。筆者らは、このような大腸菌を、カロテノイド生合成阻害剤の候補物質を添加して培養してやれば、大腸菌が生成したカロテノイドの量や組成の変化から、当該薬剤の活性を判定できると考えた。この方法では、酵素の精製や基質の調整のための手間や技術が必要なく、従来方法より簡便にカロテノイド生合成阻害活性を有する物質をスクリーニングすることが出来ると考えられる。

ここでは、植物におけるカロテノイド生成について概説しつつ、以上のようなカロテノイド生合成系遺伝子を導入した大腸菌を用いたカロテノイド生合成阻害物質のスクリーニング技術について紹介する。

2. カロテノイド生合成経路

植物体内では、カロテノイドは図-1のように生合成される（Cunningham and Gantt, 1998; Ronen et al., 1999; Isaacson et al., 2002; Park et al., 2002）。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

ー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。近年、リコペンの生成には、シス体を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と報告されている(Isaacson et al., 2002; Park et al., 2002)。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-サイクラーゼ及びリコペン-β-サイクラー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-サイクラーゼにより環化されると、もう一方の末端はリコペン-β-サイクラー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-サイクラーゼにより環化されると、もう一方の

末端もリコペン-β-サイクラー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、ゼアキサンチン、ビオラキサンチン等が生合成される。

3. 植物と微生物におけるカロテノイド生合成酵素の差異

植物と微生物 (*Erwinia*) のカロテノイド生

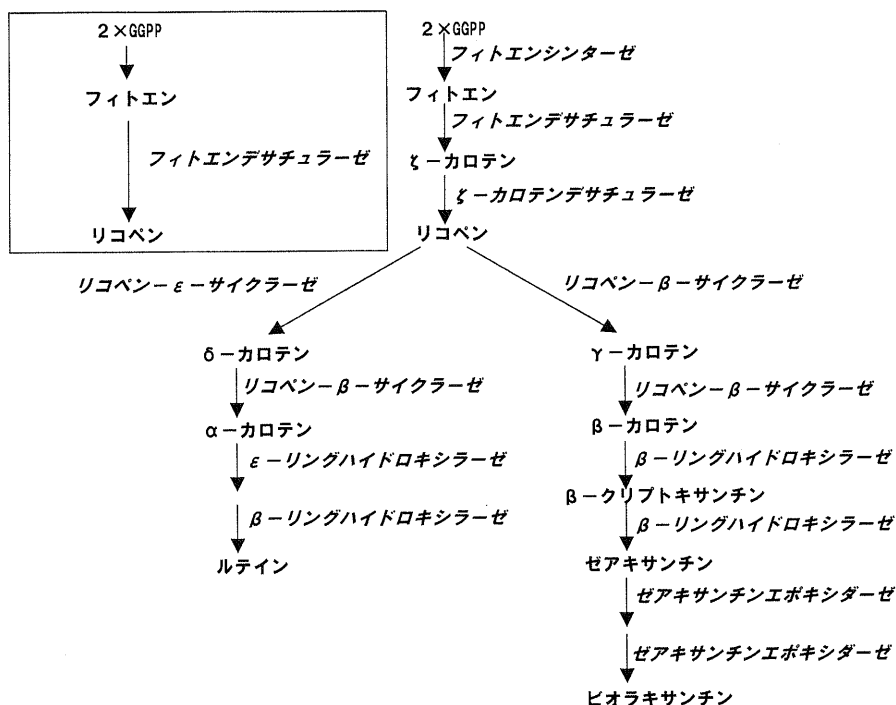


図-1 植物におけるカロテノイド生合成経路（四角内は*Erwinia*における経路）

注1) GGPPはゲラニルゲラニルピロリン酸を示す。

注2) 斜体はカロテノイド生合成系酵素を示す。

合成系を比較すると、ゲラニルゲラニルピロリン酸から、フィトエンまでの経路及びリコペンから β -カロテンまでの経路は、生合成遺伝子の機能に関して同じである。一方、フィトエンからリコペンまでの経路は、異なっており、*Erwinia*ではフィトエンデサチュラーゼという1つの酵素が、フィトエンに4個の二重結合を導入し、リコペンを1段階で生成する(図-1)のに対して、植物では、この過程で2種類の酵素が関与することが知られており、フィトエンデサチュラーゼが2個の二重結合を導入し、 ξ -カロテンを生成、さらに、 ξ -カロテンデサチュラーゼが ξ -カロテンに2個の二重結合を導入して、リコペンを生成する(三沢, 1996)。また、*Erwinia*由来のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子の塩基配列と、植物由来のフィトエンデサチュラーゼ及び ξ -カロテンデサチュラーゼ遺伝子の塩基配列を比較すると、N末端の補酵素NADまたはFAD結合領域を除いて、アミノ酸配列レベルで相同性がほとんど認められないとされている(三沢, 1996)。このような、代謝過程の違いや生合成酵素の構造の違いから、現在では、種々の生物のカロテノイド生合成遺伝子または酵素は、*Erwinia*型(細菌、カビ)と植物型(高等植物、緑藻、藍藻)の2つのカテゴリーに分類されると考えられている(三沢, 1996)。

4. 簡易スクリーニング技術開発のためのプラスミドの構築

*Erwinia*由来のカロテノイド生合成遺伝子を実験室の大腸菌に導入、発現させることで、大腸菌内でカロテノイドを生合成できる(Misawa et al., 1990)ことは前述のとおりである。しかし、*Erwinia*由来のカロテノイド生合成遺伝子だけ

を用いて作成した大腸菌では、除草剤の候補物質をスクリーニングすることは出来ないと考えた。すなわち、*Erwinia*型と植物型では、カロテノイド生合成過程やカロテノイド生合成系酵素の構造が異なるため、除草剤候補物質のスクリーニングには、植物由来のカロテノイド生合成系遺伝子を使用する必要がある。事実、植物型フィトエンデサチュラーゼの阻害剤であるNorflurazonは、*Erwinia*型のフィトエンデサチュラーゼの活性を抑制しないこと、このため、*Erwinia*型フィトエンデサチュラーゼを導入したタバコは、Norflurazonを処理しても白化しないこと(三沢, 1996)が示されており、これらの結果から、*Erwinia*型と植物型では、その構造や作用特性の違いから、阻害効果を有する物質も異なると考えられた。

そこで、筆者らは、ウンシュウミカンから、フィトエンデサチュラーゼのcDNA (*CitPDS*; GenBank accession number AB046992) と ξ -カロテンデサチュラーゼのcDNA (*CitZDS*; GenBank accession number AB072343) を単離した。*CitPDS*については、その翻訳領域をプラスミド(pET30, Novagen社製)に挿入し、ウンシュウミカン由来フィトエンデサチュラーゼcDNAを有

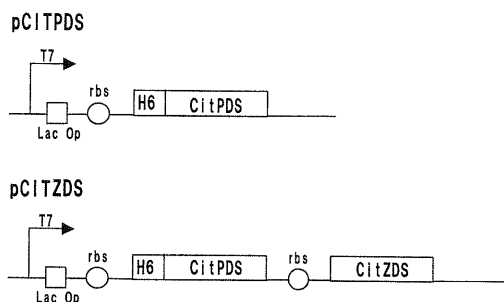


図-2 ウンシュウミカン由来のフィトエンデサチュラーゼcDNA (*CitPDS*) と ξ -カロテンデサチュラーゼのcDNA (*CitZDS*) を挿入したプラスミドの構造

T7, phage promoter; Lac Op, repressor binding site; rbs, ribosome-binding site.

するプラスミド (pCITPDS) を構築した (図-2)。さらに, pCITPDSに*CitZDS*を挿入し, ウンシュウミカン由来フィトエンデサチュラーゼと ζ -カロテンデサチュラーゼの両者のcDNAを有するプラスミド (pCITZDS) を構築した (図-2)。

5. 大腸菌内でのカロテノイドの生合成

大腸菌は通常カロテノイドを生成しない。しかし, カロテノイド生成の前駆体となるファルネシルピロリン酸を生成している。Misawaら (1990) は, 彼らが単離した*crtE* (ファルネシルピロリン酸からゲラニルゲラニルピロリン酸を生成) と*crtB* (ゲラニルゲラニルピロリン酸からフィトエンを生成) を大腸菌に導入すれば, フィトエンが生成されることを報告している。そこで, Misawaら (1995) の構築した*crtE*と*crtB*の両者を有するプラスミド (pACCRT-EB) を大腸菌に導入し, フィトエンを生成する大腸菌を作成した。さらに, 上記のフィトエン生成大腸菌 (pACCRT-EBを有する) に, pCITPDSを導入し, 両者のプラスミドが共存する大腸菌を作成した (図-3)。この大腸菌 (ζ -カロテン生成大腸菌) では, *Erwinia*由来の*crtE* 及び*crtB*の存在により, フィトエンが生成されるだけでなく, ウンシュウミカン由来の*CitPDS*も存在するため, ζ -カロテンも生成される。また, フィトエン生成大腸菌に, pCITZDSを導入した大腸菌も作成した (図-3)。この大腸菌 (リコペン生成大腸菌) では, ウンシュウミカン由来の*CitPDS*と*CitZDS*も存在するため, フィトエン, ζ -カロテンに加え, リコペンも生成される。

実際に, フィトエン生成大腸菌, ζ -カロテン生成大腸菌, リコペン生成大腸菌を液体培養してみると, フィトエン生成大腸菌は, 白色を呈し, 当該大腸菌からカロテノイドを抽出, 分

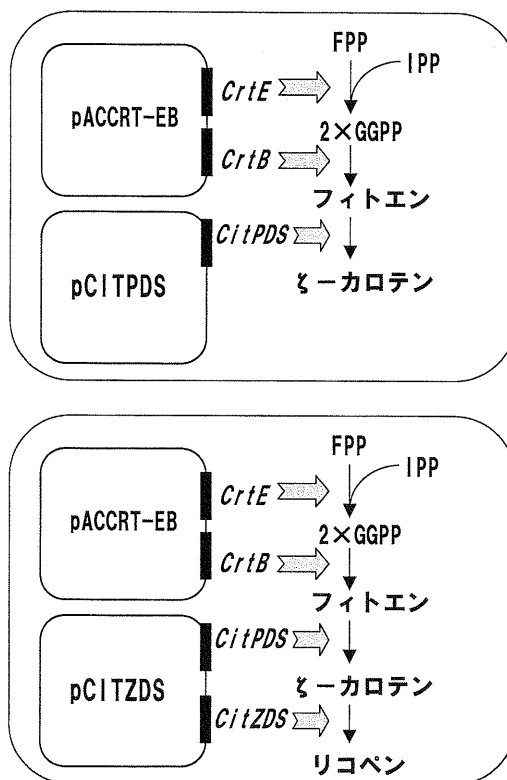


図-3 ζ -カロテン生成大腸菌 (上図) 及びリコペン生成大腸菌 (下図) におけるカロテノイド生合成

注1) pACCRT-EBは, *Erwinia*由来の*CrtE*及び*CrtB*を有するプラスミド。

注2) pCITPDSは, ウンシュウミカン由来の*CitPDS*を有するプラスミド。

注3) pCITZDSは, ウンシュウミカン由来の*CitPDS*及び*CitZDS*を有するプラスミド。

注4) FPP, IPP, GGPPは, それぞれファルネシルピロリン酸, イソペンテニルピロリン酸, ゲラニルゲラニルピロリン酸を示す。

析するとフィトエンが検出された。フィトエン生成大腸菌が白色を呈したのは, フィトエンそれ自身が無色 (吸収極大は280nm付近) であることに起因する。一方, ζ -カロテン生成大腸菌は, 薄い黄色を呈し, カロテノイドを抽出, 分析したところ, フィトエン, フィトフルエン (フィトエンから ζ -カロテン生成までの中間産物), ζ -カロテンが検出された。薄い黄色を呈したのは, ζ -カロテンの色 (吸収極大が400nm付近) に起因する。さらに, リコペン生成大腸菌の黄色は, ζ -カロテン生成大腸菌よ

りも濃くなり、フィトエン、フィトフルエン、 ζ -カロテンに加え、ニューロスポレン (ζ -カロテンからリコペン生成までの中間産物)、リコペンも検出された。

6. 阻害活性の測定法

実際に、リコペン生成大腸菌を用いて、カロテノイド生成阻害物質のスクリーニングが可能かどうかを、フィトエンデサチュラーゼの阻害剤であるNorflurazonを用いて検討した。リコペン生成大腸菌をLB (Luria-Bertani) 液体培地で、OD₆₀₀で0.6になるまで27℃下で培養後、IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) を培養液中の濃度で1 μ Mになるように添加し、同時に10 μ MになるようにNorflurazonを添加した。添加後さらに24時間培養後、培養液を遠心分離 (5,000g, 10分間) し、大腸菌を回収した。回収した大腸菌は、20mMのTris-HCl (pH8.0) で洗浄後、液体窒素で凍結させた。大腸菌を融解後、クロロホルム：メタノール (2 : 1) を用いて、カロテノイドを抽出した。抽出物は、減圧濃縮後、MTBE (methyl tert-butyl ether) : メタノール (1 : 1) に溶解し、HPLCで分析した。

遠心分離後の大腸菌の色を観察したところ、Norflurazonを添加しなかった大腸菌は、黄色であったのに対して、Norflurazonを添加した大腸菌は白色であった。このことは、目視でもカロテノイド生成の阻害活性を判定することが可能なことを示している。これらの大腸菌のカロテノイドを分析したところ、無添加では、フィトエン、フィトフルエン、 ζ -カロテン、ニューロスポレン、リコペンが検出されたのに対して、Norflurazonを添加した場合には、フィトエンだけが大量に検出された (図-4)。この結果は、大腸菌培養液に添加したNorflurazonは、大腸菌内に入り、そこでフィトエンデサチュラーゼの活性を抑制したことを示している。

以上の阻害剤の大腸菌培養液への添加試験の結果から、本法によるカロテノイド生成大腸菌は、カロテノイド生成阻害物質のスクリーニングに使用できると考えられた。尚、リコペン生成大腸菌は、フィトエンまでの生合成については、*Erwinia*型の遺伝子を使用していること、それ以降の生合成については、植物型の遺伝子を使用していることから、フィトエンデサチュラーゼと ζ -カロテンデサチュラーゼの阻害活

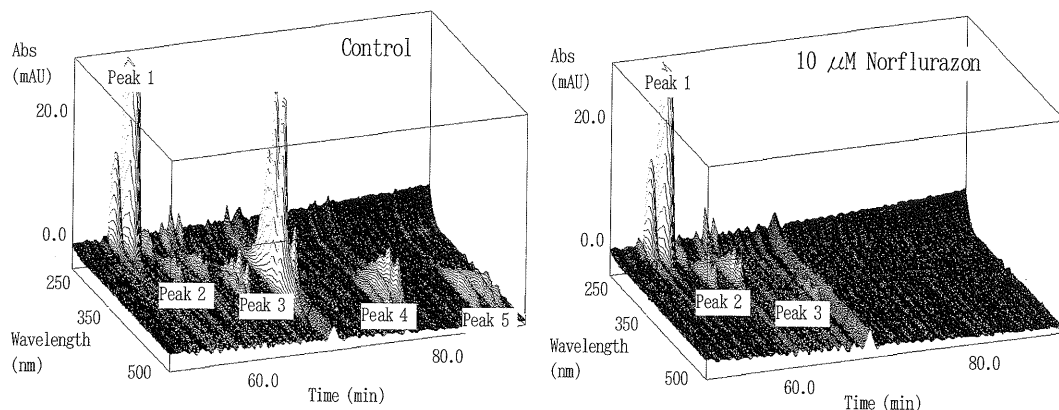


図-4 リコペン生成大腸菌におけるカロテノイド生成
Peak 1 : フィトエン, Peak 2 : フィトフルエン, Peak 3 : ζ -カロテン,
Peak 4 : ニューロスポレン, Peak 5 : リコペン

性を有する白化型除草剤のスクリーニングに有効なものと位置づけられる。また、本法では、目視による判定とカロテノイドの分析に必要な大腸菌量は、約10mg（乾燥重）で十分である。このため、培養を小スケールで行うことができ、簡易的なスクリーニングを可能としている。

実際に、本法を用いてカロテノイド生合成阻害剤の探索を実施した。植物に対して白化作用を有し、カロテノイド生合成に対して阻害活性が期待される試料43点について、スクリーニングを実施した。43点のうち、3点の試料を添加した大腸菌については、大腸菌の増殖を阻害することなく、カロテノイドの生合成は阻害され、薄い黄色もしくは白色を呈していた。これらの大腸菌のカロテノイドを分析したところ、Norflurazonと同様に γ -カロテンやリコペン等の生成が阻害され、フィトエンが蓄積していた。この結果から、以上の3点の試料が、カロテノイド生合成阻害剤であると考えられた。尚、大腸菌の増殖を阻害し、見かけ上カロテノイド生成を阻害するように見える場合も想定されるが、今回使用した43点には大腸菌の増殖を抑制した試料は見出されなかった。

7. おわりに

ここで紹介した方法は、植物のフィトエンデサチュラーゼや γ -カロテンデサチュラーゼの阻害物質を簡易にスクリーニングするものである。植物のカロテノイド生合成には、上記のほかりコペン- ϵ -サイクラゼやリコペン- β -サイクラゼ等の多くの酵素が関与している。これらについても遺伝子を植物から単離し、大腸菌内で一連のカロテノイド生合成遺伝子と共存させることで、リコペン以降のカロテノイドを大腸菌で生成することも可能となる。このよ

うな大腸菌を作成すれば、フィトエンデサチュラーゼや γ -カロテンデサチュラーゼの阻害剤だけでなく、リコペン- ϵ -サイクラゼやリコペン- β -サイクラゼ等の多くのカロテノイド生合成酵素の阻害剤をスクリーニングすることができると考えられる。ただし、多くの遺伝子が関与することになるので、使用するプラスミドの種類や培養条件等の検討が必要になると考えられる。

謝辞

ここで紹介した方法を開発するにあたり、*Erwinia*由来のカロテノイド生合成遺伝子を提供いただいた三沢典彦博士に、厚く御礼申し上げます。また、スクリーニングのためのカロテノイド生合成阻害剤を提供いただいた科研製菓株式会社に、厚く御礼申し上げます。

文献

- Cunningham, F. X. and E. Gantt. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:557-583.
- Isaacson, T., G. Ronen, D. Zamir and J. Hirschberg. 2002. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell*. 14:333-342.
- 三沢典彦. 1996. カロテノイド生合成阻害剤抵抗性植物の作出. *植物の化学調節*. 31:143-149.

Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura and K. Harashima. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172:6704-6712.

Misawa, N., Y. Satomi, K. Kondo, A. Yokoyama, S. Kajiwara, T. Saito, T. Ohtani and W. Miki. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 177:6575-6584.

Park, H., S. Kreunen, A. J. Cuttriss, D.

DellaPenna and B. J. Pogson. 2002. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. Plant Cell. 14:321-332.

Ronen, G., M. Cohen, D. Zamir and J. Hirschberg. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. Plant J. 17:341-351.

関野景介. 2003. カロテノイド生合成阻害剤の作用性と開発. 植調. 37:212-221.

この草はなんだろう? 手軽に調べたい。

三二雑草図鑑

——耕地雑草ハンドブック——

廣田伸七／著

A5判 定価2,200円＋税

耕地には主要なものだけで150種を超える雑草が生えてきます。これら雑草の防除の第一歩は草を知ることです。本書は、農耕地や樹園地などによく見られる雑草500種を収録し、主要種は、幼植物・生育中期・成植物と生育段階を追った写真を掲載。また、似た草の見分け方を記載した、身近な植物を調べるための最適な図鑑です。

原色図鑑 芽ばえとたね

浅野 貞夫／著

A4判 定価9,800円＋税

芽ばえの姿はどうなんだろう。本書は、植物の芽ばえのようすを克明に表した精密図版と、種・成植物の写真を組み合わせた植物の一生図鑑です。成植物のみの図鑑と異なり、芽ばえのようすから紹介しているため、植生などの調査にたいへん役に立つとの声が寄せられています。

全国農村教育協会

〒110-0016 東京都台東区台東1-26-6
TEL.03-3833-1821 FAX.03-3833-1665