

# 真核光合成生物における シトクロム P450 型カロテン水酸化酵素 (CYP97) の機能解析

玉木峻, 今石浩正

神戸大学バイオシグナル総合研究センター  
〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1

Shun Tamaki, Hiromasa Imaishi

## Functional analyses of cytochrome P450-type $\beta$ -carotene hydroxylases (CYP97s) in plants and eukaryotic algae

Keywords:  $\beta$ -carotene hydroxylase, CYP97, *Euglena gracilis*

Biosignal Research Center, Kobe University, Rokkodai 1-1, Kobe, 657-8501, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.9b5.00137

### 1. 真核光合成生物における多様なカロテノイドとその合成経路

真核光合成生物に存在するカロテノイド分子種は多種多様である (Takaichi 2011)。多くの真核光合成生物において、 $\beta$ -カロテンは含有量の高い分子種であるが、それ以外のカロテノイド組成は各生物種の進化の過程で多様化した。例えば、陸上植物や緑藻植物門では、ビオラキサンチン、ネオキサンチン、ルテインが主なカロテノイド分子種であるが、紅藻植物門ではゼアキサンチンが、特に大型紅藻ではルテインも豊富に存在する。ユーグレナ藻、渦鞭毛藻ではジアジノキサンチンが、ハプト藻では、ジアジノキサンチンに加えてフコキサンチンも主要なカロテノイド分子種であり、珪藻、褐藻等ではフコキサンチンが主要なカロテノイド分子種である。しかし、これらの真核藻類では、陸上植物や緑藻植物門で主要なカロテノイド分子種であるルテインを持たない。ヘマトコッカス (*Haematococcus pluvialis*) や *Chromochloris zofingiensis* 等の一部の緑藻類は強光等の条件下でアスタキサンチンを蓄積し、赤色化することも知られている。

こうしたカロテノイド分子種の多様性は、カロテノイド合成経路の多様性によって生み出される。図 1 に示すように、真核光合成生物における一般的なカロテノイド合成経路では、イソペンテニル二リン酸を初発物質とし、ゲラニルゲラニル二リン酸、フィトエン、リコペンを経て、 $\alpha$ -カロテンまたは  $\beta$ -カロテンが合成される。 $\beta$ -カロテン誘導体の合成経路では、 $\beta$ -カロテンが水酸化されると、 $\beta$ -クリプトキサンチン、ゼアキサンチンを生じる。植物や多くの緑藻類では、ゼアキサンチンとそのエポキシ化体であるアンテラキサンチン、ビオラキサンチンは、強光下での光エネルギーの放出機構であるキサントフィルサイクルに関与する。ビオラキサンチンはネオキサンチンに変換され、さらに、真核藻類の種特異的なジアジノキサンチン、ジアトキサンチン、フコキサンチン等が生成される。上記とは異なる経路として、 $\beta$ -カロテンはケト化されるとエキネノン、

S. Tamaki -1

カンタキサンチンを生じ、その水酸化体がアスタキサンチンである。 $\alpha$ -カロテン誘導体の合成経路では、 $\alpha$ -カロテンが水酸化されるとルテインを生じ、その後、真核藻類の種特異的なシフォナキサンチン等に変換される。

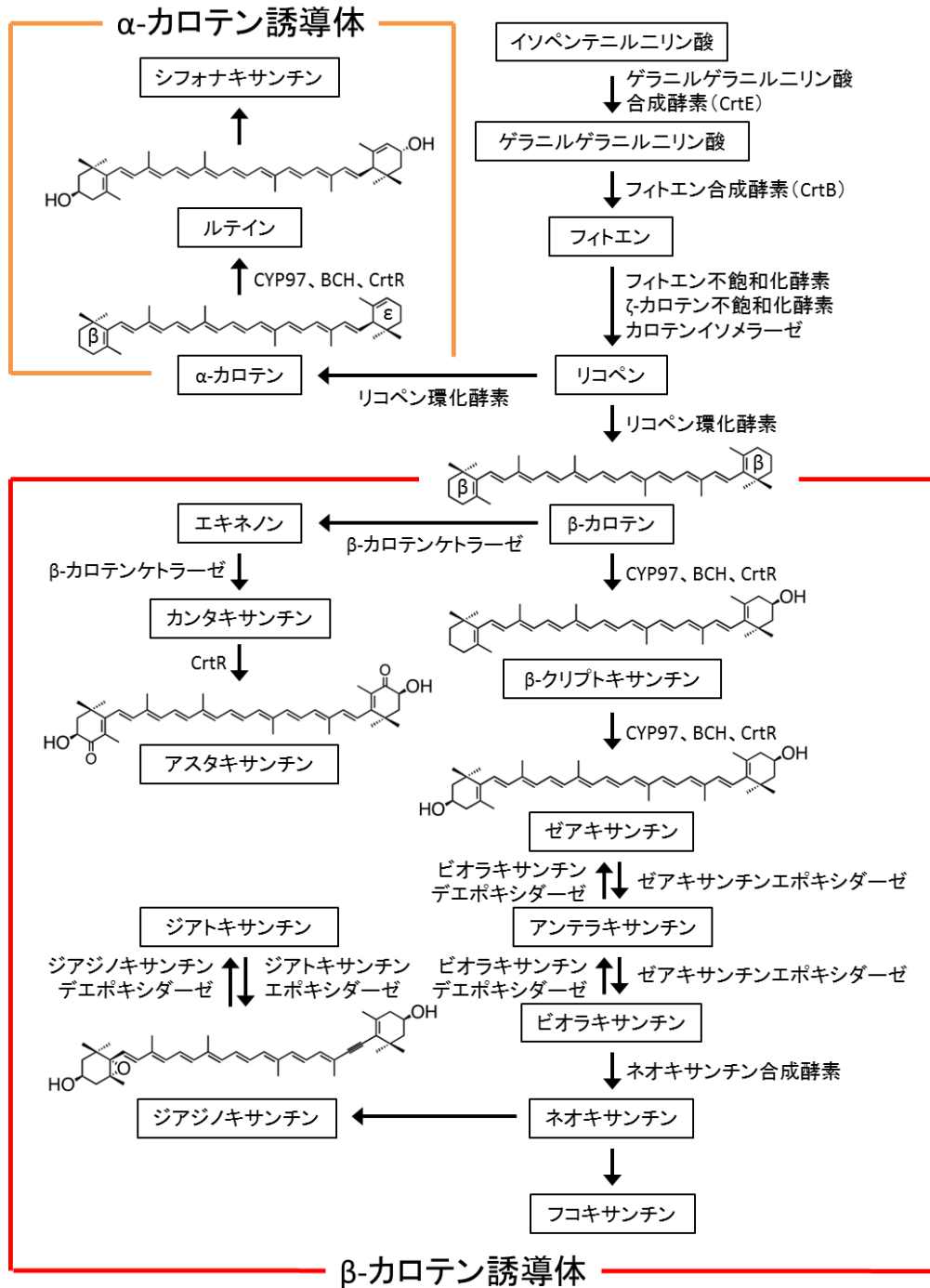


図 1. 真核光合成生物における一般的なカロテノイド合成経路

これらカロテノイド合成経路の中でも、リコペン上流までは真核光合成生物においてほぼ共通した経路である。一方、リコペンが環化され、 $\alpha$ -カロテンまたは $\beta$ -カロテンが合成される段階以降では、各真核光合成生物に特異的な酵素反応によりカロテノイドの多様性が生じる。 $\beta$ -カロテンは両端に $\beta$ 環を有し、 $\alpha$ -カロテンは一方が $\beta$ 環、他方が $\epsilon$ 環の構造を持つが、カロテン水酸化酵素 (CYP97, BCH) は $\beta$ 環、 $\epsilon$ 環を特異的に水酸化することで、ゼアキササンチン、ルテインの生合成に関与している。

CYP97はシトクロム P450 酵素ファミリーに属し、ヘムを含有する水酸化酵素である。一方、BCHは非ヘム型二鉄水酸化酵素であり、 $\beta$ 環の水酸化にのみ関与する。BCHに相同な $\beta$ -カロテン水酸化酵素である CrtR はシアノバクテリアに存在し (Takaichi and Mochimaru 2007)、その相同遺伝子は真核光合成生物では紅藻シズン (*Cyanidioschyzon merolae*) に存在する (Cunningham et al. 2007)。BCH およびその相同遺伝子が植物、緑藻類、紅藻シズンの限られた真核光合成生物にしか見出されないが、CYP97は広範な真核光合成生物に分布しており (Cui et al. 2013)、その幅広い保存性は真核光合成生物における CYP97 の生理的重要性を意味すると考えられる。本稿では、これまでに明らかになった真核光合成生物における CYP97 の酵素機能および生理機能を概説し、さらに、ユーグレナ藻の一種 *Euglena gracilis* (以下、ユーグレナと表記) に見出された CYP97 のユニークな機能についても紹介する。

## 2. 真核光合成生物に存在する CYP97 酵素群

シトクロム P450 酵素はネルソンらによって体系的な系統分類が行われている (Cytochrome P450 homepage (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>), Nelson et al. 2008)。CYP97 およびその相同遺伝子はクラン A, B, C, E, F, G, H に分類された (表 1)。緑藻植物門、陸上植物は共通して、クラン A, B, C 型 CYP97 を持つことから、CYP97 は緑藻類の進化の過程で発生したと考えられる。紅藻植物門では、海苔の一種である大型紅藻ポルフィラ (*Porphyra umbilicalis*) がクラン B 型 CYP97 を持つが (Yang et al. 2014)、単細胞紅藻シズンには CYP97 相同遺伝子が存在しない (Cui et al. 2013)。不等毛藻類 (Heterokontophyta) に属する珪藻類 (*Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*)、褐藻 (*Ectocarpus siliculosus*) 由来 CYP97 はクラン E, F に、真正眼点藻 (*Nannochloropsis oceanica*) 由来 CYP97 はクラン F に分類された。渦鞭毛藻 (*Symbiodinium minutum*) 由来 CYP97 はクラン G に、ユーグレナ由来 CYP97 はクラン F, H に分類された。CYP97 の系統分類と真核光合成生物のカロテノイド組成には関連があり、クラン A, B, C 型 CYP97 を持つ陸上植物、緑藻類、ポルフィラではビオラキササンチン、ネオキササンチン、ルテインが主要なカロテノイド分子種であるが、クラン E, F, G, H 型 CYP97 を持つ不等毛藻類、渦鞭毛藻、ユーグレナではジアジノキササンチン、一部ではフコキササンチンが主要なカロテノイド分子種である。したがって、真核光合成生物におけるカロテノイド分子種およびその合成系の多様性を理解する上

で、CYP97 の機能を解析することは重要である。近年、以下に記述する一部の CYP97 の機能が明らかになってきた。

表 1. CYP97 の系統分類

	クラン							
	A	B	C	E	F	G	H	
陸上植物 (例:シロイヌナズナ, イネ, ゼニゴケ)	○	○	○					
緑藻植物門 (例:クラミドモナス, ヘマトコッカス)	○	○	○					
紅藻植物門 (例: <i>Porphyra umbilicalis</i> )		○						
珪藻類 (例: <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i> )				○	○			
褐藻 (例: <i>Ectocarpus siliculosus</i> )				○	○			
真正眼点藻 (例: <i>Nannochloropsis oceanica</i> )					○			
渦鞭毛藻 (例: <i>Symbiodinium minutum</i> )						○		
ユーグレナ藻 (例: <i>Euglena gracilis</i> )					○		○	

## 2-1. 植物 CYP97 の機能解析

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*), イネ (*Oryza sativa*) 由来の CYP97 の機能解析により, CYP97A は  $\alpha$ -および  $\beta$ -カロテンの  $\beta$  環の水酸化を触媒すること, CYP97C が  $\alpha$ -カロテンの  $\epsilon$  環の水酸化を触媒することが明らかとなった (Tian et al. 2004, Kim and DellaPenna 2006, Quinlan et al. 2007)。さらに, イネ CYP97A4 および CYP97C2 は直接, タンパク質間相互作用することで, ルテイン合成に関与することが報告された (Quinlan et al. 2012)。一方で, シロイヌナズナの  $\beta$ -カロテン水酸化酵素欠損変異体 (*cyp97a3 bch1 bch2*) においてルテインが検出されたことから, シロイヌナズナの CYP97C1 が  $\alpha$ -カロテンの  $\beta$  環水酸化活性を持つ可能性と, シロイヌナズナに未知の  $\alpha$ -カロテンの  $\beta$  環水酸化酵素が存在する可能性が示唆された (Kim et al. 2009)。また, シロイヌナズナを用いた逆遺伝学的解析から, CYP97 は BCH とともに光合成光化学系 II の保護や強光ストレス耐性に対して重要な役割を果たすことが明らかになった (Kim et al. 2009)。ウンシュウミカン (*Citrus unshiu*), ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) 由来 CYP97 の機能解析

からは、CYP97C の  $\alpha$ -カロテンの  $\epsilon$  環水酸化活性が明らかとなったが、CYP97A の  $\alpha$ -および  $\beta$ -カロテンの  $\beta$  環水酸化活性は検出されなかった (Takemura et al. 2015, Ma et al. 2016)。これはウンシュウミカン、ゼニゴケ由来 CYP97A が活性を持たないのではなく、大腸菌を用いた CYP97 の機能解析において、機能的なタンパク質の発現に失敗したことが主な原因であると考えられた。

クラン B 型 CYP97 遺伝子は陸上植物、緑藻植物門に広く保存されているが、少なくとも、ウンシュウミカン由来 CYP97B において、 $\alpha$ -および  $\beta$ -カロテン水酸化活性は確認されなかった (Ma et al. 2016)。一方で、シロイヌナズナ CYP97B3 過剰発現体において、 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -クリプトキサンチンの含量が有意に変化したことから、植物におけるクラン B 型 CYP97 のカロテノイド合成系への関与が示唆されたが (Kim et al. 2010)、現時点で、その詳細な機能は不明である。

## 2-2. 真核藻類 CYP97 の機能解析

植物と比較して真核藻類の CYP97 に関する研究報告は多くない。近年では、ポルフィラにおいて、CYP97 (PuCHY1) の機能解析が報告された。PuCHY1 は CYP97 ファミリーのクラン B に属し、 $\beta$ -カロテンを水酸化し、ゼアキサンチンを生成する (Yang et al. 2014)。植物および緑藻類由来クラン B 型 CYP97 の機能は不明であるが、PuCHY1 は酵素機能が明らかになった唯一のクラン B 型 CYP97 である。

アスタキサンチン産生藻のヘマトコッカス、オイル産生藻のパラクロレラ (*Parachlorella kessleri*) において、CYP97 相同遺伝子の発現解析が行われた。これらの緑藻類では強光照射に応答して、CYP97 相同遺伝子の転写レベルが増大し、アスタキサンチンやゼアキサンチン蓄積との相関があることから、CYP97 相同遺伝子のアスタキサンチン合成、光合成光化学系 II の保護への関与が示唆される (Cui et al. 2013, Yu et al. 2014)。しかし、現在までこれら緑藻類の CYP97 相同遺伝子産物の酵素機能や生理機能は解析されておらず、今後さらなる詳細な機能解析が望まれる。

## 3. ユーグレナ CYP97 の機能解析

### 3-1. ユーグレナの特徴

ユーグレナは真核微細藻類の一種であり (図 2)、光合成を行う植物的特徴と鞭毛により運動を行う動物的特徴を併せ持つ (北岡 1989, Schwartzbach and Shigeoka 2017)。モデル微細藻類として広く研究されるクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) や、カロテノイド研究に汎用されるヘマトコッカス、*C. zofingiensis* 等は緑藻植物門に属するのに対し、ユーグレナはユーグレノゾア門に属するため、緑藻でもその

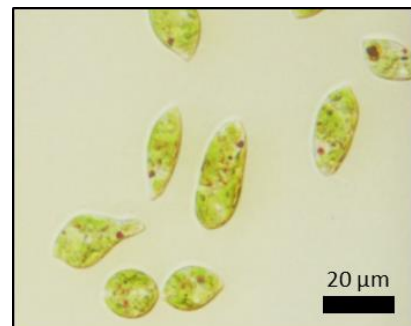


図 2. ユーグレナ (*Euglena gracilis*) の顕微鏡写真

進化の過程は大きく異なっている。その結果、ユーグレナは特徴的なカロテノイド組成を持ち、それらの合成経路も異なっていると考えられている。特に *E. gracilis* は、生育速度が速いことや、幅広い pH 条件下でも生育すること、また、独立および従属栄養条件のいずれでも生育可能であることなど、他の真核藻類と比較して有利な条件下で培養できることが知られている。こうしたユーグレナの持つ優れた特徴を活用し、ユーグレナ社はユーグレナ屋外大量培養法の開発とその商業生産を成功させた (Suzuki 2017)。このように、現在ユーグレナは基礎研究だけでなく、機能性食品、化成品、バイオ燃料等の応用研究にも盛んに用いられるようになってきた。

### 3-2. ユーグレナにおけるカロテノイド研究

ユーグレナが産生する幅広い有用物質の中で、カロテノイドも注目を集めている。ユーグレナは主要なカロテノイドとして、 $\beta$ -カロテンやネオキササンチンの他に、植物、緑藻類には検出されないジアジノキササンチン、ジアトキササンチンを産生する (Wright et al. 1991, Küpper et al. 2007, Kato et al. 2017)。現在では、カロテノイド合成経路やその制御機構の理解が、産業実用性の高いユーグレナをカロテノイド生産に利用する上で必要不可欠であると考えられるようになってきた。これまでに、ユーグレナのカロテノイド合成系遺伝子として、生合成経路の上流で機能するゲラニルゲラニルニリン酸合成遺伝子 (*crtE*) と、フィトエン合成酵素遺伝子 (*crtB*) が同定された (Kato et al. 2016)。さらに、*CrtB* はユーグレナのカロテノイド合成だけでなく、クロロフィル合成、葉緑体構造のホメオスタシスに重要な役割を果たすことが明らかになった (Kato et al. 2017)。*CYP97* を含むフィトエン下流のカロテノイド合成系遺伝子の詳細な機能は明らかになっていない一方、最近の研究から、ユーグレナの *CYP97* 相同遺伝子 (*EgCYP97H1*, *EgCYP97F2*) の酵素機能、生理機能、発現調節に関するユニークな知見が得られたため、以下に紹介する (Tamaki et al. 投稿中)。

### 3-3. ユーグレナ CYP97 の酵素活性

*EgCYP97H1*, *EgCYP97F2* の酵素活性を評価した。 $\beta$ -カロテン水酸化活性の評価では、 $\beta$ -カロテン蓄積大腸菌に評価対象の *CYP97* 遺伝子を異種発現させ、生じたカロテノイドの HPLC 分析を行う *in vivo* 活性測定法が一般的である (Quinlan et al. 2007, Quinlan et al. 2012, Yang et al. 2014)。本手法によって活性測定を行ったところ、*EgCYP97H1* は  $\beta$ -カロテンを水酸化することで  $\beta$ -クリプトキササンチンを生成したことから、*EgCYP97H1* は  $\beta$ -カロテンモノ水酸化酵素であることを明らかにした。

### 3-4. ユーグレナ CYP97 の生理機能

ユーグレナ細胞における *EgCYP97H1* および *EgCYP97F2* の生理機能を明らかにするために、ユーグレナ *CYP97* ノックダウン (KD) 細胞を作出した。ユーグレナの形質転

換技術として、標的遺伝子のノックアウト技術は未だ確立されていない。また、過剰発現法の開発は報告されたが (Ogawa et al. 2015), 現在のところ汎用性のある技術には至っていない。一方で、標的遺伝子の二本鎖 RNA をエレクトロポレーション法により導入することで、容易に KD 細胞を作出する実験系は既に報告されている (Tamaki et al. 2014, Tamaki et al. 2015)。

EgCYP97H1 および EgCYP97F2 の KD 細胞 (KD-*cyp97h1*, KD-*cyp97f2*) では、生育速度および細胞当たりのクロロフィル含量は顕著に低下していた。このことから、両 KD 細胞の生育速度の低下は、クロロフィル含量の低下から生じる光合成速度の低下に起因することが示唆された。また、両 KD 細胞中の総カロテノイド含量と、ユーグレナにおいて最も含量の高いジアジノキササンチン量は約 90% 低下したことから、両 EgCYP97 がユーグレナのカロテノイド合成に不可欠な役割を果たすことが明らかになった。また、KD-*cyp97h1* 細胞では、総カロテノイドに占める  $\beta$ -カロテンの割合が増加したことから、EgCYP97H1 が  $\beta$ -カロテン水酸化活性を持つことが *in vivo* の実験系でも明らかとなった。一方、KD-*cyp97f2* 細胞では、野生株で検出されない  $\beta$ -クリプトキササンチンおよびそのエポキシドの蓄積が起こったことから、EgCYP97F2 は  $\beta$ -クリプトキササンチン水酸化酵素である可能性が考えられた。なお、KD-*cyp97f2* 細胞は弱光下で培養を行ったため、蓄積した  $\beta$ -クリプトキササンチンの一部がエポキシ化したと考えられる (Lohr and Wilhelm 2001)。さらに、両 KD 細胞では、微量のエキネノン、カンタキササンチン、アスタキササンチンといったケトカロテノイドの蓄積も確認されたことから、ユーグレナが潜在的にケトカロテノイド合成経路を有することが示唆された。

多くの植物・緑藻類では、 $\beta$ -カロテン水酸化酵素として CYP97 遺伝子だけでなく、BCH 遺伝子も持っている (Sun et al. 1996, Qui et al. 2013)。しかし、ユーグレナの発現遺伝子データベース (Yoshida et al. 2016) 上には BCH 相同遺伝子は存在しなかった。したがって、ユーグレナにおける  $\beta$ -カロテンの水酸化には CYP97 のみに関与すると考えられる。この仮定は、両 KD 細胞の生育速度、総カロテノイド、クロロフィル含量における劇的な表現型の変化からも支持された。

### 3-5. ユーグレナ CYP97 発現の転写後調節

上述のように、両 KD 細胞において、総カロテノイド含量が顕著に低下する一方で、シロイヌナズナでは  $\beta$ -カロテン水酸化酵素欠損変異体 (*cyp97a3 bch1 bch2*) の総カロテノイド含量はほとんど変化せず、代わりに  $\alpha$ -カロテンやルテインの蓄積が起こることが明らかになっている (Kim et al. 2009)。したがって、ユーグレナにおけるカロテノイド合成は植物のそれとは異なるメカニズムで制御されると考えられる。そこで、ユーグレナのカロテノイド合成系遺伝子 (EgCYP97H1, EgCYP97F2, Eg*crtE*, Eg*crtB*) の転写調節について検討した。ユーグレナでは、暗条件から明条件に移行した際に、迅速な葉緑体の発達とカロテノイド蓄積が起こる。また、強光照射下では、 $\beta$ -カロテン、ジアジ

ノキササンチン, ジアトキササンチンが有意に蓄積する (Kato et al. 2017)。しかし, これらカロテノイド蓄積条件下では, *EgCYP97H1*, *EgCYP97F2*, *EgcrtE* および *EgcrtB* 遺伝子の転写レベルはほとんど変化しなかった。そこで, ユーグレナのカロテノイド合成における転写調節ではなく, 転写後調節の可能性を検討したところ, ユーグレナにおける暗条件から明条件移行時のカロテノイド合成は転写阻害剤の影響を受けなかったが, 翻訳阻害剤処理により強く阻害された。このことから, ユーグレナのカロテノイド合成は転写後調節によって制御されることが示唆された。また, 本機構は先に解析された植物, 緑藻類由来 *CYP97* 遺伝子の発現制御とは異なっていた。

#### 4. おわりに

*CYP97* およびその相同遺伝子は多くの真核光合成生物のゲノム上に存在しており, 最初にシロイヌナズナでその酵素機能が明らかになった。その後, イネ, ゼニゴケなどの陸上植物, ポルフィラ, ユーグレナといった真核藻類と研究範囲が広がってきた。また, 一つの酵素ファミリーでありながら, 7つものクランに系統分類され, クランごとに機能に違いがあることも分かってきた。その例として, ユーグレナのクラン F および H 型 *CYP97* の機能 (酵素活性, 生理機能, 発現制御) は植物のクラン A および C 型 *CYP97* のそれらとは異なっていた。このことは, 既存の知見を適応するだけでなく, 個別の生物種における *CYP97* の機能解析の必要性を示している。今後は, 酵素機能および生理機能が不明な植物クラン B 型 *CYP97* の機能解析や, ユーグレナ以外の有用真核藻類, 例えば, 生理活性カロテノイドとして知られるフコキササンチンを蓄積する珪藻, 褐藻における *CYP97* の機能解析が進展することに期待したい。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり, 帝京大学・篠村知子教授, 加藤翔太博士, 島根大学・石川孝博教授, 生産開発科学研究所・眞岡孝至博士に多大なるご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

#### 引用文献

- Cui, H., Yu, X., Wang, Y., Cui, Y., Li, X., & Liu, Z. 2013. Evolutionary origins, molecular cloning and expression of carotenoid hydroxylases in eukaryotic photosynthetic algae. *BMC Genomics* 14: 457.
- Cunningham, F.X. Jr., Lee, H., & Gantt, E. 2007. Carotenoid biosynthesis in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eukaryot Cell*. 6: 533-545.
- Kato, S., Takaichi, S., Ishikawa, T., Asahina, M., Takahashi, S., & Shinomura, T. 2016. Identification and functional analysis of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (*crtE*) and phytoene synthase gene (*crtB*) for carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*. *BMC Plant*



- Biol.* 16: 4.
- Kato, S., Soshino, M., Takaichi, S., Ishikawa, T., Nagata, N., Asahina, M., & Shinomura, T. 2017. Suppression of the phytoene synthase gene (*Eg crtB*) alters carotenoid content and intracellular structure of *Euglena gracilis*. *BMC Plant Biol.* 17: 125.
- Kim, J., & DellaPenna, D. 2006. Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of *Arabidopsis* carotenoid  $\beta$ -ring hydroxylase CYP97A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3474-3479.
- Kim, J., Smith, J.J., Tian, L., & Dellapenna, D. 2009. The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50: 463-479.
- Kim, J.E., Cheng, K.M., Craft, N.E., Hamberger, B., & Douglas, C.J. 2010. Over-expression of *Arabidopsis thaliana* carotenoid hydroxylases individually and in combination with a  $\beta$ -carotene ketolase provides insight into *in vivo* functions. *Phytochemistry.* 71: 168-178.
- 北岡正三郎 1989. ユーグレナ：生理と生化学. 学会出版センター. 東京
- Küpper, H., Seibert, S., & Parameswaran, A. 2007. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Anal. Chem.* 79: 7611-7627.
- Lohr, M., & Wilhelm, C. 2001. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* 212: 382-391.
- Ma, G., Zhang, L., Yungyuen, W., Tsukamoto, I., Iijima, N., Oikawa, M., Yamawaki, K., Yahata, M., & Kato, M. 2016. Expression and functional analysis of citrus carotene hydroxylases: unravelling the xanthophyll biosynthesis in citrus fruits. *BMC Plant Biol.* 16: 148.
- Nelson, D.R., Ming, R., Alam, M., & Schuler, M.A. 2008. Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes. *Tropical Plant Biol.* 1: 216-235.
- Ogawa, T., Tamoi, M., Kimura, A., Mine, A., Sakuyama, H., Yoshida, E., Maruta, T., Suzuki, K., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. 2015. Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. *Biotechnol. Biofuels.* 8: 80.
- Quinlan, R.F., Jaradat, T.T., & Wurtzel, E.T. 2007. *Escherichia coli* as a platform for functional expression of plant P450 carotene hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 458: 146-157.
- Quinlan, R.F., Shumskaya, M., Bradbury, L.M., Beltrán, J., Ma, C., Kennelly, E.J., & Wurtzel, E.T. 2012. Synergistic interactions between carotene ring hydroxylases drive lutein formation in plant carotenoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 160: 204-214.
- Schwartzbach, S.D., & Shigeoka, S. 2017. *Euglena: biochemistry, cell, and molecular biology.* Springer, German.
- Sun, Z., Gantt, E., & Cunningham, F.X. Jr. 1996. Cloning and functional analysis of the  $\beta$ -carotene

- hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 271: 24349-24352.
- Suzuki, K. 2017. Large-scale cultivation of *Euglena*. In: Schwartzbach, S.D., & Shigeoka, S. (eds.) *Euglena: biochemistry, cell, and molecular biology*. pp. 285-293. Springer, German.
- Takaichi, S. 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Mar. Drugs* 9: 1101-1118.
- Takaichi, S., & Mochimaru, M. 2007. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2607-2619.
- Takemura, M., Maoka, T., & Misawa, N. 2015. Biosynthetic routes of hydroxylated carotenoids (xanthophylls) in *Marchantia polymorpha*, and production of novel and rare xanthophylls through pathway engineering in *Escherichia coli*. *Planta* 241: 699-710.
- Tamaki, S., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Ishikawa, T. 2014. Identification and functional analysis of peroxiredoxin isoforms in *Euglena gracilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78: 593-601.
- Tamaki, S., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Ishikawa, T. 2015. Biochemical and physiological analyses of NADPH-dependent thioredoxin reductase isozymes in *Euglena gracilis*. *Plant Sci.* 236: 29-36.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M., & DellaPenna, D. 2004. The *Arabidopsis LUT1* locus encodes a member of the cytochrome p450 family that is required for carotenoid  $\epsilon$ -ring hydroxylation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 402-407.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjørnland, T., Repeta, D., & Welschmeyer, N. (1991) Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 77: 183-196.
- Yang, L.E., Huang, X.Q., Hang, Y., Deng, Y.Y., Lu, Q.Q., & Lu, S. 2014. The P450-type carotene hydroxylase PuCHY1 from *Porphyra* suggests the evolution of carotenoid metabolism in red algae. *J. Integr. Plant Biol.* 56: 902-915.
- Yoshida, Y., Tomiyama, T., Maruta, T., Tomita, M., Ishikawa, T., & Arakawa, K. 2016. *De novo* assembly and comparative transcriptome analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic conditions. *BMC Genomics* 17: 182.
- Yu, X., Cui, H., Cui, Y., Wang, Y., Li, X., Liu, Z., & Qin, S. 2014. Gene cloning, sequence analysis, and expression profiles of a novel  $\beta$ -ring carotenoid hydroxylase gene from the photoheterotrophic green alga *Chlorella kessleri*. *Mol. Biol. Rep.* 41: 7103-7113.