

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05439

研究課題名(和文)植物細胞内におけるビタミンB2の代謝調節機構の包括的解明

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the regulation of vitamin B2 metabolism in plant

研究代表者

小川 貴央(Ogawa, Takahisa)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：80603802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンB2であるリボフラビンを前駆体とするFADやFMNは、生物のあらゆる生理機能の根幹に関わる補酵素であるため、細胞内レベルは恒常的に維持されている。しかし、その合成/分解系制御の分子機構や輸送機構については全く不明である。そこで我々は、トランスクリプトーム解析により細胞内FADレベル変化に反応して発現変動する転写因子および輸送体をコードする遺伝子を見出した。さらにこれら遺伝子について、各遺伝子の破壊株を用いた解析や、酵母を用いた輸送体遺伝子のスクリーニングを行い、植物のビタミンB2代謝調節に関与する転写因子を1つ、植物のビタミンB2輸送体候補遺伝子を2つ同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンB2は動植物および微生物を含むすべての生物の生理機能の根幹を担っていることから、細胞内ビタミンB2レベルを適切に調節することが生物の様々な機能の発現/制御に必須であることは明らかである。ビタミンB2は、すべての生物にとってごく基本的な化合物であるにもかかわらず、生体内におけるビタミンB2の合成/分解の調節機構や、輸送機構についてはほとんど不明なままである。したがって、本研究で得られた植物ビタミンB2の新規調節因子と輸送体に関する成果は、植物のビタミンB2の輸送や調節機構を初めて明らかにするだけでなく、すべての生物におけるビタミンB2代謝調節機構に関する新たな基盤情報をもたらす。

研究成果の概要(英文)：Riboflavin (RF) and its cofactors (FMN and FAD) are essential molecules for vital metabolic processes in all organisms. Thus, the flavin metabolism must be tightly regulated in the cells. We previously reported that the intracellular flavin levels were tightly maintained by the enzymes involved in their synthesis and degradation in Arabidopsis. However, information of regulatory factors participated in the flavin homeostasis and transporters in each organelle is mostly limited. Recently, we tried to identify novel factors involved in the flavin metabolism by a transcriptome analysis after exogenous FAD treatment. We obtained candidate genes encoding transcription factors and transporters. Furthermore, we demonstrated the analysis using disrupted mutant plants of each gene and screening of transporter genes using yeast mutant. We identified one transcription factor involved in the regulation of flavin metabolism and two flavin transporter genes, respectively.

研究分野：植物生理学

キーワード：ビタミンB2 リボフラビン 補酵素 転写因子 輸送体

1. 研究開始当初の背景

リボフラビン (RF) は、細胞内でそのほとんどが補酵素型であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) およびフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) として存在している。これらフラビン化合物は多様な代謝系に要求されるため、動植物および微生物を含むすべての生物のバイオピリティに必須の化合物である。特に高等植物において、フラビン化合物は光合成、呼吸、脂肪酸代謝などの一次代謝だけでなく、ビタミン B₁₂、B₆、C、葉酸など各種ビタミン類の生合成にも不可欠である。またフラビン化合物は光レセプターや DNA 修復系の補因子としても機能し、近年ではフラビン化合物自身がシグナルとして植物のホルモン応答にも関与することが明らかになってきている。すなわち、フラビン化合物は植物の生理機能の根幹を担っているため、植物細胞内におけるフラビン化合物レベルは厳密に制御されなければならない。

植物において、RF は葉緑体のみで生合成されるが、RF から FMN および FAD 合成/分解に関わる酵素群は葉緑体だけでなく、細胞質においても同定されている (図 1)。さらに、それらの合成/分解酵素はミトコンドリアからも活性レベルで検出されているが、その詳細は不明である。一方で、植物のフラビン化合物の輸送系に関しては、ミトコンドリアにおいて RF の取り込み、および FAD の排出活性が報告されているのみである。限定的ではあるが、これらの知見から判断して、植物において RF は葉緑体で合成され、細胞質やミトコンドリアに輸送された後に、各オルガネラ独自の FMN や FAD の合成/分解系により代謝されると考えられる (図 1)。これまでに我々は、FAD などの外部添加による細胞内フラビン化合物レベルの変化により、多くのフラビン合成/分解酵素遺伝子の発現が変動し、余剰な FAD や FMN は RF まで分解されることを見出した。すなわち、フラビン代謝系のフィードバック制御を介して、細胞内フラビン化合物レベルの恒常性が維持されていると考えられた。このようなフラビン化合物の恒常性維持には転写因子による発現制御やオルガネラ間のフラビン化合物の輸送系が共役して関わっていると予想されるが、上述のようにそれらの実体は不明なままである (図 1)。

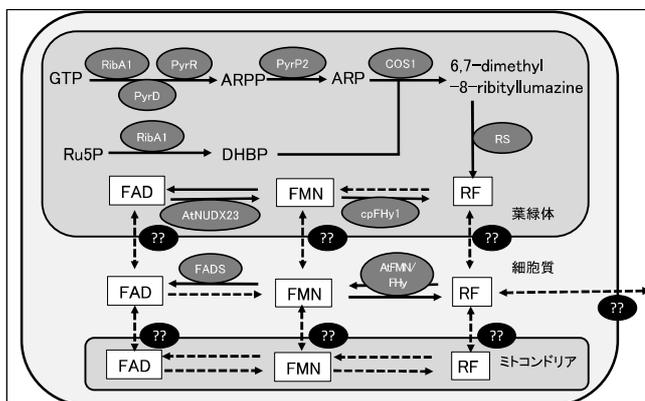


図1 シロイヌナズナにおけるフラビン化合物代謝経路
RFは葉緑体のみで合成される。FMNとFADは、葉緑体、細胞質に局在すると推測されるRibF1, 2および細胞質型のFMN/Fhy, FADSによって合成される。一方、FMNとFADは、葉緑体に局在するAtcpFHy1, AtNUDX23によって分解される。細胞内外へのフラビン化合物のオルガネラ間、細胞内外への輸送機構については全く不明である。

そこで我々は、植物のフラビン化合物の代謝制御に関わる新規因子を同定するために、FAD処理後のシロイヌナズナ葉におけるトランスクリプトーム変化を解析した。その結果、FAD処理により発現量が2倍以上および0.5倍以下に増減した遺伝子群から、トランスポーター関連遺伝子 (FAD-responsive transporters: FRTPs) を17個、転写因子関連遺伝子 (FAD-responsive transcription factors: FRTFs) を47個同定した。FRTPsには、大腸菌のフラビントランスポーターが属するMultidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE)ファミリーや、シロイヌナズナのビタミン B₆ トランスポーターであるPurine Permeases 1 (PUP1) のホモログが含まれていた。一方FRTFsには、MYB, bZIP, bHLHなどの主要転写因子が多く含まれていた。これらのことから、FRTPsやFRTFsには植物のフラビン化合物輸送体やフラビン代謝系調節に関与する新規因子が含まれる可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、FRTPs および FRTFs の生理機能を解析することで、植物における細胞内フラビン化合物の代謝調節機構を明らかにすることを目的とする。上述のように、フラビン化合物が動植物および微生物を含むすべての生物の生理機能の根幹を担っていることから、細胞内フラビン化合物レベルを適切に調節することが生物の様々な機能の発現/制御に必須であることは明らかである。動植物および微生物において、フラビン化合物の生合成経路については明らかになりつつあるが、生体内におけるフラビン化合物の合成/分解の調節機構や、輸送機構についてはほとんど不明なままである。したがって、本研究で対象としている植物細胞内フラビン化合物レベルに応答して発現変動するFRTPsおよびFRTFsの生理機能解析から得られる成果は、植物におけるフラビン化合物の輸送や調節機構を初めて明らかにするだけでなく、すべての生物におけるフラビン化合物代謝調節機構に関する新たな基盤情報となる。さらに、将来的には細胞内フラビン化合物レベルの調節を介した植物の様々な代謝系の制御や、栄養素としてのリボフラビンの高蓄積など、様々な有用形質を有する作物の分子育種技術に重要な知見をもたらす。

3. 研究の方法

本研究では、植物細胞内におけるフラビン化合物の代謝調節機構を包括的に理解することを目的として、大きく分けて以下の2つの項目について研究を行った。

(1) フラビン応答性転写因子 (FRTFs)がフラビン化合物代謝系制御に果たす役割

FRTFs とフラビン代謝系の制御との関連性を明らかにするために、各 FRTF のシロイヌナズナ遺伝子破壊株を単離し、それらの細胞内フラビン化合物レベルおよびフラビン代謝系関連遺伝子群の発現量を解析することで、フラビン代謝系調節に関与する転写因子候補のスクリーニングを行った。さらに単離した候補遺伝子についてはエストロゲン誘導型の一過的過剰発現株を用いて解析を行った。

(2) フラビン化合物輸送体の同定と生理機能解析

これまでに植物におけるフラビン化合物輸送体に関する知見は皆無である。一方、大腸菌や酵母などの微生物においては、RF 生合成遺伝子を欠損した RF 要求株を用いた相補試験によりフラビン輸送体が同定されている。これらの RF 要求株は、外部から高濃度のフラビン化合物を添加しなければ生育できないが、RF 輸送体を発現させることにより、低濃度の RF 添加培地でも生育可能となる。そこで、酵母の RF 要求株を作製し、FRTFs およびそのホモログなどの候補遺伝子を発現させ、低濃度のフラビン化合物を含む培地における生育の可否を判定することで、フラビン化合物輸送体のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) フラビン応答性転写因子 (FRTFs)がフラビン化合物代謝系制御に果たす役割

これまでに同定した47個のFRTFsのうち19種類についてシロイヌナズナ遺伝子破壊株を単離した。そこで得られたFRTF遺伝子破壊株 (*frtf1*~*19.1*)を用いて、通常条件下 (100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, 明期16時間、暗期8時間, 22°C, 湿度50%), 1/2MS培地で2週間生育させた2週齢の植物体の地上部を照射4時間後に回収し、細胞内フラビン化合物レベルを測定した。その結果、野生株と比較していくつかの変異体においてフラビン化合物レベル変化が見られたが、それらの中で、*frtf19.1*株のフラビン化合物レベルの変化は最も顕著であり、FAD、FMN、RFはそれぞれ野生株の87%、57%、51%にまで減少していた(図2)。

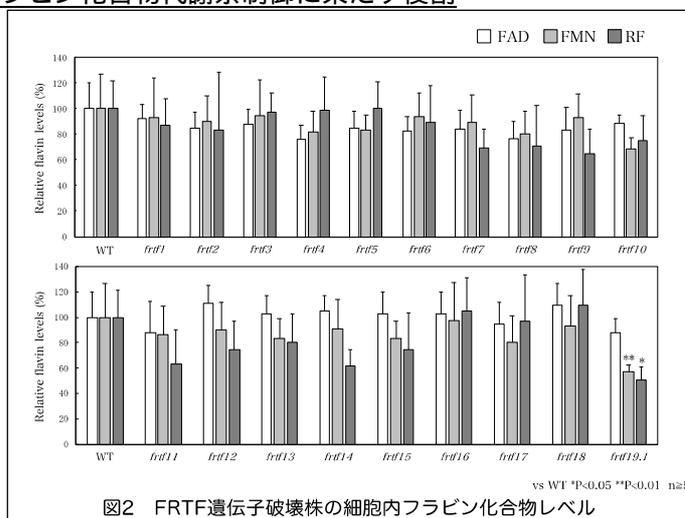


図2 FRTF遺伝子破壊株の細胞内フラビン化合物レベル

そこで次に、*frtf19.1*株のフラビン代謝系遺伝子群の発現を解析した。通常条件下、1/2MS培地で2週間生育させた植物体における、既知のフラビン代謝系遺伝子群の発現量を定量的RT-PCRにより解析した。その結果、野生株と比較して*frtf19.1*株ではRF合成に関わる*AtRibA1*、*PyrD*、*PyrR*、*COS1*、さらにFMN合成/分解に関与する*AtFMN/FHy*の発現量が減少していた(図3)。

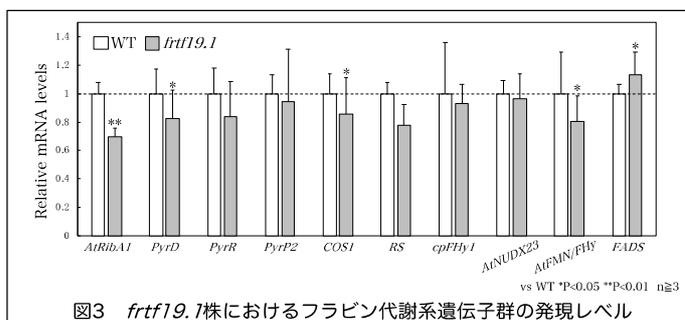


図3 *frtf19.1*株におけるフラビン代謝系遺伝子群の発現レベル

さらに *FRTF19* について詳細に解析するために、エストロゲン (ES) 誘導型一過的過剰発現株を用いた。この植物体では、恒常的に発現している XVE キメラ転写因子が ES と結合することこ

とで活性化され下流遺伝子の発現を誘導するため、ES を処理することのより任意の遺伝子を一過的に発現誘導することができる。ABRC より入手した *FRTF19* ES 誘導型一過的過剰発現株について、ES 処理後の *FRTF19* の発現量を解析した。*FRTF19* ES 誘導型一過的過剰発現株を通常条件下、1/2MS 培地で 2 週間生育させた後、2 μ M の ES または DMSO (Mock) 添加培地に移植し、0, 3, 6, 12, 24, 48 時間後の植物体を回収し、定量的 RT-PCR を行なった結果、ES 処理後、経時的に *FRTF19* の発現量の増加が認められた (図 4A)。また同様に RF 合成系遺伝子の発現量の解析を行なった結果、*FRTF19* の発現量の増加に伴った発現量の増加が認められた (図 4A)。さらにこのときの細胞内フラビン化合物レベルは RF 合成系遺伝子群の発現量の増加と同様に増加していた (図 4B)。以上の結果から、同定した *FRTF19* は植物におけるフラビン化合物の生合成を直接的もしくは間接的に正に制御する転写因子であることが示された。このように植物のフラビン化合物代謝調節に関与する転写因子に関する知見はほとんどなく、同定した *FRTF19* の新規性は極めて高いことから、今後さらなる解析を進めている。

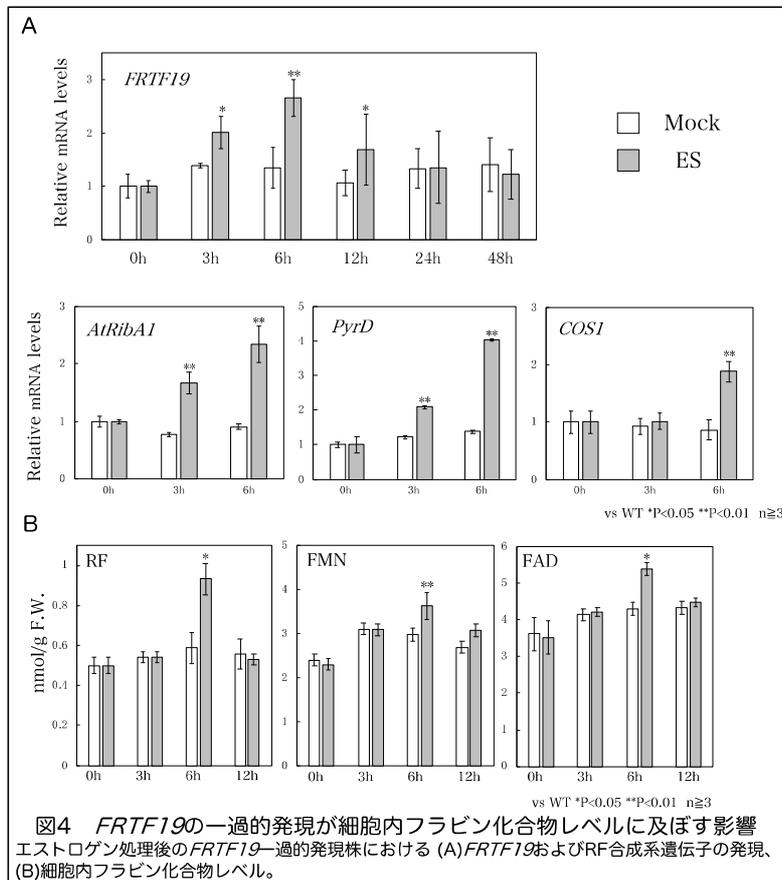


図4 *FRTF19*の一過的発現が細胞内フラビン化合物レベルに及ぼす影響
エストロゲン処理後の*FRTF19*一過的発現株における (A)*FRTF19*およびRF合成系遺伝子の発現、
(B)細胞内フラビン化合物レベル。

(2) フラビン化合物輸送体の同定と生理機能解析

出芽酵母の RF 生合成に必須な *RIB4*, *RIB5* 遺伝子を欠損した RF 要求株の作出を試みた。カナマイシン耐性遺伝子を増幅し、酢酸リチウム法により出芽酵母に形質転換することで RF 合成系遺伝子破壊株 (*rib4*, *rib5*) を作出した。形質転換後得られたコロニーを、RF (20 mg/L) を含む最少培地と RF を含まない最少培地に植菌した結果、RF 非添加培地では *rib4*, *rib5* 株の生育阻害が確認された。そこで、得られたこれらの株にトランスクリプトームにより同定した 17 個のフラビン化合物輸送体候補遺伝子 (FRTPs) を形質転換し、低濃度 RF 添加培地を用いてスクリーニングを行なった結果、残念ながら FRTPs の中で生育の回復を示す遺伝子は得られなかった。そこで我々は、FRTPs に含まれていた Purine permease に注目した。Purine permease (PUP) は、植物において細胞膜局在型のトランスポーターであり、アデニン、サイトカニン、カフェインなどのヌクレオチド塩基とその誘導体やプリン骨格を有する基質の輸送を行なうタンパク質ファミリーである。シロイヌナズナにおいて、PUP は 21 種類存在し、その多くが細胞膜局在であることが予想されている。それらの中には、サイトカニンのトランスポーターとして *AtPUP14*、ピリドキシン(ビタミン B6) やアデニンのトランスポーターとして *AtPUP1* および *AtPUP2* が同定されている。しかしながら、多くの PUP の基質や生理機能については未だ不明であり、これまでに同定された基質と同様にプリン骨格を有するフラビン化合物も、PUP の新規基質となる可能性が考えられた。

そこで、シロイヌナズナに存在する全ての PUP 遺伝子のクローニングを行い、上述の RF 要求性酵母へ形質転換を行い、低濃度 RF 添加培地で生育可能かどうか検討を行なった。その結果、2 種類の遺伝子導入株について、低濃度 RF 添加培地でも生育可能であった (図 5)。

したがって、これらの遺伝子は植物におけるフラビン化合物輸送体である可能性が示唆された。これまでに植物におけるフラビン化合物輸送体に関する知見はほとんどなく、輸送体遺伝子も未同定のままである。したがって、今回得られた結果は国内外を含めて極めて新規性が高く、現在これらの生理機能について詳細に解析を進めている。

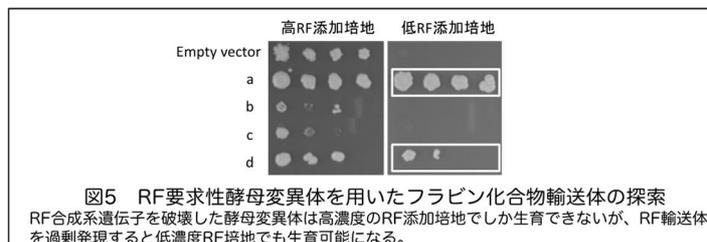


図5 RF要求性酵母変異体を用いたフラビン化合物輸送体の探索
RF合成系遺伝子を破壊した酵母変異体は高濃度のRF添加培地でしか生育できないが、RF輸送体を過剰発現すると低濃度RF培地でも生育可能になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa Takahisa, Yoshimura Kazuya	4. 巻 161
2. 論文標題 Modulation of the subcellular levels of redox cofactors by Nudix hydrolases in chloroplasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental and Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 57～66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envexpbot.2018.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 難波純也、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 植物におけるフラビン代謝制御に関与する新規転写因子の探索
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 難波純也、原田美帆、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 植物におけるフラビン代謝制御に関与する新規転写因子の解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本琢隼、原田美帆、桑田日佳里、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 植物におけるフラビン輸送体の探索
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野津昌史、野中智博、植木ももこ、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 ストレス応答に關与するAtNUDX6, 7の相互作用因子の探索と機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 難波純也、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 植物のフラビン代謝制御に關与する新規調節因子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会 中四国支部第51回講演会（例会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池円架、難波純也、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 植物のフラビン化合物輸送に關与する新規因子の探索
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池円架、難波純也、杉本琢隼、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 シロイヌナズナのフラビン化合物輸送に關与する新規因子の探索と解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 中四国支部大会（第52回講演会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 難波純也、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 植物におけるフラビン代謝制御に関する新規転写因子の探索
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池円架、杉本琢隼、原田美帆、丸田隆典、石川孝博、吉村和也、重岡 成、小川貴央
2. 発表標題 植物におけるフラビン輸送に関与する新規因子の同定と解析
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関