

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06702

研究課題名(和文)植物の光依存的なビタミンC合成に関わる未知制御機構

研究課題名(英文)Regulation of light-dependent synthesis of L-ascorbate in plants

研究代表者

小竹 敬久 (Toshihisa, Kotake)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20334146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物のビタミンC合成経路の律速反応であるMan 1-リン酸からのGDP-Manの合成は、GDP-ManピロホスホリラーゼVTC1により触媒される。KJC1はVTC1の活性を高める因子であるが分子機能は不明だった。FLAG-VTC1が発現するシロイヌナズナを作出し、VTC1のタンパク質レベルを調べたところ、kjc1変異体では1割以下に低下していた。また、シロイヌナズナ抽出液を分子量別に分画してGDP-Man合成活性を調べたところ、野生型植物では高分子画分に活性があるのに対して、kjc1変異体では活性がなかった。植物生体内でVTC1はKJC1と複合体を形成することで分解から免れていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンCは植物細胞内の酸化還元レベルの調節に極めて重要な分子であり、体内でビタミンCを合成できない我々ヒトにとっては欠くことができない栄養素の一つである。これまでにビタミンCの合成に関わる各種の酵素が同定されているが、合成の調節機構はいまだに不明な点が多い。特に遺伝子発現後のタンパク質レベルの調節機構がわかっていなかった。本研究は、VTC1の相互作用因子KJC1により、VTC1が分解から守られていることがわかり、ビタミンC合成制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：L-Ascorbic acid is synthesized via nucleotide sugar GDP-mannose (GDP-Man) and GDP-L-galactose in plants. VTC1 is a GDP-mannose pyrophosphorylase catalyzing the conversion from Man 1-P to GDP-Man, a rate-determining step in this pathway. KONJAC1 (KJC1) protein has been identified as a factor increasing VTC1 activity in Arabidopsis. To examine a function of KJC1 in the stability of VTC1, transgenic Arabidopsis harboring FLAG-fused genomic VTC1 gene was generated. In kjc1 mutant, the amount of FLAG-VTC1 protein was reduced to less than 10% of wild-type Arabidopsis, corresponding to VTC1 activity. A native form of VTC1 was extracted from Arabidopsis and applied to size-exclusion chromatography. While high VTC1 activity was detected in the high-molecular weight fraction from the wild-type plant, the activity was not detected in the fraction from kjc1 mutant. These results suggest that KJC1 protects VTC1 from protein degradation by forming a large complex in Arabidopsis.

研究分野：植物糖鎖生物学

キーワード：ビタミンC 糖ヌクレオチド GDP-マンノース 環境ストレス タンパク質分解制御

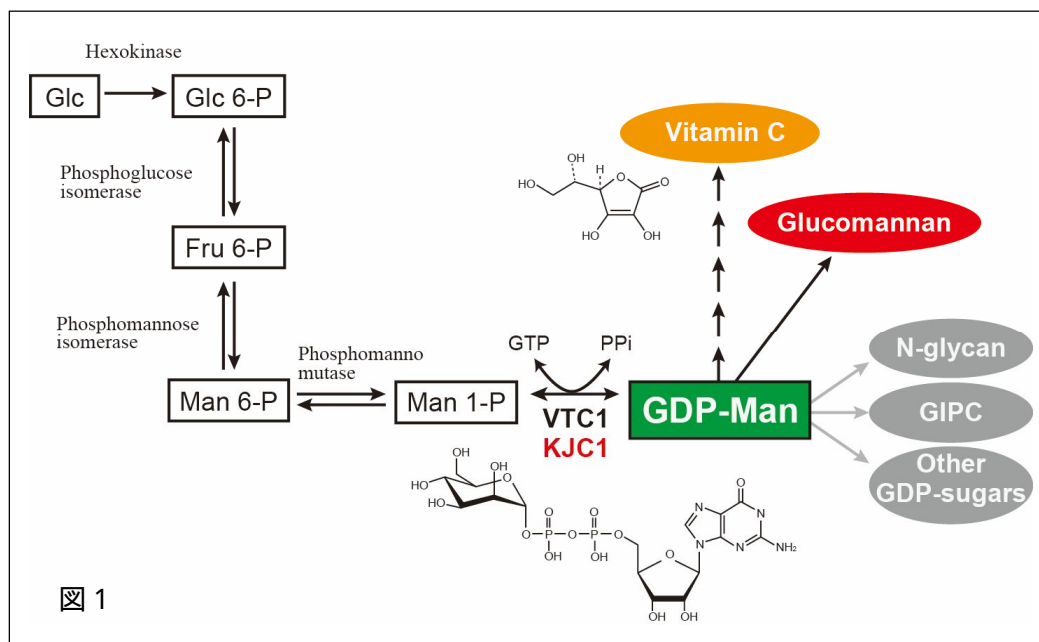
1. 研究開始当初の背景

植物は強光により生じる活性酸素種に曝されている。活性酸素種は、DNA やタンパク質、生体膜の損傷を起こすため、植物細胞はビタミン C (L-アスコルビン酸) で活性酸素種を消去している。一方で、余計なビタミン C の蓄積は生育に不利にはたらく場合もあり、ビタミン C の合成は、環境条件や組織・器官、エイジに合わせて制御されている。

植物のビタミン C は基本的に、GDP-マンノース (GDP-Man) と GDP-L-ガラクトースを経る D-Man/L-Gal 経路で合成される (Wheeler et al., 1998, Nature)。この他に、グルクロン酸を経る MIOX/D-グルクロン酸経路が存在するが、ビタミン C 蓄積量に寄与するのは D-Man/L-Gal 経路だけであることがわかっている (Kavkova et al., 2018, Plant Biol.)。D-Man/L-Gal 経路は 10 反応で構成され、主な律速反応の一つがマンノース 1-リン酸からの GDP-Man 合成である (図 1)。この反応は VITAMIN C DEFECTIVE 1 (VTC1) により触媒される (Conklin et al., 1999, PNAS)。

過去の研究で、植物の GDP-Man 合成には VTC1 の他に KONJAC タンパク質も関わることを報告した (Sawake et al., 2015, Plant Cell)。シロイヌナズナの主要 KONJAC タンパク質アイソフォームである KJC1 は、VTC1 の相互作用因子であり、植物生体内で VTC1 の活性 (GDP-Man 合成活性) を高めている。実際に、KJC1 を欠損したシロイヌナズナの *kjc1* 変異体では、GDP-Man 合成活性が 1 割に、ビタミン C 含有量は 40% に減少する (Sawake et al., 2015, Plant Cell)。大腸菌で作製した組換え KJC1 は VTC1 の活性を高めるものの、その活性は 2 倍程度であった。したがって、植物生体内では KJC1 は何か別の役割も持っていると考えられる。

VTC1 や KJC1 は真核生物で高度に保存されたタンパク質である。最近、哺乳類で VTC1 と KJC1 に相当する GMPPB と GMPPA の複合体の構造が決定され、これらが 12 量体の複合体を形成することや、GMPPA が GMPPB の活性を抑制していることがわかった (Zheng et al., 2021, Nat. Struc. Biol.)。これらの事実は、動物と植物で、KJC1/GMPPA の機能が大きく異なることを示唆している。強光などの環境ストレスに常に曝される植物は、ビタミン C 合成の迅速な合成制御のために、KJC1 の機能を変え、独自の活性制御機構を発達させたと予想される。



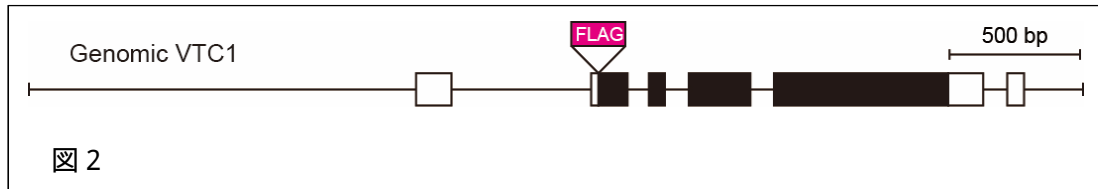
2. 研究の目的

本研究では、KJC1 が VTC1 と直接的に相互作用することで VTC1 の GDP-Man 合成活性を高めるほかに、植物生体内で VTC1 タンパク質の分解抑制因子として機能するとの仮説を立て、これを検証した。本研究ではまず、VTC1 タンパク質の蓄積量を定量的に評価できるように、FLAG ペプチドを融合した FLAG-VTC1 が自己プロモーターで発現するシロイヌナズナを作成した。次に、この FLAG-VTC1 遺伝子を *kjc1* 変異体にも導入することで、KJC1 タンパク質の有無が VTC1 タンパク質の蓄積量に与える影響を調べた。さらに、植物生体内で KJC1 が VTC1 複合体の形成に決定的な役割を果たすことを示すために、上記の FLAG-VTC1 が発現する野生型植物と *kjc1* 変異体から VTC1 複合体を抽出し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、複合体の分子量と GDP-Man 合成活性を調べた。加えて、種子ムシレージのガラクトグルコマンナンの蓄積を指標にして、VTC1 と KJC1 が GDP-Man 合成の主要因子であることを検証した。

3. 研究の方法

(1) FLAG-VTC1 導入シロイヌナズナの作出

野生型のシロイヌナズナのゲノミック DNA を鋳型として、ゲノミックの *VTC1* 遺伝子を単離した。*VTC1* のタンパク質コード領域の先頭に制限酵素サイトを PCR により導入し、ここに FLAG ペプチドをコードする塩基配列を挿入した (図 2)。この遺伝子コンストラクトをアグロバクテリウム法で、野生型 (WT) のシロイヌナズナと *kjc1* 変異体、*kjc2* 変異体に遺伝子導入した。また、同じ遺伝子コンストラクトをシロイヌナズナの *vtc1* 変異体にも導入し、FLAG-VTC1 が機能的であるかを確認した。



(2) FLAG-VTC1 タンパク質量の定量

FLAG-VTC1 タンパク質量は、ウェスタンブロッティングにより調べた。シロイヌナズナの野生型または変異体から抽出した可溶性タンパク質を SDS-PAGE により電気泳動し、PVDF 膜に転写した。その後、抗 FLAG 抗体により、FLAG-VTC1 を検出し、シグナル強度から相対的な FLAG-VTC1 タンパク質の蓄積量を算出した。

(3) 明暗による VTC1 蓄積量の変化の解析

FLAG-VTC1 が発現する野生型植物 (WT) と *kjc1* 変異体を準備し、それぞれ最初は連続光下で育成した。その後、それぞれを明所と暗所の処理区に分け、FLAG-VTC1 の蓄積量をウェスタンブロッティングにより調べた。

(4) ゲルろ過クロマトグラフィーによる VTC1 複合体の解析

FLAG-VTC1 を含む可溶性タンパク質を多量に準備し、Sephacryl S-200 を充填したカラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行った。フラクションコレクターにより分子量別に分離し、各画分の GDP-Man 合成活性とタンパク質濃度を調べた。また、ウェスタンブロッティングにより、FLAG-VTC1 の量も調べた。

(5) *vtc1* 変異体と *kjc1* 変異体におけるグルコマンナン合成

vtc1 変異体や *kjc1* 変異体で GDP-Man 合成異常が起きていることを検証するために、これらの変異体のグルコマンナン量を調べた。この実験では、グルコマンナン (正確にはガラクトグルコマンナン) が比較的多い種子ムシレージを調べる対象とした。種子ムシレージ中のグルコマンナンをマンナーゼで特異的に分解し、生じたオリゴ糖を蛍光標識し、HPLC で検出・定量した。

4. 研究成果

(1) FLAG-VTC1 の機能性

vtc1 変異体に FLAG-VTC1 遺伝子を導入し、*vtc1* 変異が相補されるかを調べた。*vtc1* 変異体では、GDP-マンノース合成活性が野生型植物の 8% に低下していたが、作出した 3 ラインは活性が WT 植物の 80~141% に増加していた。また、ビタミン C レベルも同様に、37% から 83~112% に回復していた。これらの結果から、N 末端に FLAG を付加した FLAG-VTC1 がシロイヌナズナ生体内で機能的であることが確認できた。

(2) *kjc1* 変異体における FLAG-VTC1 タンパク質蓄積量の低下

すでに、*kjc1* 変異が VTC1 の遺伝子発現を低下させないことがわかっており (図 3A)、KJC1 はタンパク質レベルで VTC1 の活性に影響していることは予想されていた。また、KJC1 と VTC1 は複合体を形成することもこれまでにに行った研究でわかっていた (Sawake et al., 2015, Plant Cell)。本研究では、KJC1 が VTC1 を直接的に活性上昇させる以外に、植物生体内で安定性にも寄与するとの仮説に基づき、本実験を行った。FLAG-VTC1 タンパク質の蓄積量は、*kjc1* 変異体で 1 割以下に低下しており (図 3B) KJC1 が VTC1 タンパク質の安定性向上に寄与することが示された。*kjc2* 変異体でも同様の解析を行ったが、*kjc1* 変異体ほどの蓄積量の変化はみられなかった。この結果は、KJC2 が遺伝子発現レベルの低いマイナーアイソフォームであることとも一致した。

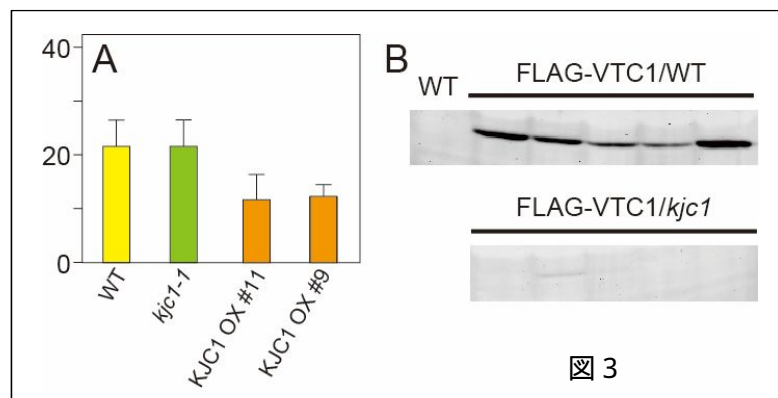


図 3

(3) 明暗による VTC1 蓄積量の変化

明所と暗所で育成した WT を比較したところ、暗所では FLAG-VTC1 は顕著に少なくなっていた。明暗条件によりビタミン C 蓄積量が変化することが知られており、この変化に VTC1 のタンパク質レベルの蓄積量制御が関与する可能性が示唆された。*kjc1* 変異体でも同様の解析を行ったが、いずれの条件下でも FLAG-VTC1 は極めて少なかった。この結果は、KJC1 は明所だけでなく、暗所でも VTC1 の分解を抑制している可能性を示している。

(4) *kjc1* 変異の VTC1 複合体への影響

WT から抽出した FLAG-VTC1 複合体は、ゲルろ過クロマトグラフィーで VTC1 単独の分子量よりも高分子の画分で検出され、植物生体内で複合体を形成していることがわかった。また、高い GDP-Man 合成活性がみられた画分は FLAG-VTC1 の溶出画分と一致しており、FLAG-VTC1 はネイティブの VTC1 と同様の複合体を形成していることも確認された。一方で、*kjc1* 変異体から抽出した FLAG-VTC1 はほとんど検出できず、いずれの画分もほとんど GDP-Man 合成活性を示さなかった。この結果は、KJC1 の欠損により、本来形成される複合体が形成されずに、VTC1 が分解されたことを示している。

(5) GDP-Man 合成における VTC1 と KJC1 の重要性

KJC1 の欠損や VTC1 の部分的な欠損が GDP-Man 合成に与える影響を種子ムシレージ中のグルコマンナン量から調べた。種子ムシレージには、Glc と Man が交互に配列する特殊なグルコマンナンが存在するため、これをマンナーゼで GlcMan の 2 糖に分解し、HPLC で定量した。*kjc1* 変異体や *vtc1* 変異体では、グルコマンナン量が大きく減少しており、KJC1 や VTC1 が GDP-Man 合成に寄与することを確認できた。この実験結果は論文発表した (Nishigaki et al., 2021; *Physiol. Plant.*)

< 引用文献 >

Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N, Last RL (1999) Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *P Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4198-4203.

Kavkova E, Blöchl C, Tenhaken R (2019) The myo-inositol converting pathway via glucuronic acid does not contribute to ascorbic acid synthesis in Arabidopsis. *Plant Biology (Stuttg) Suppl* 1: 95-102.

Nishigaki N, Yoshimi Y, Kuki H, Kunieda T, Hara-Nishimura I, Tsumuraya Y, Takahashi D, Dupree P, Kotake T. (2021) Galactoglucomannan structure of Arabidopsis seed-coat mucilage in GDP-mannose synthesis impaired mutants. *Physiologia Plantarum* 173:1244-1252.

Sawake S, Tajima N, Mortimer JC, Lao J, Ishikawa T, Yu X, Yamanashi Y, Yoshimi Y, Kawai-Yamada M, Dupree P, Tsumuraya Y, Kotake T (2015) KONJAC1 and 2 Are Key Factors for GDP-Mannose Generation and Affect l-Ascorbic Acid and Glucomannan Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 27: 3397-3409.

Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 393: 365-369.

Zheng L, Liu Z, Wang Y, Yang F, Wang J, Huang W, Qin J, Tian M, Cai X, Liu X, Mo X, Gao N, Jia D (2021) Cryo-EM structures of human GMPPA-GMPPB complex reveal how cells maintain GDP-mannose homeostasis. *Nature Structural & Molecular Biology* 28: 1-12.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsumuraya Yoichi, Ozeki Eri, Ooki Yoriko, Yoshimi Yoshihisa, Hashizume Kohjiro, Kotake Toshihisa	4. 巻 485
2. 論文標題 Properties of arabinogalactan-proteins in European pear (<i>Pyrus communis</i> L.) fruits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 107816 ~ 107816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carres.2019.107816	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 -

1. 著者名 Nishigaki Naho, Yoshimi Yoshihisa, Kuki Hiroaki, Kunieda Tadashi, Hara Nishimura Ikuko, Tsumuraya Yoichi, Takahashi Daisuke, Dupree Paul, Kotake Toshihisa	4. 巻 173
2. 論文標題 Galactoglucomannan structure of Arabidopsis seed coat mucilage in GDP mannose synthesis impaired mutants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 1244 ~ 1252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ppl.13519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿部桃太、宮川萌、西垣南歩、山梨優貴子、空屋公介、円谷陽一、高橋大輔、小竹敬久
2. 発表標題 KONJACタンパク質がビタミンC合成に与える影響
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅澤輝、曳田優、松村理奈、西垣南歩、高橋大輔、円谷陽一、小竹敬久
2. 発表標題 UDP-L-アラビノース合成系の起源とその生理的役割の解明
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西垣南歩、吉見圭永、國枝正、高橋大輔、円谷陽一、小竹敬久
2. 発表標題 KONJAC1タンパク質のグルコマンナン合成における役割
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅澤輝、中澤小夏、伏信進矢、西垣南歩、円谷陽一、高橋大輔、小竹敬久
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける二つ目のUDP-L-アラビノース合成経路
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅澤輝、松村理奈、曳田優、高橋大輔、円谷陽一、小竹敬久
2. 発表標題 二機能性UDP-グルコース4-エピメラーゼの性状と生理的役割
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 Kotake Toshihisa, Yoshimi Yoshihisa, Hara Katsuya, Tanaka Nobukazu, Higaki Takumi, Tsumuraya Yoichi
2. 発表標題 Fungal glycoside hydrolases as tools for functional analysis of type II AGs
3. 学会等名 The 15th Cell Wall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部 桃太, 山梨 優貴子, 西垣 南歩, 空屋 公介, 円谷 陽一, 小竹 敬久
2. 発表標題 GDP-マンノース合成におけるKONJACタンパク質の役割
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西垣南歩, Yeh Chuan-Ming, Tsai Wen-Chieh, 円谷陽一, 高橋大輔, 小竹敬久
2. 発表標題 グルコマンナンの修飾に関わるランの遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮川萌, 高橋大輔, 小竹敬久
2. 発表標題 KONJAC1はVTC1の分解を抑制することでL-アスコルビン酸含量に影響する
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021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
---------	---------