

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22284

研究課題名（和文）果実におけるアスコルビン酸高蓄積の分子機構に迫る

研究課題名（英文）Molecular mechanism of high vitamin C accumulation in fruits

研究代表者

石川 孝博（Ishikawa, Takahiro）

島根大学・学術研究院農生命科学系・教授

研究者番号：60285385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：一般に植物果実には多くのアスコルビン酸（ASC）が含まれており、その濃度は全可溶性糖質の約10%にも達し、我々ヒトにとっては重要なビタミンCの供給源となっている。しかし、果実になぜASCが高濃度に蓄積するのか、その機構や生理的意義は全く未解明の問題である。本研究では、成熟果実では未確定のD-ガラクトuron酸（D-GalUA）を介したASC生合成経路の誘導・活性化にあるとの我々の予測に基づき、トマトD-GalUA還元酵素の解析を進めた。その結果、SIAKR1がD-GalUA還元活性に関わる新規酵素タンパク質であるとの強い可能性を示唆する成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果実にビタミンCが豊富に含まれていることは一般によく知られていることであるが、なぜ、どのようにして蓄積しているのか？その機構は良くわかっていない。本研究では、植物で遺伝的に未確定のD-GalUA経路の関与を実験的に予測し、その代謝に関わる酵素としてD-GalUA還元酵素の候補遺伝子（SIAKR）を得た。本成果は学術的に新規の知見であるとともに、今後SIAKRの機能解析を進めることで、上記の謎を解き明かすとともに、社会的には高ビタミンC果実の育種に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：In general, plant fruits contain large amounts of ascorbic acid, with concentrations reaching as high as 10% of total soluble carbohydrates, and are an important source of vitamin C for us humans. However, the mechanism and physiological significance of why ascorbic acid accumulates in high concentrations in fruits is a completely unexplored question. Based on our previous study that the ASC biosynthetic pathway is induced and activated via D-galacturonic acid (D-GalUA), which has not yet been determined in mature fruit, we proceeded to analyze tomato D-GalUA reductase. The results of this study suggest a strong possibility that SIAKR1 is a novel enzyme protein involved in D-GalUA reduction activity.

研究分野：応用生物化学

キーワード：アスコルビン酸 果実 ガラクトuron酸経路 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、藻類や植物を含めた光合成生物を対象にアスコルビン酸の生合成およびその調節機構に関する研究を進めてきた。その成果として、植物のアスコルビン酸は光合成組織の葉において、D-マンノース(D-Man)とL-ガラクトース(L-Gal)の誘導体を代謝中間体とする D-Man/L-Gal 経路により生合成されることを明らかにしてきた。またユーグレナなど一部の微細藻類では陸上植物とは異なり、D-ガラクトン酸(D-GalUA)を代謝中間体とする経路により生合成していることを分子遺伝学的に証明してきた。さらに最近では、陸上植物においても D-Man/L-Gal 経路以外に D-GalUA 経路が関与している可能性について、トマト果実から、D-GalUA 経路の鍵酵素である D-GalUA 還元酵素およびアルドノラクトナーゼの酵素活性および代謝物レベルで示してきた (J.Exp.Bot., 63:229-239, 2012)。しかしながら、これらの酵素についてタンパク質および遺伝子レベルでの単離および分子生理学レベルでの証明には至っていない。

2. 研究の目的

一般に植物果実には多くのアスコルビン酸が含まれており、その濃度は全可溶性糖質の 10% にも達し、我々ヒトにとっては重要なビタミン C の供給源となっている。しかし、果実になぜアスコルビン酸が高濃度に蓄積するのか、その機構や生理的意義は全く未解明の問題である。研究代表らはトマト果実を用いたこれまでの研究から、1) 果実形成初期段階ではソース器官の葉において合成されたアスコルビン酸の転流、さらに 2) 成熟期では植物で未確定のウロン酸(D-GalUA)を介した合成経路の誘導・活性化、がアスコルビン酸高濃度蓄積機構解明の鍵となる知見を得ている (J.Exp.Bot., 63:229-239, 2012)。そこで本研究では、これらの知見に基づき、「果実におけるアスコルビン酸の高濃度蓄積機構」という未知のメカニズム解明を目的に、まず足掛かりとして果実成熟期において誘導・活性化される未同定の D-GalUA 経路の鍵酵素 D-GalUA の存在について、酵素遺伝子レベルで解析を行った。

3. 研究の方法

植物はトマト *Solanum lycopersicum*. cv. "Micro-Tom"を用いた。アスコルビン酸の定量は定法に従って超高速液体クロマトグラフィーを用い、Luna 5u C18 カラムに、1%メタリン酸の移動相で、検出は UV 検出器 (SPD-20A, Shimadzu) の 254 nm で測定した。トマト果実からの粗酵素液の調整は、約 15 g の成熟トマト果実を氷冷した乳鉢で潰し、5,000 g、15 min、4°Cで遠心分離し、上清を回収した。ペレットに 50 mM acetate buffer (pH 6.0) 5 ml 加えデカンテーションにより懸濁した後、同様に遠心分離し、上清を回収し先ほどの上清と合わせた。この操作を 3 回行い、得られた上清を細胞質画分とした。ガラクトン酸還元酵素活性の測定は、10 mM D-Galacturonate および 0.2 mM NADPH を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 1 ml 中で、分光光度計を用い NADPH の 340 nm の吸光度変化 ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を測定することで求めた。タンパク質量は、Bradford 法で行った。その他の方法は常法にしたがった。遺伝子探索のための BLAST 検索は、Micro-tom データベース (Kazusa Full-length Tomato cDNA Database; Kaf Tom) を用いた ($e\text{-value} < 0.05$)。遺伝子のクローニングおよび組換え体タンパク質の発現は、大腸菌を用いて定法したがって行った。

4. 研究成果

4 - 1 トマト果実における D-ガラクトン酸経路構成酵素アルド/ケトレダクターゼ (AKR) 候補遺伝子の探索

当初、トマト果実からの D-GalUA 経路構成酵素の精製を試みたが、安定性や収量等の問題によりプロテオーム解析に供するレベルの精製には至っていない。そこで、イチゴおよびマウスで報告されている ASC 生合成関連アルド/ケトレダクターゼ (AKR) のアミノ酸配列をクエリに、トマトデータベース (Kazusa Full-length Tomato cDNA Database; Kaf Tom) を用いて BLAST 検索を行った。その結果、イチゴ AKR をクエリにしたとき 13 遺伝子、マウス AKR をクエリにしたとき 10 遺伝子が見つかった。D-GalUA 経路は、果実成熟後期にかけて機能することが示唆されるため、この経路を構成する AKR の遺伝子発現レベルも果実の成熟に伴って増加すると考えられる。そこで、すべての候補遺伝子の遺伝子発現レベルを qPCR により解析した。その結果、5 遺伝子 (SIKR1-6) について開花後 (DPA) から成熟に伴い発現量が増加する傾向が認められた (図 1)。また、AKR は果実において発現していると考えられることから、葉、根、果実における各遺伝子の発現レベルを qPCR で比較解析した。その結果、いずれの遺伝子についても果実での発現が確認された (図 1)。特に果実において発現レベルが高く、また ASC 含量が増加する成熟期において発現レベルの上昇が認められた SIKR1-3 について有力な目的とする D-GalUA 還元酵素候補であることが期待された。

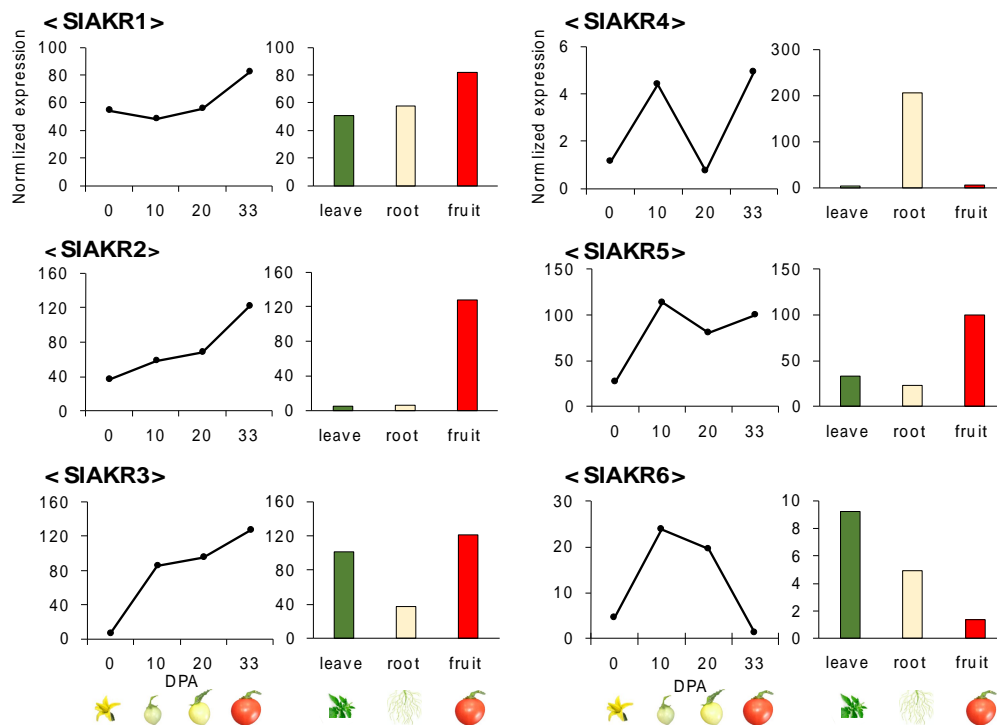


図1. トマト果実成熟段階（左）および各組織（右）における D-GalUA 還元酵素候補遺伝子(SIAKR1-6)発現レベルの検証

4 - 2 組換え体酵素による D-GalUA 還元酵素活性の評価

図1で示した6つのD-GalUA還元酵素候補遺伝子について、それらの酵素としての機能の評価するために大腸菌発現系を用いて各組換え体タンパク質を作製し、D-GalUA還元活性を評価した。その結果、組換え体SIAKR1を発現させた大腸菌の粗酵素液において、 0.08 ± 0.02 unitのD-GalUA還元活性を検出した(表1)。次に、全ての組換え体タンパク質について、Hisタグを利用してほぼ均一にまで酵素を精製後、同様にD-GalUA還元活性を評価したところ、粗抽出液で活性の検出されたSIAKR1においても、有意な活性は検出されなかった。

表1. 大腸菌組換え体酵素による各D-GalUA還元酵素活性の評価

Subject	分子量 (kDa)	粗抽出液 (unit)	精製酵素 (unit)
SIKR1	17.0	0.08 ± 0.02	N.D.
SIKR2	38.2	N.D.	N.D.
SIKR3	38.2	N.D.	N.D.
SIKR4	38.2	N.D.	N.D.
SIKR5	34.7	N.D.	N.D.
SIKR6	35.6	N.D.	N.D.

1 unit = 1 μ mol/min/mg protein, N.D. = Not determined

SIKR1の推定アミノ酸配列から計算される分子量は17.0 kDaであり、これは既知のAKR分子の約半分程度の小さな分子である。アライメント解析の結果よりSIAKR1の一次構造は、一般的にAKRで必須とされている補酵素結合残基および基質結合残基が一部しか保存されていない。

したがって、SIAKR1 は単独では D-GalUA 還元酵素活性を持たない可能性が強く示唆された。しかし、組換え体 SIAKR1 を発現した大腸菌の粗抽出液において有意な D-GalUA 還元活性が検出できた事実から、この活性を再検証するため図 2 に示す実験を実施した。すなわち、組換え体 SIAKR1 を発現した大腸菌および空ベクターを導入したコントロール大腸菌からそれぞれ粗酵素液を調整し、組換え体 SIAKR1 発現大腸菌の粗酵素液 (Frc.1)、空ベクター導入大腸菌の粗酵素液 (Frc.2)、空ベクター導入大腸菌の粗酵素液 + 精製した組換え体 SIAKR1 を混合 (Frc.3)、空ベクター導入大腸菌の粗酵素液 + 熱処理後の精製組換え体 SIAKR1 を混合 (Frc.4) の各画分について、D-GalUA 還元活性を評価した。

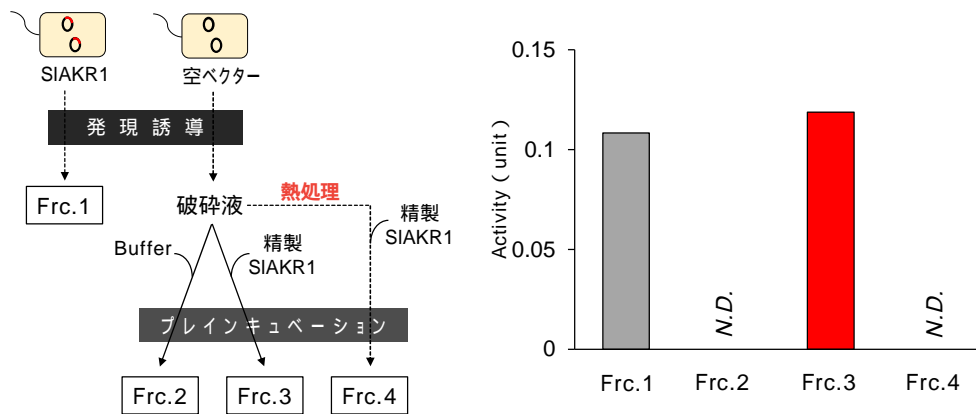


図 4 . 組換え体 SIAKR1 における D-GalUA 還元酵素活性の検証 . (左) 実験の手順 . (右) D-GalUA 還元活性 . 1unit = 1 μ mol/min/mg protein

その結果、予測した通り組換え体 SIAKR1 は単独では D-GalUA 還元活性を示さなかったが、大腸菌粗酵素液と混合することで D-GalUA 還元活性を発現することが示された。したがって、SIAKR1 は、何らかのタンパク質と相互作用することで成熟型の D-GalUA 還元酵素として機能することが示唆された。

現在、トマト果実における SIAKR1 相互作用タンパク質について、細胞生物学的手法を駆使して探索を進めると同時に、同酵素遺伝子発現抑制による ASC 生合成におよぼす影響を検討している。今回得られた SIAKR1 のような AKR ファミリーは、植物以外に他の生物界を見渡してもこれまでに報告はないことから、本酵素は新規酵素である可能性が高い。SIAKR1 の生理機能が明らかになることで、今後、トマト果実の成熟に伴った ASC 生合成調節に関する新たな知見を得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Terai, Y., Ueno, H., Ogawa, T., Sawa, Y., Miyagi, A., Kawai-Yamada, M., Ishikawa, T., Maruta, T.	4. 巻 183
2. 論文標題 Dehydroascorbate reductases and glutathione set a threshold for high light-induced ascorbate accumulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 112-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2019.118563	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 -

1. 著者名 石川孝博	4. 巻 94
2. 論文標題 植物のアスコルビン酸生合成研究の現状	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 438-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田哲也、丸田隆典、小川貴央、重岡 成、石川孝博
2. 発表標題 トマト果実におけるガラクトuron酸レダクターゼの探索
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73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
研究分担者	丸田 隆典 (Maruta Takanori) (50607439)	島根大学・学術研究院農生命科学系・教授 (15201)	

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
---------	---------