

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380207

研究課題名（和文） 光合成生物におけるアスコルビン酸合成経路の多様性と調節機構の解明

研究課題名（英文） Diversity and regulation of ascorbate biosynthesis in photosynthetic organisms

研究代表者

石川 孝博（ISHIKAWA TAKAHIRO）

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60285385

研究成果の概要（和文）：植物のアスコルビン酸（AsA）合成経路とその調節機構について遺伝子・タンパク質レベルで解析した。ヒメツリガネゴケには D-マンノース/L-ガラクトース経路およびD-ガラクトツロン酸経路が存在し、アルドノラク トナーゼが AsA 合成調節に関与することを明らかにした。トマト果実では、D-ガラクトツロン酸経路が成熟段階後期の AsA 合成に寄与することを示した。またシロイヌナズナ葉では、VTC2 が転写およびタンパク質レベルで AsA 合成の光調節に関わることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Ascorbate biosynthesis pathway and its regulation mechanism have been studied in photosynthesis organisms. A moss, *Physcomitrella patens*, possesses both D-mannose/L-galactose pathway and D-galacturonate pathway, and an identification of aldono-lactonase reveals that the enzyme plays a role in regulation of ascorbate level in the moss. It has also revealed that the alternative D-galacturonate pathway contributes to ascorbate accumulation in ripened tomato fruits. In *Arabidopsis* leaves, VTC2, one of the components of D-mannose/L-galactose pathway, plays a central role in light regulation of ascorbate via transcriptional and post-translational control.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：光合成生物・アスコルビン酸合成・光調節

## 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトにとってビタミンC（アスコルビン酸：AsA）は必須栄養素のひとつであるが、その重要な供給源となる植物など光合成生物の AsA 合成経路は長らく未解明であった。植物の AsA 合成経路は、1998 年に D-マン

ノース（Man）および L-ガラクトース（Gal）を代謝中間体とする Man/Gal 経路が提唱されて以来、国内外多くの研究グループにより当該経路の解析が進められてきた。研究代表者は、これまで同経路に関わる酵素遺伝子解析を進め、Man/Gal 経路上最後まで未同定であった GDP-L-ガラクトースフォスホリラー

ゼ (VTC2/VTC5) をシロイヌナズナから初めて同定し、植物 AsA 生合成経路の全貌を初めて解明するとともに、その遺伝子破壊株の解析から Man/Gal 経路が植物 AsA 生合成の主要経路であることを証明した。さらに緑藻ユーグレナのアルドノラクトナーゼの解析から、ユーグレナは、植物とは異なり D-ガラクトツロン酸を代謝中間体とする経路により AsA を生合成することを初めて明らかにした。これら一連の結果とデータベース解析に基づき、光合成生物の AsA 生合成経路は Man/Gal 経路のみを持つグループ (高等植物)、D-ガラクトツロン酸経路のみのグループ (緑藻・珪藻類)、さらに両経路を併せ持つグループ (ピコ藻類およびコケ類) の三群に分類されることを提唱してきた。光合成生物の AsA 生合成経路が解明された今、当該分野における最重要課題のひとつは、「なぜ光合成生物が AsA をたくさん含むことができるのか？」その調節の分子機構を明らかにすることである。

## 2. 研究の目的

光合成生物の AsA 生合成は光による調節を受けることが知られているが、その分子機構は未知の領域である。前項の背景を受け、本研究課題では、1) 光合成生物における AsA 生合成経路多様性の解明：ヒメツリガネゴケをモデルに同植物の持つ Man/Gal 経路およびガラクトツロン酸経路上の相同遺伝子を解析し、AsA 生合成経路多様性の生理的意義を明らかにすること、2) 植物 AsA 生合成調節の分子機構解明：シロイヌナズナの VTC2/VTC5 遺伝子のプロモーターおよびタンパク質の解析を行い、葉組織における AsA 生合成の光調節機構を解明するとともに、トマト果実 (Micro-Tom) における AsA 蓄積機構を明らかにすること、3) 新規 AsA 生合成調節変異体の解析：現在まで機能未知のシロイヌナズナ *vtc3* 変異体の解析を進めるとともに、ヒメツリガネゴケの同相同遺伝子破壊株を用いてプロテオミクス解析を行うことで生合成調節の分子機構を明らかにすること、を目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

実験材料には、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、トマト (*Lycopersicon esculentum*, 'Micro-Tom') を用いた。それぞれの栽培条件は、既報の文献に従った。

### (2) アスコルビン酸定量法

定法に従い、ビピリジル法もしくは C18 カ

ラム (Imtakt, *Scherzo* SM, 15 X 2 mm) を用いて LC-MS (Shimadzu) により検出した。移動層には 0.1%ギ酸を含む 5%アセトニトリル溶液を用いた。検出はネガティブモードで行い、酸化型アスコルビン酸の還元には TCEP を用いた。

### (3) プロモーター活性の評価法

VTC2 および VTC5 遺伝子のプロモーター活性は、ルミノイメーリアライザー (ImageEM, Hamamatsu) を用いて、ルシフェラーゼ (LUC) 活性により評価した。

### (4) プロテオミクス解析

シロイヌナズナ *vtc3* 変異体およびヒメツリガネゴケ同相同遺伝子破壊株について、光照射前後のサンプルからタンパク質抽出を行い、二次元電気泳動後、銀染色もしくは ProQ ダイヤモンドによりリン酸化タンパク質を検出した。得られたタンパク質スポットはプロテアーゼによる gel 内消化の後 MALDI-ToF/MS (MALDI SYNAPT G2 HDMS, Waters) により解析した。配列の同定には Mascot データベースを用いた。

### (5) 分子生物学実験

mRNA やゲノム DNA の抽出、PCR や遺伝子クローニング、植物への形質転換、定量的 PCR など分子生物学手法については定法にしたがって行った。

## 4. 研究成果

### (1) 光合成生物における AsA 生合成経路多様性の解明：

研究代表者のこれまでの研究から、ヒメツリガネゴケには Man/Gal 経路と D-ガラクトツロン酸経路の 2 つの AsA 生合成経路が存在する可能性が示唆されていた。そこで、初めにヒメツリガネゴケの AsA 生合成経路を明らかにするため、L-ガラクトースおよび D-ガラクトツロン酸を各 5 mM 濃度で添加した結果、原糸体と茎葉体でいずれも AsA の増加が観察された。また、L-ガラクトース脱水素酵素活性、D-ガラクトツロン酸還元酵素活性およびラクトナーゼ (ALase) 活性が測定できたことから、ヒメツリガネゴケには両経路が生理的に機能していることが強く支持された。そこで次に、ヒメツリガネゴケゲノムデータベースより、D-ガラクトツロン酸経路の構成酵素 ALase の相同遺伝子を 2 つ見出し (ALase-1 および ALase-2)、これらの組換え体酵素を用いて触媒活性を評価した結果、ALase-1 がドミナントな機能酵素であることを支持する結果を得た。そこでさらにヒメツリガネゴケ ALase の生理機能を明らかにするため、相同組換えにより ALase-1 破壊株 (ALase-1\_KO) を作製した (図 1)。RT-PCR および ALase 活性

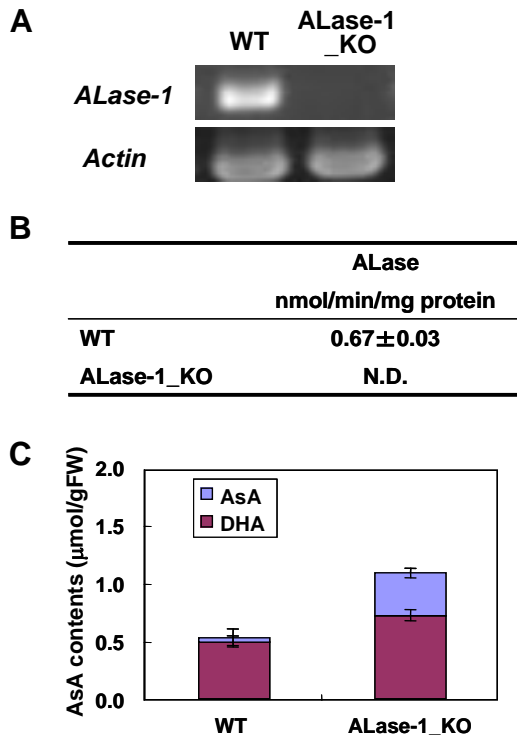


図1. ヒメツリガネゴケ ALase-1\_KO 株の作製。A, RT-PCR による発現確認; B, ALase-1\_KO における ALase 活性; C, 原系体における AsA 含量の比較。AsA, 還元型 AsA; DHA, 酸化型 AsA

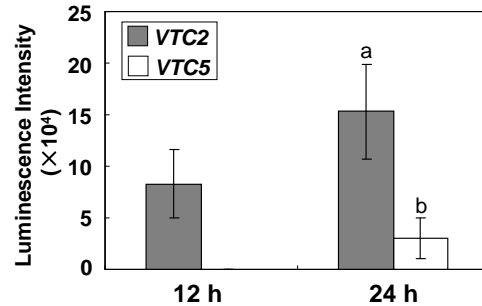
の測定結果より、ALase-1\_KO 株であることを確認した (図 1 A, 1 B)。ALase-1\_KO 原系体の AsA 量を測定した結果、還元型 AsA と酸化型 AsA (DHA) を合わせた総 AsA レベルで、約 2 倍に増加していることが認められた。この原因について、さまざまな検討を行った結果、AsA 生合成の最終段階を触媒する L-ガラクトノ-1,4-ラクトン (L-GalL) 脱水素酵素および酸化型 AsA 還元酵素活性が亢進していた。ALase は L-GalL および DHA に対して加水分解活性も有することから、ALase はこれらの代謝物量をコントロールすることで AsA プールサイズの制御に関連していることが示唆された。

(2) 植物アスコルビン酸生合成調節の分子機構解明:

緑葉の AsA レベルは日周変動性を示し、明暗および光強度に応じて増減する。これまでのシロイヌナズナを用いた解析から、Man/Gal 経路を構成する 8 遺伝子のうち、GDP-L-Gal フォスホリラーゼをコードする VTC2 遺伝子が最も顕著な光応答性を示すことを明らかにしている。そこで VTC2 遺伝子およびそのパラログの VTC5 遺伝子について、光応答性および細胞内局在性について検討

を行った。VTC2 および VTC5 遺伝子のプロモーター領域を単離し、ルシフェラーゼ (LUC) との融合遺伝子を作製し、シロイヌナズナに形質転換した。その結果、VTC2 および VTC5 遺伝子の光応答性が LUC 活性によって再現されることを確認するとともに、VTC5 のプロモーター活性は、VTC2 よりも低いことから、AsA 生合成の光制御には VTC2 が優先的に機能していることが示唆された (図 2)。また VTC2 の欠失プロモータ

A. Low light (15 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)



B. High light (300 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)

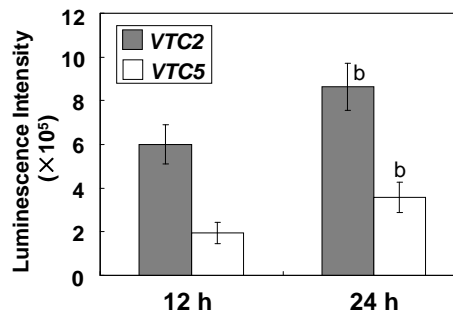


図2. シロイヌナズナ VTC2 および VTC5 遺伝子のプロモーターの光応答性。一解析から、光応答性のシスエレメントは -40~-70 の領域に存在することが予測された。また VTC2 と GFP の融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナの解析から、暗条件では核にのみ GFP 蛍光が観察されるのに対し、光条件下では核と細胞質に蛍光が観察されることから、VTC2 はタンパク質レベルでも、明暗条件により細胞内局在性を変化させることで AsA 生合成調節に関与していることが示唆された (図 3)。

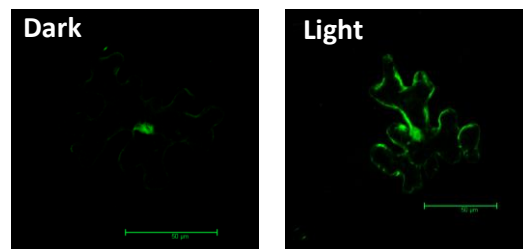


図3. VTC2 と GFP 融合タンパク質による細胞内局在性と光条件の関係。

さらに果実の AsA 生合成調節のメカニズムを明らかにするため、トマト果実をモデルに AsA レベルと生合成との関連について調べた。Man/Gal 経路構成酵素遺伝子の発現レベル、14CAsA による転流実験などさまざまな解析の結果、成熟段階に応じて増加する果実の AsA レベルの調節について、果実成熟初期段階 (IMG、MG) では Man/Gal 経路および葉からの AsA の転流が関与しているが、AsA 量が最大となる果実成熟後期 (RD) においては、D-ガラクトロン酸経路が誘導され AsA 生合成に寄与してことが示唆された (図 4)。

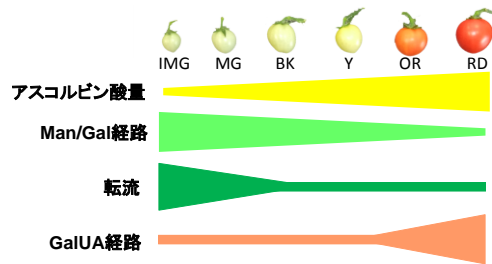


図 4. Micro-Tom 果実の成熟段階における AsA レベルの変動と AsA 生合成経路との関連のまとめ。

Man/Gal 経路, D-マンノース/L-ガラクトース経路; GalUA 経路, D-ガラクトロン酸経路

果実細胞壁の構成多糖ペクチンを D-ガラクトロン酸の前駆物質となることから、軟化により細胞壁構成多糖の再構成が盛んになる果実成熟後期において D-ガラクトロン酸経路が機能するのではないかと考えられる。

(3) 新規アスコルビン酸生合成調節変異体の解析:

新規 AsA 生合成変異体シロイヌナズナ *vtc3* の機能解析を行った。また、ヒメツリガネゴケゲノムにも *VTC3* オルソログが存在することから、相同組換えの手法により同遺伝子の破壊株 ( $\Delta VTC3-6$ ) を作製した (図 5)。

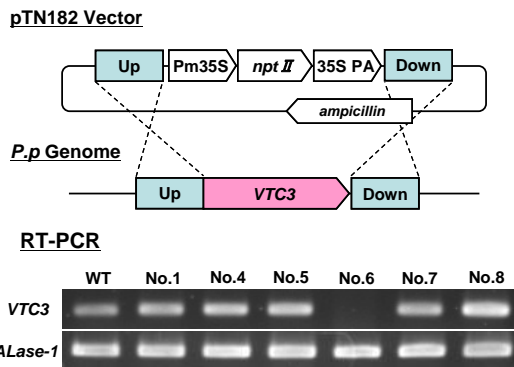


図 5. ヒメツリガネゴケ *VTC3* 破壊株の作製。No. 6 株を  $\Delta VTC3-6$  とした。

シロイヌナズナ *vtc3* およびヒメツリガネゴケ  $\Delta VTC3-6$  ともに AsA レベルは野生株の約 50% に低下していること、また AsA のレベルの日周変動性が喪失していることが明らかになった (図 6)。これまでの研究代表者らの解析から *VTC3* はタンパク質リン酸化に関与する因子であることが推測されている。

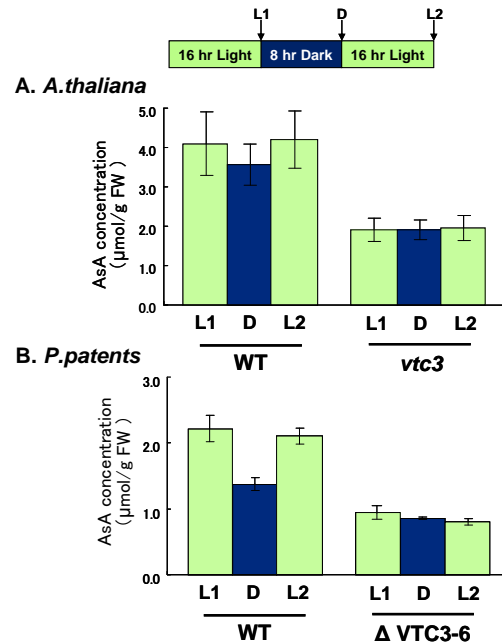


図 6. シロイヌナズナ *vtc3* 変異体とヒメツリガネゴケ  $\Delta VTC3-6$  は AsA レベルの光応答性が消失している。

そこで、暗適もしくは光照射したシロイヌナズナ *vtc3* およびヒメツリガネゴケ  $\Delta VTC3-6$  よりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動でタンパク質を分離後、銀染色または ProQ 染色を行い、野生株と発現量に変化のあるタンパク質の検出を試みた (図 7)。その結果、

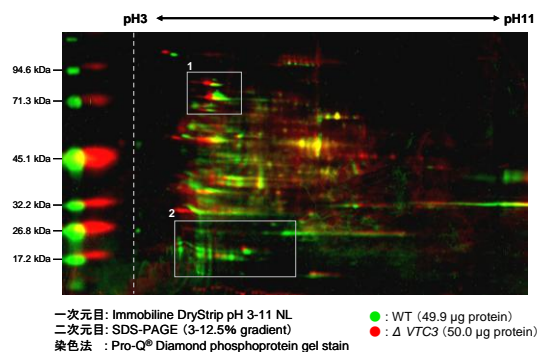


図 7. 二次元電気泳動結果の一例。図は光照射後のヒメツリガネゴケ野生株 (緑) と  $\Delta VTC3-6$  (赤) の ProQ 染色の結果を重ね合わせている。

変異体で発現レベルの変動やリン酸化修飾

状態に違いが認められるタンパク質が多数存在することが明らかになった。これらのタンパク質の詳細とAsA生合成との関連については現在解析中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Gao, Y., Badejo, A. A., Sawa, Y., Ishikawa, T. Analysis of two L-galactono-1,4-lactone responsive genes with complementary expression during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 査読有, Vol. 53, 2012, 592-601, doi:10.1093/pcp/pcs014
2. Badejo, A. A., Wada, K., Gao, Y., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., Ishikawa, T. Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *J. Exp. Bot.*, 査読有, Vol. 63, 2012, 229-239, doi:10.1093/jxb/err275
3. 石川孝博、光合成生物におけるアスコルビン酸生合成研究の新展開。生化学, 査読有, 83 巻, 2011, pp838-841, <http://www.soc.nii.ac.jp/jbiochem/magazine/83-09-05.pdf>
4. Gao, Y., Badejo, A. A., Shibata, H., Sawa, Y., Maruta, T., Shigeoka, S., Page, M., Smirnov, N., Ishikawa, T. Expression analysis of the *VTC2* and *VTC5* genes encoding GDP-L-galactose phosphorylase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, Vol. 75, 2011, 1783-1788, doi:10.11271/bbb.110320
5. Gao, Y., Nishikawa, H., Badejo, A. A., Shibata, H., Sawa, Y., Nakagawa, T., Maruta, T., Shigeoka, S., Smirnov, N., Ishikawa, T. Expression of aspartyl protease and C3HC4-type RING zinc finger genes are responsive to ascorbic acid in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 査読有, Vol. 62, 2011, 3647-3657, doi:10.1093/jxb/err068
6. Maruta, T., Inoue, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T.,

Shigeoka, S. *Arabidopsis* NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. *Plant Sci.*, 査読有, Vol. 180, 2011, 655-660,

doi:10.1016/j.plantsci.2011.01.014

7. Maruta, T., Ichikawa, Y., Mieda, T., Takeda, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Ishikawa, T., Shigeoka, S. Contribution of *Arabidopsis* homologs of L-gulonolactone oxidase to the biosynthesis of ascorbic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, Vol. 74 2010, 1494-1497, doi:10.1271/bbb.100157
8. Ishikawa, T., Tajima, N., Nishikawa, H., Gao, Y., Rapolu, M., Shibata, H., Sawa, Y. and Shigeoka S. *Euglena gracilis* ascorbate peroxidase forms an intramolecular dimeric structure: its unique molecular characterization. *Biochem. J.*, 査読有, Vol. 426 2010, 125-134, doi:10.1042/BJ20091406

[学会発表] (計 20 件)

1. Adebajo A. Badejo, 和田慶子, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 重岡 成, 石川孝博、トマト果実におけるアスコルビン酸蓄積機構の解明、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都市・京都産業大学
2. 山本 遥, 孝田 翔, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 石川孝博、シロイヌナズナ *vtc2* 変異体におけるアスコルビン酸取込み能の評価、日本農芸化学会中四国支部第 32 回講演会、2012 年 1 月 21 日、鳥取市・鳥取大学
3. 西川 仁, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 重岡 成, 石川孝博、蘇類ヒメツリガネゴケのアスコルビン酸生合成にかかわるアルドノラクトナーゼの機能解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜市・パシフィコ横浜
4. 高 用 順, 澤 嘉弘, 石川孝博、Analysis of two DUF 642 family genes with complementary expression during the development of *Arabidopsis thaliana*, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜市・パシフィコ横浜
5. Adebajo A. Badejo, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, Shigeru Shigeoka, Takahiro Ishikawa、Unfolding the mechanism of vitamin C accumulation in ripening Micro-Tom fruits、8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome

- Joint Conference、2011年11月29日、神戸市・コンベンションセンター
6. 松原まどか, 西川 仁, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 重岡 成, 石川孝博、青色光による *Euglena* アスコルビン酸合成調節機構の検討、ユーグレナ研究会第27回研究会、2011年11月12日、春日井市・中部大学
  7. Adebajo A. Badejo, Keiko Wada, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, Shigeru Shigeoka, Takahiro Ishikawa, Regulation of ascorbate pool size in tomato fruits., The 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants、2011年7月5~8日、Budapest, Hungary.
  8. Adebajo A. Badejo, Keiko Wada, Hitoshi Shibata, Yoshihiro Sawa, Takanori Maruta, Shigeru Shigeoka, Takahiro Ishikawa, Vitamin C Biosynthesis and Translocation in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Fruits., 日本ビタミン学会第63回大会、2011年6月4日、広島市・安田女子大
  9. 原井健司, 柴田 均, 澤 嘉弘, 丸田隆典, 重岡 成, 石川孝博、シロイヌナズナビタミンC欠乏変異体 *vtc3* の機能解析。日本ビタミン学会第63回大会、2011年6月4日、広島市・安田女子大
  10. 高 用順, 増澤拓也, 澤 嘉弘, 柴田均, 丸田隆典, 重岡 成, 石川孝博、植物ビタミンC合成に関わる *VTC2/5* 遺伝子の機構解析、日本ビタミン学会第63回大会、2011年6月4日、広島市・安田女子大
  11. 高 用順, 増澤拓也, Badejo A. Adebajo, 柴田 均, 澤 嘉弘, Smirnov Nicholas, 丸田隆典, 重岡 成, 石川孝博、トマト果実におけるアスコルビン酸プールサイズ調節機構の解明、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20日、仙台市(要旨公表成立)
  12. 増澤拓也, 高 用順, 澤 嘉弘, 柴田 均, 丸田隆典, 重岡 成, 石川孝博、アスコルビン酸合成に関わるシロイヌナズナ *VTC2/5* 遺伝子の発現解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸市・コンベンションセンター
  13. 和田慶子, Badejo A. Adebajo, 澤 嘉弘, 柴田 均, 丸田隆典, 重岡 成, 石川孝博、トマト果実成熟過程におけるアスコルビン酸合成関連酵素遺伝子の発現解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月8日、(神戸市)神戸ポートアイランド
  14. 石川孝博, 西川 仁、アスコルビン酸合成に関わるヒメツリガネゴケ由来アルドノラクトナーゼ遺伝子の解析、第132回ビタミンC研究委員会、2010年7月24日、東京・お茶の水大
  15. 西川 仁, 原井健司, 澤 嘉弘, 丸田隆典, 重岡 成, 石川孝博、*ヒメツリガネゴケ* のアスコルビン酸合成に関わるアルドノラクトナーゼの機能解析、第62回日本ビタミン学会、2010年6月11日、(盛岡市)岩手県公会堂
  16. Yongshun Gao, Yoshihiro Sawa, Tsuyoshi Nakagawa, Nicholas Smirnov, Shigeru Shigeoka, Takahiro Ishikawa, Ascorbate Responsive Genes in *Arabidopsis thaliana*., 21th International Conference on Arabidopsis Research、2010年6月7日、Yokohama, Japan
  17. 有田未希, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 柴田 均, 重岡 成, 石川孝博、ヌクレオシド二リン酸キナーゼはアスコルビン酸合成の光調節に関与するか?、2010年度日本農芸化学会年会、2010年3月28日、東京駒場・東京大学
  18. 高 用順, 澤 嘉弘, 柴田 均, 中川 強, Nicholas Smirnov, 重岡 成, 石川孝博、シロイヌナズナにおけるアスコルビン酸応答遺伝子の探索、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月19日、熊本市・熊本大学
  19. 西川 仁, 松原まどか, 澤 嘉弘, 柴田均, 藪田行哲, 丸田隆典, 重岡 成, 石川孝博、ユーグレナL-ガラクトノ-1,4-ラクトン脱水素酵素の機能解析、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日、横浜市・パシフィコ横浜
  20. 西川 仁, 澤 嘉弘, 柴田 均, 藪田行哲, 丸田隆典, 重岡 成, 石川孝博、*ヒメツリガネゴケ* のアスコルビン酸合成経路の解析、第61回日本ビタミン学会、2009年5月30日、京都府亀岡市・京都学園大学
- [図書] (計1件)
- ① 石川孝博, 重岡 成: II 9. ビタミンC (9.2.2 合成経路と酸化還元系) ビタミン総合辞典(日本ビタミン学会 編集, ISBN978-4-254-10228-4) . 朝倉書店, 2010, pp395-398
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
石川 孝博 (ISHIKAWA TAKAHIRO)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 60285385