

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05382

研究課題名（和文）植物におけるビタミンB2代謝調節機構とその生理的意義の解明

研究課題名（英文）Analysis of regulatory mechanisms and physiological significance of vitamin B2 metabolism in plants

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：生物のあらゆる生理機能に必須な化合物であるビタミンB2(リボフラビン)の、植物における調節機構と輸送機構について解析を行った。その結果、我々は植物細胞内のビタミンB2量が種々の環境ストレスや植物ホルモンによって増加すること、また細胞内ビタミンB2量を変化させると植物の生育や環境ストレス耐性に影響することを見出した。さらに、植物において初めてビタミンB2輸送体の候補遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々ヒトはビタミンB2を合成できないため、植物はビタミンB2の重要な供給源の一つです。したがって、本研究によって見出した植物のビタミンB2の調節機構や輸送体の存在は、植物におけるビタミンB2の生理学的重要性を初めて明らかにしただけでなく、さらに詳細に解析を行うことで、将来的にはヒトにとって有用な植物の分子育種などへの応用が期待されます。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the regulatory and transport mechanisms of vitamin B2 (riboflavin), a compound essential for all physiological functions of living organisms, in plants. Our findings reveal that the levels of vitamin B2 in plant cells are augmented by various environmental stresses and phytohormones. Furthermore, manipulating intracellular vitamin B2 levels has been demonstrated to influence plant growth and enhance tolerance to environmental stresses. Additionally, we have identified, for the first time, candidate genes for vitamin B2 transporters in plants.

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 輸送体 環境ストレス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

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一次代謝を含む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 B<sub>12</sub>、B<sub>6</sub>、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が、その調節や輸送機構については全く不明なままである。

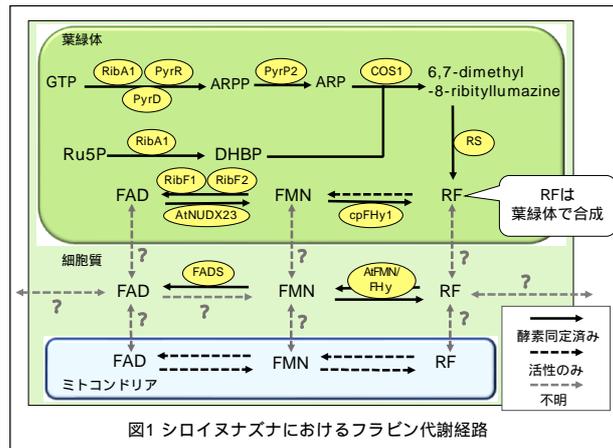


図1 シロイヌナズナにおけるフラビン代謝経路

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、転写因子関連遺伝子 (Flavin-responsive transcription factors: FRTFs) を 47 個、輸送体関連遺伝子 (Flavin-responsive transporters: FRTPs) を 17 個同定した。さらに FRTFs のシロイヌナズナ遺伝子破壊株について細胞内フラビン化合物レベルを測定した結果、種々の環境ストレス応答に關与する転写因子ファミリーに属する FRTF19 の遺伝子破壊株では、RF 合成系遺伝子群の発現と細胞内フラビン化合物レベルが低下することを見出した。一方、FRTPs に含まれていた輸送体タンパク質ファミリーについて、RF 要求性の酵母変異株を用いた相補試験を行なった結果、2 種類の候補遺伝子が RF の輸送活性を示すことを見出した。これらのことから、我々が同定した転写因子および輸送体候補遺伝子が、植物のフラビン代謝系調節やフラビン化合物輸送に關与する新規因子である可能性が極めて高いと考えられた。

2. 研究の目的

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、生命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は、我々がこれまでに同定した新規の転写因子とフラビン化合物輸送体候補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とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) フラビン化合物代謝調節に關与する新規転写因子 FRTF19 の生理機能解析

FRTF19 遺伝子破壊株および過剰発現株におけるフラビン化合物代謝系の解析

トランスクリプトーム解析および遺伝子破壊株を用いた解析により同定した FRTF19 は、植物において乾燥や低温などの様々な環境ストレス応答に關与する転写因子ファミリーに属するが、その生理機能については全く明らかになっていない。そこで FRTF19 の生理機能について詳細に解析するために、FRTF19 遺伝子破壊株に加え、FRTF19 の恒常的過剰発現株の作出し、フラビン化合物代謝系遺伝子群の発現および細胞内フラビン化合物レベルに及ぼす影響について解析を行う。さらに、FRTF19 と種々の環境ストレスとの関連性を明らかにするために、シロイヌナズナ野生株および FRTF19 遺伝子破壊株を用いて、FRTF19 およびフラビン代謝系遺伝子群の発現の

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

種々の環境ストレスに対する応答性を定量的 RT-PCR 法により解析する。また、種々の環境ストレスに対する細胞内フラビン化合物レベルの測定を行い、FRTF19 を介した環境ストレスとフラビン代謝系調節との関連性について明らかにする。

細胞内フラビン化合物代謝調節の生理的意義

上述のように FRTF19 は、環境ストレス応答に関与する転写因子ファミリーの一つであることから、植物細胞内フラビン化合物レベルが種々の環境ストレス応答に関与する可能性が考えられる。そこで、細胞内フラビン化合物が減少している FRTF19 遺伝子破壊株において、その発現量が低下していた RF 合成系遺伝子 (*RibA1*, *PyrD*, *COS1*, *RS*) の過剰発現株、細胞内フラビン化合物の増加が植物の種々のストレス感受性やストレス応答に及ぼす影響について解析を行う。

(2) フラビン化合物輸送体の生理機能解析

酵母、植物培養細胞を用いたフラビン化合物輸送活性の評価

これまでに同定した 2 種類のフラビン化合物輸送体候補について、まず酵母を用いて RF や補酵素型である FMN、FAD の取り込み活性の評価系を確立する。さらに、シロイヌナズナの緑色培養細胞である T-87 を用いて、同定した PUP 遺伝子の過剰発現細胞を作出し、植物培養細胞を用いたフラビン化合物輸送活性の評価系を確立する。

フラビン輸送体候補シロイヌナズナ PUP の生理機能解析

同定した 2 種類のフラビン化合物輸送体遺伝子について、細胞内局在性の解析、輸送体候補遺伝子の破壊株および過剰発現株を用いてその表現型、細胞内および各オルガネラにおけるフラビン化合物レベルについて詳細な解析を行い、植物におけるフラビン化合物輸送体の生理機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) フラビン化合物代謝調節に関する新規転写因子 FRTF19 の生理機能解析

FRTF19 遺伝子破壊株および過剰発現株におけるフラビン化合物代謝系の解析

シロイヌナズナ野生株および *frtf19.1* 株において、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター制御下で FRTF19 を過剰発現させた植物体を作成し、FRTF19 が高発現しているラインを 2 種類ずつ選抜した。野生株、*frtf19.1* 株および FRTF19 過剰発現株における FRTF19、RF 合成系遺伝子の発現量および細胞内フラビン化合物レベルを定量した。その結果、過剰発現株では、野生株と比較して細胞内 RF レベルが有意に増加していた。また、FRTF19 を導入した *frtf19.1* 株では、野生株と同程度まで細胞内 RF レベルが回復した。さらに、アブシジン酸 (ABA) 処理、低温ストレスおよび高温ストレス条件下における FRTF19 および RF 合成系遺伝子の発現量の解析を行なった。野生株における FRTF19 と RF 合成系遺伝子の発現は、ABA 処理および低温ストレスにより上昇し、それに伴って細胞内 RF レベルも増加した。一方、*frtf19.1* 株においては、RF 合成系遺伝子の発現および細胞内 RF レベルの増加が抑制されていた (図 2)。これらのことから FRTF19 はストレス条件下において細胞内フラビン化合物レベルの調節に関与している可能性が示唆された。このようなストレス応答性の転写因子を介したフラビンの調節機構についてはこれまでに報告されておらず、これらの成果は現在論文投稿中である。

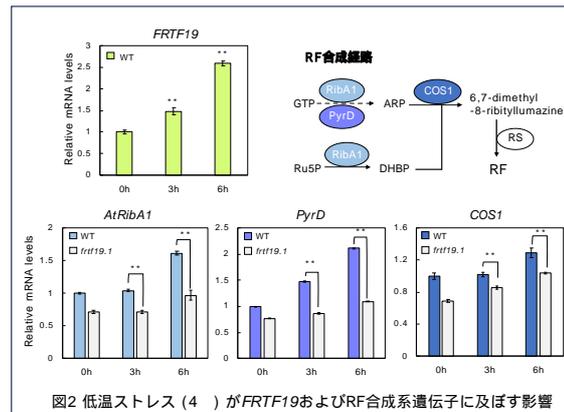


図2 低温ストレス (4 ) が FRTF19 および RF 合成系遺伝子に及ぼす影響

細胞内フラビン化合物代謝調節の生理的意義

シロイヌナズナにおける RF 合成系遺伝子 (*AtRibA1*, *PyrD*, *COS1*, *RS*) の過剰/抑制発現株を作成し、植物の細胞内フラビン化合物レベルの変化が植物体に及ぼす影響について解析を行った。作出した 4 種類の RF 合成系遺伝子過剰発現株では、それぞれコントロールと比較して約 2 倍から 50 倍の導入遺伝子の発現が確認された。また、過剰発現が確認されたいずれの株においても、コントロールの 2 倍以上の RF 蓄積が確認され、特に *AtRibA1* 過剰発現株ではコントロールの 4 倍程度の RF 蓄積が確認された。そこで次に、細胞内フラビン化合物レベルの変化と環境ストレス応答の関連性について調べるために、4 種類の RF 合成系遺伝子過剰発現株

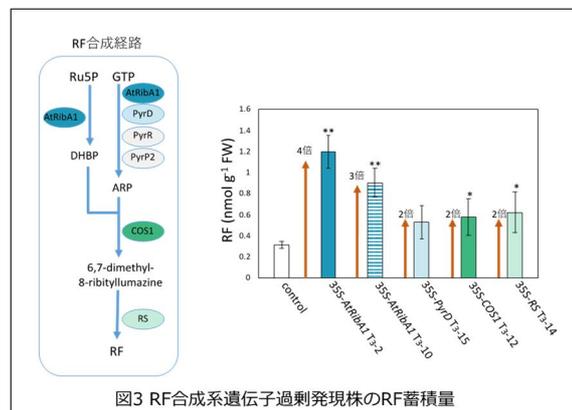


図3 RF合成系遺伝子過剰発現株のRF蓄積量

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

を用いて、環境ストレス(浸透圧ストレス、塩ストレス、酸化ストレス)感受性を評価した。その結果、*AtRibA1* 過剰発現株や *RS* 過剰発現株では浸透圧ストレスや酸化ストレス条件下においてコントロールよりも耐性を示す傾向が見られた。したがって、植物細胞内フラビン化合物レベルの増加は、植物の環境ストレス耐性の向上に寄与する可能性が示唆された。これらの成果は細胞内フラビン蓄積量変化による植物への有用形質の付与や栄養素としてのビタミン B<sub>2</sub> 高蓄積植物の分子育種などへの応用が期待される。

(2)フラビン化合物輸送体の生理機能解析

酵母、植物培養細胞を用いたフラビン化合物輸送活性の評価

2種類のフラビン化合物輸送体候補のRF取り込み活性を評価するために、両遺伝子を発現させた酵母にRFを添加し、12時間後の酵母内RF量を定量した結果、両遺伝子導入株におけるRF量は有意に増加していた。またRF添加2~6分後の酵母内RF量の定量を行った結果、候補遺伝子A導入株ではRF添加2分後から明らかな酵母内RF量の増加が認められた。一方、

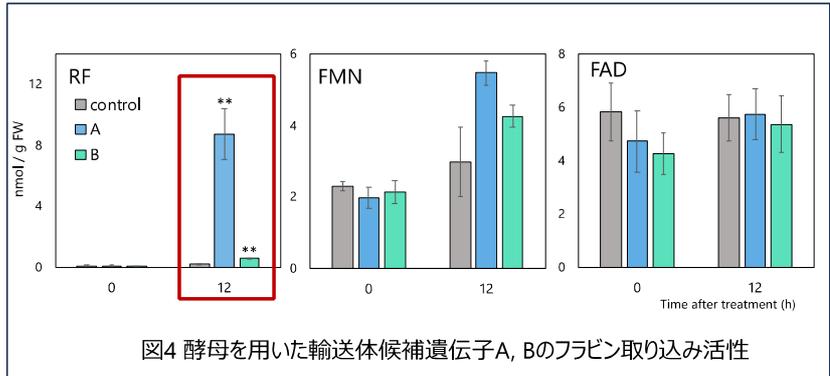


図4 酵母を用いた輸送体候補遺伝子A, Bのフラビン取り込み活性

候補遺伝子B導入株では酵母内RF量に変化は見られなかった。以上より、候補遺伝子Aは酵母においてRF輸送体として機能することが明らかとなった。さらに、シロイヌナズナ T87 培養細胞を用いて両候補遺伝子の過剰発現株を作出し、得られた過剰発現株を用いてRF取り込み活性を評価した。その結果、RF添加12時間後の候補遺伝子A過剰発現株における細胞内RF量は、コントロールと比較して約9~24倍に増加していた。さらに、同様の条件で短時間(RF添加後2, 4, 6分)でのRF取り込み活性についても評価した結果、候補遺伝子A過剰発現株においてはRF添加後2分から明らかな細胞内RF量の増加が認められた。このことから、候補遺伝子Aは植物細胞においてRF輸送体として機能することが明らかになった。

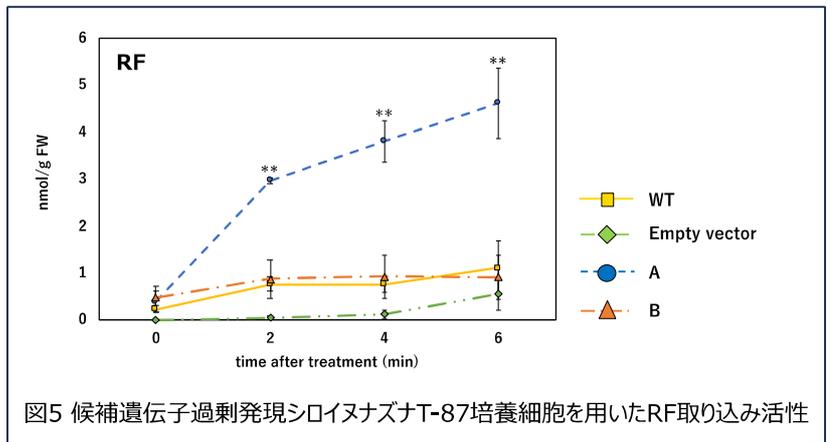


図5 候補遺伝子過剰発現シロイヌナズナT-87培養細胞を用いたRF取り込み活性

フラビン輸送体候補シロイヌナズナ PUP の生理機能解析

候補遺伝子AとGFP融合タンパク質を用いてシロイヌナズナ葉における細胞内局在性を解析した結果、候補遺伝子Aは細胞膜局在であることが明らかになった。さらに、候補遺伝子Aの組織特異的発現性を明らかにするために、プロモーターGUSアッセイを行った。その結果、候補遺伝子Aは若い茎、蕾中の柱頭、未成熟の長角果及び根において特に強く発現することが示された。これまでに、植物におけるビタミンB<sub>2</sub>の輸送体に関する知見は皆無であり、本研究で得られた成果は世界的に見ても極めて新規性が高く、植物におけるビタミンB<sub>2</sub>代謝調節において非常に重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉井天真、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 植物における細胞内フラビンの代謝調節と環境ストレス応答の関連性
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 柴田 類、桑田日佳里、丸田隆典、石川孝博、小川貴央
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるフラビン輸送体の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第67回 講演会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 杉井天真、丸田隆典、石川孝博、小川貴央
2. 発表標題 植物における細胞内フラビンレベルと環境ストレス応答の関連性
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 柴田 類、桑田日佳里、丸田隆典、石川孝博、小川貴央
2. 発表標題 植物におけるフラビン輸送体の生理機能解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 杉井天真、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 植物細胞内フラビン化合物レベルの変化が環境ストレス応答に及ぼす影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会 2022年6月 福岡（福岡大学）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑田日佳里、大福綾夏、永井文菜、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同定と機能解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会 2022年6月 福岡（福岡大学）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉井天真、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 植物における細胞内フラビン化合物レベルの調節と環境ストレス応答の関連性
3. 学会等名 第64回日本農芸化学会中四国支部例会 2023年1月 岡山（岡山県立大学）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉井天真、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 植物における細胞内フラビンレベルの変化と環境ストレス応答の関連性
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会 2023年3月 広島（広島大学）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉井天真、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 植物細胞内フラビン化合物レベルが環境ストレス応答に与える影響
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会 2023年3月 東北大学
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桑田日佳里、永井文菜、丸田隆典、石川孝博、小川貴央
2. 発表標題 植物におけるフラビン輸送体の同定と生理機能解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会 2023年3月 東北大学
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田美帆、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調節に関する新規転写因子の生理機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 中四国支部 第59回講演会：広島大学 東広島キャンパス（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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 シロイヌナズナNudix hydrolaseによる細胞内ピリジンヌクレオチド代謝の生理的意義
3. 学会等名 日本農芸化学会 中四国支部 第59回講演会：広島大学 東広島キャンパス（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑田日佳里、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 植物におけるフラビン輸送体の探索と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 中四国支部 第59回講演会：広島大学 東広島キャンパス（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田美帆、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調節に関する新規転写因子の生理機能解析
3. 学会等名 第73回日本ビタミン学会大会：東京（WEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田美帆、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 シロイヌナズナのフラビン代謝調節に関する新規転写因子の生理機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度京都大会：京都（オンライン開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 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 シロイヌナズナNudix hydrolase によるピリジンスクレオチド代謝の生理的意義
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会：筑波（オンライン開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑田日佳里、杉本琢隼、大福綾夏、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と生理機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会：筑波（オンライン開催）
4. 発表年 2022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
---------	---------