

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658110

研究課題名（和文）植物アスコルビン酸輸送機構解明のための分子遺伝学的アプローチ

研究課題名（英文）Molecular genetic analysis of ascorbate transport in plants

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）：植物アスコルビン酸（AsA）輸送機構解明のため、シロイヌナズナ AsA 輸送変異体の探索を試みた。変異原処理をした AsA 欠乏 *vtc* 変異体に対し、非光化学的消光 (NPQ) および組織染色による探索の結果、2つの新規変異体候補を得た。また、マイクロアレーおよびプロテオミクスデータに基づいて予測した遺伝子について、T-DNA 挿入変異体の AsA 取込み能および NPQ を評価した結果、少なくとも2つの遺伝子に可能性のあることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Screening of novel Arabidopsis mutants was carried out to identify ascorbate transport mechanism in plants. Two possibilities have finally obtained among approx. 8,000 EMS-treated M2 Arabidopsis *vtc* seeds based on a high-throughput screening by a combination of non-photochemical quenching (NPQ) measurement and histochemical staining with silver nitrate. In addition, based on data from *in silico* prediction and practical evaluation of ascorbate up-take activity in Arabidopsis T-DNA inserted mutants, it has indicated that at least two genes have a possibility to be the target gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	0	2,500,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	180,000	3,280,000

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：植物・アスコルビン酸輸送

1. 研究開始当初の背景

植物は細胞内に mM オーダーの高濃度でアスコルビン酸（AsA）を含んでいる。研究代表者はこれまでに、シロイヌナズナから初めて AsA 生合成主要経路の同定に成功するとともに、藻類を含めた AsA 生合成経路の解明に貢献してきた。生合成経路の解明に続き、当

該分野で未解決の最大の問題のひとつは組織間および細胞内における AsA 輸送機構の解明である。Franceschi らはシロイヌナズナやタルウマゴヤシに対する ^{14}C 標識 AsA を用いたトレーサー実験により、ソース器官（葉）からシンク器官（根や果実）への AsA 輸送機構の存在を証明している。また葉緑体には数十～数百 mM の高濃度に AsA を含むことから

細胞質からの能動輸送系の存在も明かである。これに関してはハウレンソウ単離葉緑体を用いた AsA 取込みの反応速度論的解析が報告されているが、輸送体の実態については全く未解明である。動物ではすでに Na 依存性 AsA 輸送体 (SVCT1/2) が同定されており、植物でもその相同遺伝子の解析が国内外の研究グループにより進められたが、これらは目的とする輸送体ではないことがすでに示されている。したがって植物の AsA 輸送機構を解明するためには、これまでに無い新たな発想が必要となっていた。

2. 研究の目的

前項の背景を受け、研究代表者は、シロイヌナズナ AsA 欠乏変異体 (*vtc*) に着目した。*vtc* 変異体の AsA レベルは野生型よりも 50~20%程度まで低下している。したがって *vtc* 変異体では葉緑体の AsA レベルも野生株のそれに比べて低いと考えられ、それ故、クロロフィル蛍光パラメーターの一つである非光化学消光値 (NPQ; Non-Photochemical Quenching) も低い値を示すことが予想される。NPQ 値は AsA 量に依存することが期待されるため、*vtc* 変異体に AsA を添加することで野生株と同等の NPQ 値に回復するのではないかと仮定した。そこで本研究では、この仮定を明らかにするとともに、二次元クロロフィルイメージングによる NPQ を指標にしたアスコルビン酸輸送体遺伝子の新たな探索法を確立すること、またそれ以外にもマイクロアレーやプロテオームデータベース情報に基づき、AsA 輸送に関連する可能性のある候補遺伝子について、各 T-DNA 挿入変異体を解析すること、により植物アスコルビン酸輸送体を包括的に探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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。

(2) NPQ の測定法

100 \cdot mol/m²/s の光条件下で MS 寒天培地にて栽培した植物に対して、10 mM AsANa を与え、35 \cdot mol/m²/s の弱光下で 16 時間インキュベートした。その後、300 \cdot mol/m²/s 1 時間の処理を行い、暗適した植物体を二次元クロロフィルイメージアナライザー cf Imager (Techologica) あるいは FluorCam 800MF (Photon Systems Instruments) を用い

てにより NPQ 測定を行った。

(3) 硝酸銀による組織染色法

シロイヌナズナ葉切片を、5% AgNO₃ を含む 70%メタノール、5%酢酸溶液に冷暗所に一晚浸し、5%アンモニアを含む 70%メタノール溶液で固定化し、顕微鏡で観察を行った。

(4) エチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理

定法に従って 0.3%もしくは 0.2% EMS でシロイヌナズナ *vtc* 変異体を処理し、自殖 M2 種子を得てスクリーニングを行った。

(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) *vtc* 変異体の NPQ 評価と新規変異体のスクリーニング:

二次元クロロフィルイメージアナライザーを用いて、シロイヌナズナ野生株 (WT) および *vtc* 変異体の NPQ に及ぼす AsA 添加の影響について検討した。WT および *vtc* 変異体に対し、10 mM AsANa を与え、光条件下 12 時間処理後に NPQ を測定した。その結果、WT では AsA 処理前後で NPQ 値に変化がないのに対し、*vtc* 変異体では AsA 処理後に NPQ の回復が認められた (図 1)。

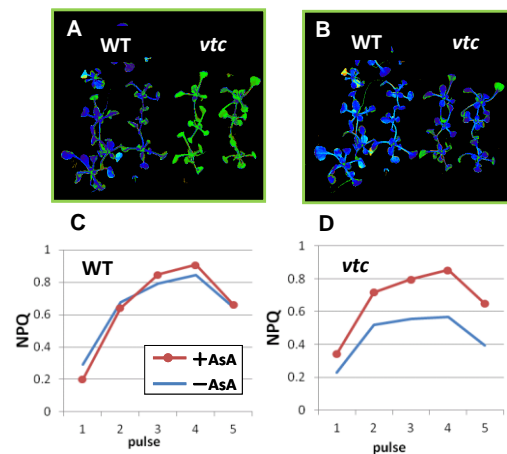


図 1. シロイヌナズナ WT と *vtc* 変異体の NPQ 値の比較。

次に、WT および *vtc* 変異体の葉を硝酸銀溶液で浸し、AsANa 処理によるプラスチド内の AsA 蓄積レベルの影響を評価した。その結果、*vtc* 変異体では AsANa 処理前のコントロールと比較して AsANa 処理によりプラスチド内に黒褐色の銀沈着物が見られた。したがって、前述の NPQ の回復はプラスチド内の AsA 蓄積

量の増加と相関していることが強く支持された (図2)。

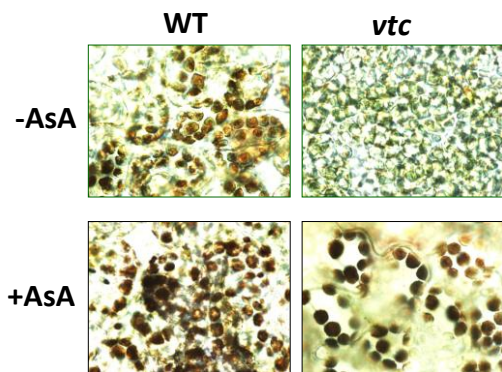


図2. 銀染色による AsA の組織化学的評価.

これまでの評価結果より、NPQ値はスクリーニングのための良いパラメーターとなることが示されたため、この事実を受け次に *vtc* 変異体の種子に対し0.03% (w/v) EMS処理を行い、自殖M2種子を得た。これらをプラスチックプレート上に播種し、3~4週齢の植物に対し、前項と同条件でAsANA処理を施し二次元クロロフィルイメージアナライザーを用いて、新規NPQ変異体の探索を行った (図3)。現在までにラフスクリーニングにより約8,000個体の中から23個体を得て、さらに詳細なNPQ値の測定と銀染色により、目的の変異体候補2個体を得た。現在、戻し交配を進め、ラフマッピングの後原因遺伝子の同定を試みている。

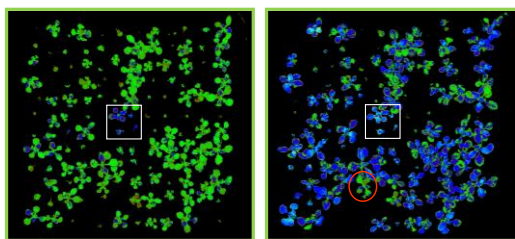


図3. クロロフィルイメージアナライザーによる変異体探索結果の一例。白四角は WT を、赤丸は得られた変異体候補を示している。

(2) データベースに基づいたアスコルビン酸輸送変異体の探索:

これまでに研究代表者のグループでは、マイクロアレーを用いてシロイヌナズナ *vtc* 変異体におけるAsA応答遺伝子の探索と解析を行っている。そこでこの時得られたマイクロアレーデータより、膜タンパク質をコードする遺伝子群の中で、AsAレベルの変動に対し顕著な応答性を示す9つの遺伝

子をピックアップした。さらにプラスチド・プロテオームデータベースから糖輸送関連と予測された9遺伝子を加え、それぞれのT-DNA挿入変異体入手し、AsA蓄積量におよぼす影響およびNPQ値について測定し、機能評価を行った。また一部の遺伝子については、Gatewayシステムにより植物形質転換用ベクターにクローン化し、タバコBY-2培養細胞に形質転換することで、AsA取込み活性の評価を試みた。

すべてのT-DNA挿入変異体について、葉からゲノムDNAを抽出後、各遺伝子に対する特異的プライマーを用いてホモ変異体であることを確認した (図4)。

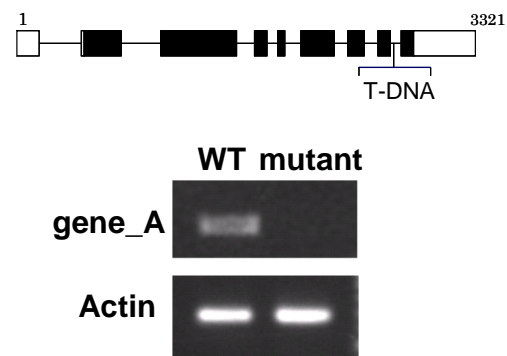


図4. シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体確認結果の一例.

得られた T-DNA 挿入変異体について、十分に生育した葉組織に対し、10 mM AsANA を与え、 $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光条件下で12時間インキュベートし、AsA 蓄積量におよぼす影響を検討した。

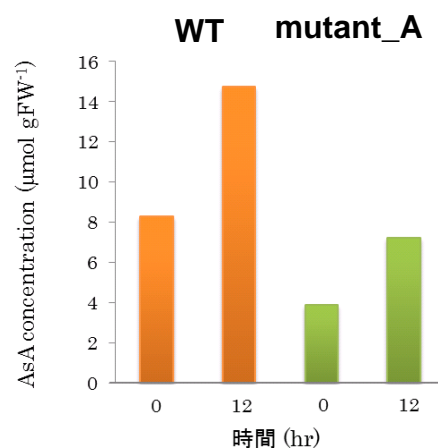


図5. シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体の AsA 取込み評価.

その結果、コントロールの野生株では処理後12時間までに約1.9倍にAsA蓄積量が増加したのに対し、あるT-DNA挿入変異体では処理

前の AsA レベルにおいても野生株よりも低い値を示し、AsANa 処理後の AsA レベルも顕著に低下していることが確認できた (図 5)。またこれとは別の T-DNA 挿入変異体では、AsA 取込みレベルに有意な違いは認められなかったものの、NPQ 値に野生株と顕著に異なる結果が得られた (図 6)。したがって、これらの遺伝子は、目的の輸送体遺伝子をコードしている可能性が示唆された。

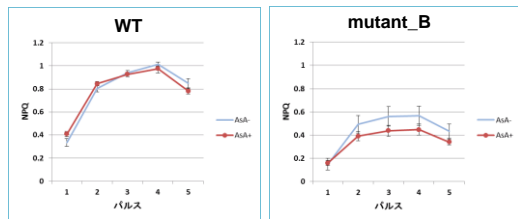


図 6. T-DNA 挿入変異体における NPQ 解析結果の一例.

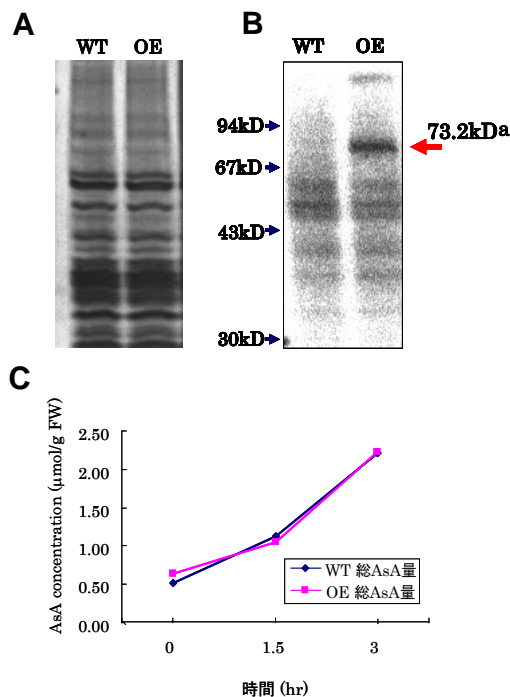


図 7. タバコ培養細胞における組換え体タンパク質 (OE) の AsA 輸送活性評価. A: SDS-PAGE、B: Myc 抗体による組換え体タンパク質の発現確認、C: 培養細胞における AsA 取込み活性

そこで次に、これら遺伝子産物の AsA 輸送活性をさらに詳細に解析するため、今回タバコ培養細胞に組換え体タンパク質を発現させ、AsA 取込み活性を評価することにした (図 7)。組換え体タンパク質の発現が確認できた

め、MS 培地中に 10 mMAsANa を加え経時的に AsA 取込み量を測定したが、結果としてコントロールの野生株との有意差は確認されなかった。その原因として、発現確認用に付加した Myc タグの影響やホストの影響が考えられる。

今回の結果より、本課題で取組んだアプローチは植物 AsA 輸送機構解明の糸口として非常に有効であることが示された。今後は、活性型タンパク質による評価系の確立が解決すべき重要な課題として挙げられる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

1) 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 3 2 回講演会、2012 年 1 月 21 日、鳥取市・鳥取大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 孝博 (ISHIKAWA TAKAHIRO)
鳥根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 60285385