

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580143

研究課題名(和文) トロピカル植物アセロラの果実へのアスコルビン酸大量集積機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of accumulation mechanism of ascorbic acid into fruit of tropical plant acerola.

研究代表者

江坂 宗春 (Esaka, Muneharu)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：70151975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アセロラは、果実に大量のアスコルビン酸を集積する。アセロラ果実のアスコルビン酸含量は、レモン果実の約50倍にもなる。しかし、アセロラ果実に大量にアスコルビン酸が集積する機構は不明である。本研究では、アセロラについて、アスコルビン酸の生合成と、その集積機構に着目した。アセロラのアスコルビン酸生合成酵素のcDNAをクローニング後、アセロラにおけるアスコルビン酸生合成酵素の発現解析を行った。また、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素のゲノム遺伝子をクローニングし、そのプロモーター活性を調べた。さらに、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子をタバコに導入発現させ、アスコルビン酸高含量タバコを作出した。

研究成果の概要(英文)：Acerola (*Malpighia glabra*), a myrtaceous fruit with an abundance of ascorbic acid is an excellent candidate for this. Ascorbic acid content in acerola fruit is about 50-fold that in lemon fruit. This study has focused on molecular mechanisms on ascorbic acid biosynthesis and accumulation in acerola fruit. The cDNA clones for ascorbic acid biosynthesizing enzymes have been isolated. The gene expression pattern of ascorbic acid biosynthesizing enzymes have been analyzed in acerola. The genomic genes for ascorbic acid biosynthesizing enzymes in acerola have also been cloned. Furthermore, in this study, the promoter fragments of genes for ascorbic acid biosynthesizing enzymes in acerola have been analyzed. Also, the effect of overexpression of the ascorbic acid biosynthesizing enzymes on the biosynthesis of ascorbic acid has been studied. Finally, transgenic tobacco plants with higher ascorbic acid contents have been generated.

研究分野：応用生物化学

キーワード：アスコルビン酸 ビタミンC アセロラ 遺伝子発現 遺伝子組換え 酵素 転写調節 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

ヒトは、アスコルビン酸を生合成することができず、アスコルビン酸を野菜や果物などの植物から摂取しなければならない。しかし、植物におけるアスコルビン酸の生合成に関しては不明な点が多い。近年、植物のアスコルビン酸の生合成経路が提唱され、D-グルコースからD-マンノース、L-ガラクトースを経てアスコルビン酸が生合成される可能性が示され、その最終段階を触媒するL-ガラクトノ- -ラクトン脱水素酵素のcDNA が単離された。私たちも、タバコからL-ガラクトノ- -ラクトン脱水素酵素のcDNA をクローニングし、タバコに過剰発現させることにより、タバコのアスコルビン酸含量をコントロールできることを示した。一方、イチゴ果実では、ガラクトン酸からアスコルビン酸が生合成可能であることが示された。私たちも、トマトのプロトプラストの一過性過剰発現系を用いて、アスコルビン酸生合成系酵素の解析を行った。ミオイノシトールからのアスコルビン酸合成も示唆され、植物には複数のアスコルビン酸生合成系が存在し、それらが組織や環境により複雑に制御されていることが示された。

一方、植物のアスコルビン酸は、多様な生理機能を有していることが示されている。一般に、アスコルビン酸は、光合成等によって生じる活性酸素種の除去や酸化ストレスの防御に利用されている。実際に、アスコルビン酸含量が野生型の30%しかないシロイヌナズナの突然変異体は、酸化ストレスに対して感受性が高くなる。また、ラットのアスコルビン酸生合成酵素を過剰発現したジャガイモでは、酸化ストレス抵抗性が付与された。私たちも、アセロラのモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素遺伝子を過剰発現させたタバコが塩ストレス抵抗性を獲得することを示した。さらに、アスコルビン酸が細胞内レッドクス調節に関与し、胚発生や細胞死に関わること

が示された。私たちも、アスコルビン酸合成酵素を過剰発現させ、アスコルビン酸含量を増大させた形質転換タバコにおいて、老化が抑制されることを示した。

2. 研究の目的

トロピカルフルーツとして知られるアセロラは、果実に大量のアスコルビン酸を集積する。アセロラ果実のアスコルビン酸含量は、新鮮果実 100g あたり約 2g にも達し、その含量は、レモン果実の約 50 倍、トマト果実の約 200 倍にもなる。しかし、アセロラ果実に大量にアスコルビン酸が集積する機構は不明である。本研究では、アスコルビン酸含量が驚くほど高いアセロラについて、アスコルビン酸の生合成と、その集積機構に着目したい。特に、アセロラの果実は、際立ってアスコルビン酸含量が高く、その含量は約 20 mg/g 新鮮重で、レモン果実のアスコルビン酸含量の約 50 倍、トマト果実の 200 倍にも達し、水分を除いた可溶性成分の半分以上がアスコルビン酸である。しかし、アセロラ等のトロピカルフルーツのアスコルビン酸生合成・集積に関する分子細胞レベルの研究については、私たちの研究以外に全くない。

本研究では、アセロラのアスコルビン酸生合成や代謝に関わる種々の酵素を解析するとともに、多量のアスコルビン酸の生合成や集積に関わる酵素や因子を同定し、アセロラが、どうして、どのような機構で、大量のアスコルビン酸を生合成し、そのアスコルビン酸を果実に集積することができるのかを明らかにしたい。

3. 研究の方法

材料として、沖縄より取り寄せた通常のアセロラ (OK種) を植物用ガラス室で栽培したものを使用する。また、ブラジル原産でアスコルビン酸含量が著しく低いアセロラ亜種 (FB種) (通常のアセロラのアスコルビン酸

含量の3分の1)は、株式会社ニチレイから譲渡されたものを用いる。

すでに、アセロラから、アスコルビン酸合成を調節している可能性の高い3つのキナーゼであるホスホマンノムターゼ、GDP-D-マンノースピロホスホリラーゼ、GDP-D-マンノースエピメラーゼのcDNAをクローニングしている。また、これらのアスコルビン酸合成酵素については、トマトからもこれらのcDNAをクローニングしている。今回、ブラジル原産のアスコルビン酸含量が低いアセロラ亜種FB種についても、それらの3つのアスコルビン酸合成酵素cDNAをRT-PCR法、RACE法によりクローニングする。アスコルビン酸含量の高い通常のアセロラのアスコルビン酸合成酵素の一次構造とアスコルビン酸含量の低いアセロラ亜種FB種、そしてトマトのアスコルビン酸合成酵素の一次構造を比較し、タンパク質構造的な特徴について評価する。アスコルビン酸含量の高い通常のアセロラ、アスコルビン酸含量が低いアセロラFB種、およびトマトの3つのアスコルビン酸合成酵素の触媒活性が、アスコルビン酸含量が低いアセロラ亜種FB種やトマトの該当酵素のものに比べ高いかどうかを評価する。

アセロラの3つのアスコルビン酸合成酵素の精製標品を抗原として、それぞれの酵素に対する特異抗体を作成する。アセロラのアスコルビン酸合成酵素の遺伝子発現が、アスコルビン酸含量が低いアセロラFB種やトマトの該当酵素の遺伝子発現に比べ高いかどうかを評価する。具体的には、特異抗体を用いたイムノプロット法により酵素タンパク質量を、また、リアルタイムRT-PCR法によりmRNAの発現量を調べ、アセロラのアスコルビン酸合成酵素の高い遺伝子発現が、アスコルビン酸含量の高い理由になりうるかどうかを評価する。

アセロラの3つのアスコルビン酸合成酵素のゲノム遺伝子の5'上流域をレポー

ター遺伝子(ルシフェラーゼ)の上流につなげ、トランジェントアッセイ系により、プロモーター活性を測定する。

アスコルビン酸合成酵素遺伝子のプロモーター活性が、アスコルビン酸含量が低いアセロラ亜種FB種やトマトの該当酵素遺伝子のプロモーター活性に比べ高いかどうかを評価する。

イチゴ果実では、ガラクトツロン酸からアスコルビン酸が合成可能であることが示唆されている。したがって、この合成系の主要な酵素であるガラクトツロン酸還元酵素の遺伝子発現についても着目し、アスコルビン酸合成に関わっているかどうかを調べる。もし、関わっているとしたら、アセロラのガラクトツロン酸還元酵素の触媒活性および遺伝子発現量、プロモーター活性を、上記同様、アスコルビン酸含量が低いアセロラFB種やトマトのもの、と比較評価する。

最終的に、アセロラが、どうして、どのような機構で、大量のアスコルビン酸を生合成し、果実に集積することができるのかを明らかにするとともに、アスコルビン酸高含量遺伝子組換えトマトについて、実用化の観点から総合的な評価・考察を行う。

4. 研究成果

(1) 植物のアスコルビン酸合成に関わる主要な酵素 GDP-D-mannose pyrophosphorylase の cDNA がアセロラ果実から単離された。ノーザンブロッティング解析から、GDP-D-mannose pyrophosphorylase 遺伝子はアセロラの全ての組織で発現していたが、特に未熟の果実で高い発現を示し、果実の熟成に伴って、その発現は低下した。また、アセロラの各組織のアスコルビン酸含量は、GDP-D-mannose pyrophosphorylase の発現と高い相関を示した。

(2) アセロラは、特に果実に大量のアスコルビン酸を含む。アセロラのアスコルビン酸

生合成酵素 GDP-D-mannose

pyrophosphorylase の mRNA 発現を、シロイヌナズナやトマトの発現と比較した結果、アセロラの GDP-D-mannose pyrophosphorylase の mRNA 発現はシロイヌナズナやトマトのものに比べ非常に高かった。アセロラの GDP-D-mannose pyrophosphorylase 遺伝子のプロモーター解析を行った結果、そのプロモーター活性は、植物の高発現プロモーターとして知られている cauliflower mosaic virus 35S プロモーターやシロイヌナズナの GDP-D-mannose pyrophosphorylase 遺伝子のプロモーターより高かった。アセロラの GDP-D-mannose pyrophosphorylase 遺伝子をタバコに導入し、過剰発現させたところ、タバコのアスコルビン酸含量は野生植物の約 2 倍に増大した。

(3) アセロラの葉のアスコルビン酸含量は、シロイヌナズナの葉の約 8 倍であった。植物の主要なアスコルビン酸合成系と考えられている Smirnoff-Wheeler pathway の 5 つの酵素に着目し、それらの遺伝子をクローニングして mRNA の発現を調べた。その結果、それらの酵素の mRNA 発現は、シロイヌナズナの該当酵素の発現の 5 ~ 700 倍高かった。また、GDP-D-mannose pyrophosphorylase 以外の酵素の mRNA 発現は、光応答性を示した。

(4) Smirnoff-Wheeler pathway の酵素である GDP-L-galactose phosphorylase の遺伝子をアセロラからクローニングし、発現様式を調べた。その結果、アセロラの GDP-L-galactose phosphorylase の発現は非常に高く、その発現はアスコルビン酸含量と正の相関を示した。アセロラの

GDP-L-galactose phosphorylase 遺伝子をタバコに導入発現することにより、タバコのアスコルビン酸含量が 2 ~ 3 倍に増大した。

(5) phosphomannomutase は、アスコルビン酸合成系 Smirnoff-Wheeler pathway の中で mannose 6-phosphate から mannose

1-phosphate への変換を触媒する。

phosphomannomutase cDNA をアセロラから単離し、その発現を調べた。その結果、アセロラの果実や葉の phosphomannomutase の mRNA 発現は高く、アスコルビン酸含量と相関した。また、アセロラやシロイヌナズナ、トマトの葉において、phosphomannomutase の酵素活性も、アスコルビン酸含量と相関した。アセロラの phosphomannomutase 遺伝子をタバコに導入発現することにより、タバコのアスコルビン酸含量が約 2 倍に増大した。

最終的に、アセロラでは、アスコルビン酸生合成系の酵素群の遺伝子が、転写レベルで著しく高い発現をし、結果的に、アスコルビン酸生合成系酵素群が大量に生合成され、アスコルビン酸含量も高くなることが示された。また、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子を植物に導入発現することにより、植物のアスコルビン酸含量を増大させることが可能になった。

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 6 件)

1 . Eltelib, H.A., Badejo A. A., Fujikawa Y., Esaka M. (2014) Enhanced Salt-Mediated Oxidative Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Overexpressing Acerola GDP-L-galactose Phosphorylase and Phosphomannomutase Genes. International Journal of Development Research 査読有 4, (10): 2024-2028.

2 . Sakamoto S., Fujikawa Y., Esaka M. (2013) Analysis of ascorbic acid biosynthesis using a simple transient gene expression system in tomato fruit protoplasts. Biosci Biotechnol Biochem. 査読有 77 (3): 673-675.

3 . Ueda A., Yahagi H., Fujikawa Y., Nagaoka T., Esaka M., Calcaño M., González M.M., Martich J.D.H., Saneoka H. (2013) Comparative physiological analysis of salinity tolerance in rice. *Soil Science and Plant Nutrition* 査読有 59 (6): 896-903.

4 . Sakamoto, S., Fujikawa, Y., Tanaka, N., Esaka, M. (2012) Molecular cloning and characterization of L-galactose-1-phosphate phosphatase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 76 (6): 1155-1162.

5 . Eltelib, H.A., Fujikawa, Y., Esaka, M. (2012) Overexpression of the acerola (*Malpighia glabra*) monodehydroascorbate reductase gene in transgenic tobacco plants results in increased ascorbate levels and enhanced tolerance to salt stress. *S. Afr. J. Bot.*, 査読有 78: 295-301.

6 . Fujikawa, Y., Fujikawa, R., Iijima, N., Esaka, M. (2012) Characterization of secretory phospholipase A₂ with phospholipase A₁ activity in tobacco, *Nicotiana tabacum* (L.). *Lipids* 査読有 47 (3): 303-312.

〔学会発表〕(計 11 件)

1 .末川 麻里奈、藤川 愉吉、江坂 宗春 (2015 年 3 月 28 日) トマトのアスコルビン酸生合成におけるガラクトン酸レダクターゼの発現機構と生理機能. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山.

2 .近藤 隆之、藤川 愉吉、江坂 宗春 (2015 年 3 月 27 日) アセロラにおけるアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-mannose pyrophosphorylase の転写調節機構の解明. 日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山 .

3 . 國川 彩香、末川麻里奈、坂本 真吾、藤川 愉吉、江坂 宗春 (2015 年 1 月 30 日) トマトのアスコルビン酸生合成および生理機能に関する研究. 第 29 回バイオテクノロジー研究成果発表会、 広島 .

4 .末川 麻里奈、藤川 愉吉、江坂 宗春 (2014 年 3 月 28 日) トマトにおけるアスコルビン酸生合成酵素ガラクトン酸レダクターゼの生理機能と発現調節. 日本農芸化学会 2014 年度大会、東京 .

5 .近藤 隆之、藤川 愉吉、江坂 宗春 (2014 年 3 月 28 日) アセロラのアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-マンノースピロホスホリラーゼ遺伝子のプロモーター解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会、東京 .

6 .遠藤 聡至、藤川 愉吉、真野 昌二、林 誠、西村 幹夫、江坂 宗春(2014 年 3 月 28 日) シロイヌナズナのペルオキシソーム輸送におけるカタラーゼのヘム結合領域の機能解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会、東京 .

7 .末川 麻里奈、藤川 愉吉、江坂 宗春 (2014 年 1 月 30 日) トマトにおけるアスコルビン酸生合成酵素ガラクトン酸レダクターゼの遺伝子発現調節. 第 28 回バイオテクノロジー研究成果発表会、 広島 .

8 . 近藤隆之、八川恵梨香、Badejo A. Adebajo、藤川愉吉、江坂宗春 (2013 年 3 月 25 日) アセロラのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の高発現機構の解明. 日本農芸化学

会 2013 年度大会、仙台 .

9 .近藤隆之、八川恵梨香、Badejo A. Adebajo、
藤川愉吉、江坂宗春 (2013 年 1 月 30 日) ア
セロラのアスコルビン酸高集積機構の解明。
第 27 回バイオテクノロジー研究成果発表会、
広島 .

10 . Fujikawa Y., Kondo T., Akiyoshi T.,
Ueda A., Nagaoka T., Saneoka H., Esaka M.,
Manuel Calcaño, José David Hernandez
Martich, Milton Martínez González (2012
年 6 月 14 日) Characterization of ascorbic
acid biosynthesis in Moringa. VIII
INTERNATIONAL INTERDISCIPLINARY
SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS, Santo
Domingo.

11 . 近藤 隆之、藤川 愉吉、上田 晃弘、
長岡 俊徳、実岡 寛文、Manuel Calcaño、
Milton Martínez González、David
Hernandez Martich、江坂 宗春 (2012 年 3
月 25 日) モリンガにおけるアスコルビン酸
生合成酵素遺伝子の発現解析。日本農芸化
学会 2012 年度大会、京都。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/enzyme/index.html>

http://www.hiroshima-u.ac.jp/en/gsbs/organization/Molecular_and_Applied_Biosciences/p_t0q923.html

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/enzyme/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江坂 宗春 (ESAKA MUNEHARU)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号 : 7 0 1 5 1 9 7 5

(2) 研究分担者

藤川 愉吉 (FUJIKAWA YUKICHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・講師

研究者番号 : 1 0 5 0 6 6 8 7

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :