

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19239

研究課題名(和文)新規安定型アスコルビン酸プローブによる植物アスコルビン酸結合タンパク質の探索

研究課題名(英文) Screening of ascorbate-binding proteins in plant using novel stable ascorbate probes

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)：植物がなぜビタミンCとして知られるアスコルビン酸(AsA)を豊富に含んでいるのか？その生理的な理由の解明を目的に、モデル植物のシロイヌナズナを材料に新規に開発した安定型AsAプローブを用いて、AsA結合タンパク質の探索を行った。その結果、葉、花、果実といったAsAが豊富に含まれるさまざまな組織から、多数のAsA結合タンパク質候補を得ており、個別に作製した組換え体タンパク質によるAsA結合性の評価が進行中である。今回の研究から、これまでに未知のものを含め多くのタンパク質がアスコルビン酸と相互作用し影響を受けることが示唆され、植物アスコルビン酸生理機能の新たな局面開拓のきっかけとなる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物がアスコルビン酸を豊富に含んでいることは誰でも知っていることであるが、これまでに知られている抗酸化、補酵素、電子伝達以外の生理的役割は実は良くわかっていない。今回本研究により、未知のタンパク質も含め多数のアスコルビン酸結合タンパク質候補が得られた事実は、アスコルビン酸の新規機能として“タンパク質との会合・相互作用を介した細胞機能の調節”にある可能性を支持するものであり、植物でなぜ高濃度のアスコルビン酸が必要であるかという単純だが難しい問題解決のための糸口となった点で学術的意義がある。今後本研究の進展により、特に果実や花序形成におけるアスコルビン酸の重要性を提唱することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate a fundamental issue that why plants contain high amount of ascorbic acid, namely vitamin C. To address this subject, we carried out a screening for identifying ascorbate-binding proteins using novel-stable ascorbate probes which have developed by Prof. Tai's group recently. After a detailed examination for optimization of protein extraction from various tissues in Arabidopsis plants, we performed an affinity chromatography using the ascorbate probes and then identify the eluted proteins by nanoLC-MS analysis. Finally, we have listed over 50 proteins as candidates for the ascorbate interactors. Evaluation of an ascorbate-binding ability for individual proteins using recombinant protein expression system is now under investigation. Finally, we have succeeded in shedding the light on a novel aspect of physiological significance of ascorbate in plants.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：ビタミンC 植物 安定型アスコルビン酸プローブ アスコルビン酸結合タンパク質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は、葉や特に果実や花序などの組織において最大で全可溶性糖質の約 10% (濃度換算で数十 mM に相当) に達するほど非常に多くのアスコルビン酸を含んでいる。これは動物血漿中のアスコルビン酸濃度の 10~100 倍にも相当する。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理機能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抗酸化物質として、光合成の活発な葉において活性酸素種代謝に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。一方で植物は酸化ストレスによる活性酸素種の生成とは関連の低い花序や果実において、葉よりもさらに多くのアスコルビン酸を含んでおり、この事実は抗酸化や酵素の補因子、電子伝達キャリアーといったこれまでに既知のアスコルビン酸の機能だけでは十分に説明が付き、何か未知の役割 (必要性) が予見される。興味深いことに、動物においては転写調節因子  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  キナーゼの  $\beta$  サブユニットにアスコルビン酸が特異的に結合し、転写因子  $\text{NF}\kappa\text{B}$  の機能制御に関与していることが報告されている。植物においてそのような報告例はないが、動物よりもアスコルビン酸を豊富に含む植物において、直接相互作用するタンパク質の存在は大いに期待できる。これまでに植物で報告例がない最大の要因は、アスコルビン酸は低分子で不安定な化合物であり、直接相互作用するタンパク質因子を調べる手法がないためである。こうした折、安定型アスコルビン酸誘導体の創出に関して世界で最も実績のある共同研究者の田井博士は、アフィニティーカラムに供することが可能な安定型アスコルビン酸新規プローブの作出に成功し、申請者の長年の懸案事項であった植物アスコルビン酸相互作用タンパク質探索の機運が高まった。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、「植物は、なぜアスコルビン酸を豊富に含んでいるのか？」その疑問を明らかにすることである。上記の背景でも述べたように、これまでの研究成果と知見から、植物のアスコルビン酸には抗酸化など既知の役割以外に、“タンパク質との会合・相互作用を介した細胞機能の調節”にあるとの仮説を立てており、新規に開発した安定型アスコルビン酸プローブとプロテオームの手法を活用することで、モデル植物のシロイヌナズナからアスコルビン酸結合タンパク質を探索および同定することで、目的の達成を目指す。

### 3. 研究の方法

植物はシロイヌナズナアスコルビン酸欠乏変異体 *vtc2-4* 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。アスコルビン酸プローブは、C2 位あるいは C6 位にそれぞれ官能基を導入した 2-amino-2-deoxy-L-ascorbic acid (2-AA) および 6-amino-6-deoxy-2-O-methyl-L-ascorbic acid (6-AA) を用い、タンパク質の探索にはこれらのプローブを固定化したアフィニティー樹脂を用いた (図 1)。

*vtc2-4* の葉、花、果実の各組織から、破碎バッファー (50 mM HEPES, pH7.5, 0.5 mM EDTA, 100 mM NaCl) でホモジナイズ後の遠心分離で得られた上清を粗抽出タンパク質溶液とし、同緩衝液で 10 時間透析後にアフィニティーカラムに供した。溶出は 0.1 mM 2-O-メチル AA で行った。得られた溶出液はトリクロロ酢酸で処理後、定法にしたがってトリプシン消化し、nanoLC-MS (Synapt G2, waters) によりペプチド分析後、得られたシグナルを Progenesis Q1 により解析した。得られた各候補タンパク質は、大腸菌による組換え体タンパク質作製後、アフィニティーカラムにより結合性の再評価を実施した。

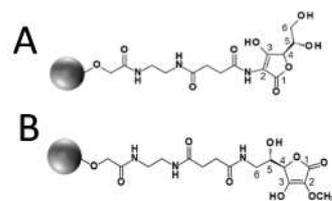


図 1. 使用したアスコルビン酸プローブの構造. A; 2-amino-2-deoxy-L-ascorbic acid (2-AA), B; 6-amino-6-deoxy-2-O-methyl-L-ascorbic acid (6-AA)

### 4. 研究成果

#### 4-1 安定型アスコルビン酸プローブによるアスコルビン酸結合タンパク質の探索

シロイヌナズナアスコルビン酸欠乏変異体 *vtc2-4* の葉、花、長角果の各組織からタンパク質を抽出し透析後のサンプルについて、2-AA および 6-AA によるアフィニティーカラム精製を行った。得られた各吸着タンパク質画分についてトリプシン消化後、nano LC/MS で測定したデータを Progenesis Q1 を用いて解析した。樹脂のみのコントロールに比べ、アスコルビン酸プローブ (2-AA あるいは 6-AA) において、シグナル値が葉と花においては 2 倍以上、長角果では 1.5 倍以上の有意差を示したタンパク質をアスコルビン酸結合タンパク質候補とした (図 2)。

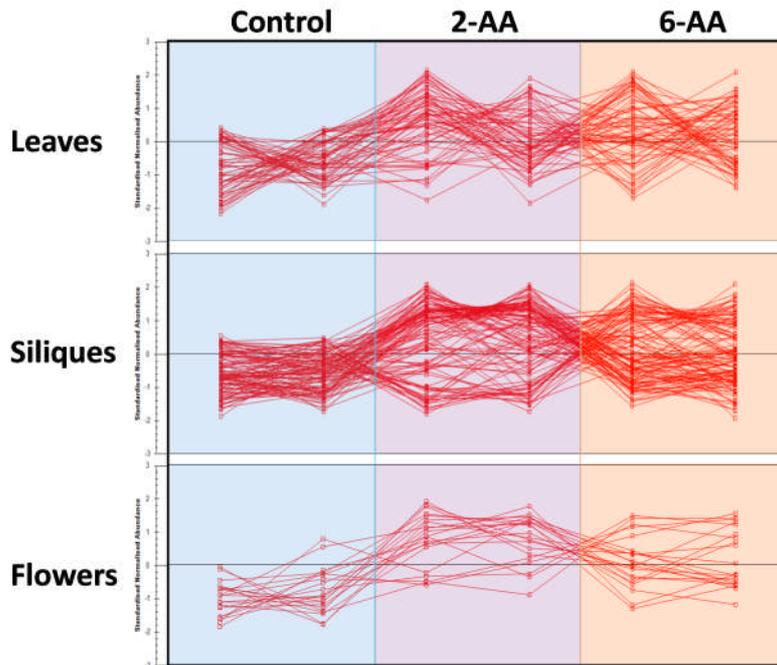


図2. nanoLC/MSによる解析結果. 各サンプル2回行った結果、2-AAあるいは6-AAにおいて有意差を示したペプチドのみを示している。

今回得られたアスコルビン酸結合タンパク質候補は、葉、長角果、花でそれぞれ、29、5、11タンパク質であった。TargetP 1.1での局在解析の結果、葉においては13タンパク質が葉緑体局在と予測され、葉緑体に高濃度のアスコルビン酸が含まれている事実と良く相関していた。

#### 4-2 アスコルビン酸結合タンパク質候補の組換え体タンパク質作製と結合性の再評価

得られたアスコルビン酸結合タンパク質候補について、該当するcDNAをクローン化した後、pColdベクターに導入し大腸菌BL21 star pLysSにおいて各組換えタンパク質を発現させた。なおトランジットシグナルをもつタンパク質に関しては該当配列を切断したmature型として発現させた。現在まで12タンパク質について可溶性画分への発現を確認し、Hisタグによるアフィニティー精製後の各組換えタンパク質について順次アスコルビン酸プローブとの結合性を再評価した。その結果、現在までに細胞質局在型のFe型スーパーオキシドディスムターゼ(FSD1)を含む複数のタンパク質においてアスコルビン酸プローブとの結合性の再現を確認している(図3)。

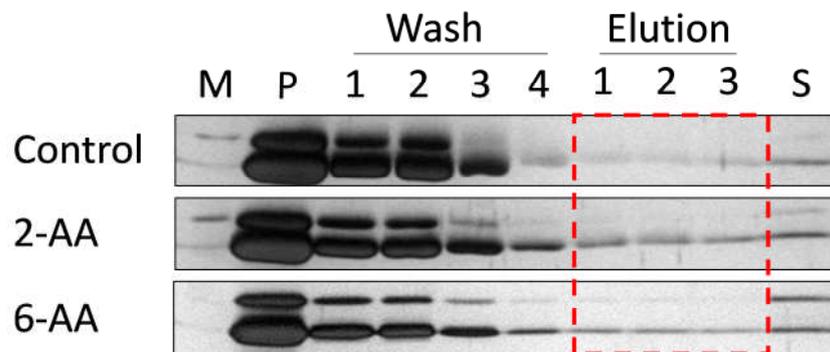


図3. 組換え体タンパク質によるアスコルビン酸プローブとの結合性を再評価の一例. 図はFe型スーパーオキシドディスムターゼ(FSD1)で実施した結果を示す。破線で囲った溶出画分においてアスコルビン酸プローブ(2-AAおよび6-AA)での結合性が認められる。

#### 4-3 ドッキングシュミレーションによる FSD1 のアスコルビン酸結合性評価

FSD1 について、統合計算化学システム MOE を用いてアスコルビン酸とのドッキングシュミレーションを行った。シロイヌナズナ FSD1 構造解析のための鋳型には、FSD1 と 65.7% の同一性を示す、好熱性シアノバクテリア (*Thermosynechococcus elongatus*) の FeSOD (PDB: 1my6) を用いた。解析の結果、アスコルビン酸は FSD1 の 43 番目のチロシンおよび 181 番目のアスパラギンとの水素結合を介して結合することが予測された (図 4)。

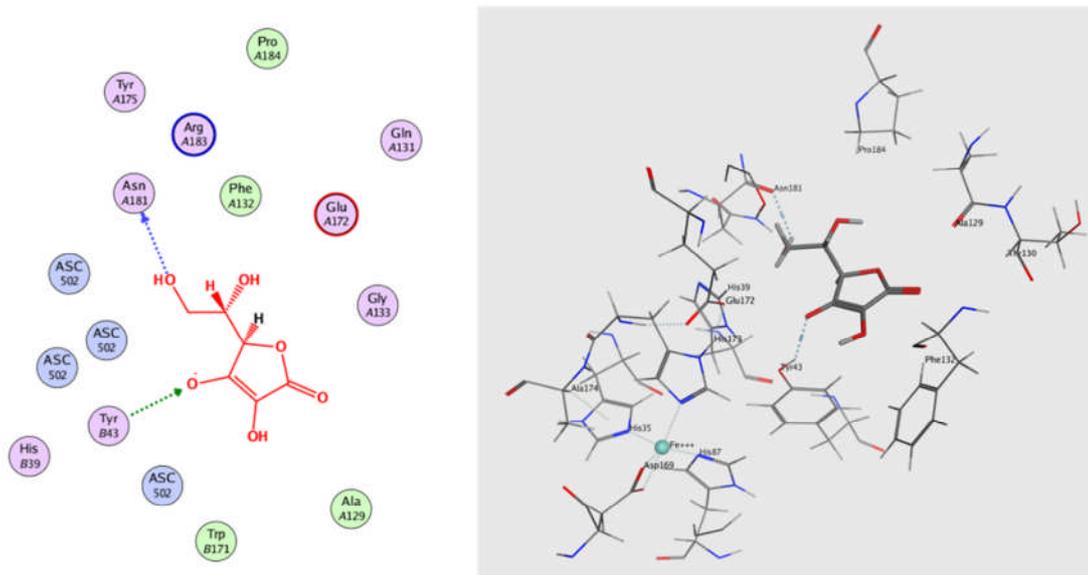


図 4. 統合計算化学システムによる FSD1 とアスコルビン酸のドッキングシュミレーションの結果.

#### 4-4 FSD1 活性におよぼすアスコルビン酸の影響

前項までに示したように組換え体タンパク質によるアスコルビン酸プローブへの結合性評価 (図 3) およびドッキングシュミレーションの結果 (図 4) より、FSD1 はアスコルビン酸と結合する可能性が強く推測された。そこで次に、組換え体 FSD1 の酵素活性におよぼすアスコルビン酸の影響について検討した。スーパーオキシドディスムターゼ活性の測定は、定法にしたがってキサンチン/キサンチンオキシダーゼ系によって発生したスーパーオキシド分子をニトロブルーテトラゾリウム (NBT) の還元で検出する NBT 法により行った。この問題点として、アスコルビン酸はスーパーオキシドを直接還元することから、FSD1 活性評価に先立ってアスコルビン酸による非酵素反応の影響を調べた。

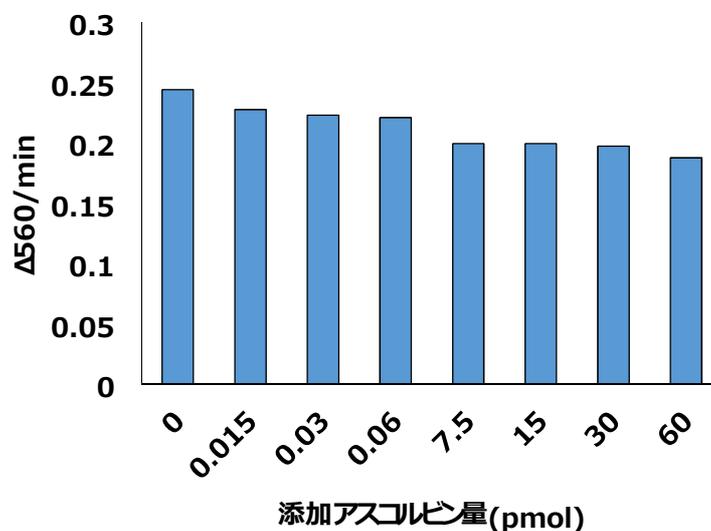


図 5. アスコルビン酸による非酵素的スーパーオキシド還元作用

その結果、非酵素反応によるスーパーオキシド還元の影響は、60 pmol アスコルビン酸添加により 10%と見積もられた (図 5)。またそれ以上の濃度ではアスコルビン酸による影響が大きく、正確な活性評価に適さないと判断した。そこで次に実際に FSD1 活性におよぼすアスコルビン酸の影響について、反応系に直接添加した場合および測定前にプレインキュベートした場合のスーパーオキシドディスムターゼ活性を測定した。その結果、いずれの場合も、アスコルビン酸は FSD1 活性に影響しないことが示された。

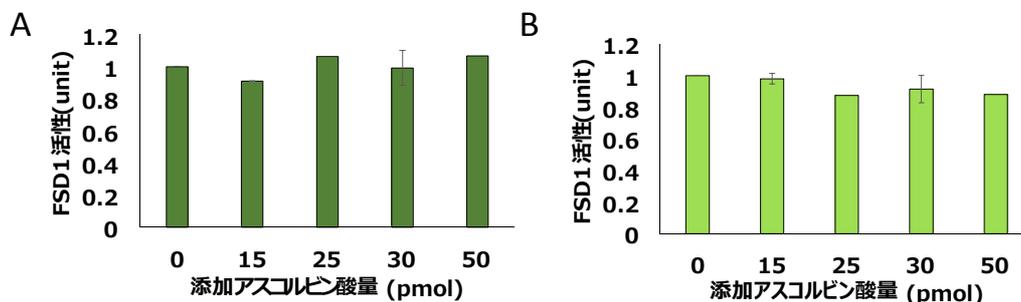


図 6. アスコルビン酸による FSD1 活性への影響. A; 反応系に各濃度のアスコルビン酸を同時添加して活性測定した場合、B; 各濃度のアスコルビン酸とプレインキュベートした後活性測定した場合. なおいずれの場合も FSD1 は 30 pmol を用いている.

Fe 型スーパーオキシドディスムターゼと (FeSOD) 一次構造が相同でありリガンドが非常に類似している、Mn 型スーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) の解析によると、MnSOD 活性部位は、活性中心の金属から水素結合ネットワークを形成し、このネットワークがプロトンの移動をサポートすることが示唆されている。しかしながら、図 4 に示したドッキングシミュレーションの結果、FSD1 のアスコルビン酸結合部位はこのネットワークへの影響が確認されないことから、アスコルビン酸による FSD1 活性への影響が観察されなかったのは妥当な結果であると考えられる。したがって、アスコルビン酸は FSD1 に結合することで、酸化還元以外の機能に関与していることが強く示唆された。現在は、シロイヌナズナ *fsd1* 変異体および、野生株と *vtc2-4* 変異体における FeSOD 発現レベルや表現型におよぼす影響等検討を進めアスコルビン酸相互作用による FSD1 の新奇生理作用の解明を進めている。

最後に、新規安定型アスコルビン酸プローブを使用したアフィニティー探索により、解析が先行した FSD1 以外にも未知のものも含め多くのタンパク質がアスコルビン酸と相互作用することが示唆された。今後の研究の進展により、アスコルビン酸によるタンパク質との会合・相互作用を介した細胞機能の調節機構が明らかになることで、「植物は、なぜアスコルビン酸を豊富に含んでいるのか？」その疑問の解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Iwaoka, Y., Nishino, K., Ishikawa, T., Ito, H., Sawa, Y., Tai, A.	4. 巻 143
2. 論文標題 Affinity resins as new tools for identifying target proteins of ascorbic acid.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 874-882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c7an01592e	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西原好美、西野耕平、岩岡裕二、小川貴央、丸田隆典、田井章博、石川孝博
2. 発表標題 アフィニティーゲルによる植物アスコルビン酸結合タンパク質の包括的探索
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部2018年度支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩岡裕二、西野耕平、石川孝博、伊東秀之、澤 嘉弘、田井章博
2. 発表標題 アスコルビン酸標的タンパク質の探索ツールとしての新規アフィニティーゲルの創製
3. 学会等名 第155回ビタミンC研究委員会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩岡裕二、西野耕平、石川孝博、伊東秀之、澤 嘉弘、田井章博
2. 発表標題 アスコルビン酸標的タンパク質の探索を指向した新規アフィニティーゲルの創製
3. 学会等名 日本ビタミン学会第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西原好美、西野耕平、岩岡裕二、丸田隆典、小川貴央、重岡 成、田井章博、澤 嘉弘、石川孝博
2. 発表標題 アフィニティー樹脂によるシロイヌナズナアスコルビン酸結合タンパク質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ishikawa, T., Maruta, T., Yoshimura K. and Smirnoff, N.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 300
3. 書名 Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants	

1. 著者名 Yoshimura, K. and Ishikawa, T.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 511
3. 書名 Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>関連の取組として、「研究成果公开发表(B)(ひらめき ときめきサイエンス~ようこそ大学の研究室へ~KAKENHI)」(課題番号:19HT0187) 植物のビタミンCにふれてみよう~なぜ、植物はビタミンCをたくさん持っているの?~ に代表者として採択され、2019年9月に高校生対象に実習を行った。</p>
---

## 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	田井 章博  (Tai Akihiro)  (70284081)	県立広島大学・生命環境学部・教授    (25406)	