

令和 3 年 4 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：2018～2020

課題番号：18K05620

研究課題名(和文)代謝工学によるアスコルビン酸強化植物の作出に関する研究

研究課題名(英文)Production of plant with high ascorbic acid contents by metabolic engineering

研究代表者

藤川 愉吉 (FUJIKAWA, YUKICHI)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・講師

研究者番号：10506687

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):植物のアスコルビン酸(AsA)強化を目標に、AsA生合成酵素の発現を試みた。その結果、6つのAsA生合成酵素のうち、上流3つの酵素の共発現が、細胞内のAsA強化に重要であることを明らかにした。しかし、構成的高発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルスCaMV35Sによる構成的過剰発現では、一過的過剰発現に比べてAsAが強化されない可能性が示唆された。またAsA生合成の最終酵素であるGalLDHについて、アセロラMgGalLDHのN末端領域にミトコンドリア局在シグナルが存在することを明らかにした。しかし、MgGalLDHの局在改変だけでは、植物のAsAを強化できない可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスコルビン酸(ビタミンC, AsA)は活性酸素種に対する主要な抗酸化物質であり、植物生産の量的・質的強化に重要な役割を果たしている。AsAの生合成に着目した研究成果により、植物のAsA生合成強化に重要な酵素の候補を明らかにした。代謝工学的なアプローチによるAsA生合成の強化は、強光、乾燥、塩、低温、高温などの環境ストレスに対して植物生産が低下しない作物育種への応用が期待できる。また植物は様々な二次代謝産物を生産しているため、将来的には、植物における機能性物質の産生向上に関する応用展開に役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文):Ascorbic acid (vitamin C, AsA) is a major antioxidant against oxidative stress in plants and plays an important role in plant productivity. To pursue the strategy for efficiently manipulating AsA accumulation in plants, we attempted to modify the expression of AsA biosynthetic enzymes. As a result, the co-expression of three upstream enzymes (GMP, GME, and GGP) among the six AsA biosynthetic enzymes showed a significant increase in intracellular AsA contents. However, constitutive overexpression using CaMV35S may not enhance AsA as compared to transient overexpression. Acerola MgGalLDH, the final enzyme of AsA biosynthesis in plants, has a mitochondrial localization signal in the N-terminal region. However, the localization modification of MgGalLDH alone may not enhance AsA in plants.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：アスコルビン酸 代謝工学 過剰発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農業生産において、作物の収量向上や栽培の省力化につながる作物の機能性を強化することは重要である。アスコルビン酸(ビタミンC, AsA)は環境ストレスによって発生した活性酸素から細胞を保護しているだけでなく植物の生長にも関わっているため、いかなる植物も一定量のAsAを必要とするが、AsAの生産量は植物種によって大きく異なっている。一方、我々人間もAsAを必要とするが、AsAを作ることができず、野菜や果物などから摂取しなければならぬ。したがって低AsA含有作物に対してAsA強化は植物の収量や環境ストレスの抵抗性向上に有効であるだけでなく、作物の栄養価が高まることで人間の健康維持にも役立つ。植物のAsA生合成についてみると、D-マンノースから6種類の生合成酵素が関わる経路によって主に生合成されていると考えられている。律速酵素GDP-L-galactosephosphorylase(GGP)も推定されているが、GGPの過剰発現ではAsA量は数倍しか増加しないことから、その詳細は不明である。またAsA生合成経路の最終酵素であるL-galactono-1,4-lactone dehydrogenase(GaILDH)はミトコンドリアに局在しているが、他の生合成酵素はすべて細胞質で機能している。AsAの最終前駆体L-ガラクトノ-1,4-ラクトンまでは細胞質で順次変換された後、ミトコンドリアでAsAに変換されているため、AsA生合成に関わる一連の反応のすべてが細胞質で行われると、より効果的なAsA生合成が見込まれる。そこで申請者は植物のAsA強化を目的として、AsA生合成酵素の発現とAsA生合成経路に着目して解析を行なった。

2. 研究の目的

本研究では、AsA生合成酵素の発現とAsA生合成経路に着目してAsA量の強化を目指した基礎研究を展開した。AsA生合成酵素は6種類あるため、AsA量に影響を与える酵素を明らかにし、AsA強化へと繋げる。また最終酵素GaILDHの局在を細胞質に変えることによってAsA生合成を効率化することも研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では低AsA含有植物のモデルとしてシロイヌナズナを用いた。またシロイヌナズナへの導入遺伝子の発現確認を容易にするため、アセロラ(*Malpighia glabra* L.)のAsA生合成酵素を利用した。

(1) アセロラMgGGP遺伝子のプロモーター活性評価

アセロラMgGGP遺伝子の開始コドンから1700bp上流までの領域について、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子の5'上流に挿入したプロモーターアッセイ用のベクターを作製した後、シロイヌナズナのプラントレットを用いてアセロラMgGGP遺伝子のプロモーター活性を測定した。

(2) AsA量に対するAsA生合成酵素群の発現についての解析

一過的過剰発現系によりAsA量を劇的に向上させるAsA生合成酵素の過剰発現の組合わせを検討した。得られた知見をもとに、シロイヌナズナに複数のAsA生合成酵素遺伝子を過剰発現させるベクターを導入した。

(3) アセロラMgGaILDHの局在性改変によるAsA量に対する影響評価

AsA生合成の最終酵素であるGaILDHだけがミトコンドリアに局在しているため、GaILDHを細胞質に局在させて、AsA量の変動を測定する。そのため、アセロラMgGaILDHの一次構造内にあるミトコンドリア局在シグナルを同定した後、ミトコンドリア局在シグナルを欠失したアセロラMgGaILDHを発現させ、AsA量に対する影響を評価した。

4. 研究成果

(1) アセロラMgGGP遺伝子のプロモーター活性評価

アセロラMgGGP遺伝子のプロモーター活性はシロイヌナズナのものと比較して高いことを明らかにしているが(Kondo T et al., 2017)、アセロラMgGGP遺伝子は不明であった。そのため、アセロラMgGGP遺伝子のプロモーターアッセイ用のベクターを作製し、シロイヌナズナのプラントレットに一過的に導入してプロモーター活性を測定した。アセロラとシロイヌナズナのGGP遺伝子のプロモーターを比較したところ、アセロラMgGGP遺伝子のプロモーター活性はシロイヌナズナのものに比べて1.6倍高いことが明らかになった。アセロラにおいて、6種類のAsA生合成酵素が高く発現していること、アセロラMgGGPとMgGGP遺伝子の高いプロモーター活性を有することから、アセロラのAsA生合成酵素遺伝子の高いプロモーター活性によるAsA生合成酵素の高発現が、アセロラの高AsA含量の要因の一つである可能性が明らかになった。

(2) AsA 量に対する AsA 生合成酵素群の発現についての解析

アセロラでは 6 種類の AsA 生合成酵素が高く発現していることから、低 AsA 含量植物において AsA 生合成酵素遺伝子を過剰発現させることを試みた。植物において構成的高発現プロモーターとして一般的に用いられているカリフラワーモザイクウイルス CaMV35S プロモーターの下流に 6 種の AsA 生合成酵素遺伝子を挿入した遺伝子発現カセットを、それぞれ作製した。作製した遺伝子発現カセットを低 AsA 含有植物としてトマトのプロトプラストに遺伝子導入して AsA 量の測定した (図 1)。その結果、アセロラ MgGGP の単独発現でも AsA 量を増加させたが、MgGGP とともに MgGMP と MgGME の共発現させた場合、最も高く AsA 量を増加させることが明らかになった。一方、下流 3 つの酵素遺伝子 (GPP、L-galactose dehydrogenase; GDH および GaILDH) では、3 つの遺伝子を共発現させても AsA 量の増加は認められなかった。植物の AsA 強化に AsA 生合成経路の上流 3 つの AsA 生合成酵素の過剰発現が重要であることが明らかになった。次に、AsA 生合成経路の上流 3 つの AsA 生合成酵素 (MgGMP、MgGME および MgGGP) を共発現させるために、それぞれの遺伝子発現カセットを Gateway Recycling Cloning 法により単一の遺伝子発現ベクターにサブクローニングして、複数遺伝子の共発現用ベクターを作製した。作製した共発現ベクターをシロイヌナズナに遺伝子導入した。その結果、共発現ベクターを遺伝子導入したシロイヌナズナを測定したところ、一過的な過剰発現の結果と比較して、AsA が強化されない可能性が示唆された。今回、AsA 生合成酵素を過剰発現させるために、いずれも CaMV35S プロモーターを用いる。同一ベクターにおいて縦列で複数の同一プロモーターを用いているため、すべての遺伝子が高発現していない可能性があるため、今後は、共発現ベクターを導入したシロイヌナズナにおける導入遺伝子の発現量を検討する必要がある。

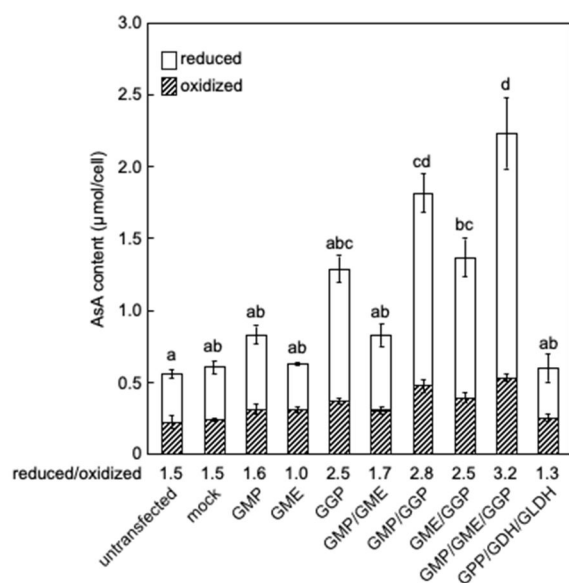


図 1. トマトのプロトプラストにおける AsA 生合成酵素遺伝子の過剰発現と AsA 量の影響

(3) アセロラ MgGaILDH の局在性改変による AsA 量に対する影響評価

AsA 生合成の最終酵素である GaILDH はミトコンドリアに局在していることが知られている。そこでアセロラ MgGaILDH について、GFP を融合させた MgGaILDH の細胞内局在を確認した (図 2 A)。ミトコンドリアで GFP 蛍光シグナルを検出したため、MgGaILDH を細胞内に局在させることを目的に、MgGaILDH を N 末端領域に着目して局在解析を行なった。その結果、MgGaILDH の N 末端領域に存在するミトコンドリア局在シグナルが明らかになった (図 2 B)。次いで、MgGaILDH のミトコンドリア局在シグナルを欠失した遺伝子をシロイヌナズナのプロトプラストに導入して AsA 量を測定した。その結果、ミトコンドリア局在シグナルを欠損させた MgGaILDH を過剰発現させたプロトプラストでは有意な AsA の増加は認められなかった。今後はミトコンドリア局在シグナルを欠損させた MgGaILDH の機能を評価する必要がある。

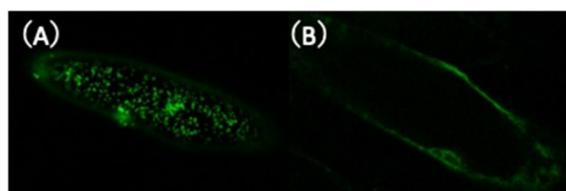


図 2. トマトのプロトプラストにおけるアセロラ MgGaILDH の局在。(A) MgGaILDH-GFP 融合蛋白質、(B) ミトコンドリアシグナル欠損 MgGaILDH-GFP 融合蛋白質

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suekawa Marina, Fujikawa Yukichi, Esaka Muneharu	4. 巻 142
2. 論文標題 Exogenous proline has favorable effects on growth and browning suppression in rice but not in tobacco	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plaphy.2019.06.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suekawa Marina, Fujikawa Yukichi, Inoue Akari, Kondo Takayuki, Uchida Eriko, Koizumi Takeshi, Esaka Muneharu	4. 巻 83
2. 論文標題 High levels of expression of multiple enzymes in the Smirnoff-Wheeler pathway are important for high accumulation of ascorbic acid in acerola fruits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1713~1716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1608808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北村風花、國川彩香、坂本真吾、末川麻里奈、藤川愉吉、江坂宗春
2. 発表標題 トマトのアスコルビン酸生成改変による アスコルビン酸強化
3. 学会等名 第34回 バイオテクノロジー研究成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末川麻里奈、北村風花、末永綾希、井上明香里、近藤隆之、藤川愉吉、江坂 宗春
2. 発表標題 植物におけるアスコルビン酸生成経路に関する研究
3. 学会等名 第33回バイオテクノロジー研究成果発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末川麻里奈, 井上明香里, 近藤隆之, 藤川愉吉, 内田絵理子, 小泉雄史, 江坂宗春
2. 発表標題 アセロラにおけるアスコルビン酸生成酵素遺伝子群の高発現に関する解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukichi Fujikawa, Marina Suekawa, Muneharu Esaka
2. 発表標題 Elucidation of high accumulation mechanism of ascorbic acid in Acerola (Malpighia glabra)
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019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