

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19179

研究課題名(和文) 真の植物ビタミンC再生機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the true vitamin C recycling system in plants

研究代表者

丸田 隆典 (Maruta, Takanori)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：50607439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物におけるアスコルビン酸再生系の分子機構と生理機能について包括的に検討した。まず既知のアスコルビン酸再生酵素(DHARおよびMDAR)の生理学的重要性について多重変異株を用いて解析したが、強光ストレス条件下のアスコルビン酸ターンオーバーへの影響はわずかであった。そこで、これらの酵素の機能を補う仕組みを追求し、還元型グルタチオンとDHARの協働が強光ストレス条件下のアスコルビン酸の高蓄積に不可欠であることを初めて証明した。また、タンパク質システイン残基を介したアスコルビン酸再生系の存在が示唆され、植物はさまざまな再生機構を冗長的に持つことでアスコルビン酸を高蓄積することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、アスコルビン酸の生合成機構は解明されてきたが、再生の仕組みや生理学の意義は不明であった。本研究の成果により、植物は既知のDHARおよびMDARに加えて、還元型グルタチオンやタンパク質システイン残基を介した仕組みを冗長的に持つことで、還元型のアスコルビン酸を高濃度に蓄積できることが初めて明らかになった。アスコルビン酸はヒトの栄養に不可欠であり、この成果はアスコルビン酸高含有作物の育種に貢献することが期待される。また、未だ不明瞭な動物のアスコルビン酸再生系の解明にも重大なヒントをもたらす結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms and physiological function of ascorbate recycling in plants were investigated. We first studied physiological significance of known ascorbate recycling enzymes (DHAR and MDAR) using knockout mutants and found only slight impacts of these enzymes on ascorbate turnover under high light. Next, we tried to identify other systems that complement DHAR and MDAR and found that cooperation of reduced glutathione and DHARs are crucial for ascorbate accumulation under high light. Further analyses suggested that oxidized ascorbate is recycled back to ascorbate by cysteine residues of proteins. Thus, our work demonstrate that plants have multiple systems for ascorbate recycling to accumulate this compound at very high levels.

研究分野：植物生理生化学

キーワード：アスコルビン酸 還元酵素、デヒドロアスコルビン酸 還元酵素、デヒドロアスコルビン酸還元酵素、モノデヒドロアスコルビン酸、グルタチオン、環境順応、植物

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミンC (アスコルビン酸) は我々ヒトの健康や美容に欠かせない栄養素として、一般にもっとも馴染みのあるビタミンである。合成酵素の遺伝的欠損のため、我々は同ビタミンを食事から摂取しなければならず、その主な供給源は野菜や果実などの植物である。

植物はアスコルビン酸を高濃度 (数十 mM) で蓄積する。しかし依然として、「なぜ、どのようにして植物はビタミンCを高蓄積するのか?」という根本的な謎は未解明であった。アスコルビン酸の生理作用はその還元型に依存しており、酸化型、すなわちモノデヒドロアスコルビン酸 (MDHA) およびデヒドロアスコルビン酸 (DHA) は極めて不安定である。したがって、アスコルビン酸を還元型で高濃度に蓄積し、その生理作用を最大限に発揮するためには、酸化型からの再生が極めて重要である。

植物は MDHA および DHA の特異的な還元酵素 (それぞれ MDAR および DHAR) を持つ。モデル植物には 5 つの MDAR と 3 つの DHAR アイソフォームが存在する (図 1)。これらは細胞質、葉緑体、ミトコンドリアまたはペルオキシソームに分布することで、オルガネラから細胞レベルでのアスコルビン酸レベルおよびレドックス状態の維持に重要であると考えられているが、その詳細は不明であった。

私たちはこれらの酵素の欠損株を用いて、特に強光ストレス条件におけるアスコルビン酸ターンオーバーへの影響を調べてきたが、個々の遺伝子の欠損株では野生株との明確な違いが見られなかった。そこで、全 3 つの DHAR を欠損させた三重欠損株 ( $\Delta dh ar$ ) を作出したが、アスコルビン酸再生への影響はほとんど見られなかった。これらの結果から、DHAR や MDAR の生理学的重要性は依然として不明のままであり、新規経路の存在も強く示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、アスコルビン酸再生の分子機構と生理学的重要性を明確化することである。これにより、アスコルビン酸ターンオーバーの観点から「なぜ、どのようにして植物はビタミンCを高蓄積するのか?」という疑問に回答することを目指した。具体的には、既知の再生酵素 (DHAR および MDAR) の生理学的重要性をより詳細に検討するとともに、これらの仕組みを相補する新規経路の可能性について、生理生化学、分子遺伝学およびプロテオミクス手法により検討した。

## 3. 研究の方法

上述の  $\Delta dh ar$  三重欠損株に加え、MDAR アイソフォームの欠損株、グルタチオンやアスコルビン酸の合成変異株を交配し、さまざまな組み合わせの多重変異株を作出した。これらの株に強光ストレスを付与し、アスコルビン酸レベルおよびレドックス状態を調べた。また、アスコルビン酸分解産物を定量することにより、そのターンオーバーについて検討した。

また、新規の DHA 還元経路としてタンパク質システイン残基を介した経路を想定した。その候補タンパク質を同定するために、DHA によりシステイン酸化修飾を受けるタンパク質を、スルフェン酸特異プローブ (DYn-2) を用いたプロテオミクス解析により単離した。

## 4. 研究成果

### (1) DHAR の生理学的重要性

シロイヌナズナ野生株および  $\Delta dh ar$  三重欠損株に強光ストレスを付与し、アスコルビン酸およびグルタチオンを定量した。強光照射により、野生株ではアスコルビン酸レベルが著しく増加した。一方、強光照射 24 時間以降において、 $\Delta dh ar$  におけるアスコルビン酸の増加は野生株と比べて最大で 20% 程度阻害された。この差は統計学的に有意であったが、大きいとは言えず、アスコルビン酸レドックス状態には違いがなかった。さらに、野生株と  $\Delta dh ar$  の強光ストレス感受性に差がなかったことも考慮すると、DHAR のアスコルビン酸再生への寄与は大きくなく、他の仕組みによって十分に相補されることが明らかになった。興味深いことに、 $\Delta dh ar$  では強光条件でのグルタチオンの酸化が抑制された。DHAR は還元型グルタチオン (GSH) 依存的な DHA 還元反応を触媒するため、細胞内では GSH 酸化酵素としても機能的であるかもしれない。

野生株と  $\Delta dh ar$  のアスコルビン酸レベルにおける差は、アスコルビン酸濃度の顕著に増加する強光照射 24 時間後以降に明確になった。このことは、DHAR のアスコルビン酸再生酵素としての重要性が細胞内アスコルビン酸レベルに依存的可能性を示唆した。このことを詳細するために、アスコルビン酸欠乏変異株 (*vtc2*) と  $\Delta dh ar$  を掛け合わせ、 $\Delta dh ar vtc2$  四重変異株を作出した。通常条件下において、*vtc2* および  $\Delta dh ar vtc2$  四重変異株は野生株の約 30% のアスコルビン酸を保持した。これらに強光を照射したところ、両株でアスコルビン酸レベルの増加が認められたものの、株間での差はまったく見られなかった。このように、野生株と  $\Delta dh ar$  を比較した場合に現れるアスコルビン酸レベルの差が、*vtc2* バックグラウンドでは消失したことから、DHAR

はアスコルビン酸が高いときに重要であり、低濃度のときは他の仕組みで十分に相補されうることが示された。

### (2) MDAR の生理学的重要性

MDAR の生理機能について、各アイソフォームの欠損株を掛け合わせて多重欠損株を作出し、単独変異株とともに激しい強光、マイルドな強光、あるいは変動光（弱光と強光の繰り返し）ストレスに曝した。その結果、いずれの株においてもアスコルビン酸レベルやレドックス状態に野生株との明確な差は見られなかった。

興味深いことに、ペルオキシソームに局在する MDAR1 と MDAR4 の二重欠損は胚性致死を引き起こすことが明らかになった。この結果から、MDAR は植物に不可欠であることが示されたが、胚性致死のために詳しい解析ができず、この表現型がアスコルビン酸再生の欠失に起因するかどうかは不明である。

### (3) 還元型グルタチオンによる DHAR の相補

$\Delta dhar$  三重欠損株でさえ、アスコルビン酸を高濃度に蓄積し、強光ストレスに順応できる点に着目し、新たな DHA 還元系として GSH そのものに注目した。上述の通り、GSH は DHAR の電子供与体であるが、GSH 自身も非酵素的に DHA をアスコルビン酸に還元することができる。ただし、この非酵素反応は GSH チオールの脱プロトン化が必要であり、その pKa は約 9.0 と高いため、細胞質のような中性環境で機能的かどうかは未解明であった（図 1）。

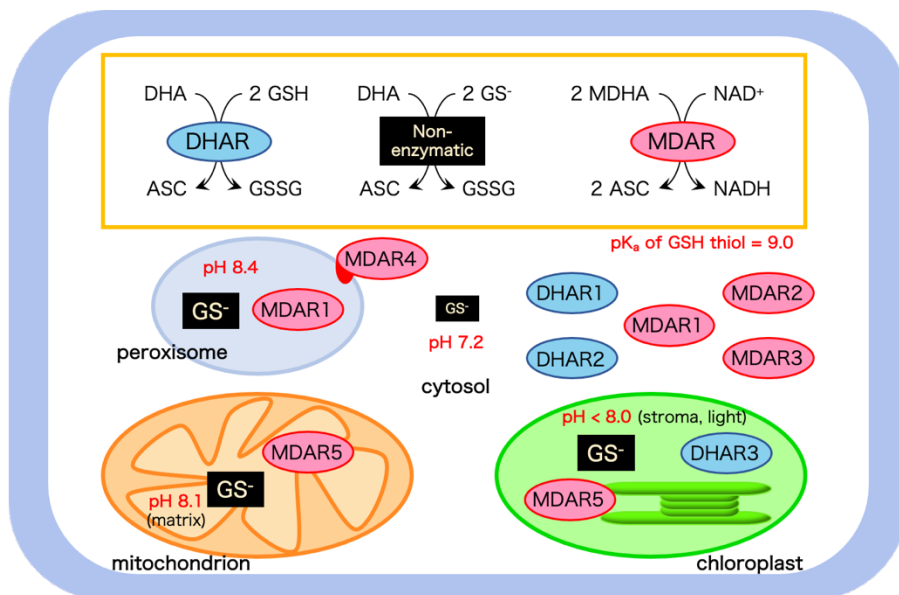


図 1 アスコルビン酸再生酵素と GSH の細胞内分布

GSH が DHAR の欠損を補う可能性について検討するため、GSH 合成変異株 (*pad2*) を用いた。*pad2* 変異株は野生株の約 30% の GSH を含む。DHAR の GSH に対する  $K_m$  値は mM オーダーと高いため、*pad2* 単独欠損株においても *in vivo* における DHAR 活性が低下し、GSH 欠乏との二重の影響を調べることが可能であると予想された。しかし、驚くべきことに、強光条件の *pad2* におけるアスコルビン酸の蓄積レベルやレドックス状態に野生株との差は見られなかった（図 2）。そのため、GSH もアスコルビン酸再生に不要である可能性が示唆された。

より詳細な検討のために、*pad2* と  $\Delta dhar$  を掛け合わせ、 $\Delta dhar pad2$  四重変異株を作出した。その結果、通常条件において  $\Delta dhar pad2$  四重変異株のアスコルビン酸レベルに野生株との差は見られなかった。しかしながら、強光ストレス条件では、アスコルビン酸レベルの増加がほぼ完全に抑制された（図 2）。さらに、同様の結果は  $\Delta dhar$  株に GSH 生合成阻害剤処理を行なった葉でも認められた。したがって、DHAR 酵素反応と GSH 非酵素反応の協働がアスコルビン酸レベルの維持に必要であると考えられたが、一方でアスコルビン酸レドックス状態への影響はわずかであった。この原因として、DHA の不安定性が考えられた。

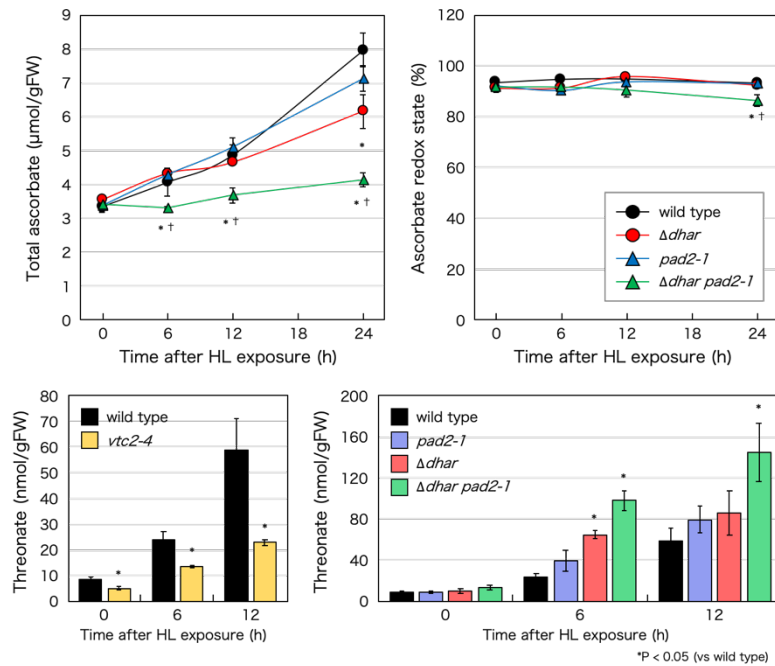


図2 強光条件下のアスコルビン酸再生へのDHARおよびGSHの協働  
野生株、 $\Delta dhar$ 、 $pad2$ 、 $\Delta dhar pad2$ または $vtc2$ 株に強光ストレスを付与し、アスコルビン酸レベル(左上)、アスコルビン酸レドックス状態(右上)およびL-トレオン酸レベル(下2つ)を定量した。

$\Delta dhar pad2$  四重変異株でアスコルビン酸ターンオーバーが促進されているかどうかを調べるため、アスコルビン酸分解産物としてシュウ酸およびL-トレオン酸の定量を試みた。その結果、シュウ酸はシロイヌナズナから検出不可能であったが、L-トレオン酸は検出できた。野生株において、L-トレオン酸レベルは強光照射に伴って増加し、この増加は $vtc2$ 株では抑制されたことから、アスコルビン酸由来であることが明らかになった。さらに、強光照射後のL-トレオン酸の増加は $\Delta dhar pad2$  四重変異株でもっとも顕著であり、この株ではアスコルビン酸分解が促進されていることが明らかになった(図2)。また、 $\Delta dhar pad2$  四重変異株は、野生株や他の変異株と比較して強光ストレスに脆弱であり、著しい葉のブリーチングを示した。これらの結果から、DHAR酵素反応とGSH非酵素反応の協働が強光条件下のアスコルビン酸高蓄積に必要不可欠であり、強光ストレス耐性にも重要であることが初めて明らかになった。

#### (4) タンパク質システイン残基を介した新規アスコルビン酸再生系の可能性

$\Delta dhar pad2$  四重変異株では強光ストレス条件下でのアスコルビン酸増加がほぼ完全に抑制されたことから、グルタチオンを介した酵素・非酵素反応の重要性は明らかになったが、通常生育条件下では野生株との違いがないことから、依然として新規経路の存在が示唆された。

新規のDHA還元経路としてタンパク質システイン残基を介した経路を想定した。従来のDHAR反応も触媒システインのレドックスサイクルによって起こるため、別のタンパク質でも十分に起こりうると思われる。ただし、 $\Delta dhar$ ではGSH依存のDHA還元活性がほぼゼロになるため、新規経路への還元力はGSHではなく、別の仕組み(おそらくチオレドキシン)に由来すると予想される。このような想定のもと、DHAによりシステイン酸化修飾を受けるタンパク質の同定を試みた。

まず、DHAによるタンパク質システイン酸化が起こるかどうか調べるために、シロイヌナズナ培養細胞にスルフェン酸特異プローブ(DYn-2)とDHAを処理し、スルフェン酸ラベル化後のウェスタンブロット解析を行なった。その結果、高濃度(10 mM)でさえ、DHAによるタンパク質酸化の亢進は認められなかった。これはGSH依存経路によるDHA還元速度が速いためだと考え、次に培養細胞をGSH生合成阻害剤処理し、同様の実験を行なった。その結果、10 mM DHA処理によって、ポジティブコントロールとして用いた10 mM  $H_2O_2$ を処理した場合と同程度のタンパク質酸化が認められた(図3)。これらの結果から、DHAがタンパク質システインを酸化しうることを示唆され、新規経路の可能性が高まった。さらに、プロテオミクスによりDHAによってシステイン酸化修飾を受けるタンパク質を複数同定することができた。これらのタンパク質が新規のGSH非依存DHARとして機能的である可能性が示唆された。

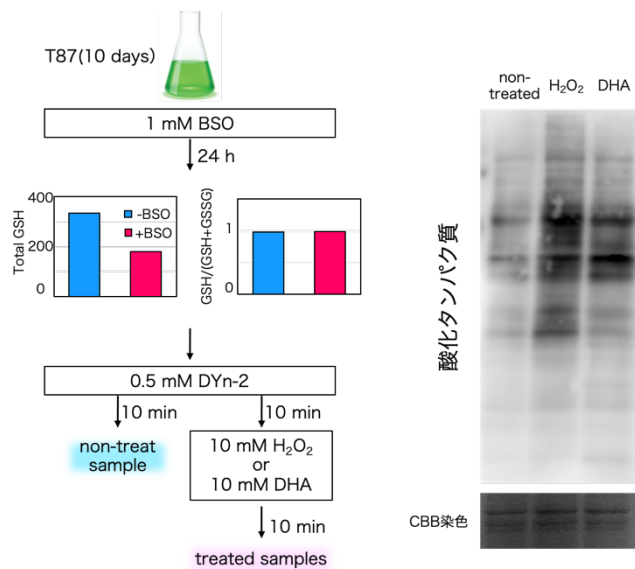


図3 DHAによるタンパク質酸化

シロイヌナズナ培養細胞 (T87) に GSH 生合成阻害剤 (BSO) を処理し、GSH レベルを低下させた (左中)。その後、スルフェン酸プローブ (DYn-2) を 10 分間、続いて 10 mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> または DHA を 10 分間処理した。ラベル化したタンパク質をウエスタンブロットにより検出した (右)。

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 Terai Yusuke, Ueno Hiromi, Ogawa Takahisa, Sawa Yoshihiro, Miyagi Atsuko, Kawai-Yamada Maki, Ishikawa Takahiro, Maruta Takanori	4. 巻 183
2. 論文標題 Dehydroascorbate Reductases and Glutathione Set a Threshold for High-Light?Induced Ascorbate Accumulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 112 ~ 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.19.01556	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13件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 上野祐美、寺井佑介、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 グルタチオンはデヒドロアスコルビン酸還元酵素の機能を相補する
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kana Kikuraku, Gen Mitomi, Takahisa Ogawa, Takahiro Ishikawa, Frank Van Breusegem, Takanori Maruta
2. 発表標題 Distinct impacts of cytosolic and chloroplastic ascorbate peroxidases on cell death in catalase-deficient plants.
3. 学会等名 14th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺井佑介、田中 澗、上野祐美、小川貴央、宮城敦子、川合真紀、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 強光下におけるグルタチオン依存的なアスコルビン酸再生
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 濠、寺井佑介、上野祐美、小川貴央、宮城敦子、川合真紀、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 強光ストレス下の植物におけるアスコルビン酸再生機構
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度 福岡大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 濠、上野祐美、寺井佑介、小川貴央、Frank Van Breusegem、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 酸化ストレス条件下におけるアスコルビン酸再生系
3. 学会等名 日本農芸化学会 中四国支部第51回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Terai, Hiromi Ueno, Mio Tanaka, Takahisa Ogawa, Frank Van Breusegem, Takahiro Ishikawa, Takanori Maruta
2. 発表標題 Glutathione-dependent enzymatic and non-enzymatic pathways for dehydroascorbate reduction are crucial for ascorbate pool size regulation under high light.
3. 学会等名 International Conference on Arabidopsis Research ICAR2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野祐美、寺井佑介、小川貴央、澤 嘉弘、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 グルタチオン依存的なアスコルビン酸再生は光ストレス耐性に必須である
3. 学会等名 日本農芸化学会 中四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸田隆典、石川孝博
2. 発表標題 植物におけるアスコルビン酸代謝酵素の分布と進化
3. 学会等名 日本DNA多型学会 第27回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野祐美、寺井佑介、小川貴央、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 植物におけるデヒドロアスコルビン酸還元システム
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 丸田隆典
2. 発表標題 アスコルビン酸のレドックスサイクルと植物の光環境順応：ようやく見えてきた酸化ストレス防御機構の頑健性とその分子基盤
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸田隆典
2. 発表標題 なぜ、そしてどのように植物はアスコルビン酸を高濃度に蓄積するのか？
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 濱田あかね、寺井佑介、小川貴央、宮城敦子、川合真紀、石川孝博、丸田隆典
2. 発表標題 グルタチオン依存的なアスコルビン酸再生系の分子機構
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸田隆典
2. 発表標題 植物環境順応におけるアスコルビン酸と活性酸素種の相互作用に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究 分担者	小川 貴央  (Ogawa Takahisa)  (80603802)	島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授   (15201)	

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
---------	---------