

平成21年 5月19日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580108

研究課題名（和文）アセロラにおけるアスコルビン酸の生合成と大量集積機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of mechanism of biosynthesis and accumulation of a large amount of ascorbic acid.

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：70151975

研究成果の概要：熱帯植物の一つであるアセロラは、特に果実に大量のアスコルビン酸を含む（レモンの20倍以上）。本研究は、植物のアスコルビン酸の増強を目的として、アセロラのアスコルビン酸生合成遺伝子をクローニングし、その発現機構を調べ、アセロラに大量のアスコルビン酸が生合成・集積する機構について明らかにするとともに、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させ、アスコルビン酸高含量遺伝子組換え植物の作出をめざしたものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：アスコルビン酸、アセロラ、遺伝子発現、ストレス抵抗性植物、cDNA、
ビタミンC、酵素、クローニング

1. 研究開始当初の背景

アスコルビン酸は、ビタミンCともいわれ、もともと抗壊血病因子として発見されたが、最近では、抗癌作用や抗ウイルス作用などの多彩な生理作用が認められ、健康生活をおくるためにはかなりの量のアスコルビン酸を摂取する必要がある。私たちは、アスコルビン酸を野菜や果物などの植物から摂取して

いるにもかかわらず、植物のアスコルビン酸の生理機能や生合成経路に関しては未だ明確になっていない。アスコルビン酸は植物組織に高濃度で存在しており、多くの生理機能を有していると考えられている。一般に、植物のアスコルビン酸は光合成によって生じる過酸化水素の除去や外的環境による酸化

ストレスの防御に利用されている。実際に、強い光や紫外線を受ける熱帯性植物、たとえば、アセロラやカムカム等のトロピカルフルーツでは、アスコルビン酸が驚くほど多量に合成され、果実中に集積することが知られている。逆に、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 *vtc1* は、オゾン傷害に対して感受性が高くなることが報告されている。一方、アスコルビン酸は、それ自身が持つ抗酸化機能とともに、種々の酵素反応の補因子として機能することが知られており、生体内代謝に必須の化学物質である。アスコルビン酸は、可逆的な酸化還元系を介した電子供与体、あるいは受容体として、レドックス制御にも関与していると考えられている。一方、植物のアスコルビン酸は細胞分裂促進機能を有することも知られている。

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た。しかし、一方では、その他のアスコルビン酸生合成経路も植物に存在することが示唆されるようになり、植物には複数のアスコルビン酸生合成経路が存在し、それらが植物の組織や周囲の環境により複雑に制御され、アスコルビン酸が生合成されると考えられるようになった。

このように、これまでに、アスコルビン酸に関する様々な研究があるが、未だに、植物のアスコルビン酸の生理機能や、生合成、集積機構については明確になっていない。

2. 研究の目的

本研究は、アスコルビン酸含量が驚くほど高いトロピカルフルーツであるアセロラのアスコルビン酸生合成、集積機構に着目した

ものである。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、レモンのアスコルビン酸含量の約50倍にも達し、水分を除いた可溶性成分のほとんどは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に関する分子細胞レベルの研究は、これまでに全くない。本研究では、アセロラのアスコルビン酸生合成経路を解析するとともに、アスコルビン酸の生合成を律速すると考えられているアスコルビン酸生合成酵素の酵素化学的特性や遺伝子発現を解析し、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、果実に集積することができるのかを明らかにする。すなわち、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素の cDNA をクローニングし、その構造を推定し、これまで調べられている他の植物由来の同酵素の構造と比較する。さらに、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素 cDNA を大腸菌に導入し、本酵素を大腸菌による組換えタンパク質として発現させ、その触媒機能活性（比活性）を、アスコルビン酸含量が必ずしも高くないタバコやレモン等の組換え酵素のものと比較し、酵素化学的な観点から、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素の触媒活性が高いかどうかを調べる。また、アセロラの各組織でのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の発現様式、発現量を調べ、他のタバコやレモン等のアスコルビン酸生合成酵素の発現と比較し、アセロラに存在する多量のアスコルビン酸が、アスコルビン酸生合成酵素の高い発現量によるものかどうかを調べる。さらに、アセロラのアスコルビン酸の組織や細胞内における生合成場所や果実に存在する多量のアスコルビン酸が細胞内のどこに集積しているのかについても解明する。アセロラにおける高いアスコルビン

酸含量が、紫外線や光照射による酸化ストレスへの抵抗性にどのように関わっているかを調べるとともに、アセロラに集積する多量なアスコルビン酸がアセロラの成長生育に、また、ホルモン応答性にどのように関係しているかについても検討する。

アセロラにおけるアスコルビン酸の大量集積機構を解明することができたら、応用学的な観点から、その集積機構を、アスコルビン酸含量の低い他の植物に導入し、アセロラのようなアスコルビン酸高含量植物の開発が可能かどうかを検討する。具体的には、形質転換が比較的容易なトマトに、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子を導入し、それらを過剰発現させることにより、アスコルビン酸含量の高いトマトを作出できないかどうかを検討する。本研究により、アスコルビン酸を強化したトマトが作出できれば、得られたトマトは、活性酸素の除去が効率的に行なわれ、老化、腐敗が防止されるとともに、光酸化ストレス等の種々の環境ストレスに対しても抵抗性を有する可能性がある。すなわち、本研究により、アスコルビン酸に富む栄養価の高い植物を、さらに、ストレス抵抗性で、腐りにくい、枯れないスーパー植物を作出できる可能性も秘めている。

本研究は、アセロラのアスコルビン酸生合成・大量集積機構の解明という基礎的な研究としてだけでなく、農作物のアスコルビン酸含量を増やすという応用学的観点からも価値ある研究と考える。

3. 研究の方法

アセロラにおけるアスコルビン酸生合成酵素の発現様式の解析を行った。アセロラのアスコルビン酸生合成酵素の cDNA について、RT-PCR 法、RACE 法を用いてクローニング後、ノーザンブロットィングおよびリアルタイム

PCR 法により、アセロラ植物体の各組織のアスコルビン酸生合成酵素 mRNA の発現様式を調べた。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遺伝子組換えタバコを作出した。

4. 研究成果

熱帯植物の一つであるアセロラは、特に果実に大量のアスコルビン酸を含む（レモンの 20 倍以上）。本論文は、植物のアスコルビン酸の増強を目的として、アセロラのアスコルビン酸生合成遺伝子をクローニングし、その発現を調べた。また、アセロラに大量のアスコルビン酸が含まれる機構について考察するとともに、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させ、アスコルビン酸高含量遺伝子組換え植物を作出した。

(1) 植物のアスコルビン酸生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。ノーザンブロットィング解析から、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、アセロラは 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、アスコルビン酸生合成系 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。

本研究において、アセロラが、どのような機構で、アスコルビン酸を大量に蓄積できるのかを調べた。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 9 件)

1. Badejo AA, Eltelib HA, Fukunaga K, Fujikawa Y, Esaka M. Increase in ascorbate content of transgenic tobacco plants overexpressing the acerola (*Malpighia glabra*) phosphomannomutase gene. *Plant Cell Physiol.* 査読有 50(2):423-428 (2009).

2. Badejo A. A, Fujikawa Y, Esaka M. Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of Smirnoff-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*). *J. Plant Physiol.* 査読有 166(6):652-660

(2009).

3. Tokunaga T. Miyata Y. Fujikawa Y. Esaka M. RNAi-mediated knockdown of the XIP-type endoxylanase inhibitor gene, OsXIP, has no effect on grain development and germination in rice. *Plant Cell Physiol.* 査読有 49(7):1122-1127 (2008),

4. Oshima Y. Kamigaki A. Nakamori C. Mano S. Hayashi M. Nishimura M. Esaka M. Plant catalase is imported into peroxisomes by Pex5p but is distinct from typical PTS1 import. *Plant Cell Physiol.* 査読有 49(4):671-677 (2008).

5. Badejo A. A, Tanaka N, Esaka M. Analysis of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene promoter from acerola (*Malpighia glabra*) and increase in ascorbate content of transgenic tobacco expressing the acerola gene. *Plant Cell Physiol.* 査読有 49(1):126-132 (2008).

6. Jeong S.T. Goto-Yamamoto N. Hashizume K. Esaka M. Expression of multi-copy flavonoid pathway genes coincides with anthocyanin, flavonol and flavan-3-ol accumulation of grapevine. *Vitis* 査読有 47:135-140 (2008)

7. Tokunaga T. Esaka M. Induction of a novel XIP-type xylanase inhibitor by external ascorbic acid treatment and differential expression of XIP-family genes in rice. *Plant Cell Physiol.* 査読有 48:700-714 (2007).

8. Badejo A. A. Jeong S. T. Goto-Yamamoto N. Esaka M. Cloning and expression of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene and ascorbic acid content of acerola (*Malpighia glabra* L.) fruit at ripening stages. *Plant Physiol. Biochem.* 査読有 45:665-672 (2007).

9. Badejo A. A. Jeong S. T. Goto-Yamamoto N. Esaka M. Molecular cloning and expression of GDP-D-mannose 3",5"-epimerase during fruit ripening in acerola. *Acta Horticulturae.* 査読有 763:91-97 (2007).

[学会発表] (計7件)

1. 坂本真吾、藤川愉吉、江坂宗春 タバコのアスコルビン酸生合成における GPPase の活性制御機構の解明. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月12日、神戸市、神戸ポートアイランド

2. Badejo AA, Eltelib HA, Fujikawa Y, Esaka M. Engineering Increased Vitamin C Concentration in Transgenic Tobacco with Acerola (*Malpighia glabra*) GDP-L-galactose phosphorylase Genes. AHC 2008 (The Asian Horticultural Congress 2008) December 11-13, 2008, Seogwipo, Korea.

3. 坂本真吾、村野亜沙子、藤川愉吉、江坂宗春 トマトにおけるアスコルビン酸生合成遺伝子ガラクトン酸レダクターゼの遺伝子発現, 日本農芸化学会中四国支部第22回講演会 2008年9月13日 鳥取市 鳥取大学

4. 福永 一成、寺田 龍司、加藤 もも、江坂 宗春 イネのアスコルビン酸生合成と

光応答. 日本農芸化学会 2008 年度大会,
2008 年 3 月 27 日 名古屋市 名城大学

5. 坂本 真吾、江坂 宗春 タバコにおけるアスコルビン酸生合成マンノース経路遺伝子の発現調節. 日本農芸化学会 2008 年度大会 2008 年 3 月 27 日 名古屋市 名城大学

6. Tokunaga T. Miyata Y. Esaka M.
Analysis of the molecular property and expression profile of a novel xylanase inhibitor in rice. The 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf (MBFT), 1st - 6th July 2007, Sapporo, Hokkaido, Japan

7. 坂本真吾、福永一成、江坂宗春、タバコにおけるアスコルビン酸生合成と生理機能の解明. 日本農芸化学会中四国支部第 18 回講演会 (例会) 2007 年 5 月 12 日 広島市、県立広島大学広島キャンパス

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：70151975

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者