

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月8日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580113

研究課題名（和文） アセロラの大量アスコルビン酸生合成・集積機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of molecular mechanism for active biosynthesis and abundant accumulation of ascorbic acid in acerola.

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（和文）：

アセロラは、熱帯植物の一つであるが、アスコルビン酸を、特に、果実に大量に蓄積し、その含量はレモンの20倍以上にも達する。本研究では、なぜアセロラがアスコルビン酸を高含量含むことができるか、その分子機構を解き明かした。また、アスコルビン酸増強を目的として、アセロラのアスコルビン酸の生合成酵素等の遺伝子を植物に導入発現させ、アスコルビン酸含量が2-3倍増大するアスコルビン酸高含量植物を作出した。

研究成果の概要（英文）：

Acerola (*Malpighia glabra*) is an exotic fruit cultivated primarily for its abundant ascorbate content, which is over 20-fold higher than ascorbate content in lemon. The molecular mechanisms that regulate the biosynthesis and accumulation of a large amount of ascorbic acid in acerola have been clarified in this study. Also, ascorbic acid biosynthesis-related genes from acerola have been manipulated to generate ascorbic acid-rich transgenic plants. The overexpression of acerola ascorbate biosynthetic enzyme genes resulted in two- to three-fold increase in the ascorbate content of the transgenic plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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、遺伝子組換え、遺伝子発現、酸化ストレス、ストレス抵抗性植物、熱帯性植物、ビタミンC

1. 研究開始当初の背景

ビタミンCとして知られるアスコルビン酸は、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様な生理作用が認められ、私たちが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。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、果実中に集積される。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。

また、アセロラやカムカム等の熱帯植物におけるアスコルビン酸の大量集積機構については全くというほどわかっていない。

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20倍以上にも達し、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、果実中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り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なアスコルビン酸が、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中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植物に、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植物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植物が作出できれば、活性酸素の除去が効果的に行なわれ、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やアスコルビン酸リサイクル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およびアスコルビン酸リサイクル酵素の cDNA を、RT-PCR 法、RACE 法を用いてクローニング後、ノーザンブロットイ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、リアルタイム PCR 法により、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素やアスコルビン酸リサイクル酵素の mRNA 発現をモデル植物であるシロイヌナズナの mRNA 発現と比較した。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についても調べ、シロイヌナズナのものと比較した。

さらに、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子やアスコルビン酸リサイクル酵素の遺伝子を、アグロバクテリウム法により、植物に導入、過剰発現させ、アスコルビン酸高含量遺伝子組換え植物を作出した。

4. 研究成果

熱帯植物であるアセロラは、アスコルビン酸を大量に含む植物としても知られている。特に、果実に大量のアスコルビン酸を含み、その含量はレモン果実の 20 倍以上となる。

本研究は、アスコルビン酸を大量に含有するアセロラに焦点をあて、アスコルビン酸の生合成、代謝および生理機能について調べることを目的とした。また、応用学的には、アスコルビン酸高含量ストレス抵抗性植物の作出を目指した。

まず、アセロラからアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-mannose pyrophosphorylase、およびアスコルビン酸をリサイクルする酵素 monodehydroascorbate reductase と dehydroascorbate reductase の cDNA をクローニングし、その一次構造を解析した。

また、アセロラの両酵素の遺伝子発現とアスコルビン酸含量との関係、および環境変動に伴う両酵素の遺伝子発現変動を調べた。興味深いことに、アスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-mannose pyrophosphorylase、およびアスコルビン酸をリサイクルする酵素 monodehydroascorbate reductase と dehydroascorbate reductase は、ともに、暗

所では発現が低下するものの、明所ではそれらの発現が増大した。また、monodehydroascorbate reductase と dehydroascorbate reductase は、低温処理や塩処理をすることでも発現が増大した。

アスコルビン酸を生合成酵素である

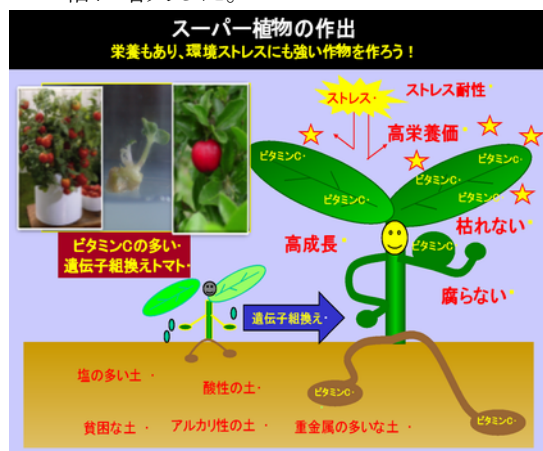
GDP-D-mannose pyrophosphorylase について、リアルタイム PCR 法を用いて、アセロラの mRNA 発現とシロイヌナズナの mRNA 発現を比較した。その結果、アセロラの GDP-D-mannose pyrophosphorylase の mRNA 発現は、シロイヌナズナの GDP-D-mannose pyrophosphorylase の mRNA 発現に比べ非常に高いことがわかった。

また、その他のアスコルビン酸生合成酵素の mRNA 発現についても同様にアセロラとシロイヌナズナのものとは比較した。その結果、調べられたアスコルビン酸生合成酵素のすべてにおいて、アセロラの mRNA 発現がシロイヌナズナの mRNA 発現に比べ著しく高かった。

さらに、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。

これらのことから、アセロラのアスコルビン酸生合成酵素の転写活性が顕著に高いことが、アセロラのアスコルビン酸の生合成能を高め、結果的にアセロラのアスコルビン酸含量が著しく高いことにつながるようになった。

アセロラのアスコルビン酸生合成酵素 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 2 ~ 3 倍に増大した。



また、アスコルビン酸リサイクリング酵素 monodehydroascorbate reductase の cDNA を導入した形質転換タバコでも、アスコルビン

酸含量が高まり、結果的に塩ストレスに対して抵抗性を示した。すなわち、アスコルビン酸をリサイクルする酵素が、環境応答的に発現しながら、酸化ストレス抵抗性の獲得にも寄与できることを示唆できた。

最終的に、本研究は、応用的に、アスコルビン酸高含量ストレス抵抗性植物の開発へと道を開くもので興味深く、今後、ますますの研究の発展が期待される。

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7件)

1. Eltelib H.A., Fujikawa Y., Esaka M. Overexpression of the acerola (*Malpighia glabra*) monodehydroascorbate reductase gene in transgenic tobacco plants results in increased ascorbate levels and enhanced tolerance to salt stress, *South African Journal of Botany*, 78, 査読有, 2012, 295-301.
2. Fujikawa Y., Fujikawa R., Iijima N., Esaka M. Characterization of secretory phospholipase A2 with phospholipase A1 activity in tobacco, *Nicotiana tabacum* (L.). *Lipids*, 47, 査読有, 2012, 303-312.
3. Eltelib H.A., Badejo A.A., Fujikawa Y., Esaka M., Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *J. Plant Physiol.* 168(6), 査読有, 2011, 619-627.
4. Fukunaga, K., Fujikawa, Y., Esaka, M., Light regulation of ascorbic acid biosynthesis in rice via light responsive cis-elements in genes encoding ascorbic acid biosynthetic enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74(4) 査読有, 2010, 888-891.
5. Azuma, R., Ito, N., Nakayama, N., Suwa, R., Nguyen, N.T., Larrinaga-Mayoral, J.A., Esaka, M., Fujiyama, H., Saneoka, H., Fruits are more sensitive to salinity than leaves and stems in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) *Scientia Horticulturae* 125(3), 査読有, 2010,

171-178.

6. Badejo A. A., Fujikawa Y., Esaka, M. Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnoff-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*). *J. Plant Physiol.*, 166(6) 査読有, 2009, 652-660.

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

[学会発表] (計4件)

1. 近藤隆之、藤川愉吉、上田晃弘、長岡俊徳、実岡寛文、Manuel Calcano, Milton Martinez, Jose Martich, 江坂宗春, 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, 24, Mar 2012, Kyoto.
2. Badejo, A. A., Esaka, M., Higher expression of vitamin C biosynthesis genes leads to higher vitamin C contents in acerola (*Malpighia glabra*) compared to *Arabidopsis thaliana*. 21st International Conference on Arabidopsis Research, 6-10 June 2010, Yokohama, Japan.
3. 坂本真吾, 渡辺元隆, 村野亜沙子, 藤川愉吉, 江坂宗春, トマトにおけるミオイノシトールオキシゲナーゼの発現解析, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食料学会九州・沖縄支部、日本食品科学工学会西日本支部、2009 年度合同沖縄大会. 31 Oct 2009, 琉球大学千原キャンパス, 沖縄県中頭郡西原町
4. Hani A. Eltelib, Adebajo A. Badejo, 藤川愉吉, 江坂宗春, Gene Expression of Vitamin C Biosynthesis and Metabolism Related Enzymes in Exotic Fruit-Acerola, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食料学会九州・沖縄支部、日本食品科学工学会西日本支部、2009 年度合同沖縄大会. 31 Oct 2009, 琉球大学千原キャンパス, 沖縄県中頭郡西原町

〔図書〕（計2件）

1. 江坂宗春, 遺伝子組換え植物・作物, 生命・食・環境のサイエンス, 江坂宗春 監修, 共立出版, 東京, 2011, 94-97.

2. Badejo, A.A., Esaka, M., Identification of potential gene targets for the improvement of ascorbate contents of genetically modified plants. In Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants, Ed. Naser A. Anjum, Shahid Umar, Ming-Tsair Chan, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2010, 405-428.

〔その他〕

ホームページ等

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

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：