

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660292

研究課題名(和文)大規模探索系による植物アスコルビン酸輸送体の同定

研究課題名(英文)Comprehensive screening for ascorbate transporter in plants

研究代表者

石川 孝博(Ishikawa, Takahiro)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60285385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物で機能未知のアスコルビン酸輸送機構解明を目的とし、シロイヌナズナのアスコルビン酸欠乏変異体を親株にEMS変異原処理を施し、クロロフィル蛍光パラメーターの一つ非光化学消光(NPQ)を指標に大規模探索を実施した。得られた複数の候補変異株のうち、32-22株はアスコルビン酸添加によるNPQ回復異常、および銀染色によるプラスチドへの銀沈着が観察されなかったことから、目的の変異体候補であることが強く推測された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed a comprehensive screening to isolate a novel Arabidopsis mutant which show abnormal recovery for non-photochemical quenching after feeding of ascorbate. We finally obtained at least two novel possibilities by following reasons; they showed low NPQ values after supplementation of ascorbate in the growth medium, and their plastids did not show any histochemical staining by silver nitrate treatment. We also confirmed that the mutants showed no substitution at least in the known causal genes including pht4;4 and npq mutants, strongly suggesting that the obtained mutants are our objectives.

研究分野：応用生物化学

キーワード：アスコルビン酸輸送体 シロイヌナズナ 非光化学消光 葉緑体

1. 研究開始当初の背景

植物はアスコルビン酸を豊富に含み、我々ヒトにとって最大のビタミンC供給源である。近年、申請者を含めた国内外の研究グループにより、植物のアスコルビン酸合成経路が明らかにされたことで、‘なぜ植物は豊富にビタミンCを含むのか?’という疑問に対する解答の一端が見えてきた。一方で植物アスコルビン酸に関して未解明の問題も存在する。すなわち、アスコルビン酸は最終的にミトコンドリアの膜間スペースで合成されるが、細胞内では特に葉緑体に高濃度で含まれること、またトマトを対象に行ったトレーサー実験よりソース器官の葉で合成されたアスコルビン酸はシンク器官の果実に転流する事実から、細胞内および組織間におけるアスコルビン酸輸送機構が存在することは明白であるが、植物アスコルビン酸輸送体に関する情報は皆無である。非光化学的消光 (Non-Photochemical Quenching ; NPQ) は、葉緑体内のアスコルビン酸レベルに依存するクロロフィル蛍光パラメーターのひとつであることから、葉緑体内のアスコルビン酸レベルの変化を間接的に評価する良い指標となる。

2. 研究の目的

本研究では、1項の背景を受け、未知の植物アスコルビン酸輸送体の単離・同定を目的としている。そのためアスコルビン酸レベルが野生株の20%程度まで低下した VTC2 遺伝子破壊株に着目し、植物アスコルビン酸輸送体候補遺伝子を包括的かつ効率的に探索・解析する手段を考案し、これを実施した。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ T-DNA 挿入による VTC2 遺伝子破壊株(VTC2-KO)を入手し、種子 200 mg (約 10,000 粒)に 0.3%EMS 処理を室温で 15 時間行い、生育させた植物体から M2 種子を収穫し、探索に用いた。変異体の探索は、プレートに播種 2 週後の植物に対し、10 mM アスコルビン酸 Na を添加し、光条件下 10 時間処理した植物体をクロロフィル蛍光イメージャー (FlourCam 800MF, PSI) により測定した。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。アスコルビン酸の組織染色は、1 mm 幅に裁断した葉組織に対し、染色液 (5% AgNO₃ in 70% (v/v) MeOH)に浸し 4、暗所に 19 時間静置した。1.0 ml の Fixing solution を 1.5 ml エッペンチューブに分注し、染色した切片を移し、4 に 2 時間以上静置した。油浸対物レンズを用いて、顕微鏡で観察した。葉緑体の単離はテープサンドイッチ法により行い、単離葉緑体のアスコルビン酸取込みは 40 mM L-[1-¹⁴C]アスコルビン酸を用

いたシリコンレイヤー法により行った。

4. 研究成果

EMS 変異原処理をした VTC2_KO の自殖 M2 植物より非光化学消光 (NPQ) を指標に、クロロフィル蛍光イメージャーによるハイスループットスクリーニングを行い、約 8,000 個体からアスコルビン酸 Na 添加後に NPQ 回復異常を示す 140 個体を選抜した。得られた個体についてアスコルビン酸 Na 添加後の NPQ 値の変化をさらに詳細に再評価し、最終的に 10 個体を選抜し、特に顕著な NPQ 回復異常が観察された 32-22、33-16、50-8 の 3 個体を対象に解析を進めた (図 1)。

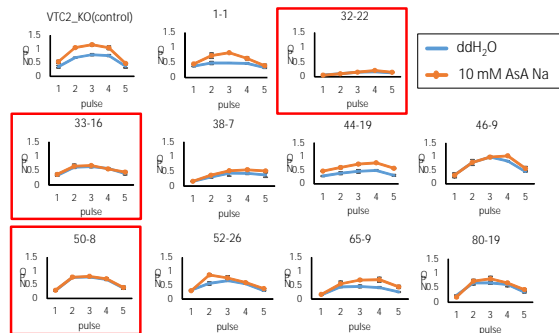


図 1. NPQ を指標としたアスコルビン酸輸送変異体の探索結果の一例。

シークエンス解析によりこれら今回選抜した 3 個体は、いずれも既知の NPQ 変異体の原因遺伝子 *VDE1*、*PsbS* および葉緑体アスコルビン酸輸送体 *PHT4;4* に変異置換のないことを確認した。硝酸銀を用いた組織染色法により葉緑体へのアスコルビン酸の取込み能の評価を行った結果、32-22 と 50-8 の 2 株はアスコルビン酸添加処理によるプラスチドの染色度合いが親株に比べ低い傾向が見られた(図 2)。

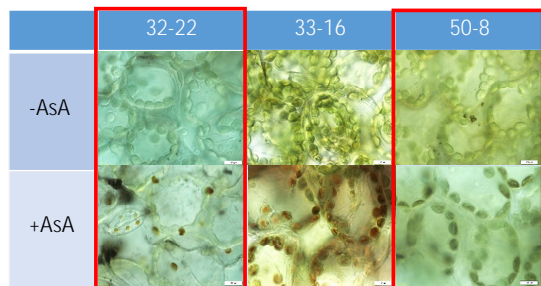


図 2. 組織染色による変異体候補株のアスコルビン酸レベル評価 .AsA: アスコルビン酸

そこでさらに、32-22 と 50-8 を対象にアスコルビン酸 Na 添加後の地上部の AsA 量を測定した。しかし、アスコルビン酸添加による AsA 量に親株との有意な差は見られなかったことから、32-22 と 50-8 は少なくとも原形質膜型の AsA 輸送変異体でない

ことが示唆された。最後に 32-22 と 50-8 から無傷葉緑体を単離し、シリコンレイヤー法により L-[1-¹⁴C]AsA の取込み活性を評価した。その結果、32-22 株は親株の VTC2_KO に比べてアスコルビン酸取込み活性が低い傾向が示されたことから、新奇の葉緑体型アスコルビン酸輸送変異体である可能性が示唆された。

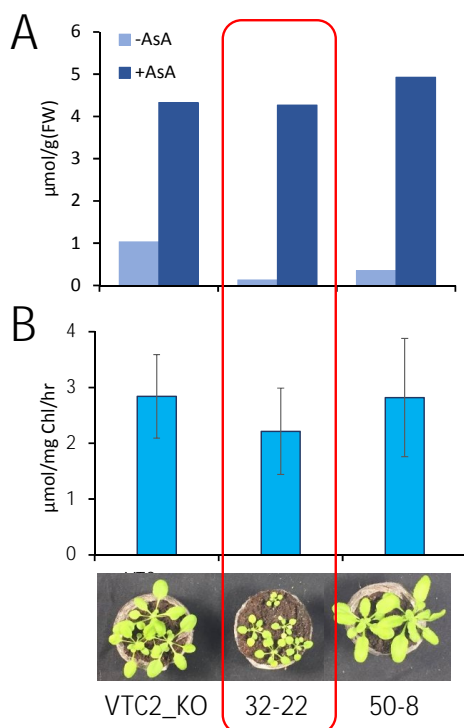


図3. 単離した変異体候補株におけるアスコルビン酸取込みレベルの評価. A; 地上部組織におけるアスコルビン酸取込みレベル, B; 単離葉緑体におけるアスコルビン酸取込み活性

今後、32-22 ラインを中心に戻し交配を進め、次世代シーケンスによる原因遺伝子を同定していくとともに、アスコルビン酸輸送変異体候補株として単離した残りの7株についても解析を進めていく。

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1件)

Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S. and Ishikawa, T. Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: More than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiol.*, in press, 2016 DOI 10.1093/pcp/pcv203

[学会発表](計5件)

袖山 翼、丸田隆典、澤 嘉弘、石川孝博

ヒメツリガネゴケに存在する2つのアスコルビン酸合成経路の機能検証. 日本農芸化学会 2016 年度大会 札幌コンベンションセンター(札幌) 2016年3月29日

種子田隼人、安本彩花、丸田隆典、吉村和也、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博 植物アスコルビン酸合成光調節の鍵酵素 GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼの機能解析. 日本ビタミン学会第67回大会 奈良県新公会堂(奈良市) 2015年6月6日

竹内 崇、丸田隆典、吉村和也、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博 シロイヌナズナ VTC2 遺伝子破壊株の機能解析. 日本農芸化学会 2015 年度大会 岡山大学津島キャンパス(岡山市) 2015年3月29日

種子田隼人、安本彩花、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博 植物アスコルビン酸合成光調節の鍵タンパク質 VTC2 の機能解析. 第37回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜(横浜市) 2014年11月27日

竹内 崇、丸田隆典、澤 嘉弘、重岡 成、石川孝博 シロイヌナズナ葉緑体のアスコルビン酸取込み活性の評価. 日本ビタミン学会第66回大会 姫路商工会議所(姫路市) 2014年6月14日

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://shimane-univ-biochemistry.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 孝博 (ISHIKAWA, Takahiro)

島根大学生・物資源科学部・教授

研究者番号: 60285385

(2)研究分担者

秋廣 高志 (AKIHIRO, Takashi)
島根大学生・物資源科学部・助教
研究者番号： 40508941

(3)連携研究者

該当なし()

研究者番号：

(4)研究者協力者

竹内 崇 (TAKEUCHI, Takashi)
阿部 卓磨 (ABE, Takuma)
Nicholas Smirnoff