

博士論文

熱帯植物のアスコルビン酸高集積機構の解明

(要約)

平成 29 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

近藤隆之



博士論文

熱帯植物のアスコルビン酸高集積機構の解明

(要約)

平成 29 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

近藤隆之

## 熱帯植物のアスコルビン酸高集積機構の解明

(要約)

### 序論

植物では、光合成により活性酸素種が生成されるだけでなく、光や乾燥、塩、高温、低温などの環境ストレス条件下では活性酸素種の生成量はさらに増大する。活性酸素種の生成・蓄積は、細胞内の脂質やタンパク質、核酸の酸化や酵素活性の阻害などの酸化ストレスとなるため、活性酸素種のすみやかな除去は植物のストレス回避に非常に重要である。アスコルビン酸は、強い還元能を有しており、活性酸素種の除去において重要な役割を果たしている。高等植物のアスコルビン酸生合成に関して、マンノース経路、ウロン酸経路、グロース経路、ガラクトツロン酸経路およびミオイノシトール経路の 5 つの生合成経路の存在が報告されており、中でもマンノース経路がアスコルビン酸生合成の主要経路であるとされている。

熱帯植物にはアスコルビン酸を豊富に含んでいる植物がある。北インド原産のモリンガ (*Moringa oleifera*) は、葉や種子に様々な栄養素を豊富に含んでおり、中でもアスコルビン酸は新鮮重量 (gFW) あたり約 10  $\mu\text{mol}$  と豊富である。しかし、モリンガのアスコルビン酸生合成に関する分子生物学的な解析はなされておらず、アスコルビン酸高集積機構は不明である。一方、中南米原産の熱帯性果樹類であるアセロラ (*Malpighia glabra*) は、果実に非常に高濃度 (60~150  $\mu\text{mol/gFW}$ ) のアスコルビン酸を含んでいる。アセロラのアスコルビン酸生合成については分子生物学的な解析がなされており、アセロラのアスコルビン酸高集積にマンノース経路のアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の高発現が貢献している可能性が示唆されているが、推測の域を出ていない。アスコルビン酸高集積機構の解明のためには、アセロラ以外のアスコルビン酸高含有植物について、アスコルビン酸生合成酵素の一次構造を明らかにし、遺伝子発現量を評価することは有益である。さらに、アスコルビン酸生合成酵素の高発現機構を明らかにする上で、それら遺伝子のプロモーター領域の解析が必要である。そこで本研究では、熱帯植物のアスコルビン酸高集積に着目し、まず、モリンガのアスコルビン酸生合成酵素 cDNA と GDP-L-ガラクトース ホスホリラーゼ (GGP) 遺伝子のゲノム DNA をクローニングした。次いで、Real-time PCR によってモリンガとシロイヌナズナのアスコルビン酸生合成酵素の mRNA 発現量を検討した。また、モリンガとアセロラのアスコルビン酸生合成酵素の高発現機構を明らかにするため、遺伝子上流域をクローニングし、プロモーター解析した。

## 第1章 モリンガにおけるアスコルビン酸生合成酵素遺伝子の構造と発現解析

モリンガのアスコルビン酸生合成酵素の構造と発現を明らかにするため、モリンガのマンノース経路に関わるアスコルビン酸生合成酵素遺伝子をクローニングした。明らかとなったモリンガのアスコルビン酸生合成酵素の推定アミノ酸配列はシロイヌナズナのもとの75%~92%の高い相同性が見られた。モリンガにおいても、アスコルビン酸生合成酵素の一次構造が高く保存されていることが明らかとなった。さらに、モリンガ GGP 遺伝子の構造も高度に保存されていた。次いで、モリンガ葉におけるアスコルビン酸生合成酵素の mRNA 発現を検討したところ、モリンガ葉においては GGP が最も高く発現し、モリンガとシロイヌナズナでは互いに異なるアスコルビン酸生合成酵素の mRNA 発現様式を示した。シロイヌナズナ葉の約 3 倍のアスコルビン酸量を含むモリンガにおいて、シロイヌナズナより高く発現していたアスコルビン酸生合成酵素は GGP と GDP-D-マンノース ピロホスホリラーゼ(GMP)のみであったことから、GGP と GMP がモリンガ葉のアスコルビン酸高集積において重要であることが示唆された。また、モリンガのアスコルビン酸生合成の光応答を解析したところ、光刺激によって、アスコルビン酸量と共に、GMP を除いたアスコルビン酸生合成酵素の mRNA 発現量は増加する傾向を示し、特に、GGP の mRNA 発現量が大きく増加した。以上のことより、モリンガにおいて、マンノース経路に関わるアスコルビン酸生合成酵素によってアスコルビン酸が生合成され、特に GGP が重要な役割を果たしている可能性がある。

## 第2章 モリンガおよびアセロラのアスコルビン酸生合成酵素遺伝子プロモーターの構造と活性の解析

モリンガとアセロラのアスコルビン酸生合成において重要と考えられる GGP と GMP に着目して、それら遺伝子上流域のプロモーター活性を評価した。はじめに、モリンガとアセロラ GGP 遺伝子上流域をクローニングし、遺伝子の開始コドンからそれぞれ 813 bp と 1723 bp 上流までの塩基配列を明らかにした。モリンガ GGP 遺伝子は開始コドンから上流 207 番目のグアニンを転写開始点とする TATA-less プロモーターを有するものと考えられた。一方、アセロラ GGP 遺伝子は開始コドンから上流 53 番目のグアニン、または 356 番目のチミンを転写開始点とする TATA-less プロモーターを有すると示唆された。さらに、植物のシス因子検索プログラムである PlantPAN2.0 によりシス因子を検索したところ、モリンガとアセロラ GGP 遺伝子上流域にはいずれも光応答だけでなく、植物ホルモン応答性として知られるシス因子の配列が複数確認されたことから、アスコルビン酸生合成が植物ホルモン応答に参与している可能性が示唆された。次いで、シロイヌナズナのプロトプラストを用いてプロモーター解析をしたところ、いずれの GGP 遺伝子も、明らかにした上流配列はプ

ロモーター活性を有していた。また、アセロラ GMP プロモーターでは、転写開始点上流 1185 bp 内に、これまで報告されていない転写活性化シス因子が存在することが示唆された。

### 第3章 アセロラ GMP 遺伝子の転写活性化因子の探索と解析

高いプロモーター活性が検出されたアセロラ GMP 遺伝子の転写開始点上流 1185 bp までの配列に着目し、新たな転写活性化シス因子を探索した。その結果、アセロラ GMP プロモーターのデリーション解析により、転写開始点上流 1100 bp から 1080 bp の領域に新たに転写活性化シス因子が存在することが明らかとなった。そこで、この領域に着目してシス因子のデータベースにより検索したところ、転写開始点上流 1097 bp から 1092 bp に MYB 認識配列である MYB1AT(AAACCA)が認められた。さらに、転写開始点上流 1093 bp から 1083 bp にパリンドローム様配列(ACCTCGAAGT)が認められた。次いで、これらの配列の欠失または置換により、プロモーター活性を解析したところ、パリンドローム様配列の欠失やパリンドローム様配列の後半領域の相補的な置換(ACCTCGAAGT→ACCTCCTTCA)によってプロモーター活性が有意に低下した。したがって、パリンドローム配列の後半領域がアセロラ GMP 遺伝子の転写活性化に貢献しているものと思われる。この領域の配列を詳細に見直したところ、アブシジン酸応答因子 Abscisic acid-responsive element; ABRE)様配列が認められた。しかし、ABRE 様配列の一部を典型的な ABRE コア配列に置換(AAGT→ACGT)するとプロモーター活性が減少したことから、ABRE として機能している可能性は低いと考えられる。また、アセロラ GMP 遺伝子の転写開始点上流 1087 bp から 1083 bp の転写活性化能を調べたところ、上流 1185 bp から 600 bp に存在する他のシス因子も転写活性化に必要であることが示唆された。

本研究により、アスコルビン酸を大量に含む熱帯植物モリンガとアセロラのアスコルビン酸高集積において、GGP と GMP が重要である可能性を示した。しかし、これら遺伝子の発現調節機構の解明には至っておらず、今後の課題である。アスコルビン酸合成経路を活性化する上で、アスコルビン酸合成酵素遺伝子の高発現に関わる転写活性化シス因子を明らかにし、その転写因子を同定することは重要である。アスコルビン酸を大量に含む熱帯植物のアスコルビン酸高集積機構が明らかにされ、その知見を応用したアスコルビン酸合成強化植物が作出されることに期待したい。