

果実におけるビタミンC 生合成調節機構の解明

石川 孝博

島根大学生物資源科学部 准教授

緒 言

我々ヒトはアスコルビン酸を生合成できないため、日常的に食事からビタミンCを摂取しなければならない。果実を筆頭に植物はビタミンCを豊富に含んでおり、我々にとって最大の供給源となっていることは周知の事実であるが、植物がどのようにアスコルビン酸の合成を調節し、なぜ多量に含んでいるのかについてはほとんど明らかになっていないのが現状である。

植物のアスコルビン酸生合成に関しては、これまでにさまざまな代謝経路が提唱されてきた(図1)。最近になってようやくモデル植物シロイヌナズナを用いた研究から、D-マンノース(D-Man)とL-ガラクトース(L-Gal)の誘導体を代謝中間体とするD-Man/L-Gal経路がその主要経路であることが分子遺伝学的に証明された¹⁾。一方、緑藻ではD-ガラクトン酸(D-GalUA)を代謝中間体とする経路がアスコルビン酸生合成に機能している事

実から²⁾、植物においてもD-Man/L-Gal経路以外の別経路の存在についても議論の最中である。事実、これまでにイチゴ果実から単離されたアルドース/ケトース還元酵素がD-GalUAを基質にすること、同酵素遺伝子を過剰発現したシロイヌナズナでは葉中のアスコルビン酸量が野生株の3倍程度まで増加することなどから、植物でも組織特異的にD-GalUA経路が機能している可能性が示唆されている³⁾。しかしながら、植物ではD-GalUAより生成したL-ガラクトン酸から、アスコルビン酸の最終前駆体となるL-ガラクトノ-1,4-ラクトンへの変換を触媒するアルドノラクトナーゼが未同定であることなどから、D-GalUA経路の存在について未だ明確な結論には至っていない。

これまで植物のアスコルビン酸生合成に関する研究は、シロイヌナズナを中心に進められており、アスコルビン酸を最も豊富に含む果実に関する知見は非常に限られてい

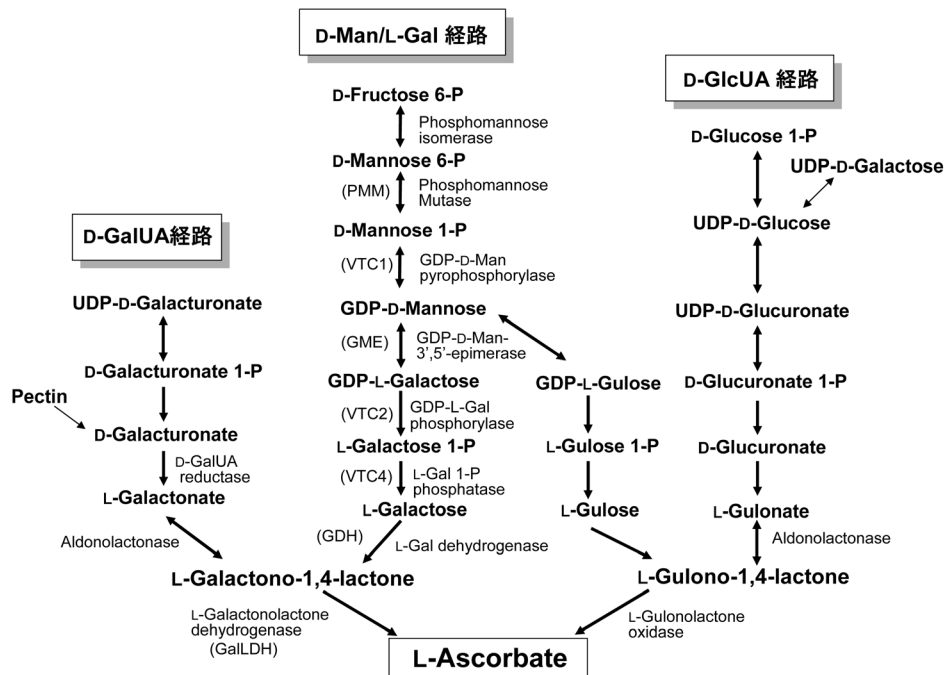


図1 植物におけるアスコルビン酸生合成経路の概要

るのが現状である。果実をアスコルビン酸供給源として考えた時、その生合成や調節機構の解明は学術的な側面のみならず、ビタミンを高含有した有用品種の開発や育種など応用研究にとっても重要であるといえる。そこで今回、未解明の果実におけるアスコルビン酸生合成調節機構の解明を目的に、モデル果実として分子遺伝学的ツールとして有用なトマトの矯性品種 Micro-Tom に着目し、果実成熟に伴うアスコルビン酸レベルおよび生合成関連酵素遺伝子発現レベルの変動、ソース葉からシンク果実へのアスコルビン酸転流の影響などについて検討を行った。

実験材料および方法

トマト (*Solanum lycopersicum* L. cv.'Micro-Tom') は、市販の土を用いてポットに植え、グロースチャンバーに

おいて 25 度で $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件の下 16 時間明・8 時間暗条件下で栽培した。アスコルビン酸の定量にはピピリジル法を用いた。

遺伝子発現解析は、real-time RT PCR 法を用い、果実組織 (約 200 mg) から定法にしたがって RNA 抽出した後、得られた total RNA ($2\mu\text{g}$) に対し Prime Script RT Master Mix (Takara) を用いて cDNA を合成した。Real-time PCR は SYBR Premix EX Taq II (Takara) を用いて、Thermal Cycler Dice Real Time System で行った。ノーマライザーにはトマト elongation factor 1 α (EF1 α) 遺伝子を用いた。

トレーサー実験は、 $1.0 \mu\text{Ci}$ の L-[6- ^{14}C] アスコルビン酸をトマト葉から吸収させた後、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続光条件下 24 時間後に植物体を回収・乾燥後、果実を含む各組織へのアスコルビン酸の分布を BAS- III

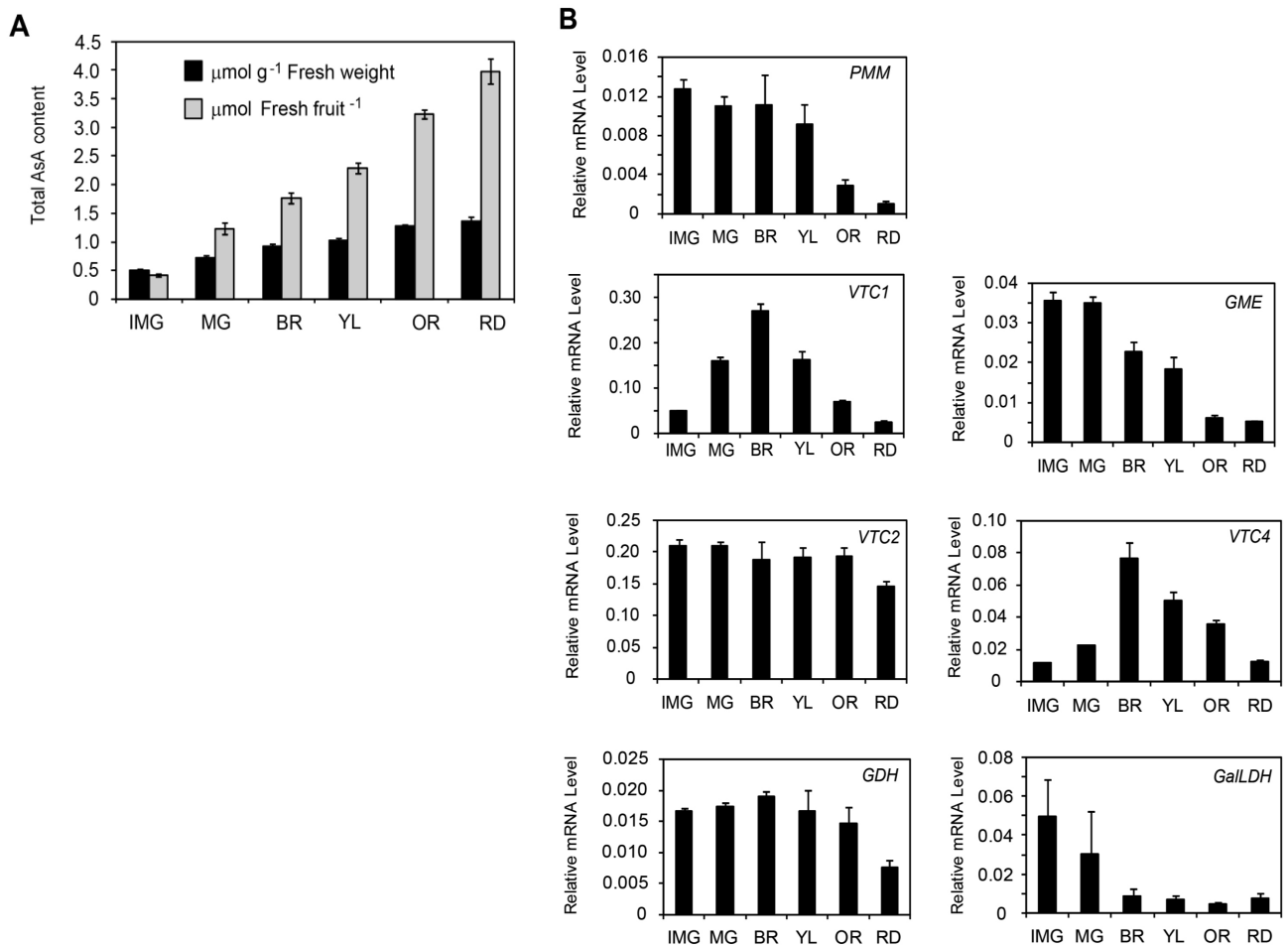


図2 トマト果実の各成熟段階におけるアスコルビン酸量 (A) および D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子の発現レベル (B)

IMG ; immature green, MG ; mature green, BR ; breaker, YL ; yellow, OR ; orange, RD ; mature red, PMM ; phosphomannose mutase, VTC1 ; GDP-D-Man pyrophosphorylase, GME ; GDP-D-Man-3',5'-epimerase, VTC2 ; GDP-L-Gal phosphorylase, VTC4 ; L-Gal 1-P phosphatase, GDH ; L-Galactose dehydrogenase, GalLDH ; L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase

(Fuji Film) を用いたオートラジオグラフィーにより評価した。

D-GalUA 還元酵素およびアルドノラクトナーゼ活性は、それぞれ文献 2) および 4) の方法にしたがって測定した。

結果および考察

1. トマト果実成熟過程におけるアスコルビン酸量と

D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子発現レベルとの関連

トマト果実を immature green (IMG) から red (RD) の各成熟段階に分け、アスコルビン酸量を測定したところ、IMG から RD にしたがって湿重量あたりで約 2 倍に、果実あたりでは約 8 倍に増加した (図 2A)。この時、植物アスコルビン酸生合成の主要経路である D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子の発現レベルを real-time PCR により検討したところ、ホソホマンノースムターゼ (PMM) や GDP-Man エピメラーゼ (GME)、GDP-L-Gal ホスホリラーゼ (VTC2)、L-Gal 脱水素酵素 (GDH) ではアスコルビン酸レベルの低い IMG の段階ですでに発現レベルは最大であり、その後 RD まで成熟に伴って低下するこ

とが認められた (図 2B)。その他の遺伝子についても、アスコルビン酸レベルが最大となる RD の段階ではいずれも発現レベルが最も低下していることが示された。以上の結果から、果実のアスコルビン酸レベルと D-Man/L-Gal 経路との関連は低いことが示唆された。

2. 葉から果実へのアスコルビン酸転流の可能性

Franceschi と Tarlyn は、シロイヌナズナとアルファルファ (*Medicago sativa*) を用いた研究から、アスコルビン酸はソース器官の葉からシンク器官の花および果実や根端に転流して蓄積することを報告している⁵⁾。そこで、前項の結果を受け、トマト果実の成熟に伴うアスコルビン酸レベルの増加には、葉からの転流が影響しているのではないかと考え、L-[6-¹⁴C] アスコルビン酸によるトレーサー実験を行った。その結果、果実においては当初の予想に反し RD の成熟果実ではなく、成熟初期の IMG 果実において強いシグナルが観察されたことから、転流は果実成熟の初期段階におけるアスコルビン酸量の制御に関連していることが強く示唆された (図 3)。また、アスコルビン酸はトマトにおいても、シロイヌナズ

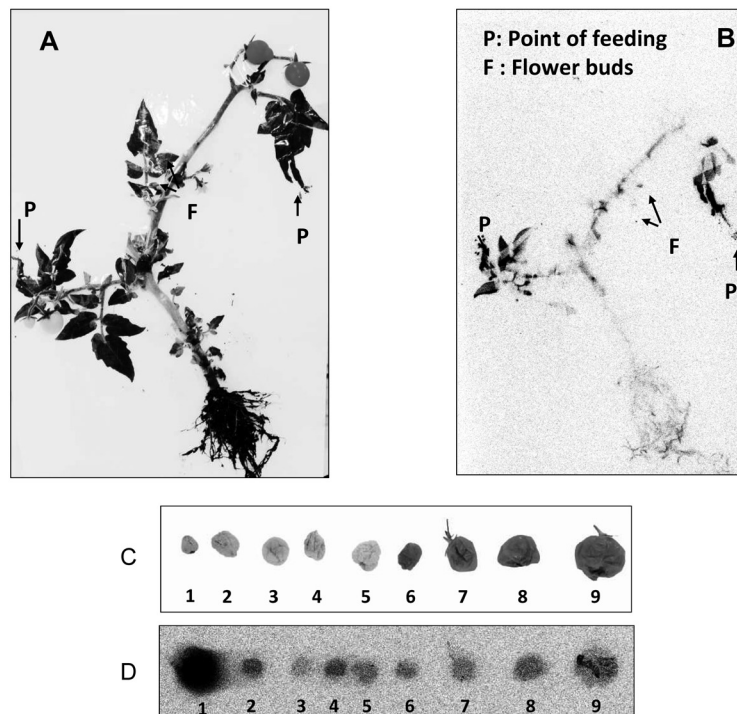


図3 L-[6-¹⁴C] アスコルビン酸によるトレーサー実験

- (A) トマト植物体の実体写真。
 (B) L-[6-¹⁴C] アスコルビン酸投与 24 時間後の植物体全体のオートラジオグラフィー。
 (C) 果実の実体写真。
 (D) L-[6-¹⁴C] アスコルビン酸投与 24 時間後の果実のオートラジオグラフィー。
 1, immature green; 2-5, mature green; 6-9, mature red.

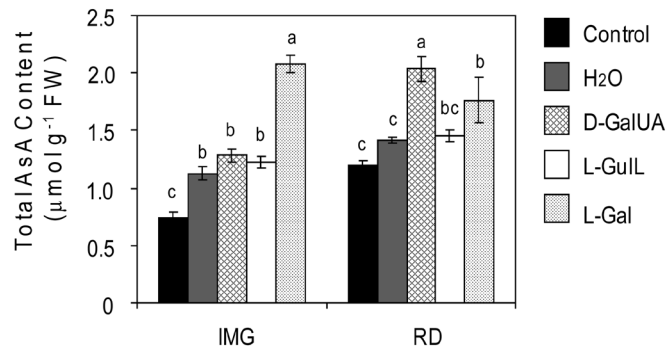


図4 各種アスコルビン酸生成前駆体が果実アスコルビン酸量に及ぼす影響

IMG ; immature green, RD ; mature red, D-GalUA ; D-galacturonate, L-GulL ; L-gulonono-1,4-lactone, L-Gal ; L-galactose

ナとアルファルファの場合と同様、葉から葉といったソース器官同士には転流しないこと、果実以外にも根端や花にも転流することが認められた(図3)。

3. 成熟果実ではD-GalUA経路がアスコルビン酸生合成に機能している

前項までの実験から、成熟果実におけるアスコルビン酸の蓄積にはD-Man/L-Gal経路および転流による影響は低いことが示唆された。そこで、次にD-Man/L-Gal経路以外の別経路の関与について検討した。はじめにIMGとRDの果実について各種アスコルビン酸生成前駆体の影響について調べた。前駆体は、D-Man/L-Gal経路、D-GalUA経路、D-グルクロン酸(D-GlcUA)経路からそれぞれL-Gal、D-GalUA、L-グルクノ-1,4-ラクトン(L-GulL)を5mM濃度で加え、24時間処理後にアスコルビン酸量を測定した。その結果、IMGの果実ではコントロールに比べ、L-Galを与えた場合のみアスコルビン酸量の増加が認められたが、他の前駆体では有意差は認められなかった(図4)。この結果は1項で示したD-Man/L-Gal経路構成酵素遺伝子の発現レベル

と良い相関性を示した。一方、RD果実の場合、IMG同様L-Gal処理により有意なアスコルビン酸の増加が認められたが、IMGの場合とは異なり、L-GalよりもD-GalUAで処理した場合に高いアスコルビン酸増加率を示した。したがって、IMG果実ではD-Man/L-Gal経路以外にD-GalUA経路の機能が示唆された。

もしIMG果実においてD-GalUA経路が機能しているのであれば、同経路を構成するD-GalUA還元酵素および植物では未同定のアルドノラクトナーゼの各酵素が機能しているはずである。そこで、この点を明らかにするためIMGおよびRD果実から調整した無細胞抽出液を用いて両酵素活性を評価した。またD-Man/L-Gal経路からも経路の最終段階を触媒するL-Gal脱水素酵素およびL-ガラクトノ-1,4-ラクトン脱水素酵素活性についても評価した。その結果、D-GalUA還元酵素とアルドノラクトナーゼ活性はともに果実の膜画分においてのみ検出可能であり、特にアルドノラクトナーゼ活性はIMGとRDで比較した場合約2倍に増加していることが示された(表1)。アルドノラクトナーゼは植物で未同定の酵素であり、活性の検出は今回が初めての報告となる⁶⁾。

表1 IMGおよびRD果実におけるアスコルビン酸生成関連酵素活性の比較

	IMG	RD
	$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$	
D-GalUA reductase	22.02 ± 0.86	26.18 ± 0.88
Aldonolactonase		
L-Galactono-1,4-lactone	5.55 ± 0.51	12.38 ± 1.38
L-Galactonic acid	10.76 ± 1.96	21.39 ± 2.97
L-Gal dehydrogenase	0.34 ± 0.09	26.18 ± 0.88
L-GalL dehydrogenase	1.14 ± 0.09	1.89 ± 0.15

一方、L-Gal脱水素酵素活性はRDではIMGと較べて76%に減少しており、図2Bで示したL-Gal脱水素酵素遺伝子の発現レベルの低下と相関していることが確認された。

以上の結果からRD果実においては、D-Man/L-Gal経路以外にもD-GalUA経路が機能しており、この経路が活性化されることで高いアスコルビン酸レベルを維持していることが推測された⁶⁾。

要 約

トマト Micro-Tom の果実成熟段階とアスコルビン酸量の関係について解析を行った。果実中のアスコルビン酸量は成熟初期段階のIMGから後期のRDにかけて増加した。この時、IMGにおいてはD-Man/L-Gal経路と葉からの転流がアスコルビン酸量の制御に関連していること、RDにおけるアスコルビン酸量の増加にはD-GalUA経路の活性化が重要であることが示唆された。本研究では、植物で未解明のD-GalUA経路が成熟段階特異的に機能している可能性を初めて示めしており、今後、

アルドノラクトナーゼの同定を中心にD-GalUA経路の解析を進めることで、果実におけるアスコルビン酸生合成調節の詳細解明が期待される。

謝 辞

本研究は、公益財団法人三島海雲記念財団の平成22年度「学術研究奨励金」により行われたものです。助成していただいた財団関係者の方々に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) J.Dowdle, et al.: *Plant J*, **52**,673-689,2007.
- 2) T.Ishikawa, et al.: *J. Biol.Chem.*, **283**,31133-31141, 2008
- 3) F.Agius, et al.: *Nat.Biotech*, **21**, 177-181, 2003.
- 4) T.Ishikawa, et al.: *Biosci. Biotech.Biochem.*, **70**,2720-2726, 2006.
- 5) VR.Franceschi and NM. Tarlyn.: *Plant Physiol*, **130**,649-656,2002.
- 6) A.A.Badejo, et al.: *J. Exp. Bot.*, in press, 2011.