

## 植物ヘキソース関連化合物輸送体の探索と同定

石川 孝博<sup>1</sup>, 秋廣 高志<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 島根大学生物資源学部生命工学科, <sup>2</sup> 同 生物科学科

### 目 的

光合成により葉で産生した糖は、細胞外に輸送され維管束を通じて地下部（根）や果実などシンク器官に蓄積する。植物の糖輸送には、篩管を媒介としたスクロースの長距離輸送とヘキソース（単糖）による短距離輸送があり、モデル植物のシロイヌナズナでは、ゲノム上にスクロース輸送体と単糖輸送体遺伝子がそれぞれ約 10 個および 50 個存在することが予測されている。この事実より、植物には多くの糖輸送体による複雑で精緻な糖輸送制御機構の存在が考えられるが、現在推定されているこれら糖輸送体の多くは機能未知である。さらに、ヘキソースの一種であるアスコルビン酸 (AsA; ビタミン C) は、細胞壁やデンプンを除いた可溶性糖質の約 10% を占める植物で最も高濃度に存在する分子であり、ミトコンドリアで合成されたのち葉緑体など細胞内コンパートメント間を移送される他、ソース・シンク間の長距離輸送されることがトレーサー実験などから明らかになっているが (Franceschi, et al., 2002; Badejo, et al., 2012), これらの輸送体も全く手掛かりが得られていない状況である。その他、糖核酸など抗酸化や細胞壁合成に重要な糖類の輸送体等も未同定である。こうした背景から本研究では、新奇のヘキソース関連化合物輸送体の同定を目指し、酵母ヘキソース輸送変異体 AFY01 株を宿主にイネの膜輸送体と機能類推されている約 1,500 個の遺伝子について発現ライブラリーの作製を進めた。また今年度は特に細胞膜および葉緑体局在の AsA 輸送体に着目し、既存の酵母発現ライブラリーを用いたスクリーニングおよびシロイヌナズナの葉緑体 AsA 輸送変異体の単離を進めた。

### 方 法

酵母へのプラスミドの導入は、LiCl 法により行った。細胞膜局在 AsA 輸送体のスクリーニングは、W303-1A 株を宿主にした酵母発現ライブラリーに対し、OD<sub>595</sub> = 0.1 に調整した酵母培養液に終濃度 300 μM の L-[1-<sup>14</sup>C]-AsA を添加し、室温で 90 分間インキュベート後、シンチレーション測定により行った。葉緑体 AsA 輸送変異体の単離には、シロイヌナズナ AsA 欠乏変異体 *vtc2* に対し、エチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理をした自殖 M2 植物に対し、10 mM AsA Na 添加 10 時間後の非光化学的消光 (NPQ) 測定および硝酸銀による組織染色により行っ

た。AsA の定量は、ビピリジル法および LC-MS (Shimadzu LCMS-2020, Intakt Scherzo SM-C18 3 μm 150 × 2 mm, ESI ネガティブモード) により行った。

### 結果と考察

ドイツの Boles より提供されたヘキソース輸送変異酵母 AFY01 株 (Wieczorke, et al., 1999) を宿主に、イネ膜輸送体と機能類推されている約 1,500 個の遺伝子について、発現ライブラリーの構築を完了し、今後の輸送体スクリーニングへ活用する。

AsA 輸送体の探索について、構築済みの W303-1A 株を宿主にした酵母発現ライブラリーに対し、1,500 クロンを 168 バッチに分け、L-[1-<sup>14</sup>C]-AsA の取込みを指標に一次スクリーニングを行ったところ、コントロールに比べ AsA 取込み量に顕著な差のある 8 バッチを見出した (図 1)。現在これらのバッチに対し二次スクリーニングを進めている。

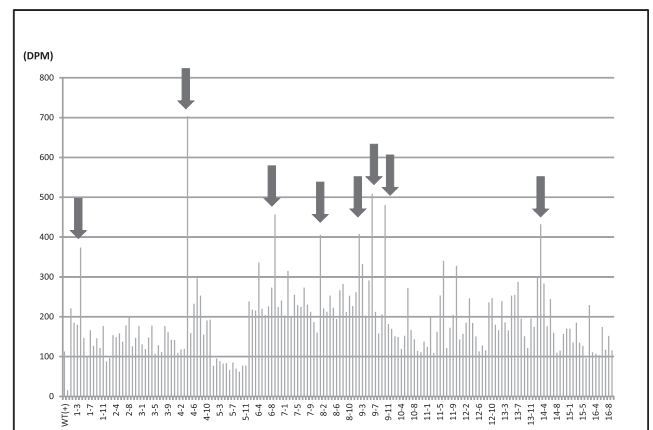


図 1. 酵母発現ライブラリーに対して L-[1-<sup>14</sup>C]-AsA を用いた一次スクリーニングの結果。赤矢印はコントロールに対して有意な L-[1-<sup>14</sup>C]-AsA 取込み活性を示したバッチを示す。

またシロイヌナズナの葉緑体 AsA 輸送変異体の探索に関して、シロイヌナズナ *vtc2* 変異体に着目した。*vtc2* 変異体の AsA レベルは、野生株の約 20% 程度に低下しており、葉緑体の AsA レベルを反映して、熱放散による光合成電子伝達系の余剰エネルギー消費機構のパラメーターである非光化学的消光 (NPQ) 値が低いという特徴を有する (Müller-Moulé, et al., 2002)。しかし、*vtc2* 変異体

に AsA Na を与えることでこの NPQ 値は野生株レベルまで回復する。そこでこの特性に着目し、EMS 変異原処理をした *vtc2* の自殖 M2 植物に対して、AsA Na 添加後に NPQ 回復異常を示す変異体数個体を選抜した (図 2)。

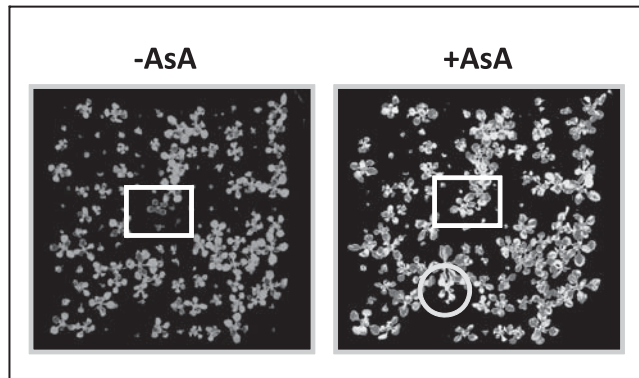


図 2. NPQ を指標にしたスクリーニング結果の一例。白四角の囲みは野生株を示す。黄丸の囲みは、目的の変異体候補。

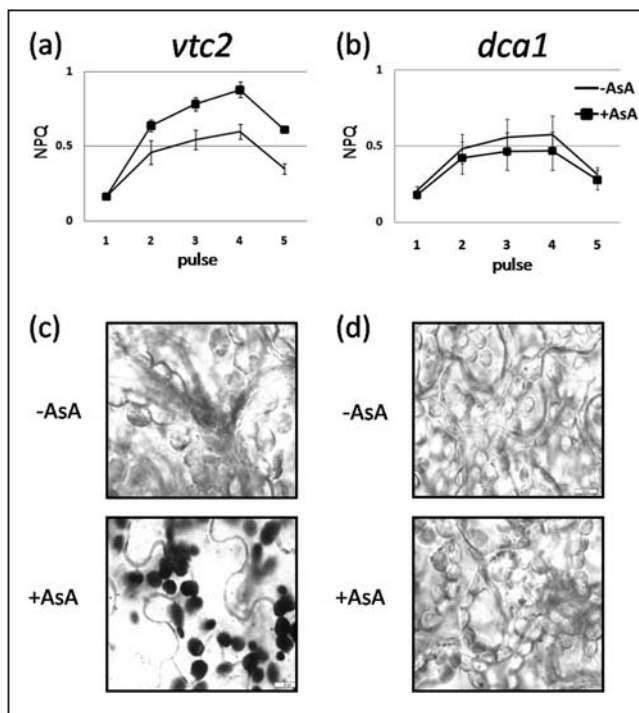


図 3. 新奇葉緑体 AsA 欠乏変異体 *dca1*. *dca1* は親株の *vtc2* に比べ、AsA 添加後も NPQ 値が回復せず (a, b), 硝酸銀による組織染色においても、AsA 添加後に *vtc2* で検出される葉緑体の AsA が検出されない (c, d).

得られた変異体候補のひとつは、AsA 添加後も葉緑体 AsA 蓄積が組織化学的に観察されないこと (図 3), 単離葉緑体は<sup>14</sup>C 標識 AsA の取込み活性を示さないことから、目的の変異体であると結論し、*dca* (deficiency of chloroplastic ascorbate) 変異体と命名した。

## 引用文献

- Badejo, A.A., Wada, K., Gao, Y., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S. and Ishikawa, T. (2012) Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *Journal of Experimental Botany*, **63** : 229-239.
- Franceschi, V.R. and Tarlyn, N.M. (2002) L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology*, **130** : 649-656.
- Müller-Moulé, P., Conklin, P.L. and Niyogi, K.K. (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*. *Plant Physiology*, **128** : 970-977.
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. and Boles, E. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **464** : 123-128.