

## 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

光合成によりソース器官の葉で産生した糖は、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。ヘキソース関連化合物のひとつアスコルビン酸（ビタミンC）は、植物で最も高濃度に存在する可溶性糖質として、抗酸化物質のみならずレドックスバッファーとして環境応答などさまざまな生理作用に寄与している。植物のアスコルビン酸は、D-マンノース/L-ガラクトース経路を経て最終的にミトコンドリア膜間スペースで生成された後、葉緑体など細胞内コンパートメント間を移送あるいはシンク器官へ長距離輸送される（Ishikawa and Shigeoka, 2008; 石川, 2011）。アスコルビン酸輸送機構については、先行する動物において、Na<sup>+</sup>依存性アスコルビン酸輸送体遺伝子（*SVCT1/2*）が同定され詳細に解析されているが、植物の*SVCT1/2*相同遺伝子（NAT遺伝子ファミリー）はアスコルビン酸輸送体として機能しておらず、その輸送機構については全く手掛かりが得られていない状況である（Maurino, et al., 2006）。こうした背景から本研究では、酵母発現ライブラリーおよびモデル植物シロイヌナズナの変異体ラインを活用し、植物アスコルビン酸輸送体を探索・同定することを目的としている。

## 方 法

酵母へのプラスミドの導入は、LiCl法により行った。細胞膜局在アスコルビン酸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]-アスコルビン酸を添加し、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。葉緑体アスコルビン酸輸送変異体の単離には、シロイヌナズナアスコルビン酸欠乏変異体*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 アスコルビン酸添加10時間後のクロロフィル蛍光イメージャーによる非光化学的消光（NPQ）測定および硝酸銀による組織染色により行った。シロイヌナズナ葉からのプロトプラストの調製および葉緑体の単離はテープサンドウィッチ法により行い、単離葉緑体のアスコルビン酸取込みアッセイはシリコンレイヤー法により行った。

## 結果と考察

前年度に引き続き、イネの膜輸送体と機能類推されている約1,500個の遺伝子を出芽酵母W303-1A株に導入した酵母発現ライブラリーの中から、糖輸送体とアノテーションされた68遺伝子について、L-[1-<sup>14</sup>C]-アスコルビン酸の取込みを指標にスクリーニングを試みた。なお、コントロールにはヒト*SVCT2*遺伝子（SLC23A2）を用いた。スクリーニングはガラクトースで発現誘導後、50 mM MES緩衝液（pH5.5）に交換し、<sup>14</sup>C標識アスコルビン酸を含む10 mMアスコルビン酸で30°C、2時間処理後、10 mM CaCl<sub>2</sub>で5回洗浄し、シンチレーションカウンターによる<sup>14</sup>Cアスコルビン酸の取込み量で評価した。その結果、<sup>14</sup>C標識アスコルビン酸を有意に取込むクローンは得られなかった。既知の糖輸送体がアスコルビン酸輸送には関わっていない可能性を示唆するとともに、コントロールの*SVCT2*遺伝子導入株でも取込みが認められなかったため、今後取込み条件を再検討した上で、今後対象をライブラリー全体に拡大してスクリーニングを実施する。

葉緑体型アスコルビン酸輸送体の同定のため、シロイヌナズナアスコルビン酸欠乏*vtc2*変異体に対して変異原エチルメタンサルホン酸処理後に得た自殖M2植物について、アスコルビン酸添加後の非光化学的消光（NPQ）に異常を示す個体を多数選抜した。このうち数ラインは、硝酸銀を用いた組織染色においても葉緑体にアスコルビン酸の還元由来する銀沈着が観察されなかった。得られた変異体は、*dca* (deficiency of chloroplastic ascorbate) 変異体と命名した。親株*vtc2*および得られた*dca1*変異体から葉緑体を単離し、シリコンレイヤー法により<sup>14</sup>C標識アスコルビン酸の取込み活性を比較した。その結果、*dca1*変異体の葉緑体は、親株（*vtc2.1*）と比較してアスコルビン酸取込み活性の顕著な抑制が観察された（図1）。これとは別に植物葉緑体におけるアスコルビン酸輸送体に関する生化学的知見を得るため、野生株（Col-0）から単離した葉緑体のアスコルビン酸取込み活性評価も実施した。その結果、アスコルビン酸添加後約60秒で最大取込み活性を示し、アロステリック型のキネティックスを示した。*dca1*変異体の原因遺伝子同定を目的として、親株*vtc2*変異体との戻し交配を進

め、分離した *dca1* 表現型ラインおよび *vtc2* 表現型ラインをそれぞれ16株ずつ樹立した (図2)。

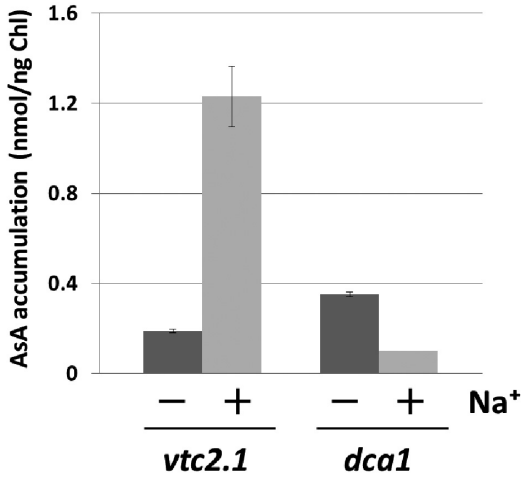


図1. 親株 (*vtc2.1*) および *dca1* 変異体からの単離葉緑体における L-[1-<sup>14</sup>C]-アスコルビン酸取込み活性. *dca1* 変異体の葉緑体のアスコルビン酸取込み活性は、親株に較べ顕著に低下していることが分かる。

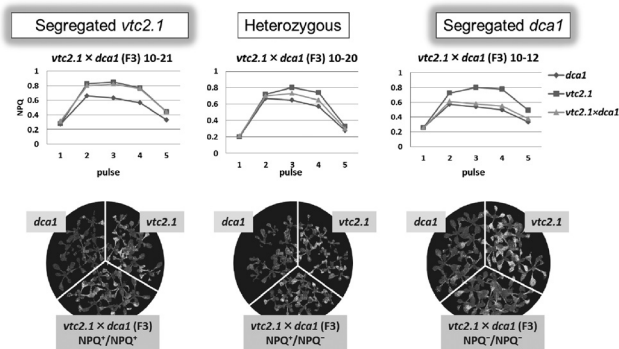


図2. 戻し交配による表現型評価結果の一例. 上段のグラフはアスコルビン酸添加後のNPQ測定の結果を、下段は実際に測定を行った植物体のNPQイメージ画像を示している。

現在、戻し交配によって得られた各ラインについて、次世代シーケンサーによるゲノムのリシーケンスを実施しており、SNPs解析を通じた原因遺伝子の同定が進行中である。

今後世界で初めて植物アスコルビン酸輸送体が同定されることで、アスコルビン酸を豊富に含む果実などシンク器官でなぜ多量に蓄積できるのか、その分子機構の解明が期待されるほか、将来、高アスコルビン酸含有植物の分子育種への応用展開が期待される。

## 引用文献

- Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2008) Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72**: 1143-1154.
- 石川孝博 (2011) 光合成生物におけるアスコルビン酸合成研究の新展開. *生化学*, **83**: 838-841.
- Maurino, V.G., Grube, E., Zielinski, J., Schild, A., Fischer, K. and Flügge, U-I. (2006) Identification and expression analysis of twelve members of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Physiology*, **47**: 1381-1393.