

学位論文審査結果の報告書

氏 名

田中 裕之

生 年 月 日

昭和 62 年 6 月 26 日

本 籍 (国籍)

京都府

学位の種類

博 士 (農 学)

学位記番号

農 第 203 号

学位授与の条件
(博士の学位)

学位規程第5条該当

論 文 題 目

Regulatory mechanism of biosynthetic pathway of

antioxidative vitamins in plants and its application to metabolic engineering

(植物における抗酸化ビタミン生合成系の制御機構の解明および植物代謝工学への応用)

審 査 委 員

(主 査)

重岡 成

教授



(副主査)

内海 龍太郎

教授



(副主査)

川崎 努

教授



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

緒論

植物において、アスコルビン酸 (AsA : ビタミンC) およびトコフェロール (Toc : ビタミンE) はそれぞれ主要な水溶性および脂溶性抗酸化剤である。これらはレドックス制御を介したストレス応答に必須であるだけでなく、ホルモン応答、成長・発達の制御にも関与している。したがって、AsA およびToc生合成の制御機構を知ることは、植物の環境適応機構の解明に重要であると考えられる。また、我々ヒトにとってAsAおよびTocは必須栄養素であるが、両ビタミンを合成できないため、植物から摂取しなければならない。そこで本研究では、両ビタミン生合成系の制御機構解明および植物代謝工学への応用を目的に以下の3つについて検討した。

1. 光および葉緑体シグナルを介したAsAおよびToc生合成系遺伝子群の発現制御機構の解明

これまでに当研究室では、植物のAsA生合成系が光遮断や光合成電子伝達系阻害剤 (DCMU) 処理により抑制されることを明らかにしてきた (Yabuta et al. 2007)。さらに、Toc生合成系も光応答性を示すことから、両ビタミン生合成系の制御への光および葉緑体由来のシグナル伝達系 (プラスチドシグナル) の関与が示唆された。そこで本研究では、プラスチドシグナルのマスターレギュレーターであるGENOMES UNCOUPLED1 (GUN1) の欠損株 (*gun1-101*) を用いて、光および葉緑体シグナリングと両ビタミン生合成系の関与について解析した。

光照射下において、シロイヌナズナ野生株および*gun1-101*株にDCMUあるいは葉緑体遺伝子発現の阻害剤であるリンコマイシン (LIN) を処理した。その結果、両阻害剤処理により野生株ではAsAおよびTocの生合成系遺伝子群の発現抑制および両ビタミン含量の減少が認められた。一方、*gun1-101*株では両阻害剤処理による両ビタミンの生合成系遺伝子群の発現抑制および両ビタミン含量の減少は部分的に回復しており、特にGDP-L-galactose phosphorylase (VTC2) およびTocopherol cyclase (TC) 発現抑制の回復は顕著であった。これらの事実は、両ビタミン生合成系がGUN1を介したプラスチドシグナルによって制御されていること、VTC2およびTCが両生合成系の律速酵素であることを示唆していた。興味深いことに、一方、GUN1欠損は生合成系遺伝子発現の光応答性に影響しなかった。したがって、AsAおよびToc生合成系は、GUN1依存のプラスチドシグナルとGUN1非依存の光応答により制御されていることが示唆された。

そこで、GUN1非依存の光応答経路における制御因子の同定を目的として、ルシフェラーゼレポーターアッセイによってVTC2プロモーターの光応答に関与する領域の同定を試みた。その結果、VTC2転写開始点上流-70から-118間の領域に光応答に関与するシスエレメントが存在することが示唆された。次に、酵母one-hybrid法によって、VTC2プロモーターの光応答領域に結合する転写因子の同定を試みた。VTC2転写開始点上流-70から-118間の領域とレポーター遺伝子 (*HIS3*および*LacZ*) との融合遺伝子をゲノムに組み込んだ酵母を用いて、シロイヌナズナ転写因子cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。

約30000の酵母形質転換体をスクリーニングした結果、*VTC2*プロモーターの光応答領域に結合する転写因子 cDNAの候補を複数得た。現在、ルシフェラーゼレポータアッセイによって、これらの候補因子の転写活性化能を検討している。

2 新規GDP-D-Man加水分解酵素 AtNUDX9の同定および生理機能解析

植物において、GDP-D-mannose (GDP-D-Man) はAsA合成の主要な代謝中間体であるほか、タンパク質のN-結合型糖鎖や細胞壁多糖のドナーとして必須の糖ヌクレオチドである。このことから、細胞内GDP-D-Manレベルの制御はそれらの経路への炭素分配を決定する上で重要であると考えられる。これまでに当研究室では、シロイヌナズナのヌクレオシド-2リン酸類縁体加水分解酵素 (Nudix hydrolase : AtNUDX) ファミリーには多様な糖ヌクレオチドや酸化ヌクレオチド、NADH、FADなどに対して特異的な加水分解活性を有するものが存在し、それらのレベル制御を介して様々な代謝や細胞応答に関与することを明らかにしてきた (Ogawa et al. 2005, 2008)。一方で、未だ基質特異性が明らかにされていないAtNUDXも約半数存在しており、それらがGDP-D-Man特異的活性を有する可能性が考えられた。そこで、シロイヌナズナに存在する28種類のNUDX (AtNUDX1-27, AtDCP2) から、細胞質局在型AtNUDX (AtNUDX1-11, 25) のリコンビナント酵素を用いてGDP-D-Manに対する加水分解活性を検討した。その結果、細胞質局在型のAtNUDX9はGDP-D-Man特異的活性 (GDP-D-Man + H₂O → GMP + mannose-1 リン酸) を有していた。そこで、AtNUDX9のGDP-D-Man代謝への関与を明らかにするために、酵素学および分子遺伝学的な解析を試みた。

AtNUDX9リコンビナント酵素のカイネティクスを検討した結果、*V*_{max}: 1.61 ± 0.15 μmol/min/mg protein、*K*_m: 376 ± 24 μMであった。RT-PCRおよびWestern blotによるAtNUDX9 の組織特異的発現解析の結果、AtNUDX9のmRNAおよびタンパク質レベルは根で高発現していた。さらに、GDP-D-Man加水分解活性はAtNUDX9の発現パターンと相関性を示した。これまでに、GDP-D-Man合成不全株はNH₄⁺ ストレスに高感受性を示すことが報告されている (Qin et al. 2008)。そこで、AtNUDX9遺伝子破壊株 (K0-*nudx9*) のNH₄⁺ ストレス感受性を解析したところ、K0-*nudx9*ではNH₄⁺ ストレスによる根の生育阻害が緩和されていた。この時、K0-*nudx9*のAsAレベルは野生株と変化はなかったが、NH₄⁺ 存在下で生育したK0-*nudx9*の根においてN-グリコシル化タンパク質レベルの増加が認められた。以上の結果から、AtNUDX9は細胞内GDP-D-Manレベルの制御に機能すること、さらにGDP-D-Manレベルはタンパク質のN-グリコシル化を介してNH₄⁺ 感受性を制御することが示唆された。

3. 葉緑体形質転換技術を用いたビタミンE高生産植物の作出

植物でのビタミンE高生産には、ヒトにとって高い生理活性を有するα-Tocを増加させることが重要である。そこで、葉緑体形質転換技術を用いてタバコおよびレタス葉緑体ゲノムに、これまでの成果からToc生合成系の律速因子と考えられる*TC*およびγ-*TMT* (γ-Tocopherol methyltransferase) 遺伝子を導入し、各Tocレベルに及ぼす影響について解析した。

シロイヌナズナ由来のTCおよび γ -TMT cDNAをpsbAプロモーター下流に連結し、パーティクルガンを用いてタバコおよびレタス葉緑体ゲノムへ導入した。TC遺伝子導入タバコ (pTTC) では、 γ -Toc量が野生株の約25倍に増加し、総Toc量は約2倍に増加したが、 α -Toc量に有意な増加は認められなかった。一方、 γ -TMT遺伝子導入タバコ (pT γ -TMT) では、 γ -TMT活性が有意に増加したが、Toc量に変化は認められなかった。そこで、 γ -TMT遺伝子とTC遺伝子を同時に導入したタバコ (pTTC- γ -TMT) を作出したところ、総Toc含量は野生株の約2.5倍に、 α -Tocは野生株の約1.6倍に増加していた。これらの結果は、TCおよび γ -TMTの共発現によって α -Tocの高蓄積が可能であることを示唆していた。また、TC遺伝子導入レタス (pLGTC) においても、 γ -Toc量の増加に起因して総Toc量の増加が認められた。このことから、植物葉においても葉緑体形質転換によるToc生合成能の強化が可能であることが示された。

次に、我々はTocの同族体であるトコトリエノール (Toc3) に着目した。近年、Toc3はTocと比較して約50倍の抗酸化活性を示すことや、がん細胞の増殖抑制などToc3特異的な機能を有することが明らかにされてきた。しかし、Toc3生合成系が存在するのは単子葉植物のみであり、双子葉植物はToc3生合成能を持たない。そこで、Toc3生合成の鍵酵素であるホモゲンチジン酸グラニルグラニルトランスフェラーゼ (HGGT) 遺伝子をタバコ核ゲノムに導入し、Toc3高蓄積作物の作出を試みた。イネ由来のHGGT cDNAをCaMV35Sプロモーター下流に連結し、アグロバクテリウム法によりタバコ核ゲノムへ導入した。HGGT遺伝子導入タバコでは、野生株タバコには見られないToc3の高蓄積が認められたが、Toc量に有意な変化は認められなかった。その結果として、総ビタミンE量は約2倍に増加した。以上の結果から、Toc3非合成植物へのHGGTの導入は、Toc3生合成能を付与することが示された。

論文審査結果の要旨

本研究では、植物における抗酸化ビタミンであるアスコルビン酸 (AsA: ビタミンC) およびトコフェロール (Toc: ビタミンE) 生合成系の制御機構の解明および植物代謝工学への応用について検討を行っている。

植物において、アスコルビン酸およびトコフェロールはそれぞれ主要な水溶性および脂溶性抗酸化剤である。これらはレドックス制御を介したストレス応答に必須であるだけでなく、ホルモン応答、成長・発達の制御にも関与している。したがって、AsAおよびToc生合成の制御機構を知ること、は、植物の環境適応機構の解明に重要であると考えられる。また、我々ヒトにとってAsAおよびTocは必須栄養素であるが、両ビタミンを合成できないため、植物から摂取しなければならない。本研究では、両ビタミン生合成系の制御機構を明らかにすると共に、ビタミン高含有植物の分子育種を目指して、3つの項目について検討されている。

最初の項目では、光および葉緑体シグナルを介したAsAおよびToc生合成系遺伝子群の発現制御機構の解明について検討されている。これまでに当該研究室では、植物のAsA生合成系が光遮断や光合成電子伝達系阻害剤 (DCMU) 処理により抑制されることが明らかにされてきた。さらに、Toc生合成系も光応答性を示すことから、両ビタミン生合成系の制御への光および葉緑体由来のシグナル伝達系 (プラスチドシグナル) の関与が示唆されている。そこでまず、プラスチドシグナルのマスターレギュレーターである GENOMES UNCOUPLED1 (GUN1) の欠損株 (*gun1-101*) を用いて、光および葉緑体シグナリングと両ビタミン生合成系の関与について解析されている。光照射下において、シロイヌナズナ野生株および *gun1-101* 株に DCMU あるいは葉緑体遺伝子発現の阻害剤であるリンコマイシン (LIN) を処理した結果、両阻害剤処理により野生株では AsA および Toc の生合成系遺伝子群の発現抑制および両ビタミン含量の減少が認められている。一方、*gun1-101* 株では両阻害剤処理による両ビタミンの生合成系遺伝子群の発現抑制および両ビタミン含量の減少は部分的に回復しており、特に GDP-L-galactose phosphorylase (VTC2) および Tocopherol cyclase (TC) 発現抑制の回復は顕著であった。これらの事実は、両ビタミン生合成系が GUN1 を介したプラスチドシグナルによって制御されていること、VTC2 および TC が両生合成系の律速酵素であることを示唆していた。興味深いことに、GUN1 欠損は生合成系遺伝子発現の光応答性に影響していなかった。したがって、AsA および Toc 生合成系は、GUN1 依存のプラスチドシグナルと GUN1 非依存の光応答により制御されていることが示唆された。次に、GUN1 非依存の光応答経路における制御因子の同定を目的として、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって VTC2 プロモーターの光応答に関与する領域の同定を試みられている。解析の結果、VTC2 転写開始点上流-70 から -118 間の領域に光応答に関与するシスエレメントが存在することが示唆された。そこで次に、酵母 one-hybrid 法によって、VTC2 プロモーターの光応答領域に結合する転写因子の同定が試みられている。VTC2 転写開始点上流-70 から -118 間の領域とレポーター遺伝子 (*HIS3* および *LacZ*) との融合遺伝子をゲノムに組み込んだ酵母を用いて、シロイヌナズナ転写因子 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、約 30000 の酵母形質転換体をスクリーニングした結果、VTC2 プロモーターの光応答領域に結合する転写因子 cDNA の候補が複数えられている。今後は、ルシフェラーゼレポーターアッセイなどによって、これらの候補因子の転写活性化能の解析が望まれる。

2つめの項目では、新規 GDP-D-Man 加水分解酵素である AtNUDX9 の同定および生理機能解析が行われている。植物において、GDP-D-mannose (GDP-D-Man) は AsA 生合成の主要な代謝中間体であるほか、タンパク質の N-結合型糖鎖や細胞壁多糖のドナーとして必須の糖ヌクレオチドである。このことから、細胞内 GDP-D-Man レベルの制御はそれらの経路への炭素分配を決定する上で重要であると考えられる。これまでに当該研究室では、シロイヌナズナのヌクレオシド-2リン酸類縁体加水分解酵素 (Nudix hydrolase: AtNUDX) ファミリーには多様な糖ヌクレオチドや酸化ヌクレオチド、NADH、FAD などに対して特異的な加水分解活性を有するものが存在し、それらのレベル制御を介して様々な代謝や細胞応答に関与することが明らかにされてきた。一方で、未だ基質特異性が明らかにされていない AtNUDX も約半数存在しており、それらが GDP-D-Man 特異的活性を有する可能性が考えられる。そこで、シロイヌナズナに存在する 28 種類の NUDX (AtNUDX1-27, AtDCP2) から、細胞質局在型 AtNUDX (AtNUDX1-11, 25) のリコンビナント酵素を用いて GDP-D-Man に対する加水分解活性を検討した結果、細胞質局在型の AtNUDX9 は GDP-D-Man 特異的活性 ($\text{GDP-D-Man} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{GMP} + \text{mannose-1 リン酸}$) を有することを明らかにされた。

AtNUDX9リコンビナント酵素のカイネティクスが検討され、 V_{max} は $1.61 \pm 0.15 \mu\text{mol/min/mg protein}$ 、 K_m は $376 \pm 24 \mu\text{M}$ であったことが示されている。AtNUDX9のmRNAおよびタンパク質レベルは根で高発現しており、GDP-D-Man加水分解活性はAtNUDX9の発現パターンと相関性を示していた。これまでに、GDP-D-Man合成不全株は NH_4^+ ストレスに高感受性を示すことが報告されていることから、AtNUDX9遺伝子破壊株(KO-*nudx9*)の NH_4^+ ストレス感受性が解析されている。KO-*nudx9*では NH_4^+ ストレスによる根の生育阻害が緩和されており、KO-*nudx9*のAsAレベルは野生株と変化はなかったが、 NH_4^+ 存在下で生育したKO-*nudx9*の根においてN-グリコシル化タンパク質レベルの増加が認められている。以上の結果から、AtNUDX9は細胞内GDP-D-Manレベルの制御に機能すること、さらにGDP-D-Manレベルはタンパク質のN-グリコシル化を介して NH_4^+ 感受性を制御することが示唆された。今後は、AsA生合成系における本酵素の生理的意義が明らかにされることが望まれる。

3つめの項目では、核および葉緑体形質転換技術を用いたビタミンE高生産植物の分子育種の可能性について検討されている。ヒトの健康機能の維持に必須であるビタミンEは、トコフェロール(Toc)とトコトリエノール(Toc3)の2種類が存在する。ヒトの主要なビタミンE摂取源である植物では、特定の組織に主にTocを蓄積していること、またToc3は一部の植物にのみ蓄積していることが明らかになっている。そこで、まずは植物組織におけるToc含量増大を目指して、タバコおよびレタスの核および葉緑体ゲノムに、これまでの成果からToc生合成系の律速因子と考えられるTCおよび γ -TMT(γ -Tocopherol methyltransferase)遺伝子が導入され、各Tocレベルに及ぼす影響について解析された。シロイヌナズナ由来のTCおよび γ -TMT cDNAをpsbAプロモーター下流に連結し、パーティクルガンを用いてタバコおよびレタス葉緑体ゲノムへ導入された。TC遺伝子導入タバコ(pTTC)では、 γ -Toc量が野生株の約25倍に増加し、総Toc量は約2倍に増加していたが、 α -Toc量に有意な増加は認められなかった。一方、 γ -TMT遺伝子導入タバコ(pT γ -TMT)では、 γ -TMT活性が有意に増加していたが、Toc量に変化は認められなかった。 γ -TMT遺伝子とTC遺伝子を同時に導入したタバコ(pTTC- γ -TMT)では、総Toc含量は野生株の約2.5倍に、 α -Tocは野生株の約1.6倍に増加していた。これらの結果は、TCおよび γ -TMTの共発現によって α -Tocの高蓄積が可能であることを示唆していた。また、TC遺伝子導入レタス(pLGTC)においても、 γ -Toc量の増加に起因して総Toc量の増加が認められている。このことから、植物葉においても葉緑体形質転換によるToc生合成能の強化が可能であることが示された。次に、Tocの同族体であるトコトリエノール(Toc3)に着目されている。近年、Toc3はTocと比較して約50倍の抗酸化活性を示すことや、がん細胞の増殖抑制などToc3特異的な機能を有することが明らかにされてきた。しかし、Toc3生合成系が存在するのは単子葉植物のみであり、双子葉植物はToc3生合成能を持たない。そこで、Toc3生合成の鍵酵素であるホモゲンチジン酸グラニルゲラニルトランスフェラーゼ(HGGT)遺伝子をタバコ核ゲノムに導入し、Toc3高蓄積作物の作出を試みられた。イネ由来のHGGT cDNAをCaMV35Sプロモーター下流に連結し、アグロバクテリウム法によりタバコ核ゲノムへ導入した形質転換タバコでは、野生株タバコには見られないToc3の高蓄積が認められたが、Toc量に有意な変化は認められていない。その結果として、総ビタミンE量は約2倍に増加していた。以上の結果から、Toc3非合成植物へのHGGTの導入は、Toc3生合成能を付与することが示された。

本研究により、AsAおよびTocの生合成は光を介して、電子伝達系の酸化還元状態およびプラスチドシグナルによって制御されている事、また2つのビタミン生合成は協調的に制御されていることが示された。現在進められている転写因子の解析、さらには予想されるシグナル伝達因子破壊株等を用いた解析により、両シグナル伝達系路の詳細が明らかになることが期待される。また、それらの成果をもとに、ビタミン高生産植物の作製にも成功している。今後は、有用作物への応用が期待される。本研究成果は、植物における水溶性・脂溶性抗酸化剤の生合成系制御機構の全貌解明の一助となることは間違いなく、植物生理学分野における基礎を固めるだけでなく、サプリメント植物の分子育種にもつながる有意義な結果であると考えられる。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成27年2月7日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。