

トピックス

アスコルビン酸分解産物から糖へのオキサリル基の転移： 植物におけるアスコルビン酸の新たな役割？

Transfer of oxalyl groups from ascorbate degradation products to sugars: a new role of ascorbate in plants?

アスコルビン酸(ビタミンC)は一般にもっとも馴染みのある栄養素であり、その抗酸化作用や補酵素としての役割がよく知られている。我々ヒトを含む一部の動物はアスコルビン酸の生合成能力を持たないため、当該ビタミンを食事から摂取する必要がある。その摂取源は野菜や果実などの植物資源である。一方、ほとんどの動物はアスコルビン酸合成能力を保持する。動物および植物におけるアスコルビン酸の生合成経路は解明されており、アスコルビン酸の生理作用に関する知見も蓄積されてきた。しかし、その分解のメカニズムや生理学的意義には不明な点が多く残されている。

動物と植物に共通して、アスコルビン酸の分解はその酸化型(デヒドロアスコルビン酸, DHA)を経るのが一般的な経路である。動物では、DHAの加水分解産物である2,3-ジケト-L-グルコン酸(DKG)を介してL-エリトルロースとシュウ酸が生成される経路がよく知られている(図1)¹⁾。植物でもDKGを介した分解経路は存在する。その詳細は不明であるが、植物のDKG経路では未同定のCompound Iが生じる(図1)²⁾。Compound Iはアスコルビン酸オキシダーゼ処理によって消失することから、エンジオール構造を持つと予想されている。興味深いことに、この化合物は非酵素的な反応によりH₂O₂を生成しうるとともに、ペルオキシダーゼの阻害剤として作用することから²⁾、病原菌に対する防御応答に関わる可能性が示唆されている。

植物でもっとも機能的な経路はDHAの酸化産物として4-オキサリル-L-トレオン酸(OxT)を介してシュウ酸とL-トレオン酸が生成されるDKG非依存的な経路である³⁾。*in vitro*のH₂O₂存在下において、OxTはもっとも主要なDHA酸化産物として検出される。*in vivo*におけるDHAからOxTの生成は、具体的には植物のアポプラスト(細胞外成分)でも起こることが実験的に証明さ

れている。三つのOxT異性体(2-OxT, 3-OxTおよび4-OxT)が存在し、非酵素的に相互変換されうるが、*in vitro*および*in vivo*において4-OxTが主要である。さらに、DHAの酸化により環状型OxT(cOxT[おそらく3,4-cOxT])も生成されうる。cOxTはOxTを経てシュウ酸とL-トレオン酸へと*in vivo*で分解される。OxTからシュウ酸とL-トレオン酸への反応を触媒するオキサリルエステラーゼの存在が示唆されているが³⁾、この酵素は未同定である。

さて、OxT異性体が相互変換されうることは、オキサリル基の分子内転移を意味する。したがって、オキサリル基の分子間転移も可能であるかもしれない。アクセプター基質としてはヒドロキシ基、チオール基またはアミノ基をもつ化合物が想定され、それぞれオキサリルエステル、オキサリルチオエステルまたはオキサリルアミドが形成される可能性が考えられる。このような仮説のもと、OxTをドナーとした糖へのオキサリル基転移反応を触媒する植物酵素(オキサリルトランスフェラーゼ)の存在が最近示され⁴⁾、アスコルビン酸の糖修飾ドナーの前駆体としての役割が提唱されたので紹介したい。

植物におけるOxTの異化機構を調べるため、オキサリル部位を¹⁴C標識したOxT(¹⁴C]OxT)を、ハウレンソウまたはシロイヌナズナの培養細胞を含む培地に処理した。ハウレンソウ培養細胞懸濁液では¹⁴C]OxTは比較的安定であり、大部分がOxTのまま処理6時間後まで存在した。一方、シロイヌナズナ培養細胞懸濁液では不安定であり、ほとんどがシュウ酸へと速やかに変換された。したがって、シロイヌナズナは高いオキサリルエステラーゼ活性(OxT → シュウ酸 + L-トレオン酸)をもつことが示された。ハウレンソウ培養細胞懸濁液に¹⁴C]OxTを加えた場合、培地中の放射活性(¹⁴C]OxT)は時間経過とともに消失し、6時間後に

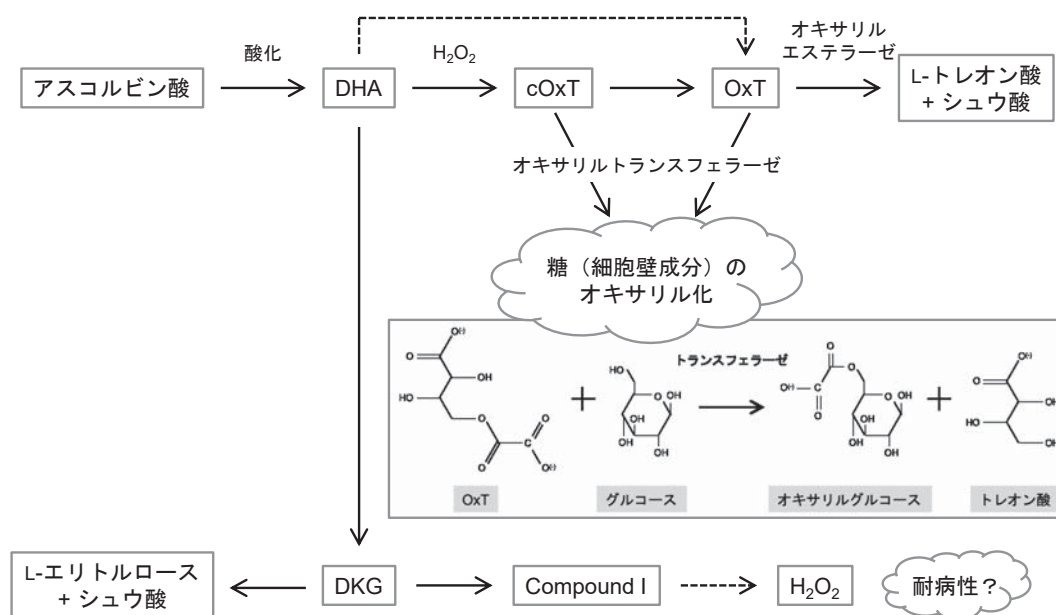


図1 動植物におけるアスコルビン酸の分解経路の概要

動植物に共通して、アスコルビン酸の分解は、その酸化型であるデヒドロアスコルビン酸(DHA)から始まるのが一般的である。動物では、DHAの加水分解産物である2,3-ジケト-L-グルコン酸(DKG)を介してL-エリトルロースとシュウ酸が生成される。植物のDKGを介した経路では、未同定のCompound Iが生成される。Compound Iは非酵素的な反応により H_2O_2 を生成する。植物で一般的な経路では、DHAの酸化産物である環状型および非環状型オキサリル-L-トレオン酸(それぞれcOxTおよびOxT)を介してシュウ酸とL-トレオン酸が生じる。cOxTおよびOxTは糖へのオキサリル基のドナーとしてはたらく、細胞壁の構造や特性に影響する可能性が示唆された。図中には、例としてグルコースをアクセプター基質とした場合の反応(予想)を示す。オキサリルエステラーゼおよびトランスフェラーゼはいずれも未同定である。

は64%まで低下した。この時点で細胞を回収し、水、エタノールで順次洗浄することにより残放射活性(細胞に取り込まれた $[^{14}C]$ OxT)の大部分が除去されたが、一部の放射活性はハウレンソウ培養細胞画分(アルコール不溶性残渣[AIR]画分)に残った。AIR画分は高分子量の物質(主に細胞壁多糖)から構成されるため、この画分への放射活性の残存は細胞壁多糖と $[^{14}C]$ オキサリル基のエステル結合の形成を示唆するものと思われた。実際に、残放射活性を含むAIR画分をアルカリ分解することで、 $[^{14}C]$ シュウ酸が検出された⁴⁾。

AIRは主に細胞壁多糖から構成されるため、 $[^{14}C]$ オキサリル化のアクセプター基質は糖であると予想された。そこで、ハウレンソウ培養細胞懸濁液に、 $[^{14}C]$ OxTとともに種々の六炭糖、五炭糖または二糖類を加えた。薄層クロマトグラフィーを用いた分析の結果、いずれの糖に対してもオキサリル基の転移が確認された。オキサリル化糖類の生成は、無細胞培地や煮沸処理した細胞を用いた場合ではほとんど認められなかったことから、酵素反応(オキサリルトランスフェラーゼ)を必要とすることが示された。糖のオキサリル化は六炭糖

(特にフルクトース)を用いた場合にもっとも顕著にみられ、続いて二糖類、五炭糖の順で低かった⁴⁾。したがって、おそらく1級水酸基が効果的なアクセプターとして働き、2級水酸基の効果は低いことが示唆された。

ハウレンソウおよびシロイヌナズナの培養細胞から細胞壁酵素画分を抽出し、アクセプター基質としてグルコースを用いた場合の $[^{14}C]$ OxTのオキサリル化反応を調べたところ、 $[^{14}C]$ オキサリルグルコースの生成が認められた。アクセプター基質の存在下では $[^{14}C]$ OxTから $[^{14}C]$ シュウ酸の生成は抑制されたことから、オキサリルトランスフェラーゼとオキサリルエステラーゼ活性は拮抗的な反応であることが示された。また、 $[^{14}C]$ シュウ酸をドナーとして用いた場合では糖のオキサリル化反応が起こらないことも確かめられた⁴⁾。

筆者らは、cOxTも有効なオキサリルドナーとしてはたらく可能性を考えた⁴⁾。事実、この環状型はグルコースへのオキサリル基の転移に有効であった。cOxTをドナーとした場合、オキサリル基を介して二分子の糖がエステル結合を形成(糖-オキサリル-糖)することが期待されたが、そのようなジエステル架橋構造は

実験的に確認されなかった。cOxTは不安定であり、cOxTにはかなりの量のOxTのコンタミネーションが生じた。このため、オキサリル化ドナーとしてのcOxTの効果を厳密に解析するのが難しく、ジエステル架橋構造の可能性も残されていると筆者らは言及している⁴⁾。

最後に、OxTから細胞壁構成多糖へのオキサリル基の転移について調べられた。種々の多糖をセルロース製ペーパーに浸潤させ、乾燥させたものをアクセプターとして利用した。この多糖を含浸させた濾紙を^[14C]OxTおよびシロイヌナズナから抽出した細胞壁酵素画分で処理し、エタノールで4回洗浄した。多糖を含浸させていないペーパー(セルロース)では、洗浄によってほぼすべての放射活性が取り除かれた。同様の結果は、ペクチンやホモガラクトロンを含む浸させたペーパーからも得られた。これらの結果は、セルロース、ペクチン、ホモガラクトロンなどはアクセプター基質として作用しないことを示唆した。一方、ヘミセルロース成分(キシランやキシログルカン)を含む浸させたペーパーでは顕著な放射活性の残存が認められ、その度合いは^[14C]OxTおよび酵素の処理時間の経過とともに増加した⁴⁾。したがって、OxTはヘミセルロースへのオキサリル基ドナーとして機能することが示唆された。

以上をまとめると、植物のアポプラストでは、DHA酸化産物であるcOxTおよびOxTをドナーとして糖のオキサリル化が生じること、そしてこの反応には未同定のオキサリルトランスフェラーゼが関与することが示された。植物のアポプラストにはアスコルビン酸オキシダーゼが存在することから、cOxTおよびOxTの生成速度はDHAの供給段階である程度は制御できるのかもしれない。細胞壁多糖は種々の修飾を受けることで細胞壁の構造や特性に大きく影響し、細胞の増殖や伸長の調節に関与することが知られている。オキサリル基は強い酸性であり、生理学的なpH条件でもアニオンの状態を維持する親水性側鎖として作用する。すなわち、アスコルビン酸をオキサリル基ドナーの前駆体として利用し、細胞壁の構造や特性を調節する仕組みがあるのかもしれない。このアスコルビン酸

の「前駆体」としての新しい役割は大変に興味深いですが、まだ課題は多く残されている。今後、オキサリルトランスフェラーゼの分子実態の解明や、植物の細胞壁成分におけるオキサリル基の検出などにより、分子機構と生理学的重要性が解明されることを期待したい。同時に、細胞の内側でのアスコルビン酸の分解経路はほとんど未解明であり、知られざる前駆体としての機能がまだまだ隠されている可能性が高い。

(2019.5.28 受付)

Key Words: Ascorbate, Degradation, 4-oxalyl-L-threonate, Oxalyltransferase, Plants

¹Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 1060 Nishikawatsu, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

²College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan
Takashi Kameoka¹, Kazuya Yoshimura², Takahiro Ishikawa¹, Takanori Maruta¹

¹ 島根大学生物資源科学部

² 中部大学応用生物学部

亀岡 峰志¹, 吉村 和也², 石川 孝博¹, 丸田 隆典¹

文 献

- 1) Smirnoff N (2018) Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radic Biol Med* **122**, 116-129
- 2) Kärkönen A, Dewhirst RA, Mackay CL, Fry SC (2017) Metabolites of 2,3-diketogulonate delay peroxidase action and induce non-enzymic H₂O₂ generation: potential. *Arch Biochem Biophys* **620**, 12-22
- 3) Green MA, Fry SC (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**, 83-87
- 4) Dewhirst RA, Fry SC (2018) Oxalyltransferase, a plant cell-wall acyltransferase activity, transfers oxalate groups from ascorbate metabolites to carbohydrates. *Plant J* **95**, 743-757