

トピックス

アスコルビン酸高含有作物育種の試み

～アスコルビン酸の過剰蓄積はトマトの花粉稔性を低下させる～

Attempt to breed high ascorbic acid-containing crops: overaccumulation of ascorbic acid suppresses pollen fertility in tomato

アスコルビン酸 (AsA) はすべての動植物に必須の分子であるが、我々はその合成能を欠いているため、日々の食事から必要量を摂取しないといけない。一方で、野菜や果物には豊富に含まれているため、ヒトにとっての AsA の良い供給源となっている。近年、健康増進や食事の栄養バランス改善のために、AsA 含有量をさらに高めた作物が求められている。植物において、AsA は葉や果実において特に多量に蓄積されており、水溶性の酸化還元物質として補酵素や電子伝達など様々な生理作用を果たしていることに加え、主要な抗酸化物質として種々の環境ストレスに対する応答/耐性に重要な役割を果たしている¹⁾²⁾。それゆえ、植物細胞内の AsA 量は周囲の環境条件の変化に合わせて迅速に変化する。

植物において、複数の AsA 生合成経路の存在が提唱されているが、それらの中で光合成の産物である D-フルクトースをもとに、D-マンノース (D-Man) および L-ガラクトース (L-Gal) の誘導体を代謝中間体として AsA を合成する D-Man/L-Gal 経路が主要な経路である¹⁾²⁾。これまでに、多様な植物種の探索/選抜や遺伝子操作を含めた育種により、AsA 高含有植物作出の試みが多数行われてきている。顕著な例として、南半球における土着植物のカムカム (*Myrciaria dubia*) やカカドゥプラム (*Terminalia ferdinandiana*) の果実では新鮮重量の 2～5% に達する AsA を蓄積することが知られている³⁾⁴⁾。一方で、AsA は糖を基に生合成されるため、細胞内の炭素代謝や炭素分配を正常に維持するために、植物は AsA 生合成能を厳密に制御していると考えられる。

VTC2 は D-Man/L-Gal 経路の律速段階である GDP-L-Gal から L-Gal-1 リン酸への反応を触媒する GDP-L-Gal ホスホリラーゼ (GGP) をコードする遺伝子であり、植物界に普遍的に存在している⁵⁾。VTC2 の名称は遺伝学的スクリーニングにより単離されたシロイヌ

ナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 変異株の表現型に由来するが、本稿では混乱を防ぐため、以降 GGP 遺伝子と表記する。GGP 遺伝子の転写は光照射下で誘導、暗所で抑制され、それに伴い AsA 量も増減する¹⁾²⁾⁶⁾。一方で、GGP 遺伝子の発現は翻訳の段階で細胞内 AsA 濃度に依存してネガティブにフィードバック制御されることも報告された⁷⁾。すなわち、細胞内に AsA が高濃度に蓄積しているとき、GGP mRNA の 5' 非翻訳領域に存在する upstream Open Reading Frame (uORF) が優先的に翻訳され、下流の GGP コード領域の翻訳効率が低下し、AsA 生合成が抑制される (図 1)。この uORF による翻訳制御機構については過去のトピックスで紹介されているので参照されたい⁸⁾。uORF は多様な植物種の GGP 遺伝子に認められることから、植物界に普遍的な制御機構であると考えられ、AsA 高含有作物の作出のための良いターゲットとなりうる。実際に、この uORF をゲノム編集技術により欠失させることで、AsA 量を増加させたシロイヌナズナやレタス (*Lactuca sativa* L.) の作出に成功している⁹⁾。ゲノム編集技術は、ゲノム上の目的形質を支配する遺伝子を直接的に改良できるだけでなく、編集完了後に導入した遺伝子を完全に取り除くことも可能である。そのため、遺伝子組換え作物が忌避される大きな理由であるマーカー遺伝子などの人為的に改変した遺伝子の残存を回避できることから、作物の機能改変への応用に有望な技術である。この点からも、ゲノム上の uORF の改変は作物育種に実用化できると期待された。しかし最近、uORF の欠失による AsA の過剰蓄積が花器官の構造、特に花粉稔性の異常の原因となることが報告されたので紹介したい¹⁰⁾。

矮性の実験用トマト マイクロトム (*Solanum Lycopersicum* cv Micro-Tom) を変異誘導剤エチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理することで作出した変異株から、順遣

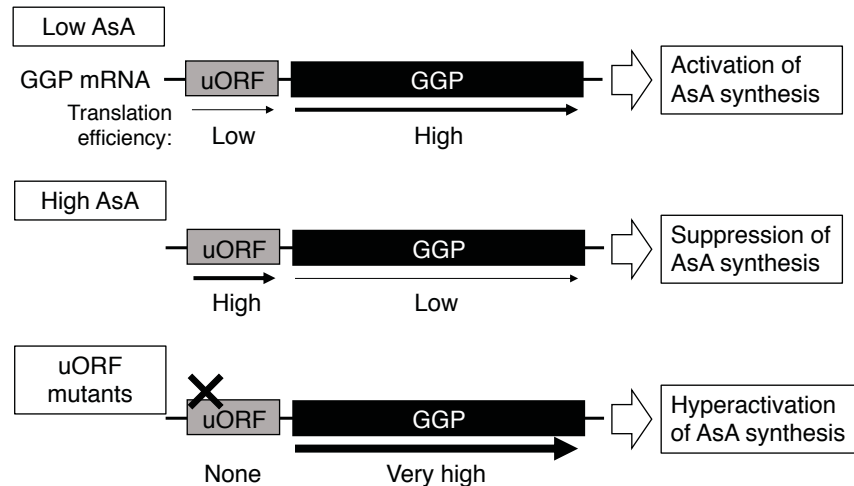


図1 uORFによるGGP遺伝子の翻訳制御モデル

細胞内AsA濃度が低いときはGGP遺伝子が優先的に翻訳され、AsA生合成が活性化される(上図)。一方、AsA濃度が高いときは優先的にuORFが翻訳され、結果的に下流のGGP遺伝子の翻訳が抑制されるため、AsA生合成が抑制される(中図)。P17C5-3変異株およびuORF-GGP1変異株ではuORFの変異によりGGP遺伝子のみが翻訳されるため、AsA生合成が過剰に活性化される(下図)。

伝学的なスクリーニングにより、成熟した果実に野生株(1~1.3 μmol/g FW)の2~5倍のAsAを高蓄積した変異株が5つ単離された。それらの中で、P17C5-3と名付けられた変異株は変異をヘテロ型で有していたが、果実のAsA量は最も高かった(約5.5 μmol/g FW)。P17C5-3株の花は異常な形態であったが、果実の形態は野生株とほぼ同じであった。しかし、ほとんどの果実に種子が無く、僅かな果実に発芽率が低い小さな種子が少量認められた。そのため、P17C5-3株の形質を引き継いだ次世代を得ることが難しかったが、他のトマト栽培品種であるM82(*S. Lycopersicum* cv. M82)と異系交雑することでF2世代を得ることができ、変異部位のマッピングが行われた。トマトには2つのGGP遺伝子パラログ、SIGGPIおよびSIGGP2が存在するが、すべての器官においてSIGGPI遺伝子の発現量が高く、特に花器官で高発現している。マッピング解析の結果、SIGGPI遺伝子の上流に位置するuORF内にCからTへの置換が認められた(図1)。

そこで、CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集により、P17C5-3に類似したuORFの変異をマイクロトムへ導入した形質転換株(uORF-GGP1変異株)のT1世代を複数系統作出した。いずれの系統もuORFの変異をヘテロ型で保有しており、それらの果実はP17C5-3株と同様にAsAを高蓄積(野生株の約4倍)していた。また、種子もわずかしこ認められなかった。自家交配後のT2世代では変異ホモ型、変異ヘテロ型、およ

び野生ホモ型に分離するが、変異ホモ型株はシビアな矮性を示し、その花も葯が融合した異常な形態であった。さらに、種子のない小さな果実のみ結実したが、そのAsA量は野生株の7~15倍に増加していた。一方、変異ヘテロ型の株は野生株と同様に生育し、P17C5-3株と同様にAsA量が3~4倍に増加した果実を結実した。また、変異ホモ型株ほどではないものの、葯が融合した花の形態異常が認められ、結実した果実のほとんどに種子が無く、僅かな果実に発芽率が低い小さな種子が少量認められた。これらの結果から、P17C5-3株にみられた花器官や種子の異常はSIGGPI遺伝子のuORFの変異に起因すると考えられた。

変異ホモ型のuORF-GGP1変異株の花粉囊には正常な花粉が僅かしか存在せず、ほとんどが異常な形態であった。また、変異ホモ型の花粉はほとんど発芽できなかった(10%以下)。一方、変異ヘテロ型の花粉の発芽率(約40%)は野生ホモ型(約80%)の半分程度であった。これらのことから、P17C5-3株やuORF-GGP1変異株では花粉の発達異常に関連した雄性不稔に起因して種子のない果実が形成されると考えられ、果実の稔性と細胞内AsA量に密接な関係があることが示された。

周知のごとく、植物細胞においてAsAはグルタチオンとともに重要なレドックスバッファーであるため、細胞内レドックスの恒常性維持や酸化ストレス

抵抗性に必須であるだけでなく、遺伝子発現制御にも大きな影響を及ぼす¹⁾²⁾。uORF 変異ホモ型、変異ヘテロ型、および野生ホモ型の株の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析の結果、AsA 生合成関連酵素遺伝子の中で、*SIGGPI* 遺伝子の発現量が uORF 変異ホモ型および変異ヘテロ型の株において最も顕著に増加 (2~3 倍) していた¹⁰⁾。これは、uORF の変異により翻訳阻害が回避されたことで、mRNA の安定性が向上したためであると考えられる。また、それらの株では花粉の発達や細胞壁合成に関係する遺伝子の発現が抑制され、ストレス防御シグナル経路に関係する遺伝子の発現が増加していることが明らかになった。さらに、uORF 変異ホモ型の株では変異ヘテロ型および野生ホモ型と異なり、花器官形成初期におけるトランスクリプトームの変化が認められず、これが花器官の異常な形態をもたらす原因と考えられた。これらのことから、uORF による AsA 生合成のネガティブフィードバック制御は細胞内レドックスの恒常性維持を介して形態形成や生殖に重要な役割を果たすことが示唆された。

興味深いことに、GGP を過剰発現したトマトは果実の AsA 量の増加とともに、種子のない果実を結実することが報告されていることから¹¹⁾、細胞内 AsA 量がある一定の閾値を超えると種子形成に異常をもたらすことが支持される。対照的に、トマトの AsA 量が 60% 低下すると、細胞分裂や細胞伸長の異常に起因して生育が阻害される¹²⁾。また、AsA 量の低下はトマトの花器官の形成異常をもたらすことも示されているが¹³⁾、生殖過程に影響しないとの報告もあり¹⁴⁾、再検証が待たれる。一方、グルタチオン欠乏シロイヌナズナ変異株においても花粉の発芽率が低下し、未発芽花粉において酸化型グルタチオンが過剰蓄積していることから¹⁵⁾、細胞内レドックス状態が花器官の発達、特に花粉形成に影響することが示唆される。

以上より、GGP 遺伝子の uORF の改変は AsA 高含有作物の育種に応用可能であるが、現状では同時に生殖能低下という作物に不適な形質ももたらす。花粉形成に影響する AsA の閾値はどの程度なのか？ また、その影響や閾値はすべての植物種に共通するのか？ について明らかにすることで、AsA 高含有作物の実用化が近づくであろう。さらに、もし花粉形成への影響を含む細胞内 AsA の生理的役割を完全に明らかにできれば、植物の花器官の形態や稔性の改変技術に繋がるかもしれない。

Key words : vitamin C, ascorbic acid, tomato, *VTC2*, uORF

Department of Food and Nutritional Science, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan

Kanako Suzuki, Kazuya Yoshimura

中部大学応用生物学部食品栄養科学科

鈴木 花奈子, 吉村 和也

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2021.3.2 受付)

参考文献

- 1) Ishikawa T, Maruta T, Yoshimura K, Smirnov N (2018) Biosynthesis and regulation of ascorbic acid in plants. *In: Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer, pp.163-179
- 2) Yoshimura K, Ishikawa T (2018) Chemistry and metabolism of ascorbic acid in plants. *In: Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Springer International Publishing, p1-23
- 3) Justi KC, Visentainer JV, Evelázio de Souza N, Matsushita M (2000) Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Arch Latinoam Nutr* **50**, 405-408
- 4) Brand-Miller JC, Cherikoff V (1982) An outstanding food source of vitamin C. *Lancet* **2**, 873
- 5) Wheeler G, Ishikawa T, Pornsaksit V, Smirnov N (2015) Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *eLife* **4**, e06369
- 6) 吉村和也, 石川孝博 (2014) *VTC2* の転写制御はアスコルビン酸生合成の明/暗調節に必須である：複雑なアスコルビン酸生合成制御機構のマスタースイッチ. *ビタミン* **88**, 535-537
- 7) Laing WA, Martínez-Sánchez M, Wright MA, Bulley SM, Brews-ter D, Dare AP, Rassam M, Wang D, Storey R, Macknight RC, Hellens RP (2015) An upstream open reading frame is essential for feedback regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**, 772-786
- 8) 袖山翼, 石川孝博 (2016) *VTC2* 遺伝子の upstream Open Reading Frame を介した植物ビタミン C 合成のフィードバック調節. *ビタミン* **90**, 119-121
- 9) Zhang H, Si X, Ji X, Fan R, Liu J, Chen K, Wang D, Gao C (2018) Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nature Biotech* **36**, 894-898
- 10) Deslous P, Bournonville C, Decros G, Okabe Y, Mauxion J-P, Jorly J, Gadin S, Brès C, Mori K, Ferrand C, Prigent S, Ariuzumi

- T, Ezura H, Hernould M, Rothan C, Pétriacq P, Gibon Y, Baldet P (2021) Overproduction of ascorbic acid impairs pollen fertility in tomato. *J Exp Bot* erab040
- 11) Bulley SM, Rassam M, Hoser D, Otto W, Schünemann N, Wright M, MacRae E, Gleave A, Laing W (2009) Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *J Exp Bot* **60**, 765-778
- 12) Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, Faurobert M, Gouble B, Page D, Garcia V, Petit J, Stevens R, Causse M, Fernie AR, Lahaye M, Rothan C, Baldet P (2009) GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J* **60**, 499-508
- 13) Mounet-Gilbert L, Dumont M, Ferrand C, Bournonville C, Monier A, Jorly J, Lemaire-Chamley M, Mori K, Atienza I, Hernould M, Stevens R, Lehner, Mollet JC, Rothan C, Lerouge P, Baldet P (2016) Two tomato GDP-D-mannose epimerase isoforms involved in ascorbate biosynthesis play specific roles in cell wall biosynthesis and development. *J Exp Bot* **67**, 4767-4777
- 14) Baldet P, Bres C, Okabe Y, Mauxion J-P, Just D, Bournonville C, Ferrand C, Mori K, Ezura H, Rothan C (2013) Investigating the role of vitamin C in tomato through TILLING identification of ascorbate-deficient tomato mutants. *Plant Biotech* **30**, 309-314
- 15) García-Quirós E, Alché J de D, Karpinska B, Foyer CH (2020). Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour. *J Exp Bot* **71**, 730-741