

トピックス

アスコルビン酸生合成機構の多機能化と効率化 ～植物のアスコルビン酸生合成酵素群は細胞質と核に局在し、 巨大な複合体を形成しているかもしれない～

Optimization and multi-functionalization of the mechanism of ascorbate biosynthesis: enzymes involved in the ascorbate biosynthesis in plants might localize to cytosol and nucleus, and form a large complex

アスコルビン酸 (AsA) は動植物において必須の分子であるが、ヒトを含む一部の動物は合成能を欠いているため食事により野菜や果物などから摂取する必要がある。一方、植物は AsA を豊富に含んでおり、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役割を担っていることに加え、抗酸化物質として環境ストレスに対する応答や耐性に重要な役割を果たしている¹⁾²⁾。そのため、植物細胞内の AsA 濃度やその酸化還元比は周囲の環境条件の変化、例えば光照射の有無やその強度に合わせてダイナミックに変化する。当然ながら、それらは生合成や分解の速度、および細胞内の酸化還元状態などのバランスにより決定されている。

植物において、AsA 生合成の主要な経路である Smirnoff-Wheeler 経路では、光合成産物である D-フルクトースから、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 が合成されるため、D-Man/L-Gal 経路とも呼ばれる³⁾ (図 1)。そのうち、L-ガラクトノ-1,4-ラクトン (L-GalL) までの反応を触媒する酵素は細胞質に局在しているが、L-GalL から AsA への最終段階の反応はミトコンドリア内膜の膜間腔側に局在する酵素、L-GalL デヒドロゲナーゼ (GLDH) により行われている。また、代謝中間体の GDP-D-Man や GDP-L-Gal は細胞壁の多糖類の合成やタンパク質のグリコシル化にも利用されるため、GDP-L-Gal から L-Gal-1-リン酸への反応以降が AsA 合成に特異的な (コミットされた) 反応となる。事実、GDP-L-Gal ホスホリラーゼ (GGP) により触媒される上記の反応 (AsA 生合成にコミットされた経路の初発段階) が D-Man/L-Gal 経路の律速段階となっている⁴⁾⁻⁷⁾。本経路の制御と重要性については、最近の本誌⁸⁾にて詳しく解説されているので参照されたい。なお、GGP

をコードする遺伝子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して *VTC2* と名付けられているが、本稿では混乱を防ぐため、以降 *GGP* 遺伝子と表記する。一部の報告を除いて、*GGP* 遺伝子の発現のみが環境の変化にダイナミックに応答し、それに伴い AsA 量も増減することが明らかになっている⁸⁾。さらに、*GGP* 遺伝子の翻訳は AsA によりフィードバック抑制されている⁹⁾。すなわち、植物の AsA 生合成能は *GGP* の転写と翻訳段階の両方で制御されていることになる。

最近、*GGP* の重要性は Complex Pathway Simulator を用いたバイオインフォマティクスの手法でも確認された¹⁰⁾。すなわち、AsA 生合成経路の速度モデルを構築したところ、AsA によるフィードバック抑制が十分に強い場合、D-Man/L-Gal 経路を構成する酵素の中で、*GGP* のみが経路の流量と合成される AsA 量に大きな影響を及ぼすことが示された。しかし、その転写や翻訳の制御に本質的に関与する因子は未同定であり、制御機構の詳細は不明なままである。

また、AsA 生合成経路を構成する酵素遺伝子が AsA 生合成とは別の役割を果たしている可能性も示されている。すなわち、GDP-Man ピロホスホリラーゼ (*GMP*) 遺伝子および GDP-Man-3,5-エピメラーゼ (*GME*) 遺伝子をホモ型にノックアウトしたシロイヌナズナ株 (*cyt1-1* および *gme-1*) はどちらも致死性の表現型を、*GME* 遺伝子をヘテロ型にノックアウトした株は葉が薄い緑色になる表現型を示すことが明らかになっている¹¹⁾¹²⁾。同様に、*GLDH* および L-Gal デヒドロゲナーゼ (*L-GalDH*) 遺伝子のノックアウト株や、*GGP* 遺伝子とそのパラログである *VTC5* 遺伝子の二重ノックアウト株も生長が著しく阻害される表現型を示すが、培地

に AsA を添加することで回復する⁴⁾¹³⁾¹⁴⁾。しかし、*GMP* や *GME* 遺伝子をホモ型に、および *GME* 遺伝子をヘテロ型にノックアウトした株の表現型は AsA を添加しても回復しなかった。これらの結果、特に *GME* 遺伝子のヘテロ型の表現型は、上述したように *GMP* や *GME* による反応の生成物が細胞壁の合成やタンパク質のグリコシル化に影響することのみでは説明できず、疑問は残されたままである。しかし最近、その疑問を解決するヒントとして、AsA 生合成関連酵素の多くが核に局在すること、および細胞内で複合体を形成していることが報告されたので紹介したい¹⁰⁾。

これまでに、*GMP* および *GGP* は細胞質と核の二重局在性を示すことが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。そこで、それら以外の AsA 生合成関連酵素の細胞内局在性を検証するために、タバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉で C 末端に GFP を融合させた酵素遺伝子を一過的に過剰発現させ、蛍光を観察した。その結果、*GMP* や *GGP* 遺伝子と同様に、L-Gal-1-リン酸ホスファターゼ (*GPP*) および L-*GalDH* 遺伝子を用いた場合、核と細胞質の両方で GFP 蛍光が検出された。一方で、*GME* 遺伝子を用いた場合は細胞質および核の周辺に GFP 蛍光が検出された。過剰発現により細胞内局在性が変化した可能性を考慮して、GFP と融合させた酵素遺伝子を、5' 非翻訳領域を含む自身のプロモーターにより発現させたシロイヌナズナの子葉、胚軸および根での GFP 蛍光を調べた。その結果、*GME* 遺伝子を用いた場合はどの組織においても細胞質でのみ GFP 蛍光が検出されたが、*GPP* および L-*GalDH* 遺伝子を用いた場合は細胞質と核の両方で蛍光が検出された。これらの結果から、*GMP* および *GGP* に加え、*GPP* および L-*GalDH* も核と細胞質の二重局在であることが示された (図 1)。また、*GPP* および L-*GalDH* 遺伝子を用いた場合、根では核内で点状に蛍光がみられ、核小体に局在していることが示唆された。

続いて、シロイヌナズナの AsA 生合成関連酵素遺伝子の C 末端に GFP もしくは HA タグを付加した遺伝子をタバコ (*N. benthamiana*) で過剰発現させ、共免疫沈降法による相互作用の解析を行った。その結果、*GMP* と *GME*、*GME* と *GGP*、*GGP* と *GPP*、*GPP* と L-*GalDH* および *GMP* と L-*GalDH* の組み合わせで相互作用が確認された。

そこで、それらが一對のペアで相互作用しているのではなく、巨大な複合体を形成している可能性を検証するために、*GMP*、*GME*、*GGP*、*GPP*、L-*GalDH* および *GLDH* 遺伝子のすべてに GFP もしくは HA タグのいずれかを付加した遺伝子を同時にタバコ (*N. benthamiana*)

に形質転換した。得られたタバコから粗抽出液を調整し、ゲルろ過クロマトグラフィーで分画した後に、抗 GFP 抗体および抗 HA 抗体を用いたイムノプロット解析を行った。その結果、L-*GalDH* (+HA = 40.9 kDa) は推定分子量に相当する画分で検出された。また、*GLDH* (+HA = 75 kDa) は 233 kDa 以上の画分で検出された。これは、*GLDH* がミトコンドリアの複合体 I と相互作用しているためと考えられた¹⁷⁾。一方、*GMP* (+GFP = 68.6 kDa)、*GME* (+HA = 49.2 kDa)、*GGP* (+GFP = 78 kDa) および *GPP* (+GFP = 58.2 kDa) はすべて 63 から 233 kDa の間の画分に渡って検出された。これらの結果から、*GMP*、*GME*、*GGP* および *GPP* は細胞内で巨大な複合体を形成していると考えられた (図 1)。

しかし、それら酵素間の相互作用は酵母ツーハイブリッド法では確認できなかった。すなわち、*GMP*、*GME* および *GPP* は他の酵素とは異なり、それら自身が多量体を形成していることを示唆する自身との相互作用のみが認められた。酵母ツーハイブリッド法での転写活性化ドメインや結合ドメインとの融合が本来の相互作用を阻害した可能性は除外できないが、上述したゲルろ過クロマトグラフィーでの結果も考慮すると、単純に 2 つの酵素が結合しているわけではなく、複数の酵素が複雑に相互作用して複合体を形成している可能性が高い。

以上より、AsA 生合成経路の一部の酵素は細胞質で巨大な複合体を形成し、AsA 生合成中間体を効率よく連続して反応させることで AsA 生合成の代謝フラックスを増加させていると考えられる。それにより、律速酵素である *GGP* による制御を効率化しているのかもしれない。また、それらの酵素は核内でも複合体を形成し、AsA 生合成以外の役割を果たしている可能性がある。さらに、複合体の形成には複数の生合成関連酵素の存在が必須であるため、*GME* 遺伝子のホモ型やヘテロ型のノックアウト株の表現型が培地への AsA 添加により回復しないのは、*GME* の欠損や減少が核での複合体形成を抑制したためかもしれない。しかし、複合体がどのようにして形成され、どのような機能を果たしているのかなどの詳細は不明であり、今後の研究課題となっている。また今回得られた結果は、複数の AsA 生合成関連酵素を形質転換により過剰発現させた植物から得られたものであることにも注意を払う必要がある。すなわち、実際に植物細胞内の native 酵素が複合体を形成しているのかについてはさらなる検証が必要である。

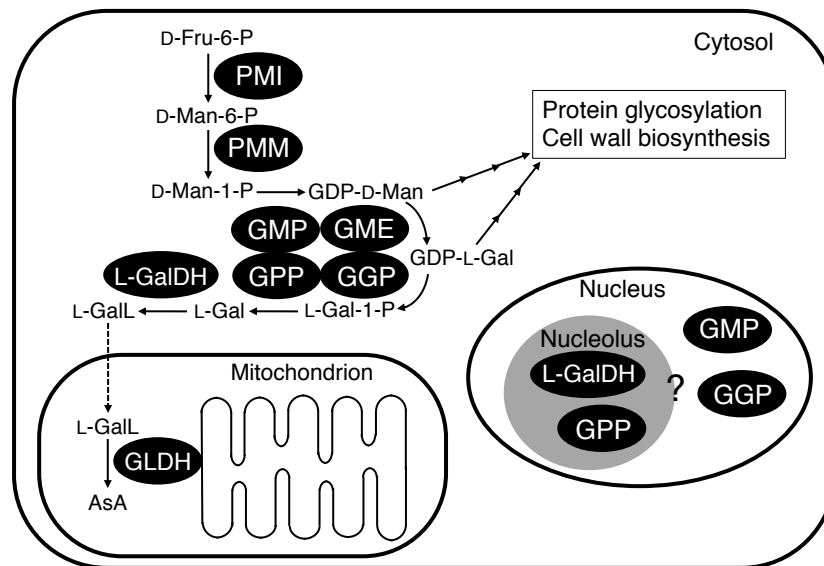


図1 シロイヌナズナの AsA 生合成酵素群の細胞内局在と複合体の形成

AsA 生合成の主要な経路である D-Man/L-Gal 経路を構成する一部の酵素 (GMP, GME, GPP および GPP) は細胞質で巨大な複合体を形成し, AsA 生合成中間体を効率よく連続して反応させることで AsA 生合成の代謝フラックスを増加させていると考えられる. また, 一部の酵素は核内にも局在し, AsA 生合成以外の役割を果たしている可能性がある. AsA: アスコルビン酸, D-Fru: D-フルクトース, D-Man: D-マンノース, L-Gal: L-ガラクトース, L-GalL: L-ガラクトノ-1,4-ラクトン, P: リン酸, PMI: Man リン酸イソメラーゼ, PMM: Man リン酸ムターゼ, GMP: GDP-Man ピロホスホリラーゼ, GME: GDP-Man-3,5-エピメラーゼ, GPP: GDP-L-Gal ホスホリラーゼ, GPP: L-Gal-1-リン酸ホスファターゼ, L-GalDH: L-Gal デヒドロゲナーゼ, GLDH: L-GalL デヒドロゲナーゼ

Key words :vitamin C, ascorbic acid, VTC2, GDP-L-galactose phosphorylase

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

(2021.7.1 受付)

参考文献

- 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
- 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
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnov N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**, 365-369
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnov N (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J* **282**, 18879-18885
- Laing WA, Wright MA, Cooney J, Bulley SM (2007) The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proc Natl Acad Sci* **104**, 9534-9539
- Linster CL, Gomez TA, Christensen KC, Adler LN, Young BD, Brenner C, Clarke SG (2007) *Arabidopsis VTC2* encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the smirnov-wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *J Biol Chem* **282**, 18879-18885
- Yoshimura K, Nakane T, Kume S, Shiomi Y, Maruta T, Ishikawa T, Shigeoka S (2014) Transient expression analysis revealed the importance of *VTC2* expression level in light/dark regulation of

- ascorbate biosynthesis in Arabidopsis. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**, 60-66
- 8) 石川孝博 (2020) 植物のアスコルビン酸生成研究の現状. *ビタミン* **94**, 438-442
 - 9) Laing WA, Martínez-Sánchez M, Wright MA, Bulley SM, Brewster 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
 - 10) Fenech M, Amorim-Silva V, Esteban del Valle A, Arnaud D, Ruiz-Lopez N, Castillo AG, Smirnoff N, Botella MA (2021) The role of GDP-L-galactose phosphorylase in the control of ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol* **185**, 1574-1594
 - 11) Lukowitz W, Nickle TC, Meinke DW, Last RL, Conklin PL, Somerville CR (2001) Arabidopsis *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 2262-2267
 - 12) Qi T, Liu Z, Fan M, Chen Y, Tian H, Wu D, Gao H, Ren C, Song S, Xie D (2017) GDP-D-mannose epimerase regulates male gametophyte development, plant growth and leaf senescence in *Arabidopsis*. *Sci Rep* **7**, 10309
 - 13) Pineau B, Layoune O, Danon A, De Paepe R (2008) L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *J Biol Chem* **283**, 32500-32505
 - 14) Lim B, Smirnoff N, Cobbett CS, Golz JF (2016) Ascorbate-deficient *vtc2* mutants in *Arabidopsis* do not exhibit decreased growth. *Front Plant Sci* **7**, 1-9
 - 15) Müller-Moulé P (2008) An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2. *Plant Mol Biol* **68**, 31-41
 - 16) Wang J, Yu Y, Zhang Z, Quan R, Zhang H, Ma L, Deng XW, Huang R (2013) Arabidopsis CSN5B interacts with VTC1 and modulates ascorbic acid synthesis. *Plant Cell* **25**, 625-636
 - 17) Schimmeyer J, Bock R, Meyer EH (2016) L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **90**, 117-126