

- 1304.
- 3) Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., & Mattaj, I.W. (1997) *Cell*, **90**, 1051–1060.
 - 4) Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., & Nishida, E. (1997) *Nature*, **390**, 308–311.
 - 5) Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F., & Dargemont, C. (1997) *Science*, **278**, 141–144.
 - 6) Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C., & Weis, K. (1997) *Cell*, **90**, 1041–1050.
 - 7) Monecke, T., Güttler, T., Neumann, P., Dickmanns, A., Görlich, D., & Ficner, R. (2009) *Science*, **324**, 1087–1091.
 - 8) Güttler, T., Madl, T., Neumann, P., Deichsel, D., Corsini, L., Monecke, T., Ficner, R., Sattler, M., & Görlich, D. (2010) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1367–1376.
 - 9) Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., & Horinouchi, S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9112–9117.
 - 10) Koyama, M. & Matsuura, Y. (2010) *EMBO J.*, **29**, 2002–2013.
 - 11) Seewald, M.J., Korner, C., Wittinghofer, A., & Vetter, I.R. (2002) *Nature*, **415**, 662–666.
 - 12) Wälde, S. & Kehlenbach, R.H. (2010) *Trends Cell Biol.*, **20**, 461–469.
 - 13) Arnaoutov, A., Azuma, Y., Ribbeck, K., Joseph, J., Boyarchuk, Y., Karpova, T., McNally, J., & Dasso, M. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 626–632.
 - 14) Wang, W., Budhu, A., Forgues, M., & Wang, X.W. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 823–830.

小山 昌子, 松浦 能行
(名古屋大学大学院理学研究科)

Structural basis for CRM1-mediated nuclear export
Masako Koyama and Yoshiyuki Matsuura (Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan)

光合成生物におけるアスコルビン酸生合成研究の新展開

はじめに

L-アスコルビン酸 (AsA) は、植物や真核藻類を含めた光合成生物およびほとんどの動物で生合成される (霊長類やモルモット, コウモリなど一部の鳥類, 真骨魚類は生合成できない)。動物の AsA はウロン酸経路の一分枝として D-グルクロン酸 (D-GlcUA) から L-グルロン酸 (L-GulA), L-グルノノ-1,4-ラクトン (L-GulL) を経て生合成されることが、最終段階を触媒する L-GulL 酸化酵素やアルドノラク トナーゼ (SMP30, ALase) の解析から明らかになってい

る^{1,2)}。ヒトを含めた霊長類は L-GulL 酸化酵素が偽遺伝子化しているため、食事からビタミン C として AsA を摂取しなければならない。我々にとって最大の AsA 供給源となる光合成生物の細胞内には、mM オーダーの高濃度で AsA が蓄積しており、細胞壁やデンプンなどを除いた可溶性糖類に占める割合は最大で約 10% に達する。光合成生物の AsA 生合成経路は長らく未解明であったが、最近ようやく遺伝子レベルで明らかになってきた。動物とは異なり、D-マンノース (D-Man) と L-ガラクトース (L-Gal) の誘導体を代謝中間体とする D-Man/L-Gal 経路と、D-ガラクトン酸 (D-GalUA) を代謝中間体とする D-GalUA 経路が存在し、それぞれの経路の分布は植物や藻類の種により異なることが分かってきた。本稿では、これまでに筆者らの行ってきた研究を中心に、光合成生物の二つの AsA 生合成経路に関する知見と今後の展望について概説したい。

1. D-マンノース/L-ガラクトース経路

D-Man/L-Gal 経路は、D-フルクトース 6-リン酸 (P) から D-Man 6-P, D-Man 1-P を経た後、ピロホスホリラーゼにより GTP と反応して GDP-D-Man となり、エピマー化により GDP-L-Gal となる。GDP-L-Gal は、さらに L-Gal 1-P, L-Gal を経て AsA の最終前駆体 L-ガラクトノ-1,4-ラクトン (L-GalL) へと順次変換される (図 1)。この経路を構成する代謝酵素はすべて遺伝子レベルでの同定が完了し、ミトコンドリアに局在しシトクロム c を電子受容体とする L-GalL 脱水素酵素を除いて、全て細胞質で機能している^{3,4)}。

D-Man/L-Gal 経路構成酵素の同定には、シロイヌナズナの AsA 欠乏 *vtc* 変異体が重要な役割を果たしてきた。*vtc* 変異体は 5 種類存在し、*vtc1* と *vtc4* の原因遺伝子は、それぞれ D-Man/L-Gal 経路上の GDP-Man ピロホスホリラーゼおよび L-Gal 1-P ホスファターゼである^{3,4)}。また *vtc2* と *vtc5* の原因遺伝子は、どちらも D-Man/L-Gal 経路上で GDP-L-Gal から L-Gal 1-P への変換反応を触媒する GDP-L-Gal ホスホリラーゼをコードしているパラログ遺伝子である。GDP-L-Gal ホスホリラーゼは、ヌクレオチド加水分解酵素や転移酵素ファミリーに特徴的な Histidine triad (HIT) モチーフを持つ新奇糖核酸代謝酵素であり、動物でも機能は未同定であるがオルソログが存在する⁵⁾。我々は *VTC2* および *VTC5* の機能解析のため、これらの遺伝子の二重破壊変異株をシロイヌナズナで作出した⁵⁾。この変異株は通常の栽培用培地上で発芽直後に黄化し致死的表現型を示すが、培地に L-Gal を添加することで正常な

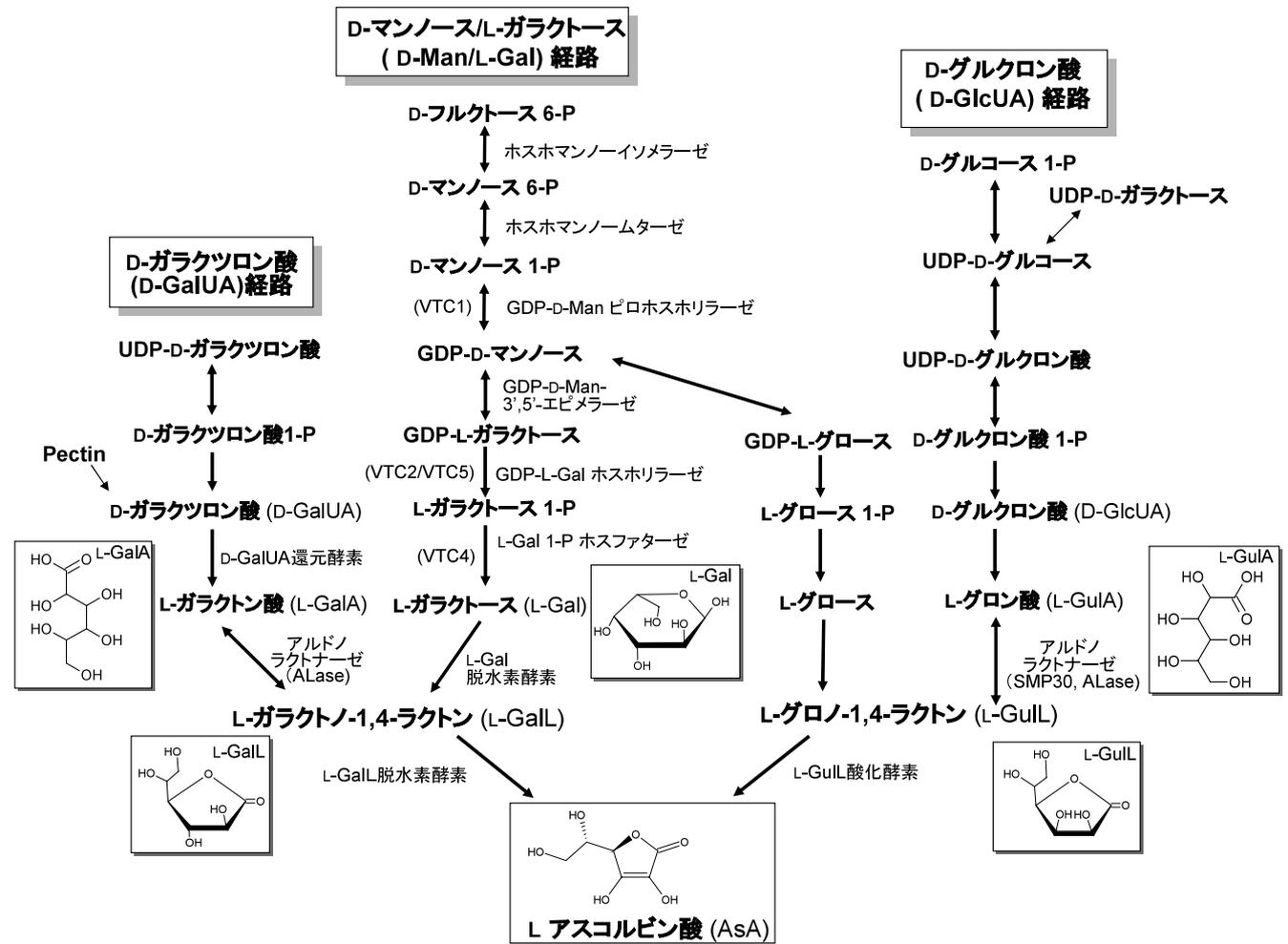


図1 アスコルビン酸生合成経路の概略
 本文に関連するアスコルビン酸生合成経路を示している。遺伝子レベルで同定されている代謝酵素名のみを図中に示した。

生育を回復することから、D-Man/L-Gal 経路が AsA 生合成に不可欠な経路であると同時に、AsA は植物の生育に必須因子であることが明らかになった。致死的表現型と AsA 添加による生育の回復は、最終段階を触媒する L-GalL 脱水素酵素の遺伝子破壊株でも報告されている⁶⁾。またホスホマンノースイソメラーゼノックダウン変異株では、野生株に比べ低い AsA レベルを示した⁷⁾。一連の事実から、植物では D-Man/L-Gal 経路が AsA 生合成の主要経路として理解されている。

D-Man/L-Gal 経路以外に、これまで動物様の D-GlcUA や後述の D-GalUA を代謝中間体とする経路、また GDP-Man エピメラーゼの反応過程で GDP-D-Man から GDP-L-グルコースが生成することから L-グルコース (L-Gul) を経る経路などさまざまな生合成経路が提唱されてきた^{3,4)}。後述する

D-GalUA を除き、D-GlcUA と L-Gul を経る経路では、最終前駆体は L-GulL を経なければならない。シロイヌナズナにはラットの L-GulL 酸化酵素とアミノ酸レベルで約 40% 程度の同一性を持つオルソログが七つ存在し、これらの遺伝子を過剰発現させたタバコ培養細胞は、L-GulL を与えることで AsA レベルの増加が認められることから、D-GlcUA や L-Gul を中間体とする経路も機能している可能性がある⁸⁾。しかし、前述の VTC2/VTC5 二重破壊株や L-GalL 脱水素酵素破壊株の結果からも、それらの AsA 生合成への関与は極めて限定されたものであると考えられる。

2. D-ガラクトツロン酸経路

D-GalUA 経路は、かつてトレーサー実験により緑藻ユーグレナ (*Euglena gracilis*) において提唱されていた⁹⁾。最

近筆者らは、ユーグレナから光合成生物で初めてこの経路を構成する ALase を同定し、D-GalUA 経路が主要経路として機能していることを明らかにしている¹⁰⁾。D-GalUA 経路は、D-GalUA から L-ガラクトン酸 (L-GalA), L-GalL を経て AsA へと順次変換し、ALase はこのうち L-GalA から L-GalL への触媒に関わる。我々は、ラット SMP30 の配列情報に基づき、ユーグレナ EST データベースより SMP30 と約 70% の類似性を持つ ALase 相同遺伝子を見出した¹⁰⁾。組換え体酵素よりユーグレナ ALase は、ラット SMP30 と同様に Zn²⁺ 要求性を示し、L-GalA から L-GalL の生成反応および L-GalL の加水分解による L-GalA の生成反応を可逆的に触媒した。さらに、ALase の二本鎖 RNA を導入したユーグレナ細胞は、通常の培地中では細胞増殖せず、L-GalL の添加により増殖の回復が認められた。この結果は、ALase 遺伝子のサイレンシングにより L-GalA から L-GalL への触媒反応が抑制された結果、AsA が合成できなくなったことが原因であり、ユーグレナでは D-Man/L-Gal 経路ではなく、D-GalUA 経路が重要な AsA 供給源となっていることが示された¹⁰⁾。またユーグレナにおいて、D-GalUA から L-GalA を生成する D-GalUA 還元酵素が精製されている事実も D-GalUA 経路の機能を裏付けている¹¹⁾。

植物においても D-GalUA 経路の存在が示唆されている。イチゴ果実から単離された新奇のアルドケトレダクターゼ遺伝子は、NADPH 依存の D-GalUA 還元酵素をコードしており、同酵素遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナの AsA 含量は 2~3 倍に増加した¹²⁾。また D-GalUA 還元酵素遺伝子は、葉では発現しておらず、果実において成熟に伴う AsA 含量の増加と相関して発現上昇することから、D-GalUA 経路は果実特異的な経路であることが示唆されている¹²⁾。植物の ALase は未同定であることから、D-GalUA 経路について結論するのはまだ尚早であるが、最近筆者らのグループではトマト果実から ALase 活性を検出しており、D-GalUA 経路の可能性は充分あると考えている¹³⁾。果実には D-GalUA を構成成分とするペクチンが多く含まれており、D-GalUA 経路の存在は妥当と思われる。葉など光合成組織では D-Man/L-Gal 経路が、果実では種に依存して D-GalUA 経路が AsA の供給を担っているのかもしれない。

3. 生物間での AsA 生合成経路の分布

D-Man/L-Gal 経路構成酵素とユーグレナ ALase 遺伝子の同定を契機に、ゲノムデータベースを中心に AsA 生合成関連酵素遺伝子の探索を行い、光合成生物間における AsA 生合成経路の分布について考察した。シロイヌナズ

ナを含めた維管束植物では、イネ、ポプラ、ミヤコグサなど調べた全ての植物で D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子は存在するが、ALase 遺伝子のオルソログは見出されなかった。また、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) やボルボックス (*Volvox carteri*) でも、ALase オルソログは見出されておらず、D-Man/L-Gal 経路構成酵素のオルソログのみがヒットすることから、これらの藻類は植物同様に D-Man/L-Gal 経路を機能させていることが示唆された。一方、珪藻タラシオシラ (*Thalassiosira pseudonana*) やフェオダクティラム (*Phaeodactylum tricorutum*) では、D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子ではなく、ALase と L-GalL 脱水素酵素のオルソログ遺伝子が存在しており、ユーグレナ同様 D-GalUA 経路を主要経路としている可能性がある。また、ピコ藻類オストレオコッカス (*Ostreococcus lucimarinus*) と蘚類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) には ALase と D-Man/L-Gal 経路構成酵素のオルソログがどちらも存在することから、二つの経路を併せ持っている可能性が考えられた。光合成生物は、D-Man/L-Gal 経路と D-GalUA 経路のいずれかもしくは両方を獲得し発達させてきたことが示唆され非常に興味深い、その理由や生理的な意義については今後の解析が必要である。

4. おわりに

植物に多くのビタミン C が含まれているのは誰もが周知のことであるが、その生合成経路が明らかになったことで、「なぜ光合成生物が高濃度の AsA を保持しているのか？」という疑問に対する解決の糸口がようやく見えてきた。生合成経路に引続き、次に解決すべき課題として生合成調節機構の解明が挙げられる。葉の AsA レベルは光制御を受けるが、D-Man/L-Gal 経路構成酵素の中でも特に GDP-L-Gal ホスホリラーゼ (VTC2 と VTC5) は酵素活性レベル、遺伝子発現レベルで顕著な光応答性を示すことから生合成調節の鍵酵素と目されている⁵⁾。VTC2 遺伝子は、VTC1 と VTC4 遺伝子とともに光合成電子伝達系のレドックス状態により発現調節を受けるが¹⁴⁾、その制御因子など分子機構は不明である。シロイヌナズナ *vtc* 変異体のうち未同定の *vtc3* 原因遺伝子は新奇の調節因子である可能性が示唆されており、AsA 生合成のネガティブレギュレーターとして最近報告された AMR1 遺伝子 (Ascorbic acid Mannose pathway Regulator 1)¹⁵⁾ と併せて今後の解析が注目される。ちなみに AMR1 はアクティベーション・タギング法により野生株の約 40% の AsA 含量を示すシロイヌナズナ変異体から同定された新奇遺伝子であり、その推定ア

ミノ酸配列中にはタンパク質間相互作用に関わる F-box モチーフが含まれている。

生合成調節以外にも、豊富な AsA が関わる生理的役割の解明も重要である。光合成生物は、AsA ペルオキシダーゼを中心とした AsA/グルタチオンサイクルを発達させて、効率的な活性酸素種の代謝系を発達させているが¹⁶⁾、他にも未知の合目的な生理機能の存在が期待される。最近筆者らのグループでは、シロイヌナズナを用いた解析から、アスパラギン酸プロテアーゼや RING-Zn フィンガータンパク質などの遺伝子が細胞内の AsA レベルに応じて発現制御されることを明らかにしており、AsA は遺伝子発現制御を通じて生育や細胞周期制御などさまざまな生理作用に寄与することを提唱している¹⁷⁾。AsA はその知名度から研究対象としてはすでに過去のものと思われがちであるが、このように解決すべき重要課題にはまだ枚挙にいとまがなく、今後の研究の進展が楽しみである。

- 1) Kawai, T., Nishikimi, M., Ozawa, T., & Yagi, K. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 21973–21976.
- 2) Kondo, Y., Inai, Y., Sato, Y., Handa, S., Kubo, S., Shimokado, K., Goto, S., Nishikimi, M., Maruyama, N., & Ishigami, A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 5723–5728.
- 3) Ishikawa, T., Dowdle, J., & Smirnov, N. (2006) *Physiol. Plant*, 126, 343–355.
- 4) Ishikawa, T. & Shigeoka, S. (2008) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1143–1154.
- 5) Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., & Smirnov, N. (2007) *Plant J.*, 52, 673–689.
- 6) Pineau, B., Layoune, O., Danon, A., & De Paepe, R. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 32500–32505.
- 7) Maruta, T., Yonemitsu, M., Yabuta, Y., Tamoi, M., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 28842–28851.
- 8) Maruta, T., Ichikawa, Y., Mieda, T., Takeda, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1494–1497.
- 9) Shigeoka, S., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1979) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 25, 299–307.
- 10) Ishikawa, T., Nishikawa, H., Gao, Y., Sawa, Y., Shibata, H., Yabuta, Y., Maruta, T., & Shigeoka, S. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 31133–31141.
- 11) Ishikawa, T., Masumoto, I., Iwasa, N., Nishikawa, H., Sawa, Y., Shibata, H., Nakamura, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2006) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2720–2726.
- 12) Agius, F., González-Lamothe, R., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., Botella, M.A., & Valpuesta, V. (2003) *Nat. Biotechnol.*, 21, 177–181.
- 13) Badejo, A.A., Wada, K., Gao, Y., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Ishikawa, T. (2011) *J. Exp. Bot.*, in press.
- 14) Yabuta, Y., Mieda, T., Rapolu, M., Nakamura, A., Motoki, T., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2007) *J. Exp. Bot.*, 58, 2661–2671.

- 15) Zhang, W., Lorence, A., Gruszewski, H.A., Chevone, B.I., & Nessler, C.L. (2009) *Plant Physiol.*, 150, 942–950.
- 16) Foyer, C.H. & Shigeoka, S. (2011) *Plant Physiol.*, 155, 93–100.
- 17) Gao, Y., Nishikawa, H., Badejo, A.A., Shibata, H., Sawa, Y., Nakagawa, T., Maruta, T., Shigeoka, S., Smirnov, N., & Ishikawa, T. (2011) *J. Exp. Bot.*, 62, 3647–3657.

石川 孝博

(島根大学生物資源科学部生命工学科)

Recent advance in the study of ascorbic acid in photosynthesizing organisms

Takahiro Ishikawa (Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 1060 Nishikawatsu, Matsue, Shimane 690–8504, Japan)

自閉症ヒト型モデルマウスの開発

1. はじめに

自閉症とは社会的相互作用の質的な欠如、言語・非言語での意思伝達の障害、常同行動・固執的行動の顕在化という三つの主症状で DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) や ICD-10 (International Classification of Disorders) により定義される脳の発達障害である。近年では自閉症スペクトラム (autism spectrum disorders; ASD) という連続体の一部に自閉症が内在すると規定されており、ASD には *Fmr1* を原因遺伝子とする脆弱 X 症候群、*Mecp2* を原因遺伝子とするレット症候群なども含まれるとされる。その特徴として、男性と女性の比率が 4:1 であり、診断は 3 歳までに下されるのが通常である。その罹患率は報告により異なるものの、現在では 0.6–1% にも及ぶと推定されている¹⁾。また、1. 様々な遺伝子の変異や構造変化が自閉症患者で認められていること、2. ASD 患者の家系ではその相対危険度が 25 倍以上であること、3. 双生児研究から、一卵性双生児における発病一致率が 70–90% と非常に高い一方、二卵性双生児においては 0–10% と、一致率の大きな違いがあることなどから、ASD は遺伝的素因がその原因として大きく関与することが知られている²⁾。無論、その発病一致率が 100% でないことから、環境要因も関与することは間違いない。例えば、1960 年代に発生した、妊婦へのサリドマイド投与が自閉症児を多