

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07449

研究課題名(和文)側鎖構造に起因するグルコシノレートの多様な生理的役割の解明

研究課題名(英文)Studies on functional differentiation of glucosinolates dependent on their side-chain structures

研究代表者

杉山 龍介(Sugiyama, Ryosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：10779664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物二次代謝産物であるグルコシノレート(GLS)は、外敵に対する化学的防御物質であると同時に、植物自身の生命活動を制御するシグナルとしてもはたらくと考えられている。本研究では、GLSの多機能性と、一分子あたり20種類にも及ぶ側鎖構造の多様性との関係を明らかにすることを目指した。様々なGLSで処理したシロイヌナズナ実生のトランスクリプトームを比較解析し、「GLSに幅広く保存される機能」と、「特定の側鎖構造をもつGLS分子種のみが示す機能」に関する知見を得た。また、安定同位体標識GLSを合成し、LCMSを用いた代謝物解析から、細胞内で活性発現の起点になると考えられる新しい分解経路を見出した。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have suggested that glucosinolates work not only as chemical bombs to get rid of enemies but also as signal molecules regulating biological events in the producing plants. Especially, they are expected to play key roles in regulation of abiotic stress responses and developmental processes. In order to elucidate molecular basis of multi-functionality of glucosinolates, we focused on a great diversity in their side-chain structures; more than 20 types of glucosinolates are found in an Arabidopsis plant. In this study we report omics-based analysis of the Arabidopsis seedlings treated with natural and synthetic glucosinolates to investigate how the targets of an isothiocyanate group are different depending on their side-chain structures.

研究分野：天然物化学

キーワード：植物二次代謝産物 グルコシノレート メタボローム シロイヌナズナ 統合オミクス解析

1 . 研究開始当初の背景

生存競争を勝ち抜き今日に至る自然界の生物は、その過程で多種多様な二次代謝産物を獲得してきた。特に植物では、側鎖構造が異なるだけの同族化合物群が一個体から十数種も検出される場合があり、それらの生産意義は古くより議論的となっている。しかし、抗生物質や誘引物質など「他者」に働きかけるものと比べて、「生産者自身」に作用する化合物については、評価系の構築や実験的証明の難しさから、広く受け入れられている知見は植物ホルモンやクオラムセンシングなどの数例に限られるのが現状である。本研究では、主にアブラナ科植物が生産するグルコシノレート (GLS) の生理的役割に着目した。

GLS はアミノ酸から生合成される含硫黄二次代謝産物であり、モデル植物として広く利用されるシロイヌナズナも 30 種類ほど生産する。植物組織が破壊されると、GLS は分解酵素と反応し、昆虫などに忌避作用を示すイソチオシアネートを生成する。そのため、GLS は外敵に対する防御物質であると長年考えられてきた。しかし近年、温度や光・乾燥・硫黄欠乏など、組織破壊を伴わない環境変化も GLS の存在量に影響することが報告され、GLS が生産植物自身の生命活動を制御するシグナルとしてもはたらく可能性が指摘されている。さらに、それらの生理活性が側鎖の構造に依存することにも注目が集まっている。例えば、4-methoxyindol-3-ylmethyl GLS が植物免疫に関わる細胞壁成分 (カロース) の合成に必須である一方で、4-methoxy基を持たない類縁体はこの活性を示さないことが知られる。また、培地に GLS を添加してシロイヌナズナを育成すると、分子種によって生長速度への影響が異なることが報告されている。しかし現在、GLS の内向的な生理活性ならびに側鎖の影響に関する研究は、GLS 生合成の変異や GLS 添加による形態・遺伝子・代謝物の変化を、植物個体レベルの現象論として報告しているに過ぎず、詳細な分子メカニズムの理解には至っていない。そこで本研究では、生産植物・外敵双方に作用する GLS の多機能性が側鎖の構造とどのように関連するのかを調べることにした。

2 . 研究の目的

本研究では、生産植物における GLS 代謝・応答システムを各 GLS 分子種について比較解析し、生理的役割の違いを明らかにする。特に「GLS に幅広く保存される機能」と「特定の GLS 分子種のみが示す機能」という 2 つの観点から実験データを考察する。GLS 分子種ごとの機能差を細胞レベルで検出するため、「植物培養細胞」と「メタボローム・トランスクリプトーム統合解析」を組み合わ

せた評価系を構築する。実験にはシロイヌナズナ培養細胞を使用し、様々な側鎖構造をもつ GLS で処理した際のメタボローム・トランスクリプトームの変化を、代謝経路へのマッピングにより可視化する。この代謝マップを「表現型」とすることで、側鎖のわずかな違いに由来する活性差の検出を実現する。また、GLS の活性本体とされるイソチオシアネートと共有結合を形成する生体分子を、シロイヌナズナ培養細胞でプロファイリングする。結合タンパク質の情報を GLS 分子種ごとに比較することで、これまで非特異性が高いと考えられてきた GLS の一次ターゲットが、側鎖構造の影響を受けている可能性を検証する。本研究では、天然生理活性物質を単離・合成してきた申請者の経験を活かし、購入困難な GLS 分子種を含めた幅広い構造活性相関を展開する。

3 . 研究の方法

本研究では、様々な側鎖をもつグルコシノレート (GLS) 分子種の活性差を GLS 処理細胞のメタボローム・トランスクリプトームと、放射性同位体ラベル化 GLS と結合する内在タンパク質という 2 つの角度から検証することとした。各実験系の初期検討には生理活性や構造に特徴のある 5 種の GLS を主に使用した。また、候補遺伝子 / タンパク質の選抜は、GLS に共通する変化 (候補 A) および特定の GLS 分子種のみが示す変化 (候補 B) の 2 つの観点から行った。各実験で選出された候補遺伝子 / タンパク質と GLS の関連性は、発現抑制株の GLS 応答性を解析することで証明することとした。

では、遺伝子・代謝物の包括的な変化を代謝マップに投影して視覚化することで、各 GLS 分子種によって影響される代謝経路の違いの検出を目指した。まず、植物からの単離または有機合成により、測定対象とする各種 GLS 分子種の精製品を調製した。シロイヌナズナ培養細胞 (T87) の使用に先立ち、前例に倣って GLS 精製品を含む寒天培地にて栽培したシロイヌナズナ実生について、メタボローム・トランスクリプトームデータを取得した。得られたデータを VANTED などのソフトウェアを用いて代謝マップに投影し、単一の GLS に対する「表現型」とした。各種 GLS を用いて得られたデータを比較解析し、前述の候補 A・候補 B に該当する遺伝子群を選抜した。なお、(1)各種植物ホルモンの生産量および生合成経路、(2)アミノ酸代謝経路、(3)硫黄代謝経路の 3 経路の変化を特に注視した。得られた候補遺伝子について、T87 細胞およびロゼッタ葉由来プロトプラストに対して RNA 干渉で一過的に発現低下させ、GLS 処理時の各種オミクスデータの比較を試みた。特に有望な遺伝子については、シロイヌナズナ植物体の遺伝子変異株を GLS 含有寒

天培地で育成し、個体レベルの影響を観察した。

においては、 ^{14}C 標識 GLS を合成し、細胞内で分解されて生じたイソチオシアネートと共有結合する一次ターゲットを二次元電気泳動でイメージングすることとした。GLS の生理活性は、主要な分解産物であるイソチオシアネート ($\text{R-N}=\text{C}=\text{S}$) がタンパク質やグルタチオンなどと共有結合することで発揮されると考えられている。また、放射性炭素 (^{14}C) で標識したイソチオシアネートをがん細胞に処理した際には、側鎖構造に応じて異なるタンパク質がラベル化されることが知られている。そこで、 ^{14}C 標識した各種 GLS を T87 細胞に添加し、代謝により生じたイソチオシアネートと結合する内在分子のオートラジオグラフィによる網羅解析を計画した。実験に用いる各種 GLS は、植物からの単離や有機合成によって調製した。GLS は短工程かつ簡便な合成法が報告されており、様々なアルデヒドと [^{14}C] - ニトロメタンを用いて各 GLS 分子種の画一的なラベル化を試みた。

4. 研究成果

前述の通り、様々な側鎖を持つグルコシノレート分子種の活性差について、グルコシノレート処理細胞のメタボローム・トランスクリプトーム、およびグルコシノレート分解物と直接結合する内在タンパク質という 2 つの角度からの検証を試みた。当初はシロイヌナズナ培養細胞の利用を計画し、実際に理研バイオリソースセンターから T87 細胞を譲り受けて実験系の構築を試みた。しかし、一般に植物培養細胞は液体培養で継代し続けなければならない、維持管理の観点から多くの形質転換株は作成できないため、本研究の主たる実験材料には適さなかった。続いて、遺伝子変異体ライブラリーが充実している植物本体からプロトプラストを作成することで細胞レベルの表現型を観察することを計画した。しかしながら、プロトプラストの作成過程で破壊されてしまう細胞が少なからず存在し、GLS 分解酵素であるミロシナーゼの流出を制御できないことから、GLS 添加時の表現型を再現よく観察できる実験系の構築には至らなかった。以上の経緯から、シロイヌナズナと各種遺伝子変異体を液体培地または寒天培地で栽培し、播種後 1~2 週間後の実生を実験に用いることとした。

については、様々なグルコシノレートで処理したシロイヌナズナ実生のトランスクリプトームを比較解析し、側鎖構造に起因する生理活性の多様性を検証した。特に、ストレス応答に関連する遺伝子群の発現変動パターンがグルコシノレートの種類によって大きく異なることを見出した。具体的には、

1/2 MS 寒天培地に 50 μM の GLS を混ぜたものでシロイヌナズナ野生株 (Col-0) を 2 週間培養し、実生全体から抽出した total RNA を用いてマイクロアレイを行った。実験には sinigrin (SIN), glucoraphanin (GRA), benzyl glucosinolate (BGLS), phenethyl glucosinolate (PGLS) の 4 種の GLS を使用した。コントロールと合わせて 5 群・各 3 反復のデータに対して Dunnett's test によって有意差検定したところ、1 つ以上の処理区で $P \leq 0.05$ となる遺伝子 (DEG) が計 5,068 個抽出された。処理する GLS によって DEG 数は大きく異なり、最少の GRA 処理区では 831 個に対し、最大の PGLS 処理区では 3,270 個に及んだ。得られた DEG について Gene Ontology (GO) 解析を行い、GLS に共通する変化、特定の GLS 分子種のみが示す変化に該当する遺伝子群を探索した。共通する変化としては、"innate immune response" や "regulation of defense response" など、各種ストレス応答に関連する GO にアノテートされる遺伝子が多く抽出されていることがわかった。GLS は病害応答や環境ストレスによってその内生量を変化させることが知られるため、この結果は妥当と言える。また、特定の GLS 分子種のみが示す変化として見られた顕著な例は、PGLS 処理区でのみキシログルカンの恒常性維持に関与する遺伝子群が発現上昇していた点である。これは「一個体あたり 20 種以上にも及ぶ GLS の側鎖多様性は、生理的役割の違いに起因する」という仮説に迫る重要な知見であり、現在、キシログルカン合成と PGLS の関係を検証中である。

一方、トランスクリプトームの結果の再現性を検証する過程で、シロイヌナズナに添加した GLS が予想よりも速やかに分解されていることが分かった。これは植物組織の破壊を伴わない未知の分解機構を介すると考えられ、植物細胞内で生成する分解産物が従来の経路と異なる可能性が生じた。組織破壊を伴わない GLS 分解に関する知見の乏しさから、これまでに得られた表現型について、分解産物の複雑さを加味して説明するのは困難であった。すなわち、GLS の生理的役割を知るために、細胞内の GLS 代謝経路をより明確にする必要が生じた。そこで、側鎖構造に由来する活性差の検証に先立って、GLS に共通する細胞内分解のメカニズム解明を目指し、次の実験を行った。

脂肪酸アミノ酸由来 GLS (glucoraphanin) を重水素でラベルした誘導体を合成し、LC-MS を用いて分解産物の網羅的解析を行った。その結果、対応するイソチオシアネートの一時的な上昇に続いて化合物 X、Y の蓄積が観察された。この現象について、グルタチオンを必要とすること、古典的な GLS 分解酵素には依存しないこと、近縁のグルコシダーゼ遺伝子が発現上昇することを見出した。遺伝子発現および GLS 量の変動が GLS 添加時の応答

と類似している環境ストレス条件が存在することから、GLSの内生量を制御する分解機構が存在し、過剰なGLSを抑制する方向にはたらいたと推測される。トランスクリプトーム解析による関連遺伝子の探索と、遺伝子変異体を用いた検証が次の課題である。

についてはまず、論文記載のGLS合成法を再現し、トリプトファン由来GLSの化学合成を行った。その後、分子ターゲット同定を指向したプローブ化合物を作製した。具体的には、細胞壁合成を特異的に制御することが知られる4-methoxyindol-3-ylmethyl GLSについて、アルキルタグを導入した誘導体を作成し、オリジナルと同様の生理活性を保持することが確認できた。今後は、この誘導体で処理したシロイヌナズナの全タンパク質を抽出し、蛍光官能基やビオチンと結合させることで、誘導体の分解物と直接結合している生体分子を可視化後、MS解析により同定できると期待される。一方で、放射性同位体標識GLSの合成には、収率・廃棄物・コストの面から合成ルートの再検討が必要であり、この点が課題である。代替案およびルート検討の一環として安定同位体標識GLSの取得を計画し、前述のglucoraphanin-*d*₅をDMSO-*d*₆から合成したところ、質量分析装置を用いたGLS分解物の網羅解析に極めて有効であることが示された。現在、THF-*d*₈、CD₃I、³⁴S-thioureaなどを原料とし異なる部位をラベル化したGLSの合成を進めており、放射性同位体標識技術への応用を計画している。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

杉山 龍介, 桑原 亜由子, 平井 優美 「組織傷害非依存的な新規グルコシノレート分解機構の発見」, 『第60回天然有機化合物討論会』, P-0035, 久留米シティープラザ (福岡県久留米市), 2018年9月

Sugiyama, R., Kuwahara, A., Hirai, M. Y. Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis thaliana* without tissue disruption. *11th International Plant Sulfur Workshop*, Conegliano, Italy, Sep. 2018.

杉山 龍介, 桑原 亜由子, 平井 優美 「組織傷害に由来しないグルコシノレートの分解に関する研究」, 『第59回日本植物生理学会年会』, 1aG11, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2018年3月

Sugiyama, R., Kuwahara, A., Hirai, M. Y. Side chain-dependent functional

differentiation of glucosinolates and their roles in *Arabidopsis*. *the 4th Glucosinolate Conference*, Berlin, Germany, Sep. 2017.

杉山 龍介, 桑原 亜由子, 平井 優美 「側鎖構造に起因するグルコシノレートの機能分化とシロイヌナズナにおける生理的役割の関係」, 『第58回日本植物生理学会年会』, PL-105, 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市), 2017年3月

Sugiyama, R., Kuwahara, A., Hirai, M. Y. Molecular-level analysis to elucidate physiological roles of glucosinolates in the producing plants. *the 3rd CSRS-ITbM Joint Workshop*, Nagoya Univ. (Nagoya City, Aichi Pref.), Jan. 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 龍介 (SUGIYAMA, Ryosuke)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号: 10779664