

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K14348

研究課題名(和文) 組織破壊に依存しない植物グルコシノレートの新たな分解機構とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Mechanism and physiological significance of tissue damage-independent glucosinolate breakdown in plants

研究代表者

杉山 龍介 (Sugiyama, Ryosuke)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：10779664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グルコシノレート(GLS)はからし油配糖体とも呼ばれ、食害などによって植物組織が破壊されると、糖加水分解酵素と混ざり合い、防虫効果や発がん抑制作用を持つイソチオシアネートなどへと変換される。本研究では組織破壊に依存しないGLS分解現象に着目し、その生理機能をシロイヌナズナで調べた。その結果、硫黄欠乏条件において、GLSが単一の硫黄源として資化可能なこと、分子中の硫黄原子がシステインなどの含硫一次代謝物へと転流していること、糖加水分解酵素BGLU28とBGLU30が本現象の責任酵素であることを見出した。本成果により、GLSは硫黄の貯蔵源でもあるという長年議論されていた仮説が証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二次代謝産物が一次代謝へとリサイクルされる可能性は古くは1980年代に指摘があるが、実験的に証明されはじめたのはごく最近であり、本発見は、体内に蓄えた二次代謝産物を栄養源として分解・再利用するシステムが植物に備わっている生化学的根拠を明確に示した初の事例である。一方通行と考えられている一次代謝と二次代謝の関係に一石を投じたことで大きなインパクトを与え、PNAS誌に掲載された。化合物を「作る」生合成経路だけでなく、化合物を「減らす」代謝フローにも目を向けることで、植物体内での複雑な物質生産制御機構やその意義のさらなる理解につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Glucosinolate (GLS) is a class of plant defense chemicals which releases toxic volatiles such as isothiocyanates upon tissue damage. Such breakdown products function as defense chemicals against herbivores as well as broad biotic/abiotic stress factors while the mechanism underlying GLS degradation independent of tissue damage remained unclear. During the grant support, we revealed the following points:

1) *Arabidopsis thaliana* can utilize glucosinolates as the sole sulfur source; 2) the sulfur atom forming the thioglucosidic bond is catabolized back into sulfur-containing primary metabolites such as cysteine; 3) BGLU28 and BGLU30 are the key enzymes responsible for GLS breakdown under sulfur deficiency. These findings demonstrate the bidirectional interaction between primary and specialized metabolism in plants.

研究分野：天然物化学

キーワード：グルコシノレート メタボロミクス 二次代謝 同位体ラベル 統合オミクス解析 ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

植物は生存戦略の一環として、1つの化合物群を巧みに制御してさまざまな生理機能を持たせることがある。アブラナ科植物などが産生するグルコシノレート (GLS)も、複数の生理的役割が注目される二次代謝産物の一つである。

古くから受け入れられている GLS の役割は、外敵に対する化学的防御である。GSL はからし油配糖体とも呼ばれ、植物組織が破壊されると、糖加水分解酵素の一種であるミロシナーゼと反応し、昆虫などに忌避作用を示すイソチオシアネート (ITC) を生成する (図 1)。これに加えて近年注目されているのは、温度・乾燥・硫黄欠乏など、組織破壊を伴わない環境変化も GLS の貯蔵量を増減させるという知見である。環境ストレスによる生長抑制が ITC の添加で軽減されるという報告もあることから、GLS 及びその分解産物には生産植物自身の生命活動を制御するシグナルとしての機能もある可能性が指摘されている。

GLS が複数の生理活性を示す要因として、大きく 3 つの指摘がある。すなわち、1) 主要な分解産物である ITC の高い反応性、2) 一個体あたり 20 種以上に及び多様な側鎖構造、そして 3) 補助タンパク質の介在による分解経路の分岐である (図 2)。組織破壊による分解では専ら ITC が生成されること、また、図 2 の分解産物それぞれがシグナル分子として機能しうる構造であることから、細胞内の GLS 機能を検証する際には特に 3) が重要と考えられる。しかし、分解産物の多様性に関する知見は、植物の粗抽出物や精製タンパク質を用いた *in vitro* 試験に限られており、生きた植物内でこれらの化合物が生成するかについては議論の余地が残されている。

研究代表者はこれまで、GLS 生産植物であるシロイヌナズナをモデルに、外部から GLS を添加する実験を行ってきた。そして最近、実生に加えた GLS が植物内へ取り込まれる際に、一部は速やかに分解されていることを見出した。後述の検討結果から、組織破壊を伴わない GLS 分解システムの解析モデルとして本現象を利用できる可能性が示唆されたため、本研究に着手した。

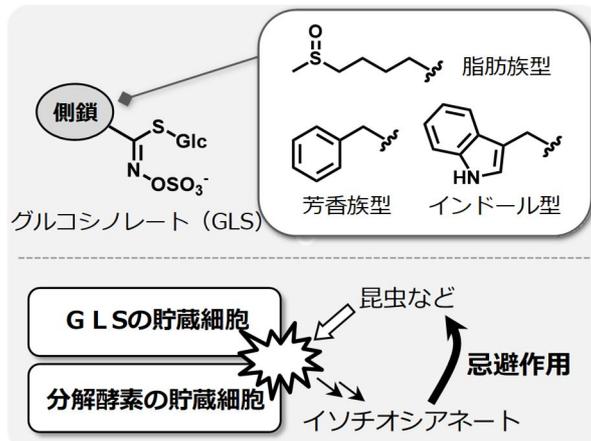


図1. GLSの構造と 化学的防御物質としての役割。

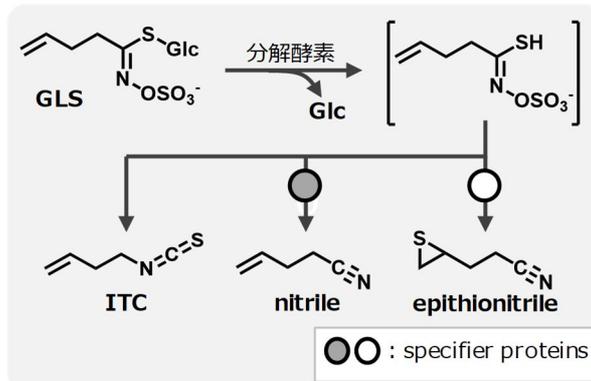


図2. *In vitro*試験に基づく GLS加水分解物の一例。

## 2. 研究の目的

本研究ではシロイヌナズナをモデルに、組織破壊を伴わない細胞レベルの GLS 分解機構を明らかにする。メタボロミクスを専門とする所属研究室の様々な質量分析装置を目的別に活用することで、外部から添加した GLS の分解過程を追跡し、その知見をもとに内在 GLS の代謝経路を解明する。さらに、遺伝子発現情報を取り入れた統合オミクス解析により、GLS 分解産物が植物細胞内のシグナル分子としてどのように機能するかを検証する。

## 3. 研究の方法

### 1) 同位体ラベル化グルコシノレートによる分解産物の網羅分析と分解経路の予測

GLS および分解産物の  $^{13}\text{C}$ /重水素ラベル体を合成し、それらを添加した際にラベル化される代謝物を質量分析装置で網羅的に解析する。得られた代謝物の時系列データをもとに、添加した GLS の推定分解経路を構築する。データ取得には LC-QToF-MS による非ターゲット分析を採用し、ラベル体・非ラベル体処理時の比較から化合物を同定する。また、GLS および分解産物は硫黄原子を含むものが多いため、含硫黄代謝物に特化した MS 測定も適用する。カギとなる代謝物

については標品を購入 / 合成し、次項で高感度分析を行う。

## 2) グルコシノレート量が増減する環境刺激を与えた際の分解産物のターゲット分析

GLS の分解・生合成が亢進することが知られる環境刺激 (硫黄欠乏・乾燥ストレスなど) を実生に与え、GLS および 1) で同定した分解産物の時系列変化を分析する。これは、外部添加した GLS の分解を解析して得られた推定経路は、植物が本来持つ分解機構を完全に反映するとは限らないためである。前項で取得した標品をもとに、LC-QqQ-MS などの高感度・高選択的な分析手法で環境刺激後の時系列サンプルを解析する。本項の結果から 1) の推定経路を検証し、より正確な分解プロセスへと導く。

## 3) トランスクリプトームデータとの統合解析による分解経路の責任遺伝子群の同定

1), 2) の時系列サンプルについてトランスクリプトームデータを取得し、代謝物と遺伝子発現の統合解析から分解経路の責任遺伝子群を同定する。代謝物の時系列変化と協調する遺伝子を抽出し、各変換反応への関与が予想される遺伝子を絞り込む。有望な遺伝子については変異体を取得し、代謝物の変化などから関連性を証明する。

## 4) 分解産物の添加に対するシロイヌナズナの応答解析

GLS の多機能性が分解産物の多様性に由来するという仮説の下、実生を様々な GLS 分解産物で処理し、統合オミクス解析を行う。オミクスデータを各分解産物の「表現型」とし、植物の生命活動への寄与を比較解析する。添加する分解産物には、ITC などの既知物質に加え、1) などで見出した化合物も使用する。メタボロームについては、所属研究室のワイドターゲット分析法により、約 700 化合物を高感度測定する。

## 4. 研究成果

研究期間中は、硫黄欠乏条件において GLS が組織破壊非依存的に分解される現象を中心に解析を行った。アブラナ科植物は多量の GLS を体内に貯蔵するが、その蓄積量は栄養条件、特に硫黄 (S) の存在量に大きく影響される。二次代謝産物の合成には多くのエネルギーと材料を投入する必要があるため、栄養源が限られた環境では、成長や生殖を担う一次代謝とのバランス調節が不可欠である。分子中に複数の S 原子を含むことも相まって、GLS は硫黄貯蔵物質としての働きもあるのではないかと仮説が生まれ、15 年以上に渡り議論されてきた。本研究により、GLS から硫黄が回収される分子メカニズムとその生理学的意義について重要な知見が得られた (Sugiyama, Li, *et al.*, PNAS (2021))。

### 1) グルコシノレートは硫黄源として植物の成長を助ける

硫黄は植物にとって必須多量元素の一つであり、主に硫酸イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) として土壌から吸収される。アブラナ科植物は特に硫黄の要求量が多く、例えばシロイヌナズナは、硫酸イオンを除いた栄養条件で栽培すると顕著な生育不良を示す。ここに GLS を一定量加えて栽培すると、シロイヌナズナは通常の栄養条件と同様に成長した。この結果は、GLS の添加により硫黄が補われたことを示す (図 3A)。

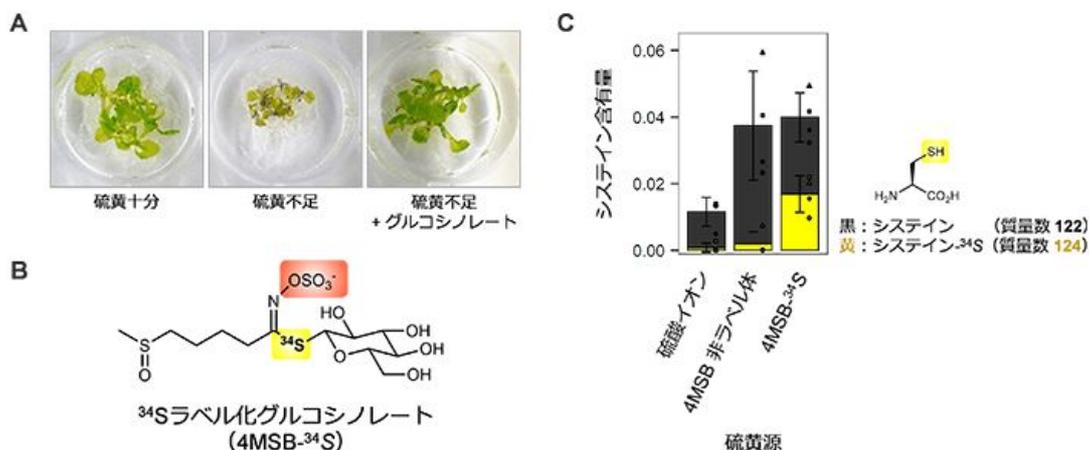


図 3. 同シロイヌナズナにおけるグルコシノレートからの硫黄栄養の回収。

- 異なる栄養条件で栽培したシロイヌナズナ実生。
- $^{34}\text{S}$  でラベル化した GLS の構造。
- 硫酸イオンまたは GLS を硫黄栄養源として栽培した実生中のシステイン含有量。

続いて、分子中の硫黄原子の1つを安定同位体  $^{34}\text{S}$  で置き換えた合成 GLS をシロイヌナズナに与え、植物中の硫黄代謝物について、 $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$  安定同位体比を LC-QqQ-MS を用いて解析した。その結果、植物体を構成するアミノ酸であるシステイン、メチオニン中の硫黄原子のうち、30-40%が GLS 由来の  $^{34}\text{S}$  に置換されていた(図 3B,C)。以上より、シロイヌナズナは GLS を硫黄源として体構成成分に転用できることが示された。

## 2) グルコシノレートは植物体内で分解されて分子中の硫黄を放出する

GLS は分子中に少なくとも 2 個の硫黄原子を含む(図 1)。そこで次に、これらの硫黄原子がどのような経路を辿ってシステインなどに取り込まれたのか、その行方を追った。この実験では一部の水素を重水素( $^2\text{H}$ )で置き換えた合成 GLS をシロイヌナズナに与え、植物中のメタボロームを経時的に解析することで、GLS が変換されていく過程を追跡した。その結果、GLS の加水分解によって生じた ITC が、植物体内に豊富に存在するグルタチオンと結合し、数段階の反応を経てラファナスム酸に変換されることが分かった(図 4)。ラファナスム酸は硫黄原子を1つ放出してシステインへと再生され、グルタチオン生合成に再利用されていた。つまり、シロイヌナズナはグルタチオンの分解と再構築を繰り返すことで、GLS 1 分子からシステインを少なくとも 2 分子獲得できることが示された。

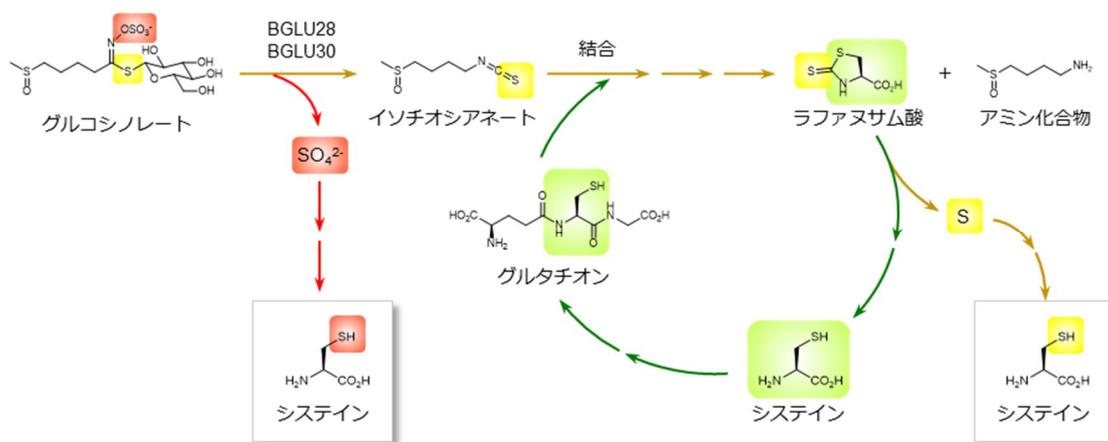


図 4. グルコシノレート分解により S 原子が回収される分子機構。

## 3) 特定の糖加水分解酵素によってグルコシノレートから硫黄が放出される

シロイヌナズナが貯蔵している内在 GLS の分解に必要な遺伝子についても新たな知見が得られた。硫黄欠乏条件で発現量が上昇する  $\beta$ -グルコシダーゼである BGLU28 と BGLU30 は以前より注目されていたが、ベンサミアナタバコを用いた一過性発現させた BGLU28 が確かに GLS を分解するミロシナーゼとしてはたらくことが確認された。*bglu28 bglu30* 二重変異体を作成して表現型を観察したところ、硫黄欠乏条件での生育が野生株よりも顕著な生育異常が見られた。硫黄欠乏条件で栽培した野生株では植物体中の GLS はほとんど分解し消失するが、この変異体においては多くの GLS が分解されずに残っていた。すなわち、BGLU28, BGLU30 の機能不全により、植物体中に貯蔵された GLS から硫黄を十分に回収できなくなった結果として、硫黄欠乏への適応力が下がったと考えられる。これらの結果は最近の報告(Zhang *et al.*, *Plant Cell Physiol.* (2020))ともよく一致しており、*BGLU28*, *BGLU30* 遺伝子の硫黄欠乏条件における発現誘導がシロイヌナズナの生存戦略として重要であることが示された。

以上、硫黄栄養不足に陥ったシロイヌナズナが、貯蔵されていたグルコシノレートを分解することで足りない硫黄原子を補う仕組みを備えていることを証明し、その分子メカニズムを明らかにした(図 5)。今回明らかになった GLS の分解経路は、ブロッコリーなどのアブラナ科野菜にも共通して保存されていると考えられる。GLS は発がん抑制活性などの健康増進機能が知られるため、分解経路の抑制は GLS を多く含む野菜の開発技術などへと応用が期待できる。植物は、さまざまな化学構造の二次代謝産物を自ら分解することができるかもしれない。植物中の有効成分の生産量を調節する試みに対し、これまでは生合成という「作る経路」に多くの目が向けられてきた。本研究により「壊す経路」の存在が証明されたことで、物質生産制御に向けた多面的なアプローチの発展が期待される。

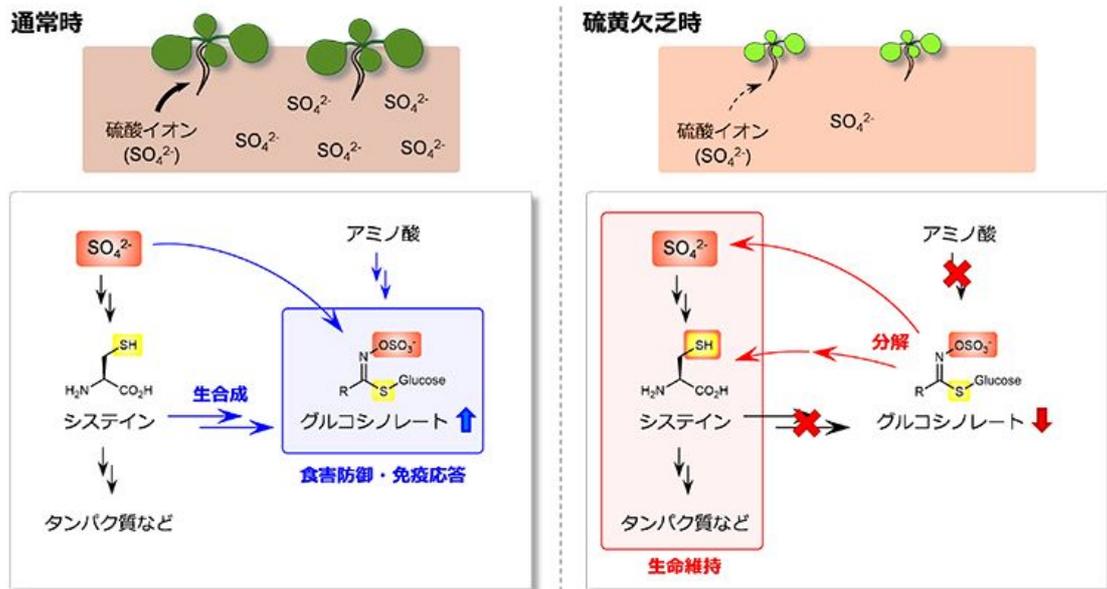


図 5 . 通常栄養時と硫黄欠乏時のグルコシノレートの役割 .

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sugiyama, R., Li, R., Kuwahara, A., Nakabayashi, R., Sotta, N., Mori, T., Ito, T., Ohkama-Ohtsu, N., Fujiwara, T., Saito, K., Nakano, R. T., Bednarek, P., Hirai, M. Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Retrograde sulfur flow from glucosinolates to cysteine in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2017890118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2017890118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito, T., Kitaiwa, T., Nishizono, K., Umahashi, M., Miyaji, S., Agake, S., Kuwahara, K., Yokoyama, T., Fushinobu, S., Maruyama-Nakashita, A., Sugiyama, R., Sato, M., Inaba, J., Hirai, M. Y., Ohkama-Ohtsu, N.	4. 巻 111
2. 論文標題 Glutathione Degradation Activity of -Glutamyl Peptidase 1 Manifests Its Dual Roles in Primary and Secondary Sulfur Metabolism in Arabidopsis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1626-1642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 杉山 龍介	4. 巻 100
2. 論文標題 二次代謝産物の生産意義を読み解く分野横断的アプローチ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 236-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.100.5_236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 杉山 龍介, 平井 優美	4. 巻 60
2. 論文標題 植物二次代謝産物のリサイクル経路を発見 - 防御物質グルコシノレートは硫黄の栄養源として再利用される	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 264-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.60.264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama, R. and Hirai, M. Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Atypical Myrosinase as a Mediator of Glucosinolate Functions in Plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsugawa Hiroshi, Nakabayashi Ryo, Mori Tetsuya, Yamada Yutaka, Takahashi Mikiko, Rai Amit, Sugiyama Ryosuke, Yamamoto Hiroyuki, Nakaya Taiki, Yamazaki Mami, Kooke Rik, Bac-Molenaar Johanna A., Oztolan-Erol Nihal, Keurentjes Joost J. B., Arita Masanori, Saito Kazuki	4. 巻 16
2. 論文標題 A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 295 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-019-0358-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakazaki, A., Yamada, K., Kunieda, T., Sugiyama, R., Hirai, M. Y., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Shimada, T.	4. 巻 179
2. 論文標題 Leaf endoplasmic reticulum bodies identified in Arabidopsis thaliana are involved in defense against herbivory.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1515-1524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.00984	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Sugiyama, R., Li, R., Hirai, M. Y.
2. 発表標題 Catabolic Recycling of Sulphur from Glucosinolates in Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 SBio 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山 龍介, 山崎 真巳
2. 発表標題 植物二次代謝産物のリサイクル経路を予測する
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山 龍介, 平井 優美
2. 発表標題 同位体ラベル化二次代謝産物を用いたカタボリズム経路の解析
3. 学会等名 第15回メタボロームシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山 龍介, Rui Li, 桑原 亜由子, 中林 亮, 反田 直之, 森 哲哉, 伊藤 岳洋, 大津 直子, 藤原 徹, 斉藤 和季, 中野 亮平, Pawel Bednarek, 平井 優美
2. 発表標題 植物が防御物質グルコシノレートから硫黄をリサイクルする代謝機構
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山龍介
2. 発表標題 Recycle of nutrients from secondary to primary metabolites: Glucosinolate breakdown regulated by "atypical" thioglucosidases initiates unique sulfur catabolism.
3. 学会等名 東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学・微生物学研究室 特別セミナー (化学コミュニケーションのフロンティア) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugiyama, R., Kuwahara, A., Hirai, M. Y.
2. 発表標題 Glucosinolate breakdown in Arabidopsis thaliana without tissue disruption.
3. 学会等名 11th International Plant Sulfur Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山 龍介, 桑原 亜由子, 平井 優美
2. 発表標題 硫黄欠乏条件におけるグルコシノレート分解の分子機構
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中崎 淳子, 山田 健志, 國枝 正, 杉山 龍介, 平井 優美, 田村 謙太郎, 西村 いくこ, 嶋田 知生
2. 発表標題 シロイヌナズナ本葉における恒常型ER bodyの食害抑止機能の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山 龍介, 桑原 亜由子, 平井 優美
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 環境資源科学研究センター 代謝システム研究チーム  
<http://metabolicsystem.riken.jp/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------