

平成21年 6月 3日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510212

研究課題名（和文） 植物の硫黄同化と含硫黄アミノ酸集積メカニズム

研究課題名（英文） Investigation of the molecular mechanism of sulfur assimilation and amino acid accumulation in plants.

研究代表者

野路 征昭（NOJI MASAOKI）

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：80271534

研究成果の概要：植物の硫黄同化経路の特徴の一つは、各酵素反応ステップに複数の酵素アイソザイムが関与している点であるが、各アイソフォームに特有な機能や役割については、その詳細は明らかとなっていなかった。そこで本研究では、シロイヌナズナを用いて硫黄同化に関与する各アイソザイムの役割をトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスというポストゲノム戦略によって解析し、硫黄の吸収・同化における個々のアイソザイムや細胞機能、分担機構を解明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生合成、硫黄同化、システイン生合成

1. 研究開始当初の背景

植物には土壤中の硫酸イオンを取り込み、複数の反応段階を経て硫化物イオンへと還元した後、有機性硫黄化合物であるシステインに固定する硫黄同化、システイン生合成系が存在する。硫黄は生物において極めて重要な必須非金属元素である。無機硫黄は硫酸イオンとして植物に取り込まれ、アミノ酸であるシステインに固定され、その後タンパク質、メチオニン等に変換され、我々人類を含む哺乳類にとって初めて利用可能となる。さらに植物には、硫黄を含むアミノ酸であるシステ

イン、メチオニンばかりではなく、細胞内の酸化還元に関与するグルタチオンや重金属の解毒に関与するファイトケラチン、タマネギ、ニンニクなどネギ属植物に含まれるアリシン等の揮発性刺激臭物質、アブラナ科植物に多く含まれるグルコシノレートなど健康機能性、食品有用性がある含硫黄成分が存在しており、これら物質の生合成の第一ステップが硫黄同化系である。

モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム配列が解読されたことで、硫黄同化、システイン生合成に関与する、あるいは、関与す

ると予想される酵素遺伝子がすべて明らかとなった。自然界における硫黄同化は大腸菌などの細菌によっても行われているが、植物の硫黄同化経路の特徴の一つは、大腸菌の場合、硫黄同化の各ステップに関与する酵素は、ほぼ1酵素（システイン合成酵素のみ *cysK*, *cysM* の二つのアイソザイムが関与している）であるのに対して、植物（今回はシロイヌナズナ）の場合、各酵素反応ステップに複数の酵素アイソザイムが関与している点である。大腸菌などの単細胞の細菌に対して、植物は多細胞、多組織の複雑な生命体であること、また植物は動物などと異なり、移動の自由がないため栄養や、日照、気温、乾燥等の環境の変化に対応するために複雑なストレス防御機構を有していると考えられる。硫黄同化系の各ステップに複数のアイソザイムが存在する理由も、細胞内の各オルガネラや、植物の組織、成長時期、あるいは環境中の硫黄栄養量によって変化する硫黄需要に対応するためと考えられるが、各アイソフォームに特有な機能や役割については、その詳細は明らかとなっていなかった。そこで本研究では、シロイヌナズナを用いて硫黄同化に関与する各アイソザイムの役割をトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスというポストゲノム戦略によって解析し、硫黄の吸収・同化における個々のアイソザイムや細胞機能、分担機構を解明しようと試みた。

2. 研究の目的

本研究では、高等植物の硫黄同化、システイン生合成経路を分子レベルで明らかにするために、シロイヌナズナを用いて、硫黄同化、システイン生合成の最終ステップに関与するセリンアセチル転移酵素、システイン合成酵素、種々の硫酸化代謝物（スルホリピド、スルホフラボノイド、グルコシノレートなど）の生合成における硫酸イオン供与体として利用される 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸（PAPS）を生成する APS キナーゼの各アイソザイムについて以下に記述する未だ明らかとなっていない疑問を解明し、それらアイソザイムの役割を明らかにすることで、植物における複雑な硫黄同化機構の分子生物学的解明を目的とした。

(1) システイン合成酵素について

システイン生合成の最終段階は、セリンにアセチル-CoA からアセチル基が転移されて生成した *O*-アセチルセリン（OAS）と、硫酸イオンから還元された硫化物イオンが結合し、システインが合成される過程である。これらの反応は、セリンアセチル転移酵素と、システイン合成酵素（*O*-アセチルセリン（チオール）リアーゼ）によりおこなわれる。硫

酸イオンから硫化物イオンへの還元が主に葉緑体でおこなわれるのに対して、このシステイン生合成の最終段階に関与する2つの酵素活性は、植物細胞の主要な3つのコンパートメント（細胞質、葉緑体、ミトコンドリア）に存在しているが、その理由は明らかではない。

(2) セリンアセチル転移酵素について

セリンアセチル転移酵素はセリンとアセチル-CoA から OAS を生成する反応を触媒する。この反応ステップはセリン代謝（炭素・窒素代謝）からシステイン合成（硫黄同化）への合流点に位置することから、代謝制御のキーステップとして重要であると考えられる。シロイヌナズナからは、細胞質、葉緑体、ミトコンドリアにそれぞれ局在するクローンが単離されている。これらの各アイソザイムのうち、細胞質局在性のアイソザイムの活性は、生合成経路の最終産物である L-システインにより生理的濃度（10 μ M 以下）でフィードバック阻害を受けることが明らかとなっている。また葉緑体、あるいはミトコンドリア局在性のアイソザイムの活性は L-システインによる阻害を受けないことから、フィードバック阻害感受性のセリンアセチル転移酵素が OAS の供給およびシステイン生合成にとって重要な制御ステップであるといえる。

(3) APS キナーゼについて

APS キナーゼは APS から 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸（PAPS）を生成する酵素である。PAPS は細菌の硫酸イオン還元系の中間体であり、PAPS 還元酵素により亜硫酸イオンが生成される。しかし植物の場合、硫酸イオン還元系は PAPS を経由せず APS 還元酵素により APS を直接還元する経路であることから、生成された PAPS は種々の硫酸化代謝物（スルホリピド、スルホフラボノイド、グルコシノレートなど）の生合成における硫酸イオン供与体として利用されると考えられている。シロイヌナズナゲノムには4つの APS キナーゼアイソフォーム遺伝子（*AKN1* ~ *AKN4*）が存在することが知られているが、そのうち酵素活性が確認されているものは、*AKN1* と 2 のみであり、*AKN3*, 4 については、いまだ解析が成されていない。

(4) 予想される結果と意義

本研究により植物硫黄同化、システイン生合成に関与する酵素の各アイソザイムの機能、役割を詳細に明らかにすることにより、人間にとって有用な硫黄含有代謝物生合成機構を分子レベルで理解することで、遺伝子操作などによる有用代謝物量の改変などが可能になると考えられる。また本研究の結果により、オルガネラ間、細胞間、組織間の硫

黄含有物質生産、代謝のネットワークが明らかになることが期待されるため、多種多様で複雑な植物の物質生合成機能を解明するための手助けになると考える。

3. 研究の方法

(1) T-DNA挿入ノックアウトシロイヌナズナ変異体の単離

シロイヌナズナを用いた解析では、ストックセンターにあるT-DNA挿入ノックアウト変異体を研究に用いることが可能である。そこで、APSキナーゼの4つのアイソフォーム遺伝子、セリンアセチル転移酵素の5つ、およびシステイン合成酵素の9つのアイソフォーム遺伝子にT-DNAが挿入され遺伝子が破壊されたノックアウト変異体株の取得と単離、あるいは作製を行う。これら各アイソフォーム遺伝子のノックアウト変異体の遺伝子発現や代謝物、ストレス応答などを比較することで、各アイソザイムの役割を明らかにできると考えているので、各アイソザイムのノックアウト変異体をシリーズでそろえることは大変重要である。各ストックセンターのデータベースを解析して、各アイソフォーム遺伝子のT-DNA挿入変異体を取得する。また、複数コピーのT-DNA挿入も考えられるため、各アイソフォームに対して複数個のノックアウト変異株の取得を目標とする。取得後はRT-PCRや、リアルタイムPCRなどの遺伝子発現解析を行うことで、目的遺伝子の破壊を確認する。またシステインやグルタチオンなど、各酵素アイソフォーム遺伝子の破壊により影響を受けやすいと思われる代謝物については、この段階で測定しておく。またこのように各酵素反応ステップに複数のアイソザイムが関与している場合、一つのアイソザイム遺伝子を破壊しただけでは、その結果が代謝物の変化として現れにくいとも考えられるので、変異株を掛け合わせるにより二重、三重変異体の作製を試みる。

(2) 組換え酵素を用いた各アイソザイムの酵素学的研究

例えばAPSキナーゼの2つのアイソフォームAKN3とAKN4は、シロイヌナズナゲノムに存在し、予想されるアミノ酸配列が、既にクローニングされているAPSキナーゼと相同性が高いためAPSキナーゼアイソザイムとされているが、その活性は未だ示されていない。組換え酵素を用いた酵素学的研究は、セリンアセチル転移酵素の5つのアイソザイムについては、既に我々により行われている。その結果、各セリンアセチル転移酵素アイソザイムにより、基質親和性や、反応速度、生成産物によるアロステリックなフィードバック阻害の感受性などが大きく異なっていた。こ

れらアイソザイムの酵素学的特性を明らかにせず、遺伝子発現量の変化などのみから各アイソザイムの役割を推測することは不可能である。そこで今回、APSキナーゼのすべてのアイソザイムについて組換えタンパクを作製し、各アイソザイムの酵素学的特性を詳細に明らかにする。

(3) 各酵素アイソザイムの細胞内局在性

各アイソザイムの細胞内局在性についてもセリンアセチル転移酵素の5つのアイソザイム (Serat1;1, 2;1, 2;2, 3;1, 3;2) については、先行して行われ、N 末配列と GFP を融合したタンパクを用いた実験では、Serat1;1, 3;1, 3;2 が細胞質、Serat2;1 が葉緑体、Serat2;2 がミトコンドリアに局在することを明らかにした。一方、APS キナーゼについては、AKN3 は細胞質へ、残り3つのアイソフォームは葉緑体へ移行すると予測された。しかしながら、APS から APS キナーゼにより生成される PAPS は種々の硫酸化代謝物 (スルホリピド、スルホフラボノイド、グルコシノレートなど) の生合成における硫酸イオン供与体として利用されると考えられており、この硫酸化反応を触媒するスルフトランスフェラーゼにも複数のアイソザイムが存在しているが、その局在は細胞質と予想されている。このことから APS キナーゼについて、本当に葉緑体に存在し、葉緑体で PAPS を生成するのか、生成した PAPS は葉緑体でどのように使われるのか、あるいは葉緑体から細胞質へ輸送されるのかなど様々な疑問が存在する。これらの事を明らかにするために、まず、コンピュータの予測だけではなく、実験的に各アイソザイムの細胞内局在性を明らかに必要がある。

(4) ポストゲノム戦略を用いた T-DNA 挿入ノックアウト変異体の解析

T-DNA 挿入ノックアウト変異株の取得は、硫黄同化、システイン生合成に関与する酵素の各アイソザイムの役割を明らかにするためである。そのためには、そのアイソフォーム遺伝子がノックアウトされたことにより最も影響を受けると思われる代謝物量 (システイン、グルタチオンやグルコシノレート) や、あるいは、あるストレスに対する応答について、各アイソザイムのノックアウト変異株間で明らかな違いが観察されれば、各アイソザイムの役割の違いというものが推測できると考える。しかし、考えられる解析で顕著な違いが観察されなかった場合、DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析や、プロテオーム解析、代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析が大変有用な解析手法になると考える。植物の硫黄同化、システイン生合成経路は独立して存在しているわけではなく、植

物内で巨大で複雑な代謝物ネットワークを形成していると思われる。そのため1つのアイソフォーム遺伝子を破壊した影響をターゲットを絞って解析するのではなく、遺伝子発現やタンパク発現の変化、代謝物蓄積量の変化をポストゲノム戦略を用いて網羅的に解析することで、これまで予想していなかった遺伝子発現ネットワークや代謝物ネットワークを発見することが出来ることを期待する。

(6) 二重、三重（四重）ノックアウト変異体の作製と解析

先に書いたように、各酵素反応ステップに複数のアイソザイムが関与している場合、一つのアイソザイム遺伝子を破壊しただけでは、その結果が代謝物の変化として現れにくいとも考えられるので、変異株を掛け合わせるにより二重、三重変異体の作製を試み、その解析を行うことで硫黄同化に関与する酵素のアイソザイムの役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) システイン合成酵素について

植物の硫黄同化・システイン生合成経路、複数の酵素ステップからなり、各酵素ステップには細胞内局在性などが異なる複数のアイソザイムが関与している。モデル植物シロイヌナズナの場合、システイン生合成の鍵酵素であり、セリンとアセチルCoAから、システインの前駆体となるO-アセチルセリン (OAS) を生成するセリンアセチル転移酵素 (Serat) には5つ、硫化物イオンとOASからシステインを合成するシステイン合成酵素 (Bsas) には9つのアイソフォームが存在している。これまでに、これら各酵素アイソフォーム遺伝子にT-DNAが挿入されたノックアウト変異体の単離に成功し、遺伝子発現解析及び代謝物分析を行うことにより、各アイソフォーム遺伝子のシステイン生合成系における異なった役割を明らかにしてきた。今回、各Bsas遺伝子の役割を解析するために、各アイソフォームのT-DNA挿入ノックアウトシロイヌナズナについて、その活性や代謝物を網羅的に解析した。その結果、Bsas1のノックアウト体について最もシステイン合成酵素活性が減少し、システイン量も減少したことから、9つのBsasアイソフォームのなかで、Bsas1がシステイン生合成に最も関与しているアイソフォームであることが明らかとなった。またBsasのもう一つの反応である β -シアノアラニン合成に関しては、Bsas3のノックアウト体で最も活性が減少することから、Bsas3の関与が示唆された。

(2) セリンアセチル転移酵素について

モデル植物シロイヌナズナの場合、システ

イン生合成の鍵酵素であり、セリンとアセチルCoAから、システインの前駆体となるO-アセチルセリン (OAS) を生成するセリンアセチル転移酵素 (Serat) には5つのアイソフォームが存在している。今回、Seratアイソフォーム遺伝子にT-DNAが挿入されたノックアウト変異体を単離し、さらに各ノックアウト体を掛け合わせるにより2重、3重、4重変異体の作製に成功し、それら変異体の解析を行った。その結果、5つあるSeratアイソフォームのうち、どれか1つが残っていればシロイヌナズナは生育可能だったことから、シロイヌナズナゲノムに存在する5つのSeratアイソフォームは機能的にセリンアセチル転移酵素活性をもつことが証明された。また細胞内のOAS生合成に最も関与しているのは、ミトコンドリアに存在するSerat2;2であることが明らかになった。一方、葉緑体に存在するSeratアイソフォームであるSerat2;1は、OASの生合成および、それに続くシステインの生合成にそれほど関与していないことが示唆された。細胞質に局在するアイソフォームであるSerat1;1, Serat3;1, Serat3;2は植物が種子を形成する際に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

- ① Mugford SG, Yoshimoto N, Reichelt M, Wirtz M, Hill L, Mugford ST, Nakazato Y, Noji M, Takahashi H, Kramell R, Gigolashvili T, Flugge UI, Wasternack C, Gershenzon J, Hell R, Saito K, Kopriva S. Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in Arabidopsis reduces levels of sulfate secondary metabolites. *Plant Cell* **3** 910-927 (2009) 査読有
- ② Watanabe M, Mochida K, Kato T, Tabata S, Yoshimoto N, Noji M, Saito K. Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 2484-2496 (2008) 査読有
- ③ Ogawa Y, Dansako T, Yono K, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Noji M, Saito K, Shibata D. Efficient and high-throughput vector construction and Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana suspension-cultured cells for functional genomics. *Plant Cell Physiol.* **49**, 242-250 (2008) 査読有

- ④ Watanabe M, Kusano M, Oikawa A, Fukushima A, Noji M, Saito K. Physiological roles of the beta-substituted alanine synthase gene family in Arabidopsis. Plant Physiol. 149, 310-320 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

- ① 吉本尚子, 中里好美, 嶋聡子, 高橋秀樹, 野路征昭, 斉藤和季: シロイヌナズナの硫黄代謝に関わるAPS キナーゼ群の機能解析. 第49回日本植物生理学会年会 2008年3月(札幌)
- ② 渡辺むつみ, 野路征昭, 加藤友彦, 田畑哲之, 斉藤和季, シロイヌナズナ変異株を用いたセリンアセチル転移酵素遺伝子群のシステイン生合成系における機能分担の解析. 第25回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 2007年8月(千葉)
- ③ 中里好美, 嶋聡子, 野路征昭, 斉藤和季, 硫黄代謝に関与するシロイヌナズナのAPS キナーゼ遺伝子群の機能解析. 第25回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 2007年8月(千葉)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野路 征昭 (NOJI MASAOKI)
徳島文理大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80271534

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし