

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05508

研究課題名(和文) アブラナ科伝統野菜の機能性有機硫黄物質の代謝に関する解析

研究課題名(英文) Genetic and physiological analysis of sulfur uptake by traditional Japanese Brassicaceae vegetables

研究代表者

伊藤・山谷 紘子(YAMAYA-ITO, Hiroko)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80648684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物に含有される、機能性含硫化合物を高めるためには、植物のイオウ吸収機構および代謝機構を解明することが重要である。そのためには、元来イオウ含有量が多く、機能性の高い植物(作物)を選抜して、代謝や遺伝子発現などを比較生理学的に調べる必要がある。そこで本研究では、機能性含硫化合物を高い濃度で含有している可能性の高いアブラナ科伝統野菜を供試作物として選び、根域イオウ濃度が生育、イオウ含量、イオウ吸収に関与する遺伝子発現量、イオウ同化に関わる酵素活性に及ぼす影響を調べた。研究結果はSoil Science and Plant Nutritionに掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの健康への機能性を持つ成分の多くが植物の有機態硫黄化合物であることに着目し、これらの有機態硫黄化合物含有量を高め、摂食目的に適う機能性成分高含有野菜を育成を目指している。そこで、硫黄含有率が高い植物アブラナ科植物の、さらに優良形質が凝縮されていると考えられる伝統野菜を対象とし、硫黄供給量に比例して体内の硫黄含有量および有機態硫黄化合物が顕著に増大する野菜種を選抜した。さらに、その品種の硫黄吸収能と選抜した植物の硫黄の取り込みに関する硫酸イオントランスポーター遺伝子の発現量との相関を調べ、植物の硫黄吸収と代謝制御に関する基礎的な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In order to increase the content of organosulfur compounds in plant, selection of plant (crop) with high levels of functional ingredients is important. To achieve the goal, we focused on absorption mechanisms of sulfur in Japanese heirloom vegetables of Brassicaceae family, which have many crops rich in organosulfur compounds. Using these plants which were cultivated under a gradient of sulfur concentration, we investigated the following points: 1) dry matter production; 2) sulfur content of plants; 3) expression levels of genes involved in sulfur absorption; 4) enzyme activity involved in sulfur assimilation. The results obtained in this study was published in the journal Soil Science and Plant Nutrition.

研究分野：植物栄養学

キーワード：硫黄代謝 伝統野菜 アブラナ科植物 硫酸イオントランスポーター 硫黄吸収 機能性成分

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の有機態硫黄(イオウ)化合物であるグルコシノレート、ジアリルトリスルフィド、イソチオシアネート、スルフォラファンなどは、抗酸化作用、殺菌作用、抗がん作用、血栓防止作用、抗肥満作用など、ヒトの健康に対する機能性を有することが知られている(Saito, 2004)。さらにイオウは、植物体内でシステイン、メチオニン、グルタチオン、タンパク質やビタミン類、補酵素などに含まれ、生体反応の様々な局面で重要な役割を果たしている。また、過剰な重金属や有害重金属の無害化物質として植物にとっての機能性を有するグルタチオン、フィトケラチン、メタロチオネインなど有機態イオウ化合物であることが知られている(Hasegawa, 2002)。したがって、植物体内におけるこれら有機態イオウ化合物の含有量を自由に調節し、高めることができれば、摂食目的に適う機能性成分高含有野菜や、環境修復に利用できる植物を育成することができると考えられる。しかしそのためには、まず高イオウ含量の野菜を探索し、大量のイオウを取込む仕組みと取込んだイオウの代謝がどのように制御されているのかを解析する必要がある。

近年、有機態イオウ化合物の合成経路の解析が進み、合成に重要な役割を果たす遺伝子が特定され、さらにはイオウ取り込みに関与するトランスポーターも複数特定されている。それでは、なぜこれらの機能性成分を高めた植物の育成が遅れているのか?それは、個々の遺伝子の機能や発現は解明されていても、これらの有機態イオウ化合物の合成量や分配を調整し、制御する機構については、未だ明らかにされているところが少ないからである。さらに、有機態イオウ化合物を多量に合成させるためには、まず原料となるイオウ(硫酸イオン)が多量に植物体内に取り込まれる必要があることも理由に挙げられる。このことから申請者は、シロイヌナズナなどのモデル植物を用いた個々の遺伝子の解明だけでなく、高イオウ含量の植物を探索し、多量のイオウを取込む仕組みと取込んだイオウの代謝がどのように制御されているのかを解析することが必要であると考えた。

2. 研究の目的

農作物、特に野菜類への期待が「美味しさ」から「健康への機能性」へと大きく変わりつつある。機能性成分の多くが植物の有機態イオウ化合物であることから、含硫二次代謝産物の植物体内での含有量を調節し、高めることができれば、摂食目的に適う機能性成分高含有野菜を育成できると考えた。そのためには、植物におけるイオウ吸収と体内代謝系がどのように制御されているかを解析する必要がある。そこで、本研究ではイオウ含有率が高いアブラナ科植物で、さらに優良形質が高度に保存されていると考えられる伝統野菜を対象とし、イオウ供給量に比例して体内のイオウ含有量および有機態イオウ化合物が顕著に増大する野菜種を選抜する。そして、選抜した植物のイオウ代謝に関与する酵素活性およびイオウの取り込みに関与する硫酸イオントランスポーター遺伝子の発現量との相関を調べ、植物のイオウ吸収と代謝制御に関する基礎的な知見を得て、高機能性野菜の育成を目指す。

3. 研究の方法

水耕液イオウ濃度(硫酸イオン供給量)に比例して体内のイオウ含有量が顕著に増大する野菜を選抜するために、日本全国に存在するアブラナ科伝統野菜(地方野菜を含む)を対象とし以下の実験を行った。葉菜類として *Brassica rapa* から 10 品種、*Brassica napus* から 2 品種、*Brassica japonica* から 5 品種、*Brassica juncea* から 3 品種、根菜類として *Brassica rapa* から(かぶ類) 8 品種、*Brassica campestris* から 1 品種、*Raphanus sativus* から 11 品種、つまり葉菜類 20 品種、根菜類 20 品種の合計 40 品種を供試した(表 1)。パーミキュライ

表 1. 供試植物一覧

学名	品種名	栽培地方	学名	品種名	栽培地方			
A: 葉菜類	<i>Brassica rapa</i>	新晩生小松菜	全国	B: 根菜類	<i>Brassica rapa</i>	大野紅かぶ	北海道	
		盛岡山東菜	岩手県			遠野かぶ	岩手県	
		早池峰菜	岩手県			温海かぶ	山形県	
		長岡菜	新潟県			寄居かぶ	新潟県	
		女池菜	新潟県			東京長かぶ	東京都	
		東京べか菜	東京都			飛騨紅丸蕪	岐阜県	
		野沢菜	長野県			日野菜かぶ	滋賀県	
		四月しろ菜	関西・東北			矢鳥かぶ	滋賀県	
		三河島菜	鹿児島県			<i>Brassica campestris</i>	加茂酸茎菜	京都府
		新山東菜	東京都				<i>Raphanus sativus</i>	赤丸金門二十日大根
		<i>Brassica napus</i>	三陸つぼみ菜			東北	赤筋大根	福島県
							のらぼう菜	神奈川県
		<i>Brassica japonica</i>	早生千筋京水菜			京都府	三浦大根	神奈川県
			中生千筋京水菜			京都府	宮領大根	愛知県
晩生千筋京水菜	京都府		宮重総太大根	愛知県				
四季どり京水菜	京都府		伊吹大根	滋賀県				
<i>Brassica juncea</i>	早生京壬生菜	京都府	大阪四十日大根	大阪府				
	ちりめん葉からし菜	宮城県	白上がり京大根	京都府				
	こぶ高菜	長崎県	時なし大根	京都府				
	わさび菜	九州	阿波晩生沢庵大根	徳島県				

トで発芽させた供試植物を 0.1 mM イオウを含む 1/10 str. 改変 Hoagland 水耕液に移植し、馴化栽培を行った。本葉 2 枚時にイオウ濃度レベルを 0 (イオウ欠除) 0.2 (対照区) 0.4、0.8 mM にそれぞれ調整した 1/5 str. 改変 Hoagland 水耕液処理に移植し、イオウ処理を開始した。本葉 9~10 枚時にサンプリングし、一部を遺伝子発現解析試料として液体窒素で凍結後、-20 で保存した。残りの地上部は 70 にて 48 時間乾燥させ、硝酸・過酸化水素にて湿式分解し、イオウ含有量を ICP で測定した。次に水耕液イオウ含有量の変化、および植物体イオウ含有量の変化が硫酸イオントランスポーター遺伝子 *SULTR1s* (*SULTR1;1*, *SULTR1;2*, *SULTR1;3* の発現量の合計) および *SULTR2;1* の発現量に与える影響を検討するため、qRT-PCR を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 水耕液イオウ濃度がアブラナ科伝統野菜中イオウ濃度に与える影響

イオウ欠除処理 (0 mM イオウ区) によるイオウ欠乏の症状の強弱は品種により異なったが、いずれの品種も生育が減少した (図 1A)。特に地上部イオウ含有量は著しく影響を受け、対照区 (0.2 mM イオウ区) の 10% 程度にまで減少した (図 1B)。またイオウ欠除処理区における地上部乾物重は平均  $0.77 \pm 0.20$  g (図 1A) であり品種により大きく異なっていたが、イオウ含有率は  $0.12 \pm 0.02\%$  とほぼ一定である (図 1C) ことから、生育初期の馴化栽培中に植物が吸収したイオウの量がバイオマス生産量を左右している可能性が考えられた。

次に水耕液イオウ濃度を上昇させた時の、地上部乾物重あたりの平均イオウ含有率は、水耕液イオウ濃度に比例して高くなり、0.2 mM イオウ区で 40 品種平均  $0.52 \pm 0.13\%$ 、4 mM イオウ区で  $0.65 \pm 0.18\%$ 、0.8 mM イオウ区で  $0.86 \pm 0.20\%$  となった (図 1C)。中には、植物体内のイオウ含有率が 1% を超える品種も存在した。これは、多くの双子葉植物のイオウ含有率が、乾物重あたり 0.3% 程度であること (Bowen, 1966) と比較しても高い数値であり、これらの結果からイオウ吸収能力が高い品種を選抜することができたと判断した。また、いずれのイオウ処理区においても、地上部イオウ含有量と乾物重の間には高い正の相関が認められた (図 2)。以上の結果から、アブラナ科植物では、品種が独自に持っているイオウ吸収能および根域イオウ濃度が、生育に与える影響は著しく大きいことが示された。

##### (2) 水耕液イオウ濃度がアブラナ科伝統野菜の硫酸イオントランスポーター発現に与える影響

イオウの吸収において重要な役割を果たす高親和型硫酸イオントランスポーター遺伝子 *SULTR1s* (*SULTR1;1*, *SULTR1;2*, *SULTR1;3* の発現量の合計) と、低親和型硫酸イオントランスポーター遺伝子 *SULTR2;1* の発現量が、水耕液イオウ濃度または植物体内中イオウ含有量 (または含有率) によりどのように変化するかを調べた。地上部における *SULTR1s* 発現量は、イオウ欠除処理

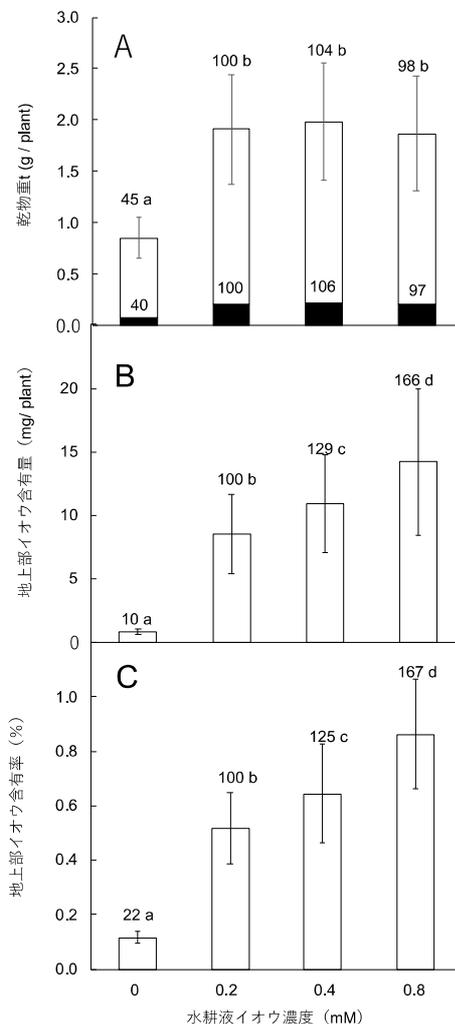


図 1. 水耕液イオウ濃度の違いがアブラナ科伝統野菜の乾物重、地上部イオウ含有量、地上部イオウ含有率に与える影響。値は 40 品種 (各品種 3 連) の平均値。(A) 乾物重; 白のカラムは地上部、黒のカラムは根部。(B) 一植物あたり地上部イオウ含有量 (C) 乾物重あたりイオウ含有率。エラーバーは標準偏差を示す。カラム上の異なるアルファベットは Tukey-Kramer 多重検定で有意差が検出されたことを示す ( $P < 0.05$ )。また、カラム上の数値は 0.2 mM イオウ区の値を 100 とした時の相対値を示す。

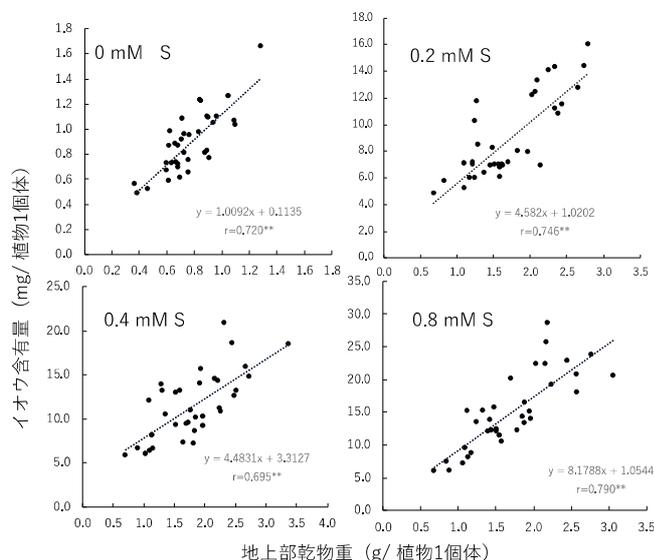


図 2 地上部乾物重と地上部イオウ含有量との相関。データには各品種の平均値を使用した (3 連)。\*\* $P < 0.01$  ( $t$ -test)。

により著しく増大した。一方、既報においてイオウ欠除時の地上部 *SULTR2;1* 発現量は、アブラナ科モデル植物シロイヌナズナ (Takahashi *et al.*, 2000, Maruyama·Nakashita *et al.*, 2015) とカーリーケール(Buchner *et al.*, 2004)では異なる応答を示しており、本研究でも双方の応答を示す植物が認められた。これらのことから、イオウ欠除時の地上部における *SULTR2;1* 発現量の変化は、同じ科の中でも種および品種により傾向が異なることが確かめられた。また、根部 *SULTR2;1* はすべての品種で増加が認められ、既報と異なる応答を示した品種はなかった。一方、水耕液イオウ濃度の上昇に対する *SULTR1s* および *SULTR2;1* の発現量の変化は、品種によって大きく異なり、一定の傾向を見出すことができなかった。

以上のことから、アブラナ科伝統野菜には高いイオウ吸収能を示す品種があること、水耕液イオウ濃度に応じた体内イオウ含有量の増加は、品種に固有の特性が大きく寄与すること、それは硫酸イオントランスポーター遺伝子発現量の高低だけでは説明できず、イオウの代謝系による調節が大きく関与していることが考えられた。

これらの研究結果は、日本土壌肥料学会の欧文誌である *Soil Science and Plant Nutrition* に掲載された (Yamaya-Ito *et al.*, 2020)。

#### 引用文献

1. Bowen, H. J. M. 1966. "The elementary composition of living matter." Chap. 5 in *Trace Elements in Biochemistry*, 68-69. Academic Press: London.
2. Buchner, P., Stuiver, C. E. E., Westerman, S., Wirtz, M., Hell, R., Hawkesford, M. J. and De Kok, L. J. 2004 "Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S and pedospheric sulfate nutrition." *Plant Physiol.*, 136: 3396-3408.
3. Hasegawa, I. 2002. "Phytoremediation: a novel strategy for removing toxic heavy metals from contaminated soils using plants." *Farming Japan*, 36-6, 10-15.
4. Maruyama-Nakashita, A., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T., Saito, K. and Takahashi, H. 2015. "Sulfur-responsive elements in the 3'-Nontranscribed intergenic region are essential for the induction of *SULFATE TRANSPORTER 2;1* gene expression in *Arabidopsis* roots under sulfur deficiency." *Plant Cell*, 27, 1279-1296.
5. Saito, K. 2004. "Sulfur Assimilatory Metabolism. The Long and Smelling Road." *Plant Physiol.*, 136, 2443-2450.
6. Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F. W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M. J. and Saito, K. 2000. "The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J.*, 23, 171-182.
7. Yamaya-Ito, H., Shinmachi, F., Suwa, A., Noguchi, A., Hasegawa, I. 2020. "Effects of rhizosphere sulfur concentration on sulfur content and sulfate transporter gene expression in Japanese heirloom vegetables of the *Brassicaceae* family." *Soil Sci. Plant Nutr.* 66 (6), 854-863.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaya-Ito, H., Shinmachi, F., Suwa, A., Noguchi, A., Hasegawa, I.	4. 巻 66
2. 論文標題 Effects of rhizosphere sulfur concentration on sulfur content and sulfate transporter gene expression in Japanese heirloom vegetables of the Brassicaceae family	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 854-863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2020.1833364	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 諏訪絢風・坂槇智香・矢崎春香・石川真友香・西川昌広・新町文絵・長谷川功・野口章・伊藤（山谷）絃子
2. 発表標題 根域イオウ濃度がアブラナ科伝統野菜のイオウ含有量と硫酸イオントランスポーター遺伝子発現に与える影響 SULTR1グループおよびSULTR2;1遺伝子発現
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaya-Ito, H., Shinmachi, F., Suwa, A., Sakamaki, C., Yazaki, H., Noguchi, A., Hasegawa, I.
2. 発表標題 Genetic and physiological analysis of sulfur uptake by traditional Japanese Brassicaceae vegetables
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 諏訪絢風、坂槇智香、矢崎春香、新町文絵、野口章、長谷川功、伊藤(山谷) 絃子
2. 発表標題 根域イオウ濃度がアブラナ科伝統野菜のイオウ含有量と硫酸イオントランスポーター遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 2018年度日本土壌肥料学会関東支部新潟大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤(山谷) 紘子、新町文絵、野口章、長谷川功
2. 発表標題 アブラナ科伝統野菜の生育におよぼすイオウの影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------