

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20770027

研究課題名（和文） メタボロミクスとフォーカスドプロテオミクスに基づく植物硫黄同化機能ユニットの解明

研究課題名（英文） Investigation of the interplay among enzymes involved in sulfur assimilation in plants.

研究代表者

吉本 尚子 (YOSHIMOTO NAOKO)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：10415333

研究成果の概要（和文）：植物は土壌中の硫酸イオンを吸収し含硫アミノ酸であるシステインへと変換する硫黄同化系を有する。近年シロイヌナズナのゲノム配列をもとに硫黄同化系に属する酵素遺伝子群が明らかにされ、各酵素遺伝子の機能や制御機構の解明が待たれている。そこで本研究では、メタボロミクスやフォーカスドプロテオミクスという手法を利用し、硫黄同化に関わる酵素の機能と酵素間の相互作用について解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Plants are able to take up sulfate from the soil solution and convert it into sulfur-containing amino acid cysteine. The completion of the Arabidopsis genome project enabled identification of genes potentially encoding enzymes involved in sulfur assimilation. In this project, we have analyzed physiological functions of sulfur assimilatory enzymes. We have also analyzed the interplay among these enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物・硫黄代謝産物・生合成・蛋白質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

硫黄は全ての生物の生命維持に不可欠な必須元素の1つである。植物は、主に土壌液に含まれる硫酸イオンを細胞内に取り込み、複数の酵素反応によって含硫アミノ酸であるシステインを生合成する硫黄同化系を持つ。さらにシステインからは、別の含硫アミノ酸であるメチオニンや、含硫ビタミンであるチアミンやビオチン、酸化還元反応や重金属解毒作用をもつグルタチオン等、様々な含硫代謝産物を合成することができる。一方、我々人類を含む動物は、環境中の無機硫黄か

ら有機硫黄化合物を合成する系を持たない。このため、動物は植物を食べることで、生命活動に必要な有機硫黄を得ている。さらに、アブラナ科の植物が合成する発ガン抑制に関わるグルコシノレートや、ネギ科の植物が合成する免疫賦活作用や発ガン抑制作用等の様々な生理活性を示すアリインは、植物細胞内でシステインを出発物質として合成される含硫代謝産物である。このように、植物由来の含硫代謝産物には人類の健康的な生活に役立つ物質が多く存在するが、これらの含硫代謝産物の生理活性には硫黄原子の化

学的性質が深く関わっており、植物の硫黄同化系の重要性がうかがえる。

近年、アブラナ科植物であるシロイヌナズナのゲノム配列が明らかにされた。細菌の硫黄同化系酵素遺伝子との配列の比較の結果、シロイヌナズナの硫黄同化に関わると予想される酵素遺伝子群が明らかにされた。細菌では硫黄同化系のほとんどの酵素反応ステップはそれぞれ1種類の酵素が行うのに対し、シロイヌナズナの硫黄同化系では各酵素反応ステップには複数の互いに似た酵素（アイソザイム）が関与していると考えられた。植物の細胞には、細胞質の他に葉緑体やミトコンドリア等の細胞内小器官が存在する。細胞内小器官を分画して硫黄同化酵素の活性を測定した研究や、硫黄同化系酵素の細胞内小器官局在性を研究した結果から、植物の硫黄同化酵素アイソザイムは細胞質・葉緑体・ミトコンドリアの3つのコンパートメントに分布し、各細胞内小器官で硫黄同化を行っていることが示唆された。

それでは、硫黄同化に関与する個々の代謝酵素は、独立して酵素反応を行っているのだろうか？硫黄同化の各酵素反応で生じる代謝中間体は化学的に不安定または細胞内毒性が強いため細胞内濃度が低い。また、硫黄同化系は途中で分岐しており、含硫アミノ酸であるシステインを合成する経路と硫酸化代謝物を合成する経路にわかれるが、両経路への硫黄の配分は植物がどのような硫黄代謝産物を必要としているかに応じて調節されている。これらの現象を考え合わせると、連続する反応段階の酵素同士が相互作用することで効率的に代謝反応を進めたり、互いの酵素活性を調節したりする可能性が想像できる。また、同じ反応を触媒する酵素アイソザイム間が相互作用することにより、単一のアイソザイムとは異なる酵素特性を示す可能性も想定できる。そこで、本研究では、硫黄同化に関わる酵素アイソザイムの機能や酵素間相互作用の解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナの硫黄同化系（硫酸イオンの吸収や蓄積、硫黄還元を介したシステイン合成、硫酸化反応の基質である3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸の合成、二次的な硫黄代謝産物の生合成）に関わる酵素や制御因子等との間の物理的相互作用を明らかにし、その相互作用がもたらす代謝機能や代謝制御への影響を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 硫黄同化酵素遺伝子を欠損する変異体シロイヌナズナの単離と解析

分子生物学的研究のモデル植物であるシ

ロイヌナズナでは、ゲノム上の遺伝子が T-DNA の挿入により破壊された遺伝子欠損変異体がストックセンターに保存されており、変異体の表現型を調べることによって破壊された遺伝子の機能を解析する逆遺伝学的解析が容易に行える。そこで、硫黄同化酵素遺伝子欠損変異体の代謝物プロファイルを解析する。機能的相互作用のある酵素遺伝子の欠損変異体どうしは、同じような代謝物プロファイルを示すと予想される。また、転写物プロファイルや酵素活性を解析し、各酵素アイソザイムの生理的機能の解明を行う。

(2) 硫黄同化系酵素の細胞内局在性の解析

シロイヌナズナの硫黄同化に関与することが予想される酵素をコードする遺伝子群について、クラゲ緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子との融合遺伝子を作製し、シロイヌナズナに発現させる。緑色蛍光の局在を顕微鏡で観察し、硫黄同化の各反応に関与する酵素アイソザイムの細胞内局在を調べる。

(3) 硫黄同化系酵素の相互作用の解析

同じ細胞内小器官に局在する酵素間の相互作用が酵素機能の調節に関わっている可能性や、硫黄同化系酵素以外の蛋白質因子が相互作用することで酵素機能に影響を与える可能性を考慮し、硫黄同化酵素と物理的相互作用する因子を酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) 硫黄同化系酵素の機能と局在の解析

植物が外部環境から吸収した硫酸イオンは、ATP スルフリラーゼの機能により活性硫酸であるアデノシン 5'-ホスホ硫酸へと変換される。シロイヌナズナには4つの ATP スルフリラーゼアイソザイム (ATPS1, ATPS2, ATPS3, ATPS4) が存在する。T-DNA 挿入遺伝子欠損変異体を取得し、代謝物プロファイル、転写物プロファイル、酵素活性等を解析した。その結果、4つのアイソザイムのうち ATPS1 を欠損した遺伝子破壊体では、硫黄同化産物の蓄積量の顕著な低下が観察された。また、細胞分画実験や GFP 融合蛋白質を用いた局在性の解析から、4つのアイソザイムのうち ATPS2 は細胞質と葉緑体の両方に局在することが示唆された。転写開始点の解析の結果、この現象は ATPS2 遺伝子の転写が葉緑体移行配列付近の複数の箇所から始められることに由来すると考えられた。一方、他の3つのアイソザイムは全て葉緑体に局在することから、硫酸イオンの活性化は主に葉緑体で行われることが示された。

ATP スルフリラーゼにより合成されたアデノシン 5'-ホスホ硫酸は、APS キナーゼによるリン酸化反応によって、硫酸化反応の基質である 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸に変換される。シロイヌナズナには4つの

APS キナーゼアイソザイム (APK1, APK2, APK3, APK4) が存在する。GFP 融合蛋白質を用いた局在解析の結果、4つのアイソザイムのうち APK1, APK2, APK4 は葉緑体に局在するが、APK3 は細胞質に局在することが示された。T-DNA 挿入遺伝子欠損変異体の解析の結果、APK1, APK2 が 3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸やグルコシノレート等の硫酸化代謝物の合成に大きく関わっていることが示された。ATP スルフリラーゼによる硫酸イオンの活性化に続く APS キナーゼによるリン酸化反応も、主に葉緑体で行われるが一部は細胞質で行われることが示された。

(2) 硫黄同化酵素の相互作用の解析

高親和型硫酸イオントランスポーター SULTR1;1 および SULTR1;2 は、シロイヌナズナの根の表皮と皮層の細胞膜に局在し、土壌液中の硫酸イオンを根の細胞内に取り込む輸送蛋白質である。SULTR1;1 および SULTR1;2 の局在場所が一致していること、両方とも硫酸イオンの吸収という同じ役割を持つことから、この2つのトランスポーター間の相互作用について酵母発現系を用いて解析した。その結果、SULTR1;1 および SULTR1;2 は物理的に相互作用することで硫酸イオン輸送活性が上昇することが示された。

ATP スルフリラーゼと APS キナーゼは連続した酵素反応を行い、前述の局在解析で明らかになったように、どちらの酵素も葉緑体と細胞質に局在する。そこで、ATP スルフリラーゼと APS キナーゼ間の相互作用を酵母 two-hybrid 法で解析したところ、葉緑体局在型の ATP スルフリラーゼアイソザイムと葉緑体局在型の APS キナーゼアイソザイムの間で相互作用が観察された。ATP スルフリラーゼの生成物であり APS キナーゼの基質であるアデノシン 5'-ホスホ硫酸は化学的に不安定な物質であることから、少なくとも葉緑体では2酵素の相互作用により酵素反応をより効率的に行っていることが示唆された。

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. Cintia G. Kawashima, Colette A. Matthewman, Siqi Huang, Bok-Rye Lee, Naoko Yoshimoto, Anna Koprivova, Ignacio Rubio-Somoza, Marco Todesco, Tina Rathjen, Kazuki Saito, Hideki Takahashi, Tamas Dalmay, Stanislav Kopriva: Interplay of SLIM1 and mir395 in the regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04547.x. (2011) 査読有

2. Sarah G. Mugford, Naoko Yoshimoto, Michael Reichelt, Markus Wirtz, Lionel Hill, Sam T. Mugford, Yoshimi Nakazato, Masaaki Noji, Hideki Takahashi, Robert Kramell, Tamara Gigolashvili, Ulf-Ingo Flügge, Claus Wasternack, Jonathan Gershenzon, Rüdiger Hell, Kazuki Saito, Stanislav Kopriva: Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in Arabidopsis reduces levels of sulfate secondary metabolites. *Plant Cell* **21**, 910-927 (2009) 査読有
3. Cintia Goulart Kawashima, Naoko Yoshimoto, Akiko Maruyama-Nakashita, Yumiko N. Tsuchiya, Kazuki Saito, Hideki Takahashi, Tamas Dalmay: Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant J.* **57**, 313-321 (2009) 査読有
4. Mutsumi Watanabe, Keiichi Mochida, Tomohiko Kato, Satoshi Tabata, Naoko Yoshimoto, Masaaki Noji, Kazuki Saito: 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

[学会発表] (計12件)

1. 吉本尚子, 関口愛, 高橋秀樹, 斉藤和季: 硫黄同化に関与するATPスルフリラーゼ遺伝子は転写開始点制御により葉緑体型と細胞質型の酵素をコードする. 第52回日本植物生理学会年会 2011年3月22日 (仙台)
2. Naoko Yoshimoto, Ai Sekiguchi, Hideki Takahashi, Kazuki Saito: Dual targeting of Arabidopsis ATP sulfurylase 2 to chloroplast and cytosol by use of multiple in-frame initiation codons. 8th International Workshop on Sulfur Metabolism in Higher Plants. 2010年11月25日 (Creswick, Australia)
3. Sarah G. Mugford, Colette Matthewman, Bok-Rye Lee, Ruslan Yatusevich, Naoko Yoshimoto, Markus Wirtz, Lionel Hill, Ruediger Hell, Hideki Takahashi, Kazuki Saito, Tamara Gigolashvili, Stanislav Kopriva: Partitioning of sulfur between primary and secondary metabolism. 8th International Workshop on Sulfur Metabolism in Higher Plants. 2010年11月23日 (Creswick, Australia)

4. 吉本尚子, 土屋 (中村) 有美子, 高橋秀樹, 斉藤和季: 硫黄同化系酵素ATPスルフリラーゼ過剰発現植物の解析. 第28回日本植物細胞分子生物学会 2010年9月3日 (仙台)
5. 吉本尚子, 東泰弘, 水野新也, 渡辺むつみ, 高橋秀樹, 野路征昭, 斉藤和季: シロイヌナズナの硫黄同化に関わるATPスルフリラーゼ群の機能解析. 第51回日本植物生理学会年会 2010年3月19日 (熊本)
6. Naoko Yoshimoto, Yasuhiro Higashi, Sakiko Katsunuma, Shin'ya Mizuno, Hideki Takahashi, Masaaki Noji, Kazuki Saito: Functional characterization of ATP sulfurylase gene family in *Arabidopsis thaliana*. 2nd SULPHYTON Meeting on Plant Sulfur Research. 2009年9月13日 (Norwich, UK)
7. 吉本尚子, 東泰弘, 勝沼咲子, 水野新也, 高橋秀樹, 野路征昭, 斉藤和季: シロイヌナズナにおける硫黄同化系酵素ATPスルフリラーゼの機能解析. 第27回日本植物細胞分子生物学会 2009年7月31日 (藤沢)
8. 吉本尚子, 東泰弘, 勝沼咲子, 水野新也, 高橋秀樹, 野路征昭, 斉藤和季: シロイヌナズナの硫黄同化系酵素ATPスルフリラーゼの機能解析. 第50回日本植物生理学会年会 2009年3月22日 (名古屋)
9. 吉本尚子, 中里好美, 高橋秀樹, 野路征昭, 斉藤和季: シロイヌナズナにおける硫酸化代謝物の合成に関わるAPSキナーゼ群の機能解析. 第26回日本植物細胞分子生物学会 2008年9月2日 (大阪)
10. Naoko Yoshimoto, Eri Inoue, Akiko Watanabe-Takahashi, Kazuki Saito, Hideki Takahashi: Post-transcriptional control of high-affinity sulfate transporters for uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. 7th Workshop on Sulfur in Plants. 2008年5月16日 (Warsaw, Poland)
11. Mutsumi Watanabe, Miyako Kusano, Akira Oikawa, Atsushi Fukushima, Keiichi Mochida, Tomohiko Kato, Satoshi Tabata, Masaaki Noji, Naoko Yoshimoto, Kazuki Saito: Cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*: comprehensive study on the functions of *Serat* and *Bsas* gene families. 7th Workshop on Sulfur in Plants. 2008年5月16日 (Warsaw, Poland)
12. Sarah G. Mugford, Michael Reichelt, Naoko Yoshimoto, Yoshimi Nakazato, Masaaki Noji, Hideki Takahashi, Kazuki Saito, Jonathan Gershenzon, Stanislav

Kopriva: Characterization of the APS kinase gene family in *Arabidopsis thaliana*. 7th Workshop on Sulfur in Plants. 2008年5月14日 (Warsaw, Poland)

[図書] (計3件)

1. Naoko Yoshimoto, Eri Inoue, Akiko Watanabe-Takahashi, Kazuki Saito, Hideki Takahashi: Post-transcriptional control of high-affinity sulfate transporters for uptake of sulfate in roots of *Arabidopsis thaliana*. in "Sulfur Metabolism in Plants" A. Sirko, L.J. De Kok, S. Haneklaus, M.J. Hawkesford, H. Rennenberg, K. Saito, E. Schnug, I. Stulen, eds: pp. 179-183, Buckhuys Publishers, Leiden, 2009.
2. Sarah G. Mugford, Michael Reichelt, Naoko Yoshimoto, Yoshimi Nakazato, Masaaki Noji, Hideki Takahashi, Kazuki Saito, Jonathan Gershenzon, Stanislav Kopriva: Characterization of the APS kinase gene family in *Arabidopsis thaliana*. in "Sulfur Metabolism in Plants" A. Sirko, L.J. De Kok, S. Haneklaus, M.J. Hawkesford, H. Rennenberg, K. Saito, E. Schnug, I. Stulen, eds: pp. 189-193, Buckhuys Publishers, Leiden, 2009.
3. Mutsumi Watanabe, Miyako Kusano, Akira Oikawa, Atsushi Fukushima, Keiichi Mochida, Tomohiko Kato, Satoshi Tabata, Naoko Yoshimoto, Masaaki Noji, Kazuki Saito: Cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*: comprehensive reverse genetic study on the functions of *BSAS* and *SERAT* gene families. in "Sulfur Metabolism in Plants" A. Sirko, L.J. De Kok, S. Haneklaus, M.J. Hawkesford, H. Rennenberg, K. Saito, E. Schnug, I. Stulen, eds: pp. 201-205, Buckhuys Publishers, Leiden, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 尚子 (YOSHIMOTO NAOKO)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 10415333

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし