

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02859

研究課題名(和文) グルタチオンの分解及び輸送の制御による植物の物質生産と生育改善に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Research for Improving Material Production and Growth of Plants by Controlling Glutathione Degradation and Transport

研究代表者

大津 直子(Ohtsu, Naoko)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40513437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物におけるグルタチオン分解は、栄養状態や器官により2経路で行われていることを明らかにした。1経路は  $\gamma$ -グルタミルペプチダーゼ(GGP)によって行われ、硫黄の一次代謝と二次代謝への分配を制御している。もう1経路は  $\gamma$ -グルタミルサイクロトランスフェラーゼ(GGCT)によるが、硫黄欠乏状態や、生長点などで、ATPを消費しながらもグルタチオンからシステインを取り出す役割を果たす。また、分解の二段階目で機能する酵素システニルグリシンペプチダーゼ(GCP)を同定し、N2-acetylorntithine deacetylase (NAOD)と二つの活性を持つことを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタチオンは細胞の酸化還元制御を通して成長やストレス耐性に大きく関与するが、その量を制御する代謝経路については、植物のみならず他の生物でも完全解明されていなかった。本研究はそれを高等植物において明らかにした。本経路の解明は植物科学全体に影響することから、植物分野においてインパクトが非常に高く権威のある国際誌であるPlant Journal2報に掲載されたほか、同じくハイインパクトであるJournal of Experimental Botanyにも総説を掲載した。さらに、グルタチオン代謝が防御応答にも関与することを示唆し、植物の基本的な代謝だけでなく、病理分野にも新たな知見をもたらした。

研究成果の概要(英文)：We found that glutathione degradation in higher plants occurs by two pathways depending on nutritional status and organs: one pathway is mediated by  $\gamma$ -glutamyl peptidase (GGP), which regulates the partitioning of sulfur into primary and secondary metabolism. The other pathway is performed by  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase (GGCT), which is responsible for extracting cysteine from glutathione while consuming ATP in sulfur-deficient conditions and at growth points.

We also identified the enzyme cysteinylglycine peptidase (GCP), which functions in the second step of glutathione degradation, and suggested that it has dual activity with N2-acetylorntithine deacetylase (NAOD).

研究分野：植物栄養学

キーワード：グルタチオン 硫黄代謝 シロイヌナズナ 酸化還元制御 メタボロミクス 酵素

1. 研究開始当初の背景

-Glu-Cys-Gly から成るトリペプチドであるグルタチオンは、植物細胞内で高濃度に存在し、植物における窒素や硫黄の貯蔵・輸送形態である。必要器官に輸送されたグルタチオンは分解され、窒素や硫黄の供給源となると考えられるが、グルタチオン輸送や分解が植物の代謝に与える影響は不明であった。研究開始当初までに研究代表者は、モデル植物シロイヌナズナの cDNA ライブラリーを用い、酵母のグルタチオン分解欠損株を補完する遺伝子を複数同定していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで研究代表者が示唆してきたグルタチオン分解や輸送を担う遺伝子の変異株や発現制御株を用い、Widely targeted metabolomics 解析や元素解析と組み合わせ、グルタチオンの輸送や分解が植物の代謝や生育に与える影響を解明することである。その中から有用物質生産や生育改善につながるグルタチオン代謝・輸送の制御方法を明らかにし、将来的に作物に応用するための基盤とする。

3. 研究の方法

酵母のグルタチオン分解欠損株を補完する遺伝子として同定されたシロイヌナズナ遺伝子、-Glutamyl peptidase (GGP)、-Glutamyl cyclotransferase (GGCT) および酵母の CysGly 分解欠損株を補完するシロイヌナズナ遺伝子について、変異株を確立した。それらを Widely targeted metabolomics 解析に供することにより、それぞれの遺伝子産物が、植物代謝に及ぼす影響を解析した。また、大腸菌にて組み換えタンパク質を作成し、Km や Vmax など酵素学的な解析を行った。さらに、タンパク質の構造解析を Alpha-fold を用いて行い、目的の基質との結合について解析した。さらに、それぞれの遺伝子の部位特異的発現を調査した。

4. 研究成果

(1) 細胞内グルタチオン分解経路の解明

グルタチオンの分解は硫黄の再分配につながり、主に -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT2;1, GGCT2;2, GGCT2;3) によって行われると考えられていたが、GSH の急激なターンオーバーを十分に説明することはできなかった。我々は、-グルタミルペプチダーゼ 1 (GGP1) が GSH の分解に寄与していることを、酵母相補アッセイにより発見した。GGP のうち主要である GGP1 および GGP3 について組み換えタンパク質を作成したところ、in vitro で GSH の高い分解活性を示したが、酸化グルタチオン (GSSG) の分解活性は示さなかった。

GGP1 の転写産物はロゼット葉で非常に豊富であり、gpp1 変異体が栄養条件に関係なく常に多くの GSH を蓄積していることと一致していた。GGCT を介する経路よりも GGP を介する経路の方がエネルギー要求量が低いことを考えると、GGCT を介する経路よりも GGP を介する経路の方が、GSH 分解の効率的な経路である可能性が考えられた。したがって、細胞質 GSH は主に GGP1 によって分解され、おそらく GGP3 によっても分解されるというモデルを提案した (図 1)。

GGP はグルコシノレートとカマレキシン合成において、前駆体である GSH 抱合体を分解することが知られていた。メタボロミクス解析において、実際、gpp1 変異体では、硫黄飢餓のシグナル分子である *o*-アセチル-L-Ser のレベルが高く、グルコシノレートとその分解産物のレベルが低いことが確認された。GGP1 の予測構造は、さらにこの仮説の根拠となった。結論として、GGP1 およびおそらく GGP3 は、一次および二次硫黄代謝において重要な役割を果たしていることを示唆した。

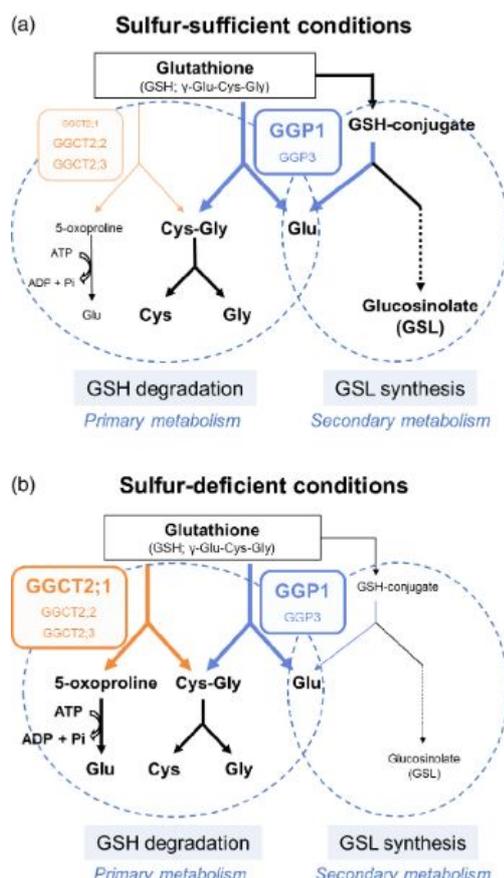


図 1. グルタチオン分解経路 (a) 硫黄十分条件 (b) 硫黄欠乏条件

## (2) グルタチオン分解第二段階で機能するシステイニルグリシン分解酵素の同定

次に、グルタチオンが上記酵素によって分解されたのち、生じた Cys-Gly を Cys に分解する経路について解析した。本研究では、At4g17830 が Cys-Gly ジペプチダーゼ、すなわちシステイニルグリシンジペプチダーゼ 1 (CGP1) であることを同定した。CGP1 は、Cys-Gly を分解できない酵母変異体の表現型を補った。シロイヌナズナの *cgp1* 変異体は、野生型よりも Cys-Gly 分解活性が低く、チオール化合物の濃度も不安定であった。大腸菌で作らせた組み換え CGP1 は *in vitro* で妥当な Cys-Gly 分解活性を示した。メタボローム解析の結果、*cgp1* は、*O*-アセチルセリン (OAS) の蓄積の上昇や含硫代謝物の減少など、重度の硫黄欠乏の徴候を示した。発芽した種子の主根が長くなるなど、*cgp1* で観察された形態学的変化もまた、硫黄飢餓に関連している可能性が高いと考えられた。

At4g17830 は、オルニチンの生合成に機能する N<sup>2</sup>-アセチルオルニチン脱アセチル化酵素 (NAOD) をコードすることが以前に別のグループにより報告されていた。*cgp1* 変異体はオルニチン含量の減少を示さなかったが、CGP1 の構造を解析した結果、CGP1 が Cys-Gly ジペプチダーゼと NAOD 活性を持つ可能性は否定できなかった (図 2)。したがって、CGP1 は細胞質の GSH 分解経路で機能する Cys-Gly ジペプチダーゼであり、GSH とオルニチンの代謝において二重の役割を担っている可能性が示唆された。

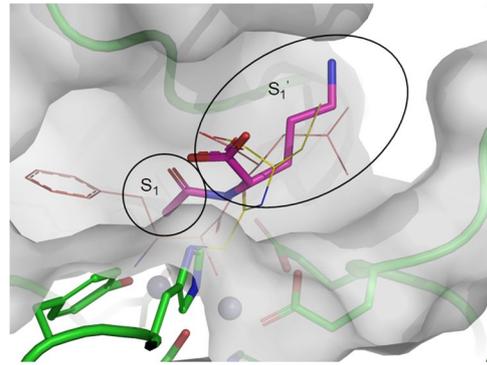


図 2. CGP1 の予測構造における NAOD の分子モデリング。NAOD 分子 (マゼンタ) を、AlphaFold2 (緑) によって予測された CGP1 の活性部位に手作業でモデル化した。CGP1 の分子表面は白で示されている。サブサイト S1 と S1' は黒丸で示す。ScDug1p の触媒亜鉛原子 (灰色の球) と Gly-Cys (黄色の細い棒) およびマウスカルノシナーゼ CN2 のベスタチン阻害剤 (ピンクの細い棒) を重ね合わせた。

## (3) グルタチオン分解第二段階で機能するシステイニルグリシン分解酵素の同定

細胞内グルタチオン分解酵素 GGCT2;3 と細胞外グルタチオン分解酵素 GGT1 の二重変異株において、発芽後 3 週間程度で白化し、致死してしまう現象が見られた。トリパンブルー染色から細胞死が引き起こされていることが観察された。サリチル酸および活性酸素の定量から、二重変異株では防御応答が過剰になっていることが示唆され、トランスクリプトーム解析でもこの仮説が支持された。GGT1 の共発現パターンを調べると、Plant-pathogen interaction (植物-病原菌相互作用) とあり、病原菌応答に関わる可能性が考えられる。*ggt1* への病原菌接種実験を行ったところ、*ggt1* は野生型株より大きな壊死斑を形成する傾向があった。本研究から、細胞内外のグルタチオン分解と、防御応答との関係が示唆された。

### 引用文献

(1) Takehiro Ito, Taisuke Kitaiwa, Kosuke Nishizono, Minori Umahashi, Shunsuke Miyaji, Shin-ichiro Agake, Kana Kuwahara, Tadashi Yokoyama, Shinya Fushinobu, Akiko Maruyama-Nakashita, Ryosuke Sugiyama, Muneo Sato, Jun Inaba, Masami Yokota Hirai, [Naoko Ohkama-Ohtsu](#)  
Glutathione degradation activity of  $\gamma$ -glutamyl peptidase 1 manifests its dual roles in primary and secondary sulfur metabolism in Arabidopsis  
*The Plant Journal*, Volume 111, Issue 6, Pages 1626-1642, 2022  
DOI: 10.1111/tpj.15912

(2) Shunsuke Miyaji, Takehiro Ito, Taisuke Kitaiwa, Kosuke Nishizono, Shin-ichiro Agake, Hiroki Harata, Haruna Aoyama, Minori Umahashi, Muneo Sato, Jun Inaba, Shinya Fushinobu, Tadashi Yokoyama, Akiko Maruyama-Nakashita, Masami Yokota Hirai, Naoko Ohkama-Ohtsu  
N<sup>2</sup>-Acetylornithine deacetylase functions as a Cys-Gly dipeptidase in the cytosolic glutathione degradation pathway in *Arabidopsis thaliana*  
*The Plant Journal*, DOI: 10.1111/tpj.16700

(3) Takehiro Ito and Naoko Ohkama-Ohtsu  
Degradation of glutathione and glutathione conjugates in plants  
*Journal of Experimental Botany*, Volume 74, Issue 11, Pages 3313-3327, DOI: 10.1093/jxb/erad018

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Takehiro, Kitaiwa Taisuke, Nishizono Kosuke, Umahashi Minori, Miyaji Shunsuke, Agake Shin-ichiro, Kuwahara Kana, Yokoyama Tadashi, Fushinobu Shinya, Maruyama Nakashita Akiko, Sugiyama Ryosuke, Sato Muneo, Inaba Jun, Hirai Masami Yokota, Ohkama Ohtsu Naoko	4. 巻 111
2. 論文標題 Glutathione degradation activity of <sc>glutamyl</sc> 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/tbj.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 Ito Takehiro, Ohkama-Ohtsu Naoko	4. 巻 74
2. 論文標題 Degradation of glutathione and glutathione conjugates in plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 3313 ~ 3327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erad018	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 -

1. 著者名 伊藤岳洋、大津(大鎌)直子	4. 巻 81
2. 論文標題 植物におけるグルタチオン分解代謝調節による硫黄分配のメカニズム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 120-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erad018	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Sugiura Hinako, Sugihara Soh, Kamiya Takehiro, Artigas Ramirez Maria Daniela, Miyatake Minori, Fujiwara Toru, Takuji Ohyama, Motobayashi Takashi, Yokoyama Tadashi, Bellingrath-Kimura Sonoko Dorothea, Ohkama-Ohtsu Naoko	4. 巻 67
2. 論文標題 Sulfur application enhances secretion of organic acids by soybean roots and solubilization of phosphorus in rhizosphere	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 400 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Li Jun-Song, Suzui Nobuo, Nakai Yuji, Yin Yon-Gen, Ishii Satomi, Fujimaki Shu, Kawachi Naoki, Rai Hiroki, Matsumoto Takashi, Sato-Izawa Kanna, Ohkama-Ohtsu Naoko, Nakamura Shin-ichi	4. 巻 305
2. 論文標題 Shoot base responds to root-applied glutathione and functions as a critical region to inhibit cadmium translocation from the roots to shoots in oilseed rape ( <i>Brassica napus</i> )	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110822 ~ 110822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2021.110822	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 -

1. 著者名 Adams Eri, Miyazaki Takae, Watanabe Shunsuke, Ohkama-Ohtsu Naoko, Seo Mitsunori, Shin Ryoung	4. 巻 10
2. 論文標題 Glutathione and Its Biosynthetic Intermediates Alleviate Cesium Stress in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01711	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 -

1. 著者名 Yamaguchi Chisato, Khamsalath Soudthedlath, Takimoto Yuki, Suyama Akiko, Mori Yuki, Ohkama-Ohtsu Naoko, Maruyama-Nakashita Akiko	4. 巻 9
2. 論文標題 SLIM1 Transcription Factor Promotes Sulfate Uptake and Distribution to Shoot, Along with Phytochelatin Accumulation, Under Cadmium Stress in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 163 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01711	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 -

1. 著者名 Nakamura Shin-ichi, Suzui Nobuo, Yin Yong-Gen, Ishii Satomi, Fujimaki Shu, Kawachi Naoki, Rai Hiroki, Matsumoto Takashi, Sato-Izawa Kanna, Ohkama-Ohtsu Naoko	4. 巻 290
2. 論文標題 Effects of enhancing endogenous and exogenous glutathione in roots on cadmium movement in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110304 ~ 110304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2019.110304	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 -

1. 著者名 Nakajima Takatsugu, Kawano Yusuke, Ohtsu Iwao, Maruyama-Nakashita Akiko, Allahham Alaa, Sato Muneo, Sawada Yuji, Hirai Masami Yokota, Yokoyama Tadashi, Ohkama-Ohtsu Naoko	4. 巻 60
2. 論文標題 Effects of Thiosulfate as a Sulfur Source on Plant Growth, Metabolites Accumulation and Gene Expression in Arabidopsis and Rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1683 ~ 1701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz082	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 T. ITO, T. KITAIWA, K. NISHIZONO, M. UMAHASHI, S. MIYAJI, S. AGAKE, K. KUWAHARA, T. YOKOYAMA, S. FUSHINOBU, A. MARUYAMA-NAKASHITA, R. SUGIYAMA, M. SATO, J. INABA, M.Y. HIRAI, N. OHKAMA-OHTSU
2. 発表標題 gamma GLUTAMYL PEPTIDASE 1 DEGRADES GLUTATHIONE AND PARTICIPATES IN BOTH PRIMARY AND SECONDARY SULFUR METABOLISM
3. 学会等名 International Plant sulfur Workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. MIYAJI, T. ITOH, T. KITAIWA, K. NISHIZONO, S. AGAKE, A. ALLAHHAM, M. SATO, J. INABA, T. YOKOYAMA, S. Fushinobu, A. MARUYAMA-NAKASHITA, M. Y. HIRAI, N. OHKAMA-OHTSU
2. 発表標題 Physiological analysis of the cysteinylglycine degrading enzyme that function in glutathione degradation in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 International Plant sulfur Workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤岳洋・宮地俊輔・馬橋美野里・北岩泰祐・西園亘祐・桑原可奈・安掛真一郎・佐藤心郎・稲葉ジュン・横山正・伏信進矢・杉山龍介 2. 丸山明子・平井優美・大津(大鎌)直子
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるグルタチオン分解酵素およびシステイニルグリシン分解酵素の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takehiro Ito, Taisuke Kitaiwa, Kosuke Nishizono, Minori Umahashi, Shunsuke Miyaji, Shin-ichiro Agake, Tadashi Yokoyama, Akiko Maruyama-Nakashita, Masami Yokota Hirai, Naoko Ohkama-Ohtsu
2. 発表標題 Characterization of Five Cytosolic Glutathione Degradation Enzymes in Arabidopsis
3. 学会等名 S/Bio Glucosinolate 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤岳洋・馬橋美野里・宮地俊輔・丸山明子・平井優美・大津(大鎌)直子
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるグルタチオン分解経路の初期反応を担う5遺伝子の異なる性質の解明
3. 学会等名 植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 俊松・中村進一・鈴木伸郎・尹 永根・河地有木・及川 彰・頼 泰樹・横山 正・大津直子
2. 発表標題 植物根へのグルタチオン添加によるカドミウム排出促進機構の解明
3. 学会等名 日本土壤肥料学会岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬橋美野里・丸山明子・Alaa Allahham・澤田有司・佐藤心郎・平井優美・大津直子
2. 発表標題 グルタチオン分解を担う遺伝子が欠損した変異株のメタボローム解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮地俊輔・丸山明子・Allahham Alaa・澤田有司・佐藤心郎・稲葉ジュン・平井優美・大津直子
2. 発表標題 シロイヌナズナのグルタチオン分解経路において機能するCys-Gly分解酵素の機能解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山明子・河野祐介・大津厳生・中嶋考嗣・大津直子・川口諒太・塩塚直輝・山口千仁・Soudthelath Khamsalath・一瀬智美
2. 発表標題 様々な硫黄源が植物の生育と硫黄代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 俊松・中村進一・中井雄治・及川 彰・頼 泰樹・山田哲也・横山 正・大津直子
2. 発表標題 植物根へのグルタチオン添加が根から地上部へカドミウム輸送を抑制する機構の研究
3. 学会等名 日本土壌肥料学会静岡大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学大学院 農学研究院 生物生産科学専攻 植物栄養学研究室  
<http://web.tuat.ac.jp/~plantnut/>  
 東京農工大学大学院 農学研究院 生物生産科学専攻 植物栄養学研究室  
<http://web.tuat.ac.jp/~plantnut/>

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
研究分担者	丸山 明子  (Maruyama-Nakashita Akiko)  (70342855)	九州大学・農学研究院・准教授    (17102)	
研究分担者	平井 優美  (Hirai Yokota Masami)  (90415274)	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・チームリーダー    (82401)	
研究分担者	澤田 有司  (Sawada Yuji)  (00415176)	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・客員研究員    (82401)	

	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
研究協力者	伏信 進矢  (Fushinobu Shinya)		
研究協力者	杉山 龍介  (Sugiyama Ryusuke)		

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