

機関番号：34303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580065

研究課題名 (和文) シロイヌナズナのガンマグルタミルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリー
機能解析研究課題名 (英文) Functional characterization of the *arabidopsis*' γ -glutamyltransferase gene family.

研究代表者

プリエト ラファエル (Prieto Rafael)

京都学園大学・バイオ環境学部・准教授

研究者番号：40434659

研究成果の概要 (和文)：ガンマグルタミルトランスフェラーゼ (GGT) は、グルタチオン (GSH) の異化、GSH-生体異物抱合体 (GSX) の分解、システイン (Cys) のリサイクル系においても初発酵素として極めて重要な働きをしていると示唆されているが、高等植物では、その詳細、特に GGT の *in vivo* で担っている役割は明らかではない。シロイヌナズナには、ヘテロダイマー型 GGT をコードする 3 種類の遺伝子 (*AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3*) が存在する。RT-PCR 解析より *AtGGT1*, *AtGGT3* は構成的に発現するのに対し *AtGGT2* は花と莢にだけ発現すると考えられる。遠心分画法によりシロイヌナズナ GGT には可溶性と結合性の 2 群が存在することを明らかにした。結合性 GGT は、マイクロソーム画分に存在せず、500mM NaCl を含む高イオン強度磨砕バッファーで可溶化されたこと、プロトプラストでは検出されなかったことから、細胞壁に局在すると考えられる。また、野生型と *atggt* 挿入変異株の GGT 活性の解析より、*AtGGT1* は結合性 (細胞壁) GGT で、*AtGGT2* 及び *AtGGT3* は可溶性 (可溶性画分) GGT であると考えられる。*atggt* 挿入変異株、GSH 合成に関与する *GSH1* 遺伝子の *pad2.1* 突然変異株、とその二重変異株を用いて、葉、莢における GSH 代謝解析より、*AtGGT1* と *AtGGT2* は GSH 異化に関与すると考えられる。細胞内における *AtGGT* タンパク質の局在解析を行うために、*AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3* プロモーターの制御下に発現される *AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3* と *GFP* の融合遺伝子をシロイヌナズナに導入した。

研究成果の概要 (英文)： γ -Glutamyltransferase (GGT) has been proposed to catalyze the first committed step in glutathione (GSH) catabolism, degradation of glutathione S-conjugates (GSX) and cysteine (Cys) recycling. However, there are still many aspects about the GGT function, especially concerning the *in vivo* role of the enzyme in plants, that are not clear. In the *Arabidopsis* genome there are three genes (*AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3*) coding for GGT. RT-PCR gene expression analysis suggested that *AtGGT1* and *AtGGT3* are expressed constitutively. In contrast, *AtGGT2* is mainly expressed in siliques. Analysis of the distribution of GGT activity by centrifugation indicated that *Arabidopsis* has soluble and bound GGT activities. Bound GGT was not localized to the microsomal fraction. Besides, the fact that bound GGT was solubilized by high ionic strength buffer containing 500 mM NaCl, and that it was not detected in protoplasts, indicated that bound GGT is likely localized to the cell wall. GGT activity analysis indicated that *AtGGT1* codes for a bound GGT, whereas *AtGGT2* and *AtGGT3* code for soluble GGTs. In order to carefully analysis the intracellular localization of GGT proteins, *AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3* cDNAs fused to GFP and expressed under the control of their corresponding promoter were introduced in *Arabidopsis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物栄養代謝・土壌学

キーワード：植物代謝調節、環境応答・適応、生体異物解毒

1. 研究開始当初の背景

(1) 高等植物においてシステインは主に葉緑体で合成され、グルタチオン (γ -GluCysGly, GSH) の形態で蓄積される。GSHは、生体内の酸化還元状態の維持、GSH抱合体形成を通じて薬剤や除草剤などの生体異物の解毒などに関与することによって生理機能を発揮するだけでなく、フィトケラチンの前駆物質やシステインの貯蔵・輸送体としても機能していると考えられている。GSHの異化は、細胞内GSH恒常性の維持、その構成アミノ酸の再利用やGSH-生体異物抱合体(GSX)の分解などにおいて必須とされるが、植物ではその仕組みは完全には明らかにはされていない。

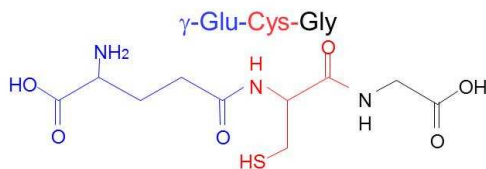


図1 GSHの構造

(2) GGT (EC. 2.3.3.2.) は生物界に広く存在し、哺乳動物や微生物においてGSHの異化を触媒する酵素として知られている。高等植物GGTは、ガンマーグルタミル基の加水分解、または転位活性により種々のガンマーグルタミル化合物の生合成および分解代謝系における鍵酵素であると考えられている (Kawasaki et al., 1982; Lancaster et al., 1994; Martin et al., 1995)。しかも、GSX分解、GSHの異化及びシステインのリサイクル系においても初発酵素として極めて重要な働きをしていると示唆されている (Martin and Slovin, 2000; Storozhenko et al., 2002; Shaw et al., *Phytochem.*, 2005; Nakano et al., 2006a,b; Ohkama et al., 2007a,b) が、その詳細、特にGGTの*in vivo*で担っている役割は明らかではない。

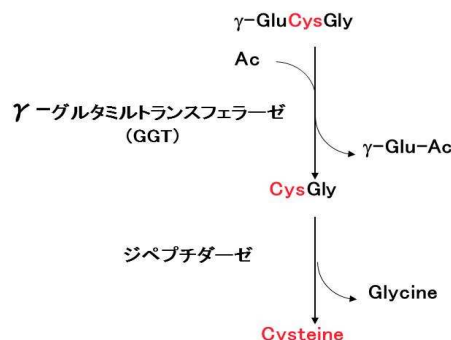


図2 GGTとジペプチダーゼによるGSH異化

(3) 我々の研究班は、ダイコン子葉を用いて、植物GGTには可溶性と結合性の2群があることを明らかにし (Nakano et al., 2004)、さらに、ダイコン細胞の液胞内可溶性画分 (Nakano et al., 2006b)、アポプラスト結合性画分 (Nakano et al., 2004) に局在するGGTアイソフォームを同定し、GGT阻害剤 (アシビシン) 実験により液胞に局在するGGT群がGSX異化を担っていることを示唆する結果を得た (Nakano et al., 2006b)。可溶性と結合性のグループ、それぞれについて2種類のGGTを単一に精製し、その酵素解析を通して、植物のGGTに多様性があることを明らかにした (Nakano et al., 2006a)。また、精製されたダイコンのヘテロダイマー型GGTのN末端の部分的なアミノ酸配列及びシロイヌナズナのゲノム配列からヘテロダイマー型GGTをコードすると推定される3種類の遺伝子 (*At4g39640*, *At4g39650*, *At4g29210*。以下各々、*AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3*) を基にして、ダイコンにおける3連のオーソログcDNAs (*RsGGT1-RsGGT3*) を単離し、それぞれ組織特異的に発現していることを見出した (Nakano et al., 2006c)。上記の植物ヘテロダイマー型GGTのアミノ酸配列や分子構造は哺乳類や酵母のものと有意に類似している (Storozhenko et al., 2002; Shaw et al., 2005; Nakano et al., 2006a; Nakano et al., 2006c)。

(4) *AtGGT1*cDNA を酵母で過剰発現させたことにより酸化ストレスへの耐性が高くなった(Kushnir et al., 1995)。 *atggt* 変異株の解析より *AtGGT1* はアポプラストでの酸化型グルタチオン(GSSG)異化 (Ohkama et al., 2007a, Martin et al., 2007) *AtGGT3* は液胞での GSX 分解に関与すると考えられる(Ohkama et al., 2007b, Grzam et al., 2007)。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物のシロイヌナズナを用いて、ヘテロダイマー型GGT遺伝子ファミリーの機能解析に取り込む。特に *in vivo* におけるGGTの各アイソフォームの役割を明らかにする点に特徴がある。それらを目的として、次の研究プランを立てた

- (1) *AtGGT* 遺伝子発現解析を行なう。
- (2) *atggt* 挿入変異株を用いて、GGT と GSH 異化との関連について解析を行なう。
- (3) 細胞内における *AtGGT* タンパク質の局在解析を行なう。

3. 研究の方法

(1) 植物材料と培地

植物材料はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)を用いた。 *atggt1-1*, *atggt2-1*, *atggt2-2* の T-DNA タグ挿入変異株、 *pad2-1* 変異株は Arabidopsis Biological Research Center (ABRC) (Ohio State University, Columbus, USA)から、 *aggt3-3* の T-DNA タグ挿入変異株と *atggt1-3*, *atggt3-1*, *atggt3-2* トランスポゾンタグ挿入変異株は Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (University of Nottingham, Loughborough, England)から入手した。1%の寒天を含むシロイヌナズナ培養用培地に1%次亜塩素酸ナトリウムと0.5% Triton X-100 で滅菌処理した種子を蒔き、4°C、暗所で3日間置いた後、25°C、長日条件でプレートを垂直に立てた状態で発芽させた。

(2) 遺伝子型の解析

atggt 変異株の遺伝子型を調べるために、T-DNA またはトランスポゾンからそれぞれの *AtGGT* 遺伝子から設計された特定のプライマーを用いてゲノム PCR 解析を行った。

(3) RT-PCR 解析

RNeasy plant mini kit (QIAGEN 社)を用いて、会社のマニュアルに従って、全 RNA を抽出した。次は、First strand cDNA kit (TOYOBO 社)を用いて、抽出した RNA を鋳型として、定法に従って逆転写反応を行った。得られた cDNA は PCR のテンプレートに用いた。

(4) 酵素活性測定法

植物組織に5倍量のL抽出バッファー(20 mM Tris-HCl, pH8, 5 mM 2-ME, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5% 不溶性 PVP) を加え、乳鉢で磨砕し、10,000g、10分、4°C で遠心分離した。この上清 (S1-画分) は「可溶性 GGT」画分として用いた。S1-画分を100,000g、60分、4°C で遠心分離することにより「S2-可溶性画分(上清)」と「P2-ミクロソーム画分(沈殿)」に分離した。一方、10,000gの沈殿(P1-画分)は、磨砕バッファーで2回洗浄・遠心分離してから、1 M NaCl (H バッファー)または1% Triton X-100 (T バッファー)を含むLバッファーに懸濁し、30分間氷上で放置後、10,000g、10分、4°C で遠心分離した。H バッファー及びT バッファーによって可溶化されたタンパク質の画分をそれぞれCW-画分、PS-画分とした。

GGT 活性は、Naftalin らの方法を改良して行った (Prieto et al., 2009)。

(5) プロトプラスト調整

シロイヌナズナ葉のプロトプラスト調整は、Prieto et al. (2009) に従って行われた。

(6) チオール化合物の定量

基質としてチオール化合物(-SH)・システイン残基を含む反応物を monobromobimane で蛍光修飾し、HPLC による定量する方法を用いた (Prieto et al., 2009)。

(7) *AtGGT* プロモーター：*AtGGT*cDNA-GFP 形質転換植物の作成

AtGGT1, *AtGGT2*, *AtGGT3* の ORF を含む cDNAs を RT-PCR で単離した。プロモーターとしては ATG 翻訳開始コード上流の 1330 bp *AtGGT1* DNA 断片、692 bp *AtGGT2* DNA 断片、791 bp *AtGGT3* DNA 断片をゲノム PCR でクローニングした。また、バイナリーベクター (pBIGFP) を用いて、*AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3* プロモーターの制御下に発現される *AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3* と GFP の融合遺伝子を作成した。それぞれの融合遺伝子をアグロバクテリアの MP90 株に導入して、花序浸し法により (Clough and Bent, 1998) 形質転換シロイヌナズナを作成した。

4. 研究成果

(1) *AtGGT* 遺伝子発現解析

シロイヌナズナには、GGT をコードする遺伝子が3種類存在し、RT-PCR 遺伝子発現解析から、*AtGGT1*, *AtGGT3* は構成的に(根、茎、葉、花、莢)発現するのに対して *AtGGT2* は主に莢に発現すると考えられる(図 3)。

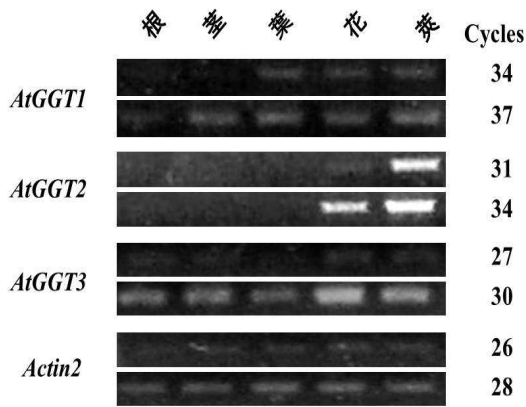


図3 *AtGGT* 遺伝子ファミリーの発現解析
それぞれの *AtGGT* 遺伝子の特定プライマーを用いた RT-PCR 反応。コントロールとして構成的に発現する *Actin2* 遺伝子を用いた。

(2) *atggt* 変異株の同定

ABRC または NASC から入手した挿入変異株の遺伝子型を調べるために、T-DNA またはトランスポゾンから設計したプライマーとそれぞれの *AtGGT* 遺伝子の特定プライマーを用いて、ゲノム PCR を行った。一方、PCR 産物をシーケンスすることにより、それぞれの T-DNA またはトランスポゾンの挿入部位を決定した (図4)。

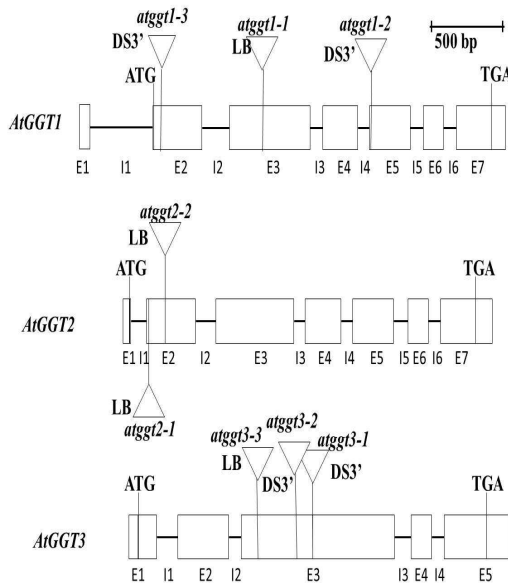
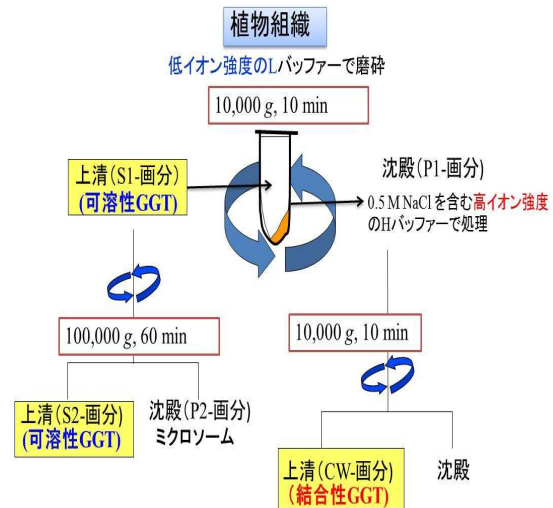


図4 *atggt* 挿入変異株

AtGGT1, *AtGGT2*, *AtGGT3* 遺伝子構造が示されている。E=エキソン、I=イントロン。T-DNA (LB) とトランスポゾン (DS3') の挿入部位は三角で示されている。

(3) GGT 活性の分画解析

遠心分画法によりシロイヌナズナの葉の GGT には可溶性と結合性の2群が存在することを明らかにした (図5)。結合性 GGT は、ミクロソーム画分 (P2-画分) に存在せず、Triton X-100 を含む T バッファーで可溶化されなかった (PS-画分) ことから、ミクロソームタンパク質でないと考えられる。その代わりに、結合性 GGT は、500mM NaCl を含む高イオン強度の H バッファーで可溶化された (CW-画分) ことより、アポプラストに局在すると考えられる。



画分	GGT 活性 (nkat/g fresh wt)
10,000 x g の上清 (S1)	0.256±0.042
100,000 x g の上清 (S2)	0.235±0.026
100,000 x g の沈殿 (P2)	Nd
H バッファーで 10,000 x g の沈殿から可溶化された CW	1.44±0.174
T バッファーで 10,000 x g の沈殿から可溶化された PS	Nd

図5 遠心分画法による GGT の画分
平均±SD (n=3) nd: 検出外

今後、S1-画分は「可溶性 GGT」として、CW-画分は「結合性 GGT」として用いる。

(4) プロトプラストの GGT 分画解析

シロイヌナズナの葉と葉から調整したプロトプラストを用いて、L バッファーで可溶性 GGT を、H バッファーで可溶性 GGT と結合性 GGT を抽出し、GGT 活性を測定した。結合性 GGT は、プロトプラストでは検出されなかったことから、細胞壁に局在すると考えられる (表 1)。

表1 葉と葉プロトプラストのGGT活性

	バッファー	GGT activity (nkat/mg chl)
ロゼット葉	L-バッファー	0.138±0.021
	H-バッファー	2.59±0.17
プロトプラスト	L-バッファー	0.118±0.021
	H-バッファー	0.122±0.028

平均±SD (n=3)

(5) *atggt* 変異株における GGT 分画解析
 野生型と *atggt* 変異株を用いて、莢の結合性 GGT と可溶性 GGT 活性を測定した。*atggt1* 変異株は、野生型程度の可溶性 GGT 活性を持っているのに対して結合性 GGT 活性がほとんど検出されなかったことから、AtGGT1 は結合性 GGT (細胞壁画分) であると考えられる (図6)。一方、*atggt2* と *atggt3* 変異株は野生型よりも可溶性 GGT 活性が低かったのに対して結合性 GGT 活性が野生型程度だったので、AtGGT2 及び AtGGT3 は可溶性 (可溶性画分) GGT であると考えられる (図6)。

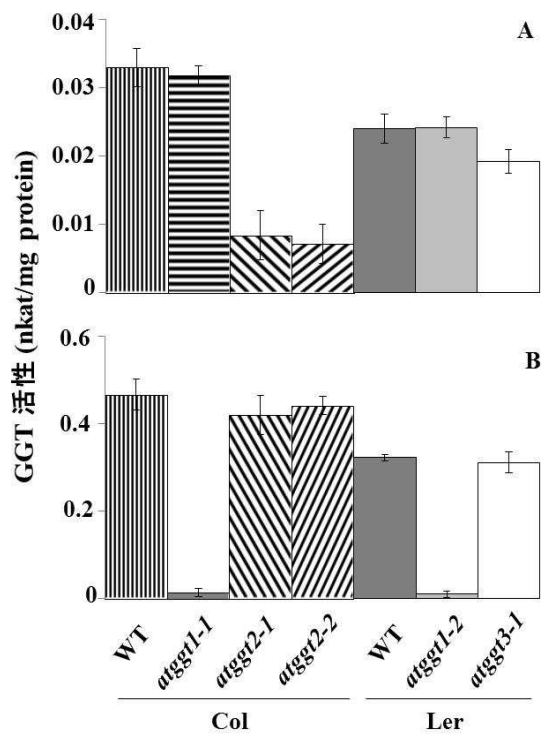


図6 野生型と *atggt* 変異株の GGT 活性。親株野生型 Col, Ler (WT)、*atggt* 変異株を用いて、莢の可溶性 GGT (A) と結合性 GGT (B) 活性を測定した。平均±SD (n=3)

(5) GSH 代謝解析

まず、野生型と *atggt1-1* 変異株を用いて、ロゼット葉における GSH 代謝 (細胞内 GSH と GSH 代謝物の蓄積定量) 解析を行った。変異しているのが GGT なので、GSH 異化は抑えられているから GSH 蓄積量が多く、Cys 蓄積量が少なくなると予測していたが、図7に示されているように、野生型と *atggt1-1* 変異株における GSH と Cys の蓄積量は等しかった。GSH の蓄積量は、GSH 合成速度と GSH 異化速度のバランスに依存しているもので、*atggt* 変異株では、GSH 異化率が野生型より低くなっている、より低い GSH 合成率ならば優位的な差は見られないと考えられる。従って、次は、GSH 合成阻害剤 (γ グルタミルシステイン合成酵素の阻害剤) である L-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO) を用いて、GSH 代謝を検討した。野生型と *atggt1-1* 変異株のロゼット葉を 0 と 1 mM BSO を含む寒天培地に移植してから、0、4、8 時間に GSH と Cys の蓄積量を定量した。図7に示されているように BSO で処理した *atggt1-1* 葉では、野生型と比べると GSH の蓄積量が多かった、Cys の蓄積量が少なかったことから、AtGGT1 は、葉における GSH 代謝に関与すると考えられる。

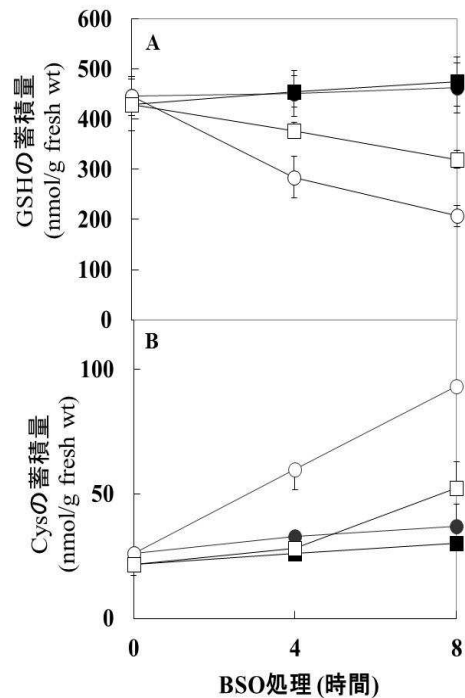


図7 野生型と *atggt1-1* 変異株における GSH 代謝解析。野生型 (丸) と *atggt1-1* 変異株 (四角) のロゼット葉を 0 (●, ■) と 1 mM BSO (○, □) を含む寒天培地に移植し、明所で 0、4、8 時間処理してから、GSH (A) と Cys (B) の蓄積量を定量した。平均±SD (n=3)

次は、野生型、*atggt1*、*atggt2*、*atggt3* 変異株、GSH 合成に関与するγグルタミルシステイン合成酵素をコードする *GSH1* 遺伝子の *pad2.1* 突然変異株、交配による作成した *atggt1-1 x atggt3-3*、*atggt2-1 x atggt3-3*、*pad2.1 x atggt1-1*、*pad2.1 x atggt2-1* 二重変異株を用いて、莢における GSH 代謝解析を行った。*atggt* の一次と二次変異株は野生型程度の GSH と Cys の蓄積量を持っていた。一方、図 8 に示されているように、*pad2-1* 変異株は、他の *gsh1* 変異株 (Cobbet et al., 1998) と同じように、野生型と比べると、GSH の蓄積量が少なく、Cys の蓄積量が多くなった(図 8)。*pad2.1 x atggt1-1*、*pad2.1 x atggt2-1* の二重変異株は、*pad2.1* と比較すると、Cys の量が少なかった、GSH の量がある程度多かった(図 8)ことから、AtGGT1 と AtGGT2 は莢における GSH 代謝に関与すると考えられる。

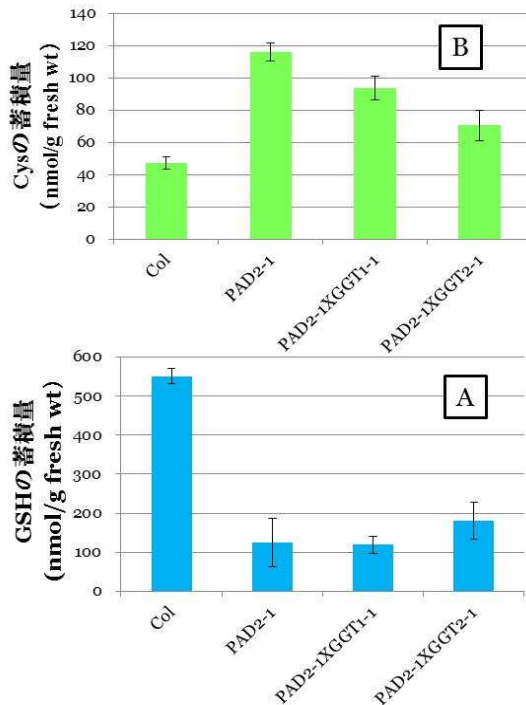


図 8 野生型、*pad2.1*、*pad2.1 x atggt* 変異株における GSH 代謝解析。親株 Col とそれぞれの変異株の莢を用いて、GSH (A) と Cys (B) の蓄積量を定量した。平均±SD (n=3)

(6) AtGGTcDNA-GFP 形質転換植物の作成
AtGGT1、*AtGGT2*、*AtGGT3* プロモーターの制御下に発現される *AtGGT1*、*AtGGT2*、*AtGGT3* と *GFP* の融合遺伝子をバイナリーベクターで作成し、アグロバクテリウム法により野生型シロイヌナズナに導入した (図 9)。今後、共焦点顕微鏡で観察することにより細胞内における AtGGT:GFP タンパク質の局在解析を行う予定である。

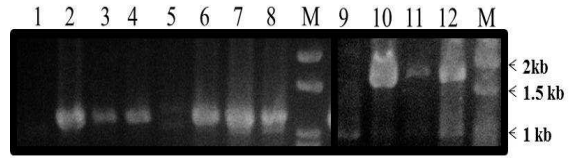


図 9 AtGGT-GFP 形質転換植物の同定
 野生型 (1,5,9)、AtGGT1-GFP (2-4)、AtGGT2-GFP (6-8)、AtGGT3-GFP (10-12) 形質転換植物からゲノム DNA を抽出し、GFP とそれぞれの *AtGGT* 遺伝子から設計した特定のプライマー (1-4: AtGGT1 と GFP, 5-8: AtGGT2 と GFP, 9-12: AtGGT3 と GFP) を用いて PCR を行った。

我々と他の研究班の研究をまとめると、AtGGT1 はアポプラストにおける GSH 代謝に関与すると考えられる (Ohkama et al., 2007a, Prieto et al., 2009, Prieto et al., 準備中)。AtGGT1 が酸化型グルタチオン (GSSG) を分解することにより植物は酸化ストレスに適応できると考えられる (Ohkama et al., 2007a)。ダイコンでは、可溶性 GGT は液胞ルーメンにおける GSH-生体異物抱合体の分解に関与すると考えられる (Nakano et al. 2006b)。シロイヌナズナでは、AtGGT3 は可溶性タンパク質であり (Ohkama et al., 2007b, Prieto et al., 2009)。AtGGT3 は、液胞に局在して、GSH-抱合体の分解に関与すると考えられる (Ohkama et al., 2007b, Grzam et al., 2007)。AtGGT2 は莢における GSH 代謝に関与する可溶性 GGT であると考えられる (Prieto et al., 2009, Prieto et al., 準備中)。しかし、AtGGT2 タンパク質の局在はまだ明らかではない。*Atggt2* 遺伝子の過剰発現株 (knockup 株) の解析より、AtGGT2 は葉では細胞外に局在する可溶性タンパク質であると考えられる (Martin et al., 2007)。一方、*atggt2* 挿入変異株の解析より、AtGGT2 は緑種では粒子画分 (Martin et al., 2007)、莢では、AtGGT1 と同じように、アポプラストに局在すると考えられる (Ohkama et al., 2007a)。

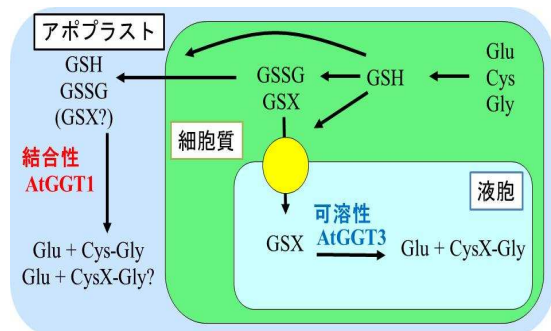


図 10 AtGGT タンパク質による GSH, GSX 分解モデル。

AtGGT2 が主に莢で発現されるので、*atggt1 x atggt3* 変異株は根や葉などで GGT 活性をほとんど持っていない(Ohkama et al., 2007a., Prieto et al., 未出版のデータ)。それでも、*atggt1 x atggt3* の葉、根における GSH、Cys の蓄積量が野生型程度だったので(Ohkama et al., 2009, Prieto et al., 未出版のデータ)、AtGGT は GSH 代謝の主役ではないと考えられる。一方、大部分の GSH は、細胞質にあるので、GSH 代謝に中心的に働く酵素は細胞質に局在すると考えられる。動物細胞では、細胞質に局在するガンマグルタミルサイクロトランスフェラーゼ (GGC) は、GGT が GSH から生成した γ グルタミルペプチドをオキシプロリン(5-OP)とペプチドに分解する。5-OP はオキシプロリナーゼ(5-OPase)によって Glu に変換される。GGC 活性は、シロイヌナズナからも検出された(Ohkama et al., 2009)。また、シロイヌナズナでは、5-OPase 変異株の解析より、5-OPase は GSH 代謝に関与すると考えられる(Ohkama et al., 2009)。一方、シロイヌナズナにおいて GSH から生成された 5-OP は γ Glu-Cys から生成された 5-OP よりも 5.5 倍多くなったので、GSH は GGC によって 5-OP に分解されると考えられる(Ohkama et al., 2009)。

参考文献

- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16:735-743.
- Grzam, A., Martin, M.N., Hell, R. and Meyer, A.J. (2007). γ -glutamyltranspeptidase GGT3 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.*, 581:3131-3138.
- Kawasaki, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K. (1982). Occurrence and some properties of a novel γ -glutamyltransferase responsible for the synthesis of γ -L-glutamyl-D-alanine in pea seedlings. *Biochim. Biophys. Acta*, 716:194-200.
- Kushnir, S., Babiychuk, E., Kampfenkel, K., Belles-Boix, E., Van Montagu, M. and Inze, D. (1995). Characterization of *Arabidopsis thaliana* cDNAs that render yeasts tolerant toward the thiol-oxidizing drug diamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92: 10580-10584.
- Lancaster, J.E. and Shaw, M.L. (1989). γ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides (flavor precursors) in *Allium*. *Phytochemistry*, 28: 455-460.
- Martin, M.N., Cohen, J.D. and Saftner, R.A. (1995). A new L-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-conjugating activity in tomato fruit. *Plant Physiol.*, 109:917-926.
- Martin, M.N. and Slovin, J.P. (2000). Purified γ -glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol.*, 122:1417-1426.
- Martin, M.N., Saladores, P.H., Lambert, E., Hudson, A.O. and Leustek, T. (2007). Localization of the γ -glutamyltranspeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugates hydrolysis. *Plant Physiol.*, 144:1715-1732
- Nakano, Y., Okawa, S., Yamauchi, T., Koizumi, Y. and Sekiya, J. (2004). Occurrence of two forms of γ -glutamyltransferases in radish plant. *Plant Biotechnol.*, 21: 243-246.
- Nakano, Y., Okawa, S., Yamauchi, T., Koizumi, Y. and Sekiya, J. (2006a). Purification and properties of soluble and bound γ -glutamyltransferases from radish cotyledons. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70(2):369-376.
- Nakano Y., Prieto R. and Sekiya J. (2006b). Subcellular localization and possible functions of γ -Glutamyltransferase in radish (*Raphanus sativus* L.) plant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (7): 1790-1793.
- Nakano Y., Prieto R., Hara M. and Sekiya J. (2006c). Cloning and molecular analysis of radish (*Raphanus sativus* L.) cDNAs encoding heterodimeric γ -Glutamyltransferases. *Plant Biotechnol.* 23: 419 - 424.
- Prieto R., Nakano Y. and Sekiya J. (2007). Identification and characterization of γ -glutamyl transferase knockout mutants in *Arabidopsis*. *J. Biol. Macromol.*, 9(2):49-62.
- Ohkama-Ohtsu, N., Radwan S., Peterson A., Zhao P., Badr A.F., Xiang C. and Oliver D.J. (2007a). Characterization of the extracellular γ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in *Arabidopsis*. *Plant J* 49: 865-877
- Ohkama-Ohtsu, N., Zhao P., Xiang C. and Oliver D.J. (2007a). Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by γ -glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. *Plant J* 49: 878-888
- Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K. and Oliver D.J. (2009). A γ -glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 148:1603-1613
- Shaw, M.L., Pither-Joyce, M.D. and McCallum, J.A., 2005. Purification and cloning of a γ -glutamyl transpeptidase from onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry*, 66:515-522.
- Storozhenko, S., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Herouart, D., Davey, M.W., Slooten, L., Montagu, M.V., Inze D. and Kushnir, S. 2002. γ -Glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiol.*, 128:1109-1119.

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1件)

Prieto R, Nakano Y. and Sekiya J. (2007).
Identification and characterization of
 γ -glutamyltransferase knockout mutants in
Arabidopsis. *J. Biol. Macromol.*, 9(2):49-62.

[学会発表] (計1件)

プリエト・ラファエル、中野善公、關谷次郎。シロイヌナズナにおけるガンマグルタミルトランスフェラーゼ挿入変異株の解析。日本生物高分子学会2008年度年大会。

[その他]

ホームページ等

http://www.kyotogakuen.ac.jp/~o_bio/NEW/Labo/05/

6. 研究組織

(1)研究代表者

プリエト ラファエル (Prieto Rafael)
京都学園大学・バイオ環境学部・准教授
研究者番号：40434659