

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20770044

研究課題名（和文） 発ガン予防グルコシノレート：その生合成と分解制御の分子機構

研究課題名（英文） Anti-carcinogenic glucosinolate: Molecular mechanism of its synthesis and degradation

研究代表者

丸山 明子 (MARUYAMA-NAKASHITA AKIKO)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70342855

研究成果の概要（和文）：

硫黄欠乏に応答する遺伝子を対象とした逆遺伝学的な解析から、メチオニン由来 GSL (mGSL) 生合成の調節因子 X を見出した。X の遺伝子欠損株および相同遺伝子 X' との二重欠損株では、mGSL 生合成酵素の転写産物量が増加し、mGSL 量も増加した。逆に X の高発現株では mGSL 量が減少した。これらの結果から、X と X' が mGSL 生合成の抑制因子であると結論した。X と X' は組織普遍的に発現し、遺伝子上流域を介して硫黄欠乏による発現誘導が起きることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We identified gene X repress methionine-derived glucosinolate (mGSL) synthesis, by a reverse genetic study on the genes up-regulated by sulfur deficiency. Gene expression of X and the homologue X' were detected and up-regulated in every tissue in Arabidopsis. By analyzing the plants disrupted and over-expressed X and X', we revealed that mGSL accumulation can be controlled by modifying X and X' transcription.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：植物、シグナル伝達、硫黄、グルコシノレート、機能未知遺伝子

1. 研究開始当初の背景

アブラナ科植物に多く含まれる含硫二次代謝物グルコシノレート(GSL)は、病害虫に対する忌避物質として知られ、また、発ガン抑制効果を有する。近年、GSL 生合成酵素群の単離、同定が相次ぎ、生合成経路の全体像が明らかになりつつあるが、植物体内における GSL 代謝の制御

については、ほとんど知見がない。SLIM1 は、環境中の硫黄欠乏に応答して、硫黄同化及び GSL 分解を正に、メチオニン由来 GSL (mGSL) 生合成を負に制御する転写因子である。

2. 研究の目的

代表者は、SLIM1 の制御下にある遺伝子群を対象とした逆遺伝学的解析から、mGSL 生合成の抑制因子 X を見出した。本研究では、植物体内の GSL 代謝制御機構の解明を目指し、(1) X による mGSL 生合成抑制機構の解析及び(2)新規 GSL 分解酵素の単離・同定を行った。

3. 研究の方法

(1) X による mGSL 生合成抑制機構の解析

- X の相同遺伝子について 2 重、3 重変異株および高発現株を作製し、硫黄十分/欠乏条件における mGSL 生合成遺伝子の発現および植物体内の mGSL 量を測定した。
- X と相同遺伝子の 2 重変異株、および高発現株を硫黄十分/欠乏条件で栽培し、GeneChip を用いた遺伝子発現解析を行った。
- X 自体が転写の抑制活性を持つ可能性を、一過的転写活性化実験を行うことにより検討した。
- 酵母2ハイブリッドスクリーニングにより X と相互作用するタンパク質の探索を行った。
- X について、プロモーター-GFP 植物、プロモーター-コーディング領域(CDS)-GFP 植物を作製し、X の組織・細胞内局在を解析した。

(2) 予測 GSL 分解酵素の機能解析

- SLIM1 の制御下で働く2つのミロシナーゼ様遺伝子について、遺伝子欠損株、過剰発現株を取得し、硫黄十分/欠乏条件における植物体内の mGSL 量を測定した。
- ミロシナーゼ様遺伝子について、プロモーター-GFP 植物、プロモーター-CDS-GFP 植物を作製し、組織・細胞内局在を解析した。

4. 研究成果

(1) X と機能を同じくする相同遺伝子の同定

X の相同遺伝子 X' との 2 重欠損変異株を作製した。硫黄十分(S1500)/欠乏(S15)条件における植物体内の mGSL 生合成酵素遺伝子の転写産物量を測定したところ、野生型株(WT)では S15 条件でこれらの転写産物量が減少するのに対し、X 欠損変異株および 2 重欠損変異株ではむしろ S15 条件で上昇していた (図1)。これは、X および X' による GLS 生合成の抑制が解除されたためであると考えられる。また、X' 単独の欠損株ではこのような現象が認められなかったことから、X の方が主要な役割を果たしていると考えられる。

同様に栽培した植物について、植物体内の GSL 量を測定したところ、S1500 条件で育てた X 欠損変異株および 2 重欠損変異株で mGSL 量が顕著に増加した(図2)。この時の増加の程度は 2 重欠損変異株で特に高かった。これらの結果から、X 遺伝子ファミリーはともに GSL 生合成を抑制することが分かった。その後、もう一つの

相同遺伝子 X'' を見出し、3 重変異株を取得し、解析を進めている。

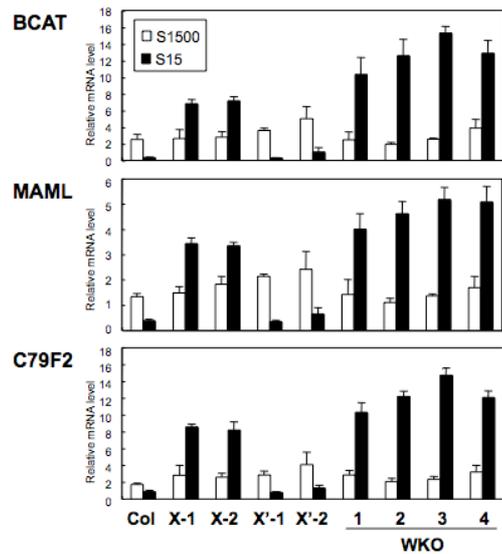


図1. X および X' の遺伝子欠損変異株における mGSL 生合成酵素の遺伝子発現

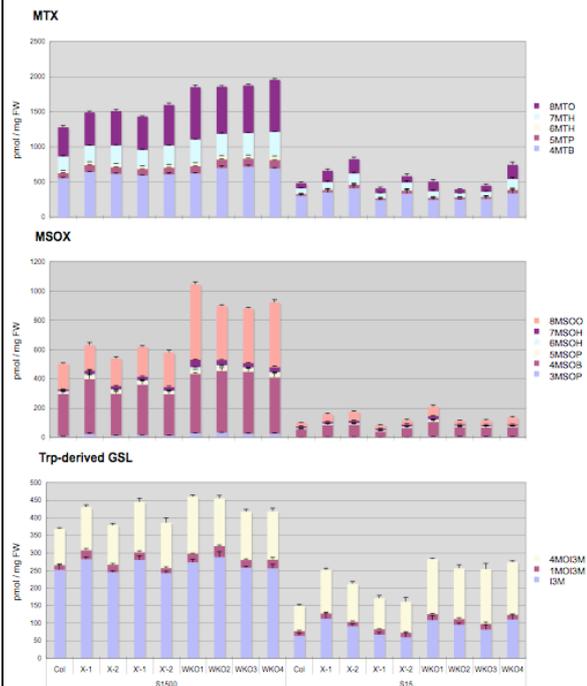


図2. X および X' 遺伝子欠損変異株の地上部における GSL の蓄積 生合成酵素の遺伝子発現

(2) X の高発現による mGSL 蓄積の抑制

X および X' について高発現株を作製し、(1)と同様の解析を行った。高発現株では、欠損変異株とは逆に mGSL 生合成酵素遺伝子の転写産物量が減少した (図3)。mGSL 量についても測定したところ、両高発現株ともに mGSL 量が減少した (図4)。減少の程度は、X 高発現株の方でより強かった。(1)の結果と合わせ、X を用いる事により植物体内の mGSL 量を調節できる事が明

らかになった。X'についても高発現株を作製し、解析を進めている。

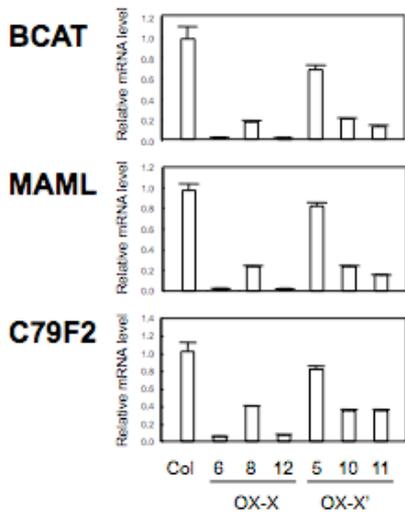


図3. XおよびX'の過剰発現株におけるmGSL生合成酵素の遺伝子発現

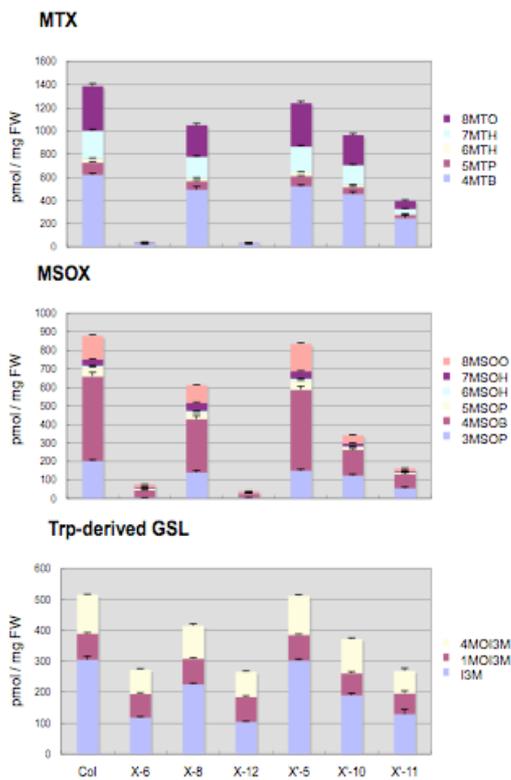


図4. XおよびX'過剰発現株の地上部におけるGSLの蓄積

(3) X 標的遺伝子の探索

(1)の2重変異株、および高発現株を硫黄十分/欠乏条件で栽培した。これらの植物由来のmRNAを用いてGeneChipを用いた遺伝子発現

解析を行い、Xの標的遺伝子群を探索した。その結果、mGSL生合成酵素を含む多数の遺伝子の発現がXやX'により変化していることが明らかになった。これらの遺伝子の中には、mGSL生合成を促進する転写因子PMGも含まれていた。

(4) Xが転写抑制活性を持つ可能性の検討
Xが転写抑制活性を持つ可能性を、一過的転写活性化実験により検討した。しかし、転写抑制活性を見出すことはできなかった。

(5) Xの組織・細胞内局在部位の解析
プロモーター-GFP植物の観察結果より、植物体全体でXの発現が認められることが分かった。プロモーター-CDS-GFP植物ではGFP蛍光が確認できず、細胞内局在の解明には至らなかった。

(6) X相互作用タンパク質の探索
(4)でXの転写抑制活性が見出されなかったため、Xが他のタンパク質と相互作用することによりGSL生合成酵素の発現を抑制する可能性を考え、相互作用タンパク質の探索を行った。3種の相互作用タンパク質候補を得ることができた。今後、相互作用を確認し、これらのタンパク質およびXがGSL生合成の調節に果たす役割を明らかにしたい。

(7) 予測GSL分解酵素欠損株の解析
SLIM1の制御下にある機能未同定のミロシナーゼ様遺伝子2種について、cDNAを単離した。また、遺伝子欠損変異株、高発現株を取得した。硫黄十分/欠乏条件下における成育、GSL量、他の硫黄代謝物(硫酸イオン、チオール)量を解析したが、野生型株との違いは確認できなかった。

(8) 予測GSL分解酵素の組織・細胞内局在部位の解析
プロモーター-GFP植物の観察結果より、植物体全体で予測GSLの発現が認められることが分かった。プロモーター-CDS-GFP植物ではGFP蛍光が確認できず、細胞内局在の解明には至らなかった。

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0件)

[学会発表] (計0件)

① 丸山明子、植物の硫酸イオン吸収・硫黄同

化系制御機構の解明、日本土壌肥料学会
2011年度大会、2011年08月09日、つく
ば市(茨城県)

- ② Akiko Maruyama-Nakashita, Transcriptional regulation of genes involved in sulfur assimilation in plants: Understanding from the analysis of high affinity transporters. China-Japan Plant Nutrition Workshop, 2008年10月、北京(中国)
- ③ 丸山明子、硫酸イオン吸収の制御: 転写制御機構の解析から. 日本土壌肥料学会 2008年度大会、2008年09月、名古屋(愛知県)
- ④ T. Fujiwara, A. Maruyama-Nakashita, Y. Ide, M. Yokota Hirai. Toward comprehensive understanding of regulatory network of sulfur metabolism. The 7th International Workshop on Plant Sulfur Metabolism. 2008年05月、ワルシャワ(ポーランド)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: メチオニン由来グルコシノレート生合成抑制遺伝子を利用した植物の作出方法
発明者: 丸山明子、高橋秀樹、斉藤和季
権利者: 独立行政法人理化学研究所
種類: 特許
番号: 特願 2008-140020
出願年月日: 2008年5月28日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: メチオニン由来グルコシノレート生合成抑制遺伝子を利用した植物の作出方法
発明者: 丸山明子、高橋秀樹、斉藤和季
権利者: 独立行政法人理化学研究所
種類: 特許
番号: 特開 2009-284799
取得年月日: 2009年12月10日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://bbs1.agr.kyushu-u.ac.jp/prweb2/b06/amaru/amn/youkoso.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 明子 (MARUYAMA-NAKASHITA AKIKO)